

Received: 2003.07.23

Accepted: 2003.12.23

Published: 2004.03.08

Znaczenie połączeń typu *gap* w fizjologii i patofizjologii przewodu pokarmowego

Gap junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract

Luiza Kańczuga-Koda

Zakład Patomorfologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie

Komunikacja międzykomórkowa z udziałem połączeń typu *gap* (gap junctional intercellular communication – GJIC) polega na bezpośrednim przekazywaniu sygnałów między komórkami i przebiega za pośrednictwem połączeń typu *gap*, które zbudowane są z podjednostek integralnego białka błonowego zwanego koneksyną (Cx). GJIC odgrywa istotną rolę w regulacji procesów różnicowania i wzrostu komórek oraz utrzymaniu homeostazy tkankowej jako wynik wymiany jonów, cząsteczek sygnalizacyjnych, nukleotydów i małych cząsteczek (<1 kDa) między sąsiadującymi komórkami. Połączenia typu *gap* mogą uczestniczyć także w generowaniu rytmicznych skurczów perystaltycznych jako skutek ich udziału w szerzeniu się i przewodzeniu potencjałów czynnościowych pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Wykazano, że połączenia typu *gap* pełnią rolę w wielu procesach fizjologicznych, jak np.: utrzymanie homeostazy, regulacja rozwoju tkanek, komunikacja metaboliczna i elektryczna, a także regulacja wzrostu komórek, różnicowania tkanek oraz procesu apoptozy. Zaburzenia ekspresji koneksyn obserwowano w różnych stanach patologicznych w przewodzie pokarmowym, np.: choroba Hirschsprunga, rak przełyku, żołądka czy jelita grubego.

Lokalizacja koneksyn w różnych strukturach jelita i ich rola w komunikacji międzykomórkowej oceniane były z wykorzystaniem różnych technik badawczych, tj.: badań ultrastrukturalnych z użyciem mikroskopu elektronowego, techniki bezpośredniego transferu barwnika Lucifer Yellow oraz technik immunochemicznych.

Praca jest przeglądem aktualnych poglądów naukowych dotyczących roli GJIC w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego w fizjologii oraz w stanach patologicznych.

Słowa kluczowe:

komunikacja międzykomórkowa • połączenia typu *gap* • koneksywy • przewód pokarmowy • ludzkie jelito grube

Summary

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is a mechanism of direct cell-to-cell signaling and is mediated by gap junctions (GJs), consisting of transmembrane proteins called connexins (Cxs). GJIC plays a critical role in tissue development and differentiation and is important in the maintenance of tissue homeostasis through the exchange of ions, signalling molecules, nucleotides, and other small molecules (less than 1kDa) between adjacent cells. Because gap junctions are sites of the propagation or conduction of action potentials between adjacent cells, it is possible that they participate in the generation of rhythmic peristaltic movements by contributing to synchronous contraction in the muscle layer. Many physiological roles have been proposed for gap junctions, such as the maintenance of tissue homeostasis, regulation of tissue development, electrical and metabolic coupling, as well as the regulation of cellular growth, differentiation and apoptosis. Altered expressions of connexins have been observed in various pathological processes of the digestive tract, such as Hirschsprung's disease, esophageal cancer, gastric cancer, and colorectal cancer.

Using a variety of techniques such as transmission electron microscopy, Lucifer Yellow transfer and immunohistochemistry, gap junctions in the digestive tracts of mammalian species have been identified.

This work is a review of recent studies on the role of GJIC in the physiology and pathology of the digestive tract.

Key words: intercellular communication • gap junction • connexins • digestive tract • human large intestine

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5275.pdf

Word count: 3932

Tables: –

Figures: –

References: 94

Source of support: Praca wykonana w ramach grantu nr 3 P05B 07922 finansowanego przez KBN.

Adres autorki: Zakład Patomorfologii Lekarskiej AM, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, e-mail: kodamar@zeus.amb.edu.pl

WSTĘP

Komunikacja międzykomórkowa odbywa się za pośrednictwem wielu dróg. Najistotniejszym jej aspektem jest umożliwienie w organizmach wielokomórkowych precyzyjnej kontroli homeostazy, różnicowania oraz procesów proliferacji i śmierci komórek. Komórki mogą komunikować się między sobą za pomocą sekrecji hormonów, cytokin i czynników wzrostu do krwiobiegu i oddziaływaniem ich na receptory w oddalonych miejscach (mechanizmy endokrynne), a także za pomocą mechanizmów miejscowych (auto- i parakrynych) oraz mechanizmów zależnych od bezpośredniego kontaktu komórek. Do tych ostatnich należą interakcje przebiegające za pomocą kompleksów połączeniowych, takich jak np. połączenia ścisłe, desmosomy, hemidesmosomy, połączenia adhezyjne oraz połączenia typu *gap*. Wszystkie te sposoby komunikacji umożliwiają organizmowi wielokomórkowemu regulację liczby i różnicowania komórek oraz przystosowanie się do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego.

Jednym z najbardziej wszechobecnych i pierwotnych sposobów komunikacji międzykomórkowej jest komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem połączeń typu *gap* (gap junctional intercellular communication – GJIC) [44, 5]. Połączenia te odnaleziono zarówno w wielu prymitywnych organizmach wielokomórkowych, jak i w tak złożonym jakim jest człowiek. U dorosłego człowieka wszystkie komórki z wyjątkiem włókien mięśni szkieletowych oraz komórek krążących w krwiobiegu wykazują obecność połączeń typu *gap*. Odmienne od innych połączeń nie pełnią jakiegokolwiek roli strukturalnej, lecz uczestniczą wyłącznie w komunikacji międzykomórkowej.

Kanały utworzone przez podjednostki połączeń typu *gap* tworzą drogi komunikacyjne między przedziałami cytoplazmatycznymi sąsiadujących komórek i pozwalają na bezpośrednią międzykomórkową dyfuzję małych cząsteczek (<1 kDa) i jonów [39, 5]. Usprawnia to utrzymanie homeostazy poprzez wymianę metabolitów, nukleotydów i cząsteczek sygnalizacyjnych (cAMP, cGMP, IP₃, DAG), a to wzmacnia i koordynuje odpowiedź tkankową.

