

Lipopolisakkarid enterositlerdeki ara bağlantı proteini Konneksin-43'ü etkileyerek hücreler arası iletişimi bozmaktadır*

Orkan ERGÜN, Faisal G. QURESHI, Catherine BATY, Jun LI, Henri R. FORD, David J. HACKAM
Pittsburgh Çocuk Hastanesi, Çocuk Cerrahisi Bölümü, Pittsburgh, Pensilvanya, Amerika Birleşik Devletleri
(Children's Hospital of Pittsburgh, Division of Pediatric Surgery, Pittsburgh, PA, USA)

Özet

Giriş: Enterositlerde hücreler arasındaki iletişimin bariyer işlevinin korunması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Ara bağlantı (AB) proteini konneksin-43'ün (K-43) nöronlarda hücre içi mediatör trafiğini düzenlediği ve fosforilasyon ile işlevinin engellendiği bilinmektedir. Bu çalışmada Lipopolisakkaridin (LPS) neden olduğu barsak bariyeri işlev bozukluğunun enterositler arasındaki iletişim, K-43 ekspresyonu ve fosforilasyon durumunu nasıl etkilediği ve hangi mekanizmanın sorumlu olduğu araştırılmıştır.

Yöntem: Enterositler arasındaki iletişimi göstermek için IEC-6 enterosit hücre serilerine kültür ortamında floresan bir molekül olan lusifer-sarı (LS) ve daha büyük başka bir molekül olan Rodamin-dekstran (Rd-D) ile mikroenjeksiyon uygulanmıştır. AB fonksiyonunun öznelliğini ortaya koymak amacıyla hücreler AB inhibitörü olan Oleamid ile muamele edildikten sonra enjeksiyon tekrarlanarak lazer konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir. Ardından, IEC-6 hücrelerinin LPS ile (50 µg/ml 24h) muamele sonrasındaki K-43 ekspresyonu ve fosforilasyonu (fK-43) Western Blot ve lazer konfokal mikroskopi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Enterositlere uygulanan mikroenjeksiyon sonrasında LS'nin hücreden komşu hücrelere AB aracılığı ile geçtiği gözlenirken Rd-D'nin sadece enjeksiyon yapılan hücrede sınırlı kalması işlevsel AB'ların varlığını ortaya koymuştur. Oleamid ile muamele sonrasında LS'nin da komşu hücrelere geçişinin engellenmesi AB işlevinin öznelliğini doğrulamıştır. LPS uygulaması enterositlerdeki fK-43 düzeyini anlamlı olarak arttırırken (aktin bant dansitesine oranla kontrol hücrelerde: 0.3 ± 0.1 , LPS sonrası: 0.9 ± 0.2 ; $p < 0.05$) toplam K-43 değişmemiştir. LPS uygulaması hücreler arasında fK-43 birikimini arttırmıştır.

Sonuç: LPS, AB proteini K-43'ün fosforilasyonunu arttırarak AB'ların işlevini engellemektedir. Bu da endotoksinin enterositler arası iletişimi bozmak yoluyla barsak bariyerinin bütünlüğünün korunmasını engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Mukozal bariyer, nekrotizan enterokolit, ara bağlantılar, konneksin-43

*XXII. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde sunulmuştur (8-11 Eylül 2004, Bursa).

Adres: Dr. Orkan ERGÜN, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 35100, İzmir
Yayına kabul tarihi: 24.5.2005

Summary

Lipopolysaccharide impairs cell-to-cell communication by affecting the gap junction protein connexin-43 in enterocytes

Aim: Communication between enterocytes is likely to be essential for the maintenance of gut barrier integrity. In many cells such as neurons, intercellular communication occurs through the gap junction (GJ) protein connexin-43 (Cx43), and phosphorylation of Cx43 (pCx43) disrupts GJ function. However, the in vivo effects of LPS on GJ expression and phosphorylation in enterocytes are undefined. We hypothesized that LPS modulates connexin-43 expression and phosphorylation in enterocytes in-vitro.

Methods: Inter-enterocyte communication was measured by microinjecting intestinal epithelial cells (IEC-6) with lucifer-yellow (LY) and a larger molecule "rhodamine-dextran (Rd-D). The specificity of GJ function was assessed by pretreatment of cells with "oleamide", a specific inhibitor of GJ function. Images were obtained by laser confocal microscopy. The expression and distribution of Cx-43 and its phosphorylation (pCx-43) were assessed in IEC-6 cells following treatment with LPS (50 µg/ml 24h) by Western blot and confocal microscopy.

