

**Estudio de la expresión exógena de  
conexina 26 silvestre o con  
mutaciones de sordera sobre la  
formación y el estado funcional de  
uniones en hendidura en la glándula  
salival de *Drosophila melanogaster***

---

**Tesista:** Joel Novoa Molina  
**Profesor tutor:** Agustín Martínez Carrasco  
**Profesor cotutor:** John Ewer  
Diciembre de 2019

## Índice

1	Introducción .....	3
1.1	Propósito del estudio .....	4
1.2	Comunicación intercelular .....	4
1.2.1	Conexinas .....	6
1.2.2	Panexinas e inexinas .....	8
1.3	Enfermedades asociadas a mutaciones en conexinas .....	9
1.4	<i>Drosophila</i> como modelo .....	10
1.5	Estudios previos .....	12
2	Hipótesis y objetivos .....	13
2.1	Hipótesis .....	13
2.2	Objetivos .....	13
2.2.1	Objetivos generales .....	13
2.2.2	Objetivos específicos .....	13
3	Métodos .....	14
3.1	Reactivos y soluciones .....	14
3.2	Líneas de <i>Drosophila</i> .....	14
3.3	Disecciones .....	14
3.4	Inmunohistoquímica .....	15
3.5	Electroforesis y westernblot .....	16
3.6	Microinyecciones .....	16
4	Resultados .....	17
4.1	Descripción de la expresión y localización subcelular de conexinas en la glándula salival de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
4.2	Estudio del efecto de la expresión de las conexinas sobre el estado funcional de las uniones en hendidura de la glándula saliva de la mosca .....	23
5	Discusión .....	24
6	Conclusión y consideraciones finales .....	26
7	Referencias .....	28

## 1 Resumen

Utilizando la glándula salival de *Drosophila melanogaster* como modelo de expresión exógena de proteínas, se estudió la expresión y localización subcelular de Cx26wt y dos mutantes asociados a sordera genética (Cx26G12R y Cx26G12V), las que fueron insertadas en la mosca para expresarse de manera dirigida en este órgano bajo el control de los drivers CgGal4 o 638Gal4. La expresión de Cx26 y sus mutantes, a través de 638Gal4, generó estructuras similares a uniones anulares (*annular junctions*) por lo que se presume que corresponde al resultado de internalización o endocitosis hipotética de placas de uniones en hendidura (*gap junctions*) o a que estas proteínas permanecen retenidas en el espacio citoplasmático debido a un posible mal plegamiento o falta de elementos regulatorios específicos de vertebrados y ausentes en *Drosophila*. No se observaron cambios para ninguna de las condiciones en las glándulas al estudiar la funcionalidad de las *gap junctions* mediante inyecciones del trazador fluorescente Amarillo de Lucifer, lo que sugiere que posiblemente no haya conexinas funcionales en la membrana que afecten al comportamiento de las *gap junctions* formadas por inexas, o que no poseen un efecto directo sobre éste.

## **2 Introducción**

### **2.1 Propósito del estudio**

Utilizando a *Drosophila* como modelo de expresión de genes exógenos, se pretende trabajar con moscas transgénicas con genes de conexinas, unas proteínas formadoras de canales presentes en los animales vertebrados, no en invertebrados como *Drosophila*.

La idea del estudio es introducir el gen de la conexina 26 humana normal o tipo salvaje (*wild type*), o dos de sus variantes mutantes asociadas a sordera genética, como la Cx26 G12V y Cx26 G12R, para estudiar las vías que regulan su expresión y estado funcional valiéndonos de herramientas genéticas como la dirección de la expresión génica bajo el control de un *driver* específico en la mosca. Esto nos permitirá responder algunas preguntas como: ¿Pueden las conexinas expresadas en la mosca formar uniones en hendidura como lo hacen en las células de vertebrados?, si la respuesta es afirmativa ¿Pueden formar canales funcionales en sus tejidos?, y finalmente ¿Puede utilizarse la mosca como sistema de expresión exógeno para estudiar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regulación de la expresión de las conexinas y sus variantes con mutaciones asociadas a enfermedad? Para este primer estudio prototipo hemos decidido dirigir la expresión en la glándula salival de la mosca por ser un tejido de fácil acceso, de células relativamente grandes, facilitando la observación de la expresión de las conexinas exógenas.

### **2.2 Comunicación intercelular**

Las células requieren mantener una comunicación constante con el medio que las rodea, intercambiando información química y/o física para mantener así su homeostasis, es decir, regular las condiciones fisiológicas internas para responder a cambios externos. Uno de los mecanismos más comunes de comunicación intercelular en organismos pluricelulares (*metazoa*) es el que ocurre por medio de uniones en hendidura (UH) o *gap junctions* (GJ).

Estas uniones son clústeres o agregados de cientos de canales que se encuentran acoplados con los de la membrana opuesta, permitiendo así la continuidad entre los citoplasmas, el intercambio de iones, moléculas citoplasmáticas y otros solutos entre ambas células (Unwin and Zampighi, 1980). Estos canales, dependiendo de los filos de animales, pueden estar formados por diferentes familias de genes que codifican las proteínas de membrana que los forman, las

que pueden ser conexinas (Cxs), panexinas (Panxs) o inexinas (Inxs), denominándose “conexones”, “panexones” o “inexones”, respectivamente (Scemes, Spray, and Meda, 2009; Yen and Saier, 2007).

Dependiendo de si se encuentran dispuestos en aposición a una célula vecina -acoplados con los de ésta- o si se encuentran dispuestos hacia el medio extracelular, se denominan uniones en hendidura (*gap junctions*) o hemicanales, respectivamente (Fountain, 2013). Las *gap junctions* consisten en aglomeraciones de canales acoplados formando “placas” que unen las membranas de las células en contacto (H. S. Duffy, Delmar, and Spray, 2002).

Cada hemicanal, es una estructura hexamérica que puede estar formada ya sea por el mismo (homomérica) o por diferentes (heteromérica) isotipos de la proteína (D. a Goodenough, Goliger, and Paul, 1996). Más aún, dependiendo de la composición de los canales que se encuentren acoplados, estos se denominan homotípicos y heterotípicos (Bittman, Becker, Cicirata, and Parnavelas, 2002), dependiendo de si los canales acoplados son idénticos o diferentes, respectivamente. Por último, se pueden clasificar según el tipo celular que se encuentre acoplado; homocelular y heterocelular, cuando ambas células son del mismo o diferente tipo, respectivamente.

La variedad en la composición dada por las múltiples combinaciones posibles en cada canal, le otorga a éstos una alta complejidad en su regulación y permite a las células modular su permeabilidad en un espectro muy variable (Ahir and Pratten, 2014; Bevans, Kordel, Rhee, and Harris, 1998; Hervé and Derangeon, 2013; Nalin M. Kumar and Gilula, 1996; Söhl and Willecke, 2003).

Cada una de éstas posee características que las diferencian, como el tamaño del poro, que limita el tamaño de moléculas que pueden pasar a través de ellos, cómo se estimula su apertura, ya sea por voltaje o por determinadas vías de señalización, como la purinérgica (Baroja-Mazo, Barberà-Cremades, and Pelegrín, 2013). Algunos autores han estudiado el rol del carbonilo y amino terminal en el mecanismo de regulación de su apertura. Entre los segmentos que mayor variabilidad presentan, se encuentran el c-terminal y el asa intracelular.

Como se mencionó anteriormente, estas corresponden a proteínas de membrana, y estructuralmente, tanto conexinas, inexinas y panexinas están conformadas por cuatro dominios transmembrana (Hua et al., 2003), denominados T1, T2, T3 y T4 (*transmembrane*), dos asas extracelulares, E1 y E2 (*Extracellular*), un asa intracelular, CL (*cytoplasmic loop*), y el carboxilo y amino terminal

intracelulares (CT y NT, respectivamente) (D. a Goodenough et al., 1996). En condiciones fisiológicas, estos canales están siendo constantemente degradados y/o reciclados mediante un proceso de endocitosis o internalización de la placa -o parte de esta- hacia una de las dos células que se encuentran acopladas, formando anillos denominados *annular junctions* (Falk, Kells, and Berthoud, 2014; Jordan, Chodock, Hand, and Laird, 2001). Se presume que este proceso de internalización es mediado por clatrina y filamentos de actina (Larsen, Tung, Murray, and Swenson, 1979), y genera vesículas de doble membrana con una gran proporción de canales aún acoplados (Dermietzel, Hertzberg, Kessler, and Spray, 1991), ya que se ha demostrado que los canales -al menos las conexinas- una vez acoplados, son inseparables en condiciones fisiológicas (Ghoshroy, Goodenough, and Sosinsky, 1995; D. A. Goodenough and Gilula, 1974). Los nuevos canales son llevados hacia la membrana y difunden lateralmente hasta unirse a la placa en constante variabilidad, la que es sometida a procesos de separación y fusión altamente regulados (Segretain and Falk, 2004), mientras que los más antiguos (de 1 a 5 horas de vida media para conexinas (Beardslee, Laing, Beyer, and Saffitz, 1998; Fallon and Goodenough, 1981)), ubicados al centro de la placa, son endocitados para su reciclaje o degradación (Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002). La mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en conexinas, pero se ha demostrado que el reciclaje y degradación de las inexas también juega un rol determinante en el desarrollo de un invertebrado como *C. elegans* (Todd A. Starich, Hall, and Greenstein, 2014).

### **2.2.1 Conexinas**

Las conexinas fueron las primeras proteínas formadoras de uniones en hendidura en ser identificadas. Están implicadas en varios procesos fisiológicos como el control del desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, y su mal funcionamiento lleva a problemas neurológicos, problemas en la piel y sordera (Martínez, Acuña, Figueroa, Maripillan, and Nicholson, 2009), entre otros. Tienen una longitud de entre 230 y 540 aminoácidos y en humanos, se han identificado 21 parálogos (Ahir and Pratten, 2014; Cruciani and Mikalsen, 2006; Hua et al., 2003).