Przepuszczalność połączeń typu *gap* jest zależna przede wszystkim od rodzaju koneksyn tworzących kanał [5]. Przykładowo, połączenia zbudowane z Cx43 są bardziej przepuszczalne dla cząstek o ładunku dodatnim niż kanały utworzone z Cx32, co najprawdopodobniej wynika z sekwencji aminokwasów fragmentu łańcucha tworzącego ścianę kanału. Połączenia typu *gap* nie są strukturami statycznymi, gdyż otwieranie i zamykanie kanałów przebiega w sposób kontrolowany i zależy od czynników, takich jak: fosforylacja koneksyn, stężenie jonów wapnia i pH wewnątrz komórki oraz potencjał antyoksydacyjny [41,3,14].

BUDOWA POŁĄCZEŃ TYPU *GAP*

Połączenia typu *gap*, należące do grupy połączeń komunikacyjnych, obserwowano po raz pierwszy w latach 60 ub.w. i opisano je jako miejsca, gdzie błony dwóch sąsiadujących komórek przybliżają się tworząc szczelinę szerokości prawie 2 nm. Połączenie typu *gap* jest zbudowane z białek transbłonowych tworzących struktury zwane koneksonami. Pojedynczy konekson składa się z sześciu ułożonych koncentrycznie podjednostek integralnego białka błonowego zwanego koneksyną (Cx), które zawiera cztery odcinki o strukturze α -helisy rozciągające się przez błonę komórkową. Koneksyny mają cztery domeny transbłonowe, dwie pętle zewnątrzkomórkowe, jedną wewnątrzkomórkową oraz znajdujące się w cytoplazmie końce C i N. Trzecie przejście łańcucha koneksyny przez błonę komórkową tworzy ścianę kanału koneksonu.

Dotąd u ludzi zidentyfikowano 20 różnych koneksyn [90]. Najlepiej poznane są koneksyny 26, 32 i 43. Białka te mają swoiste sekwencje, masę cząsteczkową i cechy biochemiczne, ale wszystkie odznaczają się podobnym przestrzennym rozmieszczeniem w błonie komórkowej. Syntetyzowane są w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej. Następnie dochodzi do oligomeryzacji koneksonów i tworzenia mostków dwusiarczkowych. Oligomery ulegają egzocytozie przez aparat Golgiego i w obrębie błony komórkowej agregują tworząc połączenie.

Do powstania i utrzymania się połączeń typu *gap* niezbędna jest obecność cząsteczek adhezyjnych CAM (cell adhesion molecules) ponieważ interakcja między koneksonami nie jest wystarczająco silna, aby utrzymać błony cytoplazmatyczne sąsiadujących komórek w ścisłym kontakcie i aby utworzenie kanału było możliwe [34,19,30]. Najistotniejszą rolę w tym procesie odgrywają kadheryny, a wśród nich E-kadheryna charakterystyczna dla nabłonka, które w kompleksach z kateninami tworzą połączenie adhezyjne. Dzięki procesowi transfekcji genów kodujących kadheryny do komórek nowotworowych, przywracano funkcjonalność połączeń typu *gap* w tych komórkach [34].

W warunkach hodowli tkankowych połączenia typu *gap* tworzą się w ciągu kilkunastu minut i równie szybko ulegają dezintegracji. Mechanizmem regulującym liczbę połączeń jest regulacja ekspresji genów koneksynowych poprzez działanie czynników fizjologicznych i farmakologicznych. Udowodniono też zmniejszenie liczby połączeń typu *gap* i jednoczesny spadek ekspresji genów koneksynowych podczas ekspozycji komórek na czynniki wzrostowe [36,75].

POŁĄCZENIA TYPU *GAP* W PRZEWODZIE POKARMOWYM

Połączenia typu *gap* są umiejscowione pomiędzy komórkami różnych warstw ściany przewodu pokarmowego ssaków [20,52,55,74,87]. W warstwie mięśniowej łączą komórki mięśniówki gładkiej prawdopodobnie biorąc udział w tworzeniu połączeń elektrycznych, dzięki którym powstają synchroniczne skurcze mięśniówki dające rytmiczne ruchy perystaltyczne [20]. Szczególną uwagę zwrócono na połączenia typu *gap* łączące ze sobą oraz z komórkami warstwy okrężnej i podłużnej błony mięśniowej komórki, nazwane od nazwiska ich odkrywcy, komórkami śródmiąższowymi Cajala (interstitial cells of Cajal – ICC). Komórki te wykryto w błonie mięśniowej żołądka oraz jelita cienkiego i grubego u zwierząt [74], w szczególności w warstwie okrężnej błony mięśniowej. Obecność ICC stwierdzono także w spłotach śródścienych przełyku, żołądka i jelit: w splocie błony mięśniowej leżącym między warstwą okrężną a podłużną (spłot Auerbacha) żołądka, jelita cienkiego i grubego u świnki morskiej [74], w splocie mięśniowym głębokim (między częścią zewnętrzną a wewnętrzną warstwy okrężnej) jelita cienkiego [74,80] i w splocie podśluzówkowym jelita grubego u zwierząt [74,87]. W ludzkim jelicie ICC zlokalizowano w splocie nerwowym błony mięśniowej, w splocie mięśniowym głębokim oraz między komórkami warstwy okrężnej jelita [67,66]. Generując wolne fale elektryczne, ICC pełnią rolę komórek rozrusznikowych w mięśniówce przewodu pokarmowego [79]. Sieć tych komórek jest połączona ze sobą oraz z komórkami mięśniówki gładkiej za pomocą połączeń typu *gap* [10].

Duża liczba połączeń typu *gap* może być czynnikiem warunkującym funkcję regulacyjną komórek Cajala w motoryce przewodu pokarmowego, która polega na:

- generowaniu wolnych fal potencjału (komórki rozrusznikowe mięśniówki gładkiej),
- pośredniczeniu w neurotransmisji,
- ułatwianiu szerzenia się pobudzenia na sąsiadujące komórki.

