

JORGE HENRIQUE NEVES

**Estudo da interação celular por meio da inxina-2 na
formação das junções comunicantes em
Rhynchosciara americana:
uma abordagem morfológica e molecular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado
Santelli

Versão Original

São Paulo
2016

RESUMO

Neves JH. Estudo da interação celular por meio de inexina-2 na formação das junções comunicantes em *Rhynchosciara americana*: uma abordagem morfológica e molecular. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As junções comunicantes medeiam a comunicação entre células e são fundamentais para o desenvolvimento e homeostase em organismos multicelulares. Nos invertebrados as junções são formadas por proteínas transmembrana denominadas inexinas. As junções permitem a passagem de pequenas moléculas através de um canal intercelular, entre uma célula e outra adjacente. O díptero *Rhynchosciara americana* tem contribuído para o estudo da biologia dos invertebrados, bem como para o estudo da interação entre genes, regulação gênica e desenvolvimento biológico. A partir de um banco de ESTs foram identificadas algumas mensagens com homologia as inexinas. Deste modo, o presente trabalho pretende estudar a inexina-2 de *R. americana* pela: caracterização molecular; análise do perfil expressão; e localização celular. Os nossos resultados de caracterização confirmam que a mensagem é de uma proteína de junção comunicante e as análises do perfil de expressão e localização celular mostram que a inexina-2 pode participar de diversos processos fisiológicos ao longo do desenvolvimento de *R. americana*.

Palavras-chave: Junções comunicantes. Inexinas. *Rhynchosciara americana*. Desenvolvimento biológico.

ABSTRACT

Neves JH. Study of cell interaction through innexin-2 in the formation of gap junctions in *Rhynchosciara americana*: a morphological and molecular approach. [dissertation (Masters thesis in Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

The gap junctions mediate communication between cells and are fundamental to the development and homeostasis in multicellular organisms. In invertebrates the gap junctions are formed by transmembrane proteins called innexins. The gap junctions allow the passage of small molecules through an intercellular channel, between a cell and other adjacent. The dipteran *Rhynchosciara americana* has contributed to the study of the biology of invertebrates, as well as for the study of the interaction between genes, gene regulation and biological development. As from a ESTs bank identified some messages with homology connexins. Therefore, this paper aims to study the innexin *R. americana* by: molecular characterization; analysis of the expression profile; and cellular localization. Our molecular characterization results confirm that the message is from a gap junction protein and analysis of the expression and cellular localization profile show that innexin can participate in many physiological processes during the development of *R. americana*.

Keywords: Gap junctions. Innexin. *Rhynchosciara americana*. Biological development.

1 INTRODUÇÃO

Rhynchosciara americana é uma espécie de díptero pertencente à família dos Sciarídeos que por apresentar características próprias, tem contribuído muito para o conhecimento da biologia celular e molecular dos insetos, como, a identificação dos pufes de DNA, por Breuer e Pavan (1955) e Machado-Santelli e Basile (1975), até estudos mais recentes, como a identificação dos elementos de transposição (Rezende-Teixeira et al., 2008). Historicamente, esta espécie foi descrita primeiramente por Christian R.W. Wiedemann em 1821 (Wiedemann, 1821¹ apud Breuer, 1969), anos mais tarde Nonato e Pavan (1951) redescobriam a espécie e a denominaram *Rhynchosciara angelae*. Em 1969 estudos feitos em por Breuer (1969) demonstraram a sinonímia entre ambas as espécies, fazendo prevalecer o nome de *Rhynchosciara americana* como classificado anteriormente por Wiedemann, 1821.

As características que a espécie *R. americana* apresenta são: um ciclo de vida longo, desenvolvimento sincrônico entre as larvas irmãs do mesmo sexo (Pavan, Cunha, 1969). Os cromossomos politênicos deste Sciarídeo são grandes e com morfologia favorável para preparações citológicas, presença de cromossomos politênicos em diferentes tecidos junto ao fenômeno de amplificação em determinados períodos do desenvolvimento larval dando origem aos pufes de DNA e RNA (Breuer, Pavan, 1955).