Existen dos sistemas alternativos de nomenclatura para las conexinas (Söhl and Willecke, 2003), el primero se basa en estudios filogenéticos (Cruciani and

Mikalsen, 2006), el grado de similitud en la secuencia de aminoácidos y la longitud de los dominios citoplasmáticos. En este sistema, los genes que codifican las conexinas se denominan con el prefijo *GJ* (*gap junction*) seguido de la familia denotada con un carácter griego  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y por último, un número que se le asigna a cada proteína por orden en que ha sido reportado su descubrimiento (Beyer and Berthoud, 2009; N. M. Kumar and Gilula, 1992).

El segundo sistema las ordena según un criterio de masa molecular del polipéptido, siendo la nomenclatura más comúnmente utilizada. En ésta, se indica de manera abreviada el animal del que derivan (por ejemplo “*m*” si es de ratón (*mus*), “*h*”, si es de humano (*homo*), etc.), seguido del prefijo Cx (*connexin*), y finalmente la masa molecular del polipéptido en kilodaltons (por ejemplo: Cx43, 43.036 D.) (Beyer, Paul, and Goodenough, 1987).

Estos canales pueden ser afectados por diversas moléculas, las que pueden producir aumentos o disminuciones de las probabilidades de apertura en estos. Entre los bloqueadores de *gap junctions* y hemicanales más utilizados se encuentran la carbenoxolona, mefloquina, ácido retinoico, propanoato de sodio, oleamida, ácido glicirretínico (enoxolona), y alcoholes de cadena larga como el heptanol y el octanol (Juszczak and Swiergiel, 2009; Skerrett and Williams, 2017). Cabe mencionar que los anteriormente mencionados son bloqueadores no selectivos de *gap junctions* y hemicanales, y algunos actúan tanto en conexiones como en inexas (Skerrett and Williams, 2017).

Históricamente se ha estudiado la funcionalidad de las *gap junctions* y hemicanales utilizando trazadores fluorescentes y midiendo el grado de difusión que presentan en células que expresen conexinas, entre éstos se encuentran el Amarillo de Lucifer (LY, *Lucifer yellow*) (aniónico), yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*) (catiónico) y el bromuro de etidio (EtBr, ethidium bromide), entre otros. Además de estudiar la permeabilidad de los hemicanales a los principales segundos mensajeros como el AMPc, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  e IP3. Las conexiones permiten el paso de moléculas con una masa de hasta aproximadamente 1 kDa. y de un tamaño máximo de entre 12 y 20 Å (Cao et al., 1998; Nicholson et al., 2000; Qu and Dahl, 2004; Schwarzmann et al., 1981; Skerrett and Williams, 2017; Unwin and Zampighi, 1980).

Tanto los hemicanales como las uniones en hendidura de conexinas responden a determinadas concentraciones del catión  $\text{Ca}^{2+}$  (intracelular y/o extracelular) además de cambios en el  $V_m$  (potencial de membrana) y a cambios en el pH, ya

sea a través de sitios específicos de unión o interacción con calcio o a través de ciertos dominios sensibles a voltaje, respectivamente. Se sabe que, concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocan el cierre de las *gap junctions* y el de hemicanales. Para el último caso, esto solo es cierto cuando la concentración de calcio intracelular supera o decae por sobre ciertas cantidades umbral ( $\sim 500\mu\text{M}$ ). Se cree que es probable que la apertura por cambio en el voltaje no corresponda a un mecanismo que funcione bajo condiciones fisiológicas (Sáez, Retamal, Basilio, Bukauskas, and Bennett, 2005).

### 2.2.2 Panexinas e inexas

Tras numerosos esfuerzos por caracterizar las uniones en hendidura en invertebrados, se concluyó que estaban constituidas por proteínas no relacionadas con las conexinas. Esta familia de proteínas fue originalmente denominada OPUS, por *ogre*, *Pas*, *unc-7* and *shak-B* (Barnes, 1994), y tras ser identificadas como específicas de invertebrados, fueron denominadas inexas (análogos invertebrados de las conexinas) (Phelan, Bacon, Davies, Stebbings, and Todman, 1998). *Pas* (por *Passover*) o *ShakB* (por *shakingB*) correspondía a una proteína de 361 aminoácidos expresada en fibras gigantes, cuyo gen fue identificado originalmente en una mosca mutante que no respondía a la ausencia de estímulo lumínico. Esta mutación generaba disfunción sináptica en neuronas de la fibra gigante, responsables de coordinar la respuesta frente a la ausencia de estímulo lumínico (Krishnan, Frei, Swain, and Wyman, 1993); *unc-7* se identificó en *C. elegans*, y participaba del proceso de coordinación motora (T A Starich, Herman, and Shaw, 1993); *ogre* (*optic ganglion reduced*), codifica para lo que hoy conocemos como inexina 1 (Güiza, Barría, Sáez, and Vega, 2018).

Se han descrito 8 isoformas de inexas en *Drosophila melanogaster* y 25 en *Caenoabditis elegans* (Phelan, 2005). Éstas forman estructuras octaméricas para cada canal y hexadecaméricas tras la aposición de dos canales en un *gap junction* (Oshima, Matsuzawa, Murata, Tani, and Fujiyoshi, 2016). Una de las principales diferencias con las conexinas reside en el tamaño del poro que forman sus canales, teniendo un diámetro de poro límite de entre 20 y 30 Å, y siendo mayor al de las conexinas, que oscila entre 16 y 20 Å (Skerrett and Williams, 2017).

Posteriormente, luego de que se detectara la presencia de proteínas homólogas de inexas en vertebrados, se propuso definir una nueva familia, que las agrupara junto a estas últimas bajo el nombre de panexinas. Las panexinas (*Panx*) (del

griego  $\pi\tilde{\alpha}\nu$ , pân, todo), con tres miembros descritos, panx1, panx2 y panx3, obtienen su nombre por su presumible naturaleza ubicua en animales multicelulares (*metazoa*), a diferencia de las conexinas, presentes específicamente en cordados (*chordata*) (Bruzzone, Hormuzdi, Barbe, Herb, and Monyer, 2003; Panchin et al., 2000; Shestopalov and Panchin, 2008).

### **2.3 Enfermedades asociadas a mutaciones en conexinas**

Nueve genes de conexinas han estado relacionados con enfermedades hereditarias en humanos, como cataratas, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, displasia oculodentodigital, y sordera heredada sindrómica y no sindrómica. Esta última condición es asociada con una variedad de enfermedades asociadas a la piel (Gerido and White, 2004). De todas las enfermedades asociadas a las conexinas, la sordera es la que más importancia posee a nivel mundial. Aunque la sordera heredada es genéticamente heterogénea, se ha demostrado que las mutaciones en el gen *GJB2*, que codifica para la Cx26, cuenta con una gran proporción de los casos en cada población estudiada, mientras que otras cuatro conexinas Cx30, Cx31, Cx32 y Cx43, han estado también asociadas a pérdida neurosensorial de la audición, ya sea de manera sindrómica o no sindrómica (D. P. Kelsell et al., 1997; David P. Kelsell, Di, and Houseman, 2001).

En este estudio se utilizaron las mutantes de Cx26 asociadas a sordera genética, Cx26G12R (sindrómica) y Cx26G12V (no sindrómica). Estas mutaciones puntuales se encuentran próximas al N-terminal de la conexina, específicamente en el residuo 12 que corresponde a glicina (G, Gly), siendo reemplazado por una arginina (R, Arg) o una valina (V, Val) según sea el caso de Cx26G12R o Cx26G12V, respectivamente. Este residuo se localiza dentro del poro a nivel de membrana plasmática (Maeda et al., 2009). Los hemicanales Cx26G12R generan un fenotipo de ganancia de función y su cierre o apertura rápido y lento se ve afectado (García et al., 2018), mientras que sus UH son reducidas en comparación con Cx26wt y una gran cantidad de la proteína queda retenida en el espacio intracelular o es ubicada en zonas de no aposición (García et al., 2015). Cx26G12R lleva al desarrollo del síndrome de queratitis-ictiosis-sordera (o *KID syndrome*, por *keratitis-ichthyosis-deafness syndrome*, por sus siglas en inglés), que afecta al desarrollo y proliferación de los queratinocitos en la piel y produce distrofias en el cabello y en uñas.

## 2.4 *Drosophila* como modelo

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (reino: Animalia; filo: Arthropoda; clase: Insecta; Orden: Diptera; familia: Drosophilidae; género: *Drosophila*; especie: *D. melanogaster*) es y ha sido un excelente modelo invertebrado para el estudio de la biología del desarrollo, genética, y enfermedades asociadas a mutaciones en las secuencias de determinadas proteínas, gracias a su bajo coste, tiempos de generación cortos, y una gran variedad de herramientas genéticas disponibles. Dado que los estudios en humanos u otros mamíferos son enormemente caros y muy lentos, *Drosophila* se convirtió en una de las mejores y más baratas maneras de estudiar cualquier cosa más compleja (Tolwinski, 2017).

Sólo se habían desarrollado dos métodos para manipular la expresión génica. El primero consistía en dirigir la expresión de un gen de interés a partir de un promotor de choque térmico (*heat shock promoter*), mientras que el segundo consistía en dirigir la expresión de un gen de interés utilizando las secuencias reguladoras transcripcionales de un determinado promotor (Zuker, Mismar, Hardy, and Rubin, 1988). Brand y Perrimon desarrollaron este último sistema, el cual poseía muchas ventajas por sobre las técnicas existentes en ese entonces (Brand and Perrimon, 1993). Éste consiste en dirigir la expresión de un gen de interés en base a promotores específicos, que generaban sus propios patrones característicos en el embrión de *Drosophila*, y que, virtualmente se expresaban en tejidos o tipos celulares específicos.

Durante décadas, dirigir la expresión de genes en *Drosophila* con precisión temporal (en un estadio larval específico) y espacial (en uno o varios tejidos específicos) ha demostrado ser una de las técnicas más poderosas para estudiar la expresión de proteínas y su interacción in vivo (J. B. Duffy, 2002). Uno de los hitos por excelencia ha sido el desarrollo del sistema de expresión UAS-GAL4, una herramienta que permite direccionar la expresión génica hacia tejidos y/o estadios de desarrollo específicos con alta precisión.

