

## GAP JUNCTIONS: FROM BIOLOGY TO THERAPEUTICAL APPLICATIONS

### LE GAP JUNCTIONS: DALLA BIOLOGIA ALLE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Francesco La Delia

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Università degli Studi di Catania

Correspondence: fladelia@unict.it

**CAPSULA EBURNEA, 2(13):1-5, 2007.**

Received: 16th August 2007, Revised: 3rd September 2007, Accepted: 19th September 2007

**Abstract.** Connexins form a multigene family of polytopic membrane proteins that, in vertebrates, are the constitutive subunits of intercellular channels and provide the structural basis for electrical coupling.

The appearance of electrical coupling in the nervous system is developmentally regulated and restricted to distinct cell types. Electrical coupling between neurons persists after the establishment of chemical transmission, thus suggesting that this form of cell-cell signalling may be functionally interrelated with, rather than alternative to chemical transmission. Furthermore, evidence for the possible role of gap junctions in human neurological diseases is also mounting, raising new questions on the significance of connexin diversity and on their functional role in the nervous system.

#### KEYWORDS

Gap junctions, pannexins, connexins, central nervous system.

#### Introduzione

Le Gap Junctions (GJ) sono degli organuli citoplasmatici specializzati, presenti in tutti gli organismi multicellulari, costituiti da gruppi di canali intercellulari che mettono in comunicazione il citoplasma di cellule adiacenti, permettendo così il passaggio di ioni, piccoli metaboliti e secondi messaggeri. In tal modo esse rappresentano il substrato anatomico della sincronizzazione intercellulare e della cooperazione metabolica. La comunicazione intercellulare attraverso le GJ svolge un ruolo importante in diversi meccanismi fisiologici, come il controllo della crescita e della proliferazione cellulare, del differenziamento e della morfogenesi embrionale, nonché nel mantenimento dell'omeostasi. Infine, esse sono alla base dell'accoppiamento elettronico [1] di fondamentale importanza in tessuti elettricamente eccitabili, quali il muscolo cardia-

**Abstract.** Le connessine formano una famiglia di proteine di membrana che, nei vertebrati, rappresentano le subunità costitutive dei canali intercellulari giocando un ruolo fondamentale nell'accoppiamento elettrico cellulare. Quest'ultimo, nel sistema nervoso centrale, è finemente regolato durante lo sviluppo embrionale ed è caratteristico di alcuni gruppi cellulari. L'accoppiamento elettrico tra neuroni persiste anche dopo lo stabilirsi di sinapsi chimiche, suggerendo che l'accoppiamento cellula-cellula mediante gap junctions rappresenti una forma di comunicazione integrativa piuttosto che alternativa a quella chimica. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato come alcune patologie del sistema nervoso centrale siano associate a mutazioni dei geni delle gap junctions, suggerendo ed aprendo nuovi scenari sul possibile significato e funzione di questa classe di proteine.

#### PAROLE CHIAVE

Gap junctions, pannexine, connessine, sistema nervoso centrale.

co e il muscolo liscio dell'utero. In queste strutture le GJ stabiliscono connessioni elettriche dirette che provvedono ad integrare il tessuto muscolare, rendendolo un'unica unità funzionale [2-6].

Recentemente è stato dimostrato che le GJ intervengono in una moltitudine di processi sia fisiologici che patologici, stimolando numerosi ricercatori a studiare i meccanismi molecolari che sottendono alle funzioni di questa classe di proteine. Tali studi hanno permesso di mettere in luce, almeno in parte, il significato fisiopatologico delle GJ, ponendo le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per diverse patologie come tumori e malattie neurodegenerative.

In questa breve review ci dedicheremo alla descrizione della struttura delle GJ, del loro significato fisiologico e del loro possibile impiego come target di nuovi farmaci con

particolare riferimento al sistema nervoso centrale.

### Struttura delle GJ

Nelle giunzioni comunicanti, le membrane plasmatiche delle due cellule adiacenti sono separate da uno spazio molto regolare di 2 o 3 nm, da cui, infatti, deriva il termine gap, che indica, appunto, separazione regolare (fig. 1).

