



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Las células primarias de los túbulos Malpighianos de
Drosophila melanogaster almacenan zinc en organelos
relacionados a los lisosomas”**

Tesis que presenta:

M. en C. Carlos Alberto Tejeda Guzmán

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Fisiología Celular y Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Fanis Missirlis

Ciudad de México

Diciembre, 2021

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 2015 a agosto del 2019 para la realización de mis estudios de doctorado que concluyen con esta tesis, como producto final del Doctorado en Fisiología Celular y Molecular en el CINVESTAV.

Agradecimientos

Mi más grande agradecimiento va para mi director de tesis, el Dr. Fanis Missirlis, por compartirme sus experiencias de vida y por transmitirme los conocimientos que me sirvieron para desarrollar este proyecto pero sobre todo por la paciencia que tuvo de esperar a que este proyecto llegara a su fin.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Marcos Nahmad y al Dr. Gerardo Contreras, que cada semestre me brindaban los comentarios que me ayudaban a conducir el proyecto de la mejor manera posible. Del mismo modo agradezco a las Dras. Liliana Quintanar y Rosa Navarro por tomarse el tiempo de revisar la tesis, a pesar de las actividades que les ocupan.

Les agradezco a mis compañeras de laboratorio Karen, Isabel, Rosalilia, Johana y Erika 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 por su apoyo con el trabajo en el laboratorio y por compartir su conocimiento acerca del desarrollo de las técnicas que yo desconocía. Así mismo, deseo agradecer a Benjamín Muñoz, técnico del laboratorio, por su apoyo con la elaboración de los múltiples estilos de comida para las moscas.

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 al pendiente de mí a pesar de la distancia.

A mis queridos abuelitos, Tere y Toño, que siempre me han apoyado y siempre los llevo en mis pensamientos.

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

A mis amigos, a los que ya no están pero que junto conmigo comenzaron este camino. A los que permanecen, con los que sigo caminando hombro a hombro. Y a los que llegaron, con lo que he comenzado a compartir mi vida.

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

Al resto de mis conocidos y conocidas, 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.

**“Las células primarias de los túbulos
Malpighianos de *Drosophila melanogaster*
almacenan zinc en organelos relacionados
a los lisosomas”**

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
La mosca mutante <i>white</i>	10
Transportadores ABCG2 en <i>D. melanogaster</i>	12
Deficiencia en zinc ligada al cromosoma X	13
Complejo AP-3	15
Organelos Relacionados a los Lisosomas.....	17
Complejos involucrados en la biogénesis de los LROs	19
Síndrome de Hermansky-Pudlak.....	23
Transportadores de zinc.....	23
Los túbulos Malpighianos de <i>D. melanogaster</i>	28
Metalotioneínas y MTF-1	29
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
METODOLOGÍA	33
Mantenimiento de los stocks	33
Sistema Gal4/UAS.....	34
Espectrometría de absorción atómica	34
Microscopia de fluorescencia	35
Microscopia de fluorescencia por rayos X de alta energía	35
RT-PCR	36
RESULTADOS	38
La delección del gen <i>white</i> de <i>D. melanogaster</i> disminuye el contenido de zinc	38
Rescate ubicuo de la mosca <i>white</i>	39
.....	40
Las moscas mutantes en la ruta de biogénesis de los LROs tienen bajo nivel de zinc.....	41

Las moscas con una concentración deficiente de zinc presentan problemas para acumular riboflavina en los túbulos Malpighianos	42
La riboflavina disminuye el contenido sistémico de zinc.....	44
El zinc se almacena en los túbulos Malpighianos de <i>D. melanogaster</i>	45
Microscopia de rayos X demuestra la presencia de zinc en los túbulos Malpighianos de <i>D. melanogaster</i>	46
Gránulos con el transportador ZnT35C en los túbulos Malpighianos de <i>D. melanogaster</i>	47
Zinc en los túbulos Malpighianos de <i>D. melanogaster</i>	48
Expresión de metalotioneínas	49
Moscas mutantes en enzimas de las vías de síntesis de los omocromos y las drospterinas tienen defectos con el almacenamiento de zinc	51
DISCUSIÓN	53
Almacenamiento de zinc en <i>D. melanogaster</i> y otros animales	53
Los LROs como posibles almacenes de metales	55
Regulación de zinc a nivel sistémico	58
El uso de la mutante <i>white</i> como control experimental en los laboratorios de <i>D. melanogaster</i>	61
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65

RESUMEN

El zinc es uno de los metales de importancia biológica ya que participa como cofactor en la actividad enzimática o en el plegamiento y estabilidad estructural de una gran variedad de proteínas involucradas en procesos como la transcripción del ADN, la secreción celular y la remodelación de la matriz extracelular, entre otros. Los animales contienen sistemas para regular la concentración de los metales a nivel fisiológico para incrementar la absorción de los mismos cuando son necesitados, evitando a la vez su acumulación que puede causar daño tisular. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cómo se da la regulación sistémica en el caso de zinc. En este trabajo mostré que *Drosophila melanogaster* almacena zinc en organelos relacionados a los lisosomas (LROs) presentes en las células primarias de los túbulos Malpighianos, el principal órgano excretor del insecto. Adicionalmente, estos organelos de almacenamiento de zinc están regulados por los genes que participan en la formación de los LROs, pero sorprendentemente también por intermediarios en la ruta de degradación del triptófano, conocida también como la ruta de las quinureninas. La demostración que el triptófano dietético está participando en la homeostasis del zinc sugiere que la vía de las quinureninas forma parte del sistema regulatorio de zinc en los insectos. En esta tesis demostré el sitio subcelular, celular y tisular de los almacenes de zinc en un animal completo e identifiqué una vía metabólica que regula la cantidad de zinc que se almacena.

ABSTRACT

Zinc is one of the biologically important metals, participating as an indispensable cofactor for enzymatic activity or for the folding and structural stability of a large variety of proteins. Examples of cellular processes where these proteins participate include DNA transcription, protein secretion and extracellular matrix reorganization, amongst others. Animals have systems to regulate the concentration of metals at the physiological level, so as to increase their absorption when they are needed, avoiding at the same time their over-accumulation, which can cause tissue damage. Up to date, however, it remains unclear how systemic regulation of zinc operates in animals. In this thesis, I showed that *Drosophila melanogaster* stores zinc in lysosome-related organelles (LROs), which are present in primary Malpighian tubule cells. Malpighian tubules are the main excretory organ of insects. Furthermore, these zinc storage granules are regulated by genes that are involved in LRO biogenesis. Surprisingly, they are also regulated by intermediate metabolites in the tryptophan degradation pathway, also known as the kynurenine pathway. The demonstration that dietary tryptophan participates in zinc homeostasis suggests that the kynurenine pathway forms part of the zinc regulatory system, in insects. In this thesis, I identified the subcellular, cellular and tissue localization of stored zinc in an entire animal and showed a metabolic pathway that regulates the quantity of zinc being stored.

INTRODUCCIÓN

Desde mediados del siglo pasado la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, comenzó a formar parte de múltiples estudios científicos que se han desarrollado alrededor del mundo. En ese entonces, e inspirado en las recién re-descubiertas leyes de la herencia de Gregor Mendel, Thomas Hunt Morgan fue uno de los primeros genetistas en utilizar a *D. melanogaster* como modelo de estudio. Años más tarde, Morgan obtendría el premio Nobel de Fisiología por sus descubrimientos sobre el papel que juegan los cromosomas en la herencia (*Thomas H. Morgan - Facts - NobelPrize.Org, 2020*), dando lugar a nuevos caminos en el estudio de la genética y permitiendo que un total de seis premios Nobel hayan sido otorgados por investigaciones realizadas en la mosca de la fruta (*Why Fly? | Droso4schools, n.d.*).

La mosca mutante *white*

Una de las aportaciones de Morgan fue el descubrimiento de la mosca mutante *white*, llamada así por el color blanco de sus ojos. Éste hallazgo llevó a Morgan a demostrar que los genes eran objetos físicos relacionados a los cromosomas y no sólo construcciones teóricas que explicaban los patrones de la herencia (Morgan, 1910).

La mosca mutante *white*, junto con la mosca mutante *rosy*, fueron de los primeros organismos en ser utilizados en los laboratorios para comprender la transferencia de genes mediada por elementos P, que son secuencias de ADN con un tamaño que oscila entre las 0.5 y las 2.9 kb (Hazelrigg et al., 1984; Rubin & Spradling, 1982), sin embargo, la mosca mutante *rosy* sería menos usada debido a que su expresión dependía del sitio donde había sido insertada la secuencia de ADN (Hazelrigg et al., 1984). Abriendo paso a un sinnúmero de investigaciones donde la mosca mutante *white* sería utilizada como control experimental. Actualmente, la mayoría de los laboratorios que usan a *D. melanogaster* como modelo de estudio continúan empleando a la mosca

mutante *white* como control experimental sin tomar en cuenta las implicaciones que dicha mutación puede acarrear en los resultados experimentales. Hasta la fecha se desconocen todas las repercusiones que la mutación puede causar por lo que cualquier estudio que se encargue de analizar el fenotipo causado en la mosca será muy relevante para re-pensar las investigaciones ya realizadas.

La mosca mutante *white* adquiere el fenotipo de ojo blanco debido a una mutación en el gen *white* ubicado en el cromosoma X (O'Hare et al., 1984). Este gen está altamente expresado en tres tejidos de la mosca: los túbulos Malpighianos, el cuerpo graso y los ojos de la mosca (*FlyBase Gene Report: Dme/lw*, 2020). Se ha demostrado que la proteína codificada por el gen *white* actúa junto con las proteínas codificadas por los genes *brown* y *scarlet*, quienes se expresan ampliamente en los mismos tejidos, con la peculiaridad de que, en los túbulos Malpighianos, lo hacen según la etapa del desarrollo: *brown* se expresa más en el estadio larvario mientras que *scarlet* lo hace más en la etapa adulta (*FlyBase Gene Report: Dme/lbw*, 2020; *FlyBase Gene Report: Dme/lv*, 2020) (Fig. 1).

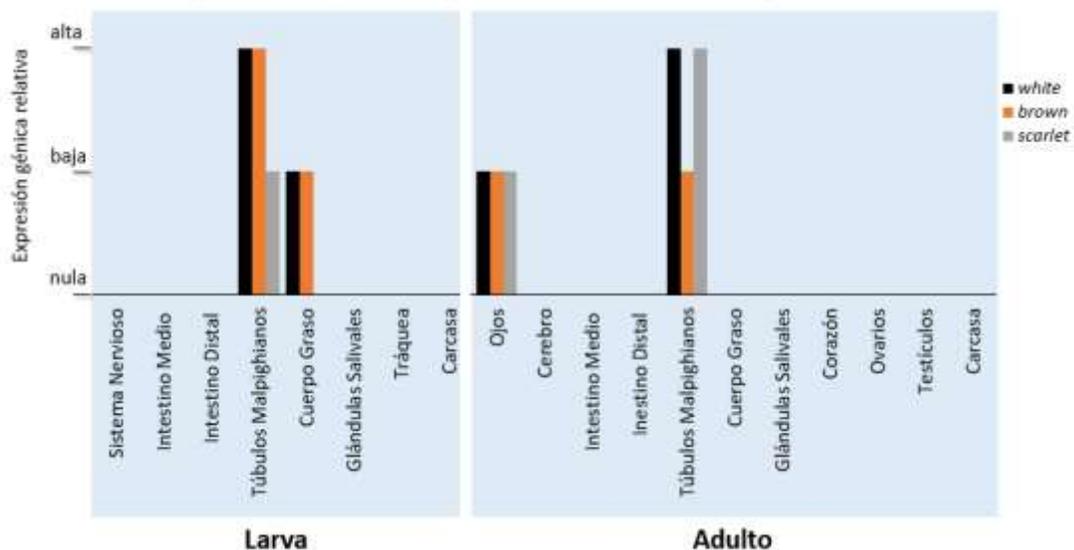


Fig. 1. Expresión de los genes *white*, *brown* y *scarlet* en tejidos de *D. melanogaster*. En el estadio larvario la expresión de los genes *white* y *brown* en los túbulos Malpighianos es similar, mientras que en la etapa adulta la expresión del gen *scarlet* es similar a la del gen *white*.

Transportadores ABCG2 en *D. melanogaster*

Los genes *white*, *scarlet* y *brown* codifican bombas de tipo ABC (Con Casete de unión al ATP) denominadas ABCG2, las cuales movilizan sustratos de un lado a otro de la membrana lipídica mediante la hidrólisis del ATP (Mount, 1987). Las tres proteínas son homólogas entre sí y forman los dímeros necesarios para el transporte y la síntesis de los pigmentos en el ojo de la mosca. El dímero *white-scarlet* participa en la síntesis de los omocromos (pigmentos cafés) transportando su precursor inmediato, la 3-hidroxiquinurenina, sintetizado a partir del triptófano y el dímero *white-brown* permite la síntesis de las drospterinas (pigmentos rojos) transportando a 6-piruviltetrahydropterina, a partir del GTP (Dreesen *et al.*, 1988; Mackenzie *et al.*, 2000) (Fig. 2). Cabe subrayar que la expresión de los tres genes en los túbulos Malpighianos es mayor que en los ojos de la mosca, en contra de lo que sugiere su participación en la formación de los pigmentos de los ojos (*FlyBase Gene Report: Dmel\bw*, 2020; *FlyBase Gene Report: Dmel\lv*, 2020; *FlyBase Gene Report: Dmel\lw*, 2020) (Fig. 1).

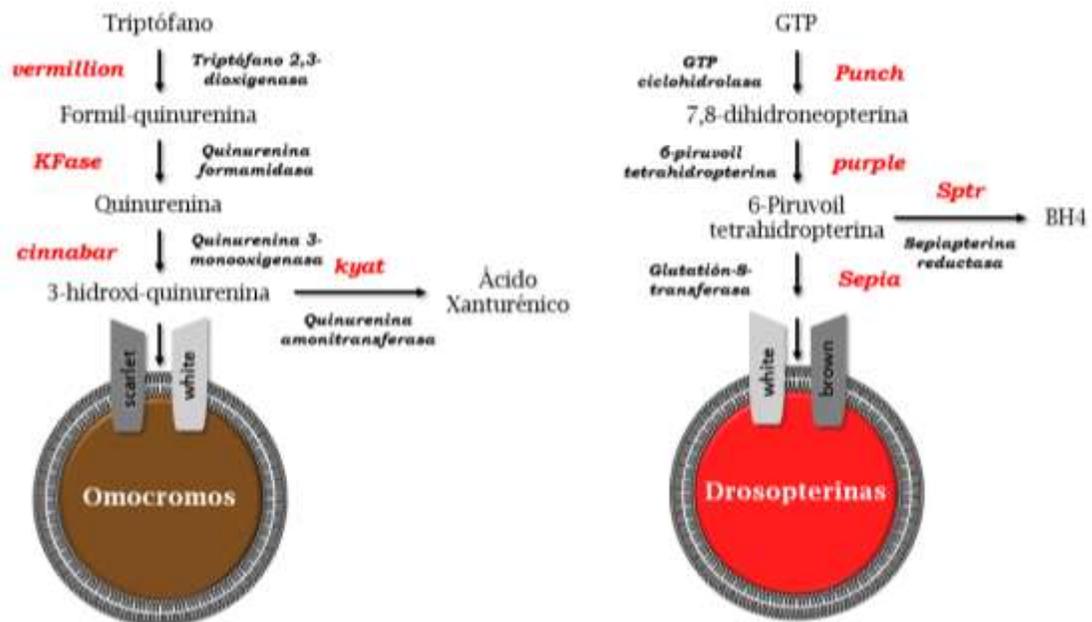


Fig. 2. Ruta de biosíntesis de los pigmentos de los ojos de *D. melanogaster*. Los pigmentos oculares son la combinación de los omocromos y drospterinas derivados del triptófano y GTP, respectivamente. En letras rojas se mencionan los nombres de los genes en *D. melanogaster* que codifican para las enzimas denominadas con letras negras oscuras. BH4: tetrahydrobiopterina (cofactor de varios enzimas).

Las bombas ABC están conservados evolutivamente y han sido estudiadas por su implicación en la resistencia celular a los fármacos (Dean *et al.*, 2001). Cuentan con cuatro dominios proteicos, dos de ellos están embebidos en la membrana lipídica formando el poro a través del cual serán transportados los sustratos y los otros dos están asociados fuera de la membrana haciendo la función de ATPasas (Taylor *et al.*, 2017) (Fig. 3).

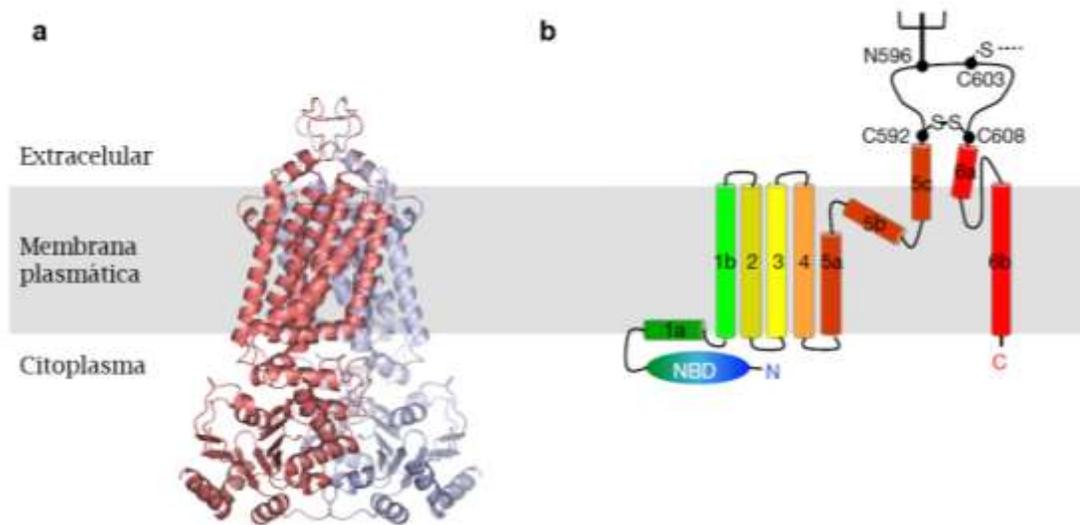


Fig. 3. Estructura de la ATPasa ABCG2 humana. (a) Diagrama de listones de la ABCG2, cada una de las subunidades se muestra en colores diferentes. (b) Topología de los dominios transmembranales, los residuos de cisteína se encuentran formando puentes disulfuro inter e intramoleculares. Modificado de Taylor *et al.*, 2017.

Deficiencia en zinc ligada al cromosoma X

Como se verá más adelante en este estudio, mutaciones en los genes *white* y *carmine* causan un déficit de zinc en las moscas (Tejeda-Guzmán *et al.*, 2018). Se llegó a esta conclusión debido a que en el grupo de trabajo del Dr. Fanis Missirlis se encontró que una mutación ligada al cromosoma X era causante de una reducción en la concentración total de zinc en varias cepas de *D. melanogaster* (Afshar *et al.*, 2013). Para identificar al gen implicado en el déficit del zinc realizaron un mapeo genético del cromosoma X. Utilizaron una mosca con baja concentración de zinc mutante en los genes, *carmine*, *miniature*,

scalloped, *unpaired* y la cruzaron con la mosca silvestre *Tan3* (normal zinc), con el objetivo de separar cada uno de los genes mutados e identificar con cuál de ellos se asocia la disminución en la concentración de zinc. Obtuvieron que un gen muy cercano a la mutación en el gen *carmine* estaba implicado en el déficit de zinc. Para identificar con mayor exactitud al gen responsable emplearon a una nueva mosca mutante en los genes *white*, *crossveinless*, *tan* ubicados a la izquierda del gen *carmine*. De este nuevo rastreo obtuvieron que un gen muy cercano a la mutación en el gen *white* también estaba implicado en la disminución de zinc. Por lo tanto, del estudio concluyeron que en dos *loci* del cromosoma X cercanos a los genes *white* y *carmine* se ubicaban mutaciones que generaban déficit de zinc (Fig. 4).

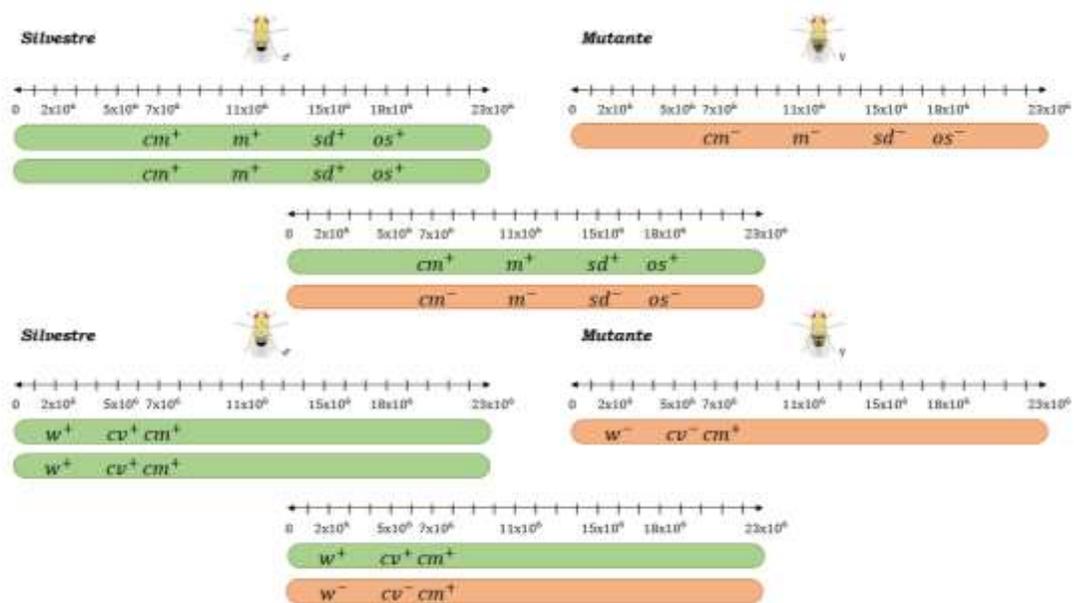


Fig. 4. Estrategia utilizada para localizar la mutación ligada al déficit de zinc. En verde se representa el cromosoma X de la mosca silvestre *Tan3* y en naranja se representa el cromosoma X de las moscas mutantes con baja concentración de zinc. En la línea recta se representa el *locus* aproximado de cada uno de los genes implicados en el mapeo de las mutaciones relacionadas con la deficiencia de zinc. De las hembras heterocigotas mostradas en la figura salen machos recombinantes que separan los fenotipos de los marcadores, mismos que se analizaron por su contenido en zinc (Tejeda-Guzmán *et al.*, 2018).