Os cromossomos politênicos estão presentes em diferentes órgãos nas várias espécies dos Sciarídeos, estes se desenvolvem a partir de um processo de endociclos que consiste em sucessivas duplicações em núcleos diploides, conhecido como politenia. De forma geral os cromossomos politênicos são várias vezes a largura dos cromossomos mitóticos, sendo longos e largos, permanecem intimamente pareados com os seus homólogos, desta forma estão acompanhados pelo aumento do conteúdo de DNA. Variações nas estruturas destes cromossomos dão origem aos conhecidos pufes de DNA, que apresentam síntese extra de DNA e síntese específica de RNA (Breuer, Pavan, 1955).

¹ Wiedemann, 1821 apud Breuer, 1969, p. 4.

Em *R. americana* é possível encontrar o processo de politenia em diversos tecidos, como glândulas salivares, túbulos de Malpighi, intestinos e vesícula seminal. Os cromossomos politênicos apresentam um padrão característico de faixas e interfaixas transversais, sendo que as faixas mais coradas são devido a condensação da cromatina que correspondem as regiões heterocromáticas (cromômeros), e as interfaixas menos coradas correspondem as regiões eucromáticas.

O ciclo de vida de *R. americana* é de aproximadamente setenta dias (Figura 1). No laboratório as larvas são mantidas a temperatura de 22 °C, quando adulto este Sciarídeo permanece na natureza por aproximadamente uma semana, no final deste estágio, a fêmea adulta tem uma única ovoposição. O desenvolvimento embrionário é de aproximadamente treze dias e após este período os ovos eclodem quase que simultaneamente, dando origem a centenas de larvas irmãs do mesmo sexo. A partir da eclosão o desenvolvimento larval ocorre sincronicamente e é dividido em quatro estágios delimitados pelas mudas (ecdise). No quarto e último estágio que compreende a maior parte do ciclo de vida larval e ocorre os mais estudados pufes de DNA e RNA. O quarto estágio é subdividido em seis períodos caracterizados por marcadores morfológicos e cromossômicos.

O segundo período do quarto estágio larval é caracterizado pela coloração avermelhada das larvas causado pela pigmentação da hemolinfa. Depois, o terceiro período é caracterizado pela secreção de uma rede delicada que dará origem ao casulo comunitário, também neste período as larvas param de se alimentar e movimentar. No quarto período ocorre o aparecimento do primeiro marcador cromossômico, com a expansão do pufe de DNA na região 2 do cromossomo B (pufe B2), neste período a rede adquiriu maior consistência e as larvas assumem a posição curva. O quinto período ocorre o aparecimento do pufe de DNA na região 3 do cromossomo C (pufe C3). O sexto e último período do quarto estágio larval é também conhecido como pré-pupa, as larvas assumem uma posição reta e estão individualizadas dentro do casulo. Em seguida, a muda pupal finaliza o período larval dando início a metamorfose da fase adulta.

