

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“INTERACCIONES MOLECULARES PROTEÍNA-PROTEÍNA DE ANTP
CON EL FACTOR TFIIIE- β A TRAVÉS DE LOS RESIDUOS 32 Y 36 DEL
HOMEODOMINIO”**

POR

CLAUDIA DALILA ALTAMIRANO TORRES

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

ENERO 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“INTERACCIONES MOLECULARES PROTEÍNA-PROTEÍNA DE ANTP CON
EL FACTOR TFIIIE- β A TRAVÉS DE LOS RESIDUOS 32 Y 36 DEL
HOMEODOMINIO”**

POR

CLAUDIA DALILA ALTAMIRANO TORRES

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

ENERO, 2014

**“INTERACCIONES MOLECULARES PROTEÍNA-PROTEÍNA DE ANTP CON
EL FACTOR TFIIIE- β A TRAVÉS DE LOS RESIDUOS 32 Y 36 DEL
HOMEODOMINIO”**

Por:

Biol. Claudia Dalila Altamirano Torres

Comisión de Tesis:

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Presidente

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA
Secretario

DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES
Vocal

DR. FERMIN MAR AGUILAR
Vocal

DR. JORGE ARMANDO VERDUZCO MARTÍNEZ
Vocal

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN.

ENERO, 2014

*Emptiness is described as the basis that makes
everything possible*

-The Twelfth Tai Situpa Rinpoche
Awakening the Sleeping Buddha

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

LUGAR DE TRABAJO

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, PERTENECIENTE A LOS DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. ANTECEDENTES.....	10
4.1 Genes homeóticos.....	10
4.2 Antennapedia.....	12
4.2.1 Especificidad funcional del homeodominio.....	13
4.2.2 Tetrapeptido YPWM.....	15
4.2.3 Regulación génica.....	16
4.2.4 Interacciones moleculares proteína-proteína.....	17
4.3 Factores generales de transcripción.....	18
4.3.1 BIP2.....	21
4.3.2 TFIIE.....	21
4.3.3 TBP.....	21
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS.....	25
6.1 Objetivo general.....	25

6.2 Objetivos particulares.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIIE-β en ensayos de BiFC.....	26
7.1.1 Plásmidos pCS2VC155-Antp mutagenizados.....	26
7.1.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α Ca $^{++}$ competentes.....	27
7.1.3 Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina a pequeña escala (Miniprep).....	28
7.2 Análisis de interacción mediante ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC).....	28
7.2.1 Preparación de cubreobjetos con polyL-lisina.....	28
7.2.2 Obtención de plásmidos recombinantes y controles.....	29
7.2.3 Ensayos de co-transfección en células HEK293.....	29
7.2.4 Visualización de los complejos fluorescentes.....	30
7.3 Construcciones plasmídicas para los Ensayos de Transactivación.....	30
7.3.1 Plásmido pNPAC-AntpI32L.....	30
7.3.2 Plásmidos pNPAC-AntpI32A y H36A.....	30
7.4 Análisis de la interacción molecular mediante Ensayos de Transactivación.....	31
7.4.1 Obtención y purificación de plásmidos productores y reporteros.....	31
7.4.2 Ensayos de transfección en células HEK293.....	31

7.4.3 Preparación de extractos celulares totales.....	32
7.4.4 Cuantificación de la expresión de los genes reporteros....	32
8. RESULTADOS.....	34
8.1 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIIE-β en ensayos de BiFC.....	34
8.1.1 Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A mediante mutagénesis sitio dirigida.	34
8.1.2 Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L-H36R y I32A-H36A mediante mutagénesis sitio dirigida..	36
8.2 Análisis de la interacción molecular de la hélice II del HD de Antennapedia con el factor transcripcional TFIIIE-β en ensayos de BiFC.....	38
8.2.1 Análisis de la interacción molecular de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp con TFIIIE-β mediante BiFC.....	40
8.2.2 Análisis de la interacción molecular de la mutación doble de los residuos 32 y 36 en la hélice II del HD de Antp con TFIIIE-β mediante BiFC.....	41
8.3 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIIE-β en ensayos de transactivación.....	44
8.3.1 Construcción del plásmido pNPAC-AntpI32L mediante mutagénesis sitio dirigida.....	44
8.3.2 Construcción de los plásmidos pNPAC-AntpI32A y H36R.....	45
8.4 Efecto de las mutaciones de los residuos 32 y 36 de la hélice	

II del HD de Antp en la actividad transcripcional de Antp en presencia de TFIIβ mediante ensayos de transactivación...	48
9. DISCUSIÓN.....	51
10. CONCLUSIONES.....	57
11. LITERATURA CONSULTADA.....	58
APENDICE I: Lista de oligonucleótidos.....	67

NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA

AbdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
Antp	Antennapedia
β gal	β -galactosidasa
BiFC	Fluorescencia por Complementación Bimolecular
$^{\circ}$ C	Grados celsius
CPRG	Cloraphenol-Red-B-Galactopiranosido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
g	Gramos
GTFs	Factores transcripcionales generales
HD	Homeodominio
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LB	Luria-Bertoni
miliQ	Agua ultrapurificada
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molaridad
ng	Nanogramo
nt	Nucleótidos
ng/ μ l	Nanogramos por microlitos
pb	Pares de bases
%	Porcentaje
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de Pre-iniciación
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
RLU	Unidades Relativas de Luz
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos

SFB	Suero fetal bovino
T	Temperatura
T _m	Temperatura media de alineamiento
TaqPol	DNA polimerasa derivada de <i>Thermophilus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
U/μl	Unidades por microlitro
VC155	Fragmento C-terminal de Venus
VNm9	Fragmento N-terminal de Venus
V	Voltio

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución espacial de los genes homeóticos.....	11
2. Colinearidad de los genes homeóticos.....	12
3. Estructura génica de Antennapedia.....	12
4. Interacción del homeodominio de Antp con el DNA.....	14
5. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en <i>Drosophila</i>	15
6. Ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la RNA polimerasa II.....	20
7. Posición de los residuos 32 y 36 en la hélice II del HD.....	23
8. Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A mediante mutagénesis dirigida.....	35
9. Confirmación de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A.....	36
10. Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L-H36R y I32A- H36A mediante mutagénesis doble de las posiciones 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp.....	37
11. Confirmación de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155AntpI32L- H36R y pCS2-VC155AntpI32A-H36A mediante secuenciación.....	38
12. Interacción de Antp y TFIIE- β mediante Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC).....	39
13. Interacción proteína-proteína de TFIIE- β con las posiciones aminoacídicas 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp.....	41

14. La mutación doble de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp elimina la interacción proteína-proteína de Antp con TFIIE- β	43
15. Mutagénesis del plásmido pNPAC-Antp en la posición 32 de la hélice II del HD.....	45
16. Construcción de los plásmidos recombinantes pNPAC-AntpI32A y H36R.....	48
17. Ensayo para analizar la actividad transactivadora de Antp en presencia de TFIIE- β	49
18. La sustitución de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp afecta la activación de la transcripción de Antp en presencia de TFIIE- β .	50

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio-dirigida.....	26
II. Plásmidos utilizados en los ensayos de BiFC.....	40
III. Plásmidos utilizados en los ensayos de Transactivación.....	48

1. RESUMEN

Las homeoproteínas contienen el homeodominio (HD) que actúa como dominio de unión al DNA y así mismo participa en interacciones proteína-proteína que intensifican la especificidad de unión. La homeoproteína Antennapedia (Antp) es responsable de la formación de segmentos torácicos y de la cabeza. El motivo de unión proteína-proteína YPWM liga a Antp a la maquinaria basal transcripcional ya que interactúa con el factor transcripcional BIP2. Estudios realizados en el laboratorio mostraron que Antp interacciona con el factor transcripcional TFIIE- β y que la hélice II del HD está involucrada en esta interacción (Cárdenas-Chávez 2012). Como los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD se encuentran expuestos en la hélice II y están conservados en Antp y otras homeoproteínas, el objetivo de ésta tesis consistió en determinar si éstas posiciones están involucradas en la interacción molecular proteína-proteína Antp-TFIIE β . Para ello, se realizó mutagénesis sitio-dirigida de los residuos 32 y 36 de la hélice II de Antp y se determinó su efecto en la interacción proteína-proteína con TFIIE- β mediante Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) y activación de la transcripción. Los resultados de BiFC mostraron una considerable disminución de la interacción molecular en células transfectadas con las mutantes AntpI32L (29%), AntpI32A (31%), AntpH36R (23%) y AntpH36A (25%) con TFIIE- β . Las mutantes dobles de los residuos 32 y 36 mostraron una drástica reducción del porcentaje de interacción con TFIIE- β correspondientes al 11% con AntpI32L-H36R y 12% con AntpI32A-H36A. La falta de interacción de Antp con TFIIE- β debido a la mutación de los residuos I32 y H36 en la hélice II recuperó la actividad transactivadora de Antp en cultivo celular ya que no mostró efecto significativo en ausencia y presencia de TFIIE- β . Estos resultados en conjunto indican que los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp están involucrados directamente en la interacción proteína-proteína con TFIIE β y rescataron la actividad transcripcional de Antp en los sitios blanco de unión al DNA. El análisis de interacción molecular contribuye al conocimiento de los procesos de regulación génica de homeoproteínas mediante interacciones proteína-proteína con factores generales de transcripción como TFIIE- β que requieren ser verificados *in vivo* en *Drosophila* para determinar cómo contribuyen a la especificidad funcional.

2. ABSTRACT

Homeoproteins contain the homeodomain (HD) which acts like a DNA binding motif and is involved in protein-protein interactions that intensify its union specificity. The homeoprotein Antennapedia (Antp) is responsible for thoracic segments and head formation. The protein-protein binding domain YPWM interacts with the transcription factor BIP2 linking Antp with the basal transcription machinery. Studies in our laboratory showed that Antp also interacts with the general transcription factor TFIIE- β through the HD helix II (Cárdenas-Chávez 2012). As residues 32 and 36 are exposed in helix II and are conserved in Antp and other homeoproteins this thesis objective was to examine if positions 32 and 36 of the HD helix II are involved in the protein-protein interaction Antp-TFIIE β . These residues were mutated by site-directed mutagenesis and then we analyzed the effect on the protein-protein interaction with TFIIE- β by Bimolecular Fluorescence Complementation assays (BiFC) and transcription activation assays. BiFC showed a considerable decrease of the molecular interaction in cells transfected with the mutants AntpI32L (29%), AntpI32A (31%), AntpH36R (23%) and AntpH36A (25%) with TFIIE- β . Double mutants of residues 32 and 36 showed a drastic reduction in the percentage of interaction of 11% with AntpI32L-H36R and 12% with AntpI32A-H36A. The lack of Antp mutants interaction rescued the transactivation activity of Antp in cell culture being that there is no significant effect in the presence or absence of TFIIE- β . Our results indicate that residues 32 and 36 of Antp HD helix II are involved in the specificity of Antp-TFIIE β protein-protein interaction and these mutants rescued the transcriptional activity of Antp on its DNA binding sites. This analysis of molecular interactions contributes with the knowledge of homeoproteins gene regulation processes conferred by using protein-protein interactions with general transcription factors such as TFIIE- β , these data required to be verified *in vivo* in *Drosophila melanogaster*.

3. INTRODUCCIÓN

En *Drosophila*, las homeoproteínas constituyen una familia de proteínas responsables de especificar la identidad de los segmentos a lo largo del eje antero-posterior de un embrión en desarrollo. Estas proteínas comparten una región homeobox; secuencia altamente conservada de 180 pb que codifica para un dominio de unión a DNA de 60 aminoácidos, el homeodominio (HD), confiriendo a las homeoproteínas una función como factor de transcripción que regula la expresión de los genes necesarios para la identidad de segmentos. Un dilema sin resolver en Biología del Desarrollo radica en la especificidad funcional de las homeoproteínas, ya que los HDs están altamente conservados y reconocen secuencias nucleotídicas similares para conferir todas las funciones en la morfogénesis animal.

La homeoproteína Antennapedia (Antp) se expresa en el núcleo de células de la epidermis torácica del embrión y de células de varios segmentos del sistema nervioso ventral y periférico, su función es requerida en todos los segmentos torácicos para suprimir por una parte el desarrollo de la cabeza y por otra promover el desarrollo de los apéndices torácicos. Esta homeoproteína interacciona a través del dominio peptídico altamente conservado, YPWM, con cofactores para regular la especificidad de otras homeoproteínas. Otro dominio funcional de Antp, el HD, además de reconocer el DNA puede presentar interacción con otras proteínas como el factor general de transcripción (GTF) TFIIE- β y se ha determinado que la hélice II del HD está directamente implicada en esta interacción. En el presente trabajo se muestra evidencia de que los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD están implicados en la especificidad de unión de Antp con el factor general de transcripción TFIIE- β . Esto plantea una liga importante con la maquinaria transcripcional basal, y dado que Antp posee un HD típico éstos resultados podrían ser extrapolados a otros HDs y proveer información valiosa que permitirá develar aspectos específicos en las interacciones proteína-proteína de las homeoproteínas y la regulación de los procesos finos del desarrollo en *Drosophila melanogaster*.

En el complejo desarrollo de los organismos multicelulares la correcta y eficiente regulación de la expresión génica en tiempo y espacio es de vital importancia. Se sabe que las homeoproteínas juegan un papel crucial como reguladores transcripcionales durante el desarrollo y en diversos procesos celulares en la etapa adulta. Estos reguladores poseen el homeodominio que tiene una doble función al actuar como dominio de unión al DNA y al participar en interacciones proteína-proteína que intensifican la especificidad de unión o la actividad reguladora de estas homeoproteínas. Debido a que una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo consiste en: ¿cómo se determina la especificidad funcional de las diferentes homeoproteínas altamente similares? En ésta tesis se analizó si los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD están implicados en la interacción de Antp con el factor general de transcripción TFIIE- β . El análisis de ésta interacción a nivel molecular fino plantea una liga importante de los HDs con la maquinaria transcripcional basal, ya que a la fecha se conocen pocos co-factores de las homeoproteínas y los resultados proveerán información valiosa que permitirá develar aspectos específicos en las interacciones proteína-proteína de las homeoproteínas con miembros de la maquinaria basal transcripcional para discernir en la selección de los genes blanco que permiten los diversos procesos de la morfogénesis animal y la regulación de los procesos finos del desarrollo en *Drosophila melanogaster*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Genes homeóticos

El mecanismo mediante el cual un organismo multicelular se desarrolla a partir de un simple huevo fertilizado presenta un complejo y fascinante proceso de eventos precisos en espacio y tiempo que culminan con la integración armónica de estructuras y órganos en un organismo completo. La clave para la identificación del control genético del desarrollo para la especificación del plan del cuerpo, la dieron algunas mutaciones homeóticas que ocurren espontáneamente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* permitiendo el descubrimiento de los genes homeóticos (García, 1977). Estos genes presentan una secuencia altamente conservada denominada homeobox que codifica para una polipéptido de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD) el cual representa el dominio de unión al DNA (Gehring, 1987).

Una de las preguntas fundamentales en Biología del Desarrollo es determinar el mecanismo mediante el cual homeoproteínas altamente similares adquieren distintas funciones durante el desarrollo mediante la activación y/o represión de genes blanco en espacio y tiempo definidos. Este proceso es controlado predominantemente mediante la regulación génica precisa en espacio y tiempo en donde la activación de una gran cantidad de genes y la represión de otros depende de los elementos regulatorios y de las interacciones con el complejo basal de transcripción.

La caracterización molecular de los genes cuya alteración de secuencia causa dramáticos fenotipos en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha permitido la identificación de los genes homeóticos, definidos como “genes maestros” debido al papel crucial que juegan en la embriogénesis (McGinnis y Krumlauf, 1992). Todos estos genes comparten una región conocida como homeobox cuya secuencia e 180 pb esta altamente conservada (McGinnis *et al.*, 1984; Scott y Weiner, 1984) y que codifica para un dominio de unión a DNA de 60 aminoácidos, conocido como homeodominio (Gehring *et al.*, 1994) confiriendo a la proteína resultante la habilidad de actuar como un factor de transcripción (Levine y Hoey, 1988).

Los genes homéoticos en *Drosophila* se encuentran organizados en dos complejos localizados en el tercer cromosoma separado por aproximadamente 8 millones de bases. La figura 1 muestra el Complejo Antennapedia (ANT-C) que contiene los genes *labial* (*lb*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*), mientras que en el Complejo Bithórax (BX-C) se encuentran *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Lemons y McGinnis, 2006).

