

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



**LOS HOMEODOMINIOS DE ANTENNAPEDIA Y SEX COMBS  
REDUCED SON REQUERIDOS EN SU INTERACCIÓN  
MOLECULAR PROTEÍNA-PROTEÍNA**

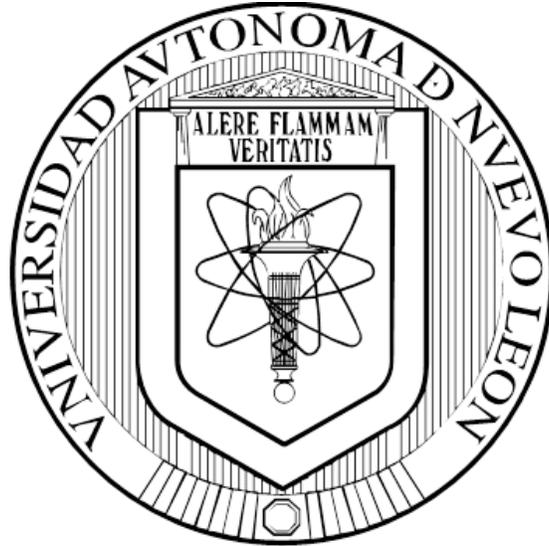
**POR**

**FERNANDO SALOMÉ ELIZONDO RODRÍGUEZ**

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

**JUNIO 2016**

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



**LOS HOMEODOMINIOS DE ANTENNAPEDIA Y SEX COMBS  
REDUCED SON REQUERIDOS EN SU INTERACCIÓN  
MOLECULAR PROTEÍNA-PROTEÍNA**

**POR**

**FERNANDO SALOMÉ ELIZONDO RODRÍGUEZ**

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

**JUNIO 2016**

**Los homeodominios de Antennapedia y Sex Combs Reduced  
son requeridos en su interacción molecular proteína-proteína**

**COMITÉ DE TESIS**

---

**Presidente:**  
**Dra. Diana Reséndez Pérez**

---

**Secretario:**  
**Dr. Fermín Mar Aguilar**

---

  
**Vocal 1:**  
**Dr. Jorge A. Verduzco Martínez**

---

**Vocal 2:**  
**Dra. Vianey González Villasana**

---

**Vocal 3:**  
**Dr. Pablo Zapata Benavides**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por permitirme realizar el posgrado bajo su tutela.

A Francisco Alvarado, Azeneth Cázares y Nancy Villarreal por preservar el buen funcionamiento de la Unidad de Biología del Desarrollo.

A Diana Cardenas y Arturo Machuca por su ayuda directa o indirecta en la realización de la tesis.

A el comité de tesis por revisar y aceptar el presente trabajo.

# ÍNDICE

1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
3 ANTECEDENTES.....	3
3.1 El modelo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
3.2 Genes homeóticos.....	4
3.3 Descubrimiento del homeobox.....	6
3.4 Evolución de los genes Hox.....	7
3.5 Genes Hox en el desarrollo de <i>Drosophila</i> .....	8
3.6 Control de la expresión de los genes Hox.....	10
3.7 Las homeoproteínas como factores de transcripción.....	11
3.8 Regulación funcional de las homeoproteínas.....	12
3.9 Sex combs reduced.....	14
3.10 Antennapedia.....	17
3.11 Genes blanco de Antennapedia y Sex combs reduced.....	18
3.12 Interacciones homeóticas proteína-proteína.....	20
4 JUSTIFICACIÓN.....	21
5 HIPÓTESIS.....	22
6 OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos particulares.....	23
7 MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7.1 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en células HEK293.....	24
7.1.1 Fundamento del análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante BiFC.....	24
7.1.2 Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155-Scr <sup>AAAA</sup> y pCS2-VNm9-Scr <sup>AAAA</sup> .....	25
7.1.3 Preparación del ADN para los ensayos BiFC.....	29
7.1.4 Transfecciones y cuantificación del porcentaje de interacción.....	30
7.2 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de transactivación en células HEK293.....	32

7.2.1 Construcción de los plásmidos recombinantes pNPAC Scr, Scr <sup>G19</sup> y Scr <sup>AAAA</sup> .....	32
7.2.2 Obtención de los plásmidos recombinantes.....	34
7.2.3 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de transactivación en células HEK293.....	35
7.2.4 Cuantificación de la expresión de genes luciferasa y $\beta$ -galactosidasa.....	37
8 RESULTADOS.....	39
8.1 Interacción molecular de Antennapedia y Sex Combs Reduced mediante BiFC.....	39
8.1.1 Antennapedia interacciona con Sex Combs Reduced.....	39
8.2 Análisis de los dominios funcionales responsables de la interacción Antp-Scr mediante BiFC.....	40
8.2.1 El homeodominio de Antp es necesario en la interacción Antp-Scr.....	40
8.2.2 La posición 19 de la hélice I de los homeodominios de Antp y Scr esta involucrada en la interacción Antp-Scr.....	41
8.2.3 Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155-Scr <sup>AAAA</sup> y pCS2VNm9-Scr <sup>AAAA</sup> .....	43
8.2.4 La interacción Antp-Scr no depende del tetrapéptido YPWM de ninguno de los homeodominios.....	44
8.3 La posición 19 de la hélice I de Antp y Scr no afecta su interacción con Exd.....	46
8.4 Análisis de la interacción Antp-Scr sobre la actividad transcripcional de Antennapedia.....	47
8.4.1 Subclonación de las secuencias recombinantes Scr, Scr <sup>G19</sup> y Scr <sup>AAAA</sup> en pNPAC.....	47
8.4.2 La interacción Antp-Scr afecta la actividad transcripcional de Antp.....	49
8.4.3 La interacción Antp-Scr esta complejamente regulada por la posición 19 de la hélice I de sus homeodominios así como del tetrapéptido YPWM de ambos.....	50
9 DISCUSIÓN.....	52
10 CONCLUSIONES.....	58
11 PERSPECTIVAS.....	59
12 BIBLIOGRAFÍA.....	60
13 APÉNDICE I.....	70
13.1 Sumario de promedios estadísticos de los ensayos de BiFC.....	70
13.2 Sumario de porcentajes estadísticos de actividad transcripcional.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pCS2VC155-Scr y pCS2VNm9-Scr.....	26
Tabla 2: Programa de PCR utilizado para la mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pCS2VC155-Scr y pCS2VNm9-Scr.....	27
Tabla 3: Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección en células HEK293 para los ensayos BiFC.....	31
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para subclonación de los plásmidos pCS2VNm9-Scr y sus mutantes en pNPAC.....	33
Tabla 5: Programa de PCR utilizado para subclonación de los fragmentos de Scr y sus mutantes en el vector pCR2.1-TOPO.....	33
Tabla 6: Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección en células HEK293 para los ensayos de transactivación.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
Figura 2: Mutante homeótica Bithórax en <i>D. melanogaster</i> .....	5
Figura 3: Los genes Hox regulan la identidad de los segmentos en el eje anterior-posterior en <i>Drosophila</i> .....	7
Figura 4: Evolución de los genes Hox.....	8
Figura 5: Representación esquemática de la jerarquía genética en el desarrollo embrionario.....	9
Figura 6: Modelos de la interacción con cofactores para la actividad funcional de dos homeoproteínas.....	13
Figura 7: Representación esquemática del ensayo de interacción molecular mediante BiFC.....	25
Figura 8: Visualización de la interacción de Antennapedia con Sex Combs Reduced mediante BiFC.....	40
Figura 9: El homeodominio de Antennapedia permite la interacción Scr-Antp.....	41
Figura 10: La interacción Antp-Scr depende de la posición 19 de la hélice I de los homeodominios....	42
Figura 11: Construcción de plásmidos recombinantes pCS2VC155-Scr <sup>AAAA</sup> y pCS2VNm9-Scr <sup>AAAA</sup> .....	43
Figura 12: El tetrapéptido YPWM de Antp y Scr no afecta la interacción Antp-Scr.....	45
Figura 13: La posición 19 de la hélice I de Antp y Scr no afecta su interacción con Exd.....	46
Figura 14: Subclonación de las secuencias recombinantes Scr, ScrG19 y Scr <sup>AAAA</sup> en pNPAC.....	48
Figura 15: La actividad transcripcional de Antp se afecta en presencia de Exd, Scr y Scr <sup>AAAA</sup> .....	50
Figura 16: La actividad transcripcional de AntpG19 se afecta en presencia de Exd, Scr, ScrG19 y Scr <sup>AAAA</sup> .....	51

## 1 RESUMEN

Los genes Hox son factores de transcripción que regulan la morfogénesis del cuerpo actuando como selectores entre las diferentes vías de desarrollo además de estar implicados en la regulación de las actividades celulares como son: migración celular, comunicación, adhesión, división, diferenciación e inervación neuronal; pero la manera en como las homeoproteínas reconocen y regulan diferentes genes blanco ha sido una de las preguntas fundamentales en la biología del desarrollo y para responderla se ha sugerido que, entre otros mecanismos, las interacciones proteína-proteína a través del homeodominio produzcan cambios conformacionales que confieran especificidad funcional. Este trabajo de tesis describe la interacción molecular proteína-proteína que existe entre las homeoproteínas Antennapedia y Sex combs reduced utilizando dos métodos de análisis molecular. Por un lado se realizaron ensayos de BiFC en los que se detectó la interacción molecular mediante la reconstitución de la fluorescencia de la proteína Venus y posteriormente se realizaron ensayos de transactivación para determinar si la interacción tiene efecto sobre la actividad transcripcional de Antp en cultivo celular. Los resultados obtenidos permiten concluir inequívocamente que existe interacción proteína-proteína entre Antp y Scr a través del homeodominio y más específicamente mediante la posición 19 de la hélice I del mismo. Se concluye también que otros factores deben estar involucrados dados los resultados observados al probar mutantes del tetrapéptido YPWM, un dominio de unión a cofactores previamente descrito. También se encontró que estas interacciones Antp-Scr afectan la actividad transcripcional de Antp en cultivo celular. Los resultados obtenidos en esta interacción molecular ensayos invitan a investigación más fina que permita determinar el efecto de otras variables potencialmente involucradas como presencia y/o ausencia de más cofactores para Antp y Scr, uso de secuencias de ADN diana y evaluación de interacciones más complejas en número en el interactoma de los genes Hox. Del mismo modo, estos resultados deberán ser evaluados *in vivo* para determinar su validez en el contexto biológico en *D. melanogaster*.

## 2 INTRODUCCIÓN

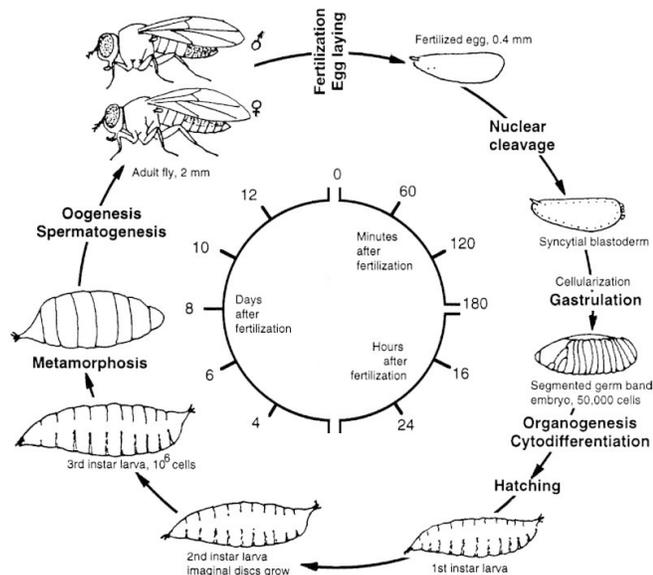
En la mayoría de los animales estructuras homólogas que tienen su origen en células similares alcanzan frecuentemente diferentes morfologías y funciones dentro del animal adulto, mientras que los cambios en número, forma y función marcan diferencias importantes evolutivas entre taxas. El entendimiento básico y modular del diseño animal así como su evolución requieren del conocimiento de la genética y los mecanismos moleculares del desarrollo que regulan la formación y la identidad de las diferentes partes del cuerpo. Los genes selectores tanto en invertebrados como en los vertebrados juegan un papel central en este proceso. Estos codifican factores transcripcionales que dirigen la formación específica de tejidos así como la diferenciación de las partes del cuerpo homólogas como son los segmentos, vértebras y apéndices. Se ha establecido que las proteínas selectoras regulan la expresión de numerosos genes blancos dentro de las redes y cascadas de transducción de señales que controlan el desarrollo de los tejidos. Dentro de esta clase de genes selectores se encuentran los genes Hox que codifican a homeoproteínas, que contienen un dominio de 60 aminoácidos altamente conservado llamado homeodominio. La regulación a nivel molecular de la expresión de los genes blanco por parte de las homeoproteínas aún no se ha clarificado totalmente ya que pocos genes blanco directos se han identificado tanto en invertebrados como en vertebrados. Aún mas, estas homeoproteínas muestran una alta especificidad de unión al ADN; se unen a secuencias de 6 pares de bases que contienen el núcleo conservado TAAT que aparece en el genoma de los animales aproximadamente una vez cada mil pares de bases, sugiriendo que existen muchos genes potenciales reconocidos por las homeoproteínas. Debido a lo anterior una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo es ¿cómo homeoproteínas tan similares producen *in vivo* diferentes efectos para la determinación de los distintos programas de regulación génica? Se ha establecido que algunas homeoproteínas adquieren la especificidad de activación/represión génica en un tejido mediante interacción con cofactores activadores o represores, por lo que en ésta tesis nos proponemos explorar una de dichas interacciones, específicamente la probable interacción proteína-proteína entre las homeoproteínas Antp y Scr.

### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 El modelo de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, reino animalia, filum arthropoda, clase insecta, y orden díptera (Tudge, 2000), se ha utilizado como modelo en la investigación genética y del desarrollo desde los primeros estudios realizados por Morgan en 1919 (Morgan y Cattell, 1919). *D. melanogaster* contiene cuatro cromosomas: los sexuales X/Y (1) y los autosómicos 2, 3 y 4 (siendo este último el más pequeño). Su genoma ha sido secuenciado y contiene cerca de 120 millones de pares de bases y aproximadamente 13,647 genes (Myers *et al.*, 2000).

*D. melanogaster* es un insecto holometábolo, es decir que tiene un desarrollo indirecto ya que pasa por distintas fases y mediante metamorfosis alcanza su estado adulto. La Figura 1 muestra el diagrama de las principales etapas del desarrollo:



**Figura 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.**

El diagrama muestra las diferentes etapas del desarrollo de *Drosophila* desde huevo hasta adulto. Este proceso dura aproximadamente 10 días dependiendo de la temperatura ambiental.

Tomado de (Gilbert, 2013)

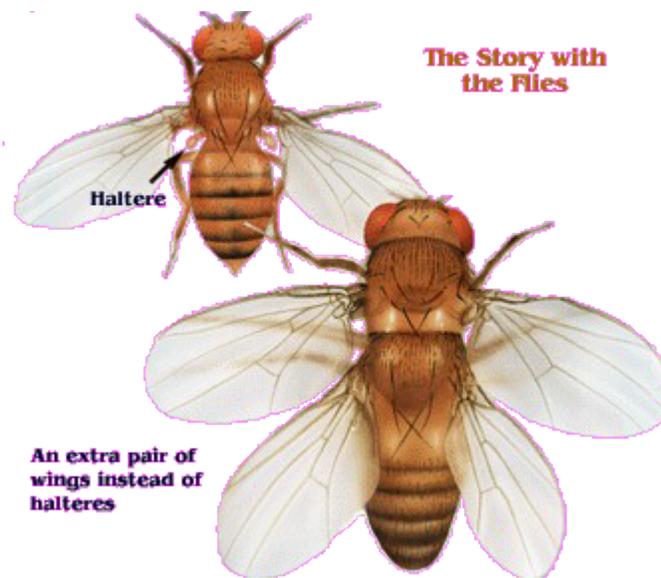
- Embriogénesis temprana: Comprende desde el momento de la fertilización hasta las 2.5-3 horas de desarrollo donde inicia la celularización.
- Embriogénesis tardía: A partir de la celularización hasta que emerge la larva (20-22 horas después de la fertilización).
- Estadio larvario: Comienza desde que emerge la larva (120 horas) y se subdivide en: estadio 1, estadio 2 y estadio 3. El paso de un estadio a otro esta asociado con un cambio de muda.
- Pupa: Empieza desde la formación de la cubierta protectora y continúa hasta la eclosión, donde emerge el adulto completamente formado.

En general el plan corporal de *Drosophila* es el mismo en el embrión, la larva y el adulto, en cada una de estas fases se distingue en los extremos la cabeza y cola, entre los cuales se encuentran unidades repetidas llamados segmentos. Cada segmento en la mosca adulta tiene su propia identidad. Tres de esos segmentos forman el tórax en donde el primero de ellos contiene un par de patas, en el segundo un par de alas y patas, mientras que el tercero tiene un par de patas y halterios y los restantes ocho conforman el abdomen anterior y posterior (Gilbert, 2013).

### **3.2 Genes homeóticos**

Durante el desarrollo embrionario de los animales se definen los ejes del cuerpo, esta información desencadena la activación secuencial de distintos programas de desarrollo en diferentes regiones, permitiendo a las estructuras formarse en el lugar correcto. Los genes homeóticos controlan la diversificación de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior durante el desarrollo embrionario de los animales. El primer paso para el descubrimiento de estos genes reguladores del desarrollo se inició con el estudio de algunas mutaciones en la mosca de la fruta *D. melanogaster*, en las que se observaron la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo. Estas mutaciones fueron denominadas “homeóticas” basadas en el trabajo de William Bateson de 1894 (Bateson, 1894) en el cual postuló el término “Homeosis” para describir la sustitución de una parte del cuerpo por otra estructura homóloga. El primer mutante

homeótico referido en *Drosophila* fue Bithorax (Bridges, 1923) con una transformación en el tercer segmento torácico donde los halterios u órganos de equilibrio son sustituidos por un segundo par de alas, es decir el tercer segmento torácico adquirió la identidad del segundo (Figura 2). Posteriormente, se describió Antennapedia (Antp) otro mutante homeótico en la cual las antenas son substituidas por un par de patas (Le Calvez, 1948). Edward Lewis en 1978 mostró que la identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca (desde el segundo segmento torácico hasta el octavo segmento abdominal) son determinados por genes homeóticos agrupados en un complejo llamado Bithórax (BX-C), mientras que la identidad de los dos primeros segmentos torácicos, así como los segmentos de la cabeza (mandibular, maxilar y labial), resultan de la expresión de genes del complejo Antennapedia (ANT-C) (Lewis *et al.*, 1978).

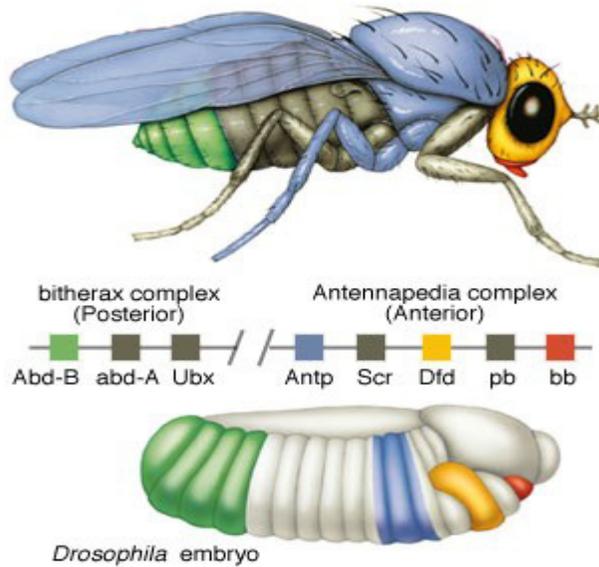


**Figura 2: Mutante homeótica Bithórax en *D. melanogaster*.** (izq.) Mosca normal con un par de alas en el segundo segmento torácico (T2) y halterios en el tercer segmento torácico (T3). (der.) Una triple mutación en el gen *Ultrabithorax* suprime su función en T3 y causa la transformación de la identidad T3 a T2 lo que ocasiona la aparición de un par extra de alas.