W badaniach immunohistochemicznych stwierdzono dodatnie odczyny na Cx40 w warstwie okrężnej błony mięśniowej dolnego zwieracza przełyku, części odzwiernikowej żołądka oraz w pobliżu spłotu mięśniowego głębokiego jelita krętego [87]. Cx40 obserwowano również w splocie śródmięśniowym jelita krętego oraz w splocie podśluzówkowym jelita grubego [87]. Szczególną uwagę zwrócono jednak na ekspresję Cx43, która jest dość powszechna w mięśniówce gładkiej. Obecność tej koneksyny wykazano między innymi pomiędzy komórkami mięśniowymi pęcherza moczowego [26,58], macicy [53], naczyń krwionośnych [27,88] oraz przewodu pokarmowego [52,56,87]. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na Cx43 odnotowano w połączeniach typu *gap* w mięśniówce gładkiej warstwy okrężnej żołądka oraz zwieracza dolnego przełyku, a także w zewnętrznej części warstwy okrężnej błony mięśniowej jelita krętego sąsiadującej ze spłotem śródmięśniowym [87]. Mikkelsen i wsp. [52] wykazali obecność Cx43 w części zewnętrznej warstwy okrężnej błony mięśniowej mysiego, psiego i ludzkiego jelita cienkiego. W splocie nerwowym błony mięśniowej oraz w splocie mięśniowym głębokim jelita krętego Cx43 występowała pomiędzy komórkami wewnątrz spłotu, najprawdopodobniej ICC [87]. W psim i ludzkim jelicie grubym Cx43 wykryto w splocie podśluzówkowym [52]. Ponadto stwierdzono obecność Cx45 pomiędzy ICC spłotu mięśniowego głębokiego szczurzego [73] i psiego [55] jelita cienkiego.

Dubina i wsp. [12] wykazali ekspresję Cx43 i Cx32 w enterocytach zdrowego jelita grubego u człowieka. W badaniach na tkankach ludzkich dotychczas koncentrowano się jednak głównie na ocenie obecności koneksyn w błonie mięśniowej przewodu pokarmowego. W błonie mięśniowej połączenia typu *gap* pełnią rolę w przewodzeniu impulsów i neurotransmisji między komórkami, a co za tym idzie są odpowiedzialne za kontrolę motoryki przewodu pokarmowego [20,17]. Wiadomo, iż połączenia typu *gap* – oprócz kontrolowania morfogenezy, rozwoju i różnicowania tkanek – są też miejscami szerzenia się i przewodzenia potencjałów czynnościowych we wszystkich tkankach, także w mięśniówce gładkiej [53]. Poprzez przewodzenie jonów nieorganicznych i małych cząsteczek między komórkami ułatwiają łączność elektryczną i metaboliczną komórek.

Szerzenie się sygnałów elektrycznych jest głównym czynnikiem regulującym kurczliwość mięśniówki gładkiej. Zmiany w składzie połączeń typu *gap* lub poziomie ekspresji koneksyn mogą zaburzać ten proces. Każdy mechanizm hamujący powstawanie potencjałów czynnościowych, włączając w to zamknięcie lub zmniejszenie liczby połączeń typu *gap*, wpływa na kurczliwość mięśniówki gładkiej. Wydaje się, iż mogą one odgrywać rolę w patogenezie choroby Hirschsprunga. Wykazano, że komunikacja międzykomórkowa za pomocą połączeń typu *gap* w tej chorobie jest zaburzona na skutek braku ekspresji Cx43 w warstwie okrężnej oraz pomiędzy nią a warstwą podłużną błony mięśniowej ściany jelita w odcinkach bezwojowych [57]. Stwierdzono ponadto spadek ekspresji Cx43 w strefie przejściowej między odcinkami chorymi a zdrowymi [57]. Utrata połączeń typu *gap* w chorobie Hirschsprunga może uniemożliwiać wymianę hormonów, neuroprzekazników i innych agonistów i antagoni-

stów pomiędzy komórkami Cajala a komórkami mięśniówki gładkiej, czego następstwem może być niezdolność do szerzenia się potencjałów czynnościowych, a co za tym idzie zaburzenie czynności motorycznej jelita.

MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA NIEPRAWIDŁOWE FUNKCJONOWANIE POŁĄCZEŃ TYPU *GAP*

Defekty transportu międzykomórkowego za pośrednictwem połączeń typu *gap* są kojarzone z takimi zespołami chorobowymi jak: neuropatia obwodowa (neuropatia Charcota-Marie Tooth), głuchota dziedziczna, arytmia serca, miażdżycza, łuszczyca, zaćma wrodzona, nieplodność, nieprawidłowa hemopoeza, powstawanie wad rozwojowych płodów i nowotwory.

Zahamowanie funkcjonowania połączeń typu *gap* może następować w wyniku zaburzeń na poziomie genu (mutacje, metylacja regionów promotorowych), a to powoduje spadek ekspresji lub powstanie koneksyny o nieprawidłowej budowie, a tym samym zaburzone jej funkcjonowanie. Mutacje były jak do tej pory wykrywane w pewnych chorobach dziedzicznych u ludzi, o których wspomniano wyżej, ale nie w chorobach nowotworowych, np. mutacja genu *Cx32* występuje w neuropatii obwodowej Charcota-Marie Tooth [13,42], mutacja genu *Cx26* i *Cx30* w głuchocie dziedzicznej [4, 60; 86], genu *Cx31* i *Cx30.3* w zespole Mendesa da Costy (*erythrokeratoderma variabilis*) [23,65], a *Cx46* i *Cx50* w zaćmie wrodzonej [78,45]. Wykryto mutacje genów niektórych koneksyn, m.in. *Cx32* powiązane z indukowanym chemicznie rakiem wątrobowo-komórkowym u gryzoni [59]. Pierwszym doniesieniem na temat mutacji genów koneksynowych w chorobie nowotworowej u ludzi, a konkretnie genu kodującego białko *Cx43*, jest publikacja badaczy rosyjskich [12]. Stwierdzili oni obecność mutacji w genie kodującym *Cx43* w zaawansowanych stadiach gruczolakoraka jelita grubego, a jej następstwem jest zamiana aminokwasów (Ala i Ile na Val i Asn) w końcu karboksylowym *Cx43*. Z domeną tą oddziałuje wiele białek, a także cząstki adhezyjne CAM - ZO-1 i β -katenina. Ponadto, domena ta ulega fosforylacji przez różne kinazy białkowe, co jest istotne dla obrotu, przepuszczalności i tworzenia skupisk połączeń typu *gap*.

Metylacja regionów promotorowych genów kodujących koneksyny wydaje się ważnym mechanizmem modulującym ekspresję koneksyn w wielu nowotworach [77]. Wykazano, że przyczyną utraty ekspresji *Cx26* w linii komórkowej raka sutka (MDA-MB-453) była hipermetylacja regionów promotorowych genu kodującego *Cx26* [81]. Regulację ekspresji genów *Cx32* i *Cx43* z udziałem tego mechanizmu badano także w komórkach wątroby szczura wykorzystując do tego celu linie komórkowe i tkanki pobrane od zwierząt. Wykryto, że transkrypcja obu koneksyn w komórkach wątroby może być blokowana przez metylację regionów promotorowych genów *Cx32* i *Cx43* [61]. Hirai i wsp. [29] wykazali, że hamowanie ekspresji genu kodującego *Cx32* w linii komórkowej raka nerki było również spowodowane hipermetylacją regionów promotorowych genów.

