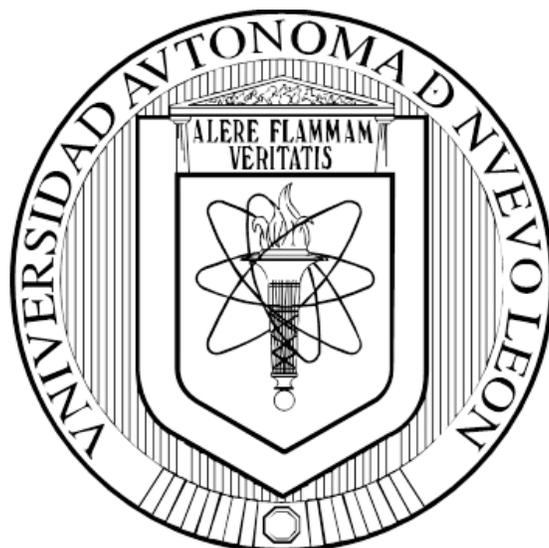


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISECCIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE LOS HDS DE
ANTENNAPEDIA Y ULTRABITHORAX**

POR

LBG. ALELY CECILIA VILLARREAL PUENTE

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

JUNIO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS

**DISECCIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE LOS HDS DE
ANTENNAPEDIA Y ULTRABITHORAX**

POR

LBG. ALELY CECILIA VILLARREAL PUENTE

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

JUNIO, 2018

Diseción molecular de la interacción de los HDs Antennapedia y Ultrabithorax

Comité de tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez

Director de tesis

Dr. Fermín Mar Aguilar

Secretario

Dr. Jorge Verduzco Martínez

Vocal

Dra. Vianey González

Vocal

Dra. Diana Caballero Hernández

Vocal

Disección molecular de la interacción de los HDs Antennapedia y Ultrabithorax

PRESENTA

LBG ALELY CECILIA VILLARREAL PUENTE

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Departamento de Biología Celular y Genética ubicado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez y la asesoría de la M.C. Claudia Dalila Altamirano Torres.

Dedicatoria y agradecimientos

Esta tesis está dedicada a mi esposo y a mi bebé por su paciencia, amor y ánimo para seguir superándome académicamente.

A mi madre por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi preparación académica y su constante ánimo de seguir adelante.

Quiero darle las gracias a la Dra. Diana Reséndez Pérez por la dirección y el apoyo no solo en la realización de esta tesis sino a lo largo de todo mi recorrido por el laboratorio, tanto académico como personal.

A la M.C Claudia Dalila Altamirano Torres por seguir de cerca mi trabajo e involucrarse de ser necesario.

A todos mis compañeros de la Unidad de Biología del Desarrollo por su amistad y apoyo.

Al Conacyt por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Tabla de Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 Genes Hox en <i>Drosophila melanogaster</i>	4
3.2 Antennapedia	8
3.3 Ultrabithorax	10
3.4 Interacciones moleculares proteína-proteína	12
3.4.1 Interacciones con dominios diferentes al HD.....	13
3.4.2 Interacciones mediadas por el HD	17
3.4.3. Interacciones que involucran la posición no. 19 de la hélice I de los homeodominios.....	19
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivo General	22
5.1 Objetivos específicos	22
6. Materiales y Métodos	23
6.1 Análisis de la mutación del residuo 19 de la hélice I del HD en la interacción Antp y Ubx mediante BiFC	23
6.1.1 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbx.....	23
6.1.2 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbxHD	27
6.1.3 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbxG19.....	28
6.1.4 Preparación plasmídica de los vectores pSC2VNUbx, y -VNUbxG19, -VCAntp, y -VCAntpHDG19.....	30
6.1.5 Análisis de Interacciones moleculares Ubx-Antp mediante BiFC.....	31
6.2 Efecto de Antp-Ubx en la actividad funcional en la transformación antena-tarso	32
6.2.1 Amplificación de las líneas de moscas transgénicas: VNUbxHD, VCAntpHD y <i>Dll</i> -Gal4	33
6.2.2 Sexado	33
6.2.3 Expresión ectópica de la interacción Antp-Ubx.....	34
6.2.4 Generación de la línea reportera VN-UbxHD;VC-AntpHD	34
6.2.5 Análisis de la transformación antena-pata en adultos	36
6.3 Efecto de los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD, BIP2 en la interacción Antp-Ubx mediante análisis de BiFC por competencia en cultivo celular.	36
6.3.1 Preparación plasmídica de pPACTBP, -TFIIE β , -TFIIA γ , -TFIIB, -EXD y -BIP2.....	37

6.3.2 Análisis de las posibles interacciones triméricas mediante BiFC competitivo	37
7. Resultados	39
7.1 La mutación del residuo 19 de la hélice I del HD de Antp afecta la interacción con Ubx	39
7.1.1 Construcciones pSC2VNUbx y -UbxHD.....	39
7.1.2 Construcción de pSC2VNUbxG19	42
7.1.3 Efecto de la mutación G19 de Antp en la interacción con Ubx	44
7.2 La interacción de Antp-Ubx afecta la actividad funcional de la transformación antena-tarso ...	46
7.3 Los factores transcripcionales BIP2, TBP, TFIIA γ , y TFIIE β afectan la interacción Antp-Ubx..	47
7.3.1 Digestión enzimática de los plásmidos competidores pPACEXD,-BIP2, -TBP, -TFIIB, - TFIIE β y -TFIIA γ	48
7.4 Análisis de los factores transcripcionales en la interacción Antp-Ubx.....	48
8. Discusión	50
9. Conclusiones.....	55
10. Bibliografía	56

Lista de figuras

Figura	Título	Página
1.	Ciclo de vida de la mosca de la fruta <i>Drosophilamelanogaster</i>	4
2.	Embrión de <i>Drosophilamelanogaster</i>	5
3.	Representación del homeodominio en las homeoproteínas.....	6
4.	Sitios de unión de las homeoproteínas Antp y Ubx y sus ortólogos.	6
5.	Genes homeóticos en <i>Drosophila melanogaster</i>	8
6.	Mutante homeótica Antennapedia.	9
7.	Mutante homeótica Ultrabithorax.....	10
8.	La especificidad de una homeoproteína esta mediada por los cofactores a los que se une.	13
9.	El motivo UbdA presente en Ubx y AbdA.....	14
10.	Interactoma de Antp.	15
11.	Interactoma de Ubx.	16
12.	Homodimerización de la homeoproteína AbdA dependiente del HD.	17
13.	Interacción entre las homeoproteínas Antp-AbdB.	18
14.	Interacción Med19-Ubx y -AbdA.....	18
15.	Interacción Ubx-Antp determinada por BiFC en embriones <i>in vivo</i>	19
16.	Interacción entre las homeoproteínas Antp-Eyeless mediante BiFC.	20
17.	Importancia del aminoácido 19 en la interacción Antp-Scr.	21
18.	Diagrama del ensayo de interacción Ubx-Antp molecular mediante BiFC.	23
19.	Generación de la línea reportera VNUbxHD-VCAntpHD.....	34
20.	Integración de los transgenes AntpHD y UbxHD y dirección tejido específico	35
21.	Ensayo de competencia por BiFC en la interacción de Ubx-Antp con TF.....	36
22.	Construcción del plásmido pSC2VNUbx.....	40
23.	Construcción del plásmido pSC2VNUbxHD.....	41
24.	Construcción del plásmido pSC2VNUbxG19.....	43
25.	Efecto de la posición G19 en la interacción de Antp con Ubx mediante BiFC.....	45
26.	Análisis estadístico de la mutagénesis G19 en Antp-Ubx mediante BiFC.....	45
27.	Interacción molecular de los HDs de las homeoproteínas Antp y Ubx	46
28.	Expresión de Antp-Ubx en la transformación antena-pata en <i>Drosophila melanogaster</i>	47
29.	Digestión enzimática de los plásmidos competidores.	48
30.	La interacción de Antp-Ubx es afectada por Bip2, TBP, TFIIA γ y TFIIIE β	49
31.	Análisis estadístico del la interacción Antp-Ubx con FTs mediante BiFC competitivo.....	49

Lista de tablas

Tabla	Título	Página
1.	Reacción de PCR para amplificar el gen Ubx	24
2.	Programa de PCR para amplificar el gen Ubx	25
3.	Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen Ubx	25
4.	Reacción de PCR para amplificar el HD de Ubx	27
5.	Programa de PCR para amplificar el HD de Ubx.....	27
6.	Oligonucleótidos diseñados para amplificar el HD del gen Ubx	28
7.	Reacción de PCR para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx	29
8.	Programa de PCR para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx	29
9.	Oligos diseñados para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx	29
10.	Digestión del producto amplificado para la mutagénesis del aa 19 del HD de Ubx	30
11.	Transfecciones celulares para determinar la interacción Antp-Ubx.....	32

1. Resumen

Las homeoproteínas brindan la identidad a los segmentos a lo largo del eje antero-posterior en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Estas contienen el homeodominio (HD) altamente conservado que además de sus funciones de reconocimiento del ADN presenta interacciones proteína-proteína, con homeoproteínas y/o factores transcripcionales para llevar a cabo la especificidad funcional. Diversas interacciones proteína-proteína entre homeoproteínas están mediadas por el HD y otras regiones de las homeoproteínas. En esta tesis nos enfocamos en la importancia de Antp y Ubx en la especificación de la región torácica del embrión de *Drosophila* y los experimentos realizados a la fecha muestran que la interacción Ubx-Antp *in vivo* en *D. melanogaster* es a través de los HDs de ambas proteínas. Debido a la evidencia de la interacción de la hélice I en diferentes HDs, se realizó la disección molecular de la interacción Antp-Ubx para determinar si el aminoácido glutámico no. 19 de la hélice I del HD participa en esta interacción mediante mutagénesis sitio-dirigida y Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en cultivo celular. Además, se analizó el efecto funcional de la interacción de los HDs en la transformación antena-tarso mediante cruza genéticas y también se determinaron en Antp-Ubx las posibles interacciones triméricas de los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD y BIP2 mediante BiFC competitivo. Los resultados obtenidos confirman la interacción molecular Antp-Ubx a través de sus HDs ya que presenta un incremento en la interacción del 89% al 96% comparada con la homeoproteínas completas. En esta interacción específicamente la posición aminoacídica no. 19 de la hélice uno del HD de Antp es importante en la interacción mientras que la posición G19 de Ubx no afectó la interacción. Además, la interacción Antp^{HD}-Ubx^{HD} afectó la transformación homeótica antena-tarso obteniéndose una transformación parcial y se detectó a los factores de transcripción BIP2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β como posibles interactores tripartitos en el complejo Antp-Ubx mientras que EXD y TFIIB no mostraron estar involucrados en la interacción Antp-Ubx. Los resultados obtenidos nos permiten incluir a Antp y Ubx en los interactomas de Ubx y Antp respectivamente y abren la posibilidad para analizar si la posición aminoacídica no, 19 de la hélice I de Antp presenta un papel funcional *in vivo* en el control genético del desarrollo de *Drosophila*. Así mismo, postula la presencia probable de BIP2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β en los complejos multiméricos de los interactomas de Antp y Ubx en *D. melanogaster*.

2. Introducción

Los genes homeóticos establecen los ejes antero-posterior y dorso-ventral, durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Estos genes codifican a una secuencia altamente conservada denominada homeobox que codifica para una polipéptido de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD), el cual está conformado por tres α -hélices y reconoce una secuencia consenso de ADN (TAAT). Estas homeoproteínas actúan como factores transcripcionales, regulando la expresión de los genes necesarios para el desarrollo del eje antero-posterior de varios organismos multicelulares; en el caso de *Drosophila melanogaster*, estos genes son los encargados de dar la identidad a los segmentos que conforman el cuerpo de este organismo.

Debido a que los HDs están altamente conservados y reconocen secuencias nucleotídicas similares altamente distribuidas en los genomas es de especial interés saber cómo las homeoproteínas adquieren la especificidad para llevar a cabo sus múltiples y diferentes funciones *in vivo* en los diferentes organismos ya que además de participar en la morfogénesis, juegan un papel clave en la organogénesis, regulando una variedad de procesos celulares tales como, diferenciación, proliferación, migración y muerte celular.

Por lo que se ha propuesto que además de las funciones conservadas de reconocimiento ADN-proteína, las homeoproteínas pueden establecer interacciones proteína-proteína a través del HD u otros dominios proteicos, con otras proteínas, algunas de las cuales pueden actuar como cofactores y aumentar la afinidad y especificidad de unión al ADN, como es el caso de Extradenticle (EXD) quien se une a Ubx y Antp mediante dominios proteicos funcionales como UbdA y YPWM, respectivamente, y aumenta su afinidad de unión al ADN en *Drosophila melanogaster*.

Mediante ensayos *in vitro*, se encontró que AbdB interacciona con el ADN en conjunto con EXD y Hth (Kannan *et al.*, 2010) y que Lab, Scr, Antp, Ubx, AbdA interaccionan con EXD en forma dimérica y con Exd y Hth en forma trimérica (Hudry *et al.*, 2012). Más recientemente, Crocker y colaboradores encontraron que la interacción trimérica Ubx-Exd-Hth reconoce secuencias específicas en el ADN (Crocker *et al.*, 2015).

La importancia de las homeoproteínas Antp y Ubx en el desarrollo de *Drosophila* ha mostrado que Antp especifica los segmentos torácicos 1 y 2, encargándose del desarrollo del primer par de patas, mientras que Ubx establece la identidad del segmento torácico 3 y del resto de los abdominales y se encarga del desarrollo diferencial de alas y halterios. El análisis molecular ha mostrado que Ubx tiene

sitios de unión en el promotor 2 de Antp, regulando a este gen negativamente, lo cual apoya el fenómeno de prevalencia posterior que establece que los genes expresados posteriormente reprimen a los expresados anteriormente, definiendo tiempo y espacio precisos en la expresión de cada uno de los genes homeóticos. Para determinar si las interacciones proteína-proteína están también involucradas en la regulación de éstas homeoproteínas, recientemente, en nuestro laboratorio determinamos que la interacción entre las homeoproteínas Ubx y Antp, es mediada por los HDs de ambas homeoproteínas.

Otras interacciones mediadas por los HDs son, la interacción AbdA-Ubx y la homodimerización AbdA-AbdA (Hudry *et al.*, 2011), así como otras interacciones que han mostrado estar mediadas específicamente por la posición 19 de la hélice I del HD: Antp-Eyeless (Plaza *et al.*, 2008), Antp-AbdB (Cárdenas-Chávez, 2012), la formación de homodímeros de Scr-Scr (Papadopoulos *et al.*, 2012) así como, Antp-Scr (Elizondo-Rodríguez, 2016).

Debido a la importancia de Ubx y Antp en el control genético del desarrollo de *Drosophila melanogaster*, en esta tesis se propuso determinar la importancia del aminoácido 19 de la hélice I del HD de Antp, así mismo se analizó el efecto de la interacción Antp-Ubx en la transformación homeótica antena-tarso *in vivo* en adultos de *Drosophila melanogaster* se determinaron los factores transcripcionales BIP2, TBP, TFIIA γ , y TFIIIE β como posibles participes en interacciones triméricas en el complejo Antp-Ubx. Los resultados obtenidos permiten incluir a Antp y Ubx en los interactomas de Ubx y Antp respectivamente y abren la posibilidad para analizar si la posición aminoacídica no, 19 de la hélice I de Antp presenta un papel funcional *in vivo* en el control genético del desarrollo de *Drosophila*. Así mismo, abren la posibilidad para analizar la presencia probable de los factores transcripcionales BIP2, TBP, TFIIA γ y TFIIIE β en los complejos multiméricos de los interactomas de Antp y Ubx en *D. melanogaster*

3. Antecedentes

3.1 Genes Hox en *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un modelo clásico en genética e investigación básica y aplicada ya que posee características importantes como ciclo de vida corto, el cual se muestra en la Figura 1, así como gran número de prole, fácil cultivo en el laboratorio así como el hecho de que es un organismo metamerizado, es decir, su cuerpo consiste en una cadena de segmentos o metámeros que se desarrollan de forma independiente unos de otros y que confieren la estructura segmentada característica de los insectos.

Esta organización segmentada se establece en el embrión temprano, representado en la Figura 2, en el que ya se encuentran separadas las células que formarán cada segmento, el cual se desarrolla de forma particular tanto en sus aspectos externos como en las estructuras internas, musculatura, sistema nervioso, etc.

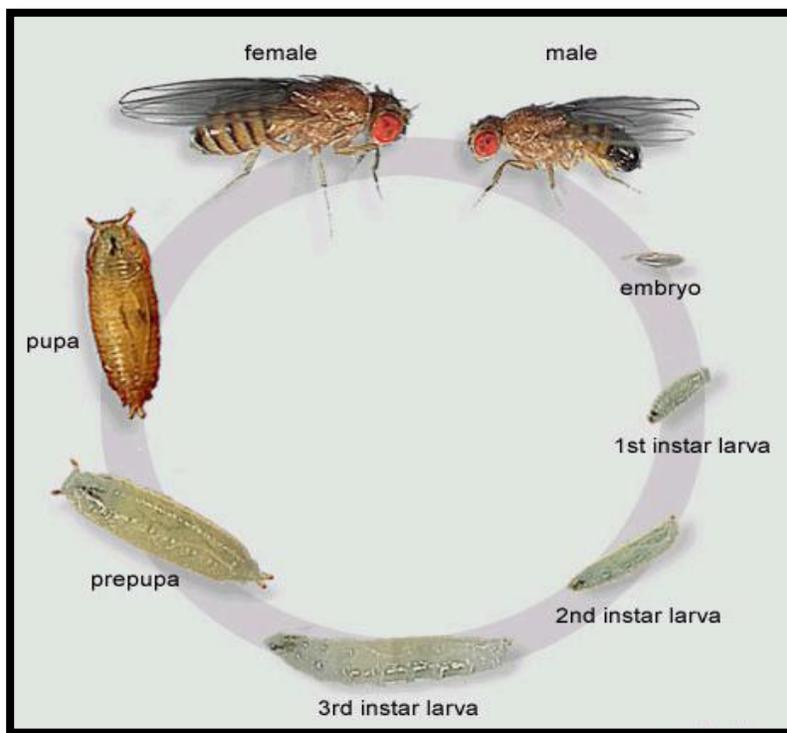


Figura 1. Ciclo de vida de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La imagen muestra el ciclo de vida de *D. melanogaster* el cual dura aproximadamente de 10-12 días a 25°C y consta de varias etapas: embrión, tres estadios larvarios, uno de prepupa, otro de pupa en el que ocurre la metamorfosis, para posteriormente eclosionar como adulto. Tomado de Weigmann *et al.*, 2003

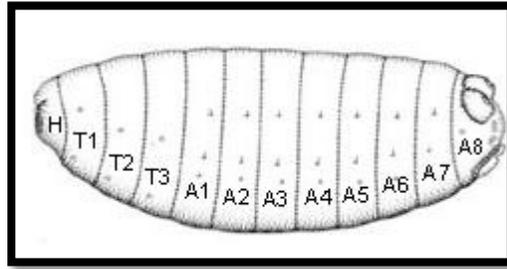


Figura 2. Embrión de *Drosophila melanogaster*. El diagrama muestra los segmentos torácicos así como los abdominales de un embrión, en los cuales se expresan los genes Hox, en el tiempo y espacio preciso, dando lugar a las estructuras que forman el cuerpo de *Drosophila*. Tomado de Weigmann *et al.*, 2003

Mutaciones homeóticas que ocurren espontáneamente en *Drosophila* (García-Bellido, 1977) permitieron identificar el control genético del desarrollo necesario para la especificación del plan corporal, lo que llevó al descubrimiento de los genes homeóticos, llamados así en base al término “Homeosis” descrito por William Bateson en 1894 que describe el desplazamiento de una estructura del cuerpo por otra homóloga.

Estos genes presentan una secuencia altamente conservada denominada homeobox (secuencia de ADN; región de aproximadamente 180 pb de longitud) que codifica para un polipéptido de 60 aminoácidos (dominio proteico) conocido como Homeodominio (HD) el cual se compone de tres alfa hélices ubicadas en el extremo C-terminal y una secuencia que no adopta una conformación en particular hacia el extremo N-terminal como se observa en la Figura 3. El HD se une al ADN principalmente por medio de la tercer alfa hélice, llamada también hélice de reconocimiento ya que reconoce al ADN en el surco mayor a través de los residuos Ile47, Gln50, Asn51, and Met54, mientras que el residuo Arg5 ubicado en el extremo N-terminal del HD, reconoce en menor grado el surco menor del ADN.