Tomado de (Akbari *et al.*, 2006)

### 3.3 Descubrimiento del homeobox

Con el advenimiento de las técnicas del ADN recombinante fue posible aislar los complejos Antennapedia (Garber *et al.*, 1983) y Bithórax (Bender *et al.*, 1983) en *Drosophila*. Durante el desarrollo de estos experimentos se detectaron hibridaciones cruzadas en regiones homólogas entre los genes *Antennapedia*, *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* (Kuroiwa *et al.*, 1984). Esta región de homología fue mapeada y secuenciada conduciendo al descubrimiento del “Homeobox” o “caja homeótica”. Este segmento de ADN de 180 pb, altamente conservado, al utilizarse como sonda permitió la clonación del resto de los genes homeóticos o genes Hox. En *D. melanogaster* estos genes se encuentran en el tercer cromosoma y está particularmente dividido en dos complejos separados por aproximadamente 8 millones de pares de bases. El complejo Antennapedia (ANT-C) 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)* (Figura 3). Dentro del grupo Hox se encuentran otros genes que presentan Homeobox, como *Zen*, *ftz* y *bcd*, que no funcionan como genes Hox, pero que se saben que evolucionaron dentro del grupo a partir de los genes Hox (Ferrier y Minguillón, 2003).



**Figura 3: Los genes Hox regulan la identidad de los segmentos en el eje anterior-posterior en *Drosophila*.**

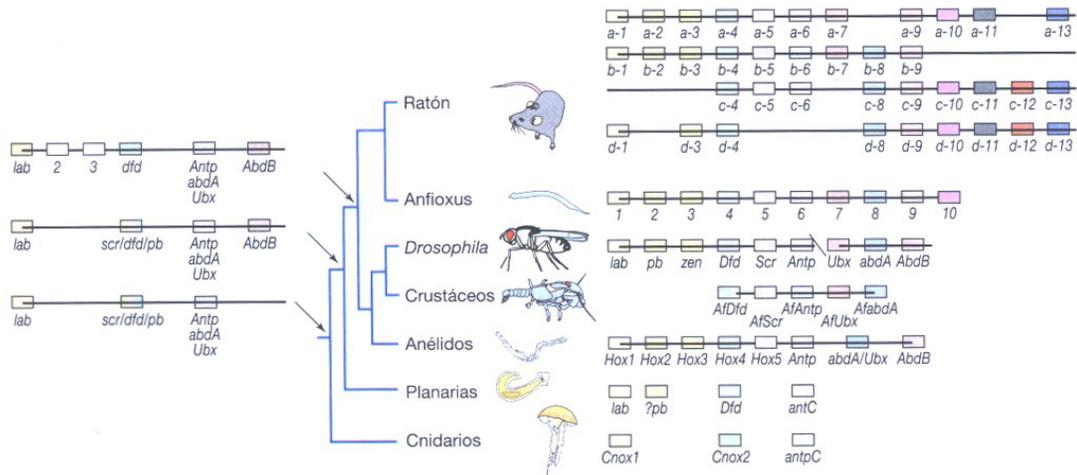
El color representa el segmento en donde se expresan cada uno de los genes Hox durante el desarrollo embrionario. Nótese que la disposición en el cromosoma de los genes Hox coincide con las partes del cuerpo que definen.

Tomado de (Peter y George, 2001)

### 3.4 Evolución de los genes Hox

Utilizando al homeobox como sonda se encontró que los genes Hox están presentes en organismos tan distantes como levaduras y vertebrados superiores incluyendo al hombre (McGinnis *et al.*, 1984). Una de las características más importantes de los genes Hox es que estos siempre se encuentran agrupados en el genoma de diferentes especies de animales. Las especies de invertebrados analizadas contienen un solo grupo de genes Hox, mientras que en vertebrados en el número varía; se han identificado cuatro en mamíferos y siete grupos en diferentes peces (Figura 4) (Meyer y Schartl, 1999). Basado en el análisis filogenético se ha propuesto que el último ancestro común de los insectos donde se incluyen a los protostomados, y vertebrados (deuterostomados) tuvo probablemente un solo grupo de seis o siete genes Hox (Yanze *et al.*, 2001). La familia de los genes Hox ha mantenido esta organización grupal en el genoma durante cientos de millones de años de evolución a través de diversas rondas de duplicación genética, lo que refleja su importancia en el desarrollo de todos los organismos (Patel y Prince,

2000). Se considera que la duplicación de los genes Hox y de los grupos Hox ha sido uno de los diversos motores de evolución de los planes corporales (Carroll, 2000).



**Figura 4: Evolución de los genes Hox.**

Árbol filogenético que muestra la evolución de los genes Hox en diferentes filum. A la derecha se muestra los genes Hox que se han encontrado en cada uno de los taxones del árbol, los genes ortólogos están alineados verticalmente y los que se muestran a la izquierda señalan aquellos que se encontraban presentes en los puntos de ramificación antes de la duplicación y divergencia.

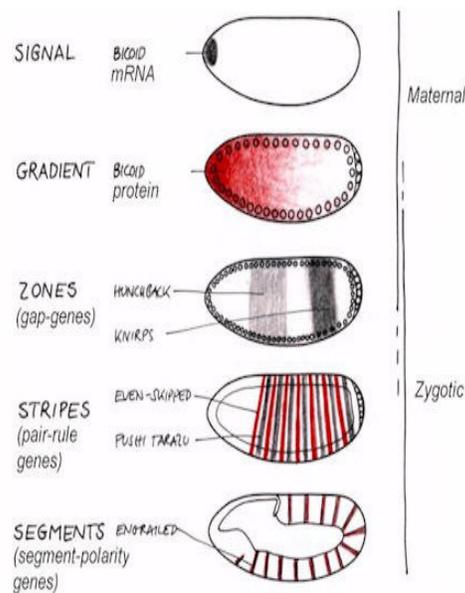
Tomado de (Valentine *et al.*, 1996)

Experimentos realizados con los genes Hox muestran que existe una relación entre la organización en el cromosoma y su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo, de tal manera que se expresan en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran en el cromosoma, fenómeno que se ha denominado colinearidad en la expresión (Lewis, 1963). Los genes Hox en vertebrados se activan sucesivamente de acuerdo a su posición en el cromosoma, lo que se ha llamado colinearidad temporal, lo que refleja la formación gradual del eje anterior-posterior durante la embriogénesis. Sin embargo, los genes Hox de la mosca se activan simultáneamente durante la etapa del blastodermo probablemente debido en gran parte a la velocidad de su embriogénesis (Ferrier y Minguillón, 2003).

### 3.5 Genes Hox en el desarrollo de *Drosophila*

Es durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* donde se establecen los ejes antero-posterior y dorso-ventral, se forman los segmentos y se confiere la identidad particular a

cada uno de ellos. La jerarquía genética que controla estos eventos comienza con la acción de los genes de coordinación de origen materno (Figura 5).



**Figura 5: Representación esquemática de la jerarquía genética en el desarrollo embrionario.**

La formación del patrón anterior-posterior en el embrión de *Drosophila* está controlado por diversas clases de genes. Primero se encuentran los genes de origen materno que controlan la expresión de los genes cigóticos que a su vez regulan a los genes de la regla del par y posteriormente la polaridad segmental.

Tomado de (Nüsslein-Volhard, 2006)

Los genes de efecto materno se transcriben en el ovario de la mosca, y los ARN's mensajeros se transmiten a diferentes regiones del huevo. Estos codifican proteínas reguladoras que se difunden a través del blastodermo del sincicio. Los promotores de los primeros genes cigóticos, los genes de segmentación, responden a diferentes concentraciones y combinaciones de los factores de transcripción maternos, expresándose en amplios dominios. Los genes de la regla del par son regulados por diferentes combinaciones y niveles de los factores, y se expresan con cierta periodicidad. De esta manera en el embrión se localizan bandas regulares de ARN mensajeros (ARN) que se repiten en cada uno de los futuros segmentos. Finalmente, los factores de transcripción de regla de par actúan sobre los promotores de los genes de polaridad segmental. Estos definen la identidad regional de cada uno de los futuros segmentos y

actúan durante el resto del desarrollo para mantener ese destino celular. A diferencia de los genes de segmentación y de la regla del par, sólo algunos genes de polaridad segmental codifican factores de transcripción. Esto es porque sus funciones comienzan después de que las células se han formado, y por lo tanto las células deben de tener la capacidad de enviar y recibir señales entre ellas. Las proteínas de segmentación y de la regla de par establecen el patrón de segmentos y regulan la expresión de los genes Hox. Estos genes se expresan en diferentes dominios dentro de los segmentos y mediante sus factores de transcripción, las homeoproteínas, establecen en cada uno de los dominios características y funciones únicas (Nasiadka *et al.*, 2002).

### **3.6 Control de la expresión de los genes Hox**

La expresión de los genes Hox en las células de un determinado segmento se regula mediante mecanismos de controles negativos o positivos. El silenciamiento de los genes Hox en *Drosophila* se lleva a cabo en dos etapas: Primero, productos de los genes Gap y regla del par localmente expresado se unen directamente a las secuencias cis-reguladoras de los genes Hox durante la embriogénesis temprana reprimiéndolos y delimitando así su expresión. A medida que avanza el desarrollo los genes Hox, que inicialmente se encontraban reprimidos en un segmento, se mantienen silenciados aun y cuando los represores Gap ya no se encuentran presentes. Este silenciamiento que se hereda a la descendencia celular lo llevan a cabo los productos de los genes del Grupo Polycomb (PcG) (Duncan, 1982; Struhl, 1981), muchos de los cuales se encuentran conservados en secuencia y función en vertebrados (Muller *et al.*, 1995; Schumacher *et al.*, 1996). En embriones de *Drosophila* que carecen de las proteínas PcG, los genes Hox inicialmente se expresan correctamente en sus dominios pero rápidamente comienzan a expresarse sin control (Soto *et al.*, 1995; Struhl y Akam, 1985). Las proteínas del grupo Trithorax (trxG) tienen una función antagónica a las PcG, al mantener la expresión de los genes Hox en la descendencia celular. Otro controles más precisos se llevan a cabo por autorregulación (Bienz y Tremml, 1988; Chouinard y Kaufman, 1991; Kuziora y McGinnis, 1988; Tremml y Bienz, 1992) y regulación cruzada entre diferentes homeoproteínas (Hafen *et al.*, 1984; Struhl y White, 1985). Recientemente se ha

comprobado en vertebrados que la expresión de algunos genes Hox es regulada mediante microRNA's, así mismo se han encontrado miRNA's involucrados en la regulación de *Drosophila* (Mansfield *et al.*, 2004; Yekta *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2014).

### **3.7 Las homeoproteínas como factores de transcripción**

Los genes Hox establecen la morfología del cuerpo actuando como selectores entre las diferentes vías de desarrollo. Estos regulan a otros genes que se encuentran bajo su control, por lo que en un segmento un gen Hox modula la expresión de los genes río abajo que al final llevarán a cabo la diferenciación celular (genes realizadores) o de otros genes selectores (Garcia-Bellido, 1975; Graba *et al.*, 1997).

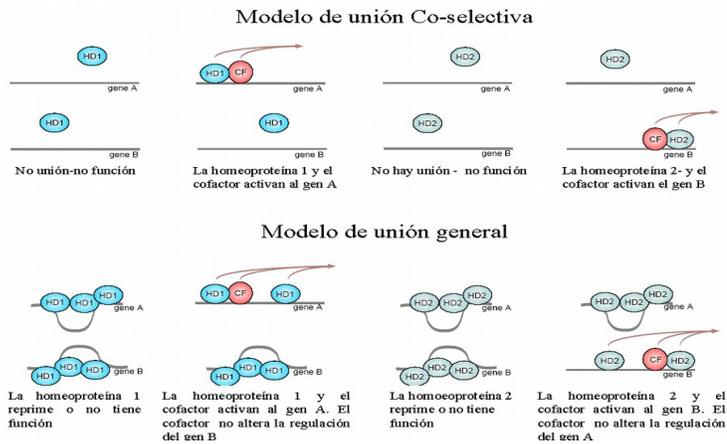
El primer indicio de la forma en que los productos de los genes Hox, podrían regular la expresión de genes blanco, provino cuando se analizó la secuencia aminoacídica del homeodominio, que es codificada por el Homeobox. La comparación aminoacídica reveló cierto grado de similitud con las proteínas reguladoras en procariontes y levaduras como Mat  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , las cuales tienen un papel clave en la determinación de tipo de identidad en levaduras (Shepherd *et al.*, 1984). La semejanza estructural en secuencia de los homeodominios y proteínas reguladoras en procariontes sugirió que estos podrían contener un motivo de unión hélice-vuelta-hélice (Laughon y Scott, 1984; Shepherd *et al.*, 1984). La capacidad de unión al ADN de los homeodominios fue confirmada cuando se determinó la estructura tridimensional del homeodominio de Antennapedia (Qian *et al.*, 1989). Posteriormente mediante ensayos de transcripción *in vitro* y experimentos de transfección se demostró que los homeodominios funcionan como activadores y/o represores de la transcripción (Han *et al.*, 1989; Jaynes y O'Farrell, 1988; Krasnow *et al.*, 1989; Thali *et al.*, 1988).

Los genes blancos de las homeoproteínas están implicados en la regulación de las actividades celulares como son: migración celular, comunicación, adhesión, división, diferenciación e inervación neuronal (Bienz y Tremml, 1988; Castelli-Gair *et al.*, 1994; Garcia-Bellido, 1975; Postlethwait, 1978). Dada la naturaleza compleja de la morfogénesis, no es sorprendente que los genes blanco codifiquen una gran variedad de proteínas, como son: factores de crecimiento, receptores de membrana, adhesión celular,

estructurales como tubulina, enzimas, diversos factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y orientación de la división celular (Botas, 1993; Follette y O'Farrell, 1997). Además, recientemente se ha propuesto que los genes Hox tienen una segunda función diferente de la regulación de la identidad segmental: el control de la organogénesis (Hombria y Lovegrove, 2003). Se estima que el número de genes blanco regulados por homeoproteínas en un tejido/embrión en particular debe ser de al menos un centenar en *Drosophila* (Mastick *et al.*, 1995) y en mayor número en vertebrados (Zhao y Potter, 2001).

### **3.8 Regulación funcional de las homeoproteínas**

Todas las proteínas Hox contienen un homeodominio altamente conservado, y consecuentemente muestran una afinidad muy similar de unión al ADN *in vitro*. (Desplan *et al.*, 1988; Hoey y Levine, 1988; Kalionis y O'Farrell, 1993). Las homeoproteínas generalmente se unen a una secuencia de seis pares de bases NNTAAT (Ekker *et al.*, 1991) *in vitro*, sin embargo esta secuencia se presenta con alta frecuencia en los genomas de los animales (una vez cada kilobase), sugiriendo demasiados genes blancos potenciales para las proteínas Hox *in vivo*. Es por ello que la manera en como las homeoproteínas reconocen y regulan diferentes genes blanco ha sido una de las preguntas fundamentales en la biología del desarrollo. Uno de los modelos que se ha propuesto postula la unión de las homeoproteínas en múltiples sitios sobre las secuencias cis-reguladoras. De tal manera que las homeoproteínas interactuarían entre sí incrementando su afinidad de unión al ADN como se muestra en la Figura 6 (Biggin y McGinnis, 1997). En este escenario, se requieren de numerosos sitios de unión para las homeoproteínas dentro de los elementos cis-reguladores para que los genes blanco sean regulados. Sin ser excluyente de este modelo es posible que la interacción de las homeoproteínas con algún factor module la actividad transregulatoria de represor a activador y viceversa. Alternativamente, un modelo de unión co-selectivo propone que las proteínas Hox pueden regular a los elementos cis a través de las interacciones cooperativas con cofactores, incrementando así su afinidad de unión al ADN (Biggin y McGinnis, 1997).



**Figura 6: Modelos de la interacción con cofactores para la actividad funcional de dos homeoproteínas.**

Los esquemas de izquierda a derecha muestran el efecto de homeoproteínas en los genes A y B en células que expresan: homeoproteína 1 (HD1), HD1 y un cofactor (CF), HD2 y HD2 y un CF. Los cofactores, que se muestran interactuando con HD1 y HD2, pueden ser los mismos o diferentes. En cualquiera de los casos, para lograr la regulación que se representa, el heterodímero podría tener diferente especificidad de unión al ADN. En el ejemplo dado, los cofactores podrían ser requeridos para la activación de la transcripción, pero bajo otras circunstancias podrían actuar como represores. En el modelo de unión general, HD1 y HD2 se unen cooperativamente a múltiples sitios de unión al ADN en la ausencia del cofactores.

Tomado de (Biggin y McGinnis, 1997)

Algunas proteínas que han demostrado ser requeridas como cofactores para la regulación de genes blanco son Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth). El gen *exd*, que contiene homeobox, fue inicialmente caracterizado debido a que su mutación causaba múltiples transformaciones homeóticas en *Drosophila* sin afectar los patrones de expresión de los genes Hox. Estas observaciones sugirieron que probablemente podría ser un cofactor de los productos de los genes Hox (Peifer y Wieschaus, 1990). Estudios moleculares han confirmado que Exd interacciona con algunas homeoproteínas y modifica la especificidad de unión al ADN (Chan y Mann, 1996). Esta función parece estar conservada en PBX, que son las proteínas similares u ortólogas a Exd en mamíferos (Peltenburg y Murre, 1997). Por otro lado la importancia de Hth se reconoció primeramente en mamíferos en donde Meis-1, su ortólogo, fue sobrepresado junto con HoxA7 y HoxA8 lo que dió como resultado una transformación leucémica de las células madres hematopoyéticas (Nakamura *et al.*, 1996). En *Drosophila*, Hth regula la

localización nuclear de Exd (Rieckhof *et al.*, 1997) y forma complejos con las proteínas Hox, incluyendo a Exd (Ryoo *et al.*, 1999). De igual forma que Exd, la función e interacción de Hth están fuertemente conservadas entre *Drosophila* y los mamíferos (Jacobs *et al.*, 1999).