Inne pozagenetyczne nieprawidłowości dotyczące koneksyn to:

- umiejscowienie cytoplazmatyczne lub jądrowe koneksyn i tym samym utrata funkcjonalności połączeń typu *gap*,
- fosforylacja aminokwasów w łańcuchu białkowym innych niż w stanie prawidłowym, co prowadzi do zaburzeń przepuszczalności przez kanały i grupowania koneksyn w zespoły,
- obniżenie ekspresji cząstek adhezyjnych CAM przy prawidłowej ekspresji koneksyn czego skutkiem jest niemożność utworzenia funkcjonalnych połączeń.

ROLA POŁĄCZEŃ TYPU *GAP* W KARCINOGENEZIE

Rozwój i progresja nowotworu jest procesem wielostopniowym i wieloczynnikowym; zależy od wielu zmian genetycznych i epigenetycznych w komórce [16]. Jedną z najważniejszych cech komórek nowotworowych jest brak kontroli wzrostu bądź znacznie zaburzony proces ich różnicowania. Badania *in vitro* przeprowadzone po raz pierwszy w 1966 r. wykazały, że komórki nowotworowe mają bardzo małą zdolność komunikowania się między sobą (zaburzone połączenia homologiczne typu *gap*). W kolejnych badaniach udowodniono brak połączeń *gap* między komórkami nowotworowymi a otaczającymi je komórkami zdrowymi (zaburzone połączenia heterologiczne typu *gap*) [51,21,9]. Izolacja ta pozwala na ucieczkę komórek nowotworowych od sygnałów, które w prawidłowych tkankach utrzymują proliferację pod kontrolą organizmu. Może to być wynikiem nie tylko obniżenia ekspresji koneksyn, ale także zmian na powierzchni błony komórkowej (glikozylacja białek błony komórkowej, brak ekspresji CAM), a to hamuje kontakt międzykomórkowy, konieczny do utworzenia połączeń typu *gap*. W następstwie tego procesu tworzy się ognisko komórek o selektywnej zdolności do szybkiego i niepojętym wzrostu oraz zostaje przerwana integracja tkanki.

Dotychczasowe badania wykazały, że większość guzów litych ma zaburzone połączenia typu *gap* i/lub zmniejszoną ich liczbę [89]. Upośledzona komunikacja między komórkami nowotworowymi w wyniku utraty połączeń typu *gap* może być skutkiem obniżenia ekspresji genów koneksynowych lub zmienionego wewnątrzkomórkowego umiejscowienia koneksyn. Jak wspomniano wyżej czynną inaktywacji połączeń typu *gap* mogą być mutacje lub hipermetylacja regionów promotorowych genów koneksynowych. Wykazano ponadto, że uszkodzenie funkcjonalne koneksyn może powodować zmianę ich lokalizacji. Mechanizmy będące przyczyną tych zaburzeń nie są znane, najprawdopodobniej wiążą się z nieprawidłową fosforylacją koneksyn i/lub zaburzeniami ekspresji CAM.

W wielu badaniach ekspresja koneksyn w komórkach nowotworowych była porównywana odpowiednio z ich ekspresją w tkankach zdrowych [25,85]. Wykazano, iż większość komórek nowotworowych miało znacząco mniejszą ekspresję koneksyn i mniejszą liczbę połączeń typu *gap* w porównaniu z komórkami zdrowymi [22]. Wilgenbus i wsp. [89] badając tkanki nowotworowe oraz tkanki zdrowe u ludzi pod kątem ekspresji *Cx26*, *Cx32* i *Cx43* stwierdzili, że w guzach złośliwych ekspresja tych koneksyn jest obniżona w stosunku do tkanek niezmiennych. Większość raków płuc w badaniach na tkankach mysich i ludzkich wykazywała obniżoną ekspresję *Cx43* w po-

równaniu ze zdrowym nabłonkiem płuc [33,9]. Ponadto wykazano, że ekspresja koneksyn w zmianach przednowotworowych w porównaniu z tkankami zdrowymi może być obniżona, co udowodniono w przypadku dysplazji szyjki macicy [37] i rozrostu błony śluzowej macicy [70].

Mechanizmy wadliwej komunikacji z udziałem połączeń typu *gap* są różnorodne. Najczęściej obserwuje się zmniejszenie ekspresji koneksyn, co może być spowodowane zaburzoną ekspresją i działaniem czynników transkrypcyjnych [43] lub metylacją regionów promotorowych genów koneksynowych [81]. Jednak w niektórych nowotworach koneksyny wykazują ekspresję podobną lub silniejszą niż w prawidłowych tkankach, jak na przykład w raku sutka, gdzie zaobserwowano wzrost ekspresji Cx26 i/lub Cx43 w porównaniu z tkankami pobranymi z obrzeża guza, niewykazującymi zmian patologicznych [32]. Autorzy wyrazili przypuszczenie, że komórki nabłonka przewodów gruczołu piersiowego mogą charakteryzować się obecnością innych koneksyn, a nadekspresja Cx26 i Cx43 może być rezultatem przestawienia komórek nowotworowych na wytwarzanie innych koneksyn niż w zdrowej tkance, w następstwie czego może dojść do zahamowania komunikacji między komórkami zdrowymi a chorymi. W wielu doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* wykazano różne nieprawidłowości w fosforylacji koneksyn, co prowadzi do zaburzeń w przepuszczalności kanałów, tworzeniu funkcjonalnych kanałów w błonie komórkowej i/lub grupowaniu się połączeń typu *gap* w zespoły [11].

