



Universidad de Valparaíso
Facultad de Ciencias
Programa de Magister en Biología mención Neurociencia

“Estudio de *Conexina 26* humana en su versión silvestre y en mutantes asociados a sordera genética en el modelo de *Drosophila melanogaster*.”

Tesis para optar al grado de Magister en Neurociencia

Estudiante: **Maia Zabel**

Tutor: Dr. John Ewer | Cotutor: Dr. Agustín Martínez

Índice

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
METODOLOGÍA Y ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES	7
Animales	7
Monitoreo de la Actividad Locomotora	7
Análisis Cualitativo de la Ritmicidad Circadiana	7
Análisis de la Autocorrelación: Índice de Ritmicidad (RI)	8
Disección e Inmunohistoquímica	8
Toma y Análisis de Imágenes	8
RESULTADOS	9
1. Determinación del efecto de la coexpresión de diferentes RNAi con los alelos de Cx26 sobre la ritmicidad circadiana.	9
1.1 Controles para Conexina	9
1.2 Vía de Sumoilación	9
1.3 Vía SNARE	12
1.4 Complejo ESCRT	14
1.5 Genes que codifican proteínas que interaccionan con actina	16
1.6 Factores Endocíticos	18
1.7 Misceláneos	20
1.8 Controles para RNAi	22
2. Efecto de la expresión de las variantes de Cx26 sobre la anatomía de las neuronas del circuito del reloj en cerebro de moscas.	23
A) La expresión de Cx26wt eventualmente causaría la muerte de las neuronas PDF	24
B) Aquellos genes cuyo <i>knockdown</i> rescatan la ritmicidad de moscas que coexpresan Cx26wt eliminarían estas partículas	25
DISCUSIÓN	29
Genes cuyo knockdown rescató la arritmicidad causada por la expresión de Cx26wt	29
Genes cuyo knockdown causó arritmicidad en animales que coexpresaban Cx26G12R o Cx26G12V	30
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	37
I. Líneas de RNAi utilizadas.	37
II. Lista de RNAi con efectos estadísticamente significativos	42

RESUMEN

En humanos, mutaciones en el gen *conexina 26* (*Cx26*), que codifica una de las subunidades proteicas que forman canales de unión en hendidura (UH), son responsables de alrededor del 50% de los casos de sordera genética a nivel mundial, pudiendo también causar trastornos dermatológicos. Existe poca información sobre los procesos moleculares afectados por las mutaciones en las UH codificadas por Cxs, por lo que esta investigación buscó utilizar el modelo de *Drosophila melanogaster* para identificar elementos regulatorios ("partners") del procesamiento intracelular de *Cx26* y/o su función. Trabajos anteriores demostraron que la expresión de *Cx26* en el circuito neuronal que regula el ritmo circadiano de *Drosophila* puede afectar la ritmicidad circadiana de moscas adultas. Interesantemente, este fenotipo depende del alelo de *Cx26* expresado. Así, la expresión del alelo silvestre (*Cx26wt*) genera arritmicidad, mientras que la expresión de los alelos que portan las mutaciones de sordera en el residuo 12, *Cx26G12R* y *Cx26G12V* expresan una ritmicidad muy cercana a la normal. En este proyecto se utilizó el fenotipo circadiano para identificar genes que podrían estar involucrados en el procesamiento y actividad de *Cx26*. Para ello se determinó la ritmicidad circadiana de animales que co-expresaban las variantes de *Cx26* y un RNA de interferencia (RNAi) correspondiente a un gen involucrado en el tráfico o procesamiento intracelular de proteínas. De un total de 55 genes (132 líneas), se encontraron 9 que rescataron el fenotipo arrítmico al coexpresarse con *Cx26wt* y 37 genes que debilitaron la ritmicidad al coexpresarse junto a las variantes *Cx26G12R* o *Cx26G12V*. Así esta estrategia identificó un total de 46 genes que podrían investigarse para comprender el procesamiento de *Cx26*. Para comenzar a investigar la base de los fenotipos observados al expresar diferentes alelos de *Cx26* en neuronas del marcapaso circadiano, se caracterizó la anatomía del circuito neuronal subyacente cuando se expresó la variante *Cx26wt* junto a un RNAi que rescataba el fenotipo arrítmico causado por la expresión de este alelo. A pesar de expresar el fenotipo normal, las neuronas del marcapaso circadiano no mostraron diferencias morfológicas evidentes con respecto a la de animales arrítmicos que solo expresaban *Cx26wt*.

INTRODUCCIÓN

El intercambio de iones, metabolitos pequeños y segundos mensajeros entre células de organismos multicelulares ocurre a través de las UH, que son estructuras de las membranas de aposición celular constituidas por cientos o miles de canales intercelulares y que permiten una actividad celular coordinada (Revel & Karnovsky, 1967). Estos canales se forman a partir de un proceso altamente regulado y que incluye la biosíntesis de las subunidades proteicas de conexinas (Cxs) en las membranas del retículo endoplasmático (RE), la oligomerización de seis Cxs compatibles para formar canales hexaméricos (Unwin & Zampighi, 1980) denominados conexones o hemicanal (HC) localizados la membrana plasmática, los que luego se asocian con HCs de las células adyacentes en las membranas de aposición celular para formar el canal intercelular completo de UH, que es una estructura que traspasa las dos membranas celulares.

Estas uniones intercelulares son codificadas por familias de genes codificantes de proteínas integrales de membrana diferentes para vertebrados e invertebrados, *Cxs* e *Inx* respectivamente. Estas no son homólogas entre sí en términos de secuencia primaria pero las UHs formados por *Inx* comparten similitudes estructurales y funcionales con los formados por *Cxs*.

Los miembros de la familia de las *Cxs* presentan una topología estructural similar, y consiste de un extremo N citoplasmático, cuatro dominios transmembrana unidos por dos bucles extracelulares, un bucle citoplasmático y una cola C terminal citoplasmática (Goodenough et al., 1996). Las *Cxs* tienen un rol crucial en la homeostasis de tejidos y órganos, y la etiología de varias enfermedades hereditarias en humanos se ha vinculado a mutaciones en los genes codificantes de estas (Meşe et al., 2007). En particular, mutaciones en *Cx26* son causantes de la mayoría de los casos de sordera genética humana (Martínez et al., 2009) pudiendo esta generar la pérdida parcial o total de la audición (mutaciones no sindrómicas) y causar además anomalías dermatológicas (mutaciones sindrómicas) (Wei et al., 2004). El nombre de *Cx26* deriva de su peso molecular teórico ya que este corresponde a 26kDa (Söhl & Willecke, 2003). Esta además destaca por utilizar una ruta no canónica de tráfico intracelular para transitar a la membrana celular. En general, para migrar desde el retículo endoplasmático (RE) hacia la membrana plasmática, las proteínas siguen la ruta clásica que implica un paso por el aparato de Golgi para luego migrar a la membrana celular (Martin et al, 2001) como hacen, por ejemplo, *Cx32* y *Cx43*. A diferencia de ello, la *Cx26* no trafica a través del aparato de Golgi, estableciendo una ruta directa a la membrana plasmática mediante puentes de membrana (Levine & Rabouille, 2005; Prydz et al., 2013). Sin embargo se desconocen muchos detalles de este proceso.

Se ha utilizado ampliamente *Drosophila melanogaster* para el estudio de problemas biológicos fundamentales. En el caso de *Cx*, aun cuando su genoma no incluye genes de *Cx*, esta mosca se ha utilizado para comprender las bases de los defectos causados en humanos por formas mutantes de *Cx*. Tal fue el caso de *Cx31*, asociada a múltiples enfermedades en humanos además de la sordera, como eritroqueratodermia variabilis (EKV), donde ha sido particularmente difícil la elucidación del mecanismo patogénico de sus mutantes pero que mediante su expresión en mosca del vinagre se logró determinar que esta era causada por problemas en el plegamiento de proteínas. En conjunto con esta información, se logró identificar pequeñas moléculas con posibles aplicaciones terapéuticas (Tang et al., 2015).

Drosophila presenta varias ventajas experimentales entre las cuales se encuentran: poder realizar experimentos simples y rápidos para demostrar conceptos biológicos importantes; no representar una amenaza para la salud humana; ser de fácil y económica obtención, mantención y transporte (Pulver et al., 2011); y tener herramientas genéticas que simplifican enormemente la combinación y mantención de mutaciones y variantes genéticas. Además, al ser un modelo simple, cuenta con la

ventajas de su simplicidad per se: un sistema nervioso central y un genoma cuantitativamente más pequeño. Además de mutantes, existen sistemas transgénicos espacial y temporalmente inducibles (Roman et al., 2001; Stebbins et al., 2001). Dentro de las herramientas usadas para el control espacial de la expresión de transgenes se encuentra el sistema GAL4-UAS. Este se basa en dos componentes donde el primero corresponde a un activador transcripcional de genes inducidos por galactosa (GAL4) e importado de *Saccharomyces cerevisiae*, expresándose de manera tejido-específica al fusionarse con un promotor de interés. El segundo componente corresponde a UAS (*Upstream Activating Sequence*), que corresponde a la secuencia de DNA a la cual se une de manera específica el factor de transcripción GAL4, activando así la transcripción del gen fusionado río abajo de UAS (Brand & Perrimon, 1993). Estos componentes se combinan mediante un cruce genético simple que genera una progenie donde el gen de interés, unido a UAS, se expresa solo en aquellos tejidos y momentos del desarrollo en los cuales se expresa GAL4 (Duffy, 2002).

Previamente en el laboratorio se habían expresado diversos alelos de *Cx26* en el ojo y en el ala para la identificar posibles cambios estructurales evidentes, pero estos no fueron observados. Los alelos expresados fueron la versión silvestre de *Cx26* (*Cx26wt*) y mutantes puntuales en el segmento N terminal de *Cx26* donde en el residuo 12 se reemplaza Glicina (G) por arginina (R) para el caso de la *Cx26G12R* (que se ha vinculado a casos de sordera genética sindrómica) y por valina (V) para *Cx26G12V* (vinculada sordera genética no sindrómica) (Martínez et al., 2009). Luego se investigó si la expresión de diferentes alelos de *Cx26* en el circuito neuronal que controla la ritmicidad circadiana causaría la expresión de fenotipos circadianos diferentes. Se eligió este fenotipo ya que la ritmicidad circadiana es investigada dentro del laboratorio además de ser un fenotipo altamente cuantitativo, lo que permite detectar y cuantificar cambios muy sutiles en el fenotipo (Prokop & Morgan, 2012).

Los relojes circadianos representan una adaptación de los organismo a los cambios diarios en las condiciones ambientales. Se distinguen 3 componentes principales en los sistemas circadianos: (1) un "reloj" interno (marcapasos) que genera una oscilación circadiana (diaria), (2) vías de entrenamiento a través de las cuales estímulos como ciclos de luz y oscuridad entrenan al reloj al período de 24h del entorno y (3) vías de salida que vinculan al reloj con los sistemas efectores (Dunlap, 1999).

El cerebro de *Drosophila* posee alrededor de 150 neuronas implicadas en la regulación de su comportamiento circadiano. Estas pueden dividirse en neuronas laterales (LNv) pequeñas (sLNv) y grandes (lLNv) que expresan el neuropéptido, PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF), una única sLNv que no expresa PDF, neuronas dorso laterales (LNd) y tres grupos de neuronas dorsales (DN1, DN2 y DN3) (Helfrich-Förster, 2005).

Los relojes circadianos de organismos multicelulares funcionan a través de bucles de transcripción/traducción. Diariamente dos factores de transcripción, codificados por los genes *Clock* (*Clk*) y *Cycle* (*Cyc*), activan la transcripción de diversos genes, incluidos *period* (*per*) y *timeless* (*tim*). Las proteínas PER y TIM forman un bucle negativo en el ciclo molecular: con cursos de tiempo individuales, PER y TIM entran en el núcleo y como dímero interfieren con las acciones de CLK y CYC, reduciendo así su propia transcripción. La degradación subsiguiente de TIM y PER permite la reanudación de la activación transcripcional mediada por CLK-CYC, iniciando así otro ciclo diario (Nitabach & Taghert, 2008). Como resultado de estas interacciones las proteínas PER y TIM y sus ARNm muestran oscilaciones diarias en su abundancia, donde los niveles de ARN alcanzan su punto máximo en la noche y los niveles de proteínas alcanzan su máxima concentración cercano al amanecer. Mutaciones en *per* o *tim* pueden acortar, alargar o incluso suprimir los ritmos circadianos en la eclosión y la actividad locomotora (Sehgal, et al. 1994).

Al expresar estas variantes de Cx26 en neuronas de reloj mediante el "driver" *clock-GAL4 (clk-GAL4)*, se observó en trabajos anteriores que expresar *Cx26wt* en este circuito neuronal causa un patrón de actividad arrítmico (AR) más no las formas mutantes estudiadas aquí, que se comportaron de forma rítmica (R) en la gran mayoría de los animales. Ante dichos antecedentes es que se planteó aquí el uso de la mosca del vinagre como un modelo para identificar elementos que modificarían los fenotipos observados al expresar los diferentes alelos de Cx26 utilizados. Para ello la estrategia consistió en coexpresar RNAi para genes involucrados en el tráfico intracelular para identificar genes cuyo *knockdown* causarían ya sea el rescate del fenotipo arrítmico causado por la expresión de *Cx26wt* o arritmicidad al coexpresarse con *Cx26G12R* o *Cx26G12V*. La selección de los RNAi se realizó en base a su participación en ciertos pasos del transporte intracelular, del proceso de formación de vesículas, etc, por lo que se espera que este "screen" genético permita identificar elementos involucrados en el proceso a través del cual la proteína Cx26 es traficada a la membrana plasmática.

Basándose en que en la realización de *knockdowns* de determinados elementos podría permitir identificar candidatos de interés en la ruta hacia la membrana plasmática de Cx26 que generan alteraciones en el fenotipo circadiano de la mosca (Hipótesis), esta investigación se propuso identificar dichos elementos (Objetivo General). Para esto, se seleccionaron elementos relacionados al procesamiento intracelular y mediante el uso de RNAis se realizó un *knockdown* para pesquisar cambios en el fenotipos de los animales (Objetivo Específico 1). Paralelamente se propuso utilizar inmunohistoquímica para examinar la morfología del circuito neuronal de la mosca cuando se expresan variantes de Cx26 causantes de arritmicidad (Objetivo Específico 2) para la pesquisa de posibles factores anatómicos que estén causando dichos efectos en el comportamiento, enfocándose principalmente en la anatomía de neuronas que expresan el neuropéptido, *Pigment Dispersing Factor (PDF)*. (Esto debido a que PDF y las neuronas cerebrales en las cuales se expresa son esenciales para la expresión de la ritmicidad circadiana y porque poseen una anatomía altamente estereotipada (Lear et al., 2005; Renn et al., 1999)).

La identificación de elementos clave en el procesamiento intracelular de Cx26 (cuyas mutaciones se han vinculado con alrededor del 50% de los casos de sordera genética a nivel mundial), podría otorgar información valiosa para futuras investigaciones en el área relacionado con la, poco descrita, ruta mediada por microtúbulos que no incluye el paso por el aparato de Golgi para llegar a la membrana celular ya que es imperativo poder identificar elementos candidatos que pudieran estar regulando esta ruta secretora. Por otra parte, la caracterización anatómica del circuito neuronal que media la ritmicidad circadiana de *Drosophila* cuando se expresan las variantes de Cx26 generadoras de un fenotipo arrítmico podrían informar sobre las bases anatómicas de los fenotipos observados. Son estos antecedentes con los que la presente investigación constituiría los primeros avances para el estudio de Cx26 utilizando el sistema modelo de *Drosophila melanogaster*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: El *knockdown* de genes específicos permite identificar candidatos involucrados en el procesamiento intracelular de Cx26 a través de las alteraciones que causan en el fenotipo circadiano de la mosca, *Drosophila melanogaster*.

Objetivo General: Identificar genes cuyo *knockdown* altera el fenotipo circadiano de *Drosophila* que coexpresan diferentes alelos de Cx26

Objetivos Específicos:

1. Determinar el efecto sobre la ritmicidad circadiana de coexpresar, junto a diferentes alelos de Cx26, RNAi para genes involucrados en el procesamiento y tráfico intracelular de proteínas en el circuito neuronal que regula la ritmicidad circadiana.
2. Examinar la anatomía de este circuito neuronal cuando se expresan variantes de Cx26 causantes de arritmicidad.

METODOLOGÍA Y ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

Animales

Las cepas de *Drosophila melanogaster* fueron cultivadas en un medio de harina de maíz estándar y mantenidas a temperatura ambiente (20-22°C) con ciclos de luz y oscuridad de 12h cada uno. Para el uso del sistema binario GAL4-UAS se utilizó como *driver* de GAL4, *clock*-GAL4 (*clk*-GAL4) (provisto por Orié Shafer, CUNY, NY, USA) y transgenes UAS-Cx26*wt* (III), UAS-Cx26G12R (II) y UAS-Cx26G12V (II) (provistas por Agustín Martínez, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile). (Entre paréntesis y en números romanos se indica el cromosoma donde se encontraba insertado cada uno de los transgenes). Como grupo experimental se realizó la cruce de moscas *clk*-GAL4+UAS-Cx26 (*wt*, G12R y G12V) con moscas portadoras de los UAS-RNAi para los diferentes genes considerados, y como control se realizó la cruce *clk*-GAL4+UAS-Cx26 en su versión silvestre (*wildtype*; *wt*) y mutantes (G12R y G12V) con moscas de genotipo *white* (*w*), que es el "*background*" genético de la mayoría las cepas transgénicas utilizadas. Para aquellos RNAi que causaron la expresión de un fenotipo de interés, se analizó además el fenotipo circadiano de animales que expresaban ese RNAi bajo el control de *clk*-GAL4 (en ausencia de Cx26). Este control se realizó para determinar si la expresión de ese RNAi en el circuito circadiano por sí solo causaba el fenotipo observado.

Las líneas de RNAi utilizadas se obtuvieron del Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC), Viena, Austria y del Bloomington *Drosophila* Stock Center (BL), Indiana, USA y de encuentran listadas en el Anexo.

Monitoreo de la Actividad Locomotora

Se realizaron las cruces de moscas a 25°C y su progenie macho de 5-8 días de edad se colocó de manera individual en los monitores de actividad locomotora *Trikinetics* (*Trikinetics*, Inc., Waltham, MA, USA) a la misma temperatura. Previo al registro, las moscas fueron entrenadas en condiciones de luz/oscuridad (LD) de 12:12 horas por 4 días y para luego ser puestas en oscuridad constante (DD) por 10 días para el registro. Tanto el entrenamiento como el registro se realizaron a 25°C.

Análisis Cualitativo de la Ritmicidad Circadiana

Basado en la inspección visual de los registros de actividad locomotora (actograma) obtenidos bajo condiciones de DD se categorizaron los animales como rítmicos (R; **Fig. 1A**), débilmente rítmicos (WR; **Fig. 1B**) y arrítmicos (AR; **Fig. 1C**) donde, en el primero de ellos se observan períodos de actividad e inactividad diarios claramente delimitados, el segundo presenta una ritmicidad diaria visible pero con menor claridad y el tercero de ellos no presenta una ritmicidad circadiana evidente.

Para todos estos registros, se descartaron aquellos donde el animal poseía una sobrevivencia menor a 3 días y para evitar sesgos en la categorización esta se realizó mediante un simple-ciego donde se desconocía el genotipo del animal hasta posterior asignación de categoría.

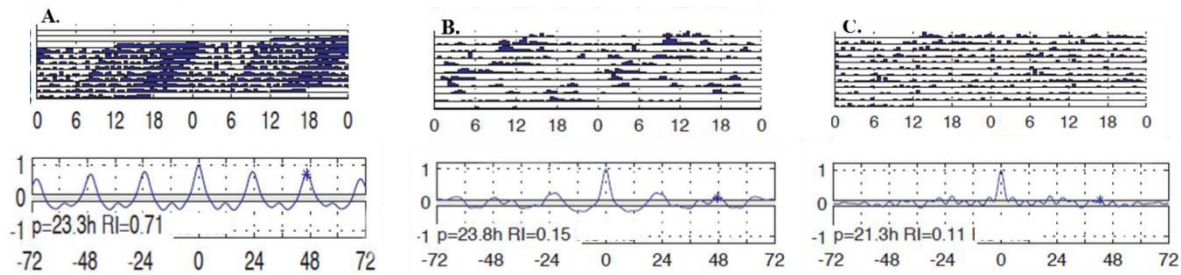


Figura 1: Actogramas (arriba) y autocorrelogramas (abajo) ejemplificadores de animales rítmicos (A), débilmente rítmicos (B) y arrítmicos (C). Las líneas horizontales de los actogramas representan 48horas (h) y cada marca corresponde a la cruce del animal a través del haz infrarrojo del monitor (invisible para el animal). En los gráficos de autocorrelación se indican los valores del Índice de Ritmicidad (RI) y la periodicidad (p, en horas) de los registros correspondientes.

