



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE VPS EN EL EPITELIO
PIGMENTARIO DE LA RETINA DE PEZ CEBRA (DANIO RERIO)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

HERNÁNDEZ LORENZO, FABIOLA

ASESOR: MALDONADO OLVERA, ERNESTO

MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Caracterización de la mutante *vps* en el epitelio pigmentario de la retina de pez cebra (*Danio rerio*)

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno.
Hernández
Lorenzo
Fabiola
52 91 29 18
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
2. Datos del tutor.
Doctor
Ernesto
Maldonado
Olvera
3. Datos del sinodal 1
Doctor
Diego
González
Halphen
4. Datos del sinodal 2
Doctor
Daniel
Piñero
Dalmau
5. Datos del sinodal 3
Doctora
Diana
Escalante
Alcalde
6. Datos del sinodal 4
Doctora
Laura
Kawasaki
Watanabe
7. Datos del trabajo escrito.
Caracterización de la mutante *vps* en el epitelio pigmentario de la retina de pez cebra (*Danio rerio*).
68
2006

A mi familia, especialmente a mi mamá.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo García Saínz y al Dr. Diego González Halphen por la ayuda proporcionada para el término de esta tesis.

Al Dr. Ernesto Maldonado por haber dirigido esta tesis, y a la Dra. Rosa Navarro por sus comentarios en los seminarios.

A la Dra. Diana Escalante, Dra. Laura Kawasaki y al Dr. Daniel Piñero por sus valiosos comentarios a la tesis.

El presente trabajo se realizó bajo la supervisión del Doctor Ernesto Maldonado, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El presente trabajo estuvo financiado por el CONACYT, 41587Q (FH-L recibió una beca por parte del CONACYT).

INDICE

	Página
Indice.....	V
Indice de figuras.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Participación del complejo HOPS en el tráfico vesicular.....	4
1.2.1 Tráfico vesicular.....	4
1.2.2 Función del complejo HOPS en el tráfico vesicular.....	6
1.2.3 Dominios de las subunidades del complejo HOPS.....	8
1.2.4 Participación de HOPS en la biogénesis de los organelos tipo lisosoma.....	10
1.3 Biogénesis de los organelos tipo lisosomas.....	11
1.3.1 Biogénesis de los melanosomas.....	13
1.3.2 Melanosomas del epitelio pigmentario de la retina.....	14
1.4 Enfermedades de hipopigmentación en humanos.....	16
1.5 El pez cebra como modelo de estudio de biología del desarrollo.....	18
1.5.1 El pez cebra como modelo de estudio de biología del desarrollo y del sistema visual.....	18
1.5.2 Mutagénesis a gran escala en el pez cebra.....	20
2. Hipótesis.....	22
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos particulares.....	23
4. Materiales y métodos.....	24
4.1 Mantenimiento de la cepa 2499A.....	24
4.2 Genotipificación por PCR a partir de DNA genómico proveniente de biopsias de aleta caudal del pez cebra adulto.....	25
4.3 Reacción de la PCR.....	26
4.4 Geles de agarosa.....	26
4.5 Amortiguador de carga para geles de agarosa.....	26
4.6 Transformación en células competentes DH5 α	27
4.7 Almacenamiento de bacterias portadoras del plásmido recombinante.....	27
4.8 Secuenciación del DNA.....	28
4.9 Clonación de productos de PCR utilizando el sistema TOPO TA Cloning.....	28
4.10 Purificación de bandas de un gel de agarosa.....	29
4.11 Extracción del RNA total de embriones y larvas del pez cebra.....	30
4.12 Síntesis del cDNA.....	32
4.13 Fijación de larvas para histología y microscopía electrónica.....	33

4.14 Preparación de moldes para cortes histológicos.....	34
4.15 Ensayo optocinético	35
4.16 Observaciones al microscopio estereoscópico.....	37
4.17 Análisis filogenético.....	38
.	
5. Resultados y discusión.....	39
5.1 Análisis del gen <i>vps18</i> de <i>D. rerio</i>	39
5.1.1 Genotipificación de la cepa 2499A portadora del alelo <i>vps</i> ^{hi2499A}	39
5.1.2 Corrección de la secuencia reportada del cDNA de <i>vps18</i> de <i>D. rerio</i>	40
5.1.3 Obtención de la secuencia genómica de <i>vps18</i> de <i>D. rerio</i>	42
5.1.4 Análisis filogenético de Vps18 y análisis de sus dominios.....	45
5.2 Fenotipo de hipopigmentación de la mutante <i>vps</i> ^{hi2499A} en <i>D. rerio</i>	48
5.2.1 Fenotipo corporal de la mutante <i>vps</i> ^{hi2499A}	48
5.2.2 Dos transcritos aberrantes son producidos por la mutante <i>vps</i> ^{hi2499A}	50
5.2.3 Los defectos del epitelio pigmentario de la retina del pez cebra en mutantes <i>vps</i> ^{hi2499A}	53
5.2.4 La mutante <i>vps</i> ^{hi2499A} presenta agudeza visual disminuida.....	57
6. Conclusiones	60
7. Perspectivas.....	62
Apéndice	63
Bibliografía	64

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Participación del Complejo HOPS en el tráfico vesicular.	7
Figura 2. 2A Biogénesis de organelos tipo lisosomas. 2B Biogénesis de los melanosomas.....	13
Figura 3. Estadios de desarrollo embrionario y larvario del pez cebra.	19
Figura 4. Montaje de los peces: Ensayo optocinético.....	36
Figura 5. Genotipificación de la cepa 2499A por PCR de la aleta caudal del pez cebra adulto.....	40
Figura 6: cDNA de <i>vps18</i> de <i>D. rerio</i> : pER405 (pCRII).....	41
Figura 7. Amplificación por PCR de los intrones de <i>vps18</i> de <i>D. rerio</i>	42
Figura 8. Construcción de pFAB5 a partir de pFAB3.....	44
Figura 9. Reconstrucción filogenética de Vps18	46
Figura 10. Porcentajes de identidad de la proteína Vps18 y de los dominios CHCR y RING-H2.....	46
Figura 11. Alineamiento del dominio de la repetición de clatrina (CHCR) de Vps18.....	47
Figura 12. Fenotipo de las larvas de la cepa 2499A (<i>vps^{hi2499A}</i>).....	49
Figura 13. Patrón de pigmentación de las larvas del pez cebra.	49
Figura 14. 14A Extracción del RNA total de larvas de 5dpf. 14B. Control de la síntesis del cDNA.....	51
Figura 15. Comportamiento de <i>vps^{hi2499A}</i> : inserción retroviral del gen <i>vps18</i>	52
Figura 16. Microscopia electrónica de los ojos de las larvas de 3 y 5 dpf del pez cebra.	54
Figura 17. Cortes histológicos de los ojos de pez cebra de 5dpf.	56
Figura 18. Respuesta optocinética de las larvas 5 dpf del pez cebra.	58

ABREVIATURAS

ARC	Síndrome de artrógriposis renal y colestasis
BLOC	Complejo de biogénesis de organelos tipo lisosomas (<u>B</u> iogenesis of <u>L</u> ysosome-related <u>O</u> rganelles <u>C</u> omplex)
CHCR	Dominio de repetición de la cadena pesada de clatina (<u>C</u> lathrin <u>h</u> heavy <u>ch</u> ain <u>r</u> repeat)
CNH	Dominio de homología de citron (CNH por <u>c</u> itron <u>h</u> omology)
CC	Dominio "coiled-coil" (<u>c</u> oiled- <u>c</u> oil)
cDNA	DNA complementario
CMV	Cuerpos multivesiculares
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpf	días post-fertilización
ENU	Etilnitrosourea
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
GEF	factor de intercambio de GTP
HOPS	Complejo de fusión homotípica y segregación de proteínas (<u>H</u> omotypic <u>f</u> usion and <u>v</u> acuole <u>p</u> rotein <u>s</u> orting <u>c</u> omplex)
hpf	horas post-fertilización
MIIC	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II
NSF	factor sensible a N-etilmaleimida (NSF por N-ethylmaleimide-sensitive factor)
NCBI	Centro Nacional de Información biotecnológica (<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation)
NRK	células de riñón de rata (<u>N</u> ormal <u>r</u> at <u>k</u> idney)
OTL	Organelos tipo lisosomas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA-Glut	Paraformaldehído-glutaraldehído
RING-H2	Dominio de dedos de zinc-H2
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscriptasa-Reacción en cadena de la DNA polimerasa
SAPID	síndrome de albinismo parcial y de inmunodeficiencia
SG	Síndrome de Griscelli
SNAREs	receptores que se unen a NSF por <u>s</u> oluble <u>N</u> SF <u>a</u> ttachment <u>p</u> rotein <u>r</u> eceptors
TGN	red del <i>trans</i> -Golgi (<u>t</u> rans- <u>G</u> olgi <u>n</u> etwork)
TRP1	proteína tipo tirosinasa 1
TPR2	proteína tipo tirosinasa 2
TUNEL	<u>T</u> dT-mediated <u>d</u> UTP <u>n</u> ick- <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
Vega	Base de datos Vega (Vega por <u>V</u> ertebrate <u>g</u> enome <u>a</u> nnotation)
vps ^{hi2499A}	vanished pigments (<i>vps</i> ^{hi2499A})
vps18	vacuolar proteing sorting 18
VSV-G	glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (<u>v</u> esicular <u>s</u> tomatitis <u>v</u> irus <u>g</u> lycoprotein)
Wt	Wild type: cepa silvestre

RESUMEN

La hipopigmentación es una característica de varias enfermedades asociadas al tráfico de vesículas (Spritz, 1999; Huizing *et al.*, 2000; Huizing *et al.*, 2002; Starcevic *et al.*, 2002; Bonifacino, 2004; Li *et al.*, 2004; Stinchcombe *et al.*, 2004). En una mutagénesis insercional a gran escala en el pez cebra, hecha en el laboratorio de la Dra. Nancy Hopkins, se identificaron varios genes que son esenciales para el desarrollo embrionario y larval. De esta mutagénesis se han descrito 315 mutantes, que corresponden al 22% de los genes esenciales embrionarios; una de ellas denominada “*vanished pigments*” (*vps*^{hi2499A}), resulta afectado el gen *vps18*, la cual produce un fenotipo de hipopigmentación en larvas del pez cebra (Golling *et al.*, 2002; Amsterdam *et al.*, 2004). *Vps18* es un componente del complejo de anclaje homotípico de fusión y segregación de proteínas (HOPS por Homotypic fusion and vacuole protein sorting complex) que está involucrado en el tráfico de vesículas en la ruta biosintética, endocítica y fagocítica (Rieder y Emr, 1997; Sato *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001, Peterson y Emr, 2001; Poupon *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2004). La mutante *vps*^{hi2499A} presenta una inserción retroviral en el cuarto exón del gen *vps18* y produce dos transcritos aberrantes, que codifican para dos proteínas truncadas no-funcionales, por lo tanto el alelo *hi2499A* es nulo.

Los análisis filogenéticos sugieren una función conservada de la proteína, sin embargo es de notarse que en el dominio de repetición de la cadena pesada de clatrina (CHCR) en el pez cebra, están conservadas 9 de 10 hélices alfa del dominio CHCR que presentan las clatrininas (Ybe *et al.*, 1999).

Los análisis morfológicos de los ojos de larvas *vps*^{hi2499A} muestran una reducción evidente del número de melanosomas maduros del epitelio pigmentario de la retina (EPR). El EPR se muestra engrosado y presenta una acumulación de melanosomas redondos aberrantes, que asemejan a melanosomas en estadio premelanosomal I

(Nguyen *et al.*, 2002; Nguyen y Wei, 2004; Richmond *et al.*, 2005), esto sugiere que *vps18* participa en la biogénesis de melanosomas.

Una de las causas de letalidad de la mutante *vps^{hi2499A}* es el desarrollo de hepatomegalia y algunos síntomas del síndrome de artrogriposis renal y colestasis (OMIM 208085) (Sadler *et al.*, 2005), la cual se caracteriza por defectos en el hígado y en el riñón (Gissen *et al.*, 2005). La agudeza visual fue evaluada a través del ensayo optocinético en larvas homocigóticas de *vps^{hi2499A}*, encontrándose disminuida pero no ausente.

Sugerimos que la mutante insercional *vps^{hi2499A}* puede ser usada como un modelo de estudio de enfermedades de hipopigmentación, donde el EPR se encuentre afectado y la agudeza visual esté disminuida y que además se asocie a problemas en el tráfico vesicular.

1. INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.

Con la finalidad de obtener un modelo de estudio en vertebrados para enfermedades de hipopigmentación causadas por daño al tráfico vesicular, se tiene en el laboratorio del Dr. Maldonado la mutante *vanished pigmented* (*vps*^{hi2499A}), que tiene el gen *vps18* (*vacuolar protein sorting 18*) interrumpido. Vps18 forma parte del complejo HOPS (Homotipic fusion and vacuolar protein sorting), que participa en el tráfico vesicular intracelular (Rieder y Emr, 1997; Sato *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Peterson y Emr, 2001; Poupon *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2004) HOPS también participa en la biogénesis de los organelos tipo lisosomas, como los melanosomas, los gránulos plaquetarios, las vesículas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y los gránulos citotóxicos (Raposo *et al.*, 2002; Raposo y Marks, 2002; Dell'Angelica, 2003; Stinchcombe *et al.*, 2004). Las enfermedades de hipopigmentación que destacan en humanos asociadas al tráfico vesicular son los síndromes de Hermansky-Pudlak, de Chediak-Higashi y de Griscelli, caracterizados por albinismo oculocutáneo, agudeza visual disminuida y problemas de coagulación sanguínea (Spritz, 1999; Huizing *et al.*, 2000; Huizing *et al.* 2002; Starcevic *et al.*, 2002; Bonifacino, 2004; Li *et al.*, 2004; Stinchcombe *et al.*, 2004). Para evaluar a *vps*^{hi2499A} como modelo de enfermedades de hipopigmentación, nos enfocaremos en estudiar el epitelio pigmentario de la retina (EPR), que está encargado de suministrar factores de crecimiento a la retina durante su desarrollo y participa en la fagocitosis de los discos externos de los fotorreceptores (Marmorstein *et al.*, 1998). El EPR se estudiará a nivel tisular y celular por histología y microscopía electrónica, además se

llevará a cabo un estudio funcional del sistema visual, a través del ensayo optocinético. Asimismo se realizará un análisis del RNA mensajero de *vps18* en la mutante *vps^{hi2499A}* por RT-PCR.

1.2 Participación del complejo HOPS en el tráfico vesicular.

1.2.1 Tráfico vesicular.

Las células eucariontes han elaborado un sistema endomembranal, que permite el transporte de macromoléculas dentro de vesículas y que incluye al retículo endoplásmico, al aparato de Golgi, endosomas, lisosomas/vacuolas/organelos tipo lisosomas y vesículas de transporte (Bonifacino y Glick, 2004). La ruta biosintética transporta las vesículas desde el retículo endoplásmico, pasando por el aparato de Golgi, para después descarga su contenido en los correspondientes organelos. En la ruta endocítica, las vesículas se invaginan en la membrana celular, para formar un endosoma temprano que al madurar da origen al endosoma tardío para fusionarse con un lisosoma. La ruta autofágica degrada componentes celulares obsoletos, los cuales al fusionarse con un lisosoma forman un fagosoma.

El tráfico de vesículas comienza con la gemación de las mismas en el compartimiento donador, donde las clatrin participan en la invaginación. Las cubiertas de clatrin participan en la selección de la carga al reconocer señales de clasificación presentes en los dominios citosólicos de las proteínas transmembranales. Cuando se ha formado la vesícula con el contenido específico, la cubierta de clatrina se desensambla y la vesícula es ahora capaz de reconocer proteínas del citoesqueleto que la dirijan hacia el compartimiento receptor y se lleve a cabo la reacción de acercamiento, anclaje

y fusión de las vesículas. Este proceso requiere de pequeñas GTPasas Rab/Ypt, efectores de las GTPasas, complejos de acercamiento y proteínas SNAREs (receptores que se unen a NSF por soluble NSF attachment protein receptors). Para reactivar la maquinaria de fusión, se requiere del factor sensible a N-etilmaleimida (NSF por N-ethylmaleimide-sensitive factor) y el cofactor α -SNAP (Collins *et al.*, 2005; Ungermann y Langosch, 2005).

Con ayuda de los complejos de acercamiento, las proteínas Rab coordinan el ensamblaje del complejo *trans*-SNARE (en membranas distintas) a través de su asociación dependiente de GTP. Cuando las vesículas se encuentran a una distancia <5-10 nm de la membrana receptora, las proteínas SNAREs interaccionan con proteínas de la familia SM/MUNC18, las cuales reconocen la vesícula receptora (Sato *et al.*, 2000). Posteriormente a la fusión, los complejos SNARE en *cis* (en la misma membrana) pierden su ensamblaje por acción de las chaperonas α -SNAP/Sec17 y NSF/Sec18, lo que permite interacciones tipo *trans* (entre vesículas), y se reactiva la maquinaria para futuros eventos de anclaje y fusión entre las vesículas.

La fusión específica entre las vesículas está regulada por las SNAREs. El modelo de las SNAREs presentado por Rothman (1994), consiste en la unión de cuatro SNAREs provenientes ya sea del compartimiento donador o del receptor, de tal manera que garantiza la especificación de la fusión entre las vesículas. Sin embargo, se ha observado que no solamente las SNAREs confieren la especificación, sino también las proteínas de la familia SM/MUNC18 y las proteínas Rab (Rink *et al.*, 2005). Las SNAREs vacuolares de *Saccharomyces cerevisiae* son: Vam3p, Vam7p, Vti1p, Nyv1p y Ykt6p, y se clasifican de acuerdo a si presentan un residuo de glutamina (Q) o arginina (R) en el motivo de "coiled-coil". Vam3p, Vti1p y Vam7 son Q-SNAREs, y Nyv1p y Ykt6p son R-SNAREs (Figura 1) (Collins *et al.*, 2005).

1.2.2 Función del complejo HOPS en el tráfico vesicular.

Con el objetivo de caracterizar molecularmente al tráfico vesicular, se efectuaron varios tamizajes en la levadura *S. cerevisiae*. Los fenotipos se clasificaron en clases A-F por sus defectos en el tráfico, función y estructura vacuolar. A las mutantes se les denominó *vps* (Banta *et al.*, 1990; Horazdovsky y Emr, 1993; Robinson *et al.*, 1988), *pep* (Preston *et al.*, 1991, Woolford *et al.*, 1990) y *vam* (Wada *et al.*, 1992). El complejo de fusión homotípica y segregación de proteínas (HOPS), esta formado por el complejo Clase C Vps (Vps11, 16, 18 y 33), asociado con factores accesorios Vps39 y Vps41 de la Clase B (Figura 1A) (Sato *et al.*, 2000, Seals *et al.*, 2000, Richardson *et al.*, 2004, Srivastava *et al.*, 2000; Subramanian *et al.*, 2004; Wurmser *et al.*, 2000). La eliminación de los genes que codifican para las subunidades del complejo HOPS, producen distintos fenotipos: las mutantes de la Clase B (Vps39 y 41) tienen una fragmentación vacuolar moderada, mientras que en la Clase C ocurre una severa fragmentación o acumulación de compartimientos vesiculares anormales.

El complejo HOPS pertenece a los complejos de acercamiento, los cuales facilitan el anclaje y la fusión entre las vesículas (Whyte y Munro, 2002). Durante el transporte del Golgi hacia los endosomas, Vps41 media la gemación de la vesícula en el *trans*-Golgi al unirse a la subunidad δ de AP-3 (Ward *et al.*, 2001). La maquinaria de anclaje y fusión en el endosoma se compone de Vac1, Vps21 (Rab GTPasa) y Vps45 (proteína SM/MUNC18), HOPS participa a través de las interacciones entre Vps11 y Vac1 (Peterson y Emr, 2001), mVps18 (homólogo de vps18 en mamífero) y Vps45, y las interacciones con las Syn13, Syn6. Durante el transporte anterógrado y posiblemente el retrógrado del endosoma hacia el Golgi, Vps18 interacciona con Vps8 (Horazdovsky *et al.*, 1996).