Complejo AP-3

El gen *carmine* codifica para la subunidad $\mu 3$ del complejo AP-3 (por sus siglas en inglés, Adaptor Protein 3) (Mullins *et al.*, 1999). Este complejo es un heterotetrámero compuesto por 4 subunidades, $\beta 3$ (Kretschmar *et al.*, 2000), δ (Ooi *et al.*, 1997), $\mu 3$, y $\sigma 3$ (Mullins *et al.*, 2000) (Fig. 5) que recubren a vesículas u organelos mediando el transporte de proteínas de membrana entre compartimentos celulares como el Golgi, los endosomas y los organelos relacionados a los lisosomas o LROs (por sus siglas en inglés, Lysosome-related organelles) (Nakatsu & Ohno, 2003).

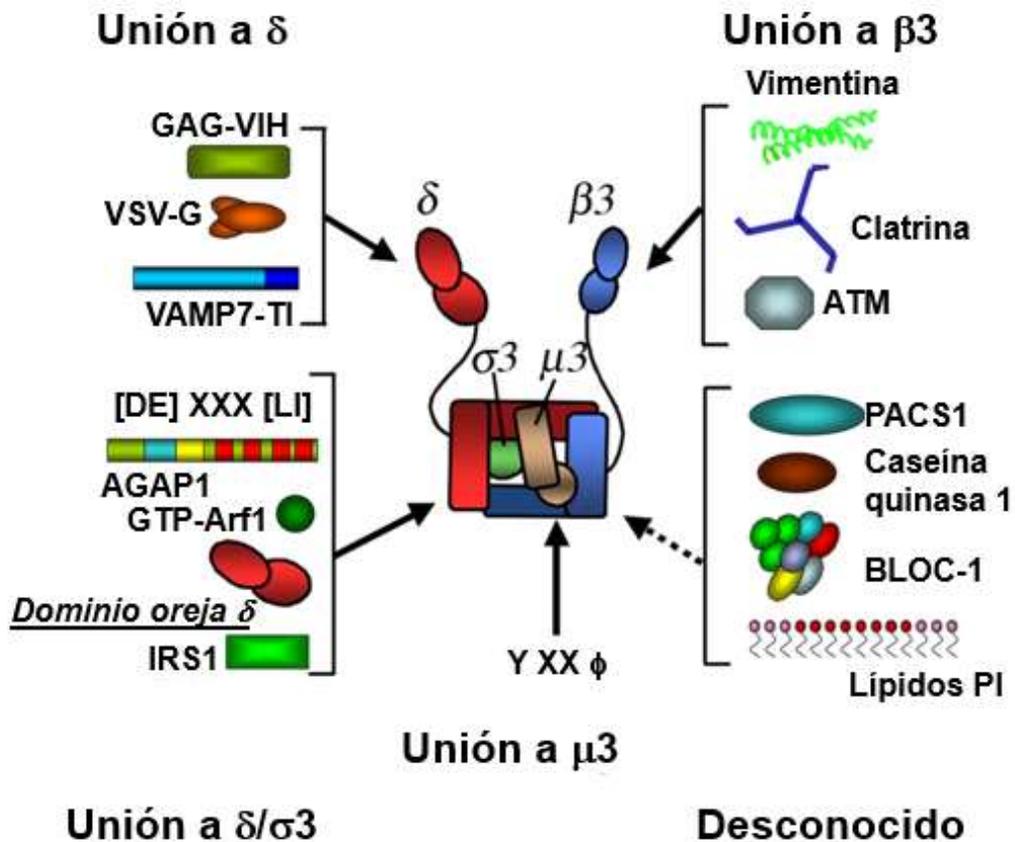


Fig. 5. Interacciones moleculares del complejo AP-3. Las interacciones moleculares con AP-3 en donde se conoce la subunidad de interacción se indican con líneas continuas mientras que aquellas donde se desconoce la subunidad de interacción se indican con una línea discontinua. Modificado de Newell-Liwa *et al.* 2007.

D. melanogaster cuenta con genes homólogos para las cuatro subunidades del complejo AP-3 y, al igual que la mosca mutante *white*, las moscas mutantes en dichos genes reciben su nombre de acuerdo al fenotipo que adquieren los ojos de la mosca, así entonces las moscas mutantes en las subunidades $\beta 3$, δ , $\mu 3$ y $\sigma 3$ reciben los nombres de *ruby*, *garnet*, *carmine* y *orange* respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Función de las subunidades del complejo AP-3.

Subunidad	<i>Drosophila</i>	Función	Referencias
$\beta 3$	<i>ruby</i>	Recluta a la clatrina a través de la secuencia de unión a clatrina: L(L, I)(D, E, N)(L, F)(D, E)	(Dell'Angelica <i>et al.</i> , 1998)
δ	<i>garnet</i>	Media la fusión de la vesícula u organelo con la membrana del organelo blanco a través de la subunidad Vps41 del complejo HOPS ^a	(Balderhaar & Ungermann, 2013)
$\mu 3$	<i>carmine</i>	Reconoce a las proteínas carga a través de motivos basados en residuos de di-leucina [DE]XXXL[LI] (donde X puede ser cualquier aminoácido) o de tirosina YXX ϕ (donde ϕ representa a un aminoácido con la cadena lateral hidrófoba)	(Bonifacino & Traub, 2003)
$\sigma 3$	<i>orange</i>	Estabiliza el complejo AP-3 ^b	(Collins <i>et al.</i> , 2002)

^a Descrito en levadura.

^b Descrito para el complejo AP-2 y extrapolado al complejo AP-3.

Estas mutantes fueron de las primeras moscas en ser estudiadas (Beadle & Ephrussi, 1936) y, por tal razón, se conocen ampliamente los detalles del fenotipo de sus ojos. Uno de estos detalles es la disminución de la cantidad de gránulos pigmentarios en las células primarias y secundarias de los omatidios, la unidad fundamental del ojo de *D. melanogaster*, en comparación con las moscas silvestres (Fig. 6), que resulta en la reducción de los omocromos y las drosopterinas (Ferré *et al.*, 1986), sugiriendo que el complejo AP-3 es crítico

para la formación de los gránulos pigmentarios (Kretzschmar *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 1999, 2000; Ooi *et al.*, 1997).

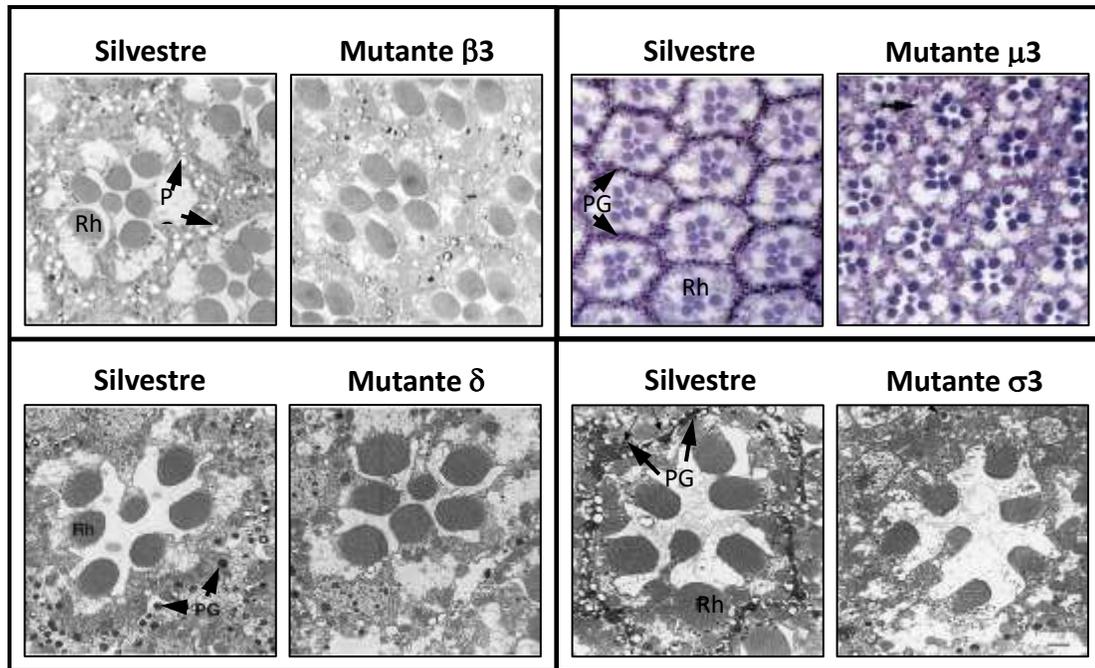


Fig. 6. Consecuencias de las mutaciones en las subunidades del complejo AP-3 de *D. melanogaster*. Micrografías de cortes transversales de los ojos de moscas silvestres y mutantes en las subunidades del complejo AP-3. En los cortes de las moscas mutantes se observa la disminución en la cantidad de gránulos pigmentarios. Los gránulos están indicados por las flechas. PG: gránulos pigmentarios, Rh: rabdómeros. Imágenes tomadas de las referencias listadas en la Tabla 1.

Organelos Relacionados a los Lisosomas

Cabe resaltar que los gránulos pigmentarios forman parte de los LROs, nombrados así por la presencia de proteínas lisosomales asociadas a la membrana y la reactividad a colorantes específicos para lisosomas como el LysoTracker (Hersh *et al.*, 2002). Dentro de los LROs podemos encontrar a los melanosomas, a los gránulos líticos, a los compartimentos del MHC clase II, a los gránulos densos de plaquetas, a los gránulos basófilos, a los gránulos azurofílicos, las vesículas pre-sinápticas, a los gránulos de insulina y a los gránulos pigmentarios de *D. melanogaster* (Fig. 7). Estos organelos difieren

entre sí por sus componentes tejido-específicos lo que los hace responsables de su función especializada (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

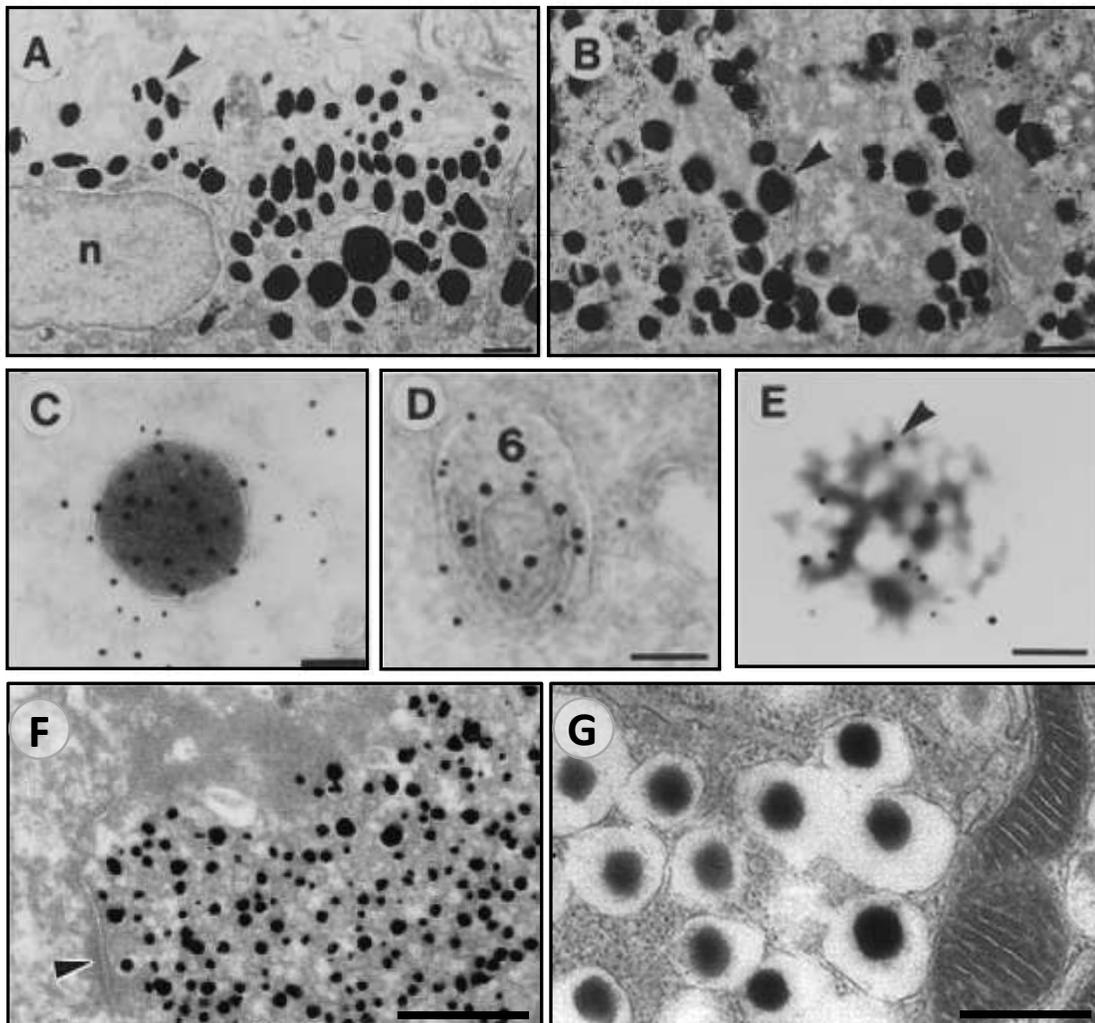


Fig. 7. Tipos de organelos relacionados a los lisosomas. Micrografías electrónicas de organelos relacionados a los lisosomas en organismos eucariotas. (A) Melanosomas en células epiteliales pigmentadas de la retina de ratón. La punta de flecha apunta a un melanosoma individual. n: núcleo. Barra, 1 μm . (B) Gránulos pigmentarios en una sección longitudinal del ojo de *D. melanogaster*. La punta de flecha apunta a un gránulo pigmentario individual. Barra, 1 μm . (C) Gránulo lítico en una célula T citotóxica marcada para LAMP-1 (partículas pequeñas de oro) y para granzima B (partículas grandes de oro). Barra, 100 nm. (D) Compartimento MHC de clase II (MIIC) multilaminar (tipo 6) en un linfoblasto B humano. La imagen muestra un etiquetado doble para LAMP-1 (pequeñas partículas de oro) y para el MHC de clase II (partículas grandes de oro). Barra, 100 nm. (E) Plaqueta con gránulos electrodensos. La punta de flecha apunta a un gránulo individual. Barra, 2 μm . (F) Micrografía electrónica de un botón sináptico en el *stratum lucidum* del CA3 del hipocampo de un ratón silvestre. La punta de la flecha indica una sinapsis. Barra, 0.5 μm . (G) Micrografía electrónica de los gránulos de insulina en células β pancreáticas de un ratón silvestre. Barra, 0.5 μm . Modificado de Dell'Angelica *et al.*, 2000.

Complejos involucrados en la biogénesis de los LROs

Adicional al complejo AP-3, otros complejos proteicos intervienen en cada una de las etapas del tráfico vesicular que va desde la formación vesicular, el transporte de la vesícula, el anclaje de ésta a la membrana blanco hasta la fusión de ambas membranas. Dichos complejos son la Rab32 y su GEF, los complejos de la biogénesis de organelos relacionados a lisosomas (BLOC, por sus siglas en inglés, Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex) y el complejo de fusión homotípica y clasificación proteica (HOPS, por sus siglas en inglés, Homotypic Fusion and Protein Sorting) (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

Las proteínas Rab pertenecen a la familia de las pequeñas GTPasas tipo Ras y garantizan que las proteínas de la carga lleguen a su destino correcto. Estas proteínas se pueden presentar en dos estados característicos: activo e inactivo. En su estado inactivo tienen unida una molécula de GDP y en su estado activo otra de GTP. El intercambio de GDP por GTP lo realiza una enzima llamada factor de intercambio del nucleótido de guanósina (GEF, por sus siglas en inglés, Guanine nucleotide Exchange Factor), mientras que para pasar al estado inactivo la proteína de activación de la actividad GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés, GTPase-Activating Protein) promueve la defosforilación del GTP por la misma Rab. 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 (Hutagalung & Novick, 2011). Hasta la fecha se han identificado 33 genes que codifican para proteínas Rab en *D. melanogaster* donde la mayoría de las proteínas Rab tienen su contraparte en vertebrados (Zhang *et al.*, 2007). Se sabe que en mamíferos las proteínas Rab32 y Rab38 cooperan para sintetizar los LROs (Bultema & Di Pietro, 2013), mientras que *D. melanogaster* cuenta con su proteína homóloga conocida como *lightoid*, *ltd*, la cual codifica para la proteína Rab32 (Ma *et al.*, 2004). Recientemente se mostró que estas proteínas redireccionan a los complejos AP-1, AP-3 y BLOC-2 a los melanosomas en los melanocitos (Bultema *et al.*, 2012) (Fig. 8).

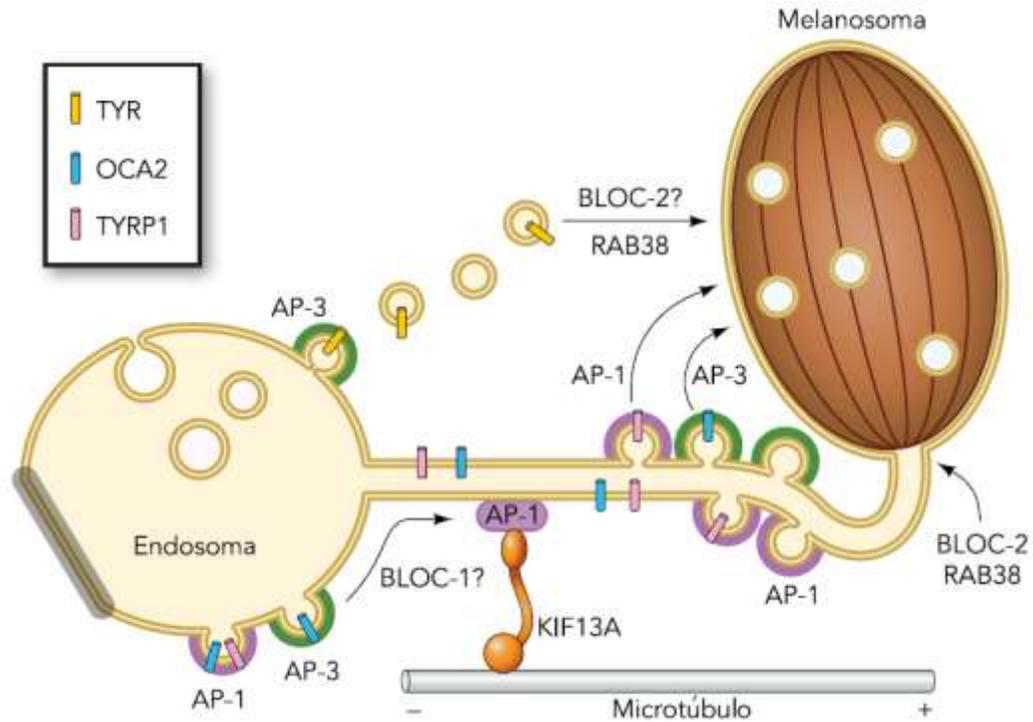


Fig. 8. Tráfico de proteínas a los melanosomas. Los complejos AP-1 y AP-3 concentran proteínas integrales de membrana como la OCA2 (barras azules), la TYRP1 (barras rosas) y la TYR (barras doradas) en los endosomas tempranos. AP-1 se acopla a la quinesina KIF13A orientada hacia el extremo positivo del microtúbulo para establecer túbulos que surjan de endosomas y se fusionen con la membrana de los melanosomas cercanos. AP-1 y AP-3 dirigen a las proteínas OCA2 y TYRP1 en esta vía. BLOC-1 participaría en esta vía al comienzo del flujo de las proteínas carga a través de los túbulos. BLOC-2 y RAB38 actúan río abajo, especificando la orientación de los túbulos a los melanosomas. La interacción de las proteínas carga en los túbulos con AP-1 o AP-3 podría ser necesaria para la entrega eficiente de las proteínas desde los túbulos al melanocitosoma. Es posible que AP-3 también funcione desde un dominio distinto dirigiendo el tráfico vesicular de TYR independiente de BLOC-1. RAB38 y quizás BLOC-2 estarían facilitando el direccionamiento vesicular en esta vía. OCA2: albinismo oculocutáneo tipo 2, TYRP1: proteína 1 relacionada con la tirosinasa, TYR: tirosinasa. Modificado de Sitaram & Marks, 2012.

Los complejos BLOCs son tres complejos multiprotéicos 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) (Dell'Angelica, 2004). 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. Adicionalmente, se demostró que estos dos complejos interactúan física y funcionalmente con AP-3 facilitando el tráfico de proteínas (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 aunque la función molecular precisa de los complejos aún se desconoce (Nazarian *et al.*, 2003).

El complejo HOPS está conservado evolutivamente y se forma de seis subunidades (Balderhaar & Ungermann, 2013) (Fig. 9) e interactúa con proteínas Rab y la receptora de adhesión del factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE, por sus siglas en inglés, Soluble NSF Attachment Protein Receptor) para la fusión de membranas (Bonifacino & Glick, 2004).

El complejo HOPS es un efector de las Rab GTPasas y funciona como complejo de unión promoviendo el ensamblaje y la selectividad del complejo SNARE (Wickner, 2010). El complejo HOPS de *Saccharomyces cerevisiae* facilita el acoplamiento de vesículas recubiertas de AP-3 con la vacuola (Angers & Merz, 2009), sin embargo, aún no está claro cómo funciona este complejo durante la biogénesis del melanosoma. La homología con *S. cerevisiae* sugiere que el complejo HOPS de mamíferos podría regular la fusión membranal dependiente de AP-3 con los melanosomas (Sitaram & Marks, 2012).

El complejo HOPS se forma de seis subunidades de la proteína de la clasificación proteica (Vps, por sus siglas en inglés, Vacuolar protein sorting): Vps11, Vps16, Vps18, Vps33, Vps39 y Vps41; cuatro de ellas forman el llamado núcleo de clase C (Class C Core, Vps11, Vps16, Vps18 y Vps33) que también están presentes en el núcleo de clase C del agrupamiento vacuola/endosoma (CORVET, por sus siglas en inglés, class C core vacuole/endosome tethering) (Balderhaar & Ungermann, 2013). El complejo

HOPS se une a proteínas del citoesqueleto como actina, tubulina y hook (Richardson *et al.*, 2004), componentes de la maquinaria de autofagia (Liang *et al.*, 2008), el complejo AP-3(Zlatic *et al.*, 2011) y la GTPasa Arl8, involucrada en la movilidad lisosomal (Garg *et al.*, 2011) (Fig. 9).

