

Received: 06.12.2019
Accepted: 24.06.2020
Published: 25.09.2020

Koneksyna-43 w osteogenezie*

Connexin 43 in osteogenesis

Krzysztof Łukowicz, Karolina Fijał, Aleksandra Nowak, Anna M. Osyczka

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

* Praca jest finansowana z grantu AMO, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki; UMO-2016/21/B/NZ5/00217

Streszczenie:

Formowanie szkieletu oraz jego prawidłowe funkcjonowanie są możliwe dzięki wyspecjalizowanym komórkom tkanki kostnej: kościotwórczym osteoblastom, kościogubnym osteoklastom oraz osteocytom znajdującym się w jamkach kostnych.

Połączenia szczelinowe są to transbłonowe kanały łączące sąsiadujące ze sobą komórki, dzięki którym możliwe jest bezpośrednie przekazywanie sygnałów przez komórki. Kanały typu szczelinowego, a konkretniej budujące je białka koneksynowe, wpływają głównie na proces obrotu kostnego, a zatem zarówno na budowę, jak i przebudowę kości. Szczególnie ważną koneksyną w tkance kostnej jest koneksyna-43 (Cx43), która jest niezbędna w prawidłowym przebiegu procesów kościotworzenia oraz w zachowaniu homeostazy kości.

To jak ważna jest obecność Cx43 w kościach, pokazują defekty szkieletu w chorobach, takich jak dysplazja oczno-zębowo-palcowa (zespół ODD) czy dysplazja czaszkowo-trzonowa, wywołane mutacjami *GJA1*, genu kodującego Cx43. Wykazano również rolę Cx43 w różnicowaniu komórek macierzystych w komórki kostne, antyapoptycznym działaniu bisfosfonianów oraz odpowiedzi kości na bodźce hormonalne i mechaniczne. Poza koneksyną-43 w tkance kostnej stwierdzono również obecność innych koneksyn, takich jak: koneksyna-45, -46 oraz -37.

Słowa kluczowe:

koneksyna-43, osteogeneza, mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego

Summary:

Skeleton formation and its proper functioning is possible thanks to specialized bone tissue cells: bone forming osteoblasts, bone resorbing osteoclasts and osteocytes located in bone cavities.

Gap junctions are transmembrane channels connecting neighboring cell. Thanks to gap junctions it is possible for signals to be directly transmitted by cells. Gap junction type channels, and more specifically the connexin proteins that build them, have a key impact on the bone turnover process, and thus on both bone building and remodeling. A particularly important connexin in bone tissue is connexin43 (Cx43), which is necessary in the proper course of the bone formation process and in maintaining bone homeostasis.

The importance of the presence of Cx43 in bones is showed by skeletal defects in diseases such as ODD syndrome and craniometaphyseal dysplasia caused by mutations in *GJA1*, the gene encoding Cx43. The role of Cx43 in the differentiation of stem cells into bone cells, anti-apoptotic action of bisphosphonates and bone responses to hormonal and mechanical stimuli have also been demonstrated. In addition to connexin43, the presence of other connexins such as connexin45, 46 and 37 was also noted in bone tissue.

Keywords:

connexin 43, osteogenesis, bone marrow mesenchymal stem cells

GICID	01.3001.0014.4153
DOI:	10.5604/01.3001.0014.4153
Word count:	5 934
Tables:	–
Figures:	3
References:	58

Adres autorki: dr hab. Anna M. Osyczka, prof. UJ, Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków; e-mail: anna.osyczka@uj.edu.pl

Wykaz skrótów: **APC** – białko gruczolakowatego polipa okrężnicy (adenoma-touspolyposis coli), **BMD** – gęstość mineralna kości (bone mineral density), **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein), **BMSC** – mezenchymalne komórki macierzy szpiku kostnego (bone marrow mesenchymal stem cells), **CMD** – dysplazja czaszkowo-trzonowa (craniometaphyseal dysplasia), **Cx43** – koneksyna-43 (connexin 43), **ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (extracellular Signac regulated kinase), **ESW** – pozaustrojowa fala uderzeniowa (extracorporeal shock wave), **FFSS** – naprężenie ścinające przy przepływie płynu (fluid floks hear stress), **Frizzled** – białka receptorowe sprzężone z białkiem G (family of G protein-coupled receptor proteins), **GSK-3beta** – kinaza syntazy glikogenu 3 beta (glycogen synthase kinase 3 beta), **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor), **LRP** – białko związane z receptorem LDL (LDL-receptor-related protein), **MSX** – Mshhomeobox, znany również jako MSX (Mshhomeobox, also known as MSX), **ODD** – dysplazja oczno-zębowa-palcowa, (oculodent to digital dysplasia), **PGE2** – prostaglandyna E2 (prostaglandin E2), **PTH** – parathormon (parathormon), **RANKL** – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (receptor activator for nuclear factor κ B ligand), **RUNX2** – powiązany z Runt czynnik transkrypcyjny (Runt-related transcription factor 2), **Sp7** – czynnik transkrypcyjny Sp7, znany również jako Osterix, **OSX** (transcription factor Sp7, also known as Osterix, OSX), **TCF** – czynnik transkrypcyjny komórek T (T-cell factor), **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta), **TRAP** – winianooporna kwaśna fosfataza (tartrate-resistant acid phosphatase), **WNT** – skrót z połączenia nazw Wg (wingless) i Int, ligandy receptorów z rodziny Frizzled (shortcut of Wg, wingless and Int, ligands to a Frizzled family receptors).

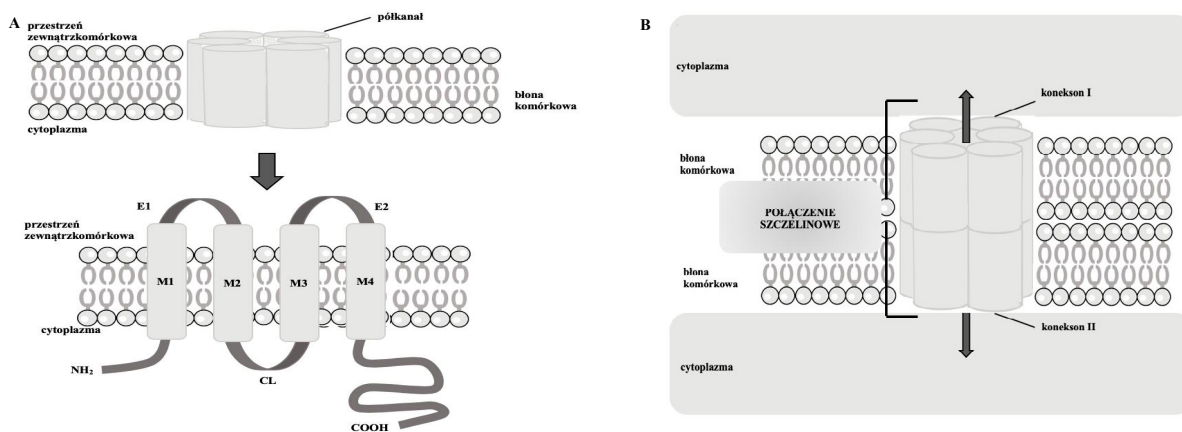
WSTĘP

Tkanka kostna jest tkanką dynamiczną, stale ulegającą przebudowie, co jest związane z procesami kościotworzenia oraz resorpcji kości. Procesy te są możliwe dzięki oddziaływaniu między trzema typami komórek kostnych: kościotwórczymi osteoblastami, końcowo zróżnicowanymi, zagłębionymi w zmineralizowanej macierzy kostnej osteocytami i kościogubnymi osteoklastami. Komunikacja między tymi komórkami polega m.in. na tworzeniu różnego rodzaju połączeń (kanałów) w przylegających do siebie błonach komórkowych tych komórek. Jednym z tego typu połączeń jest połączenie szczelinowe, zbudowane z białek koneksynowych. Połączenia tego typu są wykorzystywane m.in. do transportu jonów, wymiany cząsteczek sygnałowych czy też małych cząsteczek o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa, takich jak ATP czy NAD⁺ [11, 47].