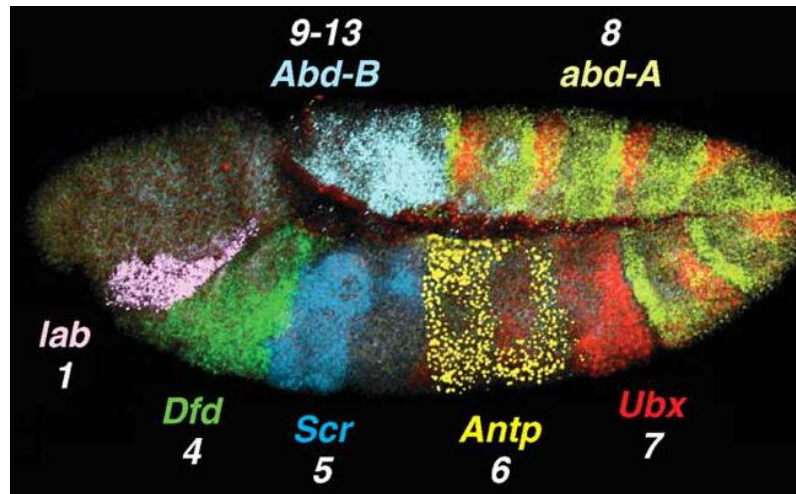


Figura 1. Distribución espacial de los genes homeóticos. Imagen confocal de una hibridación *in situ* en un embrión de *Drosophila melanogaster* estadio 11, que muestra la distribución espacial de la expresión de los diferentes transcritos de los genes homeóticos. Tomado de Lemons *et al.*, 2006

Los genes del complejo Antp especifican las características morfológicas de la epidermis en el desarrollo del sistema nervioso central desde el primer parasegmento hasta el 5 y desde el 4 al 13, mientras que los del complejo BX-C determinan la identidad morfológica de la epidermis y del sistema nervioso central del parasegmento 5 al 14. Los genes homeóticos usualmente están organizados de una forma colinear, de acuerdo a sus distintos dominios de expresión que en ocasiones se sobreponen (Figura 2). En embriones animales en los cuales se puede distinguir la cabeza y el abdomen posterior, los genes homeóticos anteriores tienen sus límites de expresión en células epidérmicas, neurales y mesodermales, mientras que los genes homeóticos posteriores tienen límites de expresión en los correspondientes tipos celulares del abdomen posterior (Castelli y Akam, 1995; Salser y Kenyon, 1996).

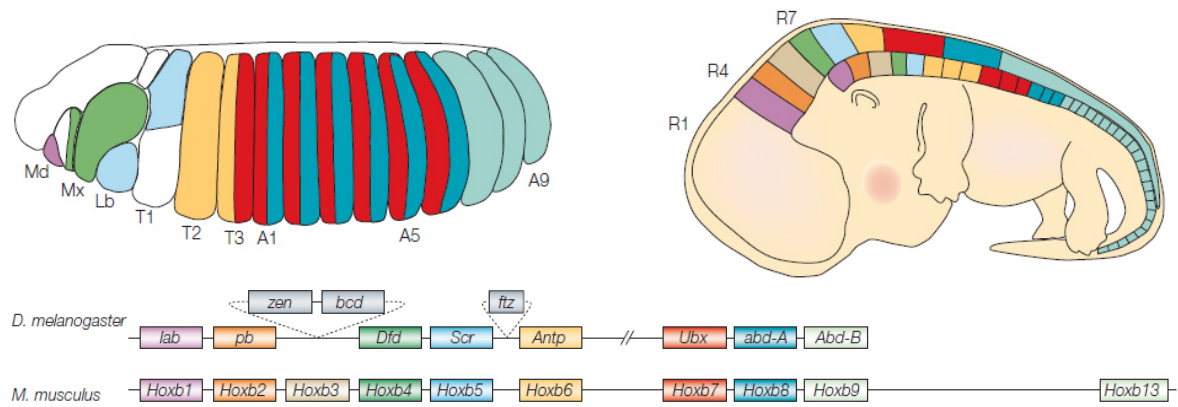


Figura 2. Colinearidad de los genes homeóticos. El diagrama muestra la expresión colinear de los genes homeóticos a lo largo de los ejes antero-posterior y cráneo caudales en *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* respectivamente. Modificado de McGinnis *et al.*, 2005

4.2 Antennapedia

El gen homeótico *Antennapedia* (*Antp*) de *Drosophila* codifica la proteína Antennapedia (ANTP) que consiste de tres regiones; una región (N-terminal) de 295 aa's, seguida de la porción llamada repetición CAX de 130 aa's rica en glutamina, el homeodominio de 60 y 23 aa's que conforman el extremo C-terminal (Figura 3). La proteína ANTP se expresa en el núcleo de células de la epidermis torácica del embrión y de células de varios segmentos del sistema nervioso ventral y periférico (Carrol *et al.*, 1986), actúa principalmente sobre los segmentos mesotorácicos, es decir, las regiones de los tres pares de patas y las regiones específicas del mesotórax dorsal.

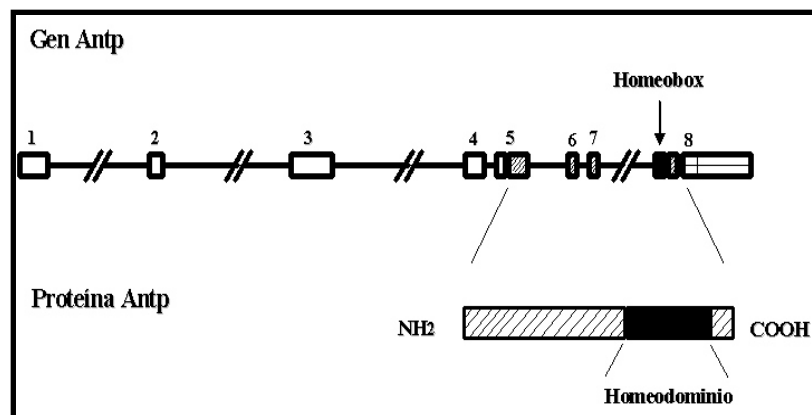


Figura 3. Estructura génica de Antennapedia. Diagrama esquemático que muestra la organización estructural del gen *Antp*, los exones del 1 al 8 están separados por siete intrones. El homeobox está localizado en el exón 8, por lo que el homeodominio se localiza cerca del extremo carboxilo terminal (COOH) de la proteína Antp. Tomado de Schneuwly *et al.* 1986.

La proteína Antp se requiere en todos los segmentos torácicos para suprimir por una parte el desarrollo de la cabeza y por otra promover el desarrollo de los apéndices torácicos (Struhl, 1981). Por lo tanto, en *D. melanogaster*, las antenas y las patas, que son estructuras homólogas, se forman diferencialmente como resultado de la ausencia o presencia de Antp respectivamente.

Antp promueve la identidad de la pata mediante la represión de los genes determinantes de la antena. En los discos de las patas, Antp previene el desarrollo de la antena reprimiendo directamente al gen *homothorax* (*hth*), esto es regresando la ruta del desarrollo al estado basal (Cásares y Mann, 1998). Análisis de la expresión de Antp en embriones mutantes revelan tres niveles de regulación de Antp: regulación por productos de los genes del complejo *bitorax*, loci homeóticos pleiotropicos, y por los productos del mismo Antp (Hafen *et al.*, 1983).

La función de la proteína Antp ha sido revelada por mutaciones de ganancia y pérdida de función hechas en el gen que la codifica (Schnewly y Gehring, 1985; Martinez-Arias, 1986). La falta de función de Antp resulta en letalidad embrionaria y muerte larvaria en desarrollo, así como en la transformación de los segmentos torácicos T2 y T3 en estructuras más anteriores con algunas características de T1 (primer segmento torácico) y de los segmentos de la cabeza. La proteína Antp también es requerida en la formación del intestino medio (Reuter y Scout, 1990) así como en el desarrollo apropiado del sistema nervioso periférico (Heuer y Kaufman, 1992). El producto de *Antp* posee un importante papel tanto promoviendo la vía torácica como previniendo el desarrollo de las estructuras de la cabeza y las antenas (Carroll *et al.*, 1986). Los mutantes homeóticos de ganancia de función muestran que Antp permite la transformación de antenas por patas debido a la expresión de la homeoproteína en un lugar donde normalmente no se expresa (Pattatucci y Kaufman, 1991).

4.2.1 Especificidad funcional del homeodominio

Los homeodominios analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución y Cristalografía de Rayos X muestran homologías estructurales, conteniendo

tres a cuatro α -hélices bien definidas dónde 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 que se une al surco mayor del DNA y el extremo N-terminal se une a bases específicas del surco menor del DNA (Figura 4; 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).

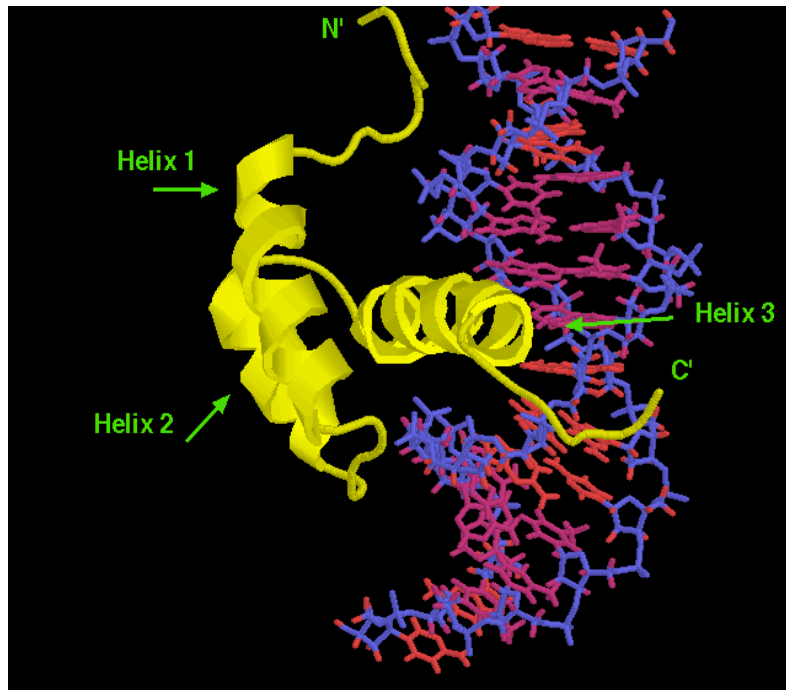


Figura 4. Interacción del homeodominio de Antp con el DNA. Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3 con el surco mayor del DNA y el extremo amino terminal del homeodominio con el surco menor. Tomado de Qian *et al.*, 1992.

El análisis de la estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear del homeodominio de Antp con una deleción del brazo N-terminal mostró que la estructura de este homedominio 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 Combs Reduced (Scr), modificaron la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubu-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 los mismos.

4.2.2 Tetrapéptido YPWM

Comparaciones en la secuencia de aminoácidos de las diferentes homeoproteínas mostraron que además del homeodominio, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina) es otra región peptídica altamente conservada. Este motivo se encuentra localizado río arriba de los genes homeóticos y se conecta al homeodominio mediante el brazo amino-terminal flexible (Figura 5). El número de aminoácidos que separan este tetrapéptido de la región N-terminal flexible es variable en las distintas homeoproteínas.

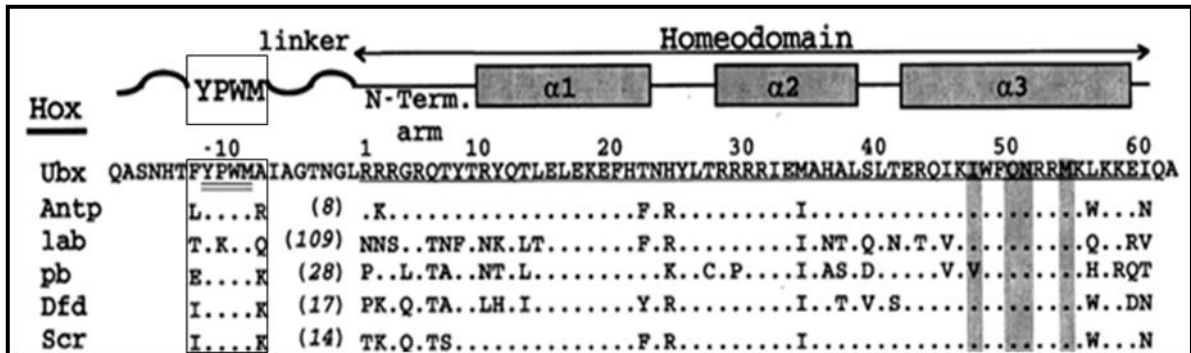


Figura 5. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en *Drosophila*. El homeodominio se muestra del 1 al 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aminoácidos entre YPWM y el homeodominio se muestra en los paréntesis. Tomado de Passner *et al.*, 1999.

El análisis mutacional mediante sustituciones de alanina en el tetrapéptido YPWM 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 a 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). La mutación en el motivo YPWM en *Antp* mostró un fenotipo larvario normal, y fenotipos 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).

La sobreexpresión ectópica de *Antp* en el adulto puede inducir la transformación de estructuras de la cabeza en apéndices del segundo segmento torácico, como por ejemplo antena en la segunda pata, cápsula de la cabeza en torax (notum) y ojo en ala. El dominio YPWM de *Antp* es absolutamente necesario para la transformación de ojo a ala, adicionalmente, mediante análisis de interacción proteica, se encontró una proteína que interactúa molecularmente con *Antp*; la proteína de interacción Bric-à-brac 2 (BIP2). Ésta mostró que interactúa específicamente con el motivo YPWM de *Antp* en ensayos realizados *in vitro*, así como *in vivo*, transformando tejido de ojo en tejido de ala. BIP2 es una proteína de unión a TATA (también conocido como dTAFII3), por lo que muestra la liga de *Antp* a la maquinaria basal de transcripción (Prince *et al.*, 2008).

4.2.3 Regulación génica

La expresión de los genes homeóticos esta regulada a su vez por la acción temprana de genes maternos y de segmentación que delimitan sus efectos 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 regulatorias cruzadas 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 expresión espacial correcta 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 Abdominal A 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).

4.2.4 Interacciones moleculares proteína-proteína

En un modelo descriptivo simple sobre la función de las homeoproteínas, cada una interactúa con secuencia específica reguladora a través de su dominio de unión a DNA para controlar la transcripción de genes blanco. Sin embargo, las homeoproteínas tienen como blanco diferentes genes en diferentes tejidos y pueden incluso activar un gen en un contexto y reprimir ese mismo gen en otro contexto (Bondos y Tan, 2001; Hughes y Kaufman, 2002; Grienberger *et al.*, 2003). Además la misma proteína homeótica puede utilizar diferentes aminoácidos para unirse a distintos sitios en el DNA (Remacle *et al.*, 2002). En consecuencia, la unión al DNA de una homeoproteína aislada no provee la especificidad necesaria para la regulación génica contexto-específica *in vivo*.

Estos datos sugieren un modelo más complejo en el cual ocurre la contribución de cofactores que contribuyen con la especificidad funcional de las homeoproteínas (Hayashi y Scott, 1990). De manera que algunas proteínas homeóticas, como Ultrabithorax, tienen baja especificidad de unión al DNA por sí mismas, pero incrementan su afinidad y especificidad cuando se unen con la homeoproteína

extradenticle en *Drosophila* o PBX (pre-B-cell leukemia transcription factor) en mamíferos, ya que la interacción vía el motivo YPWM altera la selección de sitios de unión en el DNA, y en casos específicos, puede cambiar el modo de transcripción (Mann y Morata, 2000; Pinsonneault *et al.*, 1997).

El gen *extradenticle* (*exd*) contribuye en la especificidad de la función homeótica; mutaciones en *exd* alteran la identidad de algunos segmentos corporales sin alterar el patrón de expresión de los genes homeóticos (Rauskolb *et al.*, 1993). La proteína Exd contienen un homeodominio y actúa como cofactor de las proteínas homeóticas; experimentos realizados *in vitro* han mostrado que Exd puede unirse al DNA cooperativamente con las homeoproteínas Ultrabithorax y Abdominal-A (Chan *et al.*, 1994) y con Antennapedia en una interacción dependiente del motivo YPWM (Papadopoulos *et al.*, 2011) incrementando su afinidad por algunos sitios blanco.

4.3 Factores Generales de Transcripción

La transcripción de genes codificantes de proteínas en eucariotas es un proceso complejo que requiere a la RNA polimerasa II (Pol II) y seis factores generales de transcripción (GTFs) denominados TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). Son proteínas muy conservadas evolutivamente, promueven la formación alrededor del punto de inicio del complejo de pre-iniciación que incluye el promotor basal, los GTFs y la RNAPol-II (Buratowski, 1994; Zawel y Reinberg, 1993). La unión al promotor de TFIID, TFIIA, y TFIIB constituye el primer paso en proceso de ensamblaje y es seguido del reclutamiento de TFIIF y Pol II, mientras que TFIIE y TFIIH entran en el complejo de iniciación al final.

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 y 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 6; Murakami *et al.*, 2013). 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 está 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).

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).