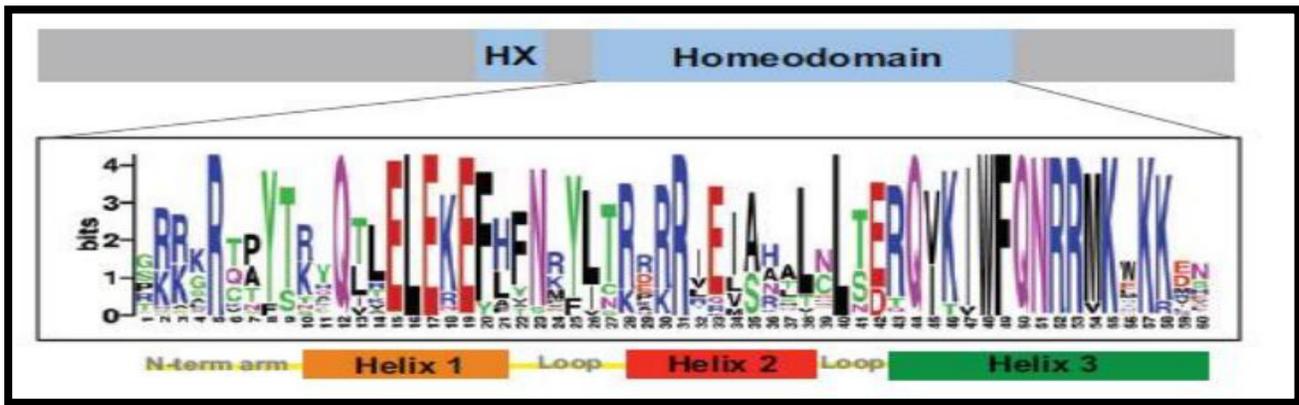


Figura 3. Representación del homeodominio en las homeoproteínas. En el esquema se muestran los dominios proteicos de una homeoproteína, el hexapéptido (HX) o tetrapéptido en el caso de *Drosophila* y el homeodominio (HD), el cual es codificado por el homeobox y se conforma de tres alfa hélices. Tomado de Rezsözy *et al.*, 2015

Se han identificado genes homeóticos en otras especies, sobre todo en vertebrados, por lo tanto el homeobox es una secuencia universal de los organismos multicelulares. Por ello, el HD presenta baja especificidad de unión al ADN, reconociendo en la mayoría de los casos, la secuencia altamente distribuida en el genoma, TAAT como se observa en la Figura 4 (Mann., *et al.* 2009).

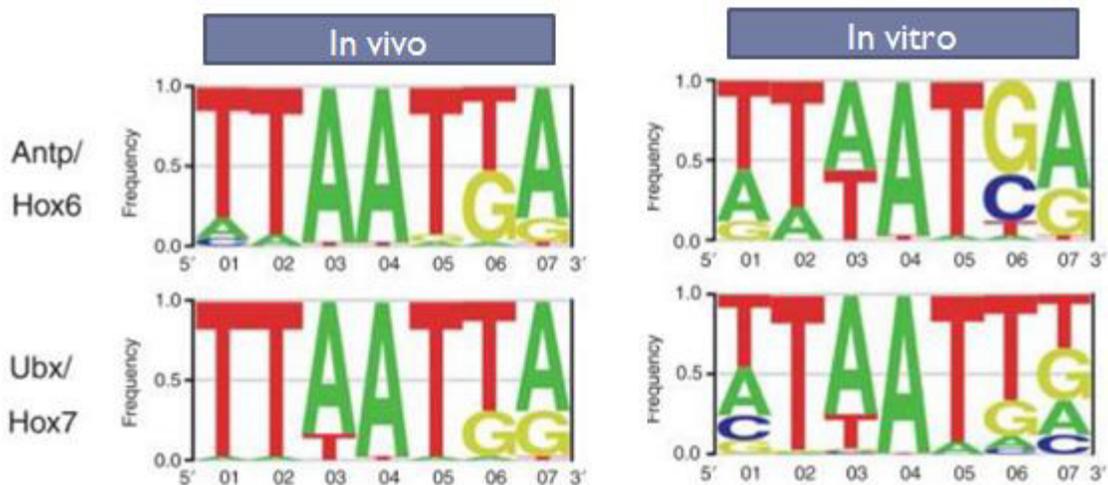


Figura 4. Sitios de unión de las homeoproteínas Antp y Ubx y sus ortólogos. La gráfica muestra la frecuencia estimada de los sitios de unión *in vivo* e *in vitro* de las homeoproteínas Antp y Ubx y sus homólogos Hox6 y Hox7 en humanos concluyendo que los HDs se unen a secuencias ricas en “AT”, encontrando 87,307 sitios TAATTA y 86,201 sitios TAATGA distribuidos en el genoma. Modificado de Mann *et al.*, 2009

Debido a lo anterior, las homeoproteínas actúan como factores de transcripción y por lo tanto regulan la actividad de redes de genes que se encuentran río abajo reconociendo determinadas secuencias de ADN y regulando su transcripción, ya sea activando y/o reprimiendo selectivamente sus genes blanco.

Una de las funciones de los genes homeóticos es determinar la identidad de los segmentos a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventrales de *Drosophila* así como de vertebrados, respectivamente, determinando por lo tanto la morfogénesis del cuerpo ya que actúan como selectores entre las diferentes vías de desarrollo, las cuales regulan genes que se encuentran bajo su control, por lo que en un segmento determinado del cuerpo de la mosca, una homeoproteína modula la expresión de genes realizadores que en última instancia llevarán a cabo la diferenciación celular específica del tejido (García-Bellido, 1975 y Graba *et al.*, 1997).

Los genes homeóticos se encuentran organizados en dos complejos localizados en el tercer cromosoma y separados por aproximadamente 8 millones de bases. Como se muestra en la Figura 5, el primero de ellos, denominado “Complejo Antennapedia” (ANT-C) comprende los genes Labial (lb), Proboscipedia (pb), Deformed (Dfd), Sex combs reduced (Scr) y Antennapedia (Antp). En el “Complejo Bithorax” (BX-C) se encuentran los genes Ultrabithorax (Ubx), Abdominal-A (AbdA) y Abdominal-B (AbdB). Los genes del complejo ANT-C especifican las características morfológicas de la cabeza y los dos primeros segmentos torácicos así como la epidermis en el desarrollo del sistema nervioso central desde el primer parasegmento hasta el quinto mientras que los del complejo BX-C determinan la identidad morfológica del tercer segmento torácico, abdomen y la epidermis y el sistema nervioso central de los parasegmentos 5 al 14 (Lewis, 1978).

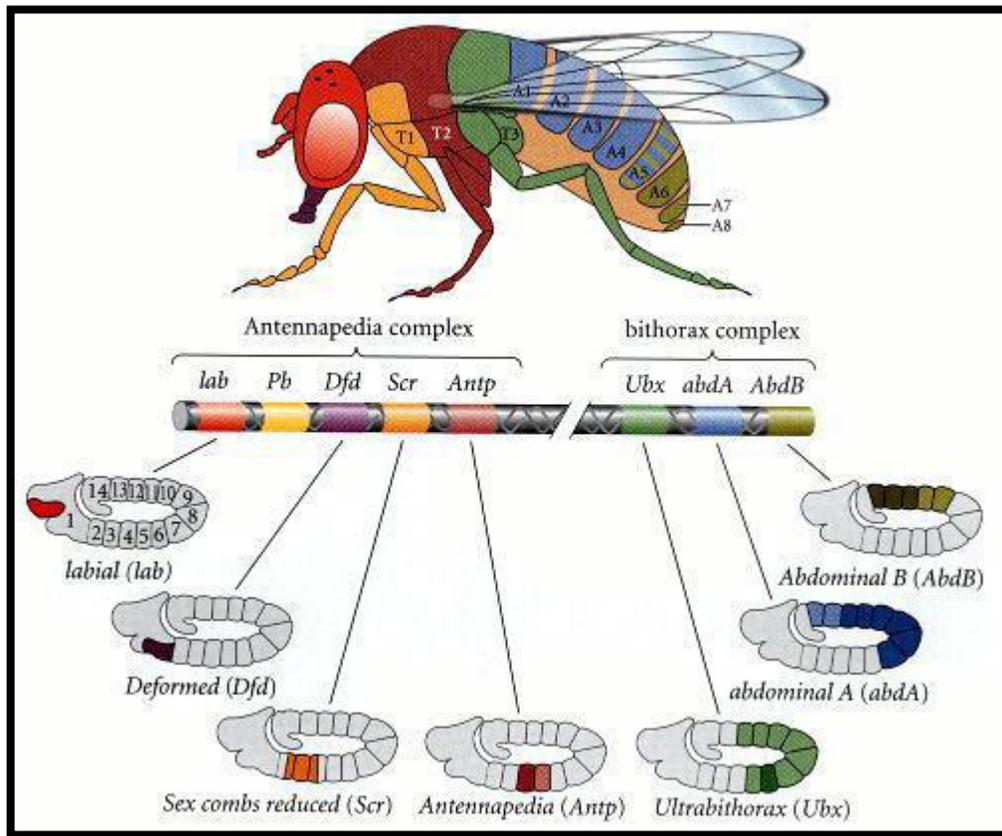


Figura 5. Genes homeóticos en *Drosophila melanogaster*. En el diagrama se muestran los complejos ANT-C y BX-C que comprenden los genes Hox en *Drosophila*, así como el patrón de expresión de cada uno, su ubicación en el cromosoma y los elementos del cuerpo de la mosca los cuales se encargan de especificar. Tomado de Gilbert, 2003

3.2 Antennapedia

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

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

Antp promueve la identidad de la pata mediante la represión de los genes determinantes de la antena. En los discos de las patas, *Antp* previene el desarrollo de la antena reprimiendo directamente al gen Homótorax (*hth*), esto es regresando la ruta del desarrollo al estado basal (Cásares y Mann, 1998).

El análisis de la expresión de *Antp* en embriones mutantes revelan tres niveles de regulación de *Antp*: regulación por productos de los genes del complejo bitórax, loci homeóticos pleiotrópicos, y por los productos del mismo *Antp* (Hafen *et al.*, 1983). La función de la proteína *Antp* ha sido revelada por mutaciones de ganancia y pérdida de función (Schnewly y Gehring, 1985; Martinez-Arias, 1986). La falta de función de *Antp* causa la transformación de los segmentos torácicos T2 y T3 en estructuras más anteriores con algunas características de T1 (primer segmento torácico) y de los segmentos de la cabeza. La proteína *Antp* también es requerida en la formación del intestino medio (Reuter y Scout, 1990) así como en el desarrollo apropiado del sistema nervioso periférico (Heuer y Kaufman, 1992). El producto de *Antp* posee un importante papel tanto promoviendo la vía torácica como previniendo el desarrollo de las estructuras de la cabeza y las antenas (Carroll *et al.*, 1986).

Como se observa en la Figura 6 los mutantes homeóticos de ganancia de función muestra que *Antp* permite la transformación de antenas por patas debido a la expresión de la homeoproteína en un lugar donde normalmente no se expresa (Pattatucci y Kaufman, 1991).

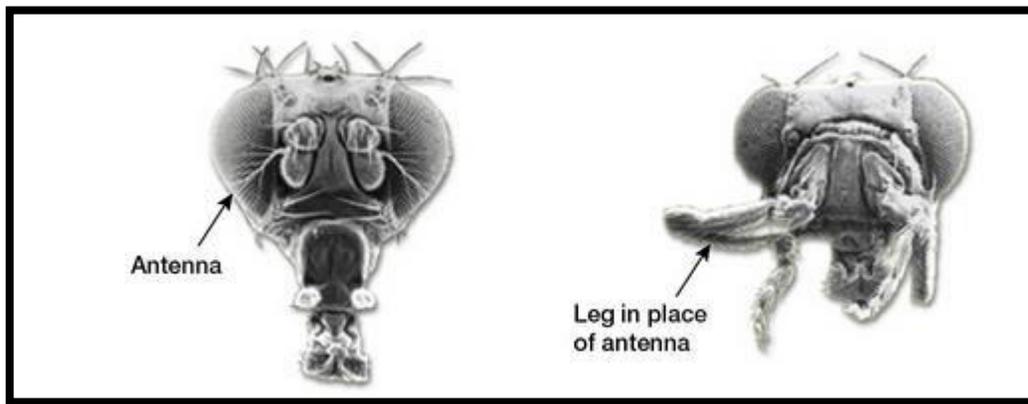


Figura 6. Mutante homeótica Antennapedia. La fotografía de la izquierda muestra el fenotipo wt de *Drosophila* mientras que la fotografía de la derecha describe el fenotipo resultante de la expresión de *Antp* en un lugar donde normalmente no se expresa, causando la transformación de antenas en pata. Tomado de Alberts *et al.*, 2002

En el gen *Antp* la regulación inicia a nivel de sus promotores P1 y P2 que presentan sitios de unión para la proteína Polycomb (Zink *et al.*, 1991). El transcrito del promotor P1 es necesario para el desarrollo del tórax dorsal, mientras que el transcrito de P2 es requerido para el desarrollo del tórax ventral y la viabilidad embrionaria (Bermingham *et al.*, 1990). La transcripción del promotor P1 es

activada por la proteína Kruppel, mientras que la proteína producida por el promotor P2 es activada por las proteínas.

También se han identificado sitios de unión en el promotor P2 de *Antp* para las homeoproteínas *AbdA* y *Ubx*, las cuales se unen para reprimir la transcripción de este promotor de *Antp* (Appel y Sakonju, 1993).

3.3 Ultrabithorax

Ultrabithorax (*Ubx*) es uno de los tres genes que constituyen el complejo Bithorax, (Sanchez-Herrero *et al.*, 1985) y fue el primer mutante homeótico referido en *Drosophila*, donde una mutación suprime su función en el segmento T3 y causa la transformación de este a T2 (desarrollo de alas), resultando en la aparición de un par de alas extra como se observa en la Figura 7.

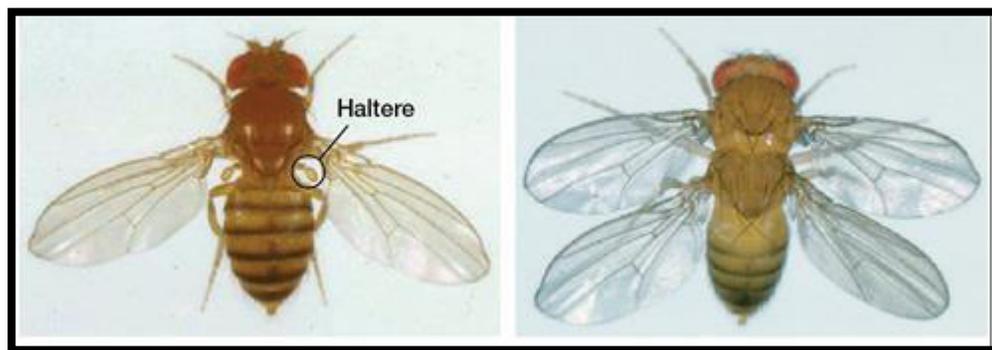


Figura 7. Mutante homeótica Ultrabithorax. La fotografía de la derecha muestra el fenotipo resultante de la mutación que causa la transformación del segmento T3 a T2, debido a la ausencia de *Ubx*, teniendo como resultado el desarrollo de un par de alas en lugar de halteres. Tomado de Alberts *et al.*, 2002

Ubx establece la identidad del segmento T3 y del resto de los abdominales. Dentro de estas regiones, *Ubx* se expresa en el intestino medio, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico (Bondos *et al.*, 2004). Por lo que *Ubx* se encarga del desarrollo de halteres, estructuras de balance, al modificar el desarrollo de alas, regulando la expresión de genes blanco que generan los halteres (Papadopoulos y Akam, 2011).

Uno de los genes blancos de *Ubx* es el gen Decapentaplégico (*Dpp*), quien es activado en el intestino medio, pero es reprimido en el desarrollo de halteres.

Ubx, además participa en muchos procesos durante la morfogénesis en *Drosophila*, como en la diferenciación de venas, organización del disco genital, induce la proliferación celular, participa en la supervivencia y en apoptosis.

Se han identificado varios dominios funcionales en Ubx. El dominio de activación está constituido por los aminoácidos 159 al 242 y río arriba se encuentra una región potenciadora correspondiente por los aminoácidos 68 al 158 y río abajo del dominio de activación se encuentra el HD (Tan *et al.*, 2002)

Ubx genera 5 diferentes RNAs, debido al proceso de splicing alternativo y cada uno codifica una isoforma diferente. Las isoformas han sido denominadas Ia, IIa, Ib, IIb y IVa. Las 5 proteínas producidas por las isoformas incluyen la misma región amino terminal de 247 aminoácidos y la misma región carboxilo terminal de 99 aminoácidos (donde se encuentra el HD) la cual es una región rica en glicina-alanina que contribuye a la represión de la transcripción (Ronshaugen *et al.*, 2002; López *et al.*, 1996; Galant y Carroll., 2002). Estas regiones en común son codificadas por 2 exones grandes denominados E5' y E3'. Las isoformas se distinguen por un segmento interno que se encuentra a solo 4 aminoácidos río arriba del HD y consiste en tres elementos: B, mI y mII. El elemento B comprende 9 aminoácidos codificados entre dos sitios donadores de splicing ("a" y "b") en el extremo de E5'. Mientras que mI y mII, de 17 aminoácidos de longitud cada uno, son codificados por exones separados (López, 1996). Beachy *et al.*, en 1985 propusieron que las proteínas producidas por los diferentes transcritos de Ubx son necesarias para la identidad de las funciones dadas por Ubx. Después se observaron los efectos de las mutaciones en la distribución metamérica de esta familia de proteínas.

Las estructuras de los RNAs y las secuencias aminoacídicas de los diferentes elementos de Ubx están conservadas en diferentes especies de *Drosophila* (Bomze y López., 1994) sugiriendo que el proceso de "splicing" alternativo es importante para la función de Ubx y que las diferentes isoformas pueden ser específicas para actuar en diferentes contextos del desarrollo.

Se ha demostrado que los diferentes RNAs de Ubx se expresan diferencialmente tanto temporal como espacialmente. Las isoformas Ia y Ib se producen principalmente en el mesodermo en el embrión, mientras que las isoformas IIa y IIb se generan en discos imaginales en larvas, la isoforma IVa es la única que se produce en el sistema nervioso central tanto en embriones como en larvas. La expresión ectópica de isoformas diferencialmente de Ubx transforma el sistema nervioso periférico. (López, 1996). Las isoformas de Ubx difieren en su capacidad para activar su blanco y generar el correcto patrón de desarrollo muscular (Mann y Hogness., 1990; Subramaniam *et al.*, 1994).

En el contexto de regulación, Ubx se une a su propio promotor regulándose negativamente por su propia proteína, y un aumento excesivo y transitorio en su expresión produce los mismos efectos

fenotípicos que la falta de función del mismo, es decir, la transformación de halterios en alas (Beachy *et al.*, 1988).

Al igual que AbdA, Ubx posee sitios de unión en el promotor 2 de Antp, evitando de esta manera la transcripción de Antp (Appel y Sakonju, 1993).

3.4 Interacciones moleculares proteína-proteína

Debido al alto grado de homología que presentan las homeoproteínas estas reconocen secuencias consenso en el ADN las cuales no son suficientes para lograr su especificidad. Por lo anterior aun no están completamente esclarecidos los mecanismos por los cuales las homeoproteínas llevan a cabo sus actividades de regulación así como funcionales.

Un factor importante que modula la interacción ADN-homeoproteína es el contexto de la cromatina ya que este determina en que sitios se unirán las homeoproteínas. El estado compacto de los nucleosomas no permite que se lleven a cabo la mayoría de las interacciones ADN-homeoproteína, por lo tanto la mayoría de los factores transcripcionales se unen a regiones abiertas de cromatina, por lo que la accesibilidad juega un papel importante en la especificidad (Kaplan *et al.*, 2011, Liet *et al.*, 2011, Wunderlich y Mirny, 2009).

Otro aspecto que considerar es que la unión al ADN de una homeoproteína puede ser individual o bien puede reclutar cofactores formando complejos multiméricos entre ellas y con el ADN, lo que permite reconocer secuencias diferentes a las que reconoce una homeoproteína por sí sola. Por lo tanto la presencia o ausencia de factores transcripcionales en cierta célula o tejido también influye en la afinidad de una homeoproteína. Como se muestra en la Figura 8, el reclutamiento de dichos cofactores depende del contacto con el ADN o bien de interacciones proteína-proteína entre ellos y el complejo homeoproteína-cofactor (Mann *et al.*, 2009, Jolma *et al.*, 2015).