Results: Enterocyte injections allowed passage of LY but not Rd-dextran to adjoining cells, suggesting GJ function. Oleamide treatment inhibited the passage of LY to the adjacent cells. LPS significantly increased enterocyte pCx-43 (density rel to actin ctrl: 0.3 ± 0.1 vs LPS 0.9 ± 0.2 , $p < 0.05$) but not total Cx-43. LPS significantly increased accumulation of pCX-43 between cells.

Conclusion: LPS impairs the function of GJ by increasing the phosphorylation of Cx-43. This may provide insights into maintenance of barrier function by interenterocyte function.

Key words: Mucosal barrier, necrotizing enterocolitis, gap junctions, connexin-43

Giriş

Nekrotizan enterokolit (NEK), preterm yenidoğan-

larda gastrointestinal sistemden kaynaklanan morbidite ve ölümün en önemli nedenlerinden birisidir (2,9,13). NEK'in etyolojisi ve patofizyolojisi henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte prematürite, enteral beslenme ve düşük doğum ağırlığı önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır (1). Risk altındaki prematüre yenidoğan bir bebekte hipoksi barsaklarda mukozal bariyerin bozulmasına ve bunun sonucunda bakteriyel translokasyon ve klinik NEK tablosunun oluşmasının yanısıra sistemik sepsisin gelişmesine de neden olur (10,11). Her ne kadar barsak bariyerinin düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalar tam olarak bilinmese de günümüzdeki bilgiler ışığında hücrelerin birbirleriyle haberleşebilme özelliğinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. NEK patogenezinin tam olarak aydınlatılabilmesi için özellikle hücreler arası iletişim açısından barsak bariyer bozukluğunun mekanizmalarının tam olarak ortaya konması gerekmektedir.

Hücreler birbirleriyle doğrudan ya da dolaylı olarak iletişim kurabilirler. Hormonlar, nöromediatörler, kalsiyum ve nitrik oksit (NO) gibi moleküller dolaylı olarak hücreler arası iletişimde rol oynarlar (22). Doku ve organlardaki hücreler arası doğrudan iletişim ise "ara bağlantılar (AB)" adı verilen özelleşmiş kanallar aracılığı ile gerçekleşmektedir. AB'lar, birbirleri ile temas halinde bulunan hücrelerin plazma membranlarında yer alan yarı-kanalların paylaşılması ile oluşan ve 1000 Dalton'dan daha küçük sitoplazmik moleküllerin hücreden hücreye bir reseptör aracılığı olmaksızın geçişine izin veren yapılardır (8,15). Her yarı-kanal altı konneksin (K) molekülünün oluşturduğu bir oligomerden meydana gelir (27). Konneksin ailesinin 20'den daha fazla elemanı tanımlanmış olup her bir eleman moleküler ağırlığı ile anılmaktadır (Ör. K-43, K-26 gibi) ve insanlarda α ve β alt grupları mevcuttur (4,7,11,15,24,26). AB işlevinin proteinin fosforilasyon durumu ile düzenlendiği bilinmektedir. Örneğin, konneksin 43'ün fosforilasyonunun AB'lar aracılığı ile iletişimi azalttığı bilinmektedir (3,16,18). Fosforilasyonun bu farklı etkileri hücreye özel olabilir. Barsak hücrelerindeki ara AB'lara ilişkin yeterli bilgi bulunmamasının yanısıra fosforilasyonun AB işlevine etkileri bilinmemektedir. AB'ların enterositlerde bulunduğu daha önce bildirilmiş olmakla birlikte fonksiyonları incelenmemiştir (6,14). Ayrıca, endotoksinin AB proteinlerinin ekspresyonu ve işlevine etkileri henüz bilinmemektedir

(21,25).