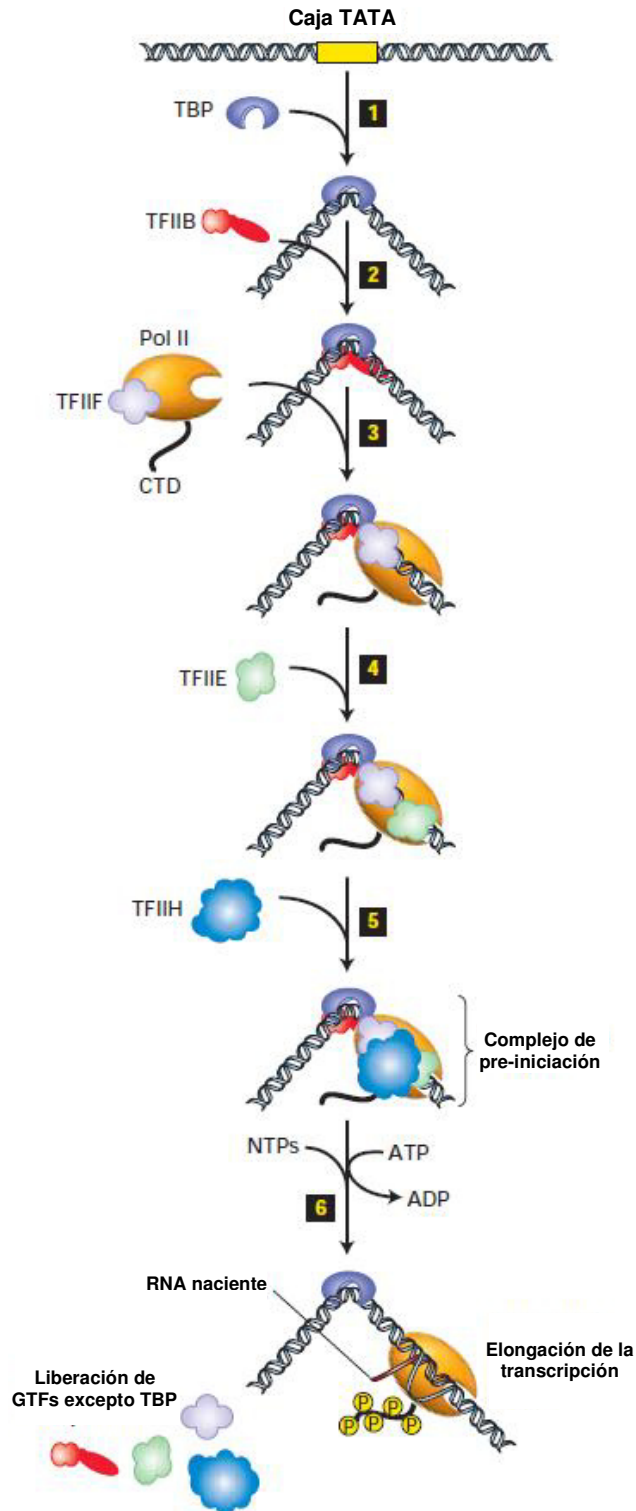


Figura 6. Ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la RNA polimerasa II. Los factores generales de transcripción y la RNA Pol II se unen de manera secuencial a la caja TATA en el DNA para formar el complejo de pre-iniciación. La hidrólisis del ATP provee la energía para desenrollar el DNA en el sitio de inicio por TFIIH. A medida que la Pol II inicia la transcripción se va alejando del promotor y el dominio carboxi-terminal (CTD) se fosforila. Tomado de Lodish *et al.*, 2004.

4.3.1 BIP2

BIP2 fue inicialmente identificada como una proteína de interacción Bric-a-brac 2 (BIP2) codificante de un factor proteico asociado a caja TATA (FAT) (Albright y Tijan, 2000), también referida como dTAFII3 o TAFII155 (Gangloff *et al.*, 2001). BIP2 es miembro del complejo TFIID para el inicio de la transcripción en *Drosophila*. El transcrito y la proteína de BIP2 son expresados ubicuamente en todos los discos imaginales en larvas de estadio tres (Gangloff *et al.*, 2001). Mediante experimentos de ganancia y pérdida de función, se demostró que BIP2 interactúa con ANTP a través del motivo YPWM, actuando como un co-factor promoviendo el desarrollo ectópico dorsal de alas (Prince *et al.*, 2008).

4.3.2 TBP

Se ha demostrado mediante ensayos de BiFC en cultivo celular que el factor general de transcripción TBP (TATA Binding protein) interactúa con Antp a través de la región amino terminal de ésta homeoproteína (Cárdenas-Chávez 2012). TBP forma parte del complejo TFIID confiriendo la capacidad de reconocimiento del promotor al unirse al surco menor del DNA provocando la flexión de la molécula de DNA (Kim *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993b) Estas evidencias indican que varias homeoproteínas interactúan con diferentes factores generales de transcripción, observación que tiene importantes implicaciones en la regulación transcripcional.

4.3.3 TFIIE

Antp también interactúa con la subunidad β de TFIIE, encontrándose que los homeodominios de Antennapedia y Abdominal-B (Abd-B) se unen a este factor transcripcional *in vitro* en ensayos pull-down y que Abd-B activa la transcripción en cultivo celular (Zhu y Kuziora, 1996). En un ensayo de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) en embriones de *Drosophila* encontraron que la homeoproteína Abdominal-A interactúa con TFIIE- β (Hudry *et al.*, 2011).

TFIIE es un heterotetrámero que contiene dos de cada una de las subunidades, TFIIE- α y TFIIE- β , con masas moleculares de 57 y 34 kDa respectivamente (Ohkuma *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). La subunidad β de TFIIE se une a la región núcleo del promotor en -14 y -2 río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+) (Robert *et al.*, 1996). TFIIE juega un papel crucial en el reclutamiento de TFIIH (Flores *et al.*, 1992) y en la regulación de las actividades de TFIIH al promover la fosforilación del dominio carboxy-terminal (CTD) de la RNA Pol II, también inhibe la actividad helicasa de TFIIH que es necesaria para el desenrollamiento del DNA previo a la iniciación de la transcripción. Ya que la fosforilación de la RNA Pol II es la forma de la enzima que elonga activamente los transcritos (O'Brien *et al.*, 1994), la habilidad del homeodominio para atraer a TFIIE al complejo de iniciación serviría para estimular la transcripción para incrementar la actividad kinasa de TFIIH, resultando en una completa fosforilación del dominio carboxi-terminal de la RNA Pol II, de esta manera, el homeodominio, contribuye en la regulación transcripcional a través de la interacción con TFIIE- β .

Las estructuras tridimensionales de varios complejos homeodominio-DNA revelan que los homeodominios a pesar que divergen en sus secuencias primarias están acomodados en una estructura globular muy similar (Kissinger *et al.*, 1990) en la que la especificidad de unión HD-DNA reside en la hélice de reconocimiento, como se muestra en la Figura 7. En contraste los aminoácidos que determinan la especificidad de las interacciones proteína-proteína podrían estar expuestos probablemente posicionados en el lado opuesto del homeodominio que tienen contacto con el DNA, es decir las hélices I y II. En el caso de la hélice I se ha demostrado que Antp presenta interacción molecular a través del residuo 17 con otras homeoproteínas como Eyeless (Plaza *et al.*, 2008).

Interesantemente, ensayos de BiFC realizados en nuestro laboratorio mostraron interacción entre Antp y TFIIE- β , adicionalmente la disección molecular del HD de Antp en los que se deletó la hélice I (Antp Δ H1) y las hélices I y II (Antp Δ H1-2) mediante ensayos de BiFC y transactivación mostraron que la mutante Antp Δ H1 fue capaz de interactuar con TFIIE- β , no así la mutante Antp Δ H1-2 por lo que éstos

resultados sugieren que la hélice II está directamente implicada en la interacción molecular del HD de Antp con TFIIE-β (Cárdenas-Chavez 2012).

Como los residuos en las, posiciones 32 y 36 están localizados en la probable superficie expuesta de la hélice II (Figura 7) podrían estar implicados en las interacciones proteicas del homedominio ya que son idénticas o similares en los homeodominios de Antp y otras homeoproteínas (Zhu y Kuziora, 1996).

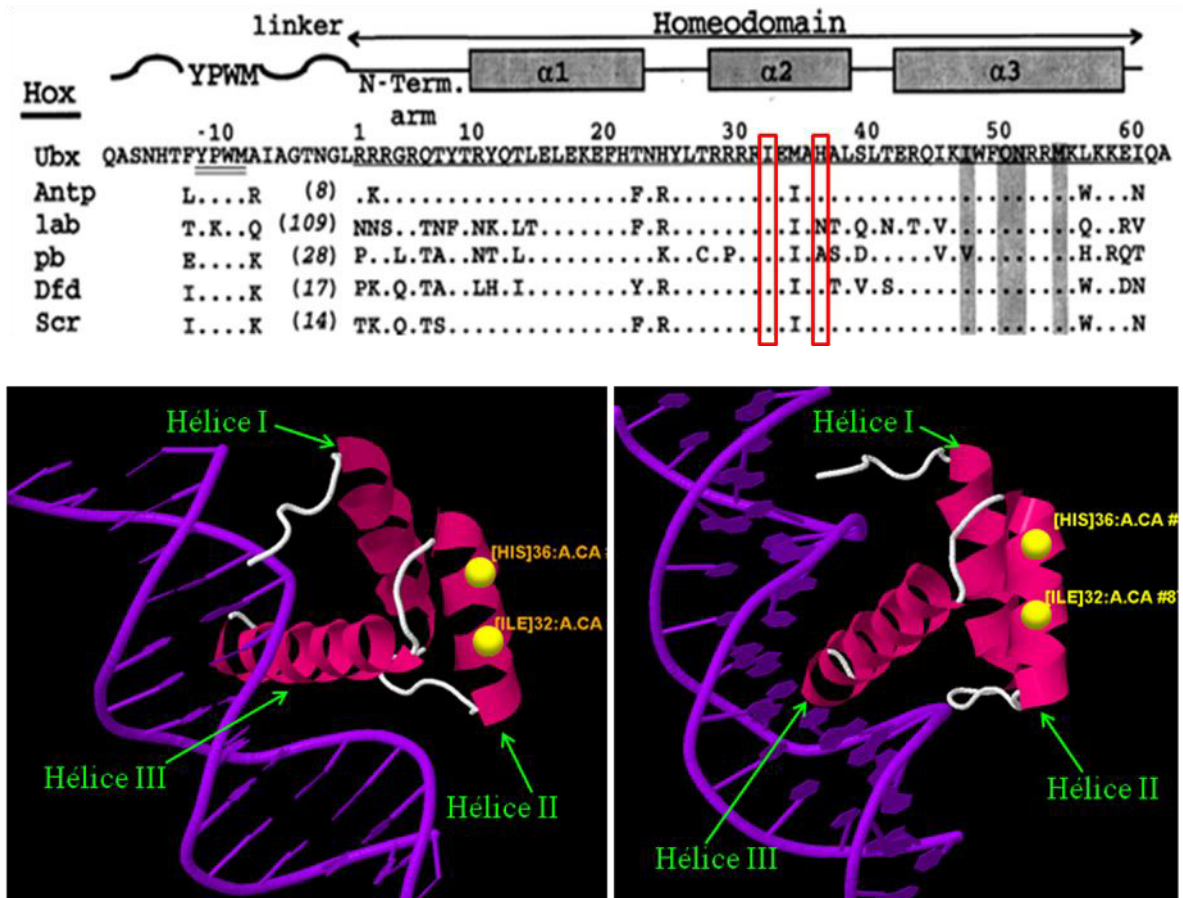


Figura 7. Posición de los residuos 32 y 36 en la hélice II del HD. El esquema superior muestra las secuencias aminoacídicas de los homeodominios de ANTP y otras homeoproteínas, los recuadros en rojo señalan las posiciones 32 (Iso) y 36 (His) de la hélice II que podrían estar implicadas en la unión proteína-proteína ANTP-TFIIE-β. El esquema inferior muestra un modelo tridimensional del homeodominio y la unión al DNA mediante la hélice III, se muestran además las posiciones de los residuos 32 y 36 de la hélice II expuestas de manera contraria a la superficie en contacto con el DNA.

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo de tesis es determinar si los residuos aminoacídicos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp están involucrados en la interacción molecular proteína-proteína Antp-TFIIEβ.

5. HIPÓTESIS

Debido a que los residuos aminoacídicos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio de Antp están expuestos de manera contraria a la superficie de contacto con el DNA podrían estar implicados en las interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con el factor general de transcripción TFIIE- β .

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar si los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II de Antp están involucrados en la interacción molecular con TFIIE- β y analizar el efecto de estas interacciones en la actividad transcripcional de Antp.

6.2 Objetivos Particulares

1. Analizar la interacción molecular proteína-proteína con las mutantes puntuales de los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio de Antp y TFIIE- β mediante BiFC.
2. Determinar la interacción molecular proteína-proteína con mutantes dobles de los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio de Antp y TFIIE- β mediante BiFC.
3. Evaluar la actividad transcripcional de los mutantes puntuales de los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio de Antp en presencia y ausencia de TFIIE- β .

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIE- β en ensayos de BiFC

7.1.1 Plásmidos pCS2VC155-Antp mutagenizados

La construcción de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R, H36A, I32L-H36R y I32A-H36A fue llevada a cabo mediante mutagénesis sitio-dirigida en el plásmido pCS2-VC155Antp utilizando el kit QuikChange®XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, La Jolla, CA USA) y los correspondientes oligonucleótidos sintéticos (Tabla I).

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio-dirigida

Mutación en el HD de Antp	Oligonucleótidos
I32L	5'AntpIso y IsoR
I32A	I32A/F y I32A/R
H36R	5'AntpArg y ArgR
H36A	H36A/F y H36A/R
I32L-H36R	IR/F y IR/R
I32A-H36A	AA/F y AA/R

Las reacciones de síntesis para cada una de las mutaciones consistieron en 5 μ l de buffer de reacción 10X, de 5 a 50 ng del plásmido pCS2-VC155Antp, 125 ng de cada oligonucleótido correspondiente, 1 μ l de mix de dNTP's, agua miliQ a un volumen final de 50 μ l y finalmente 1 μ l de la DNA polimerasa *PfuTurbo* (2.5 U/ μ l). Todos los reactivos para dichas reacciones están incluidos en el kit, excepto el DNA plasmídico templado el cual fue extraído mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI USA). El programa de ciclos térmicos consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C por 30 seg y 18 ciclos

con desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C por 1 min y una extensión a 68°C por 8 min.

La transformación de las reacciones de mutagénesis se llevó a cabo en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes (Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μ g de DNA) resultando en la obtención de colonias que fueron inoculadas en 3 ml de medio LB para la posterior extracción de DNA plasmídico mediante Minipreparación. La caracterización de los plásmidos recombinantes se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas BamHI y Xho. Posteriormente, se confirmó la mutagénesis de los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp mediante secuenciación a través del Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.1.2 Transformación de *E. coli* DH5 α Ca $^{++}$ competentes

La reacción de transformación se inició agregando en un tubo de 1.5 ml (previamente enfriado en hielo), 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α Ca $^{++}$ con el DNA requerido (50 μ g de DNA por transformación aproximadamente). Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, transcurrido ese tiempo se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 200 μ l de medio LB a cada tubo y se incubaron con agitación constante 180 rpm durante 30 minutos para permitir el restablecimiento de las células. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 segundos a 14,000 rpm, se eliminaron 200 μ l del sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en el volumen restante por pipeteo y se sembraron en una placa de agar LB con ampicilina y se incubaron por 18 horas a 37°C. Las colonias obtenidas se inocularon en 3 ml de medio LB y antibiótico de selección a 37°C en agitación constante a 180 rpm durante 24 horas para la posterior extracción de DNA plasmídico para su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa y digestión con enzimas de restricción diagnósticas.

7.1.3 Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina a pequeña escala (Minipreparación)

Se transfirieron 1.5 ml de cada cultivo a tubos de 1.5 ml, se centrifugaron por 2 minutos a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 150 µl de solución de lisis alcalina I (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8) por agitación con vórtex, se incubó en hielo durante 5 minutos para posteriormente agregar 150 µl de solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se agregaron 150 µl de solución de lisis alcalina III (KOH 5 M, CH₃COOH 11.5%), se mezcló nuevamente por inversión y se incubó a -20°C durante 5 minutos, al término de la incubación se centrifugaron durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) a un tubo de 1.5 ml nuevo. A cada sobrenadante se le agregaron 500 µl de isopropanol 100% y se mezcló por inversión, posteriormente se incubaron a -20°C durante 10 minutos, al término fueron centrifugados durante 10 minutos a 14,000 rpm para obtener la pastilla de DNA plasmídico, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm, se secó la pastilla por evaporación y finalmente se resuspendió la pastilla de DNA en 20 µl de agua mili-Q con RNasa's (10mg/ml). El DNA extraído fue verificado por electroforesis en gel de agarosa.

7.2 Análisis de interacción mediante ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC)

7.2.1 Preparación de cubreobjetos con polyL-lisina

La visualización de las células HEK293 mediante microscopia de fluorescencia requirió el cultivo de las células sobre cubreobjetos de 22 mm de diámetro estériles en placas de 6 pozos. La preparación de los cubreobjetos con poly-L-lisina (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) se realizó colocando una gota de poly-L-lisina al 0.01% en un portaobjetos estéril y después se colocó un cubreobjetos sobre cada gota. Los cubreobjetos-portaobjeto fueron sometidos a luz ultravioleta durante 20 minutos para su esterilización, al cabo de este tiempo se retiraron los cubreobjetos utilizando pinzas

estériles y se colocaron en cada pozo de la placa de cultivo. Finalmente, se sembraron las células HEK293 a la densidad deseada.

