



Cinvestav

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Los organelos relacionados a los lisosomas funcionan como
almacenes de zinc en *Drosophila melanogaster*”**

Tesis que presenta:

Ing. Bt. Carlos Alberto Tejeda Guzmán

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Fisiología Celular y Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Fanis Missirlis

México, D.F.

Agosto, 2015

Agradecimientos

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No. 299627 durante el período de septiembre del 2013 a agosto del 2015 para la realización de mis estudios de maestría que concluyen con esta tesis, como producto final de la Maestría en Fisiología Celular y Molecular en el CINVESTAV.

Agradecimientos

Quiero agradecerle a mi director de tesis, el Dr. Fanis Missirlis, por compartirme sus experiencias de vida que seguramente me ayudarán a tomar buenas elecciones futuras, por transmitirme los conocimientos que me sirvieron para desarrollar este proyecto y sobre todo por su paciencia para esperar a que este trabajo se fuera integrando poco a poco y pudiera llegar a su fin.

Les agradezco a mis asesores, la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel y al Dr. José Luis Reyes Sánchez, por brindarme los comentarios precisos que me ayudaron a conducir el proyecto de la mejor manera posible, así como por el tiempo que dedicaron para revisarlo, a pesar de las actividades que los ocupan.

Les agradezco a mis compañeros de laboratorio Johana, Dashi, David y Gonzalo por todos los momentos divertidos que vivimos, por las experiencias que compartimos y por el conocimiento que nos brindamos en los múltiples seminarios del laboratorio.

Agradezco a la auxiliar del laboratorio Beatriz Osorio Carranza por su ayuda con la cuantificación de metales y por compartir su conocimiento acerca del desarrollo de las técnicas en el laboratorio. Así mismo, deseo darle las gracias a Benjamín Muñoz Ramírez, técnico del laboratorio, por su apoyo con la elaboración de la comida para las moscas.

*“El arte supremo del maestro es despertar la alegría en
la expresión creativa y el conocimiento”
Albert Einstein*

Dedicatoria

Quiero dedicarle este esfuerzo a toda mi familia porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A mi madre por ser la parte más importante de mi vida y por estar pendiente de mí a pesar de la distancia.

A mis abuelitos, Tere y Toño, que siempre me han apoyado y siempre están en mis pensamientos.

A mi hermana Paola y mi hermano Toño porque con su simple presencia hacen maravillosa la estancia en este mundo.

A Armando, la pareja de mi mamá, por lo que hemos aprendido uno del otro en lo que va de este tiempo compartido.

A mis mejores amigos, mis hermanos del alma y del corazón Belem, Saúl, Julio, Carmen y José Luis con los que camino hombro a hombro y con los que quiero comerme al mundo.

A David, mi actual compañero de vida, con el que he vivido todo este proceso de aprendizajes y con el cual sigo aprendiendo día a día.

Al resto de mis amigos y amigas, con los que comparto este mundo y este tiempo, que no menciono aquí pero que frecuentemente están en mis pensamientos, haciendo esta vida especial y divertida.

*“La imaginación es más importante que el conocimiento.
El conocimiento es limitado, mientras que la imaginación
rodea al mundo entero...”
Albert Einstein*

**“Los organelos relacionados a los lisosomas
funcionan como almacenes de zinc en
Drosophila melanogaster”**

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
El papel biológico del zinc.....	13
El transporte celular de zinc.....	14
Los LROs como sitios de almacenamiento de zinc.....	15
Los complejos AP	16
El Síndrome Hermansky-Pudlak (HPS)	19
Los complejos BLOCs.....	20
Las proteínas Rab.....	21
Desarrollo de los gránulos pigmentarios en <i>Drosophila melanogaster</i>	22
El complejo AP-3 participa en la formación de los gránulos pigmentarios de <i>Drosophila</i>	23
Los túbulos Malpighianos.....	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
METODOLOGÍA.....	28
Mantenimiento de los stocks.....	28
Espectrometría de absorción atómica.....	29
Análisis del desarrollo	29
Tinción con FluoZin-3 <i>in vivo</i>	29
RT-PCR	30
RESULTADOS.....	31
El complejo AP-3 está involucrado en la homeostasis del zinc.....	31
Las bajas o altas concentraciones de zinc dietético no afectan el desarrollo y la sobrevivencia de la mosca <i>carmine</i> (μ 3).....	33
La mosca <i>carmine</i> (μ 3) induce la expresión de las metalotioneínas.....	34
Los gránulos pigmentarios de los túbulos Malpighianos contienen zinc	35
Las mutantes <i>pink</i> (HPS5) y <i>lightoid</i> (Rab32) también carecen de LROs y tienen bajas concentraciones de zinc.	37

DISCUSIÓN	38
La formación de los LROs a través del tráfico vesicular	38
Los LROs son un sitio de almacenamiento de zinc	39
La carencia de LROs en la mutante <i>carmine</i> ($\mu 3$) se reemplaza con la inducción de metalotioneínas.....	40
La carencia de LROs en la mutante <i>carmine</i> no afecta la sobrevivencia de las moscas en bajas o altas concentraciones de zinc dietético	40
Otros mutantes en la vía de formación de los LROs también disminuyen la concentración de zinc en la mosca completa.....	41
Implicaciones en el síndrome Hermansky-Pudlak	41
El papel de Rab32 en el tráfico vesicular	41
Una observación que puede explicar porque la mosca <i>clot</i> tiene niveles de zinc más altos que la mosca silvestre	42
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Homeostasis del zinc celular..	14
Figura 2. Organelos relacionados a los lisosomas con alto contenido de zinc....	15
Figura 3. Diagrama de los complejos AP.....	17
Figura 4. Localización y tráfico de los complejos AP.....	18
Figura 5. Productos de genes afectados en el Síndrome Hermansky-Pudlak.....	20
Figura 6. Tipos de gránulos pigmentarios en la retina de <i>Drosophila</i>	22
Figura 7. Análisis de los gránulos pigmentarios en las moscas silvestres y mutantes en las subunidades del complejo AP-3..	24
Figura 8. Túbulos Malpighianos de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Figura 9. Genotipo y fenotipo ocular de la mosca silvestre y de las moscas mutantes para las subunidades del complejo AP-3, la subunidad HPS-5 de BLOC-2, la Rab32 y la tiorredoxina.	28
Figura 10. Concentración de zinc y hierro en las moscas que carecen de las subunidades del complejo AP-3.....	31
Figura 11. Efecto de la concentración de zinc en moscas alojadas en dietas control, TPEN (200 µM) y (zinc 1 mM).....	32
Figura 12. Efecto de la dieta y el genotipo en el desarrollo de <i>Drosophila</i>	33
Figura 13. Inducción de la expresión de las metalotioneínas en moscas desarrolladas en dietas con 1 mM de zinc..	34
Figura 14. Túbulos Malpighianos de larva de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	35
Figura 15. Imágenes de fluorescencia de los túbulos Malpighianos de las larvas silvestres de <i>Drosophila melanogaster</i> incubados con FluoZin-3.....	36
Figura 16. Concentración de zinc y hierro en las moscas mutantes <i>pink</i> (subunidad HPS5 del complejo BLOC-2), <i>lightoid</i> (Rab32) y <i>clot</i> (tiorredoxina)..	37

RESUMEN

El zinc es un elemento de importancia biológica ya que participa en la actividad enzimática de una gran variedad de proteínas y en procesos como la transcripción del ADN, la remodelación de la matriz extracelular y la correcta cristalización de la insulina, entre otros. Sus mecanismos de regulación incluyen a las metalotioneínas que se unen directamente al zinc citosólico y a los transportadores de zinc que se encargan de moverlo a lo largo de la célula. Se sabe que los gránulos de insulina en las islas pancreáticas y las vesículas pre-sinápticas de las neuronas glutamatérgicas en el hipocampo contienen altas concentraciones de zinc. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se encontraron unos gránulos intestinales que contienen grandes cantidades de este metal y en *Drosophila hydei* se describieron unas vesículas con alto contenido de zinc en los túbulos Malpighianos, tejido que en los insectos se encarga de la homeostasis iónica de la hemolinfa mediante la excreción de iones en el lumen del intestino. Las vesículas y gránulos antes mencionados, son conocidos como organelos relacionados a los lisosomas (LROs) debido a que comparten características con los lisosomas. El proceso de formación de los LROs se da por la participación de la proteína adaptadora AP-3, de los complejos proteicos para la biogénesis de los LROs BLOC-1,-2,-3, y de las proteínas G monoméricas Rab32 y Rab38. En este proyecto se investiga, la función de los LROs en el almacenamiento del zinc utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo. Para lograrlo se emplearon cepas de moscas mutantes en tres subunidades del complejo AP-3, en una de BLOC-2 y en la Rab32. Mediante espectrometría de absorción atómica, se cuantificó el contenido de zinc en las moscas mutantes. Adicionalmente, se estudió el desarrollo y la progenie de las mismas, así como el nivel de expresión de las metalotioneínas mediante la reacción en cadena de la polimerasa de tiempo final. Finalmente, los túbulos Malpighianos e intestino se incubaron con una molécula que fluoresce al quelar el zinc (FluoZin-3) para evaluar la localización del zinc intracelular en estos tejidos. El resultado mostró que las moscas mutantes en AP-3, en Rab32 y en la subunidad HPS5 de BLOC-2 tienen bajas concentraciones de zinc. Se ubicó a los LROs que contienen zinc

dentro de los túbulos Malpighianos de la mosca silvestre, pero no así en la mosca mutante en la subunidad $\mu 3$ de AP-3 (*carmine*). La carencia de LROs no afectó el desarrollo ni la progenie de las moscas crecidas en dietas con diferente contenido de zinc. Sin embargo, en la cepa *carmine* se observó que se indujo la expresión de las metalotioneína A en las moscas que recibieron la dieta normal. Esto revela la manera como se regula el exceso de zinc en la ausencia de los LROs. Con estas evidencias proponemos que los LROs o gránulos pigmentarios son un sitio de almacenamiento de zinc en *Drosophila melanogaster* que funciona en paralelo con las metalotioneínas.

ABSTRACT

Zinc is an important biological element that participates in the enzymatic activity of a variety of proteins and processes such as DNA transcription, extracellular matrix remodelling and the crystallization of insulin, amongst others. The mechanisms of zinc regulation involve the direct binding of cytosolic zinc to metallothioneins and to zinc transporters which are responsible for the intracellular movement of zinc. It is known that insulin granules of pancreatic islets and the pre-synaptic vesicles of the glutamatergic neurons of the hippocampus contain high concentrations of zinc. In the nematode, *Caenorhabditis elegans*, intestinal granules contain high quantities of zinc and in *Drosophila hydei* vesicles with a high content of zinc have been described in the Malpighian tubules, the organ mediating hemolymph ion homeostasis via the excretion of ions in the lumen of the intestines. The aforementioned vesicles and granules are known as lysosome related organelles (LROs) given that they share characteristic features with lysosomes. The formation of LROs requires the adaptor protein AP-3, the protein complexes for the biogenesis of the LROs BLOC-1,-2,-3, and of the monomeric G proteins Rab32 and Rab38. In this project, the function of the LROs in the storage of zinc will be investigated using *Drosophila melanogaster* as a model.

Flies with mutations in three different subunits of the AP-3 complex, in one subunit of the BLOC-2 complex and in Rab32 were used. By means of atomic absorption spectrometry, the content of zinc in the mutant flies was quantified and compared to wild type flies. Furthermore, the level of expression of the metallothioneins was determined by means of RT-PCR. Fecundity and time required to complete development was compared between mutant flies and wild type controls raised in diets with low and high zinc content. Finally, the Malpighian tubules and intestines were incubated with a molecule that fluoresces upon zinc chelation (FluoZin-3) to evaluate the localization of intracellular zinc within these tissues.

The results showed that the mutants of AP-3, Rab32 and of the subunit HPS5 in BLOC-2 show a three-fold reduction in the total content of zinc in the fly bodies. In wild-type flies, the LROs that contain zinc could be readily visualized in the Malpighian tubules; however these zinc-containing LROs were not observed in the mutant of the subunit $\mu 3$ in AP-3 (*carmine*). The lack of LROs in *carmine* does not affect the time required to complete development or the amount of progeny of flies grown in diets of varying dietary zinc availability. However, in mutants of *carmine*, when raised on normal diet, the expression of metallothionein A was markedly induced, suggesting that metallothionein A can regulate excess zinc in the absence of LROs. Collectively, my results suggest that, in addition to the previously described metallothioneins, some LROS (pigment granules) function as zinc storage sites in *Drosophila melanogaster*.

Los organelos relacionados a los lisosomas funcionan como almacenes de zinc en *Drosophila melanogaster*

INTRODUCCIÓN

El papel biológico del zinc

El zinc es un elemento esencial para diversos procesos biológicos ya que es un cofactor de muchos tipos de proteínas, contribuyendo a su actividad enzimática o estabilidad (*revisado en* Maret *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004). A la mayoría de estas proteínas se les une el zinc durante la síntesis y frecuentemente el ion permanece unido a la proteína debido a la alta afinidad de sus sitios de unión. Sin embargo, existen motivos de unión a zinc, como los dedos de zinc donde este elemento puede unirse reversiblemente, controlando así la actividad de proteínas. Tal es el caso del factor de transcripción de metales-1 (MTF-1 por sus siglas en inglés) que en presencia de zinc induce la expresión transcripcional de las metalotioneínas (Mtns) (Laity *et al.*, 2007). Las Mtns son proteínas de bajo peso molecular, ricas en residuos de cisteína que forman sitios de unión a metales divalentes (Tapiero *et al.*, 2003). Las Mtns tienen la capacidad de unir hasta siete iones de zinc con diferentes afinidades en el rango nano y picomolar, actuando así como amortiguadores de este metal mediante su secuestro y liberación en eventos donde se necesita (Fig. 1). La expresión de las Mtns se induce por la elevación de la concentración de zinc, aunque también por iones metálicos tóxicos como el cadmio, el mercurio, el cobalto y el cobre. Dicha regulación transcripcional es mediada por secuencias de DNA que actúan en *cis* (Metal Response Elements - MREs). Para ello el metal se une al MTF-1 en el citosol y esto le permite migrar al núcleo donde se une a las secuencias MREs de ADN proporcionando el estímulo necesario para la transcripción de los genes de Mtns (Tapiero *et al.*, 2003).