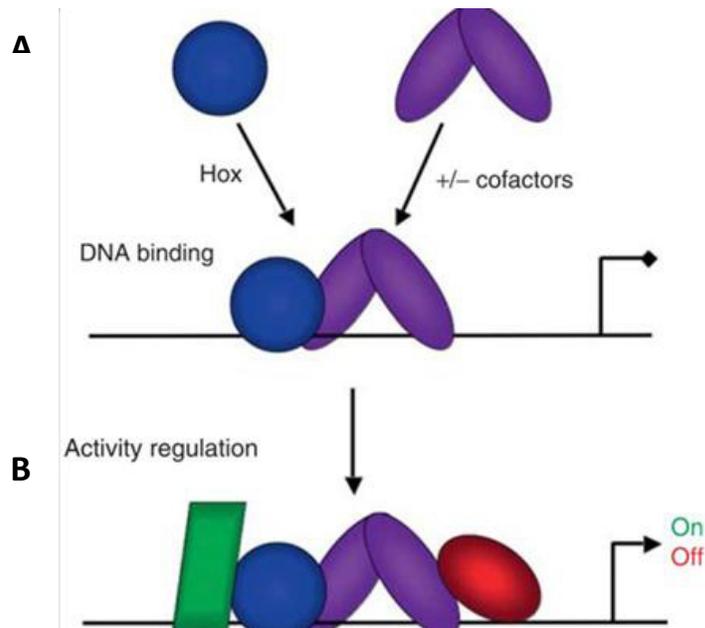


Figura 8. La especificidad de una homeoproteína está mediada por los cofactores a los que se une. **A.** La imagen muestra la unión al ADN de una homeoproteína puede ser individual o bien estableciendo interacción con cofactores. **B.** Sin embargo, la regulación transcripcional se logra al reclutar múltiples cofactores y por lo tanto formando complejos multiméricos. Tomado de Mann *et al.*, 2009

3.4.1 Interacciones con dominios diferentes al HD

El cofactor mejor caracterizado en *Drosophila melanogaster*, es la proteína Extradenticle (Exd), la cual pertenece a la subclase PBC de las proteínas con homeodominio TALE (por sus siglas en inglés: three amino acid loop extension) y que contienen el motivo conservado PBC en el extremo N-terminal del homeodominio (Burglin, 1997; Moens y Selleri, 2006).

En conjunto con Exd, Homothorax (Hth) forma un complejo con las homeoproteínas incrementando la unión de estas a múltiples nuevos sitios, por ejemplo, Ubx, analizado por Beh, *et al.*, en el 2016.

Se ha mostrado que las homeoproteínas interactúan a través de motivos lineales cortos (SLiMs, por sus siglas en inglés) (Baeza, *et al.*, 2015), por ejemplo, la interacción con EXD es a través del motivo YPWM, dominio altamente conservado ubicado río arriba del HD y que se conecta a la homeoproteína completa mediante el brazo amino-terminal flexible. Exd también interactúa con Ubx y AbdA (Johnson *et al.*, 1995) mediante un dominio proteico denominado UbdA (KEL/INEQ) como se observa en la Figura 9, el cual está localizado río abajo del HD (Merabet *et al.*, 2007). Dicho dominio se pliega en un puente flexible con la hélice de reconocimiento del HD y establece la interacción entre proteínas Hox y proteínas de la clase PBC (Foos *et al.*, 2015).

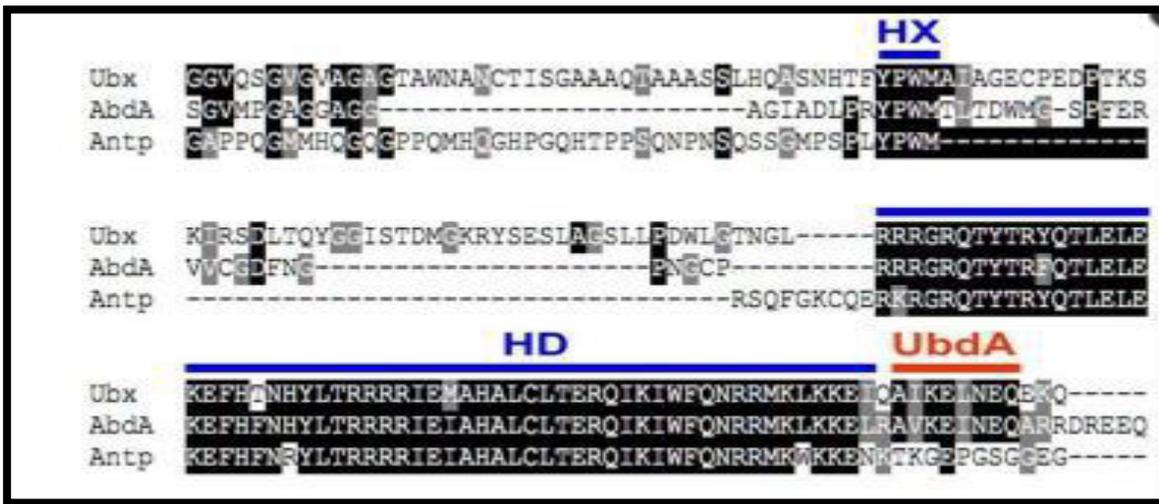


Figura 9. El motivo UbdA presente en Ubx y AbdA. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas proteicas de Ubx, AbdA y Antp muestra que a diferencia del motivo YPWM (HX) y el HD, los cuales están altamente conservados en las tres homeoproteínas, el motivo UbdA se encuentra únicamente en Ubx y AbdA y está ausente en Antp.

Tomado de Merabet *et al*, 2007

La importancia de ambos motivos (YPWM y UbdA) en interacciones proteína-proteína de diversas homeoproteínas fue analizada por Baeza y colaboradores en el 2015. Antp wt presentó interacción con 18 factores de los 35 analizados (Doc2, Apt, Su(H), Mam, Twi, Mad, Mef2, Slou, Dll, Eve, Svp, Srp, Sal, Tsh, Kr, Pnt, TFIIE β y Bin) como se muestra en la Figura 10A, mientras que la versión de Antp con el motivo YPWM mutado (Antp^{HX}) mostró cambios en las interacciones. Como se muestra en la Figura 10B algunas interacciones permanecieron intactas (Su(H), Mam, Slou, Srp, Tsh y Pnt), mientras que otras se generaron (Mid, Kn, Nau, Bap, Lbe y Pnr), o se intensificaron (Mef2), e inclusive algunas disminuyeron o se perdieron (Doc2, Apt, Twi, Mad, Dll, Eve, Salm, Kr, TFIIE β y Bin). Estos resultados confirman la importancia de los motivos lineales cortos como el motivo YPWM en el Interactoma de Antp mediante interacciones proteína-proteína.

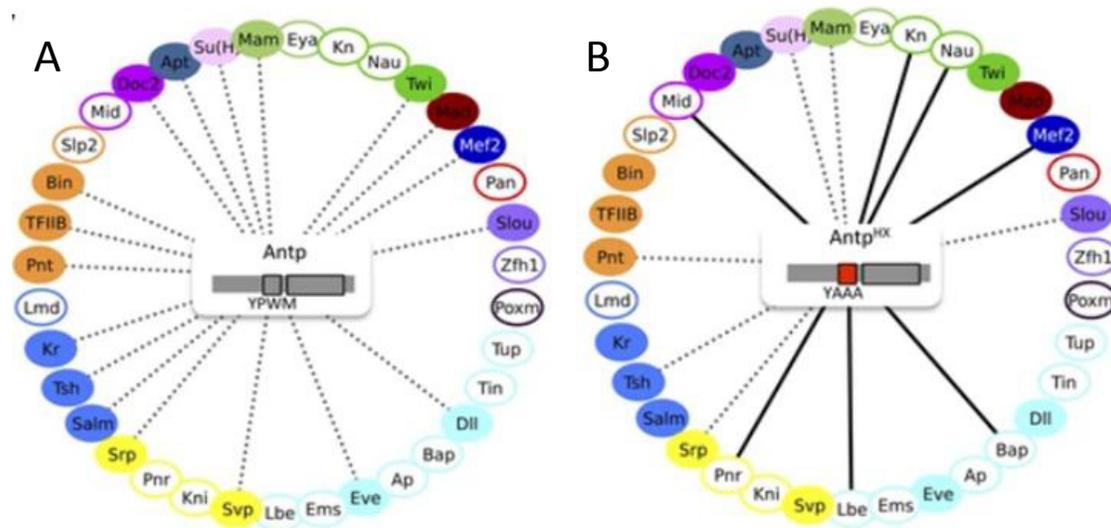


Figura 10. Interactoma de Antp. A El diagrama muestra los 35 factores analizados con Antp wt y en línea punteada se muestran los factores que interaccionaron con Antp. B. El diagrama muestra los 35 factores analizados con Antp^{HX} en la que el motivo YPWM fue sustituido por (YAAA). La línea punteada muestra la interacción; la línea sólida muestra nuevas interacciones o incremento de las ya detectadas, mientras que la ausencia de la línea muestra la pérdida de la interacción. Modificado de Baeza *et al.*, 2015

El análisis del interactoma de Ubx wt mostró que de 35 factores analizados, 21 factores presentaron interacción como se observa en la figura 11A (TFIIE β , Bin, Slp2, Mid, Doc2, Apt, Su(H), Nau, Twi, Mad, Mef2, Pan, Slou, Tup, Tin, Bap, Ap, Eve, Ems, Kni y Tsh). Por otro lado, las versiones mutantes Ubx^{HX} y Ubx^{UbdA} originaron cambios en las interacciones, los cuales se encuentran representados en el mapa de calor de la Figura 11B.

En el caso de la versión mutada en YPWM (Ubx^{HX}) las interacciones que se mantuvieron e incrementaron (amarillo) fueron Ap, Tin, Apt, Mef2, Doc2, Eve y Twi, mientras que las interacciones que se perdieron (rojo) fueron con los factores Ems, Slp2, Tsh, Bap, Kni, Mad, Nau, y Slou y las interacciones que permanecieron sin cambio (verde) fueron con los factores Su(H), TFIIE β , Tup y Mid. En el caso de la versión mutante de Ubx^{UbdA} las interacciones que se generaron e incrementaron fueron con los factores Ap, Tin, Ems, Slp2, Tsh, Su(H), TFIIE β , Tup, mientras que las interacciones que se perdieron fueron con los factores Mid, Bap, Kni, Mad, Nau, y Slou y las interacciones que permanecieron sin cambio fueron con los factores Apt y Mef2. Estos resultados muestran que ambos motivos lineales cortos (YPWM y UbdA) son importantes en las interacciones proteína-proteína de Ubx con diferentes factores transcripcionales.

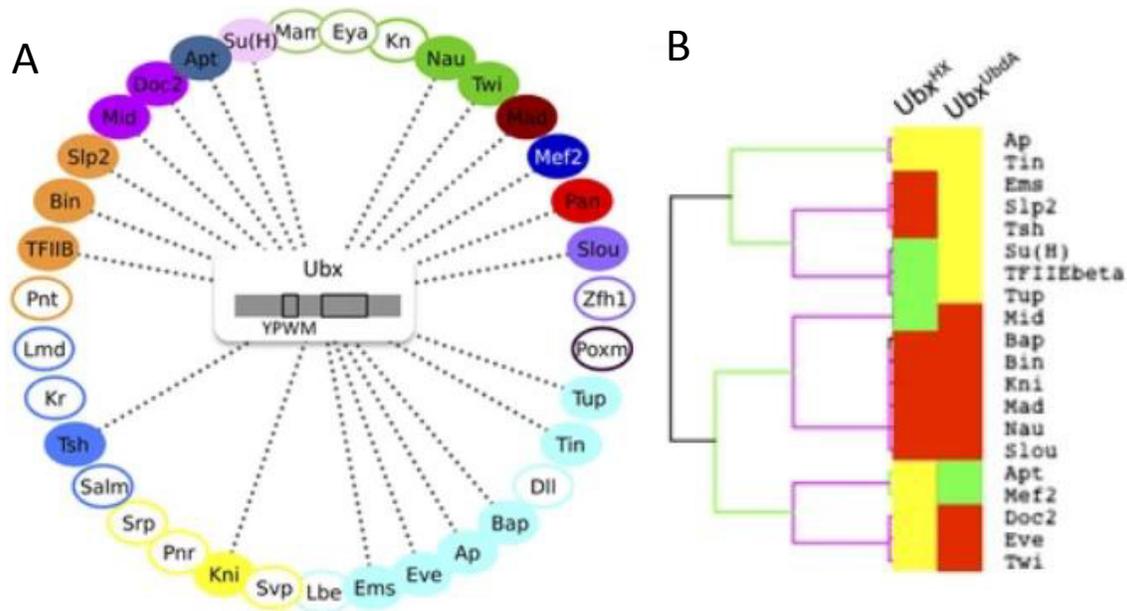


Figura 11. Interactoma de Ubx.A. El diagrama muestra los 35 factores analizados para Ubx; la línea punteada muestra los 21 factores que presentaron interacción con Ubx. **B.** El mapa de calor muestra los factores que interaccionaron con las versiones mutantes de Ubx (YPWM sustituido por YAAA y UbdA sustituido por VVLIVA). El color amarillo muestra el incremento y una nueva interacción. El color rojo muestra ausencia y pérdida de interacción mientras que el color verde muestra interacción sin cambio. Modificado de Baeza *et al.*, 2015

Ademas se ha reportado que homeoproteínas como Ubx, AbdA y AbdB se unen a sitios específicos en ausencia de Exd/Hth, por ejemplo, Ubx se encarga de la formación de halterios al modificar el desarrollo de alas, regulando la expresión de genes blanco que generan los halterios (Galant R, *et al.*, 2002, Papadopoulos y Akam, 2011).

En nuestro laboratorio se ha determinado que Antp y el factor transcripcional BIP2 (región aminoacídica 2-235) interaccionan mediante el motivo YPWM para la transformación homeótica ojo-ala (Prince *et al.*, 2008) y con TBP a través de las regiones poly Q6 y poly Q9 (Ovalle-Maqueo, 2014, Montalvo-Mendez, 2016).

Recientemente, se determinó un nuevo cofactor no perteneciente a la clase PBC de proteínas, el factor de pausa de la transcripción MIBP que presenta interacción física con Ubx y AbdA en promotores previamente unidos por proteínas del grupo Polycomb Group (PcG) en embriones de *Drosophila*. Estos resultados demostraron la regulación transcripcional de MIBP asociada a cambios en la cromatina en procesos controlados por homeoproteínas *in vivo* (Zouazet *et al.*, 2017).

Debido a que la selección del sitio de unión depende del cofactor utilizado (Beh *et al*, 2016) es importante identificar nuevos cofactores que permitan explicar la especificidad de las homeoproteínas para regular la transcripción de genes blanco.

3.4.2 Interacciones mediadas por el HD

La homeoproteína AbdA forma dímeros siendo el HD el principal dominio en dicha interacción como se muestra en la Figura 12.

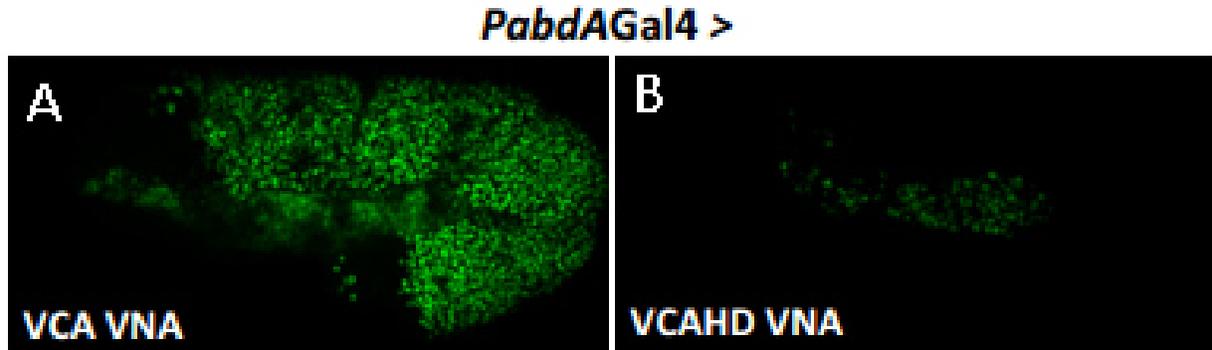


Figura 12. Homodimerización de la homeoproteína AbdA dependiente del HD. **A.** El embrión de *Drosophila* muestra la reconstitución de Venus por la formación de dímeros de AbdA. **B.** En la imagen de la derecha se observa que al deletar el homeodominio se abolía la interacción. Tomado de Hudry *et al.*, 2011

El HD de la proteína AbdA demostró ser importante en la interacción con las homeoproteínas Apterous, Tailup/isled (Tup) y Distaless (Dll). Estos experimentos se realizaron en embriones mediante BiFC, utilizando solo el HD de AbdA con las proteínas wt antes mencionadas (Baeza *et al.*, 2015).

Otra interacción mediada por los homeodominios corresponde a la descrita por Cárdenas-Chávez en el 2012, Antp-AbdB, que destaca la importancia del HD de Antp, como se observa en la Figura 13. Dicha interacción se confirmó posteriormente *in vivo* (Adashi *et al*, 2018).

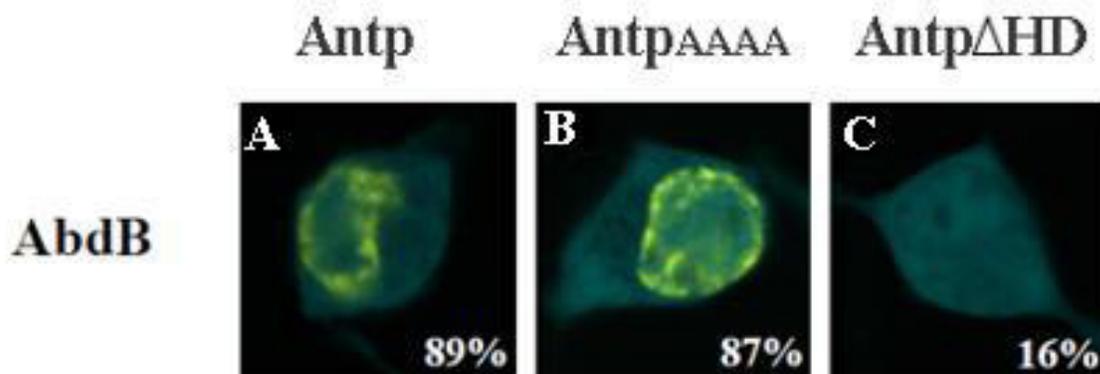


Figura 13. Interacción entre las homeoproteínas Antp-AbdB.A.La interacción de las homeoproteínas Antp y AbdB correspondió a un 89%. **B.** Al sustituir el hexapéptido por alaninas no se modifica la interacción significativamente (87%), **C.** como ocurre al deletar el HD de Antp, por lo que la interacción es mediada por el HD de Antp.

Modificado de Cárdenas-Chavez, 2012

En el 2014 se determinó mediante BiFC que homeoproteínas como Dfd, AbdA y Ubx interaccionan con la subunidad 19 del Complejo Mediador de la transcripción y que AbdA y Ubx específicamente interaccionaron vía su HD *in vivo* en embriones de *D. melanogaster* como se observa en la Figura 14.

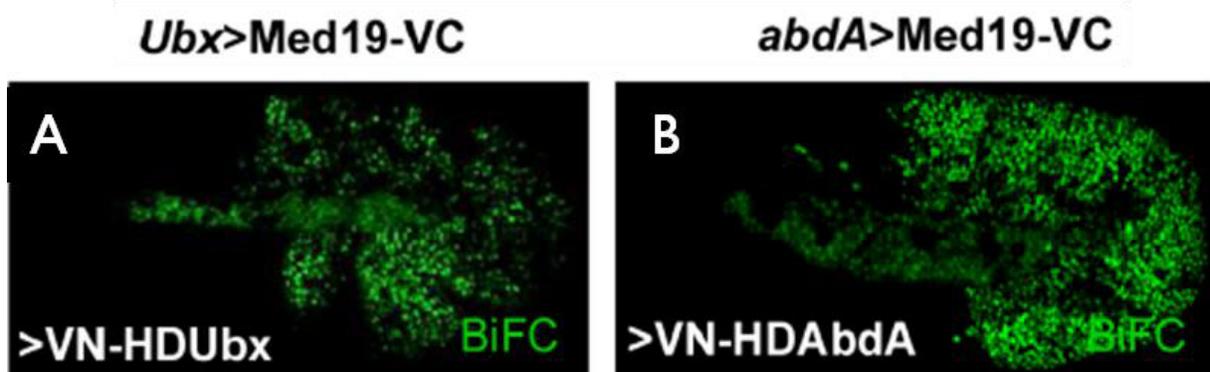


Figura 14. Interacción Med19-Ubx y -AbdA.A.La imagen muestra la fluorescencia producto de la interacción del UbxHD y Med 19. **B.** la imagen muestra la interacción entre las proteínas Med19 y AbdAHD mediante BiFC. Tomado de Boube *et al.*, 2014

También se ha determinado que Antp y Ubx interaccionan con miembros de la maquinaria basal de transcripción como TFIIE β (Kusiora *et al.*, 1996, Bondos *et al.*, 2004, Baeza *et al.*, 2015) y en nuestro laboratorio se ha determinado que Antp interacciona específicamente con TFIIE β a través de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD (Altamirano-Torres, 2014).