Se ha propuesto otro mecanismo de regulación de la actividad de las homeoproteínas, basado en que al igual que la mayoría de los factores de transcripción, las homeoproteínas pueden ser fosforiladas (Lopez y Hogness, 1991), por lo que su función podría ser modulada a través Kinasas o Fosfatasa. Se ha demostrado que la Caseína Kinasa (CKII) actúa sobre Antp; el análisis mediante mutagénesis dirigida a los sitios blancos de CKII en Antp, que se encuentran fuera del homeodominio, probó que la actividad de Antp aparentemente se elimina mediante una fosforilación (Jaffe *et al.*, 1997). Similarmente, la fosforilación de la homeoproteína Scr en el brazo N-terminal de su homeodominio, aparentemente suprimió la actividad de Scr, por lo que la defosforilación en este sitio por la proteína fosfatasa PP2 se requiere para la actividad de Scr (Berry y Gehring, 2000). En ambos casos la fosforilación interfiere con la unión al ADN ya sea como monómeros o mediante un cofactor. En ninguno de los casos, sin embargo, pareciera que la fosforilación modula la especificidad de las homeoproteínas. Al menos en estos dos sistemas, la fosforilación podría ser una forma de suprimir post-traduccionalmente la actividad de las homeoproteínas. Aunque pareciera que la fosforilación tiene un papel importante en la función de las homeoproteínas, no se sabe en qué células o durante cuál periodo del desarrollo normal este mecanismo es usado (Mann y Morata, 2000). Interesantemente, Ftz también se fosforila en el brazo N-terminal de su homeodominio, pero en este caso la fosforilación es necesaria para las funciones de segmentación de Ftz (Dong y Krause, 1999).

### **3.9 Sex combs reduced**

Sex combs reduced es requerido para labial y el primer segmento torácico. Los mutantes muestran una tendencia a transformar estructuras labiales en estructuras maxilares. El gen Scr esta sujeto a regulación compleja ya que se encuentra en un segmento cromosómico rico, en este, el área que afecta la expresión de Scr comprende un espacio

de más de 70 kb de ADN que se extiende desde Antennapedia en un extremo, atravesando el gen *fushi tarazu* en su camino a *Scr* donde no se detiene sino que continúa más allá del extremo 3' de *Deformed*. La existencia del gen de regla de par *ftz* en el centro de la región regulatoria de un gen homeótico del complejo de Antennapedia tiene implicaciones que aun no han sido dilucidadas (Henderson, 1999).

La regulación de *Scr* requiere silenciadores y estos se localizan del mismo modo en el fragmento grande que se localiza entre *ftz* y *Antp*, aproximadamente 40 kb en la dirección 5'. *Scr* en la mayor parte de los tejidos es controlada por múltiples elementos regulatorios. La expresión en el protórax (segmento torácico número uno) es controlada por un elemento en el primer intrón y un potenciador más allá de *ftz*. La expresión en el lóbulo labial requiere de secuencias en el primer exón e intrón, secuencias no identificadas más allá de *ftz* y otras secuencias aún más distantes en la dirección de Antennapedia (Gindhart *et al.*, 1995).

La formación de las glándulas salivales en el embrión de *Drosophila* está vinculado a la expresión de *Scr*. Cuando la función de *Scr* es abolida las glándulas no se forman y cuando es expresado ubicuamente se forman glándulas salivales ectópicas. Se han encontrado dos proteínas con homeodominio que también son requeridas para la formación de las glándulas de la mosca, estas son *Exd* y *hth* (Henderson y Andrew, 2000).

Para determinar si *Exd* coopera con *Scr* para controlar la expresión génica en glándula salival, la acumulación de dos proteínas tempranas glándulas salivales, y *CrebA* *Tracheless* (*Trh*), fue examinada en los embriones que carecen de función *Exd*. La pérdida de función cigótica resulta en la reducción en el número de células de la glándula salivales que expresan *CrebA* y *Trh*, así como una disminución en el nivel de proteína que se produce en estas células. Esta reducción del nivel de expresión de proteínas no es tan grave como la que se ve en los embriones mutantes *Scr*. A diferencia de *Scr*, el ARNm *exd* se suministra por vía materna y, por tanto, la contribución materna puede compensar parcialmente la pérdida de la función cigótica. Para probar esta posibilidad, la contribución materna de *exd* se eliminó mediante el sistema de FLP-FRT.

En los embriones que carecen de la función materna *exd*, la expresión en las glándulas salivales de *CrebA* y *TRH* es igual a la expresada en moscas normales. Sin embargo, la expresión en las glándulas salivales de *CrebA* y *Trh* está completamente ausente en los embriones que carecen tanto de la contribución materna como la contribución de *exd*. Por lo tanto, *Exd* es necesaria para la expresión génica de la glándula salival (Henderson y Andrew, 2000).

Dado que *Scr*, *Exd* y *Hth* se requieren para la formación de las glándulas salivales, los patrones de expresión de ARNm y/o proteínas de estos genes durante la formación normal de la glándula salival fueron examinados. Durante las etapas 9 y 10, cuando la expresión génica de la glándula salival se establece, *Scr* y *hth* se expresan en los primordios de las glándulas salivales, así como otros tejidos, y *hth* y *Exd* son nucleares. Durante la etapa 11, después de que el establecimiento de principios de la expresión génica glándula salival, las glándulas salivales comienzan a invaginarse. En esta etapa, hay varios cambios en la expresión y/o localización de estos genes y/o proteínas en las células de la glándula salival: los transcritos de *scr* y *hth* desaparecen, *Hth* desaparece y *Exd* se relocaliza a citoplasma (Glazov *et al.*, 2005).

Se sabe que *Hth* regula la entrada de *Exd* al núcleo en múltiples células del embrión y en los discos imaginales. En los embriones que carecen de función *hth*, *Exd* es citoplasmática lo largo del desarrollo embrionario, incluyendo en las células de los primordios de glándula salival. Se ha observado en embriones nulos para *exd* que ni la proteína *Scr* ni tampoco la expresión de ARNm se mantiene en las células ventrales de PS2 en los mutantes de *hth*. *Exd* es necesaria para la estabilidad de *Hth* en todo el embrión y, en consecuencia, una pérdida de estabilidad de las proteínas *Hth*, pero no la acumulación de transcrito *hth* se observa en los embriones mutantes *exd*. Por lo tanto, *hth* mantiene la expresión en los primordios de la glándula salival y regula la localización nuclear de *Exd* largo del embrión, incluidas las células de los primordios de glándula salival. Además, *exd* se requiere para la acumulación de *Hth* (Henderson y Andrew, 2000).

Recientemente, se descubrió la capacidad de dimerización de Sex combs reduced que es dependiente del dominio ELEKEF de la hélice I, más específicamente del residuo 19, característica no compartida por Antp la homeoproteína más cercana, esta dimerización no solo tiene función en la activación transcripcional de fork head, sino además en la función homeótica durante el desarrollo de la mosca probablemente mediante una modificación en la afinidad de las proteínas involucradas (Papadopoulos *et al.*, 2012).

### **3.10 Antennapedia**

En 1948 LeCalvez describió la mutación homeótica Antennapedia en *Drosophila melanogaster*. En clones mutantes de *Drosophila* (sin Antp) las células de la pata se diferencian como estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981). A raíz de tal observación se planteó la hipótesis de que la función de Antp se requiere en todos los segmentos torácicos para suprimir en cada uno de ellos el desarrollo de la cabeza y promover el de los apéndices torácicos (Struhl, 1981). Esta promueve la identidad de la pata mediante la represión de los genes determinantes de la antena. Esto debido a que Antp, en discos de pata reprime al gen *hth*, regresando la ruta del desarrollo al estado basal, el cual es pata. Sin embargo, Antp no forma parte en la generación de este estado basal, solo contribuye al desarrollo normal de la pata mediante la modificación del estado basal (Casares y Mann, 1998; Casares y Mann, 2001).

El análisis de la distribución de la proteína Antp mediante anticuerpos policlonales mostró que ésta se expresa en la epidermis embrionaria, especialmente en la región posterior T2 y anterior de T3 así como en los neurómeros (Carroll *et al.*, 1986). En la larva se ha detectado Antp en cada disco imaginal de la pata así como en los discos torácicos dorsales (ala y halterio) pero no así en los discos de ojo-antena (Wirz *et al.*, 1986).

Se ha propuesto que algunos dominios conservados participan en la modulación de la especificidad funcional de Antp en diferentes tejidos. Sin embargo sólo en algunos se ha determinado su importancia funcional más no a nivel molecular como el caso del extremo C-terminal (Gibson y Gehring, 1988; Jaffe *et al.*, 1997), la región N-terminal de

homeodominio (Gibson *et al.*, 1990; Zeng *et al.*, 1993) y el tetrapéptido YPWM (Canales-del Castillo, 2002).

Interesantemente, el análisis de la estructura tridimensional, mediante RMN, del homeodominio de Antp mutado, con una delección en el brazo N-terminal, mostró que la estructura del homeodominio permanecía intacta estructuralmente. Sin embargo, la afinidad de unión al ADN de este homeodominio truncado mostró una disminución, que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal del homeodominio (Qian *et al.*, 1994). Experimentos genéticos *in vivo* en *Drosophila* realizados mediante sustitución recíproca de cuatro residuos entre los extremos N-terminal de Antp y Scr modificaron la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993). Estos experimentos genéticos *in vivo* demostraron la importancia funcional de estos residuos y sugirieron que el extremo N-terminal de los homeodominios está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de los mismos.

### **3.11 Genes blanco de Antennapedia y Sex combs reduced**

El gen *apterous* (*ap*) codifica para una proteína que contiene un homeodominio LIM, que está involucrado en el desarrollo dorso-ventral del ala (Diaz-Benjumea y Cohen, 1993; Hobert y Westphal, 2000). *ap* se expresa en el embrión de *Drosophila* en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y en el mesodermo somático ésta limitado a los músculos progenitores que contribuyen a la formación de los músculos LT1-4, Va2 y VA3 (Bourgouin *et al.*, 1992)).

El gen *forkhead* (*fkh*) se expresa en el primordio de las glándulas salivales durante el desarrollo embrionario, éste se forma en el lado ventral del PS2 (Parasegmento 2) durante la etapa 11 del desarrollo embrionario. Las células que expresan *fkh* eventualmente se invaginan para formar la glándula salival embrionaria. Scr es uno de los genes requeridos para la activación de *fkh* y la formación de las glándulas salivales (Panzer *et al.*, 1992). Ryoo y Mann en 1999 describieron una región de 5 kpb del gen *fkh* la cual dirige la expresión de un gen reportero en un patrón idéntico al de la proteína Fkh. Dentro de este potenciador esta un elemento de 37 pb denominado *fkh*[250], que

contiene la secuencia 5'-AGATTAATCG-3' con sitios de unión para el complejo de Scr y Exd (Scr/Exd). Para probar la actividad de este elemento se clonaron cuatro copias de fkh[250] río arriba de un promotor que regula al gen reportero lacZ. La mutación de dos pares de bases de este elemento 5'-AGATTTATGG-3' convirtió este sitio de unión natural del heterodímero Scr/Exd a un sitio de unión consenso, denominado fkh [250con]. Este elemento se fusionó con cuatro copias del elemento fkh [250con] al gen reportero lacZ, el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se probó su actividad *in vivo*. Mientras que la expresión de fkh[250]-lacZ se encuentra limitada al PS2, la expresión de fkh [250con ]-lacZ se observa del PS2 hasta PS6. En mutantes dobles que carecen de los genes Scr y Antp, no se detectó  $\beta$ -Gal en los PS2 y PS5, pero si en PS6 y hacia la parte posterior del embrión. Por otro lado, la dirección de la expresión ectópica de Antp utilizando el potenciador del gen patched (ptc) y activó fkh[250con]-lacZ ectópicamente en la cabeza del embrión (Ryoo y Mann, 1999).

El gen odd paired es regulado positivamente por Antp y Abd-A en la constricción del intestino y negativamente por Ultrabithorax (Ubx) y Decapentaplegic (Dpp) (Cimborá y Sakonju, 1995)

El gen serrate es requerido en la morfogénesis del cinturón de denticulas y los ganchos bucales, es activado durante la etapa del desarrollo embrional 11 por Ubx y Abd-A pero no así en los parasegmentos donde Antp se expresa (Wiellette y McGinnis, 1999).

El gen dpp codifica para una proteína de señalización de la clase TGF $\beta$ , este es regulado positivamente en el intestino medio por Ubx y negativamente por Abd-A. Un fragmento de 813 pb del potenciador de dpp es capaz de dirigir la expresión del gen reportero lacZ con el mismo patrón en el intestino medio en mesodermo. La expresión ectópica de Antp es capaz de activar este potenciador en regiones anteriores, aún y cuando normalmente no lo active (Manak *et al.*, 1994).

Se puede incluir a los genes que son reprimidos por el fenómeno de la dominancia posterior, término que describe la regulación cruzada entre los genes Hox, y las consecuencias fenotípicas de su expresión. Este modelo se vió fortalecido con la evidencia bioquímica que Ubx podría reprimir a Antp uniéndose directamente a uno de

sus promotores (Beachy *et al.*, 1988). Se ha demostrado que Antp expresada ectópicamente en regiones más anteriores es capaz de reprimir a lab, pb y a Scr, sin embargo el mecanismo de represión molecular aún no ha sido determinado (Gibson y Gehring, 1988; Miller *et al.*, 2001; Sprecher *et al.*, 2004).

Además de su función como sitio de reconocimiento de ADN, los homeodominios están implicados en unión a ARN (Rivera-Pomar *et al.*, 1996), secreción, penetración (Prochiantz y Joliot, 2003) e interacciones proteína-proteína (Benassayag *et al.*, 2003; Bondos *et al.*, 2004; Mikkola *et al.*, 2001).

### **3.12 Interacciones homeóticas proteína-proteína**

Tras la publicación de la interacción proteína-proteína Antp-Eyeless (Plaza, 2008) se han publicado reportes de proteínas con homeodominio que interactúan entre si (Baëza *et al.*, 2015; Hudry *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 2009) en los cuales se ha observado que el HD posee mucha importancia no solo en términos de su capacidad de reconocimiento y asociación al ADN, sino también en su habilidad para interactuar con otras proteínas, específicamente otras homeoproteínas, y que dentro de este dominio altamente conservado es posible señalar la posición 19 de la primer hélice como la principal responsable de mediar dichas interacciones.

De los resultados publicados en años recientes el descubrimiento de la homodimerización de Scr (Papadopoulos *et al.*, 2012) es el mas relevante para esta tesis en la que basados en el alto porcentaje de identidad que poseen Antp y Scr entre sí se propone que el mecanismo molecular de represión de Antp sobre Scr esta mediado por interacciones proteína-proteína debido al alto porcentaje de identidad que poseen estas proteínas entre sí, mas específicamente se espera que esta interacción ocurra a través de la primer hélice del homeodominio de ambas proteínas.

## **4 JUSTIFICACIÓN**

Uno de los objetivos de la Biología del Desarrollo consiste en determinar cómo las homeoproteínas llevan a cabo sus funciones reguladoras sobre los genes blanco, durante el desarrollo de los organismos. Debido a que algunos de los mecanismos moleculares más conservados son el reconocimiento de ADN, unión a ARN, secreción, penetración e interacciones proteína-proteína así como homeoproteínas que interactúan entre sí con funciones reguladoras, por lo que el análisis de las interacciones proteína-proteína entre los homeodominios podría proveer datos para dilucidar el complejo mecanismo que determina la especificidad funcional de las homeoproteínas. Este trabajo de tesis describe la interacción molecular proteína-proteína que existe entre Antennapedia y Sex combs reduced en cultivo celular utilizando dos métodos de análisis molecular.

## **5 HIPÓTESIS**

La interacción molecular proteína-proteína de las homeoproteínas Scr y Antp se realiza a través de los homeodominios, específicamente en la región que corresponde a la hélice I afectando la actividad transcripcional de Antp

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Caracterizar la interacción molecular proteína-proteína que existe entre las homeoproteínas Antennapedia y Sex Combs Reduced.

### **6.2 Objetivos particulares**

1. Determinar si existe interacción molecular proteína-proteína de Antp y Scr mediante BiFC
2. Analizar los dominios funcionales responsables de la interacción Antp-Scr mediante BiFC
3. Explorar si la hélice I de los homeodominios afecta su interacción con Exd mediante ensayos de BiFC
4. Determinar si la interacción proteína-proteína Antp-Scr afecta la actividad transcripcional de Antp
5. Analizar si la actividad transcripcional de Antp se ve afectada por los dominios potencialmente involucradas en la interacción Antp-Scr

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en células HEK293

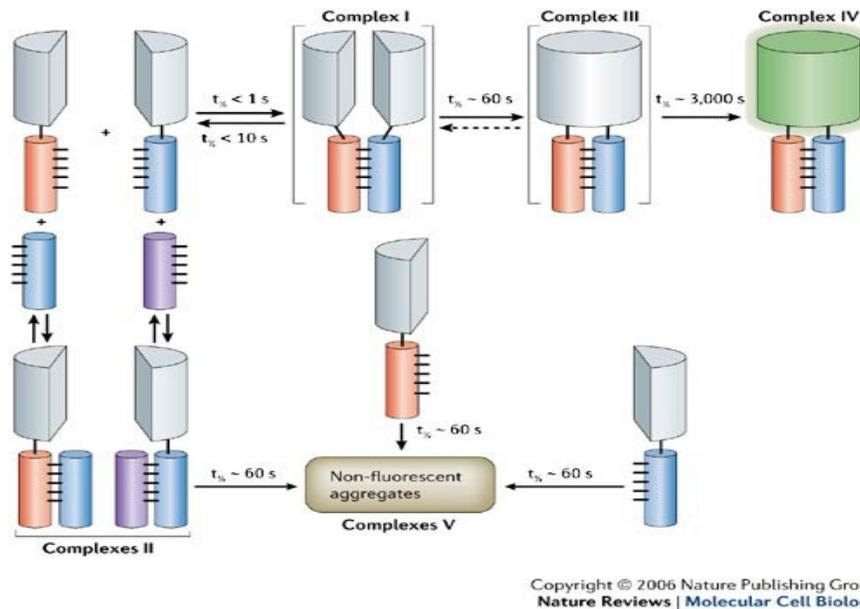
#### 7.1.1 Fundamento del análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante BiFC

La técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) consiste en analizar pares de genes que codifican proteínas híbridas compuestas por la proteína de interés fusionada al extremo N-terminal o C-terminal de la proteína Venus. Cuando existe interacción molecular entre la proteína fusionada al extremo amino-terminal de Venus y la proteína fusionada al extremo carboxilo-terminal de Venus, los fragmentos de Venus interaccionan y se produce fluorescencia. En esta tesis se utilizaron células HEK293 para llevar a cabo la transfección con los plásmidos recombinantes de los genes de interés.

En el laboratorio ya se encontraban disponibles los plásmidos con las proteínas de fusión con el extremo carboxilo de Venus para Antennapedia (pCS2VC155-Antp), así como las diversas versiones mutadas de la misma, estas son: la que tiene el homeodominio deletado (pCS2VC155-Antp $\Delta$ HD), solamente la primera y segunda hélice del homeodominio deletado (pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1-2), únicamente la primera hélice del homeodominio deletado (pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1), así mismo se contaba con una mutante en la que el tetrapéptido YPWM fue sustituido por un bloque de alaninas (pCS2VC155-Antp<sup>AAAA</sup>) y otra en la que la posición 19 del homeodominio fue sustituida por glicina (pCS2VC155-Antp<sup>G19</sup>).

Además de los plásmidos con los que se contaba en el laboratorio las construcciones de Sex combs reduced fusionadas tanto al extremo carboxilo como el extremo amino de Venus fueron amablemente proveídas por Dimitris Papadopoulos (pCS2VC155-Scr, pCS2VNm9-Scr) así como las construcciones en las que la posición 19 de Sex combs reduced fue sustituida por glicina (pCS2VC155-Scr<sup>G19</sup>, pCS2VNm9-Scr<sup>G19</sup>).

Del mismo modo la proteína de fusión Extradenticle con el extremo amino de Venus se encontraba previamente en el laboratorio (pCS2VNm9-Exd), así como también el plásmido pECFP-N1.