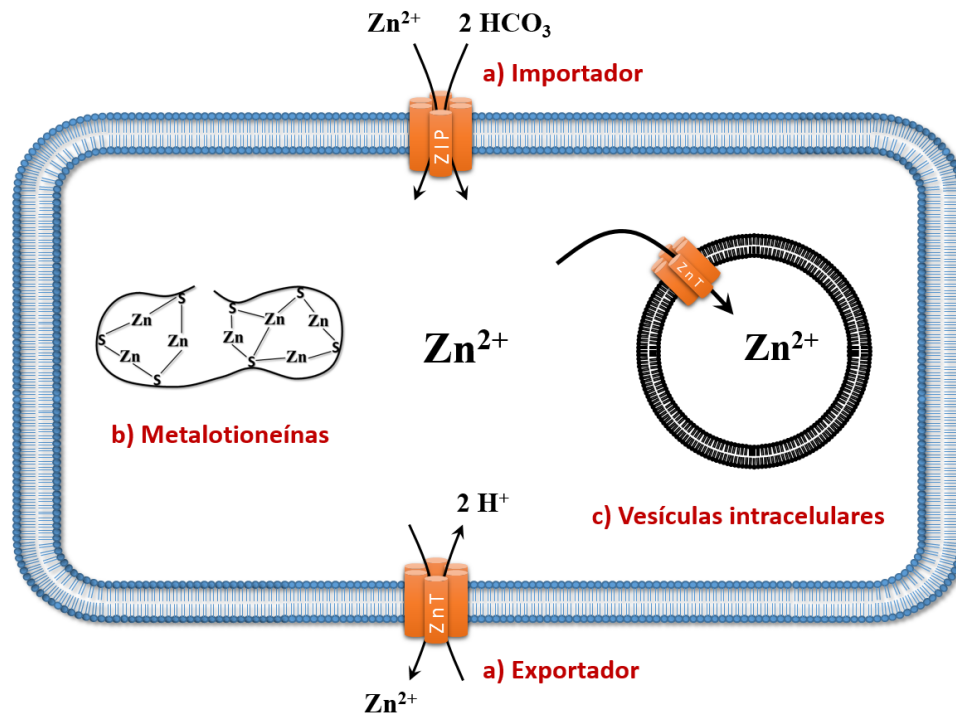


Figura 1. Homeostasis del zinc celular. a) El transporte de zinc a través de la membrana se da por medio de proteínas importadoras de la familia ZIP y exportadoras de la familia ZnT; b) las metalotioneínas son proteínas de unión a zinc que acoplan hasta siete iones de zinc; c) en algunos tipos celulares el zinc se concentra en vesículas.

El transporte celular de zinc

Además de la regulación por Mtns se han sugerido al menos otros dos mecanismos homeostáticos del zinc: su transporte a través de la membrana plasmática por medio de proteínas exportadoras e importadoras, y su almacenamiento dentro de vesículas intracelulares llamadas zincosomas (Fig. 1) (Plum *et al.*, 2010).

El transporte de zinc a través de la membrana plasmática y de la membrana de las vesículas intracelulares está mediado por dos familias de proteínas transmembranales: los transportadores ZIP (Zrt and Irt like Proteins) y los transportadores ZnT (Zinc Transporter). Los transportadores ZIPs facilitan la entrada de zinc del medio extracelular al citosol (Gaither y Eide, 2000). De manera opuesta, los miembros de la familia ZnT remueven el zinc del citosol o permiten la entrada de éste hacia el lumen de las vesículas (*revisado en* Kambe *et al.*, 2004;

Colvin *et al.*, 2000). Ambas familias de estos transportadores se han conservado evolutivamente en los invertebrados (Lye *et al.*, 2012).

Los LROs como sitios de almacenamiento de zinc

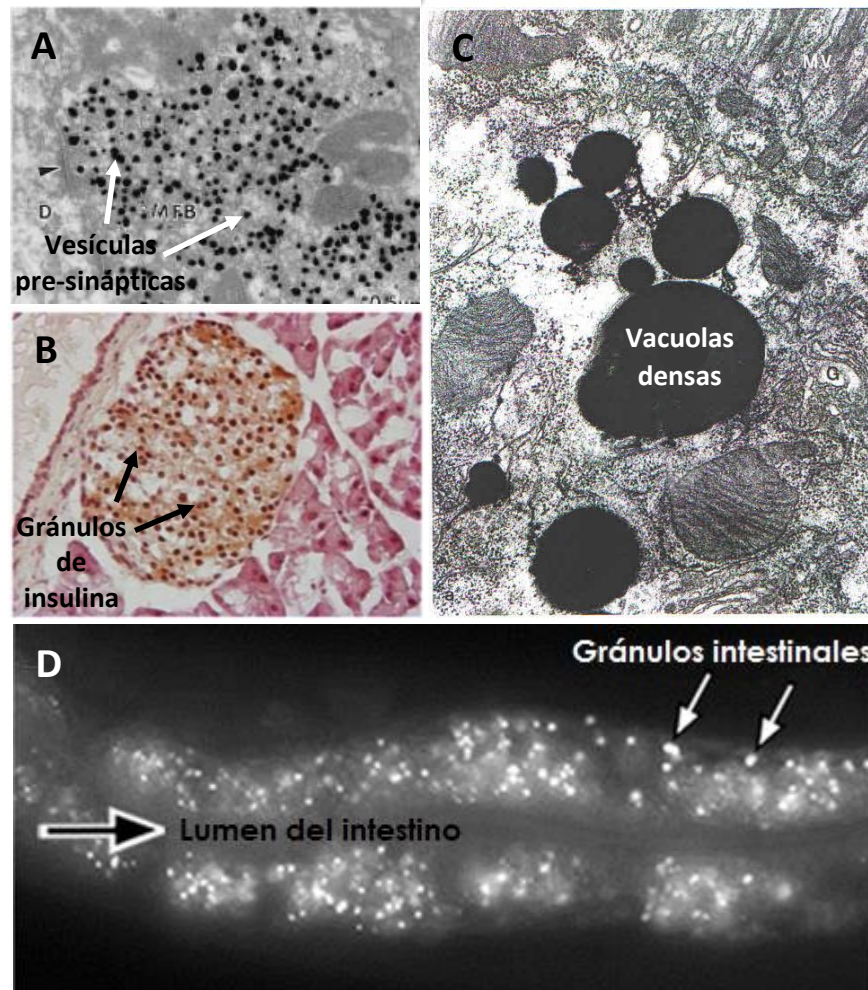


Figura 2. Organelos relacionados a los lisosomas con alto contenido de zinc. A) Micrografía electrónica de las vesículas pre-sinápticas en la región CA3 del hipocampo analizadas por tinción de Timm. Cole *et al.*, 1999. B) Gránulos de insulina en una sección pancreática de un ratón macho silvestre teñidos con la técnica de Timm. Pound *et al.*, 2009. C) Micrografía de transmisión electrónica de vacuolas densas en la parte proximal de los túbulos Malpighianos de *Drosophila hydei* estudiadas por microanálisis de rayos X. Zierold y Wessing, 1990. D) Imagen de fluorescencia de los gránulos intestinales en *C. elegans* teñidos con FluoZin3. Roh *et al.*, 2012.

Otro mecanismo regulador de la concentración de zinc intracelular, hasta la fecha poco entendido, es el que permite su almacenamiento en vesículas que algunos autores llaman zincosomas (Plum *et al.*, 2010). Desde hace tiempo se sabe que en las neuronas glutamatérgicas de las fibras musgosas del hipocampo se almacenan grandes cantidades de zinc, que se libera durante la secreción del neurotransmisor (Haug, 1967) (Fig. 2A). Así mismo, se sabe que el zinc se almacena en los gránulos de insulina de las células beta pancreáticas (Havu *et al.*, 1977) (Fig. 2B) participando en la correcta cristalización de la hormona (Baker *et al.*, 1988), y recientemente, se demostró, que organelos relacionados a los lisosomas en las células intestinales de *Caenorhabditis elegans*, llamados gránulos intestinales, son el sitio principal de almacenamiento del zinc (Fig. 2D) (Roh *et al.*, en el 2012). Mientras tanto, en *Drosophila hydei* se han identificado unas vesículas con alto contenido de zinc en los túbulos Malpighianos (Fig. 2C) (Zierold y Wessing, 1990).

La evidencia anterior muestra que el zinc puede almacenarse en vesículas comúnmente llamadas organelos relacionados a los lisosomas o LROs (por sus siglas en inglés, “Lysosome-related organelles”). El nombre LROs se debe a la presencia de proteínas lisosomales asociadas a éstas vesículas y por la reactividad a tinciones con colorantes específicos para lisosomas como el LysoTracker (Hersh *et al.*, 2002). Estas vesículas ácidas acumulan cantidades milimolares de zinc cuando éste está en exceso (Frederickson *et al.*, 2000), teniendo la ventaja de ser un mecanismo más rápido para excluir el zinc del citosol que el de la síntesis *de novo* de metalotioneínas (Wellenreuther *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha, se desconoce la función biológica del zinc vesicular y además sí estas vesículas tienen una función de almacenamiento a nivel fisiológico en el organismo.

Los complejos AP

La presencia de transportadores en las membranas de los LROs, así como la existencia de proteínas transmembranales en cualquier otro organelo requieren del tráfico vesicular, el cual se encarga del transporte de proteínas y lípidos dentro de

en la membrana plasmática y facilita la endocitosis, mediada por clatrina de un amplio rango de proteínas, incluyendo a receptores, moléculas de adhesión y proteínas virales (Motley *et al.*, 2003; Rappoport *et al.*, 2009). AP-3 se localiza principalmente en los endosomas tubulares e interviene en el transporte desde los

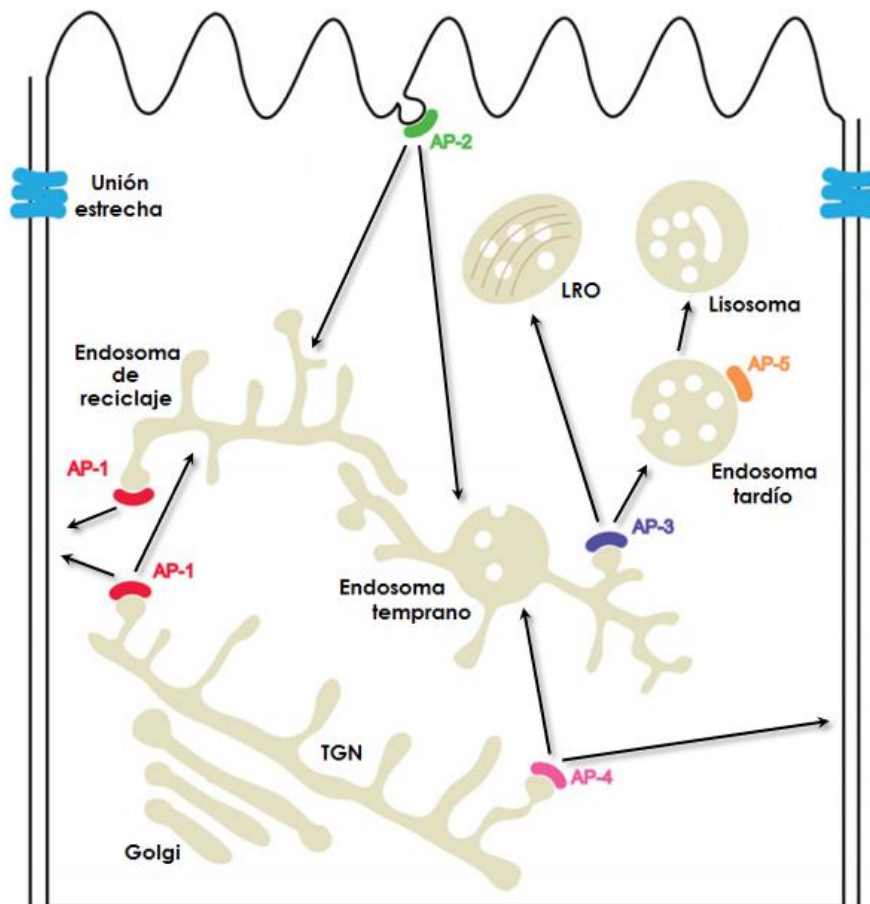


Figura 4. Localización y tráfico de los complejos AP. AP-1 se localiza en el TGN y en los endosomas de reciclaje. AP-1 media el direccionamiento basolateral en las células epiteliales. AP-2 participa en la endocitosis mediada por clatrina de la membrana plasmática. AP-3 está localizado en los endosomas tempranos y es responsable de la formación de los LROs. AP-4 se encuentra en el TGN y media el tráfico vesicular del TGN a los endosomas o a la membrana basolateral. AP-5 está localizado en los endosomas tardíos y su función aún es desconocida. Tomado de Park y Guo, 2014.

endosomas tubulares hacia los endosomas tardíos, además de que está relacionado con la biogénesis de los LROs (Boehm *et al.*, 2001; Peden *et al.*, 2004; Theos *et al.*, 2005). Por su parte, AP-4 se ubica preferentemente en el TGN y participa en el transporte del TGN a los endosomas, independientemente de la

clatrina (Dell'Angelica *et al.*, 1997; Dell'Angelica *et al.*, 1999). AP-5 se localiza en los endosomas tardíos y participa en el direccionamiento endosomal independientemente de la clatrina (Hirst *et al.*, 2015).

