

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del homeodominio de Antennapedia son necesarios para la interacción con TFIIIE β y para su especificidad funcional en *D. melanogaster*

POR

M.C. CLAUDIA DALILA ALTAMIRANO TORRES

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

DICIEMBRE, 2018

Los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del homeodominio de Antennapedia son necesarios para la interacción con TFIIIE β y para su especificidad funcional en *D. melanogaster*

COMITÉ DE TESIS

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Director de tesis

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Secretario

DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES
Vocal

DR. FERMÍN MAR AGUILAR
Vocal

DRA. ANA CAROLINA MARTÍNEZ TORRES
Vocal

LUGAR DE TRABAJO

El trabajo experimental para la realización de esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Biología del Desarrollo, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.



“Desde lo profundo de los cromosomas...”
Jorge Drexler

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la **Dra. Diana Reséndez Pérez**, por permitirme y apoyarme para continuar en mi camino como investigador, gracias por la paciencia, y por sus valiosas enseñanzas académicas y de vida.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de manutención otorgada, y por el empuje que da al desarrollo de la ciencia en nuestro país.

A mi comité de tesis: **Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dr. Pablo Zapata Benavides, Dr. Fermin Mar Aguilar y Dra. Ana Carolina Martínez Torres** por la asesoría brindada durante el desarrollo y la revisión de este proyecto.

A todos los integrantes de la Unidad de Biología del Desarrollo, por la asesoría en temas científicos y mundanos, la amistad, el compañerismo, el apoyo, por todo; **Nancy** (por siempre apoyarnos a todos en los terrenos administrativos), **Citlali, Paco, Vianey, los Rubénes, Azeneth, Gustavo, Alely, Marcela, Freinet, Samantha**, a todos.

A la **Dra. Janneth Salinas (Jeannie)** por el constante apoyo, presencial y a distancia, por enseñarme a trabajar con la mosquita a la que tanto miedo le tenía. Gracias.

A la **M.C. Alejandra Arreola** por su invaluable apoyo de edición en el artículo científico, gracias y abajo el Impact Factor.

A mis amigos del doctorado: **César Romo Sáenz y Marcela de Luna Saldívar**, por acompañarme y ser soporte durante todas las vicisitudes que acompañaron esta aventura llamada doctorado y luego las vicisitudes profesionales. Gracias, los quiero. A las chicas del coro, **Melina, Cecy, Lucero, Dulce, Yaya**, siempre en los mejores eventos.

A las secretarías de posgrado de la FCB, **Mónica Vázquez y Mirthala Páez**, gracias por todo el apoyo brindado durante el posgrado y en los trámites de titulación.

iiiiGRACIAS A TODOS!!!!

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Este trabajo está dedicado a mis padres, a su cariño y el gran ejemplo que representan para mí y mis hermanos.

Gracias por su constante e incondicional apoyo, por su paciencia, consejos, y su gran labor como padres.

¡¡¡¡Gracias, los quiero y admiro mucho!!!!

A MIS HERMANOS

Adrián, Ismael, Fernanda y Ana; el cariño, el afecto y la unidad que me han brindado siempre, son incomparables e insustituibles. Espero algún día obtener la mitad de la fortaleza que ustedes tienen, los admiro muchísimo.

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS	1
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LUGAR DE TRABAJO.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	13
RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Genes homeóticos	19
2.2 Antennapedia.....	22
2.2.1 Especificidad funcional del Homeodominio.....	23
2.2.2 Tetrapéptido YPWM	25
2.2.3 Regulación génica	26
2.3 Interacciones moleculares proteína-proteína	26
2.4 Interacciones de Antp con la Maquinaria Basal de Transcripción	28
2.4.1 Antp-Bip2.....	30
2.4.2 Antp-TBP.....	30
2.4.1 Antp-TFIIIE β	30
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS.....	35
ESTRATEGIA GENERAL.....	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Análisis de la interacción Antp-TFIIIE β mediante BiFC en <i>Drosophila</i>	37

6.1.1 Construcción de pUASTattB-VCAnp ^{I32A-H36A} para microinyección.....	37
6.1.2 Microinyección de embriones para obtener la línea de moscas transgénica UAS-VCAnp ^{I32A-H36A}	39
6.1.3 Mantenimiento y amplificación de <i>D. melanogaster</i>	39
6.1.4 Sexado, colecta y realización de cruzas	39
6.1.5 Sistema Binario UAS/Gal4	41
6.1.6 Cruzas genéticas para analizar la interacción Antp-TFIIIE β mediante BiFC en embriones de <i>D. melanogaster</i>	42
6.1.6.1 Colecta y decorionización de embriones para su observación al microscopio confocal.....	43
6.1.7 Cruzas genéticas para analizar la interacción Antp-TFIIIE β en discos imaginales de <i>D. melanogaster</i>	44
6.1.7.1 Disección y procesamiento de discos imaginales para su observación al microscopio confocal.....	45
6.2 Análisis de la actividad funcional de la mutante Antp ^{I32A-H36A} en las transformaciones homeóticas en <i>D. melanogaster</i>	46
6.2.1 Construcción de pUASTattB-Antp ^{I32A-H36A} para microinyección.....	46
6.2.2 Microinyección de embriones para obtener la línea de moscas transgénica UAS-Antp ^{I32A-H36A}	48
6.2.3 Cruzas genéticas para determinar la actividad funcional de Antp ^{I32A-H36A} en la involución de la cabeza y las transformaciones torácicas en <i>D. melanogaster</i>	48
6.2.3.1 Colecta y procesamiento de embriones para el análisis de cutículas embrionarias	49
6.2.3.2 Preparación de cutículas embrionarias	50
6.2.4 Cruzas genéticas para analizar la actividad funcional de la mutante en las transformaciones antena-tarso	50
6.2.4.1 Disección de cabezas y antenas de <i>D. melanogaster</i> para la toma de forografías	51
6.3 Análisis de la actividad funcional de la interacción Antp-TFIIIE β en la transformación antena-tarso en <i>Drosophila</i>	52
6.3.1 Cruzas genéticas para analizar la actividad funcional de la interacción Antp-TFIIIE β en la transformación antena-tarso en <i>Drosophila</i>	52

6.3.1.1 Disección de adultos y toma de fotografías de cabezas y antenas	53
6.4 Análisis del efecto de los factores TBP, TFIIIB, TFIIAγ, Bip2, EXD y AbdB en la interacción Antp-TFIIIEβ mediante ensayos de BiFC competitivo en cultivo celular	53
6.4.1 Preparación de plásmidos pCS2 BiFC y pPAC-TBP, -TFIIIB, -TFIIA γ , -Bip2, -EXD y -AbdB para las co-transfecciones	54
6.4.2 Ensayos de co-transfección en células HEK293	55
6.4.3 Visualización de los complejos fluorescentes	56
7. RESULTADOS.....	57
7.1 Interacción proteína-proteína de Antp con TFIIIEβ mediante BiFC <i>in vivo</i> en <i>D. melanogaster</i>.....	57
7.1.1 Construcción del plásmido pUASTattB-VCantp ^{I32A-H36A}	57
7.1.2 Obtención de líneas de moscas transgénicas UAS-VCantp ^{I32A.H36A}	58
7.1.3 La interacción molecular proteína-proteína Antp-TFIIIE β depende de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD <i>in vivo</i>	59
7.1.4 La interacción molecular proteína-proteína Antp-EXD no fue afectada por la mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD.....	63
7.1.5 La doble mutante del HD en la hélice 2 no afectó la función de unión al DNA ni la capacidad transactivadora de Antp.....	64
7.2 Actividad funcional de la doble mutante Antp^{I32A-H36A} en las transformaciones homeóticas en <i>D. melanogaster</i>	66
7.2.1 Construcción del plásmido pUASTattB-Antp ^{I32A-H36A}	66
7.2.2 Generación de líneas de moscas transgénicas UAS-Antp ^{I32A-H36A}	68
7.2.3 Los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp son requeridos para la actividad funcional de Antp.....	68
7.2.4 La mutación de los residuos 32 y 36 del HD de Antp no permitió la transformación antena-tarso	71

7.3 La interacción Antp-TFIIβ es requerida para la transformación antena-tarso.....	73
7.4 Los factores de transcripción TBP, Bip2, TFIIIB, TFIIAγ, EXD y AbdB afectan la interacción Antp-TFIIβ	76
7.4.1 Los GTFs TBP, Bip2, TFIIIB y TFIIAγ, así como las homeoproteínas EXD y AbdB interfieren en la interacción Antp-TFIIβ en cultivo celular	77
8. DISCUSIÓN	80
9. CONCLUSIONES.....	86
10. PERSPECTIVAS	87
APÉNDICE I- Listado de oligonuclótidos diseñados.....	88
APENDICE II- Líneas transgénicas utilizadas en esta tesis	89
APENDICE III- Construcción de pNPAC-Antp^{I32A-H36A}	91
11. BIBLIOGRAFIA.....	92
RESÚMEN BIOGRÁFICO	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de expresión de los complejos Hox	20
Figura 2. Conservación evolutiva y organización genómica de los genes homeóticos.....	21
Figura 3. Estructura génica de <i>Antennapedia</i>	22
Figura 4. Interacción del homeodominio de Antp con el DNA	24
Figura 5. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en <i>Drosophila</i>	25
Figura 6. Ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción de la RNA Pol II	29
Figura 7. Interacción proteína-proteína de TFIIIE β con el HD de Antp	31
Figura 8. Posición de los residuos 32 y 36 en la hélice 2 del HD.....	32
Figura 9. Estrategia general para analizar la interacción Antp-TFIIIE β <i>in vivo</i>	36
Figura 10. Dimorfismo sexual de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Figura 11. Sistema UAS/Gal4.....	41
Figura 12. Esquemas de cruzas genéticas para obtener líneas UAS con las proteínas de fusión BiFC.....	42
Figura 13. Esquemas de cruzas genéticas para dirigir la expresión de las proteínas BiFC a embriones.....	43
Figura 14. Esquemas de cruzas genéticas para dirigir la expresión de las proteínas BiFC a discos imaginales	45
Figura 15. Esquemas de cruzas genéticas para dirigir la expresión de Antp y Antp ^{I32A-H36A} a la región cefálica de embriones	49
Figura 16. Esquemas de cruzas genéticas para dirigir la expresión de Antp y Antp ^{I32A-H36A} al disco antenal	51
Figura 17. Esquemas de cruzas genéticas para co-expresar las proteínas BiFC en el disco imaginal de la antena.....	53
Figura 18. Principio del ensayo de BiFC competitivo.....	54
Figura 19. Construcción del plásmido recombinante pUASTattB-VCantp ^{I32A-H36A}	58
Figura 20. La interacción Antp-TFIIIE β es dependiente del HD de Antp en los residuos 32 y 36 de la hélice 2 en embriones de <i>D. melanogaster</i>	60

Figura 21. Interacción Antp-TFIIβ mediante los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD en discos imaginales de <i>D. melanogaster</i>	61
Figura 22. Análisis estadístico de la interacción Antp-TFIIβ mediante BiFC en embriones y discos imaginales.....	62
Figura 23. Localización nuclear de la doble mutante	63
Figura 24. Interacción Antp^{I32A-H36A}-EXD en cultivo celular y embriones.....	64
Figura 25. La doble mutante Antp^{I32A-H36A} es capaz de unirse al DNA y activar la transcripción	65
Figura 26. Construcción del plásmido recombinante pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}	67
Figura 27. La mutante Antp^{I32A-H36A} no afectó la involución de la cabeza en embriones de <i>D. melanogaster</i>	70
Figura 28. La expresión ectópica de la mutante Antp^{I32A-H36A} afectó la transformación antena-tarso en adultos	73
Figura 29. La interacción AntpHD-TFIIβ es requerida para la transformación antena-tarso.....	75
Figura 30. Niveles de expresión de Antp y TFIIβ detectados mediante inmunofluorescencia.	76
Figura 31. GTFs: TBP, Bip2, TFIIIB, TFIIAγ y homeoproteínas AbdB Y EXD interfieren en la interacción proteína-proteína Antp-TFIIβ.....	78
Figura 32. Análisis estadístico del efecto de otros FTs en la interacción Antp-TFIIβ mediante BiFC competitivo.....	79
Figura 33. Construcción del plásmido recombinante pNPAC-Antp^{I32A-H36A}	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Programa de PCR para la amplificación de VC-Antp^{I32A-H36A}	37
Tabla II. Programa de PCR para la amplificación de Antp^{I32A-H36A}	46
Tabla III. Plásmidos utilizados en los ensayos de BiFC competitivo.....	55
TABLA IV. Líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> obtenidas mediante microinyección del plásmido pUASTattB-VCantp^{I32A-H36A}	59
TABLA V. Líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> obtenidas mediante microinyección del plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}	68
TABLA VI. Efecto de la expresión ectópica de Antp y la mutante en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2	71
TABLA VII. Cuantificación del nivel de transformación de la antena	75
TABLA VIII. Lista de oligonucleótidos diseñados	88
TABLA IX. Líneas de moscas transgénicas utilizadas en esta tesis	89

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

aa's	Aminoácidos
AbdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
Antp	Antennapedia
BiFC	Fluorescencia por Complementación Bimolecular
Bip2	Factor Asociado a TBP 155 (TAFII155)
Dll	Distalless
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
Dpp	Decapentaplegic
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
EXD	Extradenticle
FT	Factor de Transcripción
GTFs	Factores Generales de Transcripción
HD	Homeodominio
Hth	Homothorax
Kb	Kilobases
LB	Luria-Bertoni
µg	Microgramos
µl	Microlitros
MED	Complejo Mediador
Med19	Subunidad 19 del complejo Mediador
Mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nt	Nucleótidos
ng/µl	Nanogramos por microlitos
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de Pre-iniciación
Ptc	Patched
RLU	Unidades Relativas de Luminiscencia
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
Scr	Sex combs reduced
SFB	Suero fetal bovino

TBP	Proteína de Unión a Caja TATA
TaqPol	DNA polimerasa derivada de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TFIIA γ	Subunidad γ del Factor de Transcripción II A
TFIIB	Factor de Transcripción II B
TFIIE β	Subunidad β del Factor de Transcripción II E
T _m	Temperatura media de alineamiento
Ubx	Ultrabithorax
UV	Ultravioleta
U/ μ l	Unidades por microlitro
VC	Fragmento C-terminal de Venus
VN	Fragmento N-terminal de Venus
YPWM	Motivo Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina

RESUMEN

Las homeoproteínas constituyen una familia de factores de transcripción con un papel predominante para determinar el plan corporal de un embrión durante el desarrollo. Estas contienen el homeodominio (HD) de unión al DNA que aumenta su especificidad al interactuar con cofactores adicionales constituyendo el interactoma. En *Drosophila*, la primera liga de interacción funcional con un factor general de transcripción (GTF) se encontró entre Antennapedia (Antp) y BIP2 (complejo TFIID). Las proteínas Hox también interactúan con otros componentes de la maquinaria basal de la RNA Pol II, como la subunidad Med19 del complejo Mediador (MED), TFIIE β y el factor de pausa de la transcripción M1BP. Todas estas interacciones muestran claramente que en la regulación transcripcional dirigida por Hox están implicadas diversas proteínas, sin embargo, el mecanismo molecular preciso no es del todo claro. En esta tesis, nos centramos en la interfase proteína-proteína de Antp-TFIIE β para determinar los contactos específicos de interacción, así como su importancia funcional *in vivo*. La estrategia experimental consistió en analizar la interacción de las proteínas mediante el uso de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) *in vivo* en embriones y discos imaginales de *Drosophila*. Los resultados mostraron muy evidentemente que TFIIE β interactúa con Antp a través de la hélice 2 del HD, específicamente las posiciones de aminoácidos I32 y H36 de Antp. Para determinar que estas dos posiciones en la hélice 2 son cruciales para la función homeótica de Antp en la involución de la cabeza y las transformaciones torácica y antena-tarso, se realizaron ensayos de expresión ectópica. De manera interesante, la sobreexpresión de Antp y TFIIE β en el disco imaginal de antena mostró que esta interacción es indispensable para la transformación antena-tarso. También se determinó, mediante BiFC competitivo que los GTFs: TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , y las homeoproteínas EXD y AbdB afectaron la interacción dimérica Antp-TFIIE β sugiriendo la formación probable de complejos triméricos. Nuestros resultados muestran claramente que los aminoácidos 32 y 36 en la hélice 2 de Antp HD son necesarios para la interacción con TFIIE β y para la especificidad funcional de Antp, lo que abre la posibilidad para analizar su función en el control transcripcional de activación y/o represión de genes blanco en el interactoma Hox durante el desarrollo de *Drosophila*.

ABSTRACT

Homeoproteins contain the conserved homeodomain (HD) and have an important role determining embryo body plan during development. HDs increase their DNA-binding specificity by interacting with additional cofactors outlining a Hox interactome with a multiplicity of protein-protein interactions. In *Drosophila*, the first link of functional contact with a general transcription factor (GTF) was found between Antennapedia (Antp) and BIP2 (TFIID complex). Hox proteins also interact with other components of Pol II machinery such as the subunit Med19 from Mediator (MED) complex, TFIIE β and transcription-pausing factor M1BP. All these interactions clearly demonstrate Hox-driven transcriptional regulation, but the precise molecular mechanism remains unclear. In this thesis, we focused on the Antp-TFIIE β protein-protein interface to establish the specific contacts as well as its functional role *in vivo*. Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) *in vivo* we found that TFIIE β interacts with Antp through the HD independently of the YPWM motif and the direct physical interaction is at helix 2, specifically aminoacidic positions I32 and H36 of Antp. We also found, through ectopic assays, that these two positions in helix 2 are crucial for Antp homeotic function in head involution, and thoracic and antenna-to tarsus transformations. Interestingly, overexpression of Antp and TFIIE β in the antennal disc showed that this interaction is required for the antenna-to-tarsus transformation. We also determined by competitive BiFC in cell culture that the GTFs: TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , as well as homeoproteins EXD and AbdB interfere with the Antp-TFIIE β dimeric interaction, suggesting the probable formation of trimeric complexes. In conclusion, interaction of Antp with TFIIE β is important for the functional specificity of Antp, and amino acids 32 and 36 in Antp HD helix 2 are key for this interaction. Our results open the possibility to more broadly analyze Antp-TFIIE β interaction on the transcriptional control for the activation and/or repression of target genes in the Hox interactome during *Drosophila* development.

1. INTRODUCCIÓN

En *Drosophila*, las homeoproteínas constituyen una familia de factores de transcripción (FTs) responsables de especificar la identidad corporal a lo largo del eje anteroposterior de un embrión en desarrollo, juegan con un papel fundamental en la morfogénesis y evolución de los metazoarios (Lewis *et al.*, 1984; Gehring, 1987; Mann y Morata, 2000), controlan funciones celulares diversas como migración, morfología celular, proliferación, apoptosis y diferenciación (Cerdá-Esteban y Spagnoli, 2014; Taniguchi, 2014). Estas proteínas contienen el homeodominio (HD), un motivo de unión a DNA de 60 aminoácidos mediante el cual especifican identidad tisular regulando la expresión de genes blanco (Gehring *et al.*, 1995). Los HDs son motivos altamente conservados que reconocen secuencias nucleotídicas muy similares y que se repiten con mucha frecuencia en el genoma, planteando la interrogante de cómo proteínas tan similares son capaces de especificar de manera precisa identidades corporales diversas. Entre los modelos propuestos para explicar esta especificidad funcional se encuentra la interacción de éstas con proteínas de distintas clases, se ha demostrado que son capaces de interactuar con otros factores de regulación transcripcional como cofactores Hox o factores generales de transcripción (GTFs), e incluso con RNAs no codificantes, proteínas de matriz celular y complejos remodeladores de cromatina (Bobbola *et al.*, 2017), estableciendo redes de interacción Hox a través de una amplia variedad de interacciones proteína-proteína.

La homeoproteína Antennapedia (Antp) se expresa en el núcleo de células de la epidermis torácica del embrión y de varios segmentos del sistema nervioso central y periférico, su función es requerida en todos los segmentos torácicos para suprimir por una parte el desarrollo de la cabeza y por otra promover el desarrollo de los apéndices torácicos (Struhl, 1981; Cásares y Mann, 1998). Antp interactúa a través del dominio peptídico altamente conservado, YPWM, con cofactores como EXD y factores generales de transcripción (GTFs) como BIP2 (TFIID), siendo ésta la primera liga de una homeoproteína con la maquinaria basal (Prince *et al.*, 2008). Posteriormente se demostró que, además de Antp, otras homeoproteínas interactúan con la maquinaria basal a través

la subunidad Med19 del complejo Mediador (MED) (Boube *et al.*, 2014). Se sabe también que TFIIE β interactúa con Antp, Sex combs reduced (Scr), Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (AbdA) y Abdominal B (AbdB) *in vivo* en *Drosophila* (Hudry *et al.*, 2011; Baeza *et al.*, 2015), y en nuestro laboratorio se determinó que la hélice II del HD de Antp a través de las posiciones 32 y 36 está directamente implicada en la interacción con TFIIE β (Cárdenas-Chávez 2012; Altamirano-Torres 2014) en cultivo celular. En esta tesis se muestra evidencia de la importancia de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD de Antp en la interacción molecular proteína-proteína con TFIIE β en un contexto *in vivo* en *Drosophila*, así mismo, se determinó que la interacción Antp-TFIIE β es necesaria para la función ectópica de Antp en las transformaciones torácicas y antena-tarso. Adicionalmente, encontramos que TBP, Bip2, TFIIB, TFIIA γ , EXD y AbdB afectan la interacción proteína-proteína entre Antp y TFIIE β en cultivo celular postulándolos como probables colaboradores triméricos de Antp-TFIIE β . Estos resultados proveen evidencia valiosa que contribuye con el esclarecimiento de los mecanismos para establecer la especificidad funcional de Antp y dada la alta conservación del HD, esta información puede ser extrapolada a otras homeoproteínas en la regulación de los procesos finos del desarrollo en *D. melanogaster*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Genes homeóticos

El mecanismo mediante el cual un organismo multicelular se desarrolla a partir de un simple huevo fertilizado presenta un complejo y fascinante proceso de eventos precisos de regulación génica en espacio y tiempo que culminan con la integración armónica de estructuras y órganos en un organismo completo. La clave para la identificación del control genético del desarrollo para la especificación del plan del cuerpo, la dieron algunas mutaciones que ocurren espontáneamente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, y que causan el cambio de identidad de segmentos corporales completos acuñando el término "homeosis" para definir la mutación por la que un segmento del cuerpo adquiere la identidad de otro segmento (Bateson, 1894). El análisis de estas mutaciones llevó al descubrimiento y caracterización molecular de los genes homeóticos (García, 1977). Estos genes codifican factores de transcripción que presentan una secuencia altamente conservada denominada homeobox de 180 pb que codifica para un polipéptido de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD) mediante el cual son capaces de interactuar con el DNA y regular la expresión de genes blanco durante el desarrollo embrionario (Gehring, 1987; McGinnis *et al.*, 1984; Scott y Weiner, 1984; Gehring *et al.*, 1994).

En *Drosophila*, los genes homeóticos están organizados en dos complejos localizados en el tercer cromosoma separados por aproximadamente 8 millones de bases: el Complejo Antennapedia (ANT-C) contiene los genes *labial (lb)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* y *Antennapedia (Antp)*, mientras que en el Complejo Bithórax (BX-C) se encuentran los genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abdA)* y *Abdominal-B (AbdB)* (Fig. 1). En el adulto, los genes del complejo ANT-C especifican las características morfológicas de la cabeza y los segmentos torácicos T1 a T3, mientras que los genes del complejo BX-C determinan la identidad morfológica de los segmentos abdominales A1 a A8 (Fig. 1B) (Gilbert y Barresi, 2016).