7.2.2 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 de la casa comercial. El análisis de la calidad y concentración de los diferentes DNAs plasmídicos se llevo a cabo mediante medición de absorbancia con luz ultravioleta y visualización en electroforesis de agarosa al 0.8%. Los DNAs plasmídicos obtenidos presentaron una relación absorbancia 260/280 \geq 1.8 y una concentración mayor de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para los ensayos de interacción BiFC.

7.2.3 Ensayos de co-transfección en células HEK293

Los ensayos BiFC se realizaron en células embrionarias HEK293 de epitelio renal humano 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 atmósfera de 95% de humedad, 5% CO₂ y 37 °C de temperatura. Las co-transfecciones celulares consistieron en utilizar los plásmidos recombinantes de las proteínas Antp ó mutantes (AntpI32L, I32A, H36R, H36A, I32L-H36R y I32A-H36A) fusionadas al fragmento VC155 y el factor transcripcional fusionado al fragmento VNm9 de la proteína fluorescente Venus. El plásmido control pECFPN-1 que codifica la proteína fluorescente cian fue incluido en cada ensayo de transfección como control positivo de la transfección.

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. La solución de

DNA se preparó diluyendo 6 µg de DNA plasmídico en NaCl 150mM en un volumen final de 100µl por pozo, después se le agregó la solución de PEI (0.4 µl PEI (15mM en 99.6 µl 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% CO₂ durante 24-48 hrs para su visualización mediante microscopia de fluorescencia.

7.2.4 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 invertido de fluorescencia Olympus IX-70 con un objetivo de 20 aumentos (20X) utilizando un filtro de excitación 500 ± 10 nm y un filtro de emisión 535 ± 15 nm para la detección de la fluorescencia de Venus así como un filtro de excitación 436 ± 10 nm y emisión 470 ± 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 (fluorescencia color amarillo).

7.3 Construcciones plasmídicas para los Ensayos de Transactivación

7.3.1 Plásmido pNPAC-AntpI32L

La construcción del plásmido recombinante pNPAC-AntpI32L se realizó mediante mutagénesis sitio-dirigida en el plásmido pNPAC-Antp utilizando el kit QuikChange®XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, La Jolla, CA USA) y los oligonucleótidos sintéticos 5'AntpIso y IsoR. La reacción de síntesis consistió en 5 µl de buffer de reacción 10X, de 5 a 50 ng del plásmido pNPAC-Antp, 125 ng de cada oligonucleótido, 1 µl de mix de dNTP's, agua miliQ a un volumen final de 50 µl y

finalmente 1 μ l de la DNA polimerasa *PfuTurbo* (2.5 U/ μ l). El DNA plasmídico templado fue extraído mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI USA). El programa de ciclos térmicos consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C por 30 seg y 25 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C por 1 min y una extensión a 68°C por 8 min.

La transformación de la reacción de mutagénesis se llevó a cabo en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes (Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μ g de DNA), las colonias obtenidas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB para la posterior extracción de DNA plasmídico mediante Minipreparación. La caracterización de los plásmidos recombinantes se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas ClaI y XhoI. La mutagénesis fue confirmada mediante secuenciación a través del Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.3.2 Plásmidos pNPAC-AntpI32A, H364 y H36A

Las secuencias codificantes de las proteínas AntpI32A, H36R y H36A fueron obtenidas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos sintéticos AntpNot5 y AntpNot3. Los plásmidos pCS2-VC155Antp mutantes se emplearon como DNA templado en las diferentes reacciones de PCR. La amplificación generó los fragmentos de 1100 pb que fueron clonados en el vector pTOPO para la obtención mediante Minipreparación de los plásmidos pTOPO-AntpI32A, H36R y H36A de acuerdo al protocolo de clonación de la casa comercial Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA USA).

La linearización del vector pNPAC-Antp (6357 pb) y la preparación de los insertos AntpI32A, H36R y H36A se llevó a cabo mediante la digestión de los plásmidos pTOPO-AntpI32A, H36R y H36A con la enzima de restricción NotI para su posterior purificación con el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison WI USA). La ligación del vector pNPAC-insertos (relación molecular 1:10) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes

(Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μg de DNA) para la obtención mediante Minipreparación de los plásmidos recombinantes pNPAC-AntpI32A, H36R y H36A. La caracterización de estos plásmidos recombinantes se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas XbaI, BamHI y PstI.

7.4 Análisis de la interacción molecular mediante Ensayos de Transactivación

7.4.1 Obtención y purificación de plásmidos productores y reporteros

La obtención de los plásmidos productores 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 eluído 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 H₂O 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 ≥ 1.8 y una concentración mayor de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para los ensayos de transactivación.

7.4.2 Ensayos de transfección en células HEK293

Los ensayos de transactivación se realizaron en células embrionarias HEK293 de epitelio renal humano 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 atmósfera de 95% de humedad, 5% CO₂ y 37 °C de temperatura. Las co-transfecciones celulares consistieron en utilizar los plásmidos recombinantes pNPAC productores de las proteínas Antp ó mutantes (AntpI32L, I32A, H36R, H36A, I32L-

H36R y I32A-H36A) y el factor transcripcional TFIIE- β , el plásmido reportero pGLH11 y el plásmido control pcopia β gal.

Las células HEK293 fueron sembradas 24 hrs antes del ensayo de transfección a una densidad de 4×10^4 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA). Las transfecciones celulares fueron realizadas con el compuesto PEI de 25 kDa (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL USA). La solución de DNA se preparó diluyendo 2 μ g de DNA plasmídico en NaCl 150mM en un volumen final de 50 μ l por pozo, después se le agregó la solución de PEI (0.4 μ l PEI 15mM en 44.6 μ 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% CO₂ durante 48 hrs, pasado ese tiempo se procedió a la obtención de extractos celulares para los análisis correspondientes.

7.4.3 Preparación de extractos celulares totales

La preparación de extractos celulares consistió en remover el medio de cultivo de cada y agregar 100 μ l de Buffer de Lisis Pasiva 1X (Promega, Madison, WI USA). La reacción de lisis celular fue incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. El contenido de cada pozo se transfirió a tubos individuales de 1.5 ml debidamente etiquetados y se centrifugaron por 5 minutos a 14,000 rpm para obtener los sobrenadantes en los cuales se encuentran las proteínas de interés, estos fueron transferidos a tubos nuevos, etiquetados para su uso o inmediatamente almacenados a – 70 °C para evitar la inactivación de las proteínas.

7.4.4 Cuantificación de la expresión de los genes reporteros

La actividad del gen reportero β -galactosidasa (β -gal) fue detectada mediante una reacción enzimática llevada a cabo en tubos de 1.5 ml a un volumen final de 300 μ l, con 211 μ l de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.3), 3 μ l de buffer de magnesio (MgCl₂ 0.1 M, β -mercaptoetanol 5M), 66 μ l de CPRG (clorofenol rojo β -D-galactopiranosido) de

Roche (Penzberg, Alemania) y 20 µl de extracto celular. La reacción fue incubada por 2 horas a 37°C, al término de este tiempo es detenida al agregar 500µl de NaOAC 1M. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la reacción a 574 nm. La bioluminiscencia fue determinada siguiendo las instrucciones descritas en el kit Dual-Luciferase®Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA). Para la medición de luminiscencia se empleó la función de luminiscencia del lector de placas Synergy™ HT (BioTek® Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). Se transfirieron 20 µl de extracto celular a cada pozo de una placa de 96 pozos, el equipo de manera automatizada agregó 50 µl del sustrato del kit a cada pozo para la medición de luminiscencia. La reacción enzimática fue descrita como porcentaje de Unidades Relativas de Luz (%RLU).

8. RESULTADOS

8.1 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIE- β en ensayos de BiFC

El plásmido pCS2-VC155Antp previamente construido por Cárdenas-Chavez 2012 fue utilizado para realizar la mutagénesis sitio-dirigida de los residuos I32 y H36 del HD de Antp para analizar la interacción molecular de éstas mutantes con el factor transcripcional TFIIE- β . La generación de los plásmidos mutagénicos se describe a continuación:

8.1.1 Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A mediante mutagénesis sitio dirigida

Para la obtención de los plásmidos mutagénicos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A se realizó la mutagénesis sitio-dirigida de los residuos I32 y H36 de la hélice II del HD en el vector pCS2-VC155Antp como se muestra en la Figura 8A usando el kit comercial y los oligonucleótidos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

El DNA plasmídico de pCS2-VC155Antp y las cuatro clonas mutagénicas fueron caracterizadas mediante digestión con la enzima de restricción BamHI generando dos fragmentos de 4148 y 1356 pb como se muestra en la Figura 8B (carriles 1-5). La sustitución I32L generó un sitio de restricción para la enzima XhoI (Figura 9A) que no está presente en el plásmido pCS2-VC155Antp. Por lo que la digestión de las clonas con la sustitución I32L con la enzima XhoI linearizó el plásmido como se muestra en la Figura 1C (carriles 1 y 2) mientras que el plásmido pCS2-VC155Antp no fue digerido como se esperaba (carril P).

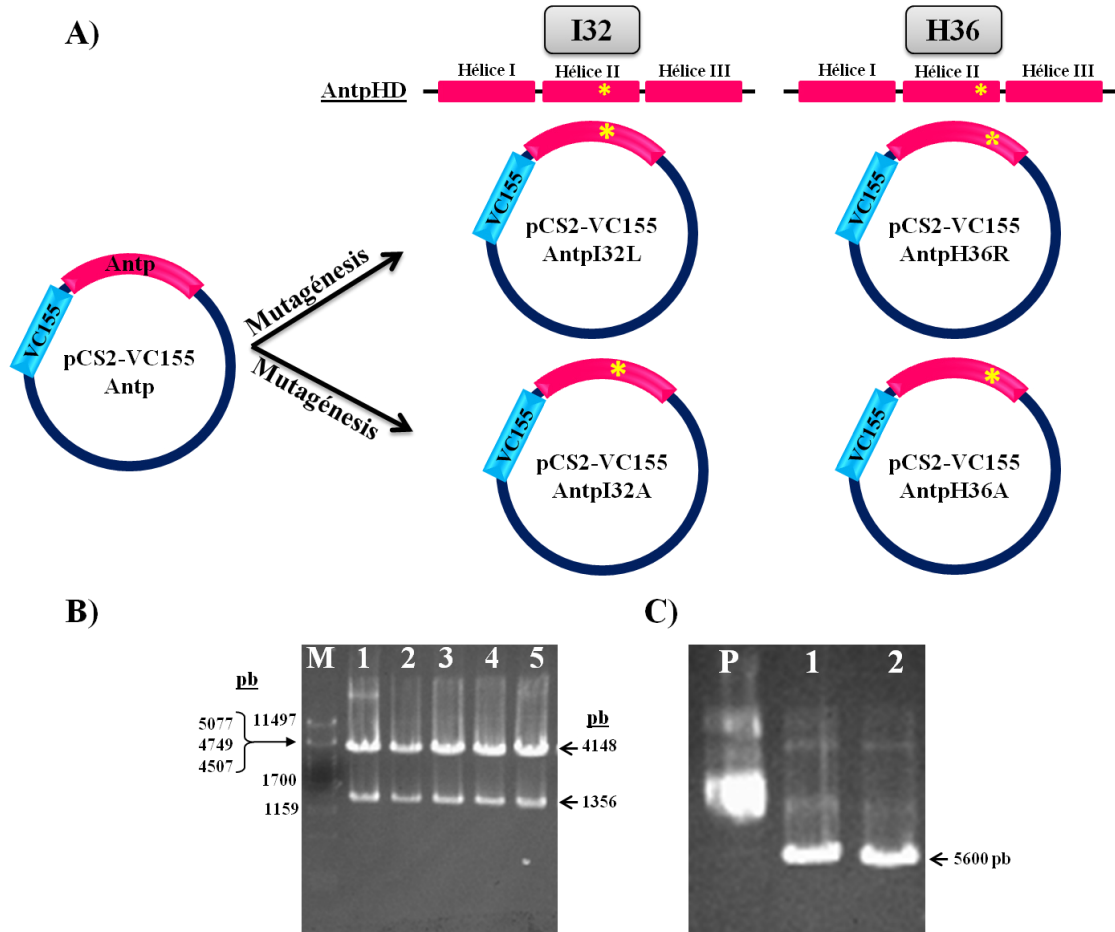


Figura 8. Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A mediante mutagénesis dirigida. **A)** El esquema representa la mutagénesis sitio-dirigida en el vector pCS2-VC155Antp de los residuos I32 y H36 para obtener las sustituciones I32L, I32A, H36R y H36A en la hélice II del HD de Antennapedia. **B)** La digestión de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A con BamHI que muestra el patrón de restricción del plásmido pCS2-VC155Antp (carril 1) y los plásmidos mutagénicos pCS2-VC155AntpI32L (carril 2), pCS2-VC155AntpI32A (carril 3), pCS2-VC155AntpH36R (carril 4) y pCS2-VC155AntpH36A (carril 5) con la liberación de los fragmentos de 4148 y 1356 pb. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI. **C)** La digestión con la enzima de restricción XhoI muestra la linealización del plásmido pCS2-VC155AntpI32L (carriles 1 y 2) cuyo sitio fue generado con la sustitución I32L, el carril P representa al plásmido pCS2-VC155Antp que no contiene el sitio para XhoI.

La Figura 9A ilustra la confirmación de las sustituciones I32L, I32A, H36R y H36A mediante secuenciación en los plásmidos mutagenizados, así mismo se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del HD de Antp y la ubicación específica de los residuos I32 y H36 mutagenizados en la hélice II (Figura 9B).

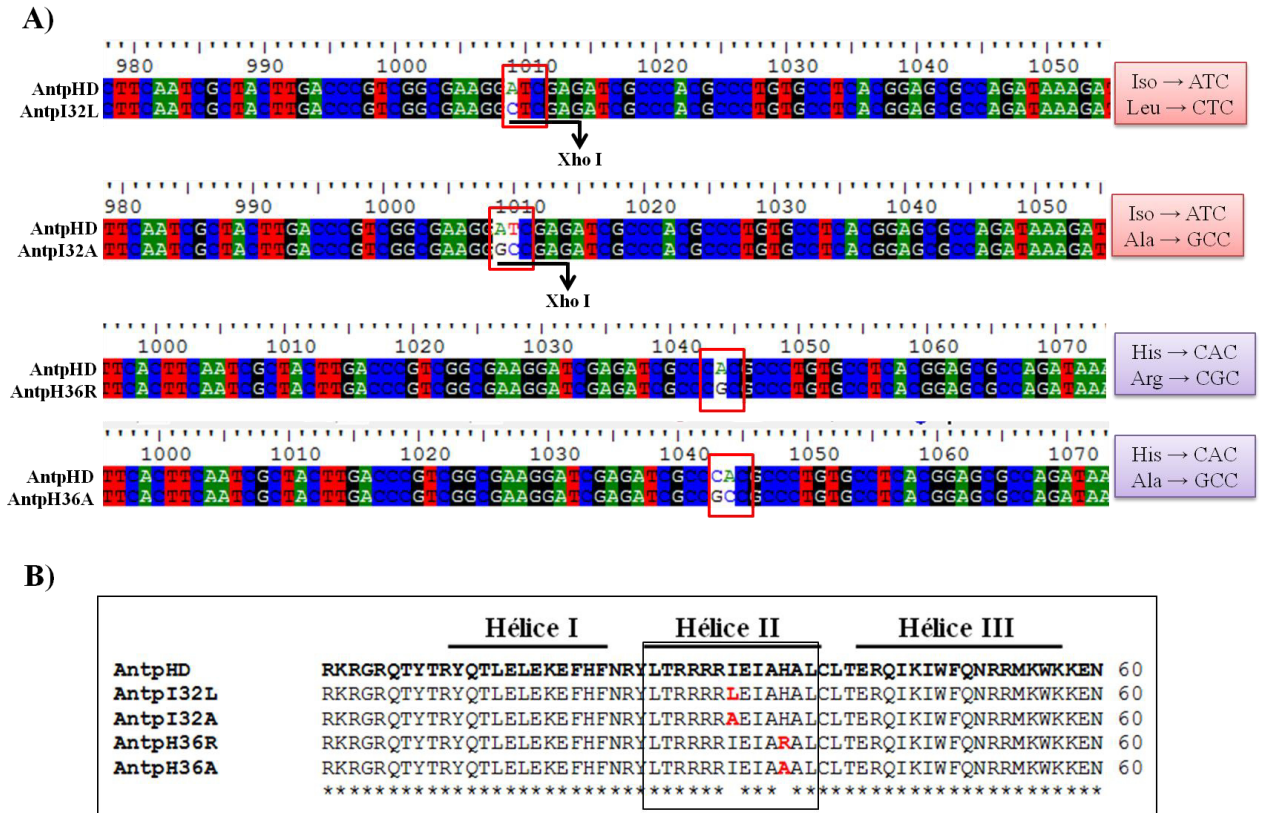


Figura 9. Confirmación de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L, I32A, H36R y H36A. A). C) El esquema muestra la confirmación mediante secuenciación de los cambios nucleotídicos en los codones indicados en los recuadros en rojo después de la mutagénesis sitio-dirigida. Los recuadros a la derecha muestran los codones correspondientes a los aminoácidos originales en la parte superior y en la inferior el aminoácido mutagenizado en cada uno. Se señala la generación del sitio de restricción para la enzima XhoI en la sustitución I32L. B) El alineamiento de las secuencias aminoacídicas del HD de Antp muestra los aminoácidos sustituidos mediante mutagénesis en los residuos 32 y 36 de la hélice II.