Así entonces, los complejos AP-3 son importantes reguladores de la biogénesis de los LROs y esto se evidencia en la afección de la biogénesis de los LROs, en enfermedades hereditarias y en modelos de ratones *knockout*, donde se altera la función de estos complejos. Las cepas murinas *mocha* y *pearl*, derivadas de mutaciones en las subunidades δ y $\beta 3A$ del complejo AP-3 respectivamente, presentan anomalías en los melanocitos y en otros tipos de LROs (Kantheti *et al.*, 1998; Falcón-Pérez *et al.*, 2007). En el fenotipo de *mocha*, además, se observa un déficit neurológico asociado con una disminución en la expresión del transportador ZnT-3 en las vesículas pre-sinápticas que normalmente contienen zinc y glutamato (Kantheti *et al.*, 1998).

El Síndrome Hermansky-Pudlak (HPS)

El Síndrome Hermansky-Pudlak (HPS) es una enfermedad recesiva autosomal cuyo curso se manifiesta por sangrados prolongados debidos a defectos en la agregación plaquetaria a consecuencia de la ausencia de los gránulos densos de las plaquetas. Así mismo se observa pérdida de color en los ojos y en la piel o albinismo, derivado del daño en la formación de los melanosomas (Huizing *et al.*, 2009). Hasta la fecha, en los humanos, se han identificado al menos ocho variantes del HPS, una asociada con una subunidad del complejo AP-3 y el resto con otros complejos proteicos llamados BLOC (por sus siglas en inglés “biogenesis of lysosome-related organelles complex”) (Fig. 5) (*revisado en* Wei, 2006).

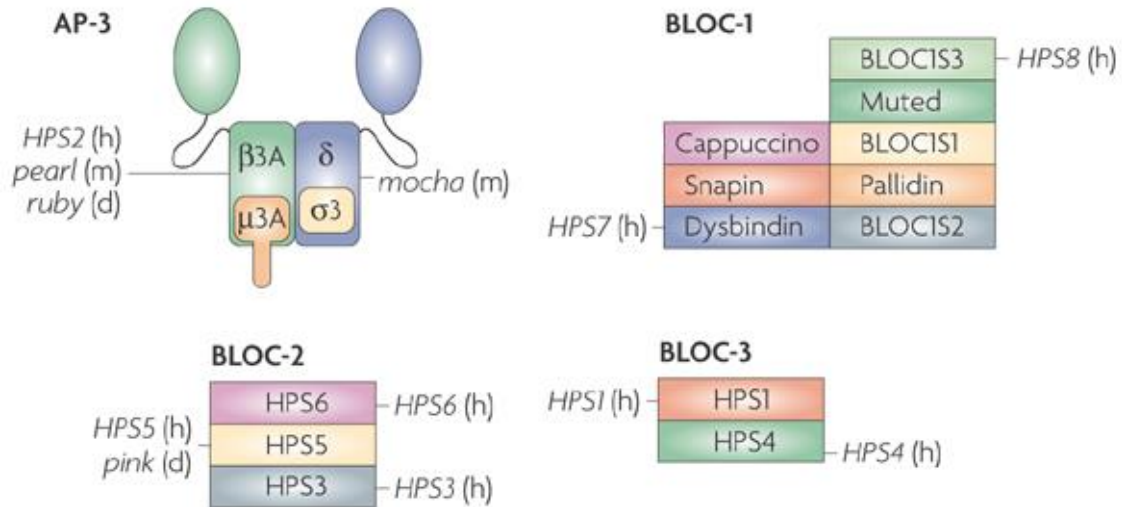


Figura 5. Productos de genes afectados en el Síndrome Hermansky-Pudlak. Las mutaciones en los genes ortólogos que codifican para las subunidades $\beta 3A$ y δ de AP-3 causan un fenotipo similar al HPS en los ratones. Las mutaciones en los genes de *Drosophila ruby* y *pink* que codifican para las subunidades $\beta 3A$ de AP-3 y HPS5 de BLOC-2, respectivamente, inducen defectos en la formación de los gránulos pigmentarios. La imagen muestra a las subunidades de los complejos y a aquellas subunidades afectadas por el HPS en los humanos (h), en el ratón (m) y en *Drosophila melanogaster* (d). Tomado de Raposo y Marks, 2007.

Los complejos BLOCs

Los complejos BLOCs son tres complejos multiproteicos que participan en la biogénesis de los LROs. El complejo BLOC-1 está integrado por ocho subunidades (dysbindin, pallidin, muted, capuccino, snapin, BLOS1, BLOS2 y BLOS3), el complejo BLOC-2 por tres (HPS3, HPS5 y HPS6) y el complejo BLOC-3 por dos (HPS1 y HPS4) (Fig. 5). Se sabe que BLOC-1 y BLOC-2 se localizan en los endosomas tempranos y facilitan el tráfico de proteínas a los melanosomas en los melanocitos (Di Pietro *et al.*, 2006). Por su parte, se ha propuesto que BLOC-3 está involucrado en la regulación del tráfico de proteínas y/o en la dinámica de los organelos de varios tipos celulares (Nazarian *et al.*, 2003). Por lo que no es sorprendente que las mutaciones en alguna de sus subunidades induzcan síntomas del HPS, aunque la función molecular precisa de estos complejos aún se desconozca. De hecho se ha reportado que una mutación en la subunidad Dysbindin de BLOC-1 genera la variante 7 del HPS (Li *et al.*, 2003), y que las

mutaciones en cualquiera de las subunidades de BLOC-2 y BLOC-3 generan el resto de las variantes de HPS, con excepción de la variante HPS-2 que se genera por la mutación de la subunidad β 3A del complejo AP-3 (Wei, 2006). Adicionalmente, se demostró una interacción física y funcional de BLOC-1 con AP-3 y BLOC-2 que facilita el tráfico de proteínas en los endosomas (Di Pietro *et al.*, 2006).

Las proteínas Rab

El tráfico de membranas entre organelos es fundamental para el mantenimiento de las células eucariotas. Las proteínas Rab garantizan que las proteínas carga lleguen a su destino correcto. Las proteínas Rab pertenecen a la familia de las pequeñas GTPasas tipo Ras. Las proteínas Ras intervienen en todo el proceso del tráfico vesicular incluyendo la formación vesicular, el transporte de la vesícula dentro del citosol, el anclaje de la vesícula a la membrana blanco y la posterior fusión membranal. Estas proteínas se pueden presentar en dos estados característicos: activo e inactivo. En su estado inactivo tienen unido un GDP (guanosín difosfato) y en su estado activo llevan consigo un GTP (guanosín trifosfato). El intercambio de GDP por GTP lo realiza una enzima llamada GEF (del inglés Guanine nucleotide Exchange Factor), mientras que para pasar al estado inactivo una proteína llamada GAP (del inglés GTPase-Activating Protein) desfosforila al GTP. En su estado activo las proteínas Rab se unen a proteínas o complejos proteicos llamados efectores que permiten el anclaje de las vesículas a su membrana blanco (*revisado en* Huatagalung y Novick, 2011).

En este proyecto trabajamos con Rab32 que, junto con la Rab38 son proteínas clave en la formación de los melanosomas. Además, recientemente se mostró que estas proteínas redireccionan a los complejos BLOC-2 y AP-3 a los melanosomas en los melanocitos (Bultema y Di Prieto, 2013).

Desarrollo de los gránulos pigmentarios en *Drosophila melanogaster*

En el modelo de *Drosophila melanogaster* existen mutaciones que afectan a las subunidades del complejo AP-3: *ruby* ($\beta 3$), *garnet* (δ), *carmine* ($\mu 3$) y *orange* ($\sigma 3$). Las moscas mutantes se caracterizan por defectos en la pigmentación, siendo el color del ojo la manifestación más clara de la aberración. El color de los ojos de la mosca se debe a la presencia de dos pigmentos: los omocromos de color café, y las drosopterinas de color rojo brillante. Los omocromos se derivan de la biosíntesis del triptófano, mientras que las drosopterinas son derivados del GTP (*revisado en Ewart y Howells, 1998*). La mutante *garnet* muestra una alteración en la biogénesis de los LROs pues produce menos pigmentos omocromo y drosopterina en los gránulos pigmentarios (Ooi *et al.*, 1997; Falcón-Pérez *et al.*, 2007). Estos pigmentos se almacenan en dos tipos de gránulos pigmentarios, los gránulos Tipo I y los gránulos Tipo II. Los gránulos Tipo I aparecen alrededor de las primeras 48 horas cuando la mosca está en la fase de pupa, y tienen un diámetro aproximado de $0.07\mu\text{m}$. Con el paso de las horas estos gránulos incrementan su diámetro y densidad hasta alcanzar un tamaño promedio de $0.48\mu\text{m}$ antes de la eclosión de la

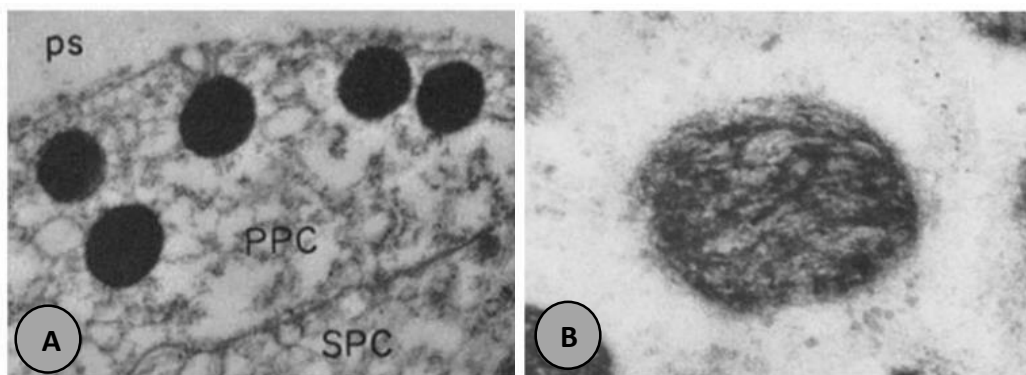


Figura 6. Tipos de gránulos pigmentarios en la retina de *Drosophila*. A) Gránulo pigmentario Tipo I maduro contenido en la célula pigmentaria primaria (PPC) cerca al pseudocono (ps). B) Estructura fibrosa del Gránulo pigmentario Tipo II dentro de una célula pigmentaria secundaria (SPC). Tomado de Shoup, 1966

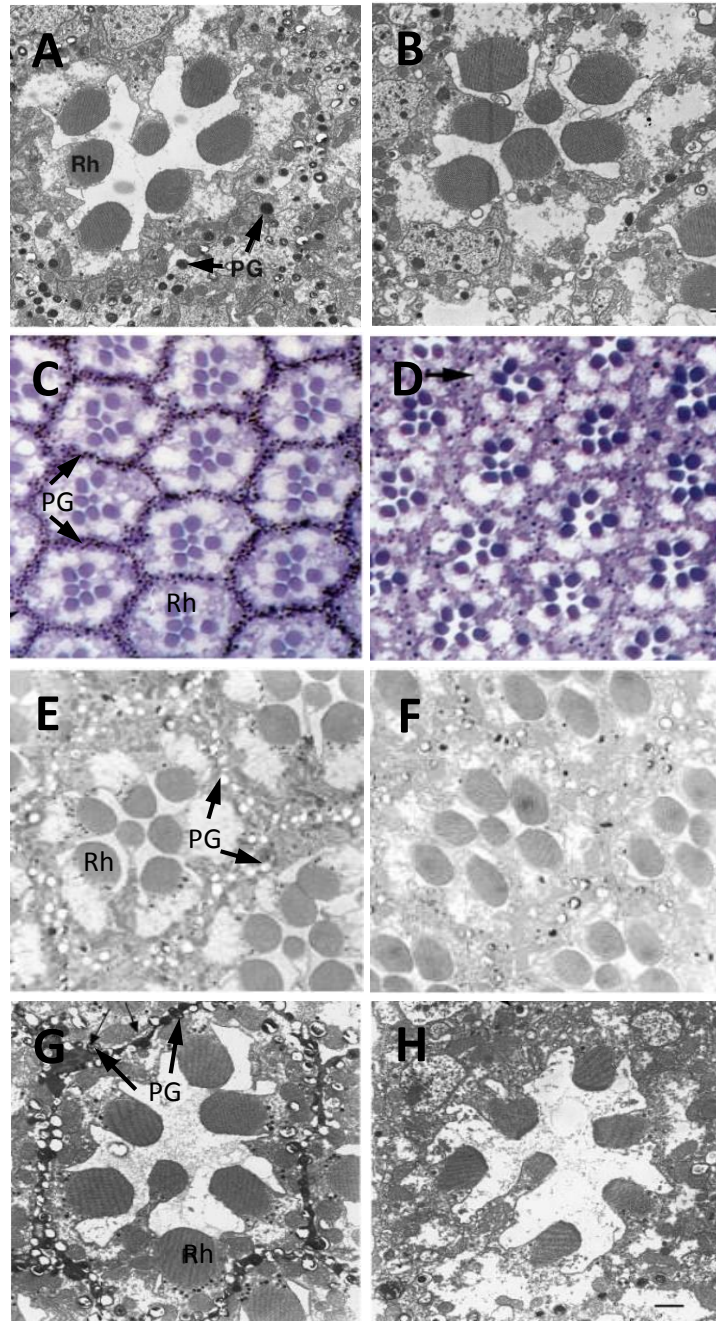
mosca. Los gránulos que provienen del Golgi, se liberan en el citoplasma donde completan su diferenciación a gránulos pigmentarios maduros. Aparecen inicialmente en la región media y proximal de las células pigmentarias secundarias y posteriormente en las células pigmentarias primarias (Fig. 6A) (Shoup, 1966). Al

mismo tiempo, un segundo tipo de gránulos (gránulos Tipo II) con una apariencia fibrosa se presentan sólo en las células pigmentarias secundarias, aunque aún se desconoce si también provienen del aparato de Golgi. La maduración del gránulo consiste en un incremento del material dentro del gránulo y de la densidad del mismo ya que, su tamaño (en promedio de $0.75 \times 0.50\mu$) y su forma elíptica no se modifican durante el desarrollo (Fig. 6B) (Shoup, 1966).