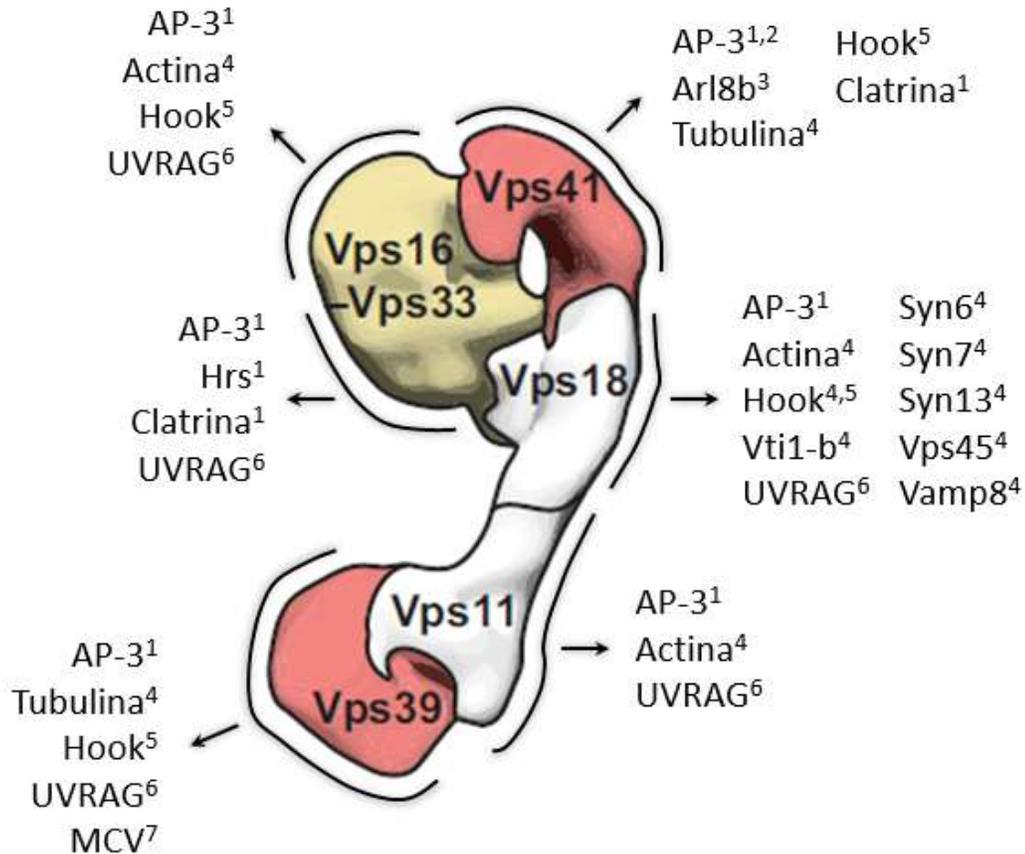


Fig. 9. Complejo HOPS. Estructura tridimensional del complejo HOPS obtenida por microscopía electrónica de tinción negativa (Bröcker *et al.*, 2012). Se ilustra la posición y las interacciones de las subunidades del complejo. UVRAG: gene asociado a la resistencia a la radiación UV (por sus siglas en inglés, UV-Irradiation-resistance-associated gene); MCV: virus del polioma de Merkel (por sus siglas en inglés, Merkel cell polyomavirus); ¹Zlatic *et al.*, 2011; ²Angers & Merz, 2009; ³Garg *et al.*, 2011; ⁴Richardson *et al.*, 2004; ⁵Xu *et al.*, 2008; ⁶Liang *et al.*, 2008. Modificado de Balderhaar & Ungermann, 2013.

Así entonces, estos complejos participan en la biogénesis de los LROs y algunas de sus mutaciones impiden la biogénesis de los LROs provocando enfermedades hereditarias. Las cepas murinas, *mocha* y *pearl*, con

mutaciones en las subunidades δ y $\beta 3A$ del complejo AP-3, respectivamente, tienen melanocitos y otros LROs anormales (Kantheti *et al.*, 1998; Zhen *et al.*, 1999). Además, el ratón *mocha*, un modelo murino para el síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS, por sus siglas en inglés), tiene deficiencias neurológicas asociadas con la disminución de la cantidad de transportador ZnT-3 en las vesículas pre-sinápticas, que normalmente contienen zinc y glutamato (Kantheti *et al.*, 1998).

Síndrome de Hermansky-Pudlak

El HPS es una enfermedad autosómica recesiva 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. Hasta la fecha, en los humanos, se han identificado al menos diez variantes del HPS asociada con los complejos involucrados en la biogénesis de los LROs (Huizing *et al.*, 2020). Este síndrome pone en evidencia la importancia de los LROs para la fisiología humana. En el ratón *pearl* se produce la variante 2 del HSP (HPS-2) (Feng *et al.*, 1999), una mutación en la disbindina de BLOC-1 genera la variante 7 del HPS (Li *et al.*, 2003) y mutaciones en cualquiera de las subunidades de BLOC-2 y BLOC-3 generan el resto de las variantes del HPS (Wei, 2006).

Transportadores de zinc

El transporte de zinc a través de las membranas lipídicas de los organismos eucariontes está mediado por dos familias de proteínas transmembranales conservadas evolutivamente (Gaither & Eide, 2001): los transportadores ZIP semejantes a las proteínas Zrt y Irt (por su nombre en inglés, Zrt and Irt like Proteins) y los transportadores de ZnT (por sus siglas en inglés, Zinc Transporters). Los ZIPs transportan zinc del medio al citosol y los ZnT en

dirección opuesta o del citosol hacia el lumen de los organelos (T. Kambe et al., 2004).

Los transportadores de zinc están conservados evolutivamente (Lye *et al.*, 2012) (Fig. 10 y 11), por ejemplo, los transportadores ZnT2, ZnT3, ZnT4 y ZnT8 de humano tienen alta similitud con los transportadores ZnT33D, ZnT35C y ZnT41F de *D. melanogaster* (Lye *et al.*, 2012) (Fig. 10).

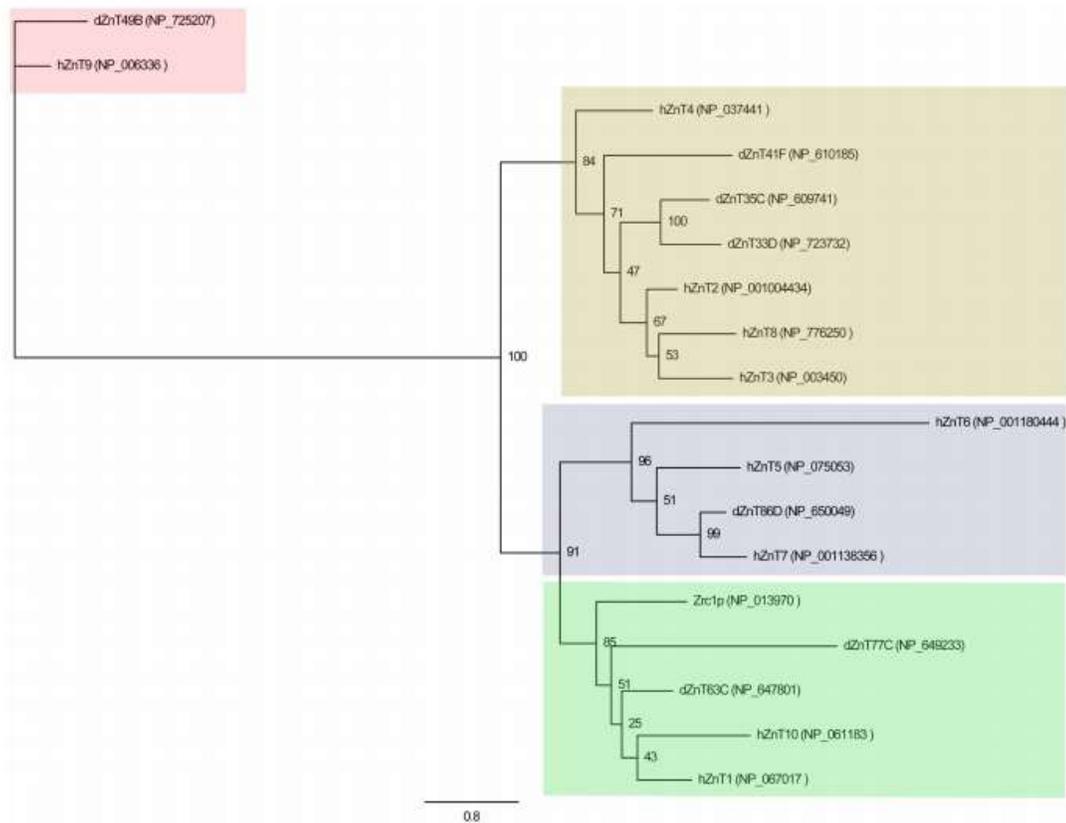


Fig. 10. Comparación entre las secuencias de aminoácidos de los transportadores ZnT de *D. melanogaster*, humanos y levaduras. El árbol fue generado usando el software de alineación de secuencias MUSCLE. Las barras de escala representan sustituciones de aminoácidos. Los valores de Bootstrap se incluyen en los nodos. Los números de acceso se muestran para cada secuencia de proteína. Las proteínas que muestran homología se agrupan en clados. Tomados de Lye *et al.*, 2012.

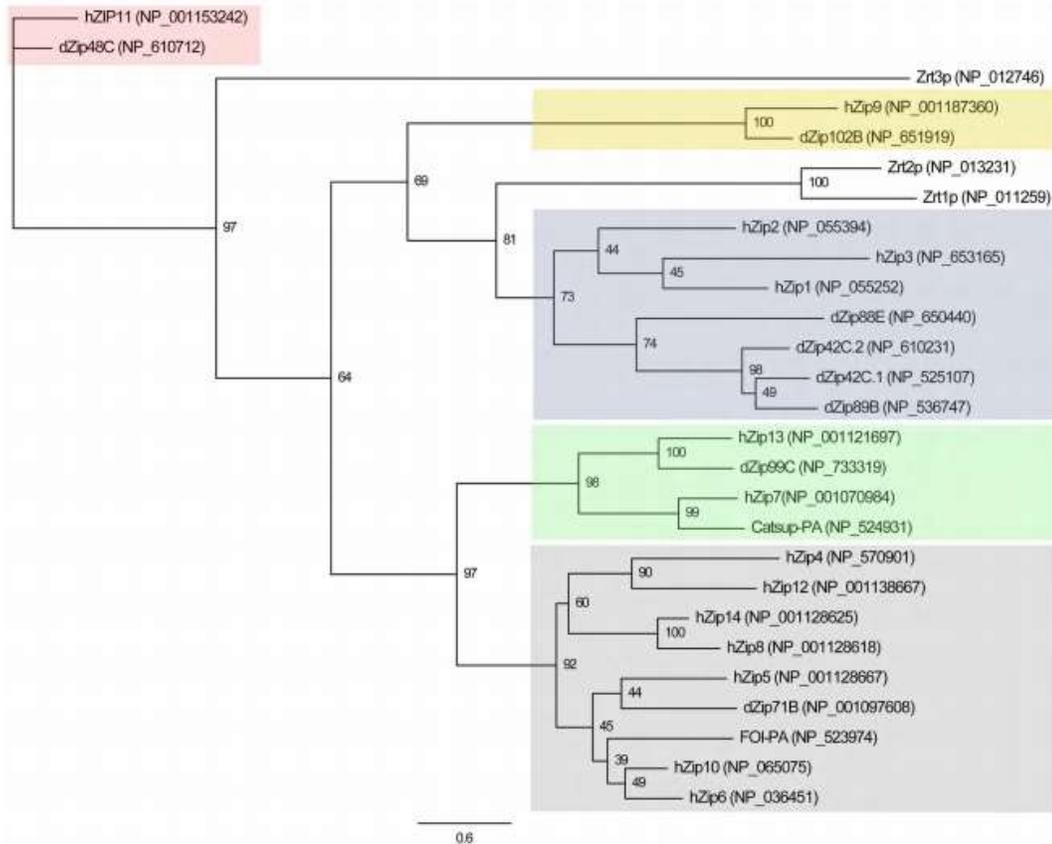


Fig. 11. Comparación entre las secuencias de aminoácidos de los transportadores Zip de *D. melanogaster*, humanos y levaduras. El árbol fue generado usando el software de alineación de secuencias MUSCLE. Las barras de escala representan sustituciones de aminoácidos. Los valores de Bootstrap se incluyen en los nodos. Los números de acceso se muestran para cada secuencia de proteína. Las proteínas que muestran homología se agrupan en clados. Tomado de Lye *et al.*, 2012.

El transportador ZnT3 es responsable del almacenamiento de zinc dentro de las vesículas pre-sinápticas de las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, tanto en la región del giro dentado, *stratum lucida* de la región CA3 como en las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 (Cole *et al.*, 1999) (Fig. 12).

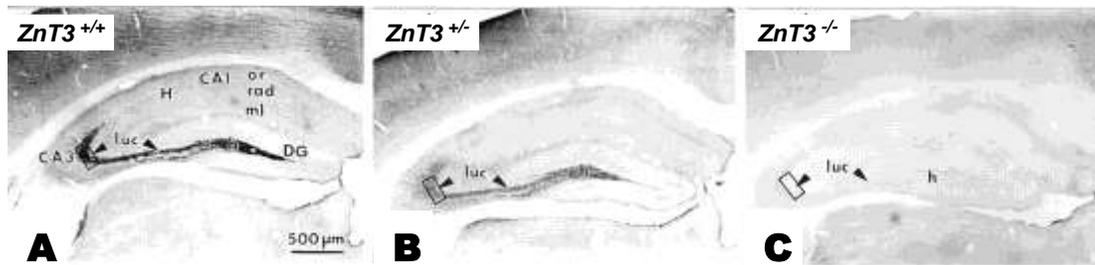


Fig. 12. Expresión del transportador ZnT3 en el hipocampo. Inmunohistoquímica de ZnT3 en el hipocampo de ratones *ZnT3*^{+/+} (A), *ZnT3*^{+/-} (B) y *ZnT3*^{-/-} (C). Comparado con el hipocampo de *ZnT3*^{+/+} (A), la inmunoreactividad de ZnT3 disminuyó en varias áreas del hipocampo de *ZnT3*^{+/-} (B), mientras que en *ZnT3*^{-/-} (C) fue indetectable. H: hipocampo; DG: giro dentado; h: hilus; luc: *stratum lucidum*; or: *stratum oriens*; rad: *stratum radiatum*; ml: capa molecular. Modificado de Cole *et al.*, 1999.

En los ratones *ZnT3*^{-/-} no se detecta histoquímicamente zinc en las fibras musgosas, evidenciando que este transportador es responsable del almacenamiento de zinc dentro de las vesículas (Cole *et al.*, 1999). En estos ratones, el zinc total fue reducido en aproximadamente un 20% en la corteza y el hipocampo mientras que en el *ZnT3*^{+/-} fue de solo un 10% (Cole *et al.*, 1999). La pérdida del transportador abate completamente el zinc en los axones de las fibras musgosas, el aparato de Golgi y la región perinuclear de las neuronas que secretan zinc, donde el transportador normalmente decora las vesículas emergentes (Linkous *et al.*, 2008).

A pesar de la disminución en el nivel de zinc en las diferentes áreas del cerebro, el ratón *ZnT3*^{-/-} solo disminuye levemente su aprendizaje espacial y función sensoriomotora (Cole *et al.*, 2001). Estudios más recientes han demostrado cambios en el comportamiento de los ratones en funciones más complejas como la disminución de la recuperación del estrés psicológico (McAllister *et al.*, 2018) y la actividad sináptica (estudios revisados por Krall *et al.*, 2021).

El transportador ZnT8 media la acumulación del zinc en los gránulos de insulina (Davidson *et al.*, 2014), se expresa en el epitelio pigmentario retinal (Leung *et al.*, 2008), adipocitos (Smidt *et al.*, 2007), linfocitos (Overbeck *et al.*, 2008) y páncreas de humanos, sobre todo en las células β de los islotes de Langerhans (Eizirik *et al.*, 2012). Cabe señalar que, además de la expresión del transportador ZnT8 en las células β , también se expresan ZnT1, ZnT2, ZnT4-9 (Eizirik *et al.*, 2012). Todos estos ZnTs son homólogos en secuencia y median la absorción de zinc en lisosomas convencionales y de secreción, en vesículas pre-sinápticas, en endosomas y en los gránulos de insulina, según el caso (Taiho Kambe, 2011).

Se ha encontrado un *enhancer* en el segundo intrón del gen del transportador de zinc *Slc30a8* de ratón y humanos, al *que* se une el factor de transcripción Pdx1 (por su nombre en inglés, Pancreatic duodenal homeobox-1) (Pound *et al.*, 2011) implicado en el desarrollo y diferenciación del páncreas y en la regulación de la función de las células β (Wolpin *et al.*, 2014). Se ha observado que la depleción de zinc, glucosa y citocinas disminuye la expresión del gen *Slc30a8* en líneas celulares derivadas de islotes de ratones y ratas (Egefjord *et al.*, 2009; Smidt *et al.*, 2009) y que la delección sistémica (Nicolson *et al.*, 2009; Pound *et al.*, 2009) y tejido-específica (Tamaki *et al.*, 2013; Wijesekara *et al.*, 2010) del transportador ZnT8 no causa cambios en el nivel de insulina de los islotes, así como tampoco se ve afectado el tamaño y número de éstos. Se ha observado una reducción en el número total de gránulos y un aumento en el número de gránulos vacíos y atípicos (en forma de varilla) así como la disminución en el contenido de zinc en los islotes (Nicolson *et al.*, 2009; Pound *et al.*, 2009; Tamaki *et al.*, 2013; Wijesekara *et al.*, 2010).

El transportador ZnT35C de *D. melanogaster*

El transportador ZnT35C es importante en la desintoxicación del zinc (Yepiskoposyan *et al.*, 2006), se expresa mayoritariamente en los túbulos

Malpighianos, es inducible por zinc y se regula por el factor de transcripción de metales-1 (MTF-1, por sus siglas en inglés, Metal Transcription Factor 1), un regulador de la homeostasis y la desintoxicación de metales en eucariotas (Yepiskoposyan *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2017). ZnT35C se localiza en la membrana plasmática de los túbulos Malpighianos a concentraciones normales de zinc y su expresión se induce por concentraciones elevadas de zinc (Yepiskoposyan *et al.*, 2006). El silenciamiento del transportador provoca hipersensibilidad a la sobre carga de zinc mientras que su sobreexpresión confiere resistencia al zinc y rescata parcialmente la sensibilidad al zinc de las moscas *knockout* para el MTF-1. Debido a estos fenotipos, se ha propuesto que el ZnT35C es el principal exportador de zinc celular en los túbulos Malpighianos (Yepiskoposyan *et al.*, 2006).

Los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*

Hasta el momento se había estado mencionando a los túbulos Malpighianos, sin embargo, no se había hablado de ellos. Los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster* consisten de dos pares de tubos epiteliales que nacen del intestino grueso durante la embriogénesis. Estos 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. 13).

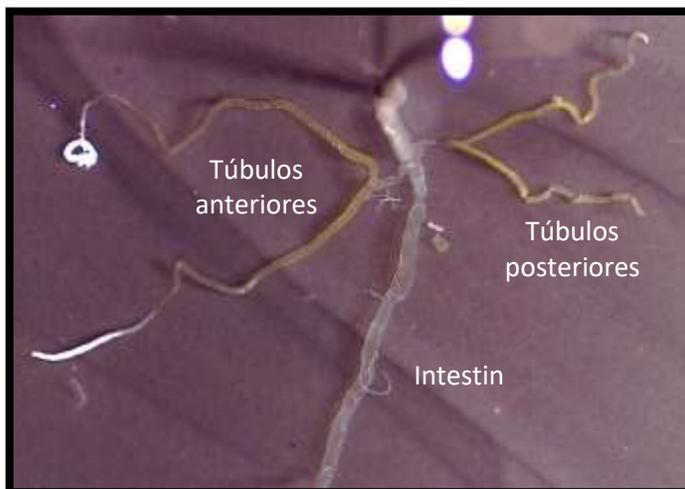


Fig. 13. Túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*. La mosca cuenta con cuatro túbulos, dos anteriores y dos posteriores. Los túbulos de la mosca silvestre son de color amarillo por la acumulación de riboflavina en gránulos pigmentarios. Los túbulos anteriores presentan acumulación de calcio en la zona más distal y debido a eso su coloración es blanca.

Los túbulos Malpighianos 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 a través del intestino grueso hacia el interior del cuerpo (Singh *et al.*, 2007).

La hemolinfa es el líquido circulatorio de los insectos. Ésta difiere de la sangre de los vertebrados por la ausencia de eritrocitos y la alta concentración de aminoácidos libres. También contiene células circulantes llamadas hemocitos. El componente principal de la hemolinfa es el agua llegando a componer entre el 20 y el 50% del agua total de los insectos (Kanost, 2009).

Metalotioneínas y MTF-1

Adicional a los dos mecanismos de homeostasis celular del zinc que ya se han mencionado: transporte a través de la membrana plasmática por medio de los ZnTs y ZIPs y almacenamiento dentro de vesículas o LROs (Plum *et al.*, 2010) existen otros componentes clave en la regulación del zinc celular. Tal es el caso del factor de transcripción MTF-1, que en presencia de zinc induce la expresión transcripcional de las metalotioneínas (Mtns) (Laity & Andrews, 2007).

Las Mtns son proteínas de bajo peso molecular, ricas en residuos de cisteína que forman hasta siete sitios de unión a metales divalentes (Tapiero & Tew, 2003), con afinidades diferentes en el rango de nano a picomolar y que confieren a las Mtns la capacidad de amortiguar este metal según se requiera (Fig. 14). La expresión de las Mtns es inducible por zinc y otros iones metálicos como el cadmio, mercurio, cobalto y cobre, a través de elementos responsivos a metales en *cis* (MREs, por sus siglas en inglés, Metal Response Elements -

MREs). El metal se une al MTF-1 en el citosol, quien lo lleva al núcleo (Tapiero & Tew, 2003). (Fig. 14).