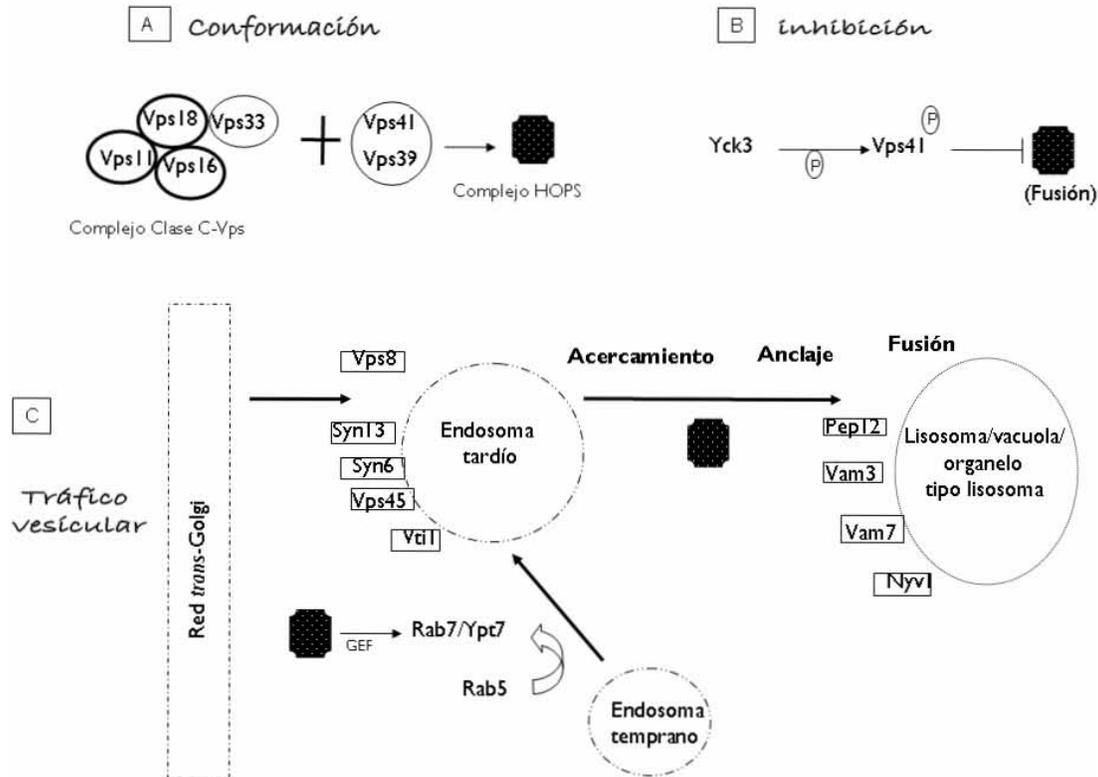


Figura 1. Participación del complejo HOPS en el tráfico vesicular. **1A** El complejo HOPS está integrado por vps11/16/18/33/39/41. **1B** Se regula negativamente por la fosforilación de Vps41 por Yck3. **1C** HOPS participa en el acercamiento de la maquinaria de fusión de vesículas, en los lisosomas/vacuola/organelos tipo lisosomas, y en los endosomas tempranos y tardíos. Durante el anclaje regula el ensamblaje del complejo *trans*-SNARE, a través de las interacciones con Syn13, Syn6, Vti1, Vam3, Vam7, Nyv1, Pep12. En el transporte de endosomas tempranos a endosomas tardíos, regula la conversión de Rab5 por Rab7.

En el endosoma temprano, Vps33 y Vps45 unen a la sintaxina Pep12, pero el transporte hacia el endosoma tardío es mediado por Vps33 (Cowles *et al.*, 1994; Subramanian *et al.*, 2004). La conversión de la pequeña GTPasa Rab5 a Rab7/Ypt7 durante el paso de endosomas tempranos a endosomas tardíos está regulada por HOPS (Figura 1C) (Rink *et al.*, 2005). Durante el transporte entre los endosomas tardíos hacia los lisosomas, la interacción entre Vps33 y Vam3/Syn7 requiere de la presencia de Vps18 (Sato *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

La proteína mVps18 regula la localización yuxtannuclear de los lisosomas, mediante las interacciones con componentes del citoesqueleto de actina, incluyendo actina, ezrina, las miosinas Ib, Ic, V, IX y Hook (Sevrioukov *et al.*, 1999; Poupon *et al.*,

2003). La gran diversidad de interacciones de HOPS con otros subcomplejos funcionalmente distintos, sugieren que HOPS es el resultado de asociaciones reversibles de dichos subcomplejos.

La fosforilación de Vps41 por Yck3 (cinasa de caseína vacuolar I) inhibe la fusión y por lo tanto regula negativamente a HOPS. Yck3 al fosforilar a Vps41 afecta la interacción del complejo Rab Ypt7:Vps41, y por lo tanto reduce la actividad de GEF (factor de intercambio de GTP) del complejo HOPS (Figura 1B) (LaGrassa y Ungermann, 2005). La proteína Vps39 tiene la actividad de GEF para Ypt7 (Seals *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000). Otro efector de Rab7/Ypt7, es RILP, y se recluta en células de riñón de rata (NRK: normal rat kidney), al sobreexpresarse mVps18 (Poupon *et al.*, 2003).

Sec17 y su co-chaperona Sec18 desensamblan el complejo SNARE, Ypt7 regula el re-ensamblaje de las SNAREs libres, formando el complejo HOPS-SNARE antes de la fusión. Por su parte, Sec17 desplaza a HOPS de las SNAREs para permitir subsecuentes eventos de fusión (Seals *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2005).

1.2.3 Dominios de las subunidades de HOPS

Las subunidades del complejo HOPS muestran tres dominios: el dominio de repetición de la cadena pesada de clatrina (CHCR: Clathrin heavy chain repeat), el dominio de dedos de zinc-H2 (RING-H2) y el dominio de “coiled-coil” (CC: coiled-coil). Vps18, Vps11, Vps39 y Vps41 presentan el dominio CHCR, Vps11, Vps18 y Vps41 presentan el dominio RING-H2, y el dominio CC lo presentan Vps11, Vps16, Vps18 y Vps33 (Whyte y Munro, 2002).

En el dominio CHCR existen siete motivos repetidos en tandem de unión a clatrina, organizados en una superhélice con giros de pequeñas hélices alfa cruzadas antiparalelamente, y son diez hélices designadas con las letras A a la J (Figura 11).

El dominio CHCR se requiere para el ensamblaje de la cadena pesada de clatrina y su trimerización (Ybe *et al.*, 1999), y funciona en interacciones de homo y hetero-oligomerización. Las proteínas Vps11, Vps18 y Vps41 únicamente presentan una repetición del dominio CHCR. Al sobreexpresarse Vps18 y Vps39, en células NRK, se agregan tanto los lisosomas como los organelos endocíticos tardíos en la región perinuclear, debido a la función de acercamiento de dichas proteínas (Poupon *et al.*, 2003). Sin embargo en Vps39 de humano, para agregar los lisosomas, es necesario el dominio CHCR y CNH (CNH por citron homology) (Caplan *et al.*, 2001).

El dominio de RING-H2 es una variante del dominio RING, debido a la sustitución de la cuarta cisteína por una histidina (C3H2C3), dando lugar al motivo CX₂CX₁₃CXHX₂HX₂CX₂C. Este dominio une dos iones de Zn²⁺, con una única estructura de brazo cruzado (“cross-brace”) (Rieder y Emr, 1997; Shestopal *et al.*, 1997). El RING-H2 de hVps11 y hVps18 (homólogos en humano de Vps11 y Vps18 de *S. cerevisiae*) está involucrado en la unión entre proteínas y/o interacción entre lípido-proteína (Kim *et al.*, 2001).

Poupon *et al.*, (2003) comprobaron que el dominio RING-H2 y el dominio CC de mVps18 (el homólogo mamífero de Vps18 de *S. cerevisiae*), están asociados a la agregación de lisosomas de células NRK. Estudios de la proteína Vps18 truncada en *Drosophila melanogaster*, levadura y en células NRK, demostraron que el dominio de RING-H2 es esencial para la función de dicha proteína (Sevrioukov *et al.*, 1999; Poupon *et al.*, 2003). En Vps41 el dominio RING-H2 interacciona con la subunidad δ del AP-3 (Ward *et al.*, 2001), además, dos formas alternativas del gen *hVps41* que se expresan en hígado, en la cual una de ellas carece del RING-H2 y es principalmente citosólica

mientras que la otra forma alternativa que presenta el RING-H2 se encuentra asociada a la membrana (McVey Ward *et al.*, 2001).

El dominio de RING-H2 de hVps18, tiene actividad de ligasa de utiquitina (E3), donde regula los niveles de proteína de SNK (cinasa de inducción por suero), la cual está involucrada en eventos de la división celular y en la transmisión sináptica (Yogosawa *et al.*, 2005).

1.2.4 Participación de HOPS en la biogénesis de los organelos tipo lisosomas

Las células animales pueden contener organelos tipo lisosomas (OTL) especializados que no se encuentran en levadura (Dell'Angelica *et al.*, 2000), de los cuales se han hecho estudios de melanosomas, gránulos pigmentarios de *D. melanogaster* (Marks y Seabra, 2001; Raposo y Marks, 2002) y gránulos de rabditina en *Caenorhabditis elegans* (Hermann *et al.*, 2005).

En la biogénesis de OTL, los dos homólogos de *vps33*, llamados *vps33a* y *vps33b* podrían no tener funciones redundantes, ya que se encuentra una diferencia en la capacidad de Vps33a y Vps33b para inducir la agregación de los endosomas tardíos, lisosomas y melanosomas (Gissen *et al.*, 2005). Además la mutante *buff* (mutación del gen *Vps33a*) de ratón, ha sido propuesta como modelo de estudio del síndrome de Hermansky-Pudlak debido a los defectos en la biogénesis de melanosomas (Susuki *et al.*, 2003), mientras que la carencia del gen *vps33b* genera un fenotipo similar al del síndrome de artrogriposis renal y colestasis (ARC por Arthrogyrosis-renal dysfunction-cholestasis syndrome) caracterizado por una disfunción renal y por defectos en el hígado (Gissen *et al.*, 2005).

La carencia de la función de los genes *vps16A* y *vps18* (mutante denominada *deep orange, dor*) en *D. melanogaster*, produce un severo fenotipo de hipopigmentación

por sus defectos en la biogénesis de los gránulos pigmentarios. En *dor*, se observan morfológicamente normales los rabdómeros, sin embargo en algunos fotorreceptores se encuentran vesículas endocitadas con cubiertas “de clatrina” (Sevrioukov *et al.*, 1999). Por otra parte, transfecciones con RNA de interferencia de *vps16A*, da lugar a una severa degeneración de la retina, con pérdida de los pseudoconos y con una acumulación de autofagosomas (Pulipparacharuvil *et al.*, 2005).

El gusano *C. elegans* presenta gránulos ácidos y autoflorescentes del tubo digestivo, denominados gránulos de rabditina. A la pérdida de estos gránulos se le denomina el fenotipo Glo (gut granule loss). Mutaciones en el gen *rab7* (homólogo de *Ypt7*) de *C. elegans* no resultan en un fenotipo Glo, pero la pérdida del gen *vps16* y *vps41*, tiene un fenotipo Glo con una reducción significativa de dichos gránulos (Hermann *et al.*, 2005).

1.3 Biogénesis de los organelos tipo lisosomas.

La mayoría de las propiedades de los lisosomas y otros organelos endocíticos tardíos son compartidas por un grupo heterogéneo de compartimientos específicos de cada tipo celular, denominados como organelos tipo lisosomas (OTL). La mayoría de los OTL han sido definidos en células del linaje hematopoyético, que incluyen a los gránulos densos y gránulos- α de las plaquetas, a los compartimientos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II en las células presentadoras de antígenos y a los gránulos citotóxicos de los linfocitos T y de células “natural killer”. Los OTL también se encuentran en las células no hematopoyéticas, éstos incluyen los cuerpos lamelares en las células epiteliales tipo 2 de pulmón y los melanosomas de los melanocitos (Dell'Angelica, 2000; Dell'Angelica, 2003; Bonifacino, 2004). Al contrario de los lisosomas clásicos, cuya función primaria es la de degradar a las macromoléculas,

cada OTL tiene una función adicional única e independiente de acuerdo al tipo celular en que se encuentren (Rapaso *et al.*, 2002).

La relación entre los OTL y los lisosomas, sugieren que el sistema endosomal juega un papel clave en su biogénesis. Los precursores de los OTL provienen de la red *trans*-Golgi (TGN por *trans*-Golgi *network*). Existen dos rutas hacia los lisosomas: la ruta directa involucra el transporte de la red *trans*-Golgi hacia los endosomas (Figura 2A; Paso 1 y 3, o paso 2), seguida de un transporte hacia los lisosomas (Figura 2A; paso 4); la segunda ruta, es la indirecta, que comienza el transporte en la red *trans*-Golgi, hacia la membrana plasmática (Figura 2A; paso 6), donde son internalizadas en los endosomas tempranos (Figura 2A; paso 7) y son liberadas en los endosomas tardíos (Figura 2A; paso 3) y posteriormente en los lisosomas (Figura 2A; paso 4). De esta manera, existen muchas proteínas que residen en los OTL, que tienen señales que les permiten el tráfico a través de la ruta directa o indirecta de los lisosomas, llegando a los OTL por la red *trans*-Golgi, endosomas tardíos ó lisosomas (Figura 2A; paso 8, 9 y 10).

Para los organelos tipo lisosomas que representan un sólo compartimiento lisosomal en tipos celulares particulares (como es el caso de los gránulos líticos), los endosomas tardíos contienen proteínas específicas. Para otros organelos tipo lisosomas, las proteínas específicas podrían ser segregadas de los lisosomas convencionales, presumiblemente en los endosomas tardíos (Figura 2A; paso 8). Este proceso sugiere que existe una señal de clasificación específica, además del reconocimiento de moléculas. De manera alternativa, las proteínas específicas de la célula, podrían modificarse en el ambiente del endosoma tardío, de tal forma que ocurra una segregación (Figura 2A; paso 8) (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

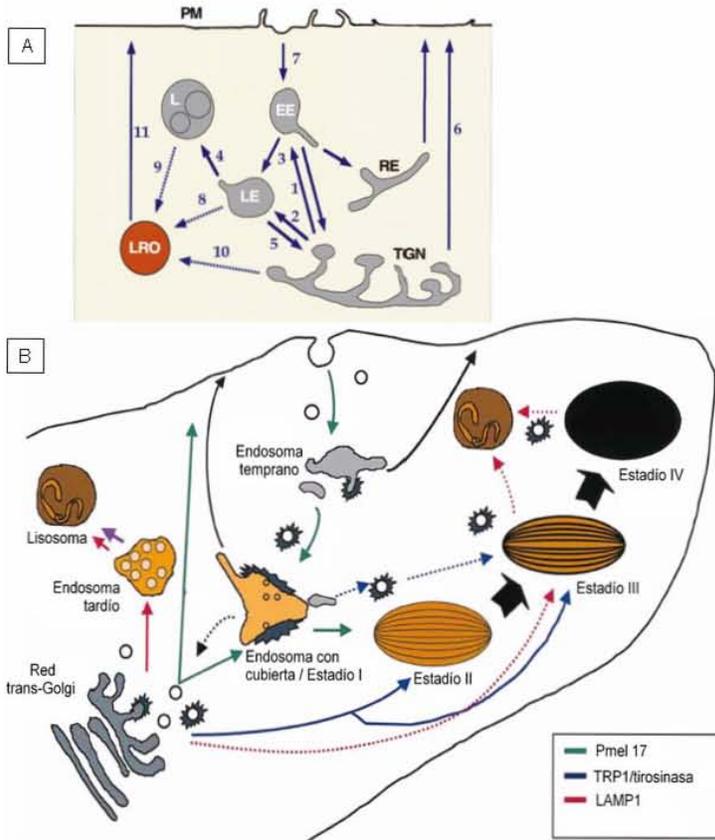


Figura 2. 2A Biogénesis de los organelos tipo lisosoma. Rutas involucradas en la biogénesis de los lisosomas y los organelos tipo lisosomas. TGN, red *trans*-Golgi; EE, endosoma temprano; RE, endosoma de reciclaje; LE, endosoma tardío; L, lisosoma; LRO, organelo tipo lisosoma; PM, membrana plasmática. Los números denotan los pasos específicos del transporte que se discuten en el texto. Las flechas continuas están documentadas, mientras que las flechas punteadas indican pasos hipotéticos del transporte. (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

2B Biogénesis de melanosomas. Modelo de transporte del sistema endosomal y melanosomal en melanocitos. Modelo de segregación de proteínas en los compartimientos premelanosomales y melanosomales. Las flechas representan las direcciones propuestas de transporte de proteínas y lípidos entre los organelos. Las rayas pequeñas, representan las cubiertas de clatrina, la cubierta densa contenedora de clatrina de los endosomas con

cubierta en los melanocitos está indicada por una barra negra. Las vesículas intralumenales se presentan en los endosomas tardíos y endosomas con cubierta, como se indican con los pequeños círculos, membranas intralumenales de forma irregular representan los lisosomas. Se indican las estriaciones intralumenales del estadio II al IV del melanosoma (Raposo y Marks, 2002).

1.3.1 Biogénesis de los melanosomas.

El melanosoma es un organelo tipo lisosoma, debido a que comparte un número de propiedades asociadas con los lisosomas, tales como un pH luminal bajo, la presencia de hidrolasas, proteínas membranales y transmembranales lisosomales (Dell'Angelica *et al.*, 2000). Los melanocitos se localizan en los melanocitos de la coroides, en el epitelio pigmentario de la retina y en los melanocitos de la epidermis.

La biogénesis de los melanosomas prosigue en estadios secuenciales definidos por características morfológicas. El estadio I premelanosomal es electrolúcido y contiene vesículas membranosas internas que parecen cuerpos multivesiculares con

una estructura fibrosa irregular. Derivan de estructuras tubulares de la ruta endosomal o de secreción tardía.

Las fibras intralumenales arregladas paralelamente, se elongan en el estadio II premelanosomal, resultando en su apariencia característica estriada y de forma elipsoidal. Estas fibras sirven como molde para que se deposite la melanina en los melanosomas maduros, resultando en un oscurecimiento y empaquetamiento denso (estado III) de la melanina. Durante la síntesis de melanina, la estructura intralumenal no se observa, por el oscurecimiento debido a la alta concentración de la melanina (estado IV) (Figura 2B) (Marks y Seabra, 2001).

Los estadios I y II premelanosomales son ricos en Pmel17/gp100, una proteína estructural específica de las células pigmentarias asociadas con las estriaciones fibrosas. Por el contrario, los estadios III y IV melanosomales son ricos en otras proteínas específicas de las células pigmentarias, tales como la tirosinasa y las proteínas tipo tirosinasa 1 y 2 (TRP1 y TPR2), enzimas involucradas en la síntesis de melanina (Raposo *et al.*, 2002). Existen diferentes rutas para el transporte de premelanosomas y melanosomas maduros (Raposo y Marks, 2002). El transporte de tirosinasa es dependiente de AP-3 y AP-1, los cuales tiene funciones parcialmente redundantes durante el transporte desde los endosomas tempranos hacia el estadio I premelanosomal (Theos *et al.*, 2005a) mientras que Pmel17 es transportada del TGN hacia el estadio I premelanosomal (Theos *et al.*, 2005b) (Figura 2B).

1.3.2 Melanosomas del epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es un monoepitelio plano ubicado entre la capa de los fotorreceptores y la coroides. Las funciones del EPR son: la fagocitosis circadiana de los segmentos externos de los fotorreceptores, el transporte de nutrientes

de la coroides hacia el espacio subretiniano, el transporte de los desechos del espacio subretiniano a la coroides, síntesis de la matriz interfotorreceptora, formación de la barrera externa “sangre-retina”, y la adhesión de la retina (Marmorstein *et al.*, 1998). Se cree que la melanización del EPR está involucrada en la protección de la retina neural al daño inducido por la luz; asimismo el EPR participa en la señalización del desarrollo de la retina neural durante el desarrollo embrionario (Lister, 2002).

En los melanocitos epidermales de mamíferos, los melanosomas son sintetizados y posteriormente transportados a las puntas de las dendritas arborescentes para transferirlos a los queratinocitos adyacentes, sin embargo en la coroides y en el EPR, los melanosomas permanecen en el mismo tipo celular en el que fue sintetizado, cumpliendo una función detoxificante de los intermediarios oxidantes (Schraermeyer y Heimann, 1999; Rapaso *et al.*, 2002; Marks y Seabra, 2001). Sin embargo, el patrón de maduración de los melanosomas es esencialmente diferente entre los teleosteos y los mamíferos, ya que en el pez *Oryzias latipes* la biogénesis de melanosomas en el EPR, inicia con melanosomas multivesiculares y esféricos adquiriendo después una forma elipsoidal. Por su parte los premelanosomas contienen una estructura fibrilar, que raramente se observa. La coroides contiene melanosomas esféricos, presentan características morfológicas similares a los melanosomas de la piel, pero diferentes de los melanosomas de las células epiteliales pigmentarias (Hirose y Matsumoto, 1994).

Los melanosomas están polarizados a través de la superficie apical de células del EPR, donde parecen fusionarse con fagosomas conteniendo segmentos externos de los fotorreceptores (Marks y Seabra, 2001). Se observan algunos melanosomas, con lipofuscina, la cual es el un residuo no degradado en los lisosomas, lo que sugiere que los melanosomas se incorporan al sistema lisosomal del EPR (Kim y Choi, 1998; Schraermeyer *et al.*, 1999; Azarian *et al.*, 2005). Los melanosomas del EPR son elípticos y esféricos (Kim y Choi, 1998).

Aún es controversial que los melanosomas elipsoides contengan eumelanina, y los melanosomas redondos contienen feomelanina, puesto que un estudio reciente en el EPR de bovino, se encontró que los melanosomas contenían principalmente eumelanina (feomelanina 0.1-0.5%), a pesar de ser elipsoidales y redondos (Liu *et al.*, 2005). Sin embargo se sabe que estos dos tipos de melanosomas pueden coexistir en el mismo melanocito de humano, además de que presentan una estructura interna que los diferencia (Inazu y Mishima, 1993) y que la proteína Slc7a11 codifica para un intercambiador de xCT cisteína/glutamato, la cual regula la proporción de feomelanina y melanina sintetizada en melanocitos (Chintala *et al.*, 2005).