Koneksyny należą do białek transbłonowych tworzących heksagonalne struktury – koneksyny, zwane również półkanałami (ryc. 1A). Każdy konekson składa się z sześciu takich samych lub różnych białek koneksynowych. Gdy półkanał w błonie komórkowej jednej komórki zrówna się z półkanałem w błonie komórkowej sąsiedniej komórki, powstaje połączenie szczelinowe między cytoplazmami sąsiadujących komórek (ryc. 1B). U człowieka koneksyny są kodowane przez 21 genów, natomiast u myszy przez 20 [64]. Wszystkie

koneksyny mają podobną strukturę przestrzenną złożoną z czterech hydrofobowych domen transbłonowych M1–M4, jednej wewnętrzkomórkowej, zagłębionej w cytoplazmie pętli – CL, dwóch pętli zewnątrzkomórkowych E1 oraz E2, a także znajdujących się wewnątrz komórki i zagłębionych w jej cytoplazmie zakończeń aminowych NH₂ i karboksylowych COOH [19, 42, 52].

Najlepiej poznaną i najczęściej występującą koneksyną w tkance kostnej jest koneksyna-43 (Cx43; connexin43) [17]. Cx43, występująca w: osteoblastach, osteoklastach i osteocytach [71], jest kodowana przez gen GJA1. Pełni ważną rolę m.in. w rozwoju szkieletu [7, 57, 59, 61], odpowiadzi na bodźce mechaniczne [24, 50] czy też w naprawie złamań [36]. Obecnie niewiele wiadomo o innych koneksynach występujących w szkieletcie, takich jak koneksyna-45 czy -46 [68]. Wiadomo jednak, że obie występują w komórkach kostnych, przy czym koneksyna-45 ulega ekspresji w osteocytach i osteoblastach, a poziom jej ekspresji jest stały i nie ulega zmianie w procesie różnicowania prekursorów osteoblastów [15, 40]. Badania immunofluorescencyjne na obecność koneksyny-46 w osteocytach wykazują małą ilość tego białka na powierzchni komórek, a także wskazują, że gromadzi się ono w okolicach regionu transaparatu Golgiego [28]. Niedawne badania wskazały też ważną rolę koneksyny-37 w rozwoju kości. Wykazano, że koneksyna-37 występuje w: osteocytach, osteoblastach i osteoklastach,



Ryc. 1A. Budowa typowej koneksyny: M1-M4 – domeny transbłonowe, E1-E2 – domeny zewnątrzkomórkowe, CL – domena wewnątrzkomórkowa oraz wewnątrzkomórkowe zakończenia aminowe i karboksylowe. **B.** Schemat koneksonu (półkanał) oraz połączenie szczelinowe (wg [19, 54]; zmienione)

a myszy z delecją genu tej koneksyny charakteryzowały się zwiększoną masą mineralną kości oraz zwiększoną wytrzymałością na obciążenia mechaniczne w porównaniu do myszy kontrolnych. Zmiany były większe u samców w porównaniu do samic. Ponadto komórki szpiku kostnego tych myszy wykazywały zmniejszoną ekspresję genów charakterystycznych dla osteoklastów, tj. ligandu aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (RANKL; receptor activator for nuclear factor κ B ligand), winianoopornej kwasnej fosfatazy (TRAP; tartrate-resistant acid phosphatase), receptora metaloproteinazy-9 czy katepsyny-3 w porównaniu do kontroli. Sugeruje to istotną rolę koneksyny-37 w procesie różnicowania prekursorów osteoklastów [43].

KONEKSINA-43 GŁÓWNYM CZYNNIKIEM W FORMOWANIU KOŚCI

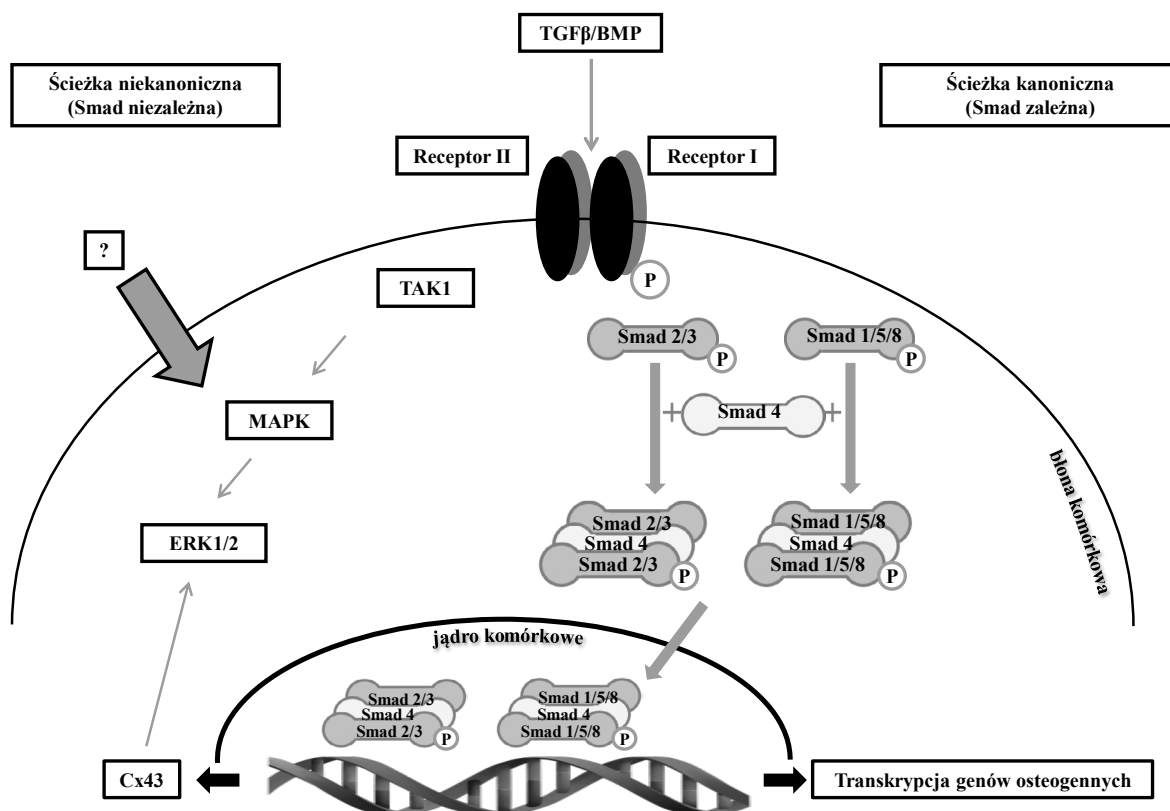
Koneksyna-43 w osteogenezie komórek zrębowych szpiku kostnego (BMSC)