Utilizzando la colorazione con idrossido di lantano, è stata dimostrata la presenza di un gran numero di cilindri cavi disposti con l'asse maggiore perpendicolare alla superficie delle cellule che attraversano lo spazio intercellulare delle giunzioni comunicanti. I cilindri cavi sono facilmente visibili in sezioni parallele alla superficie della membrana [7]. Nei vertebrati lo stretto canale che si trova al centro del cilindro ha un diametro di circa 1,5 nm nel punto più stretto, dimensione sufficiente a permettere il libero transito di ioni e di molecole di una certa grandezza.

Ciascuna delle due cellule adiacenti contribuisce alla formazione del canale con un emicanale chiamato connessione. Si tratta di una struttura esamerica, costituita quindi da 6 proteine strutturali, ciascuna delle quali prende il nome di Connessione [1, 8, 9, 10].

Finora sono stati trovati 20 geni per le connessioni nel topo e 21 nel genoma umano [11]. Il profilo d'espressione dei geni conosciuti per le connessioni (abbreviate come Cx e seguite dal loro peso molecolare in kDa) indica che sono abbondantemente distribuite nei vertebrati inferiori e supe-

riori, sia durante lo sviluppo che nell'organismo adulto, mentre risultano assenti in spermatozoi, eritrociti, trombociti e nel muscolo scheletrico dell'adulto [12].

Fino a poco tempo fa, si pensava che le connessioni fossero l'unica componente molecolare delle GJ nei vertebrati.

Recentemente è stata identificata una nuova classe di geni, denominata Pannessine, omologhi delle annessine degli invertebrati [13], coinvolti probabilmente nella formazione di canali intercellulari per la diretta comunicazione cellula-cellula.

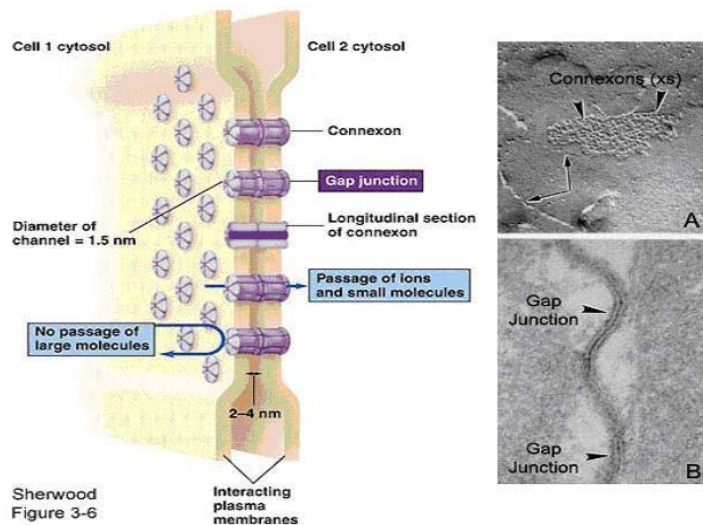
### Le GJ neuronali

Le GJ neuronali sono state inizialmente caratterizzate mediante registrazioni elettrofisiologiche e successivamente studiate dal punto di vista morfologico usando il microscopio elettronico e la tecnica freeze-fracture. Le prime evidenze sulle sinapsi elettriche sono state ottenute dalle sinapsi motorie del gambero [14] e da singole cellule che trasmettevano nel nucleo mesencefalico del V nervo cranico, nel nucleo vestibolare [15] e nel nucleo olivare inferiore di gatti e ratti [16]. Da allora sono state pubblicate numerose evidenze morfologiche per le GJ [17] ed evidenze fisiologiche riguardo all'accoppiamento tra i neuroni in molte aree del sistema nervoso centrale di mammiferi adulti [16, 18].

