

Jennifer Costa Leoncio

Análise *in silico* da rede de interação proteína-proteína da conexina 26

In silico analysis of connexin 26 protein-protein interaction network

São Paulo

2022

Jennifer Costa Leoncio

Análise *in silico* da rede de interação proteína-proteína da conexina 26

In silico analysis of connexin 26 protein-protein interaction network

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de
Biologia/Genética

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo
2022

Ficha Catalográfica

Costa Leoncio, Jennifer
Análise *In Silico* da Rede de Interação
Proteína- Proteína da Conexina 26 / Jennifer
Costa Leoncio ; orientadora Regina Célia Mingroni
Netto -- São Paulo, 2022.
123 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Conexina 26. 2. Surdez hereditária. 3. *GJB2*.
4. Duplo Híbrido de Membrana de Levedura.
5. Mitocôndria. I. Mingroni Netto, Regina Célia,
orient.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra.
Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

*Aos meus queridos pais,
Geraldo e Sueli*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, por sua incrível orientação, pelo apoio, dedicação, ensinamentos valiosos e confiança ao longo de todos os momentos.

À Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad, pela imensa contribuição ao projeto e orientação científica.

À Dra. Ana Carla Batissoco, por toda orientação científica e ajuda ao longo de todo o desenvolvimento do projeto elucidando minhas dúvidas e compartilhando ideias.

Ao Prof. Luís Eduardo Soares Netto, pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, pelos ensinamentos sobre biologia estrutural e orientação para compreender os resultados da análise da hidrofobicidade e análise estrutural do domínio de interação.

Ao Prof Dr. Antônio S. Kimus Braz, pelos ensinamentos e orientação para auxiliar na execução da análise de hidrofobicidade do domínio de interação.

À Dra. Petra Tafelmeyer, funcionária da Hybrigenics, pela paciência e disponibilidade em fornecer esclarecimentos.

Aos alunos do laboratório de Genética Humana que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto, pelo suporte. Em especial à mestrande Camila Cristina Avila Martins pela amizade e ajuda em todos os momentos árduos.

Aos meus pais, Geraldo e Sueli, que a todo momento estiveram ao meu lado e me deram suporte vital.

Aos meus irmãos, Wellington e Wildisney, por todo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos queridos, por todo incentivo e amizade.

A Deus, que permitiu a realização desse projeto mesmo ao longo de uma pandemia mundial.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pelos auxílios financeiros.

RESUMO

As conexinas (Cx) são proteínas de membrana caracterizadas por quatro domínios transmembrânicos, duas alças extracelulares, uma alça intracelular e segmentos N- e C-terminais citoplasmáticos. Estes últimos são variáveis entre membros dessa família de proteínas. Seis cadeias de Cx oligomerizam-se para formar um conexon ou hemicanal. Dois conexons em membranas de células adjacentes associam-se formando um canal intercelular, conhecido como junção comunicante ou do tipo fenda (*gap junction*), o qual é responsável pelo transporte de pequenas moléculas e íons entre as células. A conexina 26 (Cx26), proteína codificada pelo gene *GJB2*, é expressa em diferentes tecidos, incluindo a cóclea. Mutações no gene *GJB2* são responsáveis por 50% dos casos de perdas auditivas não sindrômicas com herança autossômica recessiva e quase 10% dos casos de surdez congênita. Papel funcional fundamental foi proposto para a Cx26 na manutenção e na reciclagem de potássio (K⁺) na endolinfa, fluido presente na cóclea, na orelha interna. Por meio da identificação de proteínas que interagem com a Cx26 e da caracterização de sua rede de interações buscamos descobrir quais genes correspondentes poderiam ser candidatos para explicar a perda auditiva em humanos. Também buscamos verificar se há suporte para a hipótese de que a Cx26 poderia estar localizada na mitocôndria. Para atingir esses objetivos, analisamos os resultados de um Ensaio de Duplo Híbrido de Membrana de Levedura (EDHML) realizado com uma biblioteca de cDNA de encéfalo fetal humano, por meio da análise *in silico* de cada proteína identificada pela interação com a Cx26. Utilizamos os seguintes bancos de dados: WebGestalt para estudar a ontologia gênica; ProtScale para determinar a hidrofobicidade dos SID (*selected interaction domain*); SHIELD (*Shared Harvard Inner-Ear Laboratory Database*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para verificar a expressão dos genes na cóclea ou orelha interna. Os bancos de dados UCSC (*University of California Santa Cruz Genome Institute*), *Hereditary Hearing Loss Homepage* e OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) foram utilizados para verificar a localização cromossômica dos genes e dos loci de surdez. OMIM também foi utilizado para verificar se os genes possuíam associação conhecida com doença genética, em especial a perda auditiva. NCBI, Uniprot and The Human Protein Atlas foram usados para verificar a localização das proteínas na mitocôndria. STRING (*Funcional Protein Association Networks*) e BioGRID (*Biological General Repository for Interaction Datasets*) foram usados para analisar a rede de interação das proteínas identificadas no ensaio e a rede de interação proteína-proteína da Cx26. Um total de 45 proteínas que interagem com a Cx26 foram identificadas pelo ensaio.

Dentre essas, 42 genes correspondentes têm expressão na cóclea ou na orelha interna. Além disso, três proteínas têm seus genes localizados dentro ou próximo a locus de surdez não síndrômica, previamente mapeados por estudos de ligação, mas com genes correspondentes não identificados, sugerindo que são bons candidatos para explicar a perda auditiva. Finalmente, nove proteínas estão localizadas na mitocôndria e duas delas (produtos gênicos de *TSPO* e *FUNDC2*) estão localizadas exclusivamente na mitocôndria, sugerindo uma possível localização da Cx26 nas mitocôndrias. Após a análise *in silico* e classificação hierárquica, 25 proteínas foram consideradas as mais relevantes para audição e são os produtos gênicos de *MMD*, *ELOVL4*, *GPM6B*, *DAD1*, *SLC6A3*, *RNF41*, *ACKR1*, *TSPO*, *CEND1*, *FUNDC2*, *TSPAN7*, *MSMO1*, *GPM6A*, *TTYH1*, *ATP2A2*, *SLC33A1*, *SLC38A3*, *EBP*, *IER3IP1*, *SLC31A2*, *TMEM87A*, *TVP23C*, *MT-ATP6*, *ERGIC3* e *KCNK1*. Nossos achados contribuíram para evidenciar o potencial papel das proteínas que interagem com a Conexina 26 na fisiologia da audição.

Palavras-chaves: Conexina 26, *GJB2*, surdez hereditária, mitocôndria, Duplo Híbrido de Membrana de Levedura.

ABSTRACT

Connexins (Cx) are membrane proteins characterized by four transmembrane domains, two extracellular loops, one intracellular loop and N- and C-terminal cytoplasmic segments. The terminal segments vary among members of this protein family. Six Cx molecules oligomerize to form a connexon. Two connexons in adjacent cell membranes form an intracellular channel, known as a gap junction, which is responsible for the transportation of small molecules and ions between cells. Connexin 26 (Cx26), a protein encoded by the gene *GJB2*, is expressed in different tissues, including cochlea. Mutations in *GJB2* are responsible for 50% of the cases of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss and nearly 10% of all cases of congenital deafness. A functional role has been assigned for Cx26 in the maintenance and recycling of potassium (K^+) in the endolymph, a fluid present in the cochlea, in the inner ear. Through the identification of proteins that interact with Cx26 and characterization of its network of interactions, we aimed to find which corresponding genes would be good candidates to explain hearing loss. We also aimed to verify if there is support for the hypothesis that Cx26 could be located in mitochondria. To achieve this, we analyzed the results of a membrane yeast two-hybrid assay performed with a human fetal brain cDNA library through in silico analysis of each protein identified by interaction with Cx26. We used the databases: WebGestalt to study gene ontology; ProtScale to determine the hydrophobicity of the selected interaction domains, SHIELD (Shared Harvard Inner-Ear Laboratory Database) and NCBI (National Center for Biotechnology Information) to verify the expression of genes in the cochlea; The databases UCSC (University of California Santa Cruz Genome Institute), Hereditary Hearing Loss Homepage and OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) were used to verify the chromosomal location of genes and hearing loss loci and OMIM as well to verify if the genes had a known association with a genetic disease, in particular to hearing loss; NCBI, Uniprot and The Human Protein Atlas were used to verify the localization of proteins in mitochondria; STRING (Functional Protein Association Networks) and BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets) were used to analyze the protein interaction network of proteins identified in assay and Cx26 protein-protein interaction. A total of 45 proteins that interact with Cx26 were identified by the assay. Among these, 42 corresponding genes were found to be expressed in the cochlea or inner ear. In addition, three proteins have their corresponding genes located within or close to non-syndromic hearing loss-related loci, previously mapped by linkage studies, but with the corresponding genes not yet identified, suggesting they are good candidate genes to explain

hearing loss. Finally, nine proteins are located in mitochondria, and two of them (the gene products of *FUNDC2* and *TSPO*) have been exclusively located in mitochondria, suggesting possible Cx26 localization in mitochondria. After in silico analysis and hierarchical classification, 25 proteins were found to be the more relevant to hearing and they were the products of the genes *MMD*, *ELOVL4*, *GPM6B*, *DAD1*, *SLC6A3*, *RNF41*, *ACKR1*, *TSPO*, *CEND1*, *FUNDC2*, *TSPAN7*, *MSMO1*, *GPM6A*, *TTYH1*, *ATP2A2*, *SLC33A1*, *SLC38A3*, *EBP*, *IER3IP1*, *SLC31A2*, *TMEM87A*, *TVP23C*, *MT-ATP6*, *ERGIC3*, and *KCNK1*. Our findings contributed to highlight the potential role of proteins that interact with Connexin 26 in the physiology of hearing.

Keywords: Connexin 26, *GJB2*, hereditary deafness, mitochondria, yeast two-hybrid assay.

1. INTRODUÇÃO

O termo “surdez” é frequentemente usado para designar somente os limiares auditivos que caracterizam perda auditiva de severa (grave) a profunda. Diferentemente, os termos “deficiência auditiva” e “perda auditiva” são frequentemente utilizados para se referir a audição abaixo dos limiares considerados normais, determinados principalmente pelo exame popularmente chamado de audiometria (Shearer *et al.*, 2017). No entanto, neste trabalho utilizaremos esses termos sem essa distinção. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 5% da população mundial, isto é, 466 milhões de pessoas (432 milhões de adultos e 34 milhões de crianças), possuem algum tipo de perda auditiva incapacitante. No Brasil, de acordo com o Censo de 2010 realizado pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), aproximadamente 46 milhões de brasileiros (24% da população brasileira) apresentam algum tipo de incapacidade; dentre esses, 21,9% apresentam perda auditiva que acomete, portanto, 5,1% da população total brasileira (10,6 milhões de brasileiros).

A perda auditiva, na maioria dos casos, é um distúrbio multifatorial, pois pode ser causado por muitos fatores genéticos e/ou ambientais, ou pela interação entre vários desses. Dentre os fatores genéticos, há várias formas determinadas por alterações genéticas com herança Mendeliana. Nesses casos, a perda auditiva pode ter herança autossômica recessiva, autossômica dominante, ligada ao X, dominante ou recessiva e também mitocondrial. Podem também ocorrer formas sindrômicas, isto é, caracterizadas pela perda auditiva associada com outros sinais clínicos, ou não-sindrômicas, caracterizadas apenas pela perda auditiva. Ademais, pode ser pré-lingual, quando ocorre a perda auditiva antes da aquisição da linguagem ou pós-lingual, quando ocorre a perda da audição após a aquisição da linguagem (Willems, 2000).

A perda auditiva pode ser classificada em três tipos de acordo com a sua origem: sensorineural, condutiva ou mista. A perda sensorineural é caracterizada quando há incapacidade de converter a energia mecânica em impulsos elétricos ou quando há uma incapacidade do sistema nervoso de promover ou reconhecer esses impulsos elétricos na orelha interna. Diferentemente, a perda auditiva condutiva está relacionada com um defeito ou impedimento geralmente físico na transmissão da energia sonora através da orelha externa e média. Já a mista é caracterizada pela presença de comprometimento em ambos os processos (Guilford *et al.*, 1994).

As perdas auditivas são também classificadas de acordo com a gravidade: perda auditiva leve, quando os limiares se situam entre 26-40 dB; perda auditiva moderada, quando os limiares estão entre 41-55 dB; perda auditiva moderadamente grave, quando os limiares estão entre 56-70 dB; perda auditiva severa (ou grave), quando os limiares são 71-90 dB e perda auditiva profunda, quando os limiares são maiores que 90 dB (Willems, 2000; Shearer *et al.*, 2017).