La eumelanina negra se genera por sucesivas hidroxilaciones mediadas por la tirosinasa, seguida de oxidaciones y reacciones de carboxilación a partir de la conversión de tirosina a L-DOPA (dopaquinona) por TRP1 y TRP2. La formación de la feomelanina roja, amarilla y café requiere además de al menos un paso de reducción dependiente de cisteína (Marks y Seabra, 2001).

1.4 Enfermedades de hipopigmentación en humanos.

El síndrome de Hermansky-Pudlak, es una enfermedad causada por mutaciones en 7 genes humanos y 15 genes en el ratón. Estos genes codifican para las subunidades de cuatro complejos multiproteicos llamados AP-3, BLOC-1, BLOC-2 y BLOC-3. (BLOC por Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex), además de otros componentes de la maquinaria del tráfico vesicular (Bonifacio, 2004). Esta enfermedad se caracteriza por albinismo oculocutáneo y hemorragia, a causa de melanosomas anormales y la aparente ausencia de gránulos densos de las plaquetas, respectivamente. Los pacientes sufren de hematomas fácilmente y con el tiempo desarrollan fibrosis pulmonar y colitis inflamatoria, probablemente debido a una

acumulación de material no degradado en los lisosomas (lipofuscinosis ceroides) de las células retículo-endoteliales. Algunos pacientes afectados también exhiben anormalidades en el sistema inmune tales como neutropenia (pérdida de neutrófilos) y pérdida de linfocitos citotóxicos T (Spritz, 1999; Huizing *et al.*, 2000; Huizing *et al.* 2002; Li *et al.*, 2004; Starcevic *et al.*, 2002; Stinchcombe *et al.*, 2004)

El síndrome de Chediak-Higashi está caracterizado por una hipopigmentación variable de la piel, cabellos y ojos, asimismo por hemorragia, disfunción neurológica progresiva y severas deficiencias inmunológicas. La deficiencia inmunológica es observada en el 90% de los casos y está asociada con neutropenia y defectos de la función de las células “natural killer”, que prosigue a una fase linfoproliferativa acelerada que es frecuentemente fatal. El 10% restante de los casos tiene poca o ninguna infección, pero lentamente desarrollan serios síntomas neurológicos tales como deficiencia mental. A nivel celular presenta lisosomas grandes, melanosomas, compartimientos del MHCs, gránulos líticos y gránulos azurófilos. Los gránulos densos plaquetarios, son pocos o ausentes (Marks y Seabra, 2001).

El síndrome de Griscelli (SG), y el síndrome de albinismo parcial y de inmunodeficiencia (SAPID) son enfermedades melanolisomales neuroectodermales. Ambos tipos de pacientes desarrollan hipopigmentación de la piel y cabello color grisáceo, posiblemente debido al daño en la transferencia de melanosomas de melanocitos a queratinocitos. Por otro lado, ninguna de estas enfermedades están asociadas a una deficiencia en los gránulos densos plaquetarios. SG y SAPID también exhiben inmunodeficiencia celular. En SG, la inmunodeficiencia es resultado, al menos en parte, de una disfunción de los lisosomas de secreción (e.g., gránulos líticos) que puedan permitir una fase similar de linfoproliferación acelerada, similar a la observada en el síndrome de Chediak-Higashi. Los pacientes con síndrome de SAPID también

presentan una disfunción progresiva del sistema nervioso central (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

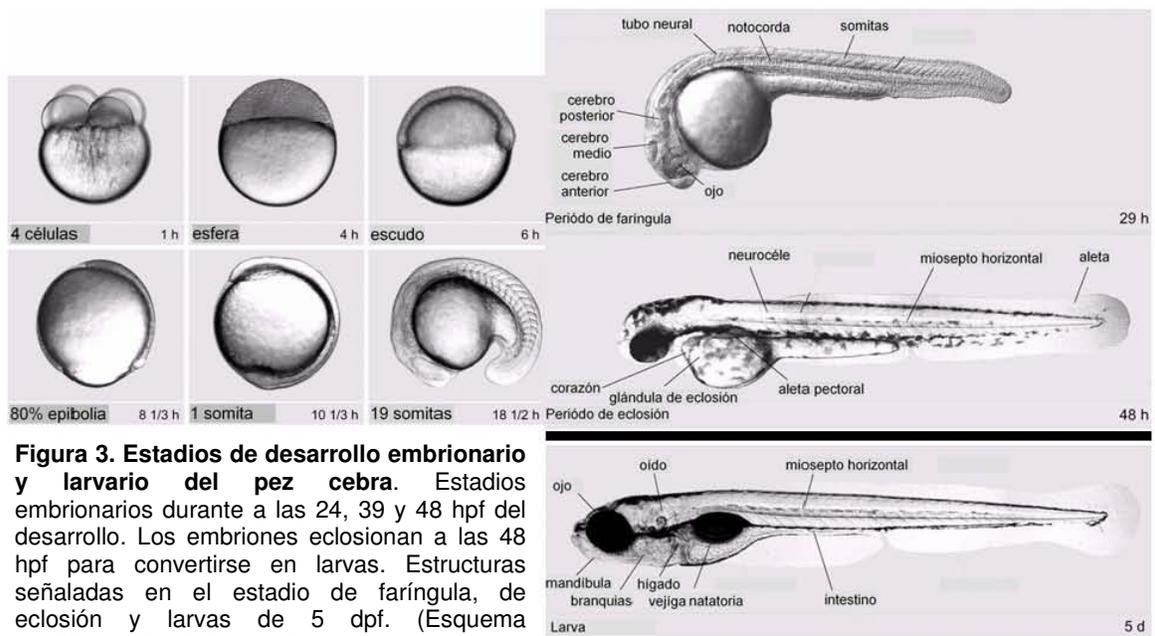
1.5 El pez cebra como modelo de estudio de biología del desarrollo.

1.5.1 El pez cebra como modelo de estudio de biología del desarrollo y del sistema visual.

El pez cebra es de fácil cuidado y mantenimiento en un acuario. Su desarrollo embrionario es rápido, y las larvas eclosionan a los 2 días post-fertilización (dpf). Su fertilización es externa y los embriones son translúcidos, lo que permite observar el desarrollo embrionario *in vivo* (Figura 3). A los 5 dpf las larvas comienzan a alimentarse de pequeños protozoarios y a escapar de los depredadores, de esta manera existe una fuerte presión evolutiva a desarrollar rápidamente el sistema sensorial y visual (Neuhauss, 2003). La edad adulta la alcanzan a los 3 meses y las hembras producen de 100 a 200 embriones en una semana, lo que facilita los análisis genéticos. Por estas razones el Dr. George Streisinger, desarrolló varias metodologías de estudio de las mutantes del pez cebra, con el objetivo de elucidar los mecanismos del desarrollo embrionario y del sistema nervioso. Los métodos están dirigidos a descubrir rápidamente mutaciones recesivas de la línea germinal y analizar las mutantes a nivel celular y genético (Grunwald y Eisen, 2002).

Debido a que la retina y el lente muestran una morfología similar a la de otros vertebrados incluyendo a la de los humanos, se ha estudiado el desarrollo ocular, la función del sistema visual y las enfermedades del sistema visual en el pez cebra. Así la

retina externa a los 5 dpf, está compuesta de un patrón preciso de fotorreceptores: cuatro tipos de conos (conos individuales, largos y cortos, y conos dobles largos y cortos) intercalados entre los bastones. La retina del pez cebra tiene diferentes pigmentos visuales incluyendo un pigmento sensible a UV, siendo capaz de tener una visión tetracromática. La retina es capaz de responder al medio, con comportamientos dependientes de la visión. El primer comportamiento visual es una respuesta de atención visual. Las larvas responden a una rápida disminución de la iluminación con un rápido movimiento del cuerpo, supuestamente como un comportamiento adaptativo para escapar de un predador. Este comportamiento de respuesta comienza a los 68 hpf, justo en el tiempo cuando los segmentos externos de los fotorreceptores y el borde sináptico se han formado en la retina (Neushasus, 2003). La maduración del sistema visual a los 5 dpf, da la posibilidad de realizar una serie de pruebas, como la respuesta optocinética, respuesta optomotora y el registro de electroretinogramas, con el fin de detectar cualquier anomalía del sistema visual.



1.5.2 Mutagénesis a gran escala en el pez cebra.

Las mutagénesis a gran escala en el pez cebra comenzaron en el Instituto Max Planck en Tübingen, Alemania y en el Hospital General de Massachussets; dirigidas por Nüsslein-Volhard y Wolfgang Driever, respectivamente. Entre Tübingen y Boston, se cuenta con ~ 4,000 fenotipos descubiertos de mutantes embrionarias letales, tanto por mutagénesis química, como por mutagénesis insercional de retrovirus (Grunwald y Eisen, 2002).

En la mutagénesis química, se utilizó *N*-etil-*N*-nitrosourea (ENU), que actúa en espermatogonias en pre-meiosis, produciendo mutaciones puntuales o pequeñas lesiones intragénicas. Sin embargo, la clonación de los genes mutados requiere de procedimientos laboriosos de clonación posicional y si es posible de un gen candidato (Haffter *et al.*, 1996). Por otro parte, se utilizó un mutágeno por inserción retroviral. El elemento insercional es el retrovirus de la leucemia murina de Moloney modificado (“pseudotyped retroviruses”) que infecta a embriones en etapas tempranas del pez cebra. Al retrovirus se le sustituye una glicoproteína vírica de estomatitis vesicular (VSV-G: vesicular stomatitis virus-glycoprotein) de la cubierta. VSV-G une a un fosfolípido común de membrana, que explica el gran rango de hospederos infectados. El retrovirus funciona como marcaje molecular en el sitio de la mutación y proporciona una ventaja para clonar el gen mutado, además cuando se inserta, introduce un exón viral y convierte el exón endógeno contiguo en un intrón. La inserción retroviral se integra al genoma de manera azarosa y sin causar grandes aberraciones cromosómicas que podrían complicar la identificación del gen mutado. Estudios en las células HeLa y en las cepas mutantes retrovirales del pez cebra, sugieren que existe un mecanismo de inserción del retrovirus, debido a que las inserciones se localizan principalmente en la

región del inicio de la transcripción (Amsterdam, 2003; Chen *et al.*, 2002; Gaiano *et al.*, 1996; Wu *et al.* 2003).

En el laboratorio de la Dra. Nancy Hopkins (MIT) se realizó una mutagénesis por inserción retroviral a gran escala. Se han identificado 315 genes a partir de 525 mutantes, que representan 22% de los genes esenciales en el desarrollo embrionario y desarrollo temprano de la larva (Amsterdam *et al.*, 2004). Los genes esenciales embrionarios del pez cebra se conservan en otras especies. De los 315 genes identificados, 72% de los genes esenciales embrionarios del pez cebra, tienen homólogos en levadura, 93% tiene homólogos en invertebrados (*D. melanogaster* y *C. elegans*), y 99% tienen homólogos en el humano (Amsterdam *et al.*, 2004). Es por ello que el estudio de las mutantes ayudará a elucidar las rutas genéticas interconectadas, que tienen un papel especial en las enfermedades humanas (Grunwald y Eisen, 2002).

2. HIPOTESIS

El fenotipo de hipopigmentación de las larvas mutantes *vps*^{hi2499A} (*vps18* interrumpido) del pez cebra, se debe a defectos en la biogénesis de los melanosomas, ya que Vps18 forma parte del complejo HOPS, el cual participa en el tráfico vesicular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

- Caracterizar el fenotipo de hipopigmentación de la mutante *vps*^{hi2499A} del pez cebra (*Danio rerio*) con el fin de estudiar la biogénesis de los melanosomas.

3.2 Objetivos particulares.

- Genotipificar la cepa 2499A de pez cebra, la cual es portadora del alelo mutante *hi2499A*.
- Obtener la secuencia genómica y del cDNA del gen *vps18*, las cuales se utilizarán para posteriores estudios de regulación génica.
- Realizar un análisis filogenético de la proteína Vps18 con el fin de determinar funciones conservadas a través de la evolución.
- Analizar la expresión del gen *vps18* en la mutante *vps*^{hi2499A}, utilizando la técnica de RT-PCR.
- Describir morfológicamente el fenotipo de hipopigmentación de la mutante *vps*^{hi2499A} en el epitelio pigmentario de la retina.
- Determinar la capacidad visual de la mutante *vps*^{hi2499A} a través del ensayo optocinético.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Mantenimiento de las cepas del pez cebra. En la especie *D. rerio*, la hembra se identifica por su vientre prominente, y su parte dorsal color verde esmeralda, mientras que el macho se identifica por su color rojizo. Para obtener una craza se procura que los peces sean del mismo tamaño. La pecera en la cual los peces se reproducen, debe tener un sistema de rejilla que evite que los peces se coman los embriones. La reproducción está ligada al ciclo circadiano, por lo que el estímulo de la luz propicia el cortejo para que liberen tanto los ovocitos como los espermatozoides y ocurra la fecundación externa.

Antes de coleccionar los embriones, se regresan los peces a sus tanques de origen, a menos que se siga utilizando la misma pareja para posteriores análisis genéticos. Para recolectar los embriones, se hace pasar el agua del tanque a través de una coladera, que retenga los embriones. Se voltea la coladera, depositando los embriones sobre una caja de Petri, que contiene agua de acuario y azul de metileno (concentración 1:500) para suprimir el crecimiento de hongos (Haffter *et al.*, 1996). Se observan los embriones al microscopio estereoscópico, y se desechan los ovocitos no fertilizados, los cuales se diferencian morfológicamente. Los embriones se incuban a 28.5°C (Kimmel *et al.*, 1995) en cajas de Petri con 60 embriones máximo. Para mantener limpia la caja de Petri, es necesario cambiar el agua de acuario el primer y tercer día del desarrollo de las larvas.

Una hembra puede aparearse una vez por semana con una producción de 200 ovocitos, sin embargo tal condición sólo puede mantenerse por 4.5 meses. Los peces alcanzan la madurez reproductiva de entre 8 a 10 semanas.

Las cepas utilizadas, son las siguientes:

2499A	Presenta el alelo <i>hi2499A</i>
14-Por	Silvestre
NOP	Silvestre

4.2 Genotipificación por PCR a partir de DNA proveniente de biopsias de la aleta caudal del pez cebra adulto. (Protocolo modificado de Gaiano *et al.*, 1996) Se prepara el amortiguador de lisis, (KCl 50 mM, NaCl 200 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM, gelatina al 0.01%, Nonidet P-40 0.45%, Tween-20 0.45%, EDTA 5 mM con proteinasa K a 0.2 mg/ml). La proteinasa K se almacena a 20 mg/ml en un amortiguador conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM de CaCl₂, 50% de glicerol.

Los peces adultos se anestesian con triclaína [0.05%] disuelta en 1L de agua de acuario. Generalmente el tiempo de anestesia toma entre 10 y 60 segundos dependiendo del tamaño del pez. Con una cuchara con hoyos, se saca al pez y se coloca sobre una superficie húmeda cubierta con un parafilm. Con un bisturí se cortan dos terceras partes de la aleta caudal y se aísla al pez en una recipiente con un volúmen mínimo de 500 ml de agua de acuario, hasta que se obtenga el resultado de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La biopsia se coloca en 60 µl del amortiguador de lisis y se incuba a 55°C (ThermoStat Plus) durante 4hrs a toda la noche. Se inactiva la reacción de lisis, incubándola a 65°C por 15 minutos y posteriormente se incuba en hielo por 2 minutos y se agita en el vortex al máximo (hasta observar una mezcla homogénea). Se centrifuga por 1 minuto a 3,000 rpm y se almacenan las muestras a 4°C.

Para la reacción de la PCR se sigue el protocolo del laboratorio, agregándose 1 μ l de la muestra de DNA a 24 μ l del volumen de reacción de la PCR. Se amplifica con los oligonucleótidos: EM11, EM67, Wnt5 forward, Wnt5 reverse y Nu3 (Figura 5).

4.3 Reacción de la PCR (Modificado de Sambrook, 2001). Los volúmenes de reacción pueden ser de 25, 50 o 100 μ l. Se utiliza una mezcla de reacción que contenga el amortiguador de la PCR (1X), $MgCl_2$ (2 mM), dNTPs (0.2 mM), oligonucleótidos (1 μ M) y Taq polimerasa a 0.04 – 1 U/ μ l. El programa de PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 1min. a 94°C, y continua con 32 ciclos de desnaturalización (94°C x 30 seg.) alineamiento (60°C x 1min.) y de extensión (72°C x 1min.). Finaliza con 10 min., a 72°C de extensión y la muestra permanece a 25°C.

Para amplificar los intrones de *vps18*, se modificó el programa de PCR, con 2 minutos de desnaturalización a 94°C, con 35 ciclos de 94°C x 15 seg., 60°C x 30 seg., y 72°C x 2 minutos.

Para amplificar el gen *vps18* y el alelo *hi2499A* por RT-PCR se usó 1.5 mM de $MgCl_2$ y un programa de PCR de 2 min. de desnaturalización a 94°C, con 35 ciclos de 94°C x 18 seg., 60°C x 30 seg. y 68°C x 1:30 min., con una extensión final de 10 min., a 72°C.

4.4 Geles de agarosa. El bromuro de etidio (SIGMA E-4391) se utilizó a 5 mg/ml. Cada tableta de BrEt contiene 10mg.

4.5 Amortiguador de carga para geles de agarosa(Sambrook, 2001). Se mezcló el amortiguador de corrida a 6X, 0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % cianol xileno FF y 30% glicerol en H_2O y se almacenó a 4°C.

4.6 Transformación de células competentes DH5α de *Escherichia coli*. Las células competentes DH5α se descongelan inmersas en hielo y se resuspenden suavemente. Se le agrega de 2 μl a 10 μl del plásmido pER405 (ORF de *vps18*) y se incuban en hielo de 5 a 30 minutos. Se les da un choque de calor a 42°C por 2 min. Se incuban en hielo 1 minuto y se recuperan agregándoles 1 ml de medio LB. Se incuban en agitación por 1hr., a 37°C, a 200 rpm. Se cosechan las bacterias por centrifugación y la pastilla se resuspende en 10 y 50 μl para sembrar en cajas con agar y con antibiótico (carbencilina o ampicilina [50 mg/ml]). Se incluye un control positivo (4 ng de un plásmido super-enrollado) y un control negativo (sin DNA).

De las colonias crecidas, se cuentan para determinar la eficiencia de la transformación. Se eligen algunas colonias y se transfieren cada una a un cultivo de 3 ml de LB con carbencilina (50 mg/ml). Se incuban en agitación durante toda la noche a 37°C con agitación. Se hace una extracción del DNA plasmídico y posteriormente se realiza una reacción de restricción del plásmido recombinante para identificar las colonias portadoras.

4.7 Almacenamiento de bacterias portadoras del plásmido recombinante. En condiciones de esterilidad (mechero encendido y mesa limpia con etanol 70%), se toma una colonia de bacterias y se siembra con una asa bacteriológica para colonia aislada en una caja de Petri con agar y carbencilina [50 mg/ml]. Se incuba a 37°C durante toda la noche.

Cuidadosamente se toma una sola colonia y se incuba en agitación (250 rpm) durante toda la noche a 37°C, en un cultivo de 3 ml de medio LB con carbencilina [50 mg/ml]. Las bacterias se cosechan en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se les agrega medio LB y glicerol estéril a una concentración final de 15%.

El medio LB (Sambrook, 2001) se prepara con 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, se afora a 1L con dH₂O y se ajusta el pH 7.0 con 5N NaOH (≈ 0.2 ml). Se esteriliza en la autoclave en un ciclo para líquidos.

4.8 Secuenciación del DNA. Los fragmentos de DNA se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La concentración de las muestras de plásmido es de 300 – 400 ng / μ l, mientras que de los productos de la PCR, se requiere 10 pg por cada 100 pares de bases, ambos en un volúmen de 15 μ l. La concentración requerida de los oligonucleótidos es de 20 pmolas/ μ l, en el amortiguador TE pH 8.0 o dH₂O MilliQ, en un volúmen de 20 μ l.

El plásmido se cuantifica en un espectofotómetro y se miden las absorbencias. La relación entre las absorbencias 260/280 nm detecta la presencia de proteínas, una muestra pura arroja una relación de 1.5 a 1.9 y por otro lado, la relación de absorbencias 230/260 nm que detecta la cantidad de sales debe estar entre 0.3 a 0.6; por lo que no se recomienda concentrar la muestra con calor o evaporación.

4.9 Clonación de productos de PCR utilizando el sistema TOPO TA Cloning (Invitrogen). El fragmento de DNA a clonar, se amplifica por PCR y se purifica siguiendo el protocolo de purificación de bandas de un gel de agarosa (Sección 4.10).

Para clonar el producto de PCR purificado, se requiere de 10 a 15 ng.

Reacción de clonación:

Producto de PCR	2 - 4 μ l
Solución de Sal	1 μ l
Vector TOPO	1 μ l
dH ₂ O estéril (disponible en el Sistema)	6 μ l c.b.p.

Se incuba la reacción de clonación a temperatura ambiente por 5 minutos y se transforma en la cepa de bacterias TOP10 que provee el sistema comercial. La transformación (ver sección 4.7) se lleva a cabo con las siguientes modificaciones: a las células TOP10 se les agrega 2 μ l de la reacción de clonación y se recuperan en 250 μ l de medio S.O.C.