El complejo AP-3 participa en la formación de los gránulos pigmentarios de *Drosophila*

Los gránulos pigmentarios de tipo I de *Drosophila* son los LROs. En trabajos recientes se ha demostrado la utilidad de estos gránulos como modelo de estudio de la formación de los LROs. De hecho, la primera pista sobre la vía de tráfico vesicular que forma a los LROs provino del descubrimiento de que el gen *garnet* en *Drosophila* codifica para la subunidad δ del complejo AP-3. Las moscas mutantes *garnet* tienen una menor cantidad de gránulos pigmentarios en comparación con las moscas silvestres, lo que da como resultado una cantidad reducida de pigmentos rojos y cafés (Fig. 7A-B) (Ooi *et al.*, 1997). Las moscas mutantes en el resto de las subunidades del complejo AP-3 presentan un fenotipo similar al que tiene la mosca mutante *garnet* (Fig. 7 C-D; 7 E-F; 7 G-H) (Mullins *et al.*, 1999; Kretzschmar *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 2000). Los defectos en la mutante *garnet* son defectos en la pigmentación general dado que otros órganos pigmentados como los túbulos Malpighianos y los testículos, también se afectan (Brehme y Demerec, 1942; Lloyd, 1995). Por lo tanto, estos resultados muestran que el complejo AP-3 es crítico para la formación de los gránulos pigmentarios.

Figura 7. Análisis de los gránulos pigmentarios en las moscas silvestres y mutantes en las subunidades del complejo AP-3. Micrografía electrónica de un corte del ojo de una mosca silvestre A) y una mutante B) en la subunidad δ . Ooi *et al.*, 1997. Fotomicrografía electrónica de un corte del ojo de una mosca silvestre C) y una mutante D) en la subunidad $\mu 3$. Mullins *et al.*, 1999. E) Micrografía electrónica de un corte del ojo de una mosca silvestre E) y una mutante en la subunidad $\beta 3$. Kretzschmar *et al.*, 2000. Micrografía electrónica de un corte del ojo de una mosca silvestre G) y una mutante en la subunidad $\sigma 3$. Mullins *et al.*, 2000. Los gránulos pigmentarios están indicados por las flechas. PG: gránulo pigmentario. Rh: Rhandomeros.



Los túbulos Malpighianos

Los túbulos Malpighianos (TM) de *Drosophila* consisten de dos pares de tubos epiteliales que nacen del intestino grueso durante la embriogénesis. Éstos se encuentran distribuidos en direcciones opuestas, los más largos o túbulos anteriores, se orientan hacia la cabeza de la mosca, mientras que los túbulos más

cortos o túbulos posteriores, se unen a la parte final del intestino grueso (Jung *et al.*, 2005) (Fig. 8).

Los TM junto con el intestino grueso forman el sistema de regulación osmótica que elimina productos y compuestos tóxicos presentes en la hemolinfa, y que retiene o reabsorbe a las sustancias útiles para el organismo. La fase final de secreción ocurre en el recto, donde los iones y el agua se reabsorben, removiéndolos de la orina y transportándolos del intestino grueso a los TM (Singh *et al.*, 2007).

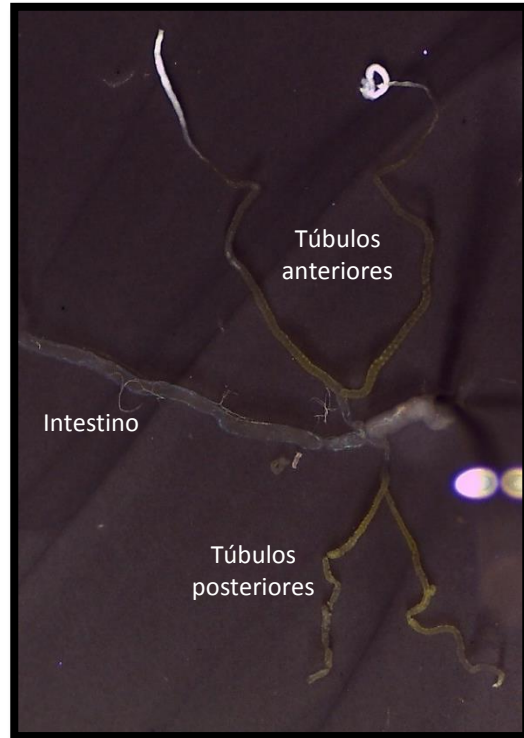


Figura 8. Túbulos Malpighianos de *Drosophila melanogaster*. La mosca cuenta con cuatro túbulos, dos anteriores y dos posteriores. Los túbulos de la mosca silvestre son de color amarillo debido a la acumulación de riboflavina.

JUSTIFICACIÓN

El zinc es un elemento esencial en varios procesos biológicos, pero su sitio de almacenamiento en el organismo se desconoce. Existe evidencia que los LROs pueden almacenar zinc, sin embargo, se desconoce si pueden funcionar como un mecanismo regulatorio de la concentración de este metal a nivel celular y fisiológico. Se sabe que AP-3, los complejos BLOC y Rab 32 están implicados en la formación y el correcto funcionamiento de los LROs. Existen cepas de moscas que tienen mutados a los genes de AP-3, de BLOC-2 y de Rab32 que nos permitirán investigar si estos complejos están comprometidos en el almacenamiento del zinc celular en *Drosophila melanogaster*. Además hay enfermedades como el Síndrome Hermansky-Pudlak, originado por alteraciones en los complejos BLOC y AP-3, en donde se desconoce si el zinc podría estar jugando un papel importante. Evaluar esta posibilidad nos podría ayudar a comprender mejor el papel fisiológico del zinc en condiciones normales y patológicas.

HIPÓTESIS

Los organelos relacionados a los lisosomas (LROs) son un sitio de almacenamiento de zinc en *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS

1. Evaluar el contenido de zinc de las distintas mutantes de AP-3 (*carmine* μ 3, *ruby* β 3, *garnet* δ) que participan en la formación de los zincosomas.
2. Evaluar el contenido de zinc de la mutante *carmine* (μ 3) en dietas con alto y bajo zinc.
3. Evaluar el desarrollo y la sobrevivencia de la mutante *carmine* (μ 3) en dietas con alto y bajo zinc.
4. Analizar el nivel de expresión de las metalotioneínas en la mutante *carmine* (μ 3) que carece de zincosomas.
5. Observar los zincosomas presentes en los túbulos Malpighianos e intestino de *Drosophila melanogaster*.
6. Evaluar el contenido de zinc de la mutante *pink* (subunidad HPS-5 del complejo BLOC-2) y de la mutante *lightoid* (Rab32).

METODOLOGÍA

Mantenimiento de los stocks

Las moscas se mantuvieron a 24°C en alimento estándar que contenía: agar (6.5%), sacarosa (9.7%), glucosa (21.3%), levadura (22.6%), maíz (9.7%), ácido propiónico (0.5%), soya (4.6%), melaza (19.3%) y nipagina (0.01%). Al momento de llevar a cabo los experimentos, las moscas se habían desarrollado en dietas donde únicamente se varió la concentración de zinc añadiendo a la solución estándar

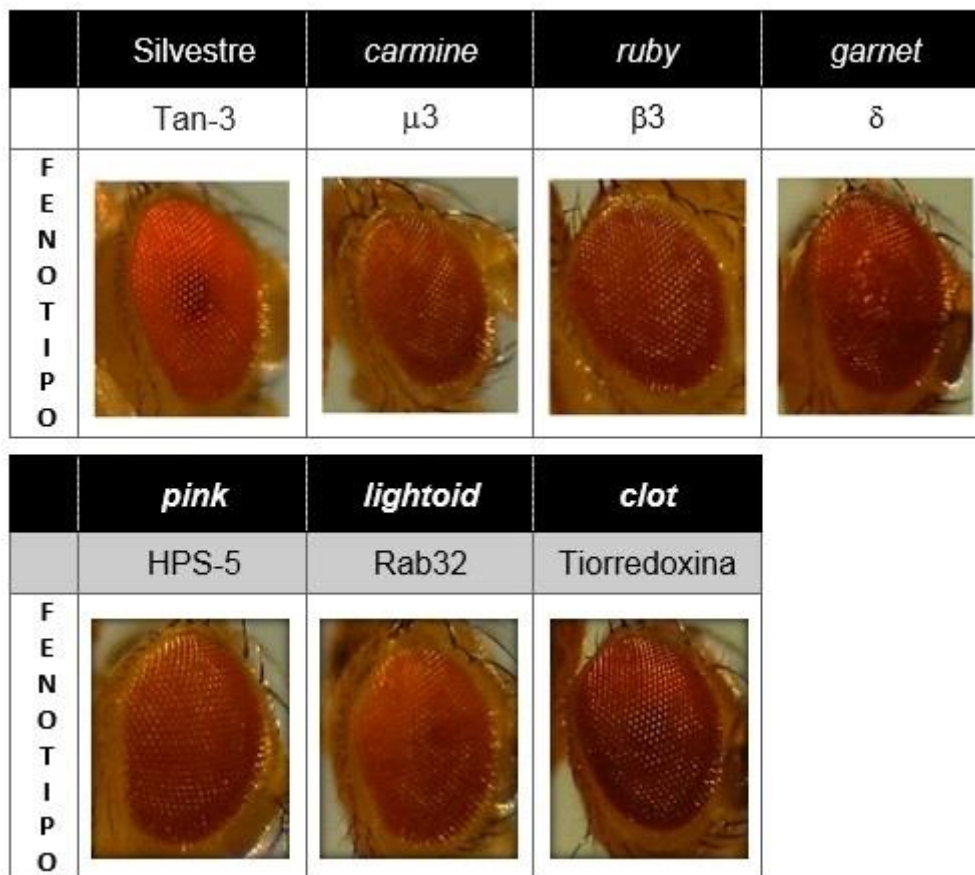


Figura 9. Genotipo y fenotipo ocular de la mosca silvestre y de las moscas mutantes para las subunidades del complejo AP-3, la subunidad HPS-5 de BLOC-2, la Rab32 y la tiorredoxina.

ZnSO₄ o el quelante específico de zinc TPEN a una concentración de 200 μ M reduciendo así la biodisponibilidad dietética de zinc. Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas del Centro de *Drosophila* en Bloomington (Universidad de

Indiana, E.U). Se usaron las siguientes cepas: *cm*¹ (#21), *rb*¹ (#88), *g*¹ (#3958), *p*^o (#553), *ltd*¹ (#338) y *cl*¹ (#261). La mosca silvestre usada se colectó originalmente por Rudi Costa de Tannes, Italia y se llama Tan-3 (Sadraie y Missirlis, 2012). El fenotipo ocular de las cepas mutantes se documentó (Fig. 9).

Espectrometría de absorción atómica

Con el fin de cuantificar la concentración total de zinc en la mosca completa, la concentración de zinc se determinó por espectrometría de absorción atómica. Machos y hembras se utilizaron indistintamente. La edad de las moscas colectadas estuvo entre los 4 y 7 días. Las muestras se recolectaron a 4°C y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, se liofilizaron durante 6.5 horas. De la muestra liofilizada se tomaron 200 mg de masa seca y se digirieron en HNO₃ (69%) durante 48 horas a 60°C. Una vez digeridas en HNO₃, se midió la concentración de zinc en un espectrofotómetro de absorción atómica. Se prepararon curvas de calibración para cada metal a partir de soluciones estándares con concentraciones conocidas, usando como vehículo ácido nítrico al 1%.

Análisis del desarrollo

Con el objetivo de evaluar el desarrollo de las diferentes mutantes de *Drosophila*, se cruzaron 12 hembras y 3 machos, posteriormente se registró el tiempo a partir de la deposición del embrión hasta que apareció la primera mosca y enseguida se realizó el conteo del número total de moscas de cada cruce parental. Se compararon los datos generados entre las diferentes progenies que crecieron en las dietas con diferentes concentraciones de zinc. Los datos se graficaron y el análisis estadístico se hizo mediante un análisis de la varianza de dos vías, por genotipo y por dieta.