Komórki zrębowe szpiku kostnego (BMSC; bone marrow mesenchymal stem cells) często opisuje się jako multipotencjalne mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego, ponieważ wykazują zdolność do różnicowania w wielu różnych typów komórek, m.in. w: osteoblasty, chondroblasty, adipocyty, jak i w neurony [1, 57]. Ważnymi wskaźnikami procesu kościotworzenia BMSC są: ekspresja osteonektyny, osteokalcyny, osteopontyny oraz zasadowej fosfatazy. Spośród wymienionych wskaźników szczególnie ważna jest osteokalcyna, ponieważ jest późnym markerem dojrzałych osteoblastów i pełni istotną rolę w procesie odkładania mineralnego wapnia w kościach [66]. Wykazano ponadto, że powiązany z Runt czynnikiem transkrypcyjny (RUNX2; Runt-related transcription factor 2) jest pozytywnym regulatorem ekspresji genów podstawowych białek kostnej macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in.: sialoproteiny kostnej, kolagenu typu I czy osteokalcyny [10]. Działanie genu kodującego czynnika transkrypcyjnego Sp7 (Sp7; transcription factor Sp7) jest natomiast częściowo zależne od aktywności RUNX2 [9, 10] i Sp7 może regulować ekspresję np. osteokalcyny [58]. W zdrowym organizmie równowaga różnicowania BMSCs jest przesunięta w stronę

ich różnicowania w osteoblasty, aniżeli w adipocyty, co pozwala na prawidłowe formowanie oraz masę kości [29]. W stanach patologicznych, np. u pacjentek cierpiących na osteoporozę, równowaga ta jest zaburzona, a to powoduje obniżenie masy kostnej oraz dużej liczby komórek tłuszczowych w szpiku kostnym [56]. Zidentyfikowano wiele czynników, które mają podstawowe znaczenie w procesie różnicowania osteogennego BMSCs. Zmiana ekspresji bądź aktywności tych czynników ma główny wpływ na formowanie kości [16, 56, 57].

Jedną z głównych ról Cx43 w procesach różnicowania BMSC w osteoblasty jest prawdopodobnie zdolność do wykrywania, wzmacniania i koordynacji wymiany sygnałów między komórkami szpiku kostnego a ich niszą [15]. Sygnały te mogą mieć postać sygnalizacji jonów Ca^{2+} . Wykazano, że osteoblasty i osteocyty wymieniają sygnały m.in. w postaci Ca^{2+} w odpowiedzi na takie czynniki jak: hormony, bodźce mechaniczne czy czynniki wzrostu [5]. Wykazano też, że Cx43 bierze udział w regulacji kaskad sygnalizacyjnych z udziałem przekazników o małej masie cząsteczkowej, takich jak: cAMP, polifosforany inozytoli oraz ATP. Uwalnianie ATP zachodzi przez niesparowane kanały Cx43 [34]. Różnicowanie osteogenne BMSCs jest kontrolowane również przez transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β ; transforming growth factor beta) czy białka morfogenetyczne kości (BMP; bone morphogenetic protein). Te zaś przyczyniają się do aktywacji ważnych dla osteogenezy czynników transkrypcyjnych Runx2, Sp7/Osterix czy tych należących do grupy Msh-homeobox, znanych również jako MSX (Mshhomeobox 1, also known as MSX). W dojrzewaniu osteoblastów biorą również udział: insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1; insulin-like growth factor) oraz Wnt [67, 69].

BMP to jedne z najbardziej kościotwórczych czynników wzrostu występujących naturalnie w macierzy kostnej. Należą do nadrodziny transformujących czynników wzrostu TGF- β . Mechanizmy aktywacji receptorów przez ligandy z rodziny TGF- β są podobne do mechanizmów aktywacji receptorów BMP [70]. Przekazywanie sygnału BMP w komórce rozpoczyna się od aktywacji receptorów

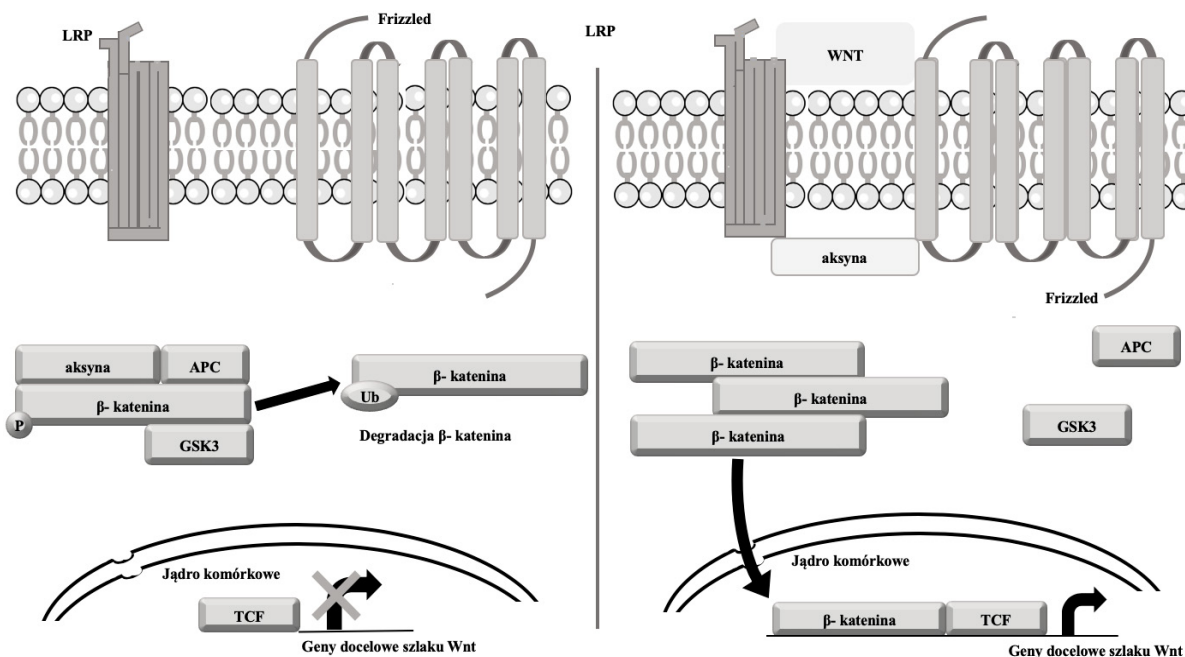


Ryc. 2. Szlaki sygnałowe TGF- β /BMP z uwzględnieniem roli koneksyny-43 (Cx43). Stymulacja ścieżek TGF- β /BMP prowadzi do aktywacji kanonicznych ścieżek Smad (tj. Smad 2/3 dla TGF- β i 1/5/8 dla BMP), a te stymulują transkrypcję Cx43 (wg [51, 73]; zmienione)