1.1 Fisiologia da audição

A orelha humana é dividida em orelha externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa possui a função de captar as ondas sonoras. A orelha média possui a função de transmitir as vibrações das ondas sonoras em vibrações mecânicas à orelha interna. Por fim, a orelha interna possui a função de transduzir as vibrações mecânicas em impulsos elétricos. A orelha externa é composta pelo pavilhão auditivo, o qual é responsável pela captação do som. Ele é constituído por uma placa de cartilagem denominada de meato acústico externo que abrange desde o pavilhão auditivo até a membrana timpânica, a qual encontra-se no fundo do meato, delimitando a fronteira entre a orelha externa e média, sendo por isso responsável pela transmissão das ondas sonoras para os ossículos da orelha média. Já a orelha média está localizada em uma cavidade cheia de ar no osso temporal e possui três ossículos que conectam a membrana do tímpano com a janela oval: o martelo, o qual toca a membrana do tímpano, o estribo, que contata a janela oval e a bigorna, que conecta o estribo, e o martelo. Desse modo, os ossículos transmitem as vibrações mecânicas geradas na membrana timpânica até a orelha interna (Junqueira e Carneiro, 2013).

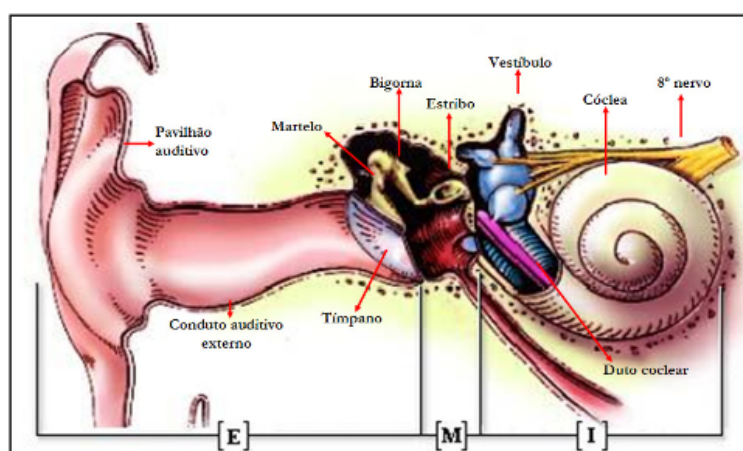


Figura 1. Representação esquemática das estruturas relacionadas à fisiologia da audição. E: orelha externa; **M:** orelha média; e **I:** orelha interna. (Figura modificada de Pujol et al., 2011).

A orelha interna é constituída pelo sistema vestibular e a cóclea. O sistema vestibular, responsável pelo equilíbrio, é composto pelas estruturas: o sáculo e o utrículo. No utrículo desembocam os canais semicirculares (Junqueira e Carneiro, 2013). A cóclea é o principal órgão do sistema receptor de sons dos mamíferos. Ela é um canal ósseo-membranoso subdividido em três compartimentos preenchidos com fluidos: a escala timpânica, a escala vestibular e a escala média (duto coclear). As escalas timpânicas e a escala vestibular contêm perilinfa com composição semelhante ao plasma. Já a escala média, por sua vez, contém endolinfa, que apresenta altas concentrações de potássio (K^+) e baixas concentrações de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) (Verselis, 2017).

A diferença entre a composição iônica da endolinfa da escala média (compartimento central da cóclea) e a perilinfa, fluido presente nos outros dois compartimentos, é responsável pelo estabelecimento do potencial endococlear, crítico para transdução do sinal adequado nas células ciliadas, criando uma força-motriz suficiente para a entrada da K^+ (secretado pela estria vascular) nas células ciliadas, sua despolarização e liberação de neurotransmissores (Verselis, 2017).

Localizado na escala média, sobre a membrana basilar, encontra-se o órgão de Corti, constituído por células ciliadas e de suporte que são banhadas amplamente pela endolinfa (Figura 2). As células ciliadas são de dois tipos: externas e internas. Ambas possuem protrusões de cílios em suas extremidades denominadas estereocílios que são ricos em filamentos de actina (Figura 3) (Dror e Avraham, 2010). As células ciliadas externas ocorrem em maior número, aproximadamente três vezes maior que as células ciliadas internas (Guyton e Hall, 2011). Além disso, as duas células são diferentes na função: a função das células ciliadas internas é a transdução do som em impulsos nervosos enquanto que as células ciliadas externas conferem uma maior sensibilidade às células ciliadas internas e contribuem na discriminação das frequências através da amplificação da recepção do som (Sampaio e Oliveira, 2006; Guyton e Hall, 2011).

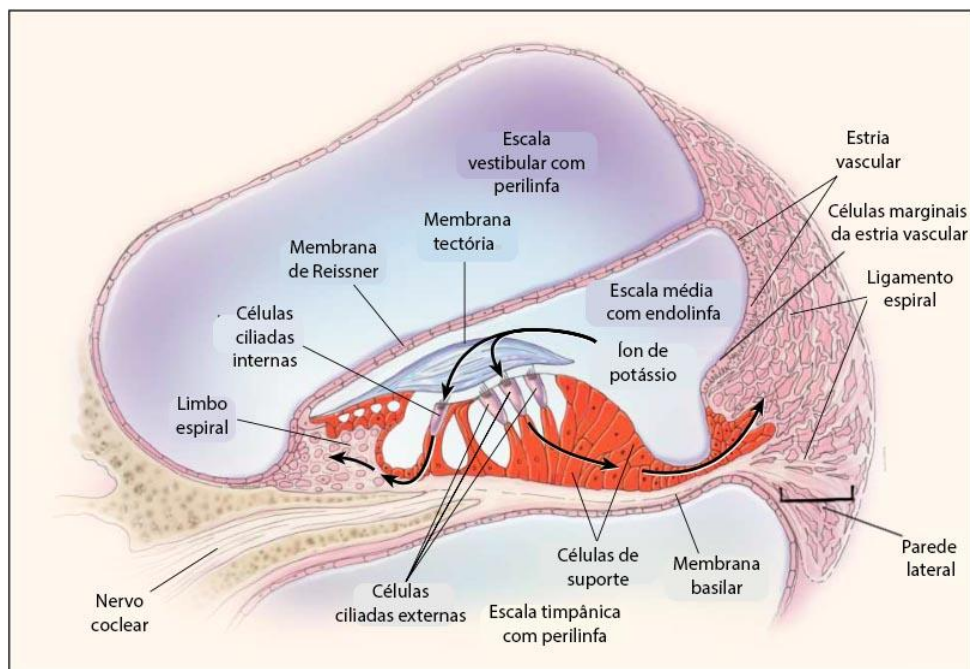


Figura 2. Representação esquemática da seção transversal de um dos giros da cóclea. Representação esquemática da cóclea subdividida em três compartimentos: escala timpânica e escala vestibular (preenchidas com perilíngua) e escala média (preenchida com endolíngua). Na escala média há a representação do órgão de Corti com a membrana tectorial em contato com os estereocílios das células ciliadas internas e externas mostrando o influxo do íon de potássio à estria vascular indicado pelas setas em preto (Figura modificada de Willems, 2000).

As células de suporte são de seis tipos: Deiters, Hensen, Claudius, Pilares, células da borda (*Border cells*) e células falangeais (*Phalangeal cells*) (Figura 4) (Smeti *et al.*, 2011). As células de suporte possuem proteínas de membrana, microfilamentos e microtúbulos citoplasmáticos que favorecem sua função de proteção contra estresse mecânico durante o estímulo sonoro, isto é, mantêm a integridade estrutural dos órgãos sensoriais durante a estimulação sonora (Sampaio e Oliveira, 2006). Após um trauma tecidual, as células de suporte podem remover as células ciliadas lesionadas ou os restos de células ciliadas fagocitadas do epitélio. Além disso, já foi demonstrado que em alguns vertebrados, as células de suporte podem gerar novas células ciliadas após lesão celular (Wan *et al.*, 2013). No entanto, isso não ocorre nos mamíferos e, por isso, a perda auditiva nesse grupo de animais é permanente.

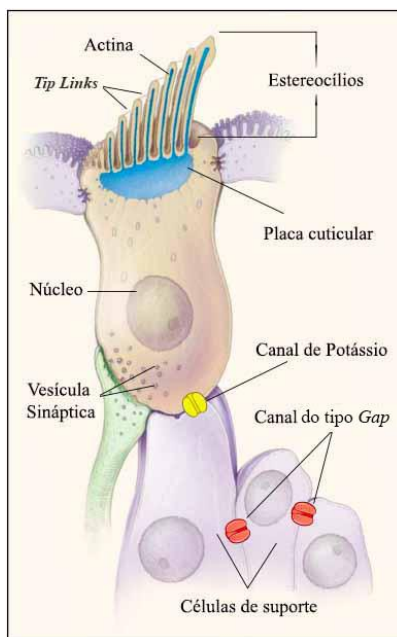


Figura 3. Esquema de uma célula ciliada. As vibrações da membrana basilar resultante da movimentação dos fluidos da escala média induzem a movimentação da membrana tectorial e consequentemente a deflexão dos estereocílios das células ciliadas permitindo que ocorra o influxo de potássio e entrada de cálcio nas células em questão. A saída do íon de potássio ocorre por meio dos canais de potássio e sua reciclagem ocorre por meio de junções do tipo *gap* (Figura modificada de Willems, 2000).

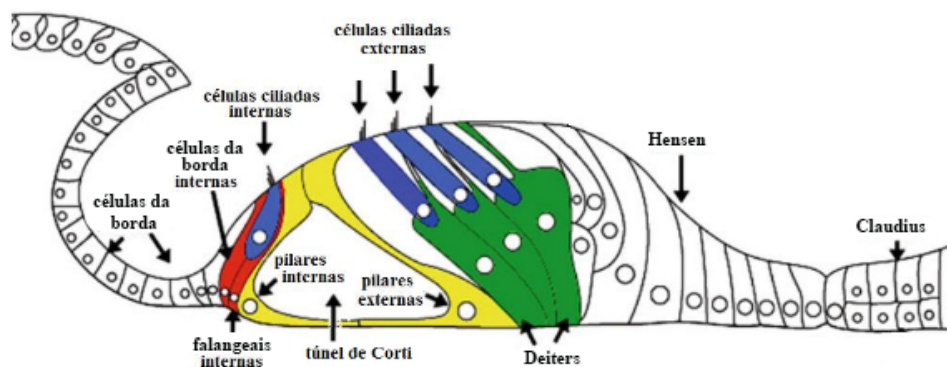


Figura 4. Representação esquemática dos tipos de células de suporte e células ciliadas. Representação esquemática do órgão de Corti com destaque às células de suporte: Deiters, Hensen, Claudius, Pilares (internas e externas), falangeais internos e células da borda. Estão também representadas as células ciliadas internas e externas (Figura modificada de Rio *et al.*, 2002).

O som captado pela orelha externa é transmitido até a orelha interna por meio da membrana timpânica e da cadeia de ossículos acoplados a ela, ou seja, a vibração do tímpano, em decorrência das ondas sonoras promove o deslocamento mecânico dos ossículos. Uma vez que eles estão acoplados à janela oval, esse deslocamento é transmitido para a perilinfa presente na escala vestibular e, por consequência, as vibrações da escala vestibular são transmitidas para a escala média. O deslocamento dos fluidos presente nessa escala faz vibrar toda a extensão do órgão de Corti. Essa vibração é o gatilho para a deflexão do estereocílios das células ciliadas, o que leva a abertura de canais condutores de cátions localizados nas

pontas dos estereocílios, permitindo o influxo do íon potássio e a despolarização das células ciliadas internas (as quais possuem inervações dos neurônios sensoriais aferentes) e a liberação do neurotransmissor glutamato, que desencadeará o impulso nervoso que será transmitido ao encéfalo, no córtex auditivo primário localizado no lobo temporal através da via nervo vestibulo-coclear (Dror e Avraham, 2010; Guyton e Hall, 2011; Junqueira e Carneiro, 2013).