Wiele czynników i produktów transkrypcji genów, które pobudzają wzrost komórek lub uczestniczą w szlakach sygnalizacyjnych pobudzających wzrost, hamuje komunikację międzykomórkową z udziałem połączeń typu *gap*. Należą do nich: czynniki wzrostu, karcynogeny i onkogeny. Czynniki wzrostu, takie jak: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) czy czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), hamują komunikację międzykomórkową z udziałem połączeń typu *gap* poprzez fosforylację lub zmniejszenie ekspresji koneksyn. Karcynogeny hamują GJIC poprzez liczne mechanizmy np. po działaniu TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) Cx43 zastępowana jest postacią hiperfosforylowaną tego białka zwaną Cx43-P3 [47]. Z kolei fenobarbital blokuje GJIC za pośrednictwem Cx32 w kulturach hepatocytów i w wątrobie szczura poprzez redukcję ekspresji lub cytoplazmatyczne umiejscowienie tej koneksyny [63,64] a DDT (2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1, 1-trichloroethane) hamuje GJIC z udziałem Cx43 i Cx32 na skutek degradacji koneksyn w lizosomach [24]. Produkty białkowe onkogenów współuczestniczą w przekazywaniu sygnałów, kontroli wzrostu i w wielu innych procesach homeostazy tkankowej i komórkowej. Wiele z nich blokuje GJIC za pośrednictwem różnych mechanizmów działania np.: Haras i Neu nie zmieniają ekspresji Cx43 w komórkach nabłonkowych wątroby szczura, ale powodują zmniejszenie zawartości prawidłowej postaci ufosforylowanej Cx43-Cx43-P2 oraz nieprawidłową lokalizację wewnątrz jądra [11]. Onkogeny mogą działać synergistycznie w hamowaniu GJIC, np. komórki nabłonka wątroby szczura wykazujące ekspresję onkogeny *Raf* lub *Myc* nie mają zredukowanej GJIC, natomiast komunikacja jest mocno hamowana w komórkach z ekspresją obu onkogenów [35].

W przeciwieństwie do następstw powyższych czynników wiele inhibitorów wzrostu oraz czynników przeciwnowotworowych zwiększa GJIC oraz ekspresję koneksyn w komórkach. Istnieje duża grupa czynników fizjologicznych i farmakologicznych (glikokortykoidy, cAMP, glukagon, retinoidy, karotenoidy, wyciąg z zielonej herbaty, hormony płciowe), które hamują transformację nowotworową i/lub wzrost komórek guza oraz zwiększają ekspresję koneksyn i tworzenie połączeń typu *gap* w tkankach, na które działały [1,2,6,8,40,62,69,71]. Czynniki te mogą także blokować hamujący wpływ karcynogenów na GJIC [76].

Doświadczenia na liniach komórkowych wykazały, że wzrost komórek nowotworowych może być hamowany jeśli obok nich występują komórki zdrowe, a w niektórych przypadkach proces ten jest przypisywany GJIC. Dowodem na to są doświadczenia przeprowadzone na liniach komórek nabłonka wątroby szczura przekształconych w komórki nowotworowe pod wpływem onkogenów *Ras* i *Neu* [15]. Rozwój komórek nowotworowych ulegał zahamowaniu kontaktowemu, gdy występowały obok komórki zdrowe i był zależny od GJIC, gdyż w obecności komórek zmutowanych wykazujących brak połączeń typu *gap* hamowanie kontaktowe nie występowało.

Aby lepiej wyjaśnić rolę GJIC w kontroli wzrostu i karcynogenezie przeprowadzono wiele doświadczeń z wykorzystaniem bezpośredniego modulowania GJIC. Należą do nich:

- badania z użyciem nukleotydów nonsensownych – wykazano hamowanie ekspresji koneksyn w komórkach nienowotworowych i zmiany we wroście tych komórek [93],
- metoda „gene knockout“ – w badaniach w komórkach mysiej wątroby pozbawionej genu Cx32, wykazano większą podatność na powstawanie spontanicznych czy indukowanych karcynogami guzów wątroby [83, 72],
- metoda transfekcji genów koneksynowych – ekspresja koneksyn była zwiększana lub przywracana poprzez transfekcję odpowiednich genów w wielu nowotworowych liniach komórkowych wykazujących niedobór lub brak koneksyn i wiążące się z tym zaburzenie transportu międzykomórkowego [18, 28, 31, 50, 54, 92, 94]. Wzrost tych komórek w hodowli *in vitro* i/lub powstawanie guza było mocno zredukowane, najczęściej proporcjonalnie do wzrostu GJIC.

UDZIAŁ POŁĄCZEŃ TYPU *GAP* W APOPTOZIE

Istnieje hipoteza, że komunikacja międzykomórkowa poprzez połączenia typu *gap* jest jednym z mechanizmów ułatwiających przepływ informacji w tkankach o rozpoczęciu apoptozy, gdyż warunkuje przekazanie sygnału odpowiedzialnego za uruchomienie tego procesu. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że utrata połączeń typu *gap* może odgrywać rolę w promowaniu rozwoju nowotworów przez hamowanie apoptozy komórek nowotworowych [38]. Wzrost i progresja nowotworu są w dużej mierze uzależnione od równowagi pomiędzy proliferacją a apoptozą. Jeśli proliferacja dominuje nad procesem apoptozy spodziewać się można bardziej agresywnego przebiegu procesu nowotworowego [48]. Badania przeprowadzone na linii komórek raka pęcherza moczowego szczura

BC31 wykazały, że z udziałem połączeń typu *gap* pojedyncze apoptotyczne komórki raka przewodziły sygnały indukujące śmierć komórkową do sąsiadujących komórek, które następnie umierały w procesie apoptozy, a przekaźnikiem sygnałów wydawały się jony Ca^{2+} [38]. Komórki apoptotyczne tej linii, podobnie jak nieapoptotyczne wykazywały ekspresję Cx43, a funkcjonalne połączenia heterologiczne między tymi komórkami uwidocznione były z użyciem techniki transferu barwnika Lucifer Yellow.

Wykazano również zahamowanie apoptozy w linii komórek BC31 o ekspresji zmutowanej postaci Cx43 – Cx43A. Wiele związków chemicznych promujących rozwój guzów nowotworowych, poza powszechnie znanym działaniem blokującym proces apoptozy, hamuje również GJIC [46] i odwrotnie, liczne substancje o działaniu przeciwnowotworowym (retinoidy, deksametazon), które nasilają proces apoptozy, mogą usprawniać GJIC. Udowodniono, że transfekcja genu Cx26 do linii komórkowych raka pęcherza moczowego (UM-UC 3, 6 i 14 oraz T24) spowodowała zahamowanie proliferacji komórek oraz uruchomienie procesu apoptozy [82]. Z powyższych prac i z wcześniejszych doświadczeń [68,84,91] wynika, że komunikacja z udziałem połączeń typu *gap* jest warunkiem koniecznym do międzykomórkowej transmisji „sygnałów śmierci“, a hamowanie tej drogi komunikowania się komórek powoduje progresję nowotworu na skutek zwiększenia stosunku proliferacji do apoptozy.