El medio S.O.C. (Sambrook, 2001) se prepara con 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, y se le agrega 20 ml de glucosa 1M precalentada a 60°C. La glucosa se prepara con 18 g de glucosa y se afora a 100 ml con dH₂O esterilizándola por filtrado. Finalmente el medio S.O.C se afora a 1L con dH₂O.

4.10 Purificación de bandas de un gel de agarosa (QIAquick no. Cat. 28104). El fragmento de DNA a purificar se carga en un gel de agarosa. Sobre el trans-iluminador encendido (UV Transilluminator Modelo TM-10E) se coloca un vidrio, sobre el cual se pone el gel de agarosa. Con un bisturí se corta solo la banda del fragmento de DNA y se coloca en un tubo Falcon de 15 ml. La muestra de agarosa se pesa en la balanza (Adventurer-AHAUS).

Se agregan 3 volúmenes del amortiguador QC a 1 volumen de agarosa (100 mg ~ 100 μ l) y se incuba a 55°C, agitando en el vórtex cada 2 o 3 minutos, hasta que se disuelva la agarosa. La muestra se mezcla con un volumen-gel-agarosa de isopropanol (2-propanol, 99%, No. 19516-500 ML SIGMA) y se coloca en una columna de centrifugado de QIAquick, de capacidad de 700 μ l. La columna contiene una membrana que une el DNA, por lo que se centrifuga por 1 minuto a 13,000 rpm ~17,900 x g (MiniSpin Eppendorf AG 22331) y se descarta el líquido que haya pasado a través de la columna.

A la columna se le agregan 0.5 ml del amortiguador QG y se centrifuga 1 minuto a 13,000 rpm. Se lava la columna agregando 0.75 ml del amortiguador PE y se centrifuga por 1 minuto a 13,000 rpm. Se deja reposar la columna por 2-5 min., y se le agrega el amortiguador PE. Se centrifuga por 1 minuto a 13,000 rpm, sin embargo para no dejar residuos de etanol proveniente del amortiguador PE se centrifuga nuevamente la columna por 1 minuto a 13,000 rpm.

Para eluir el DNA, se coloca la columna en un tubo sin tapa de microcentrifuga de 1.5 ml, y se le agrega al centro de la membrana, 30-50 μ l del amortiguador EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o dH₂O. Finalmente se centrifuga por 1 minuto a 13,000 rpm.

4.11 Extracción del RNA total de embriones y larvas del pez cebra. (Modificado de Invitrogen: TRIzol cat. 15596-026) En un tubo de 1,5 ml se coloca un mínimo de 10 y un máximo de 100 embriones o larvas, se extrae el exceso de agua de acuario y se les agrega 0.5-0.8 ml de TRIzol a temperatura ambiente. Con un pistilo de plástico estéril y libre de RNAasas (VWR Cat. KT749521-1590) se homogeniza la muestra.

A la muestra se le agregan 0.2 ml de cloroformo y se agita enérgicamente en el vórtex por 20 segundos. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos.

Se centrifuga a 4°C por 15 min. a 12,000 x g, donde se forman 3 fases: la fase roja inferior de fenol-coroforno, una interfase y una fase superior acuosa que contiene la muestra, la cual se recolecta en un tubo limpio y se precipita el DNA/RNA al agregar 0.5 ml de alcohol isopropílico (Isopropanol) y se mezcla por inversión incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifuga a 4°C por 10 min., a 12,000 x g. El precipitado es blanco y se retira el sobrenadante con una pipeta. Se lava la muestra agregando 1 ml de etanol al 75% preparado con dH₂O-DEPC (dietilpirocarbonato), y se centrifuga a 4°C por 5 min. a 7,500 x g. Se retira el sobrenadante. Con el tubo abierto y

a temperatura ambiente se seca el precipitado por 5 minutos o hasta que se evapore el etanol.

El precipitado blanco se resuspende en un volumen de 60 μ l de la siguiente reacción de eliminación del DNA genómico. En 34 μ l de dH₂O-DEPC, 6 μ l del amortiguador de transcripción *in vitro* 10X (Roche cat. 1465384), se precalienta a 37°C por 5 minutos y se le agregan 20 μ l de DNAasa libre de RNAasas (Roche cat; 0776785). La reacción se incuba a 37°C por 1 hr. Después se agregan 140 μ l de dH₂O-DEPC y 200 μ l de fenol-clororomo-alcohol isoamílico. Se vortexea enérgicamente por 20 segundos incubando a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifuga a 4°C por 15 min., a 12,000 x g y se forman las tres fases. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo limpio. Se precipita el RNA total, agregando 0.5 ml de alcohol isopropílico y se mezcla por inversión incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifuga a 4°C por 10 min., a 12,000 x g. Se obtiene un precipitado blanco y se retira el sobrenadante. Se lava el precipitado dos veces, agregar 1 ml de etanol 75% preparado con dH₂O-DEPC y se centrifuga a 4°C por 5 min., a 7,500 x g, para después retirar el sobrenadante. Se repite el lavado con etanol. Con el tubo abierto y a temperatura ambiente dejar secar los restos de etanol por 5 minutos. Finalmente se resuspende en dH₂O-DEPC con la siguiente relación: 1 μ l por cada 5 embriones o larvas. Las muestras se almacenan a -70°C.

Para determinar la concentración y la pureza del RNA total, se incuba la muestra por 10 minutos a 65°C e inmediatamente se coloca en hielo por un mínimo de 2 min, antes de cuantificarse en el espectrofotómetro. Se diluyen 5 μ l de muestra del RNA total en 1 ml de dH₂O-DEPC en una celda de cuarzo de 1 ml y se mide la absorbencia a 260 y 280 nm. La concentración se calcula con la siguiente fórmula: Abs 260 X 40 X factor de dilución = concentración [μ g/ml]. El rendimiento total se calcula con: [X μ g/ml] por el

volúmen total de la muestra. La relación de 260/280 nm de una muestra pura deber se de 1.8-2.0.

Para observar el RNA, se corre en un gel de agarosa a 0.8-1.0%. Se toman 1.5 μ l de la muestra y se le agregan 1.5 μ l del amortiguador de carga. Antes de cargarla en el gel se precalienta a 68°C por 10 minutos.

4.12 Síntesis del cDNA. Se emplean de 0.05 a 5 μ g de RNA. Se prepara la mezcla RNA/oligonucleótidos en tubos de 1.5 ml. Se etiquetan dos tubos: +RT y –RT, uno es el experimento y el otro es el control negativo que detectará contaminaciones de DNA. A cada uno de ellos, se les agrega 10 μ l de la mezcla de reacción.

Mezcla de reacción de 20 μ l.

RNA	2 - 4 μ l
10 mM dNTPs	2 μ l
Oligo dT (0.5 μ g/ μ l)	2 μ l
dH ₂ O-DEPC	6 μ l

Se incuban a 65°C por 5 min., y se colocan en hielo por 1 min. Se agregan 9 μ l de la siguiente mezcla a c/u de los tubos.

Mezcla de reacción de 18 μ l.

10X Amortiguador RT	4 μ l
25 mM MgCl ₂	8 μ l
0.1 M DTT	4 μ l
RNAasa (40 U/ μ l)	2 μ l

Se incuban a 42°C por 2 min., y solo al tubo etiquetado con +RT se le agrega 1 µl de la enzima retrotranscriptasa SUPERScript II RT (50 U), mientras que al tubo – RT se le agrega 1 µl de H₂O-DEPC. Se mezcla y se incuba a 42°C por 50 min. Para inactivar la enzima se incuba la reacción a 70°C por 15 min. Posteriormente se incuba a 4°C por 5 min., y se le agrega a cada tubo 1 µl de RNAasa H de E. coli (2 U / µl). Se incuba a 37°C por 20 min., y las muestras se almacenan a – 20°C.

4.13 Fijación de larvas para histología y microscopía electrónica. Los cortes histológicos se fijan con PFA-Glut (Paraformaldehído-glutaraldehído), mientras que los cortes para microscopia electrónica, a parte del fijador PFA-Glut, se utiliza un segundo fijador, 1-TO (1% de tetraóxido de osmio). El PFA-Glut consiste en 1% PFA, 2.5% glutaraldehído, 60 mM amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4, 3% sacarosa. Y el 1-TO se prepara a 1% tetróxido de osmio en 60 mM del amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4. De ambas sustancias se hacen alícuotas de aproximadamente 8 ml y se almacenan a –20°C.

El amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4 (Sambrook, 2001) se prepara con 77.4 ml de 1 M de Na₂HPO₄ y 22.6 ml de 1M NaH₂PO₄. La solución infiltrante se prepara al momento de usarla, y contiene 50 ml de Historesina básica de Leica (Leica Microsystems) con el activador (Leica Microsystems). Se mezcla lentamente con un agitador magnético tratando de no producir burbujas y se almacenan a 4°C protegidas de la luz con papel aluminio.

Las larvas se fijan en tubos eppendorff que contienen de 15 a 50 larvas de la cepa 2499A de 3-5 dpf (días post-fertilización). A todas las larvas se les agrega PFA-Glut por 3 horas en agitación a 4°C. Únicamente a las muestras para microscopía electrónica se les agrega 1-TO por 3 horas en agitación a 4°C.

Todas las muestras se incuban en 60 mM del amortiguador de fosfatos frío por 25 min., en agitación a 4°C. Se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol al 25%, 50%, 80%, 90%, 95%; de 2 horas cada una en agitación a 4°C. Se cambia por una mezcla 1:1 de etanol 95%: solución infiltrante durante toda la noche en agitación a 4°C. Finalmente se les agrega solamente solución infiltrante y permanecen en agitación a 4°C durante toda la noche. Las muestras fijadas se almacenan a 4°C.

Las larvas fijadas para microscopía electrónica se procesaron posteriormente en la Unidad de Microscopía electrónica del Instituto de Fisiología, UNAM.

4.14 Preparación de moldes para cortes histológicos y observaciones al microscopio óptico La solución de los moldes se prepara al momento de usarla ya que comienza a polimerizarse aproximadamente a los 10 minutos. La solución se prepara con 1.3 ml de solución infiltrante y 86 μ l del catalizador (Leica). Se mezcla por inversión para no producir burbujas y se vierte lentamente en el recipiente del molde. El catalizador es tóxico por lo que deben usarse guantes y tapabocas.

Para obtener cortes histológicos en posición horizontal, las larvas de 5 dpf se embeben con una pipeta Pasteur en la solución anterior y con unas pinzas se acomoda la larva, de manera que la región ventral esté en contacto con el fondo del recipiente del molde. Los moldes se dejan polimerizar toda la noche.

En el microtomo (Leica RM2145) que utiliza navajas de tungsteno desechables (Jung 2003-12 Carbide TC-65), se hicieron cortes histológicos de un grosor de 2 μ m. Con unas pinzas Dumont (No. 5), el corte histológico se acomodó sobre una gota de agua en el portaobjetos. Para que el corte se adhiriera al portaobjetos, se pasó por la flama de un mechero hasta que se secó el agua.

Para teñir las muestras se sumergen los portaobjetos, primeramente en azul de metileno a 65°C por 5 min., y se enjuagan en dH₂O dos veces para quitar el exceso de colorante. Posteriormente se tiñen con fuccina básica a temperatura ambiente por 7 segundos y se enjuagan dos veces en dH₂O.

El azul de metileno se prepara con 0,65 g Azul de Metileno (SIGMA M-9140, 0,1 g Azure II (SIGMA A2507-25G), 50 ml glicerol, 50 ml metanol, 15 ml PBS 10X, c.b.p. 500 ml dH₂O MilliQ. La fuccina básica a una concentración 20X, se prepara con 0,25 g de fuccina básica, (SIGMA-ALDRICH B0904) 12,5 ml etanol reactivo, en un volumen de 25 ml dH₂O MilliQ.

Los cortes histológicos se observan en el microscopio óptico, posterior a realizar la iluminación Keller. Para ello se enfoca primero en el objetivo de 10X, se cierra el diafragma y se ajusta el condensador, subiéndolo o bajándolo, hasta enfocar el hexágono del diafragma. Se enfoca la muestra y se abre el diafragma hasta el límite de la ventana de visión del objetivo. Se hace el mismo ajuste para todos los objetivos (20X, 40X y 60X). Se toman fotografías con la cámara Zeiss, colocada en el microscopio óptico y se almacenan los datos en un programa de computadora. Antes de tomar las fotografías, se ajusta el blanco de la cámara con la luz del microscopio.

4.15 Ensayo optocinético. Las condiciones del ensayo optocinético descritas por Brockerhoff *et al.*, (1995), han sido modificadas de la siguiente manera: el estímulo visual consiste en una un patrón de franjas blancas y negras intercaladas, cada franja tiene un grosor de 18 grados. La banda de franjas gira a 6 rpm. Un aparato que hace girar la banda en una sola dirección se construyó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Dicho aparato se colocó en un microscopio Leica S6E, que estaba conectado a una cámara digital para grabar el ensayo optocinético de cada larva, asimismo se

requirió de una fuente de luz externa, proveniente de una lámpara y guía de fibra óptica (luz fría).

Las muestras de las larvas vivas para el ensayo optocinético, se prepararon de acuerdo al protocolo modificado de Beck *et al.*, (2004). En un portaobjetos se le pegó una estampilla de plástico con un hoyo circular al centro (CoverWell PCI-A-0.5) para crear una depresión, creando un molde (Figura 4). En el centro del molde, se coloca la larva viva de 5 dpf y se extrae el exceso del agua con una pipeta Pasteur. Con una pipeta de transferencia se le agrega agarosa de bajo punto de fusión (Agarose, Type VII-A: Low Gelling Temperature SIGMA A0701) precalentada a 37°C, de tal manera que cubra a la larva y se deja polimerizar sobre un vidrio frío por 5 minutos.

Se corta con un bisturí un rectángulo de agarosa que contiene a la larva viva y se transfiere a una caja de Petri con resina de sylgard polimerizado (Dow corning), cubierta con agua de acuario. El rectángulo de agarosa se fija con tres alfileres, dos a

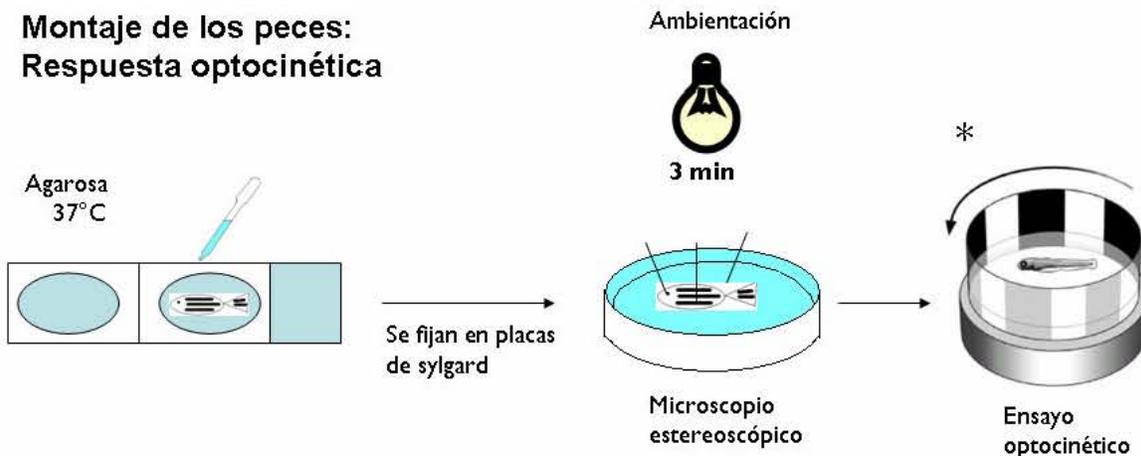


Figura 4. Montaje de los peces: Ensayo optocinético. Las larvas vivas se colocan en un portaobjetos que tiene una depresión a modo de recipiente y se embeben en agarosa de bajo punto de fusión (fundida a 37°C) dejando polimerizar por 5 min. Se corta el molde con la larva y se inserta en una placa de resina de sylgard en una caja de Petri con agua de acuario. Se inserta el molde con micro-alfileres, y se corta la agarosa cuidadosamente para liberar la cabeza y no lastimar a la larva viva. La placa de sylgard se monta en el microscopio estereoscópico dentro del barril con el patrón de las bandas negras y blancas. La larva se ambienta a la luz por 3 minutos para comenzar el ensayo optocinético que dura 2 minutos y se registra por una cámara de video (* Esquema tomado de Neuhauss, 2003).

los lados de la larva y uno sobre la aleta caudal. Se hacen 3 cortes en la agarosa alrededor de la cabeza para liberarla, de modo tal, que el resto de la larva permanezca inmóvil durante el ensayo optocinético.

La respuesta optocinética se caracteriza por un lento movimiento de seguimiento al estímulo visual, seguida de un rápido movimiento sacádico en la dirección opuesta, que coloca los ojos de la larva en la posición inicial. Antes de realizar el ensayo optocinético se dejan ambientar a las larvas a la luz del microscopio durante 3 minutos. La respuesta de cada larva se grabó durante 2 minutos y se cuantificó el número de sácades por minuto.

Las larvas utilizadas provienen de la cepa 2499A y de la cepa silvestre (14-Por). Para obtener larvas sin pigmentación, la cepa 14-Por se trató con PTU (1-phenyl 2-thiourea) con una concentración de 0.2 mM en agua de acuario (Karlsson *et al.*, 2001). El PTU degrada la tirosina (evita la conversión de tirosina a melanina) después de su maduración en el Golgi (Hall y Orlow, 2005). El PTU es efectivo cuando se aplica antes del comienzo de la pigmentación en el estadio "prim 5" a las 24 hpf (horas post-fertilización) (Kimmel *et al.*, 1995).

4.16 Observaciones al microscopio estereoscópico. Para realizar las fotografías de las larvas vivas de 2 a 5 dpf, se decorionan las larvas con dos pinzas Dumont (No. 5). Con una pinza se sostiene el corion, mientras que con la otra se le rompe y enseguida se libera a la larva. La larva se traslada con una pipeta Pasteur en una portaobjeto escavado que contiene una gota de metilcelulosa 3% (Sigma M-0387). Las larvas mayores de 1 dpf se anestesian con 10 μ l tricaina 0.04%(tricaina etil-*m*-aminobenzoato metanosulfonato, SIGMA A-5040) disuelta en la metilcelulosa. Se acomoda a la larva en posición dorsal o lateral con una pinza Dumont y se toma la fotografía con la cámara digital (Sony DSC-F707) en el microscopio estereoscópico Nikon (Nikon SMZ645) o

Zeiss (Zeiss/Stemi SV 11). Finalmente las larvas se sacrifican y se desechan en los residuos biológicos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

4.17 Análisis filogenético. La reconstrucción filogenética se hizo con el programa MacVector (Versión 7.2.2) utilizando el algoritmo “Neighbor joining”¹, y la corrección Poisson², y la topología del árbol se presentó en un filograma. Dicha topología se corroboró con bootstrap³ (1000 repeticiones). Los alineamientos se hicieron con el programa Clustal W.

¹ El algoritmo Neighbor joining, no asume una tasa de evolución constante.

² La corrección Poisson asume que el número de sustituciones que ocurren en cada sitio, se comporta como una distribución Poisson.

³ Bootstrap, es un método estadístico que toma un subconjunto de la muestra y crea un árbol por Neighbor joining, este método se repite al menos 1000 veces, y el resultado es compilado en un estimado que muestra la sustentabilidad de un agrupamiento particular.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Análisis del gen *vps18* de *D. rerio*.

5.1.1 Genotipificación de la cepa 2499A portadora del alelo *vps*^{hi2499A}.

Con la finalidad de identificar peces portadores de la inserción retroviral, que causa la mutación en el gen *vps18*, se llevó a cabo la genotipificación de 55 peces adultos heterocigotos (75% de la población inicial) descendientes de una pareja portadora de la cepa 2499A, la cual es portadora del alelo *hi2499A*. Para ello se anestesiaron los peces, obteniendo DNA genómico a partir de la aleta caudal (Figura 5A). Esta muestra se utilizó como molde para la PCR, la cual se llevó a cabo con tres oligonucleótidos: EM11 y EM57 están en el exón 4 y flanquean la inserción retroviral, mientras que Nu3 se ubica en la inserción retroviral. La combinación de los oligonucleótidos EM11 con EM57, y Nu3 con EM57, amplifican dos productos de PCR de 266pb y 186pb respectivamente (Figura 5B). El producto de 186 pb se observa únicamente en los peces portadores del alelo *hi2499A*. Como control positivo, se amplificó un fragmento de 371pb del gen de *Wnt5*. Del grupo de 55 peces analizados, 66.66 % (39/55) fueron portadores del alelo *hi2499A* (Figura 5C), lo cual coincide con la proporción esperada de una segregación mendeliana del gen *vps18*.