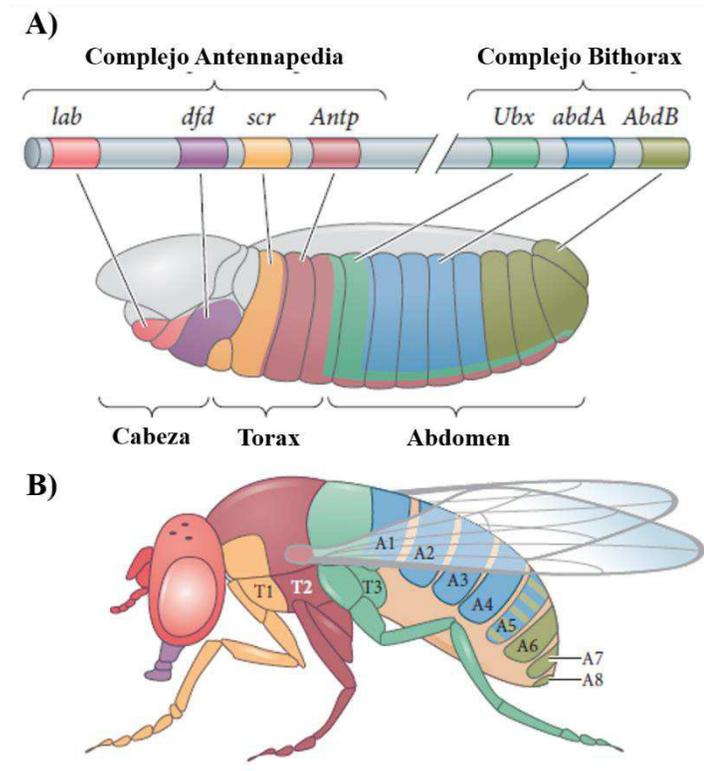


Figura 1. Esquema de expresión de los complejos Hox. En la imagen se esquematiza el mapa de expresión de los genes homeóticos en el embrión y adulto de *Drosophila melanogaster*. **A)** Ubicación de los genes de los complejos Antennapedia (ANT-C) y Bithorax (BX-C) en el cromosoma, existe colinealidad de la expresión de los genes Hox con los segmentos embrionarios a lo largo del eje anteroposterior de *Drosophila*. **B)** Regiones corporales de la mosca adulta originadas de la expresión tejido-específica de los genes Hox.

Modificado de Gilbert y Barresi 2016.

La expresión de los genes homeóticos está regulada a su vez por la acción temprana de genes maternos y de segmentación que delimitan sus efectos en dominios espaciales específicos a lo largo del eje anteroposterior durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* (Ingham y Martinez-Arias, 1986; Harding y Levine, 1988; Irish *et al.*, 1989). Posteriormente, el patrón inicial de expresión de los genes homeóticos es modulado y refinado por interacciones regulatorias cruzadas entre los mismos genes que conforman los complejos ANT-C y BX-C (Hafen *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1985). La expresión espacial correcta de los complejos homeóticos es además dependiente de una clase de genes denominados grupos Polycomb (Pc-G) y Trithorax (Trx-G) que actúan modulando la estructura de la cromatina reprimiendo o activando respectivamente (Schuettengruber *et al.*, 2007).

Se ha identificado a los genes Hox en distintos grupos de organismos además de *Drosophila*, confirmando su alta conservación evolutiva, en organismos de mayor complejidad existe una mayor cantidad de parálogos derivados de duplicaciones a lo largo de la historia evolutiva (Fig. 2). Destaca su función en el desarrollo embrionario de distintas especies de vertebrados como peces y distintos mamíferos incluido el humano e invertebrados como insectos e incluso microorganismos eucariotas como levaduras (Heffer y Pick, 2013). Se han comparado los genes homeóticos de mamíferos con los dos complejos homeóticos de *Drosophila*, y se encontró que, las secuencias nucleotídicas, las proteínas codificantes, la organización génica y los patrones de expresión son similares en ambos grupos sugiriendo que estos complejos surgieron en un organismo ancestral común antes de la divergencia evolutiva entre insectos y vertebrados (Akam, 1989; Hayashi y Scott, 1990; Patel y Prince, 2000).

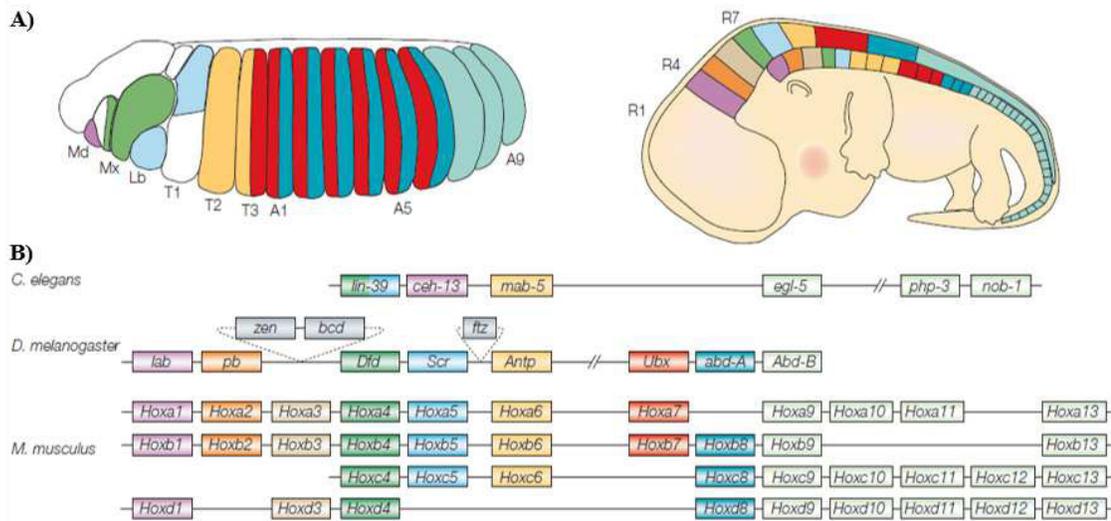


Figura 2. Conservación evolutiva y organización genómica de los genes homeóticos. A) A la izquierda se muestra un embrión de *Drosophila* estadio 13 con las regiones de expresión de los genes Hox en los diferentes segmentos corporales (Mb, mandibular; Mx, maxilar; Lb, labial; T1-T3, segmentos torácicos; A1-A9, segmentos abdominales). A la derecha se muestra el esquema de un embrión de ratón (*Mus musculus*) en estadio 12.5, con los dominios de expresión Hox a lo largo del eje craneocaudal. (R1, R4 y R7, rombómeras cráneo-posteriores). En ambos esquemas los colores corresponden con los genes Hox esquematizados en B). B) Esquemización de los grupos de genes Hox en el genoma del nemátodo *Centorhabditis elegans*, *D. melanogaster* y *M. musculus*. En vertebrados existe una mayor cantidad de genes parálogos. Los genes ortólogos entre grupos y especies están marcados con el mismo color.

Modificado de McGinnis *et al.*, 2005.

2.2 Antennapedia

En *Drosophila*, el gen homeótico *Antp* codifica la proteína Antennapedia (Antp) que consiste en tres regiones; una región (N-terminal) de 295 aminoácidos (aa's), seguida de la porción llamada repetición CAX de 130 aa's rica en glutamina, el homeodominio de 60 aa's y 23 aa's que conforman el extremo C-terminal (Fig. 3). La proteína Antp se expresa en el núcleo de células de la epidermis torácica del embrión y de células de varios segmentos del sistema nervioso central y periférico (Carrol *et al.*, 1986), actúa principalmente sobre los segmentos mesotorácicos, es decir, las regiones de los tres pares de patas y regiones específicas del mesotórax dorsal embrionarios (Fig. 1A), le confiere identidad al 2do par de patas en el torax del adulto (Fig. 1B).

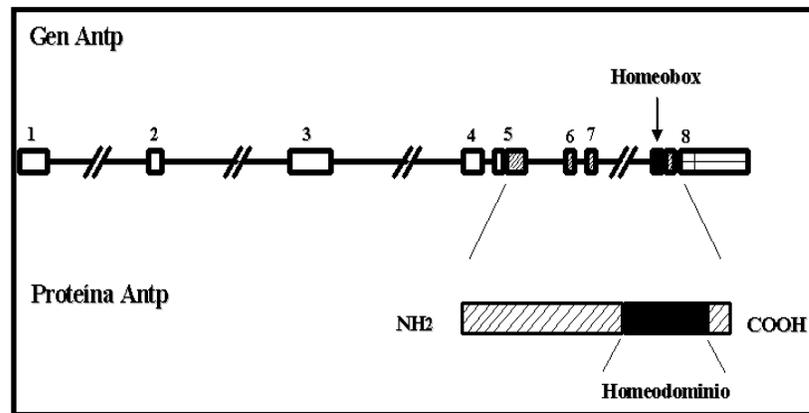


Figura 3. Estructura génica de Antennapedia. Diagrama esquemático que muestra la organización estructural del gen *Antp*, los exones del 1 al 8 están separados por siete intrones. El homeobox está localizado en el exón 8, por lo que el HD se localiza cerca del extremo carboxilo terminal (COOH) de la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

La función de Antp ha sido revelada por mutaciones de ganancia y pérdida de función (Schnevly y Gehring, 1985; Martinez-Arias, 1986); la falta de función de Antp resulta en letalidad embrionaria y muerte larvaria, así como en la transformación de los segmentos torácicos T2 y T3 en estructuras más anteriores con algunas características de T1 y de segmentos de la cabeza, por otro lado, mutantes homeóticas de ganancia de función muestran que Antp ocasiona la transformación de antenas por patas cuando se expresa en la antena, un lugar donde normalmente no se encuentra (Pattatucci y Kaufman, 1991). Los niveles más altos de expresión de *Antp* ocurren en la región ventral del 2do segmento

torácico, donde inicia la cascada de eventos para suprimir el desarrollo de la cabeza en esta región y promover el desarrollo de los apéndices torácicos (Struhl, 1981; Carroll *et al.*, 1986). Por lo tanto, en *D. melanogaster*, las antenas y las patas, que son estructuras homólogas, se forman diferencialmente como resultado de la ausencia o presencia de Antp respectivamente. Antp promueve la identidad de pata mediante la represión de genes determinantes de la antena. Durante el desarrollo larvario en los discos imaginales de pata, Antp previene el desarrollo de la antena reprimiendo directamente genes determinantes de antena como *homothorax (Hth)* y *distalles (Dll)*, esto es regresando la ruta del desarrollo de apéndices al estado basal (Cásares y Mann, 1998; Emerald *et al.*, 2003). Antp también es requerida en la formación del intestino medio (Reuter y Scout, 1990) así como en el desarrollo apropiado del sistema nervioso periférico de *Drosophila* (Heuer y Kaufman, 1992).

2.2.1 Especificidad funcional del homeodominio

El análisis de los homeodominios de distintas proteínas mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución y Cristalografía de Rayos X confirmaron la estructura tridimensional, constan de tres α -hélices bien definidas y un brazo N-terminal flexible que no asume una estructura definida en solución es decir presenta una alta flexibilidad (Gehring *et al.*, 1990; Gehring *et al.*, 1995). El análisis de los complejos Antp-DNA mostró que los contactos principales se localizan en la hélice 3 que se une al surco mayor del DNA mediante los residuos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54 y el extremo N-terminal de la hélice 1 se une al surco menor mediante la Arg5 (Fig. 4) (Otting *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1992; Mann *et al.*, 2009). La mayoría de estos ensayos de unión al DNA usaron las secuencias “TAAT” en la hebra líder y “ATTA” en la hebra complementaria como sitios de unión al HD (Kalions y O’Farrell, 1993).

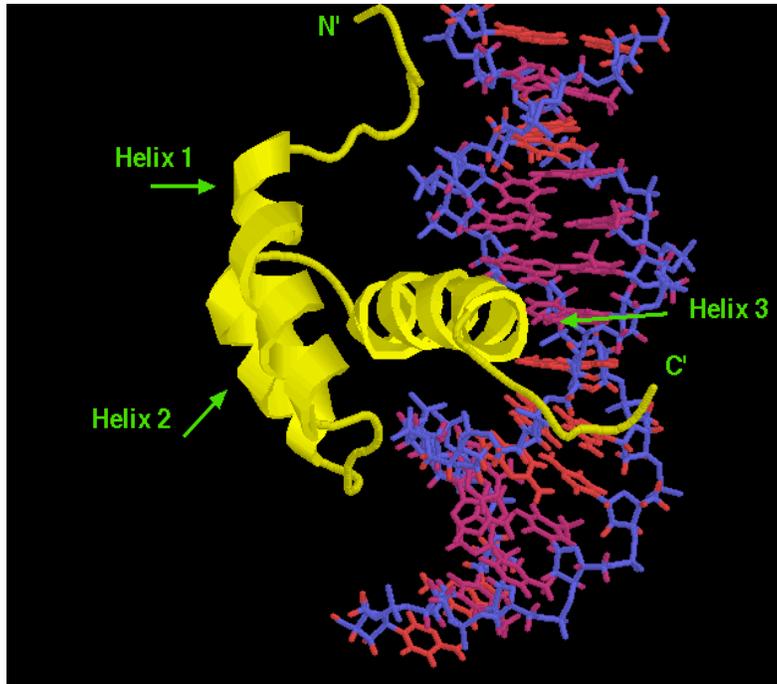


Figura 4. Interacción del homeodominio de Antp con el DNA. Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3 con el surco mayor del DNA y el extremo N-terminal de la hélice 1 con el surco menor.

Tomado de Qian *et al.*, 1992.

La delección del brazo N-terminal del HD de Antp mostró que, aunque la estructura del HD permanece intacta, su afinidad de unión al DNA disminuyó, lo anterior indica que el contacto con el DNA desde el extremo N-terminal de Antp es indispensables para su interacción con el DNA (Qian *et al.*, 1994). Experimentos genéticos realizados *in vivo* en *Drosophila* mostraron que la sustitución recíproca de cuatro residuos del extremo N-terminal entre Antp y Scr, modificaron la especificidad funcional de Antp por la de Scr y viceversa (Furukubu-Tokunaga *et al.*, 1993). Lo anterior demuestra la importancia funcional de estos residuos y sugieren fuertemente que el extremo N-terminal de los HDs está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de los mismos.

2.2.2 Tetrapéptido YPWM

Comparaciones en la secuencia de aminoácidos de las diferentes homeoproteínas mostraron que además del HD, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina) es otra región peptídica altamente conservada entre estas proteínas. Este motivo se encuentra localizado río arriba del brazo N-terminal flexible del HD y el número de aminoácidos que separan al tetrapéptido YPWM de la región N-terminal es variable en las distintas homeoproteínas (Fig. 5).

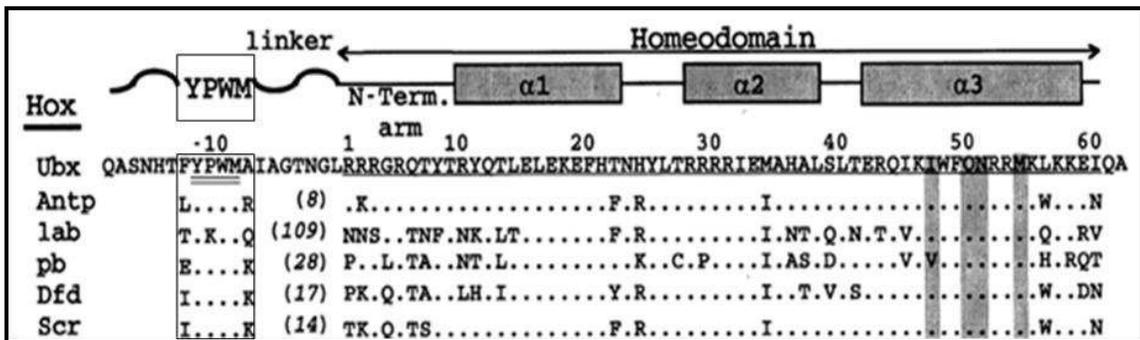


Figura 5. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en *Drosophila*. Los residuos aminoacídicos del HD se numeran del 1 al 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aminoácidos entre el motivo YPWM y el HD se muestra en paréntesis para cada homeoproteína.

Tomado de Passner *et al.*, 1999.

El análisis mutacional mediante sustituciones de alanina en el tetrapéptido YPWM y sus regiones flanqueantes permitió analizar el papel funcional de esta región altamente conservada en embriones de *D. melanogaster*. Cuando Antp silvestre se expresa ectópicamente en la región cefálica de embriones en desarrollo ocasiona pérdida de la involución de la cabeza y la transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2), y su expresión en la antena la transforma en una pata. Papadopoulos y colaboradores en 2011 demostraron que la mutación del motivo YPWM de Antp eliminó su capacidad de transformación homeótica ya que observaron fenotipos larvarios y antenales normales cuando sobreexpresaron la mutante en la región cefálica de *Drosophila*, confirmando que el motivo YPWM es necesario e indispensable para la actividad funcional *in vivo* de Antp (Papadopoulos *et al.*, 2011).

2.2.3 Regulación génica

La regulación de la expresión de *Antp* ocurre a nivel de sus promotores, el transcrito del promotor P1 es necesario para el desarrollo del tórax dorsal, mientras que el transcrito de P2 es requerido para el desarrollo del tórax ventral y viabilidad embrionaria (Bermingham *et al.*, 1990), ambos promotores presentan sitios de unión para complejos de silenciamiento Polycomb (Zink *et al.*, 1991). La transcripción del promotor P1 es además activada por la proteína de dedos de zinc Kruppel (Kr) y reprimida por las homeoproteínas Ubx y AbdA, mientras que la proteína producida por el promotor P2 es activada por las proteínas Hunchback (hb) y fushi tarazu (ftz) e inhibida por la proteína Oskar (Boulet y Scott, 1988; Irish *et al.*, 1989). La represión de *Antp* por Ubx y AbdA es conocida como supresión fenotípica o prevalencia posterior, en la cual los genes homeóticos posteriores reprimen la expresión de los genes anteriores. *Antp* también es regulada negativamente por Dll, spineless (ss) y dachshund (dac) en discos imaginales para el correcto desarrollo de los elementos distales de la pata (Emerald *et al.*, 2003).

2.3 Interacciones moleculares proteína-proteína

En un modelo descriptivo simple sobre la función de las homeoproteínas, cada una interactúa con una secuencia específica reguladora a través del HD para controlar la transcripción de genes blanco. Sin embargo, las homeoproteínas tienen como blanco diferentes genes en diferentes tejidos y pueden incluso activar un gen en un contexto y reprimir ese mismo gen en un contexto diferente (Bondos y Tan, 2002; Hughes y Kaufman, 2002; Grienberger *et al.*, 2003). Además, la misma proteína homeótica puede utilizar diferentes aminoácidos para unirse a distintos sitios en el DNA (Remacle *et al.*, 2002). En consecuencia, la unión al DNA de una homeoproteína aislada no provee la especificidad necesaria para la regulación génica contexto-específica *in vivo*; “paradoja Hox”. Una posible respuesta al mecanismo de especificidad funcional radica en las interacciones proteína-proteína con cofactores, en este sentido se ha comprobado que las homeoproteínas Scr, *Antp*, Ubx y AbdA (Chan *et al.*, 1994) incrementan su afinidad y especificidad cuando se unen al DNA cooperativamente con Extradenticle (EXD),

perteneciente a la subclase PBC de 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 HD (Burglin, 1997; Moens y Selleri, 2006). La interacción con EXD ocurre mediante el motivo YPWM y altera la selección de sitios de unión en el DNA confiriendo especificidad, y en casos específicos, puede cambiar el modo de transcripción (Pinsonneault *et al.*, 1997; Passner *et al.*, 1999; Mann y Morata, 2000). EXD contribuye con la especificidad funcional actuando como cofactor de las proteínas homeóticas, mutaciones en *exd* alteran la identidad de algunos segmentos corporales sin alterar el patrón de expresión de los genes homeóticos (Rauskolb *et al.*, 1993).

Estos datos sugieren la existencia de un modelo más complejo en el cual participan cofactores que contribuyen con la especificidad funcional de cada homeoproteína (Hayashi y Scott, 1990). Esta hipótesis se ha visto respaldada por reportes de interacción proteína-proteína entre homeoproteínas y proteínas de diversas clases, se sabe que son capaces de interactuar con otros factores de regulación transcripcional como cofactores Hox o GTFs, incluso se ha descrito la interacción de homeoproteínas con moléculas como RNAs no codificantes, proteínas de matriz extracelular y complejos remodeladores de cromatina, entre otras (Bobbola *et al.*, 2017).

Las homeoproteínas Dfd, Antp, AbdA y Ubx interactúan *in vivo* en embriones de *Drosophila* con Med19, una subunidad del Complejo Mediador de la transcripción junto con la maquinaria basal, y en estas interacciones participa el HD (Boube *et al.*, 2014). Baeza y colaboradores en el 2015 describieron la interacción de Scr, Antp, Ubx, AbdA y AbdB con 35 factores de transcripción, por ejemplo, encontraron que Antp presenta interacción con 18 de ellos (Doc2, Apt, Su(H), Mam, Twi, Mad, Mef2, Slou, Dll, Eve, Svp, Srp, Sal, Tsh, Kr, Pnt, TFIIE β y Bin), y analizaron el papel de YPWM en dichas interacciones. Observaron que la versión de Antp con el motivo YPWM mutado (Antp^{HX}) mostró un patrón diferente de interacción; mientras que algunas interacciones se mantuvieron (Su(H), Mam, Slou, Srp, Tsh y Pnt), otras disminuyeron o se perdieron (Doc2, Apt, Twi, Mad, Dll, Eve, Salm, Kr, TFIIE β y Bin), y se observaron nuevas interacciones (Mid, Kn, Nau, Bap, Lbe y Pnr) (Baeza *et al.*, 2015). Recientemente se

describió la interacción de Ubx y AbdA con M1BP, un factor de pausa de la RNA Pol II en las cercanías de promotores enriquecidos con proteínas Polycomb remodeladoras de cromatina (Zouaz *et al.*, 2017). Estos reportes ponen en evidencia la existencia de redes de interacción Hox o “Interactómas Hox” que incluyen una amplia variedad de interacciones proteína-proteína que podrían contribuir con las actividades funcionales y la especificidad de las homeoproteínas en los distintos contextos del desarrollo embrionario.

2.4 Interacciones de Antp con la Maquinaria Basal de Transcripción

La transcripción de genes codificantes de proteínas en eucariotas es un proceso complejo que requiere a la RNA polimerasa II (Pol II) y seis factores generales de transcripción (GTFs), denominados TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, que reconocen los elementos basales de un promotor (Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). Los GTFs cooperan con la RNA Pol II para unirse a un promotor abierto e iniciar la síntesis de RNAm, son proteínas muy conservadas evolutivamente, se unen secuencialmente alrededor del punto de inicio de la transcripción para constituir el Complejo de Pre-iniciación (PIC), éste incluye el promotor basal, los GTFs y la RNA Pol II (Buratowski, 1994; Zawel y Reinberg, 1993). La unión al promotor de TFIID junto con TBP, TFIIA, y TFIIB constituye el primer paso en el proceso de ensamblaje y es seguido del reclutamiento de TFIIF y la RNA Pol II, mientras que TFIIE y TFIIH entran en el complejo de iniciación al final para permitir la fosforilación del dominio carboxy-terminal (CTD) de la RNA Pol II y desenrollar el DNA e iniciar de la transcripción (Fig. 6) (Sainsbury *et al.*, 2015).

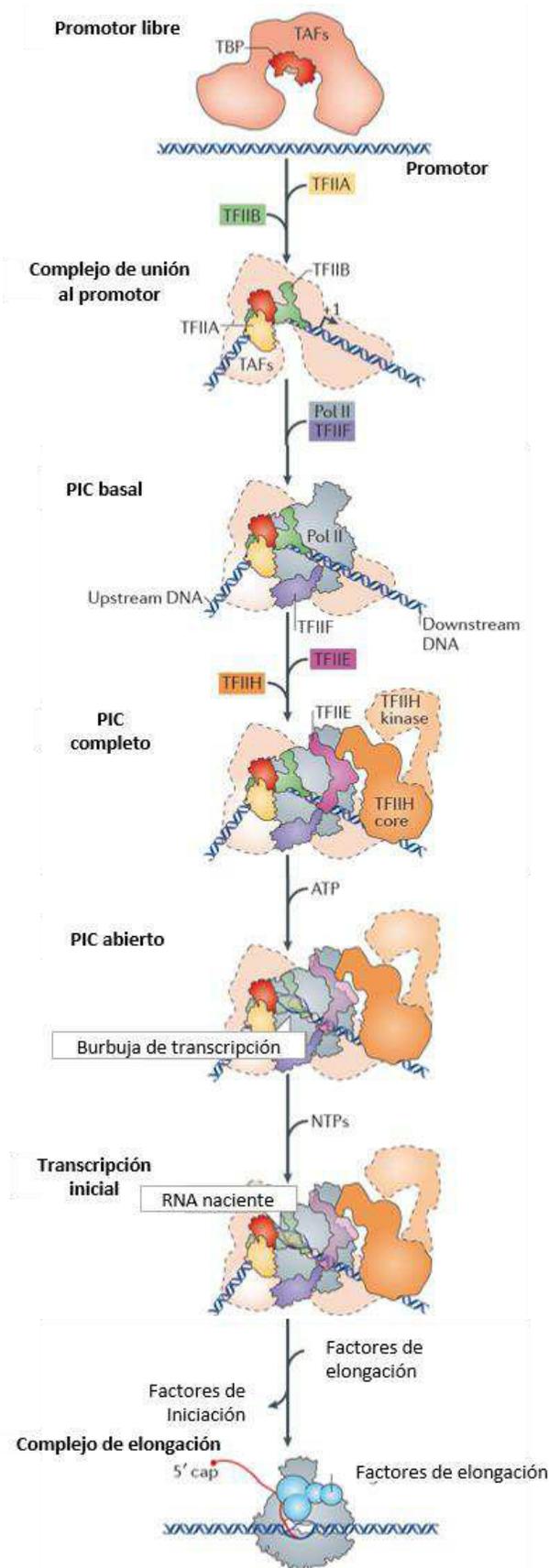


Figura 6. Ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción de la RNA Pol II. Modelo canónico del ensamblaje de los factores generales de transcripción (varios colores) y la RNA Pol II (gris) para formar el complejo de pre-iniciación (PIC). Al inicio, TFIID o su subunidad TBP se unen al DNA en el promotor induciendo una curvatura. El complejo TBP-DNA es estabilizado por TFIIB y TFIIA, que se ubican a ambos lados de TBP. Subsecuentemente se une la RNA Pol II asociada con TFIIF para conformar el PIC basal. Posteriormente, la unión de TFIIE y TFIIH completan el PIC. En presencia de ATP, el DNA es desenrollado y las hebras separadas (“burbuja de transcripción”), comienza entonces la síntesis de RNA. Finalmente, la disociación de los GTFs permite la transición hacia el complejo de elongación, que se asocia con factores de elongación transcripcionales (azul). NTPs, nucleósidos trifosfato; TAF, factores asociados a TBP.