Análisis de la Autocorrelación: Índice de Ritmicidad (RI)

La "fuerza" de la ritmicidad se cuantificó utilizando el Índice de Ritmicidad (RI) derivado del análisis de la autocorrelación. Este análisis cuantitativo se realizó utilizando el software de MATLAB del paquete "Fly Toolbox" (J. D. Levine, et Funes, Dowse, & Hall, 2002) del cual además, se obtuvieron datos sobre la periodicidad (p, en horas) de los registros (**Fig. 1**). Los registros se consideran rítmicos cuando el RI > 0,15 (Sundram et al., 2012). Posteriormente los datos de RI obtenidos se graficaron mediante el programa *GraphPad Prism 8* (Swift, 1997). Se compararon los resultados obtenidos de animales experimentales vs control vía ANOVA seguido de una prueba post hoc de Dunnett, marcando con un achurado aquellos estadísticamente diferentes.

Disección e Inmunohistoquímica

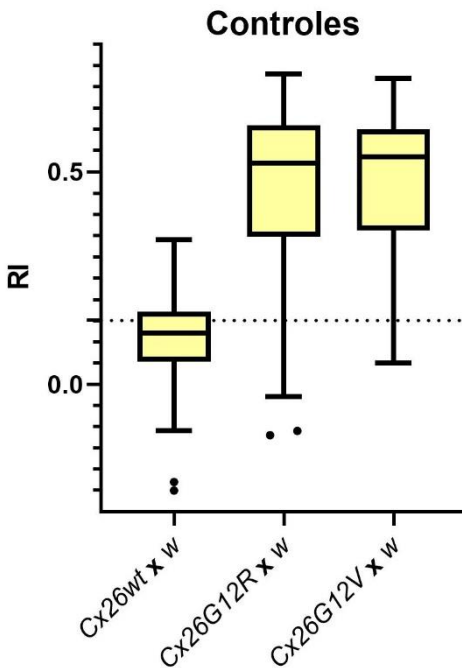
Para la observación de la anatomía de las neuronas PDF, se fijaron los cerebros disectados de moscas adultas en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados en PBS y a continuación, se hicieron 3 permeabilizaciones de 5-10min con PBS con TritonX-100 (PBST) al 0,3% con agitación. A continuación se bloquearon los tejidos incubándolos en suero normal de cabra (NGS) al 5% en PBST para luego incubar en anticuerpo primario toda la noche a 4°C con agitación. Como anticuerpos primarios se utilizó anti-PDF (ratón; Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) junto a anti-Cx26 (conejo; proporcionado por Dr. Agustín Martínez) ambos a una concentración de 1/2000. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBST al 0,3% de 10 minutos cada uno con agitación para luego incubar por 2 horas protegido de la luz con el anticuerpo secundario apropiado (ambos de Thermo Fisher Scientific, USA): Alexa Flúor 488 anti-mouse para anti-PDF y Alexa Flúor 568 anti-conejo para Cx26, diluidos con PBST con NGS al 5%. Luego se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno y se procedió a montar los cerebros en cubreobjetos cubiertos con poli-lisina (Sigma-Aldrich, USA) utilizando medio de montaje Fluoromount (Thermo Fisher Scientific, USA). Los tejidos se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su posterior observación.

Toma y Análisis de Imágenes

Se utilizó un microscopio Olympus DSU Spinning Disk equipado con una cámara Hamamatsu para observar y fotografiar las muestras a 10x, 20x y 40x para su posterior procesamiento utilizando el programa ImageJ. Complementariamente se utilizó microscopía CONFOCAL para la toma de imágenes a 100x.

RESULTADOS

1. Determinación del efecto de la coexpresión de diferentes RNAi con los alelos de Cx26 sobre la ritmicidad circadiana.



1.1 Controles para Conexina

Los resultados obtenidos de las pruebas de actividad locomotora para animales en los cuales solo se expresaron los diferentes alelos de Cx26 en el circuito circadiano (llamados aquí controles) se ilustran en la **Fig. 2**. Se aprecia claramente una marcada arritmicidad de las moscas portadoras de Cx26wt con un RI con una mediana de 0,12 contrastando con las moscas portadoras de Cx26 en sus versiones mutantes (Cx26G12R y Cx26G12V) que presentan una clara ritmicidad, con RI con medianas de 0,52 y 0,54 respectivamente.

Figura 2: Controles. Gráficas tipo "boxplot Tukey" del RI de moscas control para Cx26wt (n=142), Cx26G12R (n=122) y Cx26G12V (n=128); la línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. La línea punteada (RI=0,15) delimita el umbral de la arritmicidad. En todos los gráficos de aquí en adelante se utilizará el color amarillo para distinguir a los grupos control.

A continuación se describen los resultados de co-expresar, junto a alelos de Cx26, RNAi para genes involucrados en el procesamiento intracelular de proteínas. Estos genes fueron elegidos porque participan en el tráfico, la internalización o la degradación de proteínas. En esta tesis los genes se indican con el nombre utilizado en el campo de *Drosophila*. En el **Anexo** se resumen sus funciones así como el número de cada cepa RNAi utilizada. Genes considerados de interés fueron aquellos cuyo *knockdown rescataban* la ritmicidad causada por la expresión en el circuito circadiano de Cx26wt o *disminuían* la ritmicidad causada por la expresión de las variantes mutantes de Cx26, Cx26G12R o Cx26G12V. Este fue un "screen general", sin preconcepciones sobre posibles genes involucrados. Cuando se identificaba un gen de interés, se realizaba a continuación el *knockdown* de genes que pertenecían a la misma vía, estrategia que algunas veces fue exitosa. Dentro de lo posible, se presentan los resultados agrupando genes que tienen una función similar o que pertenecen a la misma vía.

1.2 Vía de Sumoilación

La SUMOilación corresponde a un proceso en el cual una proteína de la familia "small ubiquitin-related modifier" se une a la proteína diana afectando su localización, actividad o estabilidad (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007).

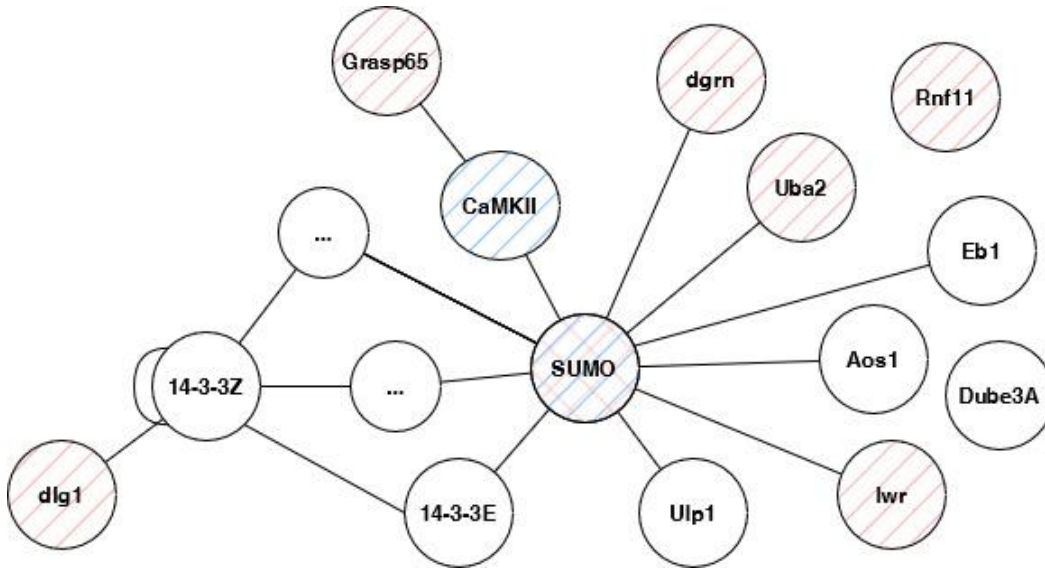


Figura 3: Diagrama de relaciones entre los RNAi vinculados (en mayor o menor medida) con la vía de SUMOilación. Aquellos elementos que causaron un fenotipo estadísticamente diferente con respecto a su grupo control se encuentran achurados en verde, azul y rojo según si el genotipo afectado fue *Cx26wt*, *Cx26G12R* o *Cx26G12V*, respectivamente.

Los genes relacionados a la vía SUMO y sus relaciones que fueron examinados en esta tesis se ilustran en la Figura 3; el achurado resume el impacto sobre el fenotipo circadiano de co-expresar RNAi para genes de esta vía con diferentes alelos de *Cx26* (ver leyenda para más detalles).

La **Fig. 4** muestra el efecto de estos RNAi sobre la ritmicidad para *Cx26wt*. Ninguno de los RNAi probados generó un cambio estadísticamente significativo en la arritmicidad, aun cuando el *knockdown* de los genes *14-3-3E*, *14-3-3Z*, *CaMKII*, *Grasp65*, *lwr*, *Rnf11* y *Uba2* (todos estos destacados en verde) produjo algunos animales "WR" por lo que fueron catalogados como "genes de interés".

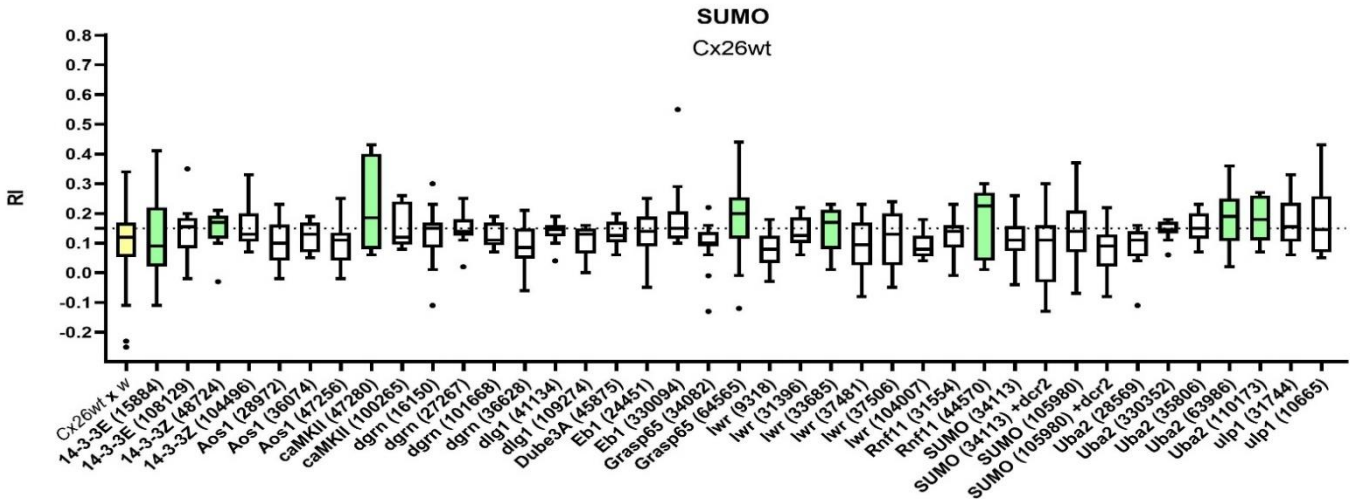


Figura 4: Resultados obtenidos luego del *knockdown* mediante RNAi de elementos de la vía de SUMOilación en moscas que co-expresan *Cx26wt*. En amarillo se muestra el grupo control, las barras de color representan elementos de interés (aun cuando ninguno fue estadísticamente diferente del control). Los números en paréntesis indican el nombre y el número de la cepa utilizada (para más detalles, ver Anexo 1). N=10-30 según genotipo.

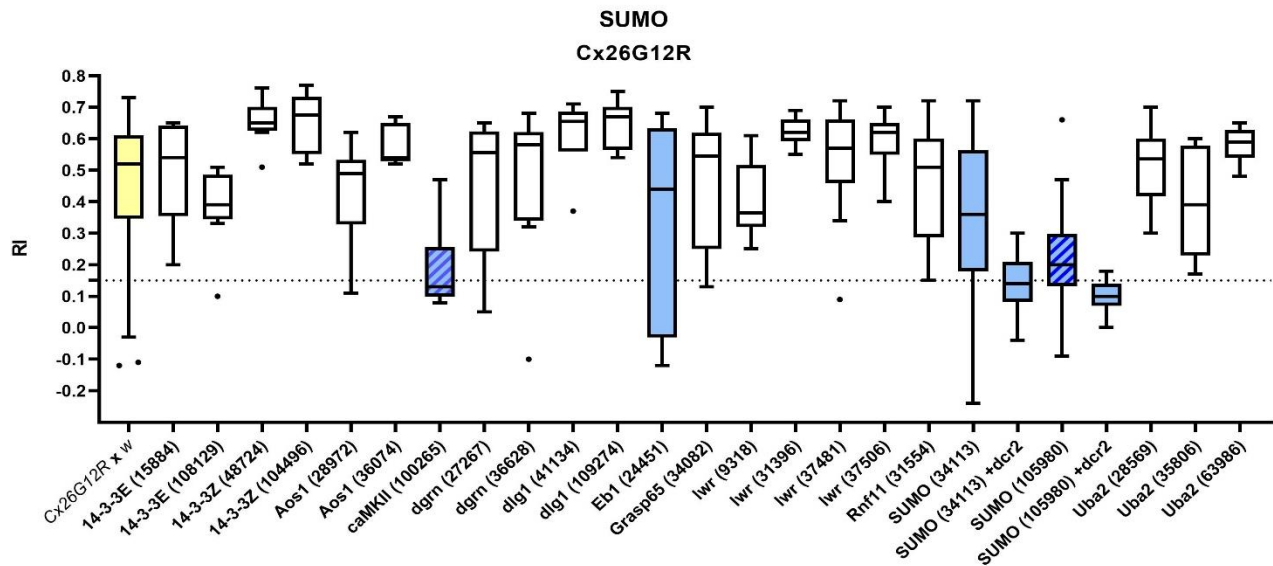


Figura 5: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes de la vía SUMO en moscas que co-expresan *Cx26G12R*. Los resultados para el control se indican en amarillo; genotipos que produjeron resultados potencialmente interesantes se indican en color azul y se encuentran achurados si fueron estadísticamente diferentes del control (este código se usará en todas las figuras). N= 10-30 según genotipo.

La **Fig. 5** resume los resultados obtenidos luego del *knockdown* de elementos de la vía de SUMOilación en moscas que co-expresan *Cx2612R*. Se resaltaron en azul genotipos con efectos potencialmente interesantes y achurados aquellos que causaron un fenotipo circadiano estadísticamente diferente del control, y que incluyen los genes *caMKII* y *SUMO*. Para *SUMO* se intentó potenciar la eficiencia del RNAi incorporando la expresión de *dcr2*. Se aprecia que el *knockdown* de algunos genes que se encuentran directamente asociados a SUMO, como *lwr* y *Uba2* (ver **Figura 3**), no causó un efecto significativo sobre el fenotipo.

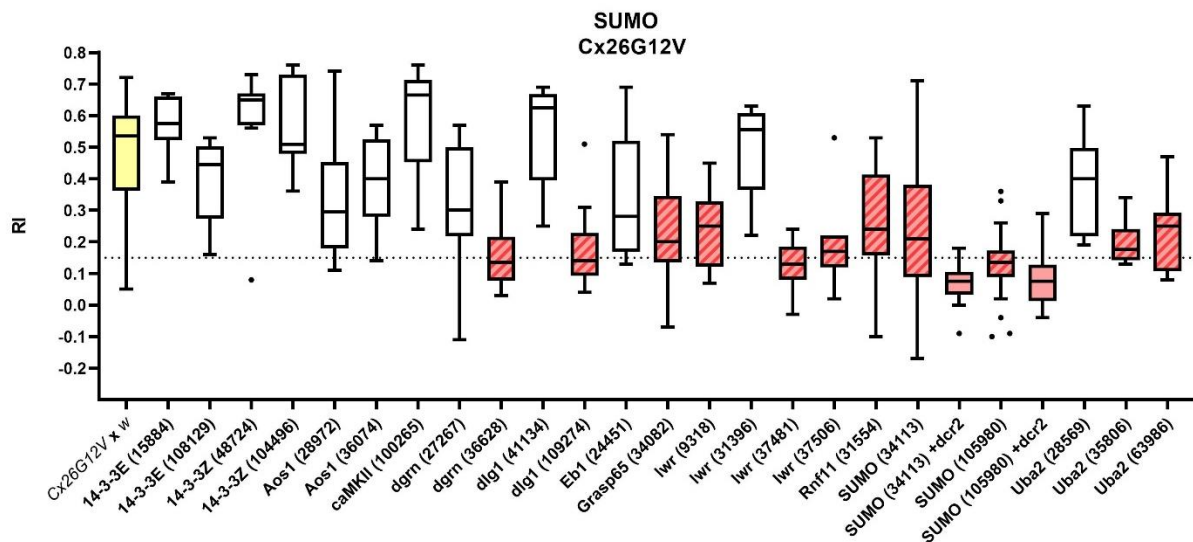


Figura 6: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes de la vía SUMO para moscas que co-expresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

En la **Fig. 6** se destacan en rojo los resultados obtenidos para el *knockdown* de

dgrn, *dlg1*, *Grasp65*, *lwr*, *Rnf11*, *SUMO* y *Uba2* al coexpresarlos con Cx26G12V. Al igual que para Cx26G12R, se intentó potenciar la eficiencia de del knockdown de *SUMO* mediante el uso de *dcr2*. El caso de *lwr* es particularmente interesante no solo debido a que varios RNAi diferentes para este gen causaron la expresión de un fenotipo arrítmico sino también porque este gen se encuentra directamente relacionado con *SUMO* (como se puede apreciar en la **Fig. 3**) ya que codifica una enzima que conjuga *SUMO*. A esta información se suma que tanto *lwr* como *SUMO* interactúan con *Uba2* de forma directa ya que este gen codifica una de las dos subunidades de la enzima activadora heterodimérica *SUMO*, y como se aprecia en la **Fig. 6**, la expresión de RNAi para *Uba2* también causó aritmicidad para 2 de los 3 RNAi usados. Estos resultados sugieren que la vía de *SUMO* regula la acción (desconocida) que Cx26G12V ejerce en el circuito neuronal que controla la ritmicidad circadiana de *Drosophila*.

1.3 Vía SNARE

Las proteínas SNARE son una superfamilia de pequeñas proteínas cuyo rol principal corresponde a la mediación del tráfico de la vía secretora de eucariontes siendo claves en la fusión de membranas. Participan en el tráfico de membranas, incluido el tráfico de vesículas transportadoras con carga, organización compartimental y fusión de organelos. Como se ilustra en la **Fig. 7**, los SNAREs incluyen a Qa-SNARE, Qb-SNARE, Qc-SNARE, Qbc-SNARE y R-SNARE, diferenciándose en sus dominios N-terminal y transmembrana. *Syntaxin13* también es parte de las Qa-SNAREs; *Snap25* y *Snap26* de Qbc-SNAREs, *Gos28* de Qb-SNAREs y *Vamp7* corresponde a una R-SNARE (Jahn & Scheller, 2006).

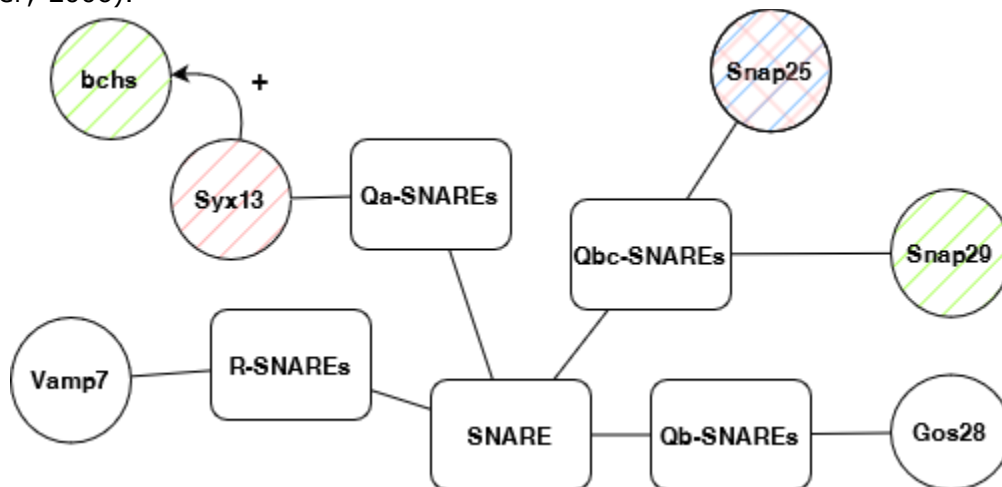


Figura 7: Diagrama de relaciones entre los genes seleccionados para *knockdown* vinculados a las proteínas SNARE. En círculos se encuentran los RNAi utilizados y en rectángulos se halla el SNARE al cual pertenecen. Las uniones representan interacciones y las flechas indican un efecto potenciador (+) o uno supresor (-). Ver Figura 3 para explicación del código de colores.