błonowych przez ligand. W zależności od konformacji receptora, do którego przyłącza się ligand, aktywowane mogą być dwie alternatywne ścieżki sygnałowe: niekanoniczne, niezależne od białek Smad oraz kanoniczne, z udziałem białek Smad [39]. Wykazano, że TGF- β symuluje ekspresję Cx43 w ludzkich komórkach trofoblastu oraz granulocytych pęcherzyka jajnikowego, natomiast w ludzkich komórkach mięśni gładkich i komórkach wątroby szczura TGF- β zmniejsza ekspresję Cx43. Badania opublikowane przez Liu i wsp. [31] wskazują na stymulującą rolę TGF- β na ekspresję Cx43 w osteocytach poprzez ścieżkę kanoniczną białek Smad. TGF- β wzmaga też proliferację osteoblastów przez aktywację kinaz regulowanych sygnałem zewnętrznym (ERK; extracellular Signac regulated kinase) [18, 31]. Co ważne, podwyższone stężenie białka Cx43 w osteoblastach lub osteocytach również zwiększa sygnalizację ERK (ryc. 2) oraz proliferację komórek osteoplastycznych z nią związaną [53]. Te dwa wyżej opisane mechanizmy podwyższające proliferację osteoblastów mogą działać synergicznie i wspólnie stymulować procesy kościotworzenia. Natomiast inne badania wskazują na brak wpływu BMP-2, -4 i -6 na ekspresję mRNA i białka Cx43 [31, 32]. BMP-2 może jednak zmniejszać poziom fosforyzowanej postaci białka Cx43 w linii komórkowej osteoblastów wywodzącej się ze sklepienia czaszki myszy (MC3T3-E1) [32]. Wykazano również, że TGF- β zwiększa aktywność Cx43, paneksyny-1 i połączeń szczelinowych w osteocytach [32]. Wyniki te potwierdzają, że TGF- β jest czynnikiem pleiotropowym, a jego wpływ na

ekspresję Cx43 zależy od typu komórki. Jedne z najnowszych badań wykazały, że Cx43 współdziała z kanoniczną ścieżką sygnałową BMP i wraz ze Smad1 promuje różnicowanie BMSC do chondrocytów, równocześnie hamując różnicowanie BMSC do osteoblastów [73].

Kompleksy TGF- β /BMP mogą też sygnalizować poprzez ścieżki niekanoniczne, tj. ścieżkę ERK1/2. Zwiększona transkrypcja Cx43 zwiększa aktywność ERK1/2. Globalne usunięcie Cx43 na wczesnym etapie rozwoju myszy powoduje śmierć płodu z powodu upośledzenia funkcji serca [48]. Badania przeprowadzone na wczesnych myszach zarodkach z całościowym usunięciem Cx43 wykazały opóźnione kostnienie zarówno na podłożu błoniastym, jak i chrzęstnym. Podobny fenotyp zaobserwowano w kościach czaszki, a także obojczykach, żebrach, kręgach i kończynach myszy pozbawionych Cx43. W chwili narodzin myszy szkielet osiowy był zbudowany prawidłowo, natomiast kości czaszki wykazywały nieprawidłową mineralizację [44, 48]. Wykazano również powiązania między Cx43 a procesami mineralizacji macierzy międzykomórkowej [48]. Myszy z nokautem Cx43, swoistym dla tkanek szkieletowych, wykazywały opóźnione tworzenie kości i ich zmniejszoną mineralizację. Wyniki innych badań [14] wykazują, że izolowane ze sklepienia czaszki nowo narodzonych myszy osteoblasty z wyciszoną ekspresją Cx43 nie wykazywały ekspresji markerów typowych dla fenotypu osteoblastycznego, takich jak: fosfataza zasadowa, osteokalcyna czy sialoproteina



Ryc. 3. Szlak sygnałowy Wnt. Lewy panel: nieaktywny szlak sygnałowy; β -katenina ulega fosforylacji pod wpływem działania kompleksu degradacyjnego (tj. aksyna, APC i GSK3), a następnie ubikwitynacji i degradacji w cytoplazmie. Nie dochodzi do transkrypcji genów docelowych szlaku Wnt. Prawy panel: aktywny szlak sygnałowy; LRP oraz białka receptorowe sprzężone z białkiem G (tj. Frizzled; family of G protein-coupled receptor proteins) tworzą kompleks receptorowy, do którego przyłącza się najpierw białko Wnt, a następnie aksyna, a to powoduje rozpad kompleksu degradującego β -kateninę, która jest przenoszona do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do czynnika transkrypcyjnego TCF i aktywuje geny docelowe szlaku Wnt (wg [25]; zmieniene)

kostna. Komórki te nie mogły wytwarzać zmineralizowanej macierzy zewnątrzkomórkowej [14]. Szlak Wnt/beta-katenina jest również jednym z głównych szlaków w procesie różnicowania osteogennego komórek macierzystych szpiku kostnego [24]. Gdy ligand Wnt jest nieobecny, beta-katenina ulega fosforylacji, a następnie degradacji, dzięki tzw. kompleksowi degradacyjnemu składającemu się z kinazy syntazy glikogenu-3 beta (GSK-3beta; glycogen synthase kinase 3beta), białka gruczolakowatego polipa okrężnicy (APC; adenomatous polyposis coli) oraz aksyny. Natomiast, jeśli ligandy Wnt są obecne i przyłączają się do receptorów na powierzchni komórki, dochodzi do inaktywacji GSK-3beta, co prowadzi do stabilizacji beta-kateniny oraz jej translokacji do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym beta-katenina przyłącza się do czynnika transkrypcyjnego komórek T (TCF; T-cell factor), a to aktywuje transkrypcję genów docelowych szlaku Wnt (ryc 3.) [22]. Stabilizacja i akumulacja beta-kateniny inicjuje ekspresję docelowych genów szlaku Wnt, powodując jednocześnie zwiększone różnicowanie osteogenne BMSC [23, 57].

Jak wspomniano na wstępie, Cx43 jest najpowszechniej występującą koneksyną wśród komórek kostnych [30]. Badania wykazały, iż zarówno poziom mRNA Cx43, jak i samego białka był podwyższony w komórkach BMSCs różnicujących w kierunku osteoblastów, w porównaniu do komórek nieróżnicujących [29]. Ponadto, komórki z wyciszonym genem kodującym Cx43 wykazywały zmniejszoną mineralizację macierzy międzykomórkowej o ponad 80% oraz zmniejszenie stężenia mRNA Runx2 czy Sp7 nawet

o 90%, co potwierdza, że usunięcie Cx43 hamuje procesy kości otworzenia [29]. Lin i wsp. [29] udowodnili również wpływ Cx43 na szlak GSK-3beta/beta-katenina w komórkach BMSCs. Po indukcji różnicowania osteogennego, poziom nieaktywnej, ufosforylowanej postaci GSK-3beta w komórkach z wyciszonym genem kodującym Cx43 spadał o ponad 40%, a beta-kateniny aż o 80%. Wyniki te wskazują zatem, iż Cx43 jest pozytywnym regulatorem szlaku GSK-3beta/beta-katenina w trakcie procesów kościotworzenia.

Koneksyna-43 niezbędna do utrzymania prawidłowej struktury kości

W kontroli przebudowy tkanki kostnej niezbędne jest oddziaływanie i wzajemny kontakt między kościotwórczymi osteoblastami, kościogubnymi osteoklastami i terminalnie zróżnicowanymi osteocytami zasiedlającymi jamki kostne. Osteocyty są uznawane za centrum przebudowy kości, ponieważ koordynują funkcję osteoblastów i osteoklastów [21]. Osteocyty są najliczniej występującymi komórkami kostnymi i są otoczone zmineralizowaną macierzą kostną. Dzięki długim wypustkom tworzą sieć łączącą zarówno sąsiednie osteocyty, jak i komórki na powierzchni kości, tj. osteoblasty i osteoklasty [6]. Kanały połączeń szczelinowych utworzone przez Cx43 pośredniczą w połączeniu sąsiadujących osteocytów i osteocytów z komórkami na powierzchni kości [35].