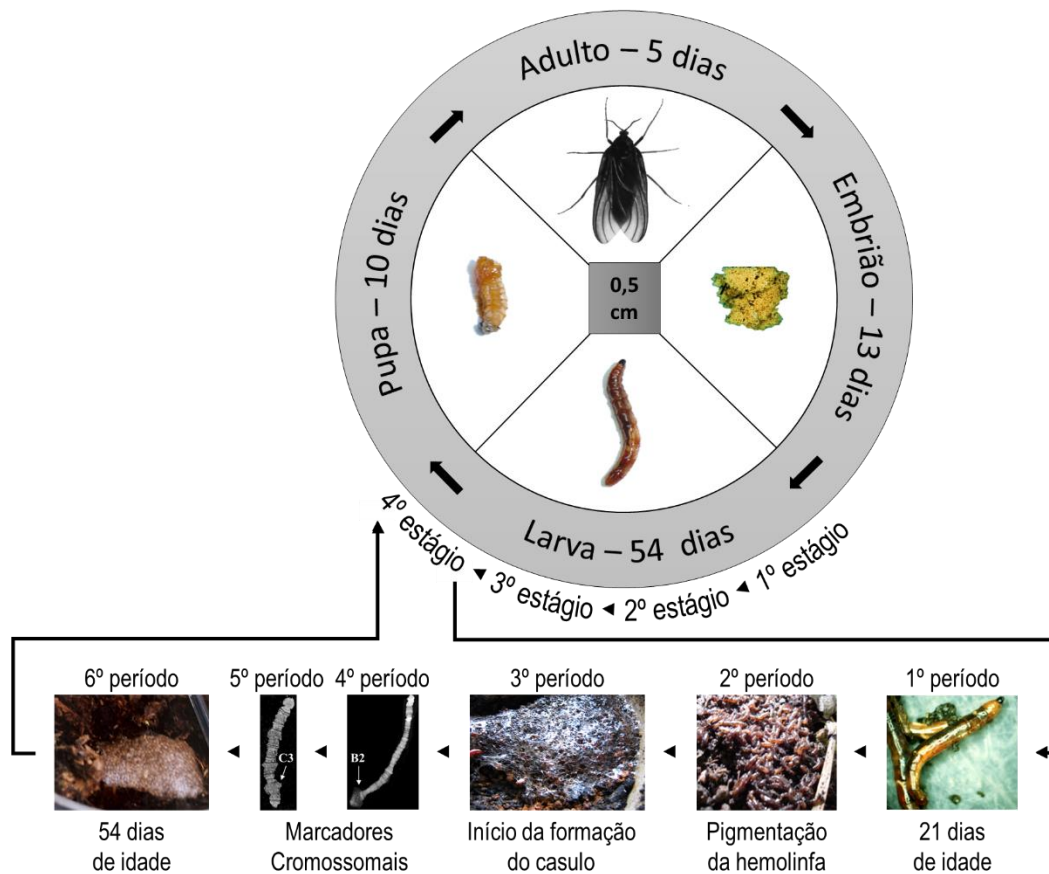


Figura 1 – Ciclo de vida do Sciarídeo *R. americana*.

O sciarídeo *R. americana* pode contribuir fortemente para o conhecimento das junções comunicantes entre os insetos. Diferente de outros organismos, como encontrado em *Drosophila*, o desenvolvimento larval e ovariano ocorre sincronicamente, e cada ovócito está associado a uma única e gigante célula nutridora. Estudos morfológicos e moleculares das junções comunicantes têm tido um papel imprescindível para o conhecimento da biologia do desenvolvimento nos invertebrados. Em especial, as junções têm um papel fundamental em diversos processos ao longo do desenvolvimento de insetos, como durante a ovogênese, embriogênese e o desenvolvimento do sistema nervoso. No entanto, o conhecimento durante os demais processos fisiológicos em insetos é pouco conhecido, como durante a espermatogênese e o desenvolvimento de órgãos como glândula salivar e o corpo gorduroso.

Com objetivo de caracterizar as junções comunicantes em *R. americana*, a partir de um banco de cDNA construído com mRNA de ovário, foram encontrados três genes com homologia as inxinas (Ra-Inx2, Ra-Inx4 e Ra-Inx7). Neste trabalho especificamente vamos realizar a caracterização molecular, analisar os níveis de expressão gênica e a localização celular de Ra-Inx2.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de caracterização molecular podemos inferir que a sequência com homologia a inexina-2 codifica uma proteína de junção comunicante. Desta forma podemos concluir que a sequência consenso da proteína Ra-Inx2 tem todas as características presentes em uma proteína da superfamília das inexinas, entre estas características encontramos principalmente os quatro domínios transmembrana, os dois pares de cisteínas localizados nas alças extracelular e a sequência **YYQW** presente especificamente no segundo domínio transmembrana e que é considerada uma assinatura entre as inexinas. Os resultados obtidos por meio de análise filogenética e construção da estrutura terciária de Ra-Inx2 confirmam os resultados.

As análises dos níveis de expressão gênica de Ra-Inx2 sugerem que esta inexina pode estar envolvida durante a metamorfose em *R. americana*, possivelmente participando na remodelação do tecido gorduroso e na histólise da glândula salivar. Desta forma, em órgãos de linhagem somática a proteína Ra-Inx2 pode participar do processo de morte celular programada, sendo que no corpo gorduroso ocorre autofagia e nas células da glândula salivar ocorre apoptose.

Nas gônadas a expressão de Ra-Inx2 também foi significativa, sendo expressa ao longo do desenvolvimento do ovário e do testículo, indicando que esta inexina pode participar da ovogênese e espermatogênese. Durante a embriogênese também ocorreu a expressão de Ra-Inx2, sendo que durante o desenvolvimento embrionário a comunicação celular é fundamental. Desta forma podemos concluir que Ra-Inx2 foi expressa de forma consistente em todos os órgãos estudados ao longo do desenvolvimento de *R. americana*. A expressão comparativa com Ra-Inx7 indica que as inexinas estão presentes em todas as células e desta forma pode participar de diversos processos celulares e conseqüentemente da homeostase dos tecidos e desenvolvimento de *R. americana*.