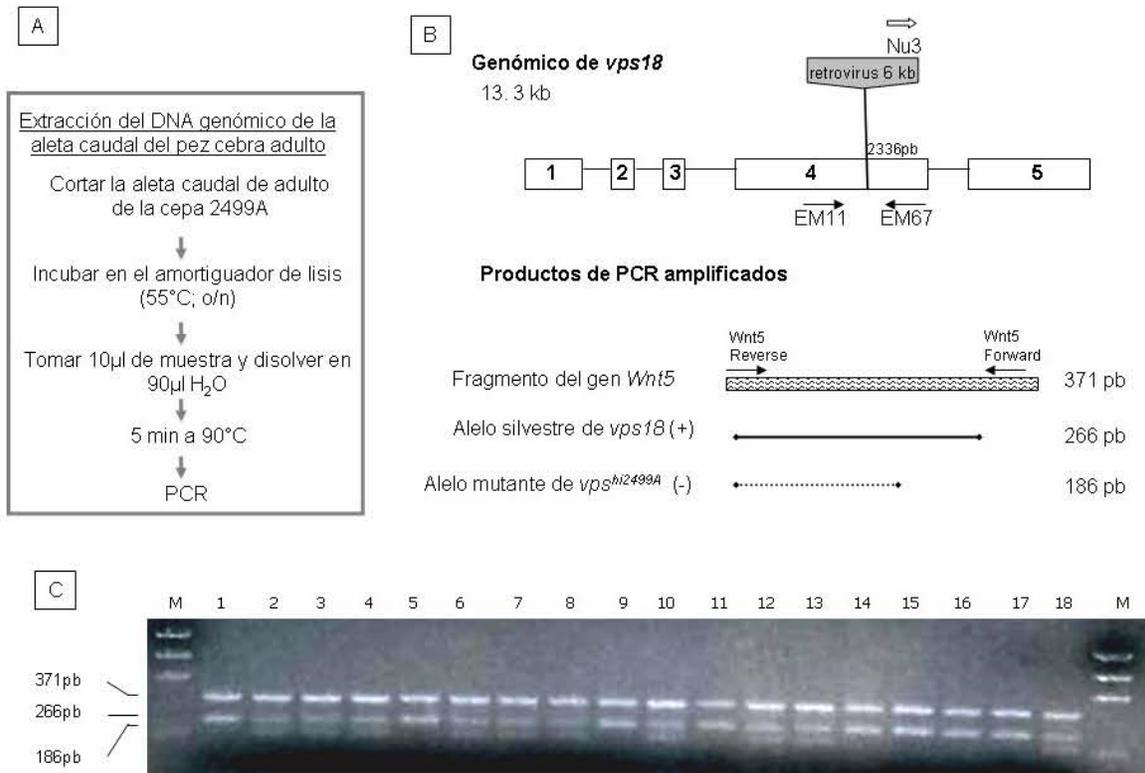


Figura 5. Genotipificación de la cepa 2499A por PCR de la aleta caudal del pez cebra adulto. 5A Protocolo de la extracción del DNA genómico de la aleta caudal del pez adulto. **5B** DNA genómico de *vps18*, con la inserción retroviral en la base #2336 (con respecto a la numeración del cDNA). En la genotipificación por PCR, se utilizan los oligonucleótidos EM11, EM67 y Nu3, usando como control positivo la amplificación del fragmento del gen *Wnt5*, con los oligonucleótidos Wnt5-Reverse y Wnt5-Forward. Los peces portadores se identifican por la amplificación de la banda de 186 pb que corresponden al alelo *hi2499A*. **5C** Gel de agarosa con las muestras del PCR de 18 peces adultos de un total de 55, observándose por la PCR aquellos portadores del alelo mutante *hi2499A*, en los carriles 2-4, 6-8, 10, 12, 13 y 18. En el primer y último carril, está el marcador de peso molecular EZ.

5.1.2 Corrección de la secuencia reportada del cDNA de *vps18* de *D. rerio*.

Al secuenciar varios productos de PCR se obtuvo la secuencia del mRNA (cDNA) de *vps18* (NM_173245) depositada en el NCBI por el grupo de la Dra. Nancy Hopkins (MIT). Con la finalidad de verificar la secuencia reportada, emprendimos la tarea de secuenciar el marco abierto de lectura (ORF por open reading frame) de *vps18* de *D. rerio*. El Dr. Maldonado subclonó el ORF de *vps18* en el plásmido pCR-II, nombrándolo pER405 (Figura 6A). La nueva secuencia de ORF de *vps18* de 3563 pb, se obtuvo al ensamblar los 8 fragmentos resultantes de la secuenciación de pER405.

Utilizando el programa Clustal W, se comparó la secuencia del ORF de *vps18* con la secuencia reportada de la base de datos (NM_173245). Se observaron diferencias en 22 nucleótidos, de los cuales sólo cuatro, cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína Vps18. Las correcciones son: S²⁵⁷RNF → S²⁵⁷FQE, V³¹⁸ → I³¹⁸, S⁷⁴⁵ → P⁷⁴⁵ (Figura 6B) y coinciden con la secuencia obtenida (ENSDAG00000001990) recientemente del proyecto del genoma del pez cebra del Sanger Center (www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/).

El dominio de CHCR de Vps18 de *D. rerio*, comprende 9 hélices alfa donde las prolinas determinan el giro entre cada hélice alfa (Voet y Voet, 2004), es por ello que la corrección de S⁷⁴⁵ → P⁷⁴⁵ es importante porque la P⁷⁴⁵ se encuentra en el cambio de la hélice alfa H a la hélice alfa I del dominio CHCR (Figura 6B y 11B), además de estar conservada en *C. elegans*, *D. melanogaster*, *O. latipes* y *Homo sapiens* (Figura 11A).

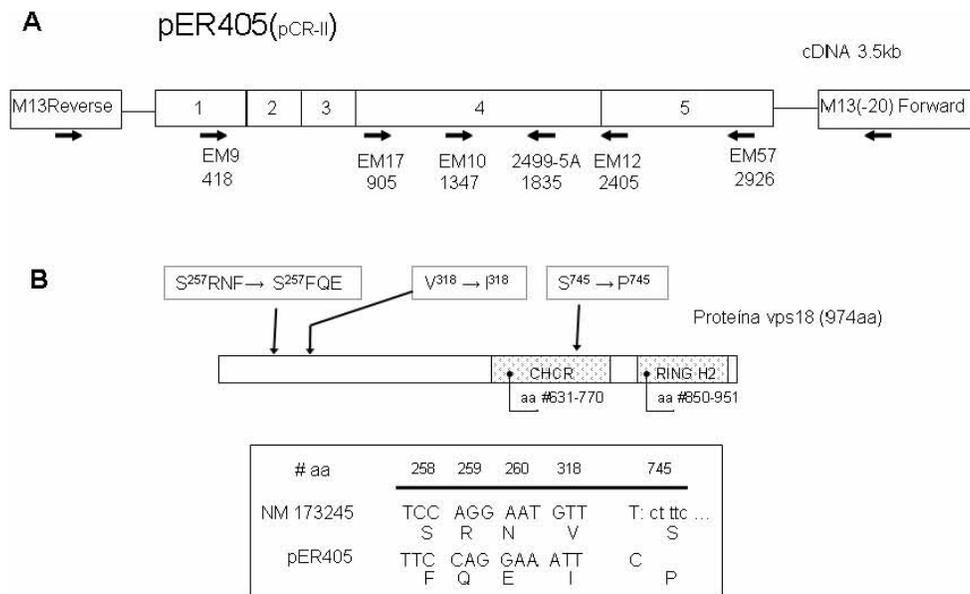


Figura 6: cDNA de *vps18* de *D. rerio*: pER405 (pCR-II). **6A** cDNA de *vps18* (pER405) de *D. rerio*, secuenciado con los siguientes oligonucleótidos: en la dirección 5'→3' están los EM9 (418pb), EM17 (905pb), EM10 (1347pb), y aquellos en la dirección 3'→5' están los: 2499-5A (1835pb), EM12 (2405pb), EM57 (2926pb), además de que se utilizó los oligonucleótidos del pER405, que son: M13 Reverse y M13 (-20) Forward. **6B** Las correcciones de la secuencia corresponden a los cambios de S²⁵⁷RNF → S²⁵⁷FQE, V³¹⁸ → I³¹⁸, S⁷⁴⁵ → P⁷⁴⁵. El recuadro muestra los tripletes de los aminoácidos corregidos.

5.1.3 Obtención de la secuencia genómica de *vps18* de *D. rerio*.

Con la finalidad de encontrar elementos de regulación génica en los intrones (Fedorova y Fedorov, 2003), emprendimos la tarea de secuenciar y clonar los intrones de *vps18*. Para ello se obtuvo el DNA genómico de *vps18* a partir del DNA aislado de la aleta caudal del pez cebra adulto. A partir de esta muestra, se amplificaron los cuatro intrones de *vps18* por PCR. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: para el intrón I, EM39 y EM59; para el intrón II, EM60 y EM69; para el intrón III, EM62 y EM68; y para el intrón IV, 1RT y EM14 (Figura 7A y 7B). Se clonaron los intrones II y III en los plásmidos pFAB2 y pFAB3/5 respectivamente y se secuenciaron. Los intrones I y IV, se secuenciaron a partir de productos de PCR.

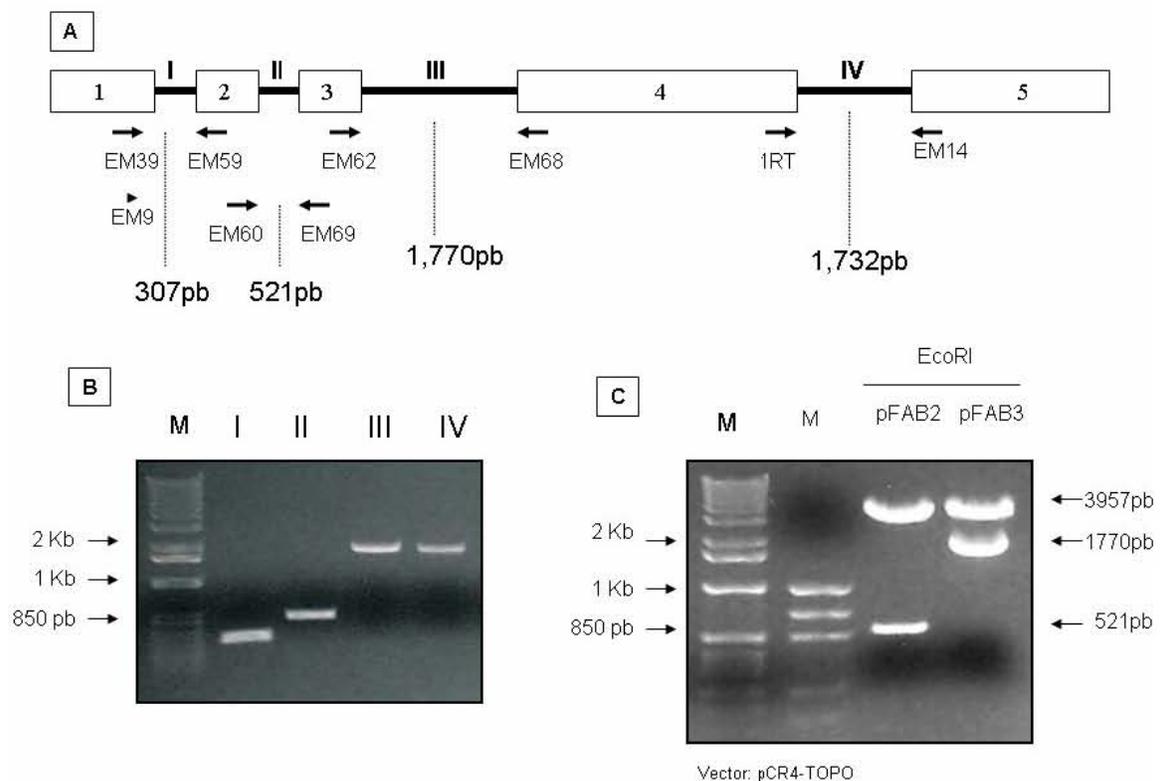


Figura 7: Amplificación por PCR de los intrones de *vps18* de *Danio rerio*. 7A Localización de los oligonucleótidos en el DNA genómico de *vps18* para amplificar los cuatro intrones. La amplificación del intrón I (EM39 y EM59), es de 307 pb; para el intrón II, el producto es de 521 pb (EM60 y EM69); para el intrón III, el producto es de 1,770 pb (EM62 y EM68), y para el intrón IV se tienen el 1RT y el EM14 que origina un producto de 1,732 pb. 7B Productos amplificados por PCR de los 4 intrones. 7C Clonación de los intrones II (pFAB2) y III (pFAB3) de *vps18* de *D. rerio* en el plásmido pCR4-TOPO. Se extrajo el fragmento correspondiente a cada intrón, mediante una reacción de restricción con la enzima *EcoRI*.

La secuencia del intrón I, se amplificó con los oligonucleótidos EM39 y EM59, y se secuenció con los oligonucleótidos EM9 y EM59. El producto de PCR del intrón II se clonó en dirección 3'-5' en el pCR-4TOPO, y se secuenció con los oligonucleótidos: M13Reverse y M13 Forward (-20) (Figura 7C). El intrón III se clonó en dirección 3'-5' en el plásmido pCR-4TOPO y se secuenció con los oligonucleótidos M13Reverse y M13Forward del plásmido, produciendo dos secuencias llamadas pFAB3_M13Reverse y pFAB3_M13Forward(-20), de 749 pb y 679 pb respectivamente.

En este punto, faltaban por secuenciar ≈ 374 pb, ya que el producto amplificado por PCR del intrón III es de ≈ 1773 pb. Para ello se tomó el plásmido pFAB3, se hizo una reacción de restricción con la enzima *Pst*I, y se obtuvieron dos fragmentos de 435 pb y 5230 pb. Se purificó el fragmento de 5230 pb y se religó dando origen a pFAB5 (Figura 8A). Para verificar la identidad del pFAB5, se hizo una reacción de restricción con la enzimas *Apa*I y *Eco*RI, y produce un fragmento de ≈ 1400 pb (Figura 8B). Al secuenciar el plásmido pFAB5 con el oligonucleótido T3, se obtuvo la secuencia faltante del intrón III.

Para el intrón IV, el Dr. Maldonado contaba con una secuencia preliminar con una región difícil de secuenciar. Se emprendió a la tarea de secuenciar con los oligonucleótidos EM4 y EM14. Por último se verificó la secuencia obtenida con la secuencia gi|58293760| de la base de datos Vega (Sanger Center).

Con el fin de generar un consenso de las secuencias de los intrones y así obtener la secuencia genómica de *vps18*, las secuencias de los cuatro intrones se alinearon (Clustal W; MacVector 7.2.2) y se ensamblaron de forma contigua, basándose en los sitios de edición del gen *vps18*, encontrados por el Dr. Maldonado (tabla I en apéndice). Finalmente la secuencia del DNA genómico de *vps18* de *D. rerio* se comparó con la secuencia ENSDAG00000001990 (Ensambl del Sanger Center).

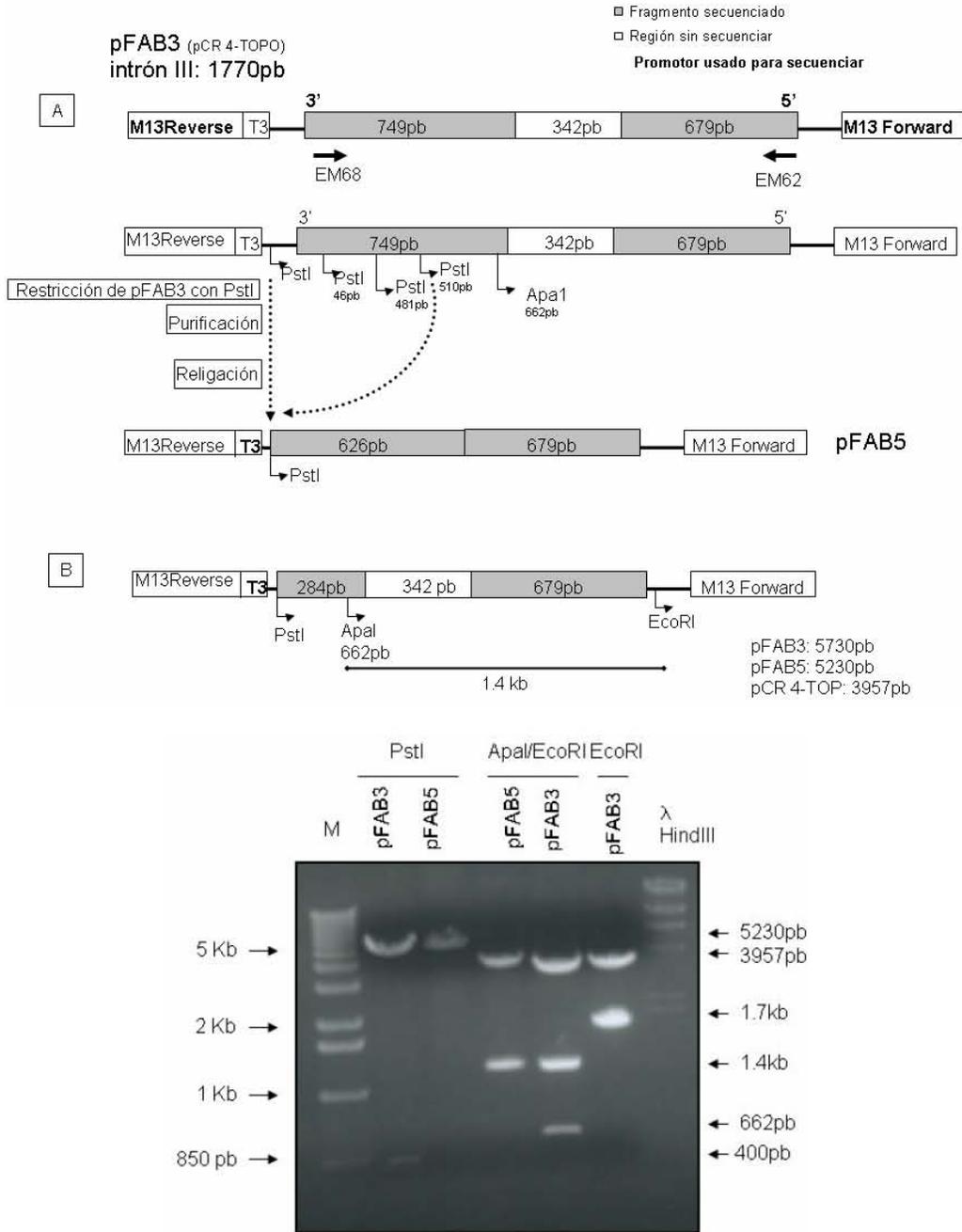


Figura 8. Construcción de pFAB5 a partir de pFAB3. **8A** La secuenciación del intrón III se realizó primeramente en el pFAB3, utilizando los oligonucleótidos M13 Reverse y M13 (-20) Forward del pCR4-TOPO, y generó dos fragmentos secuenciados en los extremos dentro del intrón III, de 749 y 679 pb, respectivamente, faltando ~ 342pb por secuenciar. Nótese que el pFAB3 contiene al intrón III en dirección 3'→5'. Para secuenciar la región faltante del intrón III, al pFAB3 se le hizo una reacción de restricción con la enzima *PstI*, la cual extrajo un fragmento de 400 pb. Se purificó únicamente la banda del plásmido resultante (5230 pb) para religarse y dar origen al pFAB5. **8B** Control de la construcción del pFAB5 a partir del pFAB3. Se muestra el pFAB5, con los sitios de *PstI*, *EcoRI* y *ApaI*. En el gel se muestran en el carril 1, el marcador de peso molecular (1 Kb DNA), en el carril 2 y 3 está la restricción con *PstI* de pFAB3 y pFAB5, en el carril 4 y 5 está la doble restricción con *ApaI/EcoRI* de pFAB5 y pFAB3, en el carril 6 está la restricción de *EcoRI* de pFAB3, y en el carril 7 está el marcador de peso molecular λ HindIII.

5.1.4 Análisis filogenético de Vps18 y análisis de sus dominios.

De la base de datos de SwissProt se obtuvieron las secuencias de las proteínas homólogas de Vps18 de varias especies. Las secuencias se utilizaron junto con la corregida del pez cebra, para realizar una reconstrucción filogenética de Vps18, usando el algoritmo “Neighbor joining” se construyó un filograma, cuya topología se corroboró con el estimado Bootstrap y se eligió a *S. cerevisiae* como grupo externo.

El filograma de Vps18 (Figura 9), muestra que los agrupamientos o clados, se sostiene por el estimado de Bootstrap, lo que sugiere que la proteína Vps18 mantiene una tasa evolutiva de acuerdo a la filogenia de las especies presentadas. La tasa evolutiva o de cambio, se ve reflejada en el porcentaje de identidad entre las proteínas, de esta manera Vps18 de *D. rerio* mantiene un porcentaje de 19 a 32 % con las especies *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *C. briggsae* y *A. thaliana*, mientras que para las especies de vertebrados: *T. rubripes*, *O. latipes*, *X. laevis*, *G. gallus*, *R. norvegicus*, *M. musculus* y *H. sapiens* hay una identidad del 65 al 81 % (Figura 10A).