Tinción con FluoZin-3 *in vivo*

Con el propósito de observar la localización anatómica del sitio de almacén de zinc en *Drosophila melanogaster*, se colectaron muestras de intestino y de túbulos Malpighianos en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Posteriormente, los intestinos se sumergieron en una solución 10 µM de

FluoZin-3 (Life Technologies, Cat. F-24195) con medio S2 (Life Technologies, Cat. 21720-024) durante 30 minutos. En seguida se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y los intestinos se montaron vivos sobre los portaobjetos. El registro de la imagen se realizó en un microscopio confocal (Roh *et al.*, 2012).

RT-PCR

Con el objetivo de caracterizar el efecto de las mutaciones y de las dietas sobre la expresión de las metalotioneínas, se aisló el ARN mensajero de los homogenizados de mosca total utilizando el reactivo de Trizol LS Reagent (Life Technologies, Cat. 10296-010) y posteriormente se sintetizó el cDNA usando la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Cat. 18080-094). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, Cat. R010A). Como control positivo se empleó el cDNA del gen de la proteína ribosomal 49 (Rb49). Los iniciadores se describen enseguida:

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores para cada una de las cinco metalotioneínas de la mosca.

Proteína blanco	Secuencia 5' → 3'	Dirección	Tamaño del producto (pb)
Metalotioneína A	CATGCGGAAGCGGATGCAAAT	Sentido	97
	CAGGCGGATTTCTTGTCGCC	Antisentido	
Metalotioneína B	GGGTTGTGGAACAAACTGCC	Sentido	130
	TTGGCCCGCTTATTTGTTGC	Antisentido	
Metalotioneína C	AAAGGCTGCGGAACAAACTG	Sentido	112
	TGCAACACTGATCTTTGGGG	Antisentido	
Metalotioneína D	AGGCTTGTGGAACAAACTGC	Sentido	123
	AGTTTTTGGTGGAGCAGCACT	Antisentido	
Metalotioneína E	AAGGGATGTGGAACAACACTGC	Sentido	137
	AATCCAAATGGATCCGGCCA	Antisentido	

El programa de PCR que se utilizó se muestra en la Tabla 2. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1.2%.

Tabla 2. Programa de PCR utilizado en la amplificación de las metalotioneínas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	94	10
Alineamiento	55	15
Extensión	72	10

} 30 ciclos

RESULTADOS

El complejo AP-3 está involucrado en la homeostasis del zinc

Con el objetivo de conocer el nivel de zinc en las moscas mutantes en las subunidades del complejo AP-3 que carecen de gránulos pigmentarios, se midió la concentración de este elemento en homogeneizados de mosca completa. Los resultados muestran que las tres moscas mutantes *ruby* ($\beta 3$), *garnet* (δ) y *carmine* ($\mu 3$) presentan bajo nivel de zinc, sugiriendo que el complejo AP-3 está involucrado en la homeostasis del zinc celular (Fig. 10a). En la Fig. 10b se muestra que no hay diferencia significativa en el nivel de hierro entre la mosca silvestre y las mutantes,

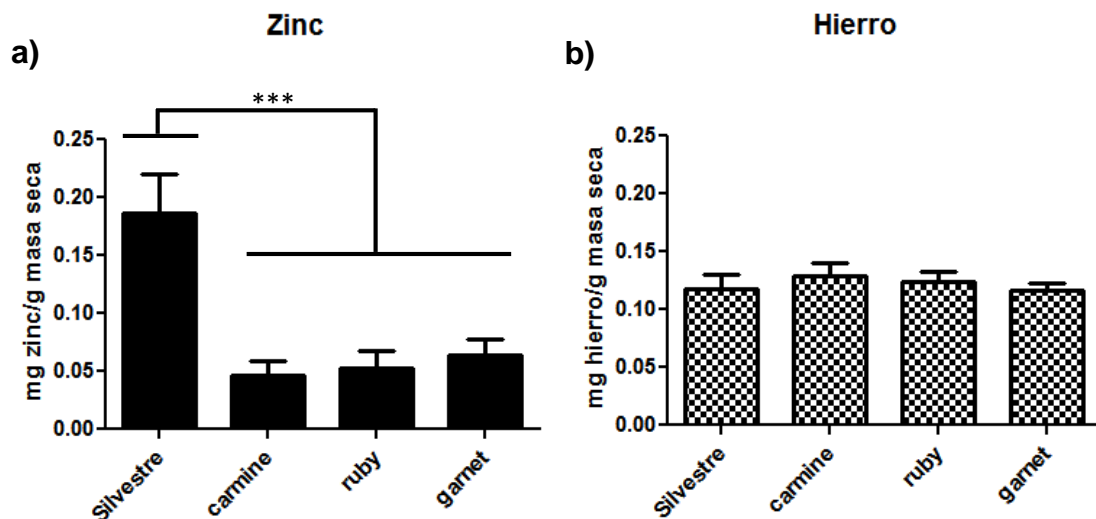


Figura 10. Concentración de zinc y hierro en las moscas que carecen de las subunidades del complejo AP-3. a) La mosca silvestre tiene una concentración promedio de zinc de 0.19 mg, a diferencia de la mutante *carmine* que contiene tres veces menos zinc (0.05 mg). Las otras dos moscas mutantes, *ruby* y *garnet* también contienen bajas concentraciones de zinc, 0.05 y 0.06, respectivamente. b) Las concentraciones de hierro son iguales entre los diferentes genotipos. Cada barra representa $\bar{X} \pm DE$. Se muestra el resultado de tres muestras independientes. *** $p \leq 0.001$.

tampoco para el manganeso y el cobre (datos no mostrados), demostrando que el complejo AP-3 funciona de manera específica en la homeostasis del zinc.

Dado que las diferentes mutantes de AP-3 redujeron la concentración de zinc al mismo nivel, los siguientes experimentos se realizaron únicamente tomando en cuenta a la mosca silvestre y a la mutante *carmine* ($\mu 3$). Una vez que se conoció el nivel de zinc en la mosca mutante, la siguiente pregunta fue saber cuál es el efecto del zinc en la mosca cuando ésta se desarrolla en dietas con alto y bajo zinc. El resultado indica que la mosca silvestre presenta una concentración promedio de 0.21 mg de zinc/g de masa seca en la dieta control, pero cuando crece en la dieta con 200 μM de TPEN, presenta una concentración promedio de 0.12 mg de zinc/g de masa seca, es decir, la mitad del valor que tenía en la dieta control. Cuando las moscas se desarrollaron en la dieta con 1 mM de zinc, la concentración promedio de zinc en la mosca silvestre fue de 0.37 mg de zinc/g de masa seca, casi el doble del valor que tenía en la dieta control. En cambio, en la mosca *carmine* ($\mu 3$) que contiene tres veces menos zinc, es decir, 0.07 mg de zinc/g de masa seca en la dieta control, al crecer en la dieta con 200 μM de TPEN, su nivel de zinc no cambia

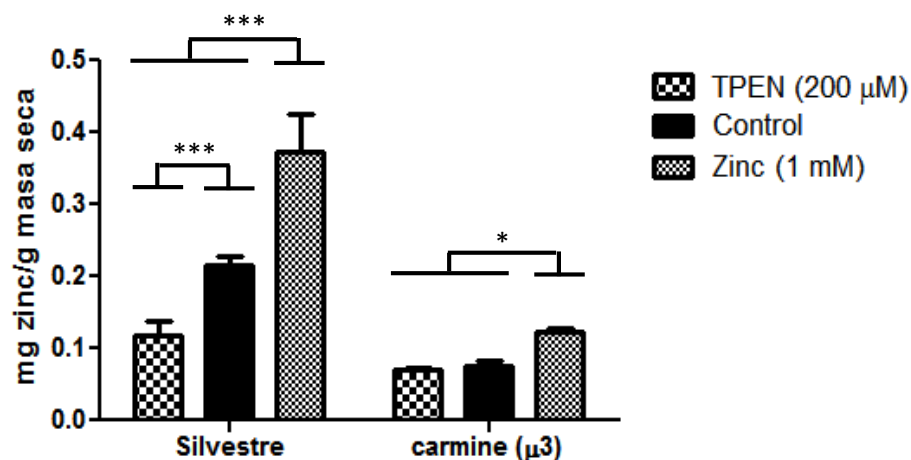


Figura 11. Efecto de la concentración de zinc en moscas alojadas en dietas control, TPEN (200 μM) y (zinc 1 mM). Se muestra el contenido de zinc en función del genotipo de la mosca. En una dieta control, la mosca silvestre tienen una concentración promedio de zinc de 0.21; mientras que *carmine* ($\mu 3$) contiene 0.07. En la dieta con 200 μM de TPEN la mosca silvestre presenta una concentración promedio de 0.12 y *carmine* ($\mu 3$) una concentración promedio similar a la que tenía en la dieta control (0.07). Cada barra representa $\bar{X} \pm \text{DE}$ de tres experimentos independientes. Las unidades se dan en mg zinc/g masa seca. * $p \leq 0.005$. *** $p \leq 0.001$.

en comparación al que presentó cuando se desarrolló en la dieta control. Cuando las moscas *carmine* ($\mu 3$) se desarrollaron en la dieta con 1 mM de zinc, la concentración promedio de zinc en la mosca alcanzó una concentración promedio de 0.12 mg de zinc/g de masa seca (Fig. 11) .

Las bajas o altas concentraciones de zinc dietético no afectan el desarrollo y la sobrevivencia de la mosca *carmine* ($\mu 3$)

Posteriormente, se realizó un experimento para analizar el efecto de la dieta en el desarrollo y la sobrevivencia de la mosca *carmine* ($\mu 3$) en comparación con la mosca silvestre. Ambas cepas de moscas se desarrollaron en cuatro diferentes dietas: bajo zinc (TPEN 200 μ M), control, alto zinc (1mM) y muy alto zinc (10 mM). En la Fig. 12 se muestra, en función de la dieta, el tiempo que tardó en surgir la primera mosca (Fig. 12a) y el número total de moscas (Fig. 12b). En el experimento donde se analizó el tiempo de aparición de la primera mosca (Fig. 12a) no se observó diferencia significativa. Al parecer la dieta con 10 mM de zinc no afecta el tiempo de desarrollo, mientras que, cuando se analizó la progenie (Fig. 12b), se observó que hubo similitud en la cantidad de moscas crecidas en las dietas TPEN (200 μ M), control y zinc 1 mM. Sin embargo, cuando las moscas se desarrollaron

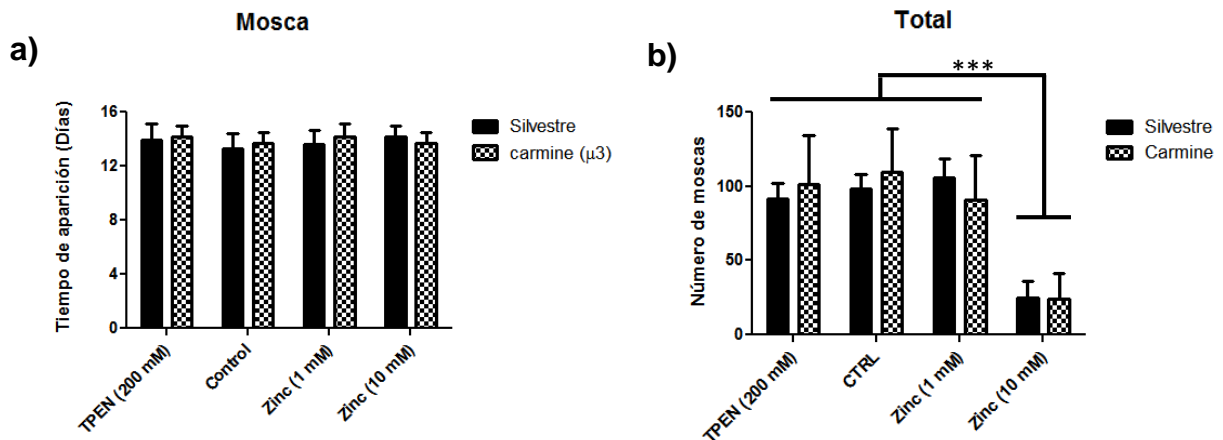


Figura 12. Efecto de la dieta y el genotipo en el desarrollo de *Drosophila*. El gráfico muestra, en función de la dieta a) el tiempo que tardó en surgir la primera pupa y b) el número total de las moscas. Se observa un descenso en el número de moscas debido a la suplementación de la dieta con 10 mM de zinc, pero este descenso es igual en la cepa silvestre y la cepa *carmine* ($\mu 3$). Cada barra representa $\bar{X} \pm DE$. Se muestra el resultado de un experimento de diez cruces (repeticiones) independientes. *** $p \leq 0.001$.

en la dieta con 10 mM de zinc el número total de moscas, en ambos genotipos, disminuyó a menos de la mitad en comparación con la dieta control. Al parecer, la concentración de 10 mM de zinc afecta de manera similar a la cantidad total de moscas en las cepas silvestre y *carmine* ($\mu 3$).