Bu çalışmada AB'ların enterositlerdeki varlığının ve işlevsel olarak aktif olduğu hipotezinin doğrulanması amaçlanmıştır. Ayrıca, endotoksinin konneksin proteinlerinin fosforilasyon durumunu nasıl etkilediği ve işlevlerini ne yönde değiştirdiği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deneylerde IEC-6 kültür hücrelerinin üretiminde ve saklanması DMEM (Dulbecco's modified eagle medium; BioWhittaker, Baltimore MD, USA), penisilin/streptomisin, fetal sığır serumu, sığır serum albümini, L-glutamin (Gibco, Carlsbad CA, USA) kullanılmıştır. Western Blot analizlerinde fare monoklonal anti-konneksin 43 ve tavşan poliklonal anti-fosfo-konneksin 43 antikorları (Chemicon, Temecula CA, USA), fare anti-K26 and fare anti-K32 antikorları (Zymed Laboratories, San Francisco, CA USA) kullanılmıştır. Kültür hücrelerinde ara AB fonksiyonlarının değerlendirilmesi için yapılan mikroenjeksiyonlarda Rodamin Dekstran ve Lusifer sarısı (Molecular Probes, Eugene OR, USA) kullanılmıştır.

Hücre kültürü ve immünofloresans

Rat enterosit IEC-6 kültür hücreleri % 5 fetal sığır serumu, penisilin, streptomisin, L-Glutamin ve insülin ile zenginleştirilmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde 37°C ve % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir (19). Hazırlanan hücre kültürleri 18 saat süre ile lipopolisakkarid (LPS, 50 µg/ml) ile muamele edilmiştir. Lipopolisakkaridin (LPS) etkisini araştırmak amacı ile hazırlanan hücre kültürleri 18 saat süre ile LPS (50 µg/ml) muamele edilmiştir. Kontrol ve LPS hücreleri 18 saatin sonunda lizis tamponunda parçalanıp hücre eriyikleri +4°C'de 9000 devirde 30 dk. santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmış ve süpernatantları (santrifüj sonrası üstte kalan sıvı) ayrılmıştır. Bisikoninik asit analizi ile süpernatantlar içindeki protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Süpernatantların içerdiği protein yapılar (30 µg'a eşdeğer hacimde) sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE; Western Blot) ile ayrıştırıldıktan sonra poliviniliden florid (PVDF) membranlara aktarılmıştır. Membranlar 1 saat süre ile oda ısısında % 0.1 PBS-Tween içinde % 5'lik süt proteini ile bloke edildikten

sonra 1:251 ve 1:1000 sulandırmada K-43 ve fosfo-konneksin (fK-43) antikoları ile oda ısısında 1 saat muamele edilmiştir. Bunu takiben sekonder antikor (IgG) ile muamele edilen membranlardaki protein bantları SuperSignal kimyasal illuminesans yöntemi ile görüntülenmiştir.

İmmünofloresan mikroskopi için hücreler kültür ortamında lameller üzerinde % 60-80 yoğunlukta çoğaltılıp 18 saatlik LPS uygulamasını takiben 20 dk. süre ile % 4 paraformaldehit ile fiksasyon, 20 dk. % 0.1 Triton X-100 ile hücrede geçirgenlik artırma ve 1 saat % 1 sıgır serum albümini/0.15M glisin ile bloke edilme işlemlerine tabi tutulmuştur. Ardından hücreler 1 saat primer antikor, 1 saat sekonder antikor ve hücre çekirdeği boyası Topro (Molecular Probes, Eugene, OR) ile muamele edilmiştir. Lameller her işlem arasında soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış, işlemlerin tamamlanmasının ardından cam lamalar üzerine yerleştirilerek 60x immersiyon objektifi altında Olympus Fluoview 500 lazer konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir.

Ara bağlantı işlevi için mikroenjeksiyon

IEC-6 hücreleri tek hazneli kültür ortamında bazal koşullarda ve 18 saat süreyle LPS (50 µg/ml) ile muamele edilmiş şekilde ortalama % 75 yoğunlukta ço-

ğaltılmıştır. Hücrelerin ara bağlantı işlevlerinin değerlendirilebilmesi amacıyla mikroenjeksiyondan 15 dk. önce ara bağlantı inhibitörü olan oleamid (25 µM) kültür ortamına ilave edilmiştir. Enterositlere InjectMan NI2, Femtojet, and Femtotips II (Eppendorf, Hamburg Germany) yardımı ile mikroenjeksiyon uygulanmıştır. Mikroenjeksiyon ve görüntüleme IX81 Olympus mikroskobu ile 60X büyütme altında gerçekleştirilmiştir. Enterositlere Lusifer Sarısı (LS, 25 mg/ml) ve Rodamin Dekstran 70 kD (RD, 10 mg/ml; Molecular Probes, Eugene, Oregon) 5:1 oranında karıştırılıp enjekte edilmiştir.