El gen GAL4 codifica una proteína de 881 aminoácidos que participa en la regulación de genes inducidos por galactosa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. GAL4 regula la transcripción de los genes transcritos divergentemente GAL10 y GAL1 por unión directa a cuatro sitios relacionados de 17 pares de bases (pb) ubicados entre estos loci. Estos sitios definen secuencias río arriba activadoras o "*upstream activating sequences*" (UAS), las

que son esenciales para la activación transcripcional de estos genes activados por GAL4 (J. B. Duffy, 2002). Así, si se quiere dirigir la expresión de una conexina en el ojo de la mosca, bastaría con enlazar el factor Gal4 a Gmr (*glass multiple reporter*) (Freeman, 1996).

generando una mosca GmrGal4, y, por otra parte, generar una mosca con el sector UAS seguido de la proteína de interés Cx26, obteniendo UAS-Cx26. De esta manera, cada vez que se active la transcripción de la proteína Gmr, se expresará Gal4, que activará UAS y gatillará la transcripción del gen de Cx26 en este caso. Idealmente, esto solo ocurrirá en el ojo, pero en la realidad la mayoría de *drivers* se expresan en más de un tejido, por lo que no son tan específicos como se pensaba originalmente (Kramer and Staveley, 2003; Li, Li, Zheng, Zhang, and Xue, 2012; Ray and Lakhotia, 2015).

La glándula salival de *Drosophila* es un excelente sistema modelo para investigar la genética y la biología del desarrollo del órgano. Históricamente se ha empleado en el estudio de los cromosomas politénicos o gigantes, que son cromosomas que, a pesar de las sucesivas rondas de duplicación o síntesis (aproximadamente 10), permanecen unidos generando estructuras cromosómicas de una gran extensión (Ashburner, 1970). La glándula consta de solo dos tipos celulares epiteliales, las células secretoras (columnares) que sintetizan y secretan grandes cantidades de proteína, y las células que conforman el ducto (cúbicas) que conectan las glándulas con el exterior, generando una estructura con forma de “Y” (Andrew, Henderson, and Seshaiyah, 2000; Myat and Andrew, 2000). Además, las células secretoras de la glándula poseen, bajo el control de *scr*, elevados niveles de proteínas encargadas de dirigir la formación de cadenas polipeptídicas nacientes hacia el retículo endoplasmático y luego del transporte vesicular hacia el Golgi, del re-plegamiento de proteínas mal plegadas y del proceso de secreción regulada (Abrams and Andrew, 2005). Por lo anterior la glándula salival es considerada como un órgano especializado y potenciado en la función de secreción de proteínas. Finalmente, el tejido completo de la glándula salival atraviesa un proceso de histólisis cerca de las 16 horas luego de la formación de la pupa, producto de la apoptosis inducida por el pulso de ecdisona que gatilla la metamorfosis (Jiang, Baehrecke, and Thummel, 1997).

En este estudio se trabajó con la glándula salival de *Drosophila melanogaster*, principalmente por la naturaleza epitelial —de monocapa— del tejido, facilitando observar la difusión de trazadores fluorescentes y el proceso de inyección de

estos, gracias a que las células secretoras tienen un tamaño aproximado de entre 40 y 60  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 Estudios previos

Las uniones en hendidura y la comunicación intercelular en *Drosophila* fueron estudiadas durante la segunda mitad del siglo pasado y los primeros años del actual, pero en los últimos 10 años se dispone de poca información actualizada al respecto. Se identificaron las inexinas 1 y 2 (Inx1 e Inx2) presentes en la glándula salival mediante inmunohistoquímica (Bauer, Lehmann, Martini, Eckardt, and Hoch, 2004; Bauer, Martini, Lehmann, and Hoch, 2003), se han estudiado las uniones en hendidura de manera funcional en las glándulas salivales a través de microinyecciones iontoforéticas de trazadores fluorescentes como Amarillo de Lucifer y fluoresceína, y hecho estudios electrofisiológicos tanto en células acopladas por *gap junctions*, como en sus membranas no acopladas (Flint, Rosbash, and Hall, 1993; Loewenstein and Kanno, 1964; Siwicki, Flint, Hall, Rosbash, and Spray, 1992).

Adicionalmente, casi no existen estudios relacionados con la expresión de conexinas en otros sistemas modelo, y, en especial en *Drosophila*. En 2015, Tang y colaboradores, analizaron el efecto de la conexina 31 (Cx31) en el desarrollo del ojo en *Drosophila* y observaron que la inserción de la mutante sindrómica Cx31 F137L resultó en despigmentación severa, a diferencia de la de Cx31wt, que no tuvo un fenotipo evidente. Más aún, la inserción de dos copias de la mutante sindrómica llevó a una malformación de la estructura ocular, además de despigmentación severa (Tang et al., 2015).

Finalmente, algunos estudios previos llevados a cabo en la Universidad de Valparaíso demostraron de manera preliminar que la expresión de Cx26, Cx43 o mutantes asociados a sordera por sí solos no alteraban la viabilidad celular y/o función, no encontrando un fenotipo notable al expresarlas en el ojo de *Drosophila* en estado adulto (Ewer J., Silva V., Martínez A. D., material no publicado). Sin embargo, estos estudios preliminares sugieren que habrían tejidos más sensibles que otros a la inserción de conexinas exógenas.

### **3 Hipótesis y objetivos**

#### **3.1 Hipótesis**

La inserción y expresión de conexinas humanas mutantes en la glándula salival de *Drosophila*, generará un fenotipo observable y marcado, acompañado de efectos en la funcionalidad típica de las uniones en hendidura mediadas por inexinas endógenas.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivos generales**

- Describir y estudiar la expresión y localización subcelular de conexinas silvestres y mutantes expresadas en glándula salival de la mosca.
- Estudiar el efecto de la expresión de las conexinas sobre el estado funcional de las uniones en hendidura de la glándula salival de la mosca.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Analizar las diferencias inmunohistoquímicas tras el empleo de los *drivers* CgGal4 y 638Gal4.
- Comparar mediante inmunohistoquímica la distribución y localización de las conexinas en la glándula salival, y la formación de placas de uniones en hendidura formadas por las conexinas introducidas.
- Comparar los niveles de expresión de las conexinas en la glándula salival.
- Determinar el nivel de acoplamiento intercelular mediante la difusión del trazador amarillo de Lucifer entre las células de la glándula, y si la expresión ectópica de conexinas afecta la función de las uniones en hendidura.

## 4 Métodos

### 4.1 Reactivos y soluciones

El buffer fosfato salino para *Drosophila* (Dm PBS) está compuesto de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7,5 mM,  $\text{NaCl}$  140 mM. La solución de fijación empleada corresponde a PBS con paraformaldehído (PFA) al 4%. La solución de permeabilizadora y de lavado para inmunohistoquímica fue PBS-T la cual contiene 0,3% de Triton X-100. La solución de lavado para westernblot consiste en un buffer tris-salino (TBS) 140 mM  $\text{NaCl}$ , 2,68 mM  $\text{KCl}$  y 24,76 mM tris base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) con tween-20 0,1%. El buffer de lisis está compuesto por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ ) 0,6  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{L}$  cóctel inhibidor de fosfatasas 100X Halt™ (cat. #78420), 20  $\mu\text{L}$  cóctel inhibidor de proteasas. El buffer Laemli de corrida (LRB), tris base 24,76 mM, glicina 192 mM y dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1%. El buffer de transferencia (TB), tris base 24,76 mM, glicina 192 mM y metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) 5 M. Buffer de carga

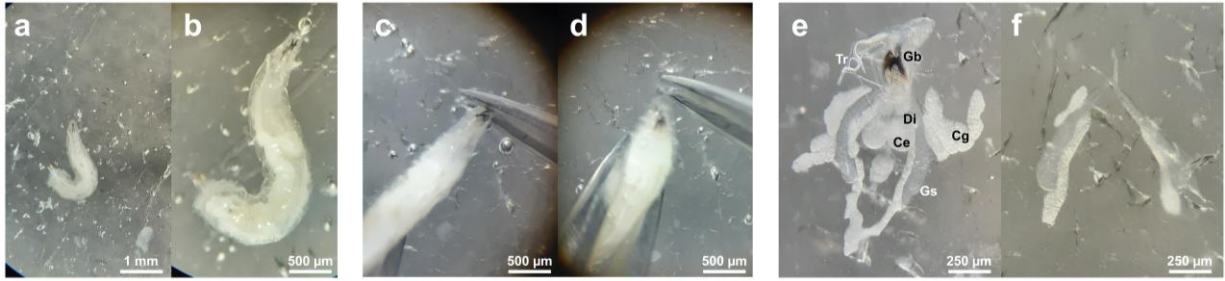
### 4.2 Líneas de *Drosophila*

Para obtener moscas transgénicas, se utilizó el vector de clonamiento para insectos pACU2 (Addgene). Este vector tiene una extensión de 9367 pb y el inserto Cx26 236 pb.

Se utilizaron los *drivers* CgGAL4 y 638GAL4; y las siguientes líneas de moscas con inserciones del segmento UAS: UAS-Cx26 (II), UAS-Cx26 G12V (II), UAS-Cx26 G12R (II), UAS-Cx43 (III). Entre paréntesis, y en números romanos se indica el cromosoma en el cual fue insertado cada elemento. Se trabajó sobre la cepa *w118* (gen reportero *white*) para facilitar la identificación de progenie.

### 4.3 Disecciones

Se seleccionaron larvas de la mosca del vinagre *Drosophila Melanogaster* en el tercer estadio larval (L3) y se diseccionaron sus glándulas salivales con pinzas de microdisección #5 (Fine Science Tools, Dumont) sobre un plato de disección con una base de polímero, en PBS de *Drosophila* (se detalla en “reactivos y soluciones”) frío (4° C) bajo una lupa estereoscópica Motic 40X (figura 1). Para facilitar la adquisición de imágenes, se removió la mayor parte de los cuerpos grasos adheridos a la glándula salival.



**Figura 1.** Descripción gráfica del proceso de disección de la glándula salival en *Drosophila m.* bajo un microscopio o lupa estereoscópica. **(a)** Larva de *Drosophila* en estadio L3 en el plato de disección. En **(b)**, se muestra una fotografía con mayor aumento. **(c, d)** Sujeción de la larva con ambas pinzas, una en la zona media de la larva, y la otra en la zona del apéndice oral (zona pigmentada). Se procede a extraer el aparato bucal hacia afuera, hasta observar las glándulas salivales. **(e)** Detalle de las glándulas salivales con el gancho bucal (Gb), restos de discos imaginales (Di), tráqueas (Tr), cerebro (Ce) y cuerpos grasos (Cg); **(f)** Glándula salival aislada con apenas algunos restos de cuerpos grasos.