Nel cervello di mammifero adulto la maggior parte dei neuroni forma sinapsi elettriche. Recenti studi hanno pure mostrato un debole accoppiamento elettrico tra i neuroni e le cellule gliali, almeno in alcune

Figura 1: Struttura delle connessioni: nel presente modello, la gap junction è rappresentata come

un canale formato tra due membrane cellulari, separate da uno spazio di circa 2-3nm. Entrambe le membrane contengono un emicanale (connessione) formato da sei subunità di connessione. Ciascuna subunità presenta quattro eliche transmembrana. Due connessioni si uniscono a livello dello spazio intermembrana per formare un canale completo del diametro di circa 1.5-2 nm di diametro che permette la comunicazione tra il citoplasma delle due cellule adiacenti. (figura modificata da: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/gap-junctions.html>).



zone del locus coeruleus [19], o tra i neuroni del Purkinje e le cellule gliali di Bergmann nel cervelletto [20]. Le sinapsi elettriche possono essere co-esprese con le sinapsi chimiche.

In termini di proprietà elettrofisiologiche, le sinapsi elettriche hanno come caratteristica la trasmissione di stimoli a bassa frequenza e di potenziali a bassa soglia che favoriscono l'attività sincrona. I canali delle GJ possono contribuire all'affinamento dell'attività neuronale sincronizzando gruppi di neuroni (inclusa la loro attività oscillatoria) a differenti bande di frequenza, che si pensa siano alla base dei vari processi cognitivi, come la percezione, la memoria e l'apprendimento. Sebbene la trasmissione chimica eccitatoria e inibitoria (spesso reciproca) sia sufficiente per un'attività oscillatoria sincrona, la precisione e il potere di una simile attività sono ridotte in assenza delle GJ [18]. Poiché i pori delle sinapsi elettriche sono relativamente larghi (16-20 Å di diametro), permettono il passaggio di correnti ioniche (principalmente K<sup>+</sup>) ed anche di secondi messaggeri come l'inositolo-1,4,5- trifosfato e l'AMP ciclico (cAMP) [21]. Inoltre nel pesce rosso è stata scoperta una seconda varietà di sinapsi elettrica: la cosiddetta sinapsi elettrica mista, tra le efferenze uditive di Mauthner, le quali sono cellule caratteristiche del pesce che ricevono informazioni acustiche e generano una risposta di fuga. Le sinapsi miste permettono una trasmissione elettrica e chimica in un singolo contatto sinaptico e sono state trovate in diverse regioni del sistema nervoso centrale di mammifero [22, 23].

### Connessine, Pannessine, Innessine

Studi recenti hanno messo in relazione le tre famiglie di geni che codificano per le proteine delle GJ.

Sono state allineate le parti rappresentative della sequenza delle tre proteine (connessine, pannessine, innessine). I risultati ottenuti mostrano che le divergenze tra connessine e pannessine sono leggermente maggiori rispetto al confronto tra innessine e pannessine, mentre le differenze tra connessine e innessine sono molto evidenti. Si potrebbe pensare, quindi, che innessine e pannessine possano essere membri di una grande superfamiglia [23, 24]. È chiaro invece che le connessine non sono correlate alle innessine e che queste

due famiglie di geni non si trovano negli stessi organismi [19, 25].

### Struttura e distribuzione delle Pannessine

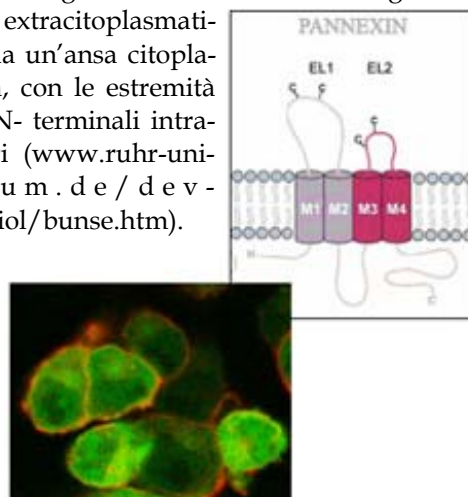
L'analisi filogenetica ha rivelato che le pannessine sono altamente conservate in vermi, molluschi, insetti e mammiferi, indicando che svolgono una importante funzione [24]. Sia le pannessine che le innessine sono costituite da 4 regioni transmembrana, collegate da 2 anse extracitoplasmatiche e da un'ansa citoplasmatica, con le estremità C- e N- terminali intracellulari [24] (fig. 2). Le regioni C- ed N- terminali delle differenti Panxs hanno differenti sequenze che potrebbero essere responsabili delle caratteristiche peculiarità di ciascuna di esse.