Modificado de Sainsbury *et al.*, 2015.

2.4.1 Antp-BIP2

BIP2 fue inicialmente identificada como una proteína de interacción Bric-a-brac 2, es un factor proteico asociado a TBP (TAF) (Albright y Tijan, 2000), también referida como dTAFII3 o TAFII155 (Gangloff *et al.*, 2001). BIP2 es miembro del complejo TFIID para el inicio de la transcripción en *Drosophila*. En 2008, mediante ensayos de doble híbrido, Prince y colaboradores determinaron que BIP2 interactúa con Antp a través del motivo YPWM *in vivo*, y mediante experimentos de ganancia y pérdida de función demostraron que BIP2 actúa como un cofactor con Antp para promover el desarrollo ectópico dorsal de alas. Éste reporte representa la primera liga de una homeoproteína con la maquinaria basal de transcripción (TFIID) *in vivo* en *Drosophila*.

2.4.2 Antp-TBP

La proteína de unión a caja TATA (TBP) forma parte del complejo TFIID de reconocimiento del promotor, contribuye en el posicionamiento de la RNA Pol II en el sitio de inicio de la transcripción (Kim *et al.*, 1993a; Kim *et al.*, 1993b). Se ha demostrado mediante ensayos de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC) en cultivo celular que TBP interactúa con Antp a través de la región amino terminal rica en glutaminas de ésta homeoproteína (Cárdenas-Chávez 2012). Se ha determinado que en esta interacción existe una relación entre la cantidad de glutaminas de Antp y el nivel de interacción Antp-TBP y que la región de glutaminas de TBP también está involucrada en la interacción. Sin embargo, la ausencia de glutaminas en ambas proteínas no elimina por completo la interacción, indicando que en ella podrían estar involucrados otros dominios en Antp o incluso otros factores (Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016).

2.4.3 Antp-TFIIIE β

TFIIIE β forma parte del heterotetrámero TFIIIE junto con TFIIIE α , y contribuye con el reclutamiento y activación de las actividades helicasa y cinasa de TFIIF en el PIC (Ohkuma *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). El primer reporte de la interacción de Antp con TFIIIE β proviene de ensayos *in vitro* mediante pull-down, en los que se encontró que tanto el HD de Antp y AbdB interactúan con este GTF (Zhu y Kuziora, 1996). Ulteriormente, mediante ensayos de BiFC se confirmó la interacción Antp-TFIIIE β en

cultivo celular e *in vivo* en embriones de *Drosophila* (Cárdenas-Chavez, 2012; Baeza *et al.*, 2015) y se sabe que TFIIIE β también interactúa con otras homeoproteínas como Scr, AbdA y Ubx (Hudry *et al.*, 2011; Baeza *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio se caracterizó la interacción molecular Antp-TFIIIE β mediante BiFC en cultivo celular, la mutagénesis deletional de Antp mostró que la interacción con TFIIIE β depende del HD y es independiente del motivo YPWM. Así mismo, la subsecuente disección molecular del HD, en la que se deletó la hélice 1 (Antp Δ H1) y las hélices 1 y 2 (Antp Δ H1-2), se observó que la mutante Antp Δ H1 mantuvo la interacción con TFIIIE β , no así Antp Δ H1-2, confirmando que la hélice 2 está directamente implicada en esta interacción molecular (Fig. 7B) (Cárdenas-Chávez 2012). En el posterior análisis de la hélice 2 del HD se realizó la mutagénesis sitio-dirigida para sustituir los residuos I32 y H36 por alaninas o aa's estructuralmente similares (I32L, H36R), los ensayos BiFC mostraron que estos residuos están directamente involucrados en su interacción con TFIIIE β ya que el porcentaje de interacción se redujo hasta un 11%, tal como se muestra en la Figura 7D (Altamirano-Torres 2014).

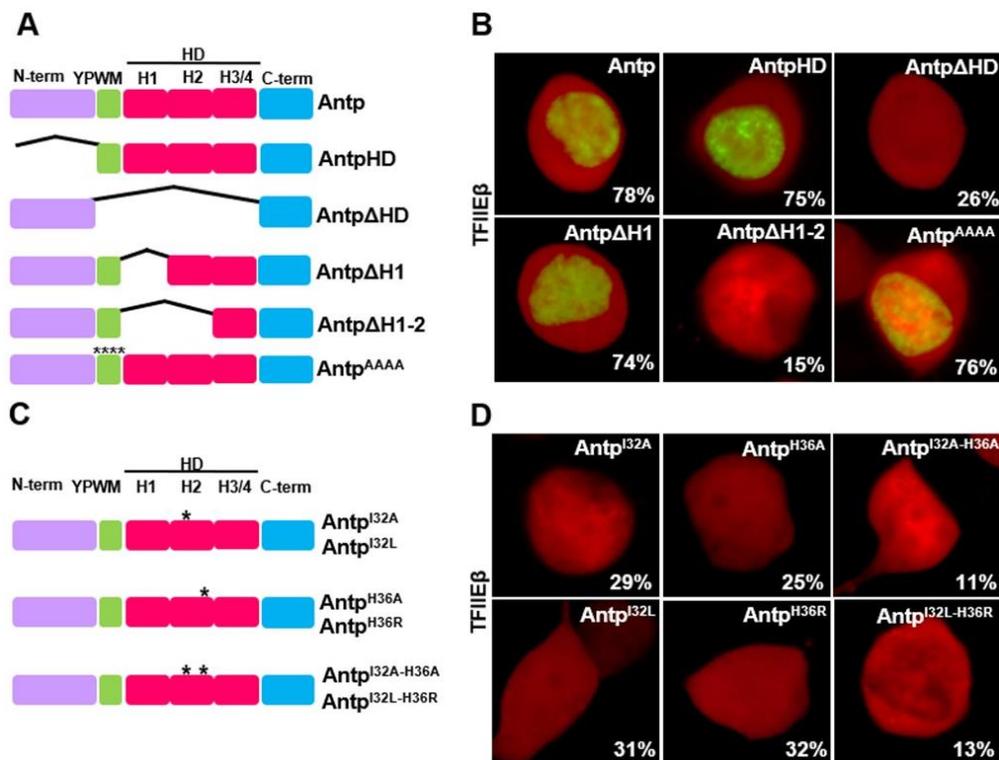


Figura 7. Interacción proteína-proteína de TFIIIE β con el HD de Antp en cultivo celular. A) Representación esquemática de Antp y las mutantes deletionales del HD, así como la sustitución de YPWM por alaninas. B) Los ensayos de interacción BiFC en cultivo celular muestran la interacción Antp-TFIIIE β (fluorescencia amarilla/reconstitución de Venus) y la pérdida de esta (15%) en ausencia de la hélice 2 del

HD. C) Representación esquemática de la mutagénesis sitio-dirigida individual (*) o doble (**) de los residuos 32 y 36 de la hélice 2. D) Los ensayos BiFC mostraron una drástica reducción de la interacción entre TFIIIE β y las mutantes de Antp, indicando que la interacción depende de estos dos residuos. Se co-transfectó el plásmido pCAG-Cherry (fluorescencia roja) como control positivo de la transfección.

Modificada de Cárdenas-Chávez 2012 y Altamirano-Torres, 2014.

Como se muestra en el alineamiento de HDs de la Figura 8, los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD están conservados en Antp y otras homeoproteínas, además se encuentran localizados en la superficie expuesta de la hélice 2 (Fig 8, panel inferior) lo que permite su disponibilidad para interactuar con otras proteínas como TFIIIE β en este caso.

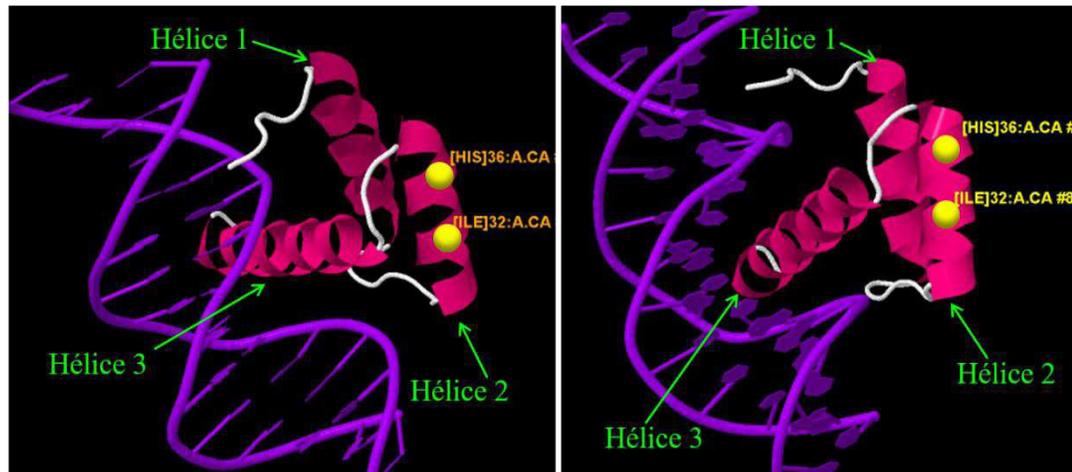
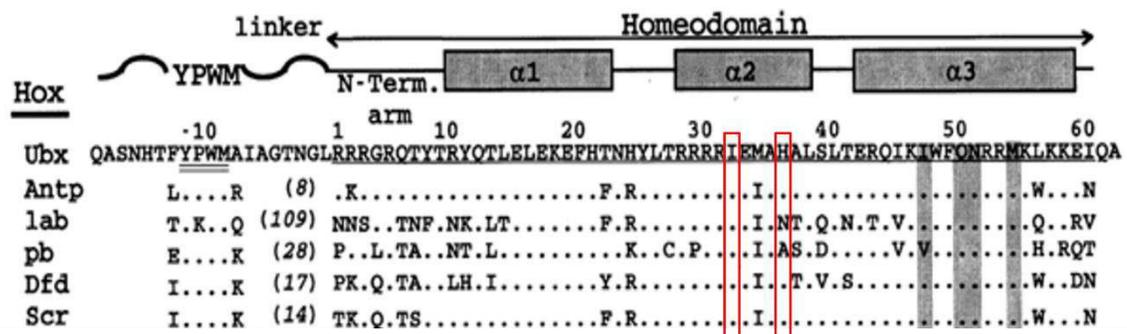


Figura 8. Posición de los residuos 32 y 36 en la hélice 2 del HD. El panel superior muestra las secuencias aminoacídicas de los HDs de Antp y otras homeoproteínas, los recuadros en rojo señalan las posiciones I32 y H36 de la hélice II implicadas en la unión proteína-proteína Antp-TFIIIE β . El panel inferior muestra un modelo tridimensional del HD (rosa) y la unión al DNA (violeta) mediante la hélice de reconocimiento 3, se muestran además las posiciones de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 ubicadas en la superficie expuesta de la hélice 2.

Los antecedentes presentados muestran claramente la existencia de una interacción entre las homeoproteínas y la maquinaria basal de transcripción, y ya que la regulación del ensamblaje del PIC es un proceso clave para el control de la expresión génica, el objetivo

de esta tesis fue confirmar la importancia de estos residuos en un contexto *in vivo*, así como determinar el papel funcional que tiene esta interacción en las actividades ectópicas de Antp en el tórax y en la transformación antena-tarso en *Drosophila*. Nuestros resultados contribuyen con la definición del mecanismo de acción de las homeoproteínas para regular genes blanco de manera específica durante del desarrollo embrionario de *Drosophila*.

3. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las homeoproteínas juegan un papel crucial como reguladores transcripcionales en los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. El descubrimiento de numerosos y diversos factores capaces de interactuar con las homeoproteínas pone en evidencia la importancia de las interacciones proteína-proteína en la actividad funcional de las homeoproteínas. De particular relevancia es la liga entre homeoproteínas y la maquinaria basal de transcripción ya que el ensamble de ésta en el promotor para el inicio de la transcripción es uno de los puntos clave de regulación de la expresión génica, por lo tanto, determinar la actividad funcional de la interacción molecular de TFIIE β con Antp arroja luz sobre los mecanismos finos de regulación y selección de genes blanco de Antp para dirigir los diversos procesos de la morfogénesis embrionaria en *Drosophila*. Además, esta información puede ser extrapolada a otras homeoproteínas e incluso a otros grupos de organismos dada la alta conservación de los HDs desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo el humano.

4. HIPÓTESIS

La interacción del factor general de transcripción TFIIE β con Antp depende de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD *in vivo* y es necesaria para la actividad funcional de Antp en el control genético del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la actividad funcional de la interacción de la hélice 2 del HD de Antp con el factor general de transcripción TFIIE β *in vivo* en *D. melanogaster* mediante expresión ectópica, así como el efecto de otros factores en la interacción Antp-TFIIE β en cultivo celular.

5.2 Objetivos Particulares

1. Analizar la interacción de la mutante en la hélice 2 del HD de Antp con TFIIE β mediante BiFC *in vivo* en embriones y discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar la actividad funcional de la mutante doble de la hélice 2 del HD de Antp mediante expresión ectópica *in vivo* en *Drosophila melanogaster*.
3. Determinar el efecto de otros factores transcripcionales en la interacción Antp-TFIIE β mediante análisis de BiFC por competencia en cultivo celular.

ESTRATEGIA GENERAL

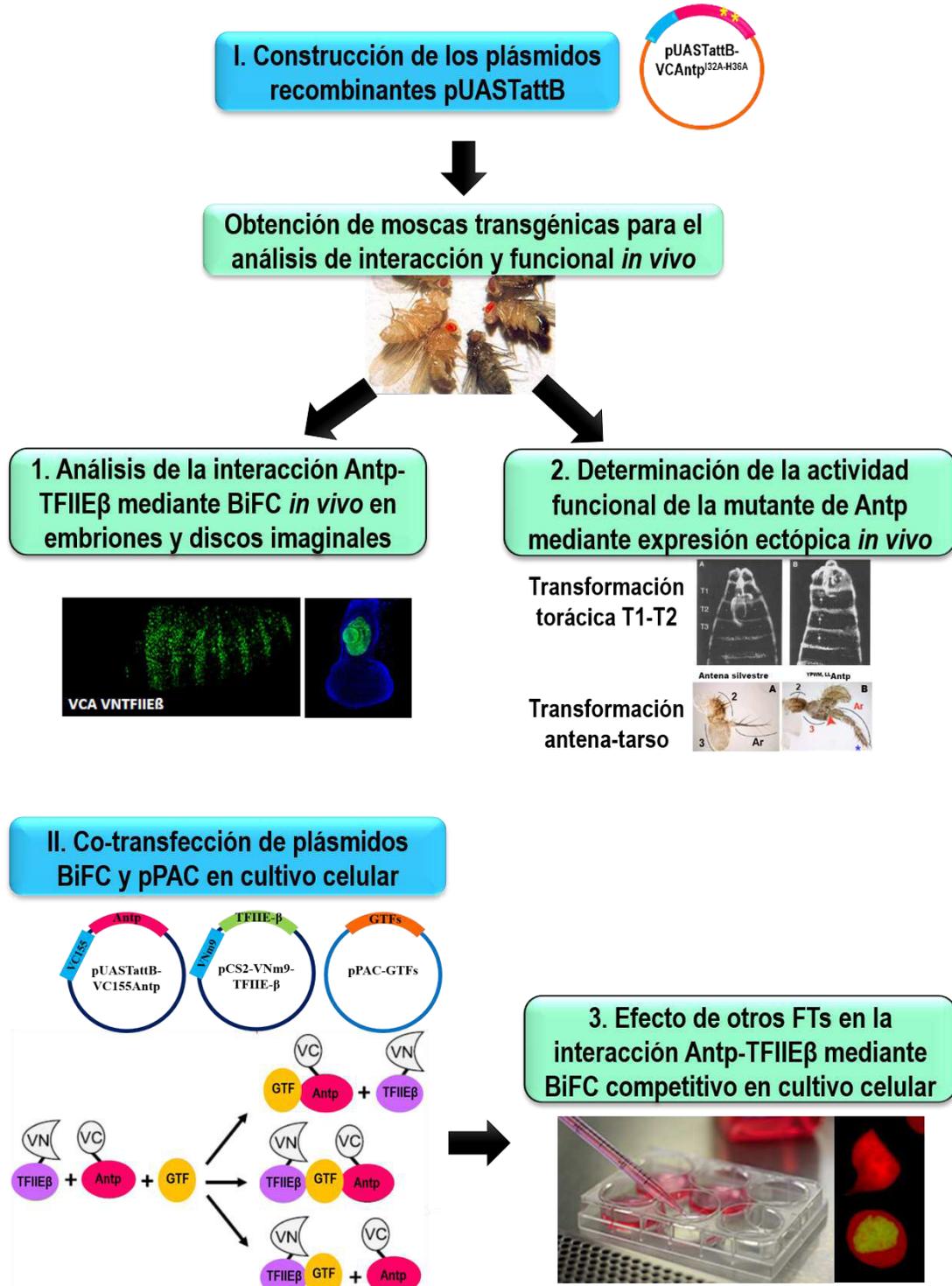


Figura 9. Estrategia general para analizar la interacción Antp-TFII β *in vivo*. Se esquematiza la construcción de plásmidos recombinantes en la primera etapa (I) para analizar la interacción Antp-TFII β y su actividad funcional *in vivo* en *Drosophila*. En la segunda etapa (II) se determinó el efecto de otros FTs en la interacción Antp-TFII β en cultivo celular mediante BiFC competitivo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Análisis de la interacción Antp-TFIIE β mediante BiFC *in vivo* en *Drosophila*

Para analizar la interacción Antp-TFIIE β *in vivo* en embriones y discos imaginales de *Drosophila* utilizamos el sistema de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (BiFC). BiFC permite determinar interacciones proteína-proteína y se basa en la escisión de la proteína fluorescente Venus en los extremos amino (VN) y carboxilo (VC), cada extremo se fusiona a una proteína de interés y si estas interactúan entre sí los extremos VN y VC se acercan lo suficiente para reconstituir la fluorescencia de Venus confirmando la interacción (Kerppola 2008). Se analizó la interacción mediante BiFC *in vivo* de Antp fusionada al extremo VC con TFIIE β fusionada al extremo VN, y se determinó el efecto de la mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp en esta interacción. Para ello, se construyó el plásmido pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A} para obtener la línea transgénica UAS-VCAntp^{I32A-H36A} y realizar cruza genéticas que permitieron dirigir la expresión de proteínas de fusión BiFC a embriones y discos imaginales de *Drosophila*.

6.1.1 Construcción de pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A} para microinyección

Para la construcción del plásmido recombinante pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A} se diseñaron los oligonucleótidos VenusAntp5' y AntpNot3' con los que se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de Antp^{I32A-H36A} fusionada a VC (VC-Antp^{I32A-H36A}) flanqueada por sitios NotI, se utilizó como templado el plásmido pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}. El fragmento VC-Antp^{I32A-H36A} de 1400 pb se amplificó con una temperatura media óptima de 60°C, el programa de PCR se describe en la Tabla I.

Tabla I. Programa de PCR para la amplificación de VC-Antp^{I32A-H36A}

Etapas	Temperatura	Tiempo
1 (1 ciclo)	94°C	1 min
2 (35 ciclos)		
Desnaturalización	94° C	30 seg
Alineamiento	60°C	30 seg
Síntesis	68°C	2 min
2 (1 ciclo)	68°C	4 min

Posteriormente, para obtener el plásmido pTOPO-VC-Antp^{I32A-H36A}, el producto de PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el protocolo de clonación de la casa comercial. La reacción de clonación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* calcio-competentes (DH5- α Ca⁺⁺), las colonias obtenidas se inocularon en caldo Luria-Bertani (LB) con Ampicilina (50 μ g/ μ l) y al cabo de 24 horas se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante Minipreparación por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos de pTOPO-VCAnp^{I32A-H36A} fueron caracterizados mediante digestión enzimática con BamHI y confirmados mediante secuenciación. Para la subclonación y obtención del vector pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A}, se realizó la digestión enzimática de pTOPO-VCAnp^{I32A-H36A} con NotI para liberar el fragmento VC-Antp^{I32A-H36A} y de pUASTattB para linearizarlo, el inserto VC-Antp^{I32A-H36A} junto pUASTattB linearizado fueron purificados a partir de gel de agarosa mediante el kit WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Una vez purificados se realizó la ligación de VC-Antp^{I32A-H36A} y pUASTattB mediante una reacción de ligación estándar con la enzima DNA Ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con una proporción molecular 1:5 vector-inserto. La reacción se incubó a 18°C toda la noche y posteriormente se tomaron 5 μ l de la reacción para transformar bacterias *E. coli* DH5- α Ca⁺⁺. Las colonias obtenidas se inocularon en caldo LB con Ampicilina (50 μ g/ μ l) y se extrajo DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA plasmídico de pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A} fue caracterizado con las enzimas de digestión diagnósticas PstI, XbaI y KpnI. El vector también se confirmó mediante secuenciación para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos ATTB5 y ATTB3.

Finalmente, confirmado el vector pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A} la clona positiva de bacterias se amplificó a mediana escala (100 ml) en medio LB y se purificó el DNA plasmídico mediante columnas de afinidad usando el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, 1997) siguiendo el protocolo de la compañía, el DNA plasmídico fue re-suspendido en agua miliQ, cuantificado y preparado para microinyección.

6.1.2 Microinyección de embriones para obtener la línea de moscas transgénicas UAS-VCAn^{tp}^{I32A-H36A}

El DNA plasmídico (50µg totales) se envió en tubos de 1.5 ml estériles a la compañía Bestgene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) donde se llevó a cabo la microinyección de embriones de *D. melanogaster* y el balanceo genético de cromosomas. Las líneas transgénicas de los embriones que lograron alcanzar la etapa adulta después de la microinyección y balanceo fueron enviadas a nuestro laboratorio por la compañía y añadidos al stock general de la UBD.

6.1.3 Mantenimiento y amplificación de *D. melanogaster*

Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas para este proyecto fueron mantenidas a 18°C en viales con comida estándar Jazz Mix (Fisher Scientific, Lawrenceville, GA, USA) y transferidas a comida fresca una vez a la semana. Las amplificaciones masivas de moscas se realizaron mediante colectas de huevos durante 18 h para transferirlos a frascos con comida que se incubaron a 25°C hasta el momento de las eclosiones. Todas las líneas productoras y reporteras utilizadas en esta tesis, así como su procedencia se enlistan en el Apéndice II.

6.1.4 Sexado, colecta y realización de cruzas

Las moscas transgénicas seleccionadas y amplificadas fueron anestesiadas con CO₂ en una plataforma porosa de polietileno para observarlas al estereoscopio. Se sexaron con base en el dimorfismo sexual de acuerdo con las siguientes características (Figura 10):

- a) El tamaño de las hembras (♀) es mayor que el de los machos (♂).
- b) Las hembras tienen los últimos tres segmentos abdominales separados y de coloración 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 peines sexuales en la región basal del tarso del primer par de patas observables como una hilera de 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine.