1.2 Surdez hereditária

Dentre os casos de surdez hereditários, que correspondem a cerca de 50-60% de todos os casos nos países desenvolvidos, 30% correspondem a uma síndrome específica, isto é, são síndrômicos e 70% dos casos são não-sindrômicos e são devidos a alterações em vários genes diferentes, cujos loci são designados pela sigla DFN (de *DeaFNess* - surdez em inglês). Dentre esses, as formas de transmissão autossômica recessiva correspondem a aproximadamente 80% dos casos de surdez neurosensorial herdada (cujos loci gênicos são designados pela sigla DFNB); as formas de transmissão autossômica dominante correspondem a 20-25% dos casos (com os loci designados pela sigla DFNA). As formas de transmissão relacionadas ao cromossomo X correspondem a 1-1,5% dos casos (loci designados pela sigla DFNX) e as formas de transmissão mitocondrial correspondem a 1-1,5%. Cada símbolo (DFN) que representa um locus gênico relacionado à surdez hereditária é seguido por um número ao seu lado, representando a ordem cronológica da sua descoberta. Até o momento, cerca de 170 loci de surdez foram mapeados por estudos de ligação e um total de 124 genes de surdez não-sindrômica foram identificados. Desses, foram identificados 68 loci de surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante com 51 genes identificados; 98 loci de surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva foram mapeados com 78 genes identificados; por fim, seis loci foram mapeados com cinco genes identificados para casos com herança ligada ao X. Além disso, um locus no cromossomo Y foi também mapeado por estudo de ligação (Van Camp e Smith, 2022). Alguns genes, quando alterados, podem acarretar tanto surdez de herança autossômica recessiva como dominante, como por exemplo, o próprio gene *GJB2* que codifica a conexina 26. Além disso, dois genes mitocondriais quando mutados acarretam perda auditiva não síndrômica de herança materna e várias mutações mitocondriais acarretam síndromes em que a surdez é sinal clínico frequente (Shearer *et al.*, 2017). Uma variante patogênica que merece destaque pela sua frequência é a m.1555G>A no gene *MT-RNR1* que codifica o RNAr 12S e

que foi relacionada à surdez não-sindrômica. Em pacientes com essa variante, a perda auditiva é induzida ou agravada pela administração de aminoglicosídeos (Estivill et al., 1998; Shearer *et al.*, 2017).

Dentre as formas de transmissão autossômica recessiva, cerca de 50% são devidas a variantes patogênicas no gene *GJB2*, que codifica a proteína Conexina 26 (Cx26) (Lefebvre e Van De Water, 2000; Willems, 2000; Kenneson *et al.*, 2002; Dror e Avraham, 2010; Shearer *et al.*, 2017). Como as variantes patogênicas em *GJB2* constituem importante causa de surdez recessiva não sindrômica, entender a distribuição de Cx26 na célula e suas funções, bem como as proteínas com as quais ela interage, é extremamente relevante à compreensão dos mecanismos moleculares da audição e suas disfunções.

O gene *GJB2* (abreviação do inglês *Gap Junction Protein Beta 2*), localizado no locus DFNB1, é um gene pequeno, de apenas dois exons e situado no cromossomo humano 13 na região 13q11-q12 (Guilford, 1994; Petersen e Willems, 2006). No exon 1, está a região não traduzida (5'-UTR) e no exon 2 estão localizadas parte da 5' UTR, a sequência codificadora da proteína conexina 26 (Cx26) de 226 aminoácidos e também uma região 3'-UTR (Figura 5) (Sohl e Willecke, 2004).

A variante patogênica mais frequente no *GJB2* é a c.35del, muito conhecida na literatura como c.35delG, que consiste na deleção de uma guanina e consequente mudança de fase da leitura da tradução (do inglês *frameshift*) (Kemperman et. al., 2002; Kelly et. al., 2015), resultando em um códon de parada prematuro que permite prever a tradução de uma proteína contendo somente 12 aminoácidos (Zelante et. al, 1997).

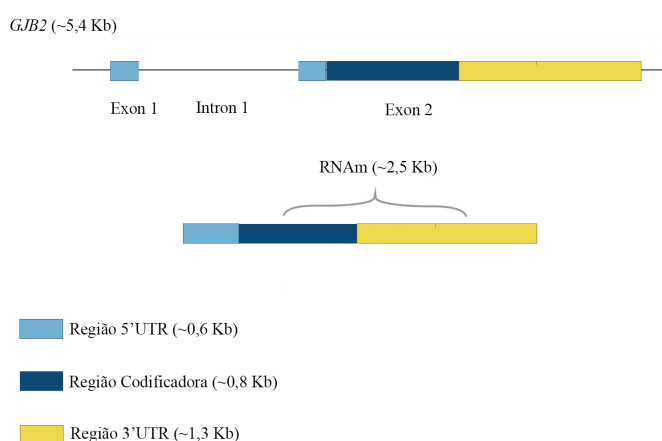


Figura 5. Representação esquemática do gene *GJB2*. Na figura, parte da região 5'UTR correspondendo ao exon 1 e o exon 2 contendo parte da 5'UTR, a região codificadora (ORF - *Open Reading Frame*) e a região 3'-UTR.

1.3 As proteínas conexas

As conexas são proteínas de membranas que possuem quatro domínios transmembrânicos hidrofóbicos (TM1-TM4) (Yeager e Nicholson, 1996) que se ligam entre si por duas alças extracelulares (E1 e E2 - que apresentam três resíduos conservados de cisteína, que são essenciais para a estrutura terciária), uma alça intracelular, um domínio amino-terminal (N-terminal) de sequência mais conservada e outro carbóxi-terminal (C-terminal), que possui sequência com maior grau de diversidade dentre as conexas, ambos localizados no citoplasma (Figura 6) (Bruzzone *et al.*, 1996; Sohl e Willecke, 2004; Laird, 2006; Maeda *et al.*, 2009; Laird *et al.*, 2015; Esseltine e Laird, 2016; del Castillo e del Castillo, 2017; Wu *et al.*, 2019). As conexas humanas são divididas em cinco subfamílias, α , β , γ , Δ e ϵ , em função de sua similaridade, e são designadas pela sigla “Cx” seguida de suas massas moleculares em kilodaltons (kDa), como a Cx26, por exemplo, que apresenta massa molecular aproximadamente de 26 kDa (Sohl e Willecke, 2004; Kelly *et al.*, 2015; Beyer e Berthoud, 2018; Laird e Lampe, 2018).

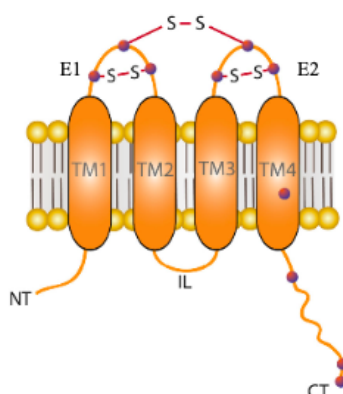


Figura 6. Representação esquemática de uma conexina. As conexas possuem quatro domínios transmembrânicos hidrofóbicos (TM1-TM4) que se ligam entre si por duas alças extracelulares (E1 e E2), uma alça intracelular (IL) e domínios amino-terminal (NT) e carbóxi-terminal (CT). Há três resíduos de Cys conservados em cada alça extracelular os quais formam ligações de dissulfeto entre elas (S-S) (Figura modificada de Retamanal *et al.*, 2016).

As conexas oligomerizam-se estruturalmente em seis cadeias (subunidades) para formar um hexâmero, denominado conexon ou hemicanal. Dois conexons em membranas de células adjacentes formam um canal de junção do tipo comunicante (*gap junction* ou junção do tipo *gap*) (Figura 7). Esse tipo de canal é responsável pelo transporte de íons, pequenas moléculas, metabólitos e mensageiros secundários entre as células, mas não permitem a passagem de moléculas que excedem a 1kDa de tamanho (Bruzzone *et al.*, 1996; Sohl e

Willecke, 2004; Laird, 2006; Maeda *et al.*, 2009; Esseltine e Laird, 2016; Wu *et al.*, 2019; Laird e Lampe, 2018).

Um conexon pode conter vários tipos de conexinas e vários tipos de conexons podem formar distintos canais completos distintos “célula a célula”. Sendo assim, um conexon pode ser tanto homomérico, formado por um único tipo de conexina, ou heteromérico, formado por mais de um tipo de conexina. Dois conexons idênticos formam um canal de junção celular homotípico, enquanto que conexons distintos formam um canal de junção celular heterotípico. A formação de canais de junções de *gap* homotípicos ou heterotípicos pode ser decorrente da compatibilidade da alça citoplasmática central e do C-terminal presente nas conexinas (Figura 8) (White *et al.*, 1995; Kemperman *et. al.*, 2002; Petersen, 2002; Koval, 2006; Kelly *et. al.*, 2015).

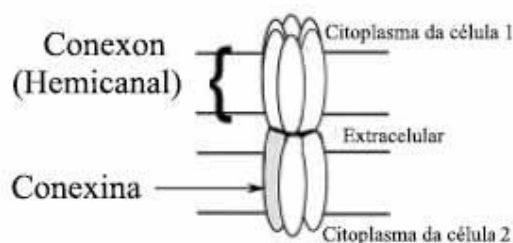


Figura 7. Representação esquemática de um canal de junção do tipo *gap*. As conexinas oligomerizam-se em seis subunidades para formar um conexon ou um hemicanal; dois conexon em membranas de células adjacentes formam um canal de junção do *gap* (Figura modificada de Spray *et. al.*, 2006).

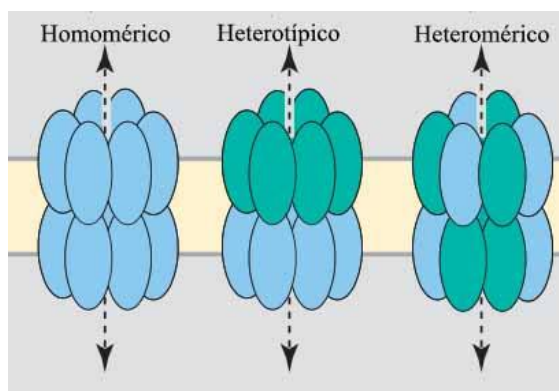


Figura 8. Representação esquemática dos tipos de conexons e junções do tipo *gap*. Um conexon pode ser do tipo homomérico, isto é, formado por um único tipo de conexina, ou heteromérico, formado por mais de um tipo de conexina. Pode ser também heterotípico, formado por dois conexons distintos, ou homotípico, por dois conexons idênticos (Figura modificada de Koval, 2006).

As conexinas possuem resíduos de cisteínas (Cys) conservados em suas alças extracelulares (E1 e E2), havendo três resíduos Cys em cada alça extracelular os quais

formam ligações de dissulfeto (S-S) por meio da interação entre elas e que são importantes para a formação da estrutura terciária da conexina e a sua estabilização (Voet e Voet, 2013) (Figura 6).

De acordo com Dahl *et al.* (1991) e Dahl *et al.* (1992), foram estudados ovócitos de *Xenopus laevis* (comumente conhecida por rã-de-unhas-africanas) no qual o gene *GJB1*, que codifica a conexina 32 (Cx32), por mutações pontuais teve os códons de Cys TGT (Cys-168) e TGC (Cys-173) substituídos por códons de serinas TCT e TCC, respectivamente, substituindo, portanto, os resíduos de Cys por serinas. Os ovócitos foram incapazes de formar canais de junções *gap*, sugerindo, dessa forma, que os seis resíduos de Cys das alças extracelulares são necessários para a formação das junções de *gap*.

Outro estudo também empregou ovócitos de *Xenopus laevis* que expressavam não somente Cx43 deficiente em resíduos de Cys nas alças extracelulares mas também deficiente em Cys não conservadas. Os ovócitos foram igualmente incapazes de formar junções do tipo *gap*. No entanto, as moléculas de Cx43 foram capazes de formar hemicanais funcionais similares às Cx43 selvagens, o que demonstrado por meio do estudo de permeabilidade por carboxifluoresceína. Esses resultados indicam que as Cys presentes nas alças extracelulares e suas ligações de dissulfeto assim como as Cys não conservadas ao longo da estrutura não são essenciais para formarem um hemicanal funcional, dado que um hemicanal funcional permite a sinalização transmembrânica e parácrina auxiliando na orelha interna a homeostase coclear (Bao *et al.*, 2004; Verselis, 2019). No entanto, a função do canal de junção do tipo *gap* foi comprometida.

Por meio do ensaio de cristalografia a partir da difração de raio-X, Maeda *et al.* (2009) propuseram um modelo representativo da estrutura terciária e quaternária do hemicanal e da junção do tipo *gap* formados pela Cx26. Apesar da baixa resolução obtida no experimento, 3.5Å (angström), evidências indicam a importância de interações dos resíduos em TM2, TM4 e nas alças extracelulares para a formação do hemicanal; mais especificamente, as interações entre os resíduos de E1 e TM2 de uma conexina com os resíduos de E1, E2, e TM4 da conexina adjacente são importantes para a formação do hemicanal.