Il genoma umano contiene 3 geni codificanti le pannessine, rispettivamente soprannominati Panx1, Panx2, Panx3: i primi due sono espressi nel sistema nervoso centrale [24, 29].

Studi *in situ* hybridization hanno dimostrato l'estesa espressione di entrambi i trascritti della Panx1 e della Panx2 in molte regioni del cervello, come ad esempio nella corteccia, nello striato, nel bulbo olfattivo, nell'ippocampo e nel cervelletto, sebbene con alcune differenze. La Panx1 forma canali comunicanti omeomerici ed eteromerici in combinazione con la Panx2 [29], indicando che le pannessine probabilmente rappresentano un'altra classe di proteine formanti le GJ.

Inoltre è stato effettuato uno studio del pattern di espressione della Panx1 e della Panx2 durante lo sviluppo e la maturazio-

*Figura 2:* Struttura delle pannessine: sono costituite da 4 regioni transmembrana, collegate da 2 anse extracitoplasmatiche e da un'ansa citoplasmatica, con le estremità C- ed N- terminali intracellulari ([www.ruhr-unibocchum.de/dev-neurobiol/bunse.htm](http://www.ruhr-unibocchum.de/dev-neurobiol/bunse.htm)).



ne del cervello di ratto utilizzando una combinazione radioattiva e non radioattiva in situ hybridization [26]. I risultati ottenuti hanno rivelato un'estesa e simile distribuzione dell'mRNA per entrambi i geni, ma indicavano che la Panx1 e la Panx2 erano inversamente regolate durante lo sviluppo del cervello di ratto. Infatti, la Panx1 è espressa in maniera considerevole nel cervello di embrione e post-natale ma si riduce considerevolmente nell'adulto, mentre la Panx2 è bassa nel cervello prenatale, ma aumenta notevolmente durante lo sviluppo post-natale.

Recentissimi studi hanno inoltre dato evidenze sperimentali della localizzazione della Panx1 a livello post-sinaptico [27].

La presenza post-sinaptica è stata convalidata dalla co-localizzazione della Panx1 con la PSD-95 (post-synaptic density protein-95) una importante proteina di struttura post-sinaptica, nei neuroni dell'ippocampo. L'evidenza è supportata dal fatto che la Panx1 è capace di operare sotto forma di singoli pannessoni [28-31], i quali a differenza degli emicanali delle connessine, sono supportati da proprietà biofisiche che permettono, quindi, l'attivazione del canale dietro determinate condizioni fisiologiche.

Tali pannessoni sono insensibili alle variazioni di concentrazione del  $Ca^{++}$  extracellulare al di sopra di un certo livello [30], e si aprono a potenziali di riposo negativi in risposta a stimoli meccanici e a micromolecolari aumenti del  $Ca^{++}$  intracellulare. In combinazione con la sensibilità all'ATP extracellulare attraverso i recettori purinergici del tipo P2Y [31], è stato postulato che una principale funzione della Panx1 sia di costituire canali per il rilascio di ATP mediante la propagazione extracellulare di onde rigenerative di ione  $Ca^{++}$ .

Una localizzazione post-sinaptica di un canale per il rilascio dell'ATP costituito da Panx1 che risponde alle variazioni di concentrazione intracellulare di ione  $Ca^{++}$  o extracellulare di ATP potrebbe quindi giocare un ruolo strategico nell'innescare di un'attività  $Ca^{++}$ -dipendente.