Interesantemente, también mostramos que la interacción Ubx-Antp es mediada por los HDs (Figura 15), la cual se determinó *in vivo* en embriones de *Drosophila melanogaster* (Villarreal-Puente, 2015).

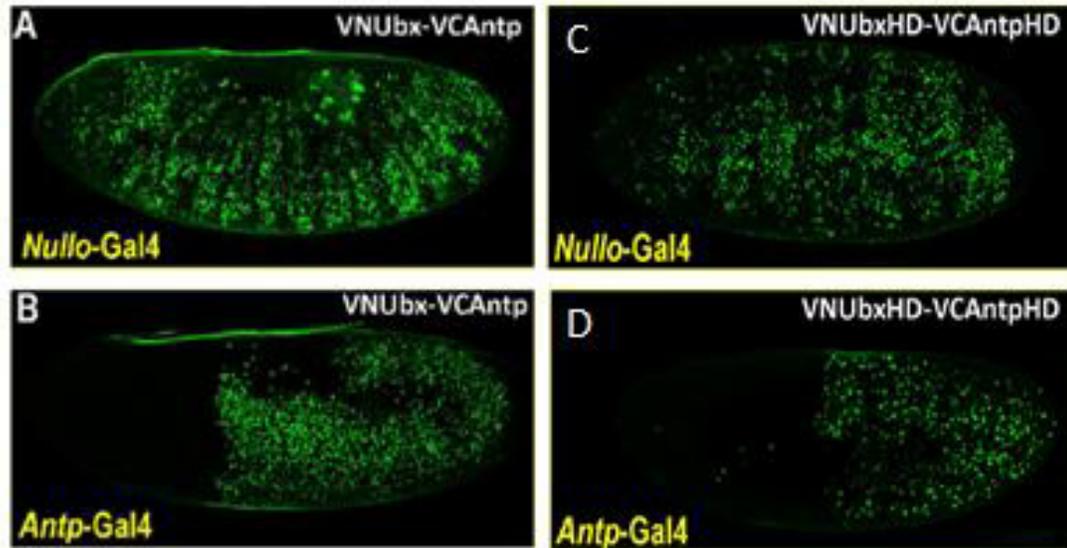


Figura 15. Interacción Ubx-Antp determinada por BiFC en embriones *in vivo*. A y B. Los embriones de la izquierda muestran la interacción de las proteínas Ubx-Antp. C y D. Los embriones de la derecha muestran la interacción de los HDs de las proteínas Ubx-Antp. Modificado de Villarreal-Puente, 2015

3.4.3. Interacciones que involucran la posición no. 19 de la hélice I de los homeodominios

Plaza y colaboradores en el 2008 usaron el sistema doble híbrido en levaduras, el cual previamente mostró que AntpHD inhibió la transactivación del enhancer sine oculis (so10) por Eyeless (Plaza *et al.*, 2001) para buscar mutaciones en el HD de Antp que fueran capaces de restablecer la transactivación de so10 sin afectar la unión de Antp a HB1 (multimeric ANTP binding sites) e indirectamente propusieron varios residuos aminoacídicos como partícipes en interacciones proteína-proteína. Las mutaciones se realizaron al azar en el HD de Antp en las posiciones 15 (E15G) y 19 (E19G) dentro del motivo altamente conservado TLELEKEF en la hélice I así como la substitución T27A de la hélice II usando la técnica “error prone-PCR”. La capacidad de unión a HB1 de estas mutantes mostró que no afectaban la unión al ADN pero fueron menos eficientes en reprimir Eyeless en comparación con Antpwt por lo que se propusieron como candidatas a participar en interacciones proteína-proteína y fueron analizadas en células HEK293 e *in vivo* mediante BiFC. Los resultados mostraron que la posición aminoacídica no. 19 de la hélice I del HD de Antp es importante en la interacción Antp-Ey como se muestra en la Figura 16.

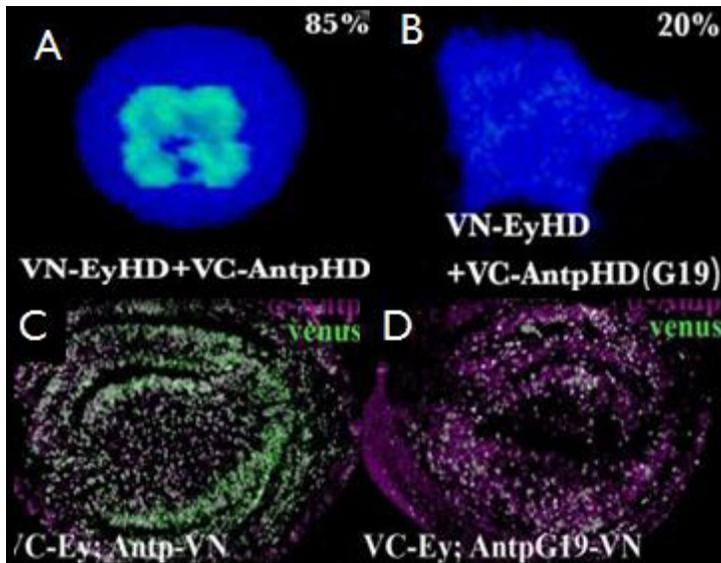


Figura 16. Interacción entre las homeoproteínas Antp-Eyeless mediante BiFC. Las células HEK293 fueron co-transfectadas con los plásmidos codificantes a Antp y Ey para analizar la interacción **A**. Se muestra la interacción Antp-Ey en un 85% de las células lo que muestra la interacción mediada por los HDs de ambas proteínas **B**. La mutación G19 del HD de Antp inhibe la interacción EyHD-AntpHD hasta un 20%. **C**. El disco imaginal de ala muestra la interacción Ey-Antp (Venus). **D**. La interacción Ey-Antp es inhibida por la mutación G19 de la hélice I del HD de Antp en disco de ala. Modificado de Plaza *et al.*, 2008

La homodimerización de la homeoproteína Scr es mediada también por el HD, específicamente por el aminoácido glutámico no 19, localizado en la hélice I del HD. Estos experimentos se realizaron al mutagenizar dicha posición, que mostró la eliminación de la homodimerización así como las funciones homeóticas de Scr *in vivo*, y la activación del gen blanco *forkhead* y la inducción ectópica de glándulas salivarias en el embrión. Así mismo se determinó que la posición aminoacídica no. 19 de la hélice I no es importante en la unión de HD al ADN (Papadopoulos *et al.*, 2012).

Esta posición aminoacídica también ha mostrado ser importante en la interacción entre Antp y Scr en cultivo celular, ya que específicamente el aminoácido no. 19 del HD de ambas homeoproteínas redujo el porcentaje de interacción de un 72% a un 58% en el caso de Antp y hasta un 57% en el caso de Scr. En contraste al mutar ambos HDs en la misma posición se redujo hasta un 32% la interacción como se muestra en la Figura 17 (Elizondo-Rodríguez, 2016).

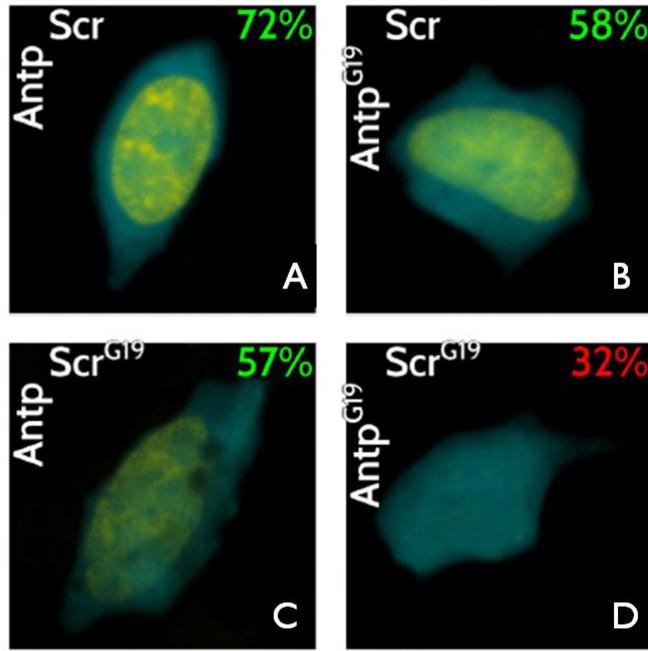


Figura 17. Importancia del aminoácido 19 en la interacción Antp-Scr. Las células HEK fueron co-transfectadas con los plásmidos que codifican a Antp y Scr para analizar su interacción mediante BiFC. **A.** Las células muestran el porcentaje de interacción entre Antp y Scr de 72%. **B.** La mutación de la posición 19 de la hélice I del HD de Antp, reduce el porcentaje de interacción a un 58%. **C.** La mutación de la posición 19 de la hélice I del HD de Scr, reduce el porcentaje de interacción a un 57%. **D.** La mutación de la posición 19 en ambos HDs de Antp y Scr, reduce el porcentaje de interacción hasta un 32%. Modificado de Elizondo-Rodríguez, 2016

Por lo tanto, debido a las evidencias de la interacción de la hélice I en diferentes HDs, en esta tesis se realizó la disección molecular de la interacción Antp-Ubx, para determinar si el aminoácido glutámico no. 19 de la hélice I del HD participa en esta interacción y si esta interacción de homeoproteínas afecta la transformación homeótica de antena-tarso así como la presencia de probables interacciones triméricas con otros factores transcripcionales.

4. Hipótesis

La interacción molecular proteína-proteína de Antp y Ubx se lleva a cabo mediante la posición 19 de la hélice I del homeodominio y afecta la actividad funcional de Antp

5. Objetivo General

Realizar la disección molecular de la interacción proteína-proteína de Antp y Ubx y su efecto en la función homeótica de la transformación antena-tarso

5.1 Objetivos específicos

- Analizar la mutación del residuo 19 de la hélice I de los HDs de Antp y Ubx en la interacción de Antp y Ubx
- Determinar el efecto de la interacción de Ubx-Antp en la actividad funcional homeótica en la transformación antena-tarso
- Evaluar en el complejo Antp-Ubx las probables interacciones triméricas de los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD, BIPip2 en el complejo Antp-Ubx

6. Materiales y Métodos

6.1 Análisis de la mutación del residuo 19 de la hélice I del HD en la interacción Antp y Ubx mediante BiFC

Para determinar el efecto de la mutación del residuo 19 de la hélice I del HD en la interacción proteína-proteína de Antp y Ubx se utilizó la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en cultivo celular. El análisis de la interacción consiste en fusionar una proteína de interés al extremo N-terminal y otra al extremo C-terminal de una proteína fluorescente, en este caso se utilizó la proteína fluorescente Venus. Si las dos proteínas de interés interaccionan, en este caso Antp y Ubx, los extremos de Venus se aproximarán lo suficiente para reconstituir la fluorescencia como se muestra en la Figura 18. Para ello el gen que codifica para Ultrabithorax, así como su HD y la versión mutante G19 se fusionaron al extremo N-terminal de Venus y ya se contaba en el laboratorio con las construcciones plasmídicas de Antp fusionada al extremo C-terminal de Venus (pSC2VCAntp, -HD y -HDG19, estas construcciones se transfectaron en células HEK293 para la expresión de las proteínas de Ubx y Antp para analizar su interacción.

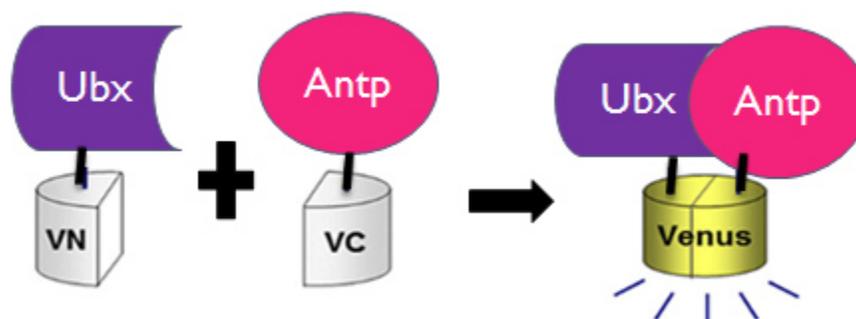


Figura 18. Diagrama del ensayo de interacción Ubx-Antp molecular mediante BiFC. El diagrama muestra a la proteína Ubx fusionada al extremo N-terminal de la proteína fluorescente Venus y a Antp fusionada al extremo C-terminal. La reconstrucción de la fluorescencia de Venus es mediada por la interacción de Ubx con Antp.

6.1.1 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbx

La secuencia nucleotídica del gen Ultrabithorax se obtuvo mediante PCR a partir de ADN genómico extraído de la línea de mosca transgénica que contiene dicho gen insertado bajo las secuencias UAS (del inglés upstream activation sequence).

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de *Drosophila* wt adultos usando el método descrito por Taylor *et al.*, en 1996 el cual indicó anestesiarse moscas con CO₂ y colocarlas en un tubo de 1.5 ml para posteriormente adicionar 200µl de buffer A (Tris HCL 0.1M, EDTA 0.1M, NaCl 0.1M y SDS 0.5%) y macerar con un embolo de plástico estéril. A continuación, se adicionaron 200µl más

del buffer A y se continuó macerando por un par de minutos hasta que solo quedaron las cutículas. Se incubó la muestra a 65° por 30 minutos en baño maría y se adicionaron 800µl de buffer B (KOAC 5M y LiCl2 6M) y se mezcló por inversión. Se incubó en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos y se transfirió 1ml del sobrenadante en un tubo nuevo, cuidando de no pasar partículas flotantes. Se adicionaron 500 a 600µl de isopropanol frio y se mezcló por inversión varias veces, hasta que el ADN precipitó. Una vez esto, se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 400µl de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla se dejó secando a temperatura ambiente hasta que no se observaron residuos de etanol. Por último, se disolvió la pastilla en aproximadamente 20µl de H2O mQ.

Una vez obtenido el ADN genómico, se visualizó su integridad en un gel de agarosa al 0.8%, y en espectrofotómetro en un equipo marca NanoDrop modelo ND-1000. Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR de la región codificante deUbx, utilizando la reacción descrita en la Tabla 1, con el programa de temperatura descrito en la Tabla 2. Los oligonucleótidos específicos diseñados (Tabla 3) contienen los sitios de restricción para las enzimas AgeI y XbaI, lo cual hizo posible su clonación en el vector pSC2Vm9.

Tabla 1. Reacción de PCR para amplificar el gen Ubx

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	5 ul
MgCl2 50 mM	1.5 ul
dNTP's 20 mM	0.5 ul
Oligo5b 5Um	5 ul
Oligo3c 5Um	5 ul
Taqpol 5U/ul	0.2 ul
ADN	1
H ₂ O mQ	6.8

Tabla 2. Programa de PCR para amplificar el gen Ubx

Etapas	Temperatura	Duración
Incubación	94°C	2 min
Desnaturalización	94°C	45s
Alineamiento	60°C	1.30 min
Polimerización	72°C	1 min 30s
Incubación	72°C	2 min

*Repetir pasos 2-4, 25 veces

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen Ubx

Oligo	Secuencia	Tm (C°)
Ubx 25'	5' TAATACCGGTATGAACTCGTACTTTGAACAGGCC3'	61.9
Ubx 23'	5' TAATTTCTAGACTACTGATCTAAGTGTCCACCTTGG3'	59.7

Posteriormente, el producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8% y se recuperó y purificó la banda con el estuche comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). El ADN purificado se caracterizó con la enzima Pst1 la cual corta en el nucleótido 173 de la región codificante de Ubx de 1068 pb, por lo que se obtuvieron 2 bandas, una de 173 pb y otra de 895 pb y además confirmó la identidad del gen por secuenciación.

Una vez confirmada la identidad de la banda, el inserto se ligó al vector comercial PCR 2.1 TOPO, y dicha ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5α Ca⁺⁺.

La reacción de transformación se inició agregando en un tubo de 1.5 ml (previamente enfriado en hielo), 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α Ca⁺⁺ con el ADN requerido (50 µg de ADN por transformación aproximadamente). Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se sometió a choque térmico a 42°C durante 1 minuto y medio. Transcurrido ese

tiempo se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 200µl de medio LB al tubo y se incubó con agitación constante de 180 rpm durante 30 minutos para permitir el restablecimiento de las células. Posteriormente, se centrifugó durante 20 segundos a 14,000 rpm, se eliminaron 200µl del sobrenadante, se resuspendió la pastilla bacteriana en el volumen restante por pipeteo y se sembraron en una placa de agar LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se inocularon en 3 ml de medio LB y antibiótico de selección a 37°C en agitación constante a 180 rpm durante 24 horas para la posterior extracción de ADN plasmídico para su análisis.

Para ello, se transfirieron 1.5 ml de cada cultivo a tubos de 1.5 ml, se centrifugaron por 2 minutos a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 150µl de solución de lisis alcalina I (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8) por agitación con vórtex, se incubó en hielo durante 5 minutos para posteriormente agregar 150µl de solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se agregaron 150µl de solución de lisis alcalina III (KOH 5 M, CH₃COOH 11.5%), se mezcló nuevamente por inversión y se incubó a -20°C durante 5 minutos, al término de la incubación se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 500µl) a un tubo de 1.5 ml nuevo. A cada sobrenadante se le agregaron 500µl de isopropanol 100% y se mezcló por inversión, posteriormente se incubó a -20°C durante 10 minutos, al término se centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm para obtener la pastilla de ADN plasmídico, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% centrifugando durante 5 minutos a 14,000 rpm, se dejó secar la pastilla por evaporación y finalmente se resuspendió la pastilla de ADN en 20µl de agua mili-Q con RNAsa (10mg/ml). Los ADNs plasmídicos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% y se seleccionaron las clonas con base en su corrimiento electroforético y se caracterizaron con las enzimas EcoRI y PstI. Una vez seleccionadas las clonas positivas, el fragmento se cortó y purificó con ayuda del kit comercial de Wizard. A la par, se cortó el vector pSC2VNTBP con las enzimas AgeI y XbaI para liberar el fragmento insertado y linearizar el vector para permitir la ligación del inserto de Ubx. La ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5α Ca⁺⁺, las colonias obtenidas se purificaron mediante minipreparación, como previamente se describió. Los ADNs plasmídicos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% y se seleccionaron las clonas en base a su corrimiento electroforético y se caracterizaron con las enzimas AgeI y XbaI así como con las enzimas BamHI y XbaI y fueron enviadas a secuenciar para la confirmación de la secuencia nucleotídica del plásmido recombinante.

6.1.2 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbxHD

Para la construcción pSC2VNUbxHD se utilizó como molde el vector pSC2VNUbx construido en la sección anterior. La secuencia nucleotídica que codifica al HD se amplificó por PCR usando la reacción de la Tabla 4, el programa mostrado en la Tabla 5 y los oligos descritos en la Tabla 6.

Tabla 4. Reacción de PCR para amplificar el HD de Ubx

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	5 ul
MgCl ₂ 50mM	1.5 ul
dNTP's 20mM	0.5 ul
Oligo5b 5Um	2.5 ul
Oligo3c 5Um	2.5 ul
Taqpol 5U/ul	0.2 ul
ADN	1 ul
H ₂ O mQ	6.8 ul

Tabla 5. Programa de PCR para amplificar el HD de Ubx

Etapa	Temperatura	Duración
Incubación	94°C	2 min
Desnaturalización	94°C	45s
Alineamiento	60°C	1.30 min
Polimerización	72°C	3 min 30s
Incubación	72°C	4 min

*Repetir pasos 2-4, 25 veces

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el HD del gen Ubx

Oligo	Secuencia	Tm (°C)
F.UbxHD5'	5'- ACC GGT AGA CGC GGC CGA CAG A-3'	66.9
R. UbxHD3'	5'- TCT AGA CTC CTT CTT CAG CTT CAT TCG CCG-3'	62.5

Posteriormente, el producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8%, y fue ligado en el vector comercial PCR 2.1 TOPO, y dicha ligación fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α Ca $^{++}$.