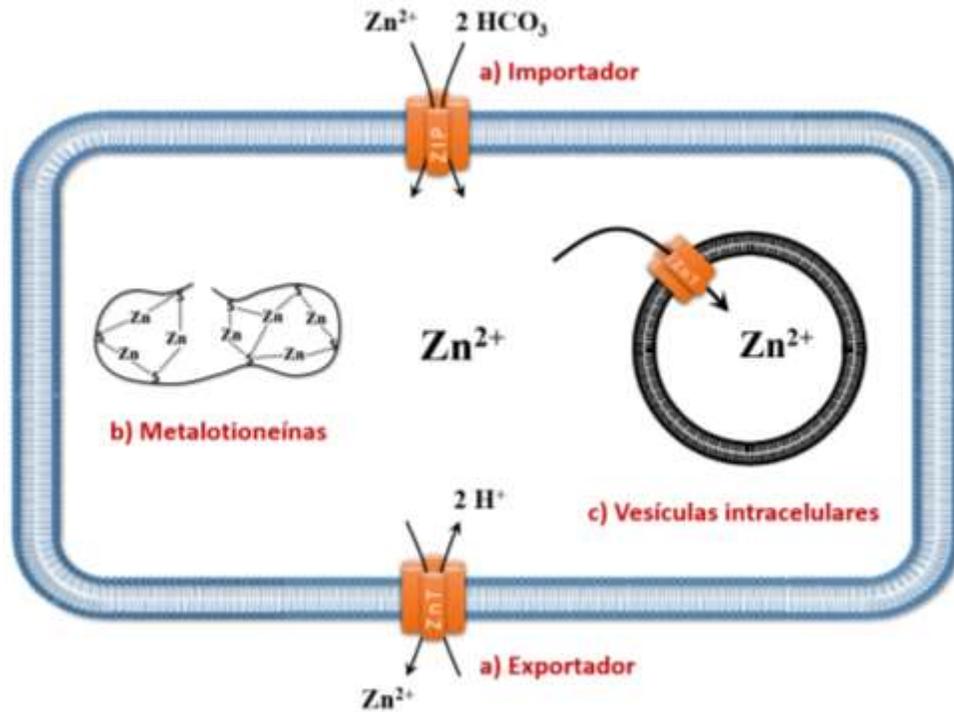


Fig. 14. Homeostasis celular del zinc. a) El transporte de zinc a través de la membrana se da por medio de proteínas importadoras de la familia ZIP y exportadoras de la familia ZnT; b) las metalotioneínas son proteínas de unión a zinc que acoplan hasta siete iones de zinc; c) en algunos tipos celulares el zinc se concentra en vesículas u organelos del tipo LROs.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El zinc es un elemento esencial en varios procesos biológicos, pero su sitio de almacenamiento y su regulación sistema se desconocen. Por un lado, existe evidencia que los LROs pueden almacenar zinc, por otro lado, se sabe que los complejos AP-3, BLOC, HOPS, Rab/GEF están implicados en la formación y el correcto funcionamiento de los LROs, sin embargo, se desconoce si estos organelos pueden funcionar como un mecanismo regulatorio de la concentración de este metal a nivel fisiológico. Dos tipos de estos LROs son las vesículas pre-sinápticas del hipocampo y los gránulos de insulina en las células β pancreáticas. Estos organelos poseen en sus membranas transportadores de zinc, ZnT3 y ZnT8, respectivamente. Es importante hacer notar que los ratones mutantes en ambos transportadores tienen problemas de almacenamiento de zinc en sus correspondientes LROs. Existen cepas de moscas *D. melanogaster* mutantes en los genes que codifican para los complejos de biosíntesis de los LROs y en el gen *white* que nos permitirá investigar si estas proteínas están comprometidas en el almacenamiento del zinc.

La mutante *carmine* en el complejo AP-3 o en el gen *white* en *D. melanogaster* tienen poco zinc. El gen *white* está altamente expresado en los túbulos Malpighianos, así como el transportador ZnT35C que se ha visto implicado en la excreción del zinc de los túbulos. Las cuestiones a resolver serán, entonces, ¿Qué proteínas participan en la homeostasis de zinc en *D. melanogaster*? ¿De qué manera participa el complejo AP-3 en la homeostasis del zinc? y, finalmente, ¿Qué implicación tiene el que la mutación en el gen *white* cause una disminución de zinc en *D. melanogaster*? Evaluar estas posibilidades permitirá comprender mejor el papel fisiológico del zinc en condiciones normales y patológicas.

HIPÓTESIS

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

OBJETIVOS

1. Evaluar el contenido de zinc en las moscas mutantes en los transportadores *white*, *scarlet* y *brown* y en los complejos proteicos que participan en formación de los organelos relacionados a los lisosomas.
2. Observar el zinc y los gránulos que lo contienen en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*.
3. Mediante el sistema GAL4/UAS llevar a cabo el rescate del contenido de zinc corporal de la mutante *white*.
4. Evaluar el contenido de zinc corporal en las moscas mutantes en las enzimas que intervienen en la formación de los pigmentos de los ojos de *D. melanogaster*.
5. Llevar a cabo el rescate del contenido de zinc corporal de las moscas mutantes en las enzimas que participan en la formación de los pigmentos de los ojos de *D. melanogaster* mediante la administración de los precursores de los pigmentos (productos químicos de dichas enzimas) en la dieta de la mosca.
6. Evaluar si las metalotioneínas participan de forma activa en la regulación de zinc a nivel sistémico.

METODOLOGÍA

Mantenimiento de los stocks

Las moscas se mantuvieron a 24°C en alimento estándar que contenía: levadura (10%), melaza (12.5%), agar (1.6%), gelatina (0.3%) ácido propiónico (1%) y nipagina (0.01%) en agua. De acuerdo al tipo de experimentos, los siguientes compuestos fueron agregados al alimento estándar: ZnSO₄ [1 mM], TPEN (N, N, N', N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine) [200 µM], riboflavina [2.4 mM], triptófano [2.4 mM], quinurenina [2.4 mM], 3-hidroxiquinurenina [2.4 mM], ácido xanturénico [2.4 mM], BH4 (tetrahidrobiopterina) [2.4 mM]. Los compuestos químicos provinieron todos de Sigma. Las cepas utilizadas en el proyecto fueron obtenidas del Centro de *Drosophila* en Bloomington (Universidad de Indiana, E.U): *Canton-S* (#1), *Oregon R-C* (#5), *y¹* (#169), *w¹¹¹⁸* (#3605), *w¹* (#145), *w^a* (#148), *bw¹* (#245), *bw¹⁹* (#9474), *st¹* (#605), *w+*; *PBac st^{e01330}* (#17944), *bw¹*; *st¹/TM3*, *st²⁴*, *sb¹* (#67), *cm¹* (#21), *rb¹* (#88), *g¹* (#3958), *or^{49h}* (#2385), *ltd¹* (#338), *ca¹* (#459), *p^p* (#553), *lt¹*, *rl¹* (#1051), *car¹* (#19), *y¹*, *w^{67c23}*; *ZnT35C^{MI07746-GFSTF.1/SM6a}* (#59419), *v¹* (#137), *pr¹* (# 70), *MTF¹* (#9241). Además, se trabajó con cepas donadas por colaboradores: la cepa cuádruple mutante *y^{*},w^{*}*; $\Delta Mtn(A-D)$ producida del laboratorio del Dr. Walter Schaffner (Egli *et al.*, 2006) y proporcionada amablemente por el Dr. Richard Burke, Australia y la cepa silvestre *Tan-3*, colectada originalmente por Rudi Costa de Tannes, Italia (Sadraie & Missirlis, 2011). Además, se trabajó con cepas isogenizadas *w⁺* y *w^{*}*. Las siguientes moscas fueron utilizadas para establecer el sistema Gal4/UAS mediante cruza: *w^{*}*; *Da-Gal4* (expresión ubicua), *y^{*}, w^{*}*; *Actin-Gal4/CyO* (expresión ubicua), *w^{*}*; *Uro-Gal4* (expresión en el segmento principal de los túbulos Malpighianos), *w^{*}*; *CG-Gal4* (expresión en el cuerpo graso), *w^{*}*; +; *UAS w::eYFP^{H8}* (construcción donada por el Dr. Julian Dow; Evans *et al.*, 2008).

Sistema Gal4/UAS

El sistema Gal4/UAS es una de las herramientas más utilizadas en el campo de *D. melanogaster* pues permite la expresión génica dirigida (Brand & Perrimon, 1993). Gal4 es un factor de transcripción de levadura cuya función es activar la transcripción de genes regulados por la secuencia UAS (por sus siglas en inglés, Upstream Activating Sequence). En *D. melanogaster*, cada uno de los componentes viene en un individuo diferente por lo que, si se cruzan, la progenie que herede ambos transgenes expresará el gen de interés. Es importante mencionar que Gal4 puede estar regulado por promotores endógenos (*drivers*) de *D. melanogaster* permitiendo una expresión tejido-específica y un control temporal preciso. Enseguida se muestran las cepas que se cruzaron con la *UAS-w::eYFP^{H8}* para llevar a cabo el rescate de la proteína white:

Driver	Proteína	Expresión	Cepa
<i>Da-Gal4</i>	Daughterless	Ubicua	<i>w*</i> ; <i>Da-Gal4</i>
<i>Actin-Gal4</i>	Actina	Ubicua	<i>y*</i> , <i>w*</i> ; <i>Actin-Gal4/CyO</i>
<i>Uro-Gal4</i>	Urato oxidasa	Túbulos Malpighianos	<i>w*</i> ; <i>Uro-Gal4</i>
<i>CG-Gal4</i>	¿?	Cuerpo Graso	<i>w*</i> ; <i>CG-Gal4</i>

Espectrometría de absorción atómica

La concentración total de zinc en la mosca completa se determinó tanto por espectrometría de absorción atómica con llama (AAS) como por espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). 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. Para el ensayo con AAS, se tomaron 200 mg de masa seca del liofilizado y se

digirieron en HNO₃ (69%) durante 48 horas a 60°C, mientras que para el ensayo con ICP-OES sólo se tomaron 20 mg de masa seca los cuales fueron digeridos a 200 °C durante 15 minutos en un sistema de digestión de microondas MARS6 (CEM). Finalmente, se midieron los niveles de zinc utilizando un estándar del elemento para calibrar los espectrofotómetros.

Microscopia de fluorescencia

Los túbulos Malpighianos fueron disecados de hembras moscas adultas en PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.0). El tejido fue fijado con metanol frío durante 5 minutos y lavado 3 veces por 3 minutos con PBS. El FluoZin-3^{AM} (Life Technologies, Cat. F-24195) se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM, fue alicuotado y almacenado a -20 °C protegiéndolo de la luz. Por cada experimento, una alícuota nueva era disuelta a 2.5 µM en PBS conteniendo 0.02% de Triton-X100 y 0.001% de Tween-20. Los tejidos fijados fueron incubados con la solución de FluoZin-3^{AM} en una cámara húmeda a 38 °C por 45 minutos. Después de 3 lavados con PBS, los tejidos fueron montados en Vecta Shield con DAPI (Vector H-1200) y observados bajo el microscopio. El procedimiento de fijación y de montaje también fue utilizado para observar la mosca con el constructo *ZnT35C^{GFP}*. Las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (TCS SP8 Leica confocal system coupled to a DMI6000 inverted microscope).

Microscopia de fluorescencia por rayos X de alta energía

Los túbulos Malpighianos fueron disectados de hembras moscas adultas en PBS, lavados 3 veces con acetato de amonio 100 mM y colocados en portaobjetos (Thermo Scientific Nunc Thermanox, Cat. 174942) para que secan a 4 °C. Las imágenes de fluorescencia de rayos X fueron obtenidas a partir de la fuente de luz de radiación del Síncrotrón de Stanford usando las

líneas 2-3. La energía de rayos X incidente se ajustó a 11 keV usando un monocromador de doble cristal de Si (111 picómetros) con el anillo de almacenamiento del Sincrotrón de Stanford conteniendo 500 mA a 3.0 GeV. Las líneas de fluorescencia de los elementos de interés, así como la intensidad de los rayos X dispersos totales, se monitorizaron utilizando un detector de vórtice de silicón montado a 90 grados con respecto al haz incidente. El procesamiento de fotones se realizó con un equipo electrónico llamado Xpress 3. Además de estas regiones de interés, también se recolectó todo el espectro de fluorescencia en cada punto de datos. El haz microenfocado de 3x3 micras fue proporcionado por un par de espejos Kirkpatrick-Báez recubiertos con rodio (Rh). Las intensidades de los rayos X incidentes y transmitidos se midieron con cámaras de iones llenas de nitrógeno. Las muestras se montaron a 45 grados con respecto al haz de rayos X incidente y se rasparon espacialmente en el microhaz utilizando una etapa Newport VP-25XA-XYZ. La exposición del haz fue de 100 milisegundos por píxel. Las señales de fluorescencia se normalizaron contra la intensidad del haz de rayos X incidente para tener en cuenta sus fluctuaciones. El análisis de datos se realizó utilizando el programa informático MicroAnalysis Toolkit.

RT-PCR

Con el objetivo de caracterizar el efecto de las mutaciones y de las dietas sobre la expresión de las metalotioneínas, se aisló ARN mensajero de homogenizados de mosca total utilizando el reactivo de Trizol LS Reagent (Life Technologies, Cat. 10296-010) y posteriormente se sintetizó ADNc usando la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Cat. 18080-094). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cat. 10966-034). Como control positivo se empleó el ADNc del gen de la proteína ribosomal RP49. Los iniciadores se describen enseguida:

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores para cada una de las metalotioneínas.

ADNc blanco	Dirección	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto (pb)
Mtn A	Sentido	CATGCGGAAGCGGATGCAAAT	97
	Antisentido	CAGGCGGATTTCTTGTCGCC	
Mtn B	Sentido	GGGTTGTGGAACAAACTGCC	130
	Antisentido	TTGGCCCGCTTATTTGTTGC	
Mtn C	Sentido	AAAGGCTGCGGAACAAACTG	112
	Antisentido	TGCAACACTGATCTTTGGGG	
Mtn D	Sentido	AGGCTTGTGGAACAAACTGC	123
	Antisentido	AGTTTTTGGTGGAGCAGCACT	
Mtn E	Sentido	AAGGGATGTGGAAACAACTGC	137
	Antisentido	AATCCAAATGGATCCGGCCA	
RP49	Sentido	CGATATGCTAAGCTGTGCGACA	116
	Antisentido	CGCTTGTTGATCCGTAACC	

El programa de PCR que se utilizó se muestra en la Tabla 3 con una totalidad de 30 ciclos. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1.2%.

Tabla 3. Programa de PCR utilizado en la amplificación de secuencias de ADNc.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	94	30
Alineamiento	55	30
Extensión	72	10

RESULTADOS

La delección del gen *white* de *D. melanogaster* disminuye el contenido de zinc

La mosca mutante *white* es utilizada como control experimental en la mayoría de los laboratorios que trabajan con el modelo de *D. melanogaster* porque es muy útil en la selección en constructos transgénicos pues, dentro del plásmido que contiene la construcción para hacer una mosca transgénica, también se incluye la secuencia mínima (*mini-white*) para rescatar el gen *white*. Por lo tanto, los embriones que hayan incorporado la secuencia de interés también llevan la del *mini-white* y, consecuentemente, dan lugar a moscas adultas con ojos rojos. Así que, cualquier información nueva sobre la mosca *white* adquiere gran relevancia en el campo de investigación de *D. melanogaster*.

Con el objetivo de conocer cuánto zinc contienen las moscas *white*, *brown* y *scarlet*, se midió la concentración de este elemento en homogenados de mosca completa. Los resultados muestran que las moscas mutantes *white* y *scarlet* tienen baja concentración de zinc sugiriendo que ambos transportadores podrían estar involucrados en la homeostasis del zinc fisiológico (Fig. 15). Por su parte, la mosca *brown* tiene una concentración de zinc cercana a los niveles normales y la doble mutante *scarlet/brown* tiene la misma concentración de zinc que las moscas *scarlet* y *white* por si solas, estos datos sugieren que el dímero *white-scarlet* podría participar en el almacenamiento de zinc en *D. melanogaster*. Más adelante se discutirán las implicaciones de ello en la homeostasis de zinc (Fig. 15).

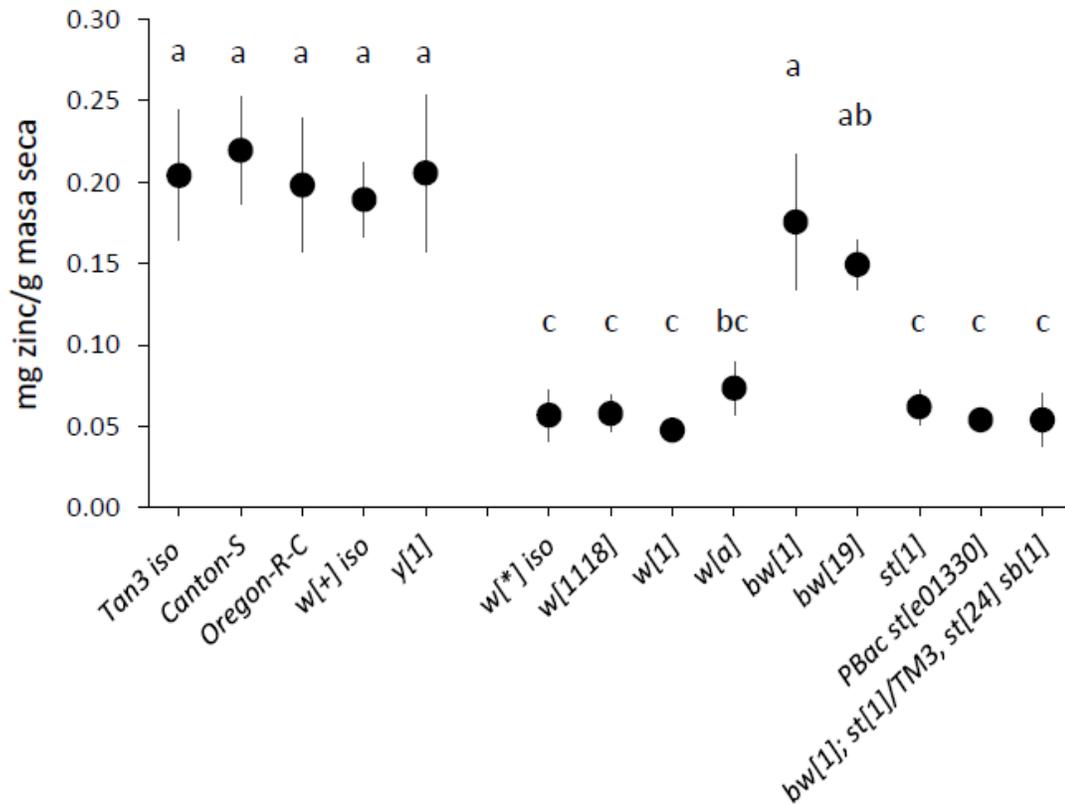


Fig. 15. Concentración de zinc en las moscas mutantes en los transportadores del tipo ABCG2. Cinco cepas de moscas control tienen una concentración de zinc aproximada de 0.20 mg de zinc/g de masa seca mientras que las moscas *white* y *scarlet* tienen 4 veces menos zinc. No así la mosca *brown* que tiene un nivel de zinc cercano a los valores normales. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas; las letras indican las diferencias entre genotipos a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

Rescate ubicuo de la mosca white

Para confirmar si el transportador codificado por el gen *white* está implicado en la homeostasis del zinc se rescató un gen mutado con el silvestre y se investigó si se recupera el fenotipo de zinc normal. Se utilizó el sistema Gal4/UAS explicado anteriormente para expresar ubicuamente *white* silvestre, bajo el control de los *drivers* *Da-Gal4* y *Actin-Gal4*, o solo en los túbulos Malpighianos bajo *Uro-Gal4* o el cuerpo graso bajo *CG-Gal4*. En la Fig. 16 se observa que se recupera la concentración de zinc en la progenie de aquellas cruas que tienen un *driver* de expresión ubicua (*Da-Gal4* X *UAS-w::eYFP^{H8}* y

Actin-Gal4 X UAS-w::eYFP^{H8}), no así para las que tienen expresión en los túbulos Malpighianos (*Uro-Gal4 X UAS-w::eYFP^{H8}*) o en el cuerpo graso (*CG-Gal4 X UAS-w::eYFP^{H8}*). Sugiriendo que la expresión del gen *white* en otros tejidos es necesaria para la regulación fisiológica del zinc.

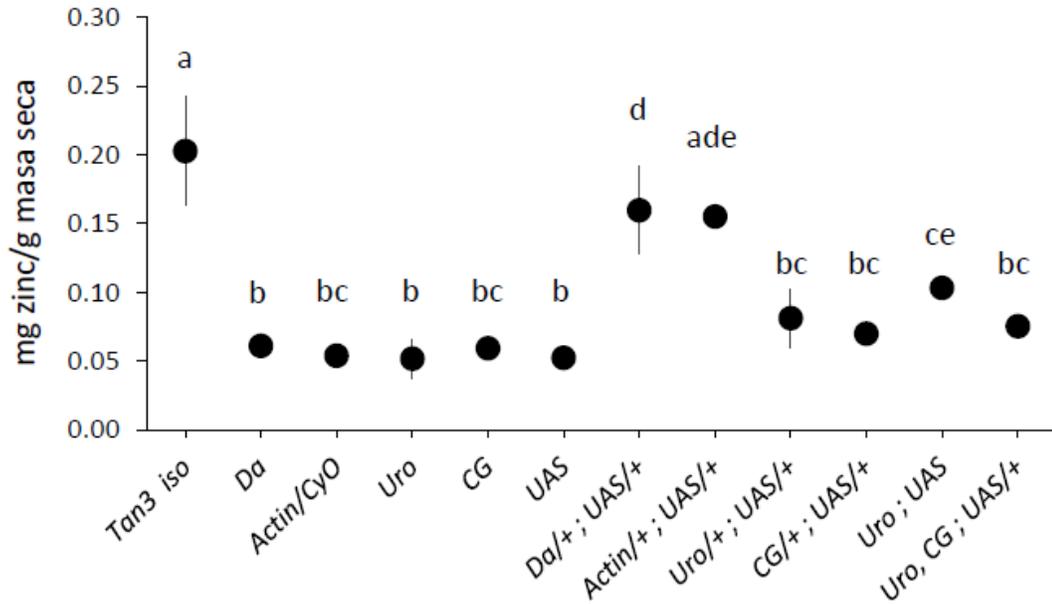


Fig. 16. La expresión del gen *white* es importante en varios tejidos de la mosca para el correcto almacenamiento del zinc. Concentración de zinc en una mosca silvestre isogenizada (*Tan3 iso*), cinco cepas parentales, todas mutantes en el gen *white*, donde no se espera alteración alguna porque el gen *mini-white* presente en los transgenes no se expresa en los tejidos periféricos. Dos cepas (*Da* y *Actin*) permiten la expresión ubicua del factor de transcripción Gal4 mientras que otras dos (*Uro* y *CG*) permiten su expresión sólo en tejidos específicos (túbulos Malpighianos y cuerpo graso). La última cepa (*UAS*) contiene la secuencia del gen *white* unido al elemento génico *UAS* que permitirá la expresión de la proteína *white* (unida a eYFP, para detalles ver Evans *et al.* 2008). Los niveles de zinc en las progenies de las cruces entre la cepa *UAS* y las que contienen los *drivers* ubicuos se aproximan al valor que tiene la mosca silvestre *Tan3 iso* (0.16 y 0.15 vs 0.20 (mg de zinc/g de masa seca), respectivamente), mientras que en las cruces con las cepas que contienen los *drivers* tejido-específicos no hay cambio en los niveles de zinc. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas; las letras indican la diferencia entre genotipos a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

Las moscas mutantes en la ruta de biogénesis de los LROs tienen bajo nivel de zinc

Como se mencionó anteriormente, la estrategia que se utilizó para conocer los genes implicados en el fenotipo de *poco zinc* arrojó como sugerencia que tanto el gen *white* como el gen *carmine* estaban implicados en la homeostasis de zinc fisiológico. En el apartado anterior se demostraron evidencias conclusivas que implican al gen *white* en el almacenamiento del zinc en *D. melanogaster*, tanto la reversión del fenotipo de bajo nivel de zinc por expresión transgénica, como la presencia de este fenotipo en diferentes alelos de *white* y en diferentes alelos del gen que codifica el co-transportador *scarlet*.