Myszy genetycznie zmodyfikowane, pozbawione Cx43 (tj. z delecją *Gja1*^{-/-}), umierają krótko po urodzeniu

z powodu ciężkich wad rozwojowych układu sercowo-naczyniowego. Nieprawidłowości w rozwoju serca są już widoczne w 10. dniu rozwoju zarodkowego [61]. Ponadto szkielet tych myszy wykazuje opóźnioną mineralizację macierzy kostnej i zmniejszoną ekspresję mRNA osteopontyny, osteokalcyny i kolagenu typu I, charakterystycznych dla osteoblastów. Wykazano też niższy potencjał proliferacyjny osteoblastów [11, 22]. Aby uniknąć wysokiej śmiertelności myszy z delecją *Gja1*^{-/-}, opracowano wiele modeli mysich z warunkową delecją, z wykorzystaniem różnych promotorów. Na przykład, w mysim modelu cKOTW2 z delecją genu Cx43, stwierdzono relatywnie małą czaszkę o małym zmineralizowaniu oraz kilka cech dysmorficznych szkieletu, takich jak zmniejszona żuchwa i jama klatki piersiowej, nieco skrócone żebra czy też pomniejszone kości ciemieniowe, piszczelowe oraz udowe [65]. U miesięcznych myszy cKOTW2 całkowita mineralna gęstość kości (BMD; bone mineral density) była zmniejszona aż o 40%, w późniejszym okresie o 8–12% w porównaniu do myszy typu dzikiego. Natomiast powiększone aż o 43% było pole przekroju poprzecznego kości trzonowej. O 41% zmniejszona była też mineralna gęstość kości w porównaniu do kontroli, co powiększało jamę szpikową [60]. Ten fenotyp doprowadził do odkrycia, że Cx43 osteocytów/osteoblastów pośrednio reguluje osteoklastogenezę, gdyż brak Cx43 powoduje wyraźny wzrost liczby osteoklastów na powierzchni śródkostnej, co wiąże się z porowatością korową, charakterystyczną dla zwiększonej resorpcji kości [65]. Rzeczywiście, u myszy cKOTW2 liczba osteoklastów była nieoczekiwanie duża, a komórki szpiku kostnego odznaczały się większą zdolnością generacji osteoklastów w porównaniu do myszy typu dzikiego [65]. Wykazano też, że przy niedoborze Cx43 kości są słabsze, a złamania występują przy mniejszym obciążeniu, niż u osobników typu dzikiego, co sugeruje nieprawidłowe właściwości mechaniczne materiału kostnego [66].

Koneksyna-43 a apoptoza komórek kostnych

Bisfosfoniany są lekami przeciwdziałającymi resorpcji kości, stosowanymi głównie w leczeniu osteoporozy, ale też i innych chorób układu kostnego [46]. Ich działanie polega na zmniejszaniu liczebności progenitorów osteoklastów, zmniejszaniu ich rekrutacji, aktywności resorbcyjnej oraz promowaniu apoptozy osteoklastów [8, 14]. Poza działaniem hamującym osteoklasty, bisfosfoniany promują również przeżycie osteocytów i osteoblastów [3]. Działanie antyapoptyczne bisfosfonianów wymaga obecności otwartych półkanałów Cx43, a następnie aktywacji kinaz ERK [49]. Wykazano, że ekspresja Cx43 jest niezbędna do antyapoptycznego wpływu bisfosfonianów na osteoblasty i osteocyty, ponieważ bisfosfoniany nie wykazywały pożądanych właściwości w liniach komórkowych nieekspresjonujących Cx43 [55]. Aby zbadać rolę Cx43 w działaniu bisfosfonianów *in vivo*, przeprowadzono badania na modelu mysim Cx43 ($\Delta Ob-Ot$), tj. z delecją Cx43 w osteocytach i osteoblastach. Użyty do badań prednizonol (tj. syntetyczny glikokortykosteroid) indukował znaczny wzrost apoptozy osteocytów oraz osteoblastów w kręgach lędźwiowych oraz całkowitą utratę kości

kręgosłupa i udowej u myszy z grupy eksperymentalnej i kontrolnej (myszy Cx43fl/- wykazujące ekspresję jednej kopii genu). Usunięcie więc Cx43 nie miało wpływu na działanie glikokortykosteroidów [71]. Ale po podaniu alendronianu (zaliczanego do grupy bisfosfonianów) u grupy kontrolnej, udało się zapobiec apoptozie osteocytów i osteoblastów indukowanej przez prednizonol, natomiast u grupy eksperymentalnej, pozbawionej koneksyny Cx43 w osteocytach i osteoblastach, alendronian był nieskuteczny [67]. Badania te udowodniły, iż ekspresja Cx43 jest niezbędna do ochronnego działania bisfosfonianów na osteoblasty i osteocyty również *in vivo*.

Mutacje koneksyn a choroby szkieletu

Dysplazja oczno-zębowo-palcowa

Dysplazja oczno-zębowo-palcowa (ODD; oculodentodigital dysplasia) była pierwszą poznaną chorobą powiązaną z mutacją genu kodującego Cx43 (tj. *GJA1*) [7]. Obecnie wykryto prawie 80 różnych mutacji w genie *GJA1* powodujących tę chorobę [27]. Zespół ODD jest rzadką chorobą, w większości przypadków dziedziczną autosomalnie dominującą [5, 7], podczas której pacjenci wykazują objawy wrodzonych deformacji czaszkowo-twarzowych, anomalii w uzębieniu, budowie oczu, ślimaka ucha wewnętrznego i kończyn oraz choroby układu sercowego [20]. Typowe anomalie czaszkowo-twarzowe obejmują cienki nos, małe nozdrza oraz małogłowie. Anomalie obserwowane w okolicy ustnej to przerost żuchwy i rozszczep podniebienia [5, 7]. Anomalie oczu obejmują niedorozwój gałek ocznych, pomniejszoną rogówkę, nieprawidłowości tęczówki, zaćmę oraz jaskrę [7]. Większość przypadków wykazuje nieprawidłowe pierwotne i stałe uzębienie, z nieprawidłową wielkością, hipoplazją szkliwa, próchnicą i wczesną utratą zębów [7]. Nieprawidłowości rąk i stóp w ODD obejmują syndaktylię (tj. zrośnięcie palców) od drugiego do czwartego palca u stóp oraz/lub czwartego i piątego palca u rąk, a także przykurcz zgięciowy palców (tj. kamptodaktylię) [43].

Dysplazja czaszkowo-trzonowa

Dysplazja czaszkowo-trzonowa (CMD; craniometaphyseal dysplasia) jest rzadką chorobą genetyczną powodującą nieprawidłowości w budowie twarzoczaszki oraz kości długich [21, 38]. Do nieprawidłowości twarzoczaszki należą szeroko rozstawione oczy, szeroki grzbiet nosa bądź zwężenie nosa i wydatna żuchwa [21]. Pacjenci chorzy na CMD wykazują przerost kości czaszki, która może powodować zwiększenie ciśnienia śródczaszkowego [57]. Dominująca postać CMD jest spowodowana mutacjami genu *ANKH* kodującego białko transbłonowe związane z transportem pirofosforanu [12]. Niedawno zidentyfikowano nowy gen odpowiedzialny za autosomalną, recesywną postać dysplazji czaszkowo-trzonowej, a mianowicie gen *GJA1* kodujący Cx43 [21]. Co ważne, u pacjentów z recesywną postacią CMD występuje charakterystyczne rozszerzenie trzonu kości długich, opisane jako deformacja kolby Erlenmayera oraz poszerzenie paliczek [21]. Brak wad zębów, oczu i syndaktylii sugeruje, że recesywna postać CMD może nie być jednak częścią ODD.