#### 4.4 Inmunohistoquímica

Se diseccionaron las glándulas salivales de *Drosophila Melanogaster* en PBS frío y se fijaron durante 3 horas a temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (PFA 4%) en tubos Falcon de 14 mL de fondo redondo (Falcon™, Corning™, NY). Las glándulas fueron lavadas con una solución 0,3% Triton X-100 en PBS (PBS-T 0,3%). Los anticuerpos primarios se diluyeron 1:1000 en PBS-T 0,3% con 0,02% azida de sodio y 2% suero normal de cabra (NGS, Normal Goat Serum). Se incubaron los tejidos con anticuerpo primario (*mouse* anti-Cx26 o anti- $\alpha$ -tubulina) 1:500 durante 5 horas a temperatura ambiente u *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Los tejidos se lavaron 4 veces con PBS-T y se incubaron con anticuerpo secundario (Cy3) diluido 1:1000 en PBS-T 0,3% con 0,02% azida de sodio y 2% NGS por 3 horas a temperatura ambiente u *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Los tejidos se lavaron 4 veces con PBS-T y se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 14mM por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Se lavó con 3 veces con PBS-T y luego 2 veces con PBS. Finalmente, los tejidos se montaron en cubreobjetos de 13 mm cubiertos con una película de poli-L-lisina 0,6% m-v con Fluoromount-G.

#### **4.5 Electroforesis y westernblot**

Se diseccionaron aproximadamente 15 glándulas salivales por condición y se almacenaron con la mínima cantidad de volumen de PBS en tubos cónicos de 1,6 mL a  $-80^{\circ}$  C hasta haber recolectado tejido para todas las condiciones. Adicionalmente a las muestras de tejido de *Drosophila*, se agregaron muestras de HeLa expresando establemente Cx26, actuando como control positivo. Una vez completado este proceso, se agregó 60  $\mu$ L de buffer de lisis y se sonicaron los tejidos dentro de cada tubo, todo lo anterior fue realizado en hielo. Para determinar los volúmenes necesarios de muestra a cargar en el gel, se midieron las concentraciones de proteína para cada condición mediante el kit de fluorímetro Qubit™ (Molecular Probes™, Invitrogen™. Eugene, Oregon, USA). Luego, se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y se cargaron 60  $\mu$ L totales en cada pocillo, conteniendo aproximadamente 60  $\mu$ g de proteína total y se corrió a 110 V con una fuente de poder PowerPac™ en buffer Laemli (LRB).

Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana de PVDF con 400 mA durante 1 hora en buffer de transferencia (TB). Finalmente, se realizó el inmunoblot contra Cx43, Cx26 y  $\alpha$ -tubulina. Los anticuerpos primarios anti-Cx43 y anti-Cx26 fueron preparados a 1:1000, el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina fue preparado 1:3000 y los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) fueron preparados a 1:5000, sendos en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-T 0,1% entre cada incubación con los anticuerpos.

Finalmente, las membranas fueron reveladas con el kit de Bio-Rad Clarity Max™ (Biocompare™) y se registraron con una cámara Nikon con 2 a 3 minutos de exposición y *binning* de 2x2.

#### **4.6 Microinyecciones**

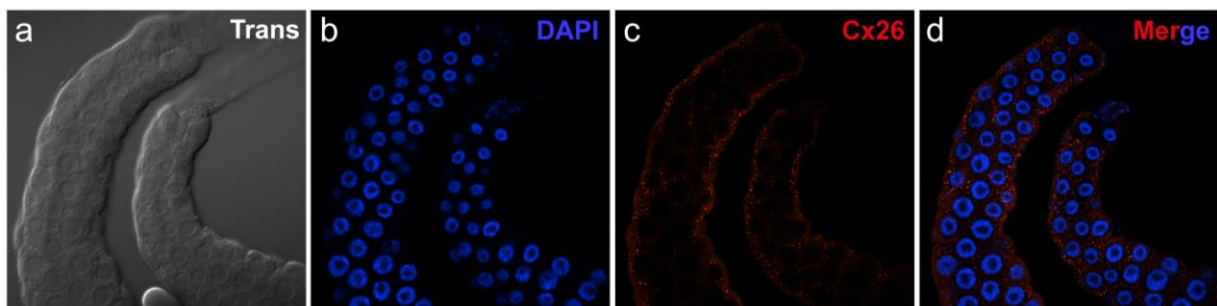
Las glándulas diseccionadas de *Drosophila m.* fueron montadas en cubreobjetos de 13 mm de diámetro cubiertos con una película de poli-L-lisina y se colocaron en placas de 35 mm de diámetro. Las microinyecciones se llevaron a cabo en medio de Schneider a temperatura ambiente durante las 2 horas posteriores a la disección. Se inyectó una solución de Amarillo de Lucifer (Sigma-Aldrich™. Cat. L0259) 4% y Neurobiotina (Vector Laboratories™, Burlingame, CA. SP-1120) 4% disueltos en agua destilada mediante un microinyector neumático InjectMan-Femtojet (Eppendorf™, Hamburg, Germany) y un micromanipulador

\*\*\* con una presión de 30 hPa. Se utilizaron capilares de borosilicato (World Precision Instruments™, Sarasota, FL) estirados mediante un *puller* (Flaming Brown micropipette puller p-97, Sutter Instrument Co.), obteniendo una punta con un diámetro aproximado de entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ .

## 5 Resultados

### 5.1 Descripción de la expresión y localización subcelular de conexinas en la glándula salival de *Drosophila melanogaster*.

A modo de análisis cualitativo se observó, de manera indirecta, la expresión de las conexinas a través de la inmunoreactividad directamente en el tejido de glándula salival y se tomaron imágenes mediante un microscopio confocal en tres canales (*figura 2*). Para dirigir la expresión de conexinas en la glándula salival, se utilizaron los *drivers* *CgGal4* y *638Gal4*.

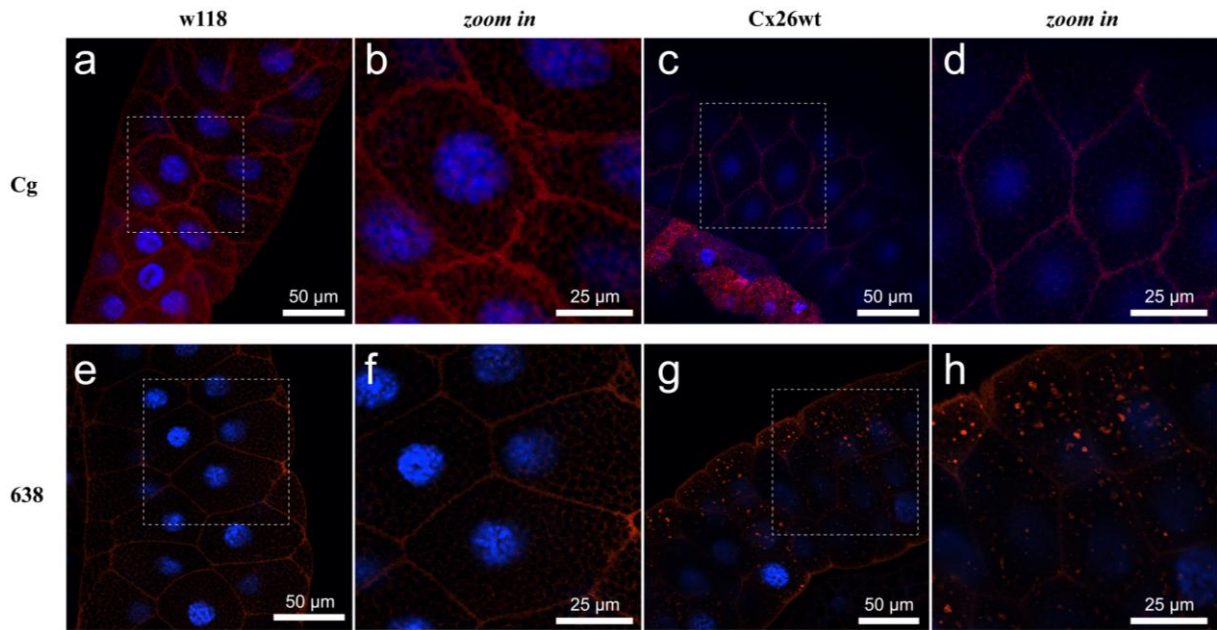


**Figura 2.** Inmunohistoquímica en glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* y procesamiento de fotografías tomadas con microscopía confocal. **(a)** Canal de luz blanca o transmitida (trans). **(b)** Canal de DAPI para identificar núcleos celulares. **(c)** Canal de Cy3 para ver inmunoreactividad para Cx26. **(d)** Fusión (*merge*) de los canales DAPI y Cx26 (c y d). En adelante, rojo: anti-Cx26 y azul: DAPI.