8.1.2 Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L-H36R y I32A-H36A mediante mutagénesis sitio dirigida

Para la obtención de los plásmidos mutagénicos pCS2-VC155AntpI32L-H36R y I32A-H36A se realizó la mutagénesis doble de los residuos I32 y H36 de la hélice II del HD en el vector pCS2-VC155Antp (Fig. 10A) con los oligonucleótidos y el kit comercial descrito en la sección de Materiales y Métodos.

El DNA plasmídico de pCS2-VC155Antp de dos clonas mutagénicas obtenidas fueron caracterizados mediante digestión con la enzima de restricción BamHI (Figura 10B) que generó dos fragmentos de 4148 y 1356 pb (carriles 1, 2 y 3). La clona con la

sustitución I32L-H36R también fue digerida con la enzima de restricción XhoI que la lineariza tal como se muestra en la Figura 10C (carril 1) mientras que la digestión del plásmido pCS2-VC155Antp no fue linearizada por esta enzima diagnóstica (carril 2).

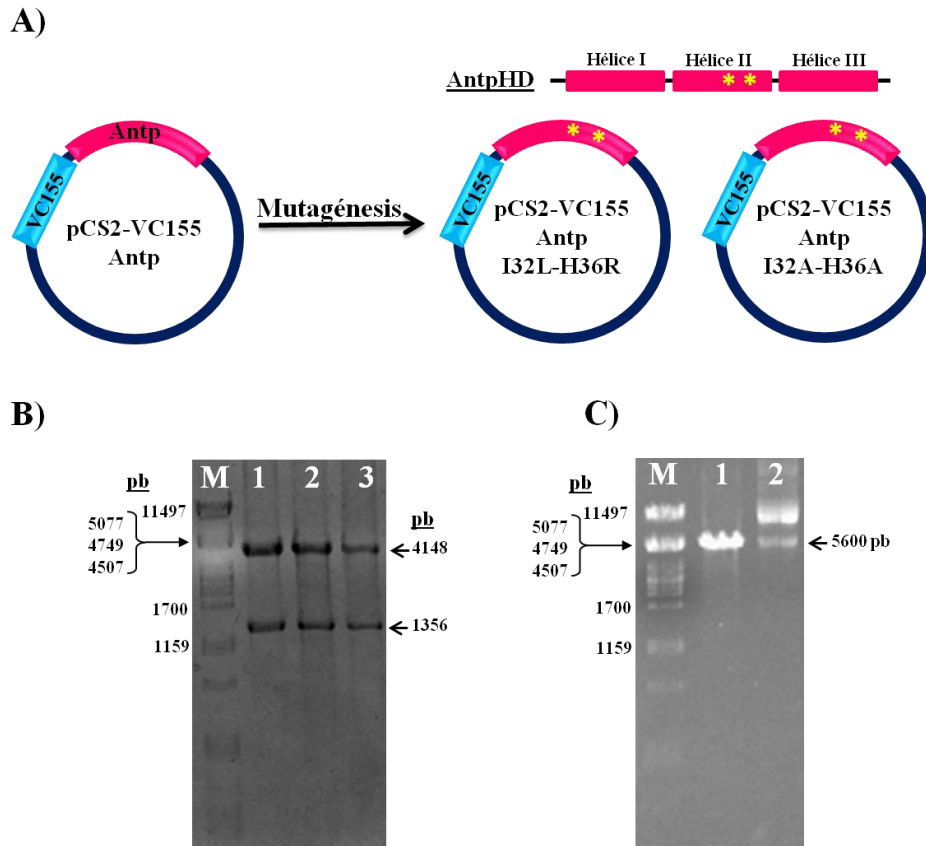


Figura 10. Construcción de los plásmidos pCS2-VC155AntpI32L-H36R y I32A-H36A mediante mutagénesis doble de las posiciones 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp. **A)** El esquema representa la mutagénesis sitio-dirigida en el vector pCS2-VC155Antp de los residuos I32 y H36 de manera simultánea para obtener las sustituciones I32L-H36R y I32A-H36A. **B)** La electroforesis en gel de agarosa al 0.8% muestra el patrón de restricción del plásmido recombinante pCS2-VC155Antp (carril 1) y los plásmidos mutagénicos pCS2-VC155AntpI32L-H36R (carril 2) y pCS2-VC155AntpI32A-H36A (carril 3) con la enzima de restricción BamHI. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI. **C)** Se muestra la linearización del plásmido pCS2-VC155AntpI32L-H36R (carril 1) con la enzima de restricción XhoI cuyo sitio fue generado con la sustitución I32L. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI y el carril 2 al plásmido pCS2-VC155Antp que no presenta el sitio de restricción para XhoI.

Las mutantes dobles I32L-H36R y I32A-H36A en la hélice II de Antp fueron confirmadas mediante secuenciación de los plásmidos mutagenizados como se muestra en la Figura 11A con las sustituciones nucleotídicas de los codones especificados en los recuadros verdes. Así mismo, en la Figura 11B se muestra el alineamiento de las

secuencias aminoacídicas del HD de Antp y la ubicación específicas de las sustituciones I32L-H36R y I32A-H36A en la hélice II.

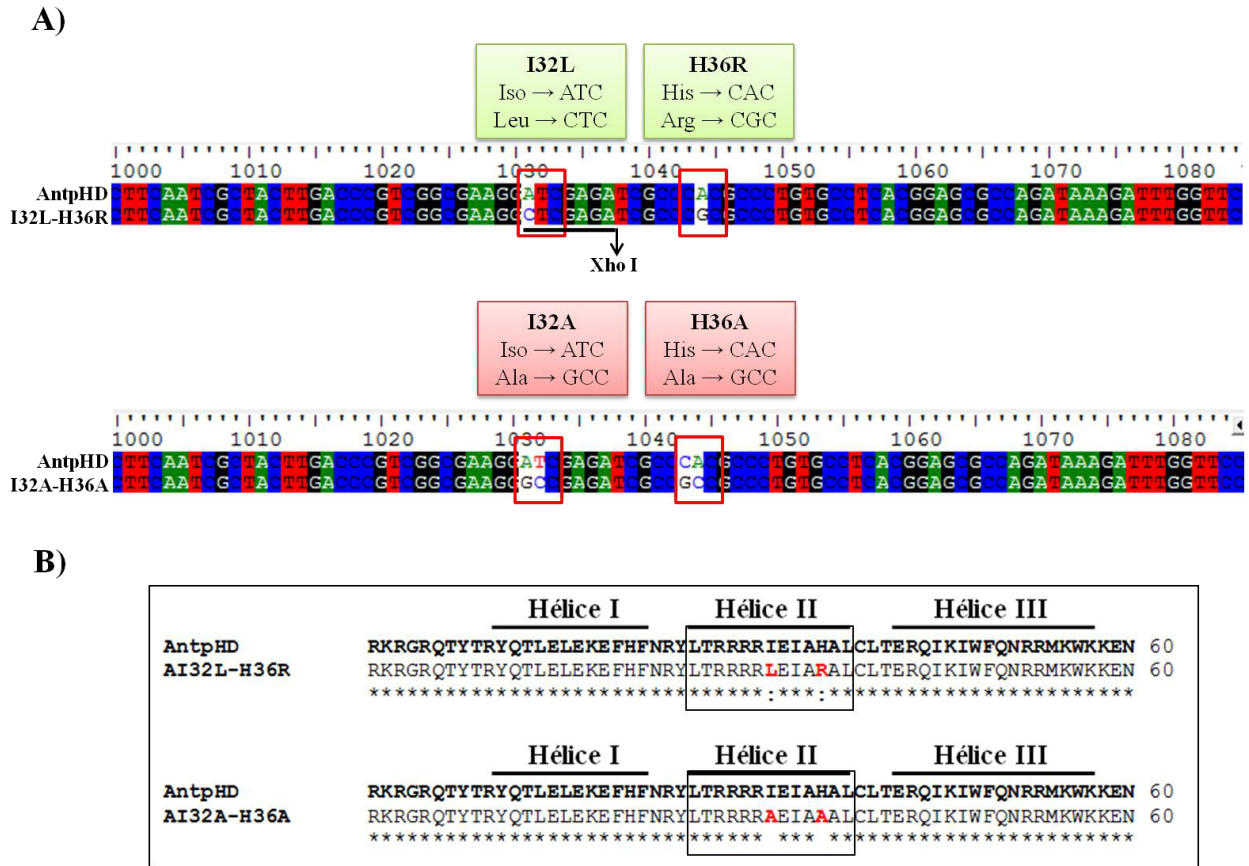


Figura 11. Confirmación de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155AntpI32L-H36R y pCS2-VC155AntpI32A-H36A mediante secuenciación. A) El esquema muestra la confirmación mediante secuenciación de los cambios nucleotídicos (recuadros en rojo) luego de la mutagénesis sitio-dirigida simultanea de las sustituciones I32A-H36A y I32L-H36R. Se señala con una flecha la generación del sitio de restricción para la enzima XhoI en la sustitución I32L-H36R. **B)** El alineamiento de las secuencias aminoacídicas del HD de Antp muestra la sustitución mediante mutagénesis doble de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD.

8.2 Análisis de la interacción molecular de la hélice II del HD de Antennapedia con el factor transcripcional TFIIIE-β en ensayos de BiFC

Con el objetivo de analizar la interacción proteína-proteína del HD de Antp y el factor de transcripción TFIIIE-β se realizaron ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) que se basan en la reconstitución o complementación de la fluorescencia de por los fragmentos carboxilo (VC155) y amino-

terminal (VNm9) de la proteína fluorescente Venus cuando las dos proteínas interactúan específicamente entre sí (Figura 12).

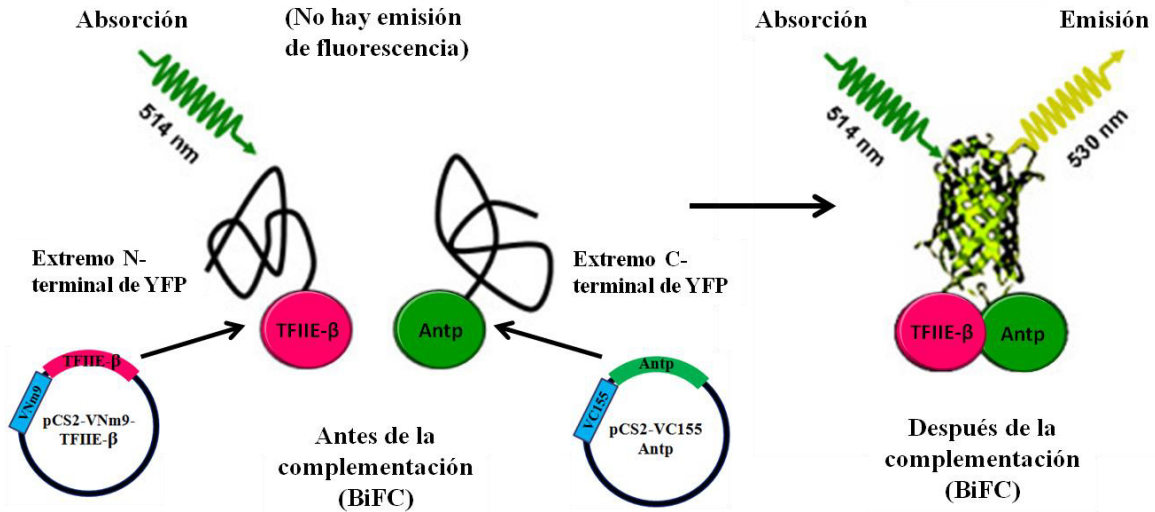


Figura 12. Interacción de Antp y TFIIΕ-β mediante Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC). El análisis de interacciones proteína-proteína de Antp y TFIIΕ-β mediante BiFC se analizaron mediante la fusión del factor transcripcional TFIIΕ-β al extremo amino terminal de la proteína amarilla fluorescente Venus (YFP) y la fusión de Antp al extremo carboxilo terminal de la proteína Venus. Después de la transfección en cultivo celular, cuando las proteínas se co-expresan si existe interacción entre ellas los extremos amino y carboxilo de Venus estarán lo suficientemente cerca para reconstituir la fluorescencia emitiendo una señal amarilla. Cuando no hay interacción entre las proteínas aunque éstas estén próximas no se observa la señal fluorescente.

La realización de los ensayos BiFC consistió en la co-transfección de plásmidos recombinantes del fragmento VC155 fusionado con las proteínas Antp, AntpΔH1-2, AntpI32L, AntpI32A, AntpH36R, AntpH36A, AntpI32L-H36R ó AntpI32A-H36A y el factor transcripcional TFIIΕ-β fusionado al fragmento VNm9. La proteína AntpΔH1-2 fue utilizada como control negativo porque presenta la delección de las hélices I y II del HD y no interactúa con TFIIΕ-β (Cárdenas-Chávez 2012). Los plásmidos recombinantes con las proteínas fusionadas el plásmido control pECFPN1 fueron co-transfectados en células embrionarias de riñón humano (HEK293).

8.2.1 Análisis de la interacción molecular de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp con TFIIE- β mediante BiFC

Para analizar la interacción molecular de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD con TFIIE- β se llevó a cabo la co-transfección de los plásmidos recombinantes que codifican para el fragmento VNm9 fusionado con TFIIE- β y las proteínas mutantes AntpI32L, AntpI32A, AntpH36R y AntpH36A fusionadas al fragmento VC155. Los plásmidos usados en las transfecciones contenían buena calidad de DNA como lo muestra la relación 260/280 de 1.9 a 1.98 (Tabla II). La proteína Antp fue utilizada como testigo positivo mientras que la proteína Antp Δ H1-2 con la delección de las hélices I y II del HD fue usada como testigo negativo. La co-transfección se llevó a cabo junto con el plásmido control pECFPN-1 en células embrionarias de riñón humano HEK293.

Tabla II. Plásmidos utilizados en los ensayos de BiFC

Plásmido	Concentración (ng/ μ l)	Absorbancia 260/280
pCS2-VC155Antp	738.2	1.91
pCS2-VC155Antp Δ H1-2	680	1.91
pCS2-VC155AntpI32L	745	1.92
pCS2-VC155AntpI32A	1150.8	1.9
pCS2-VC155AntpH36R	955.1	1.92
pCS2-VC155AntpH36A	968.3	1.98
pCS2-VNm9TFIIE β	785	1.9
pECFPN-1	946.1	1.97

La co-expresión de las proteínas de fusión TFIIE- β y Antp (Figura 13A) resultó como se esperaba en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia color amarillo) en el 75% de las células transfectadas. Por el contrario, el testigo negativo Antp Δ H1-2 disminuyó notablemente (21%) su interacción con TFIIE- β . Los resultados con las homeoproteínas mutantes mostraron una disminución significativa del porcentaje de interacción de TFIIE- β con AntpI32L (29%), AntpI32A (31%), AntpH36R (23%) y AntpH36A (25%) como se muestra en la Figura 13C-F en comparación con el porcentaje de interacción con Antp. Estos resultados indican que los residuos 32 y 36 de

la hélice II del HD de Antp tienen un papel importante en la interacción de esta homeoproteína con el factor general de transcripción TFIIIE- β .