Cx43 w odpowiedzi na bodźce

Stymulacja hormonalna

Parathormon (PTH; parathormon) jest to hormon przynależny, niezbędny do prawidłowej gospodarki wapnia w organizmie. W kościach PTH stymuluje resorpcję kości przez osteoklasty, powodując uwalnianie wapnia [37]. W przeciwieństwie do zwiększonej resorpcji kości wywołanej przedłużoną ekspozycją na PTH, parathormon podawany w odpowiedniej dawce i w krótszym czasie aktywuje tworzenie kości i zwiększa masę kostną [26]. Ponadto wykazano, iż ekspresja genów osteoplastycznych, tj. osteokalcyny, kolagenu-1 i fosfatazy zasadowej również była zwiększona u myszy nastrzykiwanych PTH [44]. Badania przeprowadzone na modelu mysim wskazują, że selektywne usunięcie Cx43 w osteoblastach znacznie zmniejsza szczytową masę kości, jednak nie prowadzi do wad rozwojowych po urodzeniu. Silnie osłabia także odpowiedź anaboliczną kości na przerywane podawanie PTH. Nieprawidłowości te są spowodowane defektem funkcjonalnym komórek tworzących kość, które nie zwiększają swojej aktywności w odpowiedzi na bodziec hormonalny. Zatem funkcjonalna Cx43 jest wymagana do prawidłowego pozyskiwania i utrzymywania masy kostnej i bierze udział w mechanizmie działania anabolizmu indukowanego PTH [14]. Chociaż mechanizmy, za pomocą których Cx43 moduluje tę odpowiedź hormonalną nie są wyjaśnione, wyniki te podkreślają znaczenie Cx43 w odpowiedziach adaptacyjnych na stymulację hormonalną.

Stymulacja mechaniczna

Uwzględniając to, że osteocyty są uważane za komórki mechanosensoryczne w kości, są otoczone macierzą kostną, mogą komunikować się między sobą oraz z komórkami na powierzchni kości zarówno przez koneksyny, jak i kanały połączeń szczelinowych, od dawna sugerowano, że kanały Cx43 pośredniczą w mechanicznej stymulacji kości. Wraz z rzęską pierwotną, integrynami i płytkami przylegania, Cx43 tworzy aparat mechanosensoryczny, dzięki któremu komórka może odbierać bodźce mechaniczne z przestrzeni zewnątrzkomórkowej [2]. Osteoblasty i osteocyty wykazują duże stężenie Cx43, a stymulacja mechaniczna ma znaczący wpływ na funkcje związane z Cx43 w obu typach komórek [2]. Wykazano, iż stymulacja mechaniczna *in vitro* z użyciem specjalnej komory przepływowej (tj. parallel-plate fluid flow chamber) oraz stymulacja mechaniczna *in vivo* przez obciążanie kości, zwiększają ekspresję Cx43 w osteocytach i osteoblastach [62, 63].

Prostaglandyny są szkieletowymi środkami anabolicznymi, a podawanie ich może zwiększać masę kostną [31] czy też stymulować tworzenie kości *in vitro* w hodowli narządów [33]. Badania wykazały, iż półkanały utworzone przez Cx43 tworzą bezpośrednią ścieżkę uwalniania wewnątrzkomórkowej prostaglandyny E2 (PGE2; prostaglandin E2) w osteocytach indukowanych przez naprężenie ścinające przy przepływie płynu (FFSS; fluid flows hear stress) [13].

Stymulacja FFSS zwiększa uwalnianie PGE2, a uwolniona PGE2 działa w sposób autokryny, stymulując funkcję połączeń szczelinowych i ekspresję Cx43 [24, 50]. Zależność między PGE2 a Cx43 może być wykorzystana w przyszłości w urazach kostnych. Najnowsze prace [13] sugerują, że użycie pozaustrojowej fali uderzeniowej (ESW; extracorporeal shock wave) może poprawić gojenie złamań lub przywrócić nieudany proces gojenia, wykorzystując stymulujący wpływ PGE2 na powstawanie połączeń szczelinowych w tkance kostnej [13]. Na podstawie obserwacji *in vitro* zakładano, iż odpowiedź na stymulację mechaniczną wymaga ekspresji Cx43 *in vivo*. Zgodnie z tą tezą u myszy szczepu Cx43fl/-; Col1a1-2.3kb-Cre, u których Cx43 jest usunięta z osteoblastów i osteocytów, wykazano osłabioną odpowiedź piszczeli na działanie stymulacji mechanicznej wywołanej jej obciążeniem przez zginanie trzypunktowe [43]. Co ważne, zastosowany protokół obciążenia kości piszczelowej powodował, iż obciążenie to uszkadzało kość, a zatem nie był reprezentatywny dla obciążeń fizjologicznych. Natomiast inne badania z wykorzystaniem obciążeń zgodnych z aktywnością fizjologiczną, wykazały zaskakująco zwiększoną odpowiedź anaboliczną na obciążenie okostnej u myszy Cx43fl/fl; OCN-Cre pozbawionych Cx43 w osteoblastach i osteocytach [72]. Podobnie, usunięcie Cx43 tylko z osteocytów (Cx43fl/fl; DMP1-Cre) było wystarczające do zwiększenia odpowiedzi anabolicznej na obciążenie mechaniczne na powierzchni okostnej [4]. Wyniki te sugerują, że ekspresja Cx43 w osteocytach ogranicza odpowiedź anaboliczną na obciążenie mechaniczne na powierzchni okostnej.

PODSUMOWANIE

Połączenia szczelinowe i budujące je białka koneksynowe są obecne we wszystkich rodzajach komórek kostnych i stanowią bardzo ważny element umożliwiający komunikację sąsiadujących ze sobą komórek. Najliczniej występującą koneksyną tkanki kostnej jest Cx43 i jest ona czynnikiem niezwykle istotnym w prawidłowym formowaniu kości. Najlepszym na to dowodem są defekty w budowie szkieletu, m.in. nieprawidłowości w budowie czaszki oraz kończyn, w przypadku modeli mysich z brakiem ekspresji Cx43 w kościach. Jeśli dochodzi do mutacji w genie kodującym Cx43, również widoczne są wady budowy szkieletu opisane w chorobach genetycznych, takich jak dysplazja oczno-zębowa-palcowa i dysplazja czaszkowo-trzonowa. Cx43 ma również wpływ na działanie antyapoptyczne bisfosfonianów, czynników farmakologicznych używanych w celu zwalczania schorzeń szkieletu. Badania *in vitro* i *in vivo* dostarczyły dowodów na rolę Cx43 w odpowiedzi na bodźce fizyczne i chemiczne, takie jak stymulacja mechaniczna oraz hormonalna. Niedawne badania wykazały, że poza Cx43, ważnym czynnikiem w prawidłowym powstawaniu kości może być koneksyna-37, ponieważ modele mysie z brakiem ekspresji tego białka wykazywały zwiększoną masę kostną. W tkance kostnej odnotowano również obecność koneksyn-45 oraz -46. Dotąd nie poznano ich funkcji w kościach, dlatego konieczne są dalsze badania dotyczące roli koneksyn w procesach kościotworzenia.