WYKORZYSTANIE POŁĄCZEŃ TYPU *GAP* W TERAPII I PROFILAKTYCE NOWOTWORÓW

Z wyżej przedstawionych informacji nasuwa się wniosek o możliwości wykorzystania wiedzy na temat funkcjonowania połączeń typu *gap* i ekspresji koneksyn w tkankach zdrowych i nowotworowych w rokowaniu, terapii i być może profilaktyce wielu nowotworów. Poziom ekspresji czy zmiany w funkcjonowaniu koneksyny (grupy koneksyn) charakterystycznej dla danej tkanki może świadczyć o progresji procesu nowotworowego. Nie można wykluczyć, że w przyszłości analizując powyższe cechy będzie można określić stopień zaawansowania choroby i ewentualnie proponować sposób dalszego leczenia pacjenta.

Przywrócenie funkcjonowania połączeń typu *gap* w tkankach nowotworowych może zahamować progresję nowotworu, co udowodniono w badaniach przeprowadzanych

w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Można to osiągnąć wykorzystując dwie metody, tj.: farmakologiczne przywrócenie lub wzrost ekspresji koneksyn z zastosowaniem np. retinoidów, karotenoidów czy deksametazonu lub stosując terapię genową. Wprowadzając gen kodujący koneksynę typową dla danej tkanki można byłoby przywrócić prawidłową jej ekspresję. Jednak nie jest to metoda doskonała, gdyż przywraca ona funkcjonowanie tylko jednego z wielu genów odpowiedzialnych za kontrolę wzrostu, proliferacji i śmierci komórek.

Metodą alternatywną polegającą na eradykacji komórek guza wydaje się terapia, której zasadą jest wprowadzenie genu kodującego enzym przekształcający nietoksyczny substrat w zabójczy produkt wewnątrz komórek nowotworowych. Najbardziej udaną kombinacją enzym/substrat testowaną na zwierzętach oraz w hodowlach *in vitro* jest kinaza tymidynowa wirusa opryszczki (Herpes simplex virus-thymidylne kinase – HSV-tk) i gancyklowir (GCV). Ekspresja genu HSV-tk czyni komórki guza wrażliwymi na analog tymidyny – gancyklowir, który ulega fosforylacji z udziałem kinazy wirusowej (endogenna kinaza nie wywołuje tego działania). Ufosforylowany metabolit jest wbudowywany do DNA proliferujących komórek np. komórek nowotworowych, powodując w rezultacie ich śmierć przez zahamowanie dalszych podziałów. Komórki niewykazujące ekspresji tego genu i komórki nieproliferujące są odporne na gancyklowir. Na szczęście metoda ta nie wymaga wprowadzenia genu do wszystkich komórek guza, gdyż oprócz komórek „odbiorców“ (HSV-tk⁺) giną także komórki otaczające (HSV-tk⁻) niewykazujące ekspresji tego genu. Zjawisko to określa się nazwą „bystander effect“ („efekt świadka, widza“). Mechanizm tego zjawiska nie jest dokładnie poznany, jednak czynnikiem wspomagającym i najprawdopodobniej koniecznym do jego zaistnienia jest zachowana komunikacja międzykomórkowa z udziałem połączeń typu *gap*. Wykazano to doświadczalnie w badaniach na liniach komórkowych raka jelita grubego [49] oraz raka trzustki [7]. Rezultaty tych doświadczeń wskazują, że poprawa komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem połączeń typu *gap* może wzmacniać „bystander effect“ w niektórych rodzajach raka, może także być wykorzystana w chemioterapii konwencjonalnej przez zwiększenie przenikania leków, zwłaszcza w guzach słabo unaczynionych, w których wychwyty i metabolizm chemioterapeutyku często jest zaburzony, a leczenie okazuje się nieskuteczne.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ara C., Massimi M., Devirgiliis Conti L.: Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 1758-1765
- [2] Bertram J.S., Bortkiewicz H.: Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62: 1327-1336
- [3] Brink P.R.: Gap junction channel gating and permselectivity: their roles in co-ordinated tissue function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1996; 23: 1041-1046
- [4] Bruzzone R., Gomes D., Denoyelle E., Duval N., Perea J., Veronesi V., Weil D., Petit C., Gabellec M.M., D'Andrea P., White T.W.: Functional analysis of a dominant mutation of human connexin26 associated with nonsyndromic deafness. *Cell. Commun. Adhes.*, 2001; 8: 425-431
- [5] Bruzzone R., White T.W., Paul D.L.: Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signalling. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 238: 1-27
- [6] Burghardt R.C., Barhoumi R., Sewall T.C., Bowen J.A.: Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J. Membr. Biol.*, 1995; 148: 243-253
- [7] Carrio M., Mazo A., Lopez-Iglesias C., Estivill X., Fillat C.: Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int. J. Cancer*, 2001; 94: 81-88