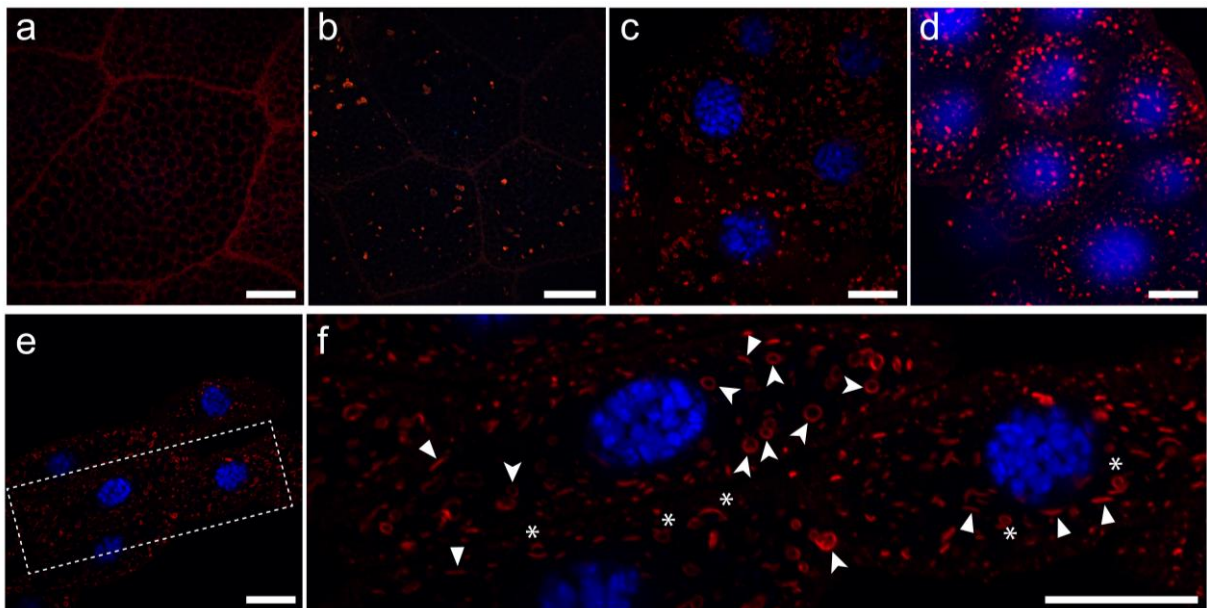
Se estudió la inmunoreactividad para dos *drivers* de expresión en glándulas, *CgGal4* y *638Gal4*, los cuales presentaron diferentes intensidades y patrones (figura 3). Como se observa en la Figura 3, no se detectó expresión evidente y clara de Cx26 utilizando el *driver* *CgGal4*, la señal fluorescente no pudo diferenciarse de la señal de fondo. Además, se aprecia una posible reacción cruzada del anticuerpo con una proteína endógena de la membrana celular

(figura 3a-d) de la glándula que da una señal fluorescente difusa en la superficie celular. Por el contrario, cuando se utilizó el *driver* 638 (figura 3e-h), se aprecia una señal fluorescente que es claramente distinguible de la señal de fondo. Bajo el *driver* 638 se observa muy evidentemente la presencia masiva de *annular junctions* en el caso de la expresión de Cx26wt y alguna marca de Cx26 que sugiere la formación de placas de Uniones en Hendidura que se encuentran posiblemente en proceso de internalización (figura 3g, h). Por este motivo, en adelante prefirió trabajar con el *driver* 638Gal4.

De esta manera, se observó que la expresión de conexinas genera lo que se presume son *annular junctions* o internalizaciones de *gap junctions* (figura 4). Estas estructuras, se encontraron presentes tanto en el caso de la Cx26wt como en el de ambas mutantes, G12V y G12R, pero no en el control, w118 (figura 4). Así, es posible afirmar que las conexinas son las responsables de generarlas en la glándula salival. Las *annular junctions* se observan generalmente como estructuras con forma de disco o anulares, como indica su nombre, aunque en ocasiones, como se trata de cortes ópticos, puede llevar a confusiones el hecho de que observan también como estructuras planas similares a *gap junctions*, pero no podemos determinar si están localizadas en la zona de aposición celular o en el espacio intracelular cercano a la superficie (figura 4f).

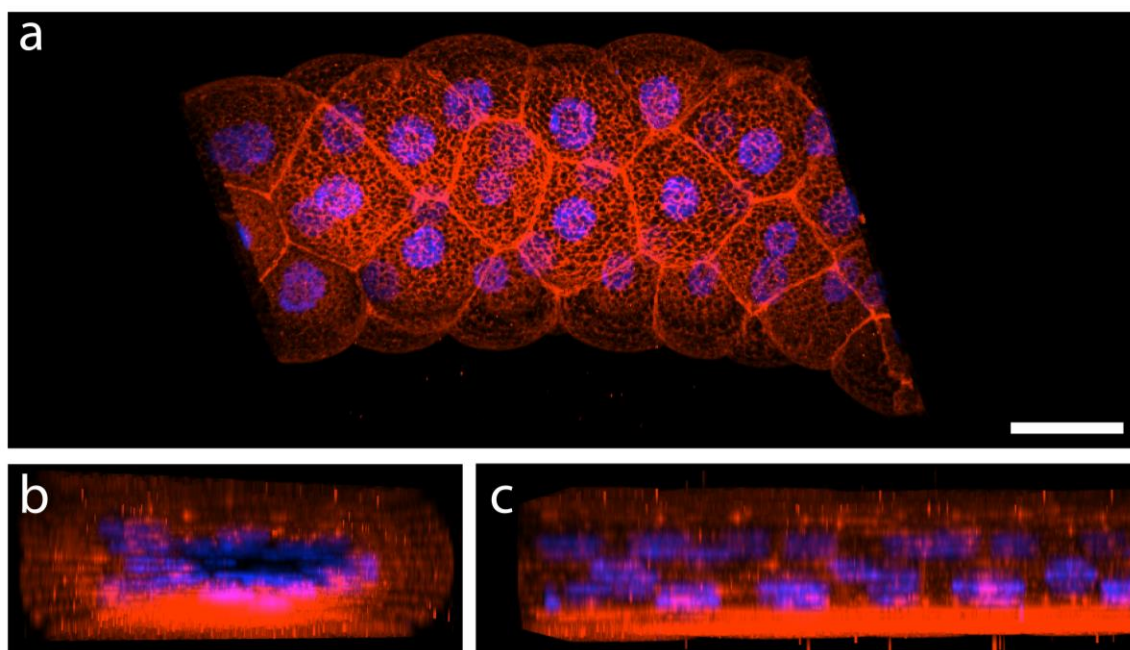


**Figura 3.** Comparación entre los niveles de inmunoreactividad del anticuerpo anti-Cx26 para los *drivers* CgGal4 (Cg) y 638Gal4 (638). Utilizando el *driver* Cg no pudimos observar una señal positiva por sobre la señal de fondo o basal que se observa incluso en la mosca control *w118* (a, b, e, f), donde no se espera inmunoreactividad para esta proteína. (e-h) Sin embargo, para 638, solo la glándula con Cx26wt presenta una marcada inmunoreactividad intracelular en estructuras similares a *annular junctions*. (b, d, f, h) Son magnificaciones de las zonas indicadas por el recuadro en (a, c, e, g), respectivamente.



**Figura 4.** Detalle de las *annular junctions* observadas tras expresar conexas bajo el control de 638Gal4. (a) control (*w118*). (b, e) Cx26wt. (c) Cx26 G12V. (d) Cx26 G12R. (f)

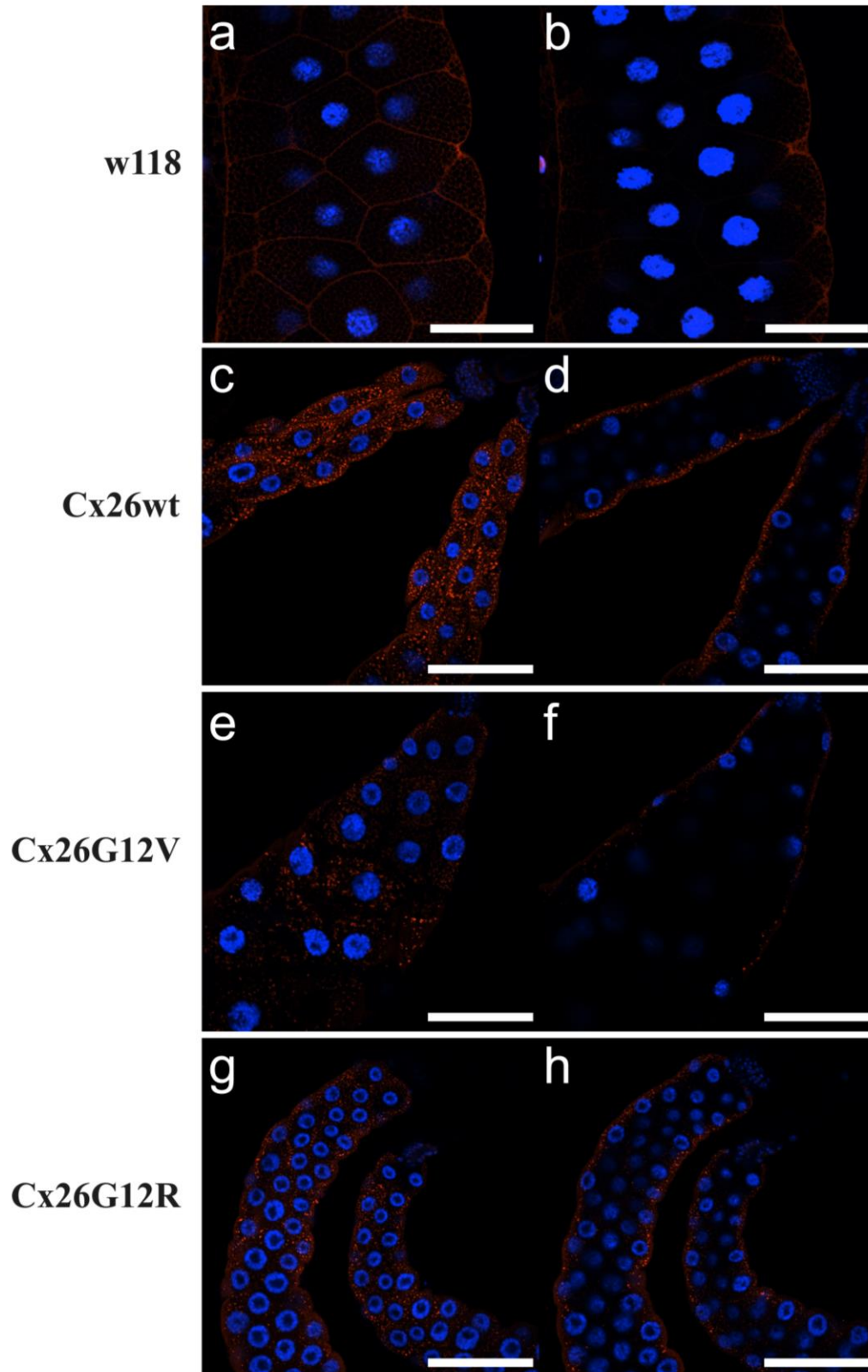
Ampliación de la zona indicada en (e) para observar en detalle las presuntas *annular junctions* o internalizaciones de *gap junctions*. Parte de estas estructuras se observan como anillos (indicadas con puntas de flecha), mientras que otras presentan una forma plana (indicadas con los triángulos) que pudieran eventualmente estar en las aposiciones celulares, además se observan estructura que parecen ser placas en proceso de internalización (asteriscos). Escala: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.** Reconstrucción tridimensional de un segmento de la glándula salival (CgGal4) a partir de 11 cortes ópticos de 5  $\mu\text{m}$ , tomados con el microscopio confocal. (a) Vista  $x$ - $y$  (superior) de la glándula. (b) vista lateral  $y$ - $z$ . Nótese el conducto interno de la glándula salival, y la posición de los núcleos en la zona apical de cada célula. (c) Vista lateral  $x$ - $z$ . Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