La mosca *carmine* ($\mu 3$) induce la expresión de las metalotioneínas

Una vez que conocimos el efecto del zinc dietético en la mosca *carmine* ($\mu 3$), nuestro interés se enfocó en investigar qué estaría pasando con la expresión de las metalotioneínas (Mtns) en la mosca que carece de los gránulos pigmentarios. Se

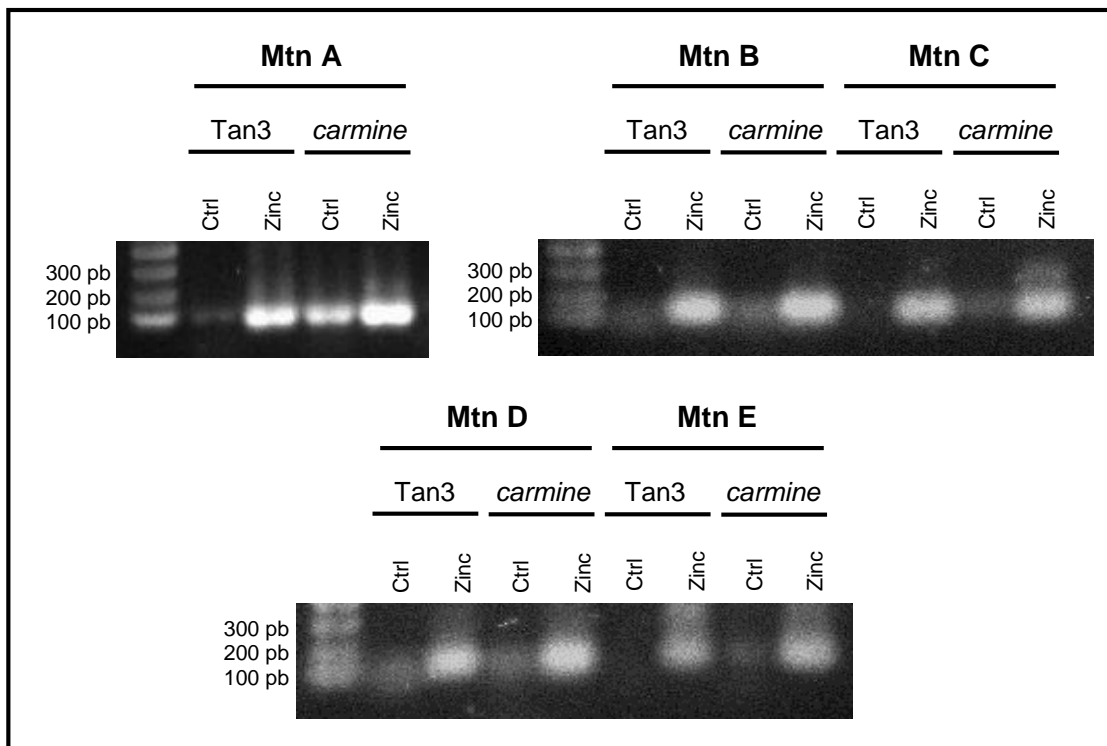


Figura 13. Inducción de la expresión de las metalotioneínas en las moscas desarrolladas en dietas con 1 mM de zinc. El nivel de expresión de las cinco metalotioneínas en las moscas desarrolladas en la dieta con 1 mM de zinc es mayor que en las moscas crecidas en la dieta control sean éstas silvestres o *carmine* ($\mu 3$). Es mayor el nivel de expresión de las MtnA, MtnC y MtnE en la mosca *carmine* ($\mu 3$) crecida en la dieta control que en la mosca silvestre.

hizo la RT-PCR en las moscas desarrolladas en las dietas control y con 1 mM de zinc. La Fig. 13 muestra que hay mayor expresión de las cinco Mtns en las moscas desarrolladas en la dieta con 1 mM de zinc tanto en las moscas silvestres como en

las moscas *carmine* ($\mu 3$). En la dieta control, la mosca *carmine* ($\mu 3$) expresa más ARNm que codifica para la MtnA que la mosca silvestre Tan3 (Fig. 13). Esto parece ser el caso también para la MtnC y la MtnE, sin embargo, cuando las moscas se desarrollaron en la dieta con zinc el nivel de expresión de ARNm de las Mtns C y E fue similar en ambas cepas. El nivel de expresión de la MtnB y la MtnD tanto en la mosca silvestre como en la mosca *carmine* ($\mu 3$) fue semejante en ambas dietas. Estos resultados sugieren que se induce la expresión de las Mtns por el incremento de zinc en la dieta, y que se induce la expresión de la Mtn A en la mosca *carmine* ($\mu 3$) criada en la dieta control.

Los gránulos pigmentarios de los túbulos Malpighianos contienen zinc

Ahora faltaba identificar a las vesículas que almacenan el zinc en *Drosophila melanogaster*. De acuerdo con los antecedentes mostrados en la Fig. 2, se optó por extraer el intestino y los túbulos Malpighianos de las moscas. La primera diferencia

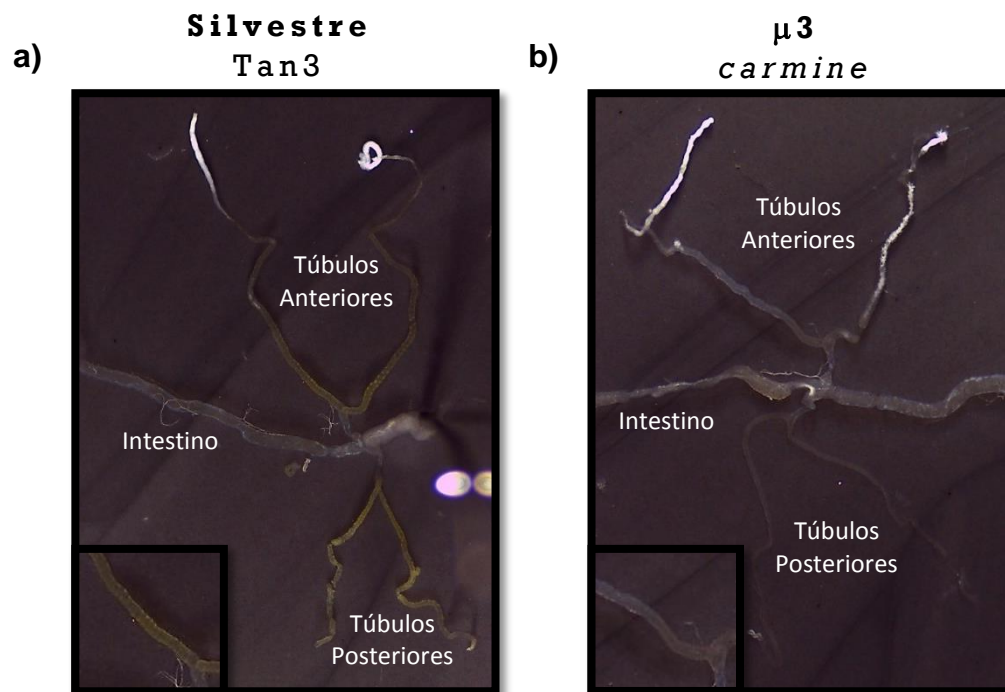


Figura 14. Túbulos Malpighianos de larva de *Drosophila melanogaster*. a) Túbulos Malpighianos de una larva silvestre. b) Túbulos Malpighianos de una larva mutante en la subunidad $\mu 3$ del complejo AP-3. Ambos túbulos son de larvas en el tercer estadio de desarrollo.

que se observó fue el color de los túbulos Malpighianos (Fig. 14). En las moscas silvestres el color de los túbulos es amarillo a diferencia de los túbulos blancos que tiene la mosca *carmine* ($\mu 3$). La diferencia de color observada en ambas moscas fue reportada por Nickla en 1972 quien demostró que la riboflavina es el principal componente de color amarillo en los túbulos Malpighianos de la mosca silvestre.

Con el objetivo de visualizar el zinc dentro de las vesículas, los túbulos Malpighianos e intestino de las larvas silvestres y mutantes se incubaron con FluoZin-3. Se muestra la fluorescencia generada a partir de la unión del zinc al FluoZin-3 en la larva silvestre y en la larva mutante (Fig. 15). La mosca *carmine* ($\mu 3$) no presentó autofluorescencia ni fluorescencia generada por la unión FluoZin-3 y el zinc, sugiriendo que el complejo AP-3 es crucial en la biogénesis de las vesículas que almacenan el pigmento amarillo (riboflavina) y el zinc.

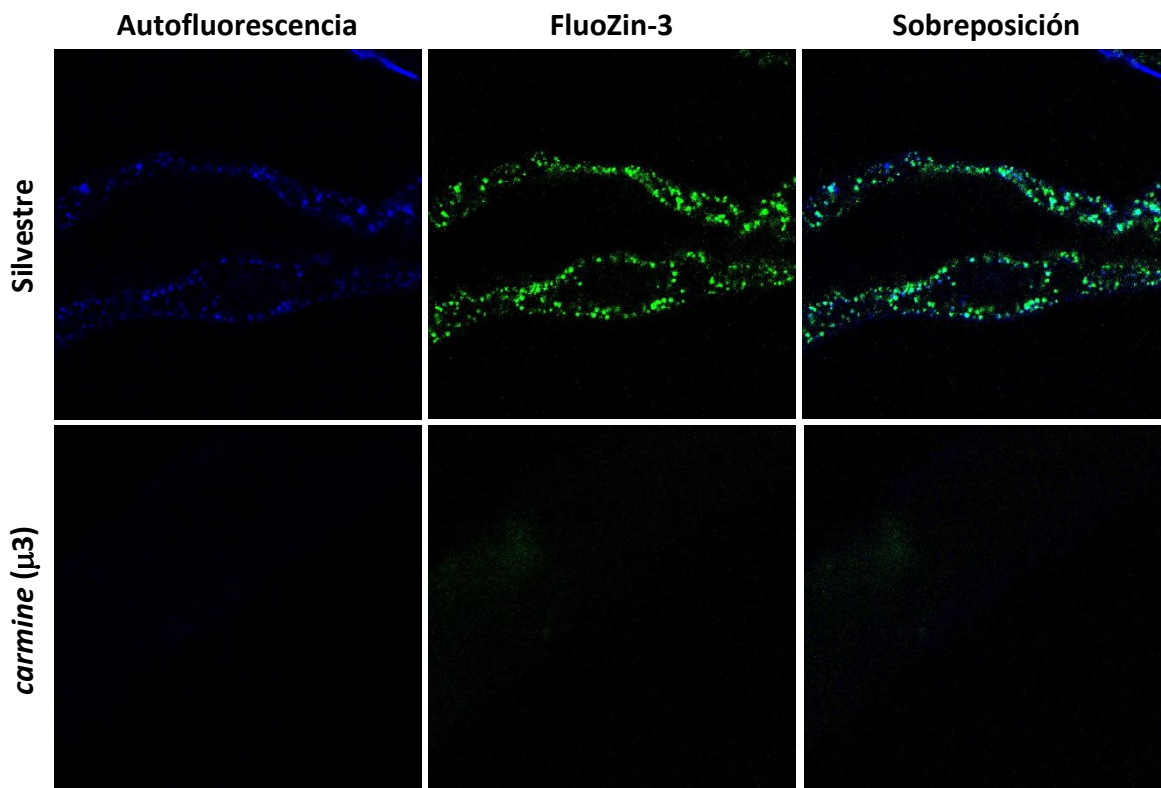


Figura 15. Imágenes de fluorescencia de los túbulos Malpighianos de las larvas silvestres de *Drosophila melanogaster* incubados con FluoZin-3. Las larvas silvestres desarrolladas en una dieta control presentan vesículas autofluorescentes que contienen zinc, a diferencia de las larvas *carmine* ($\mu 3$).

Las mutantes *pink* (HPS5) y *lightoid* (Rab32) también carecen de LROs y tienen bajas concentraciones de zinc.

Otros complejos que participan en la formación de los LROs, además de AP-3, son los complejos BLOC-1,-2 y -3, así como Rab32 y Rab38. En este último experimento se cuantificó el nivel de zinc que tienen las moscas mutantes en los genes *lightoid* que codifica para la Rab32 y *pink* que codifica para la subunidad HPS5 de BLOC-2. Adicionalmente se introdujo la mosca mutante *clot* que codifica para una tiorredoxina presente dentro de los gránulos pigmentarios. La Fig. 16a muestra que las mutantes *pink* (BLOC-2) y *lightoid* (Rab32) tienen tres veces menos zinc (0.05 y 0.07 mg de zinc/g de masa seca, respectivamente) que la mosca silvestre (0.19 mg de zinc/g de masa seca), a diferencia de la mutante *clot* (tiorredoxina) la cual tiene una concentración de zinc (0.29 mg de zinc/g de masa seca) por arriba de la mosca silvestre. Por otra parte, la Fig. 16b muestra que no hay diferencia entre el nivel de hierro de la mosca silvestre con la mosca mutante *lightoid* (Rab32) y *clot* (tiorredoxina) siendo este fenotipo específico para el zinc. No sucede lo mismo con la mosca mutante *pink* (BLOC-2) en la cual aumenta la concentración de hierro.