**Figura 7: Representación esquemática del ensayo de interacción molecular mediante BiFC.**

La asociación inicial entre las proteínas de interés (señaladas en rojo y azul) provoca la formación de un complejo estable (Complejo I) que permite la unión de los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente Venus (Complejo III) que posteriormente se reconstituye recuperando así su capacidad de emisión (Complejo IV). Otras interacciones de las proteínas fusionadas tanto con proteínas de interés no fusionadas al reportero como con otros componentes que compitan con la interacción estudiada producen complejos incompletos (Complejos II) que permanecerán con el restos de los agregados celulares no fluorescente (Complejos V).

Tomado de Kerppola, 2006.

### 7.1.2 Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2-VC155-Scr<sup>AAAA</sup> y pCS2-VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>

La técnica de mutagénesis sitio dirigida se realizó utilizando el estuche comercial QuikChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, La Jolla, CA, E.U.A.) y los oligonucleótidos diseñados, y permitió la sustitución (por codones de alaninas) de los codones que codifican para el tetrapéptido YPWM para posteriormente llevar acabo la construcción de los siguientes plásmidos mutagénicos:

- pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup>
- pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>

La mutagénesis se realizó mediante PCR utilizando como molde los plásmidos pCS2VC155-Scr y pCS2VNm9-Scr respectivamente, con oligonucleótidos que hibridan en las regiones adyacentes a los nucleótidos a sustituir amplificando en la dirección contraria a la del sitios que se mutagenizó.

Se realizó el diseño de oligonucleótidos adyacentes a los sitios que se mutaron cuidando de colocar las diferencias nucleotídicas en el extremo 5' del oligonucleótido. Para el diseño se buscó que los oligonucleótidos tuvieran una longitud de no mas de 30 nucleótidos y que la Tm mínima fuera de 60°C, que contaran con al menos dos guaninas o citocinas en el extremo 3', que no formaran homodímeros con  $\Delta G$  menor a -3 kcal/mol. Además, se evitó que el juego de oligonucleótidos formaran heterodímeros con una  $\Delta G$  menor a -7 kcal/mol.

Para obtener ambas construcciones se utilizaron los oligonucleótidos sen.YPWMmut2<sup>AAAA</sup> y ant.YPWMmut2<sup>AAAA</sup> cuyas secuencias se encuentran descritas en la Tabla 1.

**Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pCS2VC155-Scr y pCS2VNm9-Scr para la generación de mutantes de Scr**

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm (°C)
sen.YPWMmut2 <sup>AAAA</sup>	GCCGCGAAGCGAGTACATCTCGGGACGAG	68.1
ant.YPWMmut2 <sup>AAAA</sup>	CGCAGCTATCTGCGGCGGGTTCTTCTTCC	67.1

La reacción de PCR se realizó con 26  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l de Buffer de la enzima, 4  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de dNTP's 20 mM, 4  $\mu$ l de cada oligonucleótido 2.5 mM, 1  $\mu$ l de templado y 1  $\mu$ l de enzima Platinum Pfx ADN Polymerase 2.5 U/ $\mu$ l (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.). El programa de PCR empleado se encuentra descrito en la Tabla 2.

**Tabla 2: Programa de PCR utilizado para la mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pCS2VC155-Scr y pCS2VNm9-Scr**

Temperatura	Duración	
95 °C	2 min	
95 °C	30 seg	←
62 °C	30 seg	← 35×
70 °C	5 min	←
70 °C	5 min	

De la amplificación mediante PCR con la enzima Pfx, se obtuvieron los productos con las sustituciones; estos productos fueron tratados con la enzima *DpnI* (50 µl de la PCR, 6 µl Buffer Tango, 1 µl de enzima *DpnI* 20 U/µl y 3 µl de H<sub>2</sub>O) durante 1 h a 37 °C para eliminar ADN molde, seguido de 20 minutos a 80 °C para la inactivación de la enzima. Los 60 µl de reacción fueron cargados en un gel de agarosa 1.0%. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, E.U.A.). Posteriormente el ADN purificado se resuspendió en un reacción final de 30 µl compuesta por los 20 µl del ADN purificado, 3 µl de enzima ligasa, 3 µl de Buffer de ligasa 10× y 4 µl de H<sub>2</sub>O (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.), para ser incubado toda la noche.

Finalmente el producto de la ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5α Ca<sup>++</sup> competentes, agregando 15 µl del producto de ligación a alícuotas de 100 µl de bacterias Ca<sup>++</sup> competentes, las cuales se incubaron durante 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se dio un choque térmico de 90 segundos a 42 °C y se incubó inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 100 µl de medio LB y se dejaron durante 15 minutos a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al término de este tiempo se sembró en placas con agar LB y 100 mg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C toda la noche.

Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación de los plásmidos se inocularon en tubos de ensayo con 3 ml de medio LB y 8 µl de ampicilina 50 mg/ml. los tubos se incubaron en agitación constante de 200 rpm a 37 °C durante toda la noche para la

posterior obtención de los ADN plasmídicos (miniprep) por el método de lisis alcalina modificado de Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989), como se describe a continuación: un volumen de 1.5 ml de cada cultivo bacteriano se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Los cultivos se centrifugaron por 2 minutos a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante, se añadió el resto del cultivo y se volvió a centrifugar para procesar los 3 ml del cultivo, de nuevo se desechó el sobrenadante y se agregó 125 µl de solución I (Tris-Hcl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 con RNAsa A (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.) a una concentración final de 0.02 mg/ml), los paquetes celulares se resuspendieron mediante agitación por pipeteo y posterior homogenización por vortex y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se les añadió 125 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión e inmediatamente se agregó 125 µl solución III (KOAc 5 M, CH<sub>3</sub>COOH) previamente enfriado en hielo, se agitaron por inversión y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación los tubos se sometieron a centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes que contenían el ADN plasmídico se transfirieron a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 ml donde se les agregó 1 volumen de isopropanol y se incubaron a -20 °C durante 10 minutos, al termino de la incubación se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se descarto el sobrenadante. Finalmente pastillas se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se resuspendieron en 30 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura.

Los ADN plasmídicos se visualizaron en geles de agarosa al 1.0% y fueron caracterizados con enzima de restricción con una reacción final ajustada a 10 µl (2 µg de ADN, 0.5 µl de la enzima, 1 µl de Buffer de la enzima 10× y ~7 µl de H<sub>2</sub>O). Se utilizó la enzima *Pst*I que lineariza los plásmidos con el tetrapéptido YPWM sustituido por alaninas dado el diseño de los oligonucleótidos para la mutagénesis sitio dirigida.

Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México).

Posteriormente se transformaron los plásmidos confirmados en bacterias Ca<sup>++</sup> competentes siguiendo la estrategia de transformación previamente descrita.

### 7.1.3 Preparación del ADN para los ensayos BiFC

Las bacterias con los siguientes plásmidos:

- pECFP-N1
- pCS2VC155-Antp
- pCS2VC155-Antp $\Delta$ HD
- pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1-2
- pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1
- pCS2VC155-Antp<sup>G19</sup>
- pCS2VC155-Antp<sup>AAAA</sup>
- pCS2VNm9-Exd
- pCS2VNm9-Scr
- pCS2VNm9-Scr
- pCS2VNm9-Scr<sup>G19</sup>
- pCS2VNm9-Scr<sup>G19</sup>
- pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>
- pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>

Se cultivaron en 100 ml de medio LB con ampicilina 50 mg/ml al 0.2 % durante 12-18 h a 37 °C en agitación constante a 150 rpm para obtener suficiente biomasa para realizar una extracción a mediana escala con la ayuda del estuche comercial Qiagen (Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Handbook, Valencia, CA. E.U.A.)

El protocolo se basa en un procedimiento descrito por el proveedor en el cual los cultivos bacterianos se transfirieron a tubos de 50 ml, se centrifugaron por 15 minutos a 11, 000 rpm, se retiraron los sobrenadantes por decantación (por duplicado para procesar los 100 ml de cultivo) y los paquetes celulares se resuspendieron con 4 ml de buffer P1 (20 mg/ml de RNAsa A) mediante pipeteo y vortex, inmediatamente después se les agregó 4 ml de Buffer P2, se agitó por inversión 5 veces e inmediatamente se agregaron 4 ml de Buffer P3 previamente enfriado en hielo, se agitó 10 veces por inversión y se dejó incubar en hielo por 30 minutos.

Los lisados celulares se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C; al mismo tiempo se equilibraron columnas de Qiagen aplicando 4 ml de Buffer QBT y se dejó fluir por gravedad. Posteriormente se cargaron los sobrenadantes obtenidos en la

centrifugación dejando fluir por gravedad. Después de esto de lavaron las columnas con 4 ml de Buffer QC. Los ADN unidos en las columnas se eluyeron en tubos nuevos agregando 5 ml de Buffer QF. Se agregaron 3.5 ml de isopropanol absoluto y se mezcló por inversión para después centrifugar a 11,000 durante 15 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol 70% repitiendo el proceso previo de centrifugación. Posteriormente las pastillas se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura.

Para el análisis de la calidad y la concentración de ADN se midió la absorbancia con luz ultravioleta en un espectrofotómetro ND-1000 de la compañía NanoDrop (Waltham, Massachusetts, E.U.A.). Los plásmidos para los ensayos de transfección contaron con una pureza de 1.8-2.0 en su relación Abs 260/280.

#### **7.1.4 Transfecciones y cuantificación del porcentaje de interacción**

Los ensayos BiFC se realizaron en células HEK293 cultivadas en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, E.U.A.) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de ampicilina/estreptomina en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 95% de humedad relativa y 37 °C. Los plásmidos utilizados para las transfecciones están nombrados en la Tabla Error: Reference source not found.

**Tabla 3: Plásmidos usados en los ensayos de transfección en células HEK293 para los ensayos BiFC**

Plásmidos pCS2VNm9	Plásmidos pCS2VC155	Plásmido control
pCS2VNm9-Exd	pCS2VC155-Antp	pECFP-N1
pCS2VNm9-Scr	pCS2VC155-Antp $\Delta$ HD	
pCS2VNm9-Scr <sup>G19</sup>	pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1-2	
pCS2VNm9-Scr <sup>AAAA</sup>	pCS2VC155-Antp $\Delta$ 1	
	pCS2VC155-Antp <sup>G19</sup>	
	pCS2VC155-Antp	
	pCS2VC155-Scr	
	pCS2VC155-Scr <sup>G19</sup>	
	pCS2VC155-Scr <sup>AAAA</sup>	

Las células HEK293 fueron sembradas 24 h antes del ensayo de transfección en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. E.U.A.) a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pozo en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri E.U.A.) suplementado con 10% de SFB y 1% de ampicilina en una atmósfera de 95% de humedad, 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las transfecciones celulares se realizaron incubando a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (denominado TUBO A) 6  $\mu$ g de ADN plasmídico (2  $\mu$ g de cada plásmido) y 94  $\mu$ l de solución NaCl 150 mM. En un segundo tubo Eppendorf de 1.5 ml (denominado TUBO B), se agregó 6  $\mu$ l del compuesto PEI 15 mM con 94  $\mu$ l de solución NaCl 100 mM. Se mezclaron ambas reacciones añadiendo el contenido del TUBO B al TUBO A y la mezcla se incubó durante 30 minutos. Se añadió la mezcla a las células cultivadas por goteo suave. Después de 6-8 horas, se cambió el medio. Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Al final de este tiempo de incubación, las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia para la detección de la fluorescencia de Venus, utilizando un aumento de 20X. El porcentaje de células positivas de interacción

se obtuvo al realizar los conteos mayores a 100 células por ensayo donde se observó que presentaron fluorescencia control (señal azul) y fluorescencia por complementación bimolecular (señal amarilla).

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y como análisis post-hoc se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey, ambos análisis se llevaron a cabo en el programa PSPP con datos obtenidos en tres ensayos independientes con tres repeticiones por tratamiento. Las medias y desviaciones promedio de las observaciones se detallan en el Apéndice I.

## **7.2 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de transactivación en células HEK293**

Los ensayos de transactivación se fundamentan en la habilidad de Antp para promover la transcripción de genes cercanos a su secuencia de reconocimiento. Para llevar a cabo la reacción de transactivación se requiere un plásmido productor de Antp o mutantes de la misma en este caso se utilizó el plásmido pNPAC, por otro lado se requiere del plásmido reportero pGLH11 el cual contiene 11 sitios de unión para Antp, que puede dirigir la expresión del gen reportero (gen de la luciferasa) de tal manera que al activarse se expresa luciferasa. Finalmente, la luciferasa fue medida en un luminómetro. Para corroborar interacciones entre dos proteínas, se agrega un plásmido productor de la otra proteína en este caso Scr o algunas de sus mutantes, un cambio en los niveles de transactivación indican una interacción en este caso entre Antp y Scr o algunas de sus mutantes. Adicionalmente, se transfecta con el plásmido pcopia-βgal el cual se emplea para normalizar la transfección entre los ensayos, a partir de los niveles de transfección de cada pozo.

En el laboratorio se contaba con los plásmidos pNPAC-Antp, pNPAC-Antp<sup>G19</sup>, pNPAC-Antp<sup>AAAA</sup> y pNPAC-Exd, así como los plásmidos control pcopia-βgal y pGLH11.

### **7.2.1 Construcción de los plásmidos recombinantes pNPAC Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup>**

La subclonación de Scr y las mutantes Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup> consistió en amplificar las secuencias codificantes de Scr mediante PCR utilizando como molde los plásmidos

pCS2VNm9-Scr, pCS2VNm9-Scr<sup>G19</sup>, pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>, los oligonucleótidos ScrNot5 y ScrNot3 (Tabla Error: Reference source not found) los cuales añaden un sitio NotI a cada extremo del producto de PCR, subclonándolos a plásmidos pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>, generando los plásmidos pCR2.1-TOPO-Scr, pCR2.1-TOPO-Scr<sup>G19</sup> y pCR2.1-TOPO-Scr<sup>AAAA</sup>. Estos amplicones luego fueron subclonados al vector pNPAC, digiriendo los plásmidos pTOPO con la enzima NotI y ligándolos al vector pNPAC previamente abierto con la misma enzima.

**Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para amplificar Scr y sus mutantes en pNPAC mediante el uso del vector pCR2.1-TOPO**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)
ScrNot5'	GCGGCCGCATGGGATCCCGACTGTTTTGCGAT	70.9
ScrNot3'	GCGGCCGCCATGGCAATCGAACCGAGATTAAGG	69.2

La amplificación se realizó mediante el uso del estuche comercial Platinum<sup>®</sup> Taq ADN Polymerase High Fidelity utilizando 0.4 µl de la polimerasa Taq HF con 1 µl de dNTP's 20 mM, 4 µl del oligonucleótido ScrNot5' y 4 µl del oligonucleótido ScrNot3' (descritos en la Tabla Error: Reference source not found a una concentración de 2.5 mM) y 100 ng de ADN molde en una reacción con volumen final de 50 µl y los cuales se colocaron en el termociclador Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Biorad, Hercules, CA, E.U.A.) utilizando el programa de PCR descrito en la Tabla Error: Reference source not found.

**Tabla 5: Programa de PCR utilizado para amplificar los fragmentos de Scr y sus mutantes**

Temperatura	Duración
95 °C	2 min
95 °C	30 seg
62 °C	1 min
70 °C	1 min
70 °C	5 min

←  
← 35×  
←

La ligación se realizó con 4.2 µl de los productos de las PCR, 0.8 µl del vector pCR<sup>®</sup> 2.1- TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, California, E.U.A.) y 1 µl de solución salina

(incluida en el kit pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> ), incubándose toda la noche, para la obtención de los plásmidos pCR2.1-TOPO-Scr, pCR2.1-TOPO-Scr<sup>G19</sup> y pCR2.1-TOPO-Scr<sup>AAAA</sup>. La identidad de las construcciones se confirmó mediante enzimas de restricción diagnosticas. Se digirió en una solución (2 µg de ADN, 0.5 µl de enzima, 1 µl del respectivo Buffer 10X y H<sub>2</sub>O para llegar a un volumen final de 10 µl) y posteriormente se comprobó la integridad de la secuencia por secuenciación.

Los plásmidos pCR2.1-TOPO-Scr, pCR2.1-TOPO-Scr<sup>G19</sup> y pCR2.1-TOPO-Scr<sup>AAAA</sup> fueron digeridos con la enzima NotI 1.5 µl de ADN, 1 µl de enzima, 3 µl de Buffer 10X y 25 µl de H<sub>2</sub>O incubándose 5 h a 37°C. Se visualizaron los fragmentos obtenidos de las digestiones en un gel de agarosa al 1.0%. Se purificó el ADN de las bandas de los fragmentos de Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup> y del vector pNPAC (de la digestión de pNPAC-AntpWT) utilizando el estuche comercial Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, E.U.A.). Posteriormente, se ligaron con una reacción 8 µl de los fragmentos codificantes para la proteína Sex combs reduced y sus mutantes, 8 µl del vector pNPAC utilizando 1 µl de enzima ligasa T4, 2 µl de Buffer 10X y 1 µl de H<sub>2</sub>O, para obtener como productos finales los plásmidos recombinantes pNPAC-Scr, pNPAC-Scr<sup>G19</sup> y pNPAC-Scr<sup>AAAA</sup>.

Las reacciones de ligación pNPAC-inserto fueron transformadas en bacterias *E. coli* Ca<sup>++</sup> competentes (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando 5 µl de la ligación en 100 µl de bacterias y sembrando esta reacción en placas de LB con ampicilina.

Se levantaron las colonias obtenidas y se inocularon en 3 ml de LB con 10 µl de ampicilina.

Los plásmidos que confirmamos fueron transformados en bacterias *E. coli* Ca<sup>++</sup> competentes, levantándose colonias que fueron inoculadas en 3 ml de LB con 10 µl de ampicilina (50 mg/ml) y finalmente fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

### 7.2.2 Obtención de los plásmidos recombinantes

Las bacterias *E. coli* que contenían los plásmidos:

- pNPAC-Antp
- pNPAC-Antp<sup>G19</sup>
- pNPAC-Exd
- pNPAC-Scr
- pNPAC-Scr<sup>G19</sup>
- pNPAC-Scr<sup>AAAA</sup>
- pcopia-βgal
- pGLH11

Se propagaron en 100 ml de medio LB (Luria-Bertani) con 0.2% de ampicilina (50 mg/ml) durante 12-16 h a 37°C en agitación constante a 140 rpm, la obtención de los plásmidos se realizó mediante una preparación a mediana escala con la ayuda del estuche comercial Qiagen (Qiagen ® Plasmid Handbook, Valencia, CA, E.U.A) con el procedimiento previamente.

El análisis de calidad y concentración de los ADNs purificados se llevó a cabo por espectrofotometría en un equipo marca NanoDrop modelo ND-1000 (Waltham, Massachusetts, E.U.A.), descartando las muestras que no presentaron una proporción 260/280 de 1.8-2.0.

### 7.2.3 Análisis de la interacción molecular Antp-Scr mediante ensayos de transactivación en células HEK293

Los ensayos de transactivación consistieron en transfectar células HEK293 con los plásmidos que contenían la secuencia codificante para Antp y sus mutantes, los cuales se unen a los once sitios de unión BS2 (Operator binding site 2) del plásmido reportero pGLH11. La co-transfección con los plásmidos que contenían las secuencias codificantes para Scr y sus mutantes modificaron los niveles de expresión de luciferasa como resultado de la interacción con Antp, limitando la interacción de Antp con los sitios BS2.