Para los RNAi de genes relacionados a SNARE en moscas que co-expresaron *Cx26wt* (**Fig. 8**) se destacan en verde los resultados de coexpresar RNAi para *bchs* y *Snap29*. También se destacan algunos de los RNAi que generaron un cierto rescate de aritmicidad en algunos de los animales pero no en todos, siendo estos los RNAi para los genes *Syx13* y *Vamp7*.

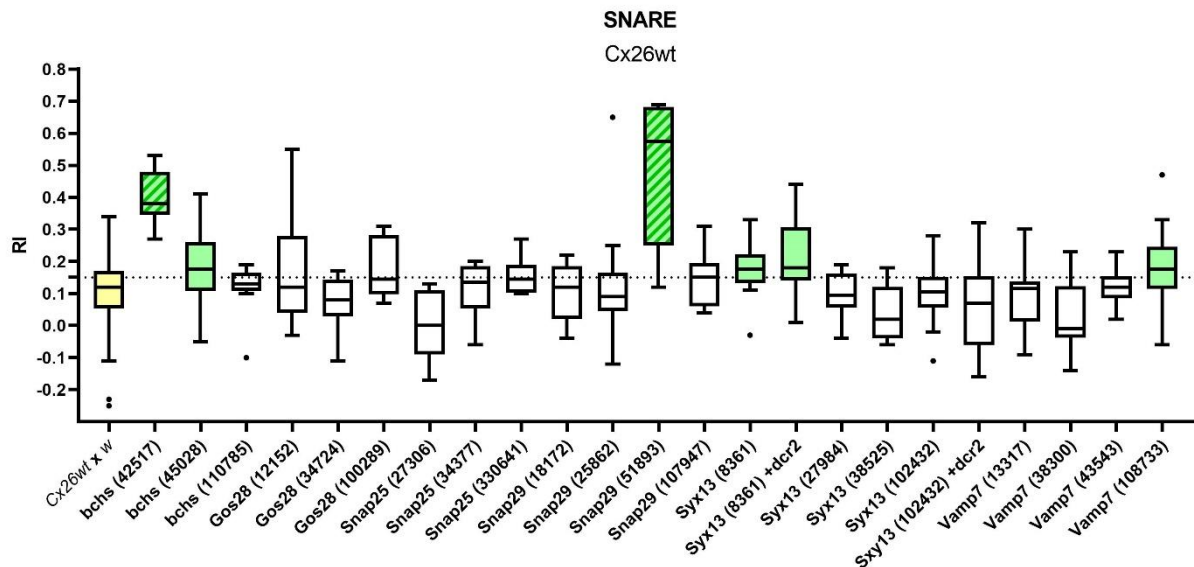


Figura 8: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a SNARE en moscas que coexpresan *Cx26wt*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para las moscas portadoras del alelo mutante *Cx26G12R* (**Fig. 9**), se observó que los animales con el *knockdown* para *Snap25* presentaron un comportamiento significativamente menos rítmicos que las moscas control, pero sin llegar a la AR. También se destaca los resultados obtenidos luego de expresar RNAi para *Syx13* junto con *dcr2* (*Syx13* (102432) + *dcr2*). Para este gen se esperó potenciar el efecto observado en ausencia de *dcr2* (tendiendo a la aritmicidad) pero en lugar de esto se observó un comportamiento incluso más rítmicos que el del grupo control.

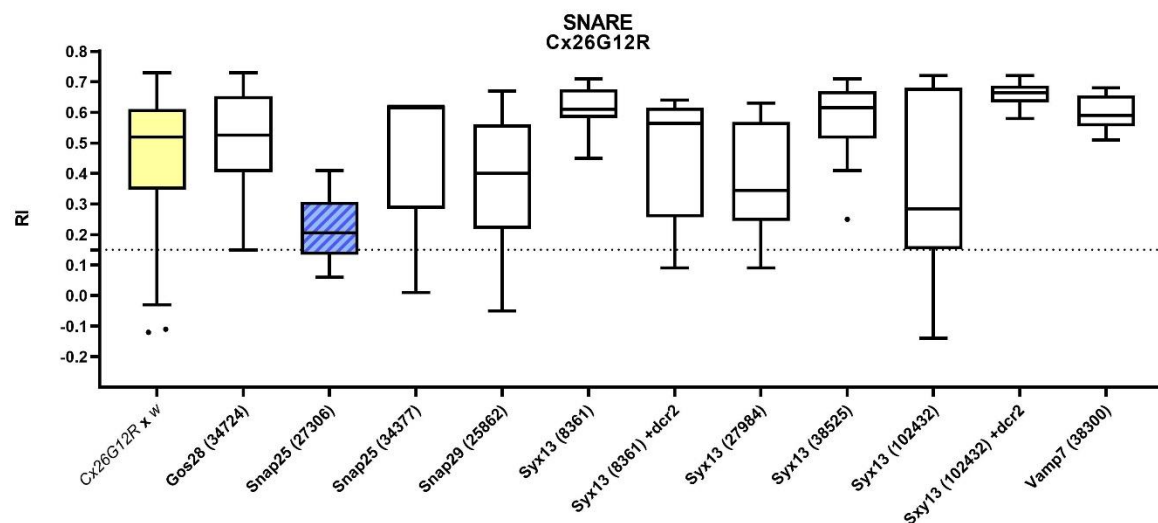


Figura 9: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a SNARE en moscas que coexpresan *Cx26G12R*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Finalmente, para el caso de *Cx26G12V* (**Fig. 10**), se observó que aquellos animales con un *knockdown* para *Snap25* y *Syx13* generaron un comportamiento significativamente menos rítmico que el de los animales control. Aparte de estos RNAi, se destaca el efecto del RNAi de *Gos28*, cuyo *knockdown* generó un comportamiento menos rítmicos mas no estadísticamente diferente del control.

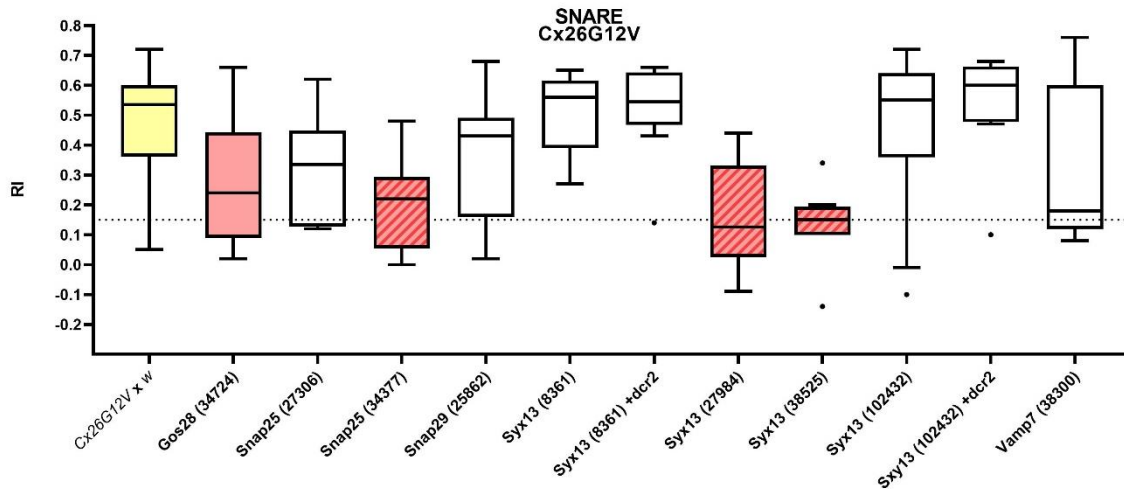


Figura 10: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a SNARE en moscas que coexpresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N=8-30 según genotipo.

1.4 Complejo ESCRT

La maquinaria ESCRT consta de los complejos de proteínas periféricas de membrana ESCRT-0, -I, -II, -III, Vps4-Vta1 y el homodímero AliX. Este sistema participa en la degradación de proteínas de membrana innecesarias o peligrosas entre otros muchos procesos. El complejo ESCRT-0 es necesario para la clasificación de proteínas de la membrana plasmática en la ruta del cuerpo multivesicular (MVB) en células animales. ESCRT-0 se une y agrupa la carga ubiquitinada para su entrega en MVB, y recluta clatrina, ligasas de ubiquitina y enzimas desubiquitinadas. Funciona como un heterodímero de estequiometría 1:1 (Ren et al., 2009) de *Hrs* y *Stam* (Asao et al., 1997). El complejo ESCRT-I corresponde a un heterotetrámero compuesto por una copia de cada subunidad: *Vps23* (sinónimo de *TSG101*), *Vps28*, *Vps37* (Katzmann et al., 2001) y *Mvb12* (Chu et al., 2006) que se coensambla con ESCRT-II en las membranas y estos dos complejos parecen funcionar como un supercomplejo de estequiometría 1:1 (Hurley, 2010). Todas estas relaciones se pueden observar en el **Fig. 11**.

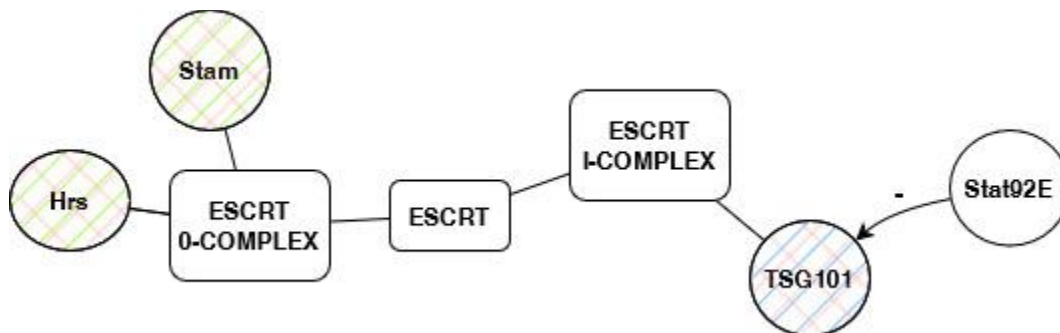


Figura 11: Diagrama de relaciones de los genes seleccionados vinculados a los complejos ESCRT. Ver Figura 3 para explicación del código de colores.

La gráfica de los RI obtenidos del análisis de la actividad locomotora para moscas portadoras de *Cx26wt* en las cuales se realizó el *knockdown* de genes asociados al complejo ESCRT se ilustran en la **Fig. 12**. En este se destaca (en verde) el efecto del

RNAi para *Hrs* que generó un claro rescate de la aritmicidad expresada por el grupo control. El otro resultado destacado es el obtenido luego del *knockdown* de *Stam*.

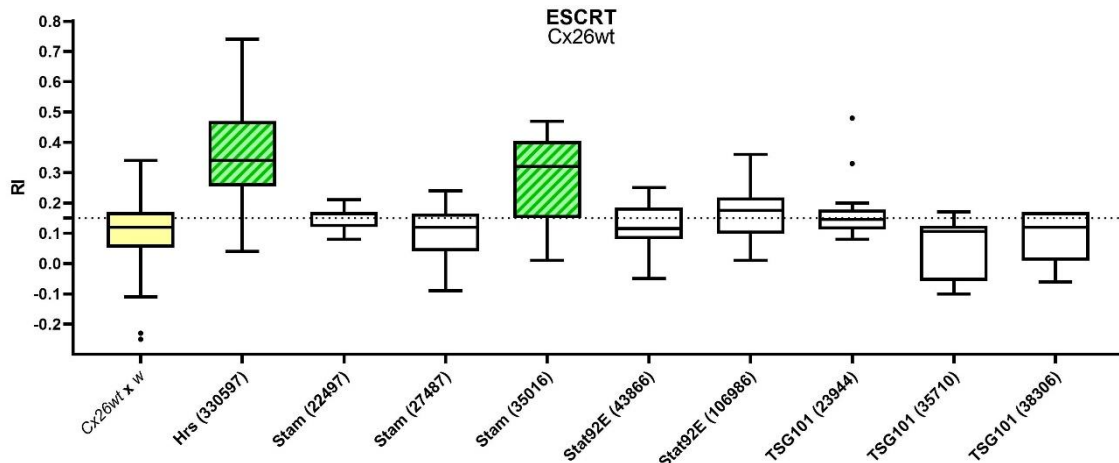


Figura 12: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a complejos ESCRT en moscas que coexpresan *Cx26wt*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para el gráfico correspondiente a los animales que expresaron *Cx26G12R* (**Fig. 13**) se observó claramente un efecto significativo al generar un *knockdown* del gen *TSG101*. Sin embargo, la expresión de este RNAi bajo control de *clk*-GAL4 (es decir en ausencia de *Cx26*) también causó aritmicidad (ver **Figura 26**, abajo), por lo que el fenotipo podría deberse al *knockdown* de *TSG101* en el circuito neuronal que regula la ritmicidad circadiana, independientemente de la co-expresión de *Cx26G12R*. (El hecho que solo uno de los 3 RNAi para *TSG101* haya afectado el fenotipo no es completamente inusual, aun cuando abre la posibilidad que ese RNAi tenga un “off target effect”, y cause el *knockdown* de un gen diferente.)

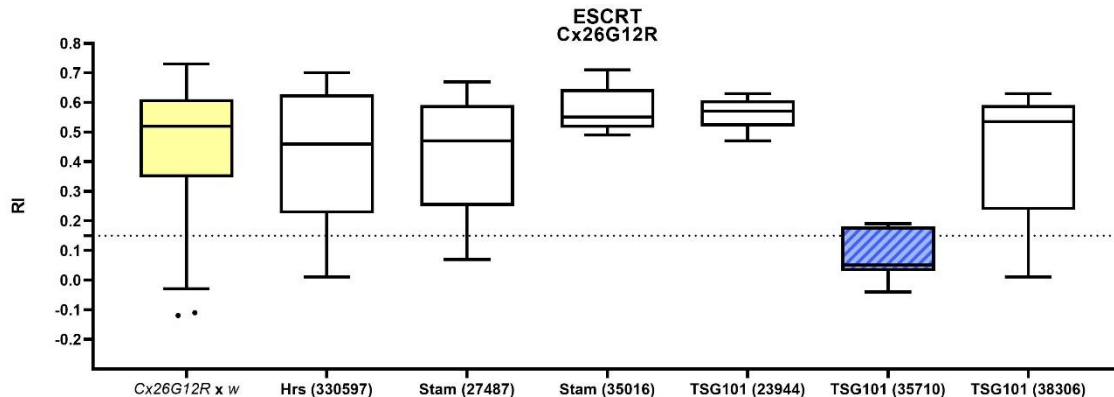


Figura 13: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a complejos ESCRT en moscas que coexpresan *Cx26G12R*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para el caso de *Cx26G12V* (**Fig. 14**), se observó un efecto similar a lo observado para *Cx26G12R* al coexpresar RNAi para *TSG101* donde para el *knockdown* de este gen también se generó una reducción significativa de la ritmicidad de los animales. Otros RNAi que generaron un efecto significativo al comparar con el grupo control, fueron *Hrs* y *Stam*. Es de interés notar que el RNAi para *Hrs* tuvo el efecto opuesto al ser coexpresado con *Cx26wt*, ya que causó rescate de ritmicidad (**Fig. 12**). Sin embargo, no afectó de manera significativa al ser coexpresado con *Cx26G12R* (**Fig. 13**).

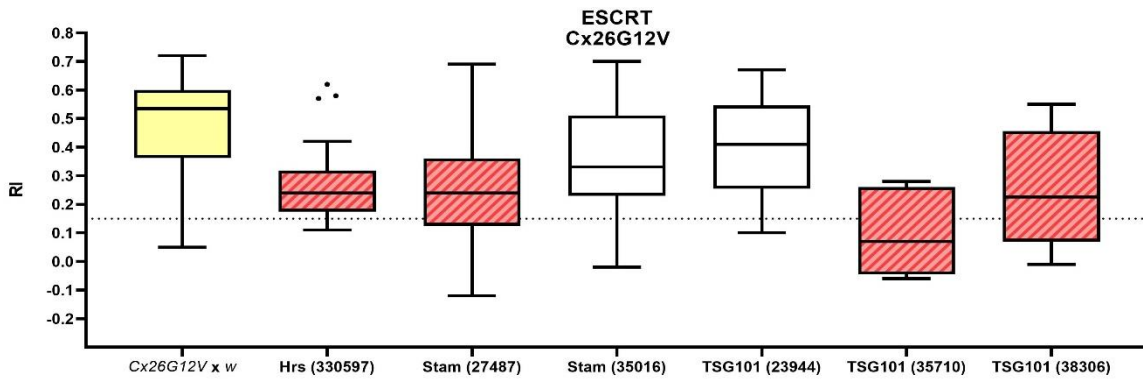


Figura 14: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes relacionados a complejos ESCRT en moscas que coexpresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

1.5 Genes que codifican proteínas que interaccionan con actina

Para los RNAi para genes relacionados con actina se seleccionaron los genes *arm*, *Cam*, *canoe*, *ena*, *jar*, *pyd*, *tmod* y *a-cat* (**Fig. 15**).

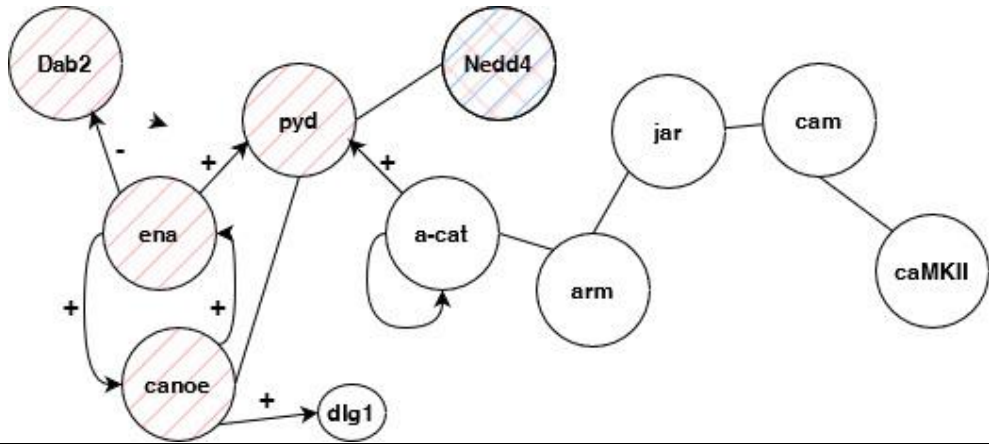


Figura 15: Elementos seleccionados de la vía de la actina y como se relaciona entre ellos. Ver Figura 3 para explicación del código de colores.

Para las moscas portadoras de *Cx26* en su versión *wildtype* (**Fig. 16**) ninguno de los RNAi seleccionados lograron generar un comportamiento que rescatara la ritmicidad de manera significativa. A pesar de esto, destacamos algunos de los RNAi que generaron resultados interesantes en el patrón locomotor como lo fueron *canoe*, *jar* y *Nedd4*.