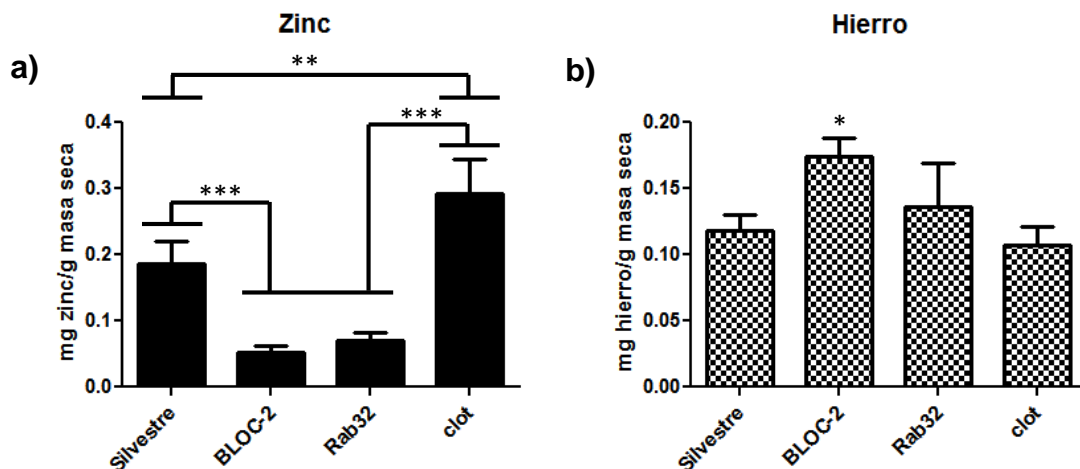


Figura 16. Concentración de zinc y hierro en las moscas mutantes *pink* (subunidad HPS5 del complejo BLOC-2), *lightoid* (Rab32) y *clot* (tiorredoxina). a) La mosca silvestre tiene una concentración promedio de zinc de 0.19 mg, a diferencia de las mutantes *pink* (BLOC-2) y *lightoid* (Rab32) que contienen tres veces menos zinc, 0.05 y 0.07 mg/g masa seca, respectivamente. La mosca mutante *clot* por el contrario, tiene una concentración promedio de zinc 0.29 mg. b) Las concentraciones promedio de hierro son semejantes entre las mutantes *lightoid* (Rab32), *clot* (tiorredoxina) y la mosca silvestre, 0.14, 0.11 y 0.12 mg hierro/g masa seca. La concentración promedio de hierro en la mutante *pink* (BLOC-2) es de 0.17 mg/g masa seca. Cada barra representa $\bar{X} \pm DE$. Se muestra el resultado de tres muestras independientes. * $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$. *** $p \leq 0.001$.

DISCUSIÓN

La formación de los LROs a través del tráfico vesicular

En las células, el transporte de proteínas y lípidos es mediado por el tráfico vesicular que incluye a pequeñas vesículas y a grandes organelos intracelulares como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, endosomas y lisosomas (Sato *et al.*, 2014). El transporte de proteínas entre estos compartimentos y el medio extracelular se lleva a cabo por la formación y fusión de vesículas de una membrana donadora a una membrana aceptora, respectivamente (Marks *et al.*, 2013). El destino que tomarán las proteínas transportadas, se encuentra regulado por las proteínas adaptadoras, como AP-3 (Peden *et al.*, 2004). En este trabajo se utilizaron moscas mutantes en las subunidades del complejo AP-3 como modelo de la ausencia de vesículas llamadas organelos relacionados a los lisosomas (LROs, por sus siglas en inglés). Como se mencionó anteriormente, existen varios tipos de LROs entre ellos se encuentran los gránulos de insulina, las vesículas pre-sinápticas que contienen glutamato, los melanosomas y los gránulos pigmentarios en los ojos de *Drosophila melanogaster* (Dell'Angelica *et al.*, 2000). Algunos de estos LROs contienen niveles elevados de zinc, tal es el caso de los gránulos de insulina (Pound *et al.*, 2009) y de las vesículas pre-sinápticas en las neuronas glutamatérgicas (Cole *et al.*, 1999), sin embargo, ninguno de los dos tipos de organelos son considerados como almacenes del zinc celular. Recientemente, se han identificado unas vesículas con alto contenido de zinc en el intestino de *Caenorhabditis elegans* que los autores consideran son el sitio de almacenamiento de zinc en este organismo (Roh *et al.*, 2012), sin embargo, el proceso de biogénesis de estas vesículas aún se desconoce. Por otro lado, cuando las moscas silvestres de *Drosophila hydei* se alimentan con una dieta rica en zinc, se observan vesículas con alto contenido de este metal en los túbulos Malpighianos (Zierold y Wessing, 1990), lo que hace suponer que éstas podrían estar participando en la homeostasis del zinc celular.

Los LROs son un sitio de almacenamiento de zinc

La hipótesis de este proyecto es que dichas vesículas son el sitio de almacenamiento de zinc dentro de *Drosophila melanogaster*. Para probar esta hipótesis empleamos al mecanismo de formación de los LROs ya que sirve como herramienta para demostrar si estas vesículas son el sitio de almacenamiento del zinc. Además de trabajar con moscas mutantes en las subunidades del complejo AP-3, empleamos a la mutante *pink* en la subunidad HPS-5 del complejo BLOC-2, a la mutante *lightoid* en la Rab32 y a la mutante *clot* en una tioredoxina, que se localiza dentro de los gránulos.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de zinc en la mosca silvestre (Tan3) y en las mutantes de las subunidades $\mu 3$ (*carmine*), $\beta 3$ (*ruby*) y δ (*garnet*) del complejo AP-3 revelaron que las tres moscas mutantes tienen bajas concentraciones de zinc en comparación con la mosca silvestre, lo que indicaría que el complejo AP-3 estaría involucrado en la homeostasis del zinc celular. Estos datos coinciden con el resultado generado por la microscopía del tejido con FluoZin-3, donde la mosca *carmine* ($\mu 3$) carece de vesículas que almacenan zinc. Estos datos concuerdan con un estudio hecho en el ratón *mocha*, nulo para la subunidad δ de AP-3, donde no se detecta historeactividad al zinc en las vesículas pre-sinápticas de las fibras musgosas del hipocampo (Kantheti *et al.*, 1998).

Con el objetivo de analizar el nivel de zinc en la mutante *carmine* ($\mu 3$) cuando se somete a dietas con alto y bajo zinc, las moscas se desarrollaron en una dieta con un quelante de zinc, TPEN (200 μ M), y en una dieta con 1 mM de zinc. El resultado muestra que cuando las moscas se desarrollaron en la dieta con TPEN el nivel de zinc sólo disminuyó en la mosca silvestre haciéndonos suponer que en la mosca *carmine* ($\mu 3$) no existe más zinc libre que el TPEN pueda quelar, por lo que, el zinc que tiene *carmine* ($\mu 3$) estaría unido a proteínas cumpliendo funciones básicas para la sobrevivencia de la mosca. Por otro lado, el nivel de zinc incrementó tanto en la mosca silvestre como en la mosca *carmine* ($\mu 3$) cuando crecieron en la dieta con 1 mM de zinc, sin embargo, la magnitud del incremento no fue la misma. La mosca

silvestre alcanzó una concentración de zinc casi del doble de la que poseía en condiciones control, mientras que el nivel de zinc en la mosca *carmine* ($\mu 3$) apenas y rebasó el 0.1 mg de zinc/g de masa seca. Este diferencial se puede explicar debido a que la mosca *carmine* ($\mu 3$) carece de vesículas que sean capaces de almacenar el exceso de zinc y su único mecanismo de captura son las metalotioneínas (Mtns).

La carencia de LROs en la mutante *carmine* ($\mu 3$) se reemplaza con la inducción de metalotioneínas

Por lo tanto, el siguiente objetivo fue analizar el nivel de expresión de las cinco Mtns que posee *Drosophila*. El incremento en el nivel de expresión de las cinco Mtns tanto en la mosca silvestre como en la mosca *carmine* ($\mu 3$) da sustento a la hipótesis de que este mecanismo de regulación participa en la captura del zinc en presencia y en ausencia de las vesículas que lo capturan. Estos datos coinciden con un estudio previo donde se vio un incremento en la expresión de las Mtns debido al aumento de zinc (Yepiskoposyan *et al.*, 2006). Un dato interesante es el nivel de expresión de la Mtn A en la mosca *carmine* ($\mu 3$) en la dieta control, siendo éste mayor al que presenta la mosca silvestre en las mismas condiciones. Una posible explicación a este fenómeno es que al carecer de vesículas que capten el zinc, la Mtn A estaría cumpliendo la función de los dos sistemas de captura, por esta razón es necesaria más Mtn A para la captura del metal.

La carencia de LROs en la mutante *carmine* no afecta la sobrevivencia de las moscas en bajas o altas concentraciones de zinc dietético

Conociendo la concentración de zinc y el nivel de expresión de las metalotioneínas en la mosca *carmine* ($\mu 3$), la siguiente pregunta a responder fue si el desarrollo y la progenie se ven afectadas por el bajo nivel de zinc que posee *carmine* ($\mu 3$). La Fig. 12 muestra que no hubo efecto en el desarrollo ni en la sobrevivencia debido a la concentración de zinc dietético. Estos datos concuerdan con los estudios hechos en ratones knockout donde se eliminó el transportador ZnT8 y ZnT3 de los gránulos de insulina (Pound *et al.*, 2009) y de las vesículas pre-sinápticas de las fibras musgosas del hipocampo (Cole *et al.*, 1999), respectivamente, y se vio que los ratones no

exhiben cambio alguno en su desarrollo y comportamiento a pesar de que los gránulos de insulina y las vesículas pre-sinápticas presentan bajas concentraciones de zinc.

Otros mutantes en la vía de formación de los LROs también disminuyen la concentración de zinc en la mosca completa

Además de trabajar con el complejo AP-3, analizamos la concentración de zinc en la mutante *pink* en la subunidad HPS-5 del complejo BLOC-2, en la mutante de *lightoid* (Rab32) y en la mutante *clot* en una tioredoxina. Los resultados mostraron que, tanto la mosca mutante en la subunidad HPS-5 como en la Rab32 tienen bajo nivel de zinc, a diferencia de la mosca *clot* cuya concentración de zinc está por arriba de la que tiene la mosca silvestre.

Implicaciones en el síndrome Hermansky-Pudlak

Este resultado es importante ya que para nuestro conocimiento ésta es la primera evidencia que relaciona a la mutación de la proteína HPS-5, implicada en el síndrome Hermansky-Pudlak (HPS, por sus siglas en inglés), con una deficiencia en los almacenes de zinc. Se sabe que en este síndrome hay malformación de los melanosomas y de los gránulos densos de las plaquetas, los cuales son un tipo de LROs (Huizing *et al.*, 2008), sin embargo, en ningún estudio sobre HPS se ha relacionado este síndrome con una alteración en el nivel de zinc. Adicionalmente, las mutaciones en el gen que codifica a la subunidad $\beta 3$ de AP-3 han sido asociadas con el síndrome Hermansky-Pudlak tipo 2 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1999). Como se mencionó anteriormente la mosca *ruby*, mutante en la subunidad $\beta 3$ de AP-3, presenta un bajo nivel de zinc. Con estos antecedentes nos planteamos la hipótesis de que en el HPS hay un bajo nivel de zinc en el organismo, adicional al fenotipo característico del síndrome.

El papel de Rab32 en el tráfico vesicular

Se conoce que Rab32 y Rab38 participan en la formación de los melanosomas y que median el transporte de las proteínas transmembranales responsables de la

síntesis de melanina (*revisado en* Hearing, 2005). En un estudio con melanocitos knockdown para Rab32 y mutados en un aminoácido de Rab38, se observó que la tirosinasa, enzima que cataliza la síntesis de melanina, dejó de situarse en las vesículas distribuidas a lo largo del citoplasma, en la periferia de la célula y en el Golgi para localizarse casi exclusivamente en la región perinuclear. Este cambio en la distribución subcelular, sugiere que el knockdown de Rab32 es el resultado de una alteración en el tráfico intracelular de la tirosinasa (Wasmeier *et al.*, 2006). Estos antecedentes indican que al alterar a las proteínas Rab32 y Rab38 se altera también la localización de las proteínas transmembranales en los melanosomas. Esto es interesante ya que, en nuestro modelo, el direccionamiento incorrecto de los transportadores de zinc, que estarían introduciendo este elemento desde el citoplasma al interior de los zincosomas, podría explicar la baja concentración de este metal en la mosca mutante en Rab32.

Una observación que puede explicar porque la mosca *clot* tiene niveles de zinc más altos que la mosca silvestre

El gen *clot* codifica para una tiorredoxina requerida para la síntesis de drosopterinas, el componente rojo del ojo de *Drosophila*. La proteína se encuentra dentro los gránulos pigmentarios, sitio donde se almacenan los pigmentos que le dan color al ojo de la mosca. Estos gránulos tienen una proteína transmembranal del tipo ABCG2 que se encarga de transportar al interior una variedad de compuestos, entre ellos la riboflavina, pigmento que se encuentra en mayor cantidad dentro de los túbulos Malpighianos y que le da el color amarillo característico a los túbulos de la mosca silvestre. Si la mutante *carmine* ($\mu 3$) carece de estos gránulos, no tendrá donde almacenar el zinc y la riboflavina, generando una mosca con bajo nivel de zinc y con los túbulos pigmentarios blancos. En la mosca *clot* no tendría por qué existir deficiencia en el zinc debido a que el producto del gen *clot* es una proteína soluble y no transmembranal. Lo que resulta curioso es la alta concentración de zinc que tiene, por arriba de la que posee la mosca silvestre. Un estudio realizado en 1961 por Nolte mostró que en la mutante *clot* los gránulos pigmentarios de las células pigmentarias primarias y de las células en la parte basal de la retínula son

más grandes que en la mosca silvestre. Esta observación de Nolte sugiere que el aumento del tamaño de los LROs en el mutante *clot* podría coincidir con el aumento de zinc que se almacena en la mosca completa.