La colecta de las hembras vírgenes (♀) se realizó descartando todos los adultos de los frascos de cultivo y monitoreando la eclosión de adultos durante un período no mayor a 8 h a 25°C o 20 h a 18°C (a dichas temperaturas durante esos periodos los machos son inmaduros sexualmente y las hembras no son receptivas), para confirmar se seleccionaron aquellas hembras que presentaban abdomen elongado, cutícula transparente o pobremente melanizada, y meconio visible en el abdomen (Fig. 10C). Todas las cruza genéticas se realizaron con una proporción hembras-machos de 3:1, los individuos se colocaron en frascos o viales con comida estándar y levadura seca granulada activa, se incubaron de 24 a 48 h a 25°C para permitir el apareamiento, transcurrido ese tiempo se realizaron los análisis de embriones, larvas o adultos pertinentes para cada experimento.

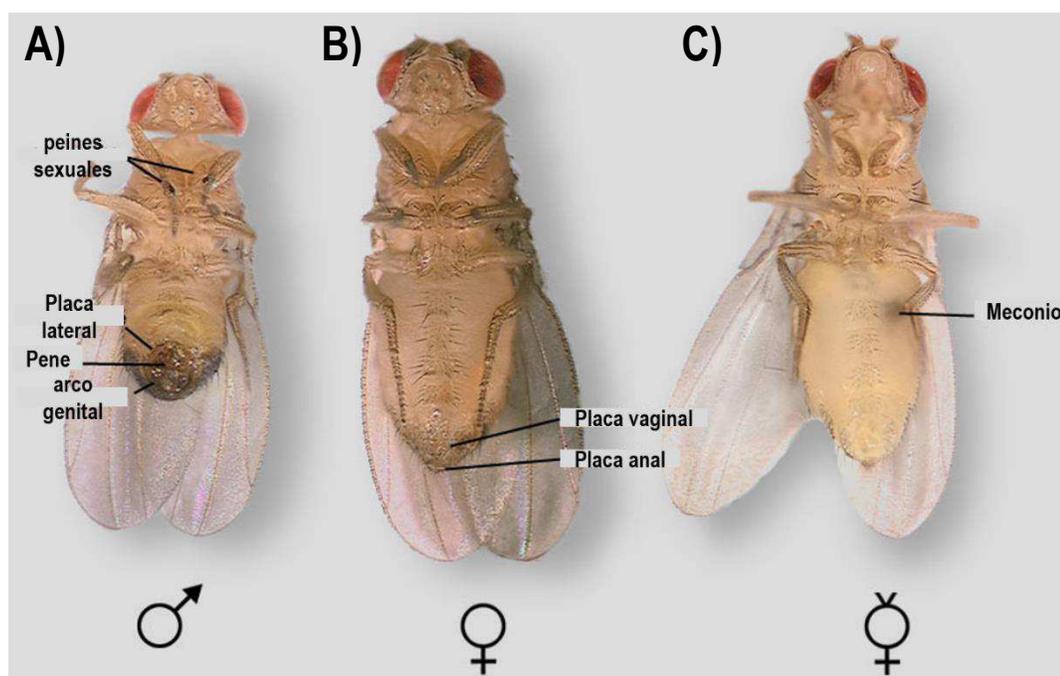


Figura 10. Dimorfismo sexual de *Drosophila melanogaster*. Vista ventral de hembras y machos de *Drosophila*. **A)** Macho de *Drosophila*, se observa el tamaño menor respecto a la hembra de la derecha, la terminación roma del abdomen y el área genital al final de éste, y en el primer par de patas se observan los peines sexuales. **B)** Hembra de *Drosophila*, se aprecia el tamaño mayor y el abdomen con terminación puntiaguda. **C)** Hembra virgen, la coloración es más clara debido a la aun poca melanización de la cutícula, también se muestra el meconio visible en el abdomen.

Tomada y modificada de <http://flymove.uni-muenster.de/>

6.1.5 Sistema Binario UAS/Gal4

Para dirigir la expresión de las proteínas a embriones y discos imaginales de *Drosophila*, se hizo uso del sistema binario UAS-Gal4 (Brand y Perrimon, 1993), el cual consiste en la cruce entre una línea productora o driver Gal4 (Fig. 11A) y una línea reportera UAS (Fig. 11B). La línea productora codifica y expresa la proteína transactivadora Gal4 bajo el control de un promotor o potenciador tejido-específico, mientras que la línea reportera contiene el gen que codifica la proteína de interés bajo el control de secuencias UAS (Upstream Activator Sequence, por sus siglas en inglés) a las que Gal4 es capaz de unirse para activar la transcripción. Al cruzar ambas líneas, en la progenie que contenga ambos transgenes la proteína Gal4 expresada de manera tejido-específica se unirá a las secuencias UAS activando la transcripción del gen de interés solo en las regiones de especificidad del driver (Fig. 11C). Todas las líneas productoras y reporteras utilizadas en esta tesis, así como su procedencia se enlistan en el Apéndice II.

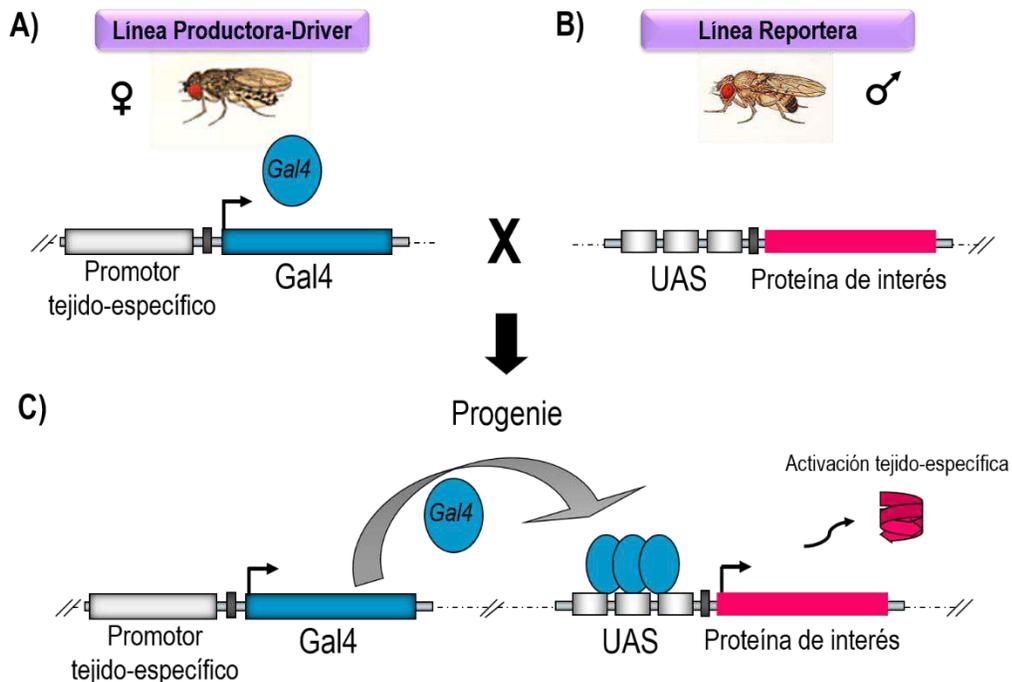


Figura 11. Sistema UAS/Gal4. El sistema consiste en la cruce de dos líneas de moscas transgénicas. **A)** La línea productora o driver expresa la proteína transactivadora Gal4 bajo el control de un promotor o potenciador tejido-específico. **B)** La línea reportera codifica la proteína de interés bajo el control de sitios UAS a los que se une Gal4. **C)** La cruce entre ambas líneas permitirá que en la progenie que contenga ambos transgenes se exprese la proteína de interés sólo en los tejidos de actividad del promotor o enhancer de la línea Gal4.

6.1.6 Cruzas genéticas para analizar la interacción Antp-TFIIIEβ mediante BiFC en embriones de *Drosophila*

Para determinar la interacción entre Antp y TFIIIEβ, así como el efecto de la mutante Antp^{I32A-H36A} en la interacción mediante BiFC *in vivo* se dirigió la expresión de VNTFIIIEβ en combinación con VCAnp, VCAnpHD o VCAnp^{I32A-H36A} a embriones mediante el driver *ptc-Gal4*. Para ello se realizaron dos series de cruzas genéticas, la 1er serie de cruzas permitió obtener individuos con los dos transgénos que codifican las proteínas de fusión VC y VN. Se seleccionaron 24 hembras vírgenes de las líneas UAS-VCAnp, -AnpHD y -Anp^{I32A-H36A} y se cruzó cada una con 8 machos de la línea UAS-TFIIIEβ tal como se esquematiza en la Figura 12, éstas cruzas permitieron obtener las líneas UAS-VCAnp;VNTFIIIEβ (Fig. 12A), -VCAnpHD;VNTFIIIEβ (Fig. 12B) y -VCAnp^{I32A-H36A};VNTFIIIEβ (Fig. 12C). Cada craza se realizó en frascos con comida suplementada con levadura seca granulada y se incubaron a 25°C hasta la eclosión de adultos, las cruzas se transfirieron a viales con comida fresca cada dos días por una semana.

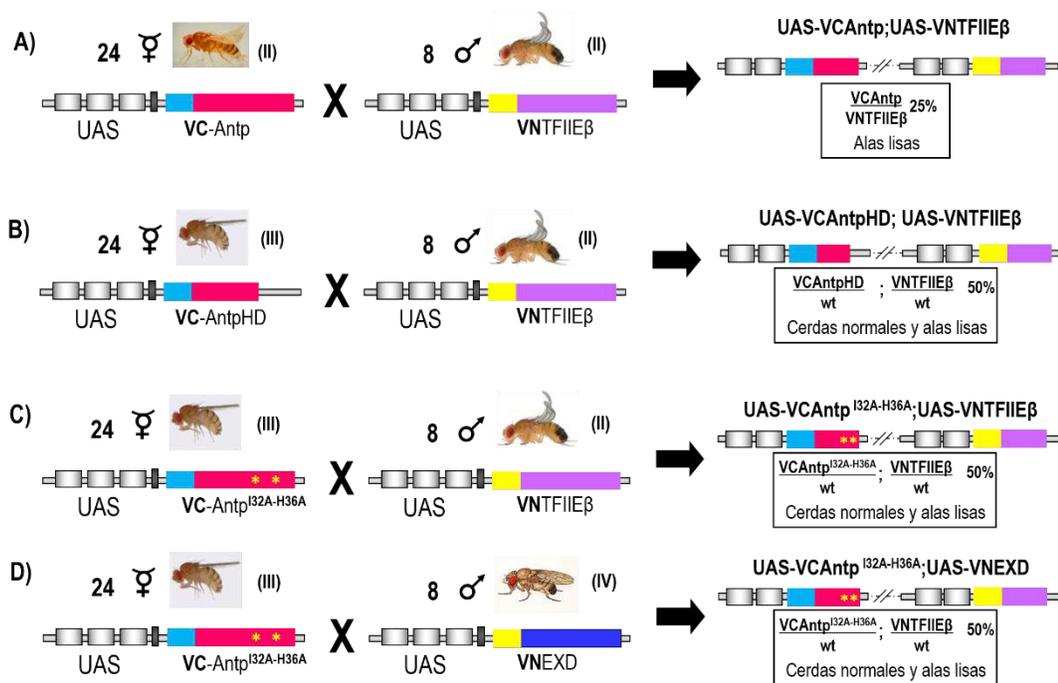


Figura 12. Esquemas de cruzas genéticas para obtener líneas UAS con las proteínas de fusión BiFC. La progenie de cada craza fue utilizada para cruzas posteriores con líneas productoras. **A)** Cruza genética entre 24 hembras vírgenes de la línea UAS-VCAnp y 8 machos de la línea UAS-VNTFIIIEβ. **B)** Esquema de craza de 24 hembras vírgenes UAS-VCAnpHD con 8 machos de UAS-VNTFIIIEβ. **C)** Cruza entre 24

hembras vírgenes de la línea UAS-VCAntp^{I32A-H36A} y 8 machos de la línea UAS-VNTFIIIE β . **D)** Cruza entre 24 hembras vírgenes de la línea UAS-VCAntp^{I32A-H36A} y 8 machos de la línea UAS-VNEXD. Se indica en recuadros el fenotipo que indican la presencia de ambos transgenes en la progenie y el porcentaje esperado.

Una vez obtenidas las líneas UAS con ambos transgenes, se llevó a cabo la 2da serie de cruza, consistió en cruzar individuos de la línea productora *ptc*-Gal4 con la progenie de la 1er serie de cruza y así dirigir la expresión de las proteínas a la región anterior de cada parasegmento embrionario. De acuerdo con el esquema de la Figura 13 se cruzaron 30 machos de cada una de las líneas reporteras UAS con 100 hembras vírgenes de la línea productora *ptc*-Gal4. La cruza se realizó en frascos con comida y se incubó a 25°C por 48 h, posteriormente se realizaron colectas de embriones para el análisis de interacción.

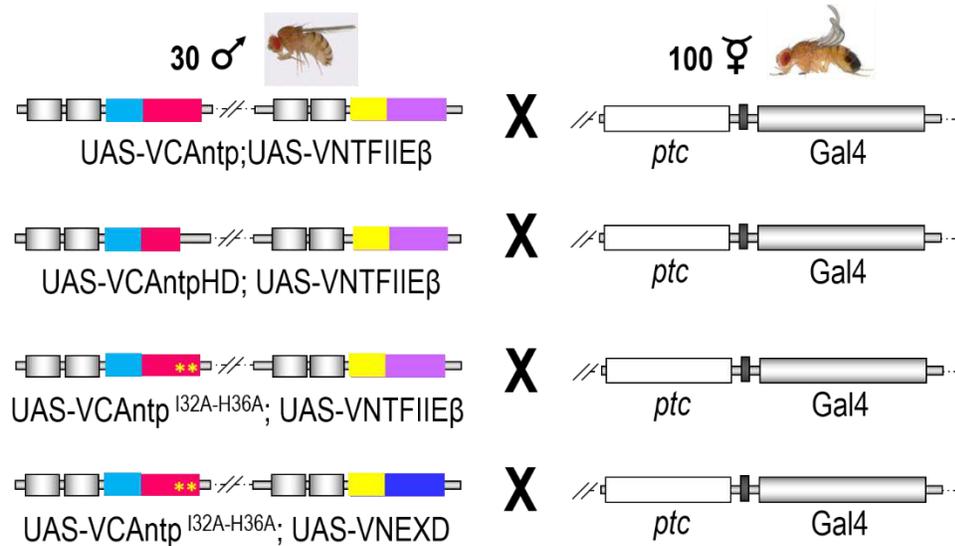


Figura 13. Esquemas de cruza genética para dirigir la expresión de las proteínas BiFC a embriones. Se seleccionaron 30 machos de cada una de las líneas reporteras UAS y se cruzaron con 100 hembras vírgenes de la línea productora *ptc*-Gal4 que permite dirigir la expresión de las proteínas de fusión en embriones a la región anterior de cada parasegmento. La cruza se realizó en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

6.1.6.1 Colecta y decorionización de embriones para su observación al microscopio confocal

Para la colecta de embriones se transfirieron cruza a matraces de puesta con perforaciones en la base para permitir la oxigenación y se colocó en la boca del matraz una placa de Petri (15 x 50 cm) con agar de puesta suplementado con jugo de uva y levadura seca activa, se incubaron a 25°C durante 18 h para permitir la ovoposición en el

agar. Transcurrido ese tiempo, se retiraron los adultos, y las placas de puesta con embriones se incubaron por 48 h a 4°C para permitir la maduración del fluoróforo. Posteriormente, para visualizar los embriones al microscopio, estos fueron decorionizados, y para ello se añadió a cada placa una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) diluido al 1.5% y se incubó por 3 minutos despegándolos del agar mediante un pincel, después los embriones se pasaron a través de un embudo que contiene una malla para retenerlos, se realizaron dos lavados con agua bidestilada, y un lavado con buffer PBX (NaCl, 140 mM; Na₂HPO₄, 7 mM; KH₂PO₄, 3 mM; triton X-100, 0.1%). Finalmente, los embriones fueron trasladados a un portaobjetos con ayuda de un pincel, se añadieron 3-4 gotas de glicerol/PBS al 60% y se cubrieron con un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron en el microscopio confocal Olympus BX61WI con un objetivo de aire 20X y la fluorescencia de Venus se detectó utilizando un láser 473 nm. Las imágenes se procesaron utilizando el programa de uso libre ImageJ (NIH).

6.1.7 Cruzas genéticas para analizar la interacción Antp-TFIIIEβ mediante BiFC en discos imaginales de *Drosophila*

Para determinar la interacción entre Antp y TFIIIEβ en discos imaginales se dirigió la expresión de las proteínas de fusión BiFC a los discos imaginales de ojo-antena, ala y pata usando el driver *dll*-Gal4, para ello se realizaron cruzas genéticas entre la línea productora *dll*-Gal4 y las líneas UAS previamente obtenidas VCAntp;VNTFIIIEβ, VCAntpHD;VNTFIIIEβ, y VCAntp^{I32A-H36A};VNTFIIIEβ tal como se ilustra en los esquemas de la Figura 14. Se cruzaron 8 machos de cada una de las líneas reporteras con 24 hembras vírgenes de la línea productora *dll*-Gal4.



Figura 14. Esquemas de cruza genéticas para dirigir la expresión de las proteínas BiFC a discos imaginale. Se seleccionaron 8 machos de cada una de las líneas reporteras UAS y se cruzaron con 24 hembras vírgenes de la línea productora *dll*-Gal4 que permite dirigir la expresión de las proteínas de fusión a los discos imaginale de ojo-antena, ala y pata. La cruce se realizó en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

6.1.7.1 Disección y procesamiento de discos imaginale para su observación al microscopio confocal

Para la disección de discos imaginale se seleccionaron larvas de tercer estadio (desde la segunda muda hasta antes de la pupación) distinguible como larvas grande que comienzan a escalar por las paredes de los frascos para iniciar la etapa de pupa. Las larvas vivas se retiraron con pinzas de los frascos y se colocaron en portaobjetos con PBS para observarlas con el microscopio de epi-fluorescencia, de esta forma se determinó la presencia o ausencia de señal fluorescente en la región anterior cercana al gancho bucal donde se ubican juntos los discos imaginale de ala, ojo-antena y pata. Las larvas que mostraron señal fluorescente fueron diseccionadas en PBS sobre portaobjetos usando agujas de jeringa para insulina, una vez separados los discos imaginale de interés, los restos de la larva junto con el exceso de PBS se retiraron con papel secante y se añadió una gota de solución Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Southfield, MI, USA), se colocó encima un cubreobjetos verificando que los discos no se salgan por el borde del cubreobjetos, las laminillas debidamente etiquetadas se incubaron a 4°C por 24 horas para permitir la tinción completa del tejido de los discos, finalmente se observaron y fotodocumentaron en un microscopio Olympus BX61WI un objetivo de aire 20X. Las fluorescencias de Venus y DAPI se visualizarán utilizando láseres de 405 y 473 nm

respectivamente. Las imágenes se procesaron utilizando el programa de uso libre ImageJ (NIH).

6.2 Análisis de la actividad funcional de la doble mutante Antp^{I32A-H36A} en las transformaciones homeóticas en *D. melanogaster*

Para analizar la actividad funcional de la mutante Antp^{I32A-H36A} *in vivo* en la involución de la cabeza, la transformación torácica T1-T2 y la transformación antenarso, primero se realizó la construcción del plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} para obtener líneas transgénicas UAS-Antp^{I32A-H36A}. Finalmente, se dirigió la expresión de Antp^{I32A-H36A} a embriones y discos imaginales de *Drosophila* mediante cruas genéticas.

6.2.1 Construcción de pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} para microinyección

Para construir el plásmido recombinante pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} se diseñaron los oligonucleótidos AntpNot5' y AntpNot3' con los que se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de Antp^{I32A-H36A} flanqueada por sitios NotI, se utilizó como templado el plásmido pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}. El fragmento Antp^{I32A-H36A} de 1100 pb fue amplificado usando una temperatura media óptima de 60°C y el programa de PCR que se describe en la Tabla II.

Tabla II. Programa de PCR para la amplificación de Antp^{I32A-H36A}

Etapa	Temperatura	Tiempo
1 (1 ciclo)	95°C	2 min
2 (35 ciclos)		
Desnaturalización	95° C	30 seg
Alineamiento	60°C	1 min
Síntesis	75°C	5 min
2 (1 ciclo)	70°C	5 min

El producto de PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para obtener el plásmido pTOPO-Antp^{I32A-H36A}, la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de clonación de la casa comercial. La reacción de clonación se utilizó para

transformar bacterias *E. coli* DH5- α Ca⁺⁺, las colonias obtenidas se inocularon en medio LB con Ampicilina (50 μ g/ μ l) y al cabo de 24 horas se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNAs plasmídicos de pTOPO-Antp^{I32A-H36A} fueron caracterizados mediante digestión enzimática con BamHI y PstI, y confirmados mediante secuenciación.

Para la subclonación y obtención de la construcción pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}, se realizó la digestión enzimática de pTOPO-Antp^{I32A-H36A} con NotI para liberar el fragmento Antp^{I32A-H36A} y el vector pUASTattB se linearizó también con Not I, el inserto Antp^{I32A-H36A} junto pUASTattB linearizado fueron purificados a partir de gel de agarosa mediante el kit WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI. USA) de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial. Una vez purificados se realizó la ligación del fragmento Antp^{I32A-H36A} y pUASTattB mediante una reacción de ligación estándar usando la enzima DNA Ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y una proporción molecular vector-inserto de 1:5. La reacción se incubó a 18°C toda la noche y utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5- α Ca⁺⁺. Las colonias obtenidas se inocularon en caldo LB con Ampicilina (50 μ g/ μ l) y se extrajo DNA plasmídico mediante Minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989). El vector pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} se caracterizó con las enzimas de digestión diagnósticas BamHI, HindIII y SmaI. Las clonas positivas mediante caracterización enzimática se confirmaron mediante secuenciación.

Finalmente, una vez confirmado el vector pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} el cultivo bacteriano correspondiente a la clona positiva se amplificó a mediana escala (100 ml) y se purificó el DNA plasmídico mediante columnas de afinidad usando el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, 1997) siguiendo el protocolo de la compañía, el DNA plasmídico fue re-suspendido en agua miliQ, cuantificado y preparado para microinyección.

6.2.2 Microinyección de embriones para obtener líneas de moscas transgénicas UAS-*Antp*^{I32A-H36A}

El DNA recombinante fue enviado en tubos de 1.5 ml estériles (50µg totales) a la compañía Bestgene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) donde se llevó a cabo la microinyección de los DNA's plasmídicos en embriones de *D. melanogaster* y el balanceo genético de cromosomas. Las líneas transgénicas de los embriones que lograron alcanzar la etapa adulta después de la microinyección y balanceo fueron enviadas a nuestro laboratorio por la compañía.

6.2.3 Cruzas genéticas para determinar la actividad funcional de *Antp*^{I32A-H36A} en la involución de la cabeza y la transformación torácica

Para analizar la actividad funcional de la mutante *Antp*^{I32A-H36A} en la involución de la cabeza y la transformación del primer segmento protorácico (T1) a mesotóraco 2 (T2) (transformación T1-T2), se utilizaron las líneas reporteras UAS-*Antp* y tres líneas UAS-*Antp*^{I32A-H36A} con inserción en el cromosoma II (a) o III (b y c). Se realizó una cruce genética entre cada una de las líneas UAS con la línea productora *nullo-Gal4* como se esquematiza en la Figura 15. Se seleccionaron 150 hembras vírgenes de la línea productora *nullo-Gal4* y 30 machos de cada línea reportera UAS. Las cruces se realizaron en frascos con comida suplementada con levadura seca activa y se incubaron a 25°C por 48 h para permitir el apareamiento, transcurrido este tiempo se colectaron y procesaron los embriones para el análisis de cutículas embrionarias.