Por otra parte, se hizo un alineamiento del dominio repetido de la cadena pesada de clatrina (CHCR) y otro del dominio de dedos de zinc-H2 (RING-H2). En Vps18 de *D. rerio*, el CHCR se ubica entre los aminoácidos 631-770 y el RING-H2 entre los aminoácidos 850-951 y se conforman de 140 y 100 residuos de aminoácidos respectivamente. El análisis arrojó el siguiente porcentaje de identidad tomando a *D. rerio* como especie de comparación: para el dominio CHCR en *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *Caenorhabditis. briggsae* y *Arabidopsis thaliana*, hay un porcentaje de identidad de 24 a 45% mientras que en el grupo de *Takifugu rubripes*, *O. latipes*, *Xaenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* y *H. sapiens*,

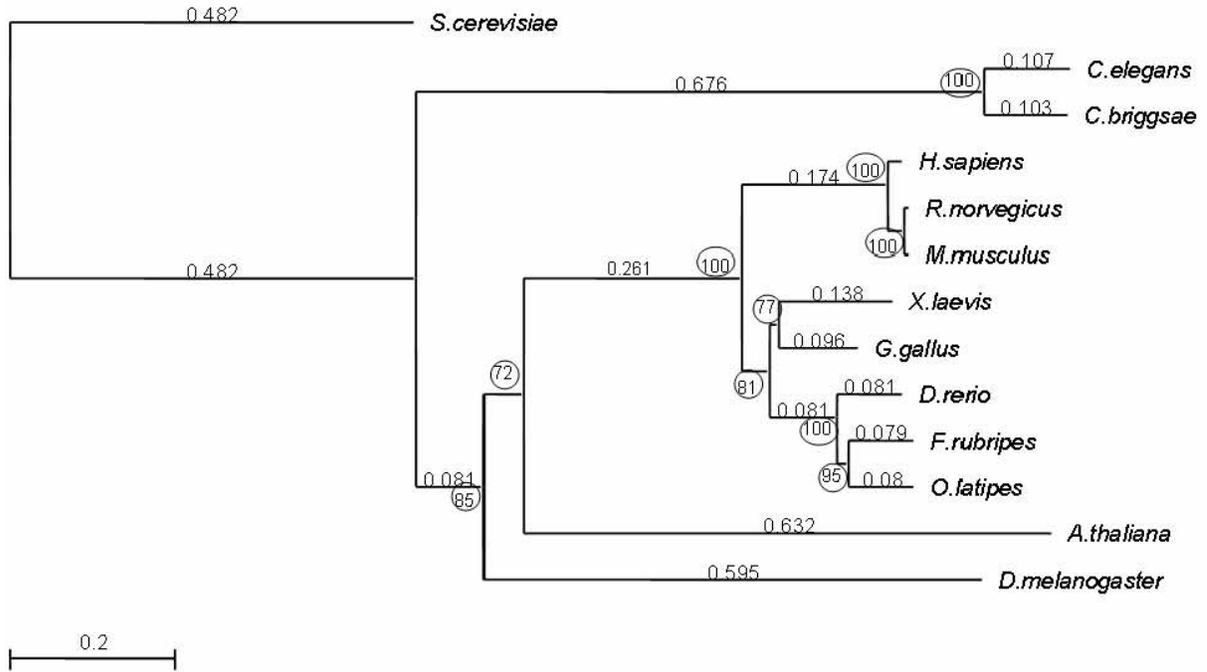


Figura 9. Reconstrucción filogenética de Vps18. Filograma de Vps18 hecho con el logaritmo Neighbor joining (MacVector 7.2.2), con las siguientes especies: *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *C. briggsae*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *F. rubripes*, *O. latipes*, *G. gallus*, *X. laevis*, *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus*. La longitud de las ramas representa el número de cambios y los números encerrados en un círculo, representan la sustentabilidad de la rama (Bootstrap).

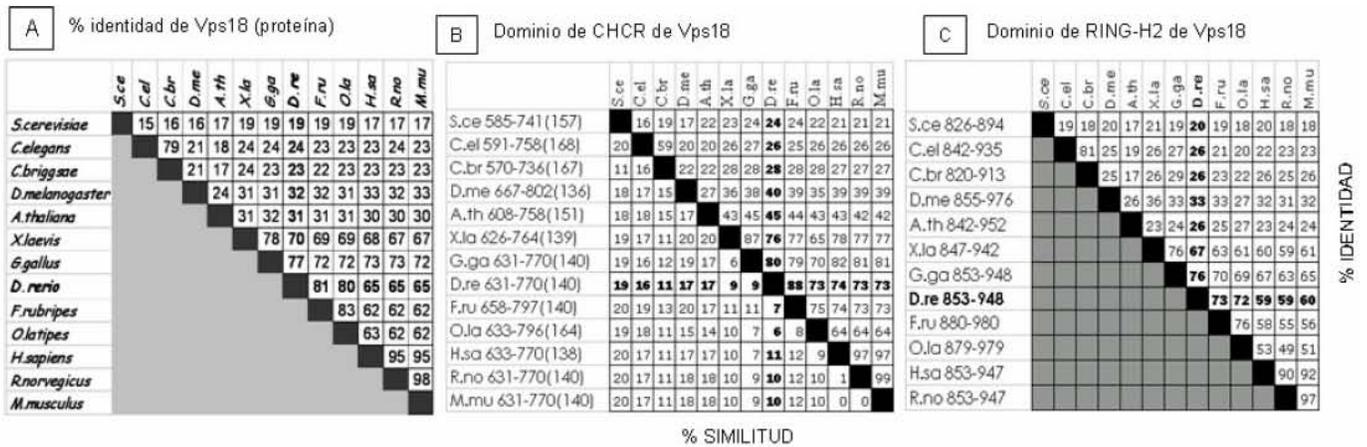


Figura 10. Porcentajes de identidad de la proteína Vps18 y de los dominios CHCR y RING-H2. **10A** Proteína completa de 974 aminoácidos de Vps18 de *D. rerio*. **10B** Porcentaje de similitud y de identidad del dominio CHCR de Vps18. **10C** Porcentaje de identidad del dominio de RING-H2 de Vps18.

mantienen una identidad de 73 a 88%. El porcentaje de identidad del dominio RING-H2, es de 20 a 33% para el grupo de *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *C. briggsae* y *A. thaliana*, y para el grupo de *T. rubripes*, *O. latipes*, *X. laevis*, *G. gallus*, *R. norvegicus*, *M. musculus* y *H. sapiens* es de 59 a 76% (Figura 10B y 10C).

De las 10 hélices alfa antiparalelas (hélice- α A a J) del dominio CHCR, Vps18 de *D. rerio* conserva únicamente 9 hélices alfa (hélice- α B-J) y en *O. latipes* y *C. elegans* la hélice- α H es aún más grande (Figura 11A y 11B). Esto sugiere que el dominio CHCR está sujeto a menos presión de selección, pero la función de Vps18 está conservada a lo largo de la evolución, como lo sugieren los altos porcentajes de identidad de la proteína completa y de sus dominios.

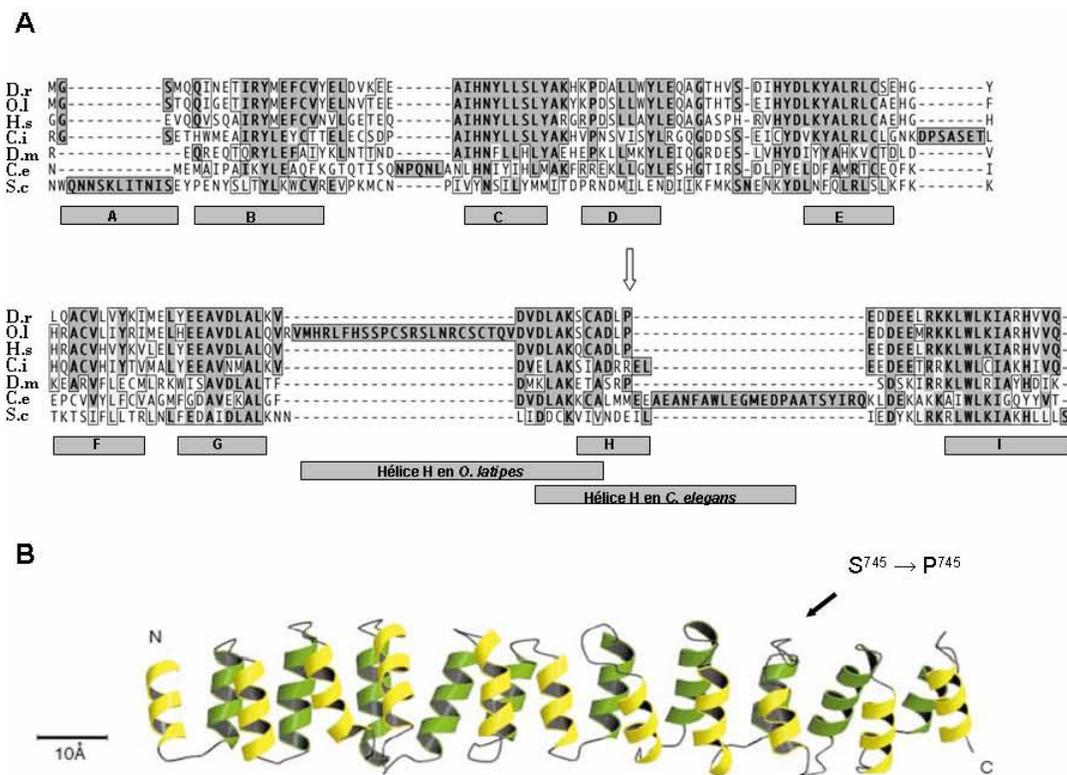


Figura 11. 11A Alineamiento del dominio de la repetición de la cadena pesada de clatrina (CHCR) de Vps18. El dominio CHCR comprende 10 hélices alfa colocadas en tandem (hélices A-J). Nótese que la hélice A solo la presenta *S. cerevisiae*, y la hélice H es más grande en *O. latipes* y *C. elegans*. La flecha blanca marca la prolina corregida a partir de la secuenciación del ORF de *vps18*. **11B** Esquema tridimensional del dominio CHCR, mostrando las hélices alfa antiparalelas (Figura tomada de Ybe *et al.*, 1999). La corrección de S⁷⁴⁵ → P⁷⁴⁵ está en el cambio de la hélice alfa H a I.

5.2 Fenotipo de hipopigmentación de la mutante *vps*^{hi2499A} en

D. rerio.

5.2.1 Fenotipo corporal de la mutante *vps*^{hi2499A}.

La pigmentación del pez cebra es notoria a los 2 dpf, siendo el ojo una de las regiones más pigmentadas, ya que existe una presión de selección a desarrollar la visión y que las larvas sean capaces de alimentarse cuando el vitelo se consuma aproximadamente a los 5 dpf (Figura 12 y 13). En las larvas mutantes de *vanished pigments* (*vps*^{hi2499A}) se observa una hipopigmentación general desde los 2 dpf, volviéndose más severa conforme prosigue el desarrollo de la larva (Figura 12). A los 5 dpf se observa una pequeña disminución en el tamaño del vitelo y en la longitud corporal de la larva (Figura 12D y 12H), que podría deberse a un desarrollo embrionario ligeramente atrasado. Es de notarse que algunas larvas mutantes *vps*^{hi2499A} no desarrollan la vejiga natatoria, que es una característica observada generalmente en muchas mutantes letales embrionarias (Golling *et al.*, 2002).

El fenotipo de la mutante *vps*^{hi2499A} produce una letalidad durante el desarrollo embrionario y larvario, ya que no sobreviven más de 10 a 15 dpf, asimismo la mutante *dor* es letal a los 5 a 6 días en el estadio “instar” tercero cuando son aún pupa (Shestopal *et al.*, 1997). Por otro lado Sadler y colaboradores (2005) observaron que la mutante *vps*^{hi2499A} desarrolla patologías del hígado, como colestasis, hepatomegalia y algunos síntomas del síndrome de artrogriposis renal y colestasis (ARC). El síndrome de ARC presenta defectos en el hígado, en los riñones, en las plaquetas y en la función muscular neurogénica. La malformación canalicular y la escasez biliar es una anomalía compartida entre la mutante *vps*^{hi2499A} del pez cebra y la mutación de gen

Fenotipo de larvas de la cepa 2499A (*vps^{hi2499A}*)

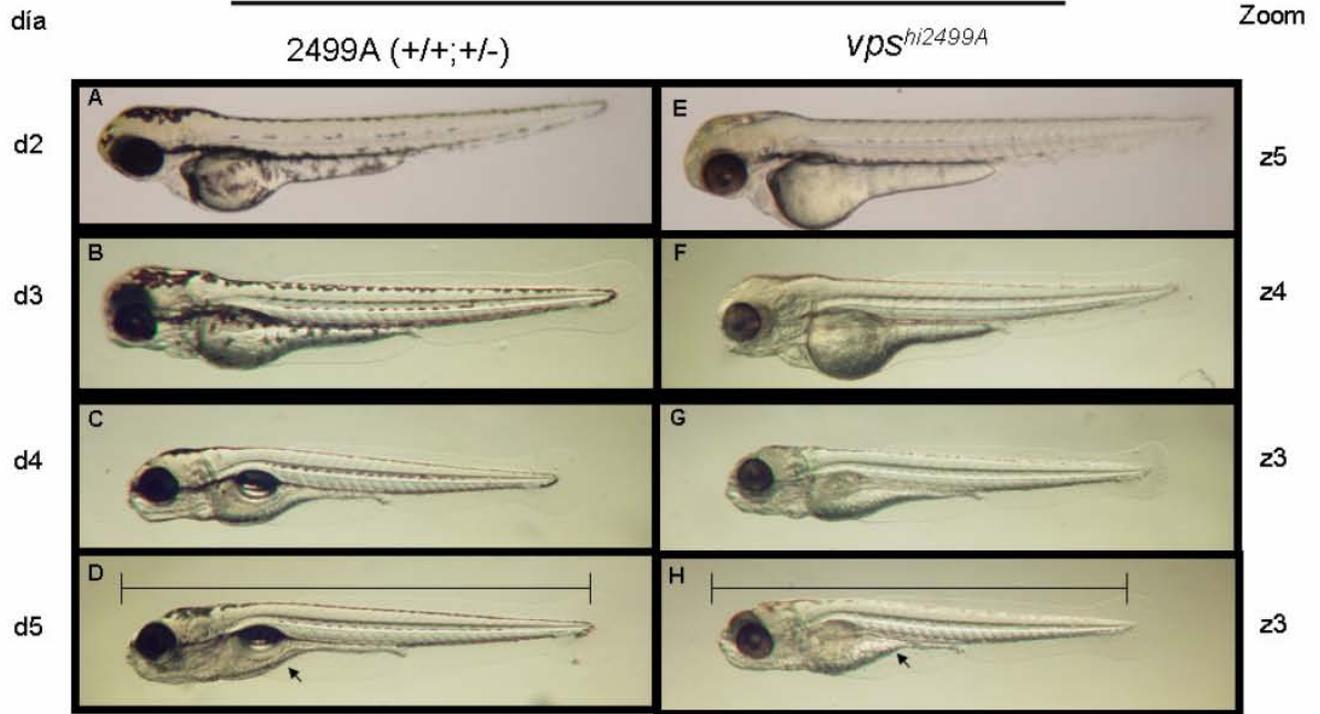


Figura 12: Fenotipo de larvas de la cepa 2499A (*vps^{hi2499A}*) Fotografías de larvas de 2, 3, 4 y 5 dpf, con acercamiento del microscopio de Z5 a Z3. **12A-12D** Silvestres fenotípicamente producto de la cruce de 2499A. **12E-12H** Larvas mutantes *vps^{hi2499A}*. **12D-H** La mutante *vps^{hi2499A}* muestra una disminución de la longitud corporal (barra) y del tamaño del vitelo (flecha).

Patrón de pigmentación de las larvas del pez cebra

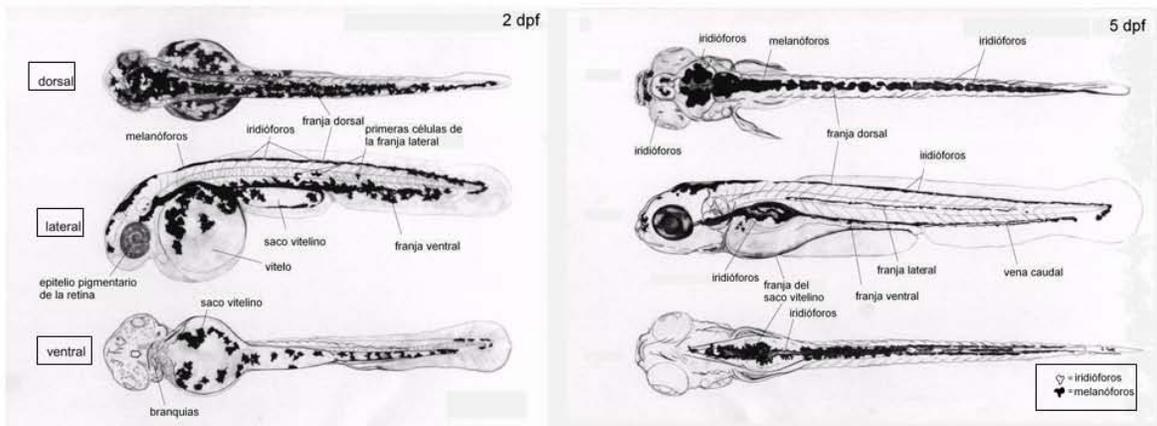


Figura 13: Patrón de pigmentación de larvas del pez cebra. Larvas de 2 y 5 dpf, en vista dorsal, lateral y ventral. Indicando los iridoforos y los melanoforos (Esquema modificado de Haffter *et al.*, 1996).

vps33B en individuos con el síndrome de ARC (Gissen *et al* 2005).

El hígado de mamífero normalmente funciona como órgano hemopoyético durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta participa en la conservación de glucosa en el torrente sanguíneo, el metabolismo de lípidos y almacenamiento de vitaminas A, B y heparina. Secreta sales biliares, fibrinógeno y albúminas plasmáticas hacia la sangre, produce colesterol y elimina los materiales tóxicos (Estrada y Uribe, 2002). Debido a la importancia vital del hígado, es posible que sea una de las causa de letalidad en las larvas mutantes *vps^{hi2499A}*, aunque no se descartan otros órganos afectados que requieran de la función de *Vps18*, como el páncreas, el tubo digestivo y el riñón.

5.2.2 Dos transcritos aberrantes son producidos por la mutante *vps^{hi2499A}*.

El RNA total extraído de larvas del estadio de 5 dpf de la cepa 2499A y NOP (silvestre) (Figura 14A) se utilizó para sintetizar el cDNA. Para corroborar dicha síntesis, se amplificó el gen de actina a partir de las muestras +RT y -RT (Ver sección 4.12) (Figura 14B). A partir del cDNA de 5 dpf, se amplificó el gen *vps18*, proveniente de la cepa NOP y 2499A (silvestres +/+, +/-, y mutantes *vps^{hi2499A}* -/-).

En las larvas silvestres de la cepa 2499A se amplificó un fragmento de 2.41 kb del gen *vps18*, con los oligonucleótidos EM39 y EM6, ubicados en los exones 1 y 5 respectivamente (Figura 15A). Por otro lado en las larvas mutantes *vps^{hi2499A}*, se amplificaron dos productos del RT-PCR de 721 y 584 pb (Figura 15B). Éstos se observan también en los silvestres (+/+, +/-), debido a que las larvas son heterocigotas y tienen el alelo mutante *hi2499A*.

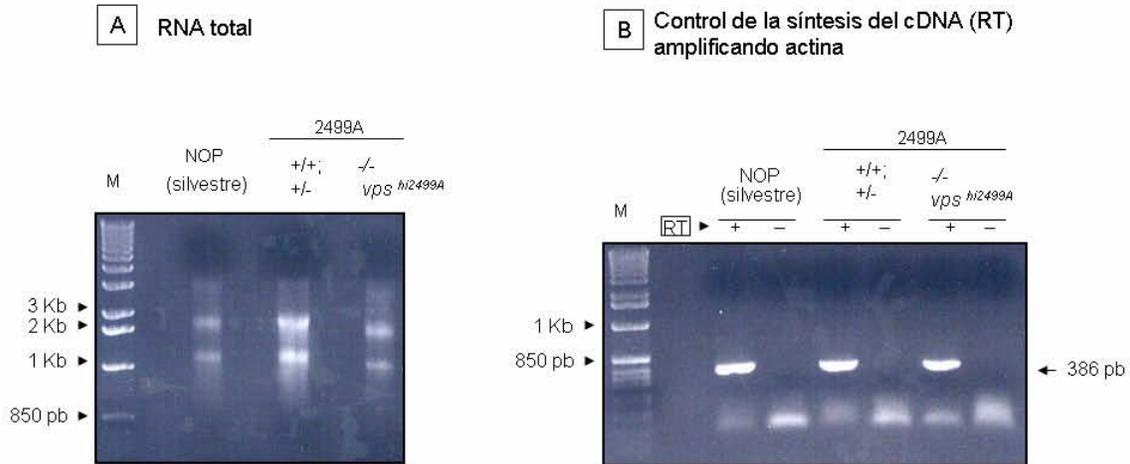


Figura 14. 14A Extracción del RNA total de larvas de 5dpf. En el carril 1 está el marcador de peso molecular, en el carril 2, está la cepa NOP (silvestre), en el carril 3 está los silvestres fenotípicamente de la cepa 2499A (+/+, +/-) y en el carril 4 está los homocigotos (mutantes $vps^{hi2499A}$). **14B. Control de la síntesis del cDNA** (RT: retrotranscriptasa). Amplificando el gen de actina: En el carril 1 es el marcador de peso molecular, con sus correspondientes +RT y -RT está la cepa NOP, los silvestres de la cepa 2499A y los mutantes $vps^{hi2499A}$.