Dado que la concentración baja de zinc en la mutante *carmine* sugería que el complejo AP-3 está implicado en la homeostasis de zinc fisiológico, se decidió investigar qué complejos de la biosíntesis de los LROs participan en la homeostasis del zinc y se cuantificó el zinc en diferentes mutantes de las subunidades de los complejos (Fig. 17). La concentración de zinc total fue de aproximadamente 4 veces menor en los mutantes *carmine*, *ruby*, *garnet* y *orange* que en la mosca silvestre, lo que prueba que están implicados en la homeostasis fisiológica del zinc (Fig. 17). Resultados similares se obtuvieron en los mutantes *lightoid* (que codifica para la Rab32), *claret* (que codifica para la GEF de la Rab32), *pink* (que codifica por una subunidad del complejo BLOC2) y *light* (que codifica por la subunidad Vps41 del complejo HOPS). La mosca *carnation*, mutante en la subunidad Vps33 del complejo HOPS, tiene una concentración intermedia de zinc, lo que indica que también estaría implicada en la homeostasis del metal.

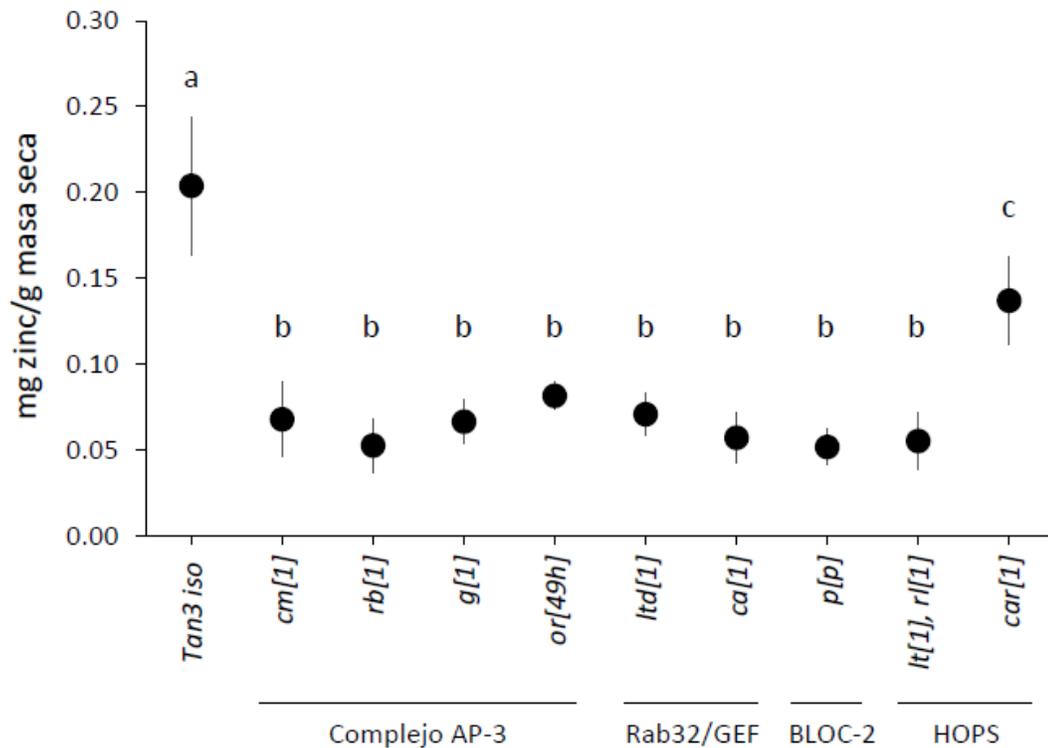


Fig. 17. Mutantes en la ruta de biogénesis de los LROs presentan problemas de almacenamiento de zinc. Las moscas mutantes en las subunidades de los complejos que participan en la formación de los LROs tienen aproximadamente 4 veces menos zinc que la mosca silvestre *Tan3 iso*. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas; las letras indican las diferencias entre genotipos a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni. Abreviaciones *cm*: carmine, *rb*: ruby, *g*: garnet, *or*: orange, *ltd*: lightoid, *ca*: claret, *p*: pink, *lt*: light, *rl*: rolled, *car*: carnation. Se indica a cuál complejo corresponden los genes de *D. melanogaster*.

Las moscas con una concentración deficiente de zinc presentan problemas para acumular riboflavina en los túbulos Malpighianos

Otro fenotipo relevante que tienen las moscas con baja concentración de zinc se presenta en los túbulos Malpighianos, órganos encargados en la homeostasis de la hemolinfa en la mosca. Los túbulos de una mosca silvestre son de color amarillo (Fig. 18) por la acumulación de riboflavina en gránulos pigmentarios (Nickla, 1972), sin embargo, se encontró ausencia de color en

los túbulos de las moscas con bajo nivel de zinc sugiriendo que, además, tienen problemas para almacenar riboflavina.

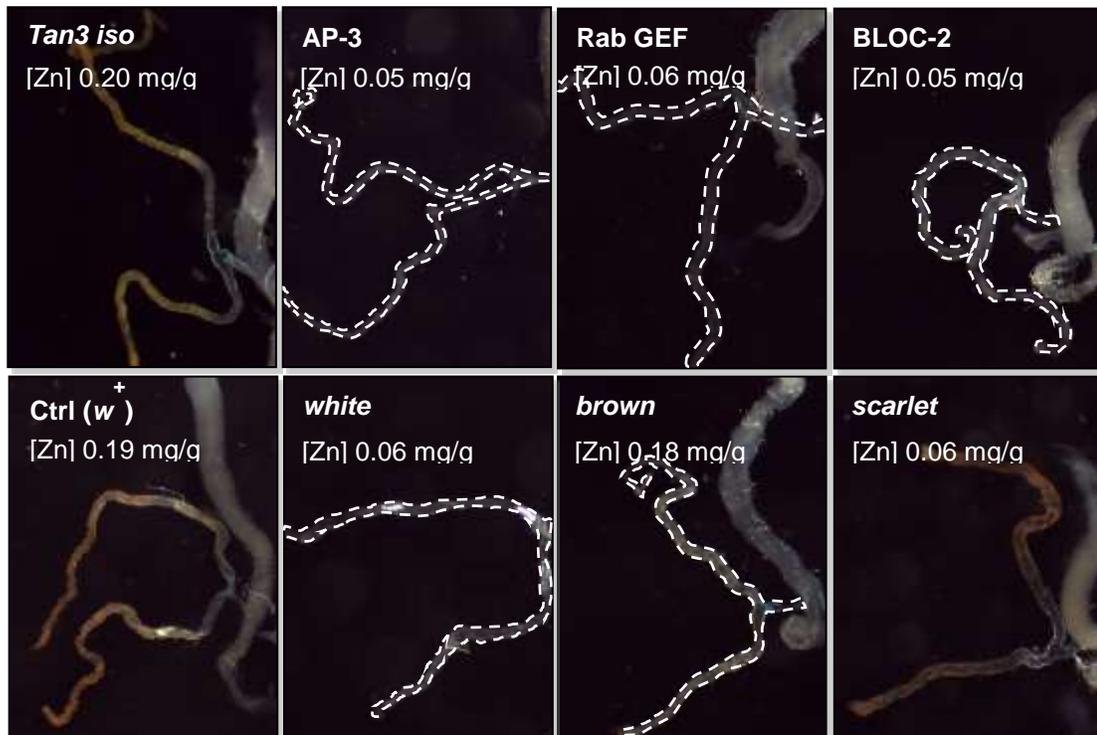


Fig. 18. Mutantes en la ruta de biogénesis de los LROs tienen problemas para acumular riboflavina en los túbulos Malpighianos. Túbulos Malpighianos de moscas hembras adultas mutantes en subunidades de los complejos que forman los LROs. Las moscas controles tienen niveles de zinc normales y los túbulos amarillos, mientras que las moscas mutantes tienen niveles de zinc bajos y los túbulos blancos. Esta característica es a la inversa en las mutantes *brown* y *scarlet*, es decir, *brown* tiene zinc intermedio y túbulos pálidos a diferencia de *scarlet* que tiene zinc bajo y túbulos amarillo/naranja.

En la mayoría de las moscas mutantes la ausencia de color se correlacionó con la ausencia de zinc, sin embargo, las mutantes *brown* y *scarlet* no cumplieron con esta regla, la mosca *brown* posee una concentración de zinc intermedio y carece de color en los túbulos mientras que la mosca *scarlet* sí tiene bajo zinc pero posee color en los túbulos. La explicación de esta observación se discutirá más adelante.

La riboflavina disminuye el contenido sistémico de zinc

Debido a que se observa una relación entre la ausencia de color en los túbulos Malpighianos y la deficiencia de zinc lo que se realizó a continuación fue crecer a las moscas mutantes y controles en una dieta suplementada con riboflavina para rescatar el fenotipo silvestre en las moscas que carecen de pigmento en los túbulos.

La Fig. 19 muestra que la concentración sistémica de zinc en las moscas control *w+* desarrolladas en una dieta con riboflavina disminuyeron su concentración de zinc al 50%, mientras que las moscas mutantes con baja concentración de zinc desarrolladas en la misma dieta no sufrieron cambios estadísticamente significativos.

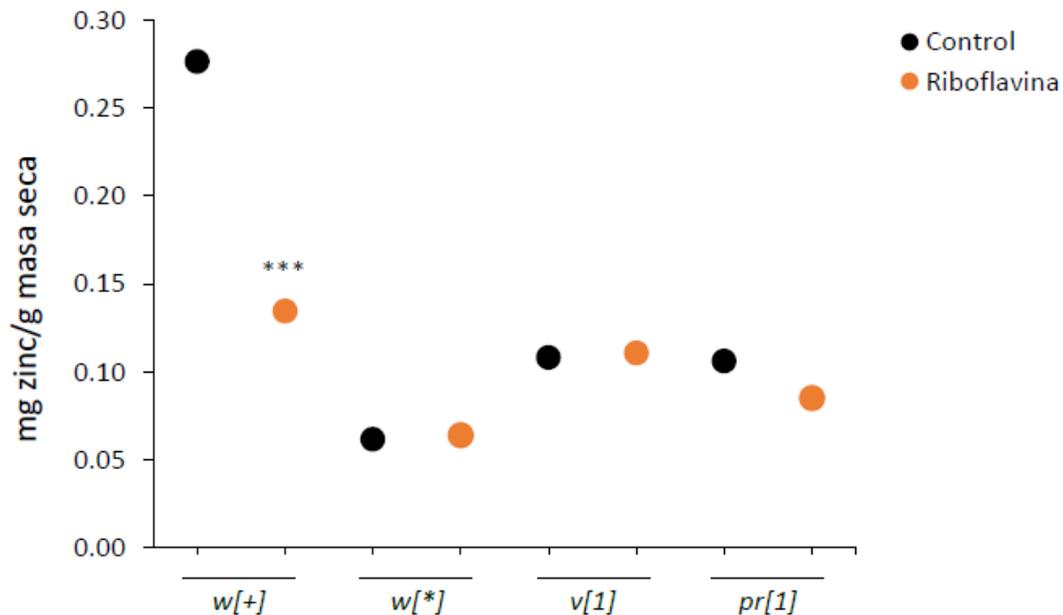


Fig. 19. Efecto de la riboflavina en la concentración de zinc de la mosca control *w+*. Concentración de zinc en las moscas *w[+]*, *w[*]*, *v[1]* y *pr[1]* desarrolladas en una dieta con riboflavina al 2.4 mM. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de dos vías mostró diferencias estadísticamente significativas; los asteriscos indican la diferencia entre un mismo genotipo alimentado con una dieta control vs una dieta con riboflavina a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0.001$).

El zinc se almacena en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*

Es importante recordar que el sitio donde se da la mayor expresión del gen *white* es en los túbulos Malpighianos y no en los ojos, sugiriendo que dicho gen tiene una función adicional a la de participar en la formación de los pigmentos de los ojos. Con este antecedente y con el hecho de que la mosca *white* tiene problemas con el almacenamiento de riboflavina en los túbulos Malpighianos se sugiere que estos órganos estarían también implicados en la homeostasis de zinc fisiológico. Por lo tanto, se procedió a diseccionar diferentes órganos de larva y de mosca adulta tanto de la mosca control *w+* como de la mosca mutante *white* con la finalidad de conocer el sitio donde está almacenado el exceso de zinc de la mosca control (Fig. 20).

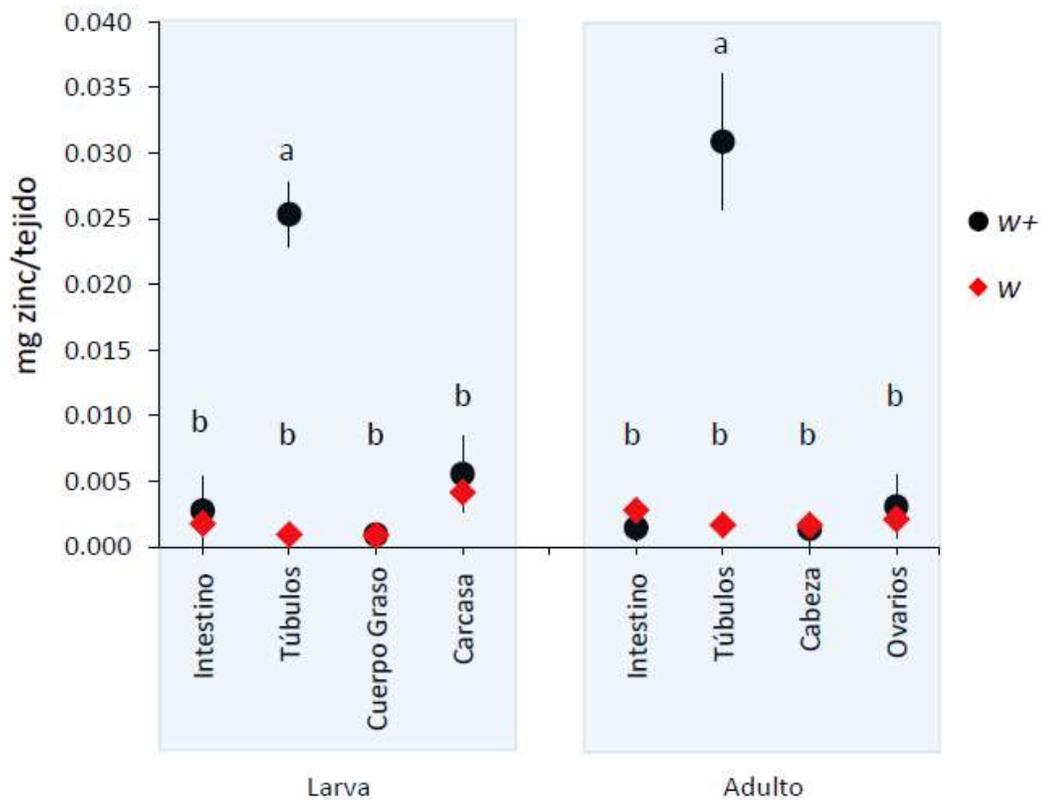


Fig. 20. Los túbulos Malpighianos de los animales control *w+* concentran la mayor cantidad de zinc presente en *D. melanogaster*. La concentración de zinc por órgano disecado de larvas y moscas adultas de los genotipos *w+* y *white*. Cada punto representa el promedio de la concentración de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de dos vías mostró diferencias estadísticamente significativas; las letras indican las diferencias entre órganos a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

Se observó que el exceso de zinc que tiene la mosca control *w+* se concentra en los túbulos Malpighianos sin importar el estadio del desarrollo en el que se encuentre la mosca. Estos resultados nos permiten proponer que los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster* son el sitio de almacenamiento de zinc a nivel de organismo, tal como se había visto en *Drosophila hydei* (Zierold & Wessing, 1990), en la misma *D. melanogaster* (Schofield *et al.*, 1997), y en la termita (Stewart *et al.*, 2011) en estudios anteriores.

Microscopia de rayos X demuestra la presencia de zinc en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*

Para demostrar la presencia de zinc en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*, se utilizó imagenología de fluorescencia de rayos X en el sincrotrón de Stanford, comprobando todo aquello describió hasta ahora.

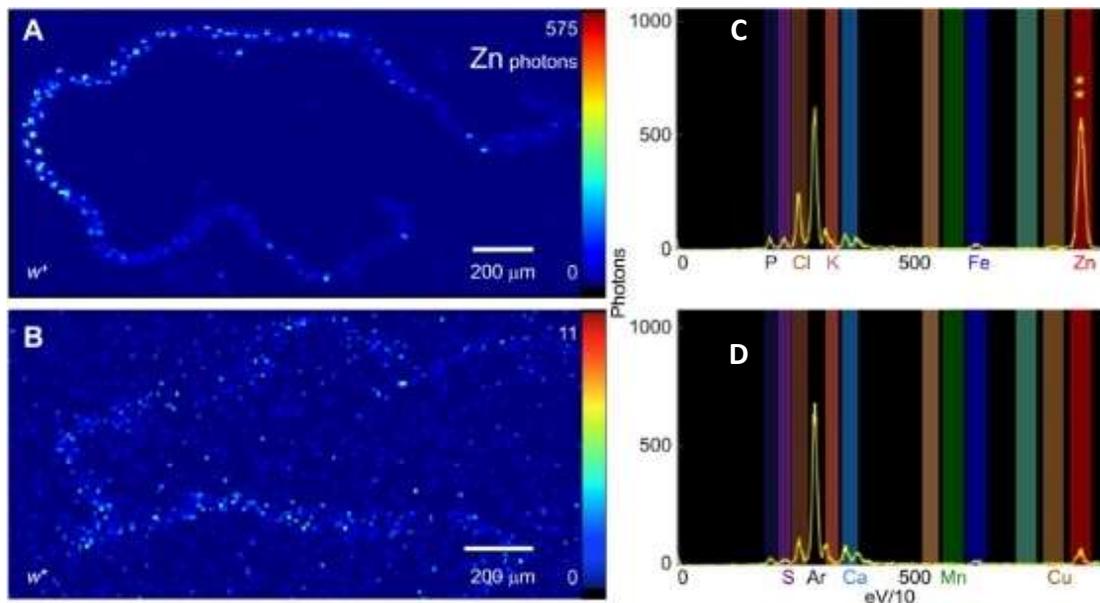


Fig. 21. Zinc en los túbulos Malpighianos demostrado mediante microscopia de rayos X. Imágenes representativas de los espectros de emisión del zinc de los túbulos Malpighianos de la mosca control *w+* (A) y de la mosca mutante *white* (B). Espectros de emisión del zinc indicando la máxima emisión del zinc a 575 fotones en la mosca control *w+* (C) y 11 fotones en la mosca mutante *white* (D).

En la Fig. 21A se observa que en los túbulos de la mosca control *w+* el zinc fue el único elemento detectado, por el contrario, en los túbulos de la mosca mutante *white* sólo se detectaron pequeñas cantidades de zinc (Fig. 21B).

Gránulos con el transportador ZnT35C en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*

Dado que la mayor concentración de zinc se encontró en los túbulos Malpighianos, el siguiente paso fue observar el tejido bajo el microscopio con la finalidad de conocer la forma en cual la célula está concentrando el metal. En este paso se utilizó a una mosca transgénica que tiene unida la proteína verde fluorescente al transportador de zinc, ZnT35C, expresado abundantemente, bajo sus propias secuencias regulatorias, en los túbulos Malpighianos, sugiriendo que podría ser el responsable de la concentración del zinc al interior de las células. Esta mosca se colocó bajo el fondo genético *w+* control y *white* mutante para analizar qué sucede en los túbulos Malpighianos de la mosca que almacena zinc en ellos y en la mutante donde este órgano no acumula el metal.

En la mosca control *w+*; *ZnT35C::GFP* el transportador de zinc está en la membrana de gránulos citoplasmáticos a diferencia de la mosca *w*; *ZnT35C::GFP* en la cual el transportador está en la membrana plasmática (Fig. 22). Este resultado sugiere que en la mosca silvestre el zinc podría estar almacenado en gránulos citoplasmáticos, en contraste, en la mosca mutante *white* el metal no se retiene debido a que no están presentes los gránulos en la célula.