Além disso, também identificaram nesse modelo as ligações de hidrogênio envolvendo E1 e E2 entre os hemicanais adjacentes (Figura 9). Em E1 e E2, os resíduos formam ligações de hidrogênio com os resíduos da conexina oposta. Tais características, de acordo com os pesquisadores, permitem que haja a formação de uma “parede de camada dupla” a qual não só permite a conexão entre os dois hemicanais mas também isolamento da estrutura em relação ao ambiente extracelular (Maeda *et al.*, 2009).

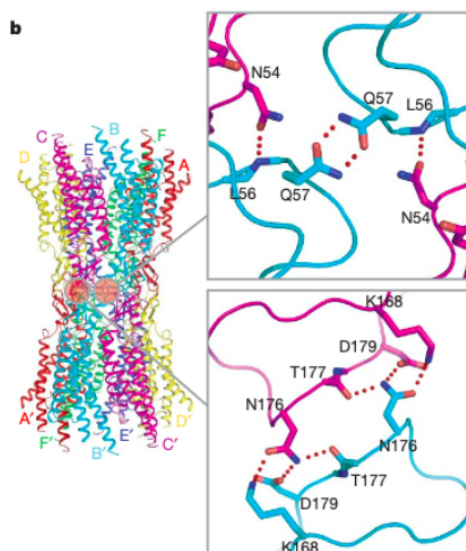


Figura 9. Representação esquemática de ligações de hidrogênio entre E1 e E2 dos hemicanais adjacentes. Na figura estão representadas as ligações de hidrogênio entre os resíduos Asp 54 - Leu 56 e entre Glu 57 - Glu 57 de E1. Em E2, há a representação de ligações de hidrogênio entre Lys 168, Asp 179, Thr 177 e Asn 176 com os resíduos da conexina oposta (Asp: aspartato; Leu: leucina; Glu: glutamato; Lys: lisina; Thr: treonina; Asn: asparagina) (Figura modificada de Maeda *et al.*, 2009).

1.4 Expressão das conexinas e a suas vias secretoras

A família de genes que codificam as conexinas possui 21 membros em humanos e 20 membros nos roedores (Söl e Willecke, 2003). A conexina 26 (Cx26), codificada pelo gene *GJB2*, que pertence à subfamília β (Kelsell *et al.*, 1997), é encontrada em diferentes tipos de tecidos, como mama, cérebro, pele, cóclea, fígado, endométrio, células da glia, epitélio das vias aéreas, pâncreas e túbulos seminíferos (Bruzzone *et al.*, 1996; Račkauskas *et al.*, 2010). Estudos realizados por meio das técnicas de *Western blotting* e imuno-histoquímica revelam a presença na cóclea do camundongo de quatro conexinas parálogas, Cx26, Cx30, Cx31 e Cx43. Nos órgãos vestibulares estão presentes três delas, Cx26, Cx30 e Cx43. Mutações em humanos nos genes que codificam Cx26 (*GJB2*), Cx30 (*GJB6*), Cx31 (*GJB3*) e Cx43 (*GJAI*) já foram associadas com perda de audição síndrômica e não síndrômica (Kelsell *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1998; Petersen, 2002; Wingard e Zhao, 2015).

Na cóclea, no órgão de Corti, a Cx26 é expressa nas células de suporte, especificamente no dia pós-natal (P) 3 (P3). Está expressa em células de Deiters, células Pilares e células de Claudius. Em P8-9, a Cx26 é expressa em quase todas as células de suporte e na cóclea adulta é expressa em todas as células de suporte no camundongo (Zhang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2018). Além disso, já foi evidenciada a sua co-localização com a Cx30 (Forge *et al.*, 2003).

Ressalta-se que já foi demonstrada a co-localização de ambas as conexinas em uma mesma placa de junções do tipo *gap*, sugerindo a formação de canais heterotípicos (Kelly *et al.*, 2015; Verselis, 2017). Supõe-se que a coexpressão de conexinas parálogas em um mesmo tipo celular permite que haja mecanismos compensatórios para superar a perda ou mutação em um membro da família das conexinas (Laird, 2006; Cruz, 2016).

As conexinas possuem uma meia-vida de apenas algumas horas. Acredita-se que a maioria das conexinas possuem meia-vida em torno de 1 a 2,5 horas (Laird *et al.*, 1991; Laird e Lampe, 2018). Desse modo, essas proteínas são programadas para serem continuamente biossintetizadas e degradadas. Em resumo, elas são biossintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) e são direcionadas à membrana plasmática através de vesículas secretoras. De acordo com Koval (2006), a via clássica de oligomerização não se aplica às conexinas e similarmente à grande maioria das proteínas de canais, podem se oligomerizar em compartimentos distintos para formar os conexons, antes de chegarem à membrana plasmática.

Sendo assim, as conexinas são co-traducionalmente transportadas no retículo endoplasmático (RE) via translocon ou por meio de sequências de aminoácidos utilizadas para endereçar as proteínas a lugares distintos da célula (Koval, 2006; Laird, 2006; Kelly *et al.*, 2015; Esseltine e Laird, 2016; Laird e Lampe, 2018). Porém, diferentemente da regra, a partir de estudos *in vitro*, a Cx26 demonstrou ser capaz de ser transportada para o RE tanto pós quanto co-traducionalmente (Ahmad *et al.*, 1999) e se oligomerizar antes do transporte para o Golgi. No entanto, também pode alcançar a superfície celular por uma via independente do Golgi (Maza *et al.*, 2005; Jara *et al.*, 2012), isto é, a Cx26 pode atingir a membrana plasmática sem passar pelo aparelho de Golgi. Entretanto, de acordo com Thomas *et al.* (2006), uma população substancial de moléculas de Cx26 passam pelo complexo de Golgi. Não obstante, de acordo com Ahmad e Evans (2002), a Cx26 demonstrou ser capaz de integrar-se diretamente de forma pós-traducional na membrana plasmática.

A Cx43, assim como a Cx26, pode também ser importada para o retículo endoplasmático tanto pós quanto co-traducionalmente. Entretanto, oligomeriza-se em hexâmero após a sua saída do retículo endoplasmático, provavelmente na rede trans-Golgi (TGN) (Musil e Goodenough, 1993). Diferentemente, a Cx32 parece se inserir no retículo endoplasmático apenas co-traducionalmente e a sua oligomerização pode ocorrer tanto no retículo endoplasmático quanto no compartimento intermediário entre o RE e o complexo de Golgi (Falk *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1999; Koval, 2006; Laird, 2006).

Sendo assim, há duas classes distintas de conexinas que se oligomerizam em subcompartimentos celulares diferentes. Enquanto que a maioria das conexinas que são da subfamília β (como por exemplo Cx32 e Cx26) requerem que a sua oligomerização completa ocorra antes de serem transportadas para o complexo de Golgi, outras conexinas, como por exemplo Cx43, Cx40 e Cx46 (abrangendo grande parte das conexinas da subfamília α), requerem que sejam transportadas ao complexo de Golgi como monômeros para que na rede trans do Golgi (TGN) ou no próprio complexo de Golgi sejam oligomerizadas (Musil e Goodenough, 1993; Maza *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2009; Jara *et al.*, 2012; Aasen *et al.*, 2018).

No entanto, Smith *et al.* (2012), subdividiram as classes de conexinas que tendem a se oligomerizar ou não no RE com base nos motivos (sequências de resíduos) em comum entre elas. Desse modo, a Cx43, por se oligomerizar na rede trans do Golgi (TGN), se encontraria no grupo R por apresentar motivo citosólico LLRTY, enquanto que, tanto a Cx32 quanto a Cx26, seriam do grupo W por apresentarem motivo citosólico LWWTY e que por sua vez, se oligomerizam no RE ou no compartimento intermediário entre o RE e o complexo de Golgi (ERGIC) (Smith *et al.*, 2012; Aasen *et al.*, 2018).

De acordo com os resultados de Lauf *et al.* (2002) e Thomas *et al.* (2006), que usaram Cx43 e Cx26 marcadas com proteínas fluorescentes (Cx43-GFP - *Green Fluorescent Protein* - e Cx26-YFP - *Yellow Fluorescent Protein*) por meio da técnica de microscopia de *time-lapse*, ao saírem do complexo de Golgi, as conexinas podem utilizar uma variedade de transportes intermediários, como vesículas ou a via secretora clássica, que as auxiliam a serem transportadas para superfície celular. Ademais, outras evidências indicam que o transporte para a superfície celular pode ser mediado por microtúbulos, que apesar de parecer não serem essenciais, parecem melhorar a eficiência da entrega à superfície celular, uma vez que houve uma diminuição de 80% no movimento das vesículas contendo Cx43-GFP e Cx26-YFP quando houve despolarização dos microtúbulos farmacologicamente.

Uma vez inseridos na membrana plasmática, os hemicanais formados se difundem livremente no interior da bicamada lipídica e, por meio do auxílio das N e E-caderinas, encontram os conexons das células adjacentes para formar os canais de junção do tipo *gap* permitindo o crescimento das placas juncionais às margens externas das placas (Figura 10) (Laird, 2006).

Em razão da forte interação entre os conexons e a sua não-dissociação, para que haja a degradação desse hemicanais, ocorre a internalização de toda placa juncional ou fragmentos dela, em uma das duas células adjacentes, por meio da formação de junções anulares ou conexossomos, que contêm, além de conexinas, moléculas que são necessárias para o

direcionamento dos conexossomos, sua internalização, bem como o seu destino intracelular. Além disso, as conexinas são degradadas pela via lisossômica ou proteossômica. Acredita-se que a degradação mediada pela via proteossômica seja responsável pela degradação associada ao RE enquanto que a degradação associada a via lisossômica seja responsável pela degradação das conexinas presentes na membrana plasmática. Além disso, é possível que as conexinas poli-ubiquitinadas sejam direcionadas para degradação via proteossômica e aquelas mono-ubiquitinadas sejam direcionadas para via lisossômica (Koval, 2006; Laird, 2006; Kelly *et. al.*, 2015; Esseltine e Laird, 2016).

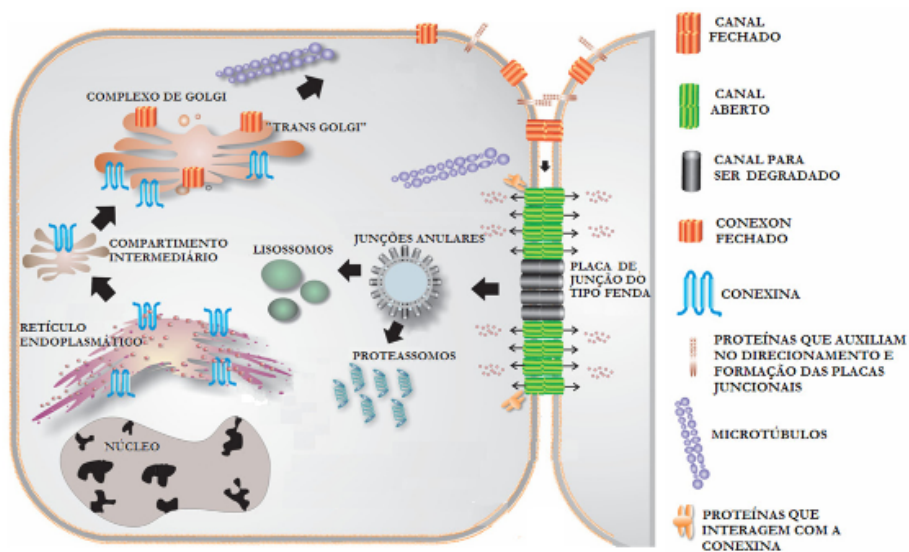


Figura 10. Representação esquemática da biossíntese e degradação das conexinas. As conexinas são co-traducionalmente transportadas para o RE onde podem se oligomerizar em diferentes compartimentos antes de alcançarem a membrana plasmática. Uma vez oligomerizadas, através de vesículas ou extensões tubulares, os hemicanais são entregues à superfície celular difundindo-se na bicamada lipídica com o auxílio de N e E-caderinas. Sua degradação pode ocorrer por meio da via lisossômica ou proteossômica (Figura modificada de Laird, 2006).