Em corpo gorduroso mostramos que a proteína Ra-Inx2 está localizada entre as células deste tecido. Nos órgãos de linhagem germinativa Ra-Inx2 identificamos que no ovário esta proteína pode estar envolvida com a comunicação entre as células de linhagem

somática como as células entre os folículos e os hemócitos localizados ao redor do ovário, indicando que esta inxina pode participar da imunidade. No testículo observamos que Ra-Inx2 está localizado entre as células de linhagem germinativa e possivelmente pode participar da comunicação entre os espermatócitos durante o processo de espermatogênese. De forma geral os ensaios de imunolocalização precisam ser confirmados com novos experimentos.

Na Figura 42 mostramos um esquema resumindo os resultados que obtivemos e sugerindo o possível papel da proteína Ra-Inx2 durante o desenvolvimento e homeostase de *R. americana*. No entanto, a muito para ser estudado sobre o papel da proteína Ra-Inx2 e de outras inxinas nesta espécie, por se tratar de proteínas dinâmicas atuando em um organismo com características únicas este trabalho se torna desafiador e instigante.

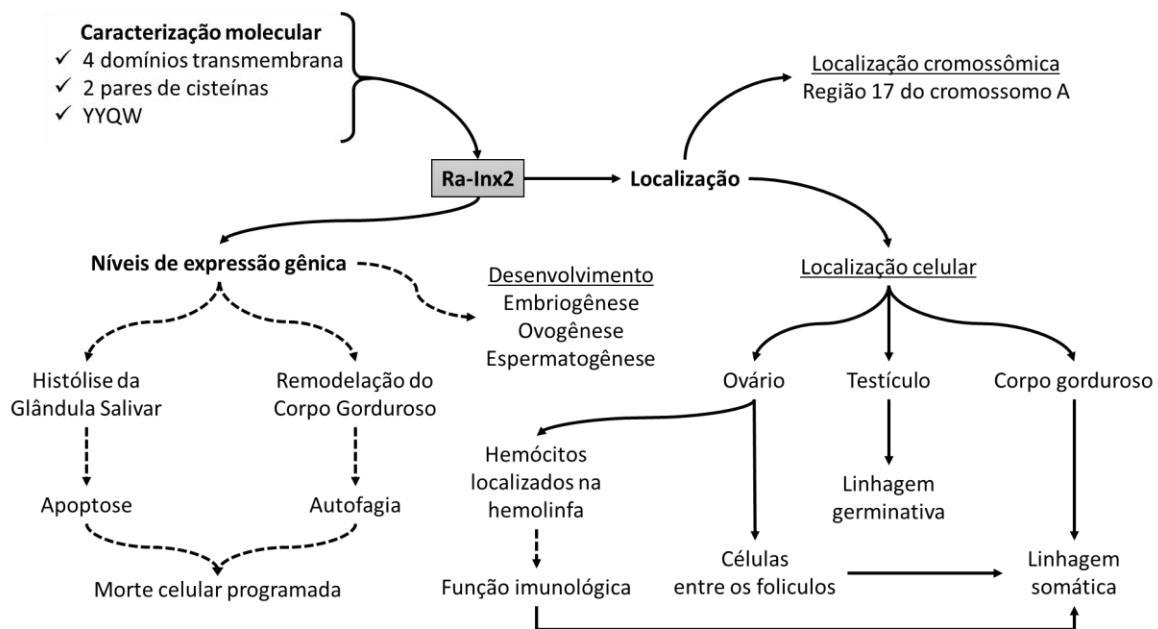


Figura 2 – Esquema mostrando o resumo dos resultados obtidos. Nas setas pontilhadas indicam os processos que Ra-Inx2 pode estar participando durante o desenvolvimento e homeostase de *R. americana*.

REFERÊNCIAS*

Abascal F, Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013;1828(1):4-14.

AcaClone. pDRAW32. Version 1.1.131. 2016. [cited 2016 Out 25]. Available from: <http://www.acaclone.com/>.

Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. 2007;210(6):956-63.

Altun ZF, Chen B, Wang ZW, Hall DH. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Developmental Dynamics*. 2009;238(8):1936-50.

Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, et al. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(32):24420-31.