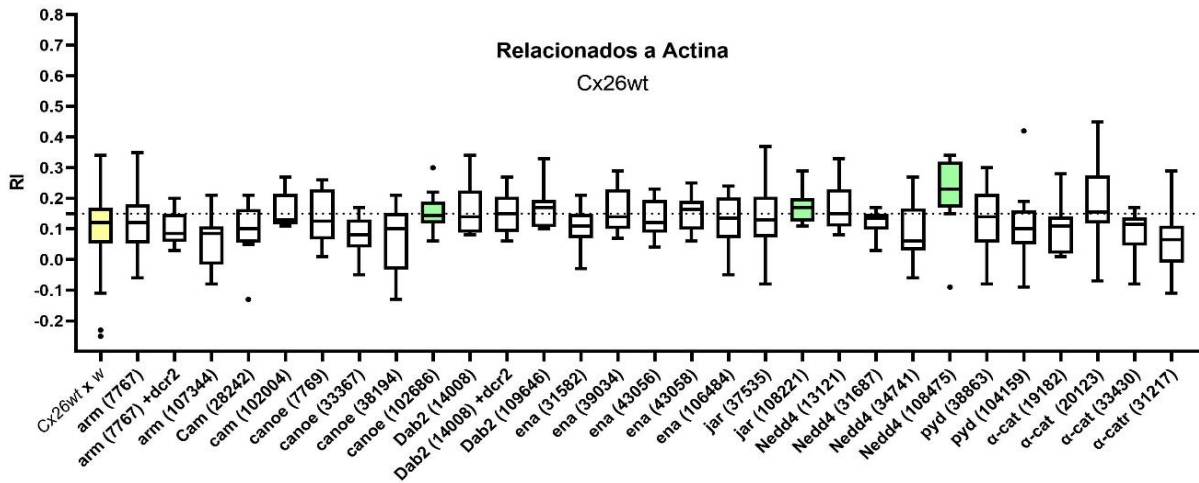


Figura 16: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes que codifican proteínas que interactúan con actina en moscas que coexpresan Cx26wt. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

En cambio, para Cx26G12R se destacan en azul en la **Fig. 16**, *Cam* y *Nedd4* donde solo este último corresponde a un RNAi con un efecto significativo. Para *Nedd4* el animal con el RI más bajo (no outlier) fue de 0,06.

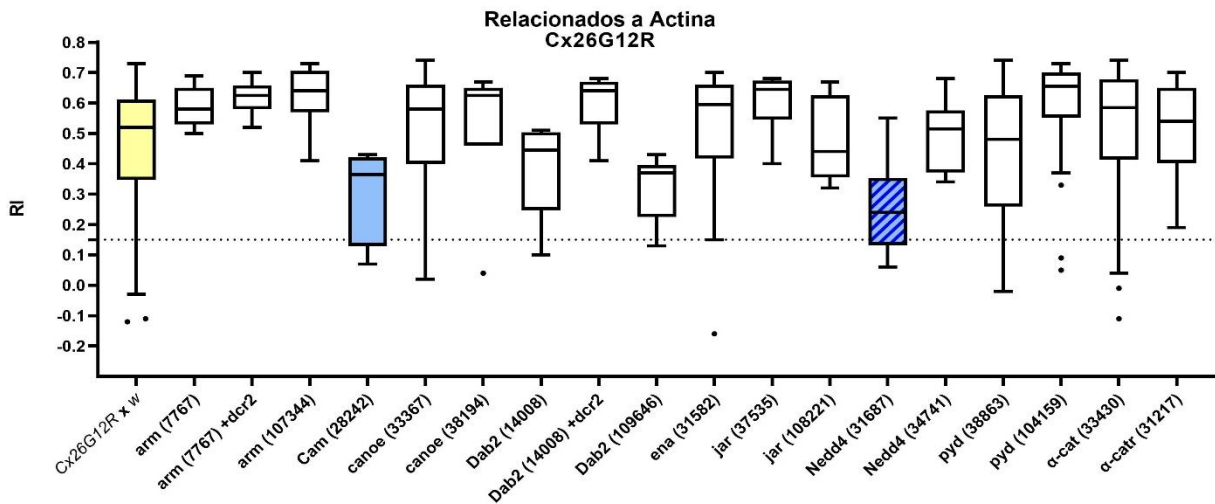


Figura 17: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes que codifican proteínas que interactúan con actina en moscas que coexpresan Cx26G12R. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

El *knockdown* en las moscas portadoras de Cx26G12V generó 8 resultados estadísticamente diferentes al grupo control. Estos incluyen los genes *canoe*, *Dab2*, *ena*, *Nedd4* y *pyd*. Interesantemente, todos estos genes se encuentran estrechamente vinculados como se observa en la **Fig. 15**. Además, hay un vínculo con el gen *dlg1*, que se encuentra agrupado con los demás elementos que se vinculan a la SUMOilación. Como se observa en la **Fig. 6**, *dlg1* también generó un efecto sobre el patrón locomotor de las moscas que coexpresan Cx26G12V.

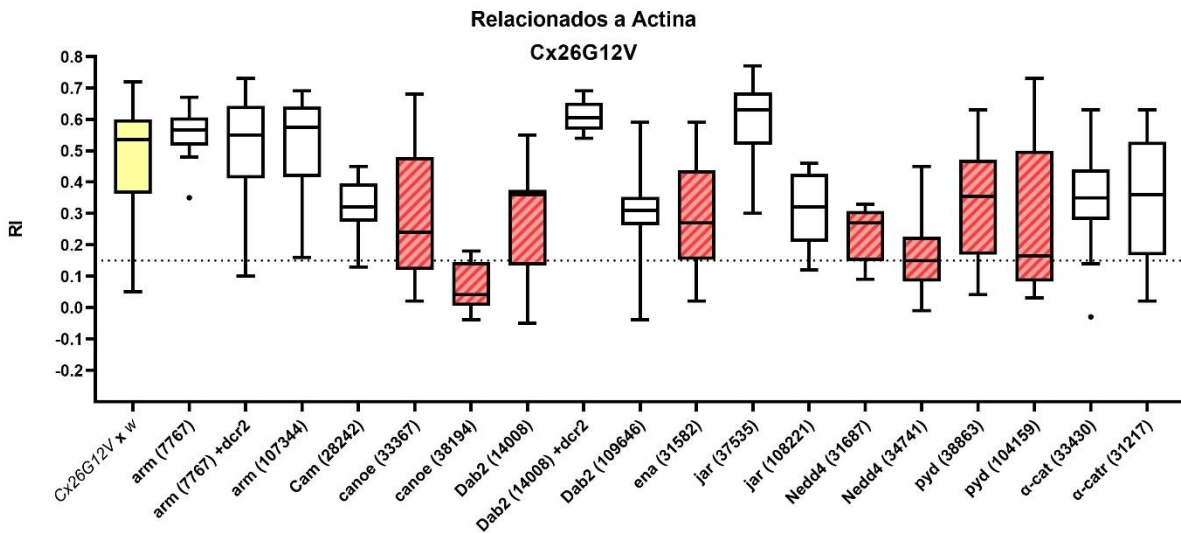


Figura 18: Resultados obtenidos para el *knockdown* de genes que codifican proteínas que interactúan con actina en moscas que co-expresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

1.6 Factores Endocíticos

El sustrato 15 de la vía del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor pathway*) o *Eps-15* se agrupa en las fosas (*pits*) recubiertas de clatrina donde interactúa directamente con el complejo de ensamblaje de clatrina AP-2 (Salcini, Chen, Iannolo, De Camilli, & Di Fiore, 1999). También interactúa con otros factores endocíticos como aquellos codificados por los genes *shi* y *Dap160*, entre otros. Dentro de esta misma vía se encuentra *Chc*, que guarda relación con el complejo de clatrina y se vincula con los genes *Clc* y *Arf1*. *Arf1* por su parte, corresponde a una pequeña GTPasa involucrada en el tráfico de pequeñas proteínas capaz de aumentar (enhance) las acciones de *arm* y *Arf6*. Este último regula los procesos de mediación del tráfico vesicular, como la carga y ensamblaje de vesículas y puede ser promovido por *Efa6*. Todas estas interacciones se ilustran en la **Fig. 19**.

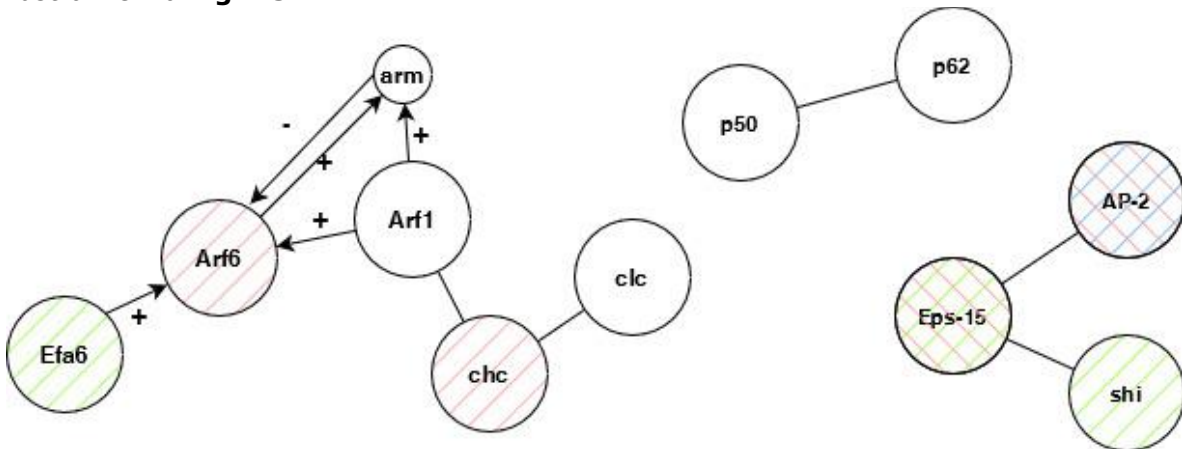


Figura 19: Elementos seleccionados de la vía de endocitosis y como se relacionan entre ellos. Ver Figura 3 para explicación del código de colores.

Para los RNAi relacionados a factores endocíticos se encontró que para *Cx26wt* el *knockdown* de *Efa6* y *eps-15* generó animales significativamente rítmicos (ver **Fig. 20**). Para *shi*, se observa un resultado interesante donde el fenotipo de moscas que co-expresaron el RNAi de la línea 3799 se ubicó por debajo del umbral de arritmicidad pero que en combinación con *dcr2* causó un rescate significativo de la arritmicidad expresada por el grupo control. A diferencia de ello, co-expresión de RNAi de la línea 105971 por

sí solo generó una conducta AR, fenotipo que no cambió al incorporar *dcr2*.

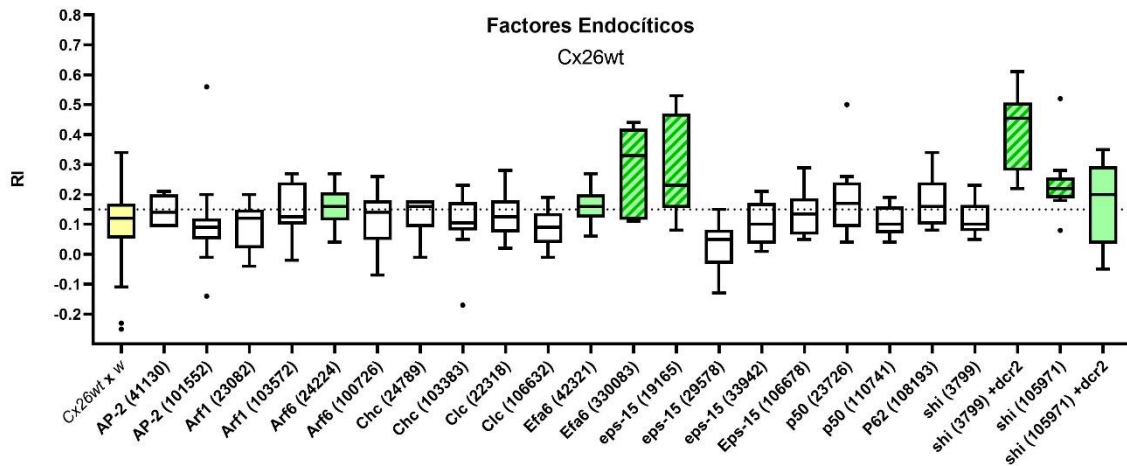


Figura 20: Resultados obtenidos para el *knockdown* de elementos relacionados a factores endocíticos en moscas que coexpresa *Cx26wt*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para los resultados obtenidos de disminuir la expresión de ciertos factores endocíticos en moscas portadoras de *Cx26G12R* (ver **Fig. 21**), se obtuvo que solo el *knockdown* de *AP-2* generó un resultado significativo comprado con el grupo control. Aparte de *AP-2*, se destacan *Chc* y *Clc* ya que dichos RNAi generaron también una disminución considerable (mas no significativa) de la ritmicidad expresada por el control.

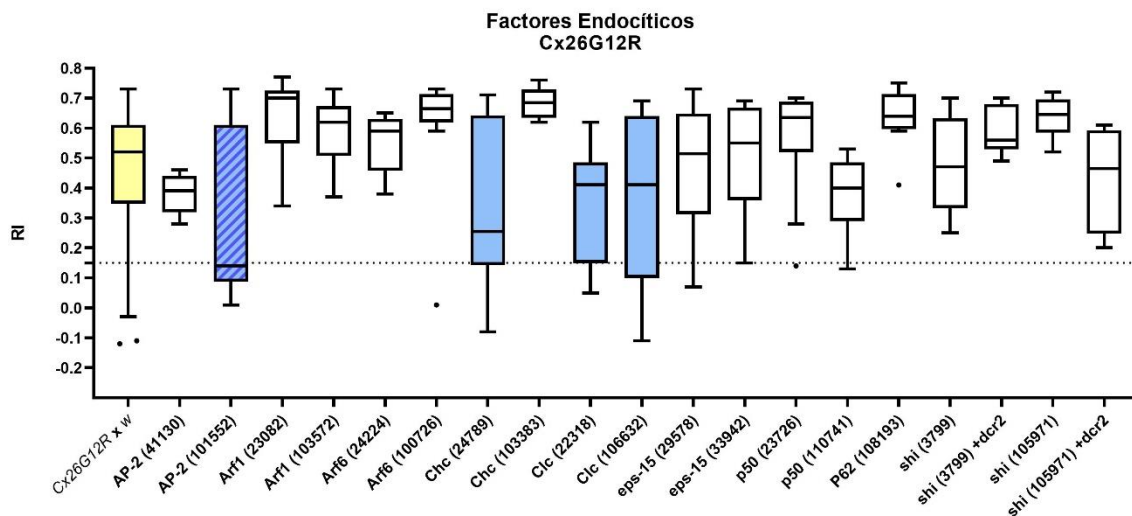


Figura 21: Resultados obtenidos para el *knockdown* de elementos relacionados a factores endocíticos en moscas que co-expresan *Cx26G12R*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para las moscas portadoras de *Cx26G12V*, los genes que participan en procesos endocíticos cuyo *knockdown* generaron una alteración en la ritmicidad fueron *AP-2*, *Chc* y *eps-15*. Para el caso de *AP-2* se destaca que, para animales que expresan *Cx26G12R*, también tuvieron un fenotipo diferente al del grupo control. Este paralelismo también se observa con el RNAi para *Chc* donde, tanto para *Cx26G12R* como para este mutante, este RNAi generó un comportamiento arrítmico en los animales.

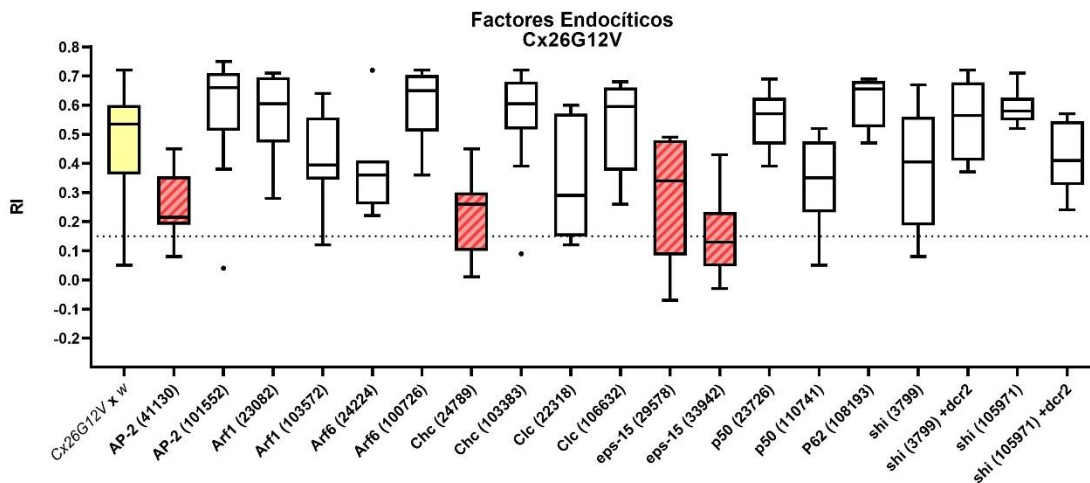


Figura 22: Resultados obtenidos para el *knockdown* de elementos relacionados a factores endocíticos en moscas que coexpresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

1.7 Misceláneos

Finalmente para las **Fig. 23-25** se ilustran los resultados obtenidos cuando se realizó el *knockdown* en moscas que coexpresan *Cx26wt*, *Cx26G12R* y *Cx26G12V*, de los genes *bsk*, *ch7*, *cora*, *Dpck*, *pck*, *Sar1*, *Snx1*, *Snx16*, *tmod* y *wbl* (llamados aquí “misceláneos” porque no son todos parte de una misma vía).

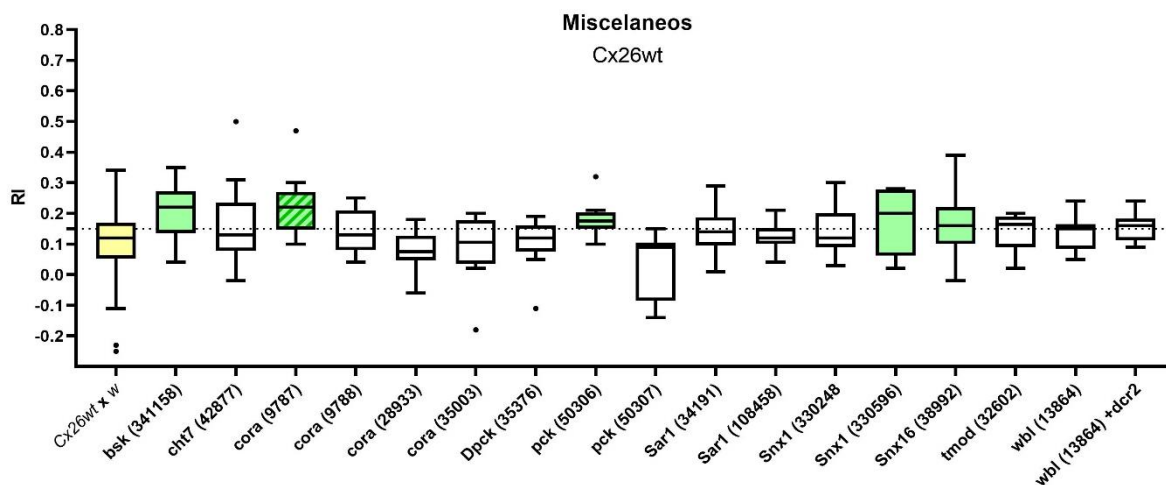


Figura 23: Resultados obtenidos para la disminución de la expresión de elementos “misceláneos” mediante el uso de RNAi en moscas que coexpresan de *Cx26wt*. Ver **Figura 5** para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para las moscas *Cx26wt*, se observa que la disminución de la expresión de *coracle* generó un aumento significativo en la ritmicidad del patrón locomotor de dichas moscas. Otros resultados interesantes correspondieron a los obtenidos luego del *knockdown* de los genes *bsk*, *pck*, *Snx1* y *Snx16* donde se observaron medianas por sobre RI=0,15.

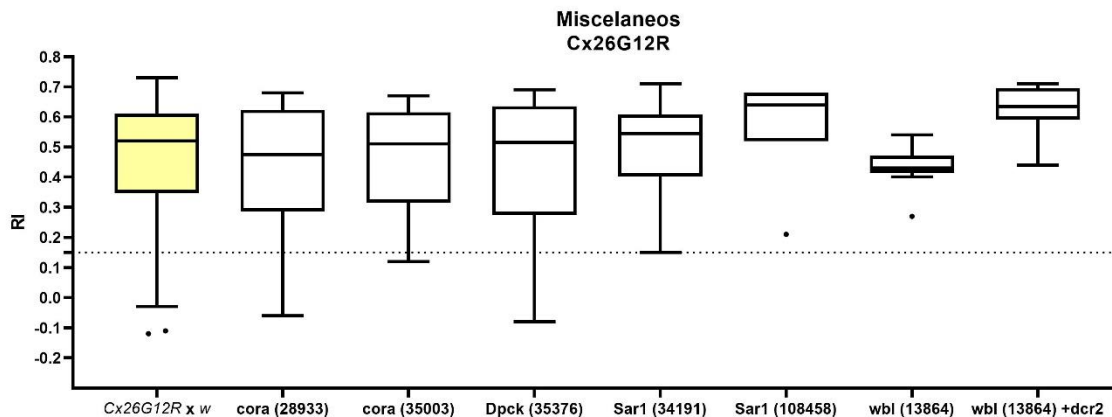


Figura 24: Resultados obtenidos para el *knockdown* de *coracle*, *Dpck*, *Sar 1* y *wbl* para moscas que coexpresan *Cx26G12R*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

Para las moscas portadoras de *Cx26G12R* no se obtuvo resultados estadísticamente significativos para estos RNAi (**Fig. 24**), pero sí para moscas *Cx26G12V*, como se grafica en la **Fig. 25**. Aquí se observó una diferencia significativa entre el comportamiento exhibido por el grupo control y el de las moscas que coexpresaron un RNAi para *Dpck* (35376). Este *knockdown* disminuyó la ritmicidad, lográndose un RI de una mediana de -0,06 y de un promedio de 0,04.