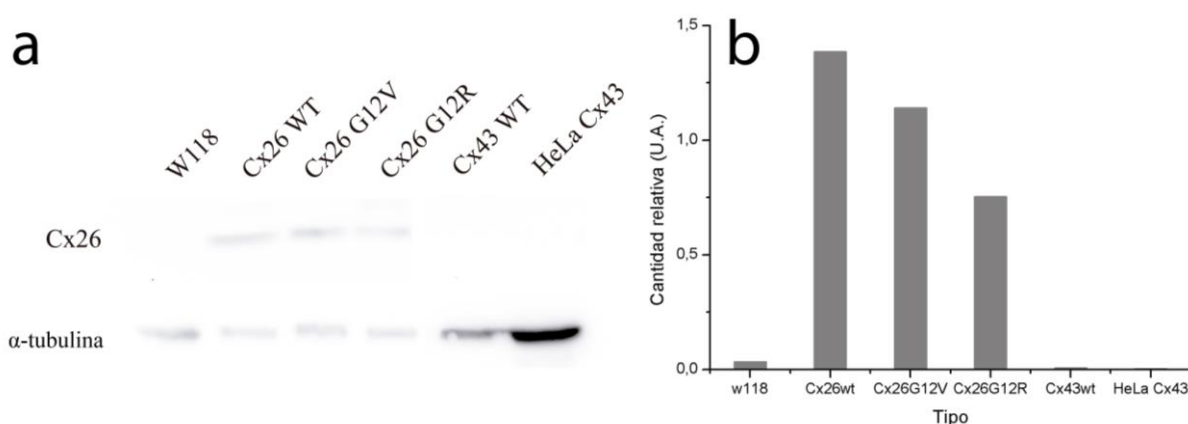
A través de la adquisición de una serie de planos focales en el eje  $z$  (conformando un *stack* o pila), es posible reconstruir el tejido formando un objeto en tres ( $x$ ,  $y$  y  $z$ ) dimensiones (figura 5) y obtener información acerca de la disposición de sus células y otros componentes de interés en el espacio. Así, se procesaron las imágenes para todas las condiciones bajo el *driver* 638Gal4 para estimar la localización celular de las conexinas en la glándula salival (figura 6), encontrando que la marca de conexina 26, en todos los casos, se distribuía hacia las zonas basales de cada célula en la glándula, dejando casi sin señal del anticuerpo el interior de la glándula.

# 638Gal4



**Figura 6.** Cambios en el patrón de inmunoreactividad observado al desplazarse en el eje z (profundidad). Como se demostró anteriormente, en el control, w118 (**a, b**), la marca de inmunoreactividad es diferente de todos los demás casos (**c-h**). Sin embargo, al desplazarse en el eje z, se observa que en todos los casos la marca se limita las zonas más basales (exterior de la glándula) de cada célula (**b, d, f, h**), estando prácticamente ausente en las zonas más apicales (conducto interior de la glándula) de éstas. Escala: 100  $\mu$ m.

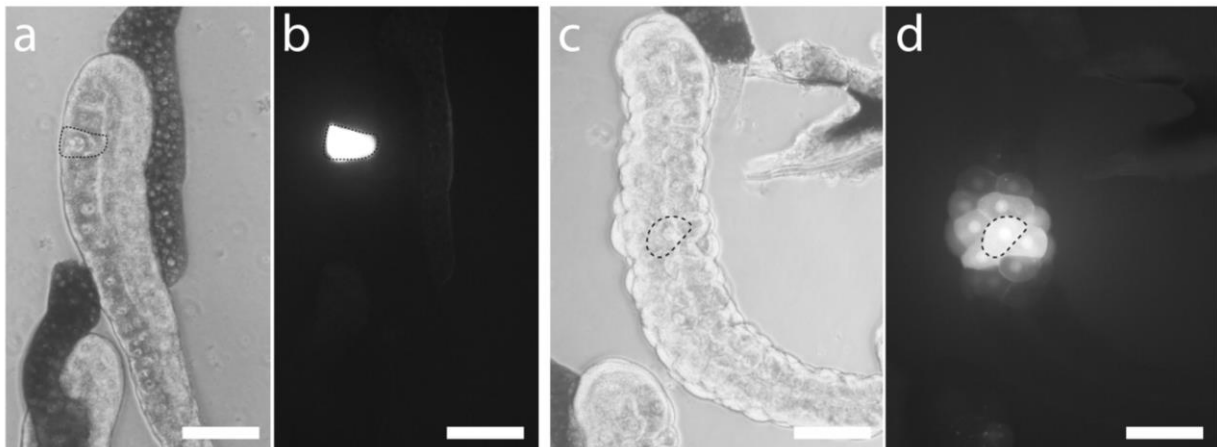
Para determinar de manera cuantitativa los niveles de conexinas en las glándulas, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) de los tejidos y posteriormente un westernblot contra Cx26 y tubulina como control de carga (figura 7). El control de carga indicó niveles similares de proteína ( $\alpha$ -tubulina) en la mayoría de los casos. Se observó inmunoreactividad para Cx26 en Cx26WT, Cx26 G12R, Cx26 G12V, pero no en el control (w118) ni en glándulas de una mosca con Cx43wt, ni en células HeLa expresando establemente Cx43 (presentan niveles despreciables de inmunoreactividad). Esto apoya la idea de que el fenotipo observado mediante inmunohistoquímica, la existencia de *annular junctions*, es atribuible a la expresión de conexinas en el tejido.



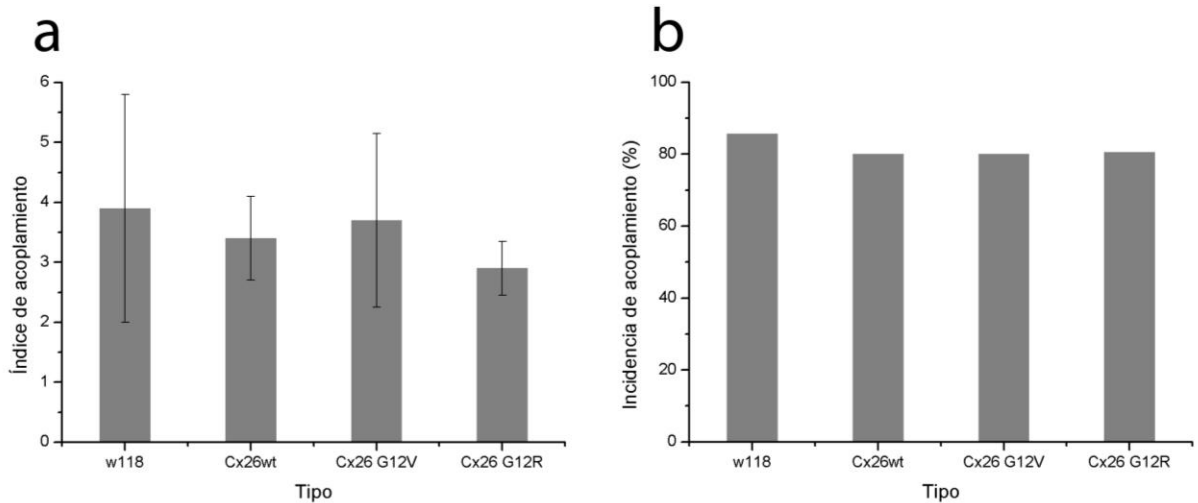
**Figura 7.** Westernblot y cuantificación de Cx26 en las diferentes condiciones. (**a**) Westernblot de Cx26 y tubulina en membrana de PVDF. (**b**) Análisis y cuantificación de la cantidad de Cx26 normalizado en base a la cantidad de tubulina para cada caso. Se detectó niveles observables de conexina 26 en las glándulas salivales de las moscas con Cx26 (wt, G12V y G12R), y no en el caso de la mosca Cx43wt ni en la mosca control, w118. Se emplearon como control células HeLa transfectadas para expresar establemente Cx43 o Cx26 (esta última no se muestra). El control de carga ( $\alpha$ -tubulina) permite estimar la cantidad relativa de proteína total para cada caso (revelando que para todas las condiciones se cargó la cantidad adecuada), y demostrar que en aquellos casos donde no se detectó Cx26, no es posible atribuirlo a una cantidad insuficiente de proteína.

## 5.2 Estudio del efecto de la expresión de las conexinas sobre el estado funcional de las uniones en hendidura de la glándula saliva de la mosca

Para estudiar la funcionalidad y transferencia intercelular a través de las uniones en hendidura o *gap junctions*, se microinyectaron las glándulas salivales de *Drosophila* con el trazador fluorescente Amarillo de Lucifer (figura 8) y se analizaron los números de células a los cuales difundió, expresándose a través de incidencias de acoplamiento e índices de acoplamiento (figura 9). En el caso del índice de acoplamiento, existe una disminución para el caso de la Cx26 G12R, pero este cambio no es estadísticamente significativo (figura 9a). También se analizó la incidencia de acoplamiento, que se mantuvo prácticamente invariable para todas las condiciones. Esto indica que las conexinas no estarían afectando de manera notable la funcionalidad de las *gap junctions* endógenas, mediadas por inexas, ni generando canales hiperactivos que aumenten significativamente el acoplamiento de las células de la glándula salival.