Las colonias obtenidas se inocularon en 3 ml de medio LB y antibiótico de selección a 37°C en agitación constante a 180 rpm durante 24 horas para la posterior extracción de ADN plasmídico para su análisis, como se describió en el punto 1.2 de esta sección.

Los ADNs plasmídicos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8% y se seleccionaron las clonas en base a su corrimiento. Estas fueron digeridas con la enzima EcoRI, se seleccionaron las clonas positivas, se ligaron al vector pSC2VNUbx previamente digerido con las enzimas AgeI y XbaI para liberar el fragmento insertado y linearizar el vector para permitir la ligación del HD de Ubx. La ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5 α Ca $^{++}$ y las colonias obtenidas se purificaron mediante minipreparación, como previamente se describió. Los ADNs obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8% y se seleccionarán las clonas según su corrimiento electroforético, se caracterizaron con las enzimas StuI y SmaI y se enviaron a secuenciar para su confirmación.

6.1.3 Construcción del plásmido recombinante pSC2VNUbxG19

Para construir el vector pSC2VNUbxG19 se utilizó como molde el plásmido pTOPOUbx construido en la sección 1.1. La mutagénesis de la posición 19 de la hélice I del HD de Ubx se realizó mediante PCR con oligonucleótidos específicos los cuales contienen un cambio nucleotídico el cual origina un codón diferente y por lo tanto la codificación de un aminoácido diferente. El codón original es: GAA, el cual codifica para ácido glutámico, y se cambió a: GGA, el cual codifica para glicina. La reacción utilizada se muestra en la Tabla 7, el programa en la Tabla 8 y los oligonucleótidos diseñados para

generar el cambio nucleotídico de la posición 19 de la hélice I del HD de Ubx se describen en la Tabla 9.

Tabla 7. Reacción de PCR para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx

Reactivo	Cantidad
oligo5' 2.5 mM	4ul
oligo3' 2.5 mM	4ul
dNTPs 20 mM	5ul
MgSO4 50mM	4ul
H ₂ O mQ	26 ul
ADN	1ul
Pfx 2.5U/ul	1ul

Tabla 8. Programa de PCR para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx

Etapa	Temperatura	Duración
Incubación	95°C	2 min 30 s
Desnaturalización	60°C	30 s
Alineamiento	70°C	6 min
Polimerización	70°C	7 min
Incubación	95°C	2 min

*Repetir pasos 2-4 35 veces

Tabla 9. Oligos diseñados para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx

Oligo	Secuencia	Tm °C
UbxG19F	5' AGGATTCATACCAACCATTATCTGACC 3'	56.6
UbxG19R	5' TTTCCAGTTCAGGGTCTGATAAC 3'	56.8

Posteriormente, el producto de PCR fue digerido con la enzima Dpn1, la cual cortó el ADN metilado, eliminando el plásmido molde y la reacción de digestión se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Digestión del producto amplificado para la mutagénesis del aa 19 de la hélice I del HD de Ubx

Reactivo	Cantidad
Producto PCR	50ul
Buffer Tango 10X	6ul
Dpn1 5U/ul	1ul
H2O mQ	3ul

La digestión se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente a 80°C por 20 minutos para inactivar la enzima. La reacción se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% y se procedió a la purificación de la banda correspondiente al vector pTOPOUbxG19 del gel mediante el estuche comercial Wizard. Posteriormente, se liberó el fragmento UbxG19 del vector pTOPOUbxG19 mediante una digestión con la enzima EcoRI y fue ligado en el vector pSC2VNm9. Las clonas obtenidas fueron visualizadas en un gel de agarosa al 0.8%, seleccionadas según su corrimiento, caracterizadas con las enzimas StuI y SmaI y confirmadas por secuenciación.

6.1.4 Preparación plasmídica de los vectores pSC2VNUbx, y -VNUbxG19, -VCAntp, y -VCAntpHDG19

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α Ca⁺⁺ con los plásmidos mencionados y las colonias obtenidas fueron inoculadas en 100 ml de medio LB (Luria-Bertani) con 100 ul (50 mg/ml) de ampicilina por 12 horas a 37°C en agitación constante a 250 rpm, para la posterior extracción de ADN plasmídico mediante midipreparación. Los cultivos bacterianos fueron transferidos a tubos cónicos de 50 ml, se centrifugaron por 8 minutos a 5,000 rpm, se retiraron los sobrenadantes por decantación y los paquetes celulares se resuspendieron totalmente con 5 ml de Solución I mediante pipeteo y vórtex, se incubaron en hielo por 10 minutos, se les agregó 5 ml de Solución II, se mezclaron por inversión, se incubaron en hielo por 10 minutos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 10 minutos, se agregaron 5 ml de Solución III, se agitaron por inversión y se incubaron en hielo por 10 minutos. Los lisados celulares fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C; posteriormente se filtraron utilizando tela de organza limpia. Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló por vórtex y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min. La fase superior fue transferida a otro tubo cónico de 50 ml y se añadieron 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío y se mezcló por inversión e incubó a 1 hora a -20°C.

La pastillade ADN fue lavada con 5 ml de etanol al 70%, se mezcló en el vórtex, se centrifugó a 5,000 rpm a 4°C, se eliminó lo más posible el sobrenadante decantando y se dejó secar el ADN a 37°C por 10 min. Se resuspendió el ADN en 1 ml de agua miliQ conteniendo RNAsa a una concentración final de 0.02 mg/ml. Se congeló a -20°C. El análisis de calidad y concentración de los ADNs purificados se realizaron en espectrofotómetro en un equipo marca Nano Drop modelo ND-1000 y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Los plásmidos pSC2VNUbx, -UbxHD y -UbxG19 fueron digeridos para corroborar su identidad con la enzima Pst1 de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial, mientras que los plásmidos pCS2VCAntp, -AntpHD y -AntpHDG19, fueron digeridos con la enzima BamH1.

6.1.5 Análisis de Interacciones moleculares Ubx-Antp mediante BiFC

En el ensayo de interacción mediante BiFC, se analizaron las proteínas de interés, Antp, -HD y -HDG19 así como y Ubx, -HD y G19 fusionadas a cada uno de los fragmentos de la proteína fluorescente Venus, para determinar si los fragmentos de Venus se aproximaron lo suficiente para emitir la señal fluorescente (Kerppola, 2008).

Los ensayos BiFC se realizaron en células embrionarias HEK293 de epitelio renal humano y adaptadas a crecer en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) en una atmósfera de 95% de humedad, 5% CO² y 37 °C de temperatura. Estas células fueron sembradas a una densidad de 1-3x10⁵ células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) que contenían cubreobjetos tratados con poly-L-lisina. 24 horas después se llevaron las co-transfecciones celulares, mostradas en la Tabla 11, las cuales consistieron en utilizar los plásmidos recombinantes de las proteínas Ubx, UbxHD y/o UbxG19 fusionada al fragmento VNm9 y la proteína Antp, AntpHD y/o AntpHDG19, fusionada al fragmento VC155 de la proteína fluorescente Venus. El plásmido pCAG-mCherry que codifica una proteína roja fluorescente reportera sirvió como control de normalización de la eficiencia de transfección para el conteo. Las transfecciones celulares fueron realizadas con el compuesto PEI de 25 kDa (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL. USA) que es un polímero catiónico capaz de unirse al ADN y formar complejos que se agregan y pueden introducirse a las células. La solución de ADN se preparó diluyendo 6 µg de ADN plasmídico en NaCl 150mM en un volumen final de 100 µl por pozo, después se le agregó la solución de PEI (0.4 µl PEI (15mM en 99.6 l NaCl 150mM) y se agitó vigorosamente esta mezcla de reacción por 15-20 segundos. La reacción fue incubada a

temperatura ambiente por 15 minutos y posteriormente fue agregada a las células HEK293. Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% CO₂ durante 48 horas. Posteriormente, 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 de 100 células que presentaron fluorescencia control (señal roja) y de estas se determinó el número de células que presentaron fluorescencia de Venus por complementación bimolecular (señal verde). Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado para generar una N de 9. 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 GraphPad Prism 6.

Tabla 11. Transfecciones celulares para determinar la interacción Antp-Ubx

Plásmido recombinante 1	Plásmido recombinante 2	Plásmido control
pSC2VNUbx	pSC2VCAntp	pCAG-mCherry
pSC2VNUbx	pSC2VCAntpHDG19	pCAG-mCherry
pSC2VNUbxG19	pSC2VCAntp	pCAG-mCherry
pSC2VNUbxHD	pSC2VCAntpHD	pCAG-mCherry
pSC2VNUbxG19	pSC2VCAntpHDG19	pCAG-mCherry

6.2 Efecto de la interacción de Antp-Ubx en la actividad funcional en la transformación antena-tarso

Para analizar el efecto *in vivo* de la interacción AntpHD-UbxHD en la función de Antp en la transformación antena-tarso, se utilizó el sistema de expresión GAL4 (Brand y Perrimon, 1993), el cual permite la expresión génica en *Drosophila* mediante la activación selectiva de cualquier gen clonado. Debido a que GAL4 no tiene genes blanco conocidos en *Drosophila* se puede expresar en tejidos y células del organismo sin ningún efecto secundario observable. Para la producción de la línea productora (GAL4) que expresa el activador transcripcional GAL4 en diferentes células y tejidos, una región potenciadora es fusionada al ADN complementario de GAL4 y se integra al azar dentro del genoma de *Drosophila* mediante la transposición usando un elemento dependiendo del sitio de integración del potenciador se produce la expresión de GAL4 que podrá ser dirigida en espacio y tiempo.

6.2.1 Amplificación de las líneas de moscas transgénicas: VNubxHD, VCAntpHD y DII-Gal4

Todas las líneas de *D. melanogaster* fueron mantenidas como homocigotas viables a 18°C en tubos de comida estándar (Fisher Scientific Cat. no. AS153) y transferidas a viales con comida fresca una vez a la semana. Las amplificaciones masivas de moscas se realizaron mediante colectas de huevos durante 12h y mantenidas en botellas con comida a 25°C hasta el momento de las eclosiones. Las líneas de moscas transgénicas productoras y reporteras utilizadas en esta tesis fueron las siguientes:

- UAS VN-Ubx (IV) Pt: Esta línea reportera posee las secuencias UAS fusionadas río arriba de la secuencia codificante para el extremo amino de la proteína fluorescente Venus fusionada a la homeoproteína Ubx wt, que codifica del aminoácido 258 al 360 y corresponde a la isoforma A, reportada en GeneBank. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma cuatro cuyo marcador fenotípico es escutelo pigmentado.
- UAS VC-AntpHD (III) TM6: Esta línea reportera posee las secuencias UAS fusionadas río arriba de la secuencia codificante para el extremo carboxilo de la proteína fluorescente Venus fusionada a la secuencia para la homeoproteína Antp wt. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres y presenta el marcador fenotípico cerdas cortas.
- DII-GAL4 [md23]/Cyo: Esta línea productora contiene el potenciador del gen DII, que dirige la expresión de la proteína GAL4 al tercer segmento antenal.

6.2.2 Sexado

Las moscas transgénicas seleccionadas y amplificadas fueron anestesiadas con éter etílico y/o dióxido de carbono, se observaron al estereoscopio y se sexaron con base en el dimorfismo sexual. El criterio de sexado se realizó en base a las siguientes características:

- a. El tamaño de las hembras por lo general es mayor que el de los machos.
- b. Las hembras tienen los últimos tres segmentos abdominales separados y la coloración de éstos es uniforme; mientras que los machos presentan los tres segmentos abdominales fusionados y melanizados.
- c. La punta del abdomen en las hembras es puntiaguda en contraste con la de los machos que es redondeada.

d. Los machos presentan los peines sexuales, como una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine, en la región basal del tarso del primer par de patas (Ramos *et al.*, 1993).

La colecta de las hembras vírgenes se realizó poniendo especial atención a que eclosionen durante un período no mayor de 8h de incubación a 25°C para evitar la cruce con machos.

6.2.3 Expresión ectópica de la interacción Antp-Ubx

Para dirigir la expresión de la interacción Antp-Ubx al tercer segmento antenal de *Drosophila melanogaster* se utilizó el sistema binario UAS-Gal4 el cual se compone de una línea productora o driver la cual posee un promotor tejido-específico, en este caso del gen Distal-less (Dll) el cual se expresa en el tercer segmento antenal de *Drosophila*, y debajo la secuencia que codifica para la proteína transactivadora GAL-4. Está se une a los sitios UAS (upstream activation sequence) presentes en la línea reportera permitiendo la transcripción de los genes que se encuentren río abajo, en este caso los genes de interés (AntpHD y UbxHD).

6.2.4 Generación de la línea reportera VN-UbxHD;VC-AntpHD

Para generar de la línea reportera VN-UbxHD;VC-AntpHD se realizó una cruce entre 24 hembras vírgenes entre la línea UAS-VNUbxHD y 8 machos de la línea UAS-VCAntpHD para la integración de ambos transgenes como se muestra en la Figura 19.

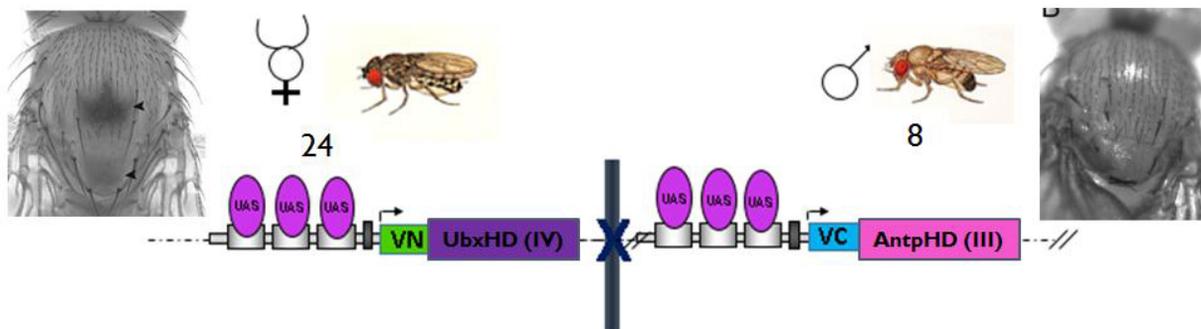


Figura 19. Generación de la línea reportera VNUbxHD-VCAntpHD.El diagrama muestra la cruce de las líneas UASVNUbxHD (escutelo pigmentado) y UASVCAntpHD (cerdas cortas) para integrar ambos transgenes en la descendencia de *Drosophila melanogaster*. Está cruce se realizó con 24 hembras vírgenes de la línea UAS-VNUbxHD y 8 machos de la línea UAS-VCAntpHD.

La cruce fue mantenida a 25°C en frascos de comida estándar (Fisher Scientific Cat. no. AS153) hasta el momento de la eclosión. Posteriormente, se seleccionaron 3 machos de la línea reportera

VNUbxHD-VCAntpHD, que presentarán escutelo no pigmentado y cerdas normales ya que estos marcadores fenotípicos se pierden en la descendencia que posea los transgenes de interés. Como se describe en la Figura 19 estos se cruzaron con 8 hembras vírgenes de la línea productora *Dll*-GAL4 para dirigir la expresión específica de los HDs de Ubx y Antp a la antena de la mosca como se muestra en la Figura 20.

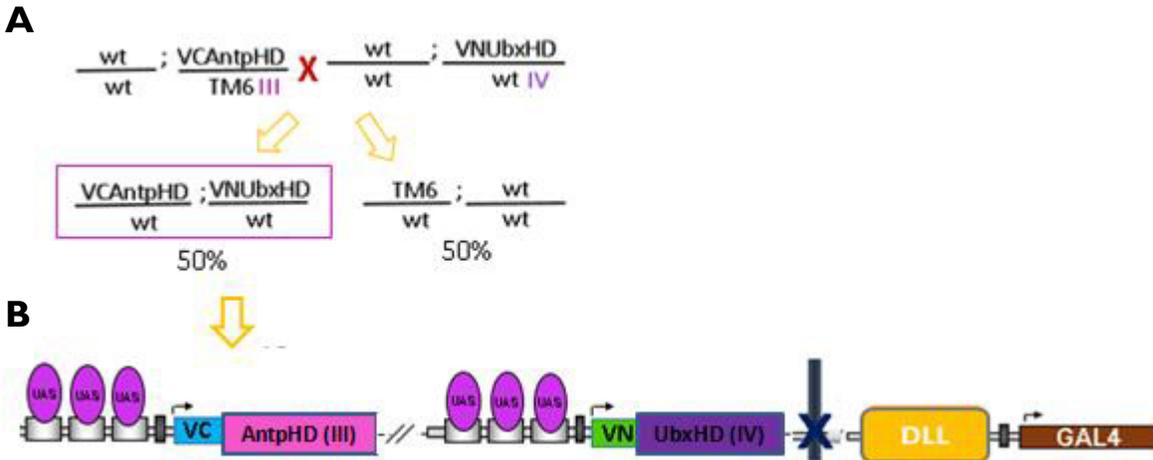


Figura 20. Cruzas genéticas para la integración de los transgenes AntpHD y UbxHD y dirección tejido específico al tercer segmento antenal en *Drosophila*. **A.** El diagrama muestra la cruza mediante la cual se integraron los transgenes AntpHD y UbxHD en el II y IV cromosoma de *Drosophila*. El recuadro en color morado muestra el porcentaje esperado (50%) de individuos con el fenotipo cerdas normales y escutelo no pigmentado con la integración de ambos transgenes, UbxHD y AntpHD. **B.** El diagrama muestra la cruza de la línea VCAntpHD;VNUbxHD y *Dll*-GAL4 usando el sistema UAS-GAL4 para dirigir los HDs de Antp y Ubx al tercer segmento antenal.

Esta cruza fue mantenida a 25°C en frascos de comida estándar (Fisher Scientific Cat. no. AS153) y las larvas fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Como se esperaba, el 50% de la progenie presentó fluorescencia en discos imaginales producto de la interacción AntpHD;UbxHD. Se seleccionaron 20 larvas con fluorescencia y se realizó la disección de estas en PBS para la obtención de los discos imaginales de ala, pata y ojo-antena los cuales fueron montados en vectashield con DAPI para teñir los núcleos y preservar la fluorescencia de la proteína Venus. Los discos imaginales fueron analizados y documentados por microscopia confocal.

Del resto de la progenie se dejaron desarrollar 10 larvas hasta la eclosión de los adultos para realizar el análisis de fenotipos y analizar el efecto en las transformaciones tarsales de la antena.

6.2.5 Análisis de la transformación antena-pata en adultos

Las transformaciones antena-pata fueron evaluadas observando mediante estereoscopia en las que se analizó la presencia de los siguientes fenotipos en adultos: transformación de la arista y/o tercer segmento antenal, presencia de ganchos en los tarsos distales y presencia de estructuras del tarso y/o de la tibia.

6.3 Efecto de los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD, BIP2 en la interacción Antp-Ubx mediante análisis de BiFC por competencia en cultivo celular.

Para determinar posibles interacciones triméricas en el complejo Antp-Ubx se realizó un análisis de competencia por BiFC en cultivo celular el cual se basa en la co-transfección de los plásmidos recombinantes de la proteína Ubx fusionada al fragmento VNm9 y la proteína Antp, fusionada al fragmento VC155 de la proteína fluorescente Venus, así como cada uno de los plásmidos pPAC que expresan las proteínas TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD, Bip2 las cuales no están fusionadas a ningún fragmento de la proteína Venus por lo que, en caso de que alguna de ellas interactúe ya sea con Ubx o con Antp, o con ambas, se espera una reducción en los niveles de reconstitución de la fluorescencia de Venus. Los posibles escenarios del efecto de los factores transcripcionales (del inglés, TF) en el complejo dimérico Ubx-Antp se muestran en el esquema de la Figura 21.