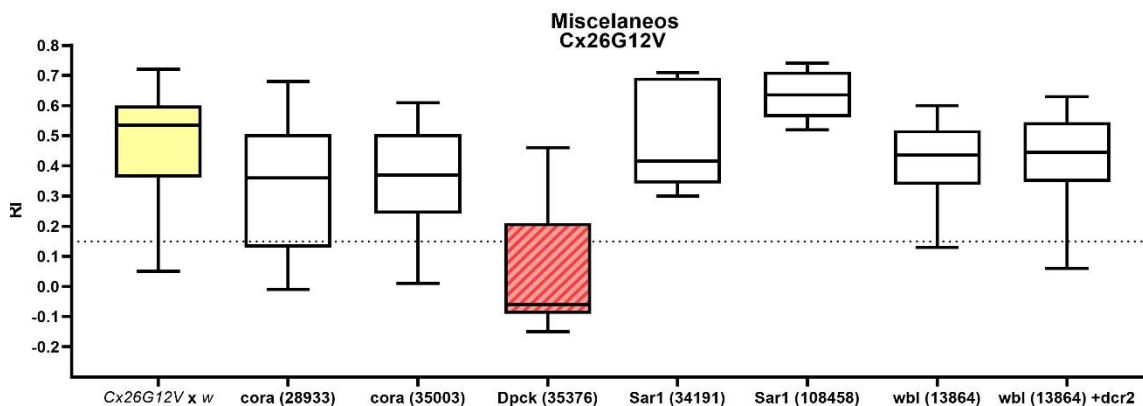


Figura 25: Resultados obtenidos para el *knockdown* de *coracle*, *Dpck*, *Sar 1* y *wbl* para moscas que coexpresan *Cx26G12V*. Ver Figura 5 para explicación de código de colores. N= 8-30 según genotipo.

1.8 Controles para RNAi

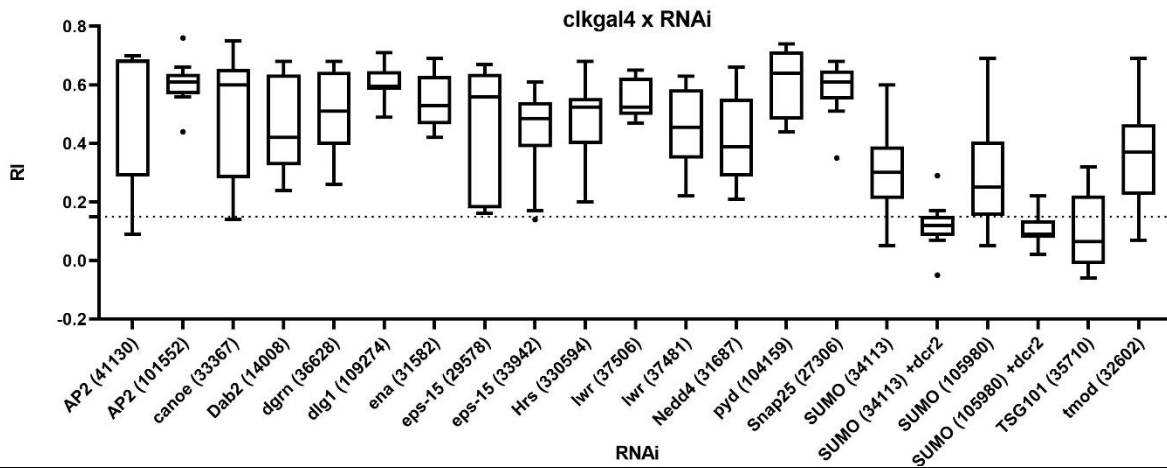


Figura 26: Ritmicidad de moscas que expresan solo el RNAi de interés bajo control de *clk*-GAL4.

Las moscas "experimentales" expresaron un RNAi para un gen de interés junto a un alelo de *Cx26*. De observarse un efecto, es necesario mostrar que este efecto se debe a la co-expresión de *Cx26*, y no simplemente al impacto del knockdown del gen en el circuito neuronal que regula la ritmicidad circadiana de la mosca. Así, como control para estos experimentos se investigó el fenotipo de moscas que expresaron solo los RNAi bajo control de *clk-gal4*. Se observa que la mayoría de los RNAi testeados no afectaron la ritmicidad normal de la mosca a excepción de los RNAi para *SUMO* y *TSG101*. Para RNAi de *SUMO*, si bien para la mayoría de los casos las medianas no llegaron a estar bajo el umbral, revelan que los resultados indicados en las **Fig. 6** y **7** deben ser interpretados con cautela. Sin embargo, el fenotipo claramente rítmico del control para RNAi de *lwr* apoyan la hipótesis que la vía SUMO juega un rol en el procesamiento de *Cx26*. En cambio, *TSG101* genera una mayoría de animales AR. Por ello, en el caso de este gen, los fenotipos arrítmicos obtenidos al coexpresar *Cx26G12R* y *Cx26G12V* podrían indicar que no se deben a cambios en la función de *Cx26* en este circuito.

2. Efecto de la expresión de las variantes de Cx26 sobre la anatomía de las neuronas del circuito del reloj en cerebro de moscas.

Cerebros de moscas adultas que expresan *Cx26wt*, *Cx26G12R* y *Cx26G12V* bajo el control de *c/k*-GAL4 mostraron un patrón de inmunoreactividad para Cx26 y PDF que se ilustra en la **Fig. 27**. Para todos los genotipos las neuronas PDF mostraron en general un número y una anatomía normal, aun cuando la expresión de la variante *G12R* (**B**) causó que las proyecciones dorsales de estas neuronas fuesen mucho menos estereotipadas. Sin embargo, este patrón anormal no afectó el fenotipo circadiano, el cual fue fuertemente rítmico (**Fig. 2**).

Al expresar la variante silvestre de *Cx26* (*Cx26wt*, **A**) se observó la presencia de partículas de inmunoreactividad para Cx26 (Cx-IR) en las neuronas PDF (flechas blancas) pudiendo apreciarse su colocalización con mayor claridad con aumento a 40x (**Fig. 28**). Interesantemente, esta marca no se observó en cerebros de moscas que expresan *Cx26G12R* y *Cx26G12V* (**B** y **C**). (Es importante notar que para todos estos experimentos, las *Cx26* se expresaron en todas las neuronas reloj, por lo que la Cx-IR [señal en canal rojo] no se encuentra exclusivamente restringida a las neuronas PDF).

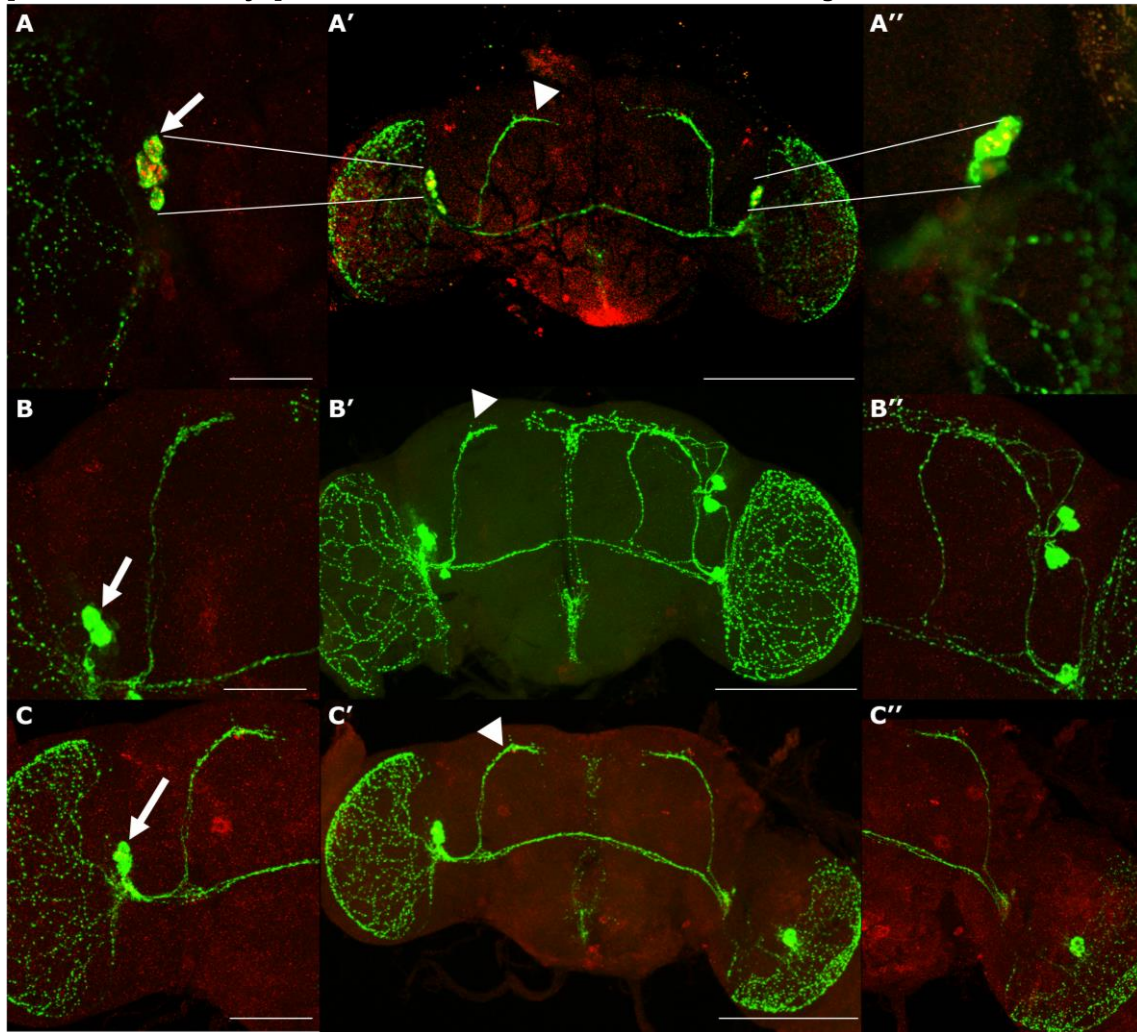


Figura 27: Imágenes captadas mediante microscopía confocal spinning disk de cerebros de *D. melanogaster* adultos control combinados con *Cx26wt* (A), *Cx26G12R* (B) y *Cx26G12V* (C) con anticuerpos para Cx26(rojo) y PDF (verde). Flechas blancas indican neuronas PDF y puntas de flecha señalan proyección dorsal de estas. Barra de escala: columna 1 y 3, 25 μ m ; columna 50 μ m.

El hecho que la expresión de *Cx26wt* cause la expresión de un fenotipo arrítmico

y fue el único genotipo para el cual se observaron partículas de Cx-IR en las neuronas PDF sugirió que la arritmicidad asociada a este genotipo podría deberse a la presencia de estas partículas. Estas podrían, por ejemplo, interferir con la funcionalidad de las neuronas PDF, las cuales son esenciales para la expresión de la ritmicidad circadiana (Renn et al., 1999). Por esta razón se exploraron las posibilidades de que: **A)** La expresión de *Cx26wt* eventualmente causaría la muerte de las neuronas PDF; y **B)** Que aquellos genes cuyo *knockdown* rescató la ritmicidad de moscas que coexpresan *Cx26wt* eliminarían estas partículas.

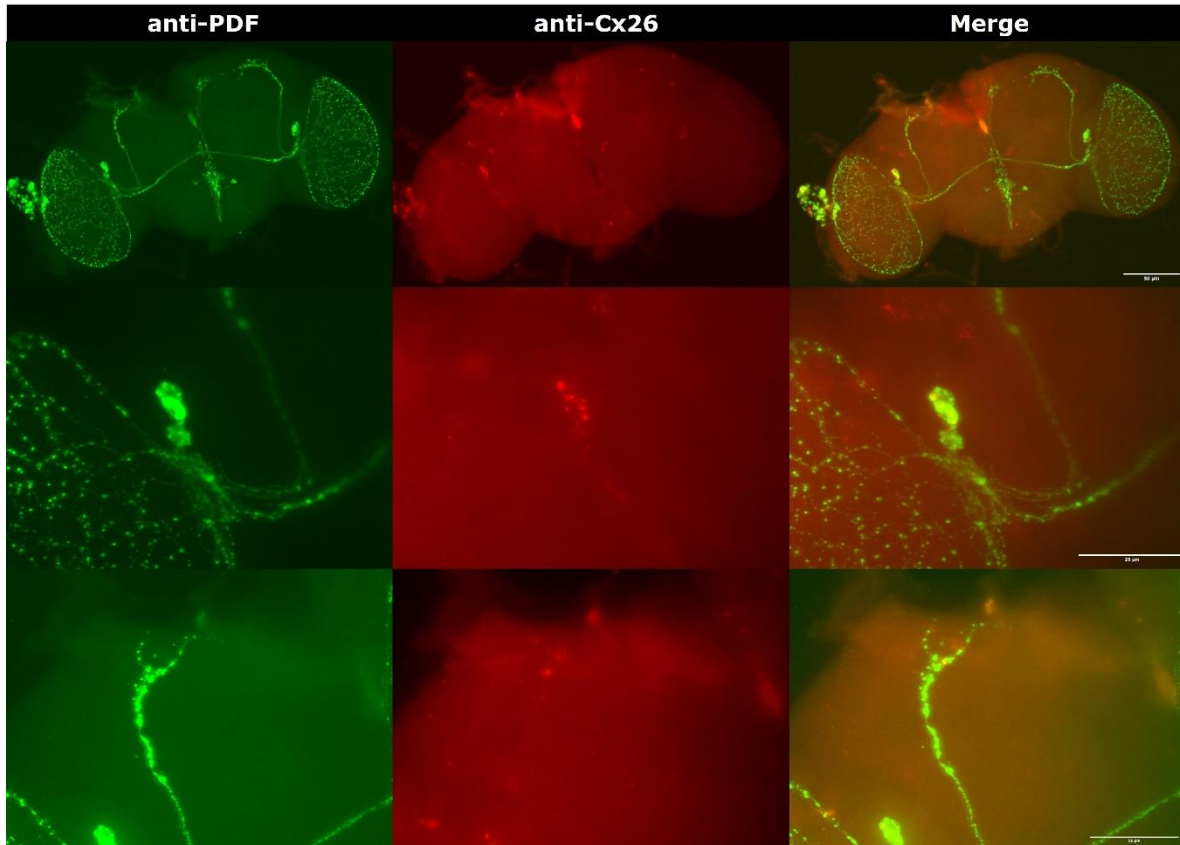


Figura 28: Cerebros de animales adultos pertenecientes al genotipo *Cx26wt x w* (joven) tratados con anticuerpos para PDF (columna 1) y *Cx26* (columna 2) completos (fila 1). Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: Fila 1, 50 μ m; Filas 2 y 3, 25 μ m.

A) La expresión de *Cx26wt* eventualmente causaría la muerte de las neuronas PDF

Para explorar esta posibilidad se examinó el patrón de inmunoreactividad para PDF y Cx26 en animales jóvenes (1 día) vs. envejecidas (17 días). Como se muestra en la Figura 29, las moscas *Cx26wt* envejecidas no mostraron mayor alteración en su patrón de Cx-IR (la menor inmunoreactividad para PDF en moscas envejecidas se debe a la edad y no es particular a este genotipo). Se observó en los cerebros jóvenes que expresan *Cx26wt* bajo el control de *clk-GAL4* (**Fig. 28**) una buena integridad del tejido acompañado de una proyección dorsal de las neuronas PDF ordenada y arborizada. A su vez se logran apreciar marcas para Cx26 que colocalizan en las neuronas PDF como se aprecia en la tercera columna de la figura. Para los cerebros de genotipo envejecido (ver **Fig. 29**), se observó esta colocalización en las neuronas pero también se vio marcas para Cx-IR sobre las proyecciones dorsales y al centro del cerebro. Dichas proyecciones en cerebros envejecidos presentan una menor arborización que en animales jóvenes al ser analizados cualitativamente. Sin embargo es muy poco probable que este cambio sutil en la anatomía de las neuronas PDF sea la causa de la arritmicidad de este genotipo

puesto que la localización exacta de la proyección dorsal no es esencial para la expresión de ritmicidad circadiana (Helfrich-Förster, 2005). Los cambios observados podrían deberse a la disminución normal de la expresión del neuropéptido PDF durante el transcurso del día ya que las disecciones se comenzaron en la mañana y finalizaron pasado el mediodía y se sabe que el patrón de expresión de PDF varía durante el día (Park et al., 2000). Sea como sea, se descarta la posibilidad de que la expresión de *Cx26wt* eventualmente causa la muerte de las neuronas PDF.

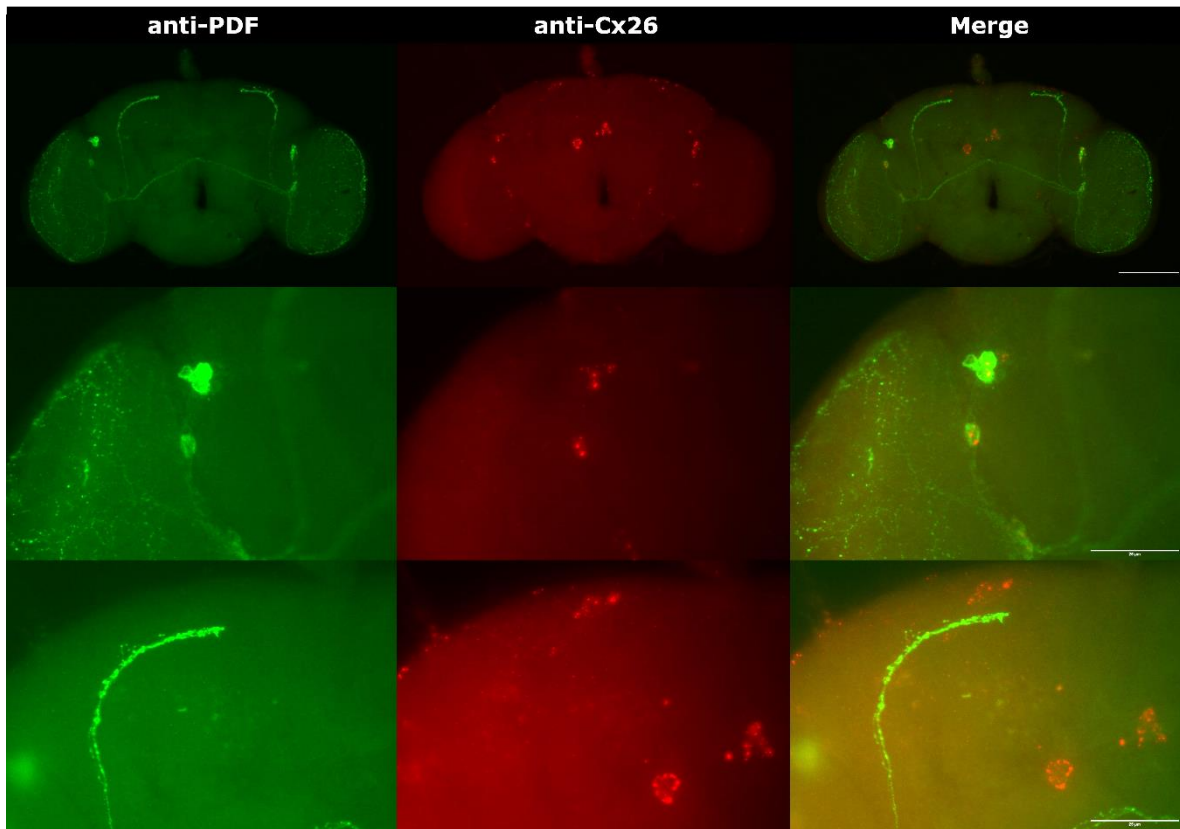


Figura 29: Cerebros para el genotipo *clk-GAL4+Cx26 x w* (envejecido) completos (fila 1). Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: fila 1 50 μ m; filas 2 y 3. 25 μ m.