- [8] Carystinos G.D., Alaoui-Jamali M.A., Phipps J., Yen L., Batist G.: Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2001; 47: 126-132
- [9] Cesen-Cummings K., Fernstrom M.J., Malkinson A.M., Ruch R.J.: Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 61-67
- [10] Daniel E.E., Wang Y.F.: Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc. Res. Tech.*, 1999; 47: 309-320
- [11] de Feijter A.W., Matesic D.F., Ruch R.J., Guan X., Chang C.C., Trosko J.E.: Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, 1996; 16: 203-212
- [12] Dubina M.V., Iatckii N.A., Popov D.E., Vasil'ev S.V., Krutovskikh V.A.: Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene*, 2002; 21: 4992-4996
- [13] Dubourg O., Tardieu S., Birouk N., Gouider R., Leger J.M., Maisnobe T., Brice A., Bouche P., LeGuern E.: Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, 2001; 124: 1958-1967
- [14] Ek-Vitorin J.F., Calero G., Morley G.E., Coombs W., Taffet S.M., Delmar M.: PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys. J.*, 1996; 71: 1273-1284
- [15] Esinduy C.B., Chang C.C., Trosko J.E., Ruch R.J.: *In vitro* growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 915-921
- [16] Farber E.: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.*, 1984; 44: 4217-4223
- [17] Farraway L., Ball A.K., Huizinga J.D.: Intercellular metabolic coupling in canine colon musculature. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: 1492-1502
- [18] Fernstrom M.J., Koffler L.D., Abou-Rjaily G., Boucher P.D., Shewach D.S., Ruch R.J.: Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with connexin43. *Exp. Mol. Pathol.*, 2002; 73: 54-60
- [19] Fujimoto K., Nagafuchi A., Tsukita S., Kuraoka A., Ohokuma A., Shibata Y.: Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J. Cell. Sci.*, 1997; 110: 311-322
- [20] Gabella G., Blundell D.: Gap junctions of the muscles of the small and large intestine. *Cell. Tissue. Res.*, 1981; 219: 469-488
- [21] Garber S.A., Fernstrom M.J., Stoner G.D., Ruch R.J.: Altered gap junctional intercellular communication in neoplastic rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 1149-1153
- [22] Gee J., Tanaka M., Grossman H.B.: Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer. *J. Urol.*, 2003; 169: 1135-1137
- [23] Gottfried I., Landau M., Glaser F., Di W.L., Ophir J., Mevorah B., Ben-Tal N., Kelsell D.P., Avraham K.B.: A mutation in GJB3 is associated with recessive erythrokeratoderma variabilis (EKV) and leads to defective trafficking of the connexin 31 protein. *Hum. Mol. Genet.*, 2002; 11: 1311-1316
- [24] Guan X., Ruch R.J.: Gap junction endocytosis and lysosomal degradation of connexin43-P2 in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with DDT and lindane. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 1791-1798
- [25] Hanna E.A., Umhauer S., Roshong S.L., Piechocki M.P., Fernstrom M.J., Fanning J.D., Ruch R.J.: Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1369-1373
- [26] Hashitani H., Fukuta H., Takano H., Klemm M.F., Suzuki H.: Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.*, 2001; 530: 273-286
- [27] He D.S., Jiang J.X., Taffet S.M., Burt J.M.: Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 6495-6500
- [28] Hellmann P., Grummer R., Schirmacher K., Rook M., Traub O., Winterhager E.: Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.*, 1999; 246: 480-490
- [29] Hirai A., Yano T., Nishikawa K., Suzuki K., Asano R., Satoh H., Hagiwara K., Yamasaki H.: Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell. *Am. J. Nephrol.*, 2003; 23: 172-177
- [30] Hsu M., Andl T., Li G., Meinkoth J.L., Herlyn M.: Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J. Cell. Sci.*, 2000; 113: 1535-1542
- [31] Huang R.P., Fan Y., Hossain M.Z., Peng A., Zeng Z.L., Boynton A.L.: Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.*, 1998; 58: 5089-5096
- [32] Jamieson S., Going J.J., D'Arcy R., George W.D.: Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J. Pathol.*, 1998; 184: 37-43
- [33] Jinn Y., Ichioka M., Marumo F.: Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett.*, 1998; 127: 161-169
- [34] Jongen W.M., Fitzgerald D.J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T.J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H.: Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell. Biol.*, 1991; 114: 545-555
- [35] Kalimi G.H., Hampton L.L., Trosko J.E., Thorgeirsson S.S., Huggett A.C.: Homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in v-raf-, v-myc-, and v-raf/v-myc-transduced rat liver epithelial cell lines. *Mol. Carcinog.*, 1992; 5: 301-310
- [36] Kanemitsu M.Y., Lau A.F.: Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell.*, 1993; 4: 837-848
- [37] King T.J., Fukushima L.H., Hieber A.D., Shimabukuro K.A., Sakr W.A., Bertram J.S.: Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1097-1109
- [38] Krutovskikh V.A., Piccoli C., Yamasaki H.: Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene*, 2002; 21: 1989-1999
- [39] Kumar N.M., Gilula N.B.: The gap junction communication channel. *Cell*, 1996; 84: 381-388
- [40] Kwiatkowski A.P., Baker T.K., Klaunig J.E.: Comparison of glucocorticoid-mediated changes in the expression and function of rat hepatocyte gap junctional proteins. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 1753-1757
- [41] Lazrak A., Peracchia C.: Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells. *Biophys. J.*, 1993; 65: 2002-2012
- [42] Lee M.J., Nelson I., Houlden H., Sweeney M.G., Hilton-Jones D., Blake J., Wood N.W., Reilly M.M.: Six novel connexin32 (GJB1) mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2002; 73: 304-306
- [43] Lee S.W., Tomasetto C., Paul D., Keyomarsi K., Sager R.: Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J. Cell Biol.*, 1992; 118: 1213-1221
- [44] Loewenstein W.R.: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979; 560: 1-65
- [45] Mackay D., Ionides A., Kibar Z., Rouleau G., Berry V., Moore A., Shiels A., Bhattacharya S.: Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999; 64: 1357-1364
- [46] Mally A., Chipman J.K.: Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology*, 2002; 180: 233-248
- [47] Matesic D.F., Rupp H.L., Bonney W.J., Ruch R.J., Trosko J.E.: Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, 1994; 10: 226-236
- [48] McDonnell T.J.: Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia. *Mol. Carcinog.*, 1993; 8: 209-213
- [49] McMasters R.A., Saylor R.L., Jones K.E., Hendrix M.E., Moyer M.P., Drake R.R.: Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation. *Hum. Gene Ther.*, 1998; 9: 2253-2261
- [50] Mehta P.P., Perez-Stable C., Nadjji M., Mian M., Asotra K., Roos B.A.: Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev. Genet.*, 1999; 24: 91-110
- [51] Mesnil M., Asamoto M., Piccoli C., Yamasaki H.: Possible molecular mechanism of loss of homologous and heterologous gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cell lines. *Cell. Adhes. Commun.*, 1994; 2: 377-384