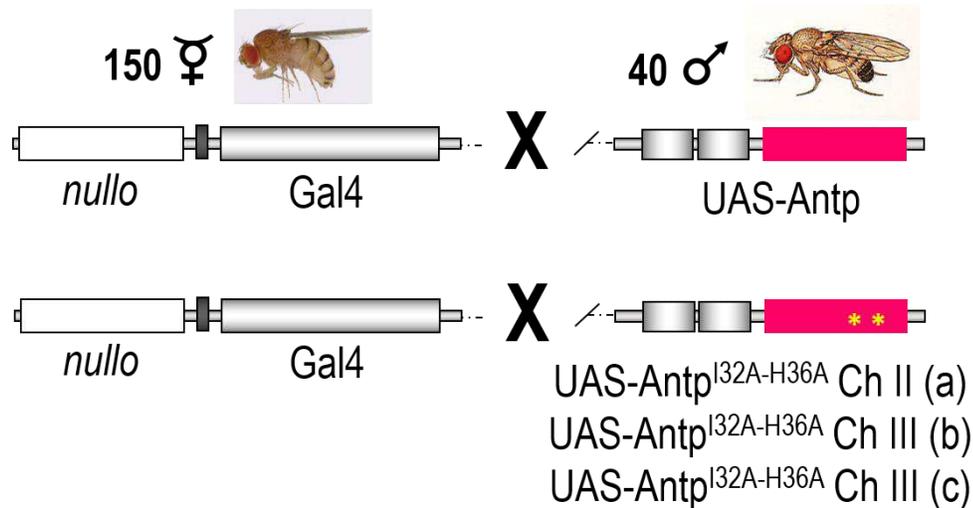


Figura 15. Esquemas de cruza genéticas para dirigir la expresión de Antp y Antp^{I32A-H36A} a la región cefálica de embriones. Se seleccionaron 150 hembras vírgenes de la línea productora *nullo-Gal4* que permite dirigir la expresión a la región cefálica de embriones y se cruzaron con 40 machos de cada una de las líneas reporteras UAS. La cruce se realizó en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

6.2.3.1 Colecta y procesamiento de embriones para el análisis de cutículas embrionarias

Los individuos de las cruza fueron transferidos a matraces de plástico con perforaciones en la base y colocando en la boca del matraz una placa de Petri (15 x 50 cm) con agar de puesta suplementado con jugo de uva y levadura seca granulada, las cruza se incubaron a 25°C durante toda la noche. Al día siguiente, las cruza se transfirieron a placas de puesta nuevas y se incubaron para ovoposición durante 2 h a 25°C. Transcurrido ese tiempo se retiraron los adultos y la placa de puesta con embriones se mantuvo a 25°C por 5.5 h para permitir el desarrollo de los embriones. Posteriormente, los embriones fueron decorionizados cuidadosamente con hipoclorito de sodio (Cloralex) al 4% durante 3 min y se pasaron a través de un filtro/embudo con una malla para retenerlos, se lavaron con abundante agua destilada y buffer PBX (NaCL, 140 mM; Na₂HPO₄, 7 mM; KH₂PO₄, 3 mM; triton X-100, 0.1%) y se enjuagaron nuevamente con agua destilada. Las mallas con los embriones decorionizados se retiraron de los embudos, se colocaron en placas de puesta sobre agar cubierto con papel filtro humedecido en agua destilada y se sellaron con Parafilm para incubarlos a 25°C por 24 h para permitir el desarrollo hasta el primer estadio

larvario antes de la eclosión (Gibson y Gehring, 1988), finalmente se procesaron para analizar las cutículas embrionarias.

6.2.3.2 Preparación de cutículas embrionarias

Para la observación de cutículas embrionarias, la malla que contiene las larvas de primer estadio se sumergió usando pinzas de disección en una solución de 500 µl de heptano y 500 µl de metanol absoluto contenida en tubos de 1.5 ml, se agitó la malla en la solución hasta que todas las larvas se desprendieron, posteriormente, los tubos se colocaron en un brazo de rotación durante 5 min a 90 rpm. Después, ambos solventes se retiraron mediante pipeteo con puntas amarillas teniendo cuidado de no aspirar las larvas, se añadieron 500 µl de metanol absoluto y los tubos se colocaron en el brazo de rotación por 10 min a 40 rpm, éste paso se repitió 3 veces. En este punto las larvas pueden ser almacenadas a -20°C en 200 µl de metanol absoluto para su posterior análisis. Finalmente, para observar el fenotipo, las larvas embebidas en metanol se transfirieron a portaobjetos usando una puntilla amarilla con la punta recortada, una vez sobre el portaobjetos se permitió la evaporación del metanol y se cubrieron con una solución de KOH para clarificar las muestras, se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con esmalte de uñas transparente. Las laminillas se analizaron en un microscopio ZEISS Axioskop 40 con objetivos 10X y 40X para la observación y clasificación de los fenotipos obtenidos.

6.2.4 Cruzas genéticas para analizar la actividad funcional de la mutante en la transformación antena-tarso

Para analizar la función de la mutante $Antp^{I32A-H36A}$ en la transformación antena-tarso se utilizaron las líneas reporteras UAS-*Antp*, UAS-*AntpHD* y tres líneas diferentes UAS- $Antp^{I32A-H36A}$. Se realizó una cruce genética entre cada una de las líneas UAS con las líneas productoras *dll-* y *dpp-Gal4* como se esquematiza en la Figura 16. Se seleccionaron 9 hembras vírgenes de las líneas productoras *dll-* o *dpp-Gal4* y se cruzaron con 3 machos de las líneas reporteras UAS-*Antp*, o tres líneas diferentes UAS- $Antp^{I32A-H36A}$ con inserción en el cromosoma II (a) o III (b y c). Las cruces se realizaron en viales

con comida suplementada con levadura seca granulada y se incubaron a 25°C hasta la eclosión de adultos (12 días aproximadamente) las cruza se transfirieron a viales con comida fresca cada dos días.

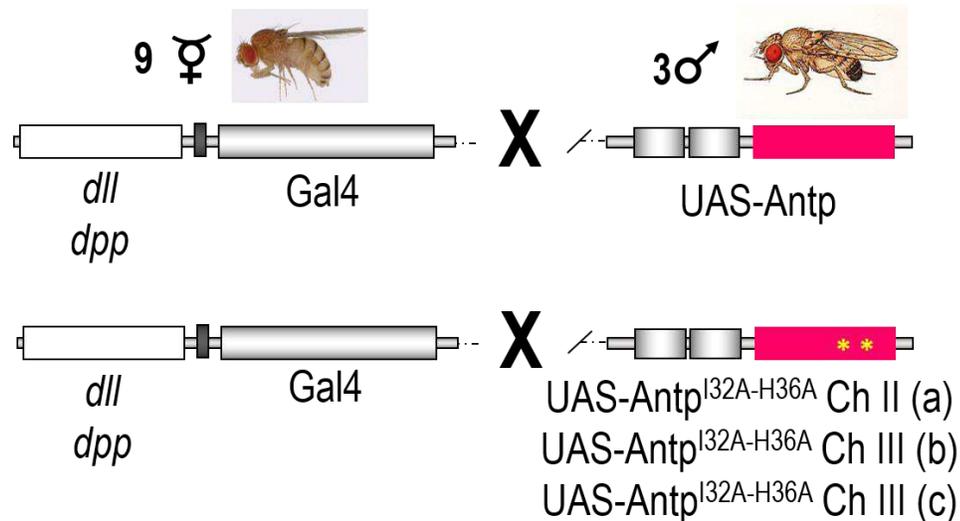


Figura 16. Esquemas de cruza genéticas para dirigir la expresión de Antp y Antp^{I32A-H36A} al disco antenal. Se seleccionaron 9 hembras vírgenes de las líneas productoras *dll*- y *dpp*-Gal4 para dirigir la expresión al disco antenal, y se cruzaron con 3 machos de cada una de las líneas reporteras UAS. La cruce se realizó en viales con comida suplementada con levadura seca granulada.

6.2.4.1 Disección de cabezas y antenas de *D. melanogaster* para la toma de fotografías

Una vez eclosionados, los adultos fueron anestesiados con CO₂ y observados al estereoscopio para la identificación de fenotipos. Las disecciones de las cabezas se realizaron mediante agujas para insulina y se transfirieron a portaobjetos para observarlas al microscopio de luz y fotografiarlas, una vez capturadas las imágenes de las cabezas se diseccionaron las antenas para fotodocumentarlas. Se utilizó un microscopio ZEISS Axioskop 40 con un objetivo 10X, las fotografías se tomaron con una cámara Canon Power Shot A640 montada al microscopio y modificada con un lente de 52 mm. Las fotografías fueron tomadas sin encender la luz del microscopio estando el cuarto bien iluminado, se colocó una hoja blanca en la platina sobre la que se posaron las laminillas. Se utilizaron los siguientes parámetros en la cámara:

- a) Sin flash.
- b) Modo retrato y para tomas cercanas (icono flor).

c) El tamaño de la imagen se estableció en S (superfina) y L (máximos píxeles). Se capturaron fotografías recorriendo el eje en Z de las cabezas girando el micrométrico del microscopio, en promedio se capturaron 50-60 fotografías de cada cabeza y 20-30 de cada antena. El grupo de fotografías de cada cabeza y antena fueron procesadas y empalmadas para crear una única imagen nítida mediante el software de procesamiento de imagen Helicon Focus 6 (Helicon Soft) usando el método C (pyramid).

6.3 Análisis de la actividad funcional de la interacción Antp-TFIIIE β en la transformación antena-tarso en *Drosophila*

Para analizar la actividad funcional de la interacción Antp-TFIIIE β *in vivo* en la transformación antena-tarso, se co-expresaron las proteínas de fusión BiFC en el disco antenal mediante cruza genéticas utilizando *dll*-Gal4, y finalmente se observaron los fenotipos para determinar efecto de la mutación en las transformaciones antena-tarso.

6.3.1 Cruzas genéticas para analizar la actividad funcional de la interacción Antp-TFIIIE β en la transformación antena-tarso

Para analiza la función de la interacción Antp-TFIIIE β *in vivo* en la transformación antena-tarso se utilizaron las líneas reporteras UAS VCantpHD;VNTFIIIE β y VCantp^{I32A-H36A};VNTFIIIE β obtenidas de acuerdo con los esquemas de cruza previamente descritos (Fig. 12B, C). Se realizó una crusa genética entre cada una de las líneas UAS con la línea productora *dll*-Gal4 como se esquematiza en la Figura 17 para co-expresar las proteínas de fusión VC y VN en el disco antenal. Se seleccionaron 24 hembras vírgenes de la línea *dll*-Gal4 y se cruzaron con 8 machos de cada línea reportera UAS. Las cruza se realizaron en frascos con comida suplementada con levadura seca granulada y se incubaron a 25°C, las cruza se transfirieron comida fresca cada dos días.

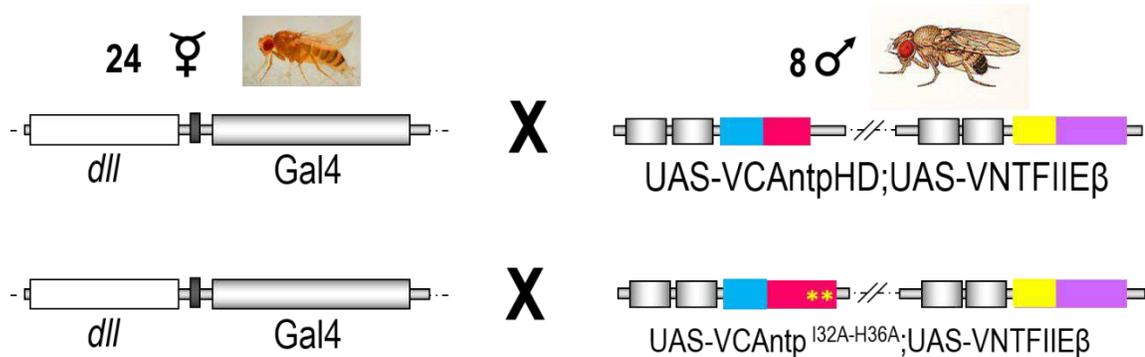


Figura 17. Esquemas de cruces genéticas para co-expressar las proteínas BiFC en el disco imaginal de la antena. Se seleccionaron 24 hembras vírgenes de la línea productora *dll*-Gal4 y se cruzaron con 8 machos de cada una de las líneas reporteras UAS. La cruce se realizó en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

6.3.1.1 Disección de adultos de *D. melanogaster* y toma de fotografías de cabezas y antenas

Para determinar con seguridad el efecto de la interacción Antp-TFIIIEβ en la transformación antena-tarso, se seleccionaron *in vivo* larvas de tercer estadio, las larvas vivas se retiraron con pinzas de los frascos y se colocaron en portaobjetos con PBS para observarlas con el microscopio de epi-fluorescencia, de esta forma se determinó la presencia o ausencia de señal fluorescente en la región anterior de la larva. Las larvas que presentaron fluorescencia se transfirieron a viales para permitir su desarrollo hasta la eclosión de adultos. En el caso de la mutante de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD se analizaron todos los adultos eclosionados. La disección de cabezas y antenas, así como la toma de fotografías se realizó bajo el mismo procedimiento y parámetros descritos en la sección 6.2.4.1.

6.4 Análisis del efecto de los factores TBP, TFIIIB, TFIIAγ, BIP2, EXD y AbdB en la interacción Antp-TFIIIEβ mediante ensayos de BiFC competitivo en cultivo celular

Para determinar el efecto de otros factores transcripcionales en el dímero Antp-TFIIIEβ se realizó un análisis de BiFC competitivo en cultivo celular, este ensayo se basa en la co-transfección de los plásmidos que codifican las proteínas de interacción VCAntp y VNTFIIIEβ, así como plásmidos pPAC que codifican cada uno de los factores

transcripcionales (FTs) TBP, Bip2, TFIIB, TFIIA γ , EXD y AbdB. En este ensayo se compara el porcentaje de interacción Antp-TFIIE β sin adición de otros FTs, con el porcentaje de interacción Antp-TFIIE β cuando se añade cada uno los FTs. Los posibles escenarios del efecto de los FTs en el complejo dimérico Antp-TFIIE β se muestran en el esquema de la Figura 18.

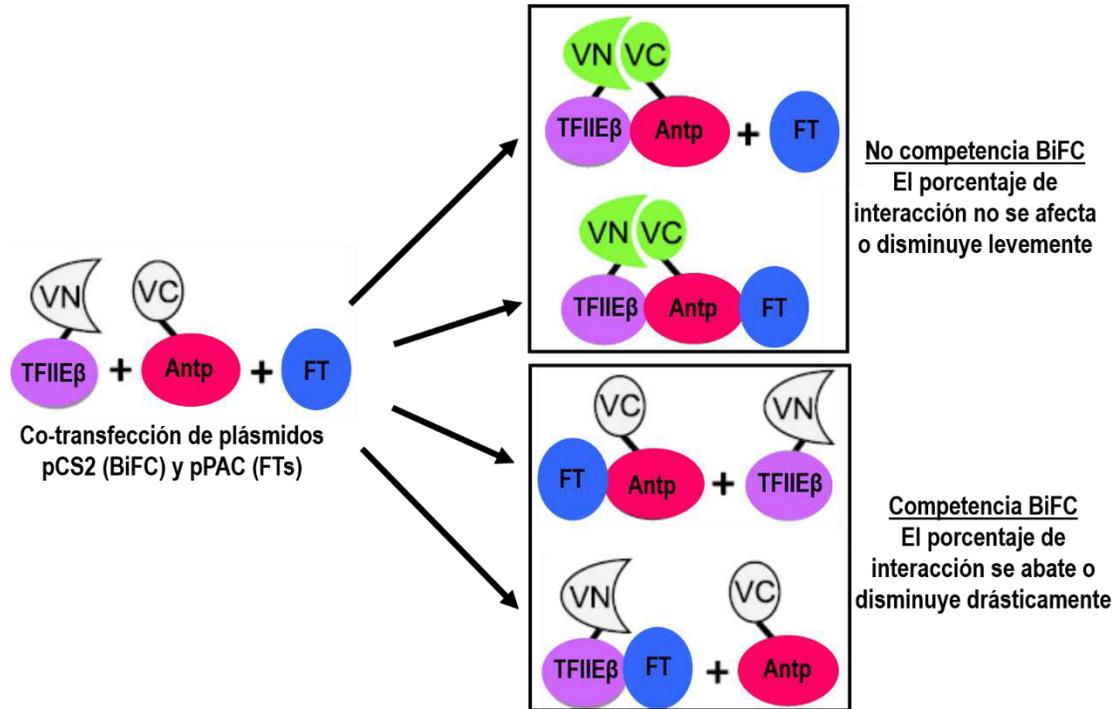


Figura 18. Principio del ensayo de BiFC competitivo. Se muestran los posibles escenarios que podrían conducir a un cambio en el porcentaje de interacción Antp-TFIIE β luego de la co-transfección de los plásmidos pCS2 BiFC con cada plásmido pPAC productor de los diferentes FTs. En el panel superior la no competencia BiFC podría deberse a que el FT adicional no interactúa con ninguna de las proteínas de interés, el FT podría interactuar con alguna de ellas sin impedir la reconstitución de Venus o disminuyéndola levemente implicando así la posible formación de complejos triméricos. En el panel inferior la competencia BiFC podría estar dada por interacción dimérica del FT adicional con cualquiera de las proteínas de interés impidiendo la reconstitución de Venus.

Modificado de Baeza *et al.*, 2015.

6.4.1 Preparación de los plásmidos pCS2 BiFC, pPAC-TBP, -BIP2, -TFIIB, -TFIIA γ , -EXD y -AbdB para las co-transfecciones

Los plásmidos pCS2 BiFC y pPAC-FTs previamente construidos en el laboratorio (Cárdenas-Chavez, 2012), así como pCAG-Cherry (donado por Ataúlfo Martínez-Torres) se caracterizaron mediante digestión enzimática y se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α Ca $^{++}$ con cada uno de ellos para obtener cultivos a mediana escala en medio LB (100 ml).

Se purificaron mediante el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, 1997) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El análisis de calidad de los DNAs plasmídicos purificados se realizó mediante visualización por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se determinó la concentración en un espectrofotómetro (NanoDrop modelo ND-1000), los plásmidos presentaron una pureza (relación absorbancia 260/280) mayor a 1.8 y una concentración por arriba de 500 ng/μl (Tabla III), dichas condiciones son óptimas para la co-transfección de células para los ensayos de BiFC competitivo.

Tabla III. Plásmidos utilizados en los ensayos de BiFC competitivo

	Plásmido	Concentración (ng/μl)	Pureza (260/280)
Plásmidos BiFC	pCS2-VC155Antp	1434.4	1.91
	pCS2-VNm9TFIIEβ	1323.6	1.91
Plásmidos productores de los FTs	pPAC-TBP	745	1.92
	pPAC-Bip2	1150.8	1.9
	pPAC-TFIIB	955.1	1.92
	pPAC-TFIIAγ	968.3	1.98
	pPAC-EXD	1525	1.9
	pPAC-AbdB	980	1.9
Control interno	pCAG-Cherry	946.1	1.97

6.4.2 Ensayos de co-transfección en células HEK293

Los ensayos BiFC se realizaron en celular HEK293 (células embrionarias de epitelio renal humano) cultivadas en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) y 1% de penicilina/estreptomicina (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) en una atmósfera a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Las co-transfecciones consistieron en utilizar los plásmidos recombinantes que codifican las proteínas BiFC VC-Antp y VN-TFIIEβ y agregando de manera individual los plásmidos pPAC-FTs. El plásmido control pCAG-Cherry que codifica la proteína roja fluorescente Cherry fue incluido en cada ensayo como control interno de transfección.

Las células HEK293 fueron sembradas 24 hrs antes del ensayo de transfección a una densidad de 1×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) que contenían cubreobjetos de vidrio estériles. Las co-transfecciones se llevaron a cabo mediante el reactivo policationico Polietilenimina (PEI) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. USA). Usando tubos de 1.5 ml esteriles, para cada combinación de plásmidos se diluyeron 6 μg totales de DNA (1.5 μg /plásmido) en 100 μl de NaCl 150 mM, y en otro tubo de 1.5 ml se prepararon 100 μl de PEI 15 mM diluido en NaCl 150 mM. Cada una de las soluciones se mezcló por vórtex durante 15-20 seg y posteriormente la solución de PEI fue transferida al tubo con DNA plasmídico (nunca de manera inversa ya que la formación de complejos DNA-PEI será ineficiente). La mezcla se homogeneizo mediante golpeteo suave y se incubo durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se vaciaron 200 μl de DNA-PEI a cada pozo con células mediante goteo suave. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h, pasado este periodo se realizaron las observaciones mediante microscopia confocal.

6.4.3 Visualización de los complejos fluorescentes

Para el montaje de laminillas se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se añadieron 2 ml de PBS estéril, los cubreobjetos con las células HEK293 adheridas (transfectadas 48 h antes) se retiraron de cada pozo mediante pinzas de disección y se colocaron sobre un portaobjetos con las células entre porta y cubre. Las laminillas fueron inmediatamente observadas en el microscopio invertido de epi-fluorescencia Olympus IX-71 con un objetivo de aire 20X, utilizando un filtro de excitación de 520 ± 10 nm para la detección de la fluorescencia de Venus, y un filtro de excitación de 587 ± 10 nm para la detección de m Cherry. El porcentaje de células positivas de interacción se obtuvo al realizar conteos de 100 células con fluorescencia roja de las cuales se determina el número de células con fluorescencia de Venus. Se realizaron 6 ensayos independientes por duplicado. Las fotografías de las células se tomaron con el microscopio confocal Olympus BX61WI y un objetivo de inmersión 25X. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey para comparación múltiple de medias en el software GraphPad Prism 6.04 para Windows (La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

7.1 Interacción proteína-proteína de Antp con TFIIIE β mediante BiFC *in vivo* en *Drosophila melanogaster*

Los ensayos BiFC de interacción proteína-proteína *in vivo* en embriones y discos imaginales de *D. melanogaster* permitieron determinar el papel de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp en la interacción con TFIIIE β . Para el análisis de interacción *in vivo*, se construyó el plásmido UAS que permitió obtener la línea transgénica UAS-VCAnp^{I32A-H36A} y se realizaron cruces genéticas para dirigir la expresión de las proteínas Antp y TFIIIE β para determinar su interacción en embriones y discos imaginales de *Drosophila*.

7.1.1 Construcción del plásmido pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A}

La construcción del plásmido pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A} que contiene la secuencia de Antp mutada en los residuos 32 y 36 del HD fusionada al extremo carboxilo de Venus (VC), se llevó a cabo mediante la estrategia general de clonación esquematizada en la Figura 19A y descrita ampliamente en la sección de Materiales y Métodos. El plásmido pCS2-VC155Anp^{I32A-H36A} se utilizó como templado para la amplificación mediante PCR de la secuencia codificante a VCAnp^{I32A-H36A} flanqueada por sitios NotI. El amplicon VCAnp^{I32A-H36A} de 1400 pb obtenido se muestra en los carriles 1 y 2 del gel de agarosa en la Figura 19B. Posteriormente, el producto amplificado se clonó en el vector pCR-TOPO 2.1 para obtener el plásmido recombinante pTOPO-VCAnp^{I32A-H36A}. En la Figura 19C se muestra una clona positiva pTOPO-VCAnp^{I32A-H36A} digerida con la enzima de restricción BamHI que liberó los fragmentos esperados de 3953 y 1400 pb (carril 2). Posteriormente, el fragmento VCAnp^{I32A-H36A} fue digerido a partir de pTOPO-VCAnp^{I32A-H36A} usando la enzima de restricción NotI, y se subclonó en el vector pUASTattB previamente linearizado con NotI. La Figura 19D muestra la caracterización de una clona positiva de pUASTattB-VCAnp^{I32A-H36A} con enzimas de restricción diagnósticas, se muestran los fragmentos esperados de 8840, 813 y 244 pb al digerir con

PstI (carril 1), los fragmentos de 9656 y 241 pb con la enzima XbaI (carril 2) y los fragmentos de 9652 y 245 pb con la enzima KpnI (carril 3). Adicionalmente, se confirmó mediante secuenciación la presencia de la doble mutación en la hélice 2 del HD de Antp.