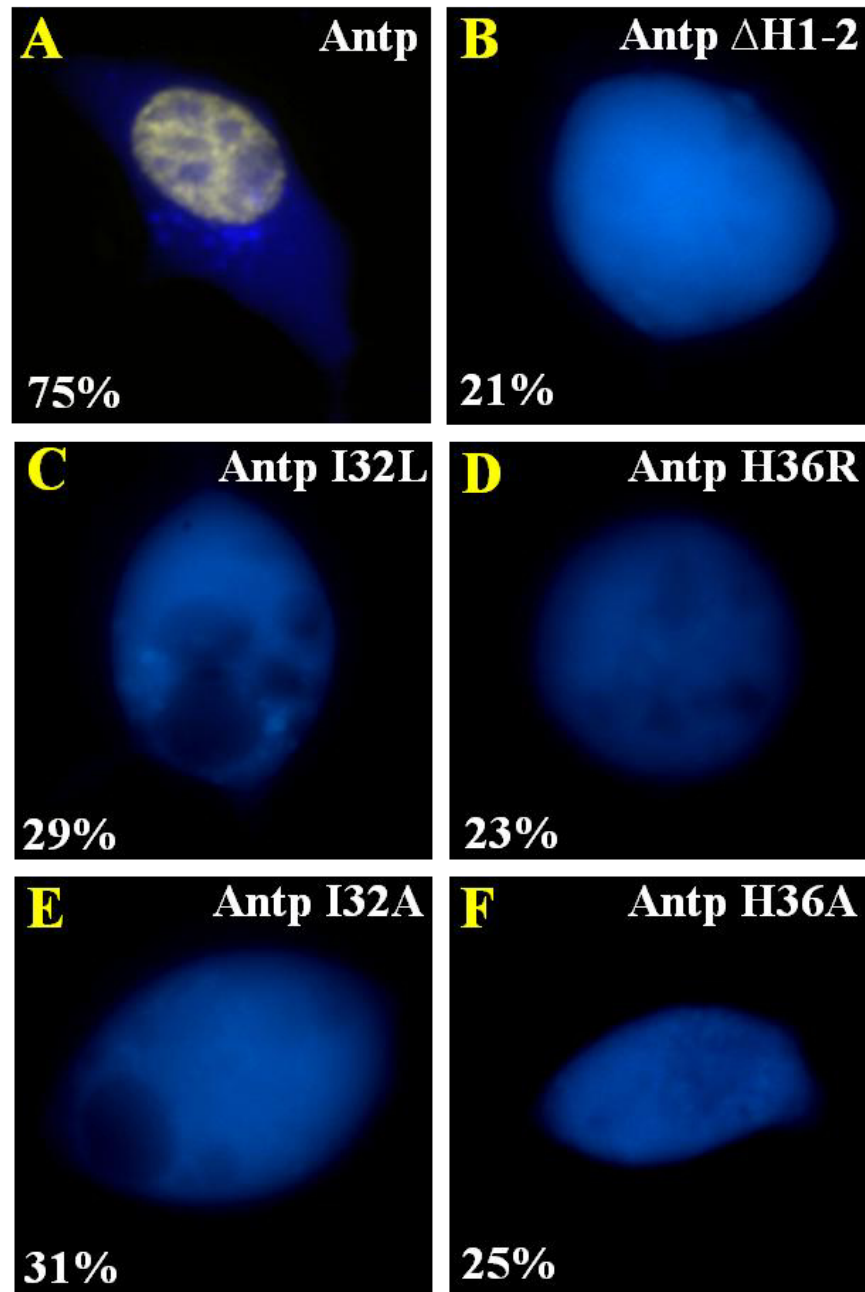


Figura 13. Interacción proteína-proteína de TFIIIE- β con las posiciones aminoacídicas 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp. Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas VC155-Antp (A), VC155-Antp Δ H1-2 (B), VC155-AntpI32L (C), VC155-AntpH36R (D), VC155-AntpI32A (E) ó VC155-AntpH36A (F) con el plásmido codificante al factor transcripcional VN-TFIIIE- β (A-F) en células HEK293. La fluorescencia en color amarillo en A) indica una interacción proteína-proteína de TFIIIE- β con Antp correspondiente al 75%. Se observa una disminución significativa del porcentaje de interacción de TFIIIE- β con la sustitución de los residuos 32 y 36 que va desde el 23 al 31% (C-D) en comparación

con el porcentaje de interacción con Antp (A). Esta disminución en la interacción corresponde aproximadamente con la delección de las hélices I y II de Antp en el testigo negativo (21%). Se co-transfectó el plásmido pECFPN-1 que codifica a la proteína fluorescente cian como control positivo de la transfección.

8.2.2 Análisis de la interacción molecular de la mutación doble de los residuos 32 y 36 en la hélice II del HD de Antp con TFIIE- β mediante BiFC

Para analizar el efecto de la mutación doble de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD en interacción molecular con TFIIE- β se llevó a cabo la co-transfección de los plásmidos recombinantes que codifican para el fragmento VNm9 fusionado con TFIIE- β y las proteínas mutantes AntpI32L-H36R y AntpI32A-H36A fusionadas al fragmento VC155.

La co-transfección se llevó a cabo junto con el plásmido control pECFPN-1 en células embrionarias de riñón humano HEK293. Los resultados de la co-expresión de las proteínas de fusión TFIIE- β y Antp mutantes dobles en la hélice II mostró una disminución significativa del porcentaje de interacción de TFIIE- β con AntpI32L-H36R (12%) y AntpI32A-H36A (11%) como se muestra en la Figura 14C-D en comparación con el porcentaje de interacción con Antp (78%).

Esta disminución de la interacción detectada en las mutantes dobles de los residuos 32 y 36 mostró un mayor efecto en la interacción con TFIIE- β que el testigo negativo Antp Δ H1-2 (23%) (Figura 14B). Por lo que estos resultados mostraron que las mutantes dobles eliminaron totalmente la interacción de Antp con TFIIE- β lo que indica que la interacción molecular específica proteína-proteína se realiza a través de los aminoácidos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp.

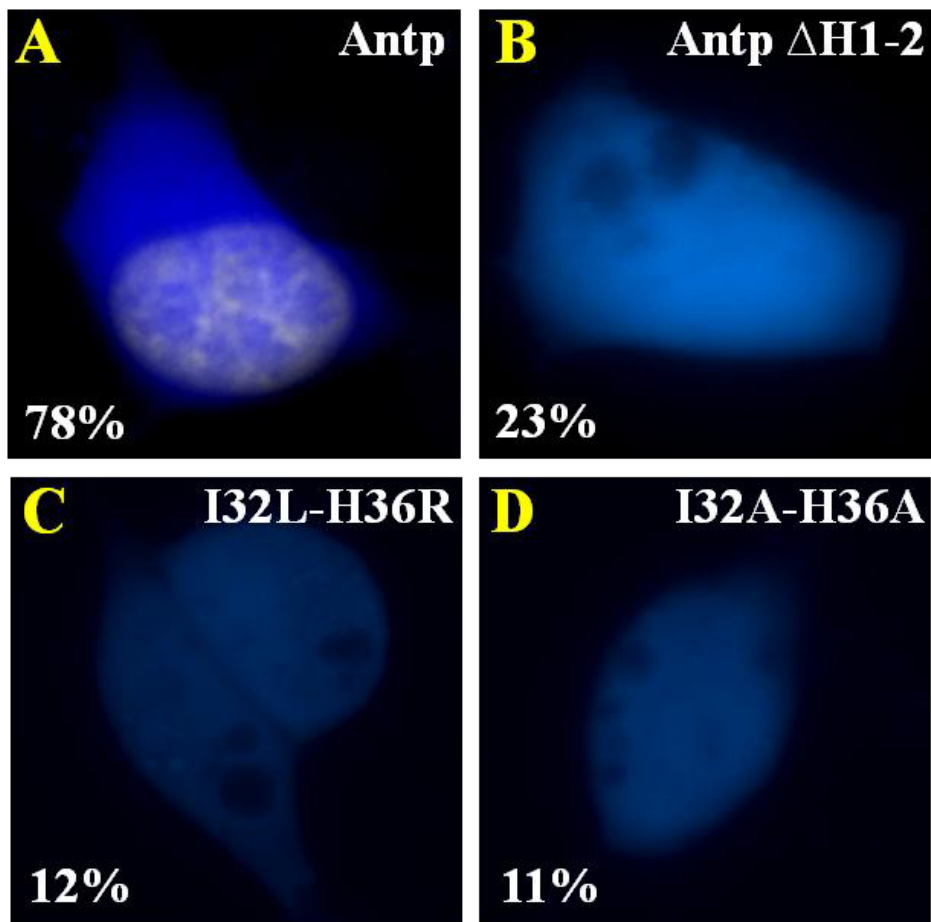


Figura 14. La mutación doble de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp elimina la interacción proteína-proteína de Antp con TFIIIE- β . Los ensayos BiFC se basaron en la co-expresión de las proteínas VC155-Antp (A), VC155-Antp Δ H1-2 (B), VC155-AntpI32L-H36R (C) ó VC155-AntpI32A-H36A (D) con el factor transcripcional VN-TFIIIE- β (A-D) en células HEK293. La fluorescencia en color amarillo en A) indica una interacción proteína-proteína de TFIIIE- β con Antp en un 78% de las células transfectadas. Se observa la falta de interacción de TFIIIE- β con la sustitución doble de los residuos 32 y 36 en Antp con una disminución hasta del 11-12% (C-D) en comparación con el porcentaje de intracción con Antp (A). Esta doble mutación en Antp mostró un mayor efecto en la interacción con TFIIIE- β que el testigo negativo (B) con las hélices I y II deletadas (23%). Se co-transfectó el plásmido pECFPN-1 que codifica a la proteína fluorescente cian como control positivo de la transfección.

8.3 Construcciones plasmídicas para analizar la interacción molecular de las mutantes del HD de Antp con el factor transcripcional TFIIE- β en ensayos de transactivación

Una vez que se determinó la interacción molecular de Antp-TFIIE- β a través de los residuos aminoacídicos 32 y 36 de la hélice II de Antp decidimos realizar la construcción de los plásmidos pNPAC codificantes a las proteínas AntpI32L, AntpI32A, AntpH36R y AntpH36A en los análisis de transactivación como se describe a continuación.

8.3.1 Construcción del plásmido pNPAC-AntpI32L mediante mutagénesis sitio dirigida

La Figura 15A muestra la construcción del plásmido pNPAC-AntpI32L mediante mutagénesis sitio-dirigida del residuo I32 en el plásmido pNPAC-Antp previamente construido en el laboratorio mediante un kit comercial como se describió en Materiales y Métodos.

El DNA plasmídico de pNPAC-Antp y las tres clonas mutagénicas positivas fueron caracterizados mediante digestión con la enzima de restricción ClaI (Figura 15B) que generó tres fragmentos de 4433, 3252 y 889 pb (carriles 1-4). La sustitución I32L generó un sitio de restricción para la enzima XhoI (Figura 15A) que no está presente en el plásmido pCS2-VC155Antp. La digestión de las clonas con la sustitución I32L con la enzima XhoI generó la linearización del vector como se muestra en la Figura 15B (carriles 5, 6 y 7) que no cortó el plásmido pNPAC-Antp (carril 8).

Posteriormente se realizó la confirmación de la sustitución I32L mediante secuenciación en el plásmido mutagenizado como se muestra en la Figura 15C.

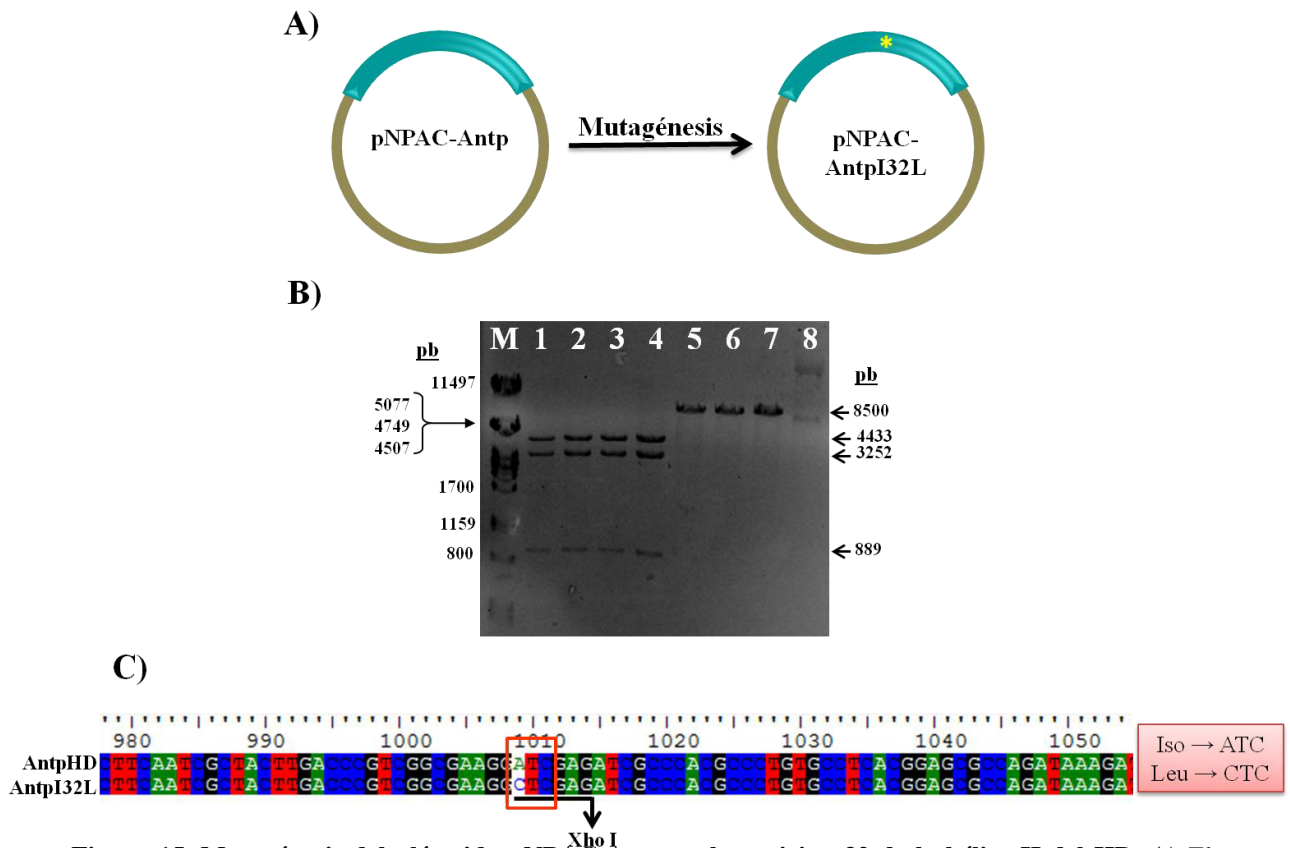


Figura 15. Mutagénesis del plásmido pNPAC-Antp en la posición 32 de la hélice II del HD. A) El esquema representa la mutagénesis sitio-dirigida en el vector pNPAC-Antp del residuo I32 para la construcción del vector mutagénico pNPAC-AntpI32L. B) El plásmido pNPAC-Antp analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% muestra el patrón de restricción generado con ClaI con la liberación de los fragmentos de 4433, 3252 y 889 pb (carril 1) así como tres clonas positivas del plásmido mutagénico pNPAC-AntpI32L (carriles 2, 3 y 4). También se muestra la linealización de los plásmidos mutagénicos pNPAC-AntpI32L (carriles 5, 6 y 7) con la enzima de restricción XhoI cuyo sitio fue generado con la sustitución I32L. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI y el carril 8 al plásmido pNPAC-Antp que no presenta el sitio de restricción para XhoI. C) El esquema muestra la confirmación mediante secuenciación del cambio nucleotídico con el codón en el recuadro rojo) lo que confirma la sustitución I32L en la hélice II del HD de Antp. Así mismo la secuenciación del plásmido muestra la generación del sitio de restricción para la enzima de restricción XhoI.

8.3.2 Construcción de los plásmidos pNPAC-AntpI32A y H36R

Para la construcción de los plásmidos recombinantes pNPAC-AntpI32A y H36R se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes de las proteínas AntpI32A y H36R a partir de los plásmidos pCS2-VC155Antp mutagenizados, posteriormente se realizó clonación en el vector pTOPO y finalmente la subclonación en el vector pNPAC a través del sitio de restricción NotI (Figura 16A).

En la Figura 16B se muestra la amplificación de los fragmentos AntpI32A y H36R a partir de los plásmidos pCS2-VC155Antp mutagenizados correspondientes a 1100 pb (carriles 1, 2 y 3). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pTOPO para la obtención de los plásmidos recombinantes pTOPO-AntpI32A y H36R. La Figura 16C muestra la caracterización de la clonación de AntpI32A en pTOPO con la enzima de restricción XbaI que generó los fragmentos 4814 y 186 pb (carril 1), con BamHI se generaron los fragmentos de 3953 y 1138 pb (carril 2) y con PstI los fragmentos de 3140, 1190 y 761 pb (carril 3).

La caracterización con la enzima de restricción PstI (Figura 16D) de la clonación del fragmento H36R (carriles 1, 3, 4 y 5) mostró los fragmentos esperados. En la Figura 16E se muestra la caracterización de la subclonación en el vector pNPAC del fragmento AntpI32A (carril 3) con la enzima de restricción PstI que mostró los fragmentos esperados de 5615, 1692 y 186 pb. De igual forma, en la Figura 16F se muestra la subclonación en el vector pNPAC de los fragmentos AntpH36R (carriles 1 y 2) que fue digerida con la enzima de restricción PstI que liberó los fragmentos esperados.