B) Aquellos genes cuyo *knockdown* rescatan la ritmicidad de moscas que coexpresan *Cx26wt* eliminarían estas partículas

La **Figura 30** muestra el patrón de inmunoreactividad para PDF y *Cx26* para cerebros jóvenes de moscas *Cx26wt* que coexpresan un RNAi para *Hrs* el cual las volvió fuertemente rítmicas (ver **Fig. 12**). A pesar de este rescate de ritmicidad, los cerebros de estas moscas aún mostraron *Cx26*-IR particulada en las neuronas PDF, las cuales mostraron una anatomía normal. Una situación similar se observó en moscas envejecidas de este genotipo (**Fig. 31**).

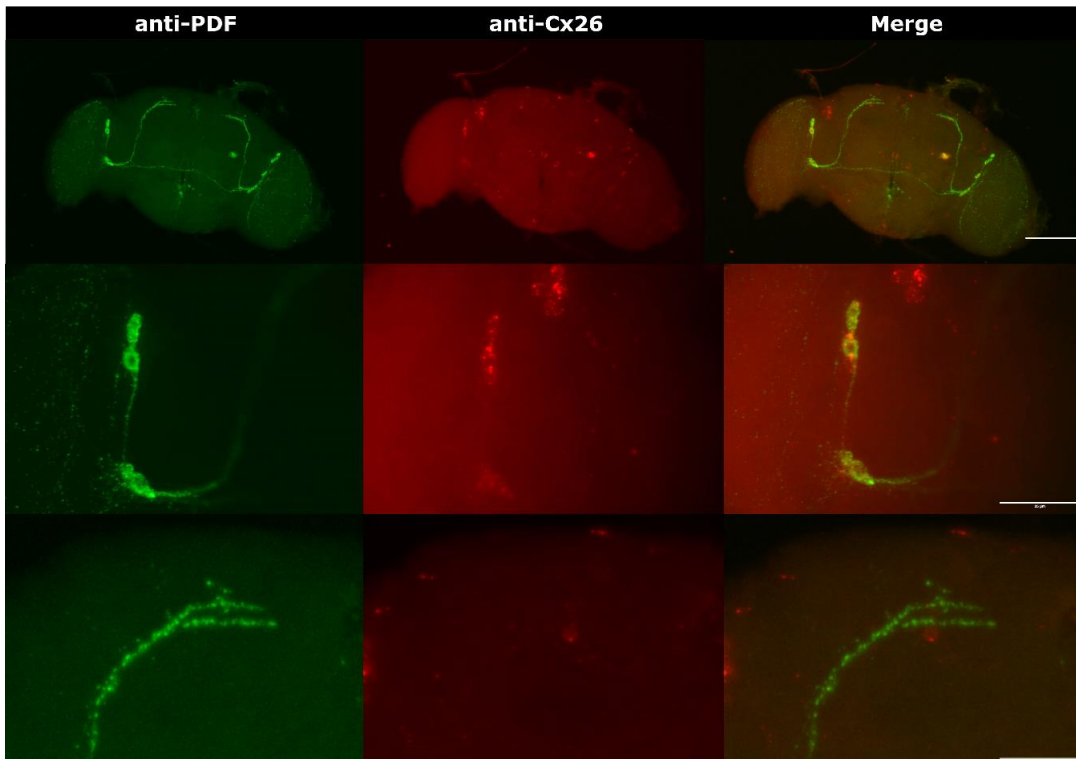


Figura 30: Cerebros de moscas adultas del genotipo *Cx26wt* que coexpresan un RNAi para *Hrs* (*joven*) completos (fila 1). Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: fila 1 50 μ m; filas 2 y 3 25 μ m.

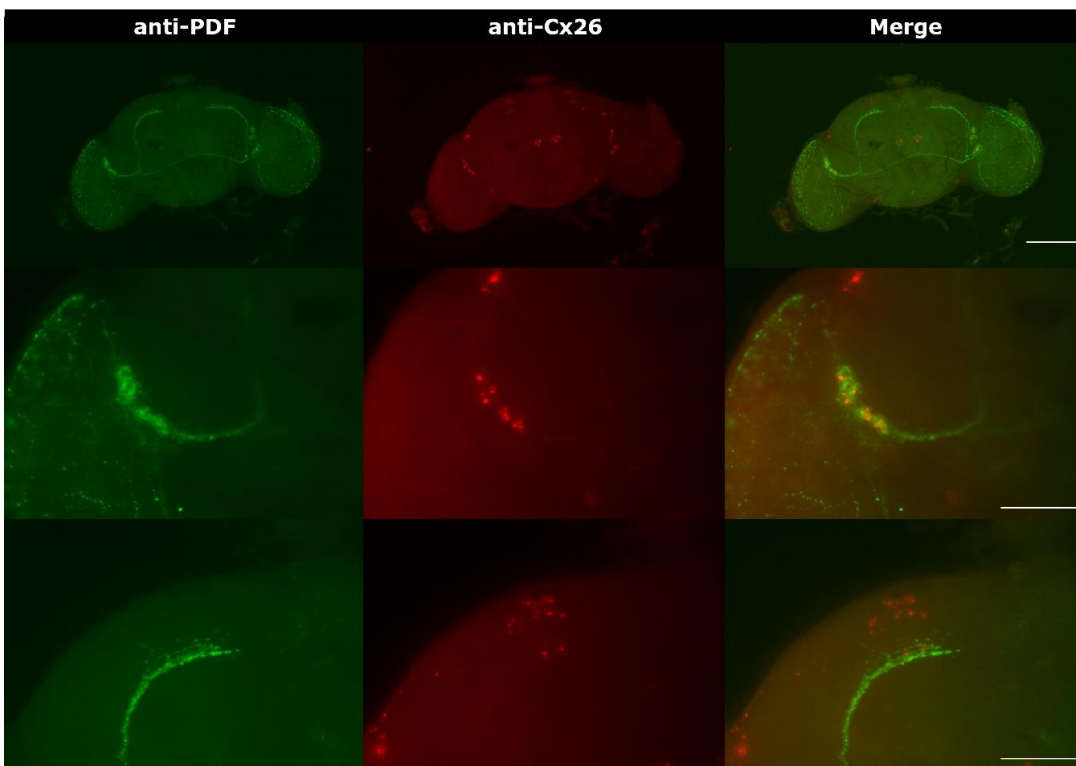


Figura 31: Cerebros de moscas adultas envejecidas del genotipo *Cx26wt* que coexpresan un RNAi para *Hrs* completos (fila 1). Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: fila 1 50 μ m; filas 2 y 3. 25 μ m.

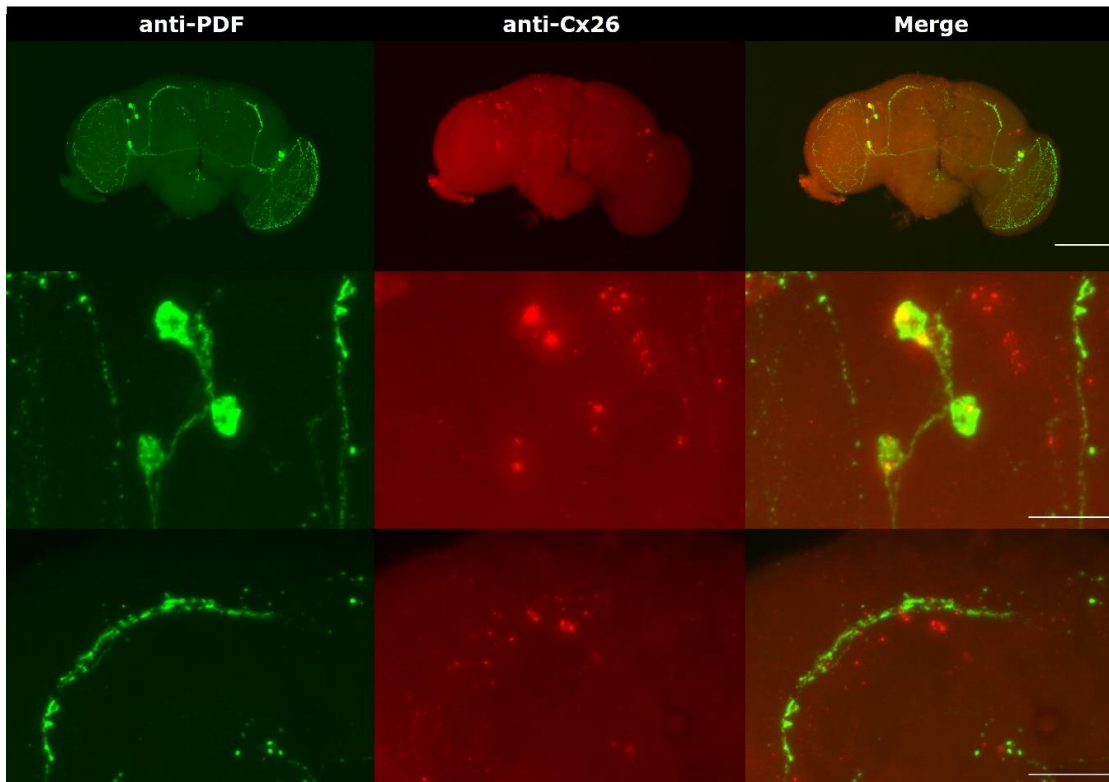


Figura 32: Cerebros de adultos *Cx26wt* que coexpresan un RNAi para *shi* (joven) completos (fila 1) Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: fila 1 50 μ m ; filas 2 y 3. 25 μ m .

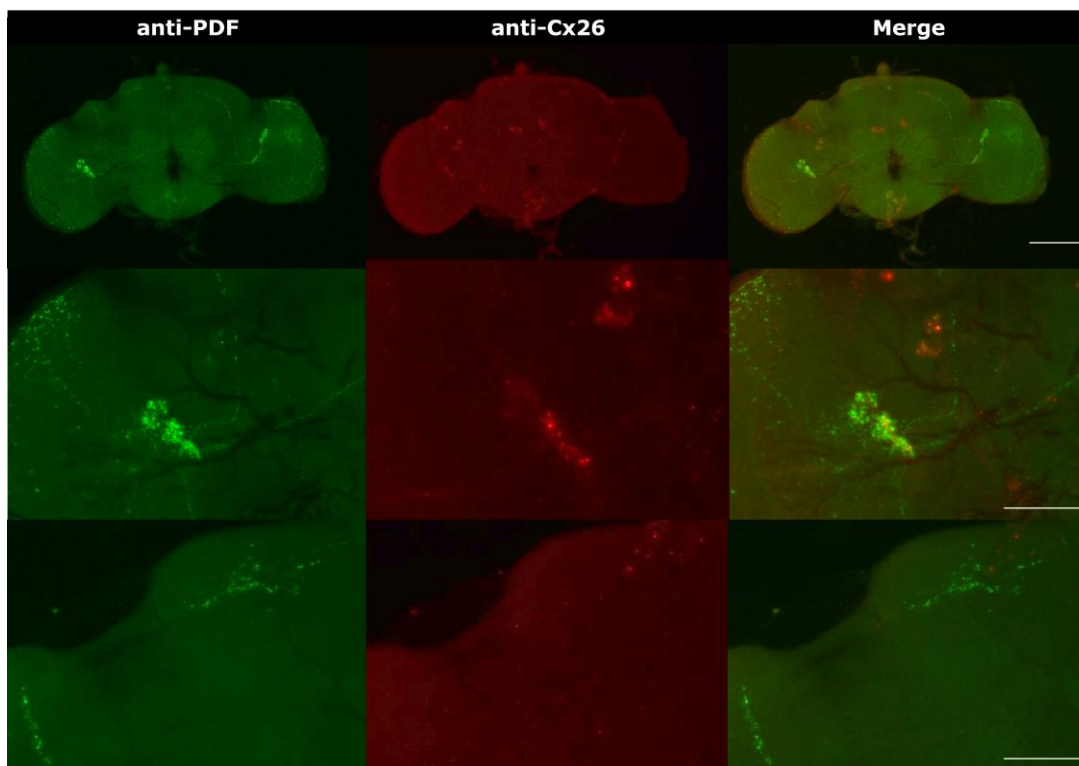


Figura 33: Cerebros adultos de moscas del genotipo *Cx26wt* que co-expresan un RNAi para *shi* (envejecidos) completos (fila 1) Las imágenes en las fila 2 y 3 muestran con mayor aumento los cuerpos celulares de las neuronas PDF y sus proyecciones dorsales, respectivamente. Barra de escala: fila 1 50 μ m ; filas 2 y 3. 25 μ m .

En las **Fig. 32 y 33**, se muestran los patrones de inmunoreactividad para PDF y Cx26 de cerebros de moscas que coexpresan *Cx26wt* y un RNAi para *shi* (VDRC 105971) jóvenes y envejecidas, respectivamente. El *knockdown* de *shi* generó un comportamiento rítmico en los animales que coexpresan *Cx26wt*. Los cerebros jóvenes presentan una buena integridad cerebral donde las neuronas PDF presentan marcas para Cx26 en y cerca de estas. Sus proyecciones llegan al sector dorsal del cerebro y presentan marcas para ambos anticuerpos. Lo que contrasta en este caso entre las neuronas de animales jóvenes y las de moscas envejecidas es que estas últimas no presentan bordes definidos y se perciben como "borrosas". A pesar de esto, estos cerebros poseen marcas de Cx26 en las neuronas PDF. La proyección dorsal si bien existente, es menos definida que las proyecciones de moscas jóvenes. Esto se puede deber a los mismos motivos mencionados para la disección anterior. Independiente de ello, el hecho que estas moscas expresaron un fenotipo rítmico significa que los cambios observados no afectaron la funcionalidad del circuito circadiano.

DISCUSIÓN

El sistema modelo, *Drosophila melanogaster*, ha contribuido enormemente a nuestra comprensión de una gran diversidad de procesos biológicos, desde los mecanismos de herencia, al desarrollo, y a la conducta. Más recientemente se ha mostrado que puede ser de utilidad incluso para comprender la biología de genes de importancia biomédica para los cuales no existe un gen homólogo en la mosca (Wangler, Yamamoto, & Bellen, 2015). Tal es el caso de Cx31 humana cuya versión mutante genera el síndrome EKV (erythrokeratoderma variabilis). En este caso, la expresión de este gen en moscas permitió identificar el mecanismo por el cual el alelo mutante genera daño celular (Tang et al., 2015).

De forma análoga, en esta tesis se utilizó *Drosophila* para identificar genes candidatos involucrados en el procesamiento y/o tráfico intracelular de *Conexina 26* (Cx26). Mutaciones en Cx26 son responsables de la mayoría de los casos de sordera genética humana. La Cx26 se diferencia de la mayoría de las Cxs y proteínas de membrana en que su procesamiento intracelular no sigue la ruta habitual vía el aparato de Golgi, sino que transita directamente a la membrana celular utilizando una ruta alternativa poco comprendida.

Como ensayo se utilizó la expresión en el circuito neuronal que regula la ritmicidad circadiana, ya que estudios anteriores establecieron no solo que la expresión de Cx26 afectaba este fenotipo sino que además el efecto dependía del alelo utilizado.

Así, se encontró que la expresión de la versión silvestre de Cx26 (Cx26wt) generaba arritmicidad mientras que las variantes Cx26G12R y Cx26G12V causaban la expresión de un fenotipo esencialmente normal. Más aun, si bien Cx26G12R y Cx26G12V expresaban un fenotipo similar, mostraron sensibilidad diferente al knockdown de diferentes genes (ver más abajo), mostrando así que este sistema podía discriminar entre 3 proteínas humanas que se diferencian en solo un aminoácido.

Como resultado de este estudio se identificaron 9 genes cuyo *knockdown* generó una mejora en la ritmicidad de animales que expresaban Cx26wt, 6 genes cuya disminución de expresión causó arritmicidad en moscas que expresaban Cx26G12R y 31 que lo hicieron a las que expresaban Cx26G12V. Esto permite posicionar dichos genes como candidatos de interés en el procesamiento intracelular y función de esta conexina.

Genes cuyo knockdown rescató la arritmicidad causada por la expresión de Cx26wt

En animales que expresaban Cx26wt, se obtuvo que los genes cuyo *knockdown* rescató la ritmicidad fueron 2 del grupo SNARE, 2 relacionados a los complejos de ESCRT, 4 relacionados a factores endocíticos y 1 del grupo "misceláneo". Dentro del grupo de las proteínas SNARE, los RNAi que generaron un comportamiento rítmico fueron los RNAi para los genes *bchs* y *Snap29*. Para estos resultados es importante destacar que se probaron 3 líneas diferentes UAS-RNAi para *bchs* y 4 para *Snap29* y en cada caso se observó un efecto solo para uno de ellos. Esto podría indicar que los efectos observados se deban al *knockdown* de otros blancos (efectos "off-target"). Como alternativa, es posible que los RNAi que no tuvieron efectos no causen un *knockdown* significativo. Para explorar esta posibilidad se planea realizar el *knockdown* de estos genes coexpresando *dcr2*, el cual debería aumentar la eficiencia del RNAi. Es relevante destacar que los fenotipos mutantes de *bchs* son potenciados por los genes *Syx13*, *SUMO* y *lwr* entre otros (Simonsen et al., 2007).

Para los elementos relacionados a los complejos ESCRT, se obtuvo que ambos RNAi del complejo ESCRT-0 examinados (*Hrs* y *Stam*) generaron animales rítmicos. *Hrs* codifica una proteína que, junto con el producto codificado por *Stam*, forman el complejo ESCRT-0. Este complejo es responsable de la selección inicial de proteínas ubiquitinadas

que finalmente se degradan en lisosomas. Por su parte la proteína codificada por *Stam* media la formación de cuerpos multivesiculares. También se ha planteado que *Hrs* regula negativamente la señalización de receptor tirosina quinasa (TKRs) Torso (Lloyd et al., 2002). Para futuros experimentos se propone la realización de la sobreexpresión de estos elementos para determinar si se genera (o no) un comportamiento arrítmico asociado a la coexpresión con *Cx26*.

Para aquellos RNAi relacionados a factores endocíticos se observó que disminuir la expresión de *Efa6*, *Eps-15* y *shi* generó un rescate de la ritmicidad. *Eps-15* codifica una proteína adaptadora multidominio implicada en la endocitosis. Interactúa con varios otros factores endocíticos como los codificados por *shi* y *AP-2*. Es necesario para el desarrollo normal de los botones sinápticos y la endocitosis de vesículas. *Shi* por su parte participa en la producción de haces de microtúbulos y está implicado en la clasificación de proteínas endocíticas (Zhang et al., 2020). *Efa6* codifica un factor clave en la activación de las GTPasas de la familia *Arf1* (Eva et al., 2017). Este ha sido el grupo con la mayor cantidad de RNAi que generan un efecto significativo. En un grupo final de elementos, el *knockdown* de *cora* generó un comportamiento rítmico en los animales que coexpresaron *Cx26wt*. Este gen codifica un componente integral de las uniones septadas (septate junction) que son propias de los invertebrados, pero funcionalmente homólogas a las uniones estrechas de los vertebrados. En base a estas evidencias sería de especial interés investigar el rol del complejo ESCRT-0 en el tráfico de *Cx26* en células de mamífero, ya que ambos componentes generaron una mejora significativa en la ritmicidad de animales que coexpresaron *Cx26wt*.