Los ensayos de transactivación se realizaron en células HEK293 cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB (SIGMA, Saint Louis, Missouri E.U.A.) y 1% de ampicilina a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Se usó el reactivo de transfección PEI de ADN

plasmídico de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, Carlsbad, California, E.U.A.).

Los ensayos se realizaron transfectando células HEK293 con el plásmido pcopia-βgal como control interno de transfección, uno de los plásmidos productores de la proteína Antp o Antp<sup>G19</sup> (pNPAC-Antp, pNPAC-Antp<sup>G19</sup>), y realizando los ensayos con y sin el plásmido productor de Scr o sus mutantes (pNPAC-Scr, pNPAC-Scr<sup>G19</sup> y pNPAC-Scr<sup>AAAA</sup>).

La proteína Antp dirige la expresión del gen Luciferasa codificado en el plásmido reportero pGLH11, el cual contiene once copias en tandem del sitio de unión a Antp BS2 que permite activar la transcripción del gen reportero Luciferasa. En presencia de Scr, la expresión de Luciferasa cambia, lo que indica una interacción de Antp con Scr, al modificarse la unión a los sitios BS2, de tal manera que es determinado si existe un cambio de RLU (del inglés, Relative Luminescence Units) en presencia de Scr, se puede determinar cuáles mutantes interaccionan. Para este ensayo se utilizó como control positivo el plásmido pNPAC-Antp que activa de manera significativa la expresión de Luciferasa.

Las células HEK293 fueron sembradas 24 h antes del ensayo de transfección en placas de cultivo de 24 pozos (SIGMA, Saint Louis, Missouri, E.U.A.) a una densidad de  $4 \times 10^4$  células/pozo utilizando el compuesto PEI. En el TUBO A, la solución con ADN se preparó con 1.5 µg de ADN plasmídico incluyendo un plásmido productor de alguna Antp, el plásmido control pcopia-βgal y el plásmido reportero pGLH11 diluyendo en NaCl 150 mM, preparando un volumen final de reacción de 50 µl por pozo. En caso de los ensayos en presencia de Scr se incluyeron plásmidos productores de Scr y sus mutantes (pNPAC-Scr, pNPAC-Scr<sup>G19</sup> y pNPAC-Scr<sup>AAAA</sup>) para un total de 2 µg de ADN (0.5 µg de cada plásmido; Tabla Error: Reference source not found). En el TUBO B, se preparó la solución con PEI (0.4 µl PEI 15mM en 44.6µl NaCl 150 mM) y se mezcló suavemente durante 5-15 s. El contenido del TUBO B se agregó al TUBO A, se mezcló por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó a las células HEK293 por goteo suave. Después, se incubaron durante 48 h a

37°C con 5% CO<sub>2</sub> ; pasado este tiempo, se procedió a la obtención de extractos celulares para los análisis correspondientes de  $\beta$ -galactosidasa y luciferasa.

La preparación de extractos celulares consistió en remover el medio de cultivo y agregar 100  $\mu$ l de Buffer de Lisis Pasiva 1X (Promega, Madison, WI, E.U.A.). La reacción de lisis celular fue incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Después de un pipeteo vigoroso y lisis mecánica, las células se desprendieron y rompieron. El contenido de cada pozo se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml etiquetados y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm para obtener los sobrenadantes, en los cuales se encontraban las proteínas de interés; éstas fueron transferidas a tubos nuevos, etiquetados y almacenados a -70°C para evitar la inactivación de las proteínas. Se realizaron 3 ensayos independientes para generar una N de 9.

**Tabla 6: Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección en células HEK293 para los ensayos de transactivación**

Plásmidos productores	Plásmido reportero	Plásmido control
pNPAC-Antp	pGLH11	pcopia- $\beta$ gal
pNPAC-Antp <sup>G19</sup>		
pNPAC-Scr		
pNPAC-Scr <sup>G19</sup>		
pNPAC-Scr <sup>AAAA</sup>		

#### 7.2.4 Cuantificación de la expresión de genes luciferasa y $\beta$ -galactosidasa

La actividad del gen reportero  $\beta$ -galactosidasa se cuantificó mediante una reacción enzimática y colorimétrica. Para ello, se mezclaron 211  $\mu$ l de PBS 1X (0.1 M, pH 7.3), 3  $\mu$ l de buffer de magnesio (MgCl<sub>2</sub> 0.1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 5M), 66  $\mu$ l de CPRG 4 mg/ml (Roche, Penzberg, Alemania) y 20  $\mu$ l de extracto celular. La reacción se incubó por 2 h a 37°C; al término de este tiempo, se detuvo la reacción agregando 500  $\mu$ l de NaOAc 1M. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la reacción a 574 nm.

La bioluminiscencia se determinó siguiendo las instrucciones del estuche comercial Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, E.U.A.). Para la medición de luminiscencia, se empleó la función de luminiscencia del lector de placas Synergy<sup>TM</sup> HT (BioTek<sup>®</sup> Instruments, Inc. Winooski, VT, E.U.A.). Se transfirió 20  $\mu$ l de los extractos celulares a cada pozo de una placa de 96 pozos y se agregó 50  $\mu$ l del sustrato del estuche a cada pozo para la medición de luminiscencia. La reacción enzimática permite cuantificar las Unidades Relativas de Luz (RLU).

Los valores de RLUs obtenidos en los ensayos fueron normalizados multiplicando el valor de RLUs de cada pozo por el valor obtenido en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa para ese pozo y dividiéndolo entre el promedio de los valores en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en ese ensayo, permitiendo ajustar los valores en base de la sobretransfección o subtransfección de cada pozo. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza por bloques (ANOVA) en el programa “R” y como análisis post-hoc se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey, realizado en la herramienta disponible en línea del programa PSPP con datos obtenidos en tres ensayos independientes con tres repeticiones por tratamiento. Las medias y desviaciones promedio de las observaciones se detallan en el Apéndice I.

## 8 RESULTADOS

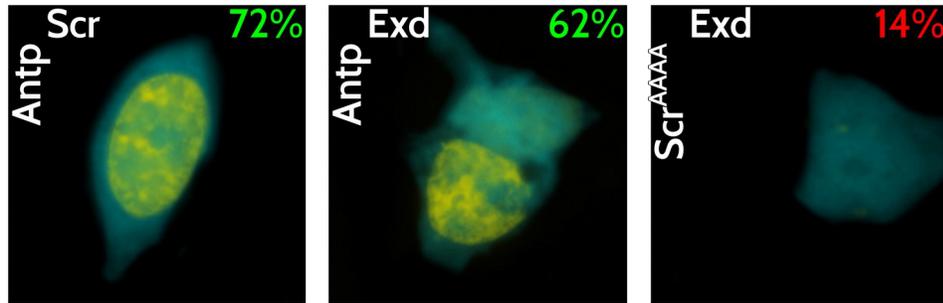
### 8.1 Interacción molecular de Antennapedia y Sex Combs Reduced mediante BiFC

La interacción de Antennapedia y Sex Combs Reduced se analizó inicialmente mediante ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC por sus siglas en inglés). BiFC se basa en la reconstitución o complementación de la fluorescencia por los fragmentos carboxilo (VC155) y amino-terminal (VNm9) de la proteína fluorescente Venus que son reunidos por dos proteínas que interactúan específicamente entre sí (Figura 7).

Los ensayos de BiFC consistieron en la co-transfección de plásmidos recombinantes del fragmento VC155 fusionado a Antp y múltiples mutantes de la misma y el fragmento VNm9 fusionado a Scr y múltiples mutantes de la misma. El plásmido pECFPN1 se utilizó como control de la transfección en todos los ensayos.

#### 8.1.1 Antennapedia interactúa con Sex Combs Reduced

Para analizar el primer objetivo de la tesis se buscó determinar si la interacción entre Antp y Scr tiene lugar usando la técnica BiFC en cultivo celular. Los resultados que se muestran en la Figura 8 fueron positivos mediante BiFC evidenciando la interacción de las proteínas de fusión Antp-VC y Scr-VN con un 72%. En esta serie de ensayos se probó la consistencia de la técnica BiFC utilizando Exd, un factor con conocida interacción con Antp, como control positivo obteniéndose un resultado de 62% consistente con lo esperado. Del mismo modo se usó un control negativo mediante la evaluación de la interacción de una versión de Antp con el tetrapéptido substituido por un bloque de alaninas de nuevo obteniéndose un resultado negativo consistente con lo reportado previamente (11%).



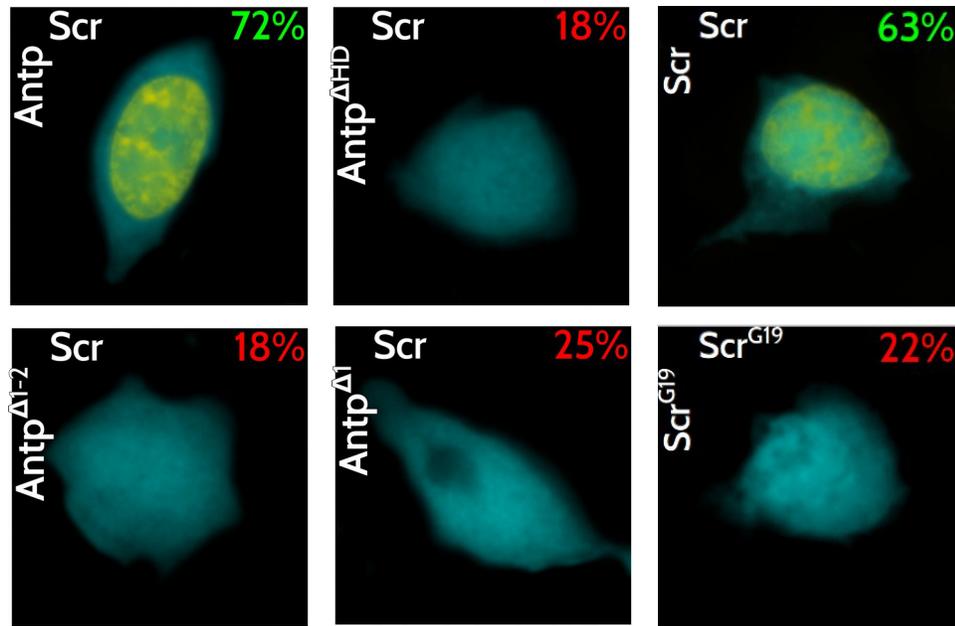
**Figura 8: Visualización de la interacción de Antennapedia con Sex Combs Reduced. mediante BiFC.** Imágen representativa de las células HEK transfectadas, con la cuantificación de las interacciones Scr-Antp mediante la técnica de BiFC, el número en la esquina superior derecha indica el porcentaje de células que presentaron interacción mediante la reconstitución de Venus. Se presenta la interacción de Antennapedia con Sex Combs Reduced del lado izquierdo (72%) y el control positivo, la interacción entre Antennapedia y Extradenticle, en la figura intermedia (62%). Se muestra, como control negativo, la ausencia de interacción entre Extradenticle y una versión de Antennapedia con el motivo YPWM sustituido por un bloque de alaninas (14%) en el lado derecho. En todos los ensayos se usó la proteína ECFP como control de transfección.

## 8.2 Análisis de los dominios funcionales responsables de la interacción Antp-Scr mediante BiFC

### 8.2.1 El homeodominio de Antp es necesario en la interacción Antp-Scr

Tras determinar que la interacción entre Antp y Scr existe se procedió a buscar el dominio de interacción involucrado usando una serie de mutantes de Antp. Estas se caracterizan por tener deleciones de diferente tamaño del homeodominio, siendo estas Antp $\Delta$ HHD con la deleción del homeodominio completo, Antp $\Delta$ 1-2 con las hélices I y II deletadas y Antp $\Delta$ 1 con solo la primer hélice deletada.

Los resultados obtenidos mediante BiFC en la Figura 9 muestran inequívocamente que el dominio de interacción Antp-Scr se encuentra dentro del homeodominio de Antp ya que su deleción reduce la interacción hasta un 18%, lo equivalente a más del 50% de reducción en la interacción observada en el caso de la proteína no deletada (72%). Mas específicamente se puede deducir que la interacción Antp-Scr se encuentra determinada por la primer hélice del homeodominio se puede observar de los ensayos con la versión de Antp sin las hélices I y II de Antp (reducción hasta el 18% de interacción) así como los ensayos con la versión que solo carece de la primer hélice (reducción hasta el 25% de interacción).



**Figura 9: El homeodominio de Antennapedia permite la interacción Scr-Antp.**

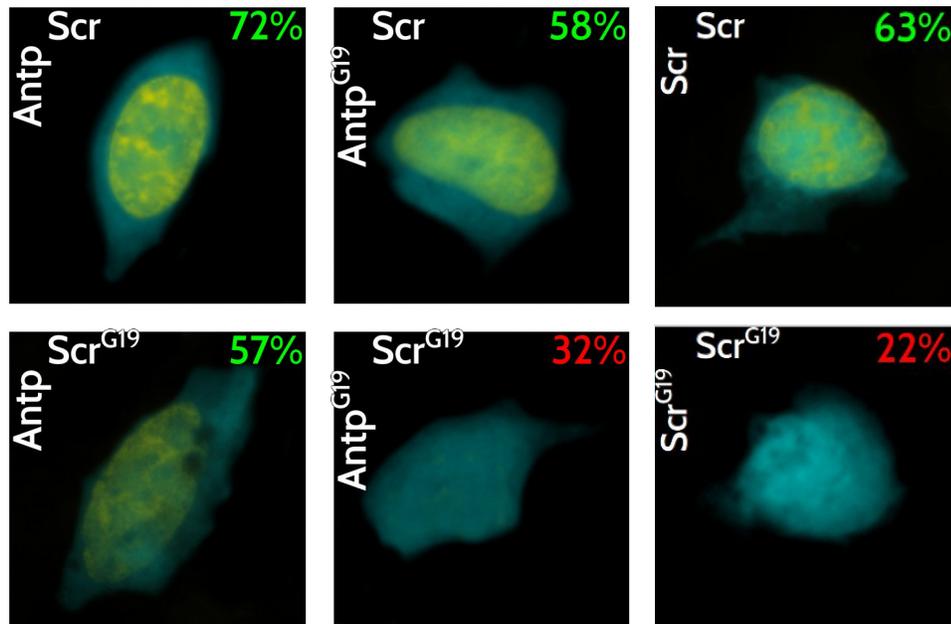
Imágenes representativas de las células HEK transfectadas para la cuantificación de las interacciones Scr-Antp mediante la técnica de BiFC. El número en la esquina superior derecha indica el porcentaje de células que presentaron interacción mediante la reconstitución de Venus. La interacción de Scr con Antennapedia muestra que el dominio debe estar localizado en el homeodominio de Antp específicamente en la hélice I ya que se disminuye drásticamente la interacción, de 72% hasta entre un 18% y 25% cuando esta es deletada. Del lado derecho se observa la homodimerización de Scr (panel superior) así como la no-dimerización previamente reportada para Scr<sup>G19</sup> (panel inferior). En todos los ensayos se usó la proteína ECFP como control de transfección.

### 8.2.2 La posición 19 de la hélice I de los homeodominios de Antp y Scr esta involucrada en la interacción Antp-Scr

Después de determinar que el dominio de interacción entre Antp y Scr se encontraba en la primer hélice del homeodominio se procedió a evaluar si esta dependía de la posición 19 del homeodominio como se ha reportado previamente para la homodimerización de Scr.

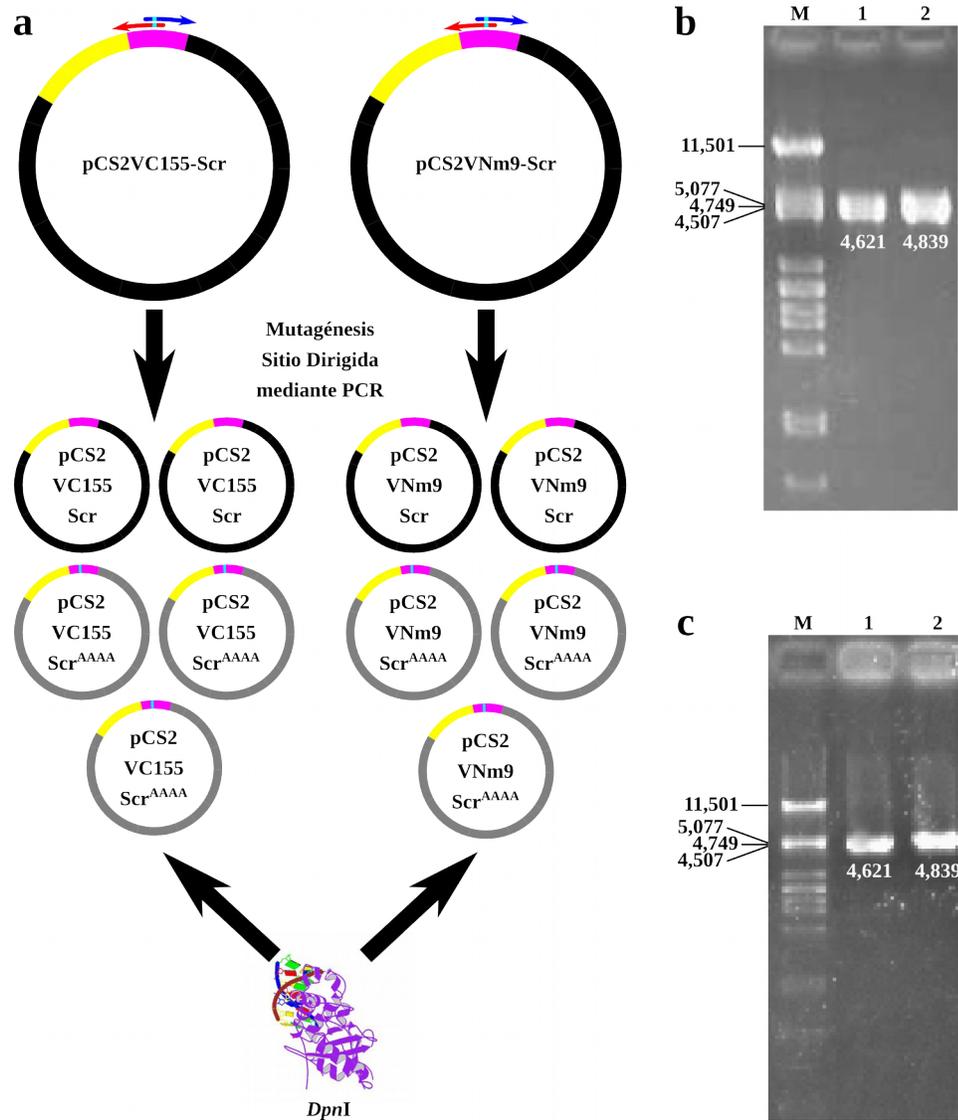
La cotransfección de las mutacntes G19 de Antp y Scr muestran en la Figura 10 que la interacción efectivamente se muestra ligeramente afectada si se evalúan versiones silvestres de las proteínas Antp y Scr contra versiones en la que la posición 19 ha sido sustituida por alanina. En el caso de Antp-Scr<sup>G19</sup> se observa una reducción a 57% y en el caso de Antp<sup>G19</sup>-Scr a 58%. Sin embargo cuando se evaluó la interacción de las dos

mutantes simultáneamente, i.e. Antp<sup>G19</sup>-Scr<sup>G19</sup>, la interacción se reduce drásticamente a un 32%, evidenciando la importancia de la posición 19 en ambas homeoproteínas.