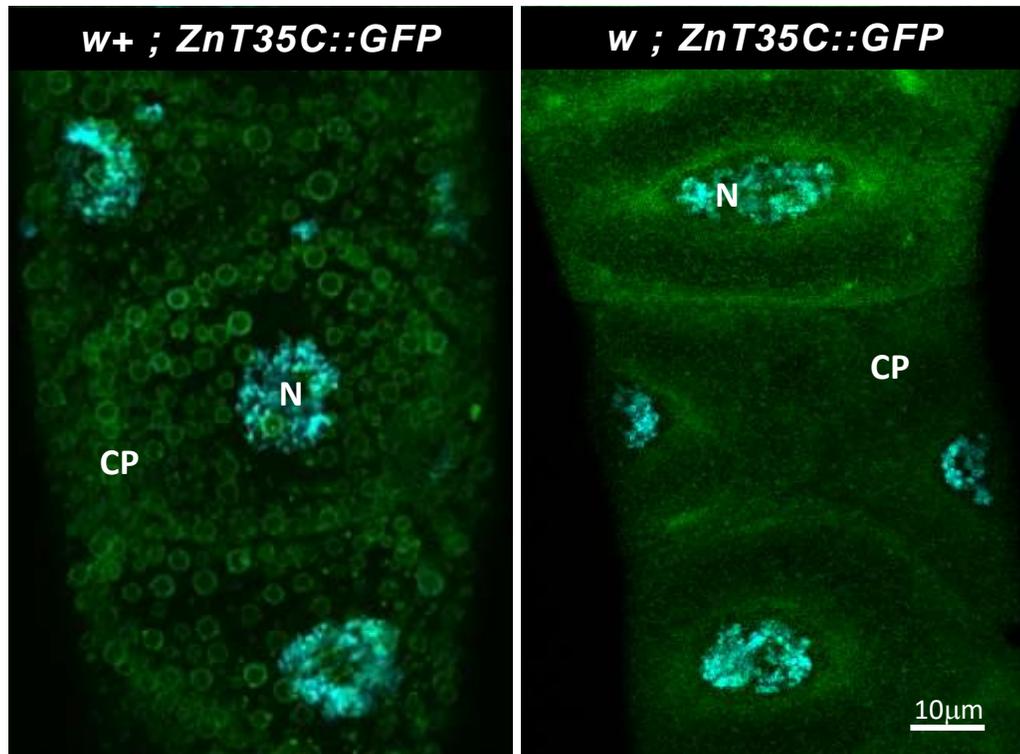


Fig. 22. El transportador ZnT35C está presente en la membrana de gránulos en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*. Imágenes confocales de los túbulos Malpighianos de una mosca adulta control *w+* y una mutante *white*. En la mosca *w+*; *ZnT35C::GFP* hay gránulos bordeados por el transportador ZnT35C mientras que en la mosca *w*; *ZnT35C::GFP* se observa el transportador asociado a la membrana como ya se había descrito previamente. CP: Células Principales; N: Núcleo.

Zinc en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster*

Una vez identificada la forma en la cual la célula está almacenando el zinc, nuestro siguiente objetivo fue observar el zinc al interior de la célula. Para llevar a cabo esta tarea se empleó el quelante FluoZin-3 AM, el cual emite a una longitud de onda de 516 nm cuando ha unido al zinc, lo que va a permitir ver señal en color verde. En la Fig. 23 se observa que en la mosca control *w+*, el zinc está en el citoplasma concentrado en pequeños cúmulos a diferencia de la mosca *white* en donde no se observan dichas señales fluorescentes. Este resultado sugiere que, por la forma en cómo está concentrado el zinc, éste podría estar almacenado en los gránulos vistos anteriormente con el marcaje ZnT35C::GFP (Fig. 22).

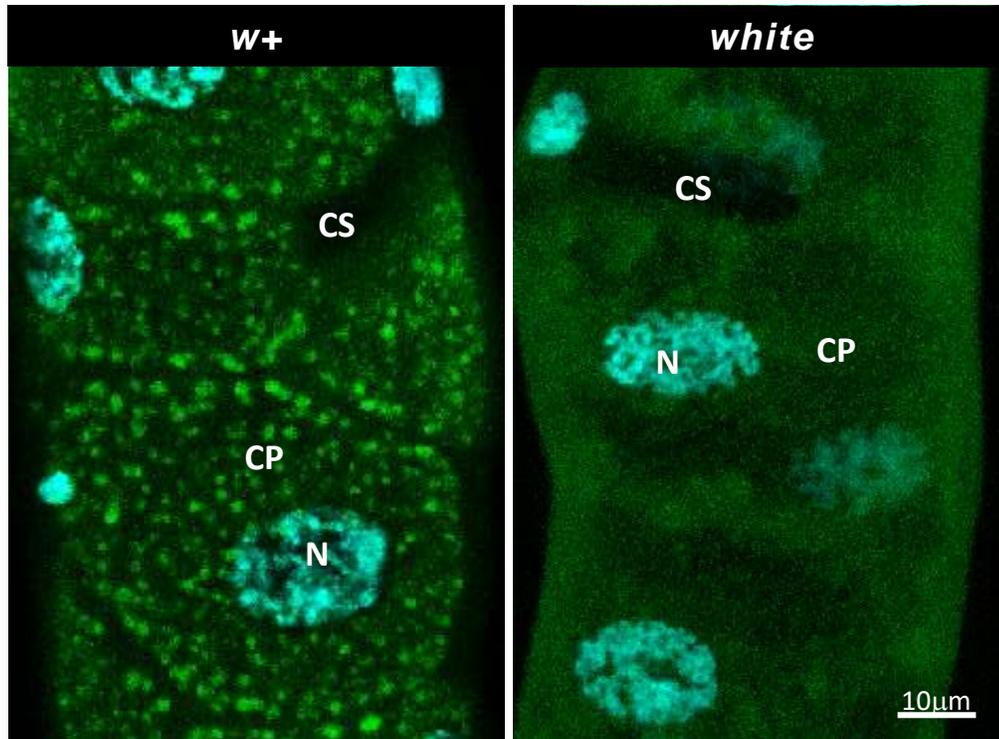


Fig. 23. Gránulos de zinc en *D. melanogaster*. Imágenes tomadas en el microscopio confocal de los túbulos Malpighianos de una mosca adulta control *w+* y una mutante *white* incubadas con el fluoróforo. En la mosca *w+* se observan acumulaciones de zinc en el citoplasma a diferencia de la mosca *white*. CP: Célula Principal; CS: Célula Secundaria; N: Núcleo.

Expresión de metalotioneínas

Como se mencionó en la introducción, es bien conocido que las metalotioneínas se encargan de amortiguar altas concentraciones de metales, reduciendo su toxicidad en la célula. Por lo tanto, cualquier modificación en la expresión de las metalotioneínas cambiaría el equilibrio en la homeostasis de los metales, en este caso, de la homeostasis del zinc. Por ello se decidió evaluar el efecto que tiene la ausencia de las metalotioneínas (A-D) y del factor de transcripción MTF-1, en la concentración de zinc fisiológico.

En la Fig. 24 se observa que la ausencia de las Mtn(A-D) induce una mayor concentración de zinc que en la mosca control *w+*. En contraste, la falta de MTF-1 no afecta la concentración de zinc. Cuando las moscas mutantes en

las Mtn(A-D) y en el MTF-1 están bajo el fondo genético *white* mutante, la concentración de zinc es similar a la que se encuentra en la mosca mutante *white*.

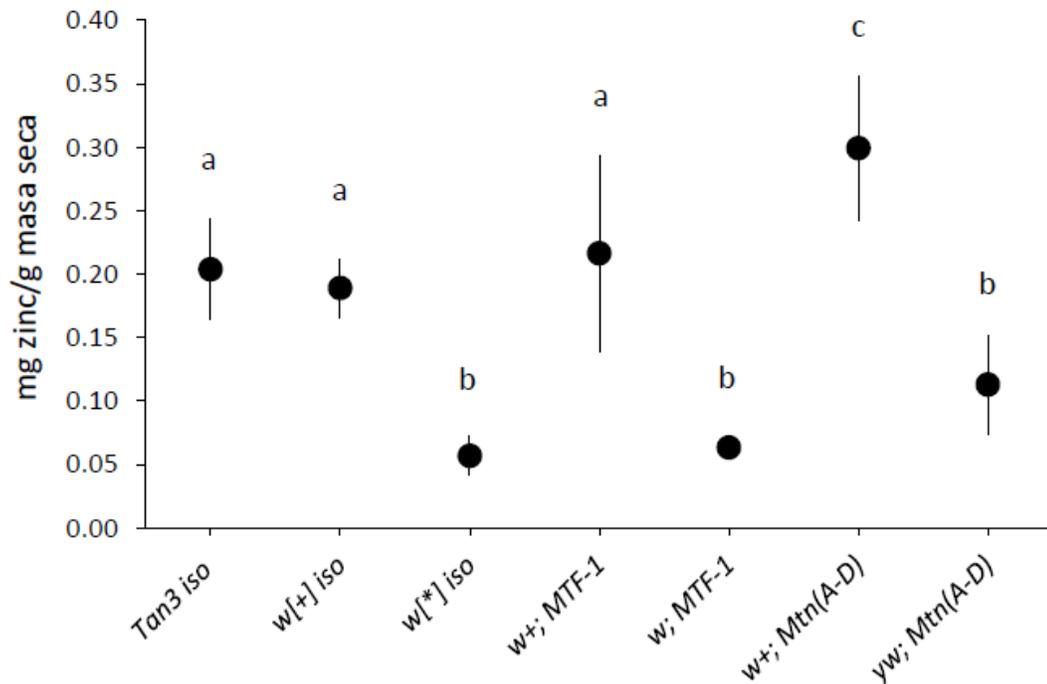


Fig. 24. Mutantes relacionadas con la regulación celular de la homeostasis de zinc. Concentración de zinc en la mosca mutante en el factor de transcripción de metales, *MTF-1*, y en la mosca mutante en 4 de las 5 metalotioneínas *Mtn(A-D)* de *D. melanogaster*. Ambas mutantes están en el fondo genético *w+* y *white*. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas; las letras indican las diferencias entre genotipos a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

Ahora bien, dado que cambios en la expresión de la metalotioneínas disminuyen la concentración de zinc, se investigó si la expresión de las metalotioneínas depende del zinc. Para llevar a cabo este objetivo se alimentó a la mosca control *w+* con 1mM de zinc. En la Fig. 25 Se observa que no hubo cambios en la expresión de las cinco metalotioneínas en la mosca adulta *w+* alimentada con 1 mM de zinc *versus* la alimentada con la dieta control. Este resultado fue inesperado dado que en el estadio larvario se conoce que 1 mM

de zinc es suficiente para inducir estos mismos genes aunque en menor proporción que lo hacen el cobre o el cadmio (Yepiskoposyan *et al.*, 2006).

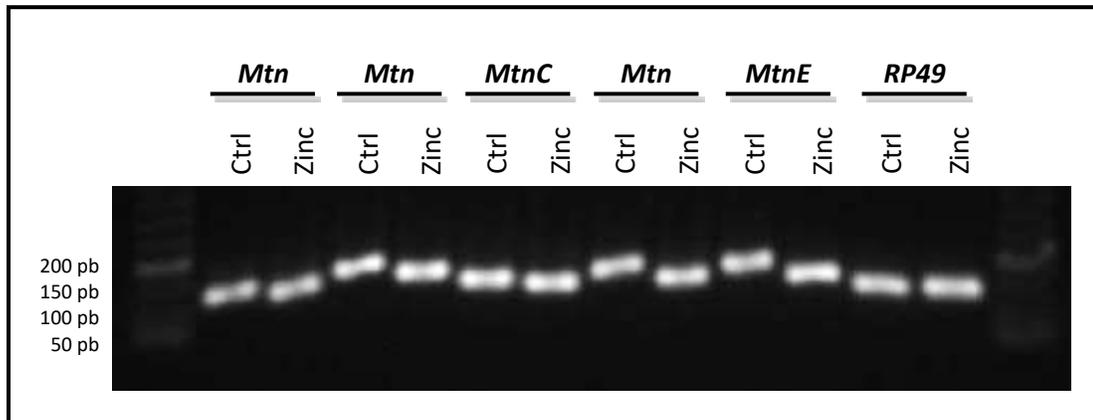


Fig. 25. RT-PCR de punto final (semi-cuantitativa) de metalotioneínas en la mosca *w+* control desarrollada en una dieta con 1mM de zinc. El nivel de expresión de las cinco metalotioneínas en la mosca *w+* control desarrollada en una dieta con 1mM de zinc es similar al que presentan las moscas crecidas en la dieta control. El gen ribosomal *RP49* fue usado como control de carga.

Moscas mutantes en enzimas de las vías de síntesis de los omocromos y las drosopterinas tienen defectos con el almacenamiento de zinc

Como ya se mostró, los transportadores *white*, *brown* y *scarlet* están involucrados en la homeostasis de zinc fisiológico. Sin embargo, desde comienzos del siglo pasado se sabe que participan en la síntesis de los pigmentos que le dan color al ojo de la mosca (Fig. 2). En experimentos aún no publicados del Dr. Fanis Missirlis se descubrió que las enzimas *vermillion* y *purple*, participantes en la síntesis de omocromos y drosopterinas respectivamente, están involucradas en la homeostasis de zinc fisiológico debido a que las moscas mutantes en dichas enzimas tienen un déficit en la concentración de zinc fisiológico (Fig. 26).

Para rescatar el fenotipo silvestre en las moscas mutantes *vermillion* y *purple* se agregó a la dieta algunos de los compuestos intermediarios de las rutas metabólicas donde intervienen las enzimas. En la Fig. 26 Se observa que al

alimentar a la mutante *vermillion* con quinurenina y 3-hidroxiquinurenina la concentración de zinc se re-establece alcanzando valores similares o por encima del valor normal de la mosca *w+* control. Ni ácido xanturénico, ni BH4 (este último se probó con el objetivo de rescatar el nivel de zinc en la mutante *purple*) tuvieron efecto estadísticamente significativo en la concentración de zinc de las moscas alimentadas con dichas dietas.

Es importante hacer notar que cuando la mosca *w+* control fue alimentada con triptófano, quinurenina y 3-hidroxiquinurenina la concentración de zinc aumentó por encima del valor que tiene normalmente, siendo la 3-hidroxiquinurenina el metabolito con el efecto más exacerbado.

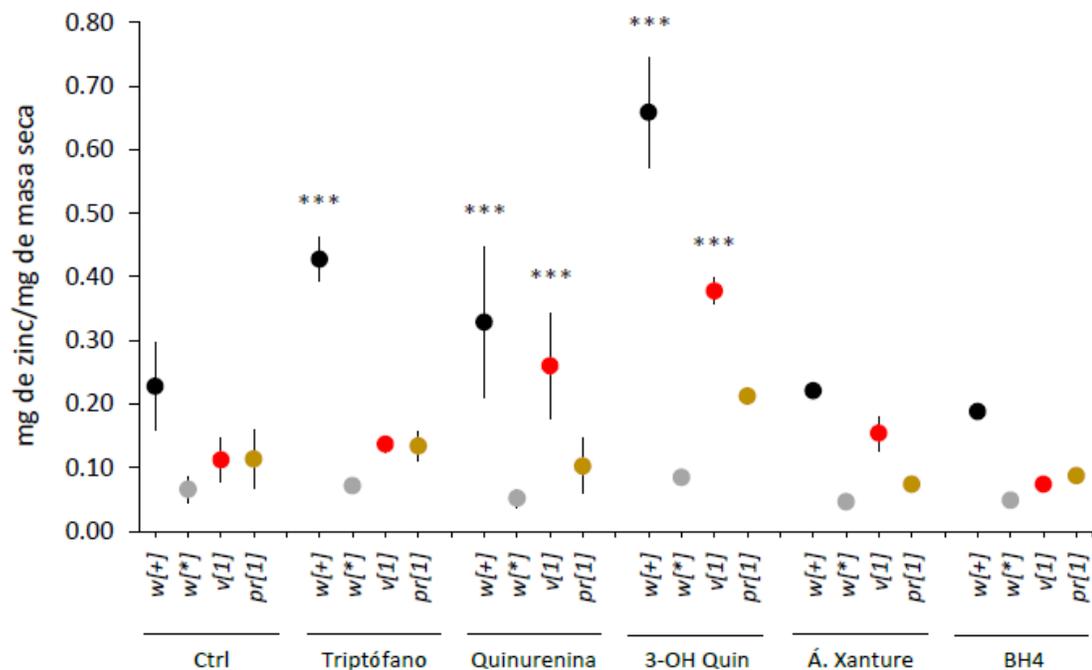


Fig. 26. Efecto de la dieta en la concentración de zinc de mutantes en las vías de síntesis de los pigmentos de los ojos de *D. melanogaster*. Concentración de zinc en las moscas mutantes en las vías de síntesis de los pigmentos de los ojos de *D. melanogaster* desarrollada en dietas con los metabolitos intermediarios de las vías. Cada compuesto tenía una concentración final de 2.4mM. Cada punto representa el promedio de las concentraciones de zinc y su desviación estándar. El ANOVA de dos vías mostró diferencias estadísticamente significativas; los asteriscos indican la diferencia entre un mismo genotipo alimentado con una dieta control vs una dieta con el intermediario metabólico a partir de un análisis *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Almacenamiento de zinc en *D. melanogaster* y otros animales

El zinc es un elemento esencial que participa en múltiples procesos celulares como la síntesis de ADN (Wu & Wu, 1987), vía secretora (Tempio & Anelli, 2020) y la señalización celular (Fukada *et al.*, 2011). La actividad enzimática depende en muchos casos del zinc como cofactor (Maret, 2013). También el metal forma parte estructural de una gran variedad de proteínas (Padjasek *et al.*, 2020). Debido a su importancia, es necesario que su homeostasis esté bien controlada a través de transportadores que permitan el flujo del metal de un sitio a otro de la célula (Lye *et al.*, 2012) y de organelos especializados que lo almacenen permitiendo su uso bajo condiciones de estrés celular y/o fisiológico (Roh *et al.*, 2012).

Tejidos como los músculos, los huesos, la piel y el hígado contienen la mayor parte del zinc corporal en humanos (King *et al.*, 2001) (Tabla 4). Se ha mostrado que, en estados de deficiencia de zinc dietético, la concentración del metal permanece constante en algunos tejidos como el cabello, la piel y el músculo esquelético, mientras que en el plasma y el hígado disminuye (King *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta la fecha no existe un sitio generalmente aceptado para el almacenamiento corporal de zinc en humanos u otros mamíferos, por lo tanto, valdría la pena investigar si las células que contienen zinc como las células β pancreáticas (Hou *et al.*, 2009) y las células *paneth* intestinales (Giblin *et al.*, 2006) sirven como reservorio para este metal. Hasta en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, que también almacenan el metal en sus vesículas pre-sinápticas (Cole *et al.*, 1999), el papel funcional del zinc en este sitio sigue investigándose, pero no en un contexto de almacenamiento del metal (Krall *et al.*, 2021). Se conoce que las células arriba mencionadas contienen importante presencia de gránulos de zinc, sin embargo, no se les considera repositorios del metal debido a que cumplen otras funciones consideradas más relevantes para el organismo, como la

secreción de insulina para la regulación del consumo de glucosa, de péptidos antimicrobianos para la regulación de microbiota y de glutamato para la transmisión sináptica, respectivamente.

Tabla 4. Contenido de zinc en los órganos de un hombre adulto normal (70 kg)^a

Tejido	Concentración de zinc (µg/g peso seco)	Contenido de zinc (g)	Porcentaje de zinc corporal (%)
Músculo esquelético	51	1.53	57
Hueso	100	0.77	29
Piel	32	0.16	6
Hígado	58	0.13	5
Cerebro	11	0.04	1.5
Riñones	55	0.02	0.7
Corazón	23	0.01	0.4
Cabello	150	< 0.01	~ 0.1
Plasma sanguíneo	1	< 0.01	~ 0.1

^a Tomado de Jackson, 1989.

El único animal donde se ha propuesto un sitio de almacenamiento de zinc, antes de la realización de esta tesis, es el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Al alimentarse con una dieta con alto contenido de zinc, *C. elegans* genera nuevos gránulos, llamados gránulos intestinales, los cuales funcionan como el principal sitio de almacenamiento de zinc, movilizándolo el metal durante una deficiencia dietética. Estos gránulos confieren resistencia al nematodo durante la intoxicación con zinc porque al haber una disminución en la cantidad de gránulos o una pérdida de la función del transportador de zinc, CDF-2, los gusanos se vuelven sensibles a la toxicidad por el zinc (Roh *et al.*, 2012). El

modelo de *C. elegans* ha contribuido de forma importante sobre nuestro entendimiento de la homeostasis de zinc a nivel celular y sistémico (Earley *et al.*, 2021).

Proponemos que los túbulos Malpighianos son el órgano encargado del almacenamiento fisiológico de zinc en *D. melanogaster*. Como los túbulos Malpighianos participan en la excreción (Yin *et al.*, 2017), una posibilidad es que estén excretando el zinc a la luz del intestino. Las células principales de los túbulos de Malpighianos podrían tener un propósito fisiológico similar al de las células *paneth* intestinales en los mamíferos, donde el zinc secretado se ha implicado en el mantenimiento del nicho de las células madre y la integridad epitelial (Geiser *et al.*, 2012; Ohashi *et al.*, 2016; Podany *et al.*, 2016). Otra posibilidad es que el zinc luminal pueda funcionar como un regulador de la microbiota intestinal o para el control de algún patógeno (Bonfini *et al.*, 2016; Mistry *et al.*, 2016). Finalmente, será de interés investigar si el zinc secretado es reabsorbido por el intestino posterior, como es el caso de los iones de metales alcalinos (O'Donnell & Maddrell, 1995).

Los LROs como posibles almacenes de metales

Se ha mostrado que en varios tipos de LROs hay presencia de metales. Ejemplos de ellos están listados en la Tabla 5. Hemos mencionado las vesículas pre-sinápticas en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, los gránulos en las células acinares y las células β pancreáticas, los gránulos secretores en las células *paneth* intestinales y los gránulos del intestino en *C. elegans*; todos ellos almacenan zinc y en algunos casos también calcio o magnesio (Tabla 5). Este tipo de gránulos están también presentes en los melanocitos en los melanosomas de la piel, los gránulos pigmentarios en las células pigmentarias de los ojos y las vesículas secretoras en las glándulas mamarias de los animales (Kelly *et al.*, 2004; Lichten & Cousins, 2009).

Tabla 5. Metales presentes en algunos LROs de animales.

Tipo de célula	LROs	Metal	Función de los LROs	Referencia
Neuronas glutamatérgicas del hipocampo	Vesículas pre-sinápticas	Zinc	Almacenamiento y secreción de glutamato	(Özkan & Ueda, 1998)
Melanocitos	Melanosomas	Calcio, zinc, hierro y cobre	Síntesis y almacenamiento de melanina	(Hong & Simon, 2007; Maranduca <i>et al.</i> , 2019)
Epitelio Pigmentario Retinal	Melanosomas	Zinc	Síntesis y almacenamiento de pigmentos oculares	(Kokkinou <i>et al.</i> , 2005; Ugarte & Osborne, 2014)
Células acinares pancreáticas	Gránulos secretores	Zinc	Síntesis, almacenamiento y secreción de enzimas pancreáticas	(Gorelick <i>et al.</i> , 2018; Lichten & Cousins, 2009)
β pancreáticas	Gránulos de insulina	Calcio, magnesio y zinc	Síntesis, almacenamiento y secreción de insulina	(Hutton <i>et al.</i> , 1983)
Células epiteliales mamarias	Vesículas secretoras	Zinc	Nutrición al neonato	(Lee & Kelleher, 2016)
Células <i>paneth</i> intestinales	Gránulos secretores	Calcio y zinc	Secreción de péptidos antimicrobianos	(Dinsdale, 1984; Ouellette <i>et al.</i> , 2000)
Células de las termitas	Gránulos	Calcio, zinc	Almacenamiento de zinc	(Stewart <i>et al.</i> , 2011)
Células intestinales de <i>C. elegans</i>	Gránulos intestinales	Zinc	Almacenamiento y secreción de zinc	(Roh <i>et al.</i> , 2012)

En este proyecto he mostrado que en los túbulos Malpighianos de *D. melanogaster* hay presencia de un tipo de LROs capaz de almacenar zinc cuando éste se encuentra en exceso. Proponemos la presencia de dos tipos de gránulos tipo LROs en los túbulos Malpighianos. En un gránulo estaría el dímero white-scarlet y el transportador ZnT35C implicados en el almacenamiento de zinc, mientras que en el otro gránulo estaría presente el

dímero white-brown involucrado en el almacenamiento de la riboflavina, pigmento responsable del color amarillo-naranja característico de los túbulos Malpighianos silvestres (Fig. 27). Cabe resaltar que el dímero white-scarlet está involucrado en la formación de los pigmentos de los ojos de la mosca. Aquí, se demostró por la primera vez su participación en la regulación homeostática de zinc.