Genes cuyo knockdown causó arritmicidad en animales que coexpresaban *Cx26G12R* o *Cx26G12V*

Para los RNAi relacionados a la SUMOilación se vio que el *knockdown* de *SUMO* y *CaMKII* en animales que expresaban *Cx26G12R* presentaron una actividad locomotora arrítmica. *CaMKII* codifica una proteína quinasa y en neuronas tiene una amplia gama de sustratos en múltiples compartimentos subcelulares, que regulan la plasticidad sináptica, la excitabilidad y las interacciones citoesqueléticas (Fabian & Sachse, 2023). *SUMO* codifica para la única proteína de la familia homónima en *Drosophila* y es conjugada a una amplia gama de proteínas para regular su estabilidad y transporte. Ambas proteínas (*CaMKII* y *SUMO*) interactúan físicamente (proteína-proteína) (Long & Griffith, 2000). En particular, *CaMKII* interactúa con la ligasa E3 de *SUMO* (Puram et al., 2011). Por otro lado, hay evidencias que muestran que la SUMOilación puede modular la actividad de *CaMKII* (Long & Griffith, 2000). En el caso de animales que expresaban *Cx26G12V*, estos presentaron un comportamiento arrítmico cuando se realizó el *knockdown* de los genes *dgrn*, *dlg1*, *lwr*, *Rnf11*, *SUMO* y *Uba2*. El hecho de que 3 de 4 RNAi para *lwr* hayan generado un cambio significativo en la ritmicidad circadiana de estos animales posiciona a *lwr* como un gen de interés, al igual que *SUMO* (2 de 2 RNAi) y *Uba2* (2 de 3 RNAi). El gene *lwr* (*lesswright*) se relaciona directamente con *SUMO* ya que codifica una enzima de conjugación para este. Además de interactuar entre sí, *SUMO* y *lwr* tienen interacciones en común con varias proteínas como *dgrn* (Hu et al., 2017), *Aos1*, *CaMKII* y *Uba2* (Long & Griffith, 2000). De esto se podría desprender la idea inicial de un conjunto de elementos relacionados que estarían afectando al genotipo: *SUMO*, *lwr*, *Uba2*. A estos se podría sumar *dgrn* ya que no solo generó moscas con comportamientos AR, sino que guarda estrecha relación con la maquinaria de *SUMO* ya que codifica una ubiquitina ligasa dirigida a este. Se propone aumentar el N (actualmente=10) para los animales que coexpresan el RNAi para *dgrn* ya que no todos los animales presentaron un comportamiento AR. Se ha predicho que *Rnf11* habilita la actividad de ligasa de proteína ubiquitina y la actividad de unión de iones de zinc. Finalmente, el RNAi para *Grasp65* también generó arritmicidad al co-expresarlo con *Cx26G12V*. *Grasp65* codifica una proteína del Golgi que media el bypass del Golgi para proteínas transmembrana. Esto último resulta especialmente interesante ya que se ha demostrado que la mayoría de *Cx26* no utiliza una vía secretora clásica (pasando por el

aparato de Golgi) para llegar a la membrana. Finalmente, se destaca que el knockdown de *dgrn*, *dlg1*, *lwr*, *Rnf11* y *Uba2* solo afectó de manera evidente el fenotipo expresado por animales *Cx26G12V* y no el de moscas que expresaban *Cx26G12R*, mostrando que *Drosophila* puede discriminar entre estas 2 versiones de *Cx26*.

Dentro de las proteínas SNARE se observó que los RNAi que generaron resultados de interés (*Snap25* y *Syx13*) pertenecen al grupo Qbc-SNAREs. Para la versión mutante de *Cx26G12R* el único efecto significativo (es decir, un comportamiento arrítmico) se obtuvo con el uso del RNAi para *Snap25*. Este gen codifica un componente del complejo de proteínas SNARE que podría desempeñar un papel importante en la función sináptica de sistemas neuronales específicos. Se asocia con proteínas involucradas en el acoplamiento de vesículas y la fusión de membranas (Risinger et al., 1997). Finalmente, para *Cx26G12V*, se obtuvo que *Snap25* también generó arritmicidad. Para este alelo el knockdown de *Syx13* también causó la expresión de un fenotipo arrítmico. Este gen codifica un miembro de la familia de sintaxinas del t-SNARE que media la fusión de vesículas dentro de las células. Se sabe también que se localiza en los endosomas y participa en la maduración del autofagosoma (Littleton, 2000). Algoritmos predictivos basados en información obtenida experimentalmente indican que *Syx13* interactúa físicamente con las proteínas *Gos28*, *Snap25*, *Snap29* y *Vamp7* entre otros (Guruharsha et al., 2011). Para el caso de *Snap25* se destaca que el knockdown de este gen afectó el fenotipo de moscas *Cx26G12R* y *Cx26G12V*. Interesantemente, el otro gen de la familia de los Qbc-SNAREs probado (*Snap29*) mejoró significativamente la ritmicidad de *Cx26wt*. Por esto sería interesante analizar otros elementos relacionados tanto a *Snap25* como a *Snap29* como lo es *Snap24* (predicho estar envuelto en el transporte desde el Golgi a la membrana plasmática) o *Syx16* (responsable del transporte retrógrado del endosoma a Golgi/trans-Golgi).

De todos los elementos relacionados al complejo ESCRT, solo uno de los 3 RNAi para *TSG101* (35710) utilizados afectó la conducta rítmica de las moscas *Cx26G12R*. *TSG101* codifica un componente del ESCRT-1 que actúa como adaptador para los reordenamientos de membrana operados por ESCRT-3. Dentro de sus funciones se encuentra la clasificación endosomal de cargas ubiquitinadas. Para las moscas que expresaban *Cx26G12V* se destaca que *Hrs*, *Stam* y *TSG101* generaron un efecto significativo en la ritmicidad del patrón locomotor de dichos animales. Cabe destacar que al probar el RNAi *TSG101* (35710) en ausencia de *Cx26* se obtuvieron resultados arrítmicos por lo que el fenotipo de animales portadores tanto de la versión mutante de *Cx26* como de la silvestre requiere de un análisis a mayor profundidad ya que su fenotipo cuando se expresa en combinación con *Cx26* podría estar enmascarado por la acción de este RNAi por sí solo. El RNAi en común entre ambas versiones mutantes de la *Cx26* fue *TSG101* (35710) y se destaca que el knockdown de *Hrs*, que genera una pérdida de la ritmicidad al coexpresarse con *Cx26G12V*, rescata de manera significativa la arritmicidad cuando se coexpresa con *Cx26wt*. Esto también se observa con la coexpresión de *Stam* en *Cx26G12V* y en *Cx26wt*. Esto posiciona a estos genes como candidatos de gran interés en la mediación del procesamiento intracelular de *Cx26*.

El knockdown de genes relacionados a actina generaron un efecto significativo en los animales que expresaban versiones mutantes de la conexina 26. Para *Cx26G12R*, solo tuvo un efecto *Nedd4* en cambio moscas que co-expresaban *Cx26G12V* presentaron un comportamiento arrítmico cuando se utilizaron los RNAi para *canoe*, *Dab2*, *ena*, *Nedd4* y *pyd*. El único gen que generó un efecto para ambos alelos de *Cx26* fue *Nedd4*. Todos estos elementos se relacionan entre sí como se ilustra en la **Fig. 15**. El gen *canoe* codifica una proteína de andamiaje en las adherens junctions que participa en la morfogénesis de varios tejidos. Es un potenciador de *ena* y de *dlg1* (ver sección sobre SUMO) y se interacciona físicamente (proteína-proteína) con *pyd* (Choi et al., 2011; Takahashi et al., 1998). Al haber menos expresión de *canoe* podría suceder el efecto observado sobre la conducta de los animales debido a una menor potenciación de los

elementos previamente descritos. Esta idea se sustenta al observar que tanto el *knockdown* para *ena* como para *dlg1* generó animales arrítmicos (para moscas *Cx26G12V*). De forma similar se explicaría lo que se observó con el *knockdown* de *ena* ya que este es un potenciador de *pyd* (y también de *canoe*) cuya expresión disminuida también generó animales arrítmicos.

El gen *ena* también actúa como un supresor de *Dab2* por lo que disminuir la expresión de *ena* podría generar un aumento en los niveles de *Dab2*. El gen *Dab2* (*Disabled2*) por su parte, codifica una proteína adaptadora que es un componente central de la vía de señalización de *Notch* (proteína señalizadora esencial con un importante rol en el desarrollo).

El RNAi relacionado a factores endocíticos que generó arritmicidad del patrón locomotor de moscas portadoras de *Cx26G12R* fue *AP-2*. Para las moscas *Cx26G12V*, estos RNAi fueron los de *AP-2*, *chc* y *Eps-15*. La función de *Eps-15* ya fue descrita en apartados anteriores pero se encuentra implicado en la endocitosis. Se sabe que *AP-2* interviene en la señalización de *Notch* y corresponde al único gen que generó un efecto para ambos alelos mutantes de la *Cx26*. El gen *chc* codifica una proteína que es parte del complejo de clatrina, que es el mayor componente de las vesículas recubiertas. En el último de los grupos ("Misceláneos") se observó un efecto sobre la ritmicidad en los animales que expresaban *Cx26G12V* cuando se disminuyó la expresión de *Dpck*, el cual codifica una enzima bifuncional que lleva a cabo los 2 últimos pasos de la vía de biosíntesis canónica de la coenzima A.

Los cerebros de los animales que expresaban solo *Cx26wt* mostraron partículas en las neuronas PDF, que son las neuronas principales del marcapaso circadiano. Estas partículas también estaban presentes en moscas que coexpresaban un RNAi para *Hrs* y *shi*, por lo que el rescate de la arritmicidad asociado al *knockdown* de estos genes no sería el resultado de la eliminación de estas partículas. Este rescate tampoco se debió a una mayor sobrevivencia de estas neuronas ya que estaban presentes y con morfología aparentemente normal en moscas envejecidas de todos los genotipos. Para comprender las bases del rescate de arritmicidad asociado al *knockdown* de *Hrs* y *shi* se podría estudiar la integridad de otros elementos del circuito neuronal circadiano ya que en el presente estudio solo se examinaron las neuronas PDF. Además, es fundamental conocer si estas partículas están en la membrana celular o si corresponden a un agregado intracelular ya que esta información es clave para la interpretación de estos resultados. También se podría determinar si las partículas vistas en animales que expresan *Cx26wt* están presentes en las neuronas PDF de animales *Cx26G12R* o *Cx26G12V* vueltos arrítmicos al coexpresar un RNAi para un gen particular, como lo son *SUMO* o *TSG101*. Finalmente, se podría determinar si la expresión y el ciclado de los genes reloj *per* y *tim* (Sehgal et al., 1994) se correlaciona con el fenotipo conductual de los animales.

Actualmente, esta investigación es la primera en buscar, mediante un screening genético utilizando *Drosophila melanogaster*, genes candidatos en la regulación y mediación del tráfico de *Cx26* en su forma silvestre (*Cx26wt*) y para 2 de los principales mutantes relacionados a la sordera genética humana (*Cx26G12R* y *Cx26G12V*). En ella se identificaron genes cuyo *knockdown* altera el fenotipo circadiano de *Drosophila* cuando esta coexpresa diferentes alelos de *Cx26* demostrando el uso de *Drosophila* como un modelo válido para la obtención de genes candidatos en el procesamiento intracelular de esta conexina. Aun así, se requieren mayores estudios que continúen con la información aquí obtenida para comprender a cabalidad como los genes responsables de los efectos observados alteran la función de *Cx26*.

Para continuar esta investigación se sugiere también investigar si la arritmicidad causada por la expresión de *Cx26* en neuronas del marcapaso circadiano se debe a defectos en el desarrollo o de la función del marcapaso. Para ello podría examinarse, por

ejemplo, el fenotipo de animales en los cuales se restringió la expresión de *Cx26* al periodo de desarrollo de la mosca o solo al período adulto. Esta restricción de la expresión se puede llevar a cabo mediante el uso de GAL80[ts], que corresponde a una versión termosensible del gen GAL80 de *Saccharomyces cerevisiae*, una proteína que antagoniza la acción de GAL4. Así, a la temperatura permisiva de 18°C, la proteína GAL80[ts] expresada bajo el control del promotor ubicuo de tubulina (*tubulina-GAL80[ts]*) es funcional, inhibiendo al activador transcripcional GAL4. A temperaturas restrictivas superiores a 29°C, GAL80[ts] ya no puede unirse a GAL4 y pierde su función represiva. Por lo tanto, GAL80[ts] se puede utilizar en combinación con cambios de temperatura para refinar el patrón temporal de expresión de un gen de interés expresado mediante el sistema de expresión binaria GAL4-UAS (Caygill & Brand, 2016; McGuire, et al., 2003).

CONCLUSIONES

Disminuir la expresión de genes involucrados en la SUMOilación, o que codifican proteínas SNARE o del complejo ESCRT, o que interaccionan con actina o con factores endocíticos entre otros, permitió identificar 46 elementos que podrían jugar un rol en la regulación del procesamiento intracelular de *Cx26*, tanto es su forma silvestre como en las versiones mutantes seleccionadas. Paralelamente se analizó el circuito neuronal de la mosca cuando se coexpresa *Cx26wt* con 2 de los RNAi que generaron una mejora en el fenotipo arrítmico de *Cx26wt*. Los resultados muestran que el uso del *knockdown* mediado por RNAi permite identificar genes candidatos que podrían participar en el procesamiento y/o tráfico intracelular de *Cx26*. El hecho de que varios de los elementos analizados no han sido previamente reportados como elementos reguladores del tráfico y función de *Cx26* (o de la familia de las *Cxs*) indica que este estudio abre las puertas a un nuevo campo para el desarrollo de investigaciones futuras. Este estudio abre la posibilidad de utilizar a *Drosophila melanogaster* como sistema modelo de estudio para la realización de *screens* genéticos que permiten identificar genes involucrados en diversos procesos, incluyendo a elementos propios a los vertebrados incluyendo humanos como es la *Cx26*.

BIBLIOGRAFÍA

- Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., ... Sugamura, K. (1997). Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 32785–32791. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.52.32785>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415.
- Caygill, E. E., & Brand, A. H. (2016). The Q-System: A Versatile Expression System for Drosophila. *Methods in Molecular Biology*, 1478, 4–6. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3>
- Choi, W., Jung, K. C., Nelson, K. S., Bhat, M. A., Beitel, G. J., Peifer, M., & Fanning, A. S. (2011). The single Drosophila ZO-1 protein Polychaetoid regulates embryonic morphogenesis in coordination with Canoe/afadin and Enabled. *Molecular Biology of the Cell*, 22(12), 2010–2030. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-1014>
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S., & Emr, S. D. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *The Journal of Cell Biology*, 175(5), 815. <https://doi.org/10.1083/JCB.200608053>
- 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>
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 96(2), 271–290. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80566-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80566-8)
- Eva, R., Koseki, H., Kanamarlapudi, V., & Fawcett, J. W. (2017). EFA6 regulates selective polarised transport and axon regeneration from the axon initial segment. *Journal of Cell Science*, 130(21), 3663–3675. <https://doi.org/10.1242/jcs.207423>
- Fabian, B., & Sachse, S. (2023). Experience-dependent plasticity in the olfactory system of Drosophila melanogaster and other insects. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1130091. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1130091>
- Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:12, 8(12), 947–956. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A., & Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 475–502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002355>
- Guruharsha, K. G., Rual, J. F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., ... Artavanis-Tsakonas, S. (2011). A Protein Complex Network of Drosophila melanogaster. *Cell*, 147(3), 690–703. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.08.047>
- Helfrich-Förster, C. (2005). Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes, Brain and Behavior*, 4(2), 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00092.x>
- Hurley, J. H. (2010, December). The ESCRT complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:9, 7(9), 631–643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00434-2)
- Lear, B. C., Merrill, C. E., Lin, J. M., Schroeder, A., Zhang, L., & Allada, R. (2005). A G Protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron*, 48(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.008>
- Levine, J. D., Funes, P., Dowse, H. B., & Hall, J. C. (2002). Signal analysis of behavioral and molecular cycles. *BMC Neuroscience*, 3, 1–25. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-3-1>

- Levine, T., & Rabouille, C. (2005). Endoplasmic reticulum: One continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(4), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.06.005>
- Littleton, J. T. (2000). A Genomic Analysis of Membrane Trafficking and Neurotransmitter Release in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 150(2), F77–F82. <https://doi.org/10.1083/JCB.150.2.F77>
- Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G., & Bellen, H. J. (2002). Hrs Regulates Endosome Membrane Invagination and Tyrosine Kinase Receptor Signaling in *Drosophila*. *Cell*, 108(2), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00611-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00611-6)
- Long, X., & Griffith, L. C. (2000). Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40765–40776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003949200>
- Martin, P. E. M., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R. J., & Evans, W. H. (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of Cell Science*, 114(21), 3845–3855.
- Martínez, A. D., Acuña, R., Figueroa, V., Maripillan, J., & Nicholson, B. (2009). Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(2), 309–322. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2138>
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., & Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science*, 302(5651), 1765–1768. <https://doi.org/10.1126/science.1089035>
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2516–2524. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770>
- Nitabach, M. N., & Taghert, P. H. (2008). Organization of the *Drosophila* Circadian Control Circuit. *Current Biology*, 18(2), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.061>
- Park, J. H., Helfrich-Förster, C., Gyunghee, L., Rosbash, M., Liu, L., & Hall. (2000). Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3608–3613. <https://doi.org/10.1073/pnas.070036197>
- Prokop, A., & Morgan, H. (2012). A rough guide to *Drosophila* Genetics, (Part 1), 1–22.
- Prydz, K., Tveit, H., Vedeler, A., & Saraste, J. (2013). Arrivals and departures at the plasma membrane: Direct and indirect transport routes. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1409-5>
- Pulver, S. R., Cognigni, P., Denholm, B., Fabre, C., Gu, W. X. W., Linneweber, G., ... Miguel-Aliaga, I. (2011). Why flies? Inexpensive public engagement exercises to explain the value: Of basic biomedical research on *Drosophila melanogaster*. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 35(4), 384–392. <https://doi.org/10.1152/advan.00045.2011>
- Ren, X., Kloer, D. P., Kim, Y. C., Ghirlando, R., Saidi, L. F., Hummer, G., & Hurley, J. H. (2009). Hybrid Structural Model of the Complete Human ESCRT-0 Complex. *Structure*, 17(3), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.012>
- Renn, S. C. P., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., & Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99(7), 791–802. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81676-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81676-1)
- Revel, J. P., & Karnovsky, M. J. (1967). Hexagonal Array of Sunits in Intercellular Junctions of the Mouse Heart and Liver. *Journal of Cell Biology*, 33, C7–C12.
- Risinger, C., Deitcher, D. L., Lundell, I., Schwarz, T. L., & Larhammar, D. (1997). Complex gene organization of synaptic protein SNAP-25 in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 194(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00106-6)

- Roman, G., Endo, K., Zong, L., & Davis, R. L. (2001). P{switch}, a system for spatial and temporal control of gene expression in drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12602–12607. <https://doi.org/10.1073/pnas.221303998>
- Salcini, A. E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P., & Di Fiore, P. P. (1999). Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(8), 805–809. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00042-4)
- Sehgal, A., Price, J. L., Man, B., & Young, M. W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless. *Science*, 263(5153), 1603–1606. <https://doi.org/10.1126/science.8128246>
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Lindmo, K., Galaviz, V., Cheng, S., Rusten, T. E., & Finley, K. D. (2007). Genetic Modifiers of the Drosophila Blue Cheese Gene Link Defects in Lysosomal Transport With Decreased Life Span and Altered Ubiquitinated-Protein Profiles. *Genetics*, 176(2), 1283–1297. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.106.065011>
- Söhl, G., & Willecke, K. (2003). An Update on Connexin Genes and their Nomenclature in Mouse and Man. *Cell Communication and Adhesion*, 10(4–6), 173–180. <https://doi.org/10.1080/15419060390262877>
- Stebbins, M. J., Urlinger, S., Byrne, G., Bello, B., Hillen, W., & Yin, J. C. P. (2001). Tetracycline-inducible systems for Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10775–10780. <https://doi.org/10.1073/pnas.121186498>
- Sundram, V., Ng, F. S., Roberts, M. A., Millán, C., Ewer, J., & Jackson, F. R. (2012). Cellular requirements for LARK in the Drosophila circadian system. *Journal of Biological Rhythms*, 27(3), 183–195. <https://doi.org/10.1177/0748730412440667>
- Swift, M. L. (1997). GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 37(2), 411–412. https://doi.org/10.1021/CI960402J/ASSET/CI960402J.FP.PNG_V03
- Takahashi, K., Matsuo, T., Katsube, T., Ueda, R., & Yamamoto, D. (1998). Direct binding between two PDZ domain proteins Canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in Drosophila morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 78(1–2), 97–111. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00151-8)
- 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>
- Unwin, P. N. T., & Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature*, 283(5747), 545–549. <https://doi.org/10.1038/283545a0>
- Wangler, M. F., Yamamoto, S., & Bellen, H. J. (2015). Fruit flies in biomedical research. *Genetics*, 199(3), 639–653. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.171785>
- Wei, C.-J., Xu, X., & Lo, C. W. (2004). Connexins and Cell Signaling in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 811–838. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144309>
- Zhang, R., Lee, D. M., Jimah, J. R., Gerassimov, N., Yang, C., Kim, S., ... Chen, E. H. (2020). Dynamin regulates the dynamics and mechanical strength of the actin cytoskeleton as a multifilament actin-bundling protein. *Nature Cell Biology*, 22(6), 674–688. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0519-7>

ANEXOS

I. Líneas de RNAi utilizadas.

Abajo se indican todos los genes que se utilizaron durante esta investigación. Se indica además su origen (centros de cepas Bloomington, USA [BL] o Vienna *Drosophila* Resource Center [VDRC]) y código, además de su CG (código asignado a cada gen de *Drosophila* durante la secuenciación del genoma por Celera Genomics) y observaciones que incluyen información sobre su función y sinónimos.