**Figura 10: La interacción Antp-Scr depende de la posición 19 de la hélice 1 de los homeodominios**  
Imágenes representativas de las células HEK transfectadas para la cuantificación de las interacciones Scr-Antp mediante la técnica de BiFC. El número en la esquina superior derecha indica el porcentaje de células que presentaron interacción mediante la reconstitución de Venus. Se observa en el panel superior derecho la interacción Antp-Scr, en los paneles superior derecho e inferior izquierdo se muestran reducciones parciales al evaluarse proteínas con una sustitución en la posición 19 de Antp (58%) y Scr(57%) respectivamente. En el panel inferior derecho se observa una reducción fuerte de la interacción al probarse ambas proteínas mutantes simultáneamente. Del lado derecho se observa la homodimerización de Scr (panel superior) así como la no-dimerización previamente reportada para Scr<sup>G19</sup> (panel inferior). En todos los ensayos se usó la proteína ECFP como control de transfección.

### 8.2.3 Construcción de los plásmidos recombinantes pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup> y pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>



**Figura 11: Construcción de plásmidos recombinantes pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup> y pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup>**

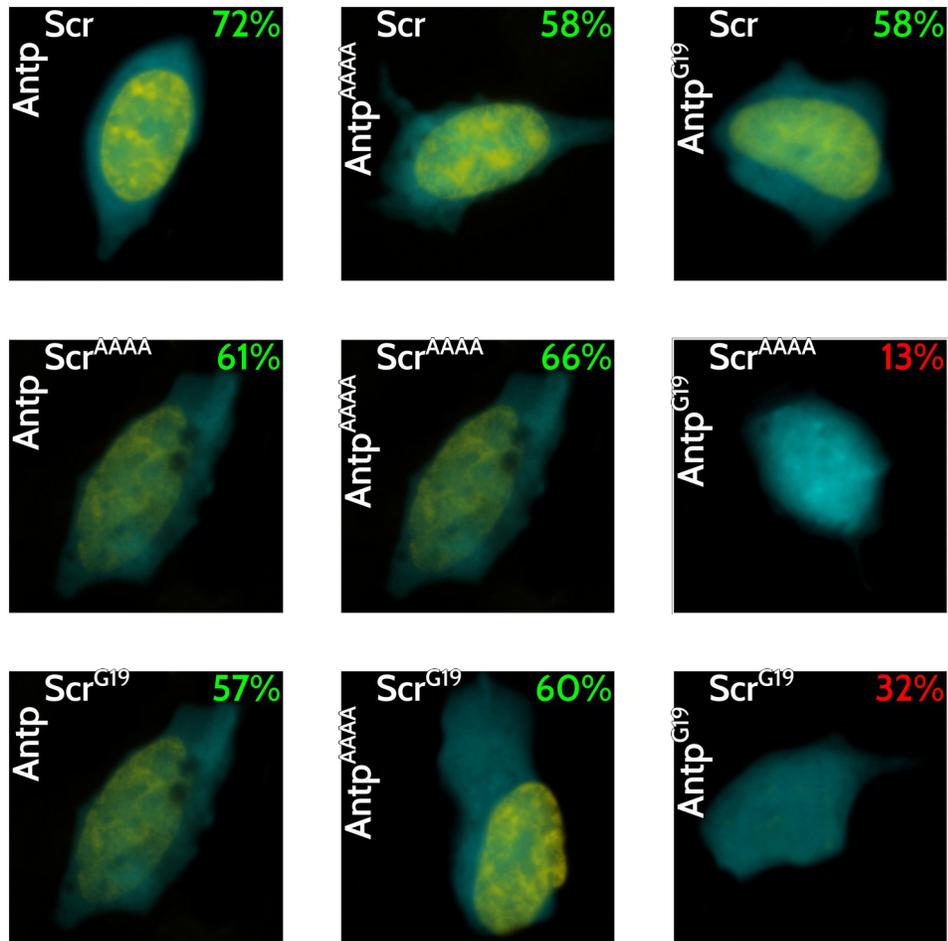
**A** Representación esquemática de la mutagénesis sitio dirigida de Scr en los vectores pCS2VC155 y pCS2VNm9. **B** Visualización de las reacciones de PCR comparados con el marcador de peso molecular  $\lambda$ +PstI (M), los plásmidos pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup> (1) y pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup> (2) muestran los tamaños esperados de 4,621 y 4,839 pares de bases respectivamente. **C** Linearización de los plásmidos pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup> (1) y pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup> (2) con la enzima PstI, de nuevo de usa el marcador  $\lambda$ +PstI (M).

Para identificar el efecto del tetrapéptido sobre la interacción de Antp y Scr se realizaron ensayos de complementación bimolecular fluorescente para los cuales se llevó a cabo la construcción de plásmidos con versiones mutantes del tetrapéptido en Scr. Se realizó una

mutagénesis sitio dirigida por PCR para obtener las construcciones pCS2VC155-Scr<sup>AAAA</sup> y pCS2VNm9-Scr<sup>AAAA</sup> que codifican para una Scr con una sustitución del tetrapéptido YPWM por un bloque de alaninas. Después de ligar y transformar los productos de PCR se realizaron minipreps los cuales fueron digeridos con la enzima *PstI* con lo que se lo linearizó el plásmido gracias al sitio de corte incluido en el bloque de alaninas lo que permitió seleccionarlas para enviarlas a secuenciar y así corroborar la integridad de la construcción (Figura 11).

#### **8.2.4 La interacción Antp-Scr no depende del tetrapéptido YPWM de ninguno de los homeodominios**

Los resultados de la Figura 11 muestran que la interacción entre Antp y Scr no se ve afectada cuando una versión de Antp con el tetrapéptido substituido por alaninas se pone a prueba con la versión de Scr con la posición 19 substituida (60%), sin embargo cuando una versión de Scr con el tetrapéptido substituido por alaninas se pone a prueba con la versión de Antp con la posición 19 substituida la interacción se afecta drásticamente la interacción, hasta un 13%. Este efecto es relevante ya que se afectó la interacción Antp-Scr aun por debajo de los niveles observados cuando se prueban las dos proteínas con la posición 19 substituida (32%).

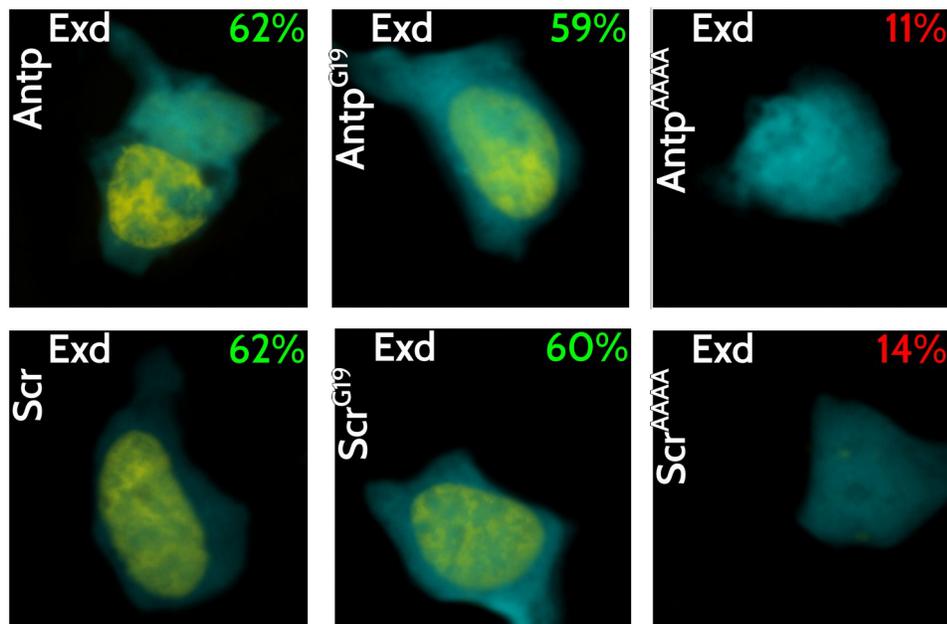


**Figura 12: El tetrapéptido YPWM de Antp y Scr no afecta la interacción Antp-Scr**

Imágenes representativas de las células transfectadas para la cuantificación de las interacciones usando la técnica de BiFC. El número en la esquina superior derecha indica el porcentaje de células que presentaron la reconstitución de Venus. La interacción Antp-Scr fue analizada en presencia de las mutantes Scr<sup>AAAA</sup> y Antp<sup>AAAA</sup>. La sustitución del tetrapéptido YPWM por <sup>AAAA</sup> en Scr y Antp tiene un efecto leve (58-61%). Sin embargo, en las figuras señalizadas en rojo se muestra que la interacción se vio severamente afectada por el dominio YPWM en Scr y cuando la posición 19 de Antp se ha sustituido por glicina (13%), en contraste cuando estas mutaciones se realizaron inversamente (Antp<sup>AAAA</sup> y Scr<sup>G19</sup>) no se afectó la interacción.

### 8.3 La posición 19 de la hélice I de Antp y Scr no afecta su interacción con Exd

Finalmente, también se determinó si las mutaciones de la posición 19 del homeodominio tienen algún efecto sobre la interacción conocida entre Antp y Exd así como entre Scr y Exd. Los ensayos de BiFC en la Figura 13 que la posición 19 no juega un papel relevante en la interacción con Exd de ninguna de las dos homeoproteínas, observándose valores muy semejantes a los obtenidos con las interacciones de las proteínas silvestres, 62% para la versión silvestre de Antp contra 59% de su versión mutada en la posición 19 y 62% para la versión silvestre de Scr contra 60% de su mutante.



**Figura 13: La posición 19 de la hélice I de Antp y Scr no afecta su interacción con Exd.** Imágenes representativas de las células transfectadas para la cuantificación de las interacciones mediante la técnica de BiFC. El número en la esquina superior derecha indica el porcentaje de células que presentaron la reconstitución de Venus. La interacción de Antp y Antp<sup>G19</sup> con Exd muestran que la posición 19 del HD no juega un papel en la interacción con Exd (62%-59%). El mismo efecto se observó en el caso de Scr y Scr<sup>G19</sup> (62%-60%). El control positivo fue el efecto previamente reportado de el tetrapéptido YPWM en la interacción con Exd.

## **8.4 Análisis de la interacción Antp-Scr sobre la actividad transcripcional de Antennapedia**

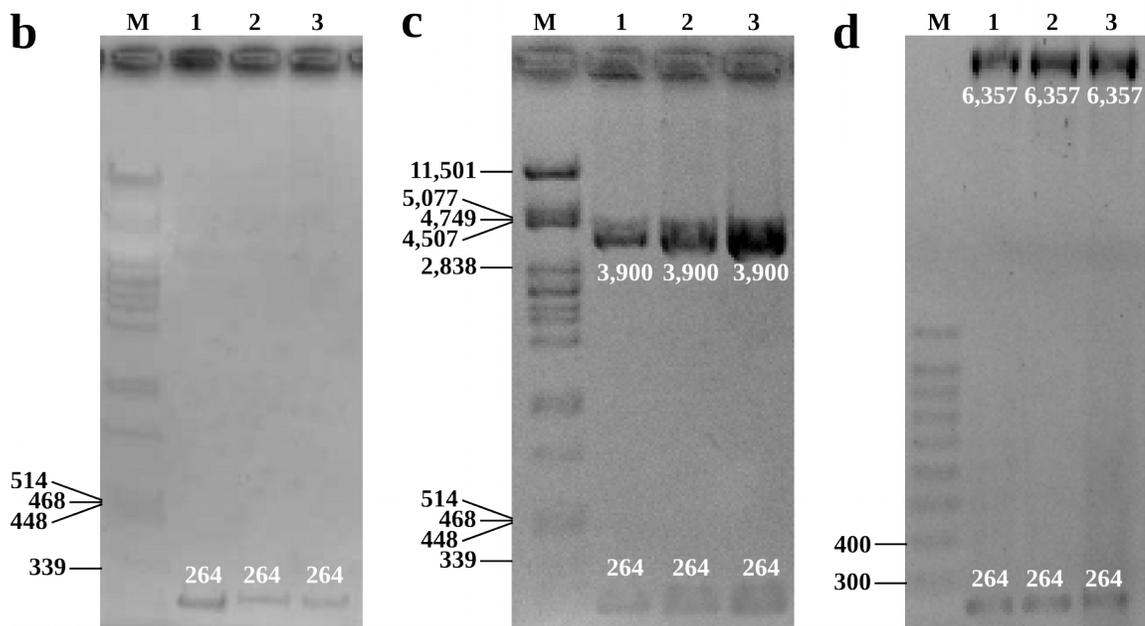
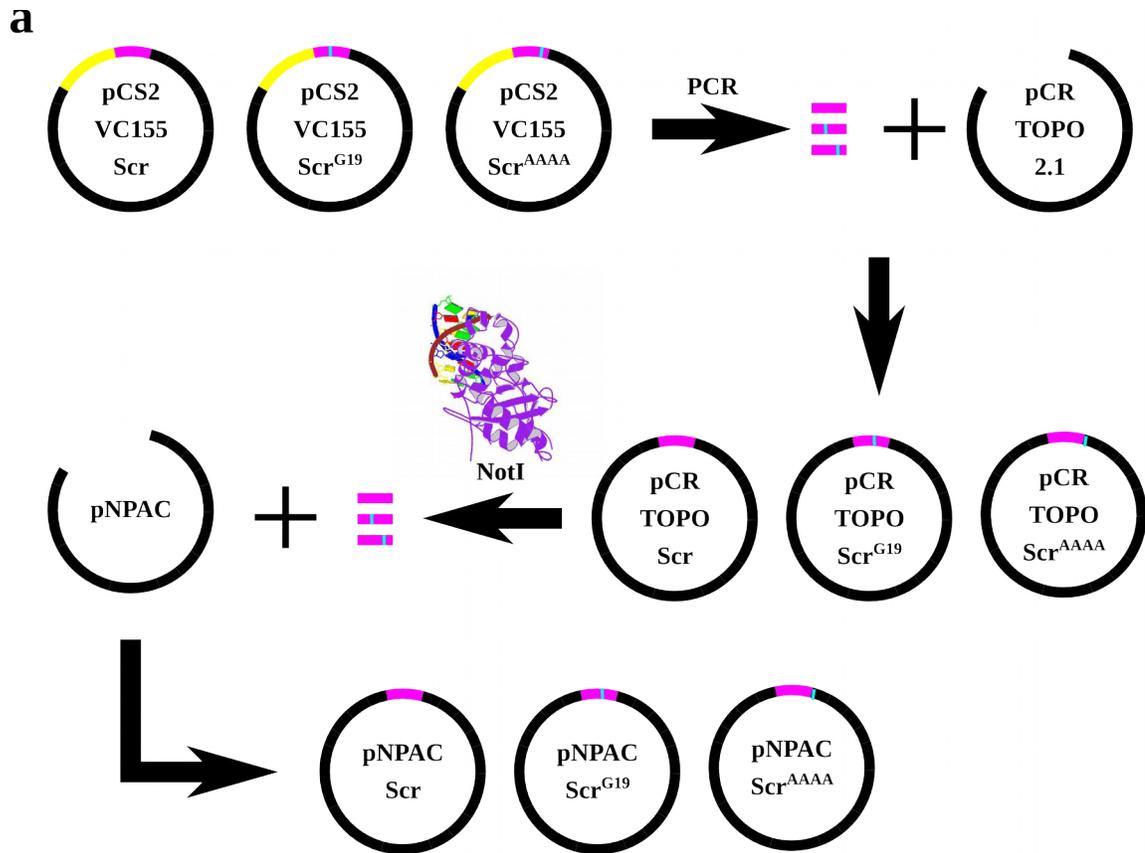
La interacción de Antennapedia y Sex Combs Reduced se analizó posteriormente mediante ensayos de transactivación. Estos ensayos se basaron en la co-transfección de los plásmidos productores de Antp y Antp<sup>G19</sup> con Scr, Scr<sup>G19</sup>, Scr<sup>AAAA</sup> e Exd para posteriormente evaluar el nivel de transcripción de Antp.

En los ensayos de transactivación los plásmidos productores dirigen la expresión de la homeoproteína Antp o la proteína mutante Antp<sup>G19</sup> que se unen a los once sitios de unión BS2 del plásmido reportero pGLH11 para activar la transcripción del gen reportero Luciferasa. La co-expresión de Scr o mutantes a partir de los diferentes plásmidos productores modificaría los niveles de expresión de Luciferasa como resultado de la probable interacción entre las proteínas expresadas simultáneamente.

### **8.4.1 Subclonación de las secuencias recombinantes Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup> en pNPAC**

Para evaluar el efecto de las distintas mutantes en la actividad transcripcional de Antp se realizaron una serie de subclonaciones mediante el uso del vector intermediario pCR-TOPO-2.1.

Primeramente, se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos para transferir las secuencias de interés a vectores pCR-TOPO donde se seleccionaron clonas que liberaron fragmentos del tamaño esperado con la enzima de restricción *NotI*. Estos fragmentos fueron posteriormente clonados en vector pNPAC previamente tratado con *NotI* para preparar los sitios de inserción de las clonas liberadas de pCR-TOPO. De las clonas obtenidas se seleccionaron las que liberaron los fragmentos para su confirmación por secuenciación (Figura 14).

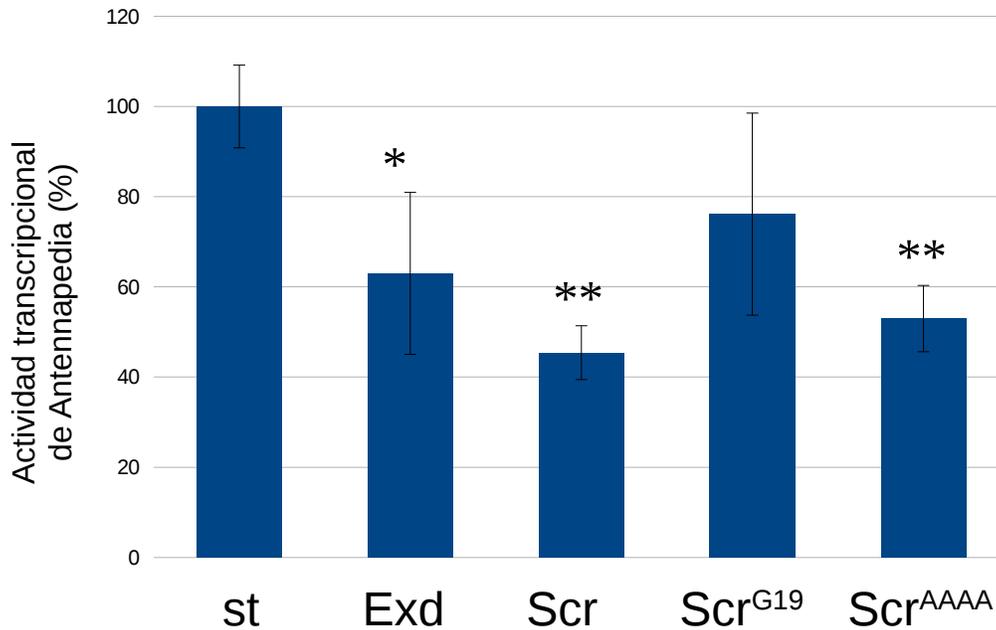


**Figura 14: Subclonación de las secuencias recombinantes Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup> en pNPAC**

**A** Representación esquemática de la subclonación de las secuencias Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup>. **B** Visualización de la reacción de PCR en gel de agarosa, se puede observar al comparar con el marcador  $\lambda$ +PstI (M) que las secuencias de interés Scr (1), Scr<sup>G19</sup> (2) y Scr<sup>AAAA</sup> (3) poseen el tamaño esperado de 264 pares de bases. **C** Se presenta el producto de la digestión de los vectores intermedios con NotI donde se aprecia la liberación de los fragmentos de 264 pb. **D** Caracterización de los plásmidos pNPAC con fragmentos de interés, en este gel se utilizó el Marcador K para comparar el peso molecular de los fragmentos, se indican los fragmentos de la digestión correspondientes a 264 pb.