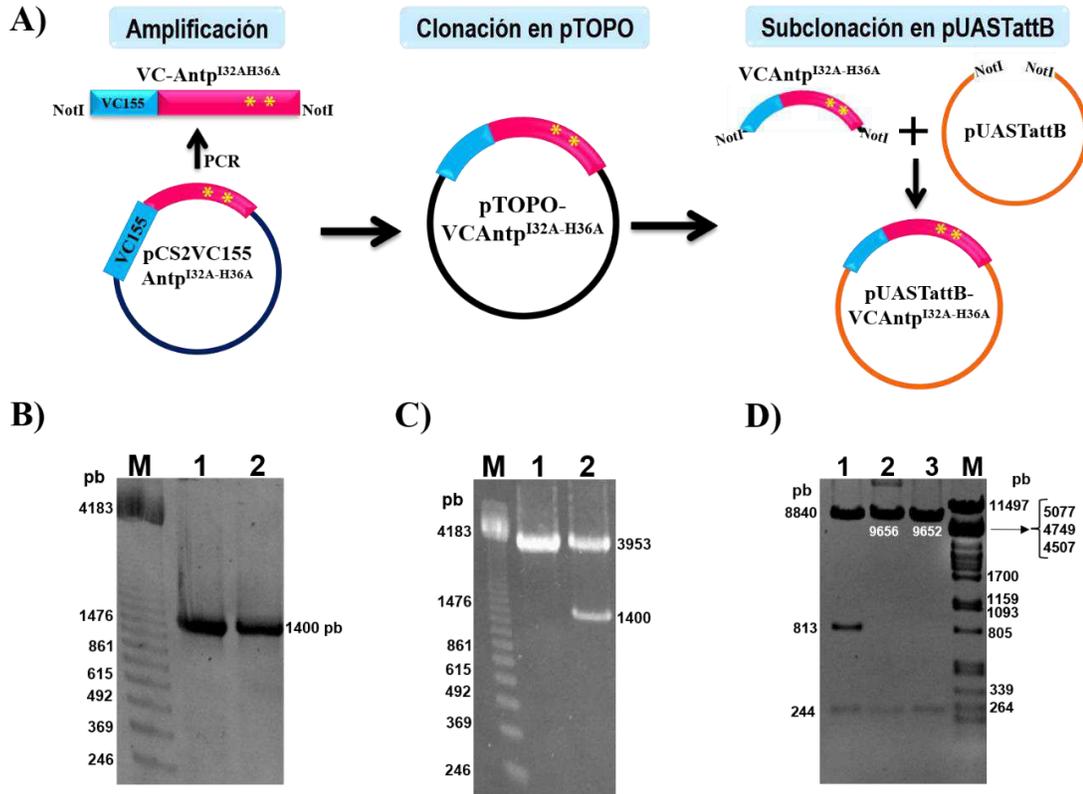


Figura 19. Construcción del plásmido recombinante pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A}. Los productos de PCR y de las caracterizaciones enzimáticas fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. **A)** Esquematisación de la estrategia de construcción del vector pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A}, el fragmento VCAntp^{I32A-H36A} se amplificó por PCR a partir del vector pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}, posteriormente el producto de PCR fue clonado en el vector pCR-TOPO2.1, y finalmente VCAntp^{I32A-H36A} se subclonó en el vector pUASTattB usando los sitios de restricción NotI. **B)** El gel de agarosa muestra la banda de 1400 pb correspondiente a VCAntp^{I32A-H36A} en los carriles 1 y 2, y el carril M corresponde al marcador de peso molecular 123 bp DNA ladder. **C)** Caracterización del vector pTOPO-VCAntp^{I32A-H36A} con la enzima de restricción BamHI (carril 2). En el carril 1 se muestra una clona negativa y el carril M corresponde al marcador de peso molecular 123 bp DNA ladder. **D)** Caracterización del vector pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A} con las enzimas de restricción PstI (carril 1), XbaI (carril 2) y KpnI (carril 3). El carril M corresponde al marcador de peso molecular λPstI.

7.1.2 Obtención de líneas de moscas transgénicas UAS-VCAntp^{I32A-H36A}

Una vez confirmada la construcción pUAST-VCAntp^{I32A-H36A} mediante secuenciación, el plásmido fue purificado mediante preparación a mediana escala como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El vector purificado resultó con una

pureza (relación 260/280) de 1.9 y una concentración de 957.1 ng/ μ l que fueron apropiadas para ser microinyectado en los embriones de *D. melanogaster*. El plásmido pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A} se envió a la compañía BestGene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) para la obtención de moscas transgénicas y en la Tabla IV se muestran las cinco líneas transgénicas obtenidas de la microinyección, con el transgén VCAntp^{I32A-H36A} insertado en el cromosoma III. Cada una de estas líneas fue numerada y agregada al stock general de líneas transgénicas de la Unidad de Biología del Desarrollo (UBD).

TABLA IV. Líneas transgénicas de *D. melanogaster* obtenidas mediante microinyección del plásmido pUASTattB-VCAntp^{I32A-H36A}

Numeración en Stock UBD	Transgén	Cromosoma de Inserción	Marcador fenotípico
147D	UAS-VCAntp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
148D	UAS-VCAntp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
149D	UAS-VCAntp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
150D	UAS-VCAntp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
151D	UAS-VCAntp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas

7.1.3 La interacción molecular proteína-proteína Antp-TFIIE β depende de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD *in vivo*

Para determinar el papel de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp en la interacción con TFIIE β *in vivo* se realizaron ensayos BiFC de interacción proteína-proteína en embriones y discos imaginales de *D. melanogaster*. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante cruza genéticas entre las líneas reporteras *ptc* o *dll*-Gal4 y las líneas UAS que contienen los transgenes VC-Antp, VC-AntpHD o VC-Antp^{I32A-H36A} en combinación con VN-TFIIE β . Las cruza genéticas con las moscas transgénicas se realizaron de acuerdo con los esquemas descritos en la sección de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se analizó la interacción Antp-TFIIE β en embriones dirigiendo la expresión de las proteínas de fusión a la región anterior de los parasegmentos embrionarios mediante *ptc*-Gal4. La Figura 20A muestra la señal fluorescente BiFC derivada de la interacción de TFIIE β con Antp en las regiones anteriores de cada

parasegmento, confirmando la interacción directa entre estas dos proteínas en embriones. Así mismo, también se detectó señal BiFC de interacción entre TFIIIE β y AntpHD (Fig. 20B), lo que demuestra la suficiencia del HD de Antp en la interacción con TFIIIE β . De modo interesante, no se detectó señal fluorescente cuando se co-expresó TFIIIE β y la doble mutante Antp^{I32A-H36A} en ninguno de los embriones analizados (Fig. 20C). Estos resultados indican que la interacción Antp-TFIIIE β en embriones depende de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp.

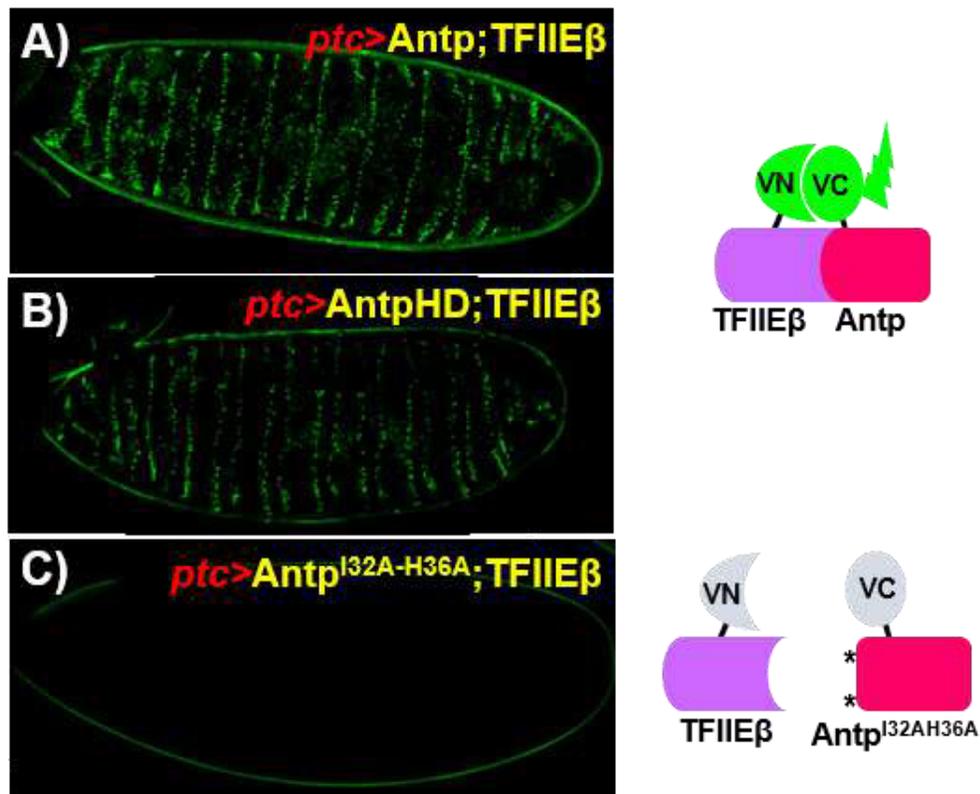


Figura 20. La interacción Antp-TFIIIE β es dependiente del HD de Antp en los residuos 32 y 36 de la hélice 2 en embriones de *D. melanogaster*. Las proteínas de fusión fueron coexpresadas en embriones mediante el *ptc*-Gal4. **A)** Se muestra la señal BiFC derivada de la reconstitución de Venus por la interacción de Antp y TFIIIE β en la región anterior de cada parasegmento. **B)** Se muestra la señal BiFC debida a la interacción entre el HD de Antp y TFIIIE β . **C)** No se detectó señal fluorescente al co-expresar la mutante doble Antp^{I32A-H36A} y TFIIIE β . Se realizaron tres cruces independientes entre las líneas UAS-VCAntp, -VCAntpHD o -VCAntp^{I32A-H36A} y *ptc*-Gal4.

Habiendo determinado la importancia de los residuos 32 y 36 del HD en la interacción de Antp-TFIIIE β en embriones, se analizó también la interacción Antp-TFIIIE β en los discos imaginales de ojo-antena, ala y pata de larvas de *Drosophila* utilizando el potenciador *dll*. El esquema de cruces utilizado se describe en la sección de Materiales y Métodos. En

concordancia con los resultados obtenidos en embriones, en la Figura 21 se observa la fluorescencia BiFC producto de la interacción entre Antp y TFIIIE β (Fig. 21A) en los discos imaginales de ojo-antena, ala y pata, así como la interacción entre el HD de Antp y TFIIIE β también en los discos de ojo-antena, ala y pata (Fig. 21B). Los resultados de la fluorescencia BiFC de ambas interacciones se aprecia, como se esperaba con el potenciador *dll*, en los anillos del primordio antenal del disco ojo-antena (panel izquierdo), en la región del margen presuntivo alar del disco de ala (panel central), y en los anillos del trocánter presuntivo del disco de pata (panel derecho). En contraste, y de la misma forma que en embriones de *Drosophila*, no se detectó señal de interacción BiFC entre la doble mutante Antp^{I32A-H36A} y TFIIIE β en ninguno de los discos imaginales de ojo-antena, ala o pata analizados como se muestra en la Figura 21C. La falta de interacción entre Antp y TFIIIE β confirma la importancia de los residuos 32 y 36 del HD en esta interacción.

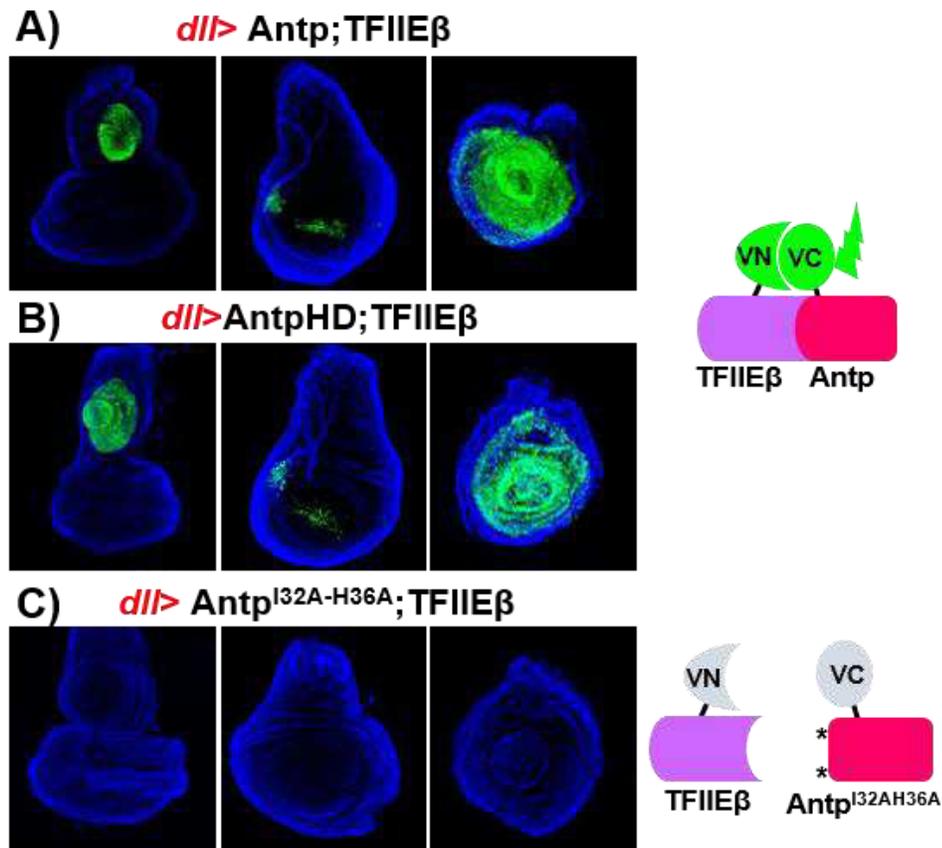


Figura 21. Interacción Antp-TFIIIE β mediante los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD en discos imaginales de *D. melanogaster*. Las proteínas de fusión fueron coexpresadas en discos imaginales mediante *dll*-Gal4 en los discos imaginales de ojo-antena, ala y pata (de izquierda a derecha). **A)** Se muestra la señal BiFC en verde derivada de la reconstitución de Venus por la interacción de Antp y TFIIIE β . **B)** Se observa en verde la señal BiFC debida a la interacción entre AntpHD y TFIIIE β . La fluorescencia BiFC se aprecia en los anillos del primordio antenal del disco ojo-antena (izquierda), en el margen presuntivo alar del disco

de ala (centro), y en los anillos del trocánter del disco de pata (derecha). C) No se detectó señal fluorescente al co-expresar la mutante doble $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ y $\text{TFIIE}\beta$ en los discos de ojo-antena, ala y pata. Todos los discos fueron teñidos con DAPI (azul) para visualizar la estructura completa. Se realizaron tres cruces independientes.

Además, la cuantificación de la intensidad relativa de fluorescencia en los embriones y discos imaginales nos permitió realizar un análisis estadístico de las interacciones que se muestra en la Figura 22. El análisis mostró que hay una diferencia altamente significativa entre la co-expresión de $\text{TFIIE}\beta$ y la doble mutante respecto a la co-expresión de $\text{TFIIE}\beta$ con Antp o AntpHD en embriones (Fig. 22A) y discos imaginales (Fig. 22B) corroborando la falta de interacción entre Antp y $\text{TFIIE}\beta$ debido a la mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD.

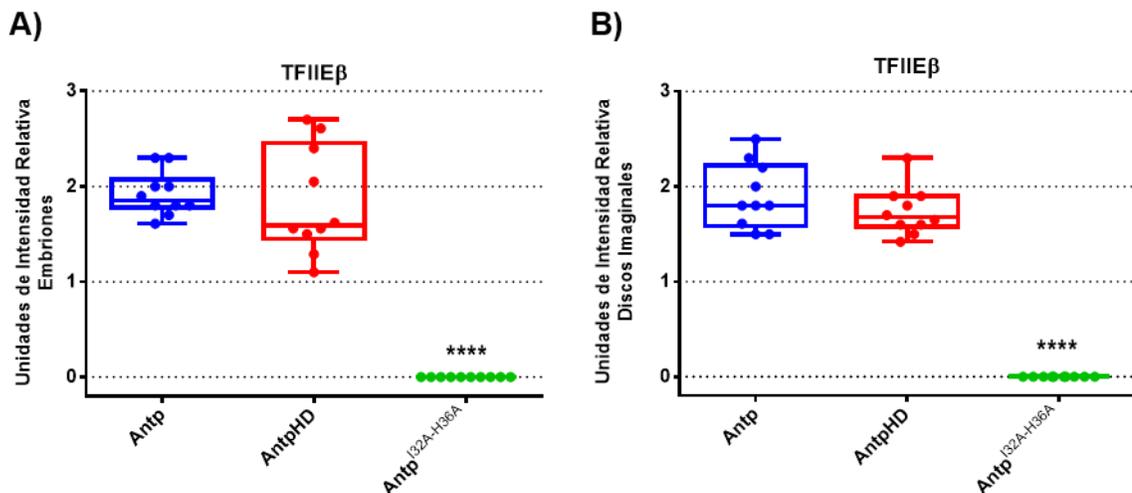


Figura 22. Cuantificación de la interacción Antp-TFIIEβ mediante BiFC en embriones y discos imaginales. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en embriones **A)** y discos imaginales **B)** se realizó mediante la función “Color Histogram” de ImageJ. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey para comparación de medias ($p < 0.005$).

Adicionalmente, para corroborar que la falta de interacción de la doble mutante no es debido a la incorrecta localización celular de la proteína, se realizó la detección de la doble mutante en células HEK293 mediante inmunofluorescencia utilizando anti-Antp4C3 (γAntp) y anti-DsRed (γDsRed). Como se muestra en la Figura 23 la doble mutante de Antp se detectó exitosamente en el núcleo celular (panel inferior en verde) de la misma forma que Antp (panel superior) tal como lo confirma la contratinción nuclear con Dapi. También se inmunodetectó la proteína mCherry en el citoplasma (fluorescencia roja) como

control interno. Estos resultados confirman la localización nuclear de la doble mutante $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$.

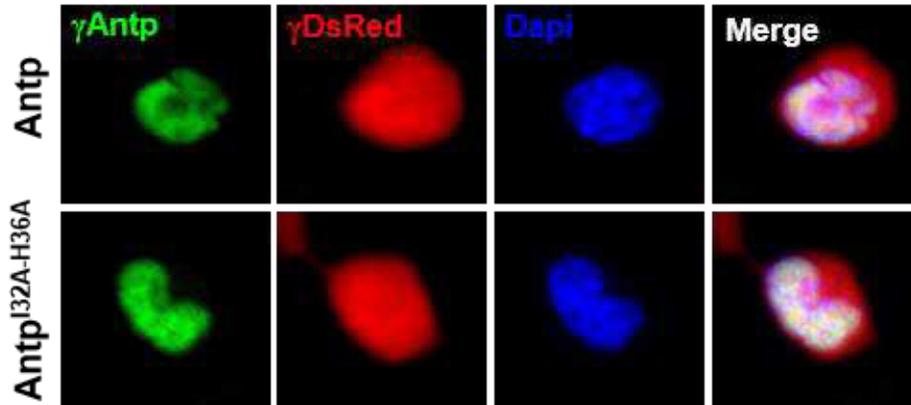


Figura 23. Localización nuclear de la doble mutante $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$. Se muestra la inmunodetección en el núcleo de Antp mediante γAntp (fluorescencia verde) así como la detección citoplásmica de Cherry mediante anti-dsRed (fluorescencia roja). Las células fueron contrateñidas con Dapi para corroborar la localización nuclear.

7.1.4 La interacción molecular proteína-proteína Antp-EXD no fue afectada por la mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD

Para confirmar que la doble mutación del HD no afectó funciones clave de Antp como interacciones proteína-proteína independientes del HD se realizaron ensayos BiFC entre la doble mutante y el cofactor de homeoproteínas EXD tanto en cultivo celular como en embriones (Figura 24).

Para los ensayos BiFC en células HEK293 se realizó la co-transfección de plásmidos pCS2 que codifican las proteínas de fusión VC- $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ y VN-EXD (Cárdenas-Chávez 2012 y Altamirano-Torres 2014). Por otro lado, los ensayos BiFC en embriones se llevaron a cabo mediante cruza genéticas entre *ptc*-Gal4 y las líneas UAS-VC $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ y UAS-VNEXD donada por Samir Merabet (el esquema de cruza se describe en la sección de Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 24A se encontró la interacción $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ -EXD en un 79% de las células con una diferencia altamente significativa respecto a $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ -TFIIIE β (11%), así mismo la interacción $\text{Antp}^{\text{I32A-H36A}}$ -EXD también fue detectada en embriones de *Drosophila* (Fig. 24B), y el análisis

estadístico indicó que no existe diferencia significativa entre la interacción de Antp^{I32A-H36A} con EXD y la interacción de Antp con TFIIEβ (Fig. 24C).

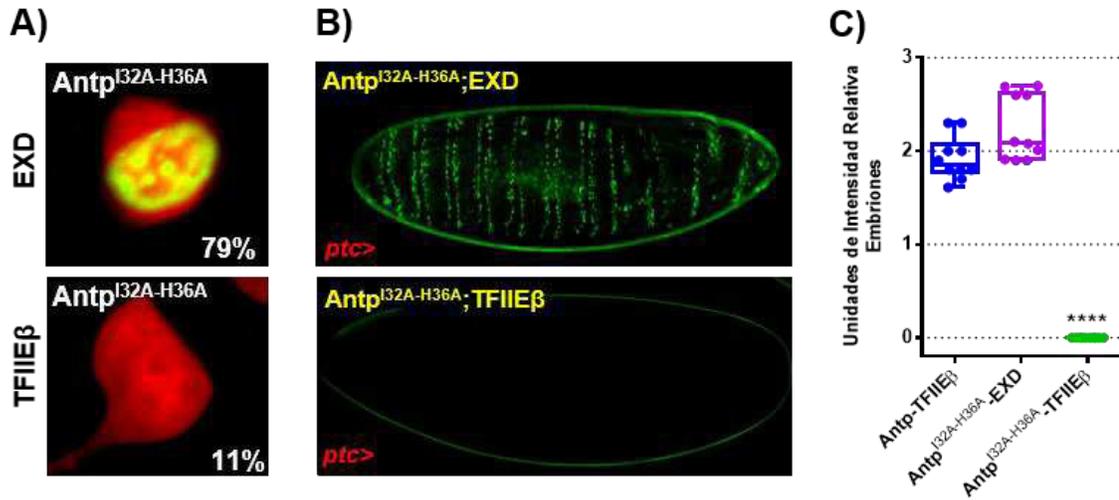


Figura 24. Interacción Antp^{I32A-H36A}-EXD en cultivo celular y embriones. Los ensayos de BiFC se basaron en la co-expresión de la doble mutante y EXD o TFIIEβ en células HEK293 y embriones. **A)** Se observó la interacción Antp^{I32A-H36A}-EXD en un 79% de las células transfectadas. Las co-transfecciones se realizaron junto con el plásmido pCAG-mCherry (fluorescencia roja) como control interno. **B)** Se observa la señal BiFC derivada de la interacción entre EXD y la doble mutante (fluorescencia verde, panel superior). **C)** Análisis estadístico de la interacción en embriones, la intensidad de fluorescencia se determinó mediante la función “Color Histogram” de ImageJ y para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey de comparación de medias ($p < 0.005$).

7.1.5 La doble mutación del HD en la hélice 2 no afectó las funciones de unión al DNA ni la capacidad transactivadora de Antp

Confirmada la capacidad de la doble mutante de interactuar con EXD, también se analizó si la doble mutación del HD no afectó otra de las funciones clave de Antp, como su capacidad de unión al DNA, en ensayos de transactivación en cultivo celular. Para analizar la capacidad transactivadora de la doble mutante de Antp se utilizaron los 11 sitios oligomerizados BS2 de unión a Antp (Figura 25).

Los ensayos de transactivación se basaron en la co-transfección de plásmidos pNPAC productores de Antp, AntpΔHD, Antp^{I32A-H36A} o TFIIEβ y el plásmido pGLH11 que codifica el gen reportero LUC (Luciferasa) (Fig 25A). Para ello, se construyó el plásmido pNPAC-Antp^{I32A-H36A} (Apéndice III), mientras que los plásmidos pNPAC-Antp, -AntpΔHD y -TFIIEβ previamente construidos en el laboratorio fueron caracterizados y

purificados de acuerdo a Cárdenas-Chávez 2007 y 2012. El ensayo de transactivación ilustrado en la Figura 25 muestra que la doble mutante (barras rojas) es capaz de activar la expresión del gen reportero a partir de los sitios de unión BS2 en niveles similares a Antp (barra azul), en contraste con Antp Δ HD (barras verdes) que al carecer del HD es incapaz de unirse al DNA para activar la transcripción. Además, no hay diferencia significativa en la actividad transcripcional de Antp^{I32A-H36A} en presencia o ausencia de TFIIE β . Estos resultados muestran que la capacidad de unión al DNA de Antp doble mutante no se vio afectada por lo que se confirma la importancia de los residuos 32 y 36 en la interacción de Antp con TFIIE β .