PIŚMIENICTWO

- [1] Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M.: Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost. *Stem Cells*, 2019; 37: 855–864
- [2] Batra N., Kar R., Jiang J.X.: Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1818: 1909–1918
- [3] Bellido T., Plotkin L.I.: Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*, 2011; 49: 50–55
- [4] Bivi N., PachecoCosta R., Brun L.R., Murphy T.R., Farlow, N.R., Robling A.G., Bellido T., Plotkin L.I.: Absence of Cx43 selectively from osteocytes enhances responsiveness to mechanical force in mice. *J. Orthop. Res.*, 2013; 31: 1075–1081
- [5] Bonewald L.F.: The role of the osteocyte in bone and non-bone disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2017; 46: 1–18
- [6] Bonewald L.F.: The amazing osteocyte. *J. Bone. Miner. Res.*, 2011; 26: 229–238
- [7] Boyden L.M., Craiglow B.G., Zhou J., Hu R., Loring E.C., Morel K.D., Lauren C.T., Lifton R.P., Bilguvar K., Paller A.S., Choate K.A.: Dominant de novo mutations in GJA1 cause erythrokeratoderma variabilis et progressiva, without features of oculodentodigital dysplasia. *J. Invest. Dermatol.*, 2015; 135: 1540–1547
- [8] Briot K., Roux C.: Glucocorticoid-induced osteoporosis. *RMD Open*, 2015: 1–8
- [9] Brodzikowska A., Wojtowicz A., Galus R., Włodarski K.: Czynniki transkrypcyjne w regulacji osteoblastogenezy i udział osteoblastów w regulacji osteoklastogenezy. *Chir. Narządów Ruchu Ortop. Pol.*, 2016; 81: 1–5
- [10] Bruderer M., Richards R.G., Alini M., Stoddart M.J.: Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur. Cell. Mater.*, 2014; 28: 269–286
- [11] Chaible L.M., Sanches D.S., Cogliati B., Mennecier G., Dagli M.L.: Delayed osteoblastic differentiation and bone development in Cx43 knockout mice. *Toxicol. Pathol.*, 2011; 39: 1046–1055
- [12] Chen I.P., Wang, L., Jiang X., Aguila H.L., Reichenberger E.J.: A Phe377del mutation in ANK leads to impaired osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in a mouse model for craniometaphyseal dysplasia (CMD). *Hum. Mol. Genet.*, 2011; 20: 948–961
- [13] Chen Y., Xu J., Liao H., Ma Z., Zhang Y., Chen H., Huang Z., Hu J.: Prostaglandin E2 and Connexin 43 crosstalk in the osteogenesis induced by extracorporeal shockwave. *Med. Hypotheses*, 2016; 94: 123–125
- [14] Chung D.J., Castro C. H., Watkins M., Stains J. P., Chung M.Y., Szejnfeld V.L., Willecke K., Theis M., Civitelli R.: Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin 43. *J. Cell. Sci.*, 2006, 119: 4187–4198
- [15] Ellison D., Mugler A., Brennan M.D., Lee S.H., Huebner R.J., Shamir E.R., Woo L.A., Kim J., Amar P., Nemenman I., Ewald A.J., Levchenko A.: Cell-cell communication enhances the capacity of cell ensembles to sense shallow gradients during morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016; 113: 679–688
- [16] Fakhry M., Hamade E., Badran B., Buchet R., Magne D.: Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J. Stem. Cells.*, 2013; 5: 136–148
- [17] Florencio-Silva R., Sasso G.R., Sasso-Cerri E., Simões M.J., Cerri P.S.: Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.*, 2015; 2015: 421746
- [18] Ghayor C., Rey A., Caverzasio J.: Prostaglandin-dependent activation of ERK mediates cell proliferation induced by transforming growth factor β in mouse osteoblastic cells. *Bone*, 2005; 36: 93–100
- [19] Giaume J.A. Sáez J.C.: Role of connexin hemichannels in neurodegeneration. W: *Neurodegenerative Diseases-Processes*. Intech Open, red.: Chuen-Chung Chang R. London 2011, 235–254
- [20] Gradowski M., Jankiewicz U., Kowalczyk P.: Human diseases caused by mutations in genes encoding connexin. *Nowa Medycyna*. 2013; 4: 168–173
- [21] Hu Y., Chen I.P., de Almeida S., Tiziani V., Do Amaral C.M., Gowrishankar K., Passos-Bueno M.R., Reichenberger E.J.: A novel autosomal recessive GJA1 missense mutation linked to Craniometaphyseal dysplasia. *PLoS One*, 2013; 8: e73576
- [22] Ishikawa M., Williams G. L., Ikeuchi T., Sakai K., Fukumoto S., Yamada, Y.: Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns. *J. Cell Sci.*, 2016; 129: 1018–1030
- [23] Katoh M., Katoh M.: Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases. *Int. J. Mol. Med.*, 2017; 40: 587–606
- [24] Kim J.H., Liu J.H., Wang J., Chen X., Zhang H., Kim S.H., Cui J., Li R., Zhang W., Kong Y., Zhang J., Shui W., Lamplot J., Rogers M.R., Zhao C. i wsp.: Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.*, 2013; 5: 13–31
- [25] Koziański K., Dobrzyń, A.: Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1098–1108
- [26] Kuo S.W., Rimando M.G., Liu Y.S., Lee O.K.: Intermittent administration of parathyroid hormone 1-34 enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by regulating protein kinase C δ . *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18: 2221
- [27] Laird D.W.: Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett.*, 2014; 588: 1339–1348
- [28] Leithe E., Sirnes S., Fykerud T., Kjenseth A., Rivedal E.: Endocytosis and post-endocytic sorting of connexins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1818: 1870–1879
- [29] Lin F.X., Zheng G.Z., Chang B., Chen R.C., Zhang Q.H., Xie P., Xie D., Yu G.Y., Hu Q.X., Liu D.Z., Du S.X., Li X.D.: Connexin 43 modulates osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through GSK-3 β /beta-catenin signaling pathways. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018; 47: 161–175
- [30] Lisowska B., Kosson D., Domaracka K.: Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2018; 12: 1753–1758
- [31] Liu W., Cui Y., Sun J., Cai L., Xie J.N., Zhou, X.: Transforming growth factor- β 1 up-regulates connexin43 expression in osteocytes via canonical Smad-dependent signaling pathway. *Biosci. Rep.*, 2018; 38: BSR20181678
- [32] Liu W., Zhang D., Li X., Zheng L., Cui C., Cui Y., Sun J., Xie J., Zhou X.: TGF- β 1 facilitates cell-cell communication in osteocytes via connexin43-and pannexin1-dependent gap junctions. *Cell Death Discov.*, 2019, 5: 141