Bulgular

Her bir deneyde 10 hücreye mikroenjeksiyon uygulanmış olup deneyler 5 kez tekrarlanmıştır. Verilen değerler yaklaşık 50 mikroenjeksiyon sonrası elde edilen verilerin ortalamasıdır. Enjeksiyon yapılan hücreden boyanın geçtiği gözlenen komşu hücreler mikroskop altında sayılmıştır.

Rat enterositleri işlevsel ara bağlantılar içermektedir.

IEC-6 hücrelerinde AB'ların varlığı küçük floresan bir molekül olan LS'nın çok daha büyük bir molekül olan RD ile birlikte ve eş zamanlı olarak hücre içeri-

Şekil 1. Küçük floresan bir molekül olan Lusifer sarısı (LS) çok daha büyük bir molekül olan Rodamin dekstran (RD) ile birlikte ve eş zamanlı olarak ok ile işaretli olan IEC-6 hücresi içerisine enjekte edilmiştir. Öncelikle, yalnızca LS ara bağlantılar yoluyla komşu hücrelere geçebilirken RD'nın geçemediği görülmüştür (Şekil 1A-C). Ardından öznel bir AB inhibitörü olan oleamid uygulaması LS'nın ara bağlantılardan geçişini engellemiştir (Şekil D-F).

Şekil 2. Farklı konneksin molekülü izofomlarının enterosit hücre serilerindeki (IEC-6) ekspresyonu; Koneksin 26, 32 ve 43'ün IEC-6 hücre serilerinde varlığını ortaya koyan Western Blot analizi.

Şekil 3. IEC-6 kültür hücrelerine LPS uygulaması fosfokonneksin-43 ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olurken total Konneksin-43 düzeylerinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Şekil 4. LPS, IEC-6 hücrelerinin membranlarında fosfokonneksin-43 dağılımını kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında belirgin olarak arttırmıştır.

sine enjekte etmek yoluyla ortaya konmuştur. Öncelikle, yalnızca LS ara bağlantılar yoluyla komşu hücrelere geçebilirken RD'nın geçemediği görülmüştür. (Şekil 1A-C). Ardından öznel bir AB inhibitörü olan oleamid uygulaması LS'nın ara bağlantılardan geçişini engellemiştir (Şekil 1D-F). Bu bulgular enterositlerde işlevsel ara bağlantıların varlığını ortaya koymaktadır. Hangi konneksin izoformlarının enterositlerde var olduğunu saptamak amacı ile yapılan Western Blot analizlerinde K-26, K-32 ve K-43'ün varlığı belirlenmiştir (Şekil 2).

LPS enterositlerdeki fK-43'ün ekspresyonunu arttırmaktadır.

NEK, LPS sistemik dolaşıma transloke olması ile karakterize bir klinik durum olmasından ötürü, in-vitro ortamda LPS'in konneksin ekspresyonuna ve fosforilasyon durumuna etkisi araştırılmıştır. IEC-6 kültür hücrelerine LPS uygulaması fK-43 ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olurken total K-43 düzeylerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. (Şekil 3). Şekil 4'de açık şeklide görüldüğü gibi, LPS, IEC-6 hücrelerinin membranlarında fK-43 dağılımını kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında belirgin olarak arttırmıştır. Bu veriler, endotoksinin membran kaynaklı k-43'ün fosforilasyonunu arttırdığını göstermektedir.

LPS, IEC-6 hücrelerinde ara bağlantı işlevini azaltmaktadır.

LPS ile muamele edilen hücrelere LS ve RD mikro-

enjekte edildikten sonra verilen boyaların hücreden hücreye geçişleri kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır. Kontrol hücrelerine LS enjekte edildiğinde, boyanın komşu olan 2 ± 0.18 hücreye geçtiği gözlenmiştir. LPS ile muamele edilmiş hücrelerin LS enjeksiyonu sonrası boyanın komşu 1.55 ± 0.16 hücreye geçtiği görülmüştür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber ($p=0.06$), elde edilen bulgular LPS'in enterositlerde ara bağlantı fonksiyonunu azaltma eğiliminde olduğunu düşündürmektedir.