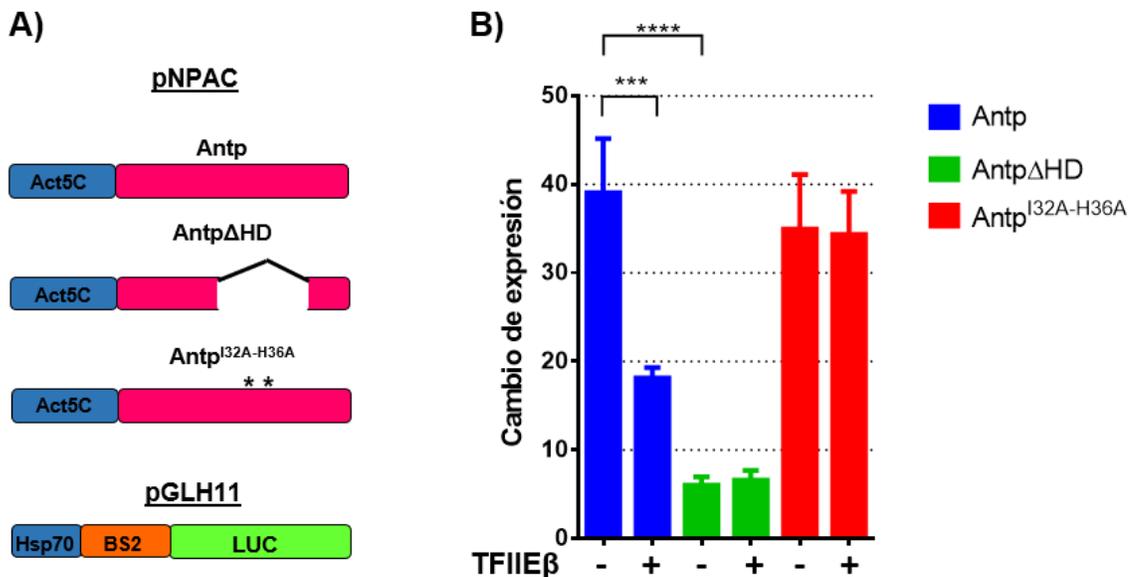


Figura 25. La doble mutante Antp^{I32A-H36A} es capaz de unirse al DNA y activar la transcripción. A) Esquematización de las construcciones en pNPAC que codifican a las proteínas Antp, Antp Δ HD y Antp^{I32A-H36A}, y del plásmido pGLH11 que contiene el gen reportero LUC bajo el control de 11 sitios oligomerizados BS2 a los que se une Antp. B) La gráfica muestra el cambio de expresión derivado de la actividad transactivadora de Antp y las mutantes en ausencia (-) o presencia (+) de TFIIE β . El vector pcopia- β gal fue co-transfectado para la normalización de los datos, para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey de comparación de medias ($p < 0.005$, $n=3$).

De manera conjunta, los resultados obtenidos mediante BiFC *in vivo* en embriones y discos imaginales junto con la confirmación de la localización nuclear de la doble mutante y su capacidad de interactuar con EXD y unirse al DNA, indican claramente que la interacción entre Antp y TFIIE β depende del HD de Antp, específicamente de los residuos 32 y 36 de la hélice 2.

7.2 Actividad funcional de la doble mutante Antp^{I32A-H36A} en las transformaciones homeóticas en *D. melanogaster*

Debido a la importancia de la participación esencial de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD en la interacción Antp-TFIIEβ *in vivo* en *Drosophila*, se decidió determinar el efecto de la mutación de dichos residuos en la actividad funcional de Antp en la involución de la cabeza, la transformación torácica T1-T2 y en la transformación antena-tarso. Para llevar a cabo estos ensayos ectópicos, primero se realizó la construcción del plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} con el fin de obtener líneas transgénicas. Se realizaron cruza genéticas que permitieron dirigir la expresión de Antp^{I32A-H36A} a embriones y discos imaginales de *Drosophila* tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos, y posteriormente se analizó el efecto de la mutación en las transformaciones homeóticas de Antp.

7.2.1 Construcción del plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}

En la Figura 26A se esquematiza la estrategia general mediante la cual se construyó el plásmido recombinante pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} que contiene la secuencia de Antp mutada en los residuos 32 y 36 del HD. La estrategia general se describe en detalle en la sección de Material y Métodos. La Figura 26B muestra la amplificación mediante PCR del fragmento de 1100 pb codificante a la proteína Antp^{I32A-H36A} (carriles 1 y 2). El fragmento Antp^{I32A-H36A} se clonó en el vector pCR-TOPO 2.1 para obtener el plásmido recombinante pTOPO-Antp^{I32A-H36A}.

La Figura 26C muestra la caracterización enzimática de dos clonas positivas de pTOPO-Antp^{I32A-H36A}, con los fragmentos esperados de la digestión con las enzimas de restricción diagnósticas. Con BamHI se obtuvieron los fragmentos esperados de 3953 y 1138 pb (carriles 1 y 7) y con PstI los fragmentos de 3140, 1190 y 761 pb (carriles 2 y 8). El fragmento Antp^{I32A-H36A} de 1100 pb digerido a partir de pTOPO-Antp^{I32A-H36A} mediante la enzima de restricción NotI, se subclonó en el vector pUASTattB previamente linearizado con NotI. La Figura 26D muestra la caracterización de una clona positiva de pUASTattB-

Antp^{I32A-H36A} con enzimas de restricción diagnósticas. BamHI liberó los fragmentos de 7773, 1504 y 779 pb (carril 1), HindIII los fragmentos de 6992 y 3037 pb (carril 2), y SmaI los fragmentos de 6097 y 3959 pb (carril 3). El plásmido de pUAST-attBAntp^{I32A-H36A} fue secuenciado para confirmar la presencia de la doble mutación en los residuos 32 y 36 del HD de Antp.

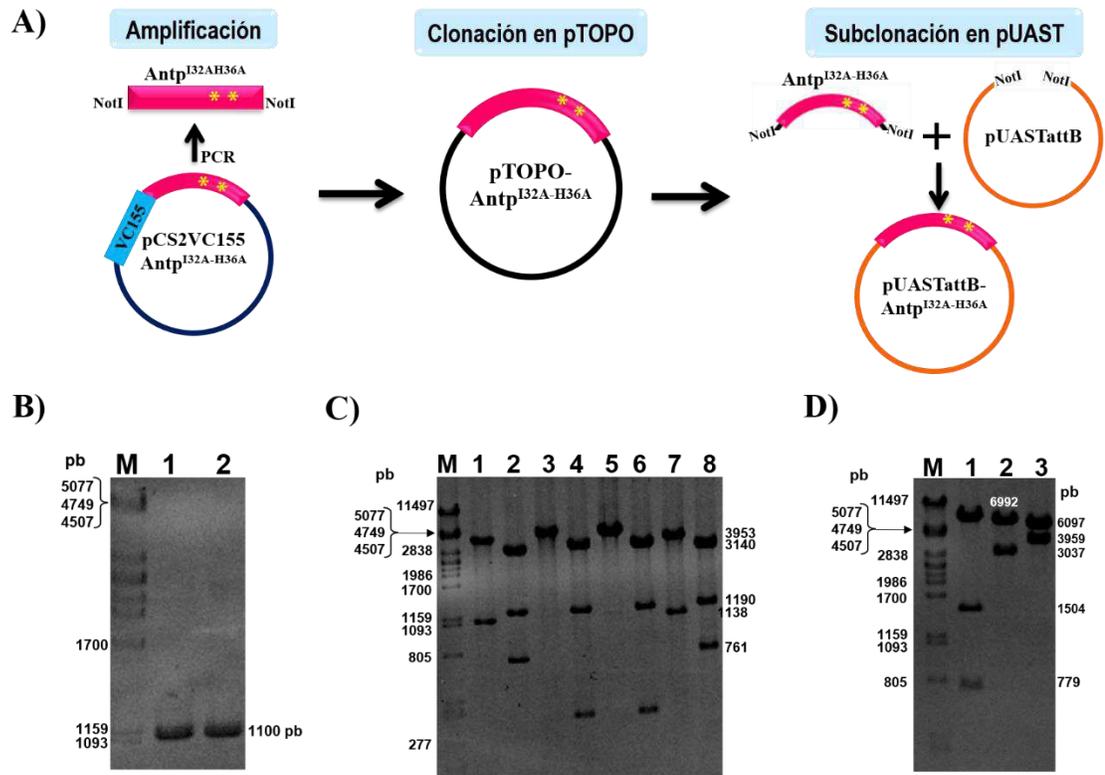


Figura 26. Construcción del plásmido recombinante pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}. Los productos de PCR y de las caracterizaciones enzimáticas fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. **A)** Diagrama de la estrategia de construcción del vector pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}. El fragmento Antp^{I32A-H36A} se amplificó por PCR a partir de pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}, posteriormente el producto de PCR fue clonado en el vector pCR-TOPO2.1, y finalmente Antp^{I32A-H36A} se subclonó en el vector pUAST usando los sitios de restricción NotI. **B)** Se muestran las bandas del fragmento amplificado de 1100 pb correspondientes a Antp^{I32A-H36A} (carriles 1 y 2). **C)** Caracterización del vector pTOPO-Antp^{I32A-H36A} con las enzimas de restricción BamHI (carriles 1 y 7) y PstI (carriles 2 y 8), en los carriles 3-6 se muestran las clonas negativas. **D)** Caracterización del vector pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} con las enzimas de restricción BamHI (carril 1), HindIII (carril 2) y SmaI (carril 3). Los carriles M corresponden al marcador de peso molecular λPstI.

7.2.2 Generación de líneas de moscas transgénicas UAS-Antp^{I32A-H36A}

Una vez confirmado el plásmido recombinante pUAST-Antp^{I32A-H36A} mediante caracterización enzimática y secuenciación, el vector se purificó mediante preparación a mediana escala con columnas de afinidad Qiagen (QIAGEN® Plasmid Handbook, January 1997) como se describe en Materiales y Métodos. El vector pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} se obtuvo con una pureza (relación 260/280) de 1.9 y una concentración de 1283.4 ng/μl, características óptimas para la microinyección de embriones. El plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A} se envió a la compañía BestGene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) para la obtención de moscas transgénicas. En la Tabla V se muestran las nueve líneas transgénicas obtenidas de la microinyección con el transgén Antp^{I32A-H36A} insertado en el cromosoma II o III. Las líneas obtenidas fueron numeradas y agregadas al stock general de líneas transgénicas de la Unidad de Biología del Desarrollo (UBD).

TABLA V. Líneas transgénicas de *D. melanogaster* obtenidas mediante microinyección del plásmido pUASTattB-Antp^{I32A-H36A}

Numeración en Stock UBD	Transgén	Cromosoma de Inserción	Marcador fenotípico
152D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	II	Alas rizadas
153D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	II	Alas rizadas
154D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	II	Alas rizadas
155D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
156D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
157D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
158D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas
159D	UAS-Antp ^{I32A-H36A}	III	Cerdas escutelares cortas

7.2.3 Los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp son necesarios para la actividad funcional de Antp

Una vez confirmada la participación de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD en la interacción Antp-TFIIEβ en embriones y discos de *Drosophila*, se decidió determinar el efecto de la mutación de dichos residuos en la actividad funcional de Antp en la

involución de la cabeza y la transformación torácica T1-T2. Se ha demostrado previamente que la expresión ectópica de Antp en la región anterior del embrión de *Drosophila* durante el desarrollo embrionario produce dos actividades funcionales: a) inhibición de la involución de la cabeza, y b) transformación homeótica del primer segmento torácico T1 por el segundo T2 (Gibson y Gehring, 1988). Para realizar los ensayos de dirección ectópica se dirigió la expresión de Antp o la doble mutante en embriones de *D. melanogaster* usando el potenciador *nullo-Gal4*. Los experimentos se realizaron con dos juegos independientes de cruzas genéticas utilizando tres líneas diferentes UAS-Antp^{I32A-H36A} de acuerdo con los esquemas de cruzas descritos en la sección de Materiales y Métodos.

De manera sorprendente, los fenotipos obtenidos de la expresión ectópica de la mutante Antp^{I32A-H36A} revelaron que el 71.8% de los embriones analizados presentaron involución de la cabeza normal (Fig. 27C), mientras que el 25.2% mostró un fenotipo intermedio de inhibición (Fig. 27D), y solamente en el 2.1% de los embriones analizados se observó la inhibición completa de la involución de la cabeza (Fig. 27E). Como se esperaba, los resultados del análisis de involución de la cabeza en cutículas embrionarias derivadas de la expresión ectópica de Antp wt mostraron los efectos fenotípicos severos de pérdida de involución de la cabeza (Fig. 27A). Las observaciones se clasificaron en tres fenotipos para la inhibición de la involución de la cabeza que son normal (-), intermedio (++) y completo (+++) de acuerdo con lo descrito por Gibson y Gehring 1988, y los porcentajes de los ensayos de involución de la cabeza de la Figura 27 se desglosan en la Tabla VI (panel izquierdo) y corresponden al promedio de resultados de tres líneas UAS-Antp^{I32A-H36A} diferentes.

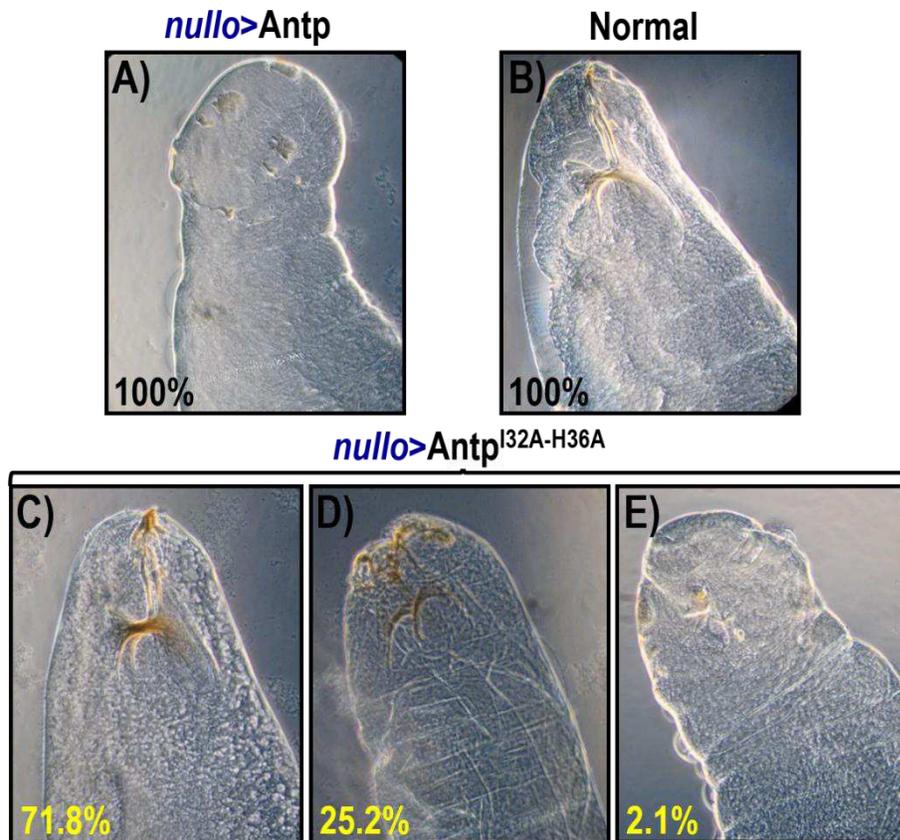


Figura 27. La mutante $Antp^{I32A-H36A}$ no afectó la involución de la cabeza en embriones de *D. melanogaster*. Antp y la doble mutante fueron sobreexpresadas usando el potenciado *nullo*-Gal4 y las cutículas fueron clasificadas de acuerdo a la descripción de Gibson y Gehring 1988. **A)** Embrión con inhibición de la involución de la cabeza causada por la expresión ectópica de Antp. **B)** Embrión con involución de la cabeza normal. **C)** La mutante $Antp^{I32A-H36A}$ no fue capaz de impedir la involución de la cabeza (71.8%). **D)** Fenotipo intermedio (25.2%). **E)** Inhibición de la involución de la cabeza (2.1%). Se presenta el promedio de los porcentajes obtenidos de dos cruas independientes.

En concordancia con la falta de inhibición de la involución de la cabeza, la transformación homeótica T1-T2 en la Tabla VI muestra que la expresión ectópica de la mutante $Antp^{I32A-H36A}$ presentó un fenotipo T1 normal en el 80.3% de los embriones, así como una transformación intermedia T1-T2 (barbilla reducida) en el 19.6%, y una transformación T1-T2 completa (barbilla ausente) solo en el 2.1% de los embriones. La falta de transformación homeótica obtenida con la doble mutante de Antp contrasta con la sobreexpresión de Antp que mostró la transformación homeótica completa T1 a T2 en todos los embriones analizados (barbilla ausente) como se esperaba.

TABLA VI. Efecto de la expresión ectópica de Antp y la mutante en involución de la cabeza y en la transformación T1-T2

	Inhibición de la Involución de la Cabeza				Transformación T1-T2			
	(+++)	(++)	(-)	n	Ausente	Reducida	Normal	n
Antp	100%	-	-	191	100%	-	-	100
Antp^{I32A-H36A} (a)	1.4%	17.1%	81.5%	140	1.4%	12.8%	87.2%	20
Antp^{I32A-H36A} (b)	3.1%	28.7%	68%	94	3.1%	21.2%	78.8%	23
Antp^{I32A-H36A} (c)	2%	30%	66%	84	2%	25%	75%	22
Promedio	2.1%	25.2	71.8		2.1	19.6	80.3	
Normal	-	-	100%	68	-	-	100%	60

En el análisis de la transformación torácica T1-T2 los fenotipos fueron determinados con base en el estado de la barbilla característica de T1 (Gibson y Gehring 1988) y se clasificaron en: ausente (transformación completa), reducida (transformación intermedia) o normal (sin transformación).

Los resultados obtenidos en conjunto muestran claramente que los residuos 32 y 36 en la hélice 2 del HD son necesarios para la actividad funcional de Antp para la inhibición de la involución de la cabeza, así como para las transformaciones torácicas T1-T2.

7.2.4 La mutación de los residuos 32 y 36 del HD de Antp no permitió la transformación antena-tarso

Debido a la importancia de los residuos 32 y 36 del HD de Antp en las dos actividades funcionales de inhibición de la involución de la cabeza y la transformación torácica T1-T2, nos preguntamos si la doble mutante de Antp podría afectar también la transformación antena-tarso, ya que la expresión ectópica de Antp en la antena es capaz de transformarla en tarso o estructuras con identidad del segundo par de patas. Para analizar el efecto de la mutante Antp^{I32A-H36A} en la transformación de la antena se dirigió la expresión mediante *dpp*- (2do segmento de la antena) y *dll*-Gal4 (3er segmento de la antena). Para ello, se probaron tres líneas UAS-Antp^{I32A-H36A} diferentes en dos cruces independientes, las cruces genéticas se llevaron a cabo de acuerdo con los esquemas descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados muestran que al dirigir la expresión de la doble mutante de la hélice 2 del HD (Antp^{I32A-H36A}) se observó una disminución en extremo evidente de la transformación homeótica utilizando ambos drivers (Fig. 28). Cuando se dirigió la mutante de Antp con *dll*-Gal4 solo se observó un ligero engrosamiento del segmento 3 de la antena (Fig. 28C) y cuando se utilizó el driver *dpp*-Gal4 se observó un fenotipo de la antena normal en todos los adultos analizados (Fig. 28E). Es decir, la dirección de Antp^{I32A-H36A} con dos diferentes potenciadores no causó ningún tipo de transformación homeótica. Estos hallazgos contrastan con los resultados esperados cuando se dirige la expresión del HD de Antp al 3er segmento de la antena mediante *dll*, el HD de Antp es capaz de transformar la antena en una pata casi completa, se observan claramente estructuras como fémur, tarso, tibia y uña (Fig. 28B). De la misma forma, al dirigir la expresión de Antp mediante *dpp*-Gal4 (Fig. 28D), se observa tejido con identidad del segundo par de patas a partir del 2do segmento de la antena como cerdas de la pata y la uña. Es importante mencionar que además de la transformación anteriormente descrita, Antp al ser dirigida con *dpp*-Gal4 causa otros efectos fenotípicos como cabeza y ojos más pequeños (Fig. 28D), falta de despliegue de las alas, patas trucas y defectos abdominales (Resultados no mostrados).

Los resultados de falta de transformación homeótica con la expresión ectópica de la mutante de Antp obtenidos con los dos potenciadores utilizados, demuestran claramente que los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp son necesarios para la transformación antena-tarso, y en conjunto con los análisis de involución de la cabeza y transformación torácica T1-T2, indican que los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp son estrictamente requeridos para la actividad funcional ectópica de Antp en *Drosophila*.

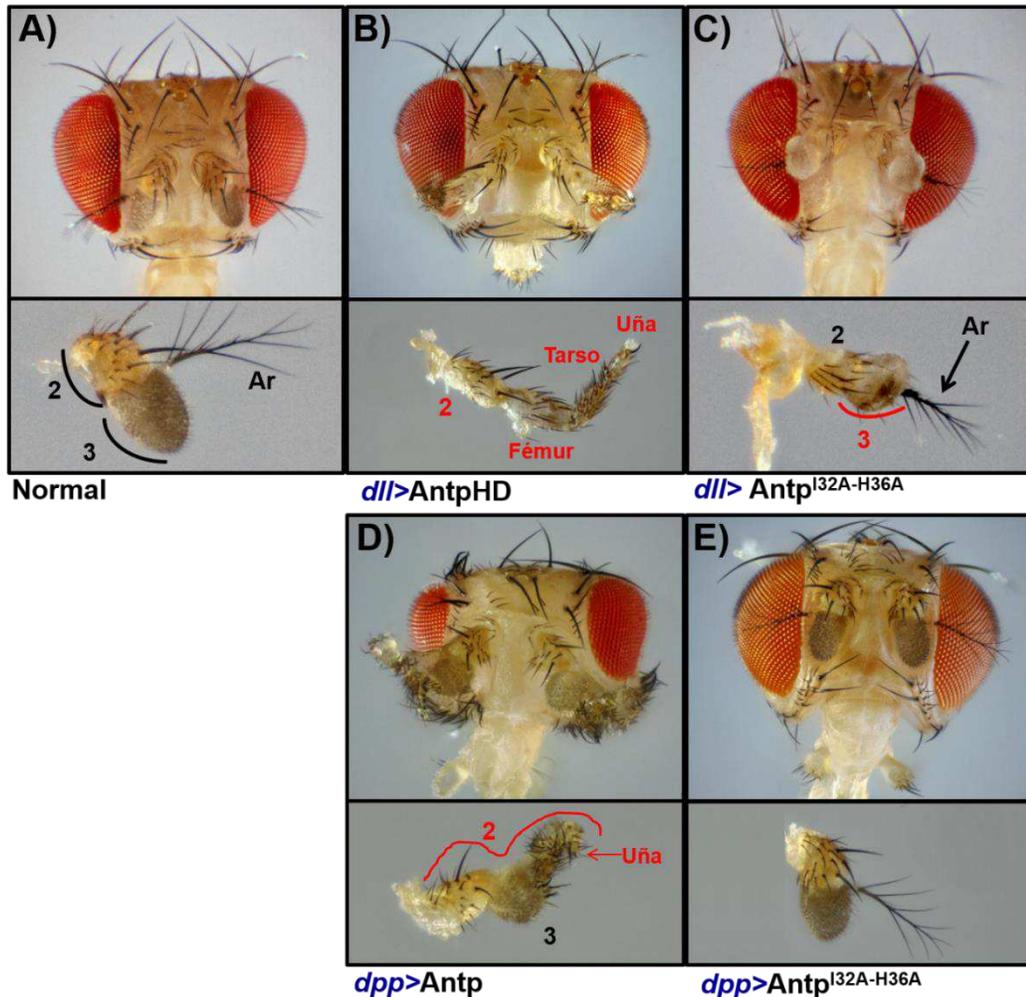


Figura 28. La expresión ectópica de la mutante $Antp^{I32A-H36A}$ afectó la transformación antena-tarso en adultos. La expresión de Antp y la doble mutante fueron dirigidas al 2do ($>dpp$) y 3er segmento antenal ($>dII$). **A)** Fenotipo normal de la antena. **B)** Transformación homeótica antena-tarso causadas por la sobreexpresión de Antp en el 3er segmento antenal. **C)** La expresión ectópica de la mutante $Antp^{I32A-H36A}$ causó una transformación leve con ligero engrosamiento del segmento antenal 3 y la base de la arista. **D)** Transformación homeótica antena-tarso causada por la sobreexpresión de Antp en el 2do segmento de la antena, se observan estructuras de pata como la uña, así como reducción de los ojos y cabeza. **E)** La sobreexpresión de la mutante $Antp^{I32A-H36A}$ no afectó la antena, se observa un fenotipo normal de todos los segmentos antenales. Los segmentos transformados se indican con líneas y números en rojo; 2, 2do segmento de la antena; 3, 3er segmento de la antena; Ar, arista.