1.5 O papel da Cx26 na cóclea

Na cóclea, a Cx26 está localizada nas células de suporte mas também está localizada nas células do limbo e do ligamento espiral, nos fibrócitos da parede lateral e também nas células basais e intermediárias da estria vascular, mas está ausente nas células marginais (Figura 2).

A Cx26, localizada nas células de suporte do órgão de Corti, tem papel fundamental na manutenção da alta concentração de K^+ na endolinfa presente no interior da escala média da orelha interna, bem como da reciclagem desses íons e, por conseguinte, na manutenção do potencial endococlear. Uma vez que as células ciliadas estejam despolarizadas pelo influxo de K^+ , esses íons são transportados por canais de potássio (formados provavelmente pelos

produtos gênicos de *KCNQ4*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNJ10* e *SLC12A2*) às células de suporte, permitindo assim a repolarização das células ciliadas. Nas células de suporte, os íons de K^+ difundem-se através das junções de *gap* formadas pelas conexinas até chegar à estria vascular. Já na estria vascular os íons de K^+ são secretados de volta à endolinfa dos canais formados a partir dos produtos dos genes *KCNQ1* e *KCNE1* (Kemperman *et al.*, 2002; Petersen e Willems, 2006; Kelly *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018).

Supõe-se que a perda da função da Cx26 nos complexos juncionais formados pela Cx26 no órgão de Corti, como consequência de alterações no gene *GJB2*, interrompa o fluxo de íons de potássio, resultando em uma intoxicação local pela alta concentração desse íons e consequente morte celular e perda auditiva (Lefebvre e Van De Water, 2000). Estudos com camundongos *nocautes* condicionais para expressão do gene da Cx26 na cóclea com cinco dias após o nascimento (P5) evidenciaram que esses animais de fato possuíam perda auditiva progressiva, leve a moderada (com aumento progressivo do limiar da respostas auditivas do tronco cerebral em P45-60) e com potencial endococlear reduzido. No entanto, não foram observadas anomalias de desenvolvimento da cóclea nem a degeneração celular das células ciliadas, isto é, sem evidência de morte celular (Zhu *et al.*, 2015a).

Liang *et al.*, (2012) observaram que animais *nocautes* condicionais para a expressão de Cx26 na cóclea antes de P5 também mostram perda auditiva evidenciada por meio da ausência de respostas auditivas do tronco cerebral (ABR). Não havia ABR detectável nos camundongos *nocautes* no dia pós-natal 14 (P14), quando a audição começa de fato. Ademais, verificaram que tais camundongos na sua fase de desenvolvimento não apresentavam degeneração celular nas células ciliadas e células de suporte. No entanto, em animais adultos, após P60, foi verificada a degeneração celular. Em ambos os casos, isto é, camundongos *nocautes* para Cx26 na fase de desenvolvimento e na fase adulta (após P60) foi observado que na orelha interna o túnel coclear não estava aberto, mostrando a presença de anomalias precoces do desenvolvimento coclear como relatados por Chen *et al.* (2014), os quais também estudaram animais *nocautes* condicionais para Cx26 antes de P5 e observaram a perda auditiva nesses animais. Sendo assim, as alterações auditivas nesses animais acontecem antes da degeneração das células ciliadas e do estabelecimento do potencial endococlear (P10), indicando que a reciclagem dos íons K^+ e o potencial endococlear reduzido não são as únicas causas da perda auditiva induzida pela falta da Cx26.

Além disso, utilizando também camundongos *nocautes* condicionais para Cx26, foi observado que as junções do tipo *gap* entre as células de suporte mantêm a permeabilidade ao brometo de etídio, corante fluorescente, cuja massa molecular é 394,294 Da, sugerindo que as

junções do tipo *gap* na orelha interna de camundongos *nocautes* condicionais para expressão de Cx26 na cóclea podem ser permeáveis aos íons, incluindo ao potássio (39,0983 Da), o que pode ser devido a co-expressão da Cx26 com Cx30 (Zhu *et. al.*, 2015b; Zhu *et al.*, 2015a), sendo assim, a expressão da Cx30 permite que haja mecanismos compensatórios para superar a perda ou mutação da Cx26.

Os conexons ou hemicanais, assim como os canais completos formados entre duas células adjacentes, possuem a função de sinalização transmembrânica e parácrina, principalmente relacionada com a liberação de moléculas de sinalização como trifosfato de adenosina (ATP) e inositol 1,2,4 trifosfato (IP3). Os pólos apicais de algumas células de suporte estão expostos à endolinfa, que além de possuir altas concentrações de potássio e baixas concentrações de sódio, possui também baixas concentrações de cálcio. Isso aumenta a estimulação mecânica acústica, a possibilidade de abertura dos hemicanais e a liberação de ATP e IP3, afetando a homeostase coclear e ocasionando um amortecimento na eletromotilidade das células ciliadas externas, regulando a sensibilidade auditiva e protegendo as células contra danos de alta intensidade sonora (Jagger e Forge, 2015; Verselis, 2019).

1.6 As conexinas na mitocôndria

Por meio de estudos de imunohistoquímica, microscopia confocal de varredura e *Western Blotting* realizados a partir de culturas de miócitos atriais HL-1 de camundongos e mitocôndrias isoladas do cardiomiócitos de porcos, ratos e humanos, foi demonstrado que a conexina 43 (Cx43) localiza-se em mitocôndrias dos cardiomiócitos.

A indução dos cardiomiócitos após períodos transitórios de isquemia, seguidos de reperfusão do tecido (pré-condicionamento), aumentam a resistência dessas células à morte celular. Já foi observado que o pré-condicionamento acentua a localização subcelular da Cx43 na mitocôndria em comparação com amostras miocárdicas de corações de ratos que não foram submetidos a esse tratamento. No entanto, esse efeito pode ser resultante da diminuição da degradação da Cx43 durante a isquemia prolongada. Essa hipótese corrobora os achados de aumento da Cx43 após 90 minutos de isquemia em miocárdios de porcos uma vez que a meia vida das conexinas são de 1 a 2,5 horas (Laird *et. al.*, 1991; Boengler *et al.*, 2005; Laird e Lampe, 2018). Curiosamente, corações e cardiomiócitos isolados de camundongos deficientes em Cx43 mostraram-se incapazes de serem pré-condicionados. Isso favorece a hipótese de que a Cx43 tem papel na resistência à morte celular (Li *et al.*, 2004).

Experimentos de fracionamento celular a partir de cardiomiócitos de porco permitiram concluir que Cx43 distribui-se principalmente na membrana interna de mitocôndrias e, por meio de ensaios de coimunoprecipitação, observou-se que a translocação de Cx43 é dependente do translocador Tom20 (abreviação do inglês *Translocase of The Outer Membrane 20*) e Hsp90 (abreviação do inglês *Heat Shock Protein 90*), embora haja também indicação da presença de Cx43 em frações de membrana externa da mitocôndria. Já foi observado que a inibição da expressão da Hsp90 reduz expressão da Cx43 na membrana mitocondrial interna e inibe a proteção do pré-condicionamento à morte celular após períodos de isquemia prolongada (Rodriguez-Sinova *et al.*, 2006). Esses achados contribuem para a hipótese de intensificação na translocação de Cx43 induzida por pré-condicionamento ao invés de uma diminuição da degradação da Cx43, como mencionada por Boengler *et al.* (2005)

Para identificar novas vias moleculares relacionadas à Cx43 mitocondrial na cardioproteção, Denuc *et al.* (2016), utilizando ensaios de precipitação por afinidade tendo como isca a Cx43, seguidos de análise de espectrometria de massas, detectaram proteínas mitocondriais que interagem com Cx43 mitocondrial. Dentre essas, destacam-se duas que estão também relacionadas à respiração mitocondrial, o fator indutor de apoptose (AIF, abreviação do inglês *Apoptosis Inducing Factor*) e a subunidade beta da proteína de transferência de elétrons (ETFB, abreviação do inglês *Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta*).

Fowler *et al.* (2013), por meio de fracionamento subcelular, identificaram que a Cx32 se localiza na membrana interna de mitocôndria de hepatócitos de camundongo. Por co-imunoprecipitação, microscopia confocal e fracionamento subcelular, identificaram 18 proteínas parceiras com interação com Cx32, destacando-se as proteínas Cx26 e a SFXN-1. Essa última possui localização na membrana plasmática e membrana externa e interna da mitocôndria. No entanto, por microscopia confocal em células HEK293 (células derivadas de rim embrionário humano) expressando Cx32 humana, evidenciaram a interação da Cx32 da membrana plasmática com SFXN-1 da membrana externa da mitocôndria, sugerindo que as conexinas podem ligar as mitocôndrias às membranas plasmáticas. Além disso, em fígados de camundongos *nocaut* para Cx32, os níveis da proteína Cx26 foram reduzidos indicando possivelmente que essa redução ocorra em razão de uma perda de estabilidade da Cx26 em decorrência da ausência da Cx32, ou seja, a Cx32 confere maior estabilidade à Cx26.

Guo *et al.*, (2017), por meio de estudos com *Western blotting* e imunofluorescência, identificaram que a Cx40 se localiza na mitocôndria de células endoteliais das coronárias humanas e dos camundongos. Além disso, a Cx40 se co-localiza com Tom20 (marcador mitocondrial). Em células endoteliais coronárias de camundongos *nocautes* para Cx40, tanto o nível de cálcio mitocondrial quanto o nível de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS) mitocondrial foram diminuídos. Em contrapartida, a superexpressão de Cx40 tanto em células endoteliais coronárias humanas quanto de camundongos aumentou os níveis de cálcio mitocondrial e de ROS mitocondrial. Esses resultados indicam que a Cx40 mitocondrial regula a homeostase do cálcio mitocondrial e também regula o nível de ROS mitocondrial.

Em estudo semelhante aos descritos acima, mas com objetivo de investigar a localização da Cx26 em tecidos cardíacos, foi verificado por meio de técnicas de imunofluorescência em cardiomiócitos de coração humano e de rato e em células H9C2 (células de cardiomiócitos de rato) que a Cx26 também possui localização na mitocôndria. Curiosamente, foi verificado que a Cx26 em cardiomiócitos não possui a localização esperada em placas de junções do tipo *gap*, mas sim distribuída no citoplasma dos cardiomiócitos. Sendo assim, a fim de identificar melhor a localização celular da Cx26 em cardiomiócitos, usando-se marcação com *imunogold* por microscopia eletrônica, verificou-se que de fato a Cx26 estava ausente nas placas de junções de *gap* mas presente em mitocôndrias, miofibrilas e vesículas citoplasmáticas, enquanto que a Cx43 estava concentrada nas placas de junções de *gap* (Moscato *et al.*, 2018). No entanto, o sub-compartimento mitocondrial não foi relatado no artigo em questão, nem foi especulado qual seria o possível papel da Cx26 nas mitocôndrias dos cardiomiócitos.

1.7 O Ensaio de Duplo Híbrido

O ensaio de duplo híbrido, também denominado Y2H, permite a detecção de interações biofísicas e diretas entre duas proteínas, detectando, portanto, a rede de interação proteína-proteína (PPI, do inglês *Protein-Protein Interaction*). O ensaio pode ser subdividido em duas modalidades, *Reverse Y2H* e *Forward Y2H*. A primeira modalidade possui como objetivo identificar a presença ou a ausência de uma interação entre duas proteínas. Sendo assim, seu princípio baseia-se na reconstituição de um fator de transcrição: DB-X: AD-Y, no qual X e Y são as proteínas ou fragmentos das proteínas que estão sendo testados; DB

refere-se ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição e o AD refere-se ao domínio de ativação transcricional do mesmo fator (Choi *et al.*, 2018).

Nessa modalidade, utiliza-se como gene repórter o *URAC3*. Sendo assim, ao haver uma interação entre as duas proteínas (X e Y), o fator de transcrição DB-AD é reconstituído e isso permite que haja a expressão do gene *URAC3* e, conseqüentemente, a produção da proteína Ura3. Essa proteína catalisa a conversão do ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), presente no meio de crescimento da levedura, em 5-fluorouracil (5-FU), o qual por sua vez, é um componente tóxico, resultando em morte celular. Portanto, infere-se que, se houver morte celular, houve uma interação entre as proteínas; se não ocorrer interação entre elas, ocorre a sobrevivência das leveduras (Choi *et al.*, 2018).