**Figura 8.** Microinyecciones llevadas a cabo en glándulas salivales de *Drosophila m.* (a, b) Ejemplo de una microinyección sin difusión del trazador LY, es decir, no acoplada. (c, d) Ejemplo de una glándula acoplada. (a, c) Imágenes de contraste de fases. (b, d) Imágenes de fluorescencia (UV). Las zonas indicadas con líneas segmentadas corresponden al lugar donde ingresó el capilar de microinyección



**Figura 9.** Índices e Incidencias de acoplamiento tras microinyectar las glándulas salivales con LY. **(a)** Índices de acoplamiento, en donde se observa que todas las condiciones, w118 (n=21), Cx26wt (n=20), Cx26 G12V (n=10), Cx26 G12R (n=41), presentan un comportamiento similar y las diferencias no son significativas. **(b)** Incidencias de acoplamiento. El porcentaje de células acopladas del total de inyecciones para cada caso revela que no existen diferencias en la probabilidad de acoplamiento entre las células para ningún caso, y que se encuentran en un rango de 80,0 a 85,7%.

## 6 Discusión

Los resultados encontrados en este estudio indican que las células de la glándula salival de la mosca no podrían producir uniones en hendidura estables en las zonas de aposición celular formadas por Cx26 humana o sus variantes con mutaciones de sordera. Lo que se observa principalmente son estructuras tipo uniones anulares o *annular junctions* que o (1) podrían corresponder a placas de UH internalizadas, sugiriendo que una vez que la proteína llega a la membrana, es rápidamente endocitada por una de las células, o (2) que la Cxs se agregan en el interior de las células antes de transportarse a la membrana. Estos resultados son diferentes a los encontrados en la publicación de Tang y colaboradores, en donde se observa que la Cx31 humana forma estructuras similares a UH cuando se expresa en el ojo de la mosca, pero no así su mutante sindrómica Cx30F137L que es retenida en el interior de las células y solo forma UH cuando es co-expresada con las chaperonas c-Fos o JunB (Tang et al., 2015).

Es importante mencionar que el anticuerpo anti Cx26 parece tener reacción cruzada con un antígeno indeterminado de la glándula que interfiere con la señal en la membrana plasmática, ya que se observa una señal positiva en glándulas controles, haciendo más difícil identificar la potencial localización de Cx26 o sus

variantes en la superficie celular. A pesar de lo anterior la señal de Cx en la forma de uniones anulares no se observa en las glándulas controles, por lo que se puede afirmar que esa señal es causada por la inserción y eventual expresión de las Cxs. Sin embargo, para descartar posible artefacto por la señal del anticuerpo, a futuro se deberán probar otros anticuerpos o incorporar un *tag* fluorescente a la Cx para facilitar identificación y localización en el tejido.

Las células de la glándula salival de *Drosophila* presentaron una gran variabilidad en cuanto a su acoplamiento, encontrando para todas las condiciones, algunos casos con acoplamiento 0 y otros con un acoplamiento de 20 o más células, esto comparando una misma condición, por lo que este fenómeno no estaría atribuido a un componente genético, sino más bien asociado a una variabilidad intrínseca de las glándulas salivales. Flint y Siwicki reportaron que esta variabilidad no estaría relacionada con la temperatura, hora del día, tamaño celular, posición de la inyección en la glándula, ni estadio larval, por lo que este resultado confirma dichas investigaciones (Flint et al., 1993; Siwicki et al., 1992). La aparente falta de formación de UH por las Cx26 y sus mutantes expresada en la glándula de la mosca es consistente con el hecho de que la expresión de estas conexinas no afecta los índices de acoplamiento celular al Amarillo de Lucifer (M.M.:  $444.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), sugiriendo que la expresión exógena de conexinas humanas no altera la funcionalidad de las uniones en hendidura formadas por las inexas, que son las proteínas endógenas formadoras de UH en las moscas.

Es posible plantear que los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes entre sí, ya que no se observó que las conexinas insertadas en la glándula salival formaran UH ni cambios desde el punto de vista funcional en el tejido con respecto al control. No obstante, no es posible descartar la eventual formación de UH entre las células de la glándula salival.

No podemos descartar errores en el diseño experimental de expresión utilizado en este estudio para expresar las Cxs, como el tipo de *driver* utilizado. Por ejemplo, el *driver* CgGal4 ha sido utilizado para dirigir expresión génica en cuerpos grasos y hemocitos (Asha et al., 2003; Kim and Choe, 2014; Schmid et al., 2014; Tavignot, Chaduli, Djitte, Charroux, and Royet, 2017), mientras que 638Gal4 se utiliza para dirigir la expresión génica en el ala (y discos imaginales del ala) (Cruz, Glavic, Casado, and De Celis, 2009; Molnar, López-Varea, Hernández, and De Celis, 2006), ambos en *Drosophila*, sin embargo, y a pesar

de no estar reportado, en este estudio estos *drivers* se utilizaron para expresar conexinas en la glándula salival de la mosca, ya que se ha observado que en este tejido, presentan niveles cuantificables de expresión. Es importante mencionar, que la inserción de elementos genéticos en *Drosophila* es un proceso con resultados aleatorios, es decir, que el gen que se desea insertar, lo hace en zonas con determinada probabilidad de recombinación, y no de manera específica y dirigida, por lo que es posible que el gen en cuestión se inserte dentro de otro gen, interrumpiendo segmentos importantes como aquellos que codifican proteínas o segmentos regulatorios. Otro aspecto relacionado es la posible diferencia en los niveles de expresión que puede generar la inserción del gen de interés en un cromosoma u otro, ya que existen diferencias de actividad transcripcional que pueden ser significativas a la hora de evaluar la expresión de un gen específico.

A futuro, se espera profundizar los estudios de la localización celular de las conexinas en la glándula salival y en otros tejidos de *Drosophila* m., con anticuerpos contra proteínas de membrana citoplásmica, como *coracle*, y también estudiar la presencia y expresión de inexas en la glándula, y cómo es afectada por la expresión de conexinas, de manera de poder identificar posibles interacciones entre estas proteínas, así como los componentes regulatorios que dirigen su expresión y reciclaje.

Finalmente, es necesario hacer notar que las glándulas estudiadas provenían de larvas L3, por lo que no podemos descartar que los efectos observados sobre la localización subcelular y expresión funcional de las conexinas se deba al estado de desarrollo de la glándula, por este motivo propongo realizar estudios en estadios más temprano del desarrollo de la glándula para descartar posibles efectos del desarrollo.

## **7 Conclusión y consideraciones finales**

La expresión de conexinas humanas en la glándula salival de la mosca *Drosophila melanogaster* no generó diferencias funcionales o de acoplamiento, ni un fenotipo observable a nivel de órgano como se esperaba describir. No se puede descartar el hecho de que puedan formar placas de UH, en su lugar, se observó la formación de lo que se presume que corresponde a internalizaciones de estas estructuras, o a que las conexinas quedan retenidas en el citoplasma, formando agregados de proteína, y no son efectivamente transportadas a la

membrana. No se observó, para la conexina 26 ni ninguna de las dos mutantes asociadas a sordera estudiadas en este trabajo, formación de estructuras de tipo UH, lo que sugiere que los mecanismos moleculares que regulan la correcta expresión de esta conexina en los vertebrados son posiblemente diferentes a los implicados en el caso de las inexas en la glándula salival de *Drosophila*.

## 8 Referencias

- Abrams, E. W., and Andrew, D. J. (2005). CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. *Development*, 132(12), 2743–2758. <https://doi.org/10.1242/dev.01863>
- Ahir, B. K., and Pratten, M. K. (2014). Structure and function of gap junction proteins: role of gap junction proteins in embryonic heart development. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(9), 649–662. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140188dp>
- Andrew, D. J., Henderson, K. D., and Seshaiyah, P. (2000). Salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 92(1), 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00321-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00321-4)
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C. R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*, 163(1), 203–215.
- Ashburner, M. (1970). Function and Structure of Polytene Chromosomes During Insect Development. *Advances in Insect Physiology*, 7(C), 1–95. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60240-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60240-4)
- Barnes, T. M. (1994). OPUS: a growing family of gap junction proteins? *Trends in Genetics*, 10(9), 303–305. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90023-X)
- Baroja-Mazo, A., Barberà-Cremades, M., and Pelegrín, P. (2013). The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(1), 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.01.002>
- Bauer, R., Lehmann, C., Martini, J., Eckardt, F., and Hoch, M. (2004). Gap Junction Channel Protein Innexin 2 Is Essential for Epithelial Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo. *Molecular Biology of the Cell*, 15(6), 2992–3004. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-01-0056>
- Bauer, R., Martini, J., Lehmann, C., and Hoch, M. (2003). Cellular Distribution of Innexin 1 and 2 Gap Junctional Channel Proteins in Epithelia of the *Drosophila* Embryo. *Cell Communication & Adhesion Cell Communication and Adhesion*, 10(10), 4–6. <https://doi.org/10.1080/15419060390262930>
- Beardslee, M. A., Laing, J. G., Beyer, E. C., and Saffitz, J. E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circulation Research*, 83(6), 629–635. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.6.629>
- Bevans, C. G., Kordel, M., Rhee, S. K., and Harris, A. L. (1998). Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *Journal of Biological Chemistry*,

- 273(5), 2808–2816. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2808>
- Beyer, E. C., and Berthoud, V. M. (2009). The Family of Connexin Genes. In *Connexins: A Guide* (pp. 3–26). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-489-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-489-6_1)
- Beyer, E. C., Paul, D. L., and Goodenough, D. A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 1), 2621–2629. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826492>
- Bittman, K., Becker, D. L., Cicirata, F., and Parnavelas, J. G. (2002). Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 443(3), 201–212. <https://doi.org/10.1002/cne.2121>
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1101/lm.1331809>
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13644–13649. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100>
- Cao, F., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, J. M., Snyder, S. a, H-ulser, D. F., ... Nicholson, B. J. (1998). A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science*, 111(1), 31–43. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/111/1/31.article-info>
- Cruciani, V., and Mikalsen, S.-O. O. (2006). The vertebrate connexin family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(10), 1125–1140. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5571-8>
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M., and De Celis, J. F. (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics*, 183(3), 1005–1026. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107748>
- Dermietzel, R., Hertzberg, E. L., Kessler, J. A., and Spray, D. C. (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: Immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *Journal of Neuroscience*, 11(5), 1421–1432. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-05-01421.1991>
- Duffy, H. S., Delmar, M., and Spray, D. C. (2002). Formation of the gap junction nexus: Binding partners for connexins. *Journal of Physiology Paris*, 96(3–4), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(02\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(02)00012-8)
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army

- knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Falk, M. M., Kells, R. M., and Berthoud, V. M. (2014). Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Letters*, 588(8), 1221–1229. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.031>
- Fallon, R. F., and Goodenough, D. A. (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *The Journal of Cell Biology*, 90(2), 521–526. <https://doi.org/10.1083/jcb.90.2.521>
- Flint, K., Rosbash, M., and Hall, J. (1993). Transfer of dye among salivary gland cells is not affected by genetic variations of the period clock gene in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Membrane Biology*, 136(3), 333–342. <https://doi.org/10.1007/BF00233672>
- Fountain, S. J. (2013). Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(December), 2007–2013. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00247>
- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, 87(4), 651–660. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81385-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81385-9)
- Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., ... Ellisman, M. H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*, 296(5567), 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.1068793>
- García, I. E., Maripillán, J., Jara, O., Ceriani, R., Palacios-Muñoz, A., Ramachandran, J., ... Martínez, A. D. (2015). Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome-associated Cx26 mutants produce nonfunctional gap junctions but hyperactive hemichannels when co-expressed with wild type Cx43. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(5), 1338–1347. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.20>
- García, I. E., Villanelo, F., Contreras, G. F., Pupo, A., Pinto, B. I., Contreras, J. E., ... González, C. (2018). The syndromic deafness mutation G12R impairs fast and slow gating in Cx26 hemichannels. *Journal of General Physiology*, 150(5), 697–711. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711782>
- Gerido, D. A., and White, T. W. (2004). Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1662(1–2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.017>
- Ghoshroy, S., Goodenough, D. A., and Sosinsky, G. E. (1995). Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *The Journal of Membrane Biology*, 146(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/BF00232677>
- Goodenough, D. A., and Gilula, N. B. (1974). The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides. *Journal of*

- Cell Biology*, 61(3), 575–590. <https://doi.org/10.1083/jcb.61.3.575>
- Goodenough, D. a, Goliger, J. a, and Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 475–502. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002355>
- Güiza, J., Barría, I., Sáez, J. C., and Vega, J. L. (2018). Innexins: Expression, regulation, and functions. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01414>
- Hervé, J. C., and Derangeon, M. (2013). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell and Tissue Research*, 352(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1485-6>
- Hua, V. B., Chang, A. B., Tchieu, J. H., Kumar, N. M., Nielsen, P. A., and Saier, M. H. (2003). Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: Connexins, innexins, claudins and occludins. *Journal of Membrane Biology*, 194(1), 59–76. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-2026-8>
- Jiang, C., Baehrecke, E. H., and Thummel, C. S. (1997). Steroid regulated programmed cell death during Drosophila metamorphosis. *Development*, 124(22), 4673–4683.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, a R., and Laird, D. W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4), 763–773. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171382>
- Juszczak, G. R., and Swiergiel, A. H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: Animal and human studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(2), 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.12.014>
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., ... Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, Vol. 387, pp. 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Kelsell, David P., Di, W. L., and Houseman, M. J. (2001). Connexin mutations in skin disease and hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, 68(3), 559–568. <https://doi.org/10.1086/318803>
- Kim, M. J., and Choe, K. M. (2014). Basement Membrane and Cell Integrity of Self-Tissues in Maintaining Drosophila Immunological Tolerance. *PLoS Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004683>
- Kramer, J. M., and Staveley, B. E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of Drosophila melanogaster. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 43–47.
- Krishnan, S. N., Frei, E., Swain, G. P., and Wyman, R. J. (1993). Passover: A

- gene required for synaptic connectivity in the giant fiber system of *Drosophila*. *Cell*, 73(5), 967–977. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90274-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90274-T)
- Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1992). Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Seminars in Cell Biology*, 3(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S1043-4682\(10\)80003-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4682(10)80003-0)
- Kumar, Nalin M., and Gilula, N. B. (1996, February 9). The gap junction communication channel. *Cell*, Vol. 84, pp. 381–388. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81282-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81282-9)
- Larsen, W. J., Tung, H., Murray, S. A., and Swenson, C. A. (1979). Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *Journal of Cell Biology*, 83(3), 576–587. <https://doi.org/10.1083/jcb.83.3.576>
- Lauf, U., Giepmans, B. N. G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., and Falk, M. M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10446–10451. <https://doi.org/10.1073/pnas.162055899>
- Li, W. Z., Li, S. L., Zheng, H. Y., Zhang, S. P., and Xue, L. (2012). A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 11(3), 1997–2002. <https://doi.org/10.4238/2012.August.6.4>
- Loewenstein, W. R., and Kanno, Y. (1964). Studies on an Epithelial (Gland) Cell Junction. I. Modifications of. *The Journal of Cell Biology*, 22, 565–586. <https://doi.org/10.1083/jcb.22.3.565>
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., and Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, 458(7238), 597–602. <https://doi.org/10.1038/nature07869>
- Martínez, A. D., Acuña, R., Figueroa, V., Maripillan, J., and Nicholson, B. (2009). Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2), 309–322. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2138>
- Molnar, C., López-Varea, A., Hernández, R., and De Celis, J. F. (2006). A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics*, 174(3), 1635–1659. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061283>
- Myat, M. M., and Andrew, D. J. (2000). Organ shape in the *Drosophila* salivary gland is controlled by regulated, sequential internalization of the primordia. *Development*, 127(4), 679–691.

- Nicholson, B. J., Weber, P. A., Cao, F., Chang, H. C., Lampe, P., and Goldberg, G. (2000). The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(4), 369–378. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000400002>
- Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K., and Fujiyoshi, Y. (2016). Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *Journal of Molecular Biology*, 428(6), 1227–1236. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.011>
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., and Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current Biology*, 10(13), 473–474. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00576-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00576-5)
- Phelan, P. (2005). Innexins: Members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1711(2 SPEC. ISS.), 225–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.10.004>
- Phelan, P., Bacon, J. P., Davies, J. A., Stebbings, L. A., and Todman, M. G. (1998). Innexins: A family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends in Genetics*, 14(9), 348–349. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01547-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01547-9)
- Qu, Y., and Dahl, G. (2004). Accessibility of cx46 Hemichannels for Uncharged Molecules and Its Modulation by Voltage. *Biophysical Journal*, 86(3), 1502–1509. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74218-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74218-6)
- Ray, M., and Lakhota, S. C. (2015). The commonly used eye-specific sev-GAL4 and GMR-GAL4 drivers in *Drosophila melanogaster* are expressed in tissues other than eyes also. *Journal of Genetics*, 94(3), 407–416. <https://doi.org/10.1007/s12041-015-0535-8>
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., and Bennett, M. V. L. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1711(2 SPEC. ISS.), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.014>
- Scemes, E., Spray, D. C., and Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: Novel roles of “hemi-channels.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(6), 1207–1226. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0591-5>
- Schmid, M. R., Anderl, I., Vesala, L., Vanha-aho, L. M., Deng, X. J., Rämets, M., and Hultmark, D. (2014). Control of *Drosophila* blood cell activation via toll signaling in the fat body. *PLoS ONE*, 9(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102568>
- Schwarzmann, G., Wiegandt, H., Rose, B., Zimmerman, A., Ben-Haim, D., and Loewenstein, W. R. (1981). Diameter of the cell-to-cell junctional membrane channels as probed with neutral molecules. *Science*, 213(4507),

- 551–553. <https://doi.org/10.1126/science.7244653>
- Segretain, D., and Falk, M. M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1662(1–2), 3–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.007>
- Shestopalov, V. I., and Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 376–394.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-7200-1>
- Siwicki, K. K., Flint, K. K., Hall, J. C., Rosbash, M., and Spray, D. C. (1992). The Drosophila period Gene and Dye Coupling in Larval Salivary Glands: A Re-evaluation. *The Biological Bulletin*, 183(2), 340–341.  
<https://doi.org/10.1086/bblv183n2p340>
- Skerrett, I. M., and Williams, J. B. (2017). A structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins. *Developmental Neurobiology*, 77(5), 522–547.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.22447>
- Söhl, G., and Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Communication & Adhesion*, 10(4–6), 173–180. <https://doi.org/10.1080/15419060390262877>
- Starich, T A, Herman, R. K., and Shaw, J. E. (1993). Molecular and genetic analysis of unc-7, a Caenorhabditis elegans gene required for coordinated locomotion. *Genetics*, 133(3), 527–541. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7681023>
- Starich, Todd A., Hall, D. H., and Greenstein, D. (2014). Two classes of gap junction channels mediate soma-germline interactions essential for germline proliferation and gametogenesis in caenorhabditis elegans. *Genetics*, 198(3), 1127–1153. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168815>
- Tang, C., Chen, X., Chi, J., Yang, D., Liu, S., Liu, M., ... Zhang, Z. (2015). Pathogenic Cx31 is un/misfolded to cause skin abnormality via a Fos/JunB-mediated mechanism. *Human Molecular Genetics*, 24(21), 6054–6065.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv317>
- Tavignot, R., Chaduli, D., Djitte, F., Charroux, B., and Royet, J. (2017). Inhibition of a NF-κB/Diap1 Pathway by PGRP-LF Is Required for Proper Apoptosis during Drosophila Development. *PLoS Genetics*, 13(1), 1–24.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006569>
- Tolwinski, N. S. (2017). Introduction: Drosophila-A model system for developmental biology. *Journal of Developmental Biology*, 5(3), 10–11.  
<https://doi.org/10.3390/jdb5030009>
- Unwin, P. N. T., and Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature*, 283(5747), 545–549.

<https://doi.org/10.1038/283545a0>

Yen, M. R., and Saier, M. H. (2007). Gap junctional proteins of animals: The innexin/pannexin superfamily. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 94(1–2), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.006>

Zuker, C. S., Mismer, D., Hardy, R., and Rubin, G. M. (1988). Ectopic expression of a minor *Drosophila* opsin in the major photoreceptor cell class: Distinguishing the role of primary receptor and cellular context. *Cell*, 53(3), 475–482. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90167-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90167-5)