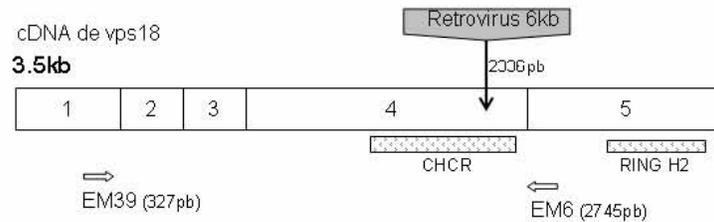
Estos dos transcritos de $vps^{hi2499A}$, fueron purificados y secuenciados por el Maestro en Ciencias Carlos Lozano. La secuencia de 721pb corresponde a un transcrito alternativo teórico de 1.85 kb, donde es remplazado el exón 4 por 173 pb del retrovirus y codifica para una proteína de 111 aminoácidos, debido a que tiene un codón prematuro de terminación en la base 663. La otra secuencia de 584 pb, corresponde a otro transcrito alternativo teórico de 1.68 kb, el cual carece del exón 4 y codifica para una proteína de 124 aminoácidos por un codón de terminación prematuro en la base 702 (Figura 15C). El análisis de las proteínas truncadas se realizó *in silico*, mas no *in vivo*. No es claro el mecanismo de empalme llevado a cabo en el alelo $hi2499A$. (Gaiano et al., 1996, Chen et al., 2002). En algunas mutante, el retrovirus no se comporta de la forma esperada, como en la mutante del gen *vHNF-1*, donde los transcritos carecen de algunos de sus exones (Sun y Hopkins, 2001) como es el caso de la mutante $vps^{hi2499A}$.

La proteína de Vps18 es de 974 aminoácidos y los dominios CHCR y RING-H2 se encuentran en el exón 4 y 5. Por consiguiente las proteínas truncadas de 111 y 124

aminoácidos, carecen de ambos dominios y el alelo **hi2499A es nulo** porque produce los dos transcritos no-funcionales.

Los dos transcritos aberrantes se detectaron con las siguientes condiciones del RT-PCR: 35 ciclos con una extensión de 1:30 min., a 68 °C. No obstante, Sadler *et al.*, (2005) amplificaron el cDNA de *vps18* por RT-PCR, en la mutante *vps^{hi2499A}*, sin detectar transcritos aberrantes, debido posiblemente a que solo amplifican un fragmento del exón 4. Para confirmar la presencia de ambos transcritos aberrantes, es necesario estudios de transferencia tipo Northern.

A *vps^{hi2499A}* : inserción retroviral



B Larvas de 5 dpf de la cepa 2499A

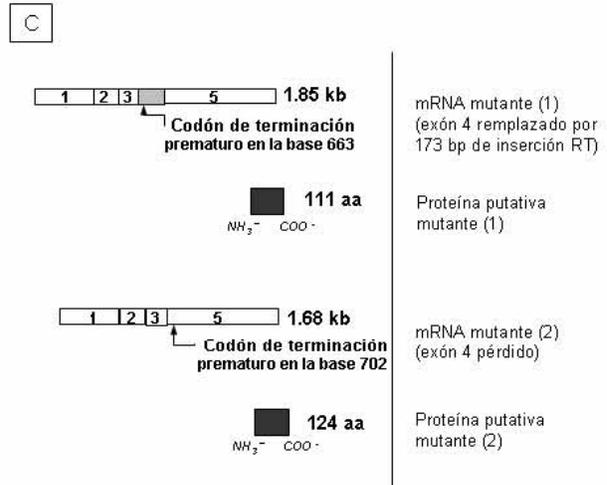
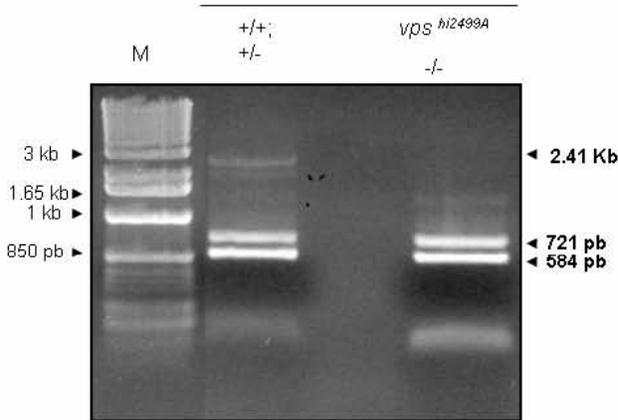


Figura 15. Comportamiento de *vps^{hi2499A}*: inserción retroviral del gen *vps18*. **15A** cDNA de *vps18* marcados los dominio los dominio CHCR y RING-2. Las flechas blancas ubican a los oligonucleótidos EM39 y EM6, que amplifican 2.41kb del gen *vps18*. **15B** En el carril 1 está el marcador de peso molecular, en el carril 2 están los silvestres fenotípicamente de la cepa 2499A generando tres productos de PCR, correspondientes a 2.41kb, 721pb y 583 pb. En el carril 3 está *vps^{hi2499A}*, generando dos productos de 721 y 584 pb. **15C** Transcritos aberrantes del alelo mutante *hi2499A*. Los dos transcritos de 1.68 y 1.85 kb codifican proteínas truncadas de 124 y 111 aminoácidos, respectivamente.

5.2.3 Los defectos del epitelio pigmentario de la retina del pez cebra en mutantes

vps^{hi2499A} .

Con el objetivo de observar histológicamente el epitelio pigmentario de la retina (EPR), en las mutantes de *vps*^{hi2499A}, se hicieron cortes horizontales de larvas silvestres (producto de la cruce de 2499A) y de las mutantes de *vps*^{hi2499A} de 5 dpf. Para las observaciones con microscopía electrónica se hicieron cortes horizontales de las larvas de 3 y 5 dpf.

Entre el tercer y quinto día de desarrollo de las larvas mutantes de *vps*^{hi2499A} se presenta una reducción progresiva en el número de melanosomas redondos y no se observan melanosomas elipsoidales, que generalmente se localizan entre los fotorreceptores (Figura 16A, B, E, F). En cambio predominan compartimientos aberrantes, que asemejan a los cuerpos multivesiculares pigmentados y que no se observaron en las larvas silvestres (Figura 16 C, D, G, H, I, J). Dichos compartimientos redondos aberrantes pueden mostrarse densamente pigmentados, claros o con varios centros levemente pigmentados, pero no se observan estriaciones, característica del estadio II premelanosomal en melanocitos de mamífero (Marks y Seabra, 2001; Raposo y Marks, 2002). Estos compartimientos aberrantes son más abundantes en las larvas mutantes *vps*^{hi2499A} de 5 dpf que de 3 dpf, debido posiblemente a la contribución del mRNA de *vps18* de origen materno.

La carencia de *vps16A* por RNA de interferencia en *D. melanogaster* se observan normalmente los gránulos pigmentarios tipo I en las células pigmentarias, sin embargo los gránulos pigmentarios alargados tipo II, están ausentes (Pulipparacharuvil *et al.*, 2005) Asimismo en *dor*, se observan cuerpos multivesiculares gigantes dentro de las células pigmentarias (Sevrioukov *et al.*, 1999) y en la mutante *fading vision*, que carece

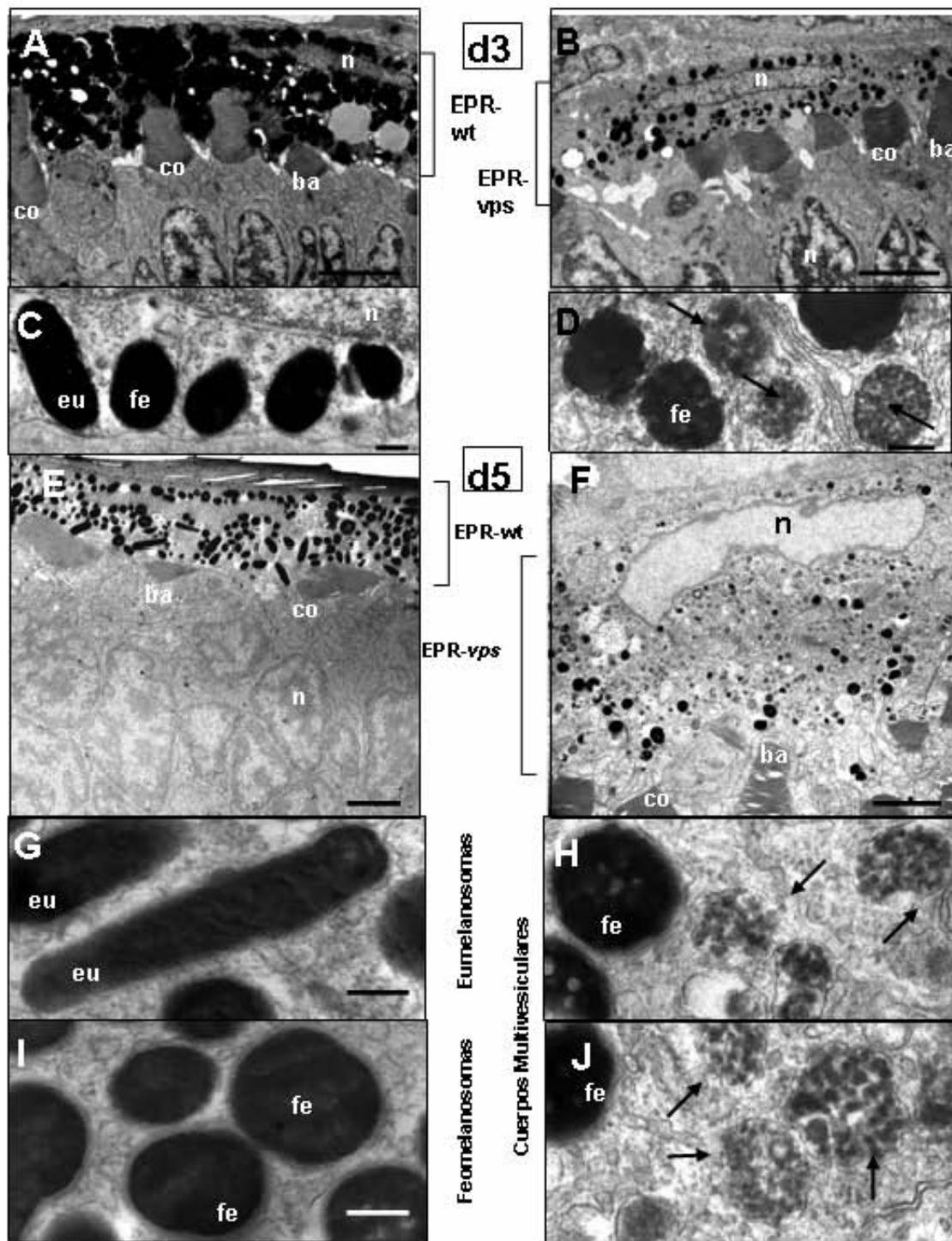


Figura 16. Microscopía electrónica de los ojos de las larvas de 3 y 5 dpf del pez cebra. 16A y 16B Silvestres y mutantes *vps*^{hi2499A} 3 dpf con su correspondiente acercamiento de melanosomas en la **16C** y **16D** respectivamente. **16E** y **16F** Silvestres y mutantes *vps*^{hi2499A} de 5 dpf, donde se observa la expansión del EPR de la mutante *vps*^{hi2499A}. Mientras que en la silvestre se observan eumelanosomas (**16G**) y feomelanosomas (**16I**) en la mutante *vps*^{hi2499A} solo se observan pocos melanosomas maduros, y abundantes melanosomas redondos aberrantes (asemejan el estadio premelanosomal I) marcados con

flechas negras (**16D, H y J**). Conos (Co), bastones (ba), eumelanosomas(eu), feomelanosomas (fe), núcleo (n).

de la función de Pmel17, se producen pocos melanosomas redondos y melanosomas aberrantes (Schonthaler *et al.*, 2005). Es de notarse que la mutante *buff* (*vps33a^{bf}*) en ratón, presenta pocos melanosomas pequeños en el EPR y en la coroides (Suzuki *et al.*, 2003) y aún menos melanosomas se encuentran en forma de cuerpos multivesiculares (Nguyen y Wei, 2004).

Los compartimientos redondos aberrantes observados en la mutante *vps^{hi2499A}* en el EPR, podrían formarse debido a la carencia del transporte entre TGN y el endosoma con cubierta, durante el estadio I premelanosomal, esto sugiere que *vps18* participa en la biogénesis de melanosomas durante el estadio I premelanosomal (Figura 16).

Por otro lado, en las mutantes *vps^{hi2499A}*, se observa el EPR engrosado con una disminución sustancial de la pigmentación (Figura 16A, 16B, 16E, 16F, 17C, 17D) y además presenta unos "huecos" en las capas nucleares externas e internas de la retina neural (Figuras 17E y 17F) con una separación del lente con la capa de células ganglionares (Figuras 17C y 17D).

La expansión del EPR también se observa en *fading vision*, y en el RNAi de *dVps16A* (Schonthaler *et al.*, 2005; Pulipparacharuvil *et al.*, 2005), pero no se observaron anomalías en los fotorreceptores de las mutantes *vps^{hi2499A}* (Figura 16E y 16F) como el fenotipo observado en *dor*, donde los rabdomeros contienen vesículas con "cubierta" o como el fenotipo del RNAi de *vps16A*, en el cual se acumulan autofagosomas (Pulipparacharuvit *et al.*, 2005; Sevrioukov *et al.*, 1999).

Se sabe que el EPR se activa por el estrés oxidativo y que regula la proliferación y diferenciación de la retina durante su desarrollo. Algunas mutantes que presentan una reducción de la pigmentación del EPR, tienen degeneración de la retina neural, a causa de la presencia de cuerpos picnóticos. Estas mutantes son: *piegus* (*pus*), *mzerny* (*miz*)

(Malicki J., *et al.*, 1996), mutaciones de los genes *atp6v1h*, *atp6v1f*, *atp6ap1*, *atp6v0c* y *atp6v0d1*, que codifican las subunidades de la ATPasa vacuolar, (Gross *et al.*, 2005). Lo que sugiere que los “huecos” de células observados en *vps^{hi2499A}*, podrían ser causados por apoptosis iniciada por estrés oxidativo y luminoso o por fallas en el desarrollo embrionario de la retina; aunque en la mutante *fading vision*, no presenta apoptosis significativa (Schonthaler *et al.*, 2005). Por lo tanto es necesario un estudio con la técnica de TUNEL para detectar apoptosis en la mutante *vps^{hi2499A}*.

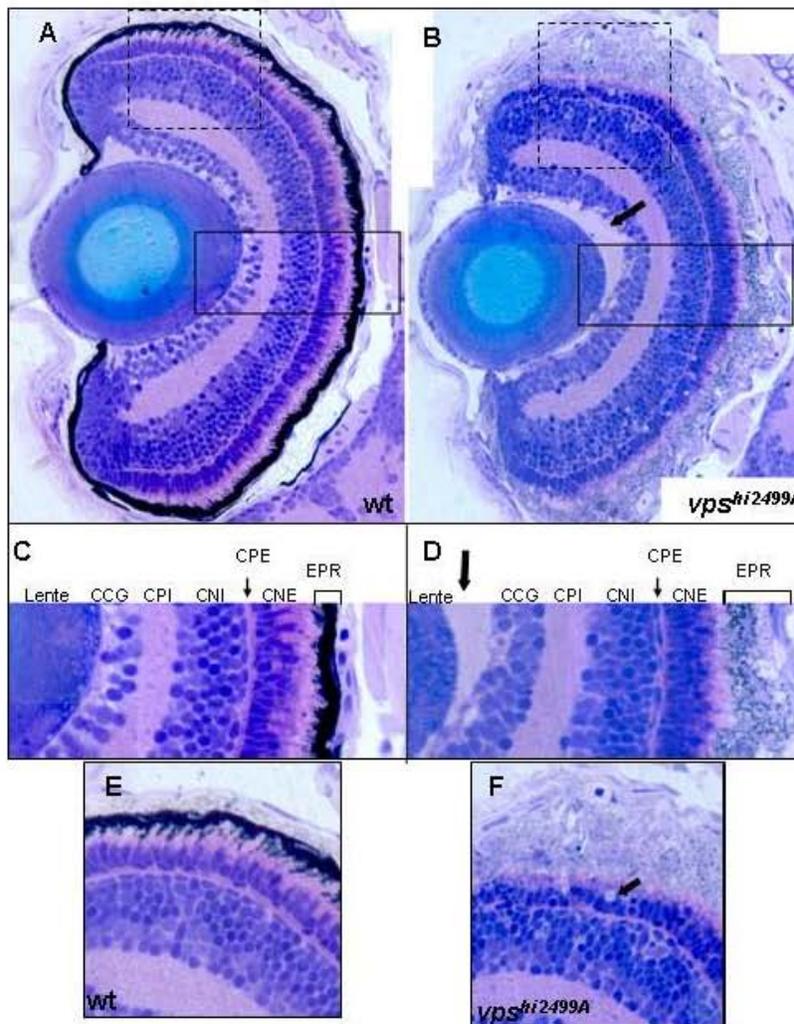


Figura 17. Cortes histológicos de los ojos del pez cebra de 5 dpf. 17A y 17B Cortes horizontales de los ojos silvestres y mutantes de *vps^{hi2499A}* respectivamente. **17C y 17D.** Acercamiento de la región en rectángulo con línea continua en la 17A y 17B. Las capas de la retina en el silvestre y la mutante *vps^{hi2499A}*: epitelio pigmentario de la retina (EPR), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG). La mutante *vps^{hi2499A}* tiene el EPR engrosado y un despegamiento de la CCG con el lente (flecha grande) **17E y 17F** Acercamiento del área indicada con un rectángulo en líneas punteadas en 17A y 17B. La capa nuclear externa de las mutantes de *vps^{hi2499A}*, se observan “huecos” (flecha).

Todo esto podría sugerir que la degeneración de la retina neural observada en *vps*^{hi2499A} se deba a efectos indirectos de la carencia de función de Vps18, y más bien se deban a la disfunción del EPR.

Paralelamente el Dr. Maldonado y Sadler *et al.*, (2005, datos no pub.) encontraron que el RNA mensajero (RNAm) de *vps18* es de origen materno. Sadler *et al.*, (2005) encontró que el morfante (“morphant”) de *vps18*, (originado por microinyección del morfolino⁴ de *vps18*, en embriones del estadio de una célula), produce defectos en la pigmentación y en algunos causa defectos globales en etapas tempranas del desarrollo. Dosis bajas del morfolino, no causan problemas en el desarrollo o en la pigmentación, pero si se presentan hepatomegalia.

Para conocer la contribución del RNAm materno de *vps18*, se requieren más estudios sobre la pigmentación en el EPR del morfante. Sin embargo se desconoce la duración de la vida media de la proteína codificada a partir de RNAm materno de *vps18*, para ello es necesario producir un anticuerpo contra Vps18, que reconozca los dominios y hacer inmunohistoquímica a partir del estadio de transición de blástula (2hpf), cuando inicia la transcripción cigótica en pez cebra (Pelegri, 2003).

5.2.4 La mutante *vps*^{hi2499A} presenta agudeza visual disminuida.

Los pacientes con el síndrome de Hermansky-Pudlak, además de desarrollar albinismo oculocutáneo, desarrollan ceguera (Huizing *et al.*, 2000; Huizing *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Para analizar la agudeza visual de las larvas mutantes de *vps*^{hi2499A}, se

⁴El morfolino es un oligonucleótido antisentido que está modificado con un grupo morfolino, que le confiere resistencia a la degradación por nucleasas. Cuando se hibrida con la región de 5' no traducida del RNAm o con el primer codón, se inhibe la traducción (Corey y Abrams, 2001).

sometieron a un ensayo de respuesta optocinética y se cuantificó el número de sácades por minuto. Las larvas silvestres registraron un promedio de 13 sácades por minuto. Las larvas mutantes *vps*^{hi2499A} registraron un promedio de 2 sácades por minuto, representando una reducción del 85% de la capacidad visual (Figura 18). Como control, se llevó a cabo el ensayo optocinético a larvas silvestres sin pigmento, (tratadas con PTU, *1-fenil 2-tiourea*) registrando un promedio de 5.5 sácades por minuto.

Las larvas silvestres sin pigmentación presentan una disminución de su capacidad visual, sin embargo no alcanzan el bajo nivel de respuesta de las mutantes *vps*^{hi2499A}. Al parecer existe un “umbral” de pigmentación en el EPR, ya que la mutante *brass* de pez cebra, además de presentar una baja presión intraocular, muestra poca pigmentación y se comporta como los peces silvestres, durante el ensayo optocinético (Link *et al.*, 2004).

Estudios en *D. melanogaster*, de *vps18* y *Hook*, demuestran la participación de éstos, en la plasticidad sináptica, a través de la endocitosis de neuroreceptores y regulación de los inhibidores del engrosamiento de las terminales sinápticas (Narayanan *et al.*, 2000). De esta manera, la baja respuesta de los mutantes *vps*^{hi2499A} ante el ensayo optocinético, podría deberse no sólo a la carencia de pigmento en el EPR, sino también a problemas del sistema motor-visual, como la degeneración del EPR y defectos en la transmisión sináptica de las células ganglionares hacia el tectum óptico (Gahtan y Baier, 2004). El tectum óptico y las neuronas MeLc y MeLr, se requieren para la captura de la presa (Gahtan y Baier, 2005).