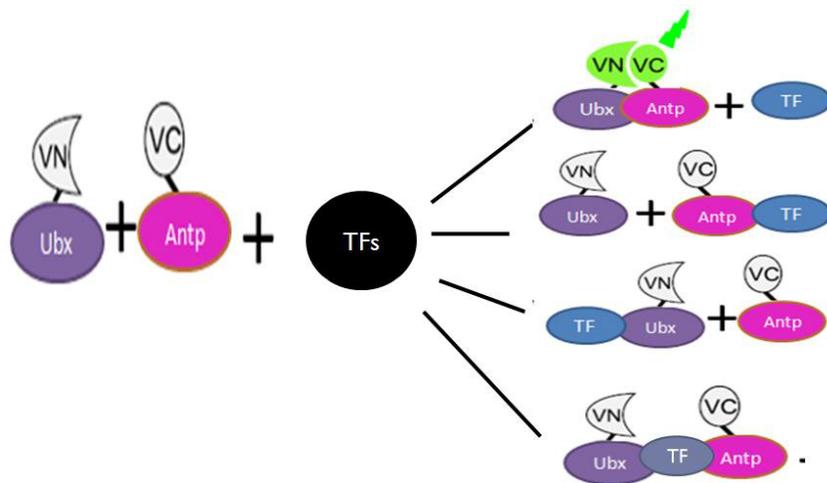


Figura 21. Ensayo de competencia por BiFC en la interacción de Ubx-Antp con TF. El esquema representa los posibles escenarios del ensayo de la interacción Ubx-Antp (BiFC) por competencia co-transfectando con un factor transcripcional adicional (TF). En el escenario superior el TF adicional no interfiere con la interacción, es decir no interaccionan con ninguna de las proteínas de interés (Ubx y Antp). En los escenarios intermedios el TF adicional interacciona con Antp o Ubx, por lo que la interacción se ve afectada. Por último, en el escenario inferior el TF adicional interacciona con Antp y Ubx, por lo que la interacción también se ve afectada. Modificado de Rezsóhazy *et al.*, 2015.

6.3.1 Preparación plasmídica de pPACTBP, -TFIIE β , -TFIIA γ , -TFIIB, -EXD y -BIP2

Para la purificación y digestión enzimática de los vectores pPAC se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α Ca⁺⁺ con los plásmidos mencionados; las colonias obtenidas fueron inoculadas en matraces de 250 ml con 100 ml de medio LB y se dejaron incubando toda la noche, para la posterior purificación de ADN mediante mini preparación (protocolo descrito en la sección 1 de Materiales y métodos). El análisis de calidad y concentración de los ADNs purificados se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop modelo ND-1000) y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Posteriormente las construcciones plasmídicas fueron digeridas con la enzima BamHI para corroborar su identidad.

6.3.2 Análisis de las posibles interacciones triméricas mediante BiFC competitivo

Los ensayos de BiFC competitivo se realizaron en células embrionarias HEK293 de epitelio renal humano y adaptadas a crecer en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) en una atmósfera de 95% de humedad, 5% CO₂ y 37 °C de temperatura. Se sembraron las células en placas de 6 pozos a una densidad de 1-3x10⁵ células/pozo (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) que contenían cubreobjetos tratados con poly-L-lisina. 24 horas después se realizaron las co-transfecciones celulares las cuales consistieron en transfectar los plásmidos BiFC (pSC2VCAn_{tp}, -VCAn_{tp}HD, -VCAn_{tp}HDG19, VNUbx, VNUbxHD y VNUbxG19) y cada uno de los plásmidos pPAC (pPACTBP, -TFIIE β , -TFIIA γ , -TFIIB, -Exd y -Bip2). Las transfecciones fueron realizadas con el compuesto PEI de 25 kDa (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL. USA) que es un polímero catiónico capaz de unirse al ADN y formar complejos que se agregan y pueden introducirse a las células. La solución de ADN se preparó diluyendo 6 μ g de ADN plasmídico en NaCl 150mM en un volumen final de 100 μ l por pozo, después se le agregó la solución de PEI (0.4 μ l PEI (15mM en 99.6 l NaCl 150mM) y se agitó vigorosamente esta mezcla de reacción por 15-20 segundos. Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 30 min y posteriormente fue agregada a las células HEK293. Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% CO₂ durante 48 horas para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Posteriormente, 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 de 100 células que presentaron fluorescencia control (señal roja) y de estas se determinó el número de células que presentaron fluorescencia por complementación biomolecular (señal verde). Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado

para generar una N de 9. 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 GraphPad Prism 6.

7. Resultados

7.1 La mutación del residuo 19 de la hélice I del HD de Antp afecta la interacción con Ubx

Para analizar los dominios de la interacción de Antennapedia con Ultrabithorax se realizaron ensayos de BiFC en cultivo celular. Para ello se llevó a cabo la construcción de plásmidos que codifican a la proteína completa Ubx así como con el HD y con la mutación en la posición G19 así como la digestión de los plásmidos pSC2VCAntp y -HD.

7.1.1 Construcciones pSC2VNUbx y -UbxHD

Para la construcción de los plásmidos pSC2VNUbx y -UbxHD se realizó la amplificación por PCR de la proteína completa Ubx así como del HD mediante el uso de oligonucleótidos específicos y los fragmentos amplificados de Ubx se clonaron en el vector PCR 2.1 TOPO y posteriormente se subclonaron en el vector pSC2VNm9 como se muestra en las Figuras 22A y 23A.

La construcción de pSC2VNUbx se realizó a partir de ADN genómico extraído de la línea de mosca transgénica UAS-Ubx, la cual contiene la secuencia nucleotídica del gen Ubx bajo los sitios UAS. La amplificación de Ubx se realizó usando oligonucleótidos específicos que contenían los sitios de restricción AgeI y XbaI y el producto amplificado del gen Ubx (1088 pb) se muestra en el gel de electroforesis de la Figura 22B. Posteriormente, éste fragmento se ligó en el vector PCR 2.1 TOPO y se digirió para su confirmación con las enzimas EcoRI y PstI (Figura 22C). Las 4 clonas digeridas con EcoRI liberaron los dos fragmentos esperados, uno de 3900 (pTOPO) y otro de 1106 pb (Ubx). El fragmento de Ubx se subclonó en el vector pSC2VNm9 haciendo uso de los sitios de restricción XbaI y AgeI y se digirió para su confirmación con las mismas enzimas, obteniendo dos bandas, una de 4575 pb (pSC2VNm9) y otra de 1106 pb (Ubx). Así mismo, como se muestra en el gel de la Figura 22D se digirió con las enzimas BamHI y XbaI, liberando dos bandas una de 2969 pb (pSC2) y otra de 1606 pb (Ubx + VN: fragmento amino de la proteína fluorescente Venus), lo que confirmó la construcción exitosa del plásmido pSC2VNUbx, además de la confirmación por secuenciación.

Para la construcción del plásmido pSC2VNUbxHD se utilizó como molde del plásmido pSC2VNUbx recién construido, del cual se amplificó el HD de Ubx y posteriormente se ligó en el vector PCR 2.1 TOPO y se subclonó en el vector pSC2VNm9 como se muestra en la estrategia de la Figura 23A. El gel de la Figura 23B muestra la banda de 200 pb correspondiente al HD de Ubx amplificada a partir del vector pSC2VNUbx. Después de ligar el fragmento en el vector PCR 2.1 TOPO, se seleccionaron 5 clonas que se digirieron con la enzima EcoRI para su confirmación. Las clonas 1, 2, 3 y 5 liberaron

el fragmento esperado de 200 pb así como la banda correspondiente al vector PCR 2.1 TOPO de 3900 pb como se muestra en la Figura 23C. Posteriormente, se subclonó en el vector pSC2VNm9 usando los sitios de restricción XbaI y AgeI y las clonas seleccionadas fueron digeridas con las enzimas StuI y SmaI para su confirmación. Las clonas 2 y 3 liberaron un fragmento de 690 pb correspondientes al HD de Ubx y al fragmento Venus amino del vector pSC2VNm9, como se observa en la Figura 23D, confirmando la construcción exitosa del vector pSC2VNUbxHD, además de la confirmación por secuenciación.

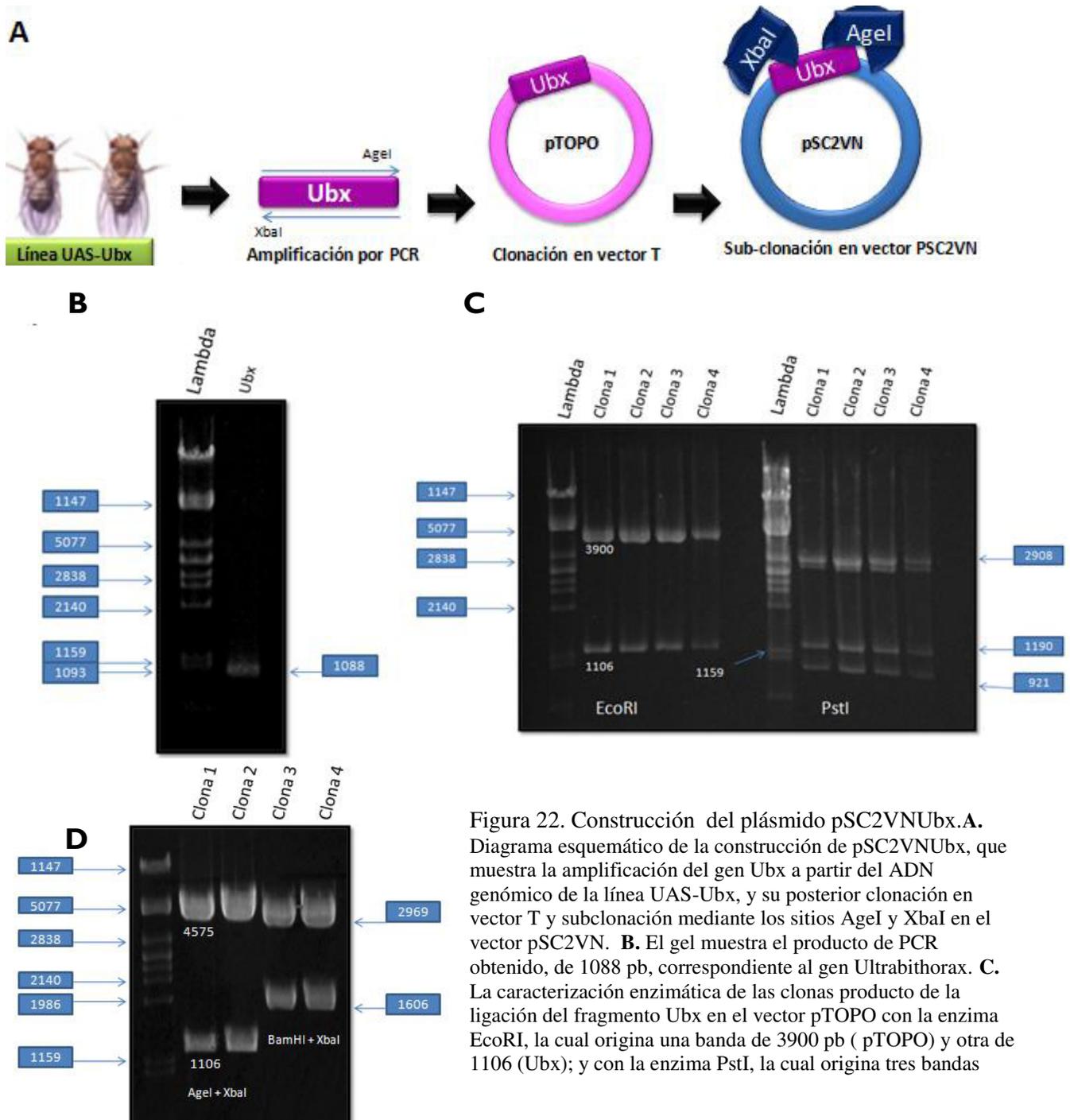


Figura 22. Construcción del plásmido pSC2VNUbx. A. Diagrama esquemático de la construcción de pSC2VNUbx, que muestra la amplificación del gen Ubx a partir del ADN genómico de la línea UAS-Ubx, y su posterior clonación en vector T y subclonación mediante los sitios AgeI y XbaI en el vector pSC2VN. B. El gel muestra el producto de PCR obtenido, de 1088 pb, correspondiente al gen Ultrabithorax. C. La caracterización enzimática de las clonas producto de la ligación del fragmento Ubx en el vector pTOPO con la enzima EcoRI, la cual origina una banda de 3900 pb (pTOPO) y otra de 1106 (Ubx); y con la enzima PstI, la cual origina tres bandas

(2908, 1190 y 921 pb). **D.** La caracterización enzimática de las clonas producto de la subclonación de Ubx en el vector pSC2VNm9 con las enzimas AgeI y XbaI libera el fragmento Ubx (1106 pb) y muestra una banda de 4575 pb correspondiente al vector; y con las enzimas BamHI y XbaI, libera Ubx mas el fragmento VN (1606 pb) y una banda de 2969 pb. Como marcador se utilizó el genoma del fago Lambda cortado con la enzima PstI.

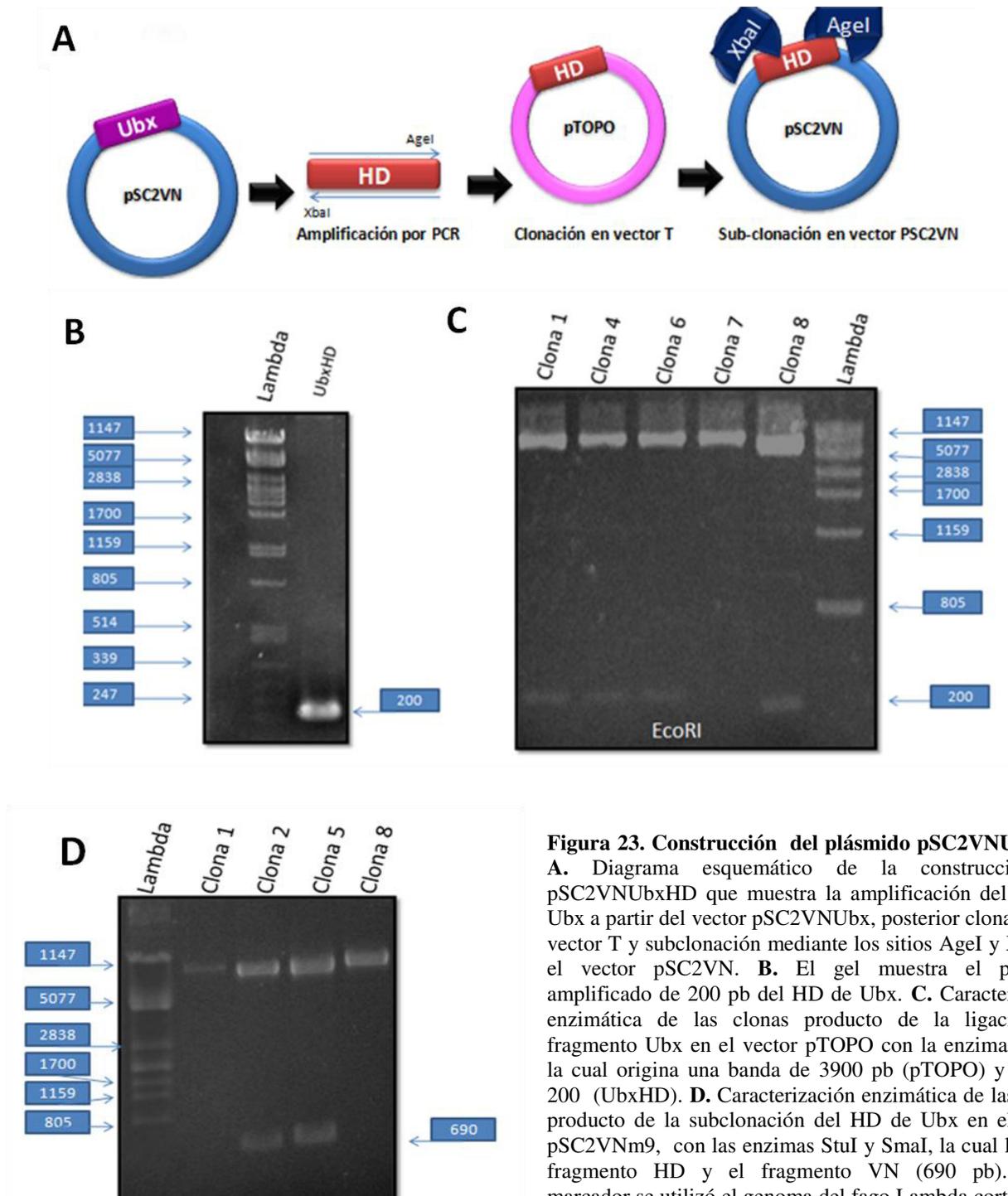


Figura 23. Construcción del plásmido pSC2VNUbxHD.

A. Diagrama esquemático de la construcción de pSC2VNUbxHD que muestra la amplificación del HD de Ubx a partir del vector pSC2VNUbx, posterior clonación en vector T y subclonación mediante los sitios AgeI y XbaI en el vector pSC2VN. **B.** El gel muestra el producto amplificado de 200 pb del HD de Ubx. **C.** Caracterización enzimática de las clonas producto de la ligación del fragmento Ubx en el vector pTOPO con la enzima EcoRI, la cual origina una banda de 3900 pb (pTOPO) y otra de 200 (UbxHD). **D.** Caracterización enzimática de las clonas producto de la subclonación del HD de Ubx en el vector pSC2VNm9, con las enzimas StuI y SmaI, la cual libera el fragmento HD y el fragmento VN (690 pb). Como marcador se utilizó el genoma del fago Lambda cortado con la enzima PstI.

7.1.2 Construcción de pSC2VNUbxG19

Para la construcción pSC2VNUbxG19 se realizó mutagénesis sitio dirigida por PCR usando como templado el vector pTOPOUbx. Como se muestra en la Figura 24A, se diseñaron oligonucleótidos específicos para sustituir una adenina, por una guanina, presente en el codón wt no. 19 de la hélice I del HD, GAG que codifica para ácido glutámico, originando el triplete GGG que codifica para una glicina en lugar de ácido glutámico. El producto de PCR obtenido fue un amplicón de 5681pb (pSC2VNm9 + Ubx*), como se observa en la Figura 24B, el cual fue recuperado del gel y purificado para su ligación en el vector PCR 2.1 TOPO. Las clonas obtenidas de dicha ligación fueron digeridas para su confirmación con la enzima EcoRI, siendo positivas las clonas 2 y 3, que liberaron los fragmentos esperados, uno de 3900 pb (pTOPO) y otro de 1106 pb (Ubx*) como se muestra en el gel de la Figura 24C. Posteriormente, el fragmento fue subclonado en el vector pSC2VNm9 y digerido con las enzimas AgeI y XbaI para su confirmación, mostrando que la clona tratada era positiva, al liberar un fragmento de 4575 pb (pSC2) y otro de 1600 pb (Ubx*), como se muestra en la Figura 24D. La mutagénesis fue confirmada por secuenciación, como se observa en la Figura 24E, el cambio nucleotídico en el codón no. 19 del HD de Ubx se realizó correctamente.

7.1.3 Efecto de la mutación G19 de Antp en la interacción con Ubx

Para determinar si la mutación del residuo 19 de los HDs de Antp y Ubx es importante en la interacción Antp-Ubx, se utilizaron en el ensayo de interacción de BiFC, los vectores previamente construidos en el laboratorio: pSC2VCAntp, -VCAntpHD y -AntpHDG19 a los que se les confirmó su identidad mediante digestión enzimática con la enzima BamHI.

Como se esperaba, las células transfectadas mostraron exitosamente la reconstitución la proteína fluorescente Venus debido a la interacción Antp-Ubx mediante BiFC. Los resultados mostraron claramente la interacción Antp-Ubx en las células transfectadas mientras que, interesantemente, la mutación del HD de Antp G19 afectó la interacción. El análisis de la interacción Antp-Ubx de manera cuantitativa mostró los porcentajes de células que presentan fluorescencia en un 89% como se observa en la Figura 25 mientras que en el ensayo con la mutante AntpG19 y la proteína Ubx wt, el porcentaje de interacción disminuyó hasta un 60%, lo cual indica que la mutación G19 afectó dramáticamente la interacción Antp-Ubx. En contraste, el análisis de comparaciones de medias en la Figura 26 mostró que no se observó una diferencia significativa al analizar la interacción Antp wt-UbxG19, ya que el porcentaje de las células que mostraron fluorescencia correspondió a un 86%. Este resultado indica que la posición G19 de Ubx no afectó la interacción Antp-Ubx. Adicionalmente, cuando se analizaron ambas mutantes de Antp y Ubx en la posición G19, se obtuvo una interacción de un 67% muy similar a la obtenida con la mutación de AntpG19. Además, se analizó la interacción de los HDs de las proteínas Antp y Ubx y se observó un incremento en el porcentaje de interacción en las células que reconstituyeron la fluorescencia correspondiente a un 96% (barra celeste). Estos resultados confirman la interacción de los HDs de Antp y Ubx y muestra un porcentaje de interacción más alto que las proteínas completas ya que probablemente presentan otros dominios con otras funciones y/o encargados de interactuar con el ADN y otros factores transcripcionales que podrían interferir en cierto grado el contacto entre los HDs de Antp y Ubx.