Nombre	VDRC/BL	Código	CG	Observaciones
14-3-3E	VDRC	15884	CG31196	Codifica una proteína ácida que se heterodimeriza preferentemente con otros miembros de la familia pudiendo también homodimerizarse. Rol en múltiples vías de señalización pero más prominentemente en la cascada Ras/MAPK. Sinónimos: <i>D14-3-3ε</i> , <i>SR3-9</i> .
	VDRC	108129		
14-3-3Z	VDRC	48724	CG17870	Codifica 3 isoformas de proteínas ácidas debido a su splicing alternativo. Las isoformas se homo- y hetero-dimerizan entre sí y con otros miembros de la familia. Rol en múltiples vías de señalización pero más prominentemente en la cascada Ras/MAPK. Sinónimos: <i>D14-3-3ζ</i> , <i>leonardo</i> .
	VDRC	104496		
Aos1	BL	28972	CG12276	<i>Activator of SUMO 1 (Aos1)</i> codifica una de las 2 subunidades (junto con el producto de <i>Uba2</i>) de la enzima heterodimérica activadora de SUMO. Sinónimos: <i>SAE1</i> , <i>DmAos1</i> .
	BL	36074		
	VDRC	47256		
AP-2	VDRC	101552	CG7807	AP-2 codifica un factor de transcripción con funciones esenciales en el desarrollo de las patas, la probóscide y el sistema nervioso central. Interviene en la señalización de Notch en el tarso en desarrollo. Sinónimos: <i>AP-2a</i> , <i>TfAP-2</i> .
	VDRC	41130		
Arf1	VDRC	103572	CG8385	Pequeña GTPasa involucrada en el tráfico de proteínas entre diferentes compartimentos celulares. Modula la formación y desprendimiento de vesículas del aparato de Golgi. Sinónimos: <i>Arf9F</i> , <i>dArf1</i> .
	VDRC	23082		
Arf6	VDRC	24224	CG8156	Regula los procesos de mediación del tráfico vesicular, como la clasificación de la carga, el ensamblaje de vesículas y la fusión de membranas. Sinónimos: <i>Arf51f</i> , <i>dArf6</i> .
	VDRC	100726		
Arm	VDRC	7767	CG11579	Homólogo de <i>Drosophila</i> de beta-catenina. Juega papeles en la adhesión celular. Sinónimos: <i>β-catenina</i> .
	VDRC	107344		
bchs	BL	42517	CG14001	<i>blue cheese (bchs)</i> es un gen expresado neuronalmente, miembro de la superfamilia BEACH (Beige and Chediak-Higashi), e involucrados en el tráfico de vesículas. Sinónimos: <i>Beach1</i> , <i>Beached</i> , <i>EP2299</i> .
	VDRC	45028		
	VDRC	110785		
Bsk	VDRC	34138	CG5680	<i>basket (bsk)</i> codifica una serina/treonina-proteína quinasa, un componente clave de la vía JNK que fosforila el factor de transcripción codificado por <i>Jra</i> . Sinónimos: <i>JNK</i> , <i>c-Jun N-terminal kinase</i> .
Cam	VDRC	28242	CG8472	<i>Calmodulin (Cam)</i> codifica una proteína mensajera cuya actividad depende de su unión a calcio. Actúa como parte de la vía de transducción de señales de calcio e interactúa con varias proteínas diana, como quinasas y fosfatasa. Está involucrado en el movimiento basado en el filamento de actina, el ensamblaje del huso mitótico, la guía del axón, la respuesta al daño del ADN, la autofagia, la muerte celular, la percepción sensorial y la homeostasis muscular.
	VDRC	102004		

				Sinónimos: <i>CaIA, D-Cam.</i>
<i>caMKII</i>	VDR	100265	CG18069	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i> (CaMKII) codifica una abundante proteína quinasa de serina/treonina regulada por Ca ²⁺ -calmodulina. Sinónimo: <i>CaM kinase II.</i>
	VDR	47280		
<i>canoe</i>	BL	38194	CG42312	Codifica una proteína de andamiaje en las adherens junctions que participa en la morfogénesis de una variedad de tejidos. Sinónimo: <i>afadina, lips, lip.</i>
	BL	33367		
	VDR	7769		
	VDR	102686		
<i>Clc</i>	VDR	106632	CG6948	<i>Clathrin light chain</i> (Clc). La clatrina es la principal proteína de la cubierta poliédrica de las fosas y vesículas recubiertas. Sinónimo: <i>clatrina.</i>
	VDR	22318		
<i>Cora</i>	BL	35003	CG11949	<i>Coracle</i> (cora) es un componente integral de la septate junction. Puede que desempeñe un papel en las interacciones célula-célula que son necesarias para un correcto desarrollo. Sinónimo: <i>Cor, D4.1.</i>
	BL	28933		
	VDR	9788		
	VDR	9787		
<i>Chc</i>	VDR	103383	CG9012	<i>Clathrin heavy chain</i> (Chc) codifica una proteína que es parte del complejo de clatrina, el cual corresponde al mayor componente de las vesículas recubiertas. Sinónimo: <i>clatrina.</i>
	VDR	24789		
<i>Cht7</i>	VDR	42877	CG1869	<i>Chitinasa 7</i> (Cht7) codifica una enzima involucrada en el desarrollo de la cutícula, y la reparación de heridas.
<i>Dab2</i>	VDR	14008	CG9695	<i>Disabled</i> codifica una proteína adaptadora componente central de la vía de señalización de la tirosina quinasa Abl.
	VDR	109646		
<i>dgrn</i>	BL	27267	CG10981	<i>degringolade</i> (dgrn) codifica una ubiquitina ligasa dirigida a SUMO. Durante el desarrollo, se requiere para la señalización y el patrón de Notch. Sinónimo: <i>STUbL.</i>
	BL	36628		
	VDR	16150		
	VDR	101668		
<i>dlg1</i>	VDR	41134	CG1725	<i>Discs large 1</i> (dlg1) juega un papel crítico en las septate junctions en el control del crecimiento celular durante el desarrollo larvario. Se sugiere un rol en la adhesión celular así como en la transducción de señales para controlar la proliferación celular.
	VDR	109274		
<i>Dpck</i>	BL	35376	CG10575	<i>Bifunctional Phosphopantetheine adenylyltransferase - Dephospho-CoA kinase</i> (Ppat-Dpck) codifica una enzima bifuncional que lleva a cabo los 2 últimos pasos de la vía de biosíntesis canónica de la coenzima A (CoA). Sinónimo: <i>dPPAT-DPCK.</i>
<i>Dube3A</i>	VDR	45875	CG6190	<i>Ubiquitin protein ligase E3A</i> (Dube3a) codifica el miembro fundador de la familia de enzimas ubiquitina E3 ligasa de tipo HECT. Está involucrado en el paso final de conjugación de ubiquitina a sus sustratos objetivo. Sinónimo: <i>As, das, Drosophila Angelman síndrome.</i>
<i>Eb1</i>	VDR	24451	CG3265	Codifica una proteína de unión a los extremos de los microtúbulos que contribuye a la organización del citoesqueleto de estos. Sinónimo: <i>dEB1</i>
	VDR	330094		
<i>Efa6</i>	VDR	42321	CG31158	<i>Exchange factor for Arf 6</i> (Efa6) codifica un Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) que sustenta la activación de las GTPasas de la familia <i>Arf1</i> .
	VDR	330083		
<i>ena</i>	BL	31582	CG15112	<i>enabled</i> (ena) codifica el único miembro de la familia Ena/VASP en <i>Drosophila</i> . Actúa como una polimerasa de actina procesiva, estimulando la adición de actina en el barbed end. Sinónimo: <i>enb, VASP.</i>
	BL	39034		
	VDR	43058		
	VDR	106484		

	VDCR	43056		
<i>Eps-15</i>	BL	29578	CG16932	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15 (Eps-15)</i> codifica una proteína adaptadora multidominio implicada en la endocitosis. Interactúa con varios otros factores endocíticos, como los codificados por <i>shi</i> , <i>stnB</i> , <i>Dap160</i> y <i>AP-2a</i> . Se enriquece en los sitios de endocitosis y se requiere para el desarrollo normal de los botones sinápticos y la endocitosis de vesículas durante la estimulación de alta frecuencia.
	BL	33942		
	VDCR	19165		
	VDCR	106678		
<i>Gos28</i>	BL	34724	CG7700	<i>Golgi SNARE, 28 kDa (Gos28)</i> codifica una proteína involucrada en el tráfico vesicular. Funciona como t-SNARE en el transporte de medial a trans Golgi de rodopsina durante la biosíntesis. Sinónimo: <i>dgos28</i> .
	VDCR	100289		
	VDCR	12152		
<i>Grasp65</i>	BL	34082	CG7809	<i>Grasp65</i> codifica una proteína de Golgi miristoilada que se une al producto de GM130 y se ha demostrado que media en la derivación de Golgi de las proteínas transmembrana. Sinónimo: <i>GRASP</i> .
	BL	64565		
<i>Hrs</i>	VDCR	330597	CG2903	<i>Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate (Hrs)</i> codifica una proteína que, junto con el producto codificado por <i>Stam</i> , forma el complejo ESCRT-0. Sinónimo: <i>vps27</i> .
<i>jar</i>	VDCR	37535	CG5695	<i>jaguar (jar)</i> es una proteína que se une a la actina y tiene actividad ATPasa que es activada por la actina. Junto a <i>CLIP-190</i> , <i>jar</i> puede coordinar la interacción entre la actina y el citoesqueleto de microtúbulos. Sinónimo: <i>Myosin VI</i> .
	VDCR	108221		
<i>lwr</i>	BL	31396	CG3018	<i>lesswright (lwr)</i> codifica Ubc9, una enzima de conjugación de SUMO que acepta SUMO de la enzima activadora de SUMO y lo transfiere al objetivo de conjugación de SUMO. Sinónimo: <i>Ubc9</i> , <i>semushi</i> .
	BL	37506		
	BL	37481		
	BL	9318		
	VDCR	104007		
	VDCR	33685		
<i>Nedd4</i>	BL	34741	CG42279	<i>Nedd4</i> codifica una ubiquitina ligasa E3 que regula negativamente la vía de señalización <i>Notch</i> y los genes <i>comm</i> y <i>Amph</i> .
	BL	31687		
	VDCR	13121		
	VDCR	108475		
<i>p50</i>	VDCR	23726	CG8269	Dynactin 2, p50 subunit (DCTN2-p50) codifica una subunidad del complejo dynactin. Junto con otros miembros del complejo de dinactina, el producto de DCTN2-p50 es fundamental para la mayoría de las funciones de la dineína-1 citoplásmica motora de los microtúbulos dirigidos al extremo negativo, incluida la polaridad del ovocito, la localización del ARNm, la localización del centrosoma, la organización del huso, la endocitosis y el transporte axonal. Sinónimo: <i>dynamitin</i> , <i>DCTN2-p50</i> .
	VDCR	110741		
<i>P62</i>	VDCR	108193	CG10360	Requerido para la activación de autofagia selectiva por proteínas ubiquitinadas. Sinónimo: <i>ref(2)P</i> , <i>SQSTM1</i> .
<i>Pck</i>	VDCR	50306	CG14779	<i>pickel (pck)</i> codifica una proteína transmembrana de la superfamilia Claudin. Es parte del complejo central de la septate junction (SJ) y es esencial para la morfogénesis y la función de SJ. La función de barrera transepitelial de los tejidos epiteliales se ve afectada en los mutantes <i>pck</i> . Sinónimo: <i>mega</i> , <i>megatrachea</i> .
	VDCR	50307		
<i>Pyd</i>	VDCR	38863	CG43140	<i>polychaetoid (pyd)</i> codifica una proteína de

	VDCR	104159		acción amplia que está asociada con múltiples proteínas en la superficie y dentro del citoesqueleto, conectando eventos entre los dos. Enhancer de <i>ena</i> y de <i>a-cat</i> . Sinónimo: <i>ZO-1, tamou, tam</i> .
<i>Rnf11</i>	BL	31554	CG32850	<i>Ring finger protein 11</i> , predicho para habilitar la actividad de ligasa de proteína ubiquitina y la actividad de unión de iones de zinc.
	BL	44570		
<i>Sar1</i>	VDCR	34191	CG7073	<i>Secretion-associated Ras-related 1 (Sar1)</i> codifica una pequeña GTPasa que se recluta en el retículo endoplásmico e inicia el reclutamiento del complejo de subunidades COPII Sec23/Sec24. Sinónimo: <i>bro5</i> .
	VDCR	108458		
<i>Shi</i>	VDCR	3799	CG18102	<i>Shibire (shi)</i> es una proteína productora de fuerza asociada a microtúbulos que participa en la producción de haces de microtúbulos y que es capaz de unirse e hidrolizar GTP. Implicado en la clasificación de proteínas endocíticas. Sinónimo: <i>dinamina, dyn</i> .
	VDCR	105971		
<i>Snap25</i>	BL	27306	CG40452	Codifica una proteína SNARE sináptica y un componente de los complejos de proteínas SNARE que funcionan en la liberación de neurotransmisores. Sinónimo: <i>Synaptosomal-associated protein 25kDa, synapse protein 25</i> .
	BL	34377		
	VDCR	330641		
<i>Snap29</i>	BL	25862	CG11173	Codifica un miembro de la familia SNARE. Está involucrado en la regulación de la autofagia, el reciclaje endocítico y la división celular. Relacionados con Vamp7. Sinónimo: <i>Synaptosomal-associated protein 29kDa, usnp, ubisnap</i> .
	BL	51893		
	VDCR	18172		
	VDCR	107947		
<i>Snx1</i>	BL	330596	CG2774	<i>Sorting nexin 1 (Snx1)</i> predicho para permitir la actividad de unión de fosfatidilinositol-3-fosfato, involucrado en el transporte temprano del endosoma al aparato de Golgi, parte del retrómero, complejo de tubulación y activo en la membrana del endosoma. Sinónimo: <i>Vps5</i> .
	VDCR	330248		
<i>Snx16</i>	BL	38992	CG6410	<i>Sorting nexin 16 (Snx16)</i> codifica una proteína que regula el crecimiento sináptico en la unión neuromuscular.
<i>Stam</i>	BL	27487	CG6521	<i>Signal Transducing Adaptor Molecule (Stam)</i> codifica un componente del complejo ESCRT-0, que media la formación de cuerpos multivesiculares.
	BL	35016		
	VDCR	22497		
	VDCR	330248		
<i>Stat92E</i>	VDCR	43866	CG4257	<i>Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E (Stat92E)</i> codifica un factor de transcripción que se desplaza entre el citosol y el núcleo y funciona en la vía JAK/STAT. Sinónimo: <i>marelle, mrl, STAT</i> .
	VDCR	106980		
<i>SUMO</i>	VDCR	34113	CG4494	SUMO codifica la única proteína de la familia SUMO de <i>Drosophila</i> . Es necesario para el patrón embrionario y la mitosis. Sinónimo: <i>smt3, dSmt3</i> .
	VDCR	105980		
<i>Syx13</i>	BL	38525	CG11278	<i>Syntaxin 13</i> codifica un miembro de la familia de syntaxina del t-SNAREs que media la fusión de vesículas dentro de las células. Se localiza en los endosomas y participa en la maduración del autofagosoma. Sinónimo: <i>ff16, Syx20</i> .
	VDCR	8361		
	VDCR	102432		
	BL	27984		
<i>tmod</i>	VDCR	32602	CG1539	<i>Tropomodulin (tmod)</i> codifica una proteína asociada a actina/tropomiosina. Participa en la señalización regulatoria de Notch. Sinónimo: <i>spdo, sanpodo</i> .
<i>TSG101</i>	BL	35710	CG9712	<i>Tumor susceptibility gene 101 (TSG101)</i> codifica un componente del ESCRT-I que actúa como un adaptador para los reordenamientos de membrana operados por
	BL	38306		
	VDCR	23944		

				ESCRT-III. Sus funciones incluyen la clasificación endosomal de cargas ubiquitinadas, que es importante para la regulación de la señalización, la citocinesis y la gemación de virus y exovesículas. Sinónimo: <i>ESCRT-1, vps23, ept, erupted</i> .
<i>Uba2</i>	BL	63986	CG7528	<i>Ubiquitin-like activating enzyme 2 (Uba2)</i> codifica una de las dos subunidades (junto con el producto de <i>Aos1</i>) de la enzima activadora SUMO heterodimérica. Sinónimo: <i>SAE2, sip2, DmUba2</i> .
	BL	28569		
	BL	35806		
	VDRC	330352		
	VDRC	110173		
<i>Ulp1</i>	VDRC	31744	CG12359	<i>Ulp1</i> codifica una cisteína proteasa que cataliza tanto la maduración como la desconjugación de SUMO. Se localiza en la cara nucleoplásmica del complejo del poro nuclear.
	VDRC	106625		
<i>Vamp7</i>	BL	38300	CG1599	<i>Vesicle-associated membrane protein 7 (Vamp7)</i> codifica una proteína SNARE de tipo R. Interviene en la fusión de autofagosomas con endosomas y lisosomas formando un complejo SNARE con los productos de <i>Syx17</i> y <i>Snap29</i> .
	BL	43543		
	VDRC	13317		
	VDRC	108733		
<i>wbl</i>	VDRC	13864	CG7225	<i>windbeutel (wbl)</i> codifica una proteína miembro de la vía de señalización Toll que reside en el retículo endoplásmico. Sinónimo: <i>wind</i> .
<i>a-catr</i>	BL	31217	CG2987	<i>Alpha-catenin related (a-catr)</i> Se predice que permite la actividad de unión del filamento de actina. Se prevé que participe en la transducción de señales de la proteína Rho.
<i>a-cat</i>	BL	33430	CG17947	<i>a-Catenin</i> se asocia con el dominio citoplasmático de una variedad de cadherinas. La asociación de cateninas a cadherinas produce un complejo que está ligado a la red de filamentos de actina y que parece ser de importancia primordial para las propiedades de adhesión celular de las cadherinas.
	VDRC	20123		
	VDRC	19182		

II. Lista de RNAi con efectos estadísticamente significativos

Vía SUMOilación	
Cx26wt	-
Cx26G12R	<i>caMKII</i> (VDRC 100265) <i>SUMO</i> (VDRC 105980)
Cx26G12V	<i>dgrn</i> (BL 36628) <i>dlg1</i> (VDRC 109274) <i>Grasp65</i> (BL 34082) <i>lwr</i> (BL 9318) <i>lwr</i> (BL 37481) <i>lwr</i> (BL 37506) <i>rnf11</i> (BL 31554) <i>SUMO</i> (VDRC 34113) <i>Uba2</i> (BL 36806) <i>Uba2</i> (BL 63986)
Vía SNARE	
Cx26wt	<i>bchs</i> (VDRC 42517) <i>Snap29</i> (BL 51893)
Cx26G12R	<i>Snap25</i> (BL 27306)
Cx26G12V	<i>Snap25</i> (BL 34377) <i>Syx13</i> (BL 27984) <i>Syx13</i> (BL 38525)
Complejos ESCRT	
Cx26wt	<i>Hrs</i> (VDRC 330597) <i>Stam</i> (BL 35016)
Cx26G12R	<i>TSG101</i> (BL 35710)
Cx26G12V	<i>Hrs</i> (VDRC 330597) <i>Stam</i> (BL 27487) <i>TSG101</i> (BL 35710) <i>TSG101</i> (BL 38306)
ACTINA	
Cx26wt	-
Cx26G12R	<i>Nedd4</i> (BL 31687)
Cx26G12V	<i>canoe</i> (BL 33367) <i>canoe</i> (BL 38194) <i>Dab2</i> (VDRC 14008) <i>Ena</i> (BL 31582) <i>Nedd4</i> (BL 31687) <i>Nedd4</i> (BL 34741) <i>pyd</i> (VDRC 38863) <i>pyd</i> (VDRC 104159)
Factores Endocíticos	
Cx26wt	<i>efa6</i> (VDRC 330083) <i>eps-15</i> (VDRC 19165) <i>shi+ dcr2</i> (VDRC 3799) <i>shi</i> (VDRC 105971)
Cx26G12R	<i>AP-2</i> (VDRC 101552)
Cx26G12V	<i>AP-2</i> (VDRC 41130) <i>chc</i> (VDRC 24789) <i>eps-15</i> (BL 29578) <i>eps-15</i> (BL 33942)
MISCELANEOS	
Cx26wt	<i>cora</i> (VDRC 9787)
Cx26G12R	-
Cx26G12V	<i>Dpck</i> (BL 35376)