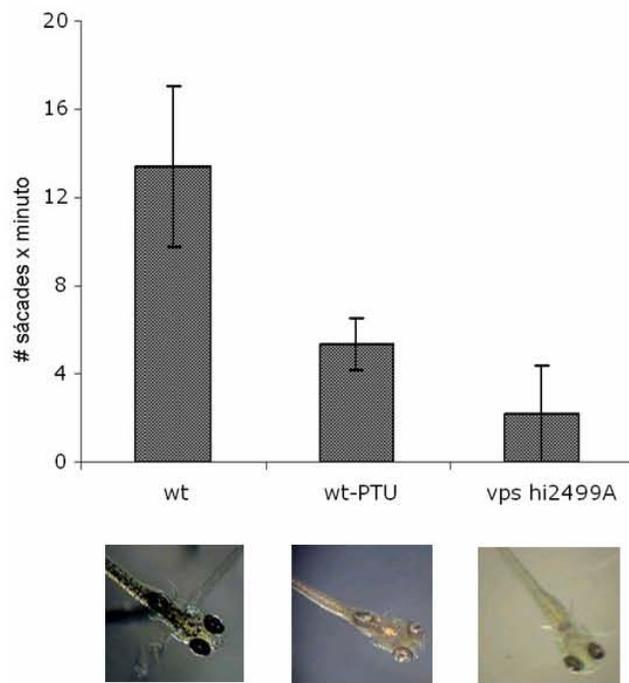


Figura 18. Respuesta optocinética de las larvas de 5 dpf del pez cebra. La respuesta optocinética mide el número de sácades por minuto. Se evaluaron larvas silvestre (*wt*), silvestres sin pigmentación tratadas con PTU (*wt-PTU*) y mutantes *vps*^{hi2499A}. Se utilizaron 30 larvas de cada una de las cepas.

6. CONCLUSIONES

1. Se genotipificó la cepa 2499A de *D. rerio* portadora del alelo *hi2499A*, que representa el gen *vps18* interrumpido por un retrovirus. El gen *vps18* resultó segregarse de manera mendeliana.

2. Se secuenciaron los cuatro intrones del gen *vps18*.

3. Con la secuenciación del cDNA de *vps18* de *D. rerio*, se corrigió la secuencia reportada del gen *vps18* (NM_173245). Los aminoácidos corregidos son los siguientes: S²⁵⁷RNF → S²⁵⁷FQE, V³¹⁸ → I³¹⁸, S⁷⁴⁵ → P⁷⁴⁵. La corrección de la P⁷⁴⁵ era importante, puesto que se encontraba en el cambio de la hélice-α H a la hélice-α I del dominio CHCR.

4. El análisis filogenético indica que el porcentaje de identidad es alto entre la proteína completa Vps18 y los dominios CHCR y RING-H2. Existe un 65% de identidad con humanos y un 19% con levadura, lo que sugiere una función conservada a lo largo de la evolución. En el análisis del dominio de CHCR, al parecer la presión de selección ejercida sobre este dominio podría ser más laxa, puesto que Vps18 del pez cebra conserva sólo 9 de las 10 hélices del dominio de CHCR y además la hélice-α H en *C. elegans* y *O. latipes*, se observa aún más larga.

5. El alelo *hi2499A* (gen *vps18* interrumpido por el retrovirus) es nulo debido a que produce dos transcritos aberrantes, que codifican para dos proteínas truncadas

carentes de los dominios CHCR y RING-H2, que son esenciales para la función de Vps18.

6. Las larvas mutantes *vps*^{hi2499A} presentan un fenotipo de hipopigmentación progresiva corporal y en los ojos a los 5 dpf. Las células del epitelio pigmentario de la retina, reducen drásticamente el número de melanosomas maduros y acumulan compartimientos redondos aberrantes, que asemejan el estadio premelanosomal I. Paralelamente no se observan melanosomas elipsoidales. Lo anterior sugiere que *vps18* está involucrado en la biogénesis de melanosomas.

7. Las mutantes *vps*^{hi2499A} presentan una reducción de la capacidad visual en un 85%, debido a la reducida pigmentación en el EPR y posiblemente a problemas del sistema nervioso.

8. El fenotipo de *vps*^{hi2499A} presenta degeneración de la retina neural, hipopigmentación de los melanóforos y células del epitelio pigmentario de la retina, disminución de la capacidad visual y anomalías en el hígado. Todo esto sugiere que el Vps18 está involucrado en la biogénesis de melanosomas, como se ha descrito para otros componentes del complejo HOPS. Es por ello que enfermedades que presenten síntomas aunados a una disfunción de las rutas del tráfico vesicular, como lo son el síndrome de Hermansky-Pudlak, el síndrome de Chediak-Higashi y el síndrome de Griscelli, podrían ser estudiados como modelo utilizando la mutante *vps*^{hi2499A} del pez cebra.

7. PERSPECTIVAS

Aunque se sugiere que Vps18 está involucrado en la biogénesis del estadio premalanosomal I, se requiere precisar las rutas bloqueadas y si existe una incorrecta localización de los melanosomas en la mutante *vanished pigments*,

El fenotipo de *vps^{hi2499A}*, no solamente presenta algunos síntomas del síndrome de Hermansky-Pudlak, sino también, algunos del síndrome de artrogriposis renal y colestasis, por lo que se podría estudiar el fenotipo en otros órganos u organelos, como por ejemplo en las plaquetas.

El alelo mutante *hi2499A*, produce dos transcritos aberrantes, que es necesario verificar por la técnica de transferencia tipo Northern, además de hacer más estudios sobre la contribución materna de *vps18*, a través, no únicamente del uso del morfolino, sino también producir un anticuerpo contra Vps18, para bloquear su función.

APENDICE

TABLA I. Relación de los exones e intrones del gen *vps18* del pez cebra.

Exón / Intrón	Posición del nucleótido	Longitud (pb)	Sitio de edición
Exón 1	1 – 420	420	TCATTCAG gtg caaac
Intrón 1	421 – 510	90	ttccac ag GGTTTGTA
Exón 2	511 – 652	142	CTGCTGAG gt aaaact
Intrón 2	653 – 1024	372	tgttc ag AATTGATC
Exón 3	1025 – 1116	92	ATCCTACAG gt aatcac
Intrón 3	1117 – 2775	1659	ttttac ag GGTCACAT
Exón 4	2776 – 4646	1871	CTCTAAAA gt atgttc
Intrón 4	4647 – 6276	1630	cccttc ag GTGGATGT
Exón 5	6277 – 7296	1020	
Total		7296	

BIBLIOGRAFIA

- Amsterdam A (2003). Insertional mutagenesis in zebrafish. *Dev Dyn.* 228:523-534.
- Amsterdam A., Nissen, R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S. y Hopkins N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:12792-12797.
- Azarian S.M., McLeod I., Lillo C., Gibbs D., Yates J.R., Williams D.S. (2005). Proteomic analysis of mature melanosomes from the retinal pigmented epithelium. *J. Proteome Res.* 5:521-529.
- Banta L.M., Vida T.A., Herman P.K., Emr S.D. (1990). Characterization of yeast Vps33p, a protein required for vacuolar protein sorting and vacuole biogenesis. *Mol Cell Biol.* 10:4638-4649.
- Beck J.C., Gilland, E., Tank D.W. y Baker R. (2004). Quantifying the ontogeny of optokinetic and vestibuloocular behaviors in zebrafish, medaka, and goldfish. *J Neurophysiol*, 92:3546-3561.
- Bonifacino J.S. (2004). Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky-Pudlak syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 1038:103-114.
- Bonifacino J.S. y Glick B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-166.
- Brockerhoff S.E., Hurley J.B., Janssen-Bienhold U., Neuhauss S.C., Driever W. y Dowling J.E. (1995). A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:10545-10549.
- Caplan S., L.M. Hartnell R.C. Aguilar N., Naslavsky y Bonifacino J.S. (2001). Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo. *J Cell Biol* 154:109-122.
- Chen, W., Burgess, S., Golling, G., Amsterdam, A. y Hopkins, N. (2002). Highthroughput selection of retrovirus producer cell lines leads to markedly improved efficiency of germ line-transmissible insertions in zebra fish. *J Virol.* 76:2192-2198.
- Chintala S., Li, W., Lamoreus M.L., Ito S., Wakamatsu K. (2005). *Slc7* gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:10964-10969.
- Collins K.M., Thorngren N.L., Fratti R.A., Wickner W.T. (2005). Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion. *EMBO J.* 24:1775-1786.
- Corey D.R. y Abrams J.M. (2001). Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol.* 2:1015.1-1015.3.
- Cowles C.R., Emr S.D., y Horazdovsky B.F. (1994). Mutations in the *VPS45* gene, a SEC1homologue, result in vacuolar protein sorting defects and accumulation of membrane vesicles. *J Cell Sci.* 107:3449-3459.
- Dell'Angelica E.C. (2003). Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends Cell Biol.* 13:503-506.
- Dell'Angelica E.C., Mullins C., Caplan S., Bonifacino J.S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14:1265-12678.
- Estrada F. E., y Uribe A. M; (2002). Atlas de histología de vertebrados. Editorial: Las prensas de Ciencias. Pp. 222.
- Fedorova L. y Fedorov A. (2003). Introns in gene evolution. *Genetica.* 118:123-131.
- Gaiano N, Allende M, Amsterdam A, Kawakami K, Hopkins N. (1996). Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23:7777-7782.
- Gahtan E. y Baier H. (2004). Of lasers, mutants, and see-through brains: functional neuroanatomy in zebrafish. *J Neurobio.* 59:147-161.
- Gahtan E, Tanger P, y Baier H. (2005). Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J Neurosci.* 25:9294-9303.
- Gissen, P., Johnson C.A., Gentle D., Hurst L.D., Doherty A.J., O'Kane C.J., Kelly D.A. y Maher E.R. (2005). Comparative evolutionary analysis of VPS33 homologues: genetic and functional insights. *Hum Mol Genet* 14:1261-1270.

- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S. Y., Nissen, R. M. y Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 31:135-140.
- Gross J.M., Perkins B.D., Amsterdam A., Egana A., Darland T., Matsui J.I., Sciascia S., Hopkins N., Dowling J.E. (2005). Identification of zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function. *Genetics*.170:245-261.
- Grunwald D.J., y Eisen J.S. (2002). Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*. 3:717-724.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins M.C., Hammerschmidt M., Kane D.A., Odenthal J., van Eeden F.J., Jiang Y.J., Heisenberg C.P., Kelsh R.N., Furutani-Seiki M., Vogelsang E., Beuchle D., Schach U. Fabian C., Nusslein-Volhard C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 123:1-36.
- Hall A.M. y Orlow S.J. (2005). Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation. *Pigment Cell Res*. 18:122-129.
- Hermann G.J., Schroeder L.K., Hieb C.A., Kershner A.M., Rabbitts B.M., Fonarev P., Grant B.D., Priess J.R. (2005). Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 16:3273-3288.
- Hirose, E. y Matsumoto, J. (1994). Differentiation of pigmented tissues in the eyes of medaka (*Oryzias latipes*) embryos: An electron microscopy study. *The Fish Biol J Medaka*, 6:25-34.
- Horazdovsky B.F., y Emr S.D. (1993). The *VPS16* gene product associates with a sedimentable protein complex and is essential for vacuolar protein sorting in yeast. *J Biol Chem*. 268:4953-4962.
- Horazdovsky (1996). A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J. Biol. Chem*. 271:33607-33615.
- Huizing M, Anikster Y, Gahl W.A. (2000). Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic*. 1:823-835.
- Huizing M, Boissy R.E, Gahl W.A. (2002). Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man. *Pigment Cell Res*. 15:405-419.
- Huizing M, Sarangarajan R., Strovel E., Zhao Y., Gahl W.A. y Boissy R.E. (2001). AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol. Biol. Cell* 12:2075-2085.
- Inazu M, y Mishima Y. (1993). Detection of eumelanogenic and pheomelanogenic melanosomes in the same normal human melanocyte. *J Invest Dermatol*. 100(2 Suppl):172S-175S
- Karlsson, J., Von Hofsten, J. y Olsson, P.E. (2001). Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol (NY)*. 3:522-527.
- Kim B. Y., Kramer H., Yamamoto A., Kominami E., Kohsaka S. y Akazawa C. (2001). Molecular characterization of mammalian homologues of class C Vps proteins that interact with syntaxin-7. *J Biol Chem*, 276:29393-29402.
- Kim I.T. y Choi J.B. (1998). Melanosomes of retinal pigment epithelium distribution, shape, and acid phosphatase activity. *Korean J Ophthalmol*, 12:85-91.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. y Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203:253-310.
- LaGrassa, T.J. y Ungermann, C. (2005). The vacuolar kinase Yck3 maintains organelle fragmentation by regulating the HOPS tethering complex. *J Cell Biol*, 168:401-414.
- Li W, Rusiniak M.E, Chintala S, Gautam R, Novak E.K, Swank R.T. (2004). Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays*. 26:616-628.
- Link B.A., Gray M.P., Smith R.S. y John S.W. (2004). Intraocular pressure in zebrafish: comparison of inbred strains and identification of a reduced melanin mutant with raised IOP. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4415-4422.
- Lister J.A. (2002). Development of Pigment Cells in the Zebrafish Embryo. *Microscopy Res. & Tech*. 58:435-441.

- Liu Y., Hong L., Wakamatsu K., Ito S., Adhyaru B.B., Cheng C., Bowers C.R. y Simon J.D. (2005). Comparisons of the structural and chemical properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium, iris and choroids of newborn and mature bovine eyes. *Photochem. & Photobiol.* 81, 510-516.
- Malicki J, Neuhauss S.C, Schier A.F, Solnica-Krezel L, Stemple D.L, Stainier D.Y, Abdelilah S, Zwartkuis F, Rangini Z, Driever W. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish retina. *Development.*123:263-273.
- Marks M.S, y Seabra M.C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:738-748.
- Marmorstein A.D, Finnemann S.C, Bonilha V.L, Rodriguez-Boulan E. (1998). Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 857:1-12.
- Ward M.D., Radisky D., Scullion M.A., Tuttle M.S., Vaughn M. y Kaplan (2001). *hVPS41* is expressed in multiple isoforms and can associate with vesicles through a RING-H2 finger motif. *Exp Cell Res.* 267:126-134.
- Narayanan, R., Kramer, H. y Ramaswami, M. (2000). *Drosophila* endosomal proteins hook and deep orange regulate synapse size but not synaptic vesicle recycling. *J Neurobiol,* 45:105-124.
- Neuhauss S.C. (2003). Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish. *J Neurobiol.* 54:148-160.
- Nguyen T, Novak E.K, Kermani M, Fluhr J, Peters L.L, Swank R.T, Wei M.L. (2002). Melanosome morphologies in murine models of Hermansky-Pudlak syndrome reflect blocks in organelle development. *J Invest Dermatol.* 119:1156-1164.
- Nguyen T, Wei M.L. (2004). Characterization of melanosomes in murine Hermansky-Pudlak syndrome: mechanisms of hypopigmentation. *J Invest Dermatol.* 122:452-460.
- Pelegri F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* 228:535-554.
- Peterson, M.R., y Emr, S.D. (2001). The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic* 2:476-486.
- Poupon V., Stewart A., Gray S.R., Piper R.C. y Luzio J.P. (2003). The role of mVps18p in clustering, fusion, and intracellular localization of late endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 14:4015-4027.
- Preston R.A, Manolson M.F, Becherer K, Weidenhammer E, Kirkpatrick D, Wright R, Jones E.W. (1991). Isolation and characterization of PEP3, a gene required for vacuolar biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 11:5801-5812.
- Pulipparacharuvil S, Akbar M.A, Ray S, Sevrioukov E.A, Haberman A.S, Rohrer J, Kramer H. (2005). *Drosophila Vps16A* is required for trafficking to lysosomes and biogenesis of pigment granules. *J Cell Sci.* 118:3663-3673.
- Raposo G., Fevrier B., Stoorvogel W. y Marks M.S. (2002). Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct Funct.* 27:443-456.
- Raposo G, y Marks M.S. (2002). The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic.* 3:237-248.
- Richardson S.C., Winistorfer S.C., Poupon V., Luzio J.P. y Piper R.C. (2004). Mammalian late vacuole protein sorting orthologues participate in early endosomal fusion and interact with the cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 15:1197-1210.
- Richmond B, Huizing M, Knapp J, Koshoffer A, Zhao Y, Gahl W.A, Boissy R.E. (2005). Melanocytes derived from patients with Hermansky-Pudlak Syndrome types 1, 2, and 3 have distinct defects in cargo trafficking. *J Invest Dermatol.* 124, 420-427.
- Rieder S.E. y Emr S.D. (1997). A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol Biol Cell.* 8:2307-2327.
- Rink J. Ghigo E., Kalaidzidis Y, y Zerial M. (2005). Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes *Cell.* 122:735-749.
- Robinson J.S, Klionsky D.J, Banta L.M, Emr S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol.* 8:4936-4948.
- Rothman J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 372:55-63.

- Sambrook. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Vol 1, 3a edición, editorial CSHL. Nueva York.
- Sadler K.C., Amsterdam A., Soroka C., Boyer J. y Hopkins N. (2005). A genetic screen in zebrafish identifies the mutants *vps18*, *nf2* and *foie gras* as models of liver disease. *Development* 132:3561-3572.
- Sato T.K., Rehling P., Peterson M.R. y Emr S.D. (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol Cell*, 6:661-671.
- Schraermeyer U, y Heimann K. (1999). Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res.* 12:219-236.
- Schraermeyer U, Peters S, Thumann G, Kociok N, Heimann K. (1999). Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp Eye Res.* 68:237-245.
- Schonthaler H.B., Lampert J.M., Von Lintig J., Schwarz H., Geisler R. y Neuhauss S.C. (2005). A mutation in the *silver* gene leads to defects in melanosome biogenesis and alterations in the visual system in the zebrafish mutant *fading vision*. *Dev Biol.* 284:421-436.
- Sevrioukov E.A., He J.P., Moghrabi N., Sunio A. y Kramer H. (1999). A role for the *deep orange* and *carnation* eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol Cell.* 4:479-486.
- Seals D.F., Eitzen G, Margolis N, Wickner W.T, Price A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9402-9407.
- Shestopal S.A., Makunin I.V., Belyaeva E.S., Ashburner M. y Zhimulev I.F. (1997). Molecular characterization of the *deep orange (dor)* gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 253:642-648.
- Spritz R.A. (1999). Multi-organellar disorders of pigmentation: intracellular traffic jams in mammals, flies and yeast. *Trends Genet.* 15:337-340.
- Srivastava A, Woolford C.A, Jones E.W. (2000). Pep3p/Pep5p complex: a putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 156:105-122.
- Starcevic M, Nazarian R, Dell'Angelica E.C. (2002). The molecular machinery for the biogenesis of lysosome-related organelles: lessons from Hermansky-Pudlak syndrome. *Semin Cell Dev Biol.* 13:271-278.
- Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths G.M. (2004). Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science.* 305:55-59.
- Subramanian S., Woolford C.A. y Jones. (2004). The Sec1/Munc18 protein, Vps33p, functions at the endosome and the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 15:2593-2605.
- Sun, Z. y Hopkins, N. (2001). *vhnf1*, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* 15:3217-3229.
- Suzuki T., Oiso N., Gautam R., Novak E.K., Panthier J.J., Suprabha P. G., Vida T., Swank R.T. y Spritz R.A. (2003). The mouse organellar biogenesis mutant *buff* results from a mutation in *Vps33a*, a homologue of yeast *vps33* and *Drosophila carnation*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1146-1150.
- Theos A.C., Tenza D., Martina J.A., Hurbain I., Peden A.A., Sviderskaya E.V., Stewart A., Robinson M.S., Bennett D.C., Cutler D.F., Bonifacino J.S., Marks M.S. y Raposo G. (2005a). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol. Biol. Cell* 16:5356-5372.
- Theos A.C., Truschel S.T., Raposo G. y Marks M.S. (2005b). The *Silver* locus product Pmel17/pg100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res.* 18:322-336.
- Ungermann C, Langosch D. (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci.* 118:3819-3828.
- Voet D. y Voet J.G. (2004). *Biochemistry*. 3a edición. Ed. John Wiley & Sons. Pag 1591.
- Wada Y, Ohsumi Y, Anraku Y. (1992). Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of two classes of *vam* mutants. *J Biol Chem.* 267:18665-18670.

- Ward D.M., Radisky D., Scullion M.A., Tuttle M.S., Vaughn M, y Kaplan J. (2001). *hVPS41* Is Expressed in Multiple Isoforms and Can Associate with Vesicles through a RING-H2 Finger Motif. *Experimental Cell Res.* 267:126–134
- Whyte J.R. y Munro S. (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci.* 115:2627-2637.
- Woolford C.A, Dixon C.K, Manolson M.F, Wright R, Jones E.W. (1990). Isolation and characterization of *PEP5*, a gene essential for vacuolar biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125:739-752.
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* 300:1749-14951.
- Wurmser A.E., Sato T.K. y Emr S.D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* 15:551-562.
- Ybe J.A., Brodsky F.M., Hofmann K., Lin K., Liu S.H., Chen L., Earnest T.N., Fletterick R.J. y Hwang P.K. (1999). Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature.* 399:371-375.
- Yogosawa S., Hatakeyama S., Nakayama K.I., Miyoshi H., Kohsaka S. y Akazawa C. (2005). Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by *hVPS18*, a RING-H2 type ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280:41619-41627.