

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INTERACCIONES MOLECULARES DE ANTENNAPEDIA CON FACTORES  
GENERALES DE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN BASAL Y  
HOMEOPROTEÍNAS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL**

**Por**

**M.C. DIANA LINDA CÁRDENAS CHÁVEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**Noviembre 2012**

**INTERACCIONES MOLECULARES DE ANTENNAPEDIA CON FACTORES  
GENERALES DE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN BASAL Y  
HOMEOPROTEÍNAS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
**Director de Tesis**

---

**Dr. Mario Morales Vallarta**  
**Secretario**

---

**Dr. Jorge Verduzco Martínez**  
**Vocal**

---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
**Vocal**

---

**Dr. Arturo Chávez Reyes**  
**Vocal**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
ABSTRACT.....	14
RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. IMPORTANCIA.....	20
5. ANTECEDENTES.....	21
5.1 Genes homeóticos.....	21
5.2 Antennapedia.....	25
5.2.1 Tetrapéptido YPWM.....	28
5.2.2 Región polyQ.....	32
5.2.3 Genes blanco.....	34
5.2.4 Regulación génica.....	35

5.2.5	Interacciones moleculares.....	36
5.3	Transcripción.....	38
5.3.1	Regulación de la transcripción.....	39
5.3.2	Factores transcripcionales generales.....	40
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
6.1	Construcción de plásmidos recombinantes para determinar la interacción de Antp y YPWM con factores transcripcionales.....	43
6.1.1	Construcción de plásmidos para ensayos de transactivación.....	43
6.1.1.1	Plásmidos pPAC-factores transcripcionales.....	43
6.1.1.1.1	pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$ y pPACBIP2 <sub>2-89</sub> .....	43
6.1.1.1.2	pPACTFIIB, pPACTFIIE $\beta$ y pPACAbdB.....	44
6.1.1.1.3	pPACExd <sub>144-376</sub> .....	45
6.1.2	Construcción de plásmidos para ensayos BiFC.....	46
6.1.2.1	Plásmidos pCS2VNm9-factores transcripcionales.....	46
6.1.2.1.1	pCS2VNm9BIP2 <sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$ .....	47
6.1.2.1.2	pCS2VNm9Exd <sub>144-376</sub> y pCS2VNm9TBP.....	47
6.1.2.2.3	pCS2VNm9TFIIB y pCS2VNm9TFIIE $\beta$ .....	48
6.1.2.2	Plásmidos pCS2VC155-Antp y mutantes.....	48
6.2	Construcción de plásmidos recombinantes para analizar la interacción de YPWM fusionado a GAL4 con factores transcripcionales.....	49
6.2.1	Plásmidos pCS2VC155-GAL4 y mutantes.....	49
6.3	Construcción de los genes sintéticos de Antp para su análisis de Interacción con BIP2 y Exd.....	51
6.3.1	Plásmidos pNPAC-genes sintéticos de Antp.....	51
6.4	Construcción de plásmidos recombinantes para determinar la interacción de la región polyQ de Antp con TBP.....	52

6.4.1	pNPACAntp $\Delta$ Q1-2 y pNPACAntp $\Delta$ Q2.....	52
6.4.2	pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2.....	52
6.5	Construcción de plásmidos recombinantes para ensayos de interacción del HD de Antp con TFIIE $\beta$ .....	53
6.5.1	pPACAntp $\Delta$ H1-2 y pPACAntp $\Delta$ H1.....	53
6.5.2	pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1 .....	54
6.6	Construcción de plásmidos recombinantes para el análisis de interacción de los HDs de Antp y AbdB.....	55
6.6.1	pNPACAntpG19 .....	55
6.6.2	pPACAAbdG19 .....	55
6.7	Análisis de Interacción mediante Ensayos de Transactivación en células Schneider.....	56
6.7.1	Purificación de plásmidos recombinantes y reporteros.....	56
6.7.2	Transfección de células Schneider.....	56
6.7.3	Preparación de extractos celulares totales .....	58
6.7.4	Cuantificación de la expresión de genes reporteros.....	59
6.8	Análisis de Interacción mediante Ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC).....	59
6.8.1	Preparación de cubreobjetos con poly-L-lisina .....	59
6.8.2	Obtención de plásmidos recombinantes y controles.....	60
6.8.3	Transfección de células HEK293.....	60
6.8.4	Visualización de los complejos fluorescentes.....	62

## 7. RESULTADOS

7.1	Análisis de la interacción molecular de Antennapedia y el tetrapéptido YPWM con factores transcripcionales en ensayos de transactivación y BiFC.....	63
-----	--	----

7.1.1	Efecto de los factores transcripcionales en la actividad transcripcional de Antp.....	63
7.1.1.1	Los factores transcripcionales TBP, TFIIE $\beta$ y AbdB modifican la actividad transcripcional de Antp en ausencia de YPWM....	65
7.1.1.2	El efecto de BIP2 <sub>2-89</sub> y Exd <sub>144-376</sub> en la actividad transcripcional de Antp es dependiente de YPWM.....	65
7.1.2	Interacciones proteína-proteína de Antp con los factores transcripcionales generales y homeoproteínas.....	67
7.1.2.1	La homeoproteína Antp interacciona específicamente con TBP, Exd <sub>144-376</sub> , TFIIE $\beta$ , BIP2 <sub>2-89</sub> y AbdB.....	68
7.1.2.2	La interacción con los factores transcripcionales Exd <sub>144-376</sub> y BIP2 <sub>2-89</sub> es dependiente de YPWM.....	68
7.1.2.3	La interacción con el factor transcripcional TBP no requiere del HD o tetrapéptido YPWM de Antp.....	69
7.1.2.4	La interacción con los factores transcripcionales TFIIE $\beta$ y AbdB es mediada por el HD de Antp.....	69
7.2	Análisis de la interacción molecular del tetrapéptido YPWM de Antp fusionado a GAL4 con factores transcripcionales mediante activación de la transcripción y BiFC.....	72
7.2.1	El tetrapéptido YPWM modifica la actividad transcripcional de GAL4 en presencia de factores transcripcionales.....	72
7.2.2	Interacción proteína-proteína del tetrapéptido YPWM con los factores transcripcionales Exd <sub>144-376</sub> y BIP2 <sub>2-89</sub> .....	73
7.3	Análisis de la interacción del tetrapéptido YPWM en los péptidos sintéticos de Antp con los factores transcripcionales BIP2 y Exd.....	77
7.3.1	Efecto de BIP2 <sub>2-89</sub> y Exd <sub>144-376</sub> en la transactivación de los péptidos sintéticos de Antp.....	79

7.4	Análisis de la interacción molecular de la región polyQ de Antp con el factor transcripcional TBP en ensayos de transactivación y BiFC.....	83
7.4.1	La región polyQ regula la actividad transcripcional de Antp en presencia de TBP.....	83
7.4.2	Interacción proteína-proteína de la región polyQ con TBP.....	85
7.5	Análisis de la interacción molecular del HD de Antp con TFIIE $\beta$ en ensayos de transactivación y BiFC.....	85
7.5.1	Actividad transcripcional de mutantes en las hélices I y II del HD en presencia de TFIIE $\beta$ .....	85
7.5.2	Interacción proteína-proteína de la hélice II del HD con TFIIE $\beta$ ...	88
7.6	Análisis de la interacción molecular de los HDs de Antp y AbdB.....	88
7.6.1	Efecto de la mutación E19G en la actividad transcripcional de Antp y AbdB.....	88
8.	DISCUSIÓN.....	92
9.	CONCLUSIONES.....	105
	APÉNDICE I: Preparación de soluciones.....	108
	APÉNDICE II: Caracterización enzimática de plásmidos recombinantes.....	110
	APÉNDICE III: Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and liker size in transcriptional activation and repression.....	121

## LITERATURA CITADA

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I.	Lista de genes blanco regulados por genes HOX en mamíferos.....	25
II.	Proteínas que contienen múltiples homopéptidos polyQ en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	34
III.	Programa de PCR para la amplificación de TFIIB, TFIIE $\beta$ y AbdB.....	45
IV.	Programa de PCR para la amplificación de factores transcripcionales y homeoproteínas.....	46
V.	Programa de PCR para la amplificación de Antp y mutantes.....	49
VI.	Programa de PCR para la amplificación de GAL4 y mutantes.....	50
VII.	Programa de PCR para la amplificación de los péptidos sintéticos de Antp.....	51
VIII.	Programa de PCR para la amplificación de mutantes polyQ.....	53
IX.	Transfección de Antp y mutantes con factores transcripcionales.....	57
X.	Transfección de GAL4 y mutantes con factores transcripcionales.....	57
XI.	Transfección de péptidos sintéticos de Antp con BIP2 <sub>2-89</sub> y Exd <sub>144-376</sub> .....	58
XII.	Transfección de Antp, AbdB y mutantes G19 con Exd.....	58
XIII.	Reacción colorimétrica para $\beta$ -galactosidasa.....	59
XIV.	Transfección de VC155-Antp y mutantes con factores Transcripcionales.....	61
XV.	Transfección de VC155-GAL4 y mutantes con factores Transcripcionales.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Mutaciones homeóticas Ultrabithorax y Antennapedia en <i>D. melanogaster</i> .....	21
2.	Los genes homeóticos regulan la identidad de los segmentos en el eje anterior-posterior de <i>Drosophila</i> .....	22
3.	Evolución de los genes Hox.....	23
4.	Los genes Hox regulan diversos procesos celulares en la etapa adulta.....	24
5.	Organización estructural del gen <i>Antennapedia</i> .....	26
6.	Interacción del homeodominio de Antennapedia con el DNA.....	27
7.	Análisis comparativo de Antennapedia entre diferentes especies de insectos.....	29
8.	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de diferentes homeoproteínas.....	30
9.	Interacción de las homeoproteínas Ultrabithorax y Extradenticle.....	31
10.	Estructura de las proteínas con homeodominio TALE.....	37
11.	Formación del complejo de Pre-iniciación en la transcripción.....	41
12.	Transactivación de Antp en presencia de homeoproteínas y factores transcripcionales generales.....	64
13.	Activación de la transcripción por Antp <sup>AAA</sup> y homeoproteínas ó factores transcripcionales generales.....	66
14.	Representación esquemática del ensayo de interacción molecular mediante BiFC.....	67

15.	Interacción de Antp con Exd <sub>144-376</sub> y TBP dependiente e independiente de YPWM mediante BiFC.....	70
16.	Interacción de Antp con BIP <sub>2-89</sub> , TFIIE $\beta$ y AbdB dependiente e independiente de YPWM mediante BiFC.....	71
17.	Determinación de la transactivación de GAL4 en presencia de factores transcripcionales generales y homeoproteínas.....	74
18.	Efecto de YPWM en la activación de la transcripción de GAL4 en presencia de factores transcripcionales generales y homeoproteínas.....	75
19.	Activación de la transcripción por GAL4 <sup>AAAA</sup> y homeoproteínas ó factores transcripcionales generales.....	76
20.	Interacción proteína-proteína de YPWM con Exd <sub>144-376</sub> mediante BiFC.....	78
21.	Interacción proteína-proteína de YPWM con BIP <sub>2-89</sub> mediante BiFC.....	79
22.	Determinación de la actividad transcripcional de los péptidos sintéticos de Antp.....	81
23.	Activación de la transcripción de los péptidos sintéticos de Antp en presencia de BIP <sub>2-89</sub> y Exd <sub>144-376</sub> .....	82
24.	Actividad transcripcional de las mutantes AntpHD, Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 en presencia de TBP.....	84
25.	Interacción de TBP con la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ de Antp mediante BiFC.....	86
26.	Efecto de TFIIE $\beta$ en la activación de la transcripción de AntpHD y mutante Antp $\Delta$ H1.....	87
27.	Interacción de TFIIE $\beta$ con la hélice II del homeodominio de Antp mediante BiFC.....	89
28.	Efecto de la mutación G19 en la actividad transcripcional de Antp, AbdB y Exd.....	91
29.	Modelo hipotético de las interacciones funcionales de YPWM, polyQ y HD	

	en la regulación transcripcional de Antp.....	107
30.	Construcción de los plásmidos recombinantes pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$ y pPACBIP2 <sub>2-89</sub> .....	110
31.	Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pPACTFIIB, pPACTFIIE $\beta$ , pPACExd <sub>144-376</sub> y pPACAbdB.....	111
32.	Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2-VC155 y pCS2-VNm9.....	112
33.	Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9BIP2 <sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$ .....	113
34.	Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9Exd <sub>144-376</sub> , pCS2VNm9TBP, pCS2VNm9TFIIB y pCS2VNm9TFIIE $\beta$ .....	114
35.	Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp, pCS2VC155Antp <sup>AAAA</sup> y pCS2VC155Antp $\Delta$ HD.....	115
36.	Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155GAL4, pCS2VC155GAL4 <sup>YPWM</sup> y pCS2VC155GAL4 <sup>AAAA</sup> .....	116
37.	Construcción de los plásmidos recombinantes pNPACSynthYPWM <sup>LL</sup> , pNPACSynthYPWM <sup>SL</sup> , pNPACSynthAAAA <sup>LL</sup> , pNPACSynthAAAA <sup>SL</sup> , pNPACSynthWRPW <sup>LL</sup> y pNPACSynthWRPW <sup>SL</sup> .....	117
38.	Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pNPACAntp $\Delta$ Q1-2, pNPACAntp $\Delta$ Q2, pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2.....	118
39.	Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pPACAntp $\Delta$ H1-2, pPACAntp $\Delta$ H1, pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1.....	119
40.	Caracterización de los plásmidos pNPACAntpG19 y pPACAbdBG19 mediante secuenciación y digestión con enzimas de restricción.....	120

## NOMENCLATURA

AAAA	Alanina-Alanina-Alanina-Alanina
AbdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
Antp	Antennapedia
$\beta$ gal	$\beta$ -galactosidasa
BiFC	Fluorescencia por Complementación Bimolecular
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
CPRG	Cloraphenol-Red-B-Galactopyra
<i>dan</i>	Distal antenna
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E19	Glutámico 19
EMSA	Ensayos de Retardación en Gel
Exd	Extradenticle
FBS	Suero Fetal Bovino
Fkh	Forkhead
Ftz	Fushi-tarazu
Glu19	Glutámico 19
Gly	Glicina
<i>grn</i>	Grain
GTFs	Factores transcripcionales generales
HD	Homeodominio
hr	Hora
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LL	Espaciador Largo
LS	Espaciador Corto
$\mu$ g	Microgramo

$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ s	Microsegundo
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetros
pb	pares de bases
pBS	pBluescript
PIC	Complejo de Pre-iniciación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RLU	Unidades Relativas de Luz
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNA <sub>pol-II</sub>	RNA polimerasa II
rpm	Revoluciones por minuto
<i>Salm</i>	Spalt mayor
Scr	Sex-Combs reduced
TAFs	Factores asociados a TBP
TBP	Proteína de unión a caja TATA
<i>Tsh</i>	Teashirt
Ubx	Ultrabithorax
VC155	Fragmento C-terminal de Venus
VNm9	Fragmento N-terminal de Venus
WRPW	Triptofano-Arginina-Prolina-Triptofano
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina

## ABSTRACT

Homeoproteins have similar structures and almost identical DNA-binding sequences. Therefore, molecular mechanism that allows its wide Hox-functional diversity remains as a fundamental question in Developmental Biology today. Amino acid sequence comparisons of different homeoproteins revealed that YPWM motif and polyQ regions in addition to homeodomain (HD) are crucial domains for the functional activity of these proteins. The aim of this thesis is determine whether the general transcription factors and other homeoproteins as AbdB and Exd present molecular protein-protein interaction with the functional domains of Antennapedia (Antp) for the activation and/or repression of transcription during development of *D. melanogaster*. The general strategy was to analyze the molecular interactions between the Antp-functional domains with TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP22-89, TFIIB transcription factors and AbdB or Exd<sub>144-376</sub> homeoproteins by transactivation assays in Schneider cells and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).

Our results demonstrated the Antp homeoprotein specifically interacts with TBP, TFIIE $\beta$ , AbdB transcription factors and amino acid regions 2-89 and 144-376 of BIP2 (BIP2<sub>2-89</sub>) and Exd (Exd<sub>144-376</sub>) respectively to perform transcriptional regulation in a positive and/or negative manner. BIP2<sub>2-89</sub> and Exd<sub>144-376</sub> protein-protein interactions also showed an absolute requirement of YPWM motif of Antp or its synthetic genes in cell culture. YPWM fusion to C-terminus of the GAL4 transactivation protein confirmed specific interaction of YPWM Antp with BIP2<sub>2-89</sub> and Exd<sub>144-376</sub>. In contrast, Antp-TBP interaction is mediated by the polyQ region of Antp without YPWM participation. Interestingly, amino acidic region 66-116 of polyQ domain in Antp is essential for the TBP-interaction, whereas the transactivation capacity of this homeoprotein requires both intact polyQ region and HD. On the other hand, helix II and amino acid Glu19 in helix I of AntpHD are responsible for molecular protein-protein interaction with the  $\beta$ -subunit of TFIIE transcription factor or AbdBHD respectively. These molecular protein-protein interactions open the possibility to postulate a *cis*-regulatory model for Antp homeoprotein given by its YPWM, polyQ and HD functional domains. Additional transcription assays using DNA templates of Antp target genes in presence or absence of general transcription factors might corroborate our hypothetical model. Furthermore, mutational analysis into the helix II of Antp HD may help to determine which amino acids are important for the Antp-TFIIE $\beta$  interaction which could have relevant biological functions in Antp and other homeoproteins.

## RESUMEN

Las homeoproteínas presentan estructuras similares y reconocen secuencias de DNA prácticamente idénticas, por lo que una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo consiste en determinar el mecanismo funcional que permite esta amplia diversidad funcional. Comparaciones en la secuencia aminoacídica de diferentes homeoproteínas mostraron que además del homeodominio (HD), el tetrapéptido YPWM y regiones polyQ son dominios importantes en la actividad de estas proteínas. El objetivo de la presente tesis es determinar si los factores transcripcionales generales así como las homeoproteínas AbdB y Exd presentan interacción proteína-proteína con los dominios funcionales de Antennapedia (Antp) para la activación y/o represión de la transcripción durante el desarrollo de *D. melanogaster*. La estrategia general consistió en determinar las interacciones moleculares de los dominios funcionales de Antp en presencia de los factores transcripcionales TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$  y las homeoproteínas AbdB y Exd<sub>144-376</sub> mediante ensayos de transactivación en células Schneider y de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC).

Los resultados obtenidos demuestran que la homeoproteína Antp interacciona de manera específica con los factores transcripcionales TBP, TFIIE $\beta$ , AbdB y las regiones aminoacídicas 2-89 y 144-376 de BIP2 (BIP2<sub>2-89</sub>) y Exd (Exd<sub>144-376</sub>) para regular positiva y/o negativamente su actividad transcripcional. Las interacciones proteína-proteína con BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> mostraron un requerimiento absoluto del tetrapéptido YPWM de Antp ó de sus péptidos sintéticos en cultivo celular. La fusión de YPWM al extremo C-terminal de la proteína transactivadora GAL4 corroboró la interacción específica del tetrapéptido YPWM de Antp con BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub>. En contraste, la interacción de Antp con TBP se realiza con la región polyQ de Antp sin requerimiento de YPWM. Interesantemente, la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ de Antp es esencial para la interacción molecular proteína-proteína con TBP, mientras que la capacidad transactivadora de la homeoproteína requiere de la región polyQ completa. Por otro lado, la hélice II y el aminoácido Glu19 de la hélice I del HD de Antp son responsables de la interacción proteína-proteína con la subunidad  $\beta$  del factor TFIIE $\beta$  y del HD de AbdB respectivamente. Estas interacciones moleculares proteína-proteína abren la posibilidad para determinar si Antp posee una regulación *cis* entre sus dominios YPWM, polyQ y HD mediante ensayos de transcripción *in vitro* utilizando templados de DNA de los genes blanco en ausencia o presencia de los factores transcripcionales. Asimismo, el análisis mutacional de la hélice II del HD de Antp permitirá seleccionar los aminoácidos importantes para la interacción Antp-TFIIE $\beta$  los cuales podrían tener una función biológica relevante en Antp y en otras homeoproteínas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos eucariotes ampliamente utilizado para determinar los mecanismos del control de la expresión génica que debe ser regulada de forma eficiente, tanto espacial como temporalmente y para ello existen un conjunto de genes denominados homeóticos ó Hox. Durante la última década, varios cientos de genes homeóticos han sido aislados de organismos tan diversos que van desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo el hombre. Los genes Hox participan durante el desarrollo embrionario y en numerosos procesos celulares en el organismo adulto como división celular, adhesión, migración celular y apoptosis. Estos genes codifican a factores transcripcionales denominados homeoproteínas cuyo homeodominio (dominio de unión al DNA) esta conformado principalmente por tres a cuatro  $\alpha$ -hélices y reconoce una secuencia consenso de DNA (TAAT). Por ello, una de las preguntas fundamentales en Biología del Desarrollo es como proteínas tan similares presentan múltiples y diferentes funciones *in vivo*.

Una de estas homeoproteínas es Antennapedia (Antp) cuya expresión ectópica genera una transformación homeótica de antena→pata en la cabeza de la mosca *Drosophila*. En embriones deficientes del gen Antp los segmentos mesotorácicos muestran un desarrollo similar al primer segmento (protórax) y en adultos mutantes las células de la pata se diferencian como estructuras de antena. El análisis de las secuencias aminoacídicas adyacentes al homeodominio de Antp revela la existencia del motivo peptídico altamente conservado YPWM el cual no muestra interacción con el DNA pero interactúa con co-factores para regular la especificidad de otras homeoproteínas. En el extremo N-terminal también se encuentra un dominio rico en glutaminas denominado comúnmente región polyQ el cual presenta una función activadora en la homeoproteína Abdominal A. El homeodominio además de reconocer el DNA puede presentar otras funciones como unión al RNA, secreción e interacción con otras proteínas. Sin embargo, actualmente se desconocen muchos de los co-factores o colaboradores que reconocen estos dominios funcionales de Antp (YPWM, polyQ y HD) cuya interacción molecular podría regular la expresión de sus genes blanco en tiempo y espacio definido. El presente trabajo muestra evidencia de que los factores generales de la maquinaria transcripcional basal (TBP, TFIIE $\beta$ , BIP2<sub>2-89</sub>) así como las homeoproteínas AbdB y Exd<sub>144-376</sub> muestran interacción proteína-proteína con los diferentes dominios funcionales de Antp como un mecanismo de regulación génica en *trans* y probablemente en *cis* de esta homeoproteína para llevar a cabo sus diferentes funciones en la morfogénesis en *D. melanogaster*.

## **2. HIPÓTESIS**

La homeoproteína Antennapedia contiene además del homeodominio de unión al DNA, el tetrapéptido YPWM y la región polyQ para regular su actividad transcripcional mediante interacciones moleculares proteína-proteína con factores de la maquinaria transcripcional basal y otras homeoproteínas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Determinar las interacciones moleculares de la homeoproteína Antennapedia y sus dominios YPWM, polyQ y HD con factores generales de la maquinaria transcripcional basal y homeoproteínas para regular su actividad transcripcional.

#### **3.2 Objetivos particulares**

1. Evaluar las interacciones moleculares proteína-proteína de Antp y el tetrapéptido YPWM en presencia de los factores transcripcionales generales y homeoproteínas como AbdB ó Exd en ensayos de transactivación y BiFC.
2. Determinar la interacción molecular del tetrapéptido YPWM fusionado a GAL4 con los factores transcripcionales generales y las homeoproteínas AbdB y Exd mediante activación de la transcripción y BiFC.
3. Analizar las interacciones moleculares proteína-proteína del tetrapéptido YPWM de los genes sintéticos de Antp con los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> mediante ensayos de transactivación.
4. Evaluar la actividad transcripcional e interacción proteína-proteína de la región polyQ de Antp con el factor transcripcional general TBP mediante activación de la transcripción y análisis BiFC.
5. Analizar la interacción molecular proteína-proteína del homeodominio así como las hélices de Antp con el factor transcripcional general TFIIE $\beta$  mediante ensayos de transactivación y BiFC.
6. Determinar las interacciones moleculares proteína-proteína del aminoácido E19 de los homeodominios de Antp y AbdB mediante un análisis de activación de la transcripción.

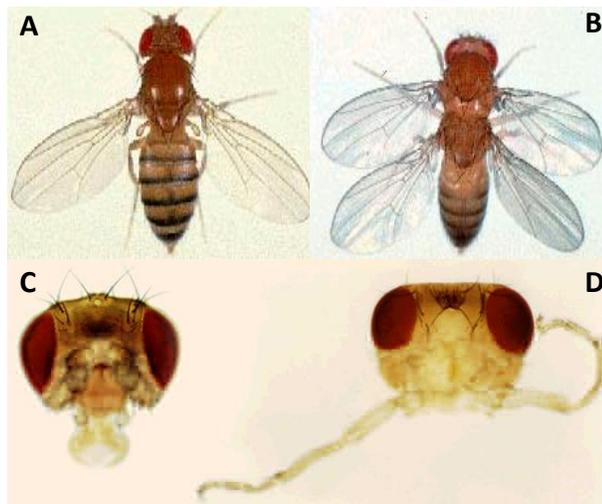
## 4. IMPORTANCIA

Durante el complejo desarrollo de los organismos multicelulares, la expresión génica debe ser regulada de forma eficiente, tanto espacial como temporalmente y cualquier desequilibrio podría implicar el desarrollo de alguna enfermedad. Para ello, existen un conjunto de factores transcripcionales (homeoproteínas) que son codificados por los genes HOX que participan en el desarrollo embrionario y en numerosos procesos celulares en la etapa adulta. Durante la última década, varios cientos de genes HOX han sido aislados de organismos tan diversos que van desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo el hombre lo que indica una fuerte presión evolutiva por conservar su secuencia aminoacídica. Además, en los últimos años se han encontrado que los genes HOX están asociados a neoplasias hematopoyéticas, linfoproliferativas (leucemias y linfomas) y tumores malignos sólidos mediante mecanismos moleculares no ampliamente identificados. Los resultados de esta tesis muestran por primera vez la evidencia experimental que la homeoproteína Antennapedia presenta interacción molecular proteína-proteína con los factores generales de la maquinaria transcripcional basal TBP, TFIIE $\beta$  y BIP<sub>22-89</sub> así como con las homeoproteínas AbdB y Exd<sub>144-376</sub> mediante el tetrapéptido YPWM, región polyQ y aminoácidos específicos del homeodominio como un mecanismo molecular para la regulación de genes blanco involucrados en procesos celulares normales durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

## 5. ANTECEDENTES

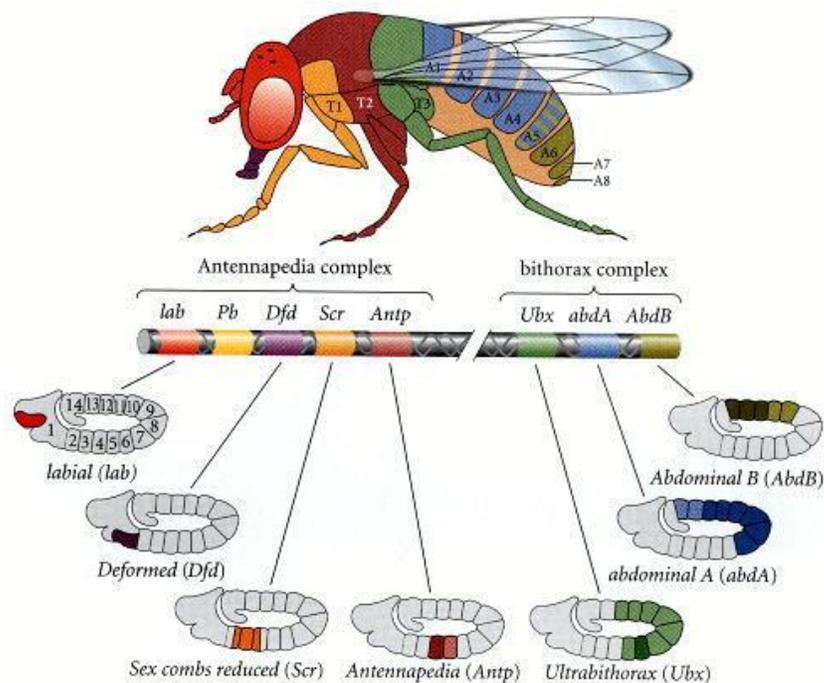
### 5.1 Genes homeóticos

Desde inicios del siglo pasado el grupo de H. Morgan analizó en *D. melanogaster* un tipo de mutaciones que presentan la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo (García-Bellido, 1977). Estas mutaciones fueron denominadas mutaciones homeóticas en base al término “Homeosis” descrito por William Bateson en 1894 que describe el reemplazamiento de una estructura del cuerpo por otra homóloga. El primer mutante homeótico referido en *Drosophila* fue Bithorax descrito por Calvin Bridges en 1919 con una transformación del tercer segmento torácico hacia el segundo donde los halterios son sustituidos por un segundo par de alas (Figura 1). Posteriormente, se describió la mutación homeótica Antennapedia (Antp) que presenta la sustitución de las antenas por un par de patas (LeCalvez *et al.*, 1984).



**Figura 1. Mutaciones homeóticas Ultrabithorax y Antennapedia en *D. melanogaster*.** **A** La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tipo silvestre presenta un par de alas en el segundo segmento torácico (T2) y halterios en el tercer segmento torácico (T3). **B** Una triple mutación en el gen *Ultrabithorax* suprime su función en el segmento T3 y causa la transformación T3→T2 ocasionando la aparición de un par extra de alas. **C** La mosca normal presenta un par de antenas normales. **D** En la mutante *Antennapedia* las antenas han sido transformadas en un par de patas debido a la expresión ectópica de la proteína *Antennapedia*.

Edward Lewis en 1978 demostró que la identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca son determinados por los genes que conforman el complejo Bithórax (BX-C), mientras que la identidad de los dos primeros segmentos torácicos y los segmentos de la cabeza son el resultado de la expresión de los genes del complejo Antennapedia (ANT-C; Figura 2). El complejo ANT-C se compone de los genes homeóticos *Labial (Lab)*, *Proboscipedia (Pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex-combs-reduced (Scr)* y *Antennapedia (Antp)*. El complejo BX-C incluye los genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal A (AbdA)* y *Abdominal B (AbdB)* (Lewis, 1978).



Tomado de Gilbert, 2003

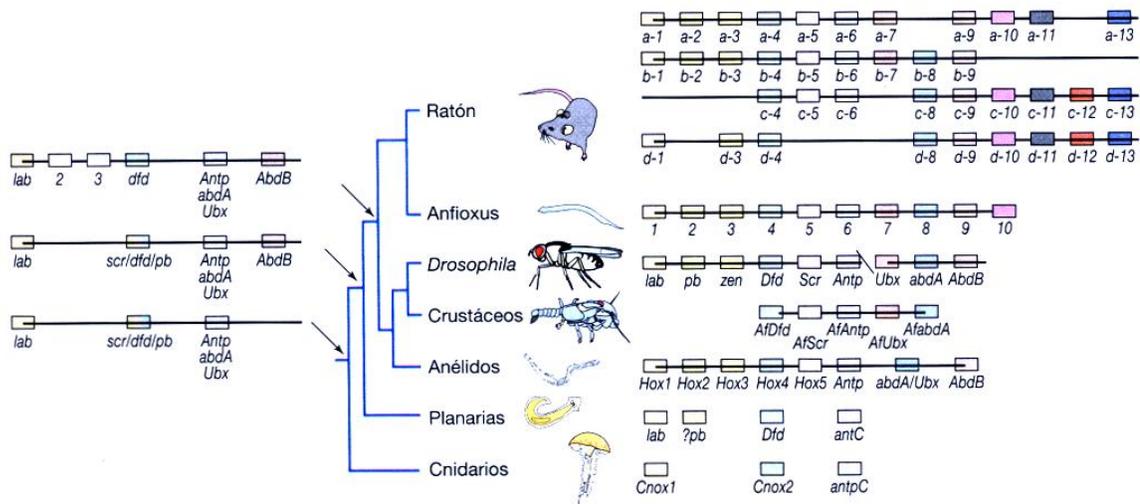
**Figura 2. Los genes homeóticos regulan la identidad de los segmentos en el eje anterior-posterior de *Drosophila*.** El color representa el segmento donde se expresa cada uno de los genes homeóticos durante el desarrollo embrionario. La disposición en el cromosoma de los genes homeóticos es el mismo orden que las partes del cuerpo que definen.

La tecnología del DNA recombinante permitió aislar los complejos Bithórax (Bender *et al.*, 1983) y Antennapedia (Garber *et al.*, 1983) en *Drosophila*. Estos experimentos mostraron hibridaciones cruzadas que se debieron a la presencia de regiones homólogas entre los genes *Antennapedia*, *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* (Kuroiwa *et al.*, 1984), esta región de homología fue mapeada y secuenciada permitiendo el descubrimiento de un segmento de DNA altamente conservado de 180 pares de bases (pb) que fue denominado “homeobox” porque se encuentra en los genes

homeóticos y codifica para una región de 60 aminoácidos denominado homeodominio (Gehring *et al.*, 1987). El homeobox fue usado posteriormente como sonda o rastreador molecular para detectar secuencias homólogas en otros organismos como levaduras y vertebrados superiores, incluyendo al humano (McGinnis *et al.*, 1984).

Una particularidad de los genes homeóticos es su organización colineal con su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo, de tal manera que se expresa en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran ubicados en el cromosoma, fenómeno denominado Colinearidad en la expresión (Lewis, 1963; Duboule y Dolle, 1989). El alto grado de similitud en la secuencia de los genes homeóticos agrupados y su distribución co-lineal confirma el alto grado de conservación evolutiva de los homeodominios (Gehring *et al.*, 1994).

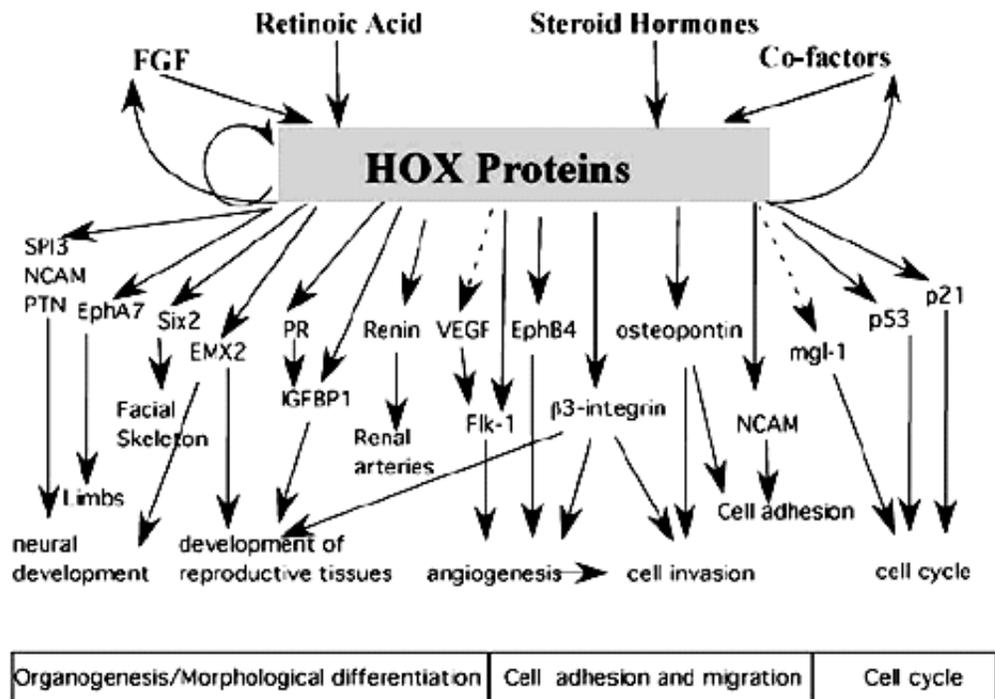
En la última década, cientos de genes homeóticos (Hox) han sido aislados de diversos organismos que van desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo el hombre (Sheperd *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993; Wysocka *et al.*, 1989; Holland *et al.*, 1992; Acampora *et al.*, 1989). Las especies de invertebrados analizadas contienen un solo grupo de genes Hox, mientras que en vertebrados varían en número: se han identificado cuatro en mamíferos y siete grupos en diferentes peces (Figura 3; Meyer y Schartl, 1999). Sin embargo, la familia de los genes Hox ha mantenido esta organización en grupos en el genoma durante cientos de millones de años de evolución a través de diversas rondas de duplicación genética, lo que refleja su importancia en el desarrollo de todos los organismos (Patel y Prince, 2000).



Tomado de Meyer y Schartl, 1999

**Figura 3. Evolución de los genes Hox.** El Árbol filogenético muestra la evolución de los genes *Hox* en diferentes filums. A la derecha se muestran los genes *Hox* identificados en cada uno de los taxones del árbol filogenético, los genes homólogos están alineados verticalmente y los que se muestran a la izquierda señalan aquellos que se encontraban presentes en los puntos de ramificación antes de la duplicación y divergencia.

Dada la naturaleza compleja de la morfogénesis, se ha propuesto que los genes *Hox* actúan como genes maestros en el control de la identidad celular permitiendo la especificación correcta y precisa de las estructuras, órganos y tejidos en el organismo en desarrollo. Así mismo, estos genes participan en la regulación de la división celular, adhesión y migración celular, diferenciación morfológica y apoptosis durante la etapa adulta (Figura 4; Ulijaszek *et al.*, 1998; Svngen *et al.*, 2006). Recientemente, se han identificado numerosos genes blancos de los genes *Hox* que presentan una amplia variedad de funciones en el organismo adulto (Tabla I; Svngen *et al.*, 2006). Se estima que el número de genes blanco regulados por homeoproteínas en un tejido/embrión en particular debe ser de al menos un ciento en *Drosophila* (Mastick *et al.*, 1995) y un número mayor en vertebrados (Zhao y Potter, 2001).



Tomado de Svngen y Tonissen, 2006

**Figura 4. Los genes Hox regulan diversos procesos celulares en la etapa adulta.** Se han identificado numerosos genes blancos de los genes *Hox* que participan en distintos procesos celulares como el

desarrollo neural, desarrollo del sistema reproductivo, angiogenesis, invasión celular, adhesión celular, ciclo celular y su propia autorregulación.

**Tabla I**  
**Lista de genes blanco regulados por genes Hox en mamíferos**

<i>Hox protein</i>	+/-	<i>Target</i>	<i>Species</i>	<i>Reference</i>
Hoxa2	-	Sn2	Mouse	Kubejova <i>et al</i> (2005)
Hoxa5	+	p53	Mouse	Raman <i>et al</i> (2000a)
HOXA5			Human	
HOXA5	+	Progesterone receptor	Human	Raman <i>et al</i> (2000b)
HOXA5	+	Pleiotrophin	Human	Chen <i>et al</i> (2005)
HOXA5	+	IGFBP-1	Human	Foucher <i>et al</i> (2002); Gao <i>et al</i> (2002)
HOXA10				
HOXB4				
Hoxa9	-	Osteopontin	Mouse	Shi <i>et al</i> (1999, 2001)
Hoxc8				
HOXA9	+	EphB4	Human	Bruhl <i>et al</i> (2004)
HOXA10	+	p21	Human	Bromleigh and Freedman (2000)
HOXA10	+	$\beta$ 3-Integrin	Human	Daftary <i>et al</i> (2002)
HOXA10	-	EMX2	Human	Troy <i>et al</i> (2003)
Hoxa10	+	IGFBP-1	Baboon	Kim <i>et al</i> (2003)
Hoxa13, Hoxd13	+	EphA7	Mouse	Salsi and Zappavigna (2006)
HOXB1	+	COL5A2	Human	Penkov <i>et al</i> (2000)
Hoxb3	+	TTF-1	Rat	Guazzi <i>et al</i> (1994)
Hoxb5	+	SPL3	Mouse	Safaei (1997)
Hoxb5	+	Fk1	Mouse	Wu <i>et al</i> (2003)
HOXB7	+	BFGF	Human	Carè <i>et al</i> (1996)
Hoxb8	-	N-CAM	Mouse	Jones <i>et al</i> (1992)
Hoxb9	+	N-CAM	Mouse	Jones <i>et al</i> (1992)
Hoxc8	?	mgl-1	Mouse	Tomotsune <i>et al</i> (1993)
Hoxc13	-	Keratins	Mouse	Tkatchenko <i>et al</i> (2001)
Hoxd10, b6, b7, b9, c8	+	Renin	Mouse	Pan <i>et al</i> (2004)

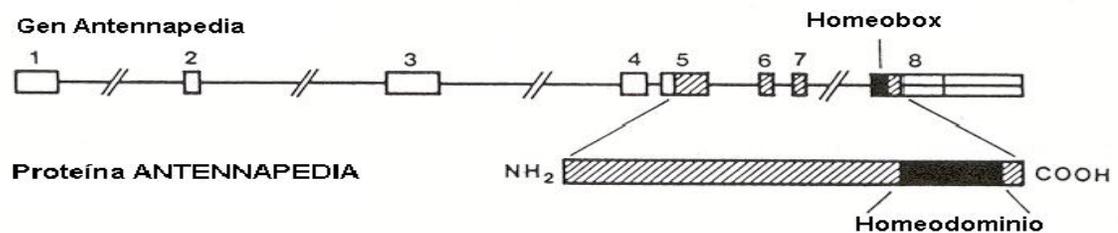
## 5.2 Antennapedia

LeCalvez describió en 1948 la mutación homeótica Antennapedia en *D. melanogaster*, esta mutante dominante transformaba las antenas en un par de patas del segundo segmento torácico (Figura 1D). Otros fenotipos que se presentan son la reducción de los ojos, transformación de la identidad de la región dorsal de la cabeza en tipo tórax y ocasionalmente los palpos maxilares no se alcanzan a desarrollar (Duncan, 1982). El estudio de varias mutantes de este tipo mostró que una inversión cromosomal deja en la mayoría de los casos al gen homeótico *Antp* bajo la regulación de otra región de control potenciadora que dirige la expresión de *Antp* a las antenas

La homeoproteína Antennapedia actúa principalmente sobre los segmentos mesotorácicos. Struhl y cols en 1981 realizaron experimentos en clones de tejido mesotorácico de las patas que eran deficientes para *Antp* observando que desde la embriogénesis temprana el tejido se transformaba en antena. En embriones mutantes que carecen del gen *Antp* los segmentos mesotorácicos se desarrollan como el primer

segmento (protórax) y en clonas de adultos mutantes (carecen de Antp) las células de la pata se diferenciaron en estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981).

La clonación del complejo Antennapedia permitió determinar el locus del gen *Antp* que se extiende en una región de 100 Kilopares de bases (Kb) del cromosoma 3 y contiene dos promotores, dos regiones de procesamiento-terminación, 8 exones y siete intrones de hasta 60 Kb (Figura 5; Schneuwly *et al.*, 1986). El RNAm de *Antp* contiene dos diferentes sitios de splicing en la región codificante (Stroeher *et al.*, 1988) y las proteínas resultantes presentan cuatro sitios de fosforilación (Jaffe *et al.*, 1997).



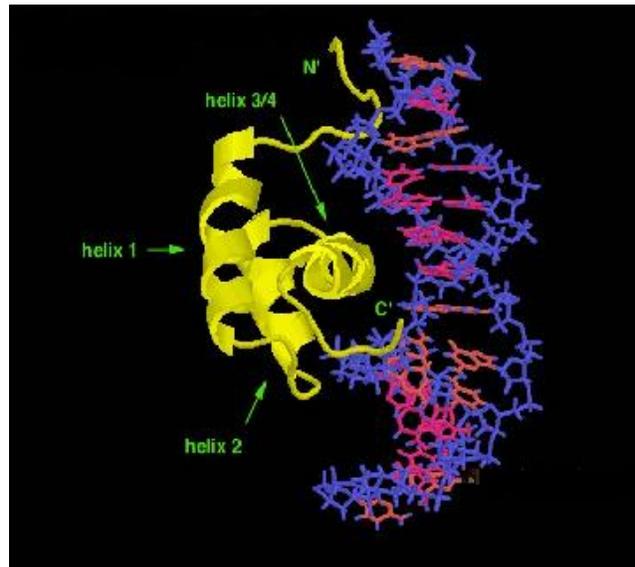
Modificado de Schneuwly y cols. 1986

**Figura 5. Organización estructural del gen *Antennapedia*.** Los exones 1-8 están separados por siete intrones. El homeobox está localizado en el exón 8, por lo que el homeodominio se localiza cerca del extremo carboxilo terminal (COOH) de la homeoproteína Antp.