#### **8.4.2 La interacción Antp-Scr afecta la actividad transcripcional de Antp**

El análisis de la interacción de Antp-Scr detectada mediante BiFC fue analizada en la actividad transcripcional de Antp. Los resultados en la Figura 15 muestran una reducción altamente significativa ( $p \geq 0.01$ ) en la actividad transcripcional de Antp cuando se evaluó en presencia de Scr (reducción de 56%) y reducción significativa ( $p \geq 0.05$ ) cuando esta se evaluó en presencia de Exd (reducción de 38%). La reducción observada en presencia de Scr fue menor pero no ausente a la mostrada cuando se evaluó el efecto de la versión con la posición 19 substituida por alanina en Scr (reducción de 22%), lo que corrobora su efecto de la interacción Antp-Scr en la transcripción. En contraste la evaluación de la actividad transcripcional de Antp en presencia de Scr<sup>AAAA</sup> mostró una reducción altamente significativa ( $p \geq 0.01$ ) y muy cercana a la obtenida en presencia de Scr tipo silvestre (reducción de 48%) mostrando que YPWM de Scr no esta involucrado en la interacción.



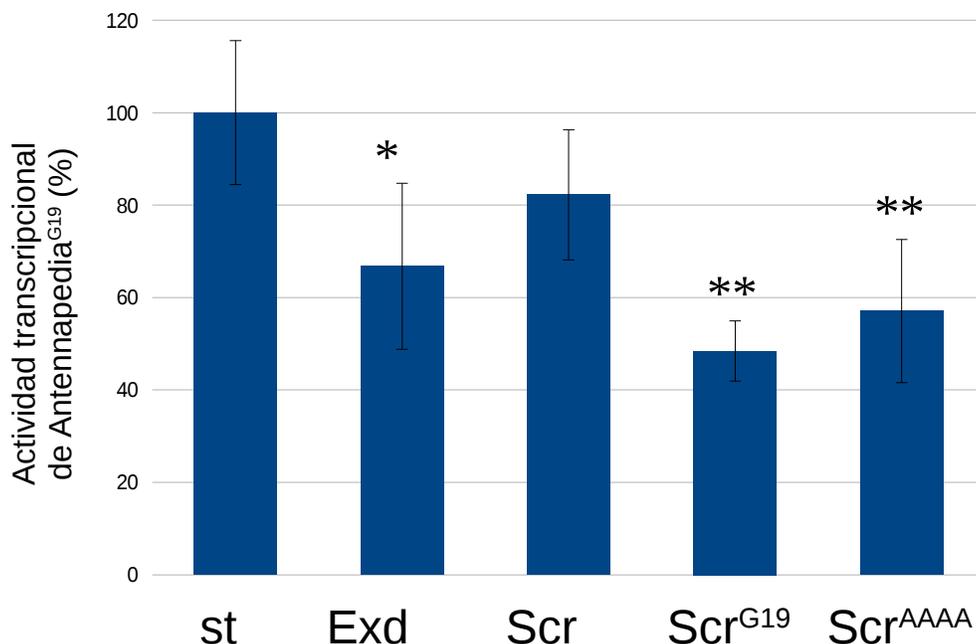
**Figura 15: La actividad transcripcional de Antp se afecta en presencia de Exd, Scr y Scr<sup>AAAA</sup>.**

La gráfica muestra las variaciones en la actividad transcripcional de Antp en presencia de Exd, Scr, Scr<sup>G19</sup>, y Scr<sup>AAAA</sup> en las células HEK transfectadas. Se observa una clara disminución de la actividad transcripcional de Antp en presencia de Exd, la cual es aun mayor bajo la presencia de Scr y Scr<sup>AAAA</sup>. En contraste no se detectó diferencia significativa con la mutante Scr<sup>G19</sup>, lo que indica que la mutación G19 afecta la interacción con Antp. Se señala mediante asteriscos sobre las barras si la diferencia observada en la actividad transcripcional con respecto a la proteína sin tratamiento, \* indica una significancia estadística de 0.05 y \*\* indican una significancia de 0.01, la ausencia de asterisco indica que la diferencia observada no es estadísticamente significativa.

#### **8.4.3 La interacción Antp-Scr esta complejamente regulada por la posición 19 de la hélice I de sus homeodominios así como del tetrapéptido YPWM de ambos**

Los ensayos de la Figura 16 mostraron una reducción significativa ( $p \geq 0.05$ ) en la actividad transcripcional de Antp<sup>G19</sup> cuando esta se evaluó en presencia de Exd (reducción de 34%) y una reducción significativa ( $p \geq 0.05$ ) cuando se evaluó en presencia de Scr (reducción de 18%). Se encontró una reducción altamente significativa ( $p \geq 0.01$ ) y evidente cuando se evaluó el efecto de la versión con la posición 19 substituida por alanina en Scr (reducción de 52%). La evaluación de la actividad transcripcional de Antp<sup>G19</sup> en presencia de Scr<sup>AAAA</sup> mostró una reducción altamente significativa ( $p \geq 0.01$ ) y muy cercana a la obtenida en presencia de Scr tipo silvestre (reducción de 48%) lo que, aunado a los resultados expuestos en la Figura 15, sugiere

que el tetrapéptido en Scr si bien no esta directamente involucrado en su interacción con Antp si lo esta en su efecto sobre la actividad transcripcional del mismo probablemente mediante interacción con otros factores relevantes en esta.



**Figura 16:** La actividad transcripcional de Antp<sup>G19</sup> se afecta en presencia de Exd, Scr, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup>.

La gráfica muestra las variaciones en la actividad transcripción de Antp<sup>G19</sup> en presencia de Exd, Scr, Scr<sup>G19</sup>, y Scr<sup>AAAA</sup> en las células transfectadas. La actividad transcripcional de Antp<sup>G19</sup> muestra una clara disminución tanto en presencia de Exd, Scr<sup>G19</sup> y Scr<sup>AAAA</sup>, pero no así para Scr, lo que indica que la mutación G19 afecta la interacción con Scr así como también lo hace el tetrapéptido que si bien no tiene un efecto directo sobre la interacción entre las proteínas si lo muestra sobre la actividad transcripcional, probablemente mediante interacciones con otros factores relevantes. Se señala mediante asteriscos sobre las barras si la diferencia observada en la actividad transcripcional con respecto a la proteína sin

## 9 DISCUSIÓN

En la presente tesis se realizó el análisis de la interacción de Antennapedia y Sex combs reduced mediante BiFC y transactivación. La estrategia experimental consistió en evaluar el efecto de Antp y Scr así como una serie de mutantes en diferentes dominios proteicos directamente mediante co-transfecciones celulares para analizar la interacción molecular mediante BiFC así como su efecto en la actividad transcripcional de Antennapedia.

Tanto para la observación de la interacción molecular de las homeoproteínas como para la medición de la actividad transcripcional de Antp se utilizaron una batería de plásmidos recombinantes, de los cuales aquellos que generados previamente en el laboratorio fueron caracterizados mediante digestiones enzimáticas diagnósticas de acuerdo a lo reportado (Cárdenas-Chavez, 2012). La identidad de los plásmidos con las proteínas de fusión Scr y Scr<sup>G19</sup> unidas a los extremos carboxilo y amino de venus (Papadopoulos *et al.*, 2012) fue confirmada por secuenciación y del mismo modo se realizó con los plásmidos recombinantes generados en el transcurso de esta tesis.

Para analizar las interacciones se utilizó la técnica BiFC que se basa en la formación de un complejo fluorescente cuando dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente son unidos por la interacción entre dos proteínas de interés. Entre las principales ventajas de BiFC se debe mencionar la capacidad de visualizar directamente los complejos formados en las células vivas, además de permitir la detección de interacciones transitorias ya que la señal fluorescente que se genera es estable (Kerppola, 2006). Sin embargo, también hay que considerar que la formación del fluoróforo requiere de un cierto tiempo, por lo que no se pueden detectar cambios rápidos en las interacciones, pero sobre todo que cuando se reconstituye la proteína fluorescente el complejo formado es irreversible lo que podría exagerar la interacción estudiada (Kerppola, 2008).

La técnica BiFC se ha utilizado en el estudio de muchos tipos de proteínas, incluyendo pero no limitándose a: péptidos, proteínas de membrana, proteínas nucleares, complejos

enzimáticos, proteínas de unión a ADN y proteínas de la familia ubiquitina, así como diversos contextos celulares que abarcan desde organismos procariontes (*E. coli*) hasta eucariontes incluyendo hongos filamentosos, células de mamíferos, de insectos y de plantas (Morell *et al.*, 2008).

Otro factor relevante en la visualización de interacciones mediante BiFC es la longitud y características del enlace entre el fluoróforo fragmentado y la proteína de interés, este enlace debe ser flexible para proveer a las proteínas de movilidad independiente, en este estudio se utilizaron enlazadores cortos de 4 aminoácidos cercanos en longitud a las reportadas por Hu y colaboradores (Hu *et al.*, 2002) que usaron la secuencia RSIAT de 5 aminoácidos en sus ensayos como enlazador corto, el grupo en cuestión también propuso el uso de un enlazador largo pero con el propósito de mantener homogeneidad entre las construcciones todas fueron obtenidas o construidas en los vectores pCS2-VC155 y pCS2-VNm9 que contienen fragmentos, carboxilo y amino respectivamente, de la proteína Venus ligado a secuencias enlazadoras de 4 aminoácidos.

El primer objetivo de la presente tesis consistió en evaluar la interacción de usando versiones silvestres de las proteínas Antennapedia y Sex combs reduced. Dado el alto porcentaje de identidad que poseen estas proteínas entre sí se esperaba un resultado consistente con la homodimerización de Scr reportada previamente de aproximadamente un 80% (Papadopoulos *et al.*, 2012). Los ensayos de BiFC mostraron claramente una interacción entre Antp y Scr (72%) que se ajusta a lo esperado dada la alta identidad que comparten estas proteínas.

Posteriormente, se utilizaron una serie de versiones mutantes de Antp para determinar el o los dominios de estas homeoproteínas responsables de la interacción. Los resultados mostraron que la interacción se veía fuertemente reducida cuando se utilizaba una versión de Antp a la que se ha deletado todo el homeodominio de Antp, de nuevo este resultado fue consistente con resultados previos que han demostrado que la homodimerización de Scr y la interacción de diferentes homeoproteínas esta determinada por el homeodominio (Adachi *et al.*, 2016; Cárdenas-Chavez, 2012; Papadopoulos *et al.*, 2012).

Con el propósito de ser mas específicos en el análisis de la interacción Antp-Scr se utilizaron dos mutantes de Antp, una a la que se deletaron las hélices I y II del homeodominio, y otra a la que se deletó exclusivamente la primer hélice. Los resultados obtenidos de estos ensayos demuestran claramente que la hélice I del homeodominio es la región responsable de la interacción molecular entre Antp y Scr. Este resultado refleja la importancia del HD como región de interacción con otros factores transcripcionales como se ha demostrado previamente en interacciones de Antp con TFIIE $\beta$  y AbdA (Cárdenas-Chavez, 2012; Altamirano-Torres, 2015) e interacciones de AbdA con Apt, Mad, Dll entre otros (Baëza *et al.*, 2015).

Para analizar de una forma mas fina la interacción Antp-Scr a nivel molecular utilizamos versiones con la posición 19 de los homeodominios mutados, tanto de Scr como de Antp para determinar su función. Los resultados mostraron que la interacción de las versiones silvestres con las versiones sustituidas, i.e. Antp-Scr<sup>G19</sup> y Antp<sup>G19</sup>-Scr, provocaron una disminución en el porcentaje de interacción observado (~20%), sin embargo el efecto mas drástico en la interacción Antp-Scr se observó cuando las dos proteínas con la posición 19 de la hélice I de los homeodominios sustituidas fueron evaluadas. Esto es el ensayo de sustitución doble Antp<sup>G19</sup>-Scr<sup>G19</sup> que, mostró una reducción hasta el 32% de la interacción, lo que muestra la importancia de la posición 19 de la hélice I en la interacción entre homeodominios. Estos resultados son consistentes con trabajos que muestran la interacción de homeodominios entre si, como en el caso de la interacción Antp-Eyeless (Plaza, 2008) y así como los previamente descritos por Papadopoulos y colaboradores que mostraron que dentro del contexto del HD de Scr la posición 19 es la principal responsable de la homodimerización de Scr. Este mismo efecto se confirmó también para Antp y Abd-B en ensayos previamente realizados en el laboratorio (Cárdenas-Chavez, 2012) en colaboración con Adachi *et al.*, 2016 que apoyan fuertemente los resultados observados con las mutantes de Antp y Scr con esa posición sustituida por alanina.

En el caso de la interacción Antp-Scr factores como la facilitación de la dimerización de Scr por unión a ADN, la irreversibilidad de los complejos de BiFC formados, así como

cambios en la afinidad de Scr por sus secuencias diana indican la probable presencia de otros factores involucrados en la interacción Antp-Scr que permitirían explicar la disminución en la interacción Antp-Scr debido a la sustitución de la posición 19 de sus homeodominios no produce una disminución tan clara como la mostrada por la homodimerización de Scr<sup>G19</sup> (Papadopoulos *et al*, 2012).

Además de la posición G19 involucrada en la interacción Antp-Scr, también se evaluó el efecto de versiones mutantes de ambas proteínas en el tetrapéptido YPWM dada la importancia que este tiene en las interacciones moleculares de los genes Hox como se ha evidenciado para la maquinaria basal de transcripción (Prince *et al.*, 2008) y en su interacción con Exd (Johnson *et al.*, 1995). Lo anterior es de particular interés en esta tesis debido a que contrasta con los resultados previamente obtenidos *in vivo* en que proponen un papel de Exd en la regulación Antp-Scr durante el desarrollo embrionario (Canales-del-Castillo, 2005; Papadopoulos *et al*, 2012) en el que observaron que la represión parcial de la expresión de Scr no se ve afectada cuando una versión de Antp con el tetrapéptido substituido por alaninas se sobre-expresa, lo que indica que el tetrapéptido YPWM de Antennapedia está involucrado en la represión parcial *in vivo* en *D. melanogaster*.

Es importante mencionar que cuando se puso a prueba la versión de Scr con la posición 19 sustituida, Antp<sup>AAA</sup>-Scr<sup>G19</sup> se detectó un 60% de interacción, sin embargo al cambiar estas mutaciones en las proteínas (Antp<sup>G19</sup>-Scr<sup>AAA</sup>) la interacción se afectó hasta un 13%. Lo anterior es relevante ya que la interacción se afectó, aun por debajo de los niveles de interacción observados cuando se prueban las dos proteínas con la posición 19 sustituida. Estos resultados indican claramente que la interacción entre Antp y Scr no se regula mediante un dominio único (la posición 19 de la hélice I) sino que se ve a su vez regulada por el tetrapéptido YPWM lo que hace pensar en un mecanismo más complejo de regulación en el interactoma.

La homo y heterodimerización de proteínas homeóticas se ha reportado previamente como un mecanismo de regulación génica de factores de transcripción y la fosforilación de las proteínas o la presencia de sitios diana en DNA son fundamentales para su

función. En el caso de Scr se ha mostrado que aunque Scr<sup>G19</sup> es capaz de unirse a sus potenciadores *in vitro* e interactuar con Exd del mismo modo que lo hace la proteína silvestre, sin embargo no es capaz de producir fenotipos asociados a Scr *in vivo* (Lelli, 2011).

Los resultados obtenidos muestran que la sustitución del tetrapéptido por un bloque de alaninas en Antp no tiene ningún efecto sobre la capacidad de interactuar de Scr con Antp, reportada previamente por Papadopoulos y colaboradores en 2012, lo que nos lleva a pensar que la represión *in vivo* de Scr podría ocurrir por vías indirectas. El efecto opuesto fue observado cuando se hizo la sustitución por el bloque de alaninas en Scr que si bien no mostró efecto cuando se probó con la proteína Antp<sup>AAA</sup> si produjo una reducción hasta el 13% en la interacción cuando se evaluó contra Antp<sup>G19</sup>, estos datos en conjunto con la clara, pero no tan dramática, reducción en la heterodimerización cuando ambas proteínas han sufrido una sustitución de la posición 19 de la hélice I del homeodominio (32%) llevan a concluir que la interacción Antp-Scr se ve afectada por la posición G19 pero no es enteramente dependiente de esta. Como se ha mencionado previamente la interacción con cofactores y cambios en la afinidad a las secuencias diana de ADN podrían estar involucrados en la heterodimerización, posiblemente un tercer factor involucrado en la interacción de estas dos proteínas que podría ser tanto de origen nucleotídico en la forma del contexto de ADN de las secuencias blanco de las homeoproteínas como de origen proteico en la forma de otros cofactores como Exd o alternativamente cambios de conformación por la sustitución de YPWM en Scr.

Para determinar si las interacciones encontradas tienen efecto sobre la actividad transcripcional de Antp se procedió a realizar ensayos de transactivación en presencia de Scr, Scr<sup>G19</sup>, Scr<sup>AAA</sup> e Exd. El análisis de activación de la transcripción por la homeoproteína Antp con factores transcripcionales se realizó mediante ensayos de transactivación en células HEK293 utilizando el plásmido reportero pGLH11. Este plásmido contiene once copias del sitio de unión BS2 de un sitio Hox consenso reconocido por múltiples homeoproteínas como Antp, AbdB, Exd (Otting *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1994).

Los resultados por los ensayos con la versión silvestre de Antp demostraron que la actividad transcripcional se ve reducida en presencia de cualquiera de los tratamientos (Scr, Scr<sup>G19</sup>, Scr<sup>AAAA</sup> e Exd) pero es mas fuertemente reducida en el caso de Scr y Scr<sup>AAAA</sup>, esto muestra consistencia con los resultados observados en los ensayos de BiFC y soporta la idea de que la interacción Antp-Scr tenga efecto funcional *in vivo*.

Sin embargo, cuando se utiliza la versión Antp<sup>G19</sup> la actividad transcripcional se ve mas fuertemente reducida en presencia de Scr<sup>G19</sup> e Exd. La asimetría de resultados obtenidos de las evaluaciones de la actividad de Antp contra Antp<sup>G19</sup> es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente previamente discutidos, y del mismo modo permiten sugerir que un tercer factor podría estar involucrado en el interactoma o bien que los resultados podrían ser el producto de cambios de conformación por la ausencia del YPWM y la sustitución e la posición 19 del homeodominio.