Anava S, Rand D, Zilberstein Y, Ayali A. Innexin genes and gap junction proteins in the locust frontal ganglion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39(3):224-33.

Ayukawa T, Matsumoto K, Ishikawa HO, Ishio A, Yamakawa T, Aoyama N, et al. Rescue of Notch signaling in cells incapable of GDP-L-fucose synthesis by gap junction transfer of GDP-L-fucose in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(38):15318-23.

Bao X, Chen Y, Reuss L, Altenberg GA. Functional expression in *Xenopus* oocytes of gap-junctional hemichannels formed by a cysteine-less connexin 43. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(11):9689-92.

Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology*. 2006;21(2):103-14.

Barnes TM. OPUS: a growing family of gap junction proteins?. *Trends in Genetics*. 1994;10(9):303-305.

Basile R, Casartelli C, Benozzati ML. Desenvolvimento dos Testículos e Ovários de "Rhynchosciara". *Ciência e Cultura*. 1975;27(2):151-158.

Basile R. Aspects of ovary development in *Rhynchosciara*. *Revista Brasileira de Genética*. 1979;145-60.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bauer R, Lehmann C, Martini J, Eckardt F, Hoch M. Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Molecular Biology of The Cell*. 2004;15(6):2992-04.

Bauer R, Löer B, Ostrowski K, Martini J, Weimbs A, Lechner H, et al. Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chemistry & Biology*. 2005;12(5):515-526.

Bernsel A, Viklund H, Hennerdal A, Elofsson A. TOPCONS. 2015. [cited 2016 Out 10]. Available from: <http://topcons.cbr.su.se/>.

Bernsel A, Viklund H, Hennerdal A, Elofsson A. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:465-68.

Blagburn JM, Alexopoulos H, Davies JÁ, Bacon JP. Null Mutation in shaking-B Eliminates Electrical, but not Chemical, Synapses in the *Drosophila* Giant Fiber System: A Structural Study. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;404(4):449-58.

Bohrmann J, Zimmermann J. Gap junctions in the ovary of *Drosophila melanogaster*: localization of innexins 1, 2, 3 and 4 and evidence for intercellular communication via innexin-2 containing channels. *BMC Developmental Biology*. 2008; 8(1):1.

Brandão AS, do Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Hartfelder K, Siviero F, Machado-Santelli GM. Cell death and tissue reorganization in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae: Diptera) metamorphosis and their relation to molting hormone titers. *Arthropod structure & Development*. 2014;43(5):511-22.

Breuer ME, Pavan C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*. 1955;7(1):371-86.

Breuer, ME. Revision of the genus *Rhynchosciara* Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. *Arquivos de Zoologia*. 1969;17(4):167-198.

Calkins TL, Woods-Acevedo MA, Hildebrandt O, Piermarini PM. The molecular and immunochemical expression of innexins in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Insights into putative life stage- and tissue-specific functions of gap junctions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2015;183:11-21.

Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder JÁ, Hülser DF, et al. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science*. 1998; 111(1):31-43.

Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1711(2):126-41.

Crompton D, Todman M, Wilkin M, Ji S, Davies J. Essential and neural transcripts from the *Drosophila* shaking-B locus are differentially expressed in the embryonic mesoderm and pupal nervous system. *Developmental Biology*. 1995;170(1):142-58.

Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ. Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the *Drosophila* optic lamina. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(16):7088-96.

Dahl G, Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?. *IUBMB Life*. 2006;58(7):409-19.

Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die&quest. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(4):524-36.

Ducret E, Alexopoulos H, Le Feuvre Y, Davies JÁ, Meyrand P, Bacon JP, et al. Innexins in the lobster stomatogastric nervous system: cloning, phylogenetic analysis, developmental changes and expression within adult identified dye and electrically coupled neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2006;24(11):3119-33.

Eastman SD, Chen THP, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics*. 2006;87(2):265-74.

Giuliani F, Giuliani G, Bauer R, Rabouille C. Innexin 3, a new gene required for dorsal closure in *Drosophila* embryo. *PloS One*. 2013;8(7):e69212.

Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009;1(1):a002576.

Hall T. BioEdit (Biological Sequence Alignment). Version 7.2.5. 2013. [cited 2016 Oct 20]: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

Hasegawa DK, Turnbull MW. Recent findings in evolution and function of insect innexins. *FEBS Letters*. 2014;588(8):1403-10.