Diferentemente, a modalidade de ensaio *Forward Y2H*, apesar de basear-se também no mesmo princípio de reconstituição de um fator de transcrição, utiliza o gene repórter *HIS3*. Quando esse gene é expresso, obtém-se o produto gênico imidazoleglicerol-fosfato desidratase, enzima que está envolvida na biossíntese da histidina, permitindo, dessa forma, que haja a biossíntese da histidina e, conseqüentemente, crescimento de levedura em meio sem histidina. Ou seja, infere-se que, havendo crescimento de levedura com meio sem histidina, houve uma interação entre as proteínas. Se houver a morte da levedura no meio sem histidina, não houve uma interação entre as proteínas (Choi *et al.*, 2018).

No entanto, a modalidade de ensaio *Forward 2YH* limita-se apenas às proteínas que se localizam no núcleo celular ou proteínas citoplasmáticas, para que haja a transcrição do gene repórter. A proteína de interesse do presente estudo, Cx26, possui localização na membrana plasmática (MP), o que inviabiliza o uso da modalidade *Forward 2YH*. Conseqüentemente, para proteínas que possuem localização distante do núcleo e/ou se localizam na MP, a modalidade do Duplo Híbrido de Membrana de Levedura (EDHML, também denominada *Split-ubiquitin Y2H*) permite que haja a detecção de suas redes PPI (Staglar *et al.*, 1998; Thaminy *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2018).

Em contraste com as duas modalidades já descritas, o EDHML baseia-se no princípio de reconstituição de dois fragmentos da proteína ubiquitina para detectar as interações entre as duas proteínas. A ubiquitina é uma proteína de apenas 76 resíduos cujo papel está relacionado com a marcação para degradação de outras proteínas. Comumente, ela liga-se à porção N-terminal das proteínas, sinalizando-as para sua degradação. A porção N-terminal ligada à ubiquitina é então reconhecida pela protease específica da ubiquitina (UBP) a qual cliva essa ligação, permitindo que a proteína seja degradada por proteassomos (Staglar *et al.*, 1998; Thaminy *et al.*, 2004; Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Choi *et al.*, 2018).

Sendo assim, no ensaio de EDHML utilizam-se dois fragmentos da ubiquitina, a porção Nub (abrangendo os resíduos de 1 ao 34) e Cub (abrangendo os resíduos de 35 ao 76). Infelizmente, ambos fragmentos se associam espontaneamente, impedindo, dessa forma, a análise de interações entre proteínas. Para isso, uma mutação pontual que resulta na substituição da Ile 13 por uma Gly no fragmento Nub (NubG) permite que essa associação deixe de ser espontânea e resulte em baixa afinidade entre os dois fragmentos. Sua associação passa a ocorrer apenas quando houver uma interação entre as duas proteínas, as “isca” e a “presa” (Staglar *et al.*, 1998; Thaminy *et al.*, 2004; Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Choi *et al.*, 2018).

Por conseguinte, a proteína denominada “isca”, aquela que se deseja analisar sua rede PPI, é ligada ao C-terminal da ubiquitina (Cub) e esta, por sua vez, se encontra associada à proteína repórter (contendo o domínio de ligação ao DNA, LexA, e o domínio de ativação transcricional, VP16). A proteína denominada “presa”, aquela que poderá interagir com a sua “isca”, é fundida ao N-terminal da ubiquitina (NubG). Quando houver uma interação entre a “isca” e a “presa”, os dois fragmentos de ubiquitina se associam, a protease UBP cliva a junção do último resíduo da ubiquitina com proteína repórter (a conformação do dobramento da ubiquitina é essencial para a clivagem), liberando a proteína repórter e permitindo que haja a transcrição do gene repórter, *HIS3*. O produto gênico, de forma semelhante, permite a biossíntese de histidina e confere à levedura capacidade de crescimento em um meio sem histidina (Figura 11). Os clones positivos, isto é, aqueles que cresceram em um meio sem histidina, são sequenciados e analisados para identificar as sequências que codificam as proteínas parceiras que se ligaram à “isca” no ensaio (Staglar *et al.*, 1998; Thaminy *et al.*, 2004; Ciechanover e Ben-Saadon, 2004; Choi *et al.*, 2018; Hybrigenics, 2021; Johnsson e Varshavsky, 1994a e 1994b).

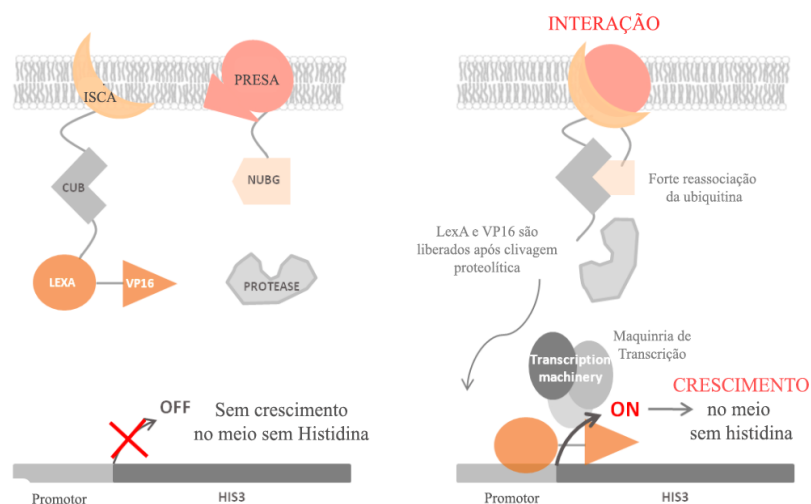


Figura 11. Interação entre as proteínas “isca” e “presa” no experimento de Duplo Híbrido de Membrana de Levedura. A “isca” encontra-se associada ao C-terminal do Cub e a “presa” encontra-se associada ao N-terminal do NubG. Na porção N-terminal do Cub estão associadas às proteínas repórteres LexA e VP16. Quando houver uma interação entre as duas proteínas, ocorre uma forte associação do Cub e NubG. A LexA e VP16 são liberados após clivagem proteolítica pela protease. As proteínas repórteres liberadas permitem que haja a transcrição do gene repórter e sobrevivência da levedura no meio sem histidina (Figura modificada de Hybrigenics, 2021).

Foi realizado anteriormente por demanda do nosso laboratório, um ensaio de duplo híbrido de membrana de levedura (EDHML) no sistema MBmate pela empresa Hybrigenics (Paris, França) em que se empregou a sequência codificadora completa do gene *GJB2* humano clonada no vetor pB112, produzindo a proteína de fusão N-STE2-CX26-Cub-LexA-VP16-C e uma biblioteca de cDNA de encéfalo fetal humano clonada em vetor pPR3N, com consequente expressão de proteínas de fusão do tipo N-STE2-presas-Nub. A triagem de cerca de 120 milhões de clones de cDNA expressando fragmentos de proteínas diversas, sob condições de elevada estringência (3-aminotriazol a 200 mM) e a expressão do gene repórter *HIS3* da levedura em meio sem histidina permitiu identificar clones contendo sequências de proteínas que interagiram com a Cx26. Esses dados requerem uma análise detalhada que potencialmente indica proteínas que interagem diretamente com a Cx26 na membrana biológica.

1.8 Proteínas parceiras da Cx26

Batissoco (2011) e Batissoco *et al.*, (2018), com objetivo de investigar proteínas que interagem com os dez resíduos terminais da cauda C-terminal citoplasmática da Cx26, realizaram ensaios de precipitação por afinidade seguidos de espectrometria de massa. Para a realização deste estudo, utilizaram o segmento do gene *Gjb2* de camundongo referente a

porção C-terminal para a produção de clones recombinantes contendo sequência que codificava uma proteína de fusão Cx26-GST que foi expressa em *Escherichia coli*. Identificaram por meio desse ensaio um total de 26 proteínas candidatas a estarem associadas a cauda C-terminal da Cx26, doze delas relacionadas a junções celulares ou do citoesqueleto, juntamente a outras 14 proteínas, dentre as quais, sete são proteínas da via secretora, quatro são proteínas mitocondriais, duas são proteínas chaperonas e uma é proteína relacionada ao transporte do citoplasma-núcleo.

Nesse estudo, verificaram por meio de co-imunoprecipitação, que as proteínas candidatas a interagir com o C-terminal da Cx26 também são passíveis de interagir com o C-terminal da conexina 30 (Cx30), da conexina 31 (Cx31) e da conexina 43 (Cx43), indicando que tais interações são independentes do comprimento do C-terminal e da sua sequência (Batissoco *et al.*, 2018), uma vez que a porção C-terminal possui a sequência de maior grau de diversidade dentre as conexinas (Laird, 2006; Maeda *et al.*, 2009). Não só isso, os resultados indicaram não ter sido identificada uma proteína específica que interaja diretamente com a Cx26, mas que as proteínas identificadas podem fazer parte de um complexo do qual a Cx26 é componente (Batissoco *et al.*, 2018).

A análise de PPI de uma proteína de interesse, a qual possui papel central em um fenótipo específico, permite-nos eventualmente elucidar uma via molecular ou um papel celular até então desconhecido. Como citado na seção “O papel da Cx26 na cóclea”, os estudos com camundongos *nocautes* condicionais para a expressão de Cx26 na cóclea (Liang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015a) nos fornecem fortes evidências que a reciclagem dos íons K⁺ e consequentemente, a degeneração de células ciliadas decorrente de uma possível interrupção dessa reciclagem, não são as principais causas da perda auditiva induzida pela falta da Cx26. Sendo assim, é relevante investigar e analisar as interações da Cx26 com outras macromoléculas, isto é, investigar a rede PPI da Cx26 e verificar se ela pode ter outros papéis na célula além dos classicamente relacionados à reciclagem de íons.

Uma vez verificado quais são as proteínas que possivelmente interagem com a Cx26, é extremamente importante e necessária a compreensão e investigação dessas proteínas a fim de compreendermos e analisarmos as interações da Cx26 com outras macromoléculas, a fim de investigar os diversos processos biológicos subjacentes à sua função, incluindo os relacionados à audição.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é analisar *in silico* as proteínas identificadas em associação à Cx26 por ensaio do duplo híbrido de membrana de levedura (EDHML), buscando contribuir para a compreensão do papel funcional da Cx26 na célula e, possivelmente, na fisiologia da audição, por meio do estudo da sua rede de interações proteína-proteína.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar sequências codificadoras identificadas por EDHML e avaliar a fase de leitura traducional e os domínios codificados.
- b) Classificar as proteínas por distribuição subcelular, expressão coclear e relevância funcional na audição, indicando genes candidatos a explicar a surdez hereditária.
- c) Evidenciar as proteínas mitocondriais que interagem com a Cx26 e verificar se há embasamento experimental e na literatura para a hipótese de que a Cx26 possa se localizar na mitocôndria.

3. CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise *in silico* das proteínas identificadas em associação à Cx26 pelo ensaio de Duplo Híbrido de Membrana de Levedura (EDHML) a fim de contribuir para compreensão do papel funcional da Cx26 na célula e, possivelmente na fisiologia da audição, por meio da sua rede de interação proteína-proteína.

Neste trabalho, avaliamos 161 clones recuperados do EDHML por interação direta com a Cx26, tendo sido identificadas 45 proteínas únicas, cujas sequências codificadoras estavam em fase de leitura traducional. Dessas 45 proteínas, somente três (produtos gênicos de *EBP*, *ERGIC3* e *TTYHI*) haviam sido mencionadas em estudos prévios sobre interação proteína-proteína com a Conexina 26. Dentre as 45 proteínas, 39 apresentam domínios transmembrânicos no domínio de interação (SID) e 39 eram proteínas de membranas. Além disso, 27 possuem o SID hidrofóbicos, sendo que 26 possuem domínios transmembrânicos.

Das 45 proteínas, nove proteínas foram descritas como localizadas na mitocôndrias, no entanto, destacam-se duas (produtos gênicos de *TSPO* e *FUNDC2*) com localização somente documentada na mitocôndria e escore **D**, evidência moderada de interação. Além disso, das 45 proteínas, 12 caracterizam-se como transportadores de pequenas moléculas e 31 proteínas pertencem à via secretora. Dos 45 genes/produtos, 42 possuem expressão coclear ou na orelha interna documentada. Três (produtos gênicos de *DADI*, *ACKR1* e *TVP23C*) eram codificadas por genes com localização cromossômica próxima ou dentro de lócus de surdez previamente mapeados. Após a classificação hierárquica, destacaram-se as 25 proteínas com maior relevância para estudos sobre fisiologia da audição e da perda auditiva.