CONCLUSIONES

En este trabajo concluimos que:

1. El complejo AP-3 es necesario para la formación de los zincosomas en los túbulos Malpighianos.
2. Cuando hay ausencia de zincosomas se induce la expresión de la metalotioneína A de la mosca *carmine* ($\mu 3$) en la dieta control.
3. La subunidad HPS5 del complejo BLOC-2 y la Rab32 están involucrados en el almacén de zinc.

PERSPECTIVAS

Las principales perspectivas de este trabajo son:

1. Confirmar la inducción de metalotioneínas mediante PCR en tiempo real.
2. Dado que las metalotioneínas compensan la falta de zincosomas. Analizar el desarrollo de la mosca que resulte de la cruce entre la mosca *carmine* ($\mu 3$) y la mosca mutante en la metalotioneína A.
3. Teniendo en cuenta la baja concentración de zinc en la mutante en la subunidad HPS5 de BLOC-2 y en Rab32, observar mediante tinción con FluoZin-3 la presencia o ausencia de los zincosomas.
4. Debido a la respuesta que se observó al someter a la mosca silvestre a dietas con diferente concentración de zinc. Analizar la capacidad de los zincosomas como almacenes de zinc.

BIBLIOGRAFÍA

- Afshar, N., Argunhan, B., Betti, L., Szular, J., & Missirlis, F. (2013). A recessive X-linked mutation causes a threefold reduction of total body zinc accumulation in *Drosophila melanogaster* laboratory strains. *FEBS open bio*, 3, 302-304.
- Asensio, C. S., Sirkis, D. W., Maas Jr, J. W., Egami, K., To, T. L., Brodsky, F. M., Shu, X., Cheng, Y., Edwards, R. H. (2013). Self-assembly of VPS41 promotes sorting required for biogenesis of the regulated secretory pathway. *Developmental cell*, 27(4), 425-437.
- Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Crowfoot-Hodgkin, D.M., Hubbard, R.E., Isaacs, N.W., Reynolds, C.D., Sakabe, K., Sakabe, N., Vijayan, N. M. (1988). The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 319(1195), 369-456.
- Balderhaar, H. J., & Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science*, 126(6), 1307-1316.
- Boehm, M., Aguilar, R. C., & Bonifacino, J. S. (2001). Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *The EMBO journal*, 20(22), 6265-6276.
- Bonifacino, J. S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *The Journal of cell biology*, 204(1), 7-17.
- Brehme, K. S., & Demerec, M. (1942). A survey of Malpighian tube color in the eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Growth*, 6(3), 351-355.
- Cole, T. B., Wenzel, H. J., Kafer, K. E., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (1999). Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1716-1721.
- Colvin, R. A., Davis, N., Nipper, R. W., & Carter, P. A. (2000). Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain. *Neurochemistry international*, 36(6), 539-547.
- Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W., & Bonifacino, J. S. (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *The EMBO journal*, 16(5), 917-928.
- Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., & Bonifacino, J. S. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, 280(5362), 431-434.

- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., & Bonifacino, J. S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *Journal of biological chemistry*, 274(11), 7278-7285.
- Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A., & Bonifacino, J. S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Molecular cell*, 3(1), 11-21.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S., & Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *The FASEB Journal*, 14(10), 1265-1278.
- Di Pietro, S. M., Falcón-Pérez, J. M., Tenza, D., Setty, S. R., Marks, M. S., Raposo, G., & Dell'Angelica, E. C. (2006). BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Molecular biology of the cell*, 17(9), 4027-4038.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15665-15670.
- Evans, J. M., Day, J. P., Cabrero, P., Dow, J. A., & Davies, S. A. (2008). A new role for a classical gene: white transports cyclic GMP. *Journal of Experimental Biology*, 211(6), 890-899.
- Ewart, G.D. & Howells, A.J. (1998). ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Methods in Enzymology*, 292: 213-24.
- Falcón-Pérez, J. M., Romero-Calderón, R., Brooks, E. S., Krantz, D. E., & Dell'Angelica, E. C. (2007). The *Drosophila* pigmentation gene pink (p) encodes a homologue of human Hermansky-Pudlak syndrome 5 (HPS5). *Traffic*, 8(2), 154-168.
- Feng, L., Seymour, A. B., Jiang, S., To, A., Peden, A. A., Novak, E. K., Zhen, L., Rusiniak, M. E., Eicher, E. M., Robinson, M. S., Gorin, M. B., & Swank, R. T. (1999). The β 3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Human molecular genetics*, 8(2), 323-330.
- Fosmire, G. J. (1990). Zinc toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, 51(2), 225-227.

- Frederickson, C. J., Suh, S. W., Silva, D., Frederickson, C. J., & Thompson, R. B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1471S-1483S.
- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2000). Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5560-5564.
- Hambidge, M. (2000). Human zinc deficiency. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1344S-1349S.
- Haug, F. M. (1967). Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie*, 8(4), 355-368.
- Havu, N., Lundgren, G., & Falkmer, S. (1977). Zinc and manganese contents of micro-dissected pancreatic islets of some rodents. *Acta endocrinologica*, 86(3), 570-577.
- Hearing, V. J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of dermatological science*, 37(1), 3-14.
- Hersh, B. M., Hartweg, E., & Horvitz, H. R. (2002). The *Caenorhabditis elegans* mucolipin-like gene *cup-5* is essential for viability and regulates lysosomes in multiple cell types. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4355-4360.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B. and Robinson, M. S. (2011) The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol.*9, e1001170
- Hirst, J., Edgar, J. R., Esteves, T., Darios, F., Madeo, M., Chang, J., & Robinson, M. S. (2015). Loss of AP-5 results in accumulation of aberrant endolysosomes: defining a new type of lysosomal storage disease. *Human molecular genetics*, ddv220.
- Howells, A. J., Summers, K. M., & Ryall, R. L. (1977). Developmental patterns of 3-hydroxykynurenine accumulation in white and various other eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochemical genetics*, 15(11-12), 1049-1059.
- Huizing, M., Helip-Wooley, A., Westbroek, W., Gunay-Aygun, M., & Gahl, W. A. (2008). Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 359.
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*, 91(1), 119-149.

- Jung, A. C., Denholm, B., Skaer, H., & Affolter, M. (2005). Renal tubule development in *Drosophila*: a closer look at the cellular level. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(2), 322-328.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., & Nagao, M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(1), 49-68.
- Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M.E., Peden, A.A., Meyer, G.E., Carskadon, S.L., Kapfhamer, D., Sulfalko, D., Robinson, M.S., Noebels, J.L., & Burmeister, M. (1998). Mutation in AP-3 δ in the mocha Mouse Links Endosomal Transport to Storage Deficiency in Platelets, Melanosomes, and Synaptic Vesicles. *Neuron*, 21(1), 111-122.
- Krstic ,D., Boll, W. & Noll, M. (2013) Influence of the White Locus on the Courtship Behavior of *Drosophila* Males. *PLoS ONE* 8(10): e77904.
- Laity, J. H., & Andrews, G. K. (2007). Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Archives of biochemistry and biophysics*, 463(2), 201-210.
- Li, W., Zhang, Q., Oiso, N., Novak, E. K., Gautam, R., O'Brien, E. P., Tinsley, C. L., Blake, D. J., Spritz, R. A., Copeland, N. G. et al. (2003) Hermansky–Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nature Genetics*, 35(1), 84-89.
- Lloyd, V. (1995). Genetic and molecular analysis of the garnet eye colour gene of *Drosophila melanogaster* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).
- Lodish, H., & Zipursky, S. L. (2008). *Molecular cell biology* (Vol. 6). New York: WH Freeman.
- Lye, J. C., Richards, C. D., Dechen, K., Paterson, D., de Jonge, M. D., Howard, D. L., Warr, C.G., & Burke, R. (2012). Systematic functional characterization of putative zinc transport genes and identification of zinc toxicosis phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology*, 215(18), 3254-3265.
- Maret, W. (2001). Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis—recent insights and current trends. *Biometals*, 14(3), 187-190.
- Marks, M. S., Heijnen, H. F., & Raposo, G. (2013). Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream. *Current opinion in cell biology*, 25(4), 495-505.

- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., & Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *The Journal of cell biology*, 162(5), 909-918.
- Morgan, T. H. (1916). Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32(812), 120-122.
- Nazarian, R., Falcón-Pérez, J. M., & Dell'Angelica, E. C. (2003). Biogenesis of lysosome-related organelles complex 3 (BLOC-3): a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) proteins HPS1 and HPS4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8770-8775.
- Nickla, H. (1972). Interaction between pteridine synthesis and riboflavin accumulation in *Drosophila melanogaster*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14(1), 105-111.
- Nolte, D. J. (1961). The pigment granules in the compound eyes of *Drosophila*. *Heredity*, 16, 25-38.
- Ooi, C.E., Moreira, J. E., Dell'Angelica, E. C., Poy, G., Wassarman, D. A., & Bonifacino, J. S. (1997). Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant garnet. *The EMBO Journal*, 16(15), 4508-4518.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., & Findley, S. D. (1996). ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *The EMBO journal*, 15(8), 1784.
- Park, S. Y., & Guo, X. (2014). Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Bioscience reports*, 34(4), 381-390.
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H., & Klumperman, J. (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *The Journal of cell biology*, 164(7), 1065-1076.
- Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, 7(4), 1342-1365.
- Pound, L., Sarkar, S., Benninger, R., Wang, Y., Suwanichkul, A., Shadoan, M., Printz, R., Oeser, J., Lee, C., Piston, D., McGuinness, O., Hutton, J., Powell, D., & O'Brien, R. (2009). Deletion of the mouse *Slc30a8* gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *Biochem. J*, 421, 371-376.

- Qin, Q., Wang, X., & Zhou, B. (2013). Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for dietary zinc absorption and regulation. *BMC biology*, 11(1), 101.
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 786-797.
- Rappoport, J. Z., & Simon, S. M. (2009). Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *Journal of cell science*, 122(9), 1301-1305.
- Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D. J., & Emr, S. D. (1999). Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nature Cell Biology*, 1(6), 346-353.
- Roh, H. C., Collier, S., Guthrie, J., Robertson, J. D., & Kornfeld, K. (2012). Lysosome-Related Organelles in Intestinal Cells Are a Zinc Storage Site in *C. elegans*. *Cell metabolism*, 15(1), 88-99.
- Sadraie, M., & Missirlis, F. (2011). Evidence for evolutionary constraints in *Drosophila* metal biology. *Biometals*, 24(4), 679-86.
- Sato, K., Norris, A., Sato, M., & Grant, B. D. (2014). *C. elegans* as a model for membrane traffic. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1.
- Shulenin, S., Schriml, L. M., Remaley, A. T., Fojo, S., Brewer, B., Allikmets, R., & Dean, M. (2001). An ATP-binding cassette gene (ABCG5) from the ABCG (White) gene subfamily maps to human chromosome 2p21 in the region of the Sitosterolemia locus. *Cytogenetic and Genome Research*, 92(3-4), 204-208.
- Simpson, F., Peeden, A.A., Christopoulou, L., & Robinson, M.S. (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol*, 137(4), 835-45.
- Singh, S. R., Liu, W., & Hou, S. X. (2007). The adult *Drosophila* malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells. *Cell stem cell*, 1(2), 191-203.
- Shoup, J. R. (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology*, 29(2), 223-249.
- Suzuki, T., Oiso, N., Gautam, R., Novak, E. K., Panthier, J. J., Suprabha, P. G., Vida, T., Swank, R.T., Spritz, R. A. (2003). The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in Vps33a, a homologue of yeast vps33 and *Drosophila* carnation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1146-1150.

- Sullivan, D. T., Grillo, S. L., & Kitos, R. J. (1974). Subcellular localization of the first three enzymes of the ommochrome synthetic pathway in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 188(2), 225-233.
- Sullivan, D. T., & Sullivan, M. C. (1975). Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochemical genetics*, 13(9-10), 603-613.
- Sullivan, D.T., Bell, L.A., Paton, D.R., Sullivan, M.C. (1979). Purine transport by Malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet*, 17(5-6):565-73.
- Sullivan, D.T., Bell, L.A., Paton, D.R., Sullivan, M.C. (1980). Genetic and functional analysis of tryptophan transport in Malpighian tubules of *Drosophila*. *Biochem Genet*, 18(11-12):1109-30.
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.
- Theos, A. C., Tenza, D., Martina, J. A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., Stewart, A., Robinson, M. S., Benneth, D.C., Cluter, D.F., Raposo, G. *et al.*, (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Molecular biology of the cell*, 16(11), 5356-5372.
- Walker, C. F., & Black, R. E. (2004). Zinc and the risk for infectious disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 255-275.
- Wasmeier, C., Romao, M., Plowright, L., Bennett, D. C., Raposo, G., & Seabra, M. C. (2006). Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *The Journal of cell biology*, 175(2), 271-281.
- Wei, M. L. (2006). Hermansky–Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Research*, 19(1), 19-42.
- Wellenreuther, G., Cianci, M., Tucoulou, R., Meyer-Klaucke, W., & Haase, H. (2009). The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(1), 198-203.
- White, C., Gadd, G. M. (1987). The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 133(3), 727-737.
- Yepiskoposyan, H., Egli, D., Fergestad, T., Selvaraj, A., Treiber, C., Multhaup, G., Georgiev, O., & Schaffner, W. (2006). Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic acids research*, 34(17), 4866-4877.

Zierold, K., & Wessing, A. (1990). Mass dense vacuoles in *Drosophila* Malpighian tubules contain zinc, not sodium. A reinvestigation by X-ray microanalysis of cryosections. *European journal of cell biology*, 53(2), 222-226.