Hervé JC, Phelan P, Bruzzone R, White TW. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2005;1719(1):3-5.

Holcroft CE, Jackson WD, Lin WH, Bassiri K, Baines RA, et al. Innexins Ogr and Inx2 are required in glial cells for normal postembryonic development of the *Drosophila* Central Nervous System. *Journal of Cell Science*. 2013;126(17):3823-34.

Hong SM, Kang SW, Goo TW, Kim NS, Lee JS, Kim KA, et al. Two gap junction channel (innexin) genes of the *Bombyx mori* and their expression. *Journal of Insect Physiology*. 2008;54(1):180-91.

Hong SM, Noh SK, Kim KA, Mitsunobu H, Mon H, Lee JM, et al. Molecular characterization, localization, and distribution of innexins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biotechnology*. 2009;43(1):52-58.

Horne-Badovinac S, Bilder D. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Developmental Dynamics*. 2005;232(3):559-74.

Hua VB, Chang AB, Tchieu JH, Kumar NM, Nielsen PA, Saier Jr MH. Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: connexins, innexins, claudins and occludins. *The Journal of Membrane Biology*. 2003;194(1):59-76.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in The Biosciences*. 1992;8:275-82.

Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*. 2012;7:1511–22.

Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. RaptorX. 2012. [cited 2016 Out 15]. Available from: <http://raptorx.uchicago.edu/>.

Kandarian B, Sethi J, Wu A, Baker M, Yazdani N, Kym E, et al. The medicinal leech genome encodes 21 innexin genes: different combinations are expressed by identified central neurons. *Development Genes and Evolution*. 2012;222(1):29-44.

Lara FJS, Tamaki H, Pavan C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. *The American Naturalist*, 1965;99(906):189-91.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-48.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. ClustalX and ClustalW. Version 2.0. 2007. [cited 2016 Out 20]. Available from: <http://www.clustal.org/clustal2/>.

Lautemann J, Bohrmann J. Relating proton pumps with gap junctions: colocalization of ductin, the channel-forming subunit c of V-ATPase, with subunit a and with innexins 2 and 3 during *Drosophila* oogenesis. *BMC Developmental Biology*. 2016;16(1):24.

Lechner H, Josten F, Fuss B, Bauer R, Hoch M. Cross regulation of intercellular gap junction communication and paracrine signaling pathways during organogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 2007;310(1):23-34.

Lehmann C, Lechner H, Lör B, Knieps M, Herrmann S, Famulok M, et al. Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in *Drosophila*. *Molecular Biology of The Cell*. 2006;17(4):1676-85.

Leitch B. Ultrastructure of electrical synapses: review. *Electron Microscopy Reviews*. 1992;5(2):311-39.

Li MW, Wang J, Zhao YO, Fikrig E. Innexin AGAP001476 is critical for mediating anti-Plasmodium responses in Anopheles mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(36):24885-97.

Liu T, Li M, Zhang Y, Pang Z, Xiao W, Yang Y, et al. A role for Innexin2 and Innexin3 proteins from *Spodoptera litura* in apoptosis. *PloS One*. 2013;8(7):e70456.

Machado-Santelli GM, Basile R. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciencia e Cultura*. 1975;27(2):167:74.

Machado-Santelli GM, Ionta M. Gap Junction Intercellular Communication and Connexin Expression Profile in Normal Liver Cells and Hepatocarcinoma. 2012;13:275-286.

Martínez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap junction plaque formation but not for homo-or hetero-oligomerization. *Cell Communication & Adhesion*. 2003;10(4-6):323-28.

NCBI. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). 2016. [cited 2016 Out 5]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

NCBI. ORFfinder (Open Reading Frame Finder). 2016. [cited 2016 Out 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>.

Nonato E, Pavan C. A new species of *Rhynchosciara* Rubsaamen, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1951;11:435-437.

Ohta Y, Nishikawa K, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y. Electron tomographic analysis of gap junctions in lateral giant fibers of crayfish. *Journal of Structural Biology*. 2011;175(1):49-61.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. 2014. Protter. [cited 2016 Out 15]. Available from: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>.

Oshima A, Matsuzawa T, Murata K, Tani K, Fujiyoshi Y. Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(6):1227-36.

Oshima A, Matsuzawa T, Nishikawa K, Fujiyoshi Y. Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* Innexin-6 gap junction protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(15):10513-21.

Oshima A, Tani K, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Sosinsky GE. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(24):10034-39.