## 10 CONCLUSIONES

El análisis de la interacción molecular de Antp y Scr realizado en ésta tesis permite concluir que:

- La interacción molecular Antp-Scr fue detectada evidentemente mediante los ensayos BiFC (observándose una interacción de 72%)
- La interacción molecular Antp-Scr es mediada fuertemente por los HDs de Antp y Scr específicamente por la posición 19 de la hélice I de ambos homeodominios (observándose una reducción de ~30%)
- El tetrapéptido YPWM de Antp no jugó un papel relevante en la interacción Antp-Scr independientemente de la sustitución de la posición 19 de la hélice I de Scr (con una reducción no significativa de ~10%)
- La posición 19 de la hélice I de los HDs de Antp y Scr no esta involucrada en su interacción con Exd (con una variación mínima de ~2% entre ensayos)
- La actividad transcripcional de Antp se ve afectada por la presencia de Scr lo que apoya la interacción molecular Antp-Scr detectada mediante BiFC.
- El tetrapéptido YPWM de Scr tiene un papel dependiente con la posición 19 del homeodominio de Antp en la interacción Antp-Scr (reduciéndose la interacción a un 13%)

## 11 PERSPECTIVAS

Mientras que el tetrapéptido YPWM de Antp no pareció tener un papel dependiente de la posición 19 del homeodominio de Scr lo contrario fue cierto ya que el motivo YPWM de Scr si mostró un efecto dependiente de la posición 19 del HD de Antp al momento de observar la interacción Antp-Scr.

Esta asimetría abre la posibilidad de realizar investigación mas fina que permita determinar el efecto de otras variables potencialmente involucradas como se ha discutido previamente, en breve, presencia y/o ausencia de mas cofactores conocidos para Antp y Scr, uso de secuencias de ADN diana y evaluación de interacciones mas complejas en número en el interactoma de los genes Hox, particularmente la búsqueda de una interacción trimérica en conjunto con Exd.

Las interacciones Antp-Scr detectadas en cultivo celular no son extrapolables al desarrollo de la mosca y se propone por lo tanto evaluar si la interacción existe de forma endógena en el desarrollo normal de la mosca, esto es, se propone realizar ensayos de interacción por BiFC *in vivo* específicamente en contextos espacio-temporales en los que las homeoproteínas en cuestión se expresen normalmente ya que se ha demostrado que el interactoma *in vivo* es fuertemente dependiente del contexto celular en el que se encuentra.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Akbari, OS., Bousum, A., Bae, E. et al (2006). Unraveling cis-regulatory mechanisms at the abdominal-a and abdominal-b genes in the drosophila bithorax complex. *Dev Biol* 293: 294-304.
- Bateson, W. (1894). *Materials for the study of variation.* : .
- Beachy, PA., Krasnow, MA., Gavis, ER. et al. (1988). An ultrabithorax protein binds sequences near its own and the antennapedia p1 promoters. *Cell* 55: 1069-1081.
- Benassayag, C., Plaza, S., Callaerts, P. et al. (2003). Evidence for a direct functional antagonism of the selector genes proboscipedia and eyeless in drosophila head development. *Development* 130: 575-586.
- Bender, W., Spierer, P., Hogness, DS. et al. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate dna from the ace and rosy loci and the bithorax complex in drosophila melanogaster. *Journal of molecular biology* 168: 17-33.
- Berry, M. and Gehring, W. (2000). Phosphorylation status of the scr homeodomain determines its functional activity: essential role for protein phosphatase 2a, b. *The EMBO journal* 19: 2946-2957.
- Bienz, M. and Tremml, G. (1988). Domain of ultrabithorax expression in drosophila visceral mesoderm from autoregulation and exclusion. : .
- Biggin, MD. and McGinnis, W. (1997). Regulation of segmentation and segmental identity by drosophila homeoproteins: the role of dna binding in functional activity and specificity. *Development* 124: 4425-4433.
- Bondos, SE., Catanese, DJ., Tan, X. et al. (2004). Hox transcription factor ultrabithorax ib physically and genetically interacts with disconnected interacting protein 1, a double-stranded rna-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 26433-26444.
- Botas, J. (1993). Control of morphogenesis and differentiation by hom/hox genes. *Current opinion in cell biology* 5: 1015-1022.
- Bourgouin, C., Lundgren, SE. and Thomas, JB. (1992). Apterous is a drosophila lim

- domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9: 549-561.
- Bridges, CB. (1923). Aberrations in chromosomal materials. *Eugenics, Genetics and the Family* 1: 76-81.
- Carroll, SB. (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101: 577-580.
- Carroll, SB., Laymon, RA., McCutcheon, MA. et al. (1986). The localization and regulation of antennapedia protein expression in drosophila embryos. *Cell* 47: 113-122.
- Casares, F. and Mann, RS. (1998). Control of antennal versus leg development in drosophila. *Nature* 392: 723-726.
- Casares, F. and Mann, RS. (2001). The ground state of the ventral appendage in drosophila. *Science* 293: 1477-1480.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. et al. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* 120: 1983-1995.
- Chan, S. and Mann, RS. (1996). A structural model for a homeotic protein-extradenticle-dna complex accounts for the choice of hox protein in the heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5223-5228.
- Chouinard, S. and Kaufman, T. (1991). Control of expression of the homeotic labial (lab) locus of drosophila melanogaster: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development* 113: 1267-1280.
- Cimbora, DM. and Sakonju, S. (1995). Drosophila midgut morphogenesis requires the function of the segmentation gene odd-paired. *Developmental biology* 169: 580-595.
- Desplan, C., Theis, J. and O'Farrell, PH. (1988). The sequence specificity of homeodomain-dna interaction. *Cell* 54: 1081-1090.
- Diaz-Benjumea, FJ. and Cohen, SM. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in drosophila. *Cell* 75: 741-752.
- Dong, J. and Krause, HM. (1999). Tissue-specific requirements for a phosphorylation site in the fushi tarazu homeodomain. *Development genes and evolution* 209: 427-

431.

- Duncan, IM. (1982). Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 102: 49-70.
- Ekker, SC., Young, KE., von Kessler, DP. et al. (1991). Optimal DNA sequence recognition by the ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *The EMBO Journal* 10: 1179.
- Ferrier, DE. and Minguillón, C. (2003). Evolution of the *hox/parahox* gene clusters. *International Journal of Developmental Biology* 47: 605-612.
- Follette, PJ. and O'Farrell, PH. (1997). Cdks and the *Drosophila* cell cycle. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 17-22.
- Fu, S., Nien, C. Y., Liang, H. L., & Rushlow, C. (2014). Co-activation of microRNAs by Zelda is essential for early *Drosophila* development. *Development*, 141(10), 2108-2118.
- Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S. and Gehring, WJ. (1993). Functional specificity of the antennapedia homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 6360-6364.
- Garber, R., Kuroiwa, A. and Gehring, WJ. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus antennapedia in *Drosophila*. *The EMBO Journal* 2: 2027.
- García-Bellido, A. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In . . Vol. 29. 1975.
- Gibson, G. and Gehring, WJ. (1988). Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of antennapedia during *Drosophila* development. : .
- Gibson, G., Schier, A., LeMotte, P. et al. (1990). The specificities of sex combs reduced and antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain. *Cell* 62: 1087-1103.
- Gilbert, SF. *Developmental biology*, 10<sup>a</sup> edición. University of Helsinki and Swarthmore College. Sinauer Associates, Inc., 2013.
- Gindhart-Jr, JG., King, AN. and Kaufman, TC. (1995). Characterization of the cis-regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene sex combs reduced. *Genetics* 139: 781.

- Glazov, EA., Pheasant, M., McGraw, EA. et al. (2005). Ultraconserved elements in insect genomes: a highly conserved intronic sequence implicated in the control of homothorax mRNA splicing. *Genome research* 15: 800-808.
- Graba, Y., Aragnol, D. and Pradel, J. (1997). *Drosophila* hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19: 379-388.
- Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, WJ. (1984). Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development. *Cell* 37: 833-841.
- Han, K., Levine, MS. and Manley, JL. (1989). Synergistic activation and repression of transcription by *Drosophila* homeobox proteins. *Cell* 56: 573-583.
- Henderson, DS. (1999). DNA repair defects and other mistakes in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 18: 377-400.
- Henderson, KD. and Andrew, DJ. (2000). Regulation and function of *scr*, *exd*, and *hth* in the *Drosophila* salivary gland. *Developmental biology* 217: 362-374.
- Hobert, O. and Westphal, H. (2000). Functions of *lim*-homeobox genes. *Trends in genetics* 16: 75-83.
- Hoey, T. and Levine, M. (1988). Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. . .
- Hombria, JC. and Lovegrove, B. (2003). Beyond homeosis-hox function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 71: 461-476.
- Hu, C., Chinenov, Y. and Kerppola, TK. (2002). Visualization of interactions among bZIP and REL family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* 9: 789-798.
- Hudry, B., Viala, S., Graba, Y. et al. (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC biology* 9: 5.
- Jacobs, Y., Schnabel, CA. and Cleary, ML. (1999). Trimeric association of Hox and Tale homeodomain proteins mediates *Hoxb2* hindbrain enhancer activity. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5134-5142.
- Jaffe, L., Ryoo, H. and Mann, RS. (1997). A role for phosphorylation by casein kinase II

- in modulating antennapedia activity in drosophila.. *Genes & development* 11: 1327-1340.
- Jaynes, JB. and O'Farrell, PH. (1988). Activation and repression of transcription by homeodomain-containing proteins that bind a common site. *Nature* 336: 744.
- Johnson, FB., Parker, E. and Krasnow, MA. (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the drosophila homeotics: role of the homeodomain and ypw amino acid motif in the interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 739-743.
- Kalionis, B. and O'Farrell, PH. (1993). A universal target sequence is bound in vitro by diverse homeodomains. *Mechanisms of development* 43: 57-70.
- Kerppola, TK. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (bifc) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics* 37: 465.
- Kerppola, TK. (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (bifc) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols* 1: 1278-1286.
- Krasnow, MA., Saffman, EE., Kornfeld, K. et al. (1989). Transcriptional activation and repression by ultrabithorax proteins in cultured drosophila cells. *Cell* 57: 1031-1043.
- Kuroiwa, A., Hafen, E. and Gehring, WJ. (1984). Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene fushi tarazu of drosophila. *Cell* 37: 825-831.
- Kuziora, MA. and McGinnis, W. (1988). Autoregulation of a drosophila homeotic selector gene. *Cell* 55: 477-485.
- Laughon, A. and Scott, MP. (1984). Sequence of a drosophila segmentation gene: protein structure homology with dna-binding proteins. *Nature* 310: 25-31.
- Le Calvez, J. (1948). Observations phenogenetiques sur la mutation aristapedia dominante de drosophila melanogaster. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp* 37: 50-72.
- Lewis, EB. (1963). Genes and developmental pathways. *American Zoologist* : 33-56.
- Lewis, EB. and others (1978). A gene complex controlling segmentation in drosophila. *Nature* 276: 565-570.
- Lopez, AJ. and Hogness, DS. (1991). Immunochemical dissection of the ultrabithorax

- homeoprotein family in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 9924-9928.
- Manak, JR., Mathies, LD. and Scott, MP. (1994). Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development* 120: 3605-3619.
- Mann, RS. and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annual review of cell and developmental biology* 16: 243-271.
- Mann, RS., Lelli, KM. and Joshi, R. (2009). Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology* 88: 63-101.
- Mansfield, JH., Harfe, BD., Nissen, R. et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nature genetics* 36: 1079-1083.
- Mastick, GS., McKay, R., Oligino, T. et al. (1995). Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of ultrabithorax protein-binding sites in yeast. *Genetics* 139: 349.
- McGinnis, W., Garber, RL., Wirz, J. et al. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37: 403-408.
- Meyer, A. and Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current opinion in cell biology* 11: 699-704.
- Mikkola, I., Bruun, J., Holm, T. et al. (2001). Superactivation of pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by DNA-independent recruitment of different homeodomain proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276: 4109-4118.
- Miller, DF., Rogers, BT., Kalkbrenner, A. et al. (2001). Cross-regulation of hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mechanisms of development* 102: 3-16.
- Morell, M., Espargaro, A., Aviles, FX. et al. (2008). Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow

- cytometry. *Nature protocols* 3: 22-33.
- Morgan, T. and Cattell, E. (1919). 12. data for the study of sex-linked inheritance in *drosophila*. *Journ. Exp. Zool* 13: 79-101.
- Muller, J., Gaunt, S. and Lawrence, PA. (1995). Function of the polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 121: 2847-2852.
- Myers, EW., Sutton, GG., Delcher, AL. et al. (2000). A whole-genome assembly of *drosophila*. *Science* 287: 2196-2204.
- Nüsslein-Volhard, C. *Coming to life: how genes drive development*. . Kales Press, 2006.
- Nakamura, A., Amikura, R., Mukai, M. et al. (1996). Requirement for a noncoding rna in *drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* 274: 2075-2079.
- Nasiadka, A., Dietrich, BH. and Krause, HM. (2002). Anterior-posterior patterning in the *drosophila* embryo. *Advances in developmental biology and biochemistry* 12: 155-204.
- Otting, G., Qian, Y., Billeter, M. et al. (1990). Protein--dna contacts in the structure of a homeodomain--dna complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution.. *The EMBO journal* 9: 3085.
- Panzer, S., Weigel, D. and Beckendorf, S. (1992). Organogenesis in *drosophila melanogaster*: embryonic salivary gland determination is controlled by homeotic and dorsoventral patterning genes. *Development* 114: 49-57.
- Papadopoulos, DK., Skouloudaki, K., Adachi, Y. et al. (2012). Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of sex combs reduced in *drosophila*. *Developmental biology* 367: 78-89.
- Patel, NH. and Prince, VE. (2000). Beyond the hox complex. *Genome Biol* 1: .
- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990). Mutations in the *drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity.. *Genes & Development* 4: 1209-1223.
- Peltenburg, L. and Murre, C. (1997). Specific residues in the pbx homeodomain differentially modulate the dna-binding activity of hox and engrailed proteins. *Development* 124: 1089-1098.
- Peter, HR. and George, BJ. *Biology*. . McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2001.

- Plaza, S., Prince, F., Adachi, Y. et al. (2008). Cross-regulatory protein--protein interactions between hox and pax transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13439-13444.
- Postlethwait, JH. (1978). Development of cuticular patterns in the legs of a cell lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 185: 37-57.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y. et al. (2008). The yPWM motif links antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* 135: 1669-1679.
- Prochiantz, A. and Joliot, A. (2003). Can transcription factors function as cell--cell signalling molecules?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 814-819.
- Qian, Y., Billeter, M., Otting, G. et al. (1989). The structure of the antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59: 573-580.
- Qian, YQ., Furukubo-Tokunaga, K., Resendez-Perez, D. et al. (1994). Nuclear magnetic resonance solution structure of the fushi tarazu homeodomain from *Drosophila* and comparison with the antennapedia homeodomain. *Journal of molecular biology* 238: 333-345.
- Rieckhof, GE., Casares, F., Ryoo, HD. et al. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires Homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91: 171-183.
- Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U. et al. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. : .
- Ryoo, HD. and Mann, RS. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by extradenticle. *Genes & development* 13: 1704-1716.
- Ryoo, HD., Marty, T., Casares, F. et al. (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/extradenticle complex. *Development* 126: 5137-5148.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. et al. *Molecular cloning*. . Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 1989.
- Schumacher, A., Faust, C. and Magnuson, T. (1996). Positional cloning of a global regulator of anterior--posterior patterning in mice. : .

- Shepherd, J.C., McGinnis, W., Carrasco, A.E. et al. (1984). Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. . .
- Soto, M.C., Chou, T. and Bender, W. (1995). Comparison of germline mosaics of genes in the polycomb group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140: 231.
- Sprecher, S.G., Müller, M., Kammermeier, L. et al. (2004). Hox gene cross-regulatory interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mechanisms of development* 121: 527-536.
- Struhl, G. (1981). A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature* 293: 36-41.
- Struhl, G. and Akam, M. (1985). Altered distributions of ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of *Drosophila*. *The EMBO journal* 4: 3259.
- Struhl, G. and White, R.A. (1985). Regulation of the ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* 43: 507-519.
- Thali, M., Müller, M.M., DeLorenzi, M. et al. (1988). *Drosophila* homoeotic genes encode transcriptional activators similar to mammalian otf-2.
- Tremml, G. and Bienz, M. (1992). Induction of labial expression in the *Drosophila* endoderm: response elements for dpp signalling and for autoregulation. *Development* 116: 447-456.
- Tudge, C. *The variety of life*. . Oxford University Press Oxford, 2000.
- Valentine, J.W., Erwin, D.H. and Jablonski, D. (1996). Developmental evolution of metazoan bodyplans: the fossil evidence. *Dev Biol* 173: 373-381.
- Wakimoto, B.T. and Kaufman, T.C. (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 81: 51-64.
- Wiellette, E.L. and McGinnis, W. (1999). Hox genes differentially regulate serrate to generate segment-specific structures. *Development* 126: 1985-1995.
- Wirz, J., Fessler, L.I. and Gehring, W.J. (1986). Localization of the antennapedia protein in *Drosophila* embryos and imaginal discs. *The EMBO journal* 5: 3327.
- Yanze, N., Spring, J., Schmidli, C. et al. (2001). Conservation of hox/parahox-related genes in the early development of a cnidarian. *Developmental biology* 236: 89-

98.

Yekta, S., Shih, I. and Bartel, DP. (2004). MicroRNA-directed cleavage of *hoxb8* mRNA. *Science* 304: 594-596.

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

Zhao, Y. and Potter, SS. (2001). Functional specificity of the *hoxa13* homeobox. *Development* 128: 3197-3207.

## 13 APÉNDICE I

### 13.1 Sumario de promedios estadísticos de los ensayos de BiFC

Interacción	Promedio	D.E.
Antp-Exd	62	9.0
Antp-Scr	72	7.3
Antp-Scr <sup>G19</sup>	62	5.4
Antp <sup>ΔHD</sup> -Exd	10	3.3
Antp <sup>ΔHD</sup> -Scr	18	3.1
Antp <sup>ΔHD</sup> -Scr <sup>G19</sup>	16	3.1
Antp <sup>Δ1-2</sup> -Exd	56	4.8
Antp <sup>Δ1-2</sup> -Scr	18	2.9
Antp <sup>Δ1-2</sup> -Scr <sup>G19</sup>	11	2.9
Antp <sup>Δ1</sup> -Exd	60	6.1
Antp <sup>Δ1</sup> -Scr	25	3.8
Antp <sup>Δ1</sup> -Scr <sup>G19</sup>	16	2.8
Antp <sup>G19</sup> -Exd	59	4.3
Antp <sup>G19</sup> -Scr	57	5.9
Antp <sup>G19</sup> -Scr <sup>G19</sup>	32	2.4
Antp <sup>AAAA</sup> -Exd	11	2.8
Antp <sup>AAAA</sup> -Scr	58	8.7
Antp <sup>AAAA</sup> -Scr <sup>G19</sup>	60	7.8
Scr-Scr	63	7.6
Scr-Scr <sup>G19</sup>	53	4.5
Scr <sup>G19</sup> -Scr <sup>G19</sup>	21	3.4
Scr-Exd	62	7.5
Scr <sup>G19</sup> -Exd	60	5.7
Antp <sup>AAAA</sup> -Scr <sup>AAAA</sup>	68	6.1
Antp-Scr <sup>AAAA</sup>	61	7.4
Antp <sup>G19</sup> -Scr <sup>AAAA</sup>	13	3.8
Scr <sup>AAAA</sup> -Exd	14	3.1
Scr <sup>AAAA</sup> -Scr <sup>G19</sup>	50	5.4

### 13.2 Sumario de porcentajes estadísticos de actividad transcripcional

Antp	%	des	Antp <sup>G19</sup>	%	des
s/t	100	9.2	s/t	100	15.6
Exd	63	18.0	Exd	67	18.0
Scr	45	6.0	Scr	82	14.1
Scr <sup>G19</sup>	76	22.4	Scr <sup>G19</sup>	48	6.5
Scr <sup>AAAA</sup>	53	7.4	Scr <sup>AAAA</sup>	57	15.5