La inserción del DNA complementario de *Antp* en un vector de expresión bajo la regulación de un promotor sensible a choques térmicos y su posterior introducción en la línea germinal de *Drosophila* para la generación de moscas transgénicas indujo la transformación de antena por pata como resultado de la sobre-expresión ectópica de la proteína Antennapedia. Este experimento constituyó el primer experimento exitoso del re-diseño del cuerpo de un organismo (Schneuwly *et al.*, 1987).

Los homeodominios (HDs) analizados hasta la fecha mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución y Cristalografía de Rayos X muestran homologías estructurales, conteniendo tres-cuatro  $\alpha$ -hélices bien definidas donde la cuarta hélice es una continuación de la tercera y un brazo amino-terminal flexible que no asume una estructura definida en solución es decir presenta una alta flexibilidad (Gehring *et al.*, 1990). El análisis de los complejos Antp-DNA mostró que los contactos principales se localizan en la hélice de reconocimiento (3/4) que se une al surco mayor del DNA y el

extremo N-terminal se une a bases específicas del surco menor del DNA (Figura 6; Otting *et al.*, 1990). La mayoría de estos ensayos de unión al DNA usaron las secuencias “TAAT” en la hebra líder así como las “ATTA” en la hebra complementaria como sitios de unión al homeodominio (Kalions y O’Farrell, 1993).



Tomado de Qian y cols. 1992

**Figura 6. Interacción del homeodominio de Antennapedia con el DNA.** Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3/4 con el surco mayor del DNA y el extremo amino terminal del homeodominio con el surco menor.

El análisis de la estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear del homeodominio de Antp con una delección en el brazo N-terminal mostró que la estructura de este homeodominio truncado permanece intacta. Sin embargo, la afinidad de unión al DNA de este homeodominio truncado muestra una disminución que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal de Antp (Qian *et al.*, 1994). Experimentos genéticos realizados *in vivo* en la mosca *D. melanogaster* mediante sustitución recíproca de cuatro residuos en el extremo amino-terminal entre Antp y Sex comb reduced (Scr), modificaron la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993). Estos experimentos demuestran la importancia funcional de estos residuos y sugieren fuertemente que el extremo amino-terminal de los homeodominios está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de las homeoproteínas.

La comparación aminoacídica entre la homeoproteína Antp de *D. melanogaster* y *Schistocerca americana* revela que existen al menos siete dominios altamente conservados (Hayward *et al.*, 1995). El análisis de un mayor número de secuencias disponibles de insectos muestra que estos dominios se mantienen conservados por lo que podrían participar en la modulación de la especificidad funcional de Antp en diferentes tejidos (Fig. 7; Devenport *et al.*, 2000; Walldorf *et al.*, 2002). Sin embargo, únicamente en algunos de estos dominios se ha determinado su importancia funcional más no a nivel molecular, como el caso del tetrapéptido YPWM (Canales-del-Castillo, 2002 y 2005; Cárdenas-Chávez, 2007) y la región rica en glutaminas (polyQ) que esta presente en otras proteínas como Sp1 y Abdominal A (Courey y Tijan, 1988; Merabet *et al.*, 2003).

### 5.2.1 Tetrapéptido YPWM

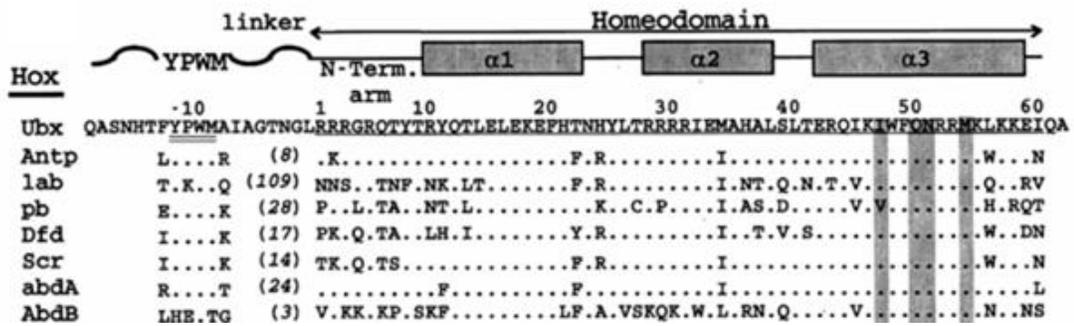
Comparaciones en la secuencia aminoacídica de diferentes homeoproteínas, mostraron que además del homeodominio, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina) es otra región peptídica altamente conservada. Este dominio ó motivo esta ubicado río arriba de los genes homeóticos y se conecta al HD mediante el brazo amino terminal flexible (Figura 8; Burglin, 1994). El número de aminoácidos que separan este tetrapéptido de la región N-terminal flexible es variable en las distintas homeoproteínas. Estudios realizados por Qian y cols. demostraron que el extremo amino-terminal de la homeoproteína Antp, formado por los residuos 1 a 6 de su HD, es flexible en solución y que al unirse al DNA establece contacto con el surco menor (Qian *et al.*, 1989).

La proximidad del motivo YPWM al sitio de unión al DNA (homeodominio) sugería la posibilidad de que este tetrapéptido pudiera estar involucrado en la regulación de unión al DNA. Estudios mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución realizados por Qian y cols permitieron determinar la estructura secundaria de un polipéptido elongado que posee el motivo conservado –Tyr-Pro-Trp-Met- (YPWM) río arriba del brazo amino-terminal de Antp. Estos resultados estructurales de la proteína, así como el análisis de unión al DNA mostraron que el motivo YPWM no presenta interacción con el DNA y constituye un puente flexible de conexión entre el homeodominio y la proteína completa sugiriendo la participación de este motivo en la especificidad de unión de esta homeoproteína al DNA (Qian *et al.*, 1992).

	1				50
AntpBee	<b>MSSYFANSYI</b>	<b>PDLRNGGVEH</b>	<b>PHQHQQHYGA</b>	<b>AVQVPQQTQS</b>	<b>VQQQSQQAGD</b>
AntpSch	<b>MSSYFAVQQG</b>	<b>PGG</b> .....	.....	.....	<b>GAD</b>
AntpDro	<b>MTSYFTNSYM</b>	<b>GAD</b> .....	<b>.MHGHY</b> ..	.....	.....
AntpBom	.....	.....	.....	.....	.....
	<b>7</b>				
	51				100
AntpBee	<b>PCDPSLLRQG</b>	<b>VPGHYGAAG</b>	<b>SQQ</b> . <b>DMPYPR</b>	<b>FFPYNRMDMR</b>	<b>NATYYQHQQD</b>
AntpSch	<b>PSSGAGAASW</b>	<b>GGGGGAGAQ</b>	<b>QPPQGMPYPR</b>	<b>FFPYDRMDIR</b>	<b>SAAYYGAQQS</b>
AntpDro	<b>PGNGVTDLDA</b>	<b>QQMHYSQNA</b>	<b>NHQGNMPYPR</b>	<b>FFPYDRMPYY</b>	<b>NGQGMDDQQQ</b>
AntpBom	<b>.MDGCDQQLR</b>	<b>PAQHHPAQP</b>	<b>APG</b> .. <b>MPYPR</b>	<b>FFPYDRLGYY</b>	<b>.....QQM</b>
			<b>2</b>		
	101				150
AntpBee	<b>HGSGMDGMGG</b>	<b>YRSASPS</b> ..	<b>GMGHMGHTPT</b>	<b>PNGHP</b> .....	.....
AntpSch	<b>GGG</b> ..... <b>G</b>	<b>GLDGGSPGGG</b>	<b>GNGGGGGGY</b>	<b>RSRSP</b> .....	.....
AntpDro	<b>HQV</b> ..... <b>Y</b>	<b>SRPDSPS</b> ..	<b>QVGGVMPQAQ</b>	<b>TNGQLGVP</b> <b>QQ</b>	<b>QQQQQQQPSQ</b>
AntpBom	<b>EQN</b> ..... <b>G</b>	<b>YRPDSPS</b> ...	<b>QMGHMGPKTD</b>	<b>GYGPN</b> .....	.....
	151				200
AntpBee	.....	.....	..... <b>S</b> ...	<b>TPIVYAS</b>	<b>CKLQAAAVDH</b>
AntpSch	.....	.....	..... <b>MGG</b>	<b>GGQTPVVYAS</b>	<b>CKLQAAAAAA</b>
AntpDro	<b>NQQQQQAQQA</b>	<b>PQQLQQQLPQ</b>	<b>VTQQVTHEQQ</b>	<b>QQQQP</b> <b>VVYAS</b>	<b>CKLQAAVGGGL</b>
AntpBom	.....	.....	..... <b>GH</b>	<b>QPATPAVYTS</b>	<b>CKLQAAAATG</b>
				<b>3</b>	
	201				250
AntpBee	<b>QGSVLD</b> ....	<b>..GPDSPLLV</b>	<b>ESQMHHQMHT</b>	<b>QHPHMQPQQG</b>	<b>QHQSQAQQQH</b>
AntpSch	<b>AAAAAGNGGG</b>	<b>AGGGSPPLD</b>	<b>VPPHQHQHHA</b>	<b>HHAPPHLQQQ</b>	<b>QQQQQLYAD</b>
AntpDro	<b>GMVPE</b> .....	<b>..GGSPPLV</b>	<b>DQMSGHMHNA</b>	<b>QMTLPHHMGH</b>	<b>PQAQLGYTDV</b>
AntpBom	<b>GAVP</b> .....	<b>..GSPPLE</b>	<b>QAQQMPHHMH</b>	<b>PQQHMVQHG</b>	<b>PPHQH</b> ....
		<b>4</b>			
	251				300
AntpBee	<b>LQAHEQHMMY</b>	<b>.....Q</b> ....	<b>..QQQSQA</b>	<b>ASQQSQFGMH</b>	<b>PRQQQAQQH</b>
AntpSch	<b>PAPQQQQQQQ</b>	<b>PPPTQQPPPV</b>	<b>PPPHQHQPPL</b>	<b>GAGVPPFGHQ</b>	<b>HQHHPQQQ</b>
AntpDro	<b>GVPDVTEVHQ</b>	<b>.....NHHM</b>	<b>GMVQQSGVP</b>	<b>PVGAPPQGM</b>	<b>HQQGPPQM</b>
AntpBom	.....	.....	.....	<b>.LMYPVDDMQ</b>	<b>HQTQMPPMHQ</b>
	301				350
AntpBee	<b>QGVVTSPLSQ</b>	<b>QQQAAPQGAA</b>	<b>SANLPSPLYP</b>	<b>WMRSQF</b> ...	<b>.ERKRGRQTYT</b>
AntpSch	<b>Q</b> ..... <b>PPP</b>	<b>QQ</b> ... <b>HNGSP</b>	<b>ANTLPSPLYP</b>	<b>WMRSQF</b> ...	<b>.ERKRGRQTYT</b>
AntpDro	<b>QGHPGQHTPP</b>	<b>SQ</b> ... <b>NPNSQ</b>	<b>SSGMPSPLYP</b>	<b>WMRSQFGKC</b>	<b>QERKRGRQTYT</b>
AntpBom	<b>QSMHAQQPPP</b>	<b>QQ</b> ... <b>PPNT</b>	<b>KPSLPSPLYP</b>	<b>WMRSQF</b> ...	<b>.ERKRGRQTYT</b>
			<b>5</b>		
	351				400
AntpBee	<b>RYQTLELEKE</b>	<b>FHFNRYLTR</b>	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpSch	<b>RYQTLELEKE</b>	<b>FHFNRYLTR</b>	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpDro	<b>RYQTLELEKE</b>	<b>FHFNRYLTR</b>	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpBom	<b>RYQTLELEKE</b>	<b>FHFNRYLTR</b>	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
			<b>6</b>		
	401			428	
AntpBee	<b>NKSK</b> ... <b>GTP</b>	<b>GSGDGDTEIS</b>	<b>PQTSPQG</b>		
AntpSch	<b>NKSK</b> PDAGQN	<b>GDNAGSDIT</b>	<b>PQTSPQ</b> .		
AntpDro	<b>NKTK</b> ... <b>GEP</b>	<b>GSGGEGDEIT</b>	<b>PPNSPQ</b> .		
AntpBom	<b>NKTK</b> ... <b>GEP</b>	<b>GSGDEPDNMS</b>	<b>PPTSPQ</b> .		
			<b>7</b>		

Modificado de Walldorf y cols. 2000

**Figura 7. Análisis comparativo de Antennapedia entre diferentes especies de insectos.** Comparación de la secuencia aminoacídica entre secuencias homólogas de la proteína Antp de la abeja (*Apis mellifera*), Saltamontes (*Schistocerca americana*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y gusano de seda (*Bombix mori*). Las regiones conservadas (1-7) se indican mediante barras negras localizadas debajo de la secuencia y las regiones ausentes en una o más secuencias son representadas por áreas punteadas. Las secuencias de aminoácidos que están conservadas en mínimo dos especies se muestran en negrillas. Los homopéptidos ricos en glutaminas Q<sub>9</sub>, Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub> que forman parte de la región polyQ de Antp en *Drosophila* son señalados en rectángulos.



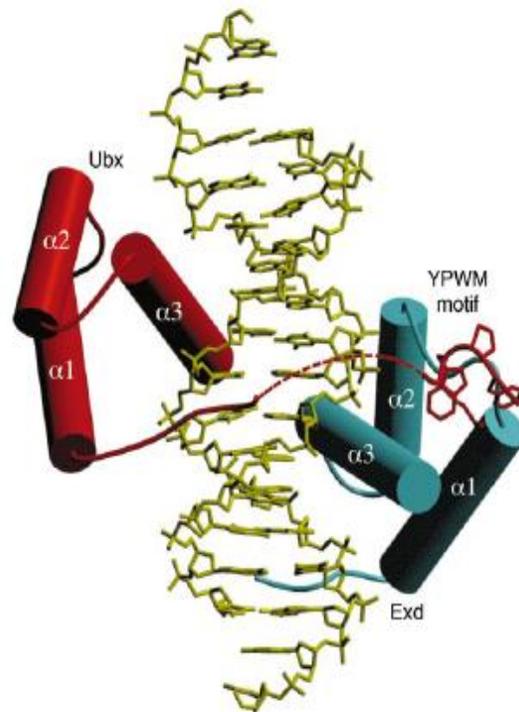
Tomado de Passner y cols. 1999

**Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de diferentes homeoproteínas.** El homeodominio se muestra en la posición aminoacídica 1 al 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aminoácidos entre YPWM y el homeodominio se muestra entre paréntesis.

El estudio sobre la evolución del dominio YPWM en las homeoproteínas fushi tarazu (Ftz) de *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Schistocherca americana* reveló su importancia funcional. La proteína Ftz de *Drosophila melanogaster* que carece de un motivo YPWM es incapaz de activar a *teashirt* (*tsh*), sin embargo Ftz de *Trilobium castaneum* que contiene YPWM si activa a *tsh* (Löhr *et al.*, 2001). Además, la expresión ectópica de la proteína Ftz de *Drosophila* no induce una transformación homeótica al contrario de Ftz de *T. castaneum* y *S. americana* que si transforman la antena en pata. En base a estas observaciones se postuló que la función de Ftz evolucionó de un gen homeótico a un gen de segmentación, debido probablemente a la pérdida del motivo YPWM y la ganancia del dominio LXXLL (Alonso *et al.*, 2001 y Löhr *et al.*, 2001).

Algunas proteínas Hox, como Ultrabithorax, tienen baja especificidad de unión al DNA por sí mismas pero incrementan su afinidad y especificidad cuando se unen con otra homeoproteína (Extradenticle o PBX en mamíferos). El homeodominio de la proteína Extradenticle interacciona de forma selectiva con las proteínas Ultrabithorax y abdominal-A (Johnson *et al.*, 1995). La fuerte interacción de Exd con Ultrabithorax requiere únicamente del homeodominio de Ultrabithorax y una porción del extremo amino-terminal que incluye el motivo YPWM (Johnson *et al.*, 1995). Passner y cols en 1999 realizaron estudios mediante cristalografía de Rayos X empleando los homeodominios de Ultrabithorax y Extradenticle para demostrar que ambas homeoproteínas se unen en caras opuestas del DNA y sus hélices de reconocimiento se conectan entre ellas. Esta interacción proteína-proteína está dada por el motivo YPWM

de Ultrabithorax que se inserta en una hendidura hidrofóbica formada en la superficie del homeodominio de Extradenticle (Figura 9).



Tomado de Passner y cols, 1999

**Figura 9. Interacción de las homeoproteínas Ultrabithorax y Extradenticle.** El diagrama muestra que los homeodominios de Ubx (rojo) y Exd (azul) se unen de forma conjunta en caras opuestas del DNA (amarillo). La línea punteada roja representa el puente flexible entre el homeodominio de Ubx y el motivo YPWM.

El análisis mutacional mediante sustituciones de alanina en el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antp y sus regiones flanqueantes permitió analizar el papel funcional de esta región altamente conservada en embriones de *D. melanogaster*. La expresión ectópica de Antp silvestre y las mutantes en los cuatro aminoácidos flanqueantes al motivo YPWM produjo la transformación homeótica esperada con una pérdida total de la involución de la cabeza y una transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2). En contraste, la mutación en el motivo YPWM en Antp mostró un fenotipo larvario normal con leves transformaciones homeóticas. Estos resultados muestran que el motivo YPWM es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp (Papadopoulos *et al.*, 2011).

El análisis de la expresión ectópica de Antp en embriones de *D. melanogaster* activa el gene blanco *tsh* y la secuencia reguladora *Fkh[250<sup>com</sup>]-lacZ* en regiones anteriores de la cabeza y reprime drásticamente la expresión de *Scr*. Interesantemente, la proteína mutante en YPWM (Antp<sup>AAAA</sup>) fue incapaz de activar a *tsh* ó *Fkh* y de reprimir la expresión de *Scr*. Lo anterior es altamente relevante ya que la actividad funcional de los diferentes genes blanco puede ser regulada por interacciones moleculares con el tetrapéptido YPWM para la selección de los genes blanco involucrados en el desarrollo del tórax ó represión de los genes de la cabeza en *D. melanogaster* (Canales-Castillo, 2005; Papadopoulos *et al.*, 2011).

La adición del dominio de represión WRPW en el extremo C-terminal de la homeoproteína Antp permitió analizar el efecto de esta fusión en la activación de la transcripción en células Schneider de *D. melanogaster*. La transactivación de la proteína de fusión Antp-WRPW mostró una reducción de la transcripción de 35% mientras que Antp con mutación en YPWM fusionada al dominio WRPW no mostró reducción en la transactivación. Estos resultados sugieren que la ausencia del tetrapéptido no permite la interacción de Antp con probables co-factores resultando en una mayor transactivación génica que no permite la actividad represora del dominio WRPW (Villanueva-Segura, 2004). Además, el análisis de la actividad transcripcional de Antp, Antp mutante en YPWM (Antp<sup>AAAA</sup>) y la fusión del tetrapéptido YPWM a la proteína transactivadora GAL4 muestra que actúa como un dominio de represión transcripcional (Cárdenas-Chávez 2007; Papadopoulos *et al.*, 2011).

### 5.2.2 Región polyQ

Los homopéptidos son regiones o secuencias que presentan repeticiones en tandem de un solo aminoácido, por ejemplo las regiones polyQ ó polyN que muestran una secuencia rica en aminoácidos glutamina y asparagina respectivamente. El número y longitud de los homopéptidos varia dependiendo de la proteína ú organismo en estudio, por ejemplo los procariontes presentan un número mínimo casi nulo de homopéptidos (Faux *et al.*, 2005). En eucariotes las secuencias polyQ son los homopéptidos más abundantes (16%) en diversas proteínas (Faux *et al.*, 2005). Notablemente, más del 50% de las proteínas de humano que contienen homopéptidos corresponden a homeoproteínas (Karlín y Burge, 1996).

Inicialmente, los homopéptidos ó regiones polyQ fueron descubiertos en el humano mediante el estudio de un grupo de enfermedades neurodegenerativas o ataxias

denominadas enfermedades polyglutamina. Estos procesos se caracterizan por el incremento o extensión en el número de aminoácidos glutamina presentes en diferentes proteínas (Jiang, 2003). La enfermedad de Huntington es causada por la expansión del codón CAG en el gen huntingtin (*htt*) ocasionando la presencia de 36-121 glutaminas en el homopéptido polyQ. La enfermedad de Kennedy es causada por una mutación similar en el gen del receptor de andrógeno (*AR*). En la atrofia DRPLA (Dentatorubral pallidoluysian atrophy) el gen atrophin 1 presenta la expansión de glutaminas. Existen cinco tipos de enfermedades SCAs (Spinocerebellar ataxia) causadas por mutaciones polyQ en los genes ataxin (Ross, 2002). Este grupo de enfermedades presenta además la formación de agregados proteicos insolubles como resultado de la mutación en la región polyQ (Warrick *et al.*, 1998) pero se desconoce si la formación de agregados es la causa o el resultado de la progresión de estos desordenes neurodegenerativos (Chai *et al.*, 2002; Kuemmerle *et al.*, 1999).

El análisis del proteoma de *Drosophila melanogaster* mostró un mayor porcentaje de proteínas que presentan homopéptidos (12%) en comparación con el humano (1.6%) y las proteínas con homopéptidos polyQ son 3.5 veces más abundantes en *Drosophila* que en el humano (Karlin y Burge, 1995; Faux *et al.*, 2005). Interesantemente, las homeoproteínas del complejo Bithorax (Abdominal B, Ultrabithorax, Abdominal A) y complejo Antennapedia (Deformed, Antennapedia, Labial) también presentan regiones polyQ, polyA, polyN y polyG (Tabla II; Karlin y Burge, 1995). La homeoproteína Antp presenta únicamente tres homopéptidos (Q<sub>9</sub>, Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub>) en su extremo N-terminal que constituyen junto con otros aminoácidos la región o dominio polyQ. Notablemente estos homopéptidos se encuentran altamente conservados en la homeoproteína Antp de diferentes especies de *Drosophila* (Papadopulos *et al.*, 2011).

Diferentes análisis computacionales muestran que las regiones polyQ constituyen un puente flexible entre dominios proteicos que presentan interacciones proteína-proteína ó proteína-DNA (Karlin y Burge, 1995; Faux *et al.*, 2005). Además, la mayoría de los homopéptidos polyQ están presentes principalmente en proteínas intracelulares como factores transcripcionales sugiriendo su participación en la activación de la transcripción, interacciones proteína-proteína y/o localización nuclear (Mitchell y Tijan, 1989; Karlin y Burge, 1995; Alba y Guigo, 2004; Harrison, 2006). Las proteínas SP1 (Emili *et al.*, 1994), SP3 (Majello *et al.*, 1997) y RF2a (Dai *et al.*, 2003) son ejemplos de factores transcripcionales que contiene una región polyQ responsable de la interacción proteína-proteína con la proteína de unión a la caja TATA (TBP).

**Tabla II**  
**Proteínas que contienen múltiples homopéptidos polyQ en *Drosophila melanogaster***

Protein Name (accession no.)	Length, aa	Homo-amino acid runs of length ≥ 5 aa	Devel./ Neuro./ TF	Description/function
E74-B (P11536)	883	S <sub>14</sub> , S <sub>8</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , Q <sub>8</sub> , A <sub>13</sub> , Q <sub>8</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>11</sub> , A <sub>9</sub> , S <sub>5</sub> , A <sub>5</sub>	D, T	Control of molting, ecdysome inducible
Abdominal-B (P09087)	491	Q <sub>10</sub> , Q <sub>8</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>10</sub> , Q <sub>7</sub> , A <sub>6</sub> , N <sub>5</sub>	D, N, T	Segment/PNS devel.
Odd-skipped (P23803)	392	Q <sub>12</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>8</sub> , H <sub>6</sub> , S <sub>7</sub>	D, N, T	Pair-rule segmentation
Big brain (P23645)	700	Q <sub>13</sub> , Q <sub>10</sub> , P <sub>5</sub> , Q <sub>25</sub> , Q <sub>5</sub>	D, N	Neural/epidermal devel.
Hairy (P14003)	337	Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub> , A <sub>10</sub>	D, N, T	Segment/sense organ/PNS development
Dorsal (P15330)	678	Q <sub>5</sub> , Q <sub>8</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>14</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub>	D	Controls dorsal polarity
AEF1 (P39413)	308	N <sub>5</sub> , Q <sub>13</sub> , Q <sub>6</sub>	T	Regulates <i>Adh</i>
E75-C (P13055)	1443	Q <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , P <sub>15</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub> , S <sub>7</sub> , S <sub>6</sub> , Q <sub>8</sub> , P <sub>8</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>5</sub> , Q <sub>9</sub> , Q <sub>5</sub> , S <sub>17</sub>	D, T	Control of molting, ecdysome inducible
Zeste (P09956)	574	Q <sub>6</sub> , Q <sub>7</sub> , A <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , A <sub>6</sub> , G <sub>5</sub>	D, T	Activates <i>Ubx</i>
Ubx (P02834)	389	A <sub>5</sub> , G <sub>13</sub> , A <sub>10</sub>	D, T	Anter./post. devel.
Giant (P39572)	448	Q <sub>11</sub> , Q <sub>12</sub> , A <sub>9</sub>	D, T	Represses Kruppel, Knirps
Caudal (P09085)	472	H <sub>5</sub> , N <sub>10</sub> , N <sub>7</sub> , R <sub>11</sub>	D, T	Segment devel. (early)
Abdominal-A (P29555)	330	Q <sub>17</sub> , Q <sub>6</sub>	D, N, T	Segment/PNS devel.
Engrailed (P02836)	552	Q <sub>11</sub> , A <sub>14</sub> , A <sub>6</sub> , S <sub>7</sub>	D, N, T	Intrasegment devel.
P62/RM62 (P19109)	575	G <sub>6</sub> , G <sub>7</sub> , G <sub>5</sub> , G <sub>6</sub> , G <sub>7</sub> , G <sub>8</sub>	—	RNA helicase
C/EBP (Q02637)	444	Q <sub>20</sub> , G <sub>5</sub> , Q <sub>5</sub>	D, T	Border cell migration
Prospero (P29617)	1407	A <sub>6</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , N <sub>7</sub> , N <sub>5</sub> , D <sub>5</sub> , Q <sub>18</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>24</sub> , P <sub>7</sub>	D, N, T	Embryonic CNS devel.
Female sterile homeotic (P13709)	2038	A <sub>14</sub> , S <sub>7</sub> , S <sub>7</sub> , Q <sub>10</sub> , Q <sub>17</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>11</sub> , A <sub>6</sub> , S <sub>7</sub> , S <sub>5</sub> , A <sub>6</sub> , G <sub>5</sub> , G <sub>8</sub> , G <sub>6</sub>	D	Oogenesis, regulates homeotic genes
RBP-J kappa (P28159)	594	Q <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>14</sub> , N <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub>	D, N, T	Suppressor of hairless
Maternal Pumilio (P25822)	1533	A <sub>6</sub> , G <sub>7</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>8</sub> , Q <sub>13</sub> , A <sub>11</sub> , Q <sub>15</sub> , A <sub>11</sub> , Q <sub>6</sub> , A <sub>10</sub> , A <sub>6</sub>	D	Anter./post. devel.
Ftz-F1 (P33244)	1043	Q <sub>9</sub> , A <sub>6</sub> , T <sub>5</sub> , N <sub>7</sub> , N <sub>7</sub> , T <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , G <sub>9</sub> , G <sub>5</sub> , G <sub>6</sub>	D, T	Activation of <i>Ftz</i>
DSX, male (P23023)	549	A <sub>8</sub> , A <sub>6</sub> , H <sub>5</sub> , G <sub>9</sub> , P <sub>6</sub>	D, T	Controls sexual diff.
ELAV (P16914)	483	A <sub>6</sub> , A <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , A <sub>6</sub>	D, N	Nerve development
Deformed (P07548)	590	G <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , N <sub>5</sub> , N <sub>11</sub> , N <sub>7</sub>	D, N, T	Regulates segmentation
DGK (Q01583)	517	S <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>13</sub> , Q <sub>6</sub>	—	Signal transduction
Knirps (P10734)	429	A <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , A <sub>6</sub> , S <sub>6</sub>	D, T	Abdominal segmentation
Orthodenticle (P22810)	671	Q <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>7</sub> , G <sub>10</sub>	D, N, T	Segmentation (head)
Topoisomerase I (P30189)	972	H <sub>6</sub> , S <sub>7</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>6</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>8</sub> , S <sub>6</sub> , D <sub>5</sub>	—	Alters DNA supercoiling
Eyes absent (Q05201)	766	Q <sub>7</sub> , Q <sub>9</sub> , G <sub>5</sub> , A <sub>6</sub> , A <sub>7</sub> , A <sub>7</sub>	D, T	Eye development
Antennapedia (P02833)	378	Q <sub>9</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub>	D, T	Anter./post. devel.
Cut (P10180)	2175	A <sub>5</sub> , A <sub>9</sub> , Q <sub>7</sub> , A <sub>9</sub> , N <sub>7</sub> , N <sub>6</sub> , N <sub>5</sub> , A <sub>11</sub> , Q <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>7</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>7</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>8</sub> , P <sub>6</sub> , S <sub>6</sub>	D, N, T	Embryonic CNS devel.
Hairless (Q02308)	1077	N <sub>5</sub> , T <sub>5</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>7</sub> , A <sub>9</sub> , A <sub>10</sub> , A <sub>8</sub>	D, N, T	Sense organ/PNS devel.
Polycomb (P26017)	390	H <sub>10</sub> , H <sub>8</sub>	D, N	Regulates homeotic genes
Polyhomeotic-proximal chromatin (P39769)	1589	Q <sub>7</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>7</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub> , Q <sub>7</sub> , Q <sub>6</sub> , T <sub>6</sub>	D, T	Regulates segment development
Disconnected (P23792)	568	A <sub>6</sub> , P <sub>5</sub> , A <sub>8</sub> , H <sub>7</sub>	D, N, T	Embryonic nerve devel.
5HT-receptor (P28285)	834	N <sub>5</sub> , T <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , G <sub>5</sub> , A <sub>5</sub> , Q <sub>8</sub>	N	Serotonin receptor
Shaker-ε (P08513)	656	Q <sub>6</sub> , Q <sub>7</sub> , Q <sub>11</sub> , Q <sub>5</sub>	D, N	Voltage-dep. K <sup>+</sup> channel
Labial (P10105)	635	Q <sub>5</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>6</sub> , Q <sub>6</sub> , G <sub>6</sub>	D, T	Anter./post. devel.
GRH/ELF1 (P13002)	1063	Q <sub>9</sub> , A <sub>8</sub> , Q <sub>17</sub> , Q <sub>5</sub> , Q <sub>7</sub>	D, T	Nerve devel /cuticle

Tomado de Karlin y Burge, 1995

### 5.2.3 Genes blanco

Los productos de los genes homeóticos ó Hox son factores transcripcionales que controlan principalmente la formación de segmentos específicos de tejido mediante la regulación transcripcional de genes localizados río abajo “downstream” denominados

genes blanco. Estos genes son activados por algunas proteínas y reprimidos por otras, algunos requieren de una sola homeoproteína ó combinaciones de homeoproteínas mediante la formación de homodímeros, heterodímeros, tetradímeros, etc. que activarían diferencialmente los genes blanco en los diferentes tejidos (McCormick *et al.* 1995). A la fecha se conocen los siguientes genes que están bajo la regulación de Antp: *teashirt* (McCormick *et al.* 1995), *apterus* (Capoville *et al.* 2001), *grain* (Brown *et al.*, 2000), *Scr* (Andrew *et al.*, 1994), *Salm* (Jürgens *et al.* 1988), *decapentaplegic* (Manak *et al.*, 1995) y *dan* (Emerald *et al.* 2003).

Los genes homeóticos *teashirt* (*tsh*) y *Sex-comb reduced* (*Scr*) se expresan normalmente en los parasegmentos 3-13 del tronco y segmentos labial-T1 del embrión de *D. melanogaster* respectivamente (Röder *et al.* 1992, McCormick *et al.*, 1995). La sobre-expresión de Antp, utilizando potenciadores específicos de tejido o un promotor de choque térmico, activa ectópicamente *tsh* en la región anterior del embrión (Roder *et al.* 1992; Zeng *et al.* 1993; Shiga *et al.* 2002; Papadopoulos *et al.*, 2011) y reprime la expresión endógena de *Scr*, *labial* (*Lab*) y *Proboscipedia* (*pb*) mediante mecanismos moleculares aún no determinados (Gibson *et al.* 1989; Miller *et al.* 2001; Sprecher *et al.*, 2004). Por otro lado, los genes *Spalt major* (*Salm*) y *distal antenna* (*dan*) codifican para proteínas nucleares que son expresadas solamente en discos imaginales ojo-antena, mientras que el gen *grain* (*grn*) codifica para un factor de transcripción GATA (GATAc) que se expresa normalmente en el disco imaginal de la pata. Estudios previos han demostrado que la expresión ectópica de Antp ocasiona la represión de *Salm* y *dan*, así como la activación de *grn* en la antena para generar la notable transformación fenotípica del segmento distal A3 y la arista en tarso (Wagner-Bernholz, 1991; Emerald *et al.*, 2003; Grieder *et al.* 2009).

#### 5.2.4 Regulación génica

La regulación de los genes homeóticos esta dada tempranamente por los genes maternos y de segmentación que delimitan la expresión de estos genes en dominios espaciales específicos a lo largo del eje anteroposterior durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* (Ingham y Martinez-Arias, 1986; Harding y Levine, 1988; Irish *et al.*, 1989). Posteriormente, el patrón inicial de expresión de los genes homeóticos es modulado y refinado por interacciones cross-regulatorias entre los mismos genes que conforman los complejos Antennapedia (ANT-C) y Bithorax (BX-C; Hafen *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1985; Adachi *et al.*, En preparación). La correcta expresión espacial de los complejos ANT-C y BX-C es además dependiente de una clase de genes denominados grupos Polycomb (Pc-G) y Trithorax (Trx-G) que actúan modulando la

estructura de la cromatina reprimiendo ó activando estos genes homeóticos (Schuettengruber *et al.*, 2007).

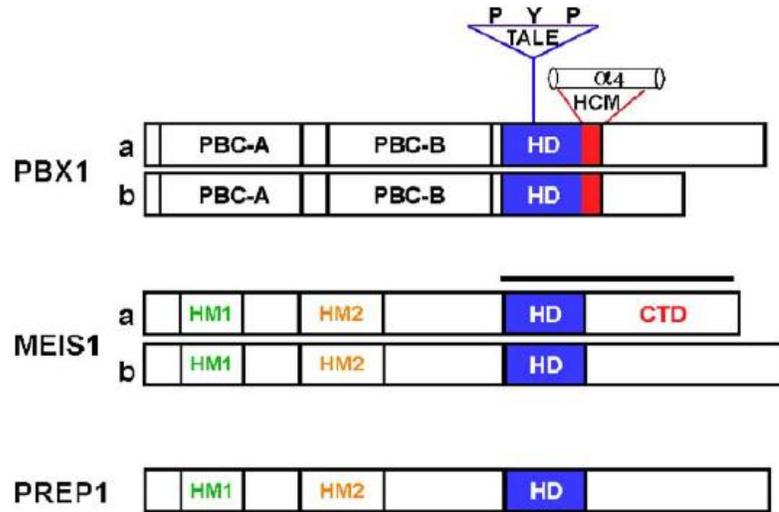
En el caso del gen homeótico *Antp* la regulación inicia a nivel de sus promotores P1 y P2 que presentan sitios de unión para la proteína Polycomb (Zink *et al.*, 1991). El transcrito del promotor P1 es necesario para el desarrollo del tórax dorsal, mientras que el transcrito de P2 es requerido para el desarrollo del tórax ventral y viabilidad embrionaria (Bermingham *et al.*, 1990). La transcripción del promotor P1 es además activada por la proteína Kruppel y reprimida por las homeoproteínas Ultrabithorax y Abdominal A, mientras que la proteína producida por el promotor P2 es activada por las proteínas Hunchback y fushi tarazu e inhibida por la proteína Oskar (Boulet y Scott, 1988; Irish *et al.*, 1989). La represión de *Antp* por Ultrabithorax y AbdominalA es conocida como supresión fenotípica o prevalencia posterior, mediante la cual los genes homeóticos posteriores reprimen la expresión de los genes anteriores. *Antp* también es regulada negativamente por Distal-less, spineless y dachshund para el correcto desarrollo de los elementos distales de la pata (Emerald *et al.*, 2003).

### **5.2.5 Interacciones moleculares**

El análisis *in vitro* muestra que las proteínas homeóticas/Hox purificadas presentan una débil capacidad de unión al DNA y el alto grado de conservación evolutiva de sus homeodominios resulta en una baja especificidad de secuencia (Hoey and Levine, 1988), por lo que surge la pregunta de cómo estas proteínas adquieren su especificidad para la regulación génica *in vivo*. Los resultados obtenidos por Mann y cols. revelan que esta especificidad de unión al DNA de las homeoproteínas es modificada mediante interacciones con otras proteínas que también se unen al DNA y actúan como co-factores o colaboradores (Mann, 1995; Mann y Affolter, 1998; Mann y Chan, 1996; Mann *et al.*, 2009).

Extradenticle (Exd) fue el primer co-factor identificado en *Drosophila* que presenta interacción molecular con las proteínas Hox u homeoproteínas. La mutación en *Exd* ocasiona la transformación homeótica de diferentes segmentos corporales de la mosca sin alterar el patrón de expresión de los genes homeóticos (Peifer y Wieschaus, 1990; Rauskolb *et al.*, 1993). La proteína Exd contiene un homeodominio divergente relacionado con la proteína Pbx1 de vertebrados, la cual fue identificada originalmente en el estudio de la translocación cromosomal t(1:19) relacionada con la leucemia linfoblástica (Kamps *et al.*, 1990; Nourse *et al.*, 1990; Rauskolb *et al.*, 1993). Ambas proteínas pertenecen a la subclase PBC de las proteínas con homeodominio TALE (por

sus siglas en inglés: three amino acid loop extensión) porque contienen el motivo conservado PBC en el extremo N-terminal del homeodominio (Fig. 10; Burglin, 1997 y 1998; Moens y Selleri, 2006).



Tomado de Moens y cols. 2006

**Figura 10. Estructura de las proteínas con homeodominio TALE.** El esquema muestra las proteínas que comprenden las clases PBC y MEIS de cofactores TALE, donde a y b corresponden a las isoformas de Pbx y Meis. Estas proteínas contienen un homeodominio divergente con una extensión de tres aminoácidos (TALE) en el loop entre las hélices alfa ( $\alpha$ ) I y II. El motivo TALE presenta comúnmente los aminoácidos Prolina (P) – Tirosina (Y) – Prolina (P) que contactan al hexapéptido de las proteínas Hox. Las proteínas Pbx presentan adicionalmente una cuarta hélice  $\alpha$  en el extremo C-terminal del homeodominio ( $\alpha$ 4; HCM). Los dominios PBC-A y PBC-B están altamente conservados entre las proteínas Exd, Pbx y Ceh-20 donde el dominio PBC-A presenta interacción con las proteínas Meis/Prep. Similarmente, los dominios HM1 y HM2 están conservados en las proteínas Meis/Prep para la interacción con Pbx. El homeodominio y dominio CTD de las proteínas Meis (línea color negro) es requerido en la interacción con los genes Hox paralogos de Abdominal B.

La interacción con las proteínas Hox esta mediada por la extensión de los tres aminoácidos TALE (PYP: Prolina-Tirosina-Prolina) del homeodominio de Exd/Pbx1 y el aminoácido Triptófano del hexapéptido N-Y/F-P/D-W-M-K/R del extremo N-terminal del homeodominio de todas las proteínas Hox, excepto los genes paralogos de los grupos 11 al 13 (Chang *et al.*, 1995; Knoepfler and Kamps, 1995; Neuteboom *et al.*, 1995; Passner *et al.*, 1999; Phelan *et al.*, 1995; Piper *et al.*, 1999). Sin embargo, el análisis *in vivo* e *in vitro* del hexapéptido en las homeoproteínas Ultrabithorax y Abdominal A revela que la interacción con Exd requiere del dominio UbdA en ausencia del hexapéptido (Galant *et al.*, 2002; Merabet *et al.*, 2003). Es importante mencionar que el cofactor Exd/Pbx presenta además funciones independientes de genes *Hox*, por

ejemplo su interacción con las proteínas MyoD que participan en la diferenciación del músculo (Berkes *et al.*, 2004).

Las proteínas Homothorax (Hth), Meis y Prep de moscas ó vertebrados también pertenecen al grupo de co-factores con homeodominio TALE, específicamente la clase MEIS (Fig. 10; Burglin, 2005). Estas proteínas modulan la actividad de las homeoproteínas mediante su interacción con el complejo Hox-DNA de manera independiente al hexapéptido y regulan la actividad de Exd/Pbx promoviendo su localización nuclear y estabilidad en ausencia DNA (Moens *et al.*, 2006). Los dominios HM1 y HM2 están altamente conservados entre las proteínas Meis/Prep y son requeridos para la interacción con el dominio PBC-A de Pbx (Ryoo *et al.*, 1999; Burglin, 1997; Mann y Affolter, 1998), así como el dominio C-terminal (CTD) es necesario para la interacción con los genes paralogos de AbdB (Williams *et al.*, 2005).

Además de los co-factores de la familia TALE, las proteínas Hox interaccionan con otras proteínas que contienen homeodominio así como factores transcripcionales generales para la regulación de la actividad Hox. Un ejemplo es la interacción de la proteína de homeodominio Engrailed (En) con Ubx ó AbdA para la represión del elemento *Distal-less* en los compartimentos posteriores de los segmentos abdominales (Gebelein y Mann, 2007). La interacción entre las homeoproteínas Antp y Pax6 Eyeless es mediada específicamente por el aminoácido Glutámico 19 de la hélice I de sus homeodominios (Plaza *et al.*, 2008). La subunidad  $\beta$  del factor transcripcional general TFIIE (TFIIE $\beta$ ) que pertenece al complejo de pre-iniciación de la transcripción también reconoce los homeodominios de Antp y AbdB en ensayos *in vitro* (Zhu y Kuziora, 1996). Similarmente, el factor transcripcional general BIP2 (TAF155), región aminoacídica 2-235, presenta interacción con el motivo YPWM de la homeoproteína Antp para la transformación homeótica ojo-ala (Prince *et al.*, 2008). BIP2 comúnmente esta asociado con la proteína de unión a la caja TATA (TBP) en TFIID (Gangloff *et al.*, 2001). Las regiones aminoacídicas de Antp y factores transcripcionales generales así como otras homeoproteínas que participan en estas interacciones moleculares serán analizadas detalladamente en el presente trabajo.

### 5.3 Transcripción

La transcripción es el proceso encargado de la síntesis de una molécula de RNA a partir de la información genética contenida en la región codificante de un DNA (Luque y Herráez, 2001). Es decir, dar lugar a una “copia” de RNA (con secuencia no idéntica, sino complementaria y antiparalela) a partir de una secuencia “molde” en una de las

hebras del DNA. Se trata de un proceso enzimático catalizado en todos los organismos por una enzima RNA polimerasa (polimerasa de RNA dependiente de DNA ó transcriptasa).

En eucariotas, el transcrito primario o RNA resultante de la transcripción experimenta en el núcleo la maduración o procesamiento postranscripcional. Los RNAs maduros se transportan luego al citosol para participar en la traducción. Existe una separación espacial y temporal entre transcripción y traducción, que supone una regulación más compleja de la expresión génica, contribuyendo así a la riqueza en variedad y función de las células eucariotas. Este control se lleva a cabo en gran medida por regulación de la actividad de la RNA polimerasa II (RNAPol-II) durante la etapa de iniciación. Esta enzima es mucho más compleja que la RNA polimerasa de procariontes ya que presenta una masa molecular aproximada de 600 kDa y esta formada por 10-12 subunidades denominadas Rpb1-12 (Lee and Young, 2000). Los genes Rpb (1-12) de humano y levadura presentan una alta homología estructural y funcional de manera que pueden sustituirse entre sí (Woychik, 1998). La subunidad mayor de la RNAPol-II (hRPB1) contiene además un dominio C-terminal (llamado CTD; C-terminal domain) con múltiples repeticiones (52 en humano) de la secuencia Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Thr (Lee y Young, 2000; Corden, 1990; Young, 1991). Este dominio es esencial para la viabilidad en células de levadura y metazoarios (Allison *et al.*, 1988; Bartolomei *et al.*, 1988; Gerber *et al.*, 1995; Nonet *et al.*, 1987; Zehring *et al.*, 1988). El dominio CTD puede ser fosforilado en Ser y Thr por el factor transcripcional TFIIF, adquiriendo una elevada carga negativa, lo cual está relacionado con su función para la transición entre las fases de iniciación y elongación.