- [52] Mikkelsen H.B., Huizinga J.D., Thuneberg L., Rumessen J.J.: Immunohistochemical localization of a gap junction protein (connexin43) in the muscularis externa of murine, canine and human intestine. *Cell. Tissue Res.*, 1993; 274: 249-256
- [53] Miyoshi H., Boyle M.B., MacKay L.B., Garfield R.E.: Gap junction currents in cultured muscle cells from human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998; 178: 588-593
- [54] Muramatsu A., Iwai M., Morikawa T., Tanaka S., Mori T., Harada Y., Okanoue T.: Influence of transfection with connexin 26 gene on malignant potential of human hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 351-358
- [55] Nakamura K., Kuraoka A., Kawabuchi M., Shibata Y.: Specific localization of gap junction protein, connexin45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell. Tissue Res.*, 1998; 292: 487-494
- [56] Nakamura K., Shibata Y.: Connexin45 expression in network-forming cells at the submucosal-muscular border of guinea pig and dog colon. *Cell. Tissues Organs.*, 1999; 165: 16-21
- [57] Nemeth L., Maddur S., Puri P.: Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. *J. Pediatr. Surg.*, 2000; 35: 823-828
- [58] Neuhaus J., Weimann A., Stolzenburg J.U., Wolburg H., Horn L.C., Dorschner W.: Smooth muscle cells from human urinary bladder express connexin 43 *in vivo* and *in vitro*. *World J. Urol*, 2002; 20: 250-254
- [59] Omori Y., Krutovskikh V., Mironov N., Tsuda H., Yamasaki H.: Cx32 gene mutation in a chemically induced rat liver tumour. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 2077-2080
- [60] Pallares-Ruiz N., Blanchet P., Mondain M., Claustres M., Roux A.F.: A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur. J. Hum. Genet.*, 2002; 10: 72-76
- [61] Piechocki M.P., Burk R.D., Ruch R.J.: Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 401-406
- [62] Ren P., de Feijter A.W., Paul D.L., Ruch R.J.: Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 1807-1813
- [63] Ren P., Mehta P.P., Ruch R.J.: Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 169-175
- [64] Ren P., Ruch R.J.: Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 2119-2124
- [65] Richard G., Brown N., Rouan F., Van der Schroeff J.G., Bijlsma E., Eichenfield L.F., Sybert V.P., Greer K.E., Hogan P., Campanelli C., Compton J.G., Bale S.J., DiGiovanna J.J., Uitto J.: Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 120: 601-609
- [66] Rumessen J.J., Mikkelsen H.B., Qvortrup K., Thuneberg L.: Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in circular muscle of human small intestine. *Gastroenterology*, 1993; 104: 343-350
- [67] Rumessen J.J., Mikkelsen H.B., Thuneberg L.: Ultrastructure of interstitial cells of Cajal associated with deep muscular plexus of human small intestine. *Gastroenterology*, 1992; 102: 56-68
- [68] Sai K., Kang K.S., Hirose A., Hasegawa R., Trosko J.E., Inoue T.: Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication. *Cancer Lett.*, 2001; 173: 163-174
- [69] Sai K., Kanno J., Hasegawa R., Trosko J.E., Inoue T.: Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 1671-1676
- [70] Saito T., Nishimura M., Kudo R., Yamasaki H.: Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int. J. Cancer*, 2001; 93: 317-323
- [71] Saito T., Oyama M., Yamasaki H., Mori M., Kudo R.: Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy. *Int. J. Cancer*, 1997; 73: 479-485
- [72] Schwarz M., Wanke I., Wulbrand U., Moennikes O., Buchmann A.: Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol. Pathol.*, 2003; 31: 99-102
- [73] Seki K., Komuro T.: Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell. Tissue Res.*, 2001; 306: 417-422
- [74] Seki K., Zhou D.S., Komuro T.: Immunohistochemical study of the c-kit expressing cells and connexin 43 in the guinea-pig digestive tract. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1998; 68: 182-187
- [75] Shiokawa-Sawada M., Mano H., Hanada K., Kakudo S., Kameda T., Miyazawa K., Nakamaru Y., Yuasa T., Mori Y., Kumegawa M., Hakeda Y.: Down-regulation of gap junctional intercellular communication between osteoblastic MC3T3-E1 cells by basic fibroblast growth factor and a phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). *J. Bone Miner. Res.*, 1997; 12: 1165-1173
- [76] Sigler K., Ruch R.J.: Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea. *Cancer Lett.*, 1993; 69: 15-19
- [77] Singal R., Tu Z.J., Vanwert J.M., Ginder G.D., Kiang D.T.: Modulation of the connexin26 tumor suppressor gene expression through methylation in human mammary epithelial cell lines. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 59-64
- [78] Steele E.C. Jr, Lyon M.F., Favor J., Guillot P.V., Boyd Y., Church R.L.: A mutation in the connexin 50 (Cx50) gene is a candidate for the No2 mouse cataract. *Curr. Eye Res.*, 1998; 17: 883-889
- [79] Takayama I., Horiguchi K., Daigo Y., Mine T., Fujino M.A., Ohno S.: The interstitial cells of Cajal and a gastroenteric pacemaker system. *Arch. Histol. Cytol.*, 2002; 65: 1-26
- [80] Takeda M., Takayama I., Terada N., Baba T., Ward S.M., Ohno S., Fujino M.A.: Immunoelectron-microscopic study of Kit-expressing cells in the jejunum of wildtype and Ws/Ws rats. *Cell. Tissue Res.*, 2001; 304: 21-30
- [81] Tan L.W., Bianco T., Dobrovic A.: Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene Connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 231-236
- [82] Tanaka M., Grossman H.B.: Connexin 26 gene therapy of human bladder cancer: induction of growth suppression, apoptosis, and synergy with Cisplatin. *Hum. Gene Ther.*, 2001; 12: 2225-2236
- [83] Temme A., Buchmann A., Gabriel H.D., Nelles E., Schwarz M., Willecke K.: High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.*, 1997; 7: 713-716
- [84] Trosko J.E., Goodman J.I.: Intercellular communication may facilitate apoptosis: implications for tumor promotion. *Mol. Carcinog.*, 1994; 11: 8-12
- [85] Umhauer S., Ruch R.J., Fanning J.: Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2000; 182: 999-1000
- [86] Wang H.L., Chang W.T., Li A.H., Yeh T.H., Wu C.Y., Chen M.S., Huang P.C.: Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J. Neurochem.*, 2003; 84: 735-742
- [87] Wang Y.F., Daniel E.E.: Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001; 281: 533-543
- [88] Wang H.Z., Day N., Valcic M., Hsieh K., Serels S., Brink P.R., Christ G.J.: Intercellular communication in cultured human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2001; 281: 75-88
- [89] Wilgenbus K.K., Kirkpatrick C.J., Knuechel R., Willecke K., Traub O.: Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer*, 1992; 51: 522-529
- [90] Willecke K., Eiberger J., Degen J., Eckardt D., Romualdi A., Guldenagel M., Deutsch U., Sohl G.: Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.*, 2002; 383: 725-737
- [91] Wilson M.R., Close T.W., Trosko J.E.: Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. *Exp. Cell Res.*, 2000; 254: 257-268
- [92] Yano T., Hernandez-Blazquez F.J., Omori Y., Yamasaki H.: Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 1593-1600
- [93] Yano T., Yamasaki H.: Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cell by connexin 26 transfection. *Mol. Carcinog.*, 2001; 31: 101-109
- [94] Zhang Z.Q., Zhang W., Wang N.Q., Bani-Yaghoob M., Lin Z.X., Naus C.C.: Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 1889-1894