Ostrowski K, Bauer R, Hoch M. The *Drosophila* innexin7 gap junction protein is required for development of the embryonic nervous system. *Cell Communication & Adhesion*. 2008; 15(1-2):55-67.

Panchina Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current Biology*. 2000;10(13):473-74.

Pavan C, Breuer ME. Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. *Journal of Heredity*. 1952;43(4):151-58.

Pavan C, Cunha ABD. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other Sciaridae. *Annual Review of Genetics*. 1969;3(1):425-50.

Pavan C. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and problem of differentiation. In *Brookhaven Symposia in Biology*. 1965;18:222.

Pézier AP, Jezzini SH, Bacon JP, Blagburn JM, Shaking B mediates synaptic coupling between auditory sensory neurons and the giant fiber of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2016;11(4):0152211.

Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, et al. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends in Genetics*. 1998;14(9):48.

Phelan P, Starich TA. Innexins get into the gap. *Bioessays*. 2001;23(5):388-96.

Phelan P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1711(2):225-45.

Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Current Biology*. 2013;23(5):424-29.

Rezende-Teixeira P, Siviero F, Brandão AS, Santelli RV, Machado-Santelli GM. Molecular characterization of a retrotransposon in the *Rhynchosciara americana* genome and its association with telomere. *Chromosome Research*. 2008;16(5):729-42.

Richard M, Hoch M. *Drosophila* eye size is determined by Innexin 2-dependent Decapentaplegic 15signaling. *Developmental Biology*. 2015;408(1):26-40.

Sansom MS, Weinstein H. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in 15signaling via transmembrane α -helices. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(11):445-51.

Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biology*. 2007;3(03):199-08.

Shruti S, Schulz DJ, Lett KM, Marder E. Electrical coupling and innexin expression in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *Journal of Neurophysiology*. 2014;112(11):2946-58.

Siviero F, Rezende-Teixeira P, Andrade A, Machado-Santelli GM, Santelli RV. Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands. *Insect Molecular Biology*. 2006;15(2):109-18.

Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*. 2004;62(2):228-32.

Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*. 2011;5(3):193-97.

Stebbins LA, Todman MG, Phelan P, Bacon JP, Davies JA. Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Molecular Biology of The Cell*. 2000;11(7):2459-70.

Stebbins LA, Todman MG, Phillips R, Greer CE, Tam J, Phelan P, et al. Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family. *Mechanisms of Development*. 2002;113(2):197-05.

Suchyna TM, Xu LX, Gao F, Fournier CR, Nicholson BJ. Identification of a proline residue as a transduction element involved in voltage gating of gap junctions. *Nature*. 1993;365:847-49.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Version 6.0. 2007. [cited 2016 Oct 15]. Available from: <http://www.megasoftware.net/>.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30:2725-29.

Thailayil J, Magnusson K, Godfray HCJ, Crisanti A, Catteruccia F. Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(33):13677-81.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*. 1999;283(5405):1176-80.

Van Der Zee M, Benton MA, Vazquez-Faci T, Lamers GE, Jacobs CG, Rabouille C. Innexin7a forms junctions that stabilize the basal membrane during cellularization of the blastoderm in *Tribolium castaneum*. *Development*. 2015;142(12):2173-83.

Wang SP, Chen FY, Dong LX, Zhang YQ, Chen HY, Qiao K, Wang KJ. A novel innexin2 forming membrane hemichannel exhibits immune responses and cell apoptosis in *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015;47(1):485-99.

Watanabe T, Kankel DR. The *l (1) oge* gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in postembryonic neuroblasts. *Developmental Biology*. 1992;152(1):172-83.

Weng XH, Piermarini PM, Yamahiro A, Yu MJ, Aneshansley DJ, Beyenbach KW. Gap junctions in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):409-22.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M. et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*. 2002;383(5):725-37.

Winter CE, De Bianchi AG, Terra WR, Lara FJS. The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. *Journal of Insect Physiology*. 1977;23(11):1455-59.

Wu CL, Shih MFM, Lai JSY, Yang HT, Turner GC, Chen L, et al. Heterotypic gap junctions between two neurons in the drosophila brain are critical for memory. *Current Biology*. 2011;21(10):848-54.

Zhang Z, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ. Nested transcripts of gap junction gene have distinct expression patterns. *Journal of Neurobiology*. 1999;40(3):288-01.