### Conclusioni

Le GJ sembrerebbero giocare un ruolo fondamentale nella formazione di canali e di emicanali partecipando nei processi sensoriali, nella plasticità ippocampale, nella sincronizzazione tra ippocampo e cortec-

cia, e propagazione delle correnti del  $Ca^{++}$  degli astrociti che supporterebbero e modulerebbero il metabolismo neuronale. Inoltre, le GJ avrebbero un ruolo fondamentale nella tumorigenesi in particolari forme tumorali come il glioma.

### Bibliografia

1. Bennet MV, Barrio LC, Bargello TA, Spray DC, Hertzberg E and Saez JC: Gap junction: new tools, answers, new questions. *Neuron* 1991; 6: 305-7.
2. Page E and Shibata T: Permeable junction between Cardiac cells. *Ann Rev Physiol* 1981; 43: 431-41.
3. Miller SM, Garfield RE and Daniel EE: Improved propagation in myometrium associated with gap junction during parturition. *Am J Physiol* 1989; 256: C130-C141.
4. Spray DC and Burt JM: Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 1990; 258: C195-C205.
5. Huizing JD, Liu L, W.C., Blennerhassett M.G., Thunenberg L. and Molleman A. (1992). Intercellular communication in smooth muscle. *Experientia* 48, 932-41.
6. De Mello WC: Gap junctional communication in excitable tissue; the heart as a paradigm. *Prog Biophys Mol Biol* 1994; 61: 1-35.
7. Revel JP and Karnovsky MJ: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of mouse heart and liver. *J Cell Biol* 1967; 33: C7-C12.
8. Beyer EC, Paul DL, and Goodnough DA: Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 1990; 116: 187-94.
9. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U and Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Boil Chem* 2002; 383: 725.737.
10. Bruzzone R, White TW, Paul DL: Connection whit connexion: the molecular basis of direct intercellular signalling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.
11. Söhl G and Willecke K: An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 2003; 10: 173-80.
12. Söhl G, Odermatt B, Maxeiner S, Degen J and Willecke K: News insights into the expression and function of neural connexin with transgenic mouse mutant. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47: 245-59.

13. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S: A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 2000; 10: R473-4.
14. Furshpan EJ and Potter DD: Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol (Lond)* 1959; 145: 289-325.
15. Korn H, Sotelo C and Crepel F: Electronic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus. *Exp Brain Res* 1973; 16: 256-75.
16. Connors BW, Long MA: Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 2004;27: 393-418.
17. Nagy JI, Dudek FE and Rash JE: Update on connexins and gap junction in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47: 191-215.
18. Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H and Bruzzone R: Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1662: 113-137.
19. Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT and Van Bockstaele EJ: Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 2000; 20: 4091-8.
20. Pakhotin P, Verkhratsky A: Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurons in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28: 79-84.
21. Bennett MV, Zukin RS: Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron* 2004; 41: 495-511.
22. Smith M and Pereda AE: Chemical synaptic activity modulates nearly electrical synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4849-54.
23. Pereda AE, Rash JE, Nagy JI and Bennett MV: Dynamics of electrical transmission at club endings on the Mauthner cells. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47: 227-44.
24. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestava A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazareno S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y: The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 2004; 83: 706-16.
25. White TW, Deans MR, O'Brain J, Al Ubaldi MR, Oodenough DA, Ripps H and Bruzzone R: Functional characteristics of skate connexin35, a member of the gamma subfamily of connexins expressed in the vertebrate retina. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1883-1890.
26. Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H: Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005 Sep 2. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Nov 18;141(1):113-20.
27. Zoidl G, Petrasch-Parwez E, Ray A, Meier C, Bunse S, Habbes HW, Dahl G, Dermietzel R: Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience* 2007; 146(1): 9-16.
28. Bao L, Locovei S, Dshl G: Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 2004; 572: 65-8.
29. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H: Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13644-9.
30. Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H: Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem*. 2005 Mar;92(5):1033-43.
31. Locovei S, Bao L, Dahl G: Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7655-9. *J Neurochem* 2005; 92: 1033-43.