7.3 La interacción Antp-TFIIE β es requerida para la transformación antena-tarso

Dada la importancia esencial de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD mostrada en la actividad funcional de Antp en las transformaciones homeóticas, se decidió analizar si la interacción con TFIIE β podría afectar la función homeótica de Antp en la transformación antena-tarso. Se confirmó el efecto de la interacción de Antp-TFIIE β

mediante co-expresión en la antena usando *dll-Gal4*, los esquemas de cruces de indican en la sección de Materiales y Métodos. Para estar seguros de la presencia de la interacción Antp-TFIIE β se seleccionaron *in vivo* las larvas que mostraron la fluorescencia de Venus derivada de esta interacción y estas larvas se transfirieron a viales para permitir su desarrollo hasta la eclosión de adultos. En el caso de la mutante de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD se analizaron todos los adultos eclosionados.

De forma sorprendente, la interacción entre AntpHD y TFIIE β causó una transformación homeótica completa de la antena, se observan claramente las estructuras de pata con la presencia de fémur, tarso y uña en la Figura 29A. Esta transformación, causada por la interacción AntpHD-TFIIE β es prácticamente igual que la obtenida al expresar únicamente el HD de Antp en la antena como se indica en la Tabla VII y previamente en la Fig. 28B. En contraste, la co-expresión de TFIIE β junto con la mutante del HD Antp^{I32A-H36A} en la antena muestra que la transformación homeótica antena-tarso fue drásticamente reducida, observando solo un ligero engrosamiento del segmento 3 (Fig. 29B). Este resultado es muy similar al efecto de la expresión de la mutante de Antp^{I32A-H36A} sola (Tabla VII) y que fue descrito previamente en la Figura 29C. Cabe mencionar que la expresión únicamente de TFIIE β en la antena no generó ningún grado de transformación en la antena (Tabla VII).

Estos resultados claramente muestran que la interacción Antp-TFIIE β es requerida para la función homeótica de Antp en la transformación antena-tarso. Así mismo, la disminución drástica de la transformación al co-expresar TFIIE β y la mutante Antp^{I32A-H36A} confirma que los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD son residuos clave para la interacción proteína-proteína entre Antp y TFIIE β , y que esta interacción promueve la actividad funcional de Antp para la transformación antena-tarso.

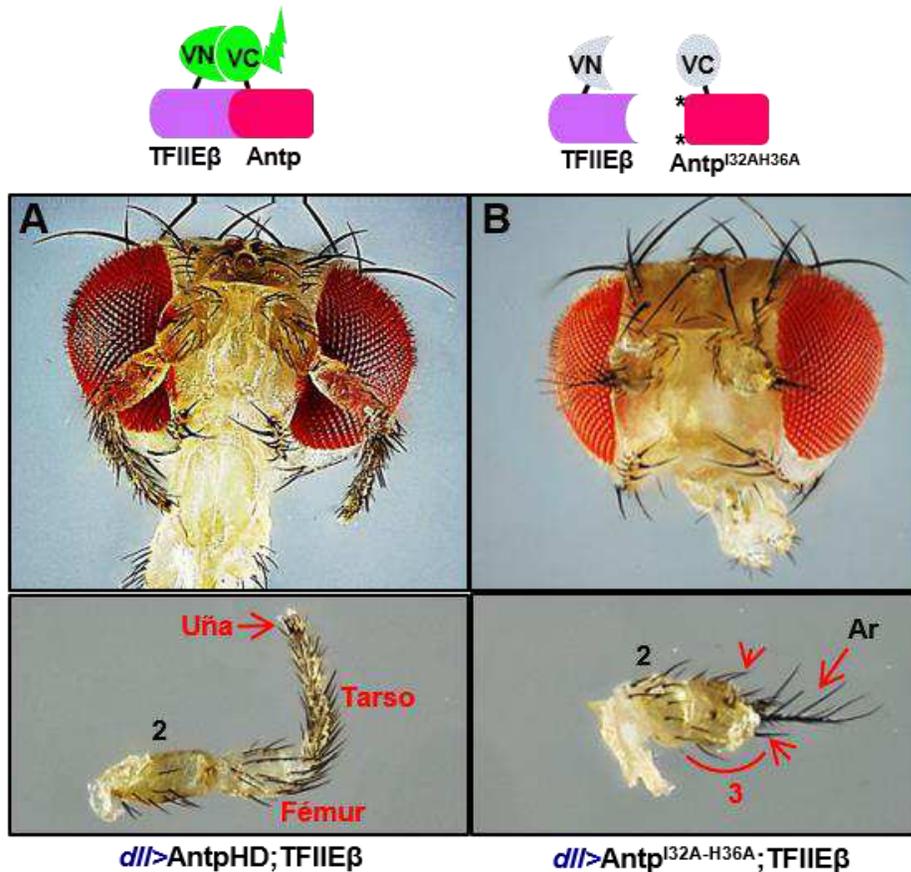


Figura 29. La interacción AntpHD-TFIIIE β es requerida para la transformación antena-tarso. Las proteínas de interacción AntpHD-TFIIIE β fueron dirigidas al 3er segmento antenal utilizando *dll*-Gal4. **A)** La interacción AntpHD-TFIIIE β permitió la transformación homeótica completa de la antena en una pata. **B)** La falta de interacción entre la mutante Antp^{I32A-H36A} y TFIIIE β disminuyó drásticamente la transformación homeótica de la antena, se observa solo un leve engrosamiento del 3er segmento de la antena. Los segmentos transformados se indican mediante líneas y leyendas en rojo. 2, 2do segmento de la antena; 3, 3er segmento de la antena; Ar, arista.

TABLA VII. Cuantificación del nivel de transformación de la antena

	AntpHD	Antp ^{I32A-H36A}	AntpHD;TFIIIE β	Antp ^{I32A-H36A} ;TFIIIE β	TFIIIE β
Nivel de transformación	+++	+	+++	+	-

(+++) indica un nivel fuerte, (++) indica un nivel débil y (-) indica ausencia de transformación

Adicionalmente, se compararon los niveles de expresión de las líneas UAS utilizadas en esta tesis al dirigir las con *ptc*-Gal4, la detección se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia utilizando anti-Antp4C3 para detectar Antp y las mutantes, y anti-GFP para detectar el extremo VN fusionado a TFIIIE β . Como se muestra en la Figura 30

se detectó la expresión de las líneas UAS-VCAntp, -Antp^{I32A-H36A} y VCAntp^{I32A-H36A} en la región anterior de los parasegmentos embrionarios, también se aprecia la detección de la proteína endógena en los segmentos torácicos 1, 2 y 3 (Fig. 30A). La expresión de VNTFIIIE β se observa sólo en los parasegmentos (Fig. 30A). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia mediante ImageJ (Función color histogram) mostró que los niveles de expresión de las líneas UAS son iguales o más bajos que la proteína endógena (Fig. 30B). Estos resultados nos indican que no se produjo una sobre-expresión de las proteínas analizadas, es decir, los análisis de interacción Antp-TFIIIE β se llevaron a cabo con niveles de expresión similares a los endógenos.

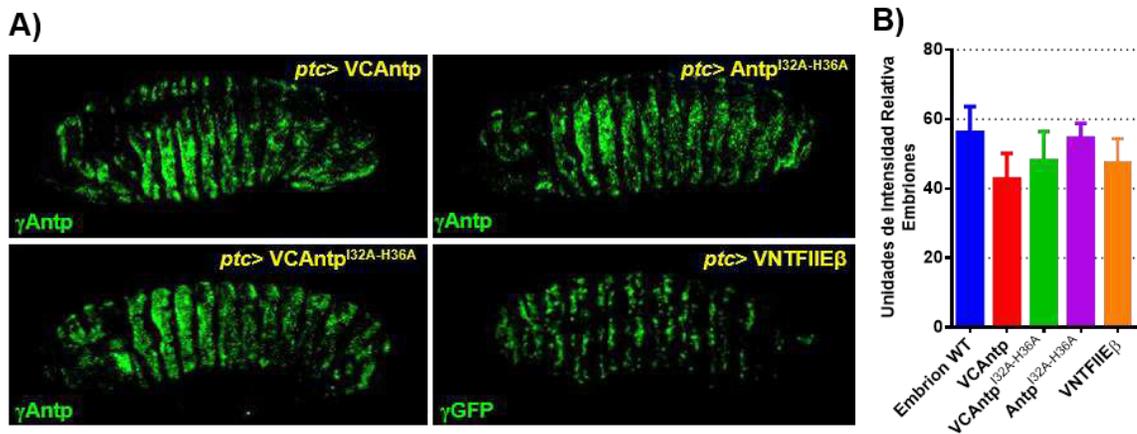


Figura 30. Niveles de expresión de Antp y TFIIIE β detectados mediante inmunofluorescencia. Las proteínas fueron dirigidas a la región anterior de cada parasegmento usando *ptc*-Gal4. **A)** La inmunodetección de VCAntp, Antp^{I32A-H36A} y VCAntp^{I32A-H36A} se realizó utilizando γ Antp4C3 y VNTFIIIE β utilizando γ GFP. **B)** Los niveles de expresión de las líneas UAS se cuantificaron con la función “Color Histogram” de ImageJ y se compararon con la expresión endógena de Antp. Las unidades de intensidad relativa se cuantificaron a partir de 5 embriones para cada caso.

7.4 Los factores de transcripción TBP, Bip2, TFIIIB, TFIIA γ , EXD y AbdB afectan la interacción Antp-TFIIIE β

Los ensayos *in vivo* de interacción Antp-TFIIIE β , así como de expresión ectópica indican claramente la importancia de la interacción dimérica Antp-TFIIIE β en las transformaciones homeóticas de Antp, por lo que es posible que para realizar todas las múltiples actividades funcionales de Antp se requiera la presencia de interacciones triméricas o multiméricas, ya sea de forma simultánea, o de forma competitiva impidiendo la formación del dímero Antp-TFIIIE β . Para analizar esta posibilidad, se decidió determinar en cultivo celular el efecto de otros factores transcripcionales en la dinámica

de la interacción Antp-TFIIE β . Para ello, se realizaron ensayos de competencia BiFC mediante la co-transfección de plásmidos pCS2 con VN-TFIIE β y VC-Antp, así como con los plásmidos pPAC que contienen una serie de 6 factores transcripcionales (FTs), entre ellos los GTFs; TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , y las homeoproteínas; EXD y AbdB. Los plásmidos pPAC utilizados fueron obtenidos previamente en el laboratorio y fueron amplificados y caracterizados enzimáticamente de acuerdo con Cárdenas-Chávez 2012 antes de ser transfectados en células.

7.4.1 Los GTFs TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , así como las homeoproteínas EXD y AbdB interfieren en la interacción Antp-TFIIE β en cultivo celular

La co-expresión únicamente de las proteínas de fusión VN-TFIIE β y VN-Antp resultó como se esperaba en la reconstitución de la actividad de Venus (fluorescencia amarilla) en un 81% de las células transfectadas (Fig. 31A). En la Figura 31B-G se muestra la co-expresión del dímero de interacción Antp-TFIIE β junto con alguno de los GTFs o homeoproteínas. El efecto de los GTFs y homeoproteínas en la interacción Antp-TFIIE β , resultó, en todos los casos, en una disminución del porcentaje de interacción Antp-TFIIE β correspondiente al 81%. La adición de TBP mostró una disminución hasta un 56%, Bip2 hasta un 43%, EXD hasta un 49%, TFIIB hasta un 51%, TFIIA γ hasta un 57% y AbdB hasta un 41%. El análisis estadístico de comparación de medias muestra diferencia altamente significativa entre el porcentaje de la interacción dimérica Antp-TFIIE β (Fig. 32, barra magenta) y los porcentajes de interacción al añadir Bip2, TFIIB, EXD y AbdB (Fig. 32, barras azules) y una diferencia significativa al añadir TBP y TFIIA γ .

Los resultados del ensayo de BiFC competitivo sugieren que todos los factores transcripcionales adicionados como competitivos interfieren en la interacción entre Antp y TFIIE β , y ya que todos los FTs adicionados disminuyeron la interacción Antp-TFIIE β aproximadamente a la mitad, estos resultados sugieren una participación probable de los GTFs TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , así como las homeoproteínas EXD y AbdA en la interacción dimérica Antp-TFIIE β que podría derivar de la formación de complejos triméricos.

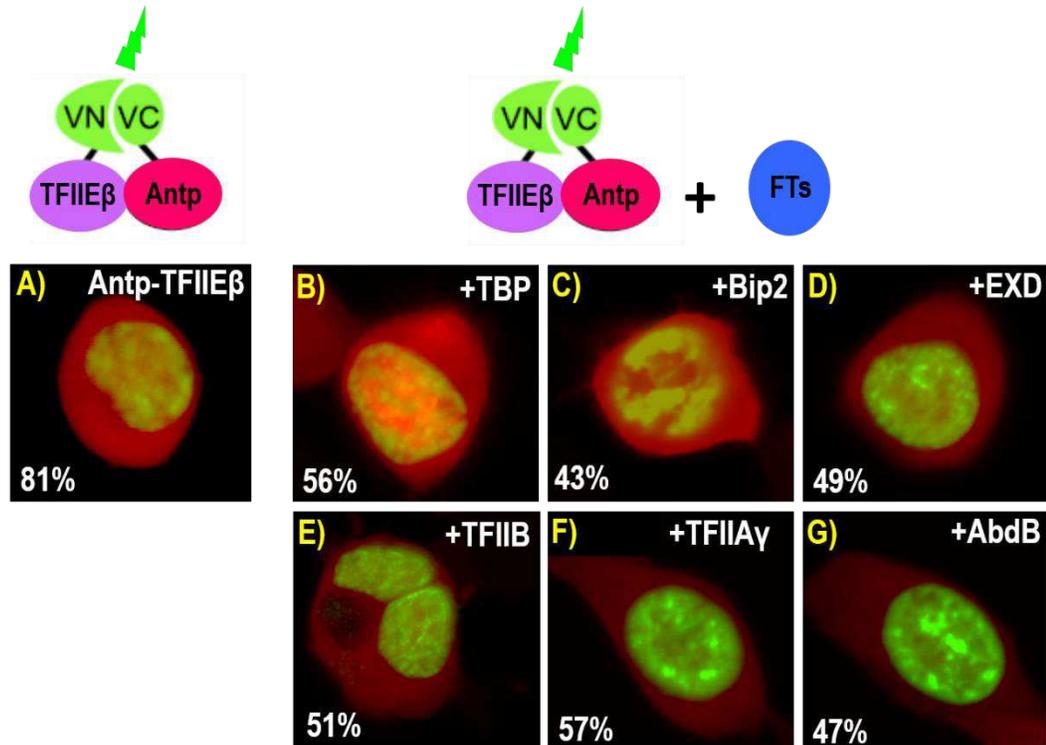


Figura 31. TBP, Bip2, TFIIB, TFIIA γ y las homeoproteínas AbdB y EXD interfieren en la interacción proteína-proteína Antp-TFIIE β . Los ensayos BiFC competitivos se basaron en la co-expresión en todos los casos de las proteínas VC155-Antp y VN-TFIIE β con y sin adición de los factores transcripcionales. **A)** El porcentaje de interacción entre Antp y TFIIE β es de 81% sin la adición de otros factores. **B)** Los factores transcripcionales adicionados se expresaron sin Venus a partir de plásmidos pPAC. Como control interno de transfección se utilizó el plásmido pCAG-Cherry en todos los casos (fluorescencia roja). La fluorescencia de Venus en verde indica la interacción proteína-proteína Antp-TFIIE β en el núcleo de las células transfectadas.

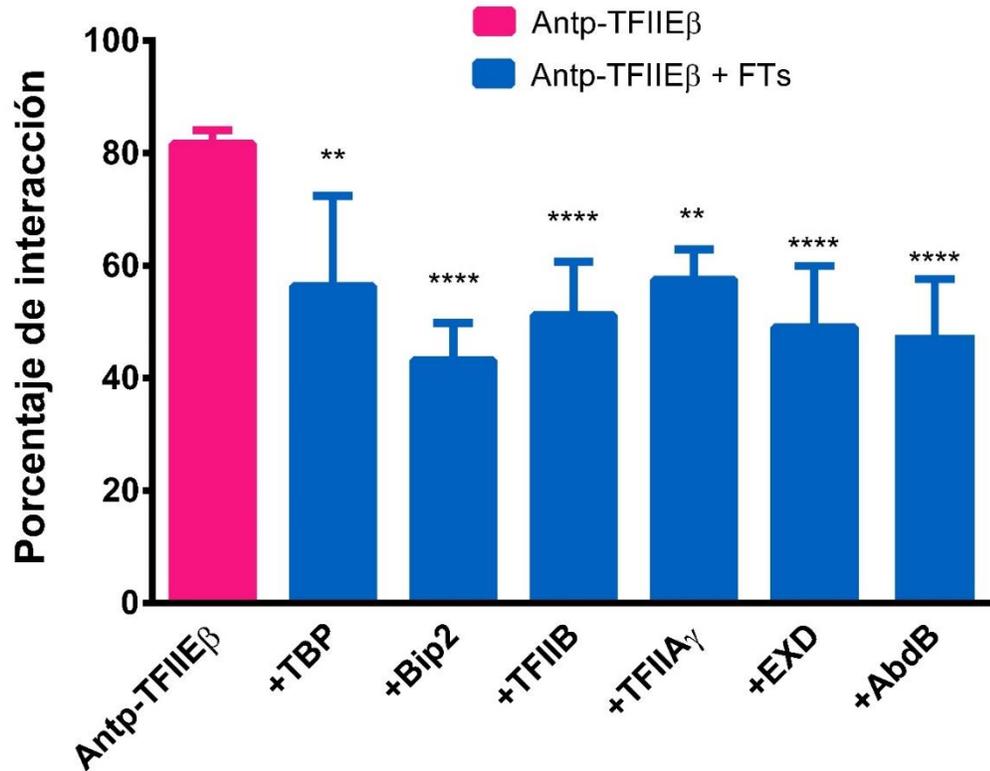


Figura 32. Efecto de otros FTs en la interacción Antp-TFIIΕβ mediante BiFC competitivo. Se comparó el porcentaje de interacción obtenido al añadir cada uno de los factores transcripcionales (barras azules) respecto al porcentaje de interacción Antp-TFIIΕβ (barra magenta). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc Tukey de comparación de medias. El análisis estadístico mostró que existe una diferencia altamente significativa (****) entre la interacción Antp-TFIIΕβ en presencia de Bip2, TFIIB, EXD y AbdB. También se observa una diferencia significativa (**) cuando se añade TBP y TFIIAγ ($p < 0.005$).

8. DISCUSIÓN

Para analizar la relación entre las homeoproteínas y la maquinaria basal de transcripción, nos centramos en describir los contactos específicos que ocurren en la interfase proteína-proteína entre Antp y TFIIE β , así como determinar el papel funcional de esta interacción en *Drosophila*. Los resultados del presente trabajo demuestran que la interacción directa entre Antp y TFIIE β depende de las posiciones 32 y 36 del HD de Antp *in vivo*. Además, esta interacción es requerida para las actividades funcionales del Antp en las transformaciones homeóticas.

Análisis previos de mutagénesis sitio-dirigida del HD en cultivo celular indicaron que la interacción de Antp con TFIIE β ocurre a través de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD de Antp (Altamirano-Torres, 2014). Los resultados mostraron *in vivo* en *Drosophila* muestran que la mutación doble de estos residuos abolió la interacción Antp-TFIIE β tanto en embriones como en discos imaginales. Para corroborar esta interacción, confirmamos mediante la inmunodetección nuclear de la mutante que la falta de interacción con TFIIE β se debe a la mutación de los residuos en la hélice 2 de Antp, y no a la incorrecta localización de la proteína. Estos resultados apoyan estudios previos que muestran que la señal de localización nuclear (SLN) de Antp se encuentra en los residuos 43-58 de la hélice 3 (Joliot *et al.*, 1991; Derossi *et al.*, 1994), por lo que la doble mutación en la hélice 2 de Antp no comprometió la importación de la proteína mutante al núcleo. Adicionalmente, probamos que la doble mutante Antp^{I32A-H36A} mantiene otras funciones clave de Antp como su interacción con el cofactor EXD o la capacidad de unión con el DNA. Estos controles nos permiten corroborar que estos residuos en la hélice 2 son cruciales para la interacción de Antp con TFIIE β . Es importante indicar que, dado que los residuos 32 y 36 del HD se encuentran en la cara opuesta de la unión del HD con el DNA y están físicamente expuestos para llevar a cabo contactos con otras proteínas, y dado que se ha demostrado que TFIIE β también interactúa con Scr, Ubx, AbdA y AbdB, los HDs de estas proteínas podrían también estar involucrados en la interacción probablemente a través de los residuos 32 y 36.

Aunque nuestros resultados muestran claramente que la interacción Antp-TFIIE β depende de los residuos 32 y 36 de la hélice 2, no excluyen la posibilidad de que otras posiciones en la hélice 2 o incluso en el lazo entre las hélices 1 y 2 (lazo intermedio) participen en la interacción con TFIIE β . Existen reportes en los que se determinó que las posiciones 30 y 33, además de las posiciones 32 y 36, permiten la interacción entre los HDs de las proteínas POU Oct-1 y Oct-2 y el factor de transactivación VP16 del virus del Herpes Simple (Lait *et al.*, 1992; Pomerantz *et al.*, 1992). Además de la hélice 2, también se ha establecido la importancia de la hélice 1 en interacciones proteína-proteína como Antp-Eyless o la dimerización de Scr, y en ambos casos se confirmó la importancia de la posición 19 de la hélice 1 (Plaza *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 2012). Lo anterior en conjunto con nuestros resultados postulan que, además de su capacidad de unión al DNA y RNA (Gehring *et al.*, 1995; Dubnau and Struhl, 1996) el HD de Antp funciona como una plataforma de interacción con diversas proteínas desde la cara opuesta al DNA (hélices 1 y 2), mediante la cual puede llevar a cabo el control de la transcripción de sus genes blanco.

Ya que el mecanismo molecular preciso de la regulación transcripcional de Antp no es del todo claro, intentamos arrojar luz en este proceso determinando si las posiciones I32 y H36 son importantes para la actividad funcional de Antp. Cuando se expresa de manera ectópica en la región cefálica de embriones en desarrollo, Antp inhibe la involución de la cabeza y transforma el segmento pro-torácico T1 en T2 en larvas, y transforma las antenas en patas meso-torácicas (T2) en adultos (Schnewly, 1987). La expresión ectópica de la mutante Antp^{I32A-H36A} demostró que los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD son esenciales para la función de Antp ya que la doble mutante no fue capaz de inhibir involución de la cabeza ni de transformar los segmentos torácicos las antenas. En análisis de función similares se observó que cuando se muta el motivo YPWM de Antp se pierde la capacidad de transformar la antena y que la posición 19 en la hélice 1 del HD es necesaria para la función homeótica de Scr (Papadopoulos *et al.*, 2011; Papadopoulos *et al.*, 2012).

Para determinar la relevancia funcional de la interacción Antp-TFIIE β , dirigimos la co-expresión de la interacción Antp-TFIIE β a la antena (visualizada por BiFC en larvas vivas) y observamos que se generó una fuerte transformación de la antena en pata, y por el contrario, la expresión de TFIIE β junto con la doble mutante Antp^{I32A-H36A} mostró una drástica reducción de la transformación de la antena prácticamente al mismo nivel que cuando dirigimos de manera individual la doble mutante. En contraste, la función de Antp se ve afectada de manera diferente cuando interactúa con otras homeoproteínas, la interacción de los HDs de Antp y AbdB en la antena impidió la transformación antena-tarso (Adashi *et al.*, en preparación), un efecto similar se observó con la interacción Antp-Eyeless en la que se impidió la reducción del ojo por Antp (Plaza *et al.*, 2008), además ambas interacciones dependen de la posición G19 de la hélice 1 del HD. La interacción de homeoproteínas con una diversidad de factores de transcripción (otras homeoproteínas o GTFs) tiene funciones también diversas, y en el caso de la interacción proteína-proteína de Antp con TFIIE β cambios sutiles en dos aminoácidos del HD ocasiona efectos drásticos que a su vez afectan el control transcripcional y las propiedades funcionales de Antp en la transformación antena-tarso.

Ya que nuestros resultados *in vivo* de interacción y expresión ectópica indican la importancia de la interacción dimérica Antp-TFIIE β en la función de Antp, es posible que para realizar las diversas actividades de Antp se requiera la formación de complejos triméricos o multiméricos. Analizamos esta posibilidad con ensayos de competencia BiFC co-expresando el dímero Antp-TFIIE β junto con los GTFs; TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , y las homeoproteínas; EXD y AbdB en cultivo celular. Este ensayo fue previamente descrito para determinar candidatos de interacción con homeoproteínas en *Drosophila* (Baeza *et al.*, 2015) y se adaptó en el laboratorio para el análisis en cultivo celular de posibles interacciones triméricas. Observamos que todos los FTs probados ocasionaron una disminución del porcentaje de interacción Antp-TFIIE β (81%) de manera altamente significativa; Bip2 