4. REFERÊNCIAS

- Aasen, T., Johnstone, S., Vidal-Brime, L., Lynn, K. S., e Koval, M. (2018). Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1296. <https://doi.org/10.3390/ijms19051296>
- Alfonso, J., Fernández, M. E., Cooper, B., Flugge, G., & Frasch, A. C. (2005). The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17196–17201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504262102>.
- AlphaFold. Protein Structure Database. Disponível em: <<https://alphafold.ebi.ac.uk>>. Acessado em: jun de 2021.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J. *et al.* (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29 . <https://doi.org/10.1038/75556>
- Barbierato, M., Argentini, C., Skaper, S. D. (2012) Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells. *Methods Mol Biol.* 2012;846:235-46.
- Bao, X., Chen, Y., Reuss, L., e Altenberg, G. A. (2004). Functional expression in *Xenopus* oocytes of gap-junctional hemichannels formed by a cysteine-less connexin 43. *The Journal of biological chemistry*, 279(11), 9689–9692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311438200>.
- Batissoco, A., Salazar-Silva, R., Oiticica, J., Bento, R. E, Mingroni-Netto, R. C., Haddad, L. A. (2018) A Cell Junctional Protein Network Associated with Connexin-26. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2535.
- Batissoco, A. C. A conexina 26 e sua relação com outras proteínas no órgão de Corti. 2011. 181 p. Dissertação (Doutorado em Biologia/Genética) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- Beyer, E. C. e Berthoud, V. M. (2018) Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta.* 2018 January; 1860(1): 5–8. doi:10.1016/j.bbamem.2017.05.016.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54

- Boengler, K.; Dodoni G.; Rodriguez-Sinovas, A.; Cabestrero A.; Ruiz-Meana, M.; Gres, P.; Konietzka, I.; Lopez-Iglesias, C.; Garcia-Dorado, D.; Di Lisa, F.; Heusch, G.; Schulz, R. (2005) Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research*, Volume 67, Issue 2, August 2005, Pages 234–244.
- Bruzzone, R., White, T. W., Paul, D. L. (1996) Connections with connexins : the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1-27.
- Bruzzone, R.; Veronesi, V.; Bicego, M.; Duval, N.; Marlin S.; Petit, C; D'Andrea, P; White, T. W. (2003) Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Letters* 533 (2003) 79–88.
- Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE, the Mouse Genome Database Group. (2019). Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan. 8;47 (D1): D801–D806.
- Chen, J.; Chen, J.; Zhu, Y.; Liang, C.; Zhao, H. (2014) Deafness induced by Connexin26 (GJB2) deficiency is not determined by endocochlear potential (EP) reduction but is associated with cochlear developmental disorders. *Biochem Biophys Res Commun.* 448(1): 28–32. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.016.
- Chen, S., Xu, K., Xie, L., Cao, H. Y., Wu, X., Du, A. N., He, Z. H., Lin, X., Sun, Y., & Kong, W. J. (2018). The spatial distribution pattern of Connexin26 expression in supporting cells and its role in outer hair cell survival. *Cell death & disease*, 9(12), 1180. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1238-x>.
- Choi, S. G., Richardson, A., Lambourne, L., Hill, D. E., e Vidal, M. (2018). Protein Interactomics by Two-Hybrid Methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1794, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7871-7_1.
- Comsa, S., Cimpean, A. M., Raica M. (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 35: 3147-3154.
- Corver, J., Broer, R., van Kasteren, P., & Spaan, W. (2007). GxxxG motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein transmembrane domain is not involved in trimerization and is not important for entry. *Journal of virology*, 81(15), 8352–8355. <https://doi.org/10.1128/JVI.00014-07>.
- Crosara, K., Moffa, E. B., Xiao, Y., & Siqueira, W. L. (2018). Merging in-silico and in vitro salivary protein complex partners using the STRING database: A tutorial. *Journal of proteomics*, 171, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.08.002>

- Cruz, D. B. (2016). Expressão das Conexinas em Células-Tronco da Polpa Dentária. Dissertação (Mestrado em Biologia/Genética) - Universidade de São Paulo.
- Dahl, G., Levine, E., Rabadan-Diehl, C., and Werner, R. (1991). Cell/cell channel formation involves disulfide exchange. *Eur. J. Biochem.* 197, 141–144. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15892.x
- Darryl N. A view from the web Biocarta (2001). Biotech Software & Internet Report Vol. 2, No. 3. doi.org/10.1089/152791601750294344.
- Das, S., Smith, T. D., Sarma, J. D., Ritzenthaler, J. D., Maza, J., Kaplan, B. E., Cunningham, L. A., Suaud, L., Hubbard, M. J., Rubenstein, R. C., e Koval, M. (2009). ERp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*, 20(10), 2593–2604.
- Del Castillo, F. J., e Del Castillo, I. (2017). DFNB1 Non-syndromic Hearing Impairment: Diversity of Mutations and Associated Phenotypes. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 428. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00428>
- Denuc, A., Núñez, E., Calvo, E., Loureiro, M., Miro-Casas, E., Guarás, A., Vázquez, J., & Garcia-Dorado, D. (2016). New protein-protein interactions of mitochondrial connexin 43 in mouse heart. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(5), 794–803. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12792>.
- Driver, E. C., e Kelley, M. W. (2020). Development of the cochlea. *Development* (Cambridge, England), 147(12), dev162263. <https://doi.org/10.1242/dev.162263>.
- Dror, A. A. e Avraham, K. B. (2010) Hearing Impairment: A Panoply of Genes and Functions. *Neuron* 68, October 21, 2010. DOI 10.1016/j.neuron.2010.10.011.
- Esseltine, J. L, Laird D. W. (2016) Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends in Cell Biology*, December 2016, Vol. 26, No. 12
- Estivill, X., Govea, N., Barceló, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzri, R., D'Urbano, L., Zeviani, M., & Torroni, A. (1998). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *American journal of human genetics*, 62(1), 27–35. <https://doi.org/10.1086/301676>
- Evans, D. M., & Cardon, L. R. (2004). Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *American journal of human genetics*, 75(4), 687–692. <https://doi.org/10.1086/424696>

- F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J.B. Williams, E.F. Meyer Jr., M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112: 535-542.
- Falk, M. M., Buehler, L. K., Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *The EMBO journal*, 16(10), 2703–2716.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N., Nevill, G. (2003) Gap Junctions in the Inner Ear: Comparison of Distribution Patterns in Different Vertebrates and Assesment of Connexin Composition in Mammals. *The Journal of Comparative Neurology* 467:207–231.
- Fowler, S. L., Akins, M., Zhou, H., Figeys, D., & Bennett, S. A. (2013). The liver connexin32 interactome is a novel plasma membrane-mitochondrial signaling nexus. *Journal of proteome research*, 12(6), 2597–2610. <https://doi.org/10.1021/pr301166p>.
- García-Vega, L., O’Shaughnessy, E. M., Jan, A., Bartholomew, C., Martin, P. E. (2019) Connexin 26 and 43 play a role in regulating proinflammatory events in the epidermis. *J Cell Physiol.* 2019;1–13.
- Glick, B. S. (1995) Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 1995, 260, 224–31.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2011) *Tratado de fisiologia médica*. 12^a ed. rio de janeiro, elsevier ed., 2011.
- Guilford, P.; Arab, S. B.; Blanchard, S.; Levilliers, J.; Weissenbach, J.; Belkahia, A.; Petit, C. (1994) A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics* volume 6 january.
- Guo, R., Si, R., Scott, B. T., & Makino, A. (2017). Mitochondrial connexin40 regulates mitochondrial calcium uptake in coronary endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 312(4), C398–C406. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2016>.
- Hauet, T., Yao, Z. X., Bose, H. S., Wall, C. T., Han, Z., Li, W., Hales, D. B., Miller, W. L., Culty, M., & Papadopoulos, V. (2005). Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 19(2), 540–554. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0307>.

- Hertzano, R., Elkon, R., Kurima, K., Morrisson, A., Chan, S. L., Sallin, M., Biedlingmaier, A., Darling, D. S., Griffith, A. J., Eisenman, D. J., & Strome, S. E. (2011). Cell type-specific transcriptome analysis reveals a major role for Zeb1 and miR-200b in mouse inner ear morphogenesis. *PLoS genetics*, 7(9), e1002309. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002309>.
- Hirata, T., Fujita, M., Nakamura, S., Gotoh, K., Motooka, D., Murakami, Y., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2015). Post-Golgi anterograde transport requires GARP-dependent endosome-to-TGN retrograde transport. *Molecular biology of the cell*, 26(17), 3071–3084. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1568>
- Hong, S. H., Chang, S. H., Cho, K. C., Kim, S., Park, S., Lee, A. Y., Jiang, H. L., Kim, H. J., Lee, S., Yu, K. N., Seo, H. W., Chae, C., Kim, K. P., Park, J., & Cho, M. H. (2016). Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 knockdown suppresses lung cancer through endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Oncotarget*, 7(40), 65335–65347. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11678>.
- Hybrigenics (2021). Acesso em: 02 mar 2021. Disponível em: <<https://www.hybrigenics-services.com/contents/our-services/interaction-discovery/mbmat-e-y2h-membrane-yeast-two-hybrid-v2>>.
- Jagger, D. J., Forge, A. (2015) Connexins and gap junctions in the inner ear – it’s not just about K⁺ recycling. *Cell Tissue Res* 360:633–644.
- Jara, O., Acuña, R., García, I. E., Maripillán, J., Figueroa, V., Sáez, J. C., Araya-Secchi, R., Lagos, C. F., Pérez-Acle, T., Berthoud, V. M., Beyer, E. C., & Martínez, A. D. (2012). Critical role of the first transmembrane domain of Cx26 in regulating oligomerization and function. *Molecular biology of the cell*, 23(17), 3299–3311. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1058>.
- Johnsson, N., & Varshavsky, A. (1994a). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10340–10344. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10340>.
- Johnsson, N., & Varshavsky, A. (1994b). Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *The EMBO journal*, 13(11), 2686–2698. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06559.x>.
- Jumper, J *et al.* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2013) *Histologia Básica*. 12a ed. Rio de Janeiro: Ed. GEN Guanabara Koogan S.A. 2013, 524p.

- Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M. (2022) KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Science* 2022; 31:47-53. doi: 10.1002/pro.4172.
- Kelsell, D. P.; Dunlop, J.; Stevens, H. P.; Lench, N. J.; Liang, J. N.; Mueller, R. F.; Parry G.; Leigh, I. M. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, vol. 387.
- Kelly, J. J.; Simek J.; Laird, D. W. (2015) Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. *Cell Tissue Res* 360:701–721
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., Leigh, I. M. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, vol 387 1May 1997.
- Kemperman, M. H., Hoefsloot, L. H., Cremers, C. W. R. J. (2002) Hearing loss and connexin 26. *J R Soc Med* 2002; 95:171±177.
- Kenmeson, A.; Braun, K. V. N.; Boyle, C. (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. July/August 2002 Vol. 4 No. 4. DOI: 10.1097/01.GIM.0000020750.60733.CA.
- Kent, WJ.; Sugnet, CW.; Furey, TS.; Roskin, KM.; Pringle, TH.; Zahler, AM.; Haussler, D. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.
- Koval, M. (2006) Pathways and control of connexin oligomerization. *TRENDS in Cell Biology* Vol.16 No.3 March 2006.
- Krupke DM, Begley DA, Sundberg JP, Richardson JE, Neuhauser SB, Bult CJ. The Mouse Tumor Biology Database: A Comprehensive Resource for Mouse Models of Human Cancer. *Cancer Res.* 2017 Nov 1;77(21):e67-e70.
- Laird, D. W. (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* (2006) 394, 527–543 (Printed in Great Britain)
- Laird, D. W.; Lampe P. D and Johnson R. G. (2015) Neighboring cells exchange molecular information through channels that can lead to disorders ranging from hearing loss to heart disease. *Scientific American*, May 2015
- Laird, D. W. e Lampe, P. D. (2018) Therapeutic strategies targeting connexins. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(12), 905–921.
- Laird, D. W.; Puranam, K. L.; Revel, J. P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *The Biochemical journal*, 273(Pt 1)(Pt 1), 67–72.
- Landegger, L. D., Vasilijic, S., Fujita, T., Soares, V. Y., Seist, R., Xu, L., & Stankovic, K. M. (2019). Cytokine Levels in Inner Ear Fluid of Young and Aged Mice as Molecular

- Biomarkers of Noise-Induced Hearing Loss. *Frontiers in neurology*, 10, 977. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00977>.
- Lauf, U., Giepmans, B. N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., & Falk, M. M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10446–10451.
- Lefebvre, P.P. e Van De Water, T. R. (2000) Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Research Reviews* 32. 159–162.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., & Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic acids research*, 47(W1), W199–W205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
- Liang, C.; Zhu, Y.; Zang, L.; Lu, G.; Zhao, H. (2012) Cell degeneration is not a primary cause for Connexin26 (GJB2) deficiency associated hearing loss. *Neurosci Lett*. 2012 October 18; 528(1): 36–41. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.085.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, 458(7238), 597–602. doi.org/10.1038/nature07869.
- Matthews, C. A., Shaw, J. E., Hooper, J. A., Young, I. G., Crouch, M. F., & Campbell, H. D. (2007). Expression and evolution of the mammalian brain gene *Ttyh1*. *Journal of neurochemistry*, 100(3), 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04237.x>
- Maza, J., Das Sarma, J., e Koval, M. (2005). Defining a minimal motif required to prevent connexin oligomerization in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 280(22), 21115–21121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412612200>.
- McKenna M. C. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research*, 85(15), 3347–3358. <https://doi.org/10.1002/jnr.21444>.
- Michibata, H., Okuno, T., Konishi, N., Kyono, K., Wakimoto, K., Aoki, K., Kondo, Y., Takata, K., Kitamura, Y., e Taniguchi, T. (2009). Human GPM6A is associated with differentiation and neuronal migration of neurons derived from human embryonic stem cells. *Stem cells and development*, 18(4), 629–639. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0215>.
- Musil, L. S., & Goodenough, D. A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74(6), 1065–1077.