- [33] Lloyd S.A., Loisel A.E., Zhang Y., Donahue H.J.: Shifting paradigms on the role of connexin43 in the skeletal response to mechanical load. *J. Bone Miner. Res.*, 2014; 29: 275–286
- [34] Lohman A.W., Isakson B.E.: Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett.*, 2014; 588: 1379–1388
- [35] Loisel A.E., Jiang J.X., Donahue H.J.: Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*, 2013; 54: 205–212
- [36] Loisel A.E., Paul E.M., Lewis G.S., Donahue H.J.: Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. *J. Orthop. Res.*, 2013; 31: 147–154
- [37] Long F.: Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2012; 13: 27–38
- [38] Martin K., Nathwani S., Bunyan R.: Craniometaphyseal dysplasia: A review and novel oral manifestation. *J. Oral. Biol. Craniofac. Res.*, 2017; 2: 134–136
- [39] Maxhimer J.B., Bradley J.P., Lee J.C.: Signaling pathways in osteogenesis and osteoclastogenesis: Lessons from cranial sutures and applications to regenerative medicine. *Genes Dis.*, 2015; 2: 57–68
- [40] Moorer M.C., Stains J.P.: Connexin43 and the intercellular signaling network regulating skeletal remodeling. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2017; 15: 24–31
- [41] Mu C., Lv T., Wang Z., Ma S., Ma J., Liu J., Yu J., Mu J.: Mechanical stress stimulates the osteo/odontoblastic differentiation of human stem cells from apical papilla via erk 1/2 and JNK MAPK pathways. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 494376
- [42] Oshima A.: Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett.*, 2014; 588: 1230–1237
- [43] Pace N.P., Benoit V., Agius D., Grima M.A., Parascandolo R., Hilbert P., Borg I.: Two novel GJA1 variants in oculodentodigital dysplasia. *Mol. Genet. Genomic Med.*, 2019; 7: 882
- [44] Pacheco-Costa R., Davis H.M., Sorenson C., Hon M.C., Hassan I., Reginato R.D., Allen M.R., Bellido T., Plotkin L.I.: Defective cancellous bone structure and abnormal response to PTH in cortical bone of mice lacking Cx43 cytoplasmic C-terminus domain. *Bone*, 2015; 81: 632–643
- [45] Pacheco-Costa R., Hassan I., Reginato R.D., Davis H.M., Bruzsaniti A., Allen M.R., Plotkin L.I.: High bone mass in mice lacking Cx37 because of defective osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 8508–8520
- [46] Pazianas M., van der Geest S., Miller P.: Bisphosphonates and bone quality. *Bonekey Rep.*, 2014; 3: 529
- [47] Plotkin L.I.: Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front. Physiol.*, 2014; 5: 131
- [48] Plotkin L.I., Laird D.W., Amedee J.: Role of connexins and pannexins during ontogeny, regeneration, and pathologies of bone. *BMC Cell Biol.*, 2016; 17: 19
- [49] Plotkin L.I., Manolagas S.C., Bellido T.: Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 8648–8657
- [50] Plotkin L.I., Speacht T.L., Donahue H.J.: Cx43 and mechanotransduction in bone. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2015; 13: 67–72
- [51] Rahman M.S., Akhtar N., Jamil H.M., Banik R.S., Asaduzzaman S.M.: TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.*, 2015; 3: 15005
- [52] Ribeiro-Rodrigues T.M., Martins-Marques T., Morel S., Kwak B.R., Girão H.: Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication—gap junctions, extracellular vesicles and tunneling nanotubes. *J. Cell. Sci.*, 2017; 130: 3619–3630
- [53] Rodríguez-Carballo E., Gámez B., Ventura, F.: p38 MAPK signaling in osteoblast differentiation. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2016; 4: 40
- [54] Rutkowski R., Koszyła-Hojna B., Kańczuga-Koda L., Sulkowska M., Sulkowski S., Rutkowski K., Bronchoskopii S.P.: Struktura i fizjologiczna funkcja białek koneksynowych Structure and physiological function of connexin proteins. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 632–641
- [55] Sadr-Eshkevari P., Ashnagar S., Rashad A., Dietz M., Jackowski J., Abdulazim A., Prochnow N.: Bisphosphonates and connexin 43: a critical review of evidence. *Cell Commun. Adhes.*, 2014; 21: 241–247
- [56] Savopoulos C., Dokos C., Kaiafa G., Hatzitolios A.: Adipogenesis and osteoblastogenesis: trans-differentiation in the pathophysiology of bone disorders. *Hippokratia*, 2011; 15: 18–21
- [57] Singh S., Qin C., Medarametla S., Hegde S.V.: Craniometaphyseal dysplasia in a 14-month old: a case report and review of imaging differential diagnosis. *Radiol. Case Rep.*, 2016; 11: 260–265
- [58] Sinha K.M., Zhou X.: Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.*, 2013; 114: 975–984
- [59] Stains J.P., Civitelli R.: Connexins in the skeleton. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2016; 50: 31–39
- [60] Stains J.P., Watkins M.P., Grimston S.K., Hebert C., Civitelli R.: Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin 43. *Calcif Tissue Int.*, 2014; 94: 55–67
- [61] Ton Q.V., Iovine M.K.: Determining how defects in connexin43 cause skeletal disease. *Genesis*, 2013; 51: 75–82
- [62] Tu X., Rhee Y., Condon K., Bivi N., Allen M.R., Dwyer D., Stolina M., Turner C.H., Robling A.G., Plotkin L.I., Bellido T.: Sost down-regulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*, 2012; 50: 209–217
- [63] Vazquez M., Evans B.A., Riccardi D., Evans S.L., Ralphs J.R., Dillingham C.M., Mason D.J.: A new method to investigate how mechanical loading of osteocytes controls osteoblasts. *Front. Endocrinol.*, 2014; 5: 208
- [64] Verheule S., Kaese S.: Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front. Pharmacol.*, 2013; 4: 81
- [65] Watkins M., Grimston S.K., Norris J.Y., Guillotin B., Shaw A., Beniash E., Civitelli R.: Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. *Mol. Biol. Cell.*, 2011; 22: 1240–1251
- [66] Wheeler G., Elshahaly M., Tuck S.P., Datta H.K., van Laar J.M.: The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J. Transl. Med.*, 2013; 11: 201
- [67] Witkowska-Zimny M., Wróbel E., Przybylski J.: Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy. *Postępy Biol. Kom.*, 2009; 36: 695–705
- [68] Wróbel E., Leszczynska J., Przybylski J.: Rola połączeń typu Gap w komórkach tkanki kostnej. *Postępy Biochem.*, 2011; 57: 4
- [69] Wu J., Zhang W., Ran Q., Xiang Y., Zhong J.F., Li S.C., Li Z.: The differentiation balance of bone marrow mesenchymal stem cells is crucial to hematopoiesis. *Stem Cells Int.*, 2018; 2018: 1540148
- [70] Wu M., Chen G., Li Y.P.: TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.*, 2016; 4: 16009

[71] Xu X.L., Gou W.L., Wang A.Y., Wang Y., Guo Q.Y., Lu Q., Lu S.B., Peng J.: Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years? *J. Transl. Med.*, 2013, 11: 303

[72] Zhang Y., Paul E.M., Sathyendra V., Davison A., Sharkey N., Bronson S., Srinivasan S., Gross T.S., Donahue H.J.: Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS One*, 2011; 6: 23516

[73] Zhang Y.D., Zhao S.C., Zhu Z.S., Wang Y.F., Liu J.X., Zhang Z.C., Xue F.: Cx43-and smad-mediated TGF- β /BMP signaling pathway promotes cartilage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and inhibits osteoblast differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2017; 42: 1277–1293

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.