### **5.3.1 Regulación de la transcripción**

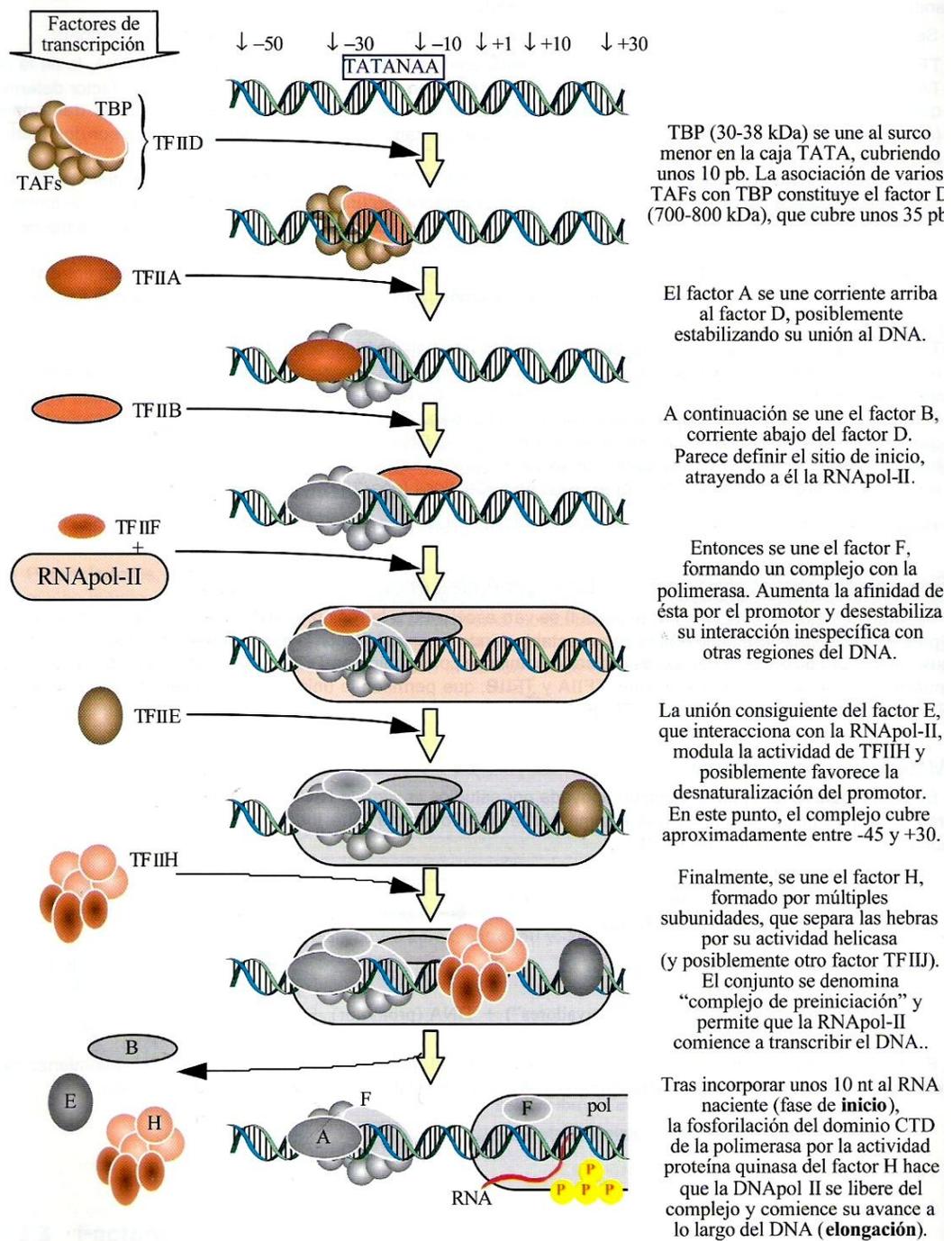
La expresión de la mayoría de los genes eucarióticos se controla al inicio de la transcripción por mecanismos conceptualmente muy similares a los encontrados en bacterias (Luque y Herráez, 2001). Esta regulación se centra en la interacción de los promotores con factores transcripcionales para la síntesis del RNA mensajero (RNAm) por la RNAPol-II. Un promotor o secuencia promotora es una región de DNA que regula el inicio de la transcripción de un gen y también se les denomina como factores que actúan *in cis* o factores *cis* por encontrarse en la misma molécula de DNA cuya expresión regulan. Los promotores clase II pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo con su acción y ubicación: promotores basales, proximales y distales. A cada promotor se puede unir un número variable de factores de transcripción (TF) que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la RNA polimerasa u otro factor

de la transcripción. Estos factores de transcripción también se denominan como factores que actúan en *trans* o factores *trans* porque sus genes están en posición alejada y no relacionada con la región génica cuya expresión regulan. La capacidad de unión a la molécula de DNA de estos factores *trans* esta generalmente mediada por la presencia de dominios estructurales que reconocen secuencias específicas de bases, por ejemplo dedos de zinc, homeodominios, HTH (hélice-giro-hélice), etc. Los homeodominios presentes en proteínas codificadas por los genes homeóticos (homeoproteínas) fueron previamente descritos (Sección 5.1).

### 5.3.2 Factores transcripcionales generales

Los factores transcripcionales que interaccionan con la RNAPol-II se pueden clasificar en proximales, inducibles y generales de acuerdo con su unión a uno de los tres tipos de secuencias o elementos promotores descritos anteriormente (Lee and Young, 2000). Los factores transcripcionales generales (GTFs) son factores de transcripción que reconocen los elementos basales de un promotor. Estos factores se denominaron TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Conaway y Conaway, 1997; Hampsey, 1998; Orphanides *et al.*, 1996; Reinberg *et al.*, 1998; Roeder, 1996). Son proteínas muy conservadas evolutivamente, que promueven la formación alrededor del punto de inicio del complejo de pre-iniciación que incluye el promotor basal, los GTFs y la RNAPol-II (Figura 11; Buratowski, 1994; Zawel y Reinberg, 1993). Se conocen las funciones de algunos de los factores transcripcionales generales asociados a la RNA polimerasa:

El complejo TFIID es el único con especificidad por una secuencia de DNA (caja TATA). Este factor también puede actuar sobre promotores que no contienen caja TATA y determina que la RNAPol-II actúe a una cierta distancia del promotor, definiendo el punto de inicio de la transcripción (+1). Tiene una masa molecular aproximadamente de 800kDa y esta formado por dos tipos de componentes: una molécula de TBP (TATA Binding protein) que confiere a TFIID la capacidad de reconocimiento del promotor con la particularidad de unirse al surco menor del DNA provocando la flexión de la molécula de DNA (Kim *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993b) y varias moléculas de factores asociados a TBP (TAFs) que son subunidades de 30 a 250 kDa involucradas en la selección del promotor (Burley y Roeder, 1996; Goodrich y Tijan, 1994; Green, 2000; Lee y Young, 1998; Verrijzer y Tijian, 1996).



Tomado de Luque y Herráez, 2001

**Figura 11. Formación del complejo de pre-iniciación en la transcripción.** El esquema muestra la secuencia de unión de los factores transcripcionales generales y la RNAPol-II en el elemento promotor durante la etapa de iniciación de la transcripción. A la izquierda se muestran los factores que componen la maquinaria transcripcional basal y a la derecha se describen cada una de las funciones de los diferentes factores transcripcionales.

El factor transcripcional TFIIA se une con TBP para estabilizar la interacción TBP-DNA (Buratowski, 1994; Imbalzano *et al.*, 1994). TFIIA presenta además interacción con numerosos activadores transcripcionales (Ozer *et al.*, 1994; Yokomori *et al.*, 1994) y antagoniza la represión transcripcional mediante el desplazamiento físico de represores o bloqueando su unión con el complejo TFIID. Posteriormente, el factor TFIIB participa en la selección de los sitios de inicio de la transcripción, unión de la RNA polimerasa II e interacción con activadores transcripcionales. Estos activadores reclutan TFIIB al promotor ó inducen un cambio conformacional en éste factor. El análisis estructural del complejo de pre-iniciación muestra que la distancia entre TFIIB y el sitio catalítico de la RNAPol II es de aproximadamente 32 pb que es la distancia promedio entre la caja TATA del promotor y sitio de inicio de la transcripción (Lee y Young, 2000).

El factor TFIIE contiene un dominio de dedos de zinc que presenta interacción con el DNA (Qian *et al.*, 1993) y participa en la apertura del promotor durante la transcripción. Este factor también favorece la actividad CTD quinasa y ATPasa de TFIIH. El requerimiento *in vitro* e *in vivo* de TFIIE es dependiente del plegamiento ó estabilidad del promotor por lo que no esta presente en todos los complejos de pre-iniciación (Lee *et al.*, 2000). TFIIE está constituido por subunidades alpha y beta, específicamente la subunidad beta (TFIIE $\beta$ ) es crucial para la transcripción basal y activada, además su extremo C-terminal posee dos regiones básicas que interactúan con TFIIB y TFIIF $\beta$  durante la formación del PIC (Okamoto *et al.*, 1998). Por otro lado, el factor transcripcional TFIIH es particularmente importante por su triple actividad enzimática, ATPasa DNA-dependiente, helicasa ATP-dependiente y CTD quinasa por distintas subunidades. La helicasa (subunidades XPB y ERCC3) está implicada en la separación de las hebras del DNA en el sitio de inicio (Guzman y Lis, 1999; Kimmelman *et al.*, 1999), mientras que como quinasa fosforila el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNAPol-II (CTD) provocando un cambio conformacional que induce el comienzo de la elongación de la molécula de RNA.

Los antecedentes muestran evidencia de que las proteínas Hox u homeoproteínas actúan como activadores o represores transcripcionales mediante la interacción selectiva con cofactores de diferente naturaleza (TALE, homeoproteínas, GTFs, etc) por mecanismos no determinados a la fecha. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente tesis es analizar las interacciones moleculares de la homeoproteína Antennapedia y sus dominios funcionales YPWM, polyQ y HD con factores generales de la maquinaria transcripcional basal y las homeoproteínas AbdB y Exd para el mejor entendimiento del complejo mecanismo de regulación génica de los genes blanco de Antp durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Construcción de plásmidos recombinantes para determinar la interacción de Antp y YPWM con factores transcripcionales

#### 6.1.1 Construcción de plásmidos para ensayos de transactivación

##### 6.1.1.1 Plásmidos pPAC-factores transcripcionales

Para analizar la interacción de la homeoproteína Antp y su tetrapéptido YPWM con la maquinaria transcripcional basal mediante ensayos de transactivación se realizó la construcción de plásmidos pPAC codificantes a los factores transcripcionales generales TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP<sub>2-89</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$  u homeoproteínas Exd y AbdB como se describe a continuación.

##### 6.1.1.1.1 pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$ y pPACBIP<sub>2-89</sub>

La construcción de los plásmidos recombinantes pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$  y pPACBIP<sub>2-89</sub> requirió inicialmente la clonación de las secuencias codificantes de los factores transcripcionales TBP, TFIIA $\gamma$  y BIP<sub>2-89</sub> en el plásmido comercial pEGFP-N3 para la obtención de un nuevo sitio de restricción *Bgl*III en el extremo 3'.

La preparación del vector se realizó mediante la digestión del DNA plasmídico pEGFP-N3 (4.7 Kb) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Las secuencias codificantes de los factores TBP (1032 pb), TFIIA $\gamma$  (269 pb) y BIP<sub>2-89</sub> (305 pb) fueron producto de la digestión de los plásmidos pGEX-hTBP (Lee *et al.*, 1991), pGEX-hTFIIA $\gamma$  (Ozer *et al.*, 1994) y pGEX-BIP<sub>2-89</sub> (Gangloff *et al.*, 2011) con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. La reacción de ligación del vector pEGFP-N3 y factores transcripcionales (relación molecular 1:10) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$

colonias/ $\mu\text{g}$  de DNA) para la obtención de los plásmidos pEGFP-TBP, pEGFP-TFIIA $\gamma$  y pEGFP-BIP2<sub>2-89</sub>.

Los plásmidos pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$  y pPACBIP2<sub>2-89</sub> fueron posteriormente contruidos mediante la linearización del vector pPAC (6357 pb) con la enzima de restricción *Bam*HI. Los insertos TBP (1032 pb), TFIIA $\gamma$  (269 pb) y BIP2<sub>2-89</sub> (205 pb) fueron purificados de los plásmidos pEGFP-TBP, pEGFP-TFIIA $\gamma$  y pEGFP-BIP2<sub>2-89</sub> digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II. La purificación del vector e insertos se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo al protocolo de purificación descrito por la casa comercial (Promega, Madison, WI, USA). Las reacciones de ligación del vector pPAC-inserto (relación molecular 1:8) se utilizaron en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu\text{g}$  de DNA) para la obtención de clonas recombinantes a las cuales se extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$  y pPACBIP2<sub>2-89</sub> fueron posteriormente caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Hinc*II, *Sac*I y *Hind*III (Apéndice II, Figs. 30B-D) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

#### **6.1.1.1.2 pPACTFIIB, pPACTFIIIE $\beta$ y pPACAbdB**

En la construcción de los plásmidos recombinantes pPACTFIIB, pPACTFIIIE $\beta$  y pPACAbdB se diseñaron seis oligonucleótidos sintéticos para la amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes de los factores transcripcionales TFIIIB, FIIIE $\beta$  y AbdB a partir de los DNAs plasmídicos pET5-6His-TFIIIB (Yamashita *et al.*, 1992), pET3-TFIIIEbeta (Sumimoto *et al.*, 1991) y pCS2VNm9AbdBHD (Adachi *et al.*, 2012). Utilizando los primers IIB5 y IIB3 se llevo a cabo la amplificación del fragmento correspondiente al factor TFIIIB (969 pb) con una temperatura de 55.1 °C. La amplificación del factor FIIIE $\beta$  (905 pb) se realizó con los primers IIE5, IIE3 y una temperatura de 55.1°C. Los primers AbdHD5 y AbdHD3 permitieron la amplificación del fragmento correspondiente al homeodominio de AbdB (251 pb) con una temperatura de 58.3°C. Los programas de PCR utilizados (E10: GRAD2) se describen en la Tabla III.

Los productos de PCR fueron posteriormente clonados en los vectores PCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y pGEM-T (Promega, Madison, WI.

USA) para la obtención de los plásmidos recombinantes pCRTOPO-TFIIB, pCRTOPO-TFIIIE $\beta$  y pGEM-AbdB. La digestión de estos plásmidos recombinantes con las enzimas de restricción *Bam*HI ó *Bgl*III permitió la purificación de los insertos TFIIB (969 pb), TFIIIE $\beta$  (905 pb) y AbdB (251 pb) utilizando el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). La ligación del vector pPAC previamente digerido con *Bam*HI e insertos (relación molecular 1:8) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA). Las clonas resultantes fueron sometidas a Minipreparación por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) para la extracción de los plásmidos recombinantes pPACTFIIB, pPACTFIIIE $\beta$  y pPACAbdB los cuales fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Bgl*III, *Pvu*II, *Xba*I, *Hind*III y *Eco*RI (Apéndice II, Figs. 31A, B y D) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

**Tabla III. Programa de PCR para la amplificación de TFIIB, TFIIIE $\beta$  y AbdB**

E10: GRAD 2				
	<i>Tiempo</i>	<b>TFIIB</b>	<b>TFIIIE<math>\beta</math></b>	<b>AbdB</b>
		<i>Temperaturas</i>		
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	2 min	94 °C	94 °C	94 °C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>				
Desnaturalización	30 seg	94 °C	94 °C	94 °C
Alineamiento	30 seg	55.1 °C	55.1 °C	58.3 °C
Síntesis	30 seg	72 °C	72 °C	72 °C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	72 °C	72 °C	72 °C

### 6.1.1.1.3 pPACExd<sub>144-376</sub>

En la construcción del plásmido recombinante pPACExd<sub>144-376</sub> se utilizó el vector pPAC previamente digerido con la enzima *Bam*HI. La preparación del inserto codificante para la región aminoacídica 144-376 de la homeoproteína Exd (1855 pb) es producto de la digestión del plásmido pPACTGAL4-Exd<sub>144-376</sub> (Cárdenas-Chávez, 2007) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*III. La reacción de ligación del vector pPAC-inserto a una relación molecular 1:4 fue transformada en bacterias *E. coli* DH5a calcio-competentes que mostraron una clona positiva para el plásmido pPACExd<sub>144-376</sub> que fue posteriormente caracterizado mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I y *Hind*III (Apéndice II, Fig. 31C).

## 6.1.2 Construcción de plásmidos para ensayos BiFC

### 6.1.2.1 Plásmidos pCS2VNm9-factores transcripcionales

Los plásmidos pCS2VNm9 y pCS2VC155 requeridos en los ensayos BiFC fueron proporcionados amablemente por el Dr. Smith (Saka *et al.*, 2007) para dirigir la expresión de los fragmentos N-terminal (VNm9) y C-terminal (VC155) de la proteína fluorescente Venus (Apéndice II, Fig. 32A). La identidad de estos plásmidos fue confirmada mediante digestión con las enzimas de restricción *PstI*, *HincII*, *BamHI* y *XbaI* (Apéndice II, Figs. 32B y C) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

Para la fusión del fragmento no fluorescente VNm9 con los factores transcripcionales generales u homeoproteínas (Apéndice II, Fig. 4B) se diseñaron cinco oligonucleótidos sintéticos que permitieron la amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes de los factores TFIIA $\gamma$ , TFIIB, TFIIE $\beta$ , TBP, Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> (Apéndice II, Fig. 33A). Los DNAs plasmídicos pPACTFIIA $\gamma$ , pPACTFIIB, pPACTFIIE $\beta$ , pPACTTBP, pPACExd<sub>144-376</sub> y pPACBIP2<sub>2-89</sub> fueron utilizados como DNA templado en la reacciones de PCR. El uso de los oligonucleótidos VNm5 y VNm3 permitió la amplificación de los fragmentos TFIIA $\gamma$  (394 pb), TFIIB (1016 pb) y TFIIE $\beta$  (950 pb) con una temperatura media óptima de 66.8°C, 66.3°C y 63.0°C respectivamente. La amplificación de los fragmentos Exd<sub>144-376</sub> (745 pb) y TBP (1054 pb) se realizó utilizando los oligonucleótidos VNm5 y Exd3 ó TBP3 con las temperaturas 66.8°C y 63.2°C. Los oligonucleótidos BIP25, VNm3 y una temperatura de alineamiento de 63.2°C se emplearon en la amplificación del fragmento BIP2<sub>2-89</sub> (311 pb). El programa de temperaturas utilizadas (E10: GTF) se describe en la Tabla IV.

**Tabla IV. Programa de PCR para la amplificación de factores transcripcionales y homeoproteínas**

E10: GRAD 2						
	<i>Tiempo</i>	<b>TFIIA<math>\gamma</math></b>	<b>TFIIB</b>	<b>TFIIE<math>\beta</math></b>	<b>Exd</b>	<b>TBP/BIP2</b>
		<i>Temperaturas</i>				
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	2 min	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>						
Desnaturalización	30 seg	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
Alineamiento	30 seg	66.8°C	63.6°C	63.0°C	66.8°C	63.2°C
Síntesis	30 seg	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C

Los productos de PCR fueron posteriormente clonados en el vector PCR®2.1-TOPO® de acuerdo al protocolo de clonación de la casa comercial (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para la obtención de los plásmidos pCRTOPO-Exd<sub>144-376</sub>, pCRTOPO-TBP, pCRTOPO-TFIIB y pCRTOPO-TFIIE $\beta$  que serán utilizados en la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9-factores transcripcionales como se describe a continuación.

#### **6.1.2.1.1 pCS2VNm9BIP2<sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$**

En la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9BIP2<sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$  la preparación del vector se realizó mediante digestión del plásmido pCS2VNm9 (4566 pb) con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI* para su posterior purificación con el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente, se realizó la digestión de los productos amplificados de BIP2<sub>2-89</sub> (311 pb) y TFIIA $\gamma$  (394 pb) con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. La ligación del vector pCS2Vnm9 con los productos digeridos BIP2<sub>2-89</sub> y TFIIA $\gamma$  (relación molecular 1:8) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA). La transformación mostró dos clonas positivas para los plásmidos pCS2VNm9BIP2<sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$  que fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *BamHI*, *PvuII* y *HindIII* (Apéndice II, Figs. 33C y D).

#### **6.1.2.1.2 pCS2VNm9Exd<sub>144-376</sub> y pCS2VNm9TBP**

En la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9Exd<sub>144-376</sub> y pCS2VNm9TBP los insertos codificantes para los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> (730 pb) y TBP (1039 pb) fueron purificados de los plásmidos pCRTOPO-Exd<sub>144-376</sub> y pCRTOPO-TBP digeridos con las enzimas *AgeI* y *XbaI*. Las reacciones de ligación del vector pCS2VNm9-inserto con una relación molecular 1:5 se utilizaron en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA) para la obtención de clonas recombinantes a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos pCS2VNm9Exd<sub>144-376</sub> y pCS2VNm9TBP fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI*, *PvuII*, *HindIII* y *XbaI* (Apéndice II, Figs. 34A y B) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

### 6.1.2.1.3 pCS2VNm9TFIIB y pCS2VNm9TFIIEβ

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9TFIIB y pCS2VNm9TFIIEβ se utilizó el vector pCS2VNm9 previamente digerido con las enzimas *AgeI* y *XbaI*. La preparación de los insertos TFIIB (995 pb) y TFIIEβ (929 pb) se realizó a partir de los plásmidos pCRTPOPO-TFIIB y pCRTPOPO-TFIIEβ digeridos con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. La ligación del vector-inserto TFIIB ó TFIIEβ con una relación molecular 1:5 fue transformada en bacterias *E. coli* DH5α calcio competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu\text{g}$  de DNA). La transformación mostró una clona positiva para el plásmido pCS2VNm9TFIIB que fue caracterizado mediante digestión con las enzimas diagnósticas *HindIII*, *BamHI* y *PvuII* (Apéndice II, Fig. 34C). La transformación de la reacción de ligación pCS2VNm9-TFIIEβ resultó en una clona positiva cuyo DNA plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI*, *PvuII*, *HindIII* y *XbaI* para confirmar su identidad (Apéndice II, Fig. 34D).

### 6.1.2.2 Plásmidos pCS2VC155-Antp y mutantes

El análisis de interacción mediante ensayos BiFC requirió también la fusión del fragmento no fluorescente VC155 con la homeoproteína Antp ó mutantes en el tetrapéptido YPWM mediante la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp, pCS2VC155Antp<sup>AAAA</sup> y pCS2VC155AntpΔHD como se describe a continuación.

Las secuencias codificantes para las proteínas Antp y mutantes fueron obtenidas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos sintéticos VCA<sub>n</sub>5, VCA<sub>n</sub>3 y una temperatura media óptima de 58.9°C (Tabla V). Los plásmidos pNPACAntp, pNPACAntp<sup>AAAA</sup> y pNPACAntpΔHD (Cárdenas-Chávez, 2007) se emplearon como DNA templado en las diferentes reacciones de PCR. La amplificación generó los fragmentos de 1160 (Antp), 801 (AntpΔHD) y 1160 pb (Antp<sup>AAAA</sup>). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T para la obtención de los plásmidos pGEM-Antp, pGEM-Antp<sup>AAAA</sup> y pGEM-AntpΔHD de acuerdo al protocolo de clonación de la casa comercial (Promega, Madison, WI. USA).

La linearización del vector pCS2VC155 (4357 pb) se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI* para su posterior purificación con el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). La preparación de los insertos Antp (1147 pb), AntpΔHD (787 pb) y Antp<sup>AAAA</sup> (1147 pb) se

llevo a cabo mediante la digestión de los plásmidos pGEM-Antp, pGEM-Antp<sup>AAAA</sup> y pGEM-AntpΔHD con las enzimas *AgeI* y *SpeI* de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. La ligación del vector pCS2VC155-insertos (relación molecular 1:10) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5α calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu\text{g}$  de DNA) para la obtención de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp, pCS2VC155Antp<sup>AAAA</sup> y pCS2VC155AntpΔHD. La caracterización de estos plásmidos recombinantes se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *BamHI*, *SmaI*, *KpnI* y *PstI* (Apéndice II, Fig. 35B-D).

**Tabla V. Programa de PCR para la amplificación de Antp y mutantes**

E10: Antp y mutantes		
	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	2 min	94°C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>		
Desnaturalización	30 seg	94°C
Alineamiento	30 seg	58.9°C
Síntesis	30 seg	72°C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	72°C

## 6.2 Construcción de plásmidos recombinantes para analizar la interacción de YPWM fusionado a GAL4 con factores transcripcionales

Los plásmidos pPACTGAL4, pPACTGAL4<sup>YPWM</sup> y pPACTGAL4<sup>AAAA</sup> requeridos en los ensayos de transactivación para analizar específicamente la interacción del tetrapéptido YPWM con factores transcripcionales fueron previamente construidos a excepción de los plásmidos codificantes para las proteínas GAL4 y mutantes (GAL4<sup>YPWM</sup> ó GAL4<sup>AAAA</sup>) fusionadas al fragmento VC155 (Apéndice II, Fig. 7A) que son necesarios para los ensayos BiFC.

### 6.2.1 Plásmidos pCS2VC155-GAL4 y mutantes

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155GAL4, pCS2VC155GAL4<sup>YPWM</sup> y pCS2VC155GAL4<sup>AAAA</sup> se utilizó el vector pCS2VC155 previamente digerido con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. Las secuencias codificantes de las proteínas GAL4 y mutantes (GAL4<sup>YPWM</sup> ó GAL4<sup>AAAA</sup>) fueron

obtenidas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos sintéticos VCGA5, VCGA3 y una temperatura media óptima de 58.3°C (Tabla VI). Los plásmidos pPACTGAL4 (Fisher *et al.*, 1996), pPACTGAL4<sup>YPWM</sup> (Cárdenas-Chávez, 2003) y pPACTGAL4<sup>AAAA</sup> (Cárdenas-Chávez, 2007) fueron usados como DNA templado para las reacciones de PCR. La amplificación generó los fragmentos de 526 y 533 pb correspondientes para GAL4 y GAL4<sup>YPWM</sup> ó GAL4<sup>AAAA</sup> respectivamente. Los productos de PCR fueron clonados en los vectores pGEM-T (Promega, Madison, WI. USA) y pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para la obtención de los plásmidos pGEM-GAL4, pCRTOPO-GAL4<sup>YPWM</sup> y pCRTOPO-GAL4<sup>AAAA</sup>. Estos plásmidos fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción *AgeI* y *SpeI* para la purificación de los insertos GAL4 (526 pb), GAL4<sup>YPWM</sup> (533 pb) ó GAL4<sup>AAAA</sup> (533 pb) utilizando el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

**Tabla VI. Programa de PCR para la amplificación de GAL4 y mutantes**

E10: GAL4 y mutantes		
	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	2 min	94°C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>		
Desnaturalización	30 seg	94°C
Alineamiento	30 seg	58.3°C
Síntesis	30 seg	72°C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	72°C

Las reacciones de ligación de vector pCS2VC155-inserto (relación molecular 1:8) se utilizaron en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA) para la obtención de clonas recombinantes a las cuales se extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos pCS2VC155GAL4, pCS2VC155GAL4<sup>YPWM</sup> y pCS2VC155GAL4<sup>AAAA</sup> fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI* y *XhoI* (Apéndice II, Figs. 36B-D) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

## 6.3 Construcción de los genes sintéticos de Antp para su análisis de interacción con BIP2 y Exd

### 6.3.1 Plásmidos pNPAC-genes sintéticos de Antp

El análisis de interacción del tetrapéptido YPWM de los péptidos sintéticos de Antp con los factores transcripcionales BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> requirió la construcción de los plásmidos recombinantes pNPACSynthYPWM<sup>LL</sup>, pNPACSynthYPWM<sup>SL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>LL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>SL</sup>, pNPACSynthWRPW<sup>LL</sup> y pNPACSynthWRPW<sup>SL</sup> para su posterior co-transfección celular.

En la construcción de los plásmidos pNPACSynthYPWM<sup>LL</sup> y mutantes se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos AntpFORsynthetic, AntpREVsynthetic y una temperatura de alineamiento de 77.8°C para la amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes para los péptidos sintéticos SynthYPWM<sup>LL</sup> y mutantes (Tabla VII). Los productos de PCR fueron clonados en el vector comercial pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para la obtención de los plásmidos pCRTOPO-SynthYPWM<sup>LL</sup>, pCRTOPO-SynthYPWM<sup>SL</sup>, pCRTOPO-SynthAAAA<sup>LL</sup>, pCRTOPO-SynthAAAA<sup>SL</sup>, pCRTOPO-SynthWRPW<sup>LL</sup> y pCRTOPO-SynthWRPW<sup>SL</sup> que fueron posteriormente digeridos con la enzima de restricción *NotI* para la purificación de los insertos SynthYPWM<sup>LL</sup> (283 pb), SynthYPWM<sup>SL</sup> (271 pb), SynthAAAA<sup>LL</sup> (283 pb), SynthAAAA<sup>SL</sup> (271 pb), SynthWRPW<sup>LL</sup> (283 pb) y SynthWRPW<sup>SL</sup> (271 pb) respectivamente (Apéndice II, Fig. 37A).

Tabla VII. Programa de PCR para la amplificación de los péptidos sintéticos de Antp

E10: AntpSynth		
	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	5 min	94°C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>		
Desnaturalización	30 seg	94°C
Alineamiento	30 seg	77.8°C
Síntesis	1 min	68°C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	68°C

La preparación del vector pNPAC (6357 pb) se realizó mediante digestión del DNA plasmídico con la enzima de restricción *NotI*. La ligación del vector pNPAC con

los diferentes insertos a una relación molecular 1:20 fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA) que mostraron seis clonas positivas para los plásmidos pNPACSynthYPWM<sup>LL</sup>, pNPACSynthYPWM<sup>SL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>LL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>SL</sup>, pNPACSynthWRPW<sup>LL</sup> y pNPACSynthWRPW<sup>SL</sup> los cuales fueron caracterizados mediante digestión con la enzima de restricción *NdeI* (Apéndice II, Fig. 37B) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

#### **6.4 Construcción de plásmidos recombinantes para determinar la interacción de la región polyQ de Antp con TBP**

Para identificar la región del extremo N-terminal (polyQ) de Antp involucrada en la interacción con el factor transcripcional TBP se realizó la construcción de los plásmidos recombinantes pNPACAntp $\Delta$ Q1-2, pNPACAntp $\Delta$ Q2, pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2 que dirigen la expresión de las proteínas Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 individuales o fusionadas al fragmento no fluorescente VC155.

##### **6.4.1 pNPACAntp $\Delta$ Q1-2 y pNPACAntp $\Delta$ Q2**

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pNPACAntp $\Delta$ Q1-2 y pNPACAntp $\Delta$ Q2 se realizó la digestión de los DNAs plasmídicos pNPAC, pBSAntpQ1 y pBSAntpQ2 con la enzima de restricción *NotI* para la purificación del vector (6357 pb) e insertos Antp $\Delta$ Q1-2 (1585 pb) y Antp $\Delta$ Q2 (1732 pb) respectivamente. Las reacciones de ligación vector pNPAC-inserto (relación molecular 1:8) se emplearon en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes competentes para la obtención de clonas recombinantes a las cuales se extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos pNPACAntp $\Delta$ Q1-2 y pNPACAntp $\Delta$ Q2 fueron posteriormente caracterizados mediante digestión con las enzimas diagnósticas *NotI*, *EcoRI*, *PstI* y *SmaI* (Apéndice II, Figs. 38A y B).

##### **6.4.2 pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2**

En la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2 se realizó la amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes para las proteínas Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 utilizando los primers VCA<sub>n</sub>5,

VCA<sub>n</sub>3 y una temperatura media óptima de 58.9°C (Tabla VIII). La amplificación generó los insertos de 935 (Antp $\Delta$ Q1-2) y 1082 pb (Antp $\Delta$ Q2) que fueron digeridos con las enzimas de restricción *AgeI* y *SpeI* y posteriormente purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). La ligación del vector pCS2VC155 (4357 pb) con los diferentes insertos (relación molecular 1:10) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes para la obtención de los DNAs plasmídicos pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2 los cuales fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas *BamHI*, *SmaI* y *KpnI* (Apéndice II, Figs. 38C y D) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

**Tabla VIII. Programa de PCR para la amplificación de mutantes polyQ**

E10: mutantes polyQ		
	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<b>Etapa 1 (1 ciclo)</b>	2 min	94°C
<b>Etapa 2 (30 ciclos)</b>		
Desnaturalización	30 seg	94°C
Alineamiento	30 seg	58.9°C
Síntesis	30 seg	72°C
<b>Etapa 3 (1 ciclo)</b>	5 min	72°C

## 6.5 Construcción de plásmidos recombinantes para ensayos de interacción del HD de Antp con TFIIIE $\beta$

Para determinar la región del homeodominio (HD) responsable de la interacción de Antp con el factor transcripcional TFIIIE $\beta$  se llevo a cabo la construcción de los plásmidos recombinantes pPACAntp $\Delta$ H1-2, pPACAntp $\Delta$ H1, pCS2-VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1 que dirigen la expresión de las proteínas mutantes Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1 individuales o fusionadas al fragmento C-terminal de Venus (VC155).

### 6.5.1 pPACAntp $\Delta$ H1-2 y pPACAntp $\Delta$ H1

En la construcción de los plásmidos recombinantes pPACAntp $\Delta$ H1-2 y pPACAntp $\Delta$ H1 se llevo a cabo mutagénesis sitio-dirigida del plásmido pGEM-Antp para la obtención de los plásmidos mutagénicos pGEM-AntpKpnH2 y pGEMAntpKpnH1 que presentan un nuevo sitio de restricción *KpnI* en el extremo 3' de

la hélice II ó en el loop que conecta las hélices I y II. La mutagénesis se realizó empleando el kit QuikChange®XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, Ca. USA) y los oligonucleótidos sintéticos Mut $\alpha$ 1-2F, Mut $\alpha$ 1-2R, Mut $\alpha$ 1F y Mut $\alpha$ 1R. Los plásmidos pGEM-AntpKpnH2 y pGEM-AntpKpnH1 fueron digeridos con la enzima *KpnI* y los fragmentos de restricción obtenidos (4073 y 4117 pb) fueron re-ligados para la construcción de los plásmidos pGEM-Antp $\Delta$ H1-2 y pGEM-Antp $\Delta$ H1 que contienen la delección de las hélices I y II ó la hélice I del homeodominio de Antp. La digestión de los plásmidos pGEM-Antp $\Delta$ H1-2 y pGEM-Antp $\Delta$ H1 con las enzimas de restricción *SacII* y *SpeI* permitió la purificación de los insertos Antp $\Delta$ H1-2 (1077 pb) y Antp $\Delta$ H1 (1121 pb) con el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

La preparación del vector pPACRL (6416 pb) se realizó mediante la digestión del DNA plasmídico con las enzimas de restricción *SacII* y *XbaI*. La ligación del vector pPACRL e insertos a una relación molecular 1:8 fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA). La transformación mostró dos clonas positivas para los plásmidos pPACAntp $\Delta$ H1-2 y pPACAntp $\Delta$ H1 que fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI*, *PstI*, *KpnI* y *XbaI* (Apéndice II; Fig. 39A y B) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

### **6.5.2 pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1**

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1 se utilizó el vector pCS2VC155 previamente digerido con las enzimas *AgeI* y *XbaI*. La preparación de los insertos que codifican para las proteínas Antp $\Delta$ H1-2 (1073 pb) y Antp $\Delta$ H1 (1117 pb) se realizó mediante la digestión de los plásmidos pGEMAntp $\Delta$ H1-2 y pGEMAntp $\Delta$ H1 con las enzimas de restricción *AgeI* y *SpeI* para su posterior purificación con el kit Wizard ya descrito. Las reacciones de ligación pCS2VC155-inserto (relación molecular 1:10) fueron transformadas en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA) para la obtención de clonas recombinantes a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2 y pCS2VC155Antp $\Delta$ H1 fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción diagnósticas *SmaI*, *KpnI*, *PstI* y *BamHI* (Apéndice II; Figs. 39C y D).

## **6.6 Construcción de plásmidos recombinantes para el análisis de interacción de los HDs de Antp y AbdB**

Para analizar la transactivación e interacción de los homeodominios (HDs) de Antp y AbdB mediada por el aminoácido Glutámico 19 (E19) se realizó primeramente la construcción de los plásmidos recombinantes pNPACAntpG19 y pPACAbdBG19 que presentan la mutación E19G como se describe a continuación.

### **6.6.1 pNPACAntpG19**

La técnica de mutagénesis sitio dirigida permitió la sustitución del aminoácido Glutámico por Glicina (mutación E19G) en la posición 19 del homeodominio de Antp en el plásmido pNPACAntp y así construir el plásmido mutagénico pNPACAntpG19. Esta técnica se llevó a cabo utilizando el kit QuikChange®XL Site-Directed Mutagenesis y los oligonucleótidos sintéticos AntpG195 y AntpG193 de acuerdo al protocolo de la casa comercial (Stratagene, La Jolla, Ca. USA). La transformación de la reacción de mutagénesis en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio-competentes (Eficiencia  $\geq 1 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA) resultó en una clona positiva a la cual se extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989) para su posterior secuenciación (Apéndice II, Fig. 40A) y caracterización mediante digestión con la enzima de restricción diagnóstica *Cla*I.

### **6.6.2 pPACAbdBG19**

En la construcción del plásmido recombinante pPACAbdBG19 se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos AbdHD5 y AbdHD3 para la amplificación mediante PCR de la secuencia codificante al homeodominio de AbdB con la mutación E19G (AbdBG19). La amplificación generó un fragmento de 251 pb (AbdBG19) con una temperatura de alineamiento de 58.3 °C y el plásmido pCS2VNm9AbdBHD19 (Adachi *et al.*, 2012) como DNA templado. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI. USA) para la obtención del plásmido pGEM-AbdBG19. Posteriormente, la digestión de los plásmidos pPAC y pGEM-AbdBG19 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*III permitió la purificación del vector (6357 pb) e inserto AbdBG19 (246 pb) utilizando el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). La transformación de la reacción de ligación pPAC-AbdBG19 (relación molecular 1:8) resultó en una clona positiva cuyo DNA plasmídico fue caracterizado

mediante digestión con las enzimas de restricción *XbaI*, *PvuII* y *EcoRI* (Apéndice II, Fig. 40B) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

## **6.7 Análisis de Interacción mediante Ensayos de Transactivación en células Schneider**

### **6.7.1 Purificación de plásmidos recombinantes y reporteros**

La obtención de los plásmidos recombinantes y reporteros a mediana escala se realizó empleando el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, January 1997) cuyo protocolo se basa en un procedimiento descrito por el proveedor correspondiente a la técnica de Lisis Alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) seguido de la unión del DNA plasmídico a una resina (columna) de intercambio iónico bajo condiciones apropiadas de pH y sales. Finalmente, el DNA es eluido de la columna usando el Buffer QF y precipitado con un volumen de Isopropanol 100%. La pastilla de DNA fue lavada con 5 ml de Etanol 70% para posteriormente secarla a temperatura ambiente y resuspenderla en 1ml de H<sub>2</sub>O mQ estéril. La calidad y concentración de los DNAs plasmídicos obtenidos se analizó mediante medición de absorbancia con luz ultravioleta y visualización en electroforesis de geles de agarosa al 0.8%. Estos DNAs plasmídicos deben presentar una relación de absorbancia 260/280  $\geq$  1.8 y una concentración mayor de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para los ensayos de transactivación.

### **6.7.2 Transfección de células Schneider**

Los ensayos de transactivación fueron realizados en células Schneider línea 2 derivadas de embriones de *D. melanogaster* de 24 horas (Schneider, 1972) adaptadas a crecer en medio Schneider pH 7.0 (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) a 25 °C. Se usó el reactivo de transfección Cellfectin con 3  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Las co-transfecciones celulares se organizaron en 4 grupos: el primer grupo consistió en utilizar plásmidos productores de las proteínas Antp ó mutantes (Antp<sup>AAAA</sup>, Antp $\Delta$ Q1-2, Antp $\Delta$ Q2, AntpHD, Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1) y plásmidos productores de los factores transcripcionales (Tabla IX). El segundo grupo consistió en la transfección de plásmidos productores de GAL4 ó mutantes (GAL4<sup>YPWM</sup> y GAL4<sup>AAAA</sup>) y factores transcripcionales (Tabla X). El tercer grupo consistió en transfectar plásmidos

productores de los péptidos sintéticos de Antp (SynthYPWM<sup>LL</sup>, SynthYPWM<sup>SL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup>, SynthWRPW<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>SL</sup>) y factores transcripcionales BIP<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> (Tabla XI). El cuarto grupo consistió en utilizar plásmidos productores de las proteínas Antp, AbdB, mutantes G19 y Exd<sub>144-376</sub> (Tabla XII). Los plásmidos reporteros pGLH11, pGL25XGAL4promoter y el plásmido control pcopiaβ-gal fueron incluidos en cada ensayo de transfección como se describe en la tablas IX-XII.

**Tabla IX. Transfección de Antp y mutantes con factores transcripcionales**

Grupo	Plásmidos Productores		Plásmido Reportero	Plásmido Control
<b>I</b>	pNPACAntp	pPACTBP pPACTFIIA $\gamma$ pPACBIP <sub>2-89</sub> pPACTFIIB	pGLH11	pcopia $\beta$ gal
	pNPACAntp <sup>AAAA</sup>	pPACTFIIIE $\beta$ pPACAbdB pPACExd <sub>144-376</sub>		
	pPACAntpHD	pPACTBP		
	pNPACAntp $\Delta$ Q1-2			
	pNPACAntp $\Delta$ Q2			
	pPACAntpHD	pPACTFIIIE $\beta$		
	pPACAntp $\Delta$ H1-2			
pPACAntp $\Delta$ H1				

**Tabla X. Transfección de GAL4 y mutantes con factores transcripcionales**

Grupo	Plásmidos Productores		Plásmido Reportero	Plásmido Control
<b>II</b>	pPACTGAL4	pPACTBP pPACTFIIA $\gamma$ pPACBIP <sub>2-89</sub> pPACTFIIB	pGL25XGAL4 promoter	pcopia $\beta$ gal
	pPACTGAL4 <sup>YPWM</sup>	pPACTFIIIE $\beta$ pPACAbdB		
	pPACTGAL4 <sup>AAAA</sup>	pPACExd <sub>144-376</sub>		

**Tabla XI. Transfección de péptidos sintéticos de Antp con BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub>**

Grupo	Plásmidos Productores		Plásmido Reportero	Plásmido Control
<b>III</b>	pNPACSynthYPWM <sup>LL</sup>	pPACBIP2 <sub>2-89</sub> pPACExd <sub>144-376</sub>	pGLH11	pcopiaβgal
	pNPACSynthYPWM <sup>SL</sup>			
	pNPACSynthAAAA <sup>LL</sup>			
	PNPACSynthAAAA <sup>SL</sup>			
	pNPACSynthWRPW <sup>LL</sup>			
	PNPACSynthWRPW <sup>SL</sup>			

**Tabla XII. Transfección de Antp, AbdB y mutantes G19 con Exd**

Grupo	Plásmidos Productores		Plásmido Reportero	Plásmido Control
<b>IV</b>	pNPACAntp	pPACAbdB pPACAbdBG19 pPACExd <sub>144-376</sub>	pGLH11	pcopiaβgal
	pNPACAntpG19			

Las transfecciones celulares se realizaron en placas de cultivo de 6 pozos (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA) a un 80% de confluencia celular con 3 µg de DNA plasmídico en total para cada pozo. Primeramente, se eliminó el medio a cada una de los pozos a transfectar mediante el uso de una pipeta Pasteur y después se le agregó 0.8 ml de medio Schneider y 200 µl de la reacción de transfección (3 µg DNA y 3 µl Cellfectin en 200 µl de medio Schneider). Esta mezcla de reacción se incubó con las células a 25°C por 6 horas, al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante y se agregó Medio Schneider con 10% de FBS para posteriormente incubar a 25 °C por 72 hrs. Finalmente, se colectaron las células para la preparación de extractos celulares.