- Moore, D. T., Berger, B. W., & DeGrado, W. F. (2008). Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure* (London, England : 1993), 16(7), 991–1001. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.05.007>.
- Moscato, S., Cabiati, M., Bianchi, F., Vaglini, F., Morales, M. A., Burchielli, S., Botta, L., Sabbatini, A., Falleni, A., Del Ry, S., & Mattii, L. (2018). Connexin 26 Expression in Mammalian Cardiomyocytes. *Scientific reports*, 8(1), 13975. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32405-2>.
- NCBI Resource Coordinators. (2015). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 2015, Vol 44, Database issue D7-D19. doi: 10.1093/nar/gkv1290.
- National Center for Biotechnology Information (US) . NCBI Help Manual [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3831/>>.
- Nicolas, M. T., Barhanin, J., Reyes, R., & Demêmes, D. (2003). Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. *Hearing research*, 181(1-2), 20–26. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(03\)00162-x](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(03)00162-x)
- Oliveira, L., Abiko, L., Salinas, R. (2017). Ressonância magnética nuclear das proteínas. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), (2021). Disponível em: <<https://omim.org/>>. Acessado em: setembro de 2021.
- PDB. Protein Data Bank. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acessado em: jun de 2021.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. Oct;25(13):1605-12.
- Petersen, MB. (2002) Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet* 2002: 62: 1–13.
- Petersen, MB. e PJ, W. (2006) Non-syndromic autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006: 69: 371–392
- Pujol, R.; Réclar-Enjalbert, V.; Pujol, T. (2011). Promenade round the cochlea. World Wide Web. Disponível em: :<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/english/index.htm>. Acesso em: Abril 2020.

- Račkauskas, M., Neverauskas, V., Skeberdis, V. A. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*; 46(1).
- Rahman, S., e Evans, W. H. (1991). Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. *Journal of cell science*, 100 (Pt 3), 567–578.
- Rahman, S., Carlile, G., & Evans, W. H. (1993). Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry*, 268(2), 1260–1265.
- Reisinger, E., Meintrup, D., Oliver, D., & Fakler, B. (2010). Gene expression associated with the onset of hearing detected by differential display in rat organ of Corti. *European journal of human genetics : EJHG*, 18(12), 1327–1332. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.111>.
- Retamal, MA., García, IE., Pinto, BI., Pupo, A., Báez, D., Stehberg, J., Del Rio, R. e González, C. (2016). Extracellular Cysteine in Connexins: Role as Redox Sensors. *Front. Physiol.* 7:1. doi: 10.3389/fphys.2016.00001
- Rodriguez-Sinovas, A., Boengler K., Cabestrero, A., Gress, P., Morente, M., Ruiz-Meana, M., Konietzka, I., Miró, E., Totzeck, A., Heusch, G., Schulz, R., Garcia-Dorado, D. (2006) Translocation of Connexin 43 to the Inner Mitochondrial Membrane of Cardiomyocytes Through the Heat Shock Protein 90–Dependent TOM Pathway and Its Importance for Cardioprotection. *Circ Res.* 2006;99:93-101.
- Sampaio, A. L. L., De Oliveira, C. A. C. P. Estrutura e ultra-estrutura da orelha interna dos mamíferos com ênfase na cóclea. *Arq Int Otorrinolaringol*, v. 10, n. 3, p. 228-240, 2006.
- Serebriiskii I, Estojak J, Berman M, Golemis EA. Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques*. 2000 Feb;28(2):328-30, 332-6. doi: 10.2144/00282rr03. PMID: 10683744.
- Séverine Duvaud, Chiara Gabella, Frédérique Lisacek, Heinz Stockinger, Vassilios Ioannidis, Christine Durinx;Expaty, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 2021. DOI: 10.1093/nar/gks225.
- Shen J, Scheffer DI, Kwan KY, Corey DP. SHIELD: an integrative gene expression database for inner ear research. *Database (Oxford)*. 2015. doi: 10.1093/database/bav071. (PMID: 26209310).
- Shin, J., Crook, O. M., Borgeaud, A. C., Cattin-Ortolá, J., Peak-Chew, S. Y., Breckels, L. M., Gillingham, A. K., Chadwick, J., Lilley, K. S., & Munro, S. (2020). Spatial proteomics

- defines the content of trafficking vesicles captured by golgin tethers. *Nature communications*, 11(1), 5987. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19840-4>.
- Smeti, I., Savary, E., Capelle, V., Hugnot, J. P., Uziel, A., & Zine, A. (2011). Expression of candidate markers for stem/progenitor cells in the inner ears of developing and adult GFAP and nestin promoter-GFP transgenic mice. *Gene expression patterns : GEP*, 11(1-2), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.08.008>.
- Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., Smith, R. JH. (2017). Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*.
- Smith, T. D., Mohankumar, A., Minogue, P. J., Beyer, E. C., Berthoud, V. M., e Koval, M. (2012). Cytoplasmic amino acids within the membrane interface region influence connexin oligomerization. *The Journal of membrane biology*, 245(5-6), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9443-5>.
- Smith CM, Hayamizu TF, Finger JH, Bello SM, McCright IJ, Xu J, Baldarelli RM, Beal JS, Campbell JW, Corbani LE, Frost PJ, Lewis, JR, Giannatto SC, Miers DB, Shaw DR, Kadin JA, Richardson JE, Smith CL, Ringwald M. (2019). The mouse Gene Expression Database (GXD): 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan. 8;47 (D1): D774–D779.
- Snider, J., Kittanakom, S., Curak, J., & Stagljar, I. (2010). Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: a powerful tool for identifying protein-protein interactions. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (36), 1698. <https://doi.org/10.3791/1698>.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., & Heesen, S. (1998). A Genetic System Based on Split-Ubiquitin for the Analysis of Interactions between Membrane Proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5187-5192. Retrieved August 17, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/44689>.
- Strausberg, R. L., Buetow, K. H., Emmert-Buck, M. R., & Klausner, R. D. (2000). The cancer genome anatomy project: building an annotated gene index. *Trends in genetics : TIG*, 16(3), 103–106. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01937-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01937-x)
- Spray, D. C., Ye ZC., Ransom, B. R. (2006) Functional Connexin “Hemichannels”: A Critical Appraisal. *GLIA* 54:758–773.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10, 173–180. doi: 10.1080/cac.10.4-6.173.180.
- Sohl G.; Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 62 228– 232.

- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Taketani, S., Kohno, H., Okuda, M., Furukawa, T., & Tokunaga, R. (1994). Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors during differentiation of mouse erythroleukemia cells. A possible involvement of these receptors in heme biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 269(10), 7527–7531.
- Taylor, S. C. and Posch, A. (2014) The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 361590.
- Thaminy S., Miller J., Stagljar I. (2004) The Split-Ubiquitin Membrane-Based Yeast Two-Hybrid System. In: Fu H. (eds) *Protein-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology*, vol 261. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:297>.
- The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine. *Nucleic Acids Res.* Jan 2021;49(D1):D325-D334
- The Human Protein Atlas (2022). Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org>> . Acessado em: setembro de 2021.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49:D1 (2021).
- Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedeszko, C., Walton, P., & Laird, D. W. (2005). Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *Journal of cell science*, 118(Pt 19), 4451–4462.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em: <<https://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso em: setembro de 2021.
- Varadi, M *et al.* (2021) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*.
- Verselis, V. K. Connexin hemichannels and cochlear function. (2017) *Neuroscience Letters*. S0304-3940(17)30754-1.
- Wan G., Corfas G., Stone, J. (2013) Inner ear supporting cells: Rethinking the silent majority. *Semin Cell Dev Biol.* May ; 24(5): 448–459

- Wang, Y., Mehta, P. P., & Rose, B. (1995). Inhibition of glycosylation induces formation of open connexin-43 cell-to-cell channels and phosphorylation and triton X-100 insolubility of connexin-43. *The Journal of biological chemistry*, 270(44), 26581–26585. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.44.26581>.
- White, T.W. et al. (1995) Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell* 6, 459–470.
- Willems, P. J. (2000) Genetic causes of hearing loss. *Mechanisms of Disease*. Volume 342 Number 15
- Wilming, L. G., Gilbert, J. G., Howe, K., Trevanion, S., Hubbard, T., & Harrow, J. L. (2008). The vertebrate genome annotation (Vega) database. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D753–D760. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm987>
- Wingard, J. C.; Zhao, H-B. (2015) Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation- induced hearing loss – a common hereditary deafness. *Frontiers in Cellular Neuroscience* May 2015 | Volume 9 | Article 202.
- Xia, J.; Liu, C.; Tang, B.; Pan, Q.; Huang, L.; Dai, H.; Zhang, B.; Xie, W.; Hu, D.; Zheng, D.; Shi, X.; Wang, D.; Xia, K.; Yu, K.; Liao, X.; Feng, Y.; Yang, Y.; Xiao, J.; Xie, D.; Huang, J. (1998) Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature genetics* volume 20 december 1998.
- Yeager, M., e Nicholson, B. J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Current opinion in structural biology*, 6(2), 183–192. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(96\)80073-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(96)80073-x)
- Yoo, W., Cho, E. B., Kim, S., & Yoon, J. B. (2019). The E3 ubiquitin ligase MARCH2 regulates ERGIC3-dependent trafficking of secretory proteins. *The Journal of biological chemistry*, 294(28), 10900–10912. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007435>.
- Zelante, L.; Gasparini, P.; Estivill, X.; Melchionda, S.; D’Agruma, L.; Govea, N.; Milá, M.; Monica, M. D.; Lutfi, J.; Shohat, M.; Mansfield, E.; Delgrosso, K.; Rappaport, E.; Surrey, S.; Fortina, P. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*, 1997, Vol. 6, No. 9 1605–1609.
- Zhang, B., Kirov, S., & Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research*, 33(Web Server issue), W741–W748. <https://doi.org/10.1093/nar/gki475>

- Zhang, Y., Wang, X., Wang, Q., Ge, H., Tao, L. (2016) Propofol depresses cisplatin cytotoxicity via the inhibition of gap junctions. *Molecular Medicine Reports* 13: 4715-4720.
- Zhang, Y., Tang, W., Ahmad, S., Sipp, J. A., Chen, P., & Lin, X. (2005). Gap junction-mediated intercellular biochemical coupling in cochlear supporting cells is required for normal cochlear functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15201–15206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501859102>.
- Zhao, H. (2017) Hypothesis of K⁺-Recycling defects is not a primary deafness mechanism for Cx26 (GJB2) deficiency. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. May 2017 | Volume 10 | Article 162.
- Zhu, Y.; Chen, J., Liang, C., Zong, L., Chen J., Jones R. O., Zhao H. (2015a) Connexin26 (GJB2) deficiency reduces active cochlear amplification leading to late-onset hearing loss. *Neuroscience*. 2015 January 22; 0: 719–729.
- Zhu, Y.; Zona, L.; Mei, L.; Zhao, H. (2015b) Connexin26 gap junction mediates miRNA intercellular genetic communication in the cochlea and is required for inner ear development. *Sci. Rep.* 5:15647. doi: 10.1038/srep15647.