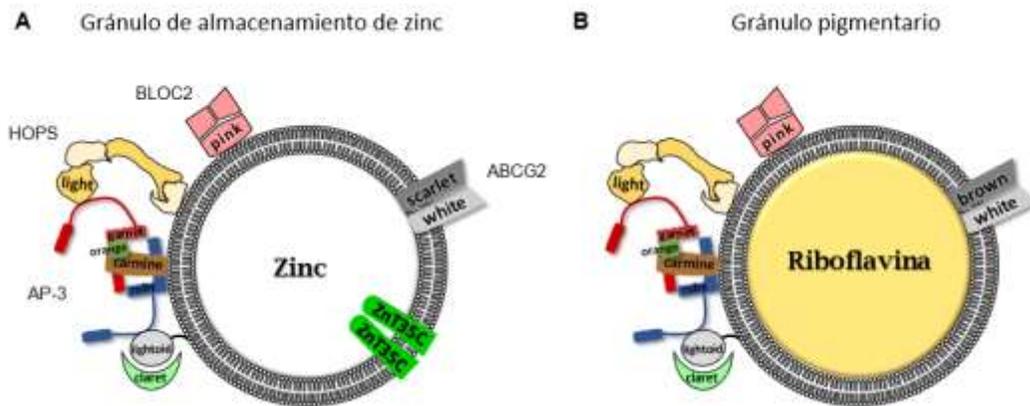


Fig. 27. Representación esquemática de un gránulo de almacenamiento de zinc y un gránulo pigmentario. A) Gránulo de almacenamiento de zinc. B) Gránulo de almacenamiento de riboflavina. A la izquierda de cada gránulo se muestran los complejos implicados en la biogénesis de los LROs, compartidos entre los dos tipos de gránulo. Los transportadores se muestran a la derecha de los gránulos. Todavía se desconoce por cuál mecanismo se separan en diferentes gránulos los dímeros white-scarlet y white-brown.

Es importante destacar que mutaciones en los genes involucrados en la biogénesis de los LROs disminuyeron la concentración de zinc y afectaron la acumulación de riboflavina (Fig. 18). Esta observación plantea una cuestión interesante: ¿Cómo los complejos Rab32/GEF, AP3, HOPS y BLOC permiten el direccionamiento de los transportadores hacia el LRO, definiendo así la identidad del organelo y dando lugar a diferentes tipos de LRO? (Bonifacino & Neefjes, 2017; Bultema *et al.*, 2012; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Gerondopoulos *et al.*, 2012; Lloyd *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 2000).

Este estudio demuestra que la biogénesis de gránulos de zinc en las células primarias de los túbulos Malpighianos no es una función vital, ya que los mutantes que carecen de dichos gránulos siguen vivos en condiciones de laboratorio (Tejeda-Guzmán *et al.*, 2018). Sin embargo, en otras especies de insectos donde se ha buscado verificar si tienen o no similares almacenes de zinc, siempre se han detectado, sea directamente, en los túbulos Malpighianos (Polat *et al.*, 2020; Stewart *et al.*, 2011) o indirectamente, por la conservación de la concentración de zinc corporal total en las diferentes especies de insectos (Rempoulakis *et al.*, 2014; Sadraie & Missirlis, 2011). Dicha conservación de los gránulos de zinc en diversas especies de insectos sugiere que tienen un papel fisiológico importante, ya que están mantenidos durante la evolución. Una de las perspectivas de este trabajo sería definir la función fisiológica que confieren dichos gránulos en *D. melanogaster*. Arriba discutimos su posible función regulando la microbiota o las uniones estrechas de los epitelios (de los túbulos Malpighianos o del intestino), ahora consideraremos su posible involucramiento en la regulación de zinc a nivel sistémico.

Regulación de zinc a nivel sistémico

La importancia de los metales en los sistemas biológicos ha quedado bien caracterizada en diferentes animales (Maret, 2018; Mwangi *et al.*, 2018). He ahí el valor de entender de qué manera se da su regulación a nivel celular y a nivel sistémico. Para el caso del hierro, el metal de transición más abundante en los mamíferos, se tiene conocimiento de cómo se da su regulación sistémica (Wang & Babitt, 2019). Cuando hay exceso de hierro plasmático, el incremento en la saturación de transferrina está detectada por el hígado y como respuesta los hepatocitos secretan la hormona hepcidina, un péptido que se une al único exportador de hierro (la ferroportina) presente en la membrana plasmática de los macrófagos y en la cara basolateral de los enterocitos. Posteriormente, el complejo hepcidina-ferroportina se endocita

impidiendo la liberación de hierro al torrente sanguíneo. El uso de la transferrina saturada para la síntesis de nuevos glóbulos rojos (un proceso continuo) regresa los niveles de hierro sistémico a un equilibrio. En el escenario contrario, cuando el nivel de saturación de la transferrina está bajo y no hay secreción de hepcidina, el hierro puede ser secretado al torrente sanguíneo por los enterocitos y los macrófagos (Fig. 28). De manera general, este sistema está controlando la disponibilidad de hierro plasmático usando la relación cuantitativa entre la transferrina saturada y la transferrina insaturada (Lawen & Lane, 2013).

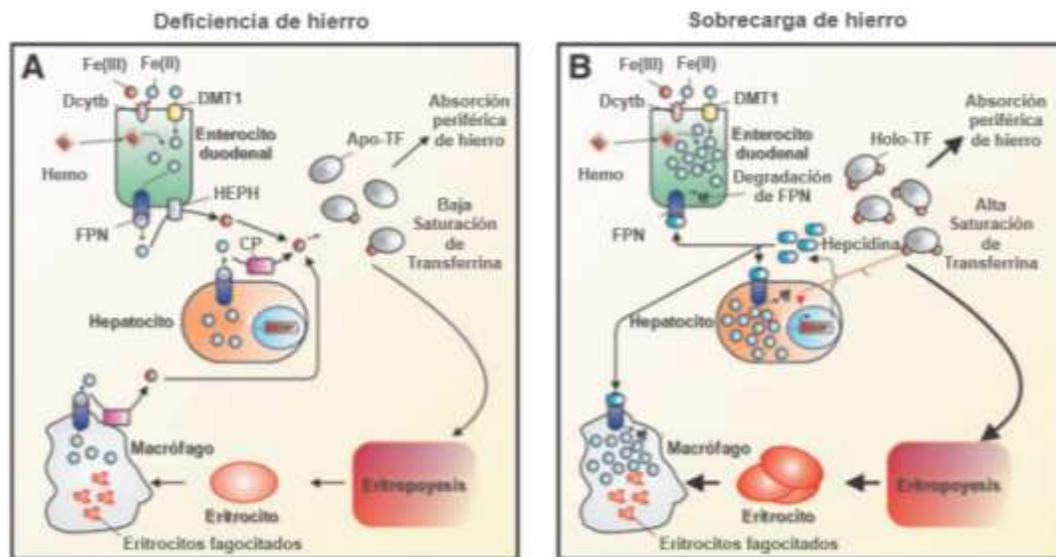


Fig. 28. Regulación sistémica de hierro. Los enterocitos importan el hierro de la dieta. Bajo condiciones de deficiencia de hierro (A) el metal es secretado al plasma sanguíneo por la ferroportina y oxidado por la hefaestina. Por otro lado, la fagocitosis de los eritrocitos senescentes conduce a la liberación de hierro dentro de los macrófagos, su secreción a través de la ferroportina y oxidación por la ceruloplasmina. El hierro oxidado se une a la transferrina. El hierro unido a transferrina es la principal fuente para la eritropoyesis. En condiciones de sobrecarga de hierro (B) los hepatocitos detectan el nivel de saturación de la transferrina y el nivel de hierro almacenado, posteriormente comienza la transcripción de la hepcidina. La hepcidina es secretada al plasma donde se une a la ferroportina de los enterocitos, los macrófagos y los hepatocitos, facilitando la internalización y degradación del transportador. Modificado de Lawen & Lane, 2013.

A diferencia del hierro, hasta la fecha se desconoce cómo se regula sistémicamente el zinc. Se tiene conocimiento de algunos participantes de la

homeostasis del metal a nivel celular (Fig. 14), sin embargo, no se sabe si existe alguna hormona como la hepcidina que pudiera estar regulando su absorción y secreción.

Recientemente hubo indicaciones de que en *D. melanogaster* la deficiencia de zinc corporal causa pérdida de la aversión innata contra alimentos con contenido tóxico de zinc (Luo *et al.*, 2021). Aquellas moscas que no cursaban por la deficiencia del metal evitaban la ingesta de dicho alimento, sugiriendo que el nivel de zinc corporal puede estar censado y regular la ingesta del metal. Estos autores discutieron que, en estudios previos, tanto *in vitro* y en modelos animales, se había demostrado que el zinc juega un papel importante en la secreción de insulina y su hormona contra-reguladora clave, el glucagón (Maret, 2017). Esto los llevo hacer experimentos que sugirieron que la vía de la hormona adipoquinética (AKH), similar al glucagón en mamíferos, y su receptor (AKHR), están mediando la sensibilidad al zinc dietético dependiendo de la concentración de zinc corporal (Luo *et al.*, 2021). Este es el primer ejemplo de que está en operación un sistema de monitoreo de zinc a nivel sistémico.

Como perspectiva de este trabajo, proponemos que la 3-hidroxiquinurenina, metabolito de la degradación del triptófano e intermediario en la producción de los omocromos (Fig. 2), podría estar implicada en la homeostasis del zinc sistémico. Mostramos que una dieta rica en 3-hidroxiquinurenina aumenta el nivel de zinc en moscas silvestres, mientras que también corrigió la deficiencia en zinc corporal en las moscas mutantes *vermillion* (en las cuales no es posible la conversión de triptófano a quinurenina). Dichas moscas cuentan con una concentración de zinc de aproximadamente 0.11 mg de zinc/mg de masa seca y después de ser alimentadas con 3-hidroxiquinurenina, la concentración de zinc aumentó a 0.37 mg de zinc/mg de masa seca, valor superior al encontrado en moscas controles (0.22mg de zinc/mg de masa seca) (Fig. 26). Estos

resultados nos sugieren que la vía de las quinureninas podría ser otra vía que estaría regulando el zinc a nivel sistémico.

Es importante hacer notar que cuando las moscas controles fueron alimentadas con una dieta rica en triptófano, éstas aumentaron su concentración de zinc corporal de 0.22 a 0.65 mg de zinc/mg de masa seca, lo que nos sugiere que el triptófano dietético, estaría participando en la homeostasis de zinc sistémico (Fig. 26).

En estudios previos se ha visto que en las moscas mutantes *vermillion*, gránulos fluorescentes en los túbulos Malpighianos están ausentes y, éstos, se rescatan al alimentar a la mosca con quinurenina (Yagi & Ogawa, 1996), lo que nos lleva a sugerir que la quinurenina podría estar regulando la biogénesis de los gránulos de almacenamiento de zinc que hemos descrito en este proyecto.

El uso de la mutante *white* como control experimental en los laboratorios de *D. melanogaster*

Desde su descubrimiento por Thomas H. Morgan en el año 1910, el gen *white* de *D. melanogaster* se ha convertido en uno de los genes más estudiados de la especie y se ha utilizado ampliamente como marcador genético en una multitud de cepas de moscas transgénicas, la mayoría de las cuales están construidas bajo el fondo genético de la mutante *white*. Nuestros resultados sobre la carencia de almacenes de zinc en los túbulos Malpighianos de las moscas mutantes *white*, se agregan a una importante serie de señalamientos de otros autores, sobre las posibles alteraciones en la fisiología celular de la mosca mutante *white*. Enseguida discutiremos las implicaciones de su uso como la principal cepa de control experimental en diversos campos de estudio con el modelo *D. melanogaster*.

Campbell y Nash (2001) mostraron una diferencia en el rendimiento neuromuscular entre las moscas silvestres y las moscas mutantes *white* o *brown* expuestas a analgésicos volátiles, sugiriendo que el transporte de guanina podría influir en la función neural y la sensibilidad anestésica. Borycz y colaboradores (2008) mostraron que las moscas mutantes *white*, *brown* y *scarlet* tienen alterado el contenido y la distribución de aminas biogénicas en el cerebro, sugiriendo que las anomalías de comportamiento en las moscas mutantes podrían deberse a que las neuronas aminérgicas tienen bajos niveles de aminas que puedan ser liberados. Años después (2013), Krstic y colaboradores mostraron que las moscas machos mutantes *white* despliegan conductas de cortejo hacia otros machos y, además, tienen incrementado la excitación sexual. Adicionalmente se mostró que las moscas mutantes *white* no sólo son ciegas, sino que también se deslumbran por el desbordamiento de la luz durante el día. Haciendo notar las implicaciones de estos hallazgos para la interpretación adecuada de los estudios de comportamiento con las moscas mutantes *white*. Xiao y Robertson (2016) mostraron que el gen *white* modula el tiempo de recuperación locomotora tras la anoxia. Las moscas silvestres mostraron una recuperación locomotora rápida y constante después de la anoxia, mientras que las moscas mutantes *white* mostraron una recuperación significativamente más retardada y variable. Dos años más tarde (2018), Ferreiro y colaboradores mostraron que las moscas mutantes *white* de la cepa *w¹¹¹⁸* sufren degeneración retiniana. Se observó que las mutantes *w¹¹¹⁸* tienen una pérdida progresiva de la capacidad de trepar, una vida útil más corta y una resistencia reducida a diversas formas de estrés. Este mismo año se publicó la conclusión principal de la presente tesis, que las mutantes *white* carecen de gránulos de zinc en sus túbulos Malpighianos (Tejeda-Guzmán *et al.*, 2018). Finalmente, en el año en curso (2021) Sasaki y colaboradores describieron, aplicando la técnica de metabolómica, cambios metabólicos en varias vías bioquímicas, algunas (como la de los tetrahidrolatos) que previamente no habían sido asociadas con la mutante *white*.

En este punto, se tiene que aclarar un detalle técnico. *D. melanogaster* se utiliza ampliamente para investigar mecanismos genéticos donde se hace uso de transposones que llevan el marcador genético-fenotípico *mini-white*, un derivado del gen endógeno *white*. Dos estudios donde se ha mostrado que la presencia del *mini-white* influye en los resultados mencionan que (1) existe un *insulator* (elemento regulador de largo alcance) colindando con el gen *white* presente en las construcciones de *mini-white*, que podría haber influido en los resultados y conclusiones de muchos trabajos (Chetverina *et al.*, 2008) y (2) en ensayos de comportamiento, la sensibilidad al etanol está notablemente influenciada por la presencia de gen *white* y del *mini-white* (Chan *et al.*, 2014). Es importante considerar que en algunos casos el constructo *mini-white* rescata por la ausencia del gen *white* endógeno (este fue el caso en el estudio de Luo y colaboradores (2021), mencionado en la sección anterior por la implicación de las neuronas gustativas en la detección de altas concentraciones de zinc en los alimentos). Pero en otros casos (por ejemplo, en nuestro estudio) el gen *mini-white* no rescató la pérdida de gránulos de zinc en los túbulos Malpighianos. Como su nombre lo indica, no se trata de un constructo que incorporó toda la región regulatoria del gen *white* silvestre. Estas observaciones son pertinentes para la multitud de experimentadores alrededor del mundo que usan diariamente el *mini-white* como marcador en las moscas transgénicas.

Más allá del fenotipo clásico del color de ojos, las mutaciones en el gen *white* alteran funciones biológicas que afectan parámetros como la movilidad, el comportamiento, la esperanza de vida y la tolerancia al estrés. En consecuencia, se sugiere precaución y atención durante la interpretación de experimentos antiguos que emplean moscas mutantes *white*. Además, se recomienda que se agregue al uso de la mosca mutante *white* como control experimental, una cepa silvestre. Esta recomendación surge naturalmente como una contribución adicional de la presente tesis doctoral.

CONCLUSIONES

En este trabajo mostramos que *D. melanogaster* almacena zinc en las células primarias de los túbulos Malpighianos.

El metal se concentra en organelos de almacenamiento de zinc, un tipo de organelo relacionado a los lisosomas (LROs).

La maquinaria de formación de los LROs está implicada, a la vez, en la formación del pigmento de los ojos de la mosca y en el almacenamiento de zinc.

La expresión de las metalotioneínas no se vio alterada en la presencia de zinc dietético en la etapa adulta de las moscas.

Además, mostramos que el triptófano está regulando la concentración de zinc corporal mediante la vía de las quinureninas.

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. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.07.003>
- Angers, C. G., & Merz, A. J. (2009). HOPS interacts with Apl5 at the vacuole membrane and is required for consumption of AP-3 transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 20(21), 4563–4574. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0272>
- Balderhaar, H. J. Klein., & Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. In *Journal of Cell Science* (Vol. 126, Issue 6, pp. 1307–1316). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.107805>
- Beadle, G. W., & Ephrussi, B. (1936). The Differentiation of Eye Pigments in *Drosophila* as Studied by Transplantation. *Genetics*, 21(3), 225–247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17356680>
- Bonfini, A., Liu, X., & Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.008>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. In *Cell* (Vol. 116, Issue 2, pp. 153–166). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01079-1)
- Bonifacino, J. S., & Neefjes, J. (2017). Moving and positioning the endolysosomal system. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 47, pp. 1–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.008>
- Bonifacino, J. S., & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 72, pp. 395–447). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800>
- Borycz, J., Borycz, J. A., Kubów, A., Lloyd, V., & Meinertzhagen, I. A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of Experimental Biology*, 211(21), 3454–3466. <https://doi.org/10.1242/jeb.021162>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Bultema, J. J., Ambrosio, A. L., Burek, C. L., & Di Pietro, S. M. (2012). BLOC-

- 2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19550–19563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.351908>
- Bultema, J. J., & Di Pietro, S. M. (2013). Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. In *Small GTPases* (Vol. 4, Issue 1). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/sgtp.22349>
- Campbell, J. L., & Nash, H. A. (2001). Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the white and brown genes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology*, 49(4), 339–349. <https://doi.org/10.1002/neu.10009>
- Chan, R. F., Lewellyn, L., Deloyht, J. M., Sennett, K., Coffman, S., Hewitt, M., Bettinger, J. C., Warrick, J. M., & Grotewiel, M. (2014). Contrasting influences of *Drosophila* white/mini-white on ethanol sensitivity in two different behavioral assays. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(6), 1582–1593. <https://doi.org/10.1111/acer.12421>
- Chetverina, D., Savitskaya, E., Maksimenko, O., Melnikova, L., Zaytseva, O., Parshikov, A., Galkin, A. V., & Georgiev, P. (2008). Red flag on the white reporter: A versatile insulator abuts the white gene in *Drosophila* and is omnipresent in mini-white constructs. *Nucleic Acids Research*, 36(3), 929–937. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm992>
- Cole, T. B., Martyanova, A., & Palmiter, R. D. (2001). Removing zinc from synaptic vesicles does not impair spatial learning, memory, or sensorimotor functions in the mouse. *Brain Research*, 891(1–2), 253–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03220-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03220-0)
- 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 of the United States of America*, 96(4), 1716–1721. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1716>
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109(4), 523–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00735-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00735-3)
- Davidson, H. W., Wenzlau, J. M., & O'Brien, R. M. (2014). Zinc transporter 8 (ZnT8) and β cell function. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 25, Issue 8, pp. 415–424). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.008>
- Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research*, 11(7),

1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>

- Dell'Angelica, E. C. (2004). The building BLOC(k)s of lysosomes and related organelles. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 458–464). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.05.001>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.431>
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S., & Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *The FASEB Journal*, *14*(10), 1265–1278. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.10.1265>
- Di Pietro, S. M., Falcón-Pérez, J. M., Tenza, D., Setty, S. R. G., 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-05-0379>
- Dinsdale, D. (1984). Ultrastructural localization of zinc and calcium within the granules of rat Paneth cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *32*(2), 139–145. <https://doi.org/10.1177/32.2.6693753>
- Dreesen, T. D., Johnson, D. H., & Henikoff, S. (1988). The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. *Molecular and Cellular Biology*, *8*(12), 5206–5215. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.12.5206>
- Earley, B. J., Mendoza, A. D., Tan, C. H., & Kornfeld, K. (2021). Zinc homeostasis and signaling in the roundworm *C. elegans*. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1868, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118882>
- Egefjord, L., Jensen, J. L., Bang-Berthelsen, C. H., Petersen, A. B., Smidt, K., Schmitz, O., Karlsen, A. E., Pociot, F., Chimienti, F., Rungby, J., & Magnusson, N. E. (2009). Zinc transporter gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines: A potential role for zinc transporters in beta-cell apoptosis? *BMC Endocrine Disorders*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-9-7>
- Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A., Multhaup, G., Mettler, S., Vardanyan, A., Georgiev, O., & Schaffner, W. (2006). A Family Knockout of All Four *Drosophila* Metallothioneins Reveals a Central Role in Copper Homeostasis and Detoxification. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(6), 2286–2296. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2286-2296.2006>
- Eizirik, D. L., Sammeth, M., Bouckenooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M. L., Barthson, J., Bouwens, L., Hughes, L., Gregory, L., Lunter, G., Marselli, L., Marchetti, P., McCarthy,