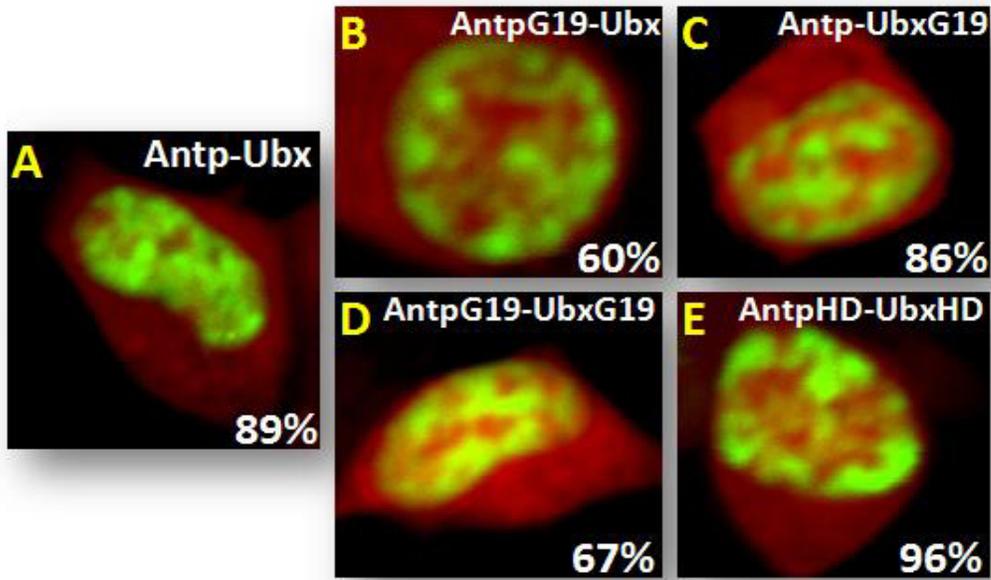


Figura 25. Efecto de la posición G19 en la interacción de Antp con Ubx mediante BiFC. Las células HEK 293 fueron co-transfectadas con los plásmidos codificantes a Antp y Ubx para determinar el % de interacción mediante BiFC. En la imagen se indican los porcentajes de interacción de Antp con Ubx y las mutaciones G19 de los HDs. Interacción de Antp-Ubx: **A.**89%, **B.**AntpHD-UbxHD: 96%, **C.**AntpG19-Ubxwt: 60%, **D.**Antpwt-UbxG19: 86%, y **E.**AntpG19-UbxG19: 67%. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado.

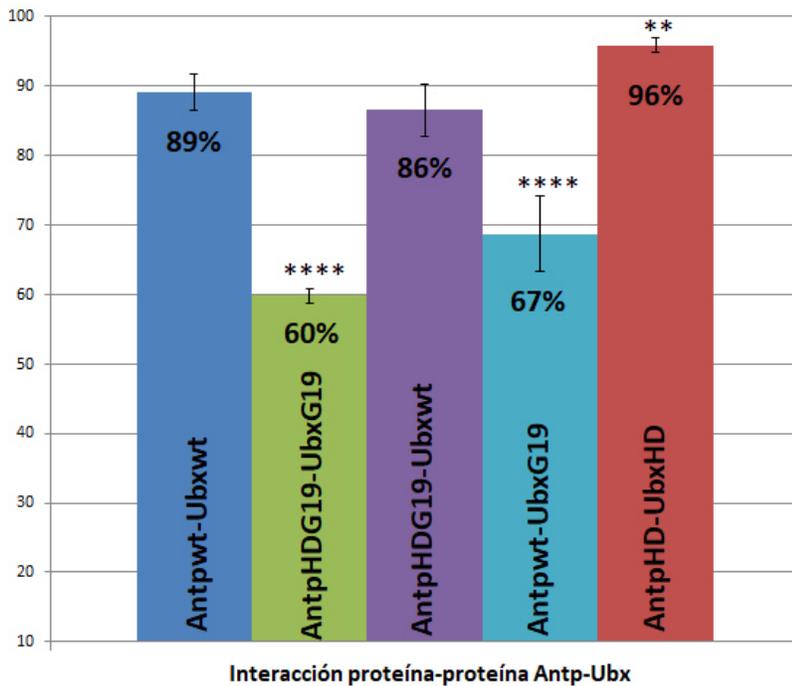


Figura 26. Análisis estadístico de la mutagénesis G19 en Antp-Ubx mediante BiFC. Se realizó un ANOVA de una vía y una comparación de medias Tukey con un valor de $p < 0.05$ para comparar los porcentajes de interacción. De acuerdo al análisis hay una diferencia altamente significativa (****) de las interacciones AntpG19-Ubxwt (60%) y AntpG19-UbxG19 (67%) respecto a la interacción control de las proteínas wt, así como una diferencia significativa (**) de la interacción de los HD (96%) respecto al control. No se observó diferencia significativa de la interacción Antpwt-UbxG19 respecto al control.

7.2 La interacción de Antp-Ubx afecta la actividad funcional de la transformación antena-tarso

Para determinar el papel funcional de la interacción Antp-Ubx en la transformación antena-tarso se dirigieron los HDs de Antp y Ubx a la antena con el potenciador *Dll*-Gal4. Para ello, se realizaron dos cruza genéticas descritas previamente en la sección de metodología (Figura 20). Para ello, las larvas obtenidas de la segunda crusa se seleccionaron al microscopio para colectar únicamente las larvas que reconstituyeron la fluorescencia en los discos imaginales, producto de la interacción de AntpHD-UbxHD. Los tres discos imaginales de ala, pata y ojo-antena presentaron la fluorescencia debido a la reconstitución de la proteína Venus como se muestra en la Figura 27. Específicamente en el disco de ojo-antena se observó la fluorescencia en el área de la antena, esto es importante ya que ahí es donde se dirigieron las proteínas para analizar el efecto de dicha interacción en la transformación antena-tarso.

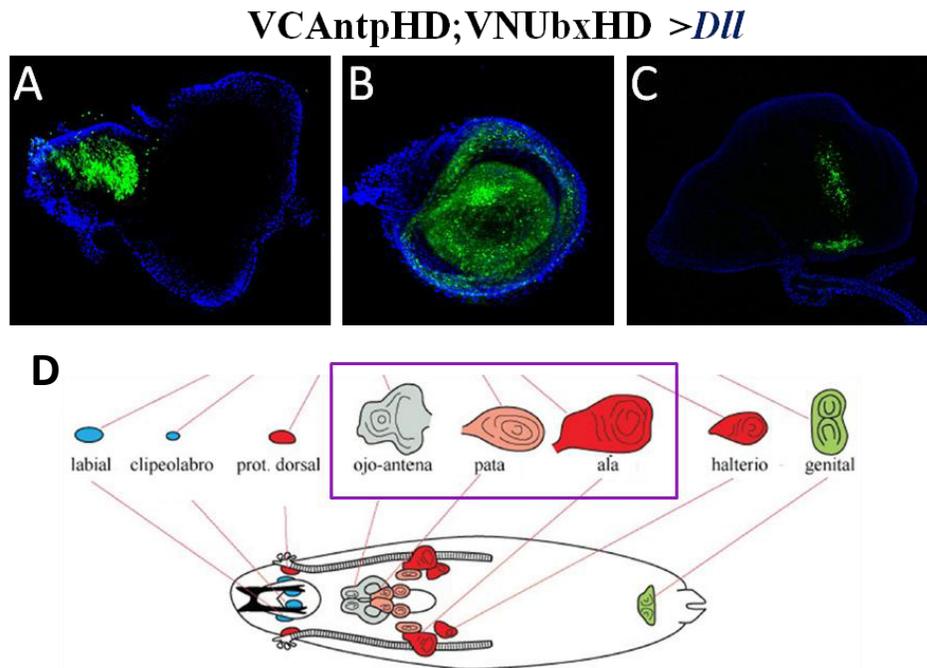


Figura 27. Interacción molecular de los HDs de las homeoproteínas Antp y Ubx mediante BIFC *in vivo* en *Drosophila*. La imagen muestra los discos imaginales obtenidos de las larvas de la crusa VC AntpHD; VNUbxHD dirigida con el potenciador *Dll*-GAL4. **A.** ojo-antena, **B.** pata y **C.** ala, teñidos con DAPI (azul) y mostraron la reconstitución de Venus (verde) resultante de la interacción entre AntpHD y UbxHD. Los discos están orientados hacia la región anterior de la larva; observados a 20X en microscopía confocal. **D.** Representación de una larva que muestra la ubicación de los discos imaginales; hacia la región anterior se encuentran los discos labial, clipeolabro, prot. dorsal, ojo-antena, pata, ala, halterio y genital. En recuadro morado se muestran los discos disectados de ojo-antena, pata y ala.

Posteriormente, se dejaron desarrollar 10 larvas hasta la eclosión de los adultos. En la Figura 28A se muestra una mosca wt con fenotipo normal. La interacción AntpHD-UbxHD afectó la transformación antena-pata parcialmente ya que solo se observaron estructuras similares al fémur (Fig. 28E). En contraste, como se esperaba, el HD de Antennapedia causó la evidente transformación antena-pata (Fig. 28B) mientras que Ubx mostró un fenotipo aparente wt (Fig. 28C) y el HD de Ubx únicamente provocó un engrosamiento de la arista (Fig. 28D). Estos resultados indican que la transformación antena-pata se vió afectada por la interacción de Antp con Ubx al observarse solo una transformación parcial.

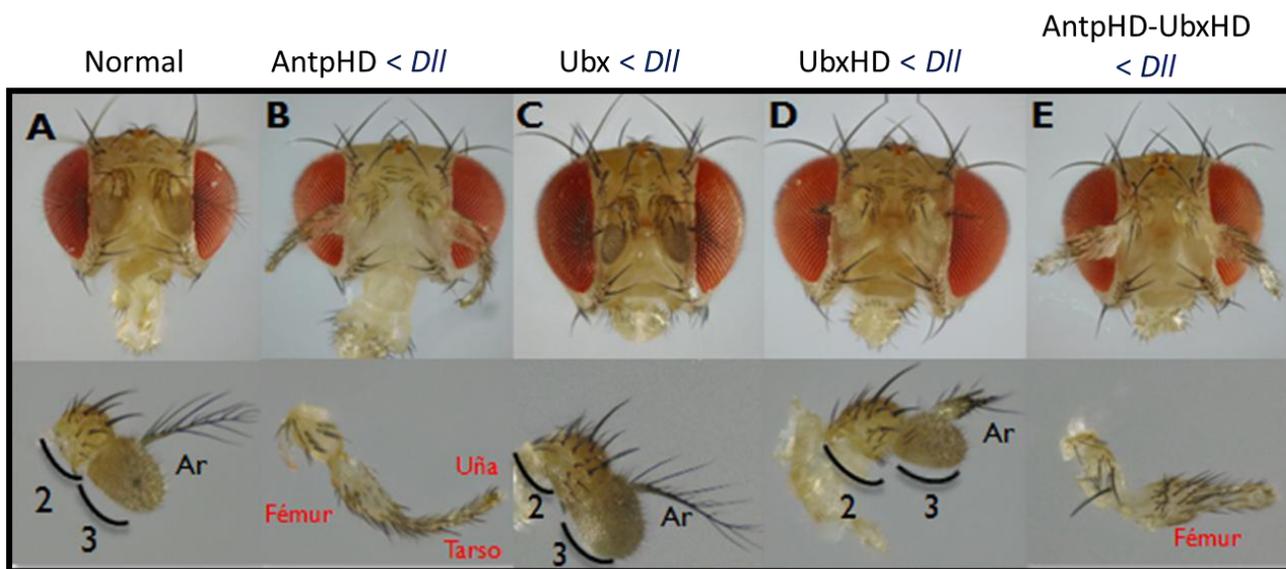


Figura 28. Expresión de Antp y Ubx en la transformación antena-pata en *Drosophila melanogaster*. Se realizaron dos cruza genéticas para dirigir los HDs de Antp y Ubx a la antena con el potenciador *Dll* usando el sistema binario UAS/GAL4. **A.** Imagen de la cabeza y antena de una mosca wt utilizada como control. **B.** La expresión del HD de Antp con *Dll* en la antena muestra la transformación causada por el HD de Antennapedia; se observan estructuras similares al fémur, tarso y uña. **C.** La expresión de Ubx en la antena no transformó la antena en pata y se observa una antena tipo wt. **D.** Al dirigir el HD de Ubx a la antena se muestra un engrosamiento de la arista. **E.** La expresión de los HDs de Antp y Ubx en la antena mostró una transformación parcial, con reducción del segmento 2, se aprecia estructura similar al fémur.

7.3 Los factores BIP2, TBP, TFIIA γ , y TFIIIE β afectan la interacción Antp-Ubx

Para analizar si otros factores transcripcionales están involucrados en la interacción Antp-Ubx se realizó un análisis de interacción mediante BiFC competitivo. Para ello, se corroboró la identidad de los plásmidos competidores mediante la digestión con una enzima de restricción diagnóstica y posteriormente se analizó su efecto en la interacción Antp-Ubx mediante BiFC competitivo.

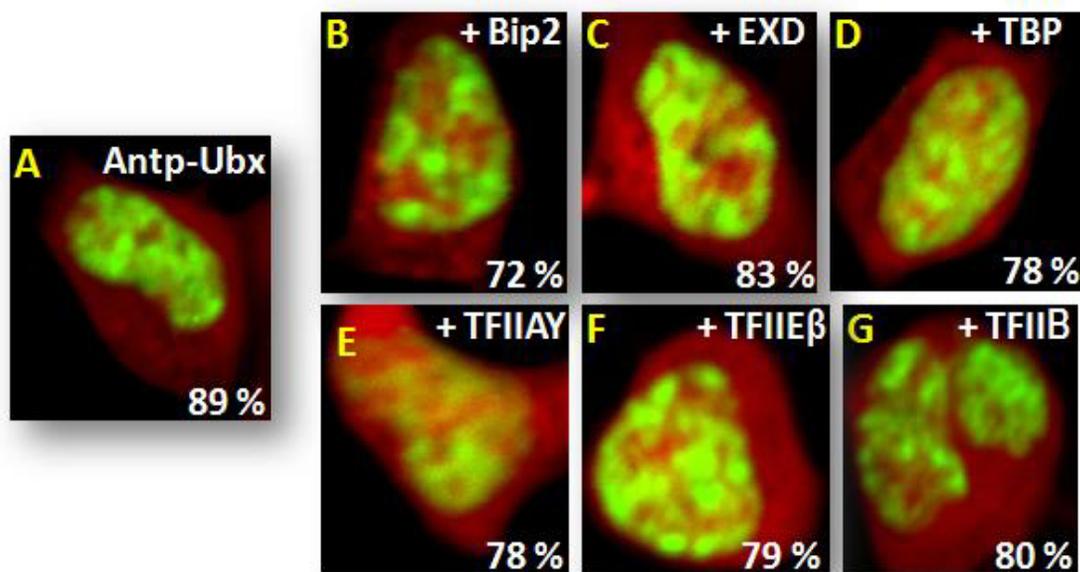


Figura 30. La Interacción de Antp y Ubx es afectada por Factores transcripcionales Bip2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β . Las células HEK293 fueron co-transfectadas con los plásmidos codificantes a Antp y Ubx así como con factores transcripcionales para determinar los factores probables que afectan la interacción mediante BiFC competitivo. Se indican los porcentajes de interacción (%) de las proteínas Antp y Ubx, así como al agregar un factor transcripcional adicional. Antp-Ubx: 89%, + Bip2: 72%, + Exd: 83%, + TBP: 78%, TFIIA γ : 78%, TFIIE β : 79% y TFIIB: 80%. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes por triplicado.

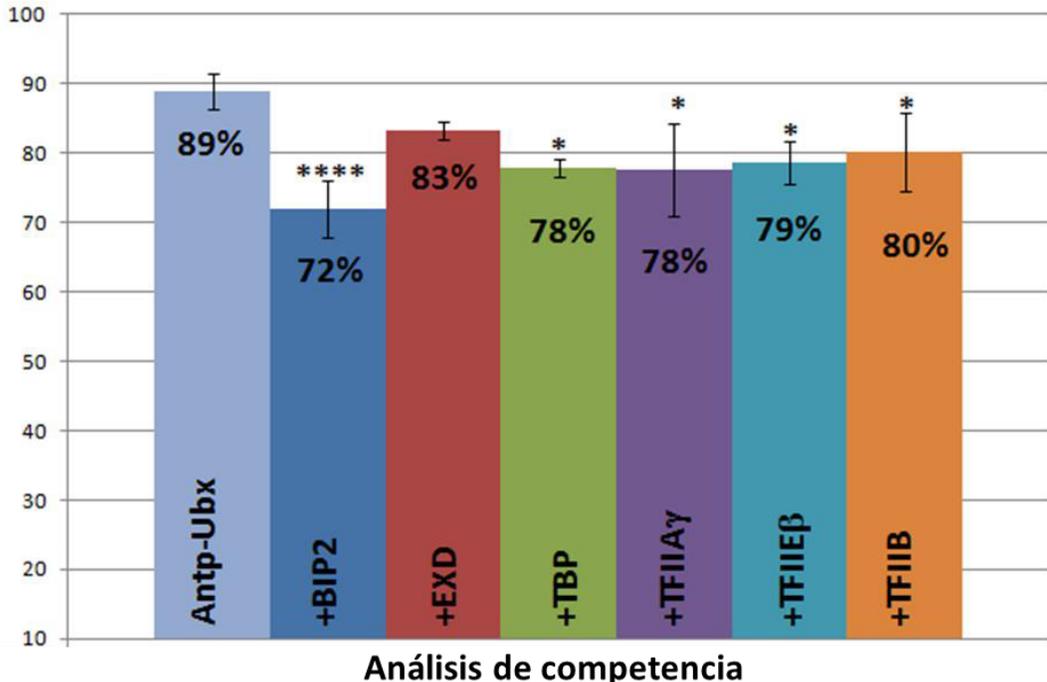


Figura 31. Análisis estadístico de la interacción Antp-Ubx con FTs mediante BiFC competitivo. Los porcentajes de interacción obtenidos se compararon mediante ANOVA de una vía y una comparación de medias Tukey con un valor de $p < 0.05$. Los resultados muestran una diferencia altamente significativa de la interacción Antp-Ubx + Bip2 respecto a la interacción control Antp-Ubx. También se observa una diferencia significativa con los FTs TBP, TFIIA γ y TFIIE β , a diferencia de los factores Exd y TFIIB que no mostraron diferencia significativa con respecto a la interacción control Antp-Ubx.

8. Discusión

Los resultados obtenidos muestran que los HDs son importantes en la interacción de las homeoproteínas Antp y Ubx y se determinó específicamente que la posición aminoacídica no. 19 de la hélice I del HD de Antp es importante en la interacción proteína–proteína de Antp y Ubx mientras que la posición G19 de Ubx no afectó la interacción Antp-Ubx. Además, la interacción Antp-Ubx afectó la transformación antena-tarso obteniendo una transformación parcial y se detectó a los factores de transcripción BIP2, TBP, TFIIA γ , y TFIIIE β como participantes posibles en interacciones triméricas en el complejo Antp-Ubx.

El análisis de las interacciones de las proteínas Antp y Ubx wt mediante BiFC en cultivo celular confirmó que los HDs son esenciales en la interacción de las homeoproteínas Antp y Ubx. Es importante indicar que la interacción de los homeoproteínas mostraron un porcentaje de interacción del 89%, mientras que sus HDs mostraron un aumento al 96% de las células que presentaron fluorescencia confirmando nuestros resultados previos en embriones *in vivo* donde se determinó que el dominio proteico que participa en la interacción Antp-Ubx es el HD (Villarreal-Puente, 2015). Estos resultados indican además, que tal vez los dominios proteicos externos al HD interfieren en la interacción Antp-Ubx, ya que existen múltiples dominios, por ejemplo las regiones poly Q en el caso de Antp que se encargan de establecer interacción con el factor general transcripcional TBP (Ovalle-Maqueo, 2014) o bien en el caso de Ubx el dominio UbdA que participa en la interacción con el cofactor EXD (Merabet *et al.*, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por Boube y colaboradores en el 2014 donde en este caso no fue posible detectar la interacción de la homeoproteína AbdA completa con la subunidad 19 del complejo mediador de la transcripción (Med19) por BiFC *in vivo* en embriones, pero al evaluar solo el HD de AbdA la interacción fue detectada, sugiriendo que las secuencias externas al HD limitan el acceso a Med19. Por lo tanto, son los HDs los principales dominios encargados de establecer la interacción proteína-proteína Antp-Ubx de la misma forma que AbdA-Med19.