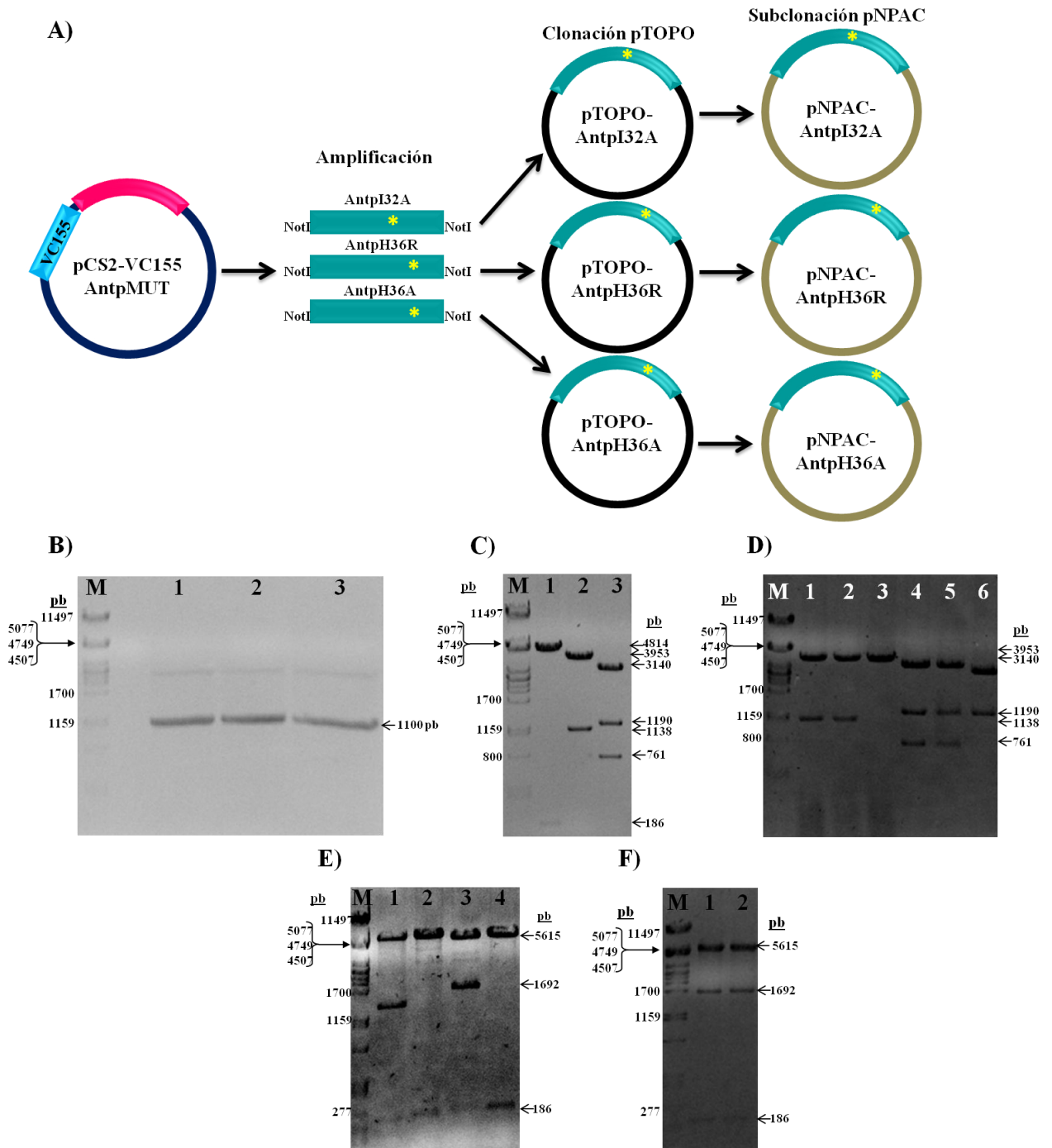


Figura 16. Construcción de los plásmidos recombinantes pNPAC-AntpI32A y H36R. A) Representación esquemática de la amplificación de los fragmentos AntpI32A, AntpH36R y AntpH36A a partir de los vectores mutagénicos pCS2-VC15-Antp mutagenizados, posteriormente se realizó la clonación en el vector pTOPO y subclonación en el vector pNPAC. B) El gel de agarosa al 0.8% muestra la amplificación mediante PCR de los fragmentos de 1150 pb correspondientes a AntpI32A (carril 1), AntpH36R (carriles 2 y 3) utilizando los oligonucleótidos AntpNot5 y AntpNot3 para su purificación y clonación en el vector pTOPO. C) La caracterización de la clonación en el vector pTOPO del fragmento AntpI32A se realizó con las enzimas de restricción XbaI (carril 1), BamHI (carril 2) y PstI (carril 3)

mostrando los fragmentos esperados. **D)** La clonación en el vector pTOPO del fragmento AntpH36R (carriles 1, 3, 4 y 5) con las enzimas de restricción BamHI (carriles 1 y 2) y PstI (carriles 4 y 5) mostró los fragmentos esperados en comparación con los carriles 3 y 6 que muestran clonas negativas. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI. **E)** La subclonación en el vector pNPAC del fragmento AntpI32A (carril 3) con la enzima de restricción PstI mostró los fragmentos esperados en contraste con los carriles 1, 2 y 4 que contienen clonas negativas. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI. **F)** La subclonación en el vector pNPAC del fragmento AntpH36R (carriles 1 y 2) fue analizada con la enzima de restricción PstI que liberó los fragmentos esperados. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI.

8.4 Efecto de las mutaciones de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp en la actividad transcripcional de Antp en presencia de TFIIE- β en ensayos de transactivación

Los ensayos de transactivación se basaron en la co-transfección de los plásmidos pNPAC productores de Antp ó las mutantes con las sustituciones de los residuos 32 y 36, el plásmido productor de TFIIE- β y el plásmido reportero pGLH11. Los plásmidos productores y reporteros usados en las transfecciones contenían buena calidad en el DNA como lo muestra la relación de absorbancia 260/280 de 1.8 a 1.96 en la tabla III. El plásmido reportero pGLH11 contiene un promotor con 11 sitios de unión de Antp y que dirige la expresión del gen reportero Luciferasa (Figura 17) y el plásmido pcopia β gal fue utilizado como control interno para normalizar la transfección (Tabla III).

Tabla III. Plásmidos utilizados en los ensayos de Transactivación

Plásmido	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/280
pNPAC-Antp	620	1.9
pNPAC-Antp Δ H1-2	540	1.8
pNPAC-AntpI32L	845	1.9
pNPAC-AntpI32A	1050.6	1.96
pNPAC-AntpH36R	956.5	1.8
pNPAC-VNm9TFIIE β	867	1.9
pGLH11	1020.5	1.91
pcopia β gal	957.1	1.9

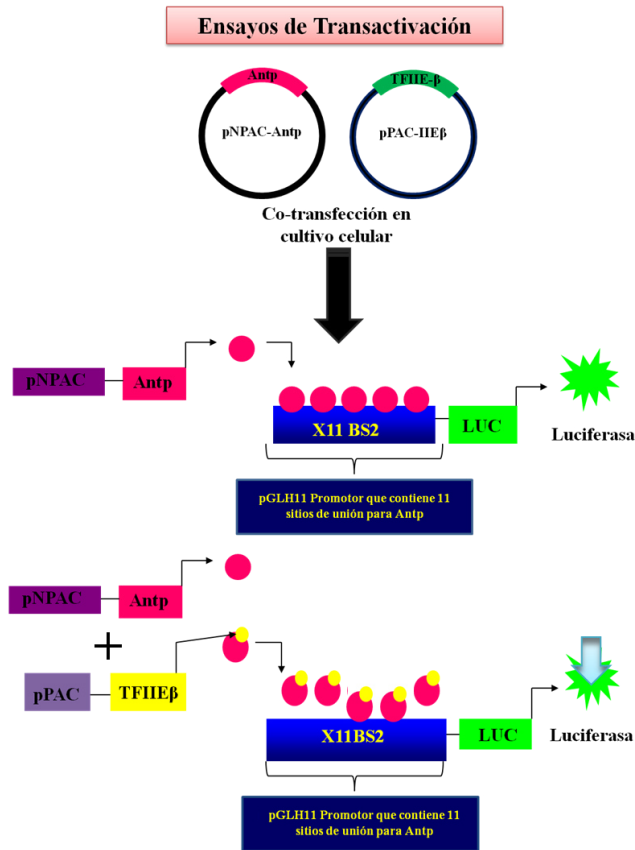


Figura 17. Ensayo para analizar la actividad transactivadora de Antp en presencia de TFIIΕ-β. Los ensayos de transactivación consisten en la co-transfección de los plásmidos pNPAC-Antp (proteínas Antp y mutantes), el plásmido pPAC-TFIIΕβ (factor transcripcional TFIIΕ-β) y el plásmido pGLH11 que contiene un promotor con 11 sitios de unión para la proteína Antp y esta fusionado con el gen LUC (reportero luciferasa). La unión de Antp a los sitios de unión en el promotor activa la transcripción del gen reportero luciferasa y la adición de TFIIΕ-β al interactuar con Antp modifica la capacidad de unión de Antp al promotor disminuyendo su capacidad transactivadora.

El análisis de la actividad transcripcional de Antp y mutantes muestra que la expresión simultánea del factor transcripcional TFIIΕ-β disminuyó la actividad transcripcional de Antp (53%) debido a la formación del complejo Antp-TFIIΕβ. Las proteínas AntpΔH1-2, AntpI32L, AntpI32A y AntpH36R no mostraron una reducción significativa en su actividad transcripcional en presencia del factor TFIIΕ-β (Figura 18B) en comparación con la proteína Antp sin modificar. Estos resultados sugieren que los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp son importantes en la interacción molecular de Antp con TFIIΕ-β ya que recuperaron la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp.

A)

	Hélice I	Hélice II	Hélice III	
Antp ^{HD}	RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN			60
Antp ^{I32L}	RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN			60
Antp ^{I32A}	RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN			60
Antp ^{H36R}	RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN			60
Antp ^{H36A}	RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN			60
	***** **			

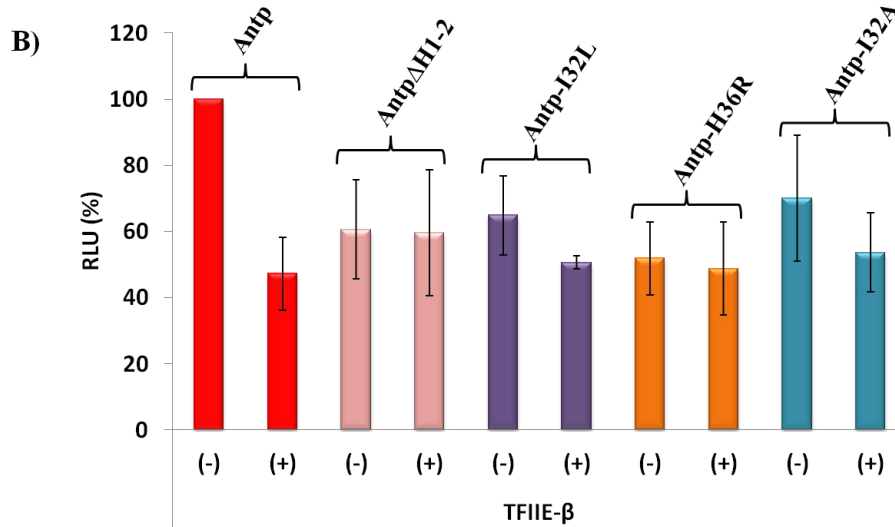


Figura 18. La sustitución de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp afecta la activación de la transcripción de Antp en presencia de TFIIIE-β. **A)** El alineamiento del HD de Antp muestra que las proteínas mutantes AntpI32L, AntpI32A, AntpH36R y H36A que presentan la sustitución del residuo I32 por leucina o alanina y del residuo H36 por arginina o alanina. **B)** En la gráfica se muestra el porcentaje de la actividad transcripcional en Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) de las proteínas Antp y mutantes Antp Δ H1-2 (delección de las hélices I y II del HD), AntpI32L, AntpI32A y AntpH36R en ausencia (-) o presencia (+) del factor transcripcional TFIIIE-β. El plásmido pcopia β gal fue usado para normalizar las transfecciones y cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

9. DISCUSIÓN

El objetivo de ésta tesis consistió en determinar si los residuos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio de Antp están involucrados en la interacción proteína-proteína de Antp y el factor transcripcional TFIIE- β . Para ello, en el trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo la construcción de los plásmidos mediante mutagénesis sitio-dirigida de los residuos 32 y 36 del HD de Antp de manera puntual y doble. Posteriormente, se determinó el efecto de éstas mutaciones en la interacción molecular proteína-proteína con TFIIE- β mediante ensayos de BiFC en cultivo celular y finalmente se determinó el efecto de las mutaciones puntuales en la hélice II de Antp en la actividad transcripcional de Antp en presencia de TFIIE- β en cultivo celular.

Las construcciones de los plásmidos recombinantes conteniendo Antp se realizaron tomando en cuenta el análisis de la secuencia aminoacídica de la hélice II del homeodominio para determinar los aminoácidos expuestos de la hélice II. Como los residuos 32 y 36 de la hélice II de Antp se encuentran en una posición expuesta, se llevó a cabo la mutagénesis sitio-dirigida mediante la cual se sustituyó el residuo 32-Isoleucina por leucina (I32L) y por alanina (I32A). Así mismo se sustituyó el residuo 36-Histidina por arginina (H36R) y por alanina(H36A).

Las construcciones plasmídicas para los ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular ó BiFC (Kerppola, 2006; Saka *et al.*, 2006) se realizaron con la homeoproteína Antp y las mutantes de los residuos 32 y 36 fusionados con el fragmento C-terminal (VC155) de la proteína fluorescente Venus y el factor general de transcripción TFIIE- β fusionado al fragmento N-terminal (VNm9) de Venus. Estos ensayos se realizaron debido a que la evidencia experimental de la interacción de Antp con TFIIE- β fue descrita inicialmente en estudios *in vitro* en ensayos pull down (Zhu y Kuziora 1994) y recientemente mediante ensayos BiFC en nuestro laboratorio por Cárdenas-Chavez 2012 que determinó la interacción molecular proteína-proteína del HD de Antp con TFIIE- β . Así mismo, la disección molecular del HD de Antp mediante delección de la hélice I (Antp Δ H1) mostró la maduración del fluoróforo Venus en la mayoría de las células transfectadas, en contraste con la delección de las hélices I y II

(Antp Δ H1-2). Estos resultados indicaron que la interacción proteína-proteína Antp-TFIIE β está dada por el HD y de manera específica a través de la hélice II. En concordancia con éstos resultados el análisis de interacción molecular mediante BiFC reveló como se esperaba que la mayoría de las células transfectadas (75-78%) con la proteína Antp y TFIIE- β mostraron la maduración del fluoróforo Venus (Fig. 13A) confirmando la interacción molecular Antp-TFIIE β , mientras que el testigo negativo no mostró la interacción (Fig. 13B). Los resultados de las interacciones moleculares por BiFC con las mutantes puntuales de los residuos 32 y 36 de la hélice II de Antp arrojaron una considerable disminución de la interacción molecular en células positivas transfectadas con AntpI32L (29%), AntpI32A (31%), AntpH36R (23%) y AntpH36A(25%) en combinación con TFIIE- β . Estos resultados de las mutantes Antp 32 y 36 fueron similares al porcentaje de interacción obtenido en el testigo negativo en la mutante Antp Δ H1-2 (21%) y en contraste con Antp-TFIIE β que si presenta interacción (75%). Así mismo, las mutantes doble de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD (AntpI32L-H36R y AntpI32A-H36A) fusionadas con el fragmento VC155 en el análisis de interacción por BiFC mostraron una drástica reducción del porcentaje de células positivas de interacción con TFIIE- β de 11% con AntpI32L-H36R y 12% con AntpI32A-H36A. Lo cual indica que en conjunto estos dos aminoácidos de la hélice II (I32 y H36) son importantes en la interacción molecular proteína-proteína de Antp-TFIIE β ya que el porcentaje de interacción obtenido es menor que el del testigo negativo (21%). Estos resultados confirman que los residuos aminoacídicos Iso32 y His36 están involucrados directamente en la interacción de la hélice II del HD de Antp con TFIIE- β . Esta interacción molecular específica de Antp-TFIIE β podría extrapolarse a otras homeoproteínas ya que Zhu y Kuziora en 1996 en cultivo celular mostraron *in vitro* que el homeodominio de AbdB presenta interacción con TFIIE- β (Zhu y Kuziora, 1996). Adicionalmente, Hudry *et al.* en 2011 en el análisis de interacción mediante BiFC en embriones de *Drosophila* mostraron que la homeoproteína Abdominal-A (AbdA) interactúa con el factor general TFIIE- β *in vivo*. Lo que indica que la interacción probablemente sea a través de los mismos residuos aminoacídicos 32 y 36 en AbdA ya que al igual que Antp corresponden a una isoleucina e histidina respectivamente. En contraste, en el caso de AbdB corresponden a un triptófano en la posición 32 y una

arginina en la posición 36. Dado que los residuos aminoacídicos 32 y 36 son los mismos en AbdA y Antp la interacción molecular proteína-proteína podría extrapolarse a otros homeodominios, ya que en otras homeoproteínas como Sex combs reduced (Scr) y Ultrabitorax (Ubx) los residuos 32 y 36 también corresponden a isoleucina e histidina respectivamente. Por otra parte, cuando sustituimos una histidina por una arginina en el residuo 36 de Antp encontramos una disminución de la interacción del 23% por lo que la arginina en el residuo 36 de AbdB podría indicar que hay otros residuos clave de la hélice II involucrados en la interacción del HD con TFIIE- β . Debido a lo anterior, un análisis de estas mutantes en ensayos BiFC e *in vivo* permitirían verificar la importancia de los mismos en ésta interacción, de igual forma el análisis de otros residuos de la hélice II contribuirán en la determinación de los aminoácidos con una función biológica relevante en la interacción TFIIE β con Antp y otras homeoproteínas.