- M. I., & Cnop, M. (2012). The Human Pancreatic Islet Transcriptome: Expression of Candidate Genes for Type 1 Diabetes and the Impact of Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002552>
- Evans, J. M., Day, J. P., Cabrero, P., Dow, J. A. T., & Davies, S. A. (2008). A new role for a classical gene: White transports cyclic GMP. *Journal of Experimental Biology*, 211(6), 890–899. <https://doi.org/10.1242/jeb.014837>
- 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. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.2.323>
- Ferré, J., Silva, F. J., Real, M. D., & Ménsua, J. L. (1986). Pigment patterns in mutants affecting the biosynthesis of pteridines and xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics*, 24(7–8), 545–569. <https://doi.org/10.1007/BF00504334>
- Ferreiro, M. J., Pérez, C., Marchesano, M., Ruiz, S., Caputi, A., Aguilera, P., Barrio, R., & Cantera, R. (2018). *Drosophila melanogaster white* mutant *w1118* undergo retinal degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 11(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732>
- FlyBase Gene Report: Dmel/bw*. (n.d.). Retrieved January 24, 2021, from <https://flybase.org/reports/FBgn0000241>
- FlyBase Gene Report: Dmel/v*. (n.d.). Retrieved January 24, 2021, from <https://flybase.org/reports/FBgn0003965>
- FlyBase Gene Report: Dmel/w*. (n.d.). Retrieved January 24, 2021, from <https://flybase.org/reports/FBgn0003996>
- Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M., & Hirano, T. (2011). Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. In *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (Vol. 16, Issue 7, pp. 1123–1134). J Biol Inorg Chem. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0797-4>
- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. In *BioMetals* (Vol. 14, Issues 3–4, pp. 251–270). Biometals. <https://doi.org/10.1023/A:1012988914300>
- Garg, S., Sharma, M., Ung, C., Tuli, A., Barral, D. C., Hava, D. L., Veerapen, N., Besra, G. S., Hachohen, N., & Brenner, M. B. (2011). Lysosomal Trafficking, Antigen Presentation, and Microbial Killing Are Controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity*, 35(2), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.009>

- Geiser, J., Venken, K. J. T., de Lisle, R. C., & Andrews, G. K. (2012). A mouse model of acrodermatitis enteropathica: Loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS Genetics*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002766>
- Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J. R., Linford, A., & Barr, F. A. (2012). BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Current Biology*, 22(22), 2135–2139. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.020>
- Giblin, L. J., Chang, C. J., Bentley, A. F., Frederickson, C., Lippard, S. J., & Frederickson, C. J. (2006). Zinc-secreting Paneth cells studied by ZP fluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(3), 311–316. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6724.2005>
- Gorelick, F. S., Pandol, S., & Jamieson, J. D. (2018). Structure-Function Relationships in the Pancreatic Acinar Cell. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract: Sixth Edition* (Vols. 2–2, pp. 869–894). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00039-6>
- Hazelrigg, T., Levis, R., & Rubin, G. M. (1984). Transformation of *white* locus DNA in *Drosophila*: Dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell*, 36(2), 469–481. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90240-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90240-X)
- 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 of the United States of America*, 99(7), 4355–4360. <https://doi.org/10.1073/pnas.062065399>
- Hong, L., & Simon, J. D. (2007). Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(28), 7938–7947. <https://doi.org/10.1021/jp071439h>
- Hou, J. C., Min, L., & Pessin, J. E. (2009). Chapter 16 Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 80, Issue C, pp. 473–506). NIH Public Access. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00616-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00616-X)
- Huizing, M., Malicdan, M. C. V., Wang, J. A., Pri-Chen, H., Hess, R. A., Fischer, R., O'Brien, K. J., Merideth, M. A., Gahl, W. A., & Gochuico, B. R. (2020). Hermansky–Pudlak syndrome: Mutation update. In *Human Mutation* (Vol. 41, Issue 3, pp. 543–580). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/humu.23968>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. In *Physiological Reviews* (Vol. 91, Issue 1, pp. 119–149). American Physiological Society Bethesda, MD.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>

- Hutton, J. C., Penn, E. J., & Peshavaria, M. (1983). Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochemical Journal*, *210*(2), 297–305. <https://doi.org/10.1042/bj2100297>
- Jackson, M. J. (1989). *Physiology of Zinc: General Aspects* (pp. 1–14). Springer, London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3879-2_1
- Jung, A. C., Denholm, B., Skaer, H., & Affolter, M. (2005). Renal tubule development in *Drosophila*: A closer look at the cellular level. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 322–328). J Am Soc Nephrol. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004090729>
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., & Nagao, M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 61, Issue 1, pp. 49–68). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3148-y>
- Kambe, Taiho. (2011). An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip Zinc transporters in the secretory pathway. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 75, Issue 6, pp. 1036–1043). Biosci Biotechnol Biochem. <https://doi.org/10.1271/bbb.110056>
- Kanost, M. R. (2009). Hemolymph. *Encyclopedia of Insects*, 446–449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00126-0>
- Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M. E., Peden, A. A., Meyer, G. E., Carskadon, S. L., Kapfhamer, D., Sufalko, 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. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80519-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80519-X)
- Kelly, P., Feakins, R., Domizio, P., Murphy, J., Bevins, C., Wilson, J., Mcphail, G., Poulson, R., & Dhaliwal, W. (2004). Paneth cell granule depletion in the human small intestine under infective and nutritional stress. *Clinical and Experimental Immunology*, *135*(2), 303–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02374.x>
- King, J. C., Shames, D. M., Lowe, N. M., Woodhouse, L. R., Sutherland, B., Abrams, S. A., Turnlund, J. R., & Jackson, M. J. (2001). Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, *74*(1), 116–124. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.1.116>
- King, J. C., Shames, D. M., & Woodhouse, L. R. (2000). Zinc homeostasis in humans. *Journal of Nutrition*, *130*(5 SUPPL.), 1360–1366. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1360s>

- Kokkinou, D., Kasper, H. U., Schwarz, T., Bartz-Schmidt, K. U., & Schraermeyer, U. (2005). Zinc uptake and storage: The role of fundus pigmentation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 243(10), 1050–1055. <https://doi.org/10.1007/s00417-005-1197-7>
- Krall, R. F., Tzounopoulos, T., & Aizenman, E. (2021). The Function and Regulation of Zinc in the Brain. In *Neuroscience* (Vol. 457, pp. 235–258). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.010>
- Kretzschmar, D., Poeck, B., Roth, H., Ernst, R., Keller, A., Porsch, M., Strauss, R., & Pflugfelder, G. O. (2000). Defective pigment granule biogenesis and aberrant behavior caused by mutations in the Drosophila AP-3 β adaptin gene ruby. *Genetics*, 155(1), 213–223. [/pmc/articles/PMC1461058/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1461058/)
- Krstic, D., Boll, W., & Noll, M. (2013). Influence of the White locus on the courtship behavior of Drosophila males. *PloS One*, 8(10), 77904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077904>
- Laity, J. H., & Andrews, G. K. (2007). Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 463, Issue 2, pp. 201–210). Arch Biochem Biophys. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.019>
- Lawen, A., & Lane, D. J. R. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: Uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 18, Issue 18, pp. 2473–2507). Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA . <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4271>
- Lee, S., & Kelleher, S. L. (2016). Biological underpinnings of breastfeeding challenges: The role of genetics, diet, and environment on lactation physiology. In *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (Vol. 311, Issue 2, pp. E405–E422). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00495.2015>
- Leung, K. W., Liu, M., Xu, M., Seiler, M. J., Barnstable, C. J., & Tombran-Tink, J. (2008). Expression of ZnT and ZIP zinc transporters in the human RPE and their regulation by neurotrophic factors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(3), 1221–1231. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0781>
- 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., Jenkins, N. A., Amato, D., Roe, B. A., Starcevic, M., Dell'Angelica, E. C., Elliott, R. W., Mishra, V., Kingsmore, S. F., Paylor, R. E., & Swank, R. T. (2003). Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nature Genetics*, 35(1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/ng1229>

- Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., & Jung, J. U. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, *10*(7), 776–787. <https://doi.org/10.1038/ncb1740>
- Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: Nutritional and physiologic regulation. In *Annual Review of Nutrition* (Vol. 29, pp. 153–176). Annu Rev Nutr. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-033009-083312>
- Linkous, D. H., Flinn, J. M., Koh, J. Y., Lanzirrotti, A., Bertsch, P. M., Jones, B. F., Giblin, L. J., & Frederickson, C. J. (2008). Evidence that the ZNT3 protein controls the total amount of elemental zinc in synaptic vesicles. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *56*(1), 3–6. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A7035.2007>
- Lloyd, V., Ramaswami, M., & Krämer, H. (1998). Not just pretty eyes: *Drosophila* eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends in Cell Biology*, *8*(7), 257–259. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01270-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01270-7)
- Luo, R., Zhang, Y., Jia, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zhao, J., Liu, T., & Zhang, W. (2021). Molecular basis and homeostatic regulation of Zinc taste. In *Protein and Cell* (pp. 1–8). Higher Education Press Limited Company. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00845-8>
- 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*. *Journal of Experimental Biology*, *215*(18), 3254–3265. <https://doi.org/10.1242/jeb.069260>
- Ma, J., Plesken, H., Treisman, J. E., Edelman-Novemsky, I., & Ren, M. (2004). Lightoid and Claret: A rab GTPase and its putative guanine nucleotide exchange factor in biogenesis of *Drosophila* eye pigment granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(32), 11652–11657. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401926101>
- Mackenzie, S. M., Howells, A. J., Cox, G. B., & Ewart, G. D. (2000). Sub-cellular localisation of the White/Scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, *108*(3), 239–252. <https://doi.org/10.1023/A:1004115718597>
- Maranduca, M. A., Branisteanu, D., Serban, D. N., Branisteanu, D. C., Stoleriu, G., Manolache, N., & Serban, I. L. (2019). Synthesis and physiological implications of melanic pigments (review). *Oncology Letters*, *17*(5), 4183–4187. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10071>
- Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key

- element of life. In *Advances in Nutrition* (Vol. 4, Issue 1, pp. 82–91). Adv Nutr. <https://doi.org/10.3945/an.112.003038>
- Maret, W. (2017). Zinc in pancreatic islet biology, insulin sensitivity, and diabetes. In *Preventive Nutrition and Food Science* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–8). Korean Society of Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.1.1>
- Maret, W. (2018). Metallomics: The Science of Biometals and Biometalloids. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1055, pp. 1–20). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90143-5_1
- McAllister, B. B., Wright, D. K., Wortman, R. C., Shultz, S. R., & Dyck, R. H. (2018). Elimination of vesicular zinc alters the behavioural and neuroanatomical effects of social defeat stress in mice. *Neurobiology of Stress*, 9, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.10.003>
- Mistry, R., Kounatidis, I., & Ligoxygakis, P. (2016). Exploring interactions between pathogens and the *Drosophila* gut. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.016>
- Morgan, T. H. (1910). Sex limited inheritance in *drosophila*. *Science*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Mount, S. M. (1987). Sequence similarity. *Nature*, 325(6104), 487. <https://doi.org/10.1038/325487c0>
- Mullins, C., Hartnell, L. M., & Bonifacino, J. S. (2000). Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics*, 263(6), 1003–1014. <https://doi.org/10.1007/PL00008688>
- Mullins, C., Hartnell, L. M., Wassarman, D. A., & Bonifacino, J. S. (1999). Defective expression of the μ 3 subunit of the AP-3 adaptor complex in the *Drosophila* pigmentation mutant *carmine*. *Molecular and General Genetics*, 262(3), 401–412. <https://doi.org/10.1007/s004380051099>
- Mwangi, M. N., Oonincx, D. G. A. B., Stouten, T., Veenenbos, M., Melse-Boonstra, A., Dicke, M., & Van Loon, J. J. A. (2018). Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. *Nutrition Research Reviews*, 31(2), 248–255. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000094>
- Nakatsu, F., & Ohno, H. (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. In *Cell Structure and Function* (Vol. 28, Issue 5, pp. 419–429). Cell Struct Funct. <https://doi.org/10.1247/csf.28.419>
- 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 of the United States of America*, 100(15), 8770–8775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1532040100>
- Nickla, H. (1972). Interaction between pteridine synthesis and riboflavin accumulation in *Drosophila melanogaster*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology. Journal Canadien de Génétique et de Cytologie*, 14(1), 105–111. <https://doi.org/10.1139/g72-013>
- Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Wijesekara, N., Loder, M. K., Baldwin, J. M., Gyulkhandanyan, A. V., Koshkin, V., Tarasov, A. I., Carzaniga, R., Kronenberger, K., Taneja, T. K., Da Silva Xavier, G., Libert, S., Froguel, P., Scharfmann, R., Stetsyuk, V., Ravassard, P., Parker, H., Gribble, F. M., ... Rutter, G. A. (2009). Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes*, 58(9), 2070–2083. <https://doi.org/10.2337/db09-0551>
- O'Donnell, M. J., & Maddrell, S. H. (1995). Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 198(8), 1647–1653. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.8.1647>
- O'Hare, K., Murphy, C., Levis, R., & Rubin, G. M. (1984). DNA sequence of the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology*, 180(3), 437–455. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90021-4)
- Ohashi, W., Kimura, S., Iwanaga, T., Furusawa, Y., Irié, T., Izumi, H., Watanabe, T., Hijikata, A., Hara, T., Ohara, O., Koseki, H., Sato, T., Robine, S., Mori, H., Hattori, Y., Watarai, H., Mishima, K., Ohno, H., Hase, K., & Fukada, T. (2016). Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving ER Stress. *PLoS Genetics*, 12(10), e1006349. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006349>
- 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*. *EMBO Journal*, 16(15), 4508–4518. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.15.4508>
- Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Hsieh, M. M., Hagen, S. J., & Selsted, M. E. (2000). Characterization of luminal Paneth cell α -defensins in mouse small intestine: Attenuated antimicrobial activities of peptides with truncated amino termini. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33969–33973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004062200>
- Overbeck, S., Uciechowski, P., Ackland, M. L., Ford, D., & Rink, L. (2008). Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(2), 368–380. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307148>

- Özkan, E. D., & Ueda, T. (1998). Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. In *Japanese Journal of Pharmacology* (Vol. 77, Issue 1, pp. 1–10). Japanese Pharmacological Society. <https://doi.org/10.1254/jjp.77.1>
- Padjasek, M., Kocyla, A., Kluska, K., Kerber, O., Tran, J. B., & Krężel, A. (2020). Structural zinc binding sites shaped for greater works: Structure-function relations in classical zinc finger, hook and clasp domains. In *Journal of Inorganic Biochemistry* (Vol. 204). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110955>
- Plum, L. M., Rink, L., & Hajo, H. (2010). The essential toxin: Impact of zinc on human health. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 7, Issue 4, pp. 1342–1365). Int J Environ Res Public Health. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041342>
- Podany, A. B., Wright, J., Lamendella, R., Soybel, D. I., & Kelleher, S. L. (2016). ZnT2-Mediated Zinc Import Into Paneth Cell Granules Is Necessary for Coordinated Secretion and Paneth Cell Function in Mice. *CMGH*, 2(3), 369–383. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.006>
- Polat, I., Amutkan Mutlu, D., & Suludere, Z. (2020). Accessory glands of male reproductive system in *Pseudochorthippus parallelus parallelus* (Zetterstedt, 1821) (Orthoptera: Acrididae): A light and electron microscopic study. *Microscopy Research and Technique*, 83(3), 232–238. <https://doi.org/10.1002/jemt.23406>
- Pound, L. D., Hang, Y., Sarkar, S. A., Wang, Y., Milam, L. A., Oeser, J. K., Printz, R. L., Lee, C. E., Stein, R., Hutton, J. C., & O'Brien, R. M. (2011). The pancreatic islet β -cell-enriched transcription factor Pdx-1 regulates Slc30a8 gene transcription through an intronic enhancer. *Biochemical Journal*, 433(1), 95–105. <https://doi.org/10.1042/BJ20101488>
- Pound, L. D., Sarkar, S. A., Benninger, R. K. P., Wang, Y., Suwanichkul, A., Shadoan, M. K., Printz, R. L., Oeser, J. K., Lee, C. E., Piston, D. W., McGuinness, O. P., Hutton, J. C., Powell, D. R., & O'Brien, R. M. (2009). Deletion of the mouse Slc30a8 gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *Biochemical Journal*, 421(3), 371–376. <https://doi.org/10.1042/BJ20090530>
- Rempoulakis, P., Dimou, I., Chrysargyris, A., & Economopoulos, A. P. (2014). Improving olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) adult and larval artificial diets, microflora associated with the fly and evaluation of a transgenic olive fruit fly strain. *International Journal of Tropical Insect Science*, 34(S1), S114–S122. <https://doi.org/10.1017/S1742758414000162>
- Richardson, S. C. W., Winistorfer, S. C., Poupon, V., Luzio, J. P., & Piper, R. C. (2004). Mammalian Late Vacuole Protein Sorting Orthologues Participate in Early Endosomal Fusion and Interact with the Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1197–1210.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E03-06-0358>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.003>
- Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. In *Science* (Vol. 218, Issue 4570, pp. 348–353). Science. <https://doi.org/10.1126/science.6289436>
- Sadraie, M., & Missirlis, F. (2011). Evidence for evolutionary constraints in *Drosophila* metal biology. *BioMetals*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9420-y>
- Sasaki, A., Nishimura, T., Takano, T., Naito, S., & Yoo, S. K. (2021). *white* regulates proliferative homeostasis of intestinal stem cells during ageing in *Drosophila*. *Nature Metabolism*, 3(4), 546–557. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00375-x>
- Schofield, R. M. S., Postlethwait, J. H., & Lefevre, H. W. (1997). MeV-ion microprobe analyses of whole *Drosophila* suggest that zinc and copper accumulation is regulated storage not deposit excretion. *Journal of Experimental Biology*, 200(24), 3235–3243. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.24.3235>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.07.003>
- Sitaram, A., & Marks, M. S. (2012). Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. In *Physiology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 85–99). Physiology (Bethesda). <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2011>
- Smidt, K., Jessen, N., Petersen, A. B., Larsen, A., Magnusson, N., Jeppesen, J. B., Stoltenberg, M., Culvenor, J. G., Tsatsanis, A., Brock, B., Schmitz, O., Wogensen, L., Bush, A. I., & Rungby, J. (2009). SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in β -cells and is critical for insulin production and in vivo glucose-metabolism during β -cell stress. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005684>
- Smidt, K., Pedersen, S. B., Brock, B., Schmitz, O., Fisker, S., Bendix, J., Wogensen, L., & Rungby, J. (2007). Zinc-transporter genes in human visceral and subcutaneous adipocytes: Lean versus obese. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.010>
- Stewart, A. D., Anand, R. R., Laird, J. S., Verrall, M., Ryan, C. G., de Jonge, M. D., Paterson, D., & Howard, D. L. (2011). Distribution of metals in the termite *Tumulitermes tumuli* (Froggatt): Two types of Malpighian tubule concretion host Zn and Ca mutually exclusively. *PLoS ONE*, 6(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027578>

- Tamaki, M., Fujitani, Y., Hara, A., Uchida, T., Tamura, Y., Takeno, K., Kawaguchi, M., Watanabe, T., Ogihara, T., Fukunaka, A., Shimizu, T., Mita, T., Kanazawa, A., Imaizumi, M. O., Abe, T., Kiyonari, H., Hojyo, S., Fukada, T., Kawauchi, T., ... Watada, H. (2013). The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4513–4524. <https://doi.org/10.1172/JCI68807>
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 57, Issue 9, pp. 399–411). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00081-7)
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Tejeda-Guzmán, C., Rosas-Arellano, A., Kroll, T., Webb, S. M., Barajas-Aceves, M., Osorio, B., & Missirlis, F. (2018). Biogenesis of zinc storage granules in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 221(6). <https://doi.org/10.1242/jeb.168419>
- Tempio, T., & Anelli, T. (2020). The pivotal role of ERp44 in patrolling protein secretion. In *Journal of Cell Science* (Vol. 133, Issue 21). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.240366>
- Thomas H. Morgan - Facts - NobelPrize.org. (n.d.). Retrieved January 21, 2021, from <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/morgan/facts/>
- Ugarte, M., & Osborne, N. N. (2014). Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues. *Metallomics*, 6(2), 189–200. <https://doi.org/10.1039/c3mt00291h>
- Wang, C. Y., & Babitt, J. L. (2019). Liver iron sensing and body iron homeostasis. In *Blood* (Vol. 133, Issue 1, pp. 18–29). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-815894>
- Wei, M. L. (2006). Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Research*, 19(1), 19–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00289.x>
- Why fly? | droso4schools. (n.d.). Retrieved January 21, 2021, from <https://droso4schools.wordpress.com/why-fly/>
- Wickner, W. (2010). Membrane fusion: Five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 26, pp. 115–136). Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev->

- Wijesekara, N., Dai, F. F., Hardy, A. B., Giglou, P. R., Bhattacharjee, A., Koshkin, V., Chimienti, F., Gaisano, H. Y., Rutter, G. A., & Wheeler, M. B. (2010). Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia*, *53*(8), 1656–1668. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1733-9>
- Wolpin, B. M., Rizzato, C., Kraft, P., Kooperberg, C., Petersen, G. M., Wang, Z., Arslan, A. A., Beane-Freeman, L., Bracci, P. M., Buring, J., Canzian, F., Duell, E. J., Gallinger, S., Giles, G. G., Goodman, G. E., Goodman, P. J., Jacobs, E. J., Kamineni, A., Klein, A. P., ... Amundadottir, L. T. (2014). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nature Genetics*, *46*(9), 994–1000. <https://doi.org/10.1038/ng.3052>
- Wu, F. Y., & Wu, C. W. (1987). Zinc in DNA replication and transcription. In *Annual review of nutrition* (Vol. 7, pp. 251–272). Annu Rev Nutr. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.001343>
- Xiao, C., & Robertson, R. M. (2016). Timing of locomotor recovery from anoxia modulated by the *white* gene in *Drosophila*. *Genetics*, *203*(2), 787–797. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185066>
- Yagi, S., & Ogawa, H. (1996). Effect of Tryptophan Metabolites on Fluorescent Granules in the Malpighian Tubules of Eye Color Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Zoological Science*, *13*(1), 97–104. <https://doi.org/10.2108/zsj.13.97>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl606>
- Yin, S., Qin, Q., & Zhou, B. (2017). Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for zinc excretion in Malpighian tubules. *BMC Biology*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0355-9>
- Zhang, J., Schulze, K. L., Robin Hiesinger, P., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J., & Scott, M. P. (2007). Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins. *Genetics*, *176*(2), 1307–1322. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066761>
- Zhen, L., Jiang, S., Feng, L., Bright, N. A., Peden, A. A., Seymour, A. B., Novak, E. K., Elliott, R., Gorin, M. B., Robinson, M. S., & Swank, R. T. (1999). Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood*, *94*(1), 146–155.

https://doi.org/10.1182/blood.v94.1.146.413k39_146_155

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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081540>

Zlatic, S. A., Tornieri, K., L'Hernault, S. W., & Faundez, V. (2011). Clathrin-dependent mechanisms modulate the subcellular distribution of class C Vps/HOPS tether subunits in polarized and nonpolarized cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(10), 1699–1715. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-10-0799>