Tartışma

Bu çalışma, enterositlerin işlevsel AB'lara sahip olduğunu ve bu AB işlevlerinin LPS ile kısmen engellendiğini göstermektedir. LPS'in karaciğer hücresi ve lökositlerde AB işlevlerini değiştirdiği daha önce gösterilmiş olmakla birlikte enterositlerdeki AB işlevi üzerine etkileri daha önce araştırılmamıştır (5,12,23). Bununla birlikte, enterositlerin LPS'e maruz kalması önemli bir AB proteini olan K-43'ün fosforilasyonu ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Konneksin proteinlerinin fosforilasyonu AB'lar yoluyla sağlanan hücreler arası iletişimin bozulmasına yol açtığından ötürü, LPS'in böyle bir mekanizma ile hücreler arası iletişimi bozduğunu düşündürmektedir (20).

Bu etkinin fizyolojik olarak ne anlama geldiğinin anlaşılması, NEK'de söz konusu olan değişikliklerin oluş mekanizması hakkında bilgi verici olabilir. Bilindiği gibi, NEK'de meydana gelen epitelyal hasar, villus kriptlerinde yer alan enterositlerin hasar görmüş olan epitel hücrelerinin yerine göçü ve aynı zamanda çoğalmaları sonucu onarılmaktadır. Bu olaylar zinciri enterositlerin düzenli ve programlı bir şekilde davranmalarını gerektirmektedir. Buna göre, NEK'de mukozal bariyer incinmesini takiben meydana gelen LPS translokasyonu, diğer etkilerinin yanı sıra, enterositlerde yer alan konneksin proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Konneksinin fosforile olması sonucu enterositler arası ara bağlantı işlevleri bozulmakta, hücreler arası iletişim aksamakta ve bariyer işlevinin yerine konması için gereken epitelyal hücre onarımı aksamaktadır. Böylelikle, bakteriyel translokasyonun artarak devam etmesi sistemik inflamatuvar yanıtın da ilerlemesine yol açmaktadır.

Özetle, bu çalışmanın sonucunda enterositlerin işlev-

sel ara bağlantılara sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Ara bağlantı proteinlerinin en önemlilerinden biri olan Konneksin-43'ün fosforilasyonu ile ara bağlantıların işlevi bozulmaktadır. Konneksin proteinlerinin fosforilasyonunun, ara bağlantıların işlevlerini bozan ve endotoksemi sırasında barsak bariyeri işlev bozukluğuna neden olan bir stres yanıtı olabileceği düşünülmektedir. Bu da nekrotizan enterokolit patogenezi içindeki oluş mekanizmaları hakkında fikir verici olabilir.

Kaynaklar

1. Albanese CT, Rowe MI: Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 4:200, 1995
2. Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU: Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 111:529, 2003
3. Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Dotto GP: The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* 11:5364, 1991
4. Cottrell GT, Burt JM: Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1559, 2001
5. De Maio A, Gingalewski C, Theodorakis NG, Clemens MG: Interruption of hepatic gap junctional communication in the rat during inflammation induced by bacterial lipopolysaccharide. *Shock* 14:53, 2000
6. Evans WH, Martin PE: Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19:121, 2002
7. Falk MM, Buehler LK, Kumar NM, Gilula NB: Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *Embo J* 16:2703, 1997
8. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL: Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475, 1996
9. Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody J, Clark RH: Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol* 23:278, 2003
10. Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, et al: Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G695, 2003
11. He DS, Jiang JX, Taffet SM, Burt JM: Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6495, 1999
12. Jara PI, Boric MP, Saez JC: Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7011, 1995
13. Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C: Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis* 16:349, 2003
14. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al: Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deaf-

- ness. *Nature* 387:80, 1997
15. Kumar NM, Gilula NB: The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388, 1996
 16. Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF: Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149:1503, 2000
 17. Leykauf K, Durst M, Alonso A: Phosphorylation and subcellular distribution of connexin43 in normal and stressed cells. *Cell Tissue Res* 311:23, 2003
 18. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA: Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 111:2077, 1990
 19. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ: Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80:248, 1979
 20. Schulz R, Gres P, Skyschally A, et al: Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *Faseb J* 17:1355, 2003
 21. 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* 306:417, 2001
 22. Serre-Beinier V, Mas C, Calabrese A, et al. Connexins and secretion. *Biol Cell* 94:477, 2002
 23. Torimoto K, Sato N, Okubo M, et al. Development of multiple necrotizing enteritis induced by a tumor necrosis factor-like cytokine from lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages in rats. *Am J Pathol* 137:1103, 1990
 24. Valiunas V, Weingart R, Brink PR. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Circ Res* 86:E42, 2000
 25. Wang YF, Daniel EE. Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G533, 2001
 26. Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725, 2002
 27. Yeager M, Unger VM, Falk MM. Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 8:517, 1998