Estas interacciones moleculares son importantes ya que se ha demostrado que Antp interactúa con la proteína Eyeless (EY) (Plaza *et al.*, 2001) y el análisis mediante BiFC demostró que la interacción Antp-EY ocurre a través del residuo E19 de la hélice I del HD de Antp, ya que la sustitución del aminoácido Glutámico 19 por Glicina (E19G) en la hélice I del HD fue suficiente para bloquear la interacción Antp-EY (Plaza *et al.*, 2008). Estos resultados en conjunto indican que el homeodominio es capaz de llevar a cabo múltiples funciones regulatorias a un nivel molecular ya que además de la interacción proteína-DNA en la hélice III de reconocimiento está involucrado en interacciones proteína-proteína a través de las hélices I y II.

Por otro lado, éstos resultados de interacción molecular Antp-TFIIE β mediados por la hélice II junto con la interacción de Antp con otros factores generales de transcripción como BIP2 mediada por el tetrapéptido YPWM (Prince *et al.*, 2008) y TBP mediada por el extremo amino terminal de Antp (Cárdenas-Chavez 2012) ponen en evidencia las interacciones de las homeoproteínas con miembros de la maquinaria basal de transcripción, mostrando el potencial de éstas para interactuar con varias clases de factores transcripcionales a través de diferentes dominios funcionales. La mayoría de estos análisis han sido realizados mediante BiFC en cultivo celular y el análisis de las

interacciones moleculares proteína-proteína *in vivo* por Hudry y colaboradores en 2011 con las homeoproteínas Antp y AbdA abre la posibilidad para la identificación y visualización de las interacciones moleculares proteína-proteína directamente en las regiones endógenas de los embriones o discos imaginales en *Drosophila in vivo*.

Finalmente, también se analizó la actividad transcripcional de las mutantes AntpI32L, AntpI32A y AntpH36R usando como testigos positivo y negativo respectivamente a Antp y la mutante Antp Δ H1-2 (Cárdenas-Chavez 2012) en ensayos de transactivación en células HEK293 en presencia y ausencia de TFIIE- β . La presencia de TFIIE- β como se esperaba no ocasionó una disminución significativa en la transactivación del testigo negativo Antp Δ H1-2 (2%) (Figura 18B). De la misma forma tampoco se encontró efecto en la transactivación de las mutantes AntpI32L (14%), AntpI32A (10%) y AntpH36R (17%). Estos resultados indican que la mutación de estos residuos rescató la actividad transcripcional de Antp. En contraste, en el testigo positivo Antp se observó una reducción de su actividad transactivadora en presencia de TFIIE- β de un 53% (Fig. 18B) indicando que los residuos 32 y 36 son necesarios para la interacción molecular entre Antp y la subunidad β del factor transcripcional general por lo que esta interacción sin duda afectó la actividad transcripcional de Antp en los sitios blanco de unión al DNA. De manera similar, Zhu y Kuziora en 1996 en cultivo celular, mostraron que los HDs Antp y AbdB presentan interacción con TFIIE- β para estimular la transcripción y esta interacción es independiente de la unión al DNA por parte de las homeoproteínas Antp y AbdB *in vitro* (Zhu y Kuziora, 1996).

La importancia de la interacción entre TFIIE- β y el HD de Antp en la regulación transcripcional puede radicar a nivel bioquímico, ya que TFIIE promueve la fosforilación del dominio carboxiterminal (CTD) de la RNA polimerasa II por parte de TFIIF (Ohkuma y Roeder 1994; Okuda *et al.*, 2008), por otro lado también inhibe la actividad helicasa de TFIIF que podría ser requerida para desenrollar la doble hélice de DNA antes del inicio de la transcripción. TFIIE podría ser reclutado al promotor a través de interacción directa con activadores de transcripción específicos, como los HDs de Antp y AbdB (Zhu y Kuziora 1996), AbdA (Hudry *et al.*, 2011) ó otros HDs. Una vez

reclutado, TFIIE interactúa directamente con TFIIF, TFIIB, la RNA Pol II y colabora en el reclutamiento de TFIIH (Flores *et al.*, 1989; Maxon *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1998; Yokomori *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2003; Forget *et al.*, 2004). TFIIE se une a la RNA Pol II cerca de su centro activo y en el promotor aproximadamente 10 bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, dónde se desenrolla (Douziech *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Forget *et al.*, 2004). Dado que se sabe que tanto TFIIE como TFIIH tienen funciones significativas en el inicio de la transcripción y en la elongación de la misma (Drapkin *et al.*, 1994; Goodrich y Tijan 1994), la habilidad del HD de atraer a TFIIE al complejo de iniciación podría contribuir a la estimulación de la transcripción al potenciar la actividad de TFIIH.

De forma alternativa y ya que TFIIE regula las actividades enzimáticas de TFIIH, las cuales son necesarias en los pasos subsiguientes a la formación del complejo de iniciación, entre ellos, promover el desenrollamiento en el promotor, se ha propuesto que TFIIE podría ser removido del complejo luego de la fosforilación de la RNA Pol II (Drapkin *et al.*, 1994). A la par de los cambios conformacionales que ocurren en el complejo de iniciación y que alteran el acceso a los factores generales de transcripción, la remoción de TFIIE del complejo podría ser facilitada por la interacción con un HD.

El factor transcripcional TFIIE está formado por un heterodímero ó heterotetrámero constituido de las subunidades α y β (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- α) reconoce el DNA de cadena sencilla (ssDNA) ó doble (dsDNA) y colabora con los factores TFIIB y TFIIF- β 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- β podría alterar la interacción con otras proteínas, modificando la actividad quinasa de TFIIH ó la tasa de elongación de la RNA polimerasa II. Otra posibilidad es que la interacción Antp-TFIIE- β 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; Zawel *et al.*, 1995). La interacción molecular Antp-TFIIE β presenta diferentes mecanismos en la regulación de la maquinaria transcripcional por lo que la activación o disminución podría contribuir a la determinación de la especificidad funcional del HD de Antp durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

10. CONCLUSIONES

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

- Las mutaciones puntuales de los residuos I32 y H36 de la hélice II del homeodominio de Antennapedia redujeron moderadamente la interacción molecular proteína-proteína con el factor general de transcripción TFIIE- β . La interacción se disminuyó en AntpI32L (29%), AntpI32A (32%), AntpH36R (23%) y AntpH36A (25%).
- La mutagénesis doble de los residuos 32 y 36 del HD de Antp redujo significativamente la interacción de ésta homeoproteína con TFIIE- β hasta el 11% con AntpI32L-H36R y 12% con AntpI32A-H36A.
- La falta de interacción molecular de Antp con TFIIE- β debido a la mutación de los residuos I32 y H36 en la hélice II de Antp recuperó la actividad transactivadora de Antp en cultivo celular ya que en los ensayos de transactivación no se encontró efecto significativo en la transactivación de las mutantes en ausencia y presencia de TFIIE- β .

Los resultados obtenidos muestran evidencia de que los residuos 32 y 36 de la hélice II de Antp están involucrados en la interacción molecular de ésta homeoproteína con el factor general de transcripción TFIIE- β . Debido a ello, sería de gran importancia la realización de un análisis de las mutantes de éstos residuos en ensayos BiFC *in vivo*, lo cual permitiría verificar la importancia de los mismos en ésta interacción, de igual forma resultaría interesante la realización del análisis de otros residuos de la hélice II para determinación de su función biológica relevante en la interacción de Antp-TFIIE β .

La liga de Antp con la maquinaria basal transcripcional y el alto grado de conservación evolutiva de los homeodominios mostrados en ésta tesis abren la posibilidad para el análisis de la interacción de TFIIE- β con otras homeoproteínas, lo que aportaría información valiosa para la determinación de los mecanismos que dan lugar a la especificidad funcional de las homeoproteínas durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

11. LITERATURA CONSULTADA

Albright SR, Tijan R. 2000. TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242: 1-13.

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

Bondos SE, Tan XX. 2002. Combinatorial transcription regulation: the interaction of transcription factors and cell signaling molecules with homeodomain proteins in *Drosophila melanogaster*. *Crit. Rev. Euk. Gene Express.* 11: 145-171.

Botas J. 1993. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 1015-1022.

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

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.

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

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

Carroll SB, Laymon RA, McCutcheon MA, Riley PD, Scott MP. 1986. The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* embryos. *Cell* 47: 113-122.

Casares F, Mann RS. 1998. Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392: 723-726.

Castelli-Gair J, Akam M. 1995. How the Hox gene *Ultrabithorax* specifies two different segments: the significance of spatial and temporal regulation within metameres. *Development* 121: 2973-2982.

Chan SK, Jaffe L, Capovilla M, Botas J, Mann RS. 1994. The DNA binding specificity of *Ultrabithorax* is modulated by cooperative interactions with *Extradenticle*, another homeoprotein. *Cell* 78: 603-615.

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

Emerald BS, Curtis J, Mlodzik M, Cohen SM. 2003. Distal antenna and distal antenna related encode nuclear proteins containing pipsqueack motifs involved in antenna development in *Drosophila*. *Development* 130: 1171-1180.

Flores O, Lu H, Reinberg D. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: identification and characterization of factor IIIH. *J. Biol. Chem.* 267: 2786-2793.

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

Gangloff YG, Pointud JC, Thuault S, Carre L, Romier C, Muratoglu S, Brand M, Tora L, Couderc JL, Davidson I. 2001. The TFIID components human TAF(II)140 and *Drosophila* BIP2 (TAF(II)155) are novel metazoan homologues of yeast TAF(II)47 containing a histone fold and a PHD finger. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5109-5121.

García BA. 1977. Homeotic and atavic mutations in insects. *Amer. Zool.* 17: 613-630.

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

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

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Reséndez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78: 211-223.

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 (TAFIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem. Sci.* 25: 59-63.

Grienemberger A, Merabet S, Manak J, Iltis I, Fabre A, Bérenger H, Scott MP, Pradel J, Graba Y. 2003. Tgfb signaling acts on a Hox response element to confer specificity and diversity to Hox protein function. *Development* 130: 5445-5455.

Hafen E, Levine M, Garber RL, Gehring WJ. 1983. An improved *in situ* hybridization method for the detection of cellular RNAs in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of the homeotic *Antennapedia* gene complex. *EMBO J.* 2: 617-623.

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.

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.

Hayashi S, Scott MP. 1990. What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? *Cell* **63**: 883-894.

Heuer JG, Kaufman TC. 1992. Homeotic genes have specific functional roles in the establishment of the *Drosophila* embryonic peripheral nervous system. *Development* **115**: 3547.

Hudry B, Viala S, Graba Y, Merabet S. 2011. Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biology.* **9**:5

Hughes CL, Kaufman TC. 2002. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol. Dev.* **4**: 459-499.

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. *EMBO J.* **8**: 1527-1537.

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

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. 1993b. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365:512-520.

Kissinger CR, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO. 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63: 579-590.

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

Lemons D, McGinnis W. 2006. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313: 1918-1922.

Levine M, Hoey T. 1988. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55: 537-540.

Mann RS, Morata G. 2000. The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 243-271.

Martinez-Arias A. 1986. The *Antennapedia* gene is required and expressed in parasegments 4 and 5 of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 5: 135141.

McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ. 1984. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37: 403-408.

McGinnis W, Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 63: 961-967.

McGinnis W, Lemons D, Pearson JC. 2005. Modulating Hox genes functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Gen.* 6: 893-904.

Murakami K, Elmlund H, Kalisman N, Bushnell DA, Adams CM, Azubel A, Elmlund D, Levi-Kalishman Y, Liu X, Gibbons BJ, Levitt M, Kornberg RD. 2013.

Architecture of an RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation Complex. *Science*. 342, 1238724.

O'Brien T, Hardin S, Greenleaf A, Lis JT. 1994. Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature (London)*, 370:75-77.

Ohkuma Y, Sumimoto H, Horikoshi M, Roeder RG. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8928-8935.

Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683.

Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Gehring WJ, Wüthrich K. 1990. Determination of the three-dimensional structure of the Antennapedia homeodomain from *Drosophila* in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 214: 183-197.

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.

Pattatucci AM, Kaufman TC. 1991. The homeotic gene *Sex Combs Reduced* of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics* 129: 443461.

Peterson MG, Inostroza J, Maxon ME, Flores O, Admon A, Reinberg D, Tijan R. 1991. Structure and functional properties of human general transcription factor IIE. *Nature* 354: 369-373.

Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenaz-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA, Fünfschilling R, Gehring WJ. 2011. Functional synthetic *Antennapedia* genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in transcriptional activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 11959-11964.

Passner JM, Ryoo HD, Shen L, Mann RS, Aggarwal AK. 1999. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*. 297: 649-651.

Pinsonneault J, Florence B, Vaessin H, McGinnis W. 1997. A model of extradenticle function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. *EMBO J.* 16: 2023-2042.

Plaza S, Prince F, Jaeger J, Kloter U, Flister S, Benassayag C, Cribbs D, 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, Yoshiteru O, Plaza S, Reséndez-Pérez D, Berry M, Kurata S, Gehring WJ. 2008. The YPWM motif links *Antennapedia* to the basal transcriptional machinery. *Development* 135: 1669-1679.

Qian YQ, Otting G, Furukubo-Tokunaga K, Affolter M, Gehring WJ y 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 YQ, Furukubo-Tokunaga K, Reséndez-Pérez D, Muller M, Gehring WJ, Wüthrich K. 1994. Nuclear magnetic resonance solution structure of the fushi tarazu homeodomain from *Drosophila* and comparison with the *Antennapedia* homeodomain. *J. Mol. Biol.* 238: 333-345.

Rauskolb C, Peifer M, Wieschaus E. 1993. *extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx-1*. Cell 74: 1101-1112.

Reinberg D, Orphanides G, Ebright R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H, Cortes P, Drapkin R, Flores O, Ha I, Inostroza JA, Kim S, Kumar P, Lagrange T, Leroy G, Lu H, Ma DM, Maldonado E, Merino A, Mermelstein F, Olave I, Sheldon M, Shiekhattar R, Stone N, Sun X, Weis L, Yeung K, Zawel L. 1998. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 63: 83-103.

Remacle S, Shaw-Jackson C, Matis C, Lampe X, Picard J, Rezsöhazi R. 2002 Changing homeodomain residues 2 and 3 of Hoxa1 alters its activity in a cell-type and enhancer dependent manner. Nucleic Acid Res. 30: 2663-2668.

Reuter R, Scott MP. 1990. Expression and function of the homeotic genes *Antennapedia* and *Sex Combs Reduced* in the embryonic midgut of *Drosophila*. Development 109: 2893-303.

Roeder RG. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. 21: 327-335.

Robert F, Forget D, Li J, Greenblatt J, Coulombe B. 1996. Localization of subunits of transcription factors IIE y IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. J. Biol. Chem. 271: 8517-8520.

Salser S, Kenyon CA. 1996. *C. elegans* Hox genes switches on, off, on and off again to regulate proliferation, differentiation and morphogenesis. Development 122: 1651-1661.

Schneuwly S, Gehring WJ. 1985. Homeotic transformation of thorax into head developmental analysis of a new *Antennapedia* allele in *Drosophilla melanogaster*. Dev. Biol. 108: 377-386.

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

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

Scott MP, Wainer A. 1984. Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4115-4119.

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

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

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.

Zawel L, Reinberg D. 1993. Regulation of RNA Polymerase II Transcription. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 44: 68-105

Zhu A, Kuziora MA. 1996. Homeodomain Interaction with the β Subunit of the General Transcription Factor TFIIE. J. Biol. Chem. 271: 20993-20996.

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

APENDICE I

LISTA DE OLIGONUCLEOTIDOS

5'AntpIso

5'CTACTTGACCCGTCGGCGAAGGCTCGAGATCGCCCACGCCCTGTG 3'

IsoR

5'CACAGGGCGTGGGCGATCTCGAGCCTTCGCCGACGGGTCAAGTAG 3'

I32A/F

5'CTACTTGACCCGTCGGCGAAGGGCCGAGATCGCCCACGCCCTGTG 3'

I32A/R

5'CACAGGGCGTGGGCGATCTCGGCCCTTCGCCGACGGGTCAAGTAG 3'

5'AntpArg

5'CGGCGAAGGATCGAGATCGCCCGCGCCCTGTGCCTCACGGAGCGC 3'

ArgR

5'GCGCTCCGTGAGGCACAGGGCGCGGGCGATCTCGATCCTTCGCCG 3'

H36A/F

5'TCGGCGAAGGATCGAGATCGCCGCCGCCCTGTGCCTCACGGAGCG 3'

H36A/R

5'CGCTCCGTGAGGCACAGGGCGGGCGGCGATCTCGATCCTTCGCCGA 3'

IR/F

5'ACCCGTCGGCGAAGGCTCGAGATCGCCCGCGCCCTGTGCCTCACG 3'

IR/R

5'CGTGAGGCACAGGGCGCGGGCGATCTCGAGCCTTCGCCGACGGGT 3'

AA/F

5'ACCCGTCGGCGAAGGGCCGAGATCGCCGCCGCCCTGTGCCTCACG 3'

AA/R

5'CGTGAGGCACAGGGCGGGCGGCGATCTCGGCCCTTCGCCGACGGGT 3'

AntpNot5

5'GCGGCCGCATGACGATGAGTACAAAC 3'

AntpNot3

5'GCGGCCGCCGATCCTACTGCG 3'