En ensayos previos realizados en nuestro laboratorio, se ha analizado el papel que juega el HD en las interacciones entre homeoproteínas, eliminándolo y analizando la interacción de proteínas específicas en su ausencia. Un ejemplo son los ensayos realizados por Cárdenas-Chaves en el 2012, en donde se observó que al eliminar el HD de Antp, la interacción con AbdB disminuía de un 89% a un 16% mostrando el papel importante del HD de Antp en la interacción Antp-AbdB. Resultados similares fueron obtenidos por Elizondo-Rodríguez en el 2016 al probar la interacción Antp-Scr la cual mostró

un 72% de interacción, mientras que al deletar el HD de Antp esta se redujo a un 18% ambos ensayos realizados por BiFC en cultivo celular y además la interacción Antp-Scr mostró que la hélice I, específicamente la posición 19, participa en la interacción entre estas homeoproteínas. Lo anterior reafirma la importancia del HD en interacciones proteína-proteína entre homeoproteínas.

Con base en estos resultados y a los publicados por Plaza *et al.*, en el 2008, donde se analiza la interacción Antp-Ey, comprobando la participación de la posición 19 de la hélice I del HD, así como los resultados obtenidos por Papadopoulos *et al.*, en el 2012, donde se determinó que Scr homodimeriza y que la posición aminoacídica antes mencionada participa en dicha homodimerización, en esta tesis se analizó el papel de la posición 19 de la hélice I mediante mutagénesis sitio dirigida en la interacción Antp-Ubx usando BiFC en cultivo celular. Se realizaron 4 ensayos de BiFC por triplicado usando como control la interacción de las homeoproteínas Antp y Ubx wt y se comparó el resto de las interacciones en el análisis estadístico para el cual se realizó un ANOVA de una vía y una comparación múltiple de medias (Tukey).

Los resultados obtenidos, al probar la interacción AntpG19-Ubx, mostraron que de un 89% de las proteínas wt, el porcentaje de interacción se redujo a un 60%, en contraste al mutagenizar Ubx y co-transfectarla con Antp wt, el porcentaje de las células que presentaron fluorescencia no mostró diferencia significativa, obteniendo un 86% de interacción. Estos resultados permiten concluir que el aminoácido 19 de la hélice I de Antp es esencial en la interacción Antp-Ubx mientras que ésta posición en Ubx no participa en la interacción Antp-Ubx, al no observar un porcentaje significativamente menor con la mutante de Ubx. Además, se analizó la interacción de ambas mutantes, es decir la doble mutante que mostró un porcentaje de interacción del 67%, mientras que AntpG19-Ubx obtuvo un 60% de interacción, confirmando que el 67% de interacción obtenido al analizar ambas mutantes es debido a la mutante en el aminoácido 19 del HD de Antp, ya que si la mutante de Ubx hubiese tenido efecto, lo esperado era una reducción aún mayor en el porcentaje de interacción. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Elizondo-Rodríguez en el 2016, donde al analizar la interacción AntpG19-ScrG19, de un 72% en las proteínas wt, obtuvo una reducción hasta un 32% de interacción, mientras que al analizar solo una proteína mutante se obtuvo un 58% en el caso de AntpG19 y 57% para ScrG19. Algunos posibles residuos de Ubx que participan en la interacción Antp-Ubx, son las posiciones 11,14 y 15 en la hélice I, las posiciones 22 y 24 presentes en el loop entre las hélices I y II así como las posiciones 32 y 36 en la hélice II, y en la hélice 3 la posición 56. Todos estos residuos aminoacídicos están ubicados en el lado opuesto del HD que interactúa con el ADN por lo tanto están expuestos y en posiciones favorables para establecer

interacciones proteína-proteína y ya se ha determinado en nuestro laboratorio que las posiciones 32 y 36 de la hélice II de Antp participan en la interacción con TFIIIE β . Además, en Ubx las posiciones 22, 24 y 56 específicamente están altamente conservadas en el clado Ecdycsozoa por lo que son buenas candidatas como participes en interacciones proteína-proteína (Zhu y Kuziora, 1996, Merabet *et al.*, 2009).

Debido a que Antp y Ubx reprimen genes responsables de generar estructuras de la cabeza y se aseguran del correcto desarrollo de estructuras torácicas por lo que en su ausencia se da la transformación de patas por antenas (Struhl, 1982), en la presente tesis se realizó el análisis funcional de ésta interacción en la transformación antena-pata mediante cruza genéticas. Para asegurarnos de que los HDs de Antp y Ubx se expresan tejido específico en la antena, se observaron larvas producto de la cruce al microscopio y se seleccionaron las que presentaron fluorescencia. Es decir, se corroboró la interacción Antp-Ubx en las larvas que fueron disectadas para verificar la fluorescencia en el disco de ojo-antena. Como se esperaba, el 50% de la progenie presentó fluorescencia y se seleccionaron y disectaron 20 larvas para verificar la fluorescencia en el disco ojo-antena. Además, se dejaron desarrollar hasta la eclosión 10 larvas para la disección de cabezas tanto para la interacción como en el análisis de la expresión de Ubx wt y su HD en la antena. Los resultados mostraron que la interacción Antp^{HD}-Ubx^{HD} afectó parcialmente la transformación antena-pata, en comparación con el fenotipo de Antp^{HD} en la transformación antena-pata. Con Ubx completa se observó una antena tipo wt y con Ubx^{HD} un engrosamiento de la arista. Nuestros resultados muestran que Ubx no causó efecto en la transformación, pero al dirigir su expresión junto con Antp, el resultado obtenido fue una transformación parcial. Resultados similares fueron obtenidos por Plaza y colaboradores en el 2001 donde dirigieron la expresión de Antp y Ey a la antena con el potenciador *Dpp-Gal4* y la transformación antena-pata fue inhibida y se determinó que estas dos homeoproteínas interactuaban *in vitro* (GST-pulldown). Más tarde en 2008 se comprobó la interacción proteína-proteína de Antp y Ey en células HEK293 e *in vivo* en discos imaginales de ala (Plaza *et al.*, 2008). Por lo que debido a que Antp y Ubx presentan interacción posiblemente el reclutamiento de Antp^{HD} afecta la capacidad homeótica de la transformación antena-pata. Además, es importante indicar que el efecto de Ubx observado en esta tesis es diferente al obtenido por Mann y colaboradores en 1990, quienes observaron que al expresar Ubx mediante un promotor inducible por calor se mostró la transformación antena por pata, por lo que es necesario corroborar las transformaciones obtenidas al dirigir Ubx wt, así como determinar si realmente se está expresando Ubx en la antena.

Por último, también analizamos las posibles interacciones triméricas de los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , TFIIB, TFIIA γ , EXD y BIP2 en el complejo Antp-Ubx usando el análisis de competencia por BiFC. Este ensayo fue previamente descrito para determinar posibles compañeros de interacción de homeoproteínas en *Drosophila* (Baeza *et al.*, 2015) por lo que fue adaptado en el laboratorio para su análisis en cultivo celular. BiFC competitivo se basa en la co-transfección de dos plásmidos que codifican las proteínas de interés fusionadas cada una a un extremo de la proteína fluorescente Venus, así como un tercer plásmido que contenga el competidor, este sin estar fusionado a algún extremo de una proteína fluorescente.

En la interacción Antp-Ubx se analizaron 6 factores transcripcionales que mostraron que BIP2 redujo el porcentaje de interacción de Antp-Ubx de un 89% a un 72%, Exd a 83%, TBP a 78% al igual que TFIIA γ , TFIIE β a 79% y TFIIB 80%. El análisis estadístico reveló que los factores transcripcionales Bip2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β mostraron diferencia significativa respecto a la interacción Antp-Ubx, indicando que estos cuatro TFs probablemente interactúan ya sea con Antp o con Ubx o quizá con ambas homeoproteínas probablemente mediante interacciones triméricas. Esta probable interacción tripartita es similar a la realizada por Baeza *et al.*, 2015 en un análisis de competencia por BiFC *in vivo* en embriones de *D. melanogaster* en el que propusieron y corroboraron compañeros de interacción para la homeoproteína AbdA: en este ensayo se basaron en su interacción con el cofactor EXD, por ejemplo, homeoproteínas como Teashirt, Even-skipped, Empty spiracles y Distal-less inclusive el factor general de transcripción TFIIE β . Una vez analizado el interactoma de la homeoproteína AbdA, prosiguieron con el interactoma de Antp, Ubx, Scr y AbdB, encontrando que todas estas homeoproteínas interactuaron con TFIIE β , lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro ensayo de competencia basado en BiFC en cultivo celular ya que al agregar a TFIIE β como competidor, el porcentaje de interacción de Antp-Ubx disminuyó significativamente lo que lo postula como un probable interactor.

Los resultados obtenidos por Cárdenas-Chaves en el 2012 al analizar diversos factores transcripcionales con la homeoproteína Antp, mostraron interacción dimérica con EXD, BIP2, TBP y TFIIE β , mientras que TFIIB y TFIIA γ no mostraron interacción. Por lo que tomando como base sus resultados, los competidores, EXD, BIP2, TBP y TFIIE β que interactúan con Antp, e inclusive EXD y TFIIE β con Ubx (Bondos *et al.*, 2004, Baeza *et al.*, 2015) podrían ser candidatos para interacciones triméricas con Antp-Ubx. En contraste, nuestros resultados muestran como probables competidores a BIP2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β , mas no a EXD y TFIIB. TFIIB no mostró diferencia significativa respecto al control Antp-Ubx probablemente debido a que Antp no interactuó con

TFIIB en los experimentos realizados por Cárdenas-Chaves, 2012 y aun no existen reportes de la interacción con Ubx. Por otro lado, también se mostró que el factor TFIIA γ si redujo significativamente el porcentaje de interacción en Antp-Ubx, por lo que es importante verificar la interacción de Antp y Ubx con este factor de forma individual mediante FRET basado en BiFC en *Drosophila*.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la disección molecular y funcional de la interacción Antp-Ubx en ésta tesis permitieron concluir:

- La interacción molecular Antp-Ubx a través de sus HDs presenta un incremento en la interacción del 89% al 96% comparada con la homeoproteínas completas
- El papel esencial de la posición aminoacídica número 19 de de la hélice I de Antp en la interacción Antp-Ubx
- La falta de efecto de la posición 19 del HD de Ubx en la interacción Antp-Ubx
- La interacción de los HDs de Antp-Ubx afectó parcialmente la transformación homeótica antena-tarso
- Los factores transcripcionales TBP, BIP2, TFIIA γ y TFIIE β son probables colaboradores triméricos en la interacción Antp-Ubx
- Los factores transcripcionales EXD y TFIIB no afectaron la interacción Antp-Ubx por lo que probablemente no participan en interacciones triméricas

Los resultados obtenidos abren la posibilidad para analizar si la posición aminoacídica número 19 de la hélice I de Antp participa en la interacción Antp-Ubx *in vivo* en *Drosophila melanogaster* así como determinar su papel funcional en la interacción Antp-Ubx. Por otro lado, se postula también verificar las probables interacciones triméricas en el complejo Antp-Ubx con BIP2, TBP, TFIIA γ y TFIIE β mediante FRET basado en BiFC para determinar el papel de los complejos multiméricos en los interactomas Hox y en control genético del desarrollo en *D. melanogaster*.

10. Bibliografía

- Altamirano-Torres CD. 2014. Interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con el factor TFIIIE- β a través de los residuos 32 y 36 del homeodominio. Tesis de maestría, FCB UANL, Monterrey Nuevo León, México.
- Appel, B., & Sakonju, S. (1993). Cell-type-specific mechanisms of transcriptional repression by the homeotic gene products UBX and ABD-A in *Drosophila* embryos. *The EMBO journal*, 12(3), 1099.
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., & Merabet, S. (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*, 4, e06034.
- Beachy, P. A., Krasnow, M. A., Gavis, E. R., & Hogness, D. S. (1988). An Ultrabithorax protein binds sequences near its own and the Antennapedia P1 promoters. *Cell*, 55(6), 1069-1081.
- Beh, C. Y., El-Sharnouby, S., Chatzipli, A., Russell, S., Choo, S. W., & White, R. (2016). Roles of cofactors and chromatin accessibility in Hox protein target specificity. *Epigenetics & chromatin*, 9(1), 1.
- Bermingham, J. R., Martinez-Arias, A., Petitt, M. G., & Scott, M. P. (1990). Different patterns of transcription from the two Antennapedia promoters during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 109(3), 553-566.
- Bomze, H. M., & López, A. J. (1994). Evolutionary conservation of the structure and expression of alternatively spliced Ultrabithorax isoforms from *Drosophila*. *Genetics*, 136(3), 965.
- Bondos, S. E., Catanese, D. J., Tan, X. X., Bicknell, A., Li, L., & Matthews, K. S. (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(25), 26433-26444.
- Boulet, A. M., & Scott, M. P. (1988). Control elements of the P2 promoter of the Antennapedia gene. *Genes & development*, 2(12a), 1600-1614.
- Boube, M., Hudry, B., Immarigeon, C., Carrier, Y., Bernat-Fabre, S., Merabet, S., ...& Cribbs, D. L. (2014). *Drosophila melanogaster* Hox transcription factors access the RNA polymerase II machinery

through direct homeodomain binding to a conserved motif of mediator subunit Med19. *PLoS genetics*, 10(5), e1004303.

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

Cárdenas-Chávez DL. 2012. Interacciones moleculares de Antennapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

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

Casares, F., & Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, 392(6677), 723-726.

Elizondo-Rodríguez FS. 2016. Los homeodominios de Antennapedia y Sex comb reduced son requeridos en su interacción molecular proteína-proteína. Tesis de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León

Katrin Weigmann, Robert Klapper, Thomas Strasser, Christof Rickert, Gerd Technau, Herbert Jäckle, Wilfried Janning and Christian Klämbt: FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* (2003) 19, 310.

Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 465-487.

Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Jesús Maté, M., Vincentelli, R., Hainaut, M., Berenger, H., Pradel, J., Saurin, A. J., Ortiz-Lombardía, M. and Graba, Y. (2015). A flexible extension of the *Drosophila* Ultrabithorax homeodomain defines a novel Hox/PBC interaction mode. *Structure* 23, 270-279.

Galant, R., & Carroll, S. B. (2002). Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature*, 415(6874), 910-913.

García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Cell patterning*, 29, 161-182.

- Garcia-Bellido, A. 1977. Homeotic and atavistic mutations in insects. *Amer. Zool.* **17**: 613-630.
- Gehring WJ. 1987. Homeoboxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252.
- Gilbert, F. S. 2003. *Developmental Biology*. Séptima edición. USA. Sinauer. Capitulo 9.
- Graba, D. Aragnol, J. Pradel *Drosophila* Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays*, **19** (1997), pp. 379–388.
- Hafen E, Levine M and Gehring WJ. 1984. Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **307**: 287-289.
- Heuer JG, Kaufman TC. 1992. Homeotic genes have specific functional roles in the establishment of the *Drosophila* embryonic peripheral nervous system. *Development* **115**: 3547.
- Hudry, B., Viala, S., Graba, Y., & Merabet, S. (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC biology*, **9**(1), 5.
- Irish VF, Martinez-Arias A and Akam M. 1989. Spatial regulation of the Antennapedia and Ultrabithorax homeotic genes during *Drosophila* early development. *EMBO J.* **8**: 1527-1537.
- Johnson FB, Parker E, Krasnow MA. 1995. Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 739-43.
- Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K. R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., ...& Taipale, J. (2015). DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*, **527**(7578), 384.
- Kaplan T, Li XY, Sabo PJ, Thomas S, Stamatoyannopoulos JA, Biggin MD, Eisen MB. 2011. Quantitative models of the mechanisms that control genome-wide patterns of transcription factor binding during early *Drosophila* development. *PLoS Genet* **7**: e1001290. doi: 10.1371/journal.pgen.1001290
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.

- Li X-Y, Thomas S, Sabo P, Eisen M, Stamatoyannopoulos J, Biggin M. The role of chromatin accessibility in directing the widespread, overlapping patterns of *Drosophila* transcription factor binding. *Genome Biol.* 2011;12(4):R34.)
- López, A. J., Artero, R. D., & Pérez-Alonso, M. (1996). Stage, tissue, and cell specific distribution of alternative Ultrabithorax mRNAs and protein isoforms in the *Drosophila* embryo. *Roux's archives of developmental biology*, 205(7-8), 450-459.
- Mann, R. S., & Hogness, D. S. (1990). Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell*, 60(4), 597-610.
- Mann, R. S., Lelli, K. M., & Joshi, R. (2009). Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology*, 88, 63-101.
- Martinez-Arias A. 1986. The Antennapedia gene is required and expressed in parasegments 4 and 5 of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 5: 135141.
- Merabet, S., Hudry, B., Saadaoui, M., & Graba, Y. (2009). Classification of sequence signatures: a guide to Hox protein function. *Bioessays*, 31(5), 500-511.
- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M., & Graba, Y. (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 16946-16951.
- Moens, C. B., & Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental biology*, 291(2), 193-206.
- Montalvo-Méndez RJ. 2016. El homeopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción molecular proteína-proteína con Antennapedia. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
- Ovalle-Maqueo A. 2015. Identificación de los homeopeptidos de glutaminas de Antennapedia responsables de su interacción molecular con el factor transcripcional TBP. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

- Pattatucci AM, Kaufman TC. 1991. The homeotic gene Sex Combs Reduced of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics*, 129: 443-461.
- Plaza, S, Prince F, Adachi Y, Punzo C, Cribbs DL and Gehring WJ. 2008. Cross-Regulatory Protein-Protein Interactions Between Hox and Pax Transcription Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 13439–13444.
- Plaza, S., Prince, F., Jaeger, J., Kloter, U., Flister, S., Benassayag, C., ...& Gehring, W. J. (2001). Molecular basis for the inhibition of *Drosophila* eye development by Antennapedia. *The EMBO journal*, 20(4), 802-811.
- Papadopoulos, A., & Akam, M. (2011). Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2855-2860.
- Papadopoulos, D. K., Skouloudaki, K., Adachi, Y., Samakovlis, C., & Gehring, W. J. (2012). Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. *Developmental biology*, 367(1), 78-89.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., ...& Gehring, W. J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development*, 135(9), 1669-1679.
- Reuter R, Scott MP. 1990. Expression and function of the homeotic genes Antennapedia and Sex Combs Reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development* 109: 2893-303.
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C., & Graba, Y. (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development*, 142(7), 1212-1227.
- Ronshaugen, M., McGinnis, N., & McGinnis, W. (2002). Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature*, 415(6874), 914-917.
- Sanchez-Herrero, E., & Akam, M., (1989). Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of *Drosophila*. *Development*, 107(2), 321-329.

- Schnewly, S., & Gehring, W. J. (1985). Homeotic transformation of thorax into head: developmental analysis of a new Antennapedia allele in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 108(2), 377-386.
- Struhl G. 1981. A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* 292: 635-638.
- Struhl, G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(23), 7380-7384.
- Subramaniam, V., Bomze, H. M., & López, A. J. (1994). Functional differences between Ultrabithorax protein isoforms in *Drosophila melanogaster*.
- Tan, X. X., Bondos, S., Li, L., & Matthews, K. S. (2002). Transcription activation by Ultrabithorax Ib protein requires a predicted α -helical region. *Biochemistry*, 41(8), 2774-2785.
- Taylor, D. B., Szalanski, A. L., & PETERSON, R. D. (1996). Identification of screwworm species by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Medical and veterinary entomology*, 10(1), 63-70.
- Villarreal-Puente AC. 2015. Interacción molecular de Ubx con Antp mediante BiFC *in vivo*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología Genómica, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
- Weigmann K, Klapper R, Strasser T, Rickert C, Technau G, Jäckle H, Janning W, Klämbt C. FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet.* 2003 Jun;19(6):310-1.
- Wunderlich, Z., & Mirny, L. A. (2009). Different gene regulation strategies revealed by analysis of binding motifs. *Trends in genetics*, 25(10), 434-440.
- Zink, B., Engström, Y., Gehring, W. J., & Paro, R. (1991). Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal*, 10(1), 153.
- Zouaz, A., Auradkar, A., Delfini, M. C., Macchi, M., Barthez, M., Akoa, S. E., ...& Graba, Y. (2017). The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription. *The EMBO journal*, e201695751.

Zhu, A., & Kuziora, M. A. (1996). Homeodomain interaction with the β subunit of the general transcription factor TFIIE. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 20993-20996.