### 6.7.3 Preparación de extractos celulares totales

La preparación de extractos celulares consistió en remover las células de cada pozo mediante pipeteo fuerte y colocarlas en un tubo Falcon estéril de 15 ml para su posterior centrifugación por 2 minutos a 5,000 rpm con una temperatura de 25°C, se eliminó el sobrenadante y cada pastilla celular fue resuspendida en 150 µl de Buffer de Lisis Pasiva

1X (Promega, Madison, WI U.S.A.). La reacción de lisis celular fue sometida a un ciclo de congelación en Nitrógeno líquido (3 min), descongelación a temperatura ambiente (5 min) y centrifugación por 2 minutos a 5,000 rpm para obtener los sobrenadantes en los cuales se encuentran las proteínas de interés, estos fueron etiquetados y almacenados a –70 °C para evitar la inactivación de las proteínas.

#### **6.7.4 Cuantificación de la expresión de genes reporteros**

La actividad del gen reportero  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) fue detectada mediante una reacción enzimática colorimétrica descrita por Tokunaga-Furukubo en 1991. La reacción fue incubada por 2 horas a 37°C, al término de este tiempo es detenida al agregar 500 $\mu$ l de NaCO<sub>3</sub> 1M. La reacción colorimétrica se describe en la tabla XIII. La bioluminiscencia fue determinada mediante el uso del luminómetro OPTCOMP II siguiendo las instrucciones descritas en el kit Dual-Luciferase®Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA). El tiempo entre la preparación de la muestra y la medición no fue mayor a 2 segundos y el tiempo de medición en el luminómetro fue de 20 segundos. La reacción enzimática fue descrita como porcentaje de Unidades Relativas de Luz (%RLU).

**Tabla XIII. Reacción colorimétrica para  $\beta$ -galactosidasa**

Componentes	Cantidad ( $\mu$ l)
Buffer Fosfato de Sodio 0.1M	50
Buffer Mg 100X	0.75
CPRG 4 mg/ml (Boeringer)	15
Extractos celulares	60

### **6.8 Análisis de Interacción mediante Ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BIFC)**

#### **6.8.1 Preparación de cubreobjetos con poly-L-lisina**

La visualización de las células HEK293 mediante microscopia confocal requirió el cultivo de las células sobre cubreobjetos de 22 mm de diámetro estériles en placas de 6

pozos. Para esterilizar los cubreobjetos se someten a luz ultravioleta durante 20 minutos ó se almacenan en una incubadora a 60°C por 12 horas. La preparación de los cubreobjetos con poly-L-lisina (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) se realizó colocando tres gotas separadas (8 µl/gota) de poly-L-lisina al 0.01% en un portaobjetos estéril y después se ubica un cubreobjetos sobre cada gota. Los cubreobjetos-portaobjeto se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, al cabo de este tiempo se retiraron los cubreobjetos utilizando pinzas estériles y fueron re-esterilizados sobre la flama de un mechero para posteriormente colocarse en cada pozo de la placa de cultivo. Finalmente, se siembran las células HEK293 a la densidad deseada.

### **. 6.8.2 Obtención de plásmidos recombinantes y controles**

La extracción de los plásmidos recombinantes y controles a mediana escala se realizó empleando el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, January 1997) de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.7.1. El análisis de la calidad y concentración de los diferentes DNAs plasmídicos se llevó a cabo mediante medición de absorbancia con luz ultravioleta y visualización en electroforesis de agarosa al 0.8%. Los DNAs plasmídicos obtenidos deben presentar una relación absorbancia 260/280  $\geq$  1.8 y una concentración mayor de 0.5 µg/µl para los ensayos de interacción BiFC.

### **6.8.3 Transfección de células HEK293**

Los ensayos BiFC se realizaron en células embrionarias HEK293 de epitelio renal humano transformado con el gen E1A de adenovirus (Graham *et al.*, 1977) adaptadas a crecer en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) en una atmosfera de 95% de humedad, 5% CO<sub>2</sub> y 37 °C de temperatura. Las co-transfecciones celulares se organizaron en 2 grupos: el primer grupo consistió en utilizar plásmidos recombinantes de las proteínas Antp ó mutantes (Antp<sup>AAAA</sup>, AntpΔHD, AntpΔQ1-2, AntpΔQ2, AntpHD, AntpΔH1-2 y AntpΔH1) fusionadas al fragmento VC155 y factores transcripcionales fusionados al fragmento VNm9 de la proteína fluorescente Venus (Tabla XIV). El segundo grupo consistió en la transfección de plásmidos recombinantes de las proteínas GAL4, GAL4<sup>YPWM</sup> y GAL4<sup>AAAA</sup> fusionados al fragmento VC155 así como factores transcripcionales fusionados con el fragmento VNm9 (Tabla XV). El plásmido control pECFP-N1 fue incluido en cada ensayo de transfección para el conteo de células positivas de interacción (Tablas XII y XIII).

**Tabla XIV. Transfección de VC155-Antp y mutantes con factores transcripcionales**

Grupo	Plásmidos Recombinantes		Plásmido Control
<b>I</b>	pCS2VC155Antp	pCS2VNm9TBP pCS2VNm9TFIIA $\gamma$ pCS2VNm9BIP2 <sub>2-89</sub> pCS2VNm9TFIIB pCS2VNm9TFIIE $\beta$ pCS2VNm9AbdB pCS2VNm9Exd <sub>144-376</sub>	pECFP-N1
	pCS2VC155Antp <sup>AAAA</sup>		
	pCS2VC155Antp $\Delta$ HD		
	pCS2VC155AntpHD	pCS2VNm9TBP	
	pCS2VC155Antp $\Delta$ Q1-2		
	pCS2VC155Antp $\Delta$ Q2		
	pCS2VC155AntpHD		
	pCS2VC155Antp $\Delta$ H1-2	pCS2VNm9TFIIE $\beta$	
pCS2VC155Antp $\Delta$ H1			

**Tabla XV. Transfección de VC155-GAL4 y mutantes con factores transcripcionales**

Grupo	Plásmidos Recombinantes		Plásmido Control
<b>II</b>	pCS2VC155GAL4	pCS2VNm9TBP pCS2VNm9TFIIA $\gamma$ pCS2VNm9BIP2 <sub>2-89</sub> pCS2VNm9TFIIB pCS2VNm9TFIIE $\beta$ pCS2VNm9AbdB pCS2VNm9Exd <sub>144-376</sub>	pECFP-N1
	pCS2VC155GAL4 <sup>YPWM</sup>		
	pCS2VC155GAL4 <sup>AAAA</sup>		

Las células HEK293 fueron sembradas 24 hrs antes del ensayo de transfección a una densidad de  $1-3 \times 10^5$  células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) que contenían cubreobjetos tratados con poly-L-lisina. Las transfecciones celulares fueron realizadas con el compuesto PEI de 25 kDa (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL. USA) que es un polímero catiónico capaz de unirse al DNA y formar complejos que se agregan y pueden introducirse a las células (Godbey *et al.*, 1999; Wightman *et al.*, 2001). La solución de DNA se preparó diluyendo 4  $\mu$ g de DNA plasmídico en NaCl 150mM en un volumen final de 100 $\mu$ l por pozo, después se le agregó la solución de PEI (0.4  $\mu$ l PEI en 99.6  $\mu$ l NaCl 150mM) y se agitó vigorosamente

esta mezcla de reacción por 15-20 seg. Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 30 min y posteriormente agregada a las células HEK293. Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24-48 hrs para su visualización mediante microscopía confocal.

#### **6.8.4 Visualización de los complejos fluorescentes**

El montaje de los cubreobjetos que contienen las células HEK293 transfectadas se realizó añadiendo gotas de 10 µl de PBS 1X estéril sobre un portaobjetos y colocando el cubreobjetos con las células dirigidas hacia la solución de PBS, sobre cada gota. Las células fueron inmediatamente observadas en el microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de 40 aumentos (40X) utilizando un filtro de excitación  $500 \pm 10$  nm y un filtro de emisión  $535 \pm 15$  nm para la detección de la fluorescencia de Venus así como un filtro de excitación  $436 \pm 10$  nm y emisión  $470 \pm 30$  nm para la detección de la proteína fluorescente control ECFP. El porcentaje de células positivas de interacción se obtiene al realizar diferentes conteos de 100 células que presentan fluorescencia de ECFP (fluorescencia color cian) de las cuales se determina el número de células que muestran fluorescencia por complementación bimolecular (fluorescencia color amarillo).

## 7. RESULTADOS

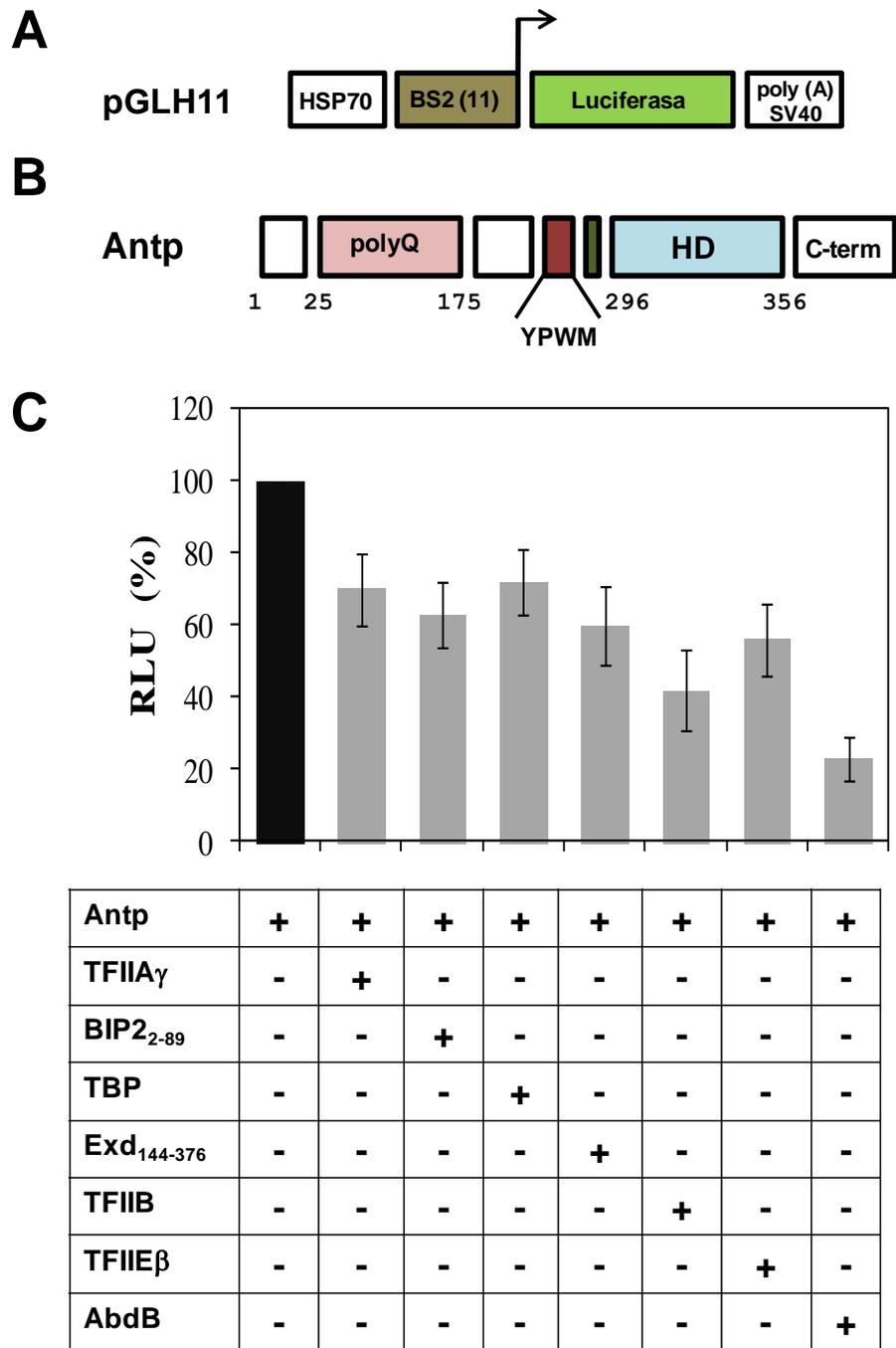
### 7.1 Análisis de la interacción molecular de Antennapedia y el tetrapéptido YPWM con factores transcripcionales en ensayos de transactivación y BiFC

#### 7.1.1 Efecto de los factores transcripcionales en la actividad transcripcional de Antp

La interacción de Antennapedia y el tetrapéptido YPWM con factores de la maquinaria transcripcional basal se analizó inicialmente mediante ensayos de transactivación. Estos ensayos se basaron en la co-transfección de los plásmidos productores de Antp y de los factores transcripcionales generales y homeoproteínas. Los plásmidos productores y reporteros fueron introducidos en células Schneider usando el reactivo de transfección Cellfectin como se describe en la sección de materiales y métodos.

En los ensayos de transactivación los plásmidos productores dirigen la expresión de la homeoproteína Antp (Fig. 12B) ó la proteína mutante con sustitución del tetrapéptido YPWM por alaninas (Antp<sup>AAAA</sup>; Fig. 13A) que se unen a los once sitios de unión BS2 del plásmido reportero pGLH11 (Fig. 12A) para activar la transcripción del gen reportero Luciferasa. La co-expresión de factores transcripcionales con los diferentes plásmidos productores modifica los niveles de expresión de Luciferasa como resultado de la probable interacción entre las proteínas expresadas simultáneamente.

Los niveles de transactivación de la homeoproteína Antp y factores transcripcionales se muestran en la figura 12C. La activación de la transcripción dirigida por la proteína Antp (100%) mostró una reducción significativa en presencia de los factores transcripcionales TBP (72%), TFIIA $\gamma$  (70%), BIP<sub>2-89</sub> (63%), TFIIB (42%), TFIIE $\beta$  (56%), Exd<sub>144-376</sub> (60%) y AbdB (23%). Esta reducción en la actividad transcripcional refleja la probable interacción molecular de Antp con todos los factores transcripcionales generales de la maquinaria transcripcional basal analizados así como con las homeoproteínas Exd y AbdB.



**Figura 12. Transactivación de Antp en presencia de homeoproteínas y factores transcripcionales generales.** Los ensayos de transactivación se basaron en la co-transfección del plásmido reportero pGLH11 y plásmidos productores de Antp (pNPACAntp), factores transcripcionales (pPACTFIIA $\gamma$ , pPACBIP2<sub>2-89</sub>, pPACTBP, pPACTFIIB y pPACTFIIE $\beta$ ) y otras homeoproteínas (pPACExd<sub>144-376</sub> y pPACAbdB). **A** El plásmido pGLH11 presenta el promotor *hsp70* y once sitios de unión de Antp (BS2) para dirigir la expresión del gen reportero Luciferasa (RLU). **B** La homeoproteína Antp posee un dominio

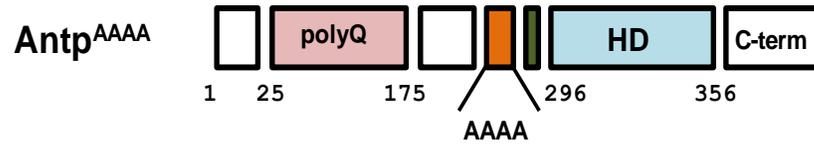
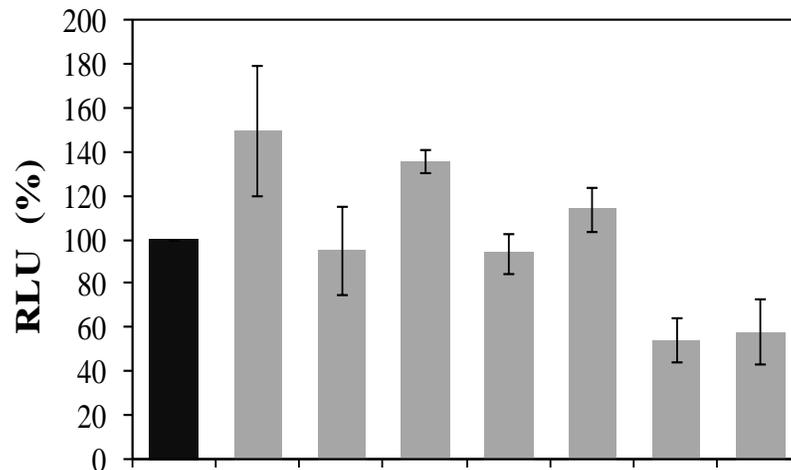
polyQ (rosa) en la región N-terminal y el tetrapéptido YPWM (café) río arriba del homeodominio (azul) a una distancia de 8 aminoácidos (verde). C La gráfica muestra el porcentaje de activación de la transcripción dada por la proteína Antp en ausencia (negro) o presencia (gris) de las homeoproteínas Exd<sub>144-376</sub> y AbdB ó factores transcripcionales generales TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, TBP, TFIIB, TFIIE $\beta$ . El plásmido pcpia $\beta$ gal fue usado para normalizar las transfecciones y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

### **7.1.1.1 Los factores transcripcionales TBP, TFIIE $\beta$ y AbdB modifican la actividad transcripcional de Antp en ausencia de YPWM**

Para analizar la importancia del tetrapéptido YPWM en la interacción de la homeoproteína Antp con factores transcripcionales generales u otras homeoproteínas, se realizó la co-expresión de la proteína mutante Antp<sup>AAAA</sup> (Fig. 13A) y los factores transcripcionales TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$ , Exd<sub>144-376</sub> y AbdB. La Figura 13B muestra los resultados obtenidos en los ensayos de transactivación con un incremento en la actividad transcripcional de Antp<sup>AAAA</sup> en presencia de TBP (136%) y una reducción con TFIIE $\beta$  (54%) y AbdB (58%). Estos resultados sugieren que la interacción molecular de Antp con los factores transcripcionales TBP, TFIIE $\beta$  y AbdB es independiente del tetrapéptido YPWM.

### **7.1.1.2 El efecto de BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> en la actividad transcripcional de Antp es dependiente de YPWM**

Notablemente, la co-expresión de los factores BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> no afectó la actividad transcripcional de la proteína Antp<sup>AAAA</sup> (Figura 13B) a diferencia de la proteína Antp silvestre (Fig. 12B y C) lo cual sugiere que el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antp presenta una interacción específica con las regiones aminoacídicas 2-89 y 144-376 de los factores transcripcionales BIP2 y Exd respectivamente. Todos los demás factores transcripcionales analizados modificaron la actividad transcripcional de Antp<sup>AAAA</sup> de la misma forma que la proteína Antp silvestre (Fig. 13B).

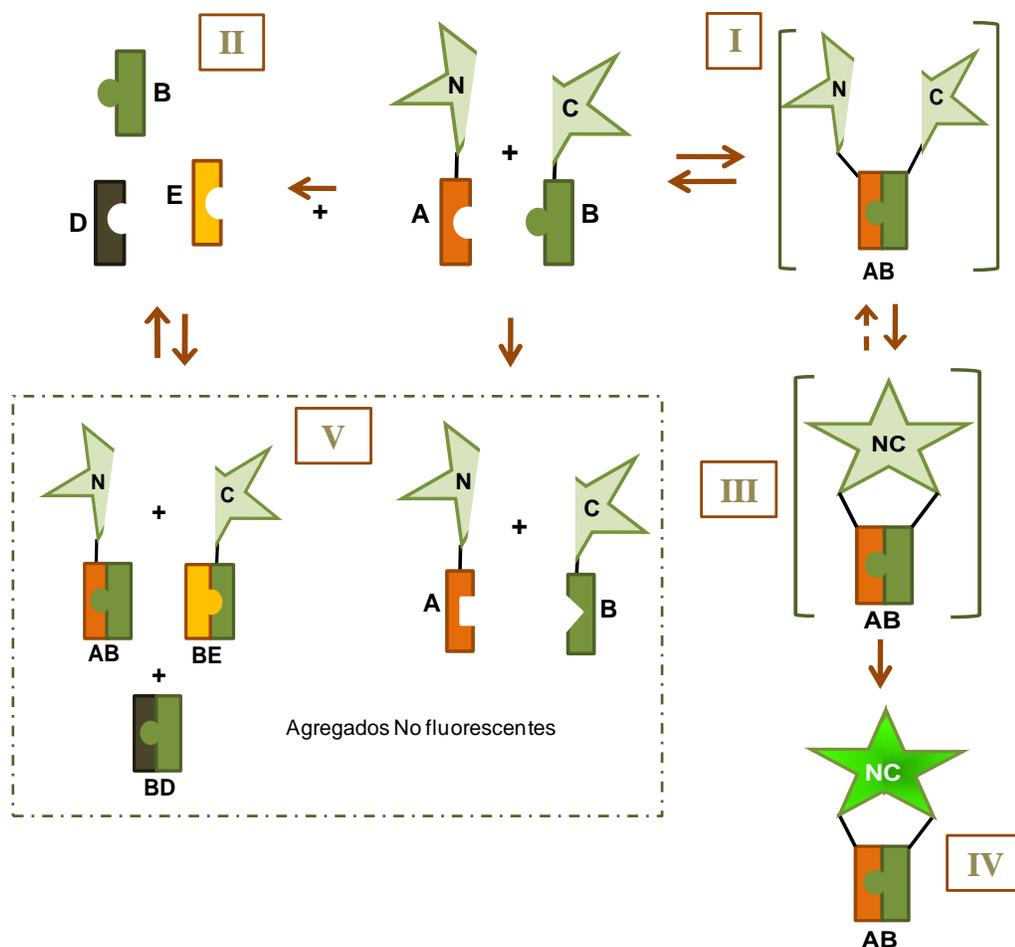
**A****B**

<b>Antp<sup>AAAA</sup></b>	<b>+</b>							
<b>TFIIA<math>\gamma</math></b>	-	<b>+</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BIP2<sub>2-89</sub></b>	-	-	<b>+</b>	-	-	-	-	-
<b>TBP</b>	-	-	-	<b>+</b>	-	-	-	-
<b>Exd<sub>144-376</sub></b>	-	-	-	-	<b>+</b>	-	-	-
<b>TFIIB</b>	-	-	-	-	-	<b>+</b>	-	-
<b>TFIIE<math>\beta</math></b>	-	-	-	-	-	-	<b>+</b>	-
<b>AbdB</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>+</b>

**Figura 13. Activación de la transcripción por Antp<sup>AAAA</sup> y homeoproteínas ó factores transcripcionales generales.** **A** La proteína mutante Antp<sup>AAAA</sup> presenta un bloque de cuatro alaninas (naranja) en sustitución del tetrapéptido YPWM en Antp. **B** La gráfica muestra la media y desviación estándar de la transactivación del gen reportero Luciferasa (RLU) por la proteína Antp<sup>AAAA</sup> en ausencia (negro) ó presencia (gris) de las homeoproteínas Exd<sub>144-376</sub> y AbdB ó los factores transcripcionales generales TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, TBP, TFIIB, TFIIE $\beta$ . Cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

### 7.1.2 Interacciones proteína-proteína de Antp con los factores transcripcionales generales y homeoproteínas

Con el objetivo de confirmar la interacción proteína-proteína de Antp y su tetrapéptido YPWM con factores transcripcionales generales y homeoproteínas se realizaron ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) que se basan en la reconstitución o complementación de la fluorescencia por los fragmentos carboxilo (VC155) y amino-terminal (VNm9) de la proteína fluorescente Venus que son reunidos por dos proteínas que interaccionan específicamente entre sí como se muestra en la figura 14.



Modificado de Kerppola, 2006

**Figura 14. Representación esquemática del ensayo de interacción molecular mediante BiFC.** La asociación inicial entre los fragmentos N-terminal (N) y C-terminal (C) de la proteína fluorescente Venus (complejo I) es mediada por la interacción entre las proteínas de estudio (A y B). Esta interacción ocurre en competencia con proteínas endógenas celulares (complejo II). La asociación no covalente de los

fragmentos no fluorescentes N y C reconstituye el fluoróforo (complejo III) de forma reversible. La maduración del fluoróforo (complejo IV) es irreversible y detectable mediante microscopía de fluorescencia. Esta fluorescencia se interpreta como una interacción específica entre las proteínas A y B. En contraste, las proteínas de fusión no asociadas (complejo V) carecen del plegamiento requerido para la reconstitución de la fluorescencia.

Los ensayos BiFC consistieron en la co-transfección de plásmidos recombinantes del fragmento VC155 fusionado con las proteínas Antp, Antp<sup>AAAA</sup> ó Antp $\Delta$ HD y los factores transcripcionales (Exd<sub>144-376</sub>, TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP<sub>2-89</sub>, TFIIIE $\beta$  y TFIIB) fusionados al fragmento VNm9. La proteína Antp $\Delta$ HD fue utilizada como control negativo porque presenta la delección del tetrapéptido YPWM y homeodominio (HD) de Antp. Estos plásmidos recombinantes y el plásmido control pECFPN1 fueron introducidos en células embrionarias de riñón humano (HEK293) como se describe en la sección de material y métodos.

#### **7.1.2.1 La homeoproteína Antp interacciona específicamente con TBP, Exd<sub>144-376</sub>, TFIIIE $\beta$ , BIP<sub>2-89</sub> y AbdB**

El análisis de fluorescencia mediante microscopia confocal reveló que las proteínas Antp y mutantes fusionadas al fragmento VC155 no mostraron fluorescencia basal en células HEK293 (Figs. 15A, E y I). La co-expresión de las proteínas de fusión Antp y Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 15B), TBP (Fig. 15C), BIP<sub>2-89</sub> (Fig. 16A), TFIIIE $\beta$  (Fig. 16B) ó AbdB (Fig. 16D) mostró claramente la reconstitución de la actividad fluorescente de la proteína Venus (fluorescencia color amarillo). Por el contrario, la complementación de la fluorescencia de Venus no fue detectada en la co-expresión de las proteínas de fusión Antp y TFIIA $\gamma$  (Fig. 15D) ó TFIIB (Fig. 16C). Estos resultados muestran la interacción proteína-proteína de la homeoproteína Antp con los factores transcripcionales TBP, BIP<sub>2-89</sub>, TFIIIE $\beta$ , AbdB y Exd<sub>144-376</sub> así como la ausencia de interacción molecular entre Antp y los factores transcripcionales TFIIA $\gamma$  y TFIIB.

#### **7.1.2.2 La interacción con los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP<sub>2-89</sub> es dependiente de YPWM**

Las figuras 15B y 16A muestran que la interacción de Antp con Exd<sub>144-376</sub> y BIP<sub>2-89</sub> resultó en la reconstitución de la fluorescencia de la proteína Venus. En contraste, la sustitución del tetrapéptido YPWM por alaninas en la proteína de fusión Antp<sup>AAAA</sup> disminuyó notablemente su interacción con las proteínas Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 15F) y BIP<sub>2-89</sub>

(Fig. 16E) evitando la maduración del fluoróforo en las células HEK293 transfectadas. Estas células presentaron únicamente niveles basales de fluorescencia (15-19%) al igual que las proteínas TFIIA $\gamma$  (Figs. 15H y L) ó TFIIB (Figs. 16G y K) que no presentaron interacción con Antp<sup>AAAA</sup> y Antp $\Delta$ HD. Estos resultados muestran evidentemente que la interacción proteína-proteína de Antp con los factores transcripcionales Exd y BIP2, regiones aminoacídicas 144-376 y 2-89 respectivamente, es dependiente del tetrapéptido YPWM. Similarmente, la ausencia de fluorescencia por complementación en células HEK293 que co-expresan las proteínas de fusión Antp $\Delta$ HD y Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 15J) ó BIP2<sub>2-89</sub> (Fig. 16I) confirman la importancia del tetrapéptido YPWM de Antp en la formación de los complejos transcripcionales Antp-Exd y Antp-BIP2.

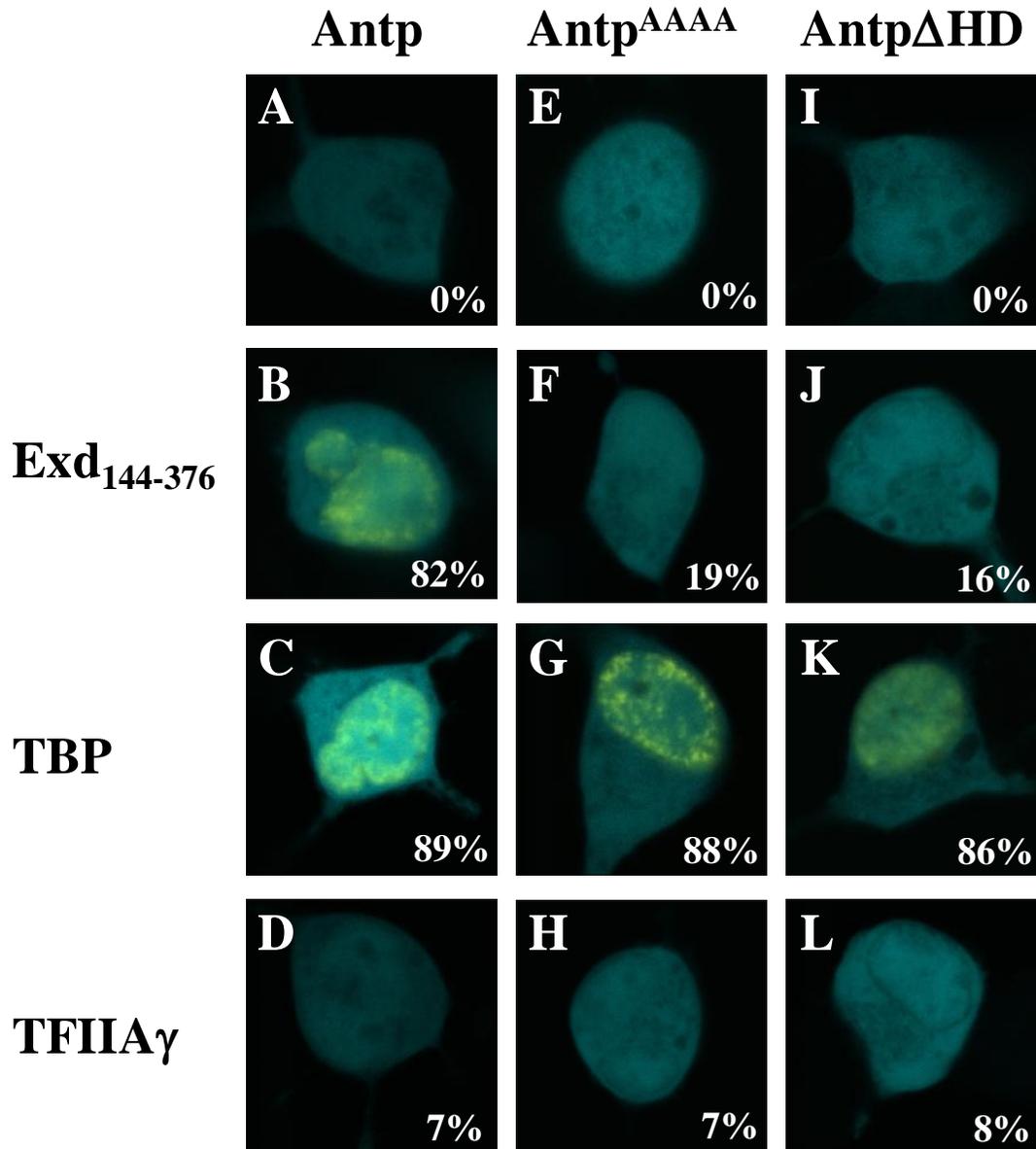
### **7.1.2.3 La interacción con el factor transcripcional TBP no requiere del HD o tetrapéptido YPWM de Antp**

Los ensayos BiFC mostraron que la expresión simultánea de las proteínas de fusión Antp ó Antp<sup>AAAA</sup> y TBP (Figs. 15C y G) resultó en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia color amarillo), lo cual indica la interacción de la homeoproteína Antp con el factor transcripcional TBP. Además, la presencia de fluorescencia por complementación en células HEK293 que co-expresan las proteínas de fusión Antp $\Delta$ HD y TBP (Fig. 15K) confirma que la formación del complejo transcripcional Antp-TBP es independiente del tetrapéptido YPWM y HD de Antp por lo que no son necesarios para la interacción con TBP.

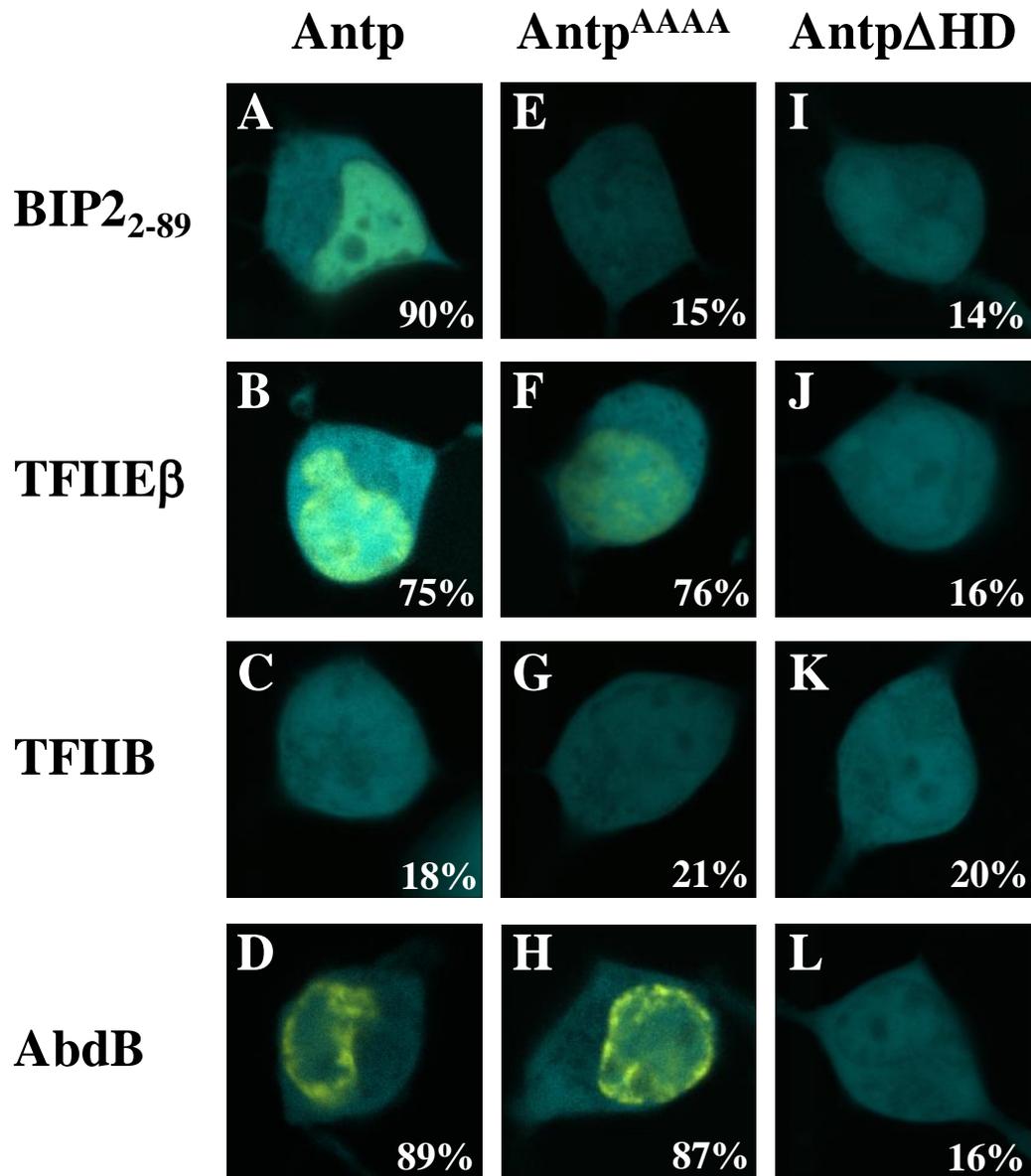
### **7.1.2.4 La interacción con los factores transcripcionales TFIIE $\beta$ y AbdB es mediada por el HD de Antp**

La expresión simultánea de las proteínas de fusión Antp ó Antp<sup>AAAA</sup> y TFIIE $\beta$  (Figs. 16B y F) resultó en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia color amarillo) en la mayoría de las células transfectadas. Así mismo, la co-expresión de las proteínas de fusión Antp ó Antp<sup>AAAA</sup> y AbdB (Figs. 16D y H) mostró la maduración del fluoróforo lo que indica que la interacción de la homeoproteína Antp con el factor transcripcional TFIIE $\beta$  y la homeoproteína AbdB no requiere del tetrapéptido YPWM. En contraste, la ausencia de fluorescencia por complementación en las células HEK293 que co-expresan las proteínas de fusión Antp $\Delta$ HD y TFIIE $\beta$  (Fig. 16J) ó AbdB (Fig. 16L) confirmaron que la interacción proteína-proteína de Antp con los factores transcripcionales TFIIE $\beta$  y AbdB es mediada por el homeodominio de Antp. Estos resultados muestran que los factores transcripcionales TFIIE $\beta$  y AbdB interaccionan con

la homeoproteína Antp de manera dependiente del homeodominio pero independiente del tetrapéptido YPWM.



**Figura 15. Interacción de Antp con Exd<sub>144-376</sub> y TBP dependiente e independiente de YPWM mediante BiFC.** Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas Antp (A-D), Antp<sup>AAAA</sup> (E-H) ó Antp $\Delta$ HD (I-L) fusionadas al fragmento no fluorescente VC155 y los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> (B, F, J), TBP (C, G, K) y TFIIA $\gamma$  (D, H, L) fusionados al fragmento no fluorescente VNm9 en células HEK293. Las figuras A, E y I corresponden a las proteínas de fusión VC155-Antp, VC155-Antp<sup>AAAA</sup> y VC155-Antp $\Delta$ HD en ausencia de los factores transcripcionales. La fluorescencia de color amarillo indica una interacción proteína-proteína de los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y TBP con Antp y/o mutantes (Antp<sup>AAAA</sup> y Antp $\Delta$ HD). La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.



**Figura 16. Interacción de Antp con BIP2<sub>2-89</sub>, TFIIE $\beta$  y AbdB dependiente e independiente de YPWM mediante BiFC.** Co-expresión de las proteínas de fusión VC155-Antp (A-D), VC155-Antp<sup>AAAA</sup> (E-H) ó VC155-Antp $\Delta$ HD (I-L) y VNm9-BIP2<sub>2-89</sub> (A, E, I), VNm9-TFIIE $\beta$  (B, F, J), VNm9-TFIIB (C, G, K) ó VNm9-AbdB (D, H, L) en células HEK293. La fluorescencia de color amarillo indica una interacción proteína-proteína de los factores transcripcionales BIP2<sub>2-89</sub>, TFIIE $\beta$  y AbdB con Antp ó Antp<sup>AAAA</sup>. La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.

Los resultados obtenidos en conjunto de los ensayos de transactivación y BiFC corroboran la interacción molecular de la homeoproteína Antp con factores transcripcionales generales de la maquinaria transcripcional basal específicamente: TBP, BIP2<sub>2-89</sub> y TFIIE $\beta$  así como con las homeoproteínas Exd<sub>144-376</sub> y AbdB de una manera dependiente e independiente del tetrapéptido YPWM ó del homeodominio de Antp. Estas interacciones moleculares proteína-proteína que modifican la actividad transcripcional de Antp serán analizadas más detalladamente en la presente tesis.

## **7.2 Análisis de la interacción molecular del tetrapéptido YPWM de Antp fusionado a GAL4 con factores transcripcionales mediante activación de la transcripción y BiFC**

### **7.2.1 El tetrapéptido YPWM modifica la actividad transcripcional de GAL4 en presencia de factores transcripcionales**

Para analizar la función del tetrapéptido YPWM de Antp en la actividad transcripcional se analizó en el contexto de la proteína transactivadora GAL4. Para ello, se fusionó el tetrapéptido YPWM en GAL4 y se analizó la interacción con factores transcripcionales mediante la co-transfección de plásmidos productores de las proteínas GAL4, GAL4 fusionada con YPWM (GAL4<sup>YPWM</sup>) ó un bloque de cuatro alaninas (GAL4<sup>AAAA</sup>) y plásmidos productores de factores transcripcionales generales y homeoproteínas. Los plásmidos productores y reporteros (pGL25XGAL4promoter y p copia $\beta$ gal) fueron introducidos en células Schneider como se describe en la sección de materiales y métodos. El plásmido reportero pGL25XGAL4 promoter contiene cinco sitios de unión de la proteína transactivadora GAL4 (UAS) para activar la transcripción del gen reportero Luciferasa (Fisher *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en la co-expresión de la proteína GAL4 y factores transcripcionales muestran que la activación de la transcripción dirigida por GAL4 es afectada significativamente por los factores transcripcionales TFIIE $\beta$ , TBP y AbdB que incrementan la transactivación en 170, 800 y 300% respectivamente (Fig. 17A y B). Las proteínas GAL4<sup>YPWM</sup> y GAL4<sup>AAAA</sup> también mostraron un incremento en la transactivación de aproximadamente 133, 1250 y 400% en presencia de TFIIE $\beta$ , TBP y AbdB respectivamente (Figs. 18 y 19). Este incremento en la transactivación de GAL4 y mutantes con TFIIE $\beta$  y TBP refleja la interacción de estos factores transcripcionales con el promotor SV40 del plásmido reportero pGL25XGAL4. Además, el efecto de AbdB en

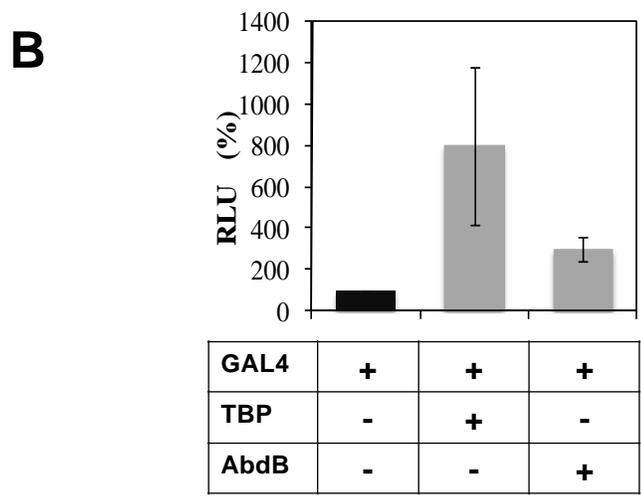
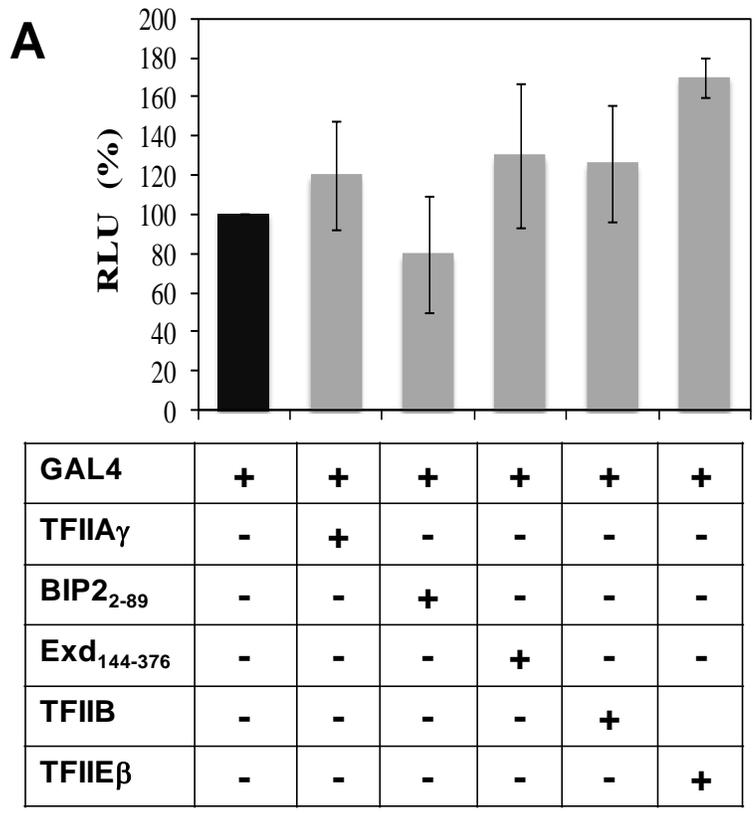
la capacidad transactivadora de GAL4 y mutantes sugiere la interacción de esta homeoproteína con la maquinaria transcripcional basal.

Notablemente, la actividad transcripcional de la proteína GAL4<sup>YPWM</sup> (Fig. 18A) mostró una reducción significativa de 70% en presencia del factor transcripcional BIP2<sub>2-89</sub> mientras que la proteína control GAL4<sup>AAAA</sup> (Fig. 19A) presentó niveles normales de transactivación con BIP2<sub>2-89</sub> (103%). Estos resultados demuestran que el tetrapéptido YPWM fusionado con la proteína GAL4 presenta una interacción molecular específica con la región aminoacídica 2-89 del factor transcripcional BIP2 a diferencia de las proteínas GAL4 ó GAL4<sup>AAAA</sup>. Interesantemente, la co-expresión de Exd<sub>144-376</sub> no modificó la transactivación de la proteína GAL4<sup>YPWM</sup> (Figs. 18A) al igual que GAL4 y GAL4<sup>AAAA</sup> debido a la ausencia de sitios de unión para el cofactor Exd en el plásmido reportero pGL25XGAL4promoter.

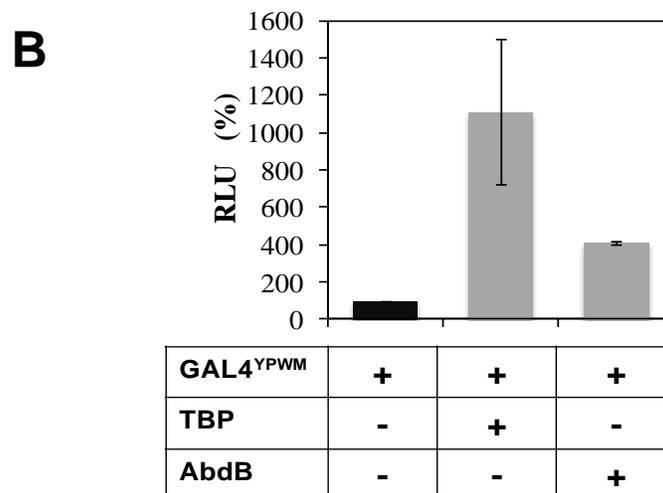
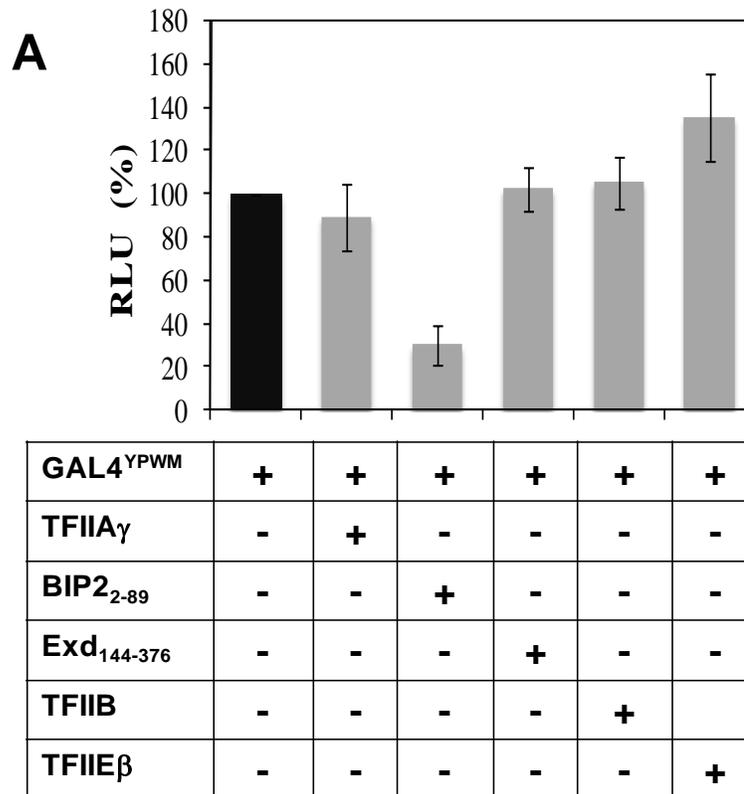
### **7.2.2 Interacción proteína-proteína del tetrapéptido YPWM con los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub>**

El análisis BiFC para corroborar la interacción proteína-proteína del tetrapéptido YPWM en GAL4 con factores transcripcionales generales u homeoproteínas se llevó a cabo mediante la co-transfección de plásmidos recombinantes que codifican para las proteínas GAL4 ó mutantes (GAL4<sup>YPWM</sup> y GAL4<sup>AAAA</sup>) y factores transcripcionales (Exd<sub>144-376</sub>, TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, TFIIE $\beta$  y TFIIB) fusionados a los fragmentos VC155 y VNm9 respectivamente. El plásmido control pECFP-N1 y plásmidos recombinantes fueron posteriormente introducidos en las células HEK293.

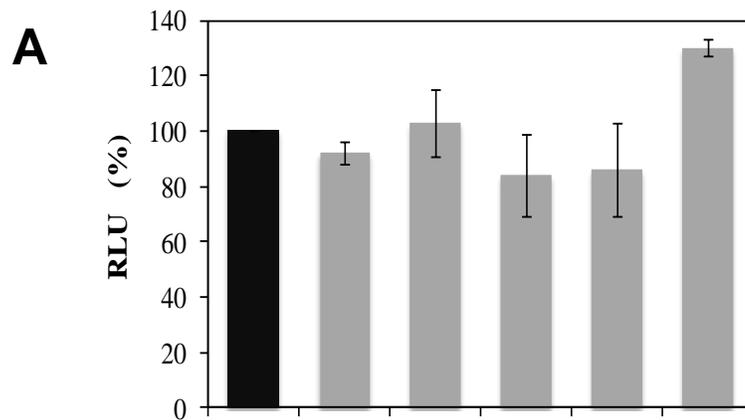
La visualización de las proteínas GAL4 y mutantes fusionadas al fragmento VC155 mediante microscopia confocal muestra como se esperaba la ausencia de fluorescencia intrínseca (Figs. 20A, E y I). Similarmente, la fluorescencia de Venus por complementación no fue detectada en la co-expresión de las proteínas de fusión GAL4 y Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 20B), TBP (Fig. 20C), TFIIA $\gamma$  (Fig. 20D), BIP2<sub>2-89</sub> (Fig. 21A), TFIIE $\beta$  (Fig. 21B) y TFIIB (Fig. 21C) ya que las células HEK293 mostraron únicamente niveles basales de fluorescencia (2-4%).



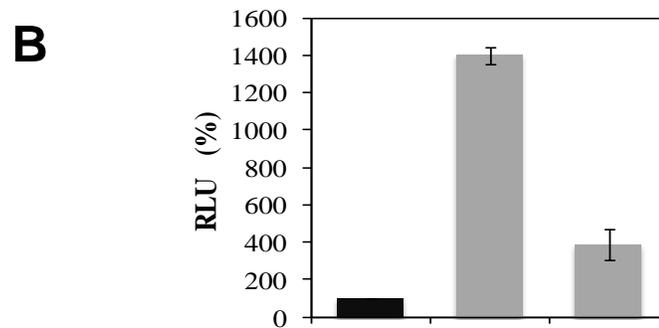
**Figura 17. Determinación de la transactivación de GAL4 en presencia de factores transcripcionales generales y homeoproteínas.** Los ensayos de transactivación se basaron en la co-transfección de plásmidos productores de GAL4 (pPACTGAL4NS) y/o factores transcripcionales (pPACTFIIA $\gamma$ , pPACBIP2<sub>2-89</sub>, pPACExd<sub>144-376</sub>, pPACTFIIB, pPACTFIIE $\beta$ , pPACTBP y pPACAbdB) usando el plásmido reportero pGL25XGAL4promoter. Las gráficas muestran la expresión del gen reportero Luciferasa (RLU) como resultado de la transactivación dada por GAL4 en presencia (gris) o ausencia (negro) de las proteínas **(A)** TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, Exd<sub>144-376</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$  y **(B)** TBP ó AbdB. El plásmido pcopia $\beta$ gal se utilizó para normalizar la eficiencia de transfección y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.



**Figura 18. Efecto de YPWM en la activación de la transcripción de GAL4 en presencia de factores transcripcionales generales y homeoproteínas.** En las gráficas se observa la media y desviación estándar del porcentaje de activación de la transcripción dada por la proteína de fusión GAL4<sup>YPWM</sup> en presencia (gris) o ausencia (negro) de los factores transcripcionales (A) TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, Exd<sub>144-376</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$  y (B) TBP ó AbdB. El plásmido pcopia $\beta$ gal se utilizó para normalizar las transfecciones y cada barra muestra la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.



<b>GAL4<sup>AAAA</sup></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>TFIIA<math>\gamma</math></b>	-	<b>+</b>	-	-	-	-
<b>BIP2<sub>2-89</sub></b>	-	-	<b>+</b>	-	-	-
<b>Exd<sub>144-376</sub></b>	-	-	-	<b>+</b>	-	-
<b>TFIIB</b>	-	-	-	-	<b>+</b>	
<b>TFIIE<math>\beta</math></b>	-	-	-	-	-	<b>+</b>



<b>GAL4<sup>AAAA</sup></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>TBP</b>	-	<b>+</b>	-
<b>AbdB</b>	-	-	<b>+</b>

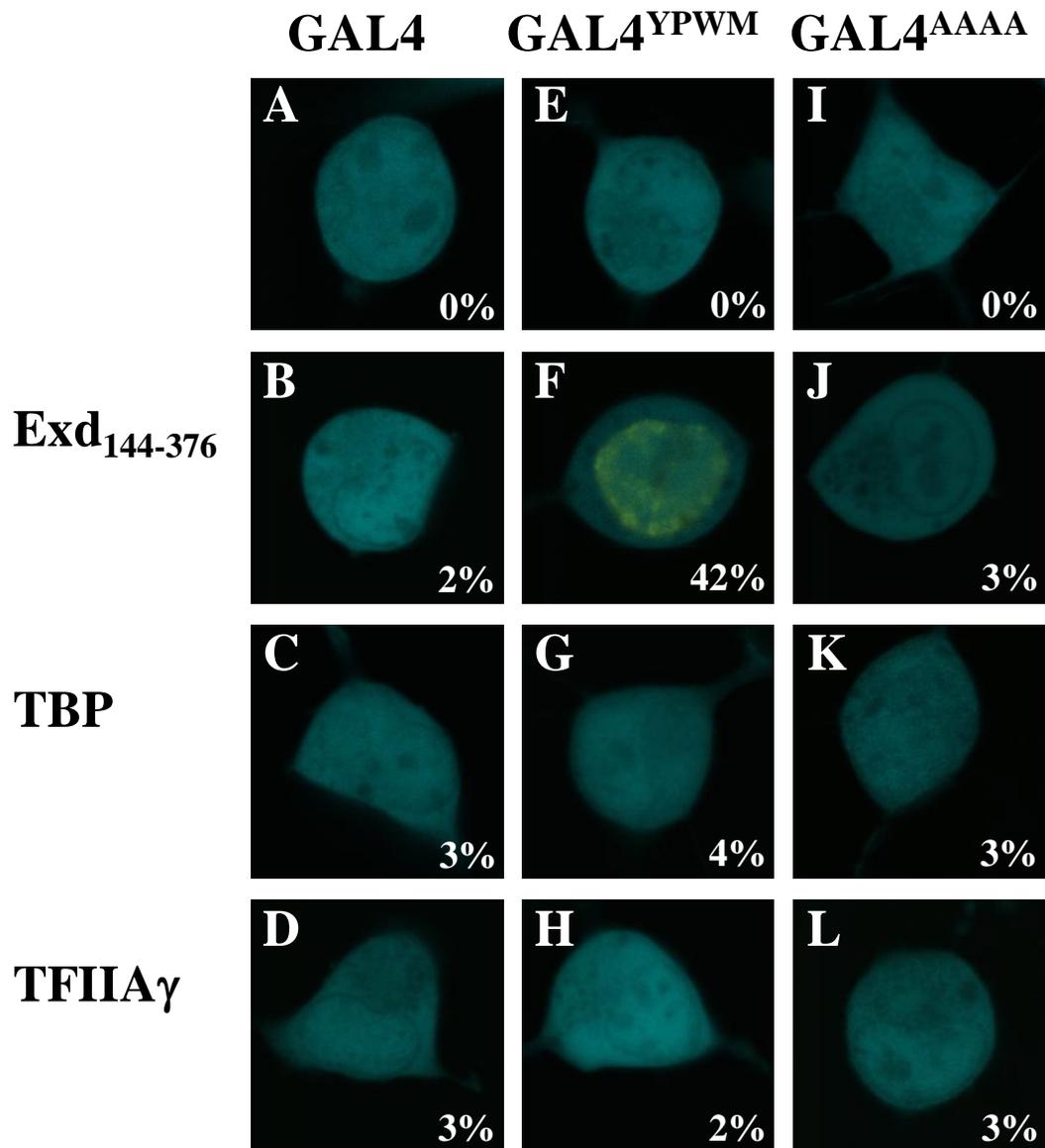
**Figura 19. Activación de la transcripción por GAL4<sup>AAAA</sup> y homeoproteínas ó factores transcripcionales generales.** Las gráficas muestran la actividad transcripcional de la proteína de fusión GAL4<sup>AAAA</sup> (RLU) en presencia (gris) o ausencia (negro) de las proteínas (A) TFIIA $\gamma$ , BIP2<sub>2-89</sub>, Exd<sub>144-376</sub>, TFIIB, TFIIE $\beta$  y (B) TBP ó AbdB. El plásmido pcopia $\beta$ gal se utilizó para normalizar la eficiencia de transfección y cada barra muestra la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

La expresión simultánea de las proteínas de fusión GAL4<sup>YPWM</sup> con Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 20F) ó BIP<sub>22-89</sub> (Fig. 21D) resultó en la maduración del fluoróforo Venus (fluorescencia color amarillo) a diferencia de las proteínas TBP (Fig. 20G), TFIIA $\gamma$  (Fig. 20H), TFIIE $\beta$  (Fig. 21E) y TFIIB (Fig. 21F) que no mostraron interacción con GAL4<sup>YPWM</sup>. Estos resultados fueron corroborados con la proteína control GAL4<sup>AAAA</sup> la cual no presentó interacción con las proteínas Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 20J) y BIP<sub>22-89</sub> (Fig. 21G), así como con TBP (Fig. 20K), TFIIA $\gamma$  (Fig. 20L), TFIIE $\beta$  (Fig. 21H) y TFIIB (Fig. 21I). Los resultados indican que las proteínas GAL4 y GAL4<sup>AAAA</sup> no presentan interacción con los factores transcripcionales generales TBP, TFIIA $\gamma$ , BIP<sub>22-89</sub>, TFIIE $\beta$ , Exd<sub>144-376</sub> y TFIIB mientras que la proteína GAL4<sup>YPWM</sup> muestra interacción molecular proteína-proteína con Exd<sub>144-376</sub> y BIP<sub>22-89</sub> debido a la presencia del tetrapéptido YPWM en su extremo C-terminal.

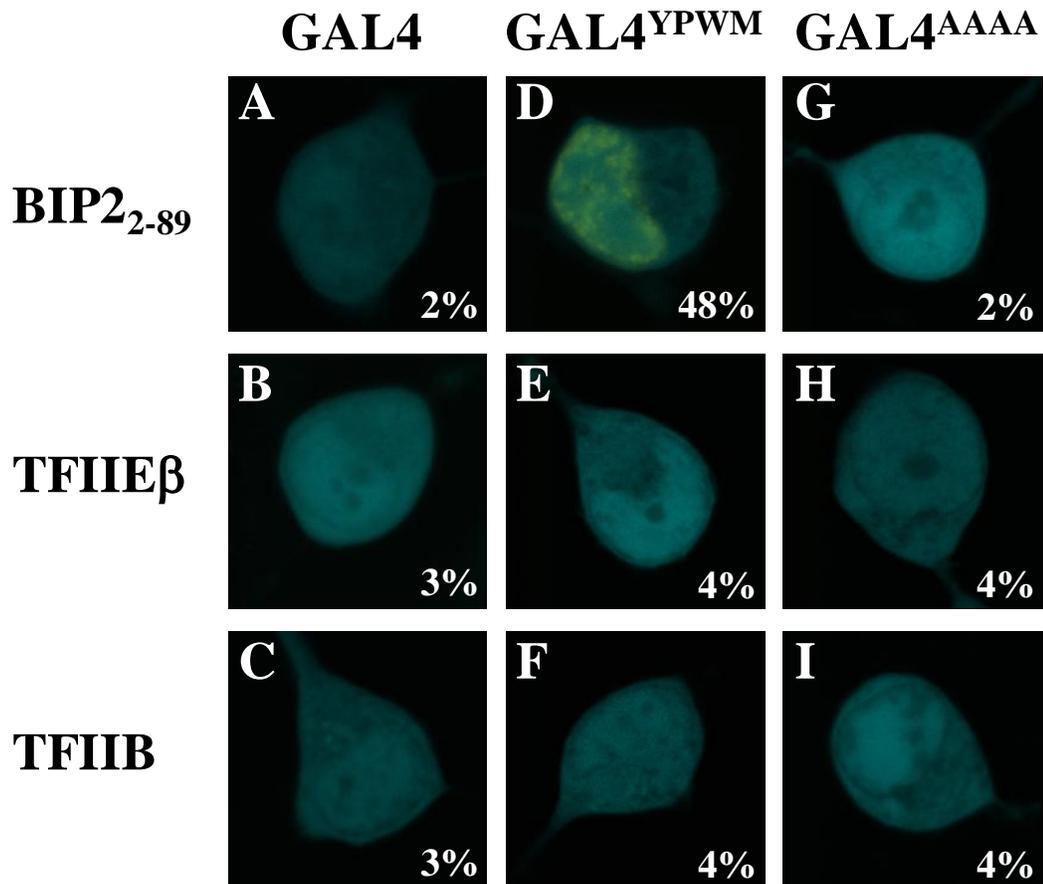
En resumen, los resultados obtenidos en los ensayos de transactivación y BiFC utilizando únicamente los cuatro aminoácidos del tetrapéptido YPWM ó un bloque de cuatro alaninas fusionados a la proteína GAL4 corroboran que el motivo YPWM presenta interacción molecular específica con los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP<sub>22-89</sub> en el contexto de la homeoproteína Antp o fusionado con GAL4.

### **7.3 Análisis de la interacción del tetrapéptido YPWM en los péptidos sintéticos de Antp con los factores transcripcionales BIP2 y Exd**

Adicionalmente, la interacción del tetrapéptido YPWM con los factores transcripcionales BIP<sub>22-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> se analizó en los péptidos sintéticos de Antp (Fig. 22A). Estos péptidos sintéticos (SynthYPWM<sup>LL</sup> y SynthYPWM<sup>SL</sup>) corresponden a la región aminoacídica 277-365 de la homeoproteína Antp que contiene el homeodominio (HD), YPWM y una región del carboxilo-terminal así como un enlazador largo de 8 aminoácidos (LL; del inglés Long Linker) ó corto de 4 aminoácidos (SL; del inglés Short Linker) entre YPWM y HD. Los péptidos de Antp sintéticos SynthWRPW<sup>LL</sup>, SynthWRPW<sup>SL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthAAAA<sup>SL</sup> que presentan la sustitución del tetrapéptido YPWM por el motivo WRPW ó un bloque de alaninas fueron utilizados como controles negativos en los ensayos de transactivación.



**Figura 20. Interacción proteína-proteína de YPWM con Exd<sub>144-376</sub> mediante BiFC.** Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas GAL4 (**A-D**), GAL4<sup>YPWM</sup> (**E-H**) ó GAL4<sup>AAAA</sup> (**I-L**) fusionadas al fragmento no fluorescente VC155 y los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> (**B, F, J**), TBP (**C, G, K**) y TFIIA $\gamma$  (**D, H, L**) fusionados al fragmento no fluorescente VNm9 en células HEK293. Las figuras **A, E** y **I** corresponden a las proteínas de fusión VC155-GAL4, VC155-GAL4<sup>YPWM</sup> y VC155-GAL4<sup>AAAA</sup> en ausencia de factores transcripcionales. La fluorescencia de color amarillo indica una interacción proteína-proteína del factor transcripcional Exd<sub>144-376</sub> con GAL4<sup>YPWM</sup>. La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.



**Figura 21. Interacción proteína-proteína de YPWM con BIP2<sub>2-89</sub> mediante BiFC.** Co-expresión de las proteínas de fusión VC155-GAL4 (A-C), VC155-GAL4<sup>YPWM</sup> (D-F) ó VC155-GAL4<sup>AAAA</sup> (G-I) y VNm9-BIP2<sub>2-89</sub> (A, D, G), VNm9-TFIIE $\beta$  (B, E, H) ó VNm9-TFIIB (C, F, I) en células HEK293. La fluorescencia en color amarillo indica una interacción proteína-proteína del factor transcripcional BIP2<sub>2-89</sub> con GAL4<sup>YPWM</sup>. La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.

### 7.3.1 Efecto de BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> en la transactivación de los péptidos sintéticos de Antp

Para corroborar la interacción molecular de los factores transcripcionales BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> con el tetrapéptido YPWM de los péptidos sintéticos de Antp se llevó a cabo la co-transfección de plásmidos reporteros y productores de BIP2 ó Exd así como los plásmidos productores de los péptidos sintéticos de Antp conteniendo el enlazador largo (SynthYPWM<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup>, SynthWRPW<sup>LL</sup>) ó corto (SynthYPWM<sup>SL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup>, SynthWRPW<sup>SL</sup>) en las células Schneider de *D. melanogaster*.

Los resultados obtenidos en los ensayos de transfección muestran que la homeoproteína Antp presentó una fuerte transactivación del gen reportero Luciferasa (Fig. 12C) a diferencia de los péptidos sintéticos que mostraron una actividad transcripcional del 30 al 50% en comparación con la proteína Antp silvestre (completa). Notablemente, los péptidos sintéticos de enlazador largo SynthYPWM<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>LL</sup> presentaron una mayor transactivación que los péptidos de enlazador corto SynthYPWM<sup>SL</sup> (87%), SynthAAAA<sup>SL</sup> (75%) y SynthWRPW<sup>SL</sup> (50%) como se muestra en la figura 22B. Los péptidos sintéticos que contienen la sustitución del tetrapéptido YPWM por el motivo WRPW (SynthWRPW<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>SL</sup>) ó un bloque de alaninas (SynthAAAA<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup>) mostraron una menor transactivación (50-80%) en comparación con el péptido sintético SynthYPWM<sup>LL</sup> (Fig. 22B). Estos resultados confirman la importancia del tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional de Antp y sugieren que la distancia ó longitud del enlazador (8 ó 4 aminoácidos) entre el homeodominio y YPWM es esencial para la actividad global de esta homeoproteína, así como el extremo amino-terminal de Antp que potencia su actividad transactivadora.

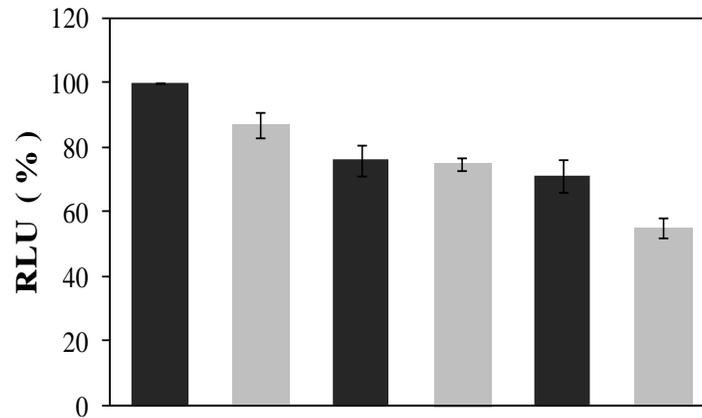
El análisis de transactivación de los péptidos sintéticos de Antp y el factor transcripcional BIP2<sub>2-89</sub> se muestra en la figura 23A. La activación de la transcripción dirigida por los péptidos SynthYPWM<sup>LL</sup> y SynthYPWM<sup>SL</sup> mostró una reducción del 30 y 18% en presencia de BIP2<sub>2-89</sub> respectivamente. Por el contrario, los péptidos SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthAAAA<sup>SL</sup> no presentaron modificación en su actividad transcripcional con BIP2<sub>2-89</sub>. Estos resultados corroboran la interacción del factor transcripcional BIP2<sub>2-89</sub> con el tetrapéptido YPWM de los péptidos sintéticos de Antp.

La co-expresión de la homeoproteína Exd<sub>144-376</sub> disminuyó un 20% ó incrementó en 70% la actividad transcripcional de los péptidos sintéticos SynthYPWM<sup>LL</sup> y SynthYPWM<sup>SL</sup> respectivamente (Fig. 23B). Como se esperaba, la actividad transcripcional de los péptidos sintéticos SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthAAAA<sup>SL</sup> no mostró una diferencia significativa en presencia de Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 23B). Los resultados obtenidos confirman la interacción de la homeoproteína Exd<sub>144-376</sub> con el tetrapéptido YPWM de los péptidos sintéticos de Antp y sugieren que la actividad transcripcional del complejo Antp-Exd es dependiente de la distancia del espaciador (8 ó 4 aminoácidos) entre el tetrapéptido YPWM y el homeodominio.

**A**



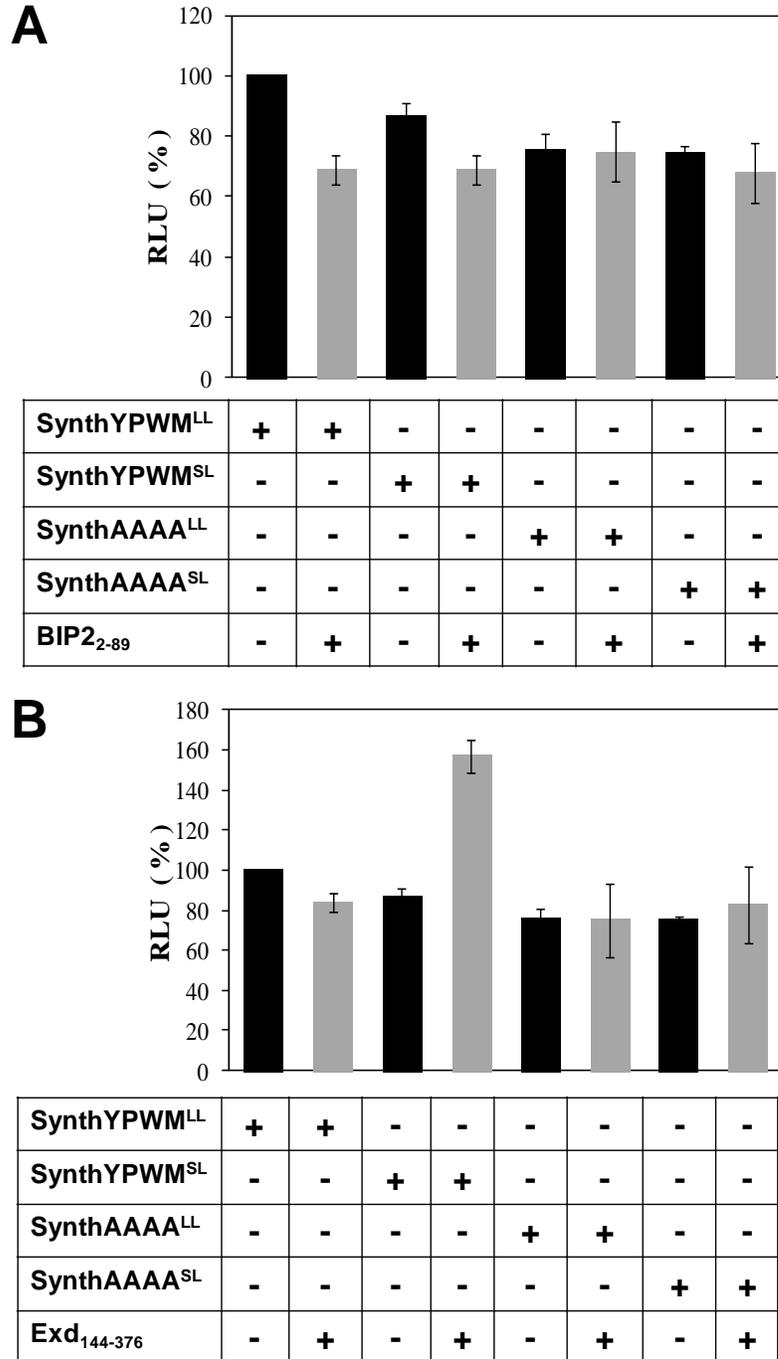
**B**



SynthYPWMLL	+	-	-	-	-	-
SynthYPWMSL	-	+	-	-	-	-
SynthAAAA <sup>LL</sup>	-	-	+	-	-	-
SynthAAAA <sup>SL</sup>	-	-	-	+	-	-
SynthWRPW <sup>LL</sup>	-	-	-	-	+	-
SynthWRPW <sup>SL</sup>	-	-	-	-	-	+

**Figura 22. Determinación de la actividad transcripcional de los péptidos sintéticos de Antp.** **A** Los péptidos sintéticos SynthYPWMLL y SynthYPWMSL se componen de la región aminoacídica 277-365 de la homeoproteína Antp que contiene el tetrapéptido YPWM (café) ubicado río arriba del homeodominio (celeste) a una distancia de 8 (verde) ó 4 aminoácidos (amarillo) respectivamente. Los péptidos SynthAAAA<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup>, SynthWRPW<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>SL</sup> también presentan 8 (espaciador LL) ó 4 aminoácidos (espaciador SL) entre el homeodominio y un bloque de cuatro alaninas (naranja) ó el motivo WRPW (azul) en sustitución de tetrapéptido YPWM. **B** La gráfica muestra la media y desviación estándar de la activación del gen reportero Luciferasa (RLU) por los péptidos SynthYPWMLL, SynthYPWMSL, SynthAAAA<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup>, SynthWRPW<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>SL</sup> producidos por los plásmidos pNPACSynthYPWMLL, pNPACSynthYPWMSL, pNPACSynthAAAA<sup>LL</sup>,

pNPACSynthAAAA<sup>SL</sup>, pNPACSynthWRPW<sup>LL</sup> y pNPACSynthWRPW<sup>SL</sup>. El plásmido pcopiaβgal se utilizó para normalizar la eficiencia de transfección y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.



**Figura 23. Activación de la transcripción de los péptidos sintéticos de Antp en presencia de BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub>.** Las gráficas muestran el porcentaje de activación de la transcripción (RLU) dada por los péptidos sintéticos SynthYPWM<sup>LL</sup>, SynthYPWM<sup>SL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthAAAA<sup>SL</sup> en ausencia (negro)

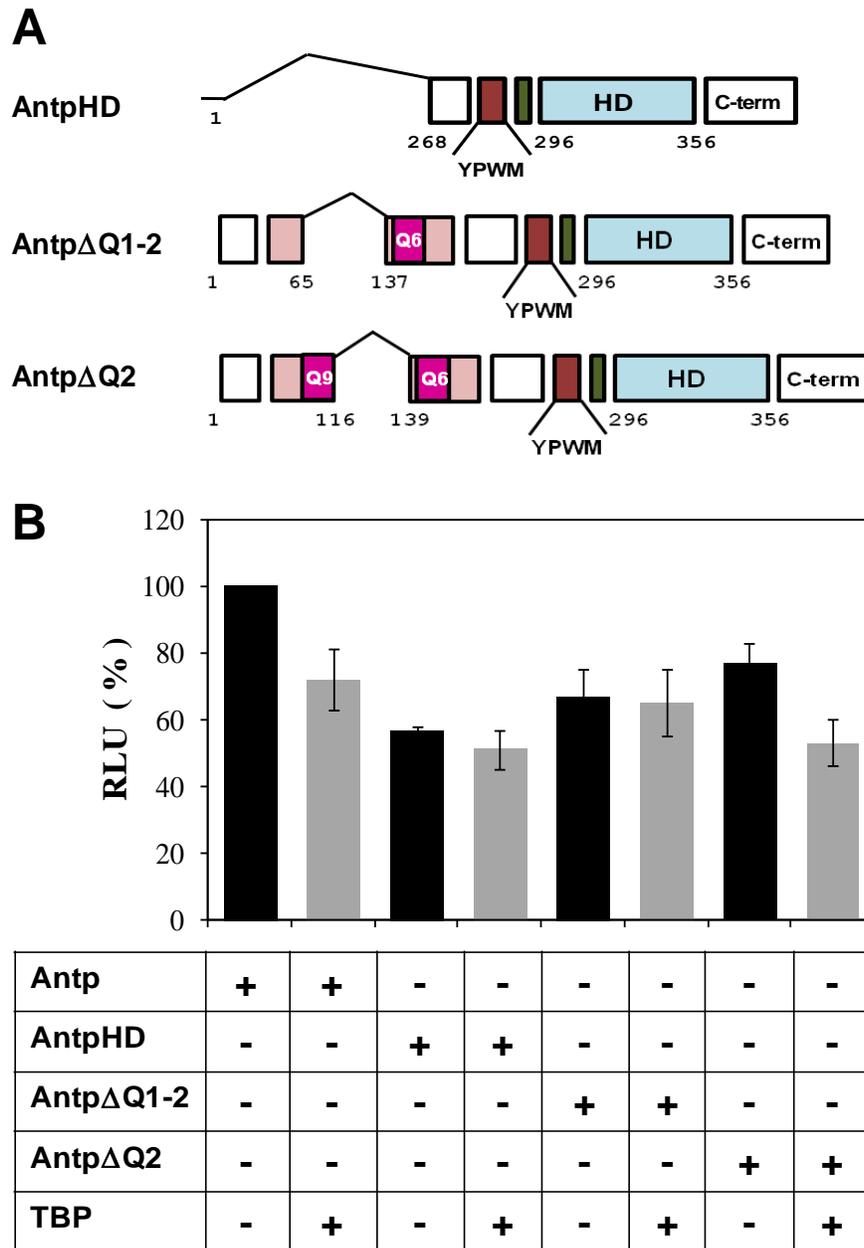
o presencia (gris) de los factores transcripcionales BIP<sub>2-89</sub> (A) y Exd<sub>144-376</sub> (B). El plásmido pcopiaβgal fue empleado para normalizar las transfecciones y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

## **7.4 Análisis de la interacción molecular de la región polyQ de Antp con el factor transcripcional TBP en ensayos de transactivación y BiFC**

### **7.4.1 La región polyQ regula la actividad transcripcional de Antp en presencia de TBP**

Estudios previos han mostrado que los dominios ricos en glutaminas (polyQ) presentes en diferentes activadores transcripcionales por ejemplo SP1 (Emili *et al.*, 1994), SP3 (Majello *et al.*, 1997) y RF2a (Dai *et al.*, 2003) presentan interacción específica con la proteína de unión de la caja TATA (TBP). Debido a lo anterior, se analizó el dominio o región polyQ del extremo N-terminal de la homeoproteína Antp como probable sitio de interacción con el factor transcripcional TBP en ensayos de transactivación. Estos ensayos se basaron en la co-transfección de células Schneider con plásmidos reporteros y productores de las proteínas TBP, AntpHD, AntpΔQ1-2 ó AntpΔQ2. La proteína AntpHD corresponde a la región aminoacídica 268-379 de la homeoproteína Antp que contiene el HD, extremo C-terminal y la delección del extremo N-terminal. Las proteínas AntpΔQ1-2 y AntpΔQ2 presentan las delecciones Δ66-136 y Δ117-138 respectivamente de la región polyQ localizada en el extremo N-terminal de la homeoproteína Antp como se muestra en la figura 24A.

Los resultados obtenidos en los ensayos de transactivación muestran que la homeoproteína Antp completa presenta una fuerte actividad transcripcional (100%) a diferencia de las proteínas mutantes AntpHD, AntpΔQ1-2 y AntpΔQ2 que mostraron una transactivación de 57, 67 y 77% respectivamente (Fig. 24B). Notablemente, la co-expresión de TBP reduce significativamente en 43 y 24% la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp y AntpΔQ2 respectivamente mientras que las proteínas AntpHD y AntpΔQ1-2 no mostraron disminución en su transactivación (Fig. 24B). Estos resultados indican que el extremo N-terminal y región polyQ de la homeoproteína Antp son esenciales para su actividad transcripcional y sugieren que el dominio polyQ, específicamente la región aminoacídica 66-116 presente en la mutante AntpΔQ2, es requerido para la formación del complejo transcripcional Antp-TBP.



**Figura 24. Actividad transcripcional de las mutantes AntpHD, AntpΔQ1-2 y AntpΔQ2 en presencia de TBP.** **A** Los plásmidos recombinantes pPACAntpHD, pNPACAntpΔQ1-2 y pNPACAntpΔQ2 dirigen la expresión de las proteínas mutantes AntpHD, AntpΔQ1-2 y AntpΔQ2 que poseen una delección del extremo N-terminal (AntpHD) o delección parcial del dominio polyQ en las regiones 66-136 (AntpΔQ1-2) y 117-138 (AntpΔQ2) de Antp. **B** La gráfica muestra la media y desviación estándar de activación de la transcripción (RLU) dada por las proteínas Antp y mutantes (AntpHD, AntpΔQ1-2 y AntpΔQ2) en ausencia (negro) ó presencia (gris) del factor transcripcional general TBP. El plásmido pcopiaβgal se utilizó para normalizar la eficiencia de transfección y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

## **7.4.2 Interacción proteína-proteína de la región polyQ con TBP**

Para corroborar la interacción proteína-proteína del dominio polyQ, específicamente la región aminoacídica 66-116 del extremo N-terminal de Antp con el factor transcripcional TBP se realizaron ensayos BiFC basados en la co-transfección de plásmidos recombinantes para las proteínas TBP y AntpHD, Antp $\Delta$ Q1-2 ó Antp $\Delta$ Q2 fusionadas a los fragmentos VNm9 y VC155 respectivamente. Estos plásmidos recombinantes y el plásmido control pECFP-N1 fueron introducidos en las células HEK293 como se describe en la sección de materiales y métodos.

El análisis de fluorescencia mediante microscopía confocal muestra que las proteínas de fusión Antp, AntpHD, Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 no presentaron fluorescencia basal en las células HEK293 transfectadas (Figs. 25A, C, E y G). La interacción de las proteínas de fusión Antp y TBP resultó en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia color amarillo) como se muestra en la figura 25B. La delección del dominio polyQ en AntpHD (Fig. 25D) ó la región aminoacídica 66-136 en Antp $\Delta$ Q1-2 (Fig. 25F) disminuyó significativamente la interacción con la proteína de fusión TBP evitando la maduración del fluoróforo ya que las células HEK293 transfectadas presentaron únicamente niveles de fluorescencia inespecífica (25%). Por el contrario, la co-expresión de las proteínas de fusión Antp $\Delta$ Q2 y TBP resultó en la complementación de la fluorescencia de Venus (Fig. 25H) demostrando que la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ de Antp es indispensable para su interacción con TBP.

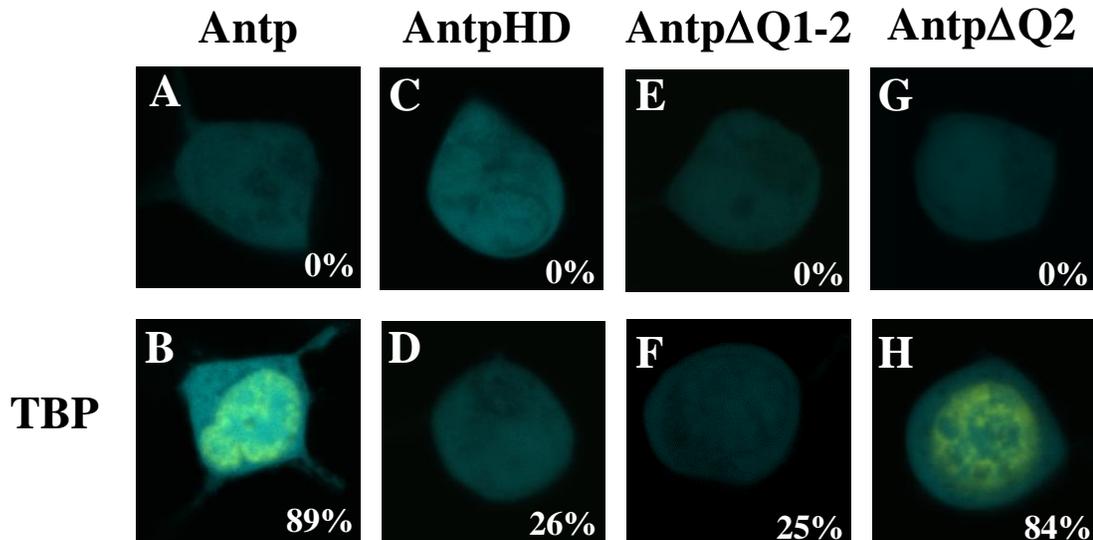
Estos resultados en conjunto corroboran la interacción molecular proteína-proteína del factor transcripcional TBP con el dominio polyQ de la homeoproteína Antp a través de su región aminoacídica 66-116 modificando así la actividad transcripcional de esta homeoproteína.

## **7.5 Análisis de la interacción molecular del HD de Antp con TFIIE $\beta$ en ensayos de transactivación y BiFC**

### **7.5.1 Actividad transcripcional de mutantes en las hélices I y II del HD en presencia de TFIIE $\beta$**

Los resultados obtenidos en ensayos de transactivación y BiFC muestran que la interacción de la homeoproteína Antp y el factor transcripcional TFIIE $\beta$  es mediada por el HD el cual presenta el sitio de unión al DNA en la hélice III por lo que se analizaron

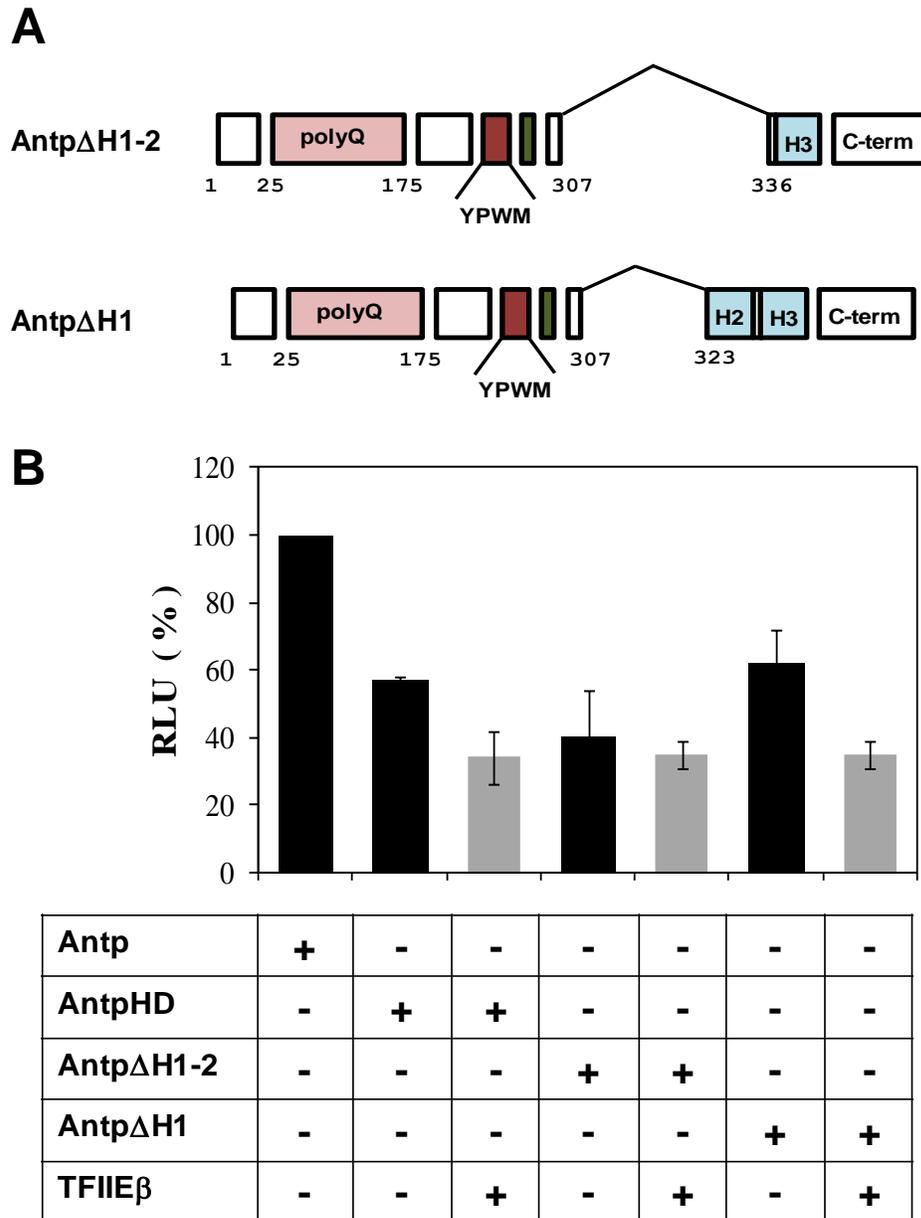
las hélices restantes (hélice I y II) del HD como sitios probables de interacción con TFIIE $\beta$ . Para ello, se realizó la co-transfección de plásmidos reporteros y productores de las proteínas Antp, AntpHD, Antp $\Delta$ H1-2, Antp $\Delta$ H1 y TFIIE $\beta$  en células Schneider de *D. melanogaster* como se describe en la sección de material y métodos. Las proteínas Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1 presentan la delección de las regiones aminoacídicas 308-335 (hélices I y II) ó 308-322 (hélice I) de la homeoproteína Antp como se muestra en la figura 26A.



**Figura 25. Interacción de TBP con la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ de Antp mediante BiFC.** Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas VC155-Antp (A-B), VC155-AntpHD (C-D), VC155-Antp $\Delta$ Q1-2 (E-F) ó VC155-Antp $\Delta$ Q2 (G-H) y el factor transcripcional TBP fusionado al fragmento VNm9 (B, D, F, H) en células HEK293. Las figuras A, C, E y G corresponden a las proteínas de fusión VC155-Antp y mutantes en ausencia de los factores transcripcionales. La fluorescencia de color amarillo indica una interacción proteína-proteína del factor transcripcional TBP con Antp y Antp $\Delta$ Q2. La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.

El análisis de la actividad transcripcional de Antp y mutantes muestra que las proteínas AntpHD (57%), Antp $\Delta$ H1-2 (40%) y Antp $\Delta$ H1 (62%) presentaron una menor transactivación en comparación con el 100% dado por la homeoproteína Antp completa (Fig. 26B). La reducción en la transactivación de las proteínas AntpHD y mutantes es debida a la ausencia del extremo N-terminal de Antp que presenta interacción proteína-proteína con el factor transcripcional TBP (Fig. 24B). La expresión simultánea del factor transcripcional TFIIE $\beta$  disminuyó notablemente la actividad transcripcional de las proteínas AntpHD (23%) y Antp $\Delta$ H1 (27%) indicando que la formación del complejo Antp-TFIIE $\beta$  es independiente de la hélice I del homeodominio (Fig. 26B). Por el

contrario, la proteína Antp $\Delta$ H1-2 no presentó una reducción significativa en su transactivación en presencia de TFIIE $\beta$  (Fig. 26B). Estos resultados sugieren que la interacción molecular del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIE $\beta$  es mediada específicamente por la hélice II.



**Figura 26. Efecto de TFIIE $\beta$  en la activación de la transcripción de AntpHD y mutante Antp $\Delta$ H1. A** Las proteínas mutantes Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1 presentan una delección de las hélices I y II (Antp $\Delta$ H1-2) o hélice I (Antp $\Delta$ H1) del homeodominio de Antp. **B** En la gráfica se muestra el porcentaje de la actividad transcripcional en Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) de las proteínas Antp y mutantes (AntpHD, Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1) en ausencia (negro) o presencia (gris) del factor transcripcional

TFIIE $\beta$ . El plásmido pcopia $\beta$ gal fue utilizado para normalizar las transfecciones y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

### **7.5.2 Interacción proteína-proteína de la hélice II del HD con TFIIE $\beta$**

El análisis BiFC para corroborar la interacción proteína-proteína de las hélices I y/o II del homeodominio de Antp con el factor transcripcional TFIIE $\beta$  se llevó a cabo mediante la co-transfección de los plásmidos recombinantes que codifican para el fragmento VNm9 fusionado con TFIIE $\beta$  y proteínas mutantes AntpHD, Antp $\Delta$ H1-2 ó Antp $\Delta$ H1 fusionadas al fragmento VC155. El plásmido control pECFP-N1 y los plásmidos recombinantes fueron posteriormente introducidos en células embrionarias HEK293.

La visualización de las proteínas de fusión Antp, AntpHD y mutantes mediante microscopía confocal mostró la ausencia de fluorescencia intrínseca (Figs. 27A, C, E y G). La co-expresión de las proteínas de fusión TFIIE $\beta$  y Antp (Fig. 27B), AntpHD (Fig. 27D) ó Antp $\Delta$ H1 (Fig. 27H) resultó en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia color amarillo). Por el contrario, la delección de la hélice II del HD en Antp $\Delta$ H1-2 disminuyó notablemente (21%) su interacción con la proteína de fusión TFIIE $\beta$  evitando la maduración del fluoróforo en células HEK293 (Fig. 27F). Estos resultados confirman que la hélice II del HD es requerida mediante interacción proteína-proteína en la formación del complejo transcripcional Antp-TFIIE $\beta$ .

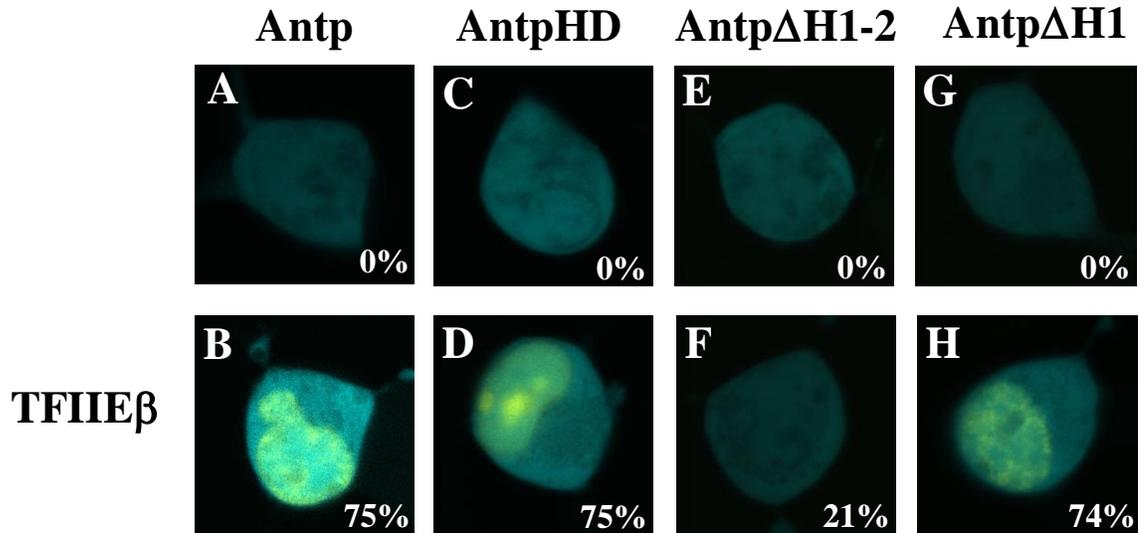
En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos de transactivación y BiFC utilizando proteínas mutantes en el homeodominio de Antp (Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1) corroboraron que la hélice II del homeodominio presenta interacción proteína-proteína con el factor transcripcional TFIIE $\beta$  para la regulación de la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp.

## **7.6 Análisis de la interacción molecular de los HDs de Antp y AbdB**

### **7.6.1 Efecto de la mutación E19G en la actividad transcripcional de Antp y AbdB**

Estudios realizados por Plaza y cols. en 2008 demostraron que el aminoácido Glutámico 19 (E19) localizado en el HD de Antp es requerido para la interacción con los

dominios HD y PD de la proteína Eyeless (Plaza *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, se analizó la importancia del aminoácido E19 en la actividad transcripcional de los HDs de Antp y AbdB mediante ensayos de transactivación. Estos ensayos se basaron en la co-transfección de plásmidos reporteros y productores de las proteínas Antp, AntpG19 y AbdB ó AbdBG19 en células Schneider. Adicionalmente, se analizó la participación de la homeoproteína Exd en la formación del complejo Antp-AbdB.



**Figura 27. Interacción de TFIIIE $\beta$  con la hélice II del homeodominio de Antp mediante BiFC.** Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas VC155-Antp (A-B), VC155-AntpHD (C-D), VC155-Antp $\Delta$ H1-2 (E-F) ó VC155-Antp $\Delta$ H1 (G-H) y el factor transcripcional VNm9-TFIIIE $\beta$  (B, D, F, H) en células HEK293. Las figuras A, C, E y G corresponden a las proteínas de fusión VC155-Antp y mutantes en ausencia de factores transcripcionales. La fluorescencia de color amarillo indica una interacción proteína-proteína del factor transcripcional TFIIIE $\beta$  con Antp y mutantes (AntpHD y Antp $\Delta$ H1). La proteína fluorescente ECFP (cian) fue empleada como control positivo de transfección. El porcentaje indica el número de células positivas de interacción.

Los resultados obtenidos en los ensayos de transactivación muestran que las proteínas Antp y AntpG19 presentaron una fuerte actividad transcripcional (3.5 veces) a diferencia de las proteínas AbdB (30%), AbdBG19 (31%) y Exd (35%) que mostraron la nula transactivación del gen reportero en comparación con el vector parental pPAC (30%) que representa la activación transcripcional basal (Figs. 28A y B). El análisis de la actividad transcripcional de AbdB ó AbdBG19 no mostró una diferencia significativa en presencia del cofactor Exd<sub>144-376</sub> (Figs. 28A y B). La co-expresión de Antp-AbdB ó Antp-Exd<sub>144-376</sub> disminuyeron en un 77 y 53% la actividad transcripcional de Antp respectivamente (Fig. 28A). La transactivación de AntpG19 también mostró una disminución (57%) en presencia de las proteínas AbdB y Exd<sub>144-376</sub> (Fig. 28B).



**Figura 28. Efecto de la mutación G19 en la actividad transcripcional de Antp, AbdB y Exd.** Los ensayos de transactivación se basaron en la co-transfección de plásmidos reporteros (pGLH11 y pcpia $\beta$ gal) y productores de Antp (pNPACAntp) ó AntpG19 (pNPACAntpG19), Exd<sub>144-376</sub>, (pPACExd<sub>144-376</sub>), AbdB (pPACAbdB) y AbdBG19 (pPACAbdBG19). **A** En la gráfica se observa la expresión de Luciferasa (RLU) como resultado de la transactivación dada por las homeoproteínas Antp, AbdB y Exd<sub>144-376</sub> individuales o en combinación. **B** La gráfica muestra la activación transcripcional del gen reportero (RLU) producida por las proteínas mutantes AntpG19, AbdG19 y Exd individuales o en combinación. El plásmido pcpia $\beta$ gal fue utilizado para normalizar la eficiencia de transfección y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

Para confirmar la interacción proteína-proteína del aminoácido E19 de las homeoproteínas Antp y AbdB se realizaron ensayos BiFC mediante la fusión de las proteínas AntpHD, AntpHDG19 y AbdBHD ó AbdBHDG19 con los fragmentos VC155 y VNm9 de la proteína fluorescente Venus. Las proteínas AntpHD y AbdBHD corresponden a los homeodominios de Antp y AbdB respectivamente mientras que las proteínas AntpHDG19 y AbdBHDG19 presentan la mutación E19G en el homeodominio. El análisis BiFC mostró que la interacción de las proteínas de fusión AntpHD y AbdBHD resultó en la reconstitución de la actividad de Venus en el 90% de las células HEK293 transfectadas. En contraste, la mutación E19G en el homeodominio de las proteínas AntpHDG19 y AbdBHDG19 eliminó completamente la interacción entre ambas homeoproteínas confirmando que la interacción proteína-proteína de los homeodominios de Antp y AbdB es mediada únicamente por el aminoácido E19 (Adachi *et al.*, 2012).

## 8. DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis consistió en analizar las interacciones moleculares de la homeoproteína Antennapedia y sus dominios YPWM, polyQ y homeodominio con GTFs de la maquinaria transcripcional basal así como otras homeoproteínas. Para ello, se realizó la disección funcional de estas regiones en Antp mediante mutación del tetrapéptido YPWM por alaninas ó su fusión con la proteína transactivadora GAL4, delección total ó parcial del dominio polyQ (homopéptidos Q<sub>9</sub> y Q<sub>6</sub>) y homeodominio (hélices I y II) así como la mutación puntual del aminoácido Glutámico19 (Glu19) en los homeodominios de Antp y AbdB. Posteriormente, se determinó la actividad transcripcional de Antp, GAL4 y mutantes en presencia de los factores transcripcionales generales TBP, TFIIA $\gamma$ , TFIIB, BIP<sub>2-89</sub>, TFIIIE $\beta$  y homeoproteínas Exd<sub>144-376</sub> ó AbdB. Finalmente, se corroboraron y visualizaron las interacciones proteína-proteína de las diferentes mutantes de Antp y GAL4 con los factores transcripcionales y homeoproteínas mediante la formación de complejos fluorescentes con BiFC.

### **Antp interactúa específicamente con los factores transcripcionales TBP, TFIIIE $\beta$ , BIP<sub>2-89</sub> y las homeoproteínas Exd<sub>144-376</sub> y AbdB**

El análisis de activación de la transcripción por la homeoproteína Antp con factores transcripcionales se realizó mediante ensayos de transactivación en células Schneider (Schneider, 1972) utilizando el plásmido reportero pGLH11 (Fig. 12A). Este plásmido contiene once copias del sitio de unión BS2 de un sitio Hox consenso reconocido por múltiples homeoproteínas: Antp, AbdB, Exd, HoxA5, HoxB7, HoxB8 y HoxC8 (Otting *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 1995; Adachi *et al.*, 2012). Los niveles de transactivación cuantificados como RLU (Unidades Relativas de Luz) indican que la homeoproteína Antp actúa como un potente activador transcripcional *ex vivo* (Figs. 12C, 28A) a diferencia de los péptidos sintéticos de Antp (Fig. 22A) u homeoproteínas AbdB y Exd (Fig. 28A) que mostraron una menor activación (30%). En contraste con otras proteínas de homeodominio que reprimen la transcripción basal o activada (Catron *et al.*, 1995; Moonkyoung *et al.*, 1995; Han y Manley, 1993), la homeoproteína Antp incrementó notablemente la transcripción basal en comparación con el plásmido parental (Fig. 28A) confirmando su habilidad para

favorecer la transcripción *in vivo* (Winslow *et al.*, 1989). Además, las células Schneider expresan endógenamente el co-factor Exd (Rieckhof *et al.*, 1997) el cual podría colaborar con Antp para la activación del reportero (Fig. 12C). Por otro lado, estos resultados muestran la primera evidencia de la probable interacción molecular de Antp con todos los factores transcripcionales analizados (TBP, TFIIA $\gamma$ , TFIIB, BIP<sub>2-89</sub>, TFIIE $\beta$ , Exd<sub>144-376</sub> y AbdB) ya que ocasionaron una reducción significativa del 28-77% en la transactivación de esta homeoproteína (Fig. 12C). Consideramos que lo anterior se debe al fenómeno denominado comúnmente como “*squelching*” el cual es producto de la interacción entre dos proteínas expresadas simultáneamente, por ejemplo el efecto transcripcional de la interacción Eve-TBP en células Schneider L2 (Moonkyoung *et al.*, 1995). Es importante mencionar que estos resultados no descartan posibles interacciones entre Antp y los factores transcripcionales TFIIA $\alpha\beta$ , TFIIF ó TFIIH que forman parte del complejo de pre-iniciación (PIC) pero no fueron analizados en el presente trabajo.

Para analizar la probable interacción de Antp con todos los factores transcripcionales, se realizaron ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular ó BiFC (Fig. 14; Kerppola, 2006; Saka *et al.*, 2006) mediante la co-expresión en células HEK293 (Graham *et al.*, 1977) de la homeoproteína Antp y factores transcripcionales fusionados con los fragmentos C-terminal (VC155) ó N-terminal (VNm9) de la proteína fluorescente Venus. El análisis de fluorescencia mediante microscopía confocal reveló que la mayoría de las células transfectadas (75-90%) con las proteínas Antp y Exd<sub>144-376</sub>, TBP, BIP<sub>2-89</sub>, TFIIE $\beta$  ó AbdB mostraron la maduración del fluoróforo Venus (Figs. 15B, 15C, 16A, 16B y 16D). Estos resultados confirmaron la interacción molecular proteína-proteína de Antp con TBP, TFIIE $\beta$ , AbdB y las regiones aminoacídicas 144-376 y 2-89 de Exd (Exd<sub>144-376</sub>) y BIP2 (BIP<sub>2-89</sub>) respectivamente. Los factores generales TBP y TFIIE $\beta$  participan en el inicio de la transcripción (iniciación) y en la transición a la etapa de elongación (Lee y Young, 2000). BIP2 (TAF155) es un factor transcripcional TAF también asociado al complejo acetiltransferasa de histonas TFTC (Gangloff *et al.*, 2001; Prince *et al.*, 2008). La homeoproteína AbdB forma parte del complejo Bithorax y determina la identidad de los segmentos más posteriores del embrión de *D. melanogaster*. Extradenticle (Exd) es una homeoproteína atípica que forma parte de la familia de co-factores TALE que presentan interacción con diversas proteínas Hox para incrementar su especificidad de unión al DNA (Mann *et al.*, 2009; Hudry *et al.*, 2012).

Por otro lado, el análisis BiFC no mostró fluorescencia de Venus en la expresión simultánea de las proteínas de fusión Antp y TFIIA $\gamma$  ó TFIIB (Figs. 15D y 16C) lo que refleja la ausencia de interacción molecular entre Antp y los factores transcripcionales generales TFIIA $\gamma$  y TFIIB. Como la subunidad menor de 12 kDa del factor

transcripcional TFIIA (TFIIA $\gamma$ ) presenta interacción específica con la región básica de TBP (DeJong *et al.*, 1995), probablemente el efecto de TFIIA $\gamma$  en la capacidad transactivadora de Antp mostrado en la figura 12C es el resultado de la formación de un complejo trimérico TFIIA $\gamma$ -TBP-Antp donde TBP colabora simultáneamente con ambas proteínas pero no existe una interacción directa entre TFIIA $\gamma$  y Antp como se visualizó en los ensayos BiFC (Fig. 15D). Similarmente, el factor transcripcional TFIIB que muestra interacción proteína-proteína con TBP (Orphanides *et al.*, 1996) también ocasionó la reducción en la transactivación de Antp (Fig. 12C) pero como no mostró una interacción directa con esta homeoproteína mediante BiFC (Fig. 16C), probablemente se deba a la interacción de TFIIB con el heterodímero TBP-Antp vía TBP.

Los resultados obtenidos en la co-expresión de las proteínas Antp y GAL4 en conjunto mostraron un incremento (115%) en la transactivación de GAL4 (Cárdenas-Chávez, 2007) sugiriendo que la interacción de la homeoproteína Antp con los factores transcripcionales TBP, BIP2<sub>2-89</sub> y TFIIE $\beta$  (Figs. 15C, 16A y 16B) se podría presentar aún en ausencia de sitios de unión para Antp en el DNA. De forma similar, Msx1 regula la diferenciación y proliferación mediante interacción con los complejos transcripcionales TBP-TFIIA y TBP-TFIIA-TFIIB en ausencia de sitios de unión del homeodominio (Catron *et al.*, 1995).

### **El motivo YPWM de Antp modula la actividad transcripcional e interacción molecular con Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub>**

El estudio funcional del tetrapéptido YPWM reveló que este motivo es esencial para el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* y transformaciones homeóticas antena-tarso y ojo-antena inducidas por Antp (Apéndice III, Papadopoulos *et al.*, 2011). La mutación de este tetrapéptido por alaninas así como su fusión con la proteína heteróloga GAL4 revelaron que YPWM actúa como un dominio de represión transcripcional en la homeoproteína Antp de manera similar que el dominio WRPW en las proteínas Hairy (Cárdenas-Chávez, 2007; Fisher *et al.*, 1996). Además, el tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la represión de los genes blanco *Salm*, *dan* y *Scr* en el disco de la antena y segmentos labial-T1 del embrión de *Drosophila* lo que confirma su actividad represora *ex vivo* (Cárdenas-Chávez, 2003). Interesantemente, la activación ectópica de *grn* (disco antenal) y *tsh* (región anterior del embrión) inducida por Antp también mostró un requerimiento absoluto de este motivo (Apéndice III, Papadopoulos *et al.*, 2011). Estos resultados confirman la importancia funcional del tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional dual (represión y/o activación) de la homeoproteína Antp para la regulación de los diferentes genes blanco.

Estudios previos identificaron la homeoproteína Exd y el factor transcripcional BIP2 como co-factores de Antp (Merabet *et al.*, 2007; Prince *et al.*, 2008). Notablemente, la co-expresión de Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> no modificó la capacidad transactivadora de la mutante con sustitución de YPWM por alaninas (Antp<sup>AAAA</sup>) a diferencia de la proteína Antp normal (Figs. 12C, 13A y 13B) lo cual indica que el tetrapéptido YPWM es requerido para la formación de los complejos Antp-BIP2<sub>2-89</sub> y Antp-Exd<sub>144-376</sub> como se observó en ensayos de retardación en gel (Apéndice III, Papadopoulos *et al.*, 2011). Estos resultados demuestran que únicamente las regiones aminoacídicas 144-376 y 2-89 de los factores transcripcionales Exd (Exd<sub>144-376</sub>) y BIP2 (BIP2<sub>2-89</sub>) participan en la interacción con la homeoproteína Antp (Figs. 12C, 15B y 16A). El motivo YPWM de Antp contiene el aminoácido Triptófano (W) que ha sido involucrado principalmente en la interacción de diferentes proteínas Metahox con el homeodominio de Exd/Pbx (Moens y Selleri, 2006). Además, el análisis de diferentes proteínas Hox de vertebrados (Hoxa1, Hoxb8, Hoxa9) e invertebrados confirma que el motivo YPWM es requerido de manera preferencial para la interacción con Exd/Pbx ya que la unión al DNA y/o interacción con las proteínas Meis podría modificar esta interacción (Hudry *et al.*, 2012). Por el contrario, algunas homeoproteínas como AbdA y Ubx utilizan principalmente otros dominios, por ejemplo UbdA y TDWM, para la interacción con el co-factor Exd (Hudry *et al.*, 2012). La región 2-89 del factor transcripcional BIP2 corresponde principalmente a un dominio HFD (Histone Fold Domain) relacionado con la formación de dímeros de histonas (Gangloff *et al.*, 2001; Aasland *et al.*, 1995), por ello la interacción Antp-BIP2<sub>2-89</sub>, mediada por el tetrapéptido YPWM, propone la asociación de esta homeoproteína con la cromatina o proteínas asociadas a la cromatina. Adicionalmente, este dominio HFD presenta interacción selectiva con el factor transcripcional dTAF<sub>II</sub>24 (Gangloff *et al.*, 2001) sugiriendo una probable competencia con la homeoproteína Antp durante la formación del complejo de pre-iniciación que repercutiría obviamente en la especificidad de Antp *in vivo*.

La interacción entre el tetrapéptido YPWM de Antp y factores transcripcionales generales también se analizó en el contexto de una proteína heteróloga (Figs. 17-19). Para ello, se utilizó la proteína GAL4 de levaduras y su fusión con YPWM (GAL4<sup>YPWM</sup>) ó un bloque de cuatro alaninas como control negativo (GAL4<sup>AAAA</sup>). Los ensayos de transactivación en células Schneider mostraron que la co-expresión de BIP2<sub>2-89</sub> resultó en una reducción (70%) de la transactivación de la proteína GAL4<sup>YPWM</sup> en comparación con GAL4 y GAL4<sup>AAAA</sup> sugiriendo que la formación del complejo GAL4<sup>YPWM</sup>-BIP2<sub>2-89</sub> es mediada exclusivamente por el tetrapéptido YPWM (Figs. 17A, 18A y 19A). Asimismo, la interacción GAL4<sup>YPWM</sup>-Exd<sub>144-376</sub> no fue identificada en los ensayos de transactivación (Fig. 18A) debido a la ausencia de sitios de unión para Exd (TGAT, Mann *et al.*, 2009) en el plásmido reportero pGL25XGAL4promoter. Estos resultados corroboran que la regulación transcripcional por el complejo Antp-Exd es

específicamente dependiente de DNA y del tetrapéptido YPWM, mientras que la interacción Antp-BIP2 requiere únicamente de YPWM por lo que otras homeoproteínas ó proteínas heterólogas que contengan este motivo, por ejemplo GAL4<sup>YPWM</sup>, podrían interactuar con BIP2.

Los ensayos BiFC utilizando la proteína mutante Antp<sup>AAAA</sup> y factores transcripcionales fusionados con los fragmentos no fluorescentes VC155 y VNm9 respectivamente mostraron que Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> no presentaron interacción con esta mutante en células HEK293 (Figs. 15F y 16E). Esto demuestra que los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> mostraron un requerimiento absoluto del tetrapéptido YPWM para la interacción con Antp en cultivo celular e *in vitro* (Apéndice III, Papadopoulos et al., 2011). Adicionalmente, el 42-48% de las células HEK293 transfectadas mostraron fluorescencia por complementación en la expresión simultánea de las proteínas de fusión GAL4<sup>YPWM</sup> y Exd<sub>144-376</sub> ó BIP2<sub>2-89</sub> (Figs. 20F y 21D) demostrando así la interacción proteína-proteína de estos factores transcripcionales con el tetrapéptido YPWM fusionado al extremo C-terminal de GAL4.

La interacción específica del tetrapéptido YPWM con los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP2<sub>2-89</sub> fue adicionalmente confirmada mediante el estudio *in vivo* e *in vitro* de los péptidos sintéticos de Antp (Fig. 22A). Estos péptidos contienen un espaciador largo de 8 aminoácidos (LL) ó corto de 4 aminoácidos (SL) entre el homeodominio y YPWM (SynthYPWM) ó un bloque de alaninas como control negativo (SynthAAAA). La sustitución del tetrapéptido por el dominio WRPW (SynthWRPW) permitió analizar su actividad represora. Los resultados muestran que el tetrapéptido YPWM es requerido para la función homeótica de los péptidos sintéticos de Antp en las etapas embrionaria, larval y adulta de *Drosophila* (Apéndice III, Papadopoulos et al., 2011). Además, este tetrapéptido presentó una actividad transcripcional dual en los péptidos sintéticos igual que en la homeoproteína Antp, mientras que la sustitución por WRPW retiene la actividad represora en ambos casos. Interesantemente, el péptido sintético de espaciador largo (SynthYPWM<sup>LL</sup>) exhibe una mayor actividad represora de *Scr*, *Sal* y *dan* en comparación con el péptido de espaciador corto (SynthYPWM<sup>SL</sup>) que participa principalmente en la activación de *tsh* y *grn* (Apéndice III, Papadopoulos et al., 2011).

El análisis en cultivo celular reveló que los péptidos sintéticos de Antp poseen una menor actividad transcripcional (30-50%) que la homeoproteína Antp (100%), aunque exhibieron una idéntica actividad homeótica *in vivo* (Apéndice III, Papadopoulos et al., 2011). Esta diferencia transcripcional de los péptidos sintéticos radica en la ausencia de la región polyQ en su extremo N-terminal la cual fue identificada como dominio de

activación en las proteínas Bicoide y AbdB (Janodi *et al.*, 2001; Merabet *et al.*, 2003). El motivo TSYF localizado en el extremo N-terminal de Antp pero no en los péptidos sintéticos es otro dominio involucrado en el potencial transcripcional de homeoproteínas como Scr y HoxA5 (Tour *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 1996). Los péptidos sintéticos SynthYPWM<sup>LL</sup> y SynthYPWM<sup>SL</sup> también mostraron una mayor transactivación en comparación con el resto de los péptidos sintéticos (50-80%) que contienen alaninas o el motivo WRPW así como un espaciador largo o corto (Fig. 22B). Notablemente, los péptidos de espaciador largo (SynthYPWM<sup>LL</sup>, SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthWRPW<sup>LL</sup>) poseen una mayor actividad transcripcional que los péptidos de espaciador corto (SynthYPWM<sup>SL</sup>, SynthAAAA<sup>SL</sup> y SynthWRPW<sup>SL</sup>). Este comportamiento de los péptidos sintéticos de Antp fue previamente observado en el embrión y discos antenales de *Drosophila* donde los péptidos de espaciador largo actúan como potentes activadores mientras que los péptidos de espaciador corto son fuertes represores (Apéndice III, Papadopoulos *et al.*, 2011). Estos resultados confirman evidentemente la importancia del tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional de Antp y péptidos sintéticos e indican que la especificidad de esta homeoproteína depende parcialmente de la longitud del espaciador (8 ó 4 aminoácidos). En el caso de las homeoproteínas Deformed y Scr, el motivo YPWM y la región espaciadora conforman el único elemento regulatorio *in vivo* ya que no poseen dominios funcionales N-terminales relacionados con la especificidad de reconocimiento del DNA (Joshi *et al.*, 2010).

Los resultados de transactivación mostraron además una actividad transcripcional reducida (70-80%) del péptido sintético SynthYPWM<sup>LL</sup> en presencia de los factores transcripcionales BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> (Figs. 23A y B). Similarmente, la co-expresión de BIP2<sub>2-89</sub> resultó en una reducción (18%) en la transactivación del péptido de espaciador corto SynthYPWM<sup>SL</sup> (Fig. 23A), mientras que Exd<sub>144-376</sub> incrementó su actividad transcripcional en 70% (Fig. 23B). Lo anterior refleja nuevamente la interacción de las regiones aminoacídicas 2-89 y 144-376 de los factores BIP2 y Exd respectivamente con el tetrapéptido YPWM de Antp y sus péptidos sintéticos, mientras que la ausencia de interacción de estos factores transcripcionales con los péptidos que contienen la mutación de alaninas (SynthAAAA<sup>LL</sup> y SynthAAAA<sup>SL</sup>) corroboran nuestros resultados (Figs. 23A y B). En ensayos de retardación *in vitro* (EMSA) el tetrapéptido YPWM también fue indispensable para la interacción péptidos sintéticos-Exd/BIP2, observándose una fuerte interacción entre el péptido de espaciador corto SynthYPWM<sup>SL</sup> y el co-factor Exd (Apéndice III, Papadopoulos *et al.*, 2011). Reed y cols. en 2010 observaron que la isoforma de espaciador corto de la homeoproteína Ubx presentaba mayor afinidad por el DNA en presencia de Exd en comparación con la isoforma de espaciador largo.

## **El motivo YPWM de Antp no es requerido para la interacción molecular con TBP, TFIIE $\beta$ y AbdB**

El análisis de interacción del tetrapéptido YPWM en ensayos de transactivación mostró que la presencia de los factores TBP, TFIIE $\beta$  y AbdB resultó en una reducción (54-58%) e incremento (136%) respectivamente en la actividad transcripcional de la mutante Antp<sup>AAAA</sup> en células Schneider (Fig. 13B). Estos resultados proponen que la interacción de Antp con los factores transcripcionales TFIIE $\beta$ , AbdB y TBP es independiente del tetrapéptido YPWM. Sin embargo, en ausencia de YPWM la homeoproteína Antp incrementó su afinidad por el DNA *in vitro* (Cárdenas-Chávez, 2007; Qian *et al.*, 1994) sugiriendo que la interacción del tetrapéptido YPWM con un cofactor o colaborador podría bloquear su actividad represora favoreciendo así el reclutamiento de TBP al promotor y/o activación de la transcripción por el complejo Antp-TBP de maneja similar que la interacción Antp<sup>AAAA</sup>-TBP (Fig. 13B). Pinsonneault en 1977 propone que las homeoproteínas presentan actividad represora como monómeros y cuando heterodimerizan con co-factores abolían esta función represora permitiéndoles actuar como activadores durante el desarrollo embrionario. Además, el análisis de secuencia de diferentes sitios de unión para homeoproteínas revela que los sitios Hox-Pbc se encuentran comúnmente en genes activados por el complejo Hox-Pbc, mientras que los sitios Hox individuales están presentes en genes normalmente reprimidos por estas proteínas (Mann *et al.*, 2009).

En el contexto de GAL4, los resultados de transactivación revelan que la co-expresión de TBP, TFIIE $\beta$  y AbdB generó un incremento notable (133-1250%) en la actividad transcripcional de esta proteína y sus mutantes GAL4<sup>YPWM</sup> ó GAL4<sup>AAAA</sup> (Figs. 17-19). Estudios anteriores señalan que la sobre-expresión de TBP y TFIIE en células Schneider incrementa la expresión de diferentes promotores de caja TATA (Colgan *et al.*, 1992; Moonkyoung *et al.*, 1995), lo cual podría explicar la transactivación del promotor SV40 de manera independiente de GAL4 y mutantes con o sin el tetrapéptido YPWM (Figs. 17-19 A y B). Además, la secuencia aminoacídica empleada de GAL4 corresponde únicamente al dominio de unión al DNA (DBD) y carece de la región de activación previamente reportada como sitio de interacción con TBP y TFIIB (Traven *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1996). Interesantemente, el efecto de AbdB en la transactivación de GAL4 y mutantes sugiere la interacción de esta homeoproteína con la maquinaria transcripcional basal de manera similar que Antp y Msx-1 (Figs. 12, 15 y 16; Catron *et al.*, 1995).

Los resultados BiFC utilizando la proteína de fusión Antp<sup>AAAA</sup> mostraron la reconstitución de Venus en la co-expresión con TBP, TFIIE $\beta$  y AbdB previamente

fusionados con el fragmento VNm9 (Figs. 15G, 16F y 16H). Esto confirma que el tetrapéptido YPWM no es indispensable en las interacciones proteína-proteína Antp-AbdB, Antp-TBP y Antp-TFIIE $\beta$  a diferencia de los factores transcripcionales Exd<sub>144-376</sub> y BIP22.<sub>89</sub> (Figs. 13B, 15F y 16E) en células Schneider y HEK293. La existencia de una interacción molecular entre el factor TFIIE $\beta$  y la homeoproteína AbdB que carece de un motivo YPWM (Zhu y Kuziora, 1996) apoya claramente nuestros resultados: una interacción Antp-TFIIE $\beta$  independiente de YPWM. Interesantemente, la diferencia transcripcional de Antp (23%) y Antp<sup>AAAA</sup> (58%) en presencia de AbdB indica la presencia de un co-factor adicional que colabora con el tetrapéptido YPWM para la formación del heterodímero Antp-AbdB (Fig. 16D). Este co-factor podría ser Exd (Fig. 28A; Adachi *et al.*, 2012). Por otro lado, el análisis de fluorescencia confirmó la ausencia de interacción molecular entre las proteínas GAL4 ó GAL4<sup>AAAA</sup> y todos los factores transcripcionales fusionados con VC155 y VNm9 respectivamente (Figs. 20B-D, 20J-L, 21A-C y 21G-I). La mutante GAL4<sup>YPWM</sup> tampoco mostró interacción proteína-proteína con TBP y TFIIE $\beta$  en ensayos BiFC (Figs. 20G y 21E) lo cual corrobora nuevamente que el tetrapéptido YPWM fusionado con GAL4 no está involucrado en la interacción con los factores transcripcionales TBP y TFIIE $\beta$ .

### **La interacción de Antp con TBP es independiente del HD y mediada por el dominio de activación polyQ región aminoacídica 66-116**

Los resultados obtenidos en el análisis BiFC mostraron claramente que la interacción Antp-TBP es independiente del homeodominio (HD; Fig. 15K) por lo cual se analizó si la región polyQ participa directamente en esta interacción molecular debido a que evidencia previa muestra la interacción del factor transcripcional TBP con el homeodominio y regiones ricas en aminoácidos alanina, prolina ó glutamina de activadores y represores transcripcionales (Moonkyoung *et al.*, 1995; Catron *et al.*, 1995; Emili *et al.*, 1994). Por otro lado, comparaciones en la secuencia aminoacídica de la homeoproteína Antp de *D. melanogaster* y diferentes organismos (Walldorf *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2011) revela la existencia de una región rica en glutaminas en su extremo N-terminal que posee tres homopéptidos polyQ denominados Q<sub>9</sub>, Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub> (Karlín y Burge, 1996).

Primeramente, se determinó la actividad transcripcional de las mutantes AntpHD, Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 en comparación con la homeoproteína Antp completa (Figs. 24A y B). La delección del extremo N-terminal que contiene la región polyQ (AntpHD) así como la delección parcial de esta región (Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2) ocasionó una reducción importante (23-43%) en la capacidad transactivadora de Antp (Fig. 24B). Este

resultado mostró evidencia de la importancia del extremo N-terminal en la actividad transcripcional de Antp, específicamente la región polyQ que probablemente actúa como dominio de activación en esta homeoproteína. La fusión de esta región rica en glutaminas al dominio de unión al DNA del factor transcripcional Sp1 confirmó su actividad transcripcional (Courey *et al.*, 1989). Otras homeoproteínas también presentan dominios de activación polyQ, por ejemplo Abdominal A (AbdA) que posee una región rica en glutaminas en el extremo C-terminal para modular la activación de los genes blanco *decapentaplegic* y *wingless* (Vigano *et al.*, 1998; Janodi *et al.*, 2001; Merabet *et al.*, 2003). En este caso, el hexapéptido de AbdA inhibe la función del dominio polyQ mientras que la región PFER bloquea la actividad de un dominio represor (Merabet *et al.*, 2003). Similarmente, el tetrapéptido YPWM podría modular negativamente la actividad de la región polyQ de Antp ya que en ausencia de este tetrapéptido se incrementó significativamente el potencial activador de la homeoproteína (Cárdenas-Chávez, 2007). Por otra parte, el aumento en la transactivación de la proteína Antp $\Delta$ Q2 en comparación con AntpHD y Antp $\Delta$ Q1-2 (Fig. 24B) refleja una relación directa entre el número de glutaminas y su actividad transcripcional como ha sido descrito en la fusión de GAL4 y polímeros de glutamina (Atanesyan *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 1994).

La realización de ensayos pull-down utilizando las regiones polyQ de Sp1 (aminoácidos 83-262 y 345-542) y Antp (aminoácidos 25-175) fusionadas con la proteína GST proponen la interacción de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) con regiones polyQ *in vitro* (Emili *et al.*, 1994). En el presente trabajo, el análisis de transactivación en presencia de TBP mostró una disminución importante (43%) en la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp a diferencia de las proteínas AntpHD y Antp $\Delta$ Q1-2 (Fig. 24B). Estas mutantes carecen total ó parcialmente del dominio polyQ confirmando que esta región es esencial para la interacción Antp-TBP, pero no otras regiones como el extremo C-terminal u homeodominio. Interesantemente, la comparación de la transactivación entre Antp $\Delta$ Q1-2 y Antp $\Delta$ Q2 con TBP (Fig. 24B) sugiere que únicamente la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ es requerida para la interacción con TBP. Este factor transcripcional general posee una estructura molecular simétrica en forma de silla que se coloca sobre el promotor e induce un desenrollamiento parcial del DNA para iniciar la transcripción basal y unión de otros GTFs (Lee y Young, 2000; Chasman *et al.*, 1993; Nikolov *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). Por lo tanto, la unión de Antp en sitios cercanos al promotor así como su interacción con TBP probablemente facilitarían el reclutamiento de los componentes del complejo de pre-iniciación (PIC) para regular eficientemente la transcripción. En el caso de unión de Antp a sitios distantes, su región rica en glutaminas podría generar un plegamiento ó loop en el DNA facilitando su interacción con TBP de manera similar que la unión de Sp1 con el DNA (Su *et al.*, 1991). En un contexto represor, la unión de Antp en sitios distantes al promotor también podría ocasionar el secuestro de TBP evitando su

interacción con el PIC como mecanismo de represión transcripcional de manera similar que la interacción de Even-skipped (Eve) con TBP (Li y Manley, 1998).

En concordancia con los resultados de transactivación, los ensayos BiFC permitieron visualizar las interacciones proteína-proteína de las mutantes en región polyQ y TBP fusionados con los fragmentos VC155 y VNm9 respectivamente. La co-expresión de la mutante Antp $\Delta$ Q2 con TBP mostró la reconstitución de la actividad de Venus igual que la homeoproteína Antp (Figs. 25B y H). Como se esperaba, las proteínas con delección del dominio polyQ (AntpHD) ó su región 66-116 (Antp $\Delta$ Q1-2) presentaron una mínima (25-26%) ó nula fluorescencia de Venus confirmando que la formación del heterodímero Antp-TBP es mediada exclusivamente por esta región aminoacídica, mientras que la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp requiere del dominio polyQ intacto. La región aminoacídica 66-116 contiene siete de los nueve aminoácidos glutamina del homopéptido Q<sub>9</sub> (Fig. 24A) que podría ser responsable de los contactos proteína-proteína con TBP. Ésta región 66-116 no incluye los homopéptidos Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub> del dominio polyQ de Antp (Fig. 24A). La interacción Antp polyQ-TBP posiblemente también involucra la región rica en glutaminas localizada en el extremo N-terminal de TBP debido a que las regiones polyQ pueden interaccionan entre sí (Atanesyan *et al.*, 2011). Sin embargo, la región aminoacídica 160-339 de TBP también presenta interacción con las regiones polyQ de otras proteínas (Emili *et al.*, 1994) por lo cual se requerirá una disección funcional de TBP para establecer estas interacciones *in vivo*. Los homopéptidos actúan además como elementos espaciadores entre dominios funcionales permitiendo el ensamblaje de múltiples complejos proteicos con otros factores (Karlin y Burge, 1996; Faux *et al.*, 2005). Esto sugiere que la delección del homopéptido Q<sub>9</sub> y residuos de glutamina adyacentes podría alterar la estructura tridimensional de la región polyQ de Antp interfiriendo así en la interacción con TBP. Estudios recientes proponen que en condiciones de heterodimerización, los homopéptidos polyQ poseen una tendencia a formar una estructura de hélice superenrollada (coiled-coil) seguido de una región flexible de prolina (polyP) para estabilizar la hélice (Schaefer *et al.*, 2012). Interesantemente, los homopéptidos polyQ de la homeoproteína Antp están flanqueados por aminoácidos prolina pero aún no existen estudios de Cristalografía o Resonancia Magnética Nuclear del extremo N-terminal ó su dominio polyQ que permitan confirmar esta estructura tridimensional en Antp.

### **La interacción de Antp con TFIIIE $\beta$ y AbdB es mediada por el HD en las hélices II y I (aminoácido E19) respectivamente**

La delección del homeodominio en la proteína mutante Antp $\Delta$ HD bloqueó su interacción con el factor transcripcional TFIIIE $\beta$  en células HEK293 (Fig. 16J)

demostrando así la importancia del HD en esta interacción molecular (Zhu y Kuziora, 1996). Los homeodominios actúan principalmente como dominios de unión al DNA en las proteínas homeóticas o Hox para regular la expresión génica (Mann *et al.*, 2009). Sin embargo, estos dominios también llevan a cabo otras funciones como unión al RNA (Rivera-Pomar *et al.*, 1996), secreción (Prochiantz y Joliot, 2003) e interacciones proteína-proteína (Mikkola *et al.*, 2001; Benassayag *et al.*, 2003; Bondos *et al.*, 2004; Bruun *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, se realizó la disección molecular del homeodominio de Antp mediante delección de sus hélices I y/o II (Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1) pero no la hélice III que establece la unión al DNA (Qian *et al.*, 1992).

La actividad transcripcional de Antp $\Delta$ H1-2 y Antp $\Delta$ H1 se analizó en ensayos de transactivación en células Schneider. Estas mutantes mostraron una reducida transactivación del 40-62% (Fig. 26B) ya que como se esperaba el homeodominio es necesario para el potencial transcripcional de Antp por lo que la delección de las hélices I-II probablemente desestabiliza drásticamente su conformación estructural alterando su actividad de unión al DNA. Interesantemente, la presencia de TFIIE $\beta$  ocasionó una disminución (25%) en la transactivación de Antp $\Delta$ H1 y proteína control AntpHD en contraste con Antp $\Delta$ H1-2 (Fig. 26B) indicando que la hélice II del homeodominio es necesaria para la interacción entre Antp y la subunidad  $\beta$  del factor transcripcional general TFIIE. Este factor transcripcional está formado por un heterodímero ó heterotetrámero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Jawhari *et al.*, 2006; Okhuma, 1997; Okhuma *et al.*, 1990) involucradas en la interacción con la forma no fosforilada de la RNA polimerasa II así como el reclutamiento y regulación de las actividades ATPasa, quinasa y helicasa de TFIIH (Lee y Young, 2000; Lu *et al.*, 1992; Okhuma y Roeder, 1994). Además, la subunidad pequeña de TFIIE (TFIIE $\beta$ ) reconoce DNA de cadena sencilla (ssDNA) ó doble (dsDNA) y colabora con los factores TFIIIB y TFIIF $\beta$  durante la formación del PIC a través del dominio bHL (Watanabe *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 1998). Lo anterior sugiere que la interacción de la hélice II del homeodominio de Antp con TFIIE $\beta$  podría alterar la interacción con otras proteínas, modificar la actividad quinasa de TFIIH ó la tasa de elongación de la RNA polimerasa II. Otra posibilidad es que la interacción Antp-TFIIE $\beta$  permita la retención de TFIIE en sitios cercanos al promotor favoreciendo la reiniciación de la transcripción de manera similar que otros activadores transcripcionales (Lee y Young, 2000; Zhu y Kuziora, 1996; Struhl, 1996; Zewel *et al.*, 1995).

Posteriormente, la fusión de las proteínas TFIIE $\beta$  y AntpHD, Antp $\Delta$ H1-2 ó Antp $\Delta$ H1 con los fragmentos VNm9 y VC155 respectivamente permitió realizar un análisis de interacción por BiFC. Los ensayos mostraron la maduración del fluoróforo

Venus en la mayoría (74-75%) de las células HEK293 transfectadas con TFIIE $\beta$  y las mutantes AntpHD (Fig. 27D) ó Antp $\Delta$ H1 (Fig. 27H). Estas proteínas poseen intacta la hélice II del homeodominio a diferencia de la mutante Antp $\Delta$ H1-2 (Fig. 26A) lo cual corrobora que la interacción proteína-proteína Antp-TFIIE $\beta$  es mediada por el homeodominio, específicamente la hélice II. Ensayos pull-down realizados por Zhu y Kuziora en 1996 demuestran además que la interacción del homeodominio con TFIIE $\beta$  es independiente de la unión al DNA. Lo anterior confirma que el homeodominio de Antp actúa como dominio de unión al DNA a través de la hélice III (Qian *et al.*, 1992) e interacciona con el factor transcripcional TFIIE $\beta$  mediante la hélice II en la activación/represión de la transcripción. Similarmente, el homeodominio de AbdB presenta interacción con TFIIE $\beta$  para estimular la transcripción *in vitro* (Zhu y Kuziora, 1996). La participación de este factor transcripcional general en el complejo de pre-iniciación es determinada por la estabilidad de la molécula de DNA (Holstege *et al.*, 1995). Esto indica que el requerimiento de TFIIE es específico de secuencia y promotor (Lee y Young, 2000) sugiriendo que la formación del complejo transcripcional Antp-TFIIE $\beta$  ó AbdB-TFIIE $\beta$  podría no presentarse durante la regulación de sus diferentes genes blanco.

Además de la interacción HD-TFIIE $\beta$ , nuestros resultados proponen la existencia de una interacción proteína-proteína entre los homeodominios de Antp y AbdB (Figs. 12C, 16D y 16L). La sobre-expresión *in vivo* de *AbdB* ocasiona una leve reducción en la expresión endógena de Antp y por consiguiente una co-localización de ambas homeoproteínas favoreciendo así la interacción Antp-AbdB y/o regulación de Antp para inducir la transformación homeótica torax $\rightarrow$ abdomen (Kuziora *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la sustitución del aminoácido Glutámico 19 por Glicina (E19G) en el homeodominio de Antp (AntpG19) es suficiente para bloquear las interacciones Antp-EyHD y Antp-EyPD (Plaza *et al.*, 2008). Esta mutación también fue analizada en la transactivación e interacción de Antp con AbdB en presencia ó ausencia del co-factor Exd (Figs. 28A y B). Los niveles de transactivación no mostraron diferencia entre Antp y AntpG19 confirmando que esta mutación no afecta el potencial activador de la homeoproteína (Plaza *et al.*, 2008). La proteína AbdB y mutante (AbdBG19) exhibieron niveles basales de activación transcripcional (30%) debido probablemente a la ausencia de co-factores en células Schneider que reconocen el extremo N-terminal de AbdB (Shen *et al.*, 1997). Similarmente, el ortólogo de AbdB, HoxA9, no activó la transcripción del gen reportero a partir de múltiples sitios de unión Hox (Shen *et al.*, 1999). El homeodominio de Exd (Exd<sub>144-376</sub>) no presenta unión al DNA en ausencia de proteínas Hox (Lu *et al.*, 1995; Lu y Kamps, 1996) por lo cual no incrementó la transcripción basal (Fig. 28A).

Por otra parte, la disminución en la transactivación de Antp y AntpG19 en presencia de Exd<sub>144-376</sub> (55%) indica que la interacción entre estas homeoproteínas es independiente del aminoácido Glu19 (Figs. 28A y B). Esta interacción es establecida principalmente por el motivo YPWM de Antp (Merabet *et al.*, 2007; Papadopoulos *et al.*, 2011). La co-expresión de Exd<sub>144-376</sub>/AbdB y Exd<sub>144-376</sub>/AbdBG19 no alteró la transactivación debido a su incapacidad de colaborar cooperativamente con el DNA *in vitro* (van Dijk y Murre, 1994). Sorprendentemente, el efecto transcripcional del complejo Antp-AbdB no se observó cuando ambas proteínas contenían la mutación E19G (Fig. 28B) demostrando que este aminoácido (Glu19) es esencial para la interacción entre estos homeodominios. Este aminoácido también es importante en la homodimerización de la homeoproteína Scr pero no de la homeoproteína Antp (Papadopoulos *et al.*, 2012). La interacción Antp-AbdB-Exd<sub>144-376</sub> generó un incremento en la transactivación (17%) en comparación con Antp-AbdB sugiriendo la participación de Exd en la formación de este heterodímero (Fig. 28A). Las células Schneider poseen una expresión endógena de Exd que podría facilitar la formación del complejo Antp-AbdB en estos ensayos (Rieckhof *et al.*, 1997). La expresión transitoria de Exd<sub>144-476</sub> es principalmente citoplásmica pero puede entrar al núcleo a altas concentraciones (Abu-Shaar *et al.*, 1999) lo cual implicaría una probable competencia entre Exd endógeno y Exd<sub>144-376</sub> por colaborar con Antp (Adachi *et al.* En preparación 2012).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Adachi y cols. en ensayos BiFC y FCCS (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy). El análisis BiFC utilizando los homeodominios de Antp (AntpHD) y AbdB (AbdBHD) fusionados con los fragmentos VC155 y VNm9 mostró la maduración del fluoróforo en células HEK293 (89%) y cromosomas politénicos de larvas en tercer estadio corroborando así la formación del complejo AntpHD-AbdBHD *ex vivo* e *in vivo*. La mutación E19G eliminó completamente la interacción de estos homeodominios en células HEK293, lo cual confirma la relevancia funcional del aminoácido Glu19 de la hélice I en las interacciones moleculares de diferentes HDs. Los resultados FCCS también mostraron evidencia del requerimiento de Exd en la interacción AntpHD-AbdBHD ya que en presencia de este co-factor el tiempo de difusión de AbdB (150  $\mu$ s) y la sonda BS2 (200  $\mu$ s) incrementó o disminuyó hasta 250  $\mu$ s y 165  $\mu$ s respectivamente. Además, el uso de RNA de interferencia contra Exd en discos imaginales que expresan VC155-AntpHD y VNm9-AbdBHD evitó la reconstitución de Venus. Esto corroboró definitivamente la colaboración del co-factor Exd en la interacción proteína-proteína entre los homeodominios de Antp y AbdB (Adachi *et al.* En preparación 2012).

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron concluir lo siguiente:

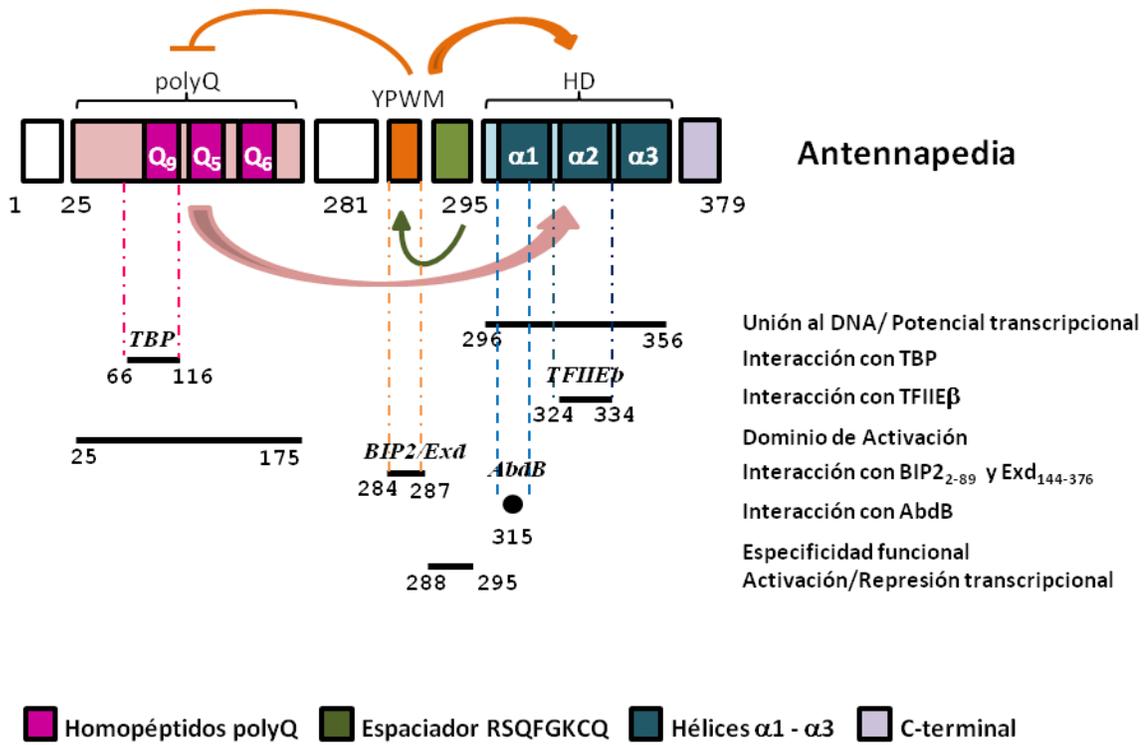
- La homeoproteína Antp presenta interacción proteína-proteína con la maquinaria transcripcional basal, específicamente con los factores transcripcionales generales TBP, TFIIE $\beta$  y la región aminoacídica 2-89 de BIP2 (BIP2<sub>2-89</sub>) pero no interactúa con TFIIA $\gamma$  y TFIIB.
- La homeoproteína Antp interacciona además con otras homeoproteínas como AbdB y la región aminoacídica 144-376 del cofactor Exd (Exd<sub>144-376</sub>) para regular su especificidad de unión al DNA.
- La interacción molecular de Antp con BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub> es exclusivamente dependiente del tetrapéptido YPWM, el cual modula la función transcripcional dual (activación/represión) de Antp y sus péptidos sintéticos.
- Los péptidos sintéticos de Antp poseen una actividad transcripcional del 30 al 50% en comparación con la homeoproteína completa, así como un requerimiento absoluto del tetrapéptido YPWM en la interacción con BIP2<sub>2-89</sub> y Exd<sub>144-376</sub>.
- Los péptidos sintéticos de espaciador largo actúan como potentes activadores transcripcionales mientras que los péptidos de espaciador corto son fuertes represores indicando que la región espaciadora participa en la especificidad de Antp.
- El tetrapéptido YPWM fusionado al extremo C-terminal de la proteína transactivadora GAL4 (GAL4<sup>YPWM</sup>) conserva la habilidad de interactuar de manera específica con el factor transcripcional BIP2<sub>2-89</sub> en un contexto heterólogo.
- La fusión GAL4<sup>YPWM</sup> también mostró interacción proteína-proteína con el cofactor Exd<sub>144-376</sub> pero esta interacción no regula la actividad transcripcional en ausencia de sitios de unión para Exd.
- La interacción con los factores transcripcionales TFIIE $\beta$  y AbdB para la formación de los complejos Antp-TFIIE $\beta$  y Antp-AbdB es mediada por el HD de Antp e independiente del tetrapéptido YPWM.

- La interacción proteína-proteína con el factor transcripcional TBP es mediada principalmente por la región aminoacídica 66-116 del dominio polyQ de Antp, mientras que la función activadora transcripcional de esta homeoproteína requiere de un dominio polyQ intacto.
- El homeodominio contribuye al potencial transcripcional de Antp e interacciona simultáneamente con el surco mayor del DNA y subunidad menor del factor TFIIE $\beta$  a través de las hélices III y II respectivamente.
- La interacción molecular entre las homeoproteínas Antp y AbdB es mediada por el aminoácido Glu19 presente en la hélice I de ambos homeodominios pero este aminoácido no contribuye a la actividad transcripcional de las homeoproteínas.

Estos resultados abren la posibilidad de proponer un modelo de interacciones proteína-proteína para la regulación génica *in cis* de la homeoproteína Antennapedia (Fig. 29). En este modelo, el tetrapéptido YPWM modula la especificidad y afinidad de unión al DNA del homeodominio probablemente inhibiendo la función del dominio de activación polyQ localizado en el extremo N-terminal de Antp. Asimismo, la región espaciadora ubicada entre YPWM y HD regula la actividad transcripcional e interacción de este tetrapéptido con co-factores como Exd. Además, la región polyQ podría favorecer la actividad homeótica del homeodominio al incrementar la actividad transcripcional de la homeoproteína. Por lo tanto, el potencial transcripcional global de la homeoproteína Antp podría ser el producto de la regulación interna entre sus dominios YPWM, polyQ y HD así como de la interacción con co-factores o colaboradores (GTFs, homeoproteínas, etc) que estimularían ó bloquearían la función específica de alguno de estos dominios ocasionando la represión y/ó activación de los diferentes genes blanco en *D. melanogaster*. Para lo anterior, se requiere corroborar el efecto de las interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con TBP, TFIIE $\beta$ , BIP2, AbdB y Exd en ensayos de transcripción *in vitro* con DNAs templados de los diferentes genes blanco de Antp (*tsh*, *Scr*, *sal*, etc). Además, la importancia funcional *in vivo* de estas interacciones moleculares podría ser confirmada mediante la expresión ectópica de las mutantes en YPWM, polyQ y HD individuales o en combinación con los factores transcripcionales generales en un tejido y etapa específica del desarrollo de *D. melanogaster*.

Por otro lado, la disección molecular de los dominios funcionales de TBP y TFIIE $\beta$  también permitirá un análisis fino de la interacción de estos factores transcripcionales con la región polyQ y homeodominio de Antp respectivamente *in vitro* e *in vivo*. El dominio de aminoácidos glutamina y la región aminoacídica 160-339 de TBP así como el dominio central “core” y región básica de TFIIE $\beta$  constituyen los dominios funcionales de estos factores transcripcionales que han sido previamente

reportados como sitios de contacto con DNA y otras proteínas. Se ha observado además que un dominio o aminoácido específico podría presentar múltiples colaboradores de interacción, por ejemplo el aminoácido Glu19 involucrado en la interacción del homeodominio de Antp con EyPD, EyeHD y AbdB así como en la homodimerización de Scr. Por ello, sería interesante llevar a cabo un análisis detallado de los aminoácidos de la hélice II del homeodominio que son responsables de la interacción Antp-TFIIIE $\beta$  para posteriormente determinar su función biológica en Antp y posiblemente en otras homeoproteínas dado el alto grado de conservación evolutiva de los homeodominios.



**Figura 29. Modelo hipotético de las interacciones funcionales de YPWM, polyQ y HD en la regulación transcripcional de Antp.** La homeoproteína Antennapedia posee 379 aminoácidos y presenta un extremo N-terminal con un dominio de activación rico en glutaminas (polyQ; región aminoacídica 25-175), un dominio de unión al DNA (HD; región 296-356) y el motivo central YPWM localizado río arriba del HD a una distancia de ocho aminoácidos (RSQFGKCQ) denominada región espaciadora (posición aminoacídica 288-295). El esquema muestra la regulación del HD y región polyQ por el tetrapéptido YPWM (flechas color naranja), mientras que la región polyQ podría modular positivamente la actividad del HD (flecha color rosa). YPWM es regulado a su vez por el espaciador (flecha color verde) que participa en la especificidad y actividad transcripcional dual de Antp. Los ensayos de transactivación y BiFC proporcionan evidencia de la interacción proteína-proteína de Antp con la maquinaria transcripcional basal y otras homeoproteínas: el factor general TFIIIE $\beta$  y la homeoproteína AbdB interactúan con el homeodominio de Antp a través de la hélice II (región 324-334) y aminoácido Glu19 (posición aminoacídica 315) respectivamente; el dominio HFD de BIP2 (BIP2<sub>2-89</sub>) y el HD de Exd (Exd<sub>144-376</sub>) reconocen el tetrapéptido YPWM (región 284-287), mientras que la interacción con TBP requiere del homopéptido Q<sub>9</sub> y aminoácidos adyacentes del dominio polyQ de Antp (región 66-116) pero no los homopéptidos Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub>.

## APÉNDICE I

### Preparación de soluciones

#### Buffer Fosfato de sodio 0.1 M (100 ml)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M 38 ml

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M 24 ml

#### Buffer Lisis Pasiva 1X (10 ml)

Buffer Lisis Pasiva 5X (Promega) 2 ml

H<sub>2</sub>O mQ 8 ml

#### Buffer Mg 100X (1 ml)

MgCl<sub>2</sub> 1 M 100 µl

β-mercaptoetanol 14.4 M 347 µl

H<sub>2</sub>O 553 µl

#### Buffer QF

1.25 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 8.5

15% Etanol

#### CPRG 4 mg/ml

CPRG (Boehringer) 4 mg

Buffer Fosfato de Sodio 0.1 M 1 ml

#### Lisis alcalina

Solución I: 25 mM Tris-HCl pH8.0

10 mM EDTA pH 8.0

Solución II: 0.2 N NaOH

1 % SDS

Solución III: 5M Acetato de Potasio 60 ml

Ac. Acético Glacial 11.5 ml

H<sub>2</sub>O 28.5 ml

**Medio DMEM con 10% FBS (250 ml)**

Medio DMEM (Sigma) pH 7.3 225 ml

Suero Fetal Bovino Inactivado 25 ml

**Medio Schneider con 10% FBS (250 ml)**

Medio Schneider (Sigma) pH 7.0 225 ml

Suero Fetal Bovino Inactivado 25 ml

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (100 ml)**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10.6 g

**NaCl 150 mM (50 ml)**

NaCl 0.4383 g

**PBS 1X (1 L)**

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g

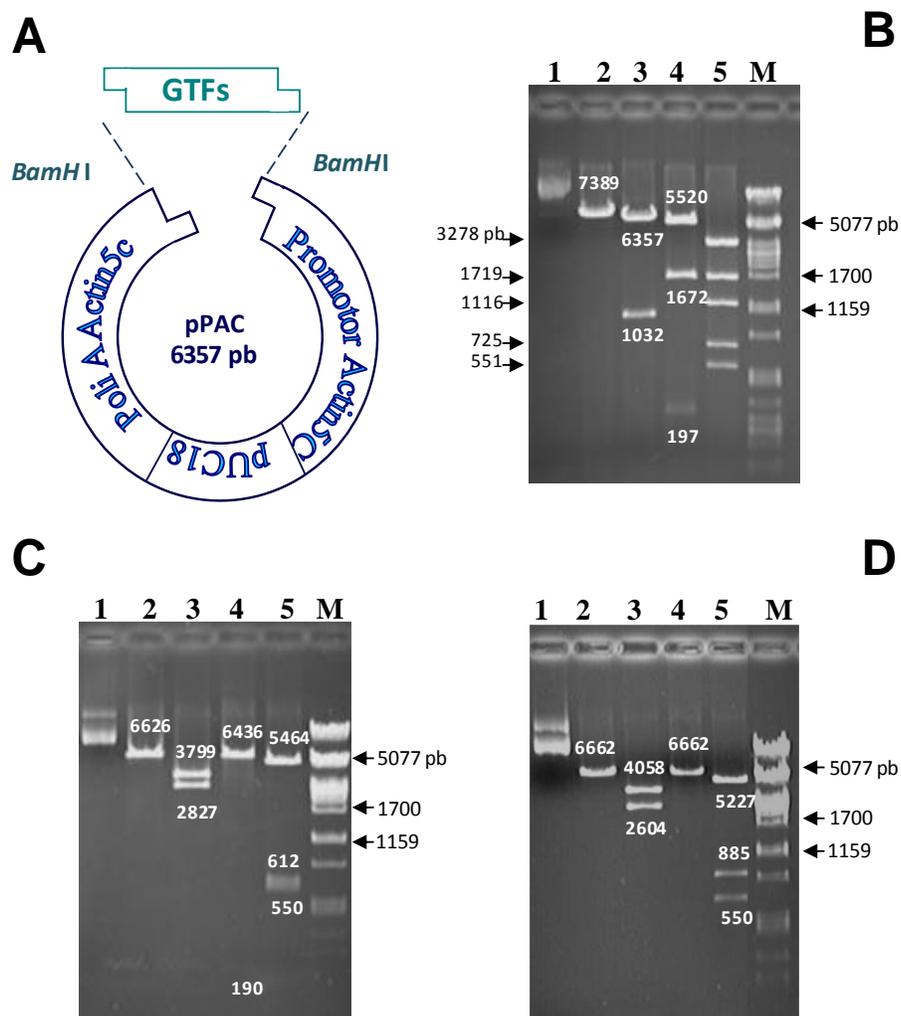
**Poly-L-lisina 0.01% (10 ml)**

Poly-L-lisina 1mg/ml 1 ml

H<sub>2</sub>O mQ 9 ml

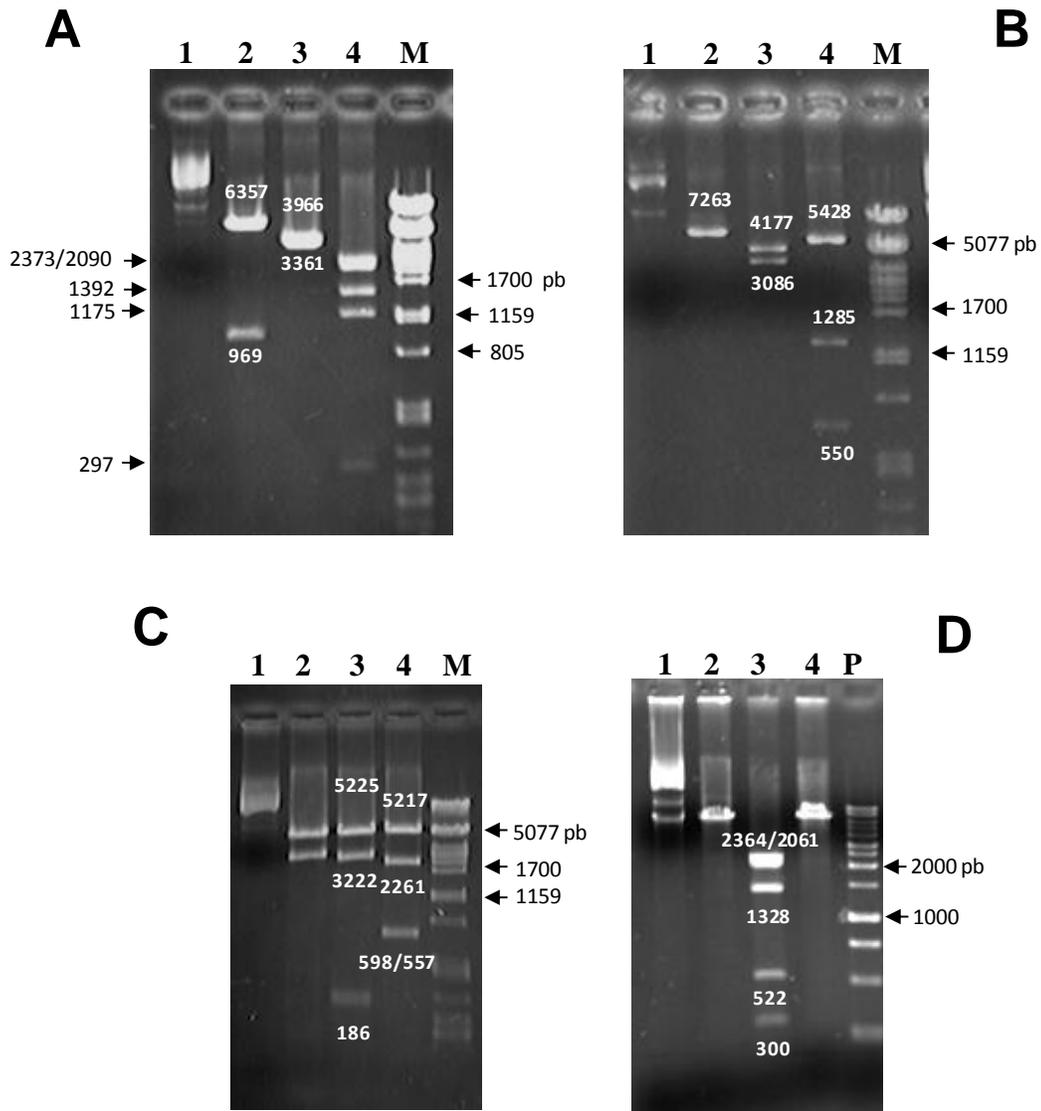
## APÉNDICE II

### Caracterización enzimática de plásmidos recombinantes

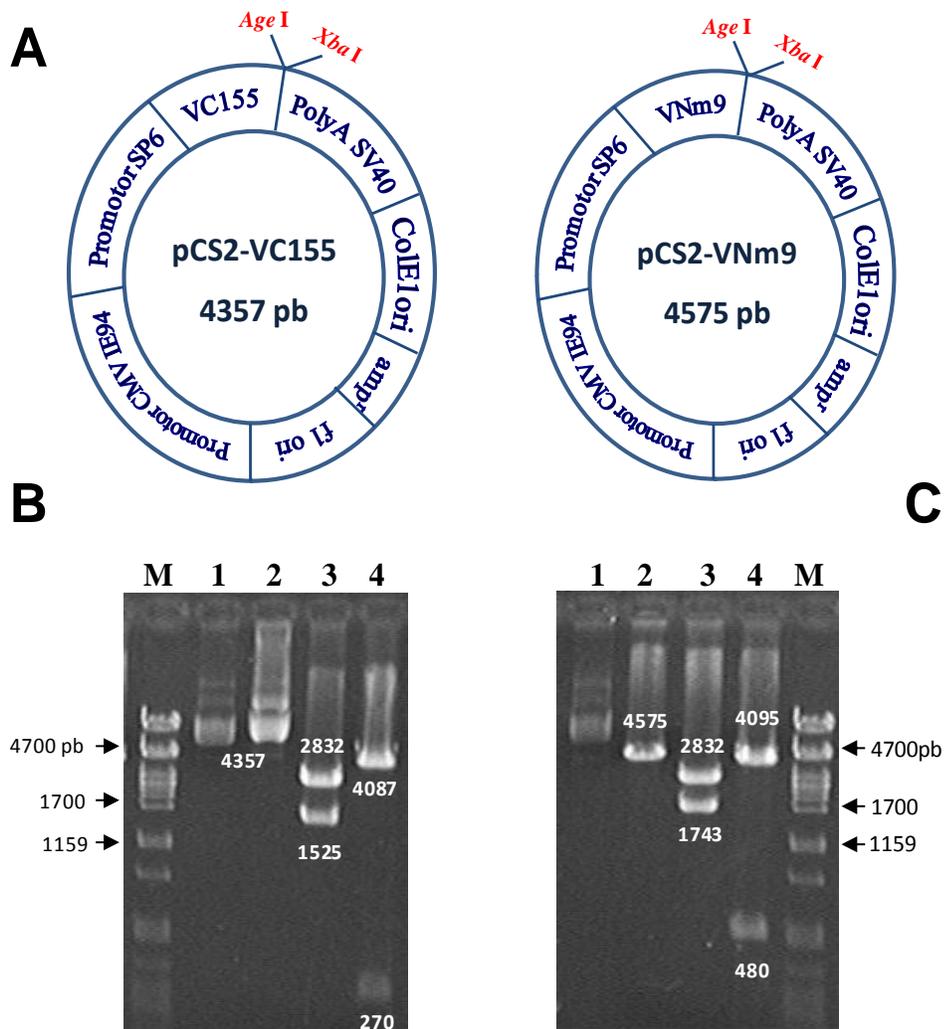


**Figura 30. Construcción de los plásmidos recombinantes pPACTBP, pPACTFIIA $\gamma$  y pPACBIP2-89.**

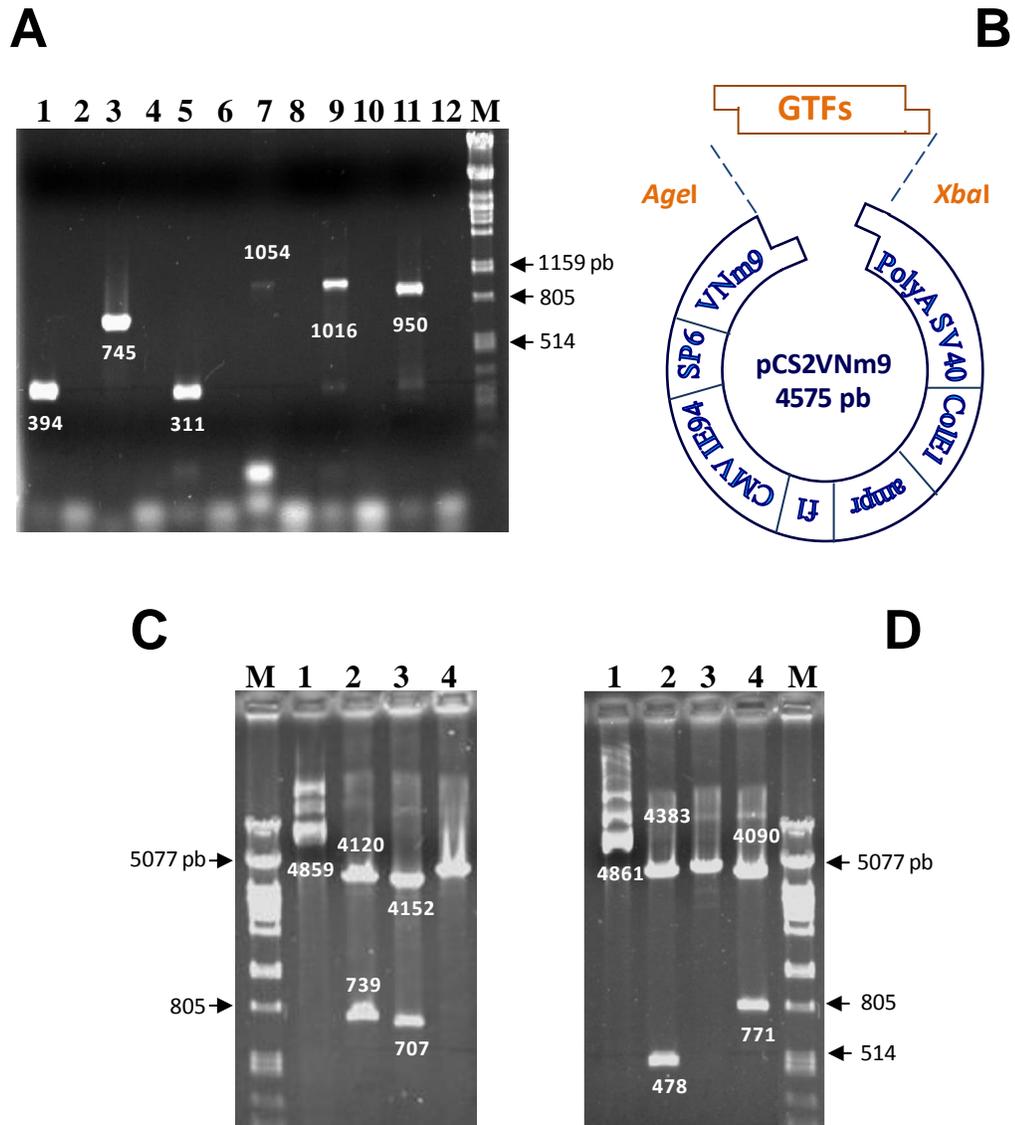
**A** Representación esquemática de la ligación de las secuencias codificantes a los factores transcripcionales TBP, TFIIA $\gamma$  y BIP2-89 en el vector pPAC. **B** Caracterización enzimática del plásmido pPACTBP con las enzimas de restricción *EcoRI* (carril 2), *BamHI* (carril 3), *PstI* (carril 4) y *HincII* (carril 5). **C** Digestión del plásmido recombinante pPACTFIIA $\gamma$  con las enzimas *BamHI* (carril 2), *EcoRI* (carril 3), *SacI* (carril 4) y *HindIII* (carril 5). **D** Patrón de restricción del plásmido pPACBIP2-89 (carril 3) con las enzimas *BamHI* (carril 2), *EcoRI* (carril 3), *SacI* (carril 4) y *HindIII* (carril 5). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda + *PstI*.



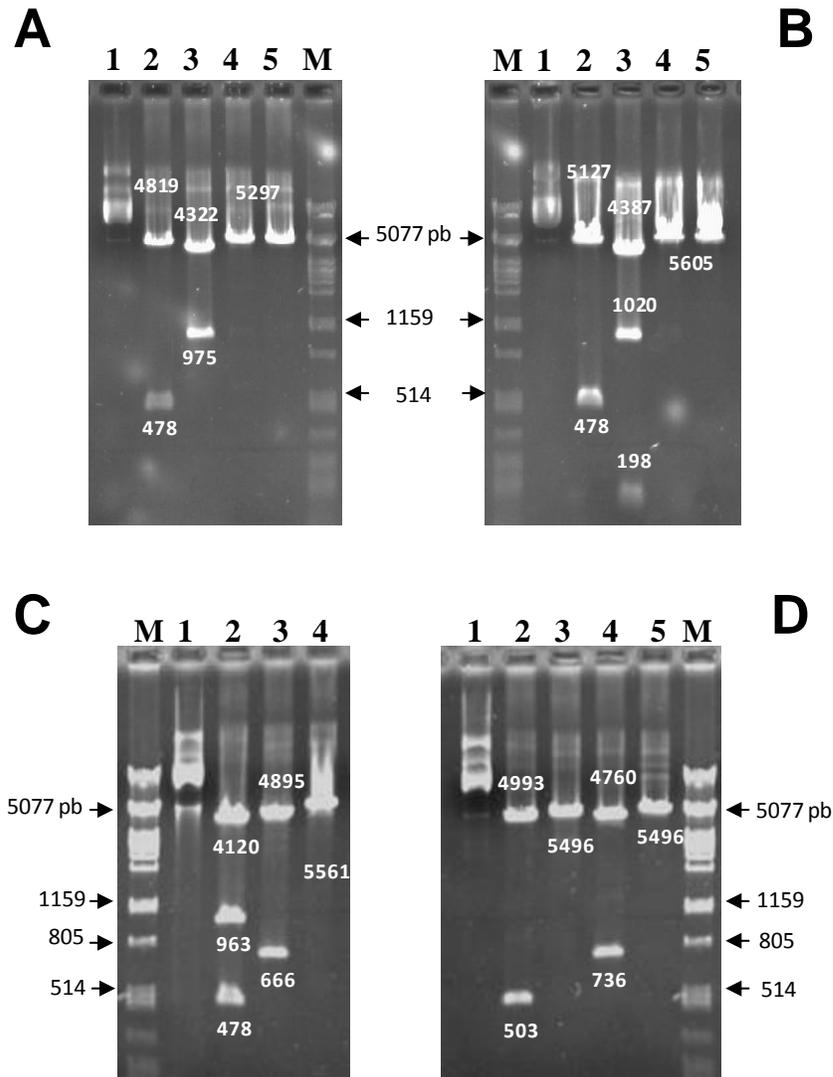
**Figura 31. Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pPACTFIIB, pPACTFIIIE $\beta$ , pPACEXd<sub>144-376</sub> y pPACAbdB.** **A** Visualización de la digestión del plásmido pPACTFIIB con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Bgl*II (carril 3) y *Pvu*II (carril 4) en comparación con el DNA plasmídico sin digerir (carril 1). **B** Patrón de restricción del plásmido recombinante pPACTFIIIE $\beta$  (carril 1) digerido con las enzimas *Bam*HI (carril 2), *Eco*RI (carril 3) y *Hind*III (carril 4). **C** Digestión del plásmido pPACEXd<sub>144-376</sub> (carril 1) con las enzimas *Bam*HV/*Eco*RI (carril 2), *Bam*HV/*Pst*I (carril 3) y *Bam*HV/*Hind*III (carril 4). **D** Caracterización del plásmido recombinante pPACAbdB (carril 1) con las enzimas *Xba*I (carril 2), *Pvu*II (carril 3) y *Eco*RI (carril 4). Los carriles M y P corresponden a los marcadores de peso molecular Lambda + *Pst*I y 1 Kb respectivamente



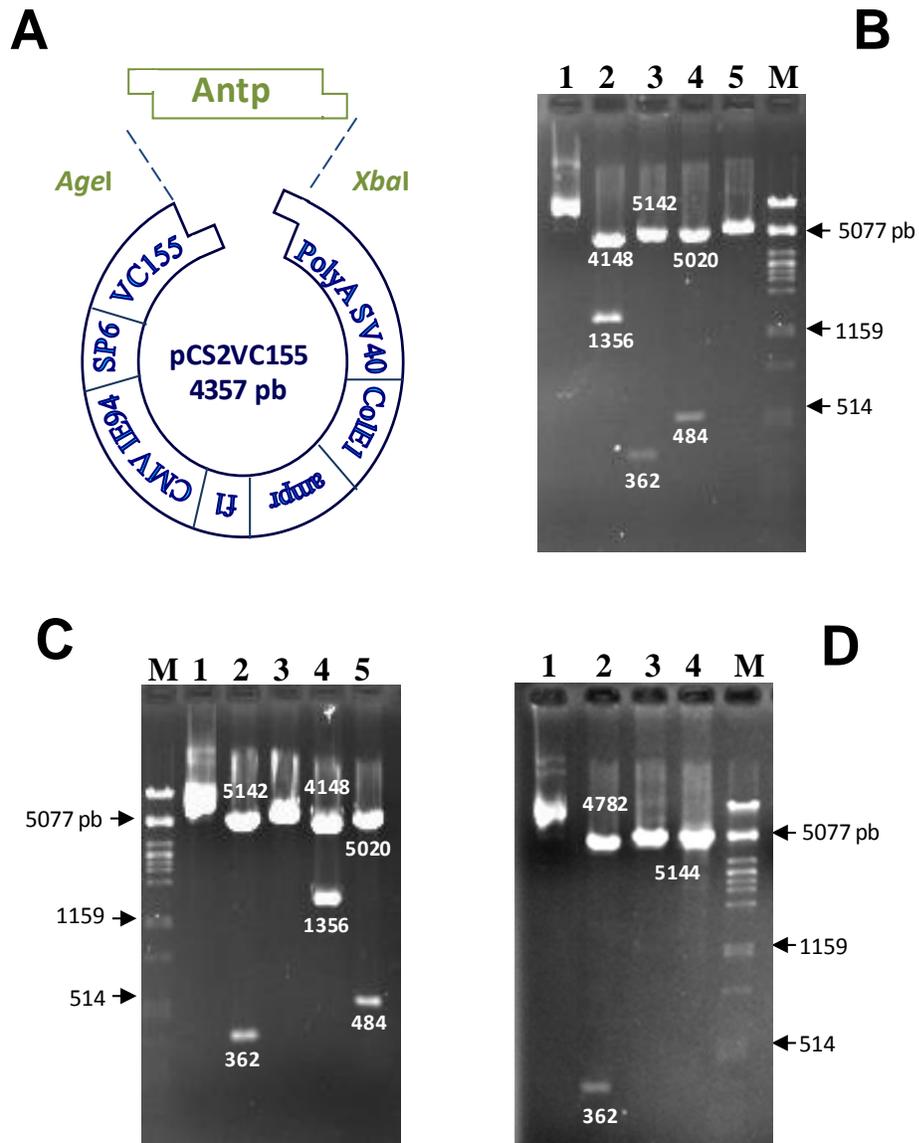
**Figura 32. Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2-VC155 y pCS2-VNm9.** **A** Representación esquemática de los plásmidos pCS2-VC155 y pCS2-VNm9 que presentan el promotor/enhancer CMV IE94 para dirigir la expresión de los fragmentos VC155 y VNm9 de la proteína fluorescente Venus. Los plásmidos contienen el promotor SP6 que permite la transcripción/traducción *in vitro* y los sitios de restricción AgeI y XbaI. **B** El plásmido pCS2-VC155 (carril 1) fue caracterizado con las enzimas de restricción PstI (carril 2), HincII (carril 3) y BamHI/XbaI (carril 4). **C** Linearización del plásmido pCS2-VNm9 con la enzima de restricción PstI (carril 2) y su digestión con las enzimas HincII (carril 3) y BamHI/XbaI (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda + PstI.



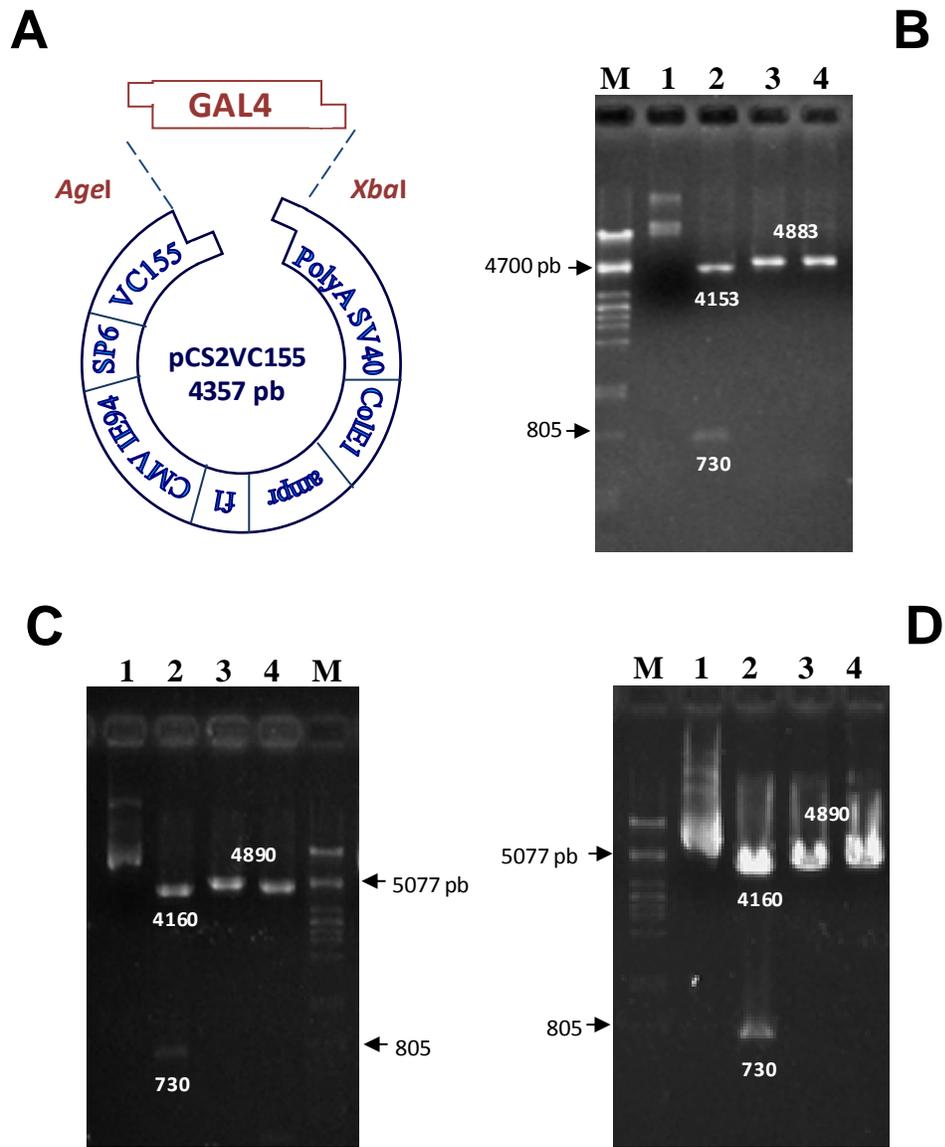
**Figura 33. Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9BIP2<sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$ .** **A** Amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes a los factores transcripcionales TFIIA $\gamma$  (carril 1), Exd<sub>144-376</sub> (carril 3), BIP2<sub>2-89</sub> (carril 5), TBP (carril 7), TFIIB (carril 9) y TFIIE $\beta$  (carril 11) con un peso molecular de 394, 745, 311, 1054, 1016 y 950 pb respectivamente. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 corresponden a las reacciones de PCR sin DNA blanco. **B** El esquema representa la ligación del vector pCS2VNm9 con las secuencias codificantes de los factores transcripcionales generales u homeoproteínas. **C** Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9BIP2<sub>2-89</sub> y pCS2VNm9TFIIA $\gamma$  (**D**) con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Pvu*II (carril 3) y *Hind*III (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda+ *Pst*I.



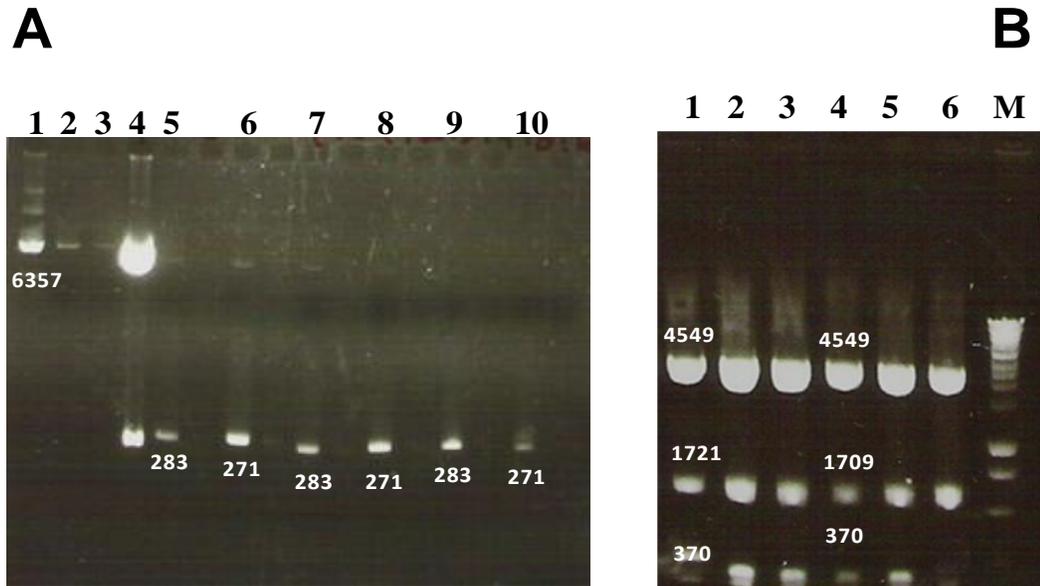
**Figura 34. Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9Exd<sub>144-376</sub>, pCS2VNm9TBP, pCS2VNm9TFIIB y pCS2VNm9TFIIEβ.** Patrón de restricción de los plásmidos recombinantes pCS2VNm9Exd<sub>144-376</sub> (**A**) y pCS2VNm9TBP (**B**) digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Pvu*II (carril 3), *Hind*III (carril 4) y *Xba*I (carril 5). **C** Caracterización del plásmido pCS2VNm9TFIIB (carril 1) con las enzimas *Bam*HI (carril 2), *Pvu*II (carril 3) y *Hind*III (carril 4). **D** Digestión del plásmido pCS2VNm9TFIIEβ (carril 1) con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Pvu*II (carril 3), *Hind*III (carril 4) y *Xba*I (carril 5). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda+ *Pst*I.



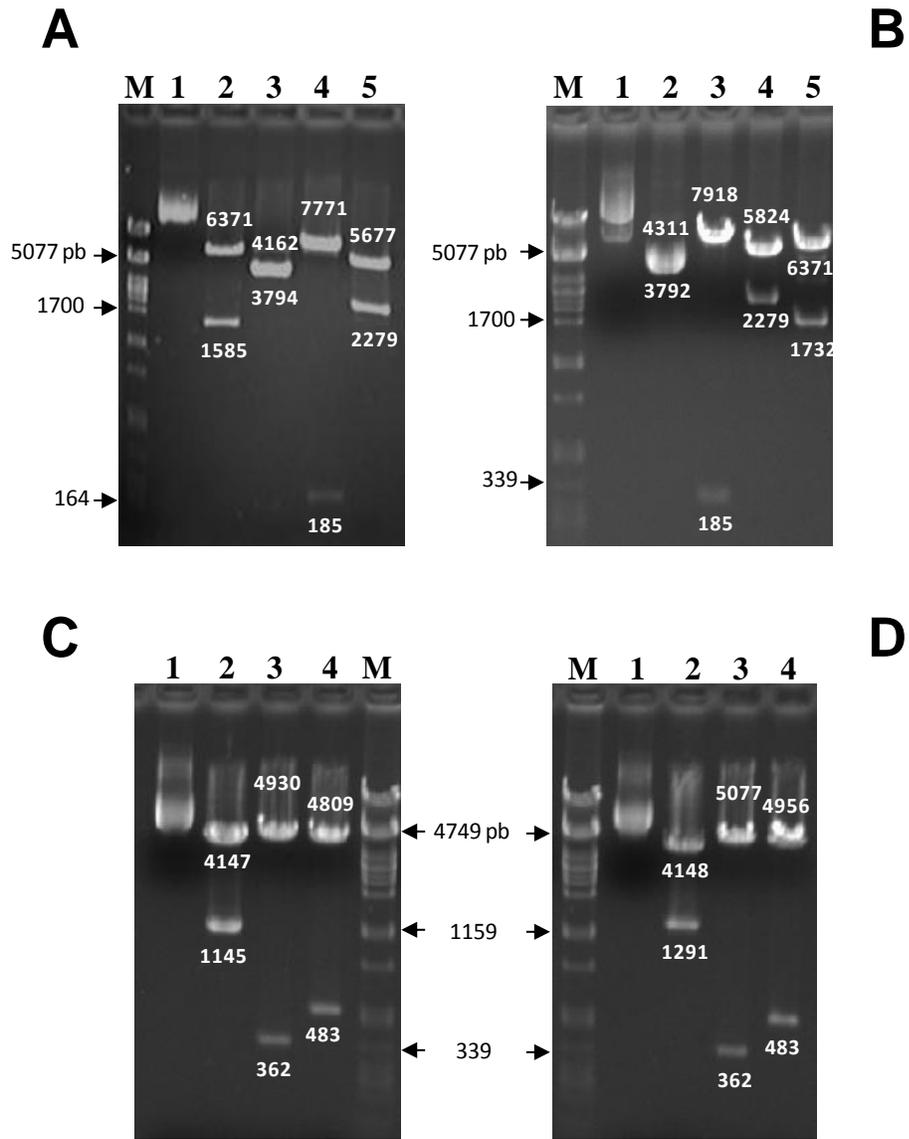
**Figura 35. Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155Antp, pCS2VC155Antp<sup>AAA</sup> y pCS2VC155Antp $\Delta$ HD.** **A** El esquema representa la ligación de los insertos codificantes para las proteínas Antp y mutantes (Antp<sup>AAA</sup> y Antp $\Delta$ HD) en marco de lectura del fragmento VC155 del plásmido pCS2VC155. **B** Caracterización enzimática del plásmido recombinante pCS2VC155Antp (carril 1) con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Sma*I (carril 3), *Kpn*I (carril 4) y *Pst*I (carril 5). **C** Digestión del plásmido pCS2VC155Antp<sup>AAA</sup> (carril 1) con las enzimas *Sma*I (carril 2), *Pst*I (carril 3), *Bam*HI (carril 4) y *Kpn*I (carril 5). **D** El plásmido pCS2VC155Antp $\Delta$ HD (carril 1) fue digerido con las enzimas *Sma*I (carril 2), *Pst*I (carril 3) y *Kpn*I (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda+ *Pst*I.



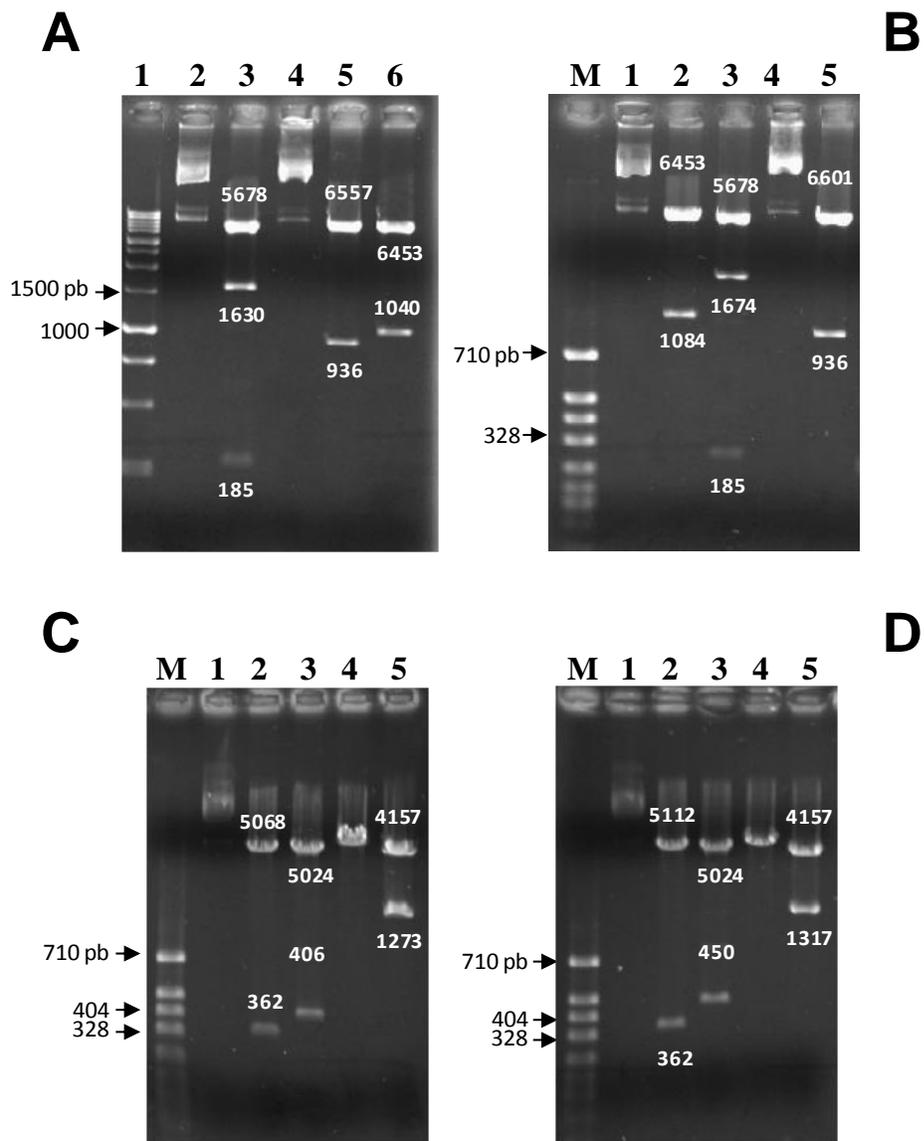
**Figura 36.** Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155GAL4, pCS2VC155GAL4<sup>YPWM</sup> y pCS2VC155GAL4<sup>AAAA</sup>. **A** El diagrama esquematiza la ligación de los insertos codificantes de las proteínas GAL4 y mutantes en el vector pCS2VC155. Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pCS2VC155GAL4 (**B**), pCS2VC155GAL4<sup>YPWM</sup> (**C**) y pCS2VC155GAL4<sup>AAAA</sup> (**D**) con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Eco*RI (carril 3) y *Xho*I (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda + *Pst*I.



**Figura 37. Construcción de los plásmidos recombinantes pNPACSynthYPWM<sup>LL</sup>, pNPACSynthYPWM<sup>SL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>LL</sup>, pNPACSynthAAAA<sup>SL</sup>, pNPACSynthWRPW<sup>LL</sup> y pNPACSynthWRPW<sup>SL</sup>.** **A** Preparación del vector pNPAC mediante digestión con la enzima de restricción *NotI* (carril 1) y su purificación en dos eluciones (carril 2 y 3). Purificación de las secuencias codificantes de los genes sintéticos de Antp previamente digeridas con la enzima *NotI*: YPWM<sup>LL</sup> (carril 5), YPWM<sup>SL</sup> (carril 6), AAAA<sup>LL</sup> (carril 7), AAAA<sup>SL</sup> (carril 8), WRPW<sup>LL</sup> (carril 9) y WRPW<sup>SL</sup> (carril 10). **B** Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pNPACSynthYPWM<sup>LL</sup> (carril 1), pNPACSynthYPWM<sup>SL</sup> (carril 2), pNPACSynthAAAA<sup>LL</sup> (carril 3), pNPACSynthAAAA<sup>SL</sup> (carril 4), pNPACSynthWRPW<sup>LL</sup> (carril 5) y pNPACSynthWRPW<sup>SL</sup> (carril 6) mediante digestión con la enzima de restricción *NdeI*. El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb.



**Figura 38. Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pNPACAntpΔQ1-2, pNPACAntpΔQ2, pCS2VC155AntpΔQ1-2 y pCS2VC155AntpΔQ2.** **A** La electroforesis en gel de agarosa al 0.8% muestra la caracterización del plásmido pNPACAntpΔQ1-2 (carril 1) con las enzimas de restricción *NotI* (carril 2), *EcoRI* (carril 3), *PstI* (carril 4) y *SmaI* (carril 5). **B** Digestión del plásmido recombinante pNPACAntpΔQ2 (carril 1) con las enzimas *EcoRI* (carril 2), *PstI* (carril 3), *SmaI* (carril 4) y *NotI* (carril 5). Patrón de restricción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155AntpΔQ1-2 (**C**) y pCS2VC155AntpΔQ2 (**D**) digeridos con las enzimas *BamHI* (carril 2), *SmaI* (carril 3) y *KpnI* (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular Lambda+ *PstI*.



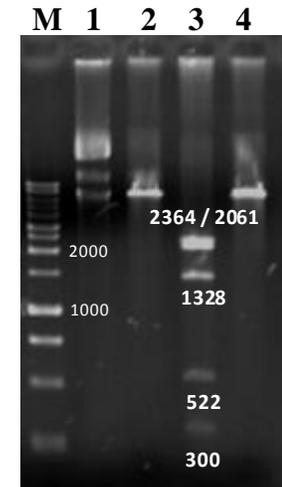
**Figura 39. Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes pPACAntpΔH1-2, pPACAntpΔH1, pCS2VC155AntpΔH1-2 y pCS2VC155AntpΔH1.** **A** Patrón de restricción del plásmido recombinante pPACAntpΔH1-2 (carril 2) digerido con las enzimas *Pst*I (carril 3), *Xba*I (carril 4), *Kpn*I (carril 5) y *Bam*HI (carril 6). El carril 1 corresponde al marcador de 1Kb. **B** Digestión del plásmido recombinante pPACAntpΔH1 (carril 1) con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 2), *Pst*I (carril 3), *Xba*I (carril 4) y *Kpn*I (carril 5). Caracterización de los plásmidos recombinantes pCS2VC155AntpΔH1-2 (**C**) y pCS2VC155AntpΔH1 (**D**) mediante digestión con las enzimas *Sma*I (carril 2), *Kpn*I (carril 3), *Pst*I (carril 4) y *Bam*HI (carril 5). El carril M corresponde al marcador de peso molecular pBS + *Msp*I.

**A****AntpG19:**

```

tctccactgtatccctggatgccaagtcaagtttgtaagtgtcaagaacgcaaacgcgga
S P L Y P W M R S Q F G K C Q E R K R G
aggcagacatacaccggtagcagactctagagctagagaaggggtttcacttcaatcgc
R Q T Y T R Y Q T L E L E K G F H F N R
tacttgaccctcgccgaaggatcgagatcgcccacgccctgtgcctcacggagcgccag
Y L T R R R R I E I A H A L C L T E R Q
ataaagatgtggtccagaatcggcgcatgaagtgaagaaggagaacaagacgaagggc
I K I W F Q N R R M K W K K E N K T K G
gagccgggatccggaggcgaaggcgacgagataacaccaccaacagtcgcagtag
E P G S G G E G D E I T P P N S P Q *

```

**B**

**Figura 40. Caracterización de los plásmidos pNPACAntpG19 y pPACAbdBG19 mediante secuenciación y digestión con enzimas de restricción.** **A** La secuenciación del plásmido mutagénico pNPACAntpG19 confirmó la presencia del aminoácido Gly (color rojo) en la posición 19 del homeodominio de Antp (color azul). **B** Visualización de la digestión del plásmido recombinante pPACAbdBG19 con las enzimas de restricción *Xba*I (carril 2), *Pvu*II (carril 3) y *Eco*RI (carril 4) en comparación con el DNA plasmídico sin digerir (carril 1). El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb.

## LITERATURA CONSULTADA

Aasland R, Gibson TJ and Stewart AF. 1995. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 56-59.

Abu-Shaar M, Ryoo HD and Mann RS. 1999. Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev* **13**: 935-945.

Adachi Y, Beaufils-Hugot M, Cárdenas-Chávez DL, Reséndez-Pérez D, Kloter U and Gehring WJ. 2012. Antennapedia-AbdominalB homeodomain interaction is Extradenticle-dependent. En preparación.

Alba MM and Guigo R. 2004. Comparative analysis of amino acid repeats in rodent and humans. *Genome Res.* **14**: 549-554.

Alonso C, J. Maxton-Kuechenmei. 2001. Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol.* **11**: 1473-1478.

Allison LA, Wong JK, Fitzpatrick VD, Moyle M and Ingles CJ. 1988. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 321-329.

Andrew DJ, Horner MA, Pettit MG, Smolik SM and Scott MP. 1993. Setting limits on homeotic gene function: Restraint of Sex combs reduced activity by teashirt and other homeotic genes. *EMBO J.* **13**: 1132-1144.

Atanesyan L, G Nther V, Dichtl B, Georgiev O and Schaffner W. 2011. Polyglutamine Tracts as Modulators of Transcriptional Activation from Yeast to Mammals. *Biol Chem.*

Bartolomei MS, Halden NF, Cullen CR, Corden JL. 1988. Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 330-339.

Bateson W. 1948. Mutation Aristapedia, heterozygote dominant, homozygote lethal chez *Drosophila melanogaster*. Bull. Boil. France Belg. **82**: 97-113

Benassayag C, Plaza S, Callaerts P, Clements J, Romeo Y, Gehring WJ and Cribbs DL. 2003. Evidence for a direct functional antagonism of the selector genes *proboscipedia* and *eyeless* in *Drosophila* head development. Development **130**: 575-586.

Bender W, Spierer P. and Hogness D. 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate AND from the Ace and rosy loc and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. **168**: 17-33.

Berkes CA, Bergstrom DA, Penn BH, Seaver KJ, Knoepfler PS and Tapscott SJ. 2004. Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. Mol. Cell **14**: 465-477.

Birmingham J. R., Martinez-Arias A. et al. 1990 Development (Cambridge, UK) **109**: 553-566.

Bondos SE, Catanese DJ, Tan X-X, Bicknell A, Li L and Matthews KS. 2004. Hox Transcription Factor Ultrabithorax Ib Physically and Genetically Interacts with Disconnected Interacting Protein 1, a Double-stranded RNA-binding Protein. J Biol Chem **279**: 26433-26444.

Boulet, A.M. and Scott M.P. 1988. Control elements of the P2 promoter of the Antennapedia gene. Genes Dev. **2**:1600–1614.

Bridges CB, and Morgan TH. 1923. The third-Chromosome Group of Mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Of Washington Publ. 327-393.

Brown, S. and Castelli-Gair Hombria, J. 2000. *Drosophila* grain encodes a GATA transcription factor required for cell rearrangement during morphogenesis. Development **127**: 4867-4876.

Bruun J-A, Thomassen EIS, Kristiansen K, Tylden G, Holm T, Mikkola I, Bjørkøy G and Johansen T. 2005. The third helix of the homeodomain of paired class homeodomain proteins acts as a recognition helix both for DNA and protein interactions. Nucleic Acids Res **33**: 2661-2675.

Buratowski S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. Cell **77**: 1-3

Burglin, T. 1994. A comprehensive classification of homeobox. In Guidebook of the homeobox genes (Duboule d, ed) Oxford University Press, pp. 26-71.

Burglin TR. 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4173-4180.

Burglin, TR. 2005. Homeodomain proteins. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, vol. 6. Wiley-VCH, pp. 179-222.

Burley SK and Roeder RG. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 769-799.

Canales del-Castillo, R. 2002. Análisis molecular y funcional del tetrapéptido YPWM en antennapedia en el estadio larvario de *D. melanogaster*.

Canales del-Castillo R. 2005. Actividad funcional del tetrapéptido “YPWM” de Antennapedia en la regulación de los genes blanco durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Capovilla, M., Z. Kambris, et al. 2001. Direct regulation of the muscle-identity gene apterous by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development* **128**: 1221-1230.

Cárdenas-Chávez DL. 2007. Purificación de las proteínas Antennapedia, GAL4 y mutantes en el tetrapéptido “YPWM”: dominio de represión transcripcional en Antennapedia. Tesis de Maestría en Ciencias, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Cárdenas-Chávez DL. 2003. Análisis de la represión transcripcional *in vitro* del tetrapéptido YPWM de Antennapedia. Tesis de Licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Catron KM, Zhang H, Marshall SC, Inostroza JA, Wilson JM and Abate C. 1995. Transcriptional repression by Msx-1 does not require Homeodomain DNA-Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 861-871.

Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A and Paulson HL. 2002. Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9310-9315.

Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C and Cleary ML. 1995. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* **9**: 663–674.

Chasman DI, Flaherty KM, Sharp PA and Kornberg RD. 1993. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 8174-8178.

Colgan J and Manley JL. 1992. TFIID can be rate limiting *in vivo* for TATA-containing, but not TATA-lacking, RNA polymerase II promoters. Genes Dev. **6**: 304-315.

Conaway RC and conaway JW. 1997. General transcription factors for RNA polymerase II. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. **56**: 327-346.

Corden JL. 1990. Tails of RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. **15**: 383-387.

Courey A J, Holtzman DA, Jackson SP and Tijan R. 1989. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. Cell **59**: 827-836.

Dai S, Petruccelli S, Ordiz MI, Zhang Z, Chen S and Beachy RN. 2003. Functional analysis of RF2a, a rice transcription factor. J Biol Chem. **278**: 36396-402.

DeJong J, Bernstein R and Roeder RG. 1995. Human general transcription factor TFIIA: Characterization of a cDNA encoding the small subunit and requirement for basal and activated transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 3313-3317.

Devenport, M., C. Blass, *et al.* 2000. Characterization of the Hox gene cluster in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Evol Dev **2**: 326-39.

Duboule D, Dollé P. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila homeótica* gene. EMBO J. **8**: 1497-1505.

Duncan I. M. 1982. Polycomb like: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and Antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **102**: 49-70.

Emerald, B.S. et al. 2003. Distal antenna and distal antenna related encode nuclear proteins containing pipsqueak motifs involved in antenna development in *Drosophila*. Development **130**: 1171-1180.

Emili A, Greenblatt J and Ingles J. 1994. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol.* **14**: 1582-1593.

Fasano, L., L. Roder, et al. 1991. The gene teashirt is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* **64**: 63-79.

Faux NG, Bottomley SP, Lesk AM, Irving JA, Morrison JR, Garcia-de-la-Banda M and Whisstock JC. 2005. Functional insights from the distribution and role of homopéptido repeat-containing proteins. *Genome Research* **15**: 537-551.

Fisher AL, Shunji O and Michael C. 1996. The WRPW of the Hairy-Related Helix-Loop-Helix Repressor Proteins Acts as a 4-Amino-Acid Transcription Repression and Protein-Protein Interaction Domain. *Mol Cell Biol.* **16**: 2670-2677.

Furukubo-Tokunaga K, Flister S, Gehring WJ. 1993. Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6360-6364.

Galant R, Walsh CM and Carroll SB. 2002. Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development* **129**: 3115-3126.

Gangloff YG, Pointud JC, Thuault S, Carré L, Romier C, Muratoglu S, Brand M, Tora L, Couderc JL and Davidson I. 2001. The TFIID components human TAF<sub>II</sub>40 and *Drosophila* BIP2 (TAF<sub>II</sub>155) are novel metazoan homologues of Yeast TAF<sub>II</sub>47 containing a Histone Fold and a PHD finger. *Mol Cell Biol.* **21**: 5109-5121.

Garber RL, Kuroiwa AY, Gehring WJ. 1983. Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. *EMBO J.* **2**: 2027-36.

Garcia-Bellido, A. 1977. Homeotic and atavic mutations in insects. *Amer. Zool.* **17**: 613-630.

Gebelein B and Mann R. 2007. Compartmental modulation of abdominal Hox expression by engrailed and sloppy-paired patterns the fly ectoderm. *Dev. Biol.* **308**: 593-605.

Gehring, W J. 1987. Homeoboxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252.

Gehring WJ, Muller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Quian YQ and Otting Wuthrich K. 1990. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.* **6**: 323-329

Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. 1994. Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 437-526.

Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Höfferer M, Hug M, Rusconi S and Schaffner W. 1994. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**: 808-811.

Gerber HP, Hagmann M, Seipel K, Georgiev O, West MA, et al. 1995. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* **374**: 660-662.

Gibson G. and W Gehring. 1988. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during *Drosophila* development. *Development* **102**: 657-675.

Gilbert, F. S. 2003. *Developmental Biology*. Séptima edición. USA. Sinauer. Capitulo 9.

Goodrich JA and Tijan R. 1994. TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 403-409.

Green MR. 2000. TBP-associated factors (TAFIIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 59-63.

Grieder NC, et al. 2009. Spalt major controls the development of the notum and of wing hinge primordia of the *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Dev Biol* **329**: 315-326.

Guzman E and Lis JT. 1999. Transcription factor TFIID is required for promoter melting in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5652-5658.

Hafen E, Levine M and Gehring WJ. 1984. Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **307**: 287-289.

Hampsey M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 465-503.

Han K and Manley JL. 1993. Transcriptional repression by the *Drosophila* Even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. *Genes Dev.* **7**: 491-503.

Harding K, Wedeen C, McGinnis W and Levine M. 1985. Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* **229**: 1236-1242.

Harding K and Levine M. 1988. Gap genes define the limits of Antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *EMBO J.* **7**: 205-214.

Harrison PM. 2006. Exhaustive assignment of compositional bias reveals universally prevalent biased regions: analysis of functional associations in human and *Drosophila*. *BMC Bioinformatics* **7**: 441.

Hayward D, Patel N, Rehm E, Goodman C. and Ball E. 1995. Sequence and expression of grasshopper antennapedia: comparison to *Drosophila*. *Dev Biol* **172**: 452-65.

Hoey T and Levine M. 1988. Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332**: 858-861.

Holstege FC, Tantin D, Carey M, Van der Vliet PC and Timmers HT. 1995. The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *EMBO J.* **14**: 810-819.

Imbalzano AN, Zaret KS, Kingston RE. 1994. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* **269**: 8280-8286.

Ingham PW and Martinez-Arias A. 1986. The correct activation of Antennapedia and bithorax complex genes requires the fushi tarazu gene. *Nature* **324**: 592-597.

Irish VF, Martinez-Arias A and Akam M. 1989. Spatial regulation of the Antennapedia and Ultrabithorax homeotic genes during *Drosophila* early development. 1989. *EMBO J.* **8**: 1527-1537.

Jaffe L, Ryoo H and Mann R. 1977. A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes and Dev.* **11**: 1327-1340.

Janodi F, Sturny R, Schaeffer V, Azou Y and Dostatni N. 2001. Two distinct domains of Bicoid mediate its transcriptional downregulation by the Torso pathway. *Development* **128**: 2281-2290.

Jawhari A, Uhring M, DeCarlo S, Crucifix C, Tocchini-Valentini G, Moras D, Schultz P and Poterszman A. 2006. Structure and oligomeric state of human transcription factor TFIIE. *EMBO* **7**: 500-505.

Jiang H. 2003. Mechanisms of polyglutamine expanded Huntingtin induced toxicity. University of Pittsburg.

Johnson FB, Parker E, Krasnow MA. 1995. Extradenticle protein is a selective cofactor for the Drosophila homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc. Natl. Sci. USA* **92**: 739-43.

Joshi R, Sun L and Mann R. 2010. Dissecting the functional specificities of two Hox proteins. *Genes Dev.* **24**: 1533-1545.

Jürgens, G. 1988. Head and tail development of the Drosophila embryo involves spalt, a novel homeotic gene. *EMBO J.* **7**: 189-196.

Kalions PS and O'Farrell PH. 1993. A universal target sequence is bound *in vitro* by diverse homeodomains. *Mech. Dev.* **43**: 57-70.

Kamps MP, Murre C, Sun XH and Baltimore D. 1990. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**: 547-555.

Karlin S and Burge C. 1996. Trinucleotide repeats and long homopéptidos in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1560-1565.

Kerppola TK. 2006. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 449-456.

Kerppola TK. 2006. Design and implementation of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* **1**: 1278-1286.

Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. 1993. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* **365**: 520-27.

Kim Y, Geiger JH, Hahn S and Sigler PB. 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* **365**:512-520.

Kimmelman J, Kaldis P, Hengartner CJ, Laff GM, Koh SS, et al. 1999. Activating phosphorylation of the Kin28p subunit of yeast TFIIF by Cak1p. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4774-87.

Knoepfler PS and Kamps MP. 1995. The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5811-5819.

Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersh SM and Ferrante RJ. 1999. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **46**: 842-849.

Kuroiwa A, Hafen E. and Gehring W. 1984. Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *Fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell* **37**:825-831.

Kuziora, M. 1993. Abdominal-B protein isoforms exhibit distinct cuticular transformations and regulatory activities when ectopically expressed in *Drosophila* embryos. *Mech Dev* **42**: 125-137.

LeCalvez, J. 1948. Mutation *Aristopedia*, hétérozygote dominante, homozygote lethal chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. France Belg.* **82**: 97-113.

Lee WS, CC Kao, GO Bryant, X Liu and AJ Berk. 1994. Adenovirus E1A binds TATA-box transcription factor TFIID. *Cell* **67**: 365-376.

Lee TI and Young RA. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**: 77-137.

Lewis E. B. 1963. Genes and developmental pathways. *Am. Zool.* **3**: 33-56.

Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.

Lôhr U, Yussa M. and Pick L. 2001. *Drosophila fushi tarazu*: a gene on the border of homeotic function. *Current biology* **11**: 1403-1412.

Lu H, Zawel L, Fisher L, Egly JM and Reinberg D. 1992. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**: 641-5.

Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD and Kamps MP. 1995. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol.* **15**: 3786-3795.

Lu Q and Kamps MP. 1996. Selective repression of transcriptional activators by Pbx1 does not require the homeodomain. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**: 470-474.

Manak, J., L. Mathies, et al. 1995. Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development* **120**: 3605-3619.

McCormick, A., N. Core, et al. (1995). "Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene." *Development* **121**: 2799-2812.

McGinnis W, Levine M, Hefen E, Kuroiwa AY, Gehring W J. 1984. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *Bithorax* complexes. *Nature* **308**: 428-433.

Majello B, De Luca P and Lania L. 1997. Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem.* **272**: 4021-4026.

Mann RS and Chan SK. 1996. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* **12**. 258-262.

Mann RS and Affolter M. 1998. Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev.* **8**:423-429.

Mann RS, Lelli KM and Joshi R. 2009. Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Topics in Development Biol.* **88**: 63-101.

Mastick G. S. et al. 1995. Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of Ultrabithorax protein-binding site in yeast. *Genetics* **139**: 349-363.

Merabet S, Saadaoui M, Sambrani N, Hudry B, Pradel J, Affolter M and Graba Y. 2007. A unique Extradenticle recruitment mode in the Drosophila Hox protein Ultrabithorax. *Proc Nat Acad Sci USA* **104**: 16946–16951.

Merabet S and Kambris Z. 2003. The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell* **4**: 761-8.

Meyer A. and M. Schartl. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (to-eight in fish) rule and the evolution of a novel gene functions. *Curr. Opin. Cell. Boil.* **11**:699-704.

Mikkola I, Bruun J-A, Holm T and Johansen T.2001. Superactivation of Pax6-mediated Transactivation from Paired Domain-binding Sites by DNA-independent Recruitment of Different Homeodomain Proteins. *J Biol Chem* **276**: 4109-4118.

Miller D, B Rogers, et al. 2001. Cross-regulation of Hox genes in the Drosophila melanogaster embryo. *Mech Dev* **102**: 3-16.

Mitchell PJ and Tijan R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.

Moens CB and Selleri L. 2006. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* **291**: 193-206.

Moonkyoung UM, Li C and Manley JL. 1995. The transcriptional repressor Even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5007-5016.

Neuteboom ST, Peltenburg LT, van Dijk MA and Murre C. 1995. The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 9166-9170.

Nikolov DB, Hu SH, Lin J, Gasch A, Hoffmann A, *et al.* 1992. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* **360**: 40-46.

Nonet M, Sweetser D, Young RA. 1987. Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* **50**: 909-15.

Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD and Cleary ML. 1990. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**: 535-545.

Ohkuma Y, Sumimoto H, Horikoshi M and Roeder RG and. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 9163-9167.

Ohkuma Y and Roeder RG. 1994. Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. Nature **368**: 160-63.

Ohkuma Y. 1997. Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by *trans*-acting factors. J. Biochem (Tokyo) **122**: 481-489.

Okamoto T, Yamamoto S, Watanabe Y, Ohta T, Hanaoka F, Roeder RG and Ohkuma Y. 1998. Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIE $\beta$  subunit. J. Biol. Chem. **273**: 19866-19876.

Okuda M, Watanabe Y, Okamura H, Hanaoka F, Ohkuma Y and Nishimura Y. 2000. Structure of the central core domain of TFIIE $\beta$  with a novel double-strand DNA-binding surface. EMBO J. **19**: 1346-1456.

Orphanides G, Lagrange T and Reinberg D. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. Genes Dev. **10**:2657-83.

Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, Gehring WJ and Wuthrich K. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. EMBO J. **9**: 3085-92.

Ozer J, Moore PA, Bolden AH, Lee A, Rosen CA, Lieberman PM. 1994. Molecular cloning of the small (gamma) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. Genes Dev. **8**: 2324-35.

Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA, Fünfschilling R and Gehring WJ. 2011. PNAS

Papadopoulos DK, Skouloudaki K, Adachi Y, Samakovlis C and Gehring WJ. 2012. Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. Dev. Biol. **367**: 78-89.

Passner Jonathan M., Hyung Don Ryoo, Leyi Shen, Richard S. Mann and Aneel K. Aggarwal. 1999. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. Nature. **297**: 649-651.

Patel N y V. Prince. 2000. Beyond the Hox complex. *Genome Biol*, **1**: 1027.

Peifer M. and Wieschaus E. 1990. Mutations in the *Drosophila* gene *Extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev.* **4**: 1209-1223.

Phelan ML, Rambaldi I and Featherstone MS. 1995. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3989-3997.

Piper DE, Batchelor AH, Chang CP, Cleary ML and Wolberger C. 1999. Structure of a HoxB1–Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* **96**: 587-597.

Plaza S, Prince F, Jaeger J, Kloter U, Flister S, Benassayag C, Cribbs D and Gehring WJ. 2001. Molecular Basis for the Inhibition of *Drosophila* Eye Development by *Antennapedia*. *EMBO J.* **20**: 802-811.

Plaza, S, Prince F, Adachi Y, Punzo C, Cribbs DL and Gehring WJ. 2008. Cross-Regulatory Protein–Protein Interactions Between Hox and Pax Transcription Factors. *Proc Nat Acad Sci USA* **105**: 13439–13444.

Prince F, Katsuyama T, Plaza S, Resendez-Perez, Berry M, Kurata S and Gehring WJ. 2008. The YPWM motif links *Antennapedia* to the basal transcriptional machinery. *Development* **135**: 1669-1679.

Prochiantz A and Joliot A. 2003. Can transcription factors function as cell- cell signalling molecules? *Nature Rev Mol Cell Biol* **4**: 814-819.

Qian YQ, Billeter M, Otting G, Muller M, Gehring WJ and Wüthrich K. 1989. The structure of the *Antennapedia* homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* **59**: 573-580.

Qian YQ, Otting G, Furukubo-Tokunaga K, Affolter M, Gehring WJ and Wüthrich K. 1992. NMR structure determination reveals that the homeodomain is connected through a flexible linker to the main body in the *Drosophila* *Antennapedia* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10738-10742.

Qian X, Jeon C, Yoon H, Agarwal K, Weiss MA. 1993. Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcriptional elongation factor TFIIS. *Nature* **365**: 277-279.

Qian YQ, Resendez-Perez D, Gehring WJ and Wuthrich K. 1994. The des(1-6)Antennapedia-homeodomain: Comparison of the NMR solution structure and the DNA-binding affinity the intact Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 4091-4095.

Rauskolb C, Peifer M and Wieschaus E. 1993. Extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1. *Cell* **74**: 1101-1112.

Rauskolb C and Wieschaus E. 1994. Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *EMBO J*. **13**: 3561-3569.

Reed HC, et al. 2010. Alternative splicing modulates Ubx protein function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **184**: 745-758.

Reinberg D, Orphanides G, Ebricht R, Akoulitchev S, Carcamo J, et al. 1998. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 83-103.

Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M and Mann RS. 1997. Translocation of Extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**: 171-183.

Rivera-Pomar R, Niessing D, Schmidt-Otto U, Gehring WJ and Jackle H. 1996. RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* **379**: 747-749.

Roder, L., C. Vola, et al. 1992. The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development* **115**: 1017-1033.

Roeder RG. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 327-35.

Ross CA. 2002. Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*. **35**: 819-22.

Ryoo HD and Mann RS. 1999. The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev.* **13**: 1704-1716.

Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M and Mann RS. 1999. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* **126**: 5137-5148.

Saka Y, Hagemann AI, Piepenburg O and Smith JC. 2007. Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in *Xenopus*. *Development* **134**: 4209-4218.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schaefer MH, Wanker EE and Andrade-Navarro MA. 2012. Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Research* 1-15.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B and Cavalli G. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**: 735-745.

Shen W-F, Rozenfeld S, Lawrence HJ and Largman C. 1997. The Abd-B-like Hox Homeodomain Proteins Can Be Subdivided by the Ability to Form Complexes with Pbx1a on a Novel DNA Target. *J Biol Chem* **272**: 8198-8206.

Shen W-F, Rozenfeld S, Kwong A, Kömüves LG, Lawrence HJ and Largman C. 1999. HOXA9 Forms Triple Complexes with PBX2 and MEIS1 in Myeloid Cells. *Mol Cell Biol* **19**: 3051-3061.

Shepherd JC, McGinnis, Carrasco AE, DeRobertis EM, Gehring WJ. 1984. Fly and frog homeodomains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* **310**: 70-71.

Shiga Y, R Yasumoto, et al. 2002. Evolving role of Antennapedia protein in arthropod limb patterning. *Development* **129**: 3555-3561.

Schneuwly S, Kuroiwa A, Baumgartner P. and Gehring WJ. 1986. Structural organization and sequence of the homeotic genes Antennapedia of *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal* **5**: 733-739.

Sprecher S, M Muller, et al. 2004. Hox gene cross-regulatory interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mech Dev* **121**: 527-36.

Stroeher VL, JG and Garber RL. 1988. Alternative RNA splicing that is spatially regulated: generation of transcripts from the Antennapedia gene of *Drosophila melanogaster* with different protein-coding regions. *Mol. Cell Biol.* **8**: 4143-4154.

Struhl G. 1981. A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* **292**: 635-638.

Struhl K. 1996. Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription. *Cell* **84**: 179-82.

Sumimoto H, Ohkuma Y and Roeder RG. 1991. Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor. *Nature* **354**: 401-404.

Svingen T and Tonissen KF. 2006. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* **97**: 88-96.

Su W, Jackson S, Tjian R and Echols H. 1991. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev.* **5**: 820-826.

Tour E, Hittinger CT and McGinnis W. 2005. Evolutionary conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox proteins Ultrabithorax. *Development* **132**: 5271-5281.

Traven A, Jelcic B. and Sopta M. 2006. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO J.* **7**: 496-499.

Ulijaszek SJ, Johnston FE and Preece MA. 1998. *The Cambridge Encyclopedia of Human Growth and Development*. Cambridge University Press: Cambridge.

van Dijk MA and Murre C. *Extradenticle* Raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. 1994. *Cell* **78**: 617-624.

Verrijzer CP, Tjian R. 1996. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 338-42.

Vigano MA, Di Rocco G, Zappavigna V and Mavilio F. 1998. Definition of the transcriptional activation domains of three human HOX proteins depends on the DNA-binding context. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6201-6212.

Villanueva-Segura K. 2004. Modulación de la Represión Transcripcional de Antennapedia con el motivo WRPW en cultivo celular. Tesis de Licenciatura F.C.B. UANL.

Wagner-Bernholz JT, et al. 1991. Identification of target genes of the homeotic gene Antennapedia by enhancer detection. *Genes Dev.* **5**: 2467-2480.

Walldorf, U, Binner P and Fleig R. 2000. Hox genes in the honey bee *Apis mellifera*. *Dev Genes Evol* **210**: 483-92.

Wakimoto BT. and Kaufman TC. 1981. Análisis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **81**: 51-64.

Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board GL, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN and Bonini NM. 1998. Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* **93**: 939-949.

Watanabe T, Hayashi K, Tanaka A, Furumoto T, Hanaoka F and Ohkuma Y. 2003. The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **23**: 2914-2926.

Williams TM, Williams ME and Innis JW. 2005. Range of HOX/TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13: MEIS interaction. *Dev. Biol.* **277**: 457-471.

Winslow GM, Hayashi S, Krasnow M, Hogness DS and Scott MP. 1989. Transcriptional activation by the Antennapedia and fushi tarazu proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* **57**: 1017-1030.

Woychik NA. 1998. Fractions to functions: RNA polymerase II thirty years later. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 311-17.

Wu Y, Reece RJ and Ptashne M. 1996. Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J* **15**: 3951–3963.

Yamashita S, Wada K, Horikoshi M and Roeder RG. 1992. Isolation and characterization of a cDNA encoding *Drosophila* transcription factor TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2839-2843.

Yokomori K, Zeidler MP, Chen JL, Verrijzer CP, Mlodzik M, Tjian R. 1994. *Drosophila* TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev.* **8**: 2313-2323.

Young RA. 1991. RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 689-715.

Zawel L, Kumar KP and Reinberg D. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* **9**: 1479-90.

Zehring WA, Lee JM, Weeks JR, Jokerst RS, Greenleaf AL. 1988. The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3698-702.

Zeng W, D Andrew, et al. 1993. Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development* **118**: 339-352.

Zhao JJ, Lazzarini RA and Pick L. 1996. Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *EMBO J.* **15**: 1313-1322.

Zhao Y. And S. S. Potter. 2001. Functional specificity of the HoxA13 homeobox. *Development* **128**: 3197-3207.

Zawel L and Reinberg D. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **44**: 67-108.

Zhu A and Kuziora MA. 1996. Homeodomain interaction with the  $\beta$  subunit of the general transcription factor TFIIE. *The journal of Biological Chemistry* **271**: 20993-20996.

Zink B, Engström Y, Gehring WJ and Paro R. 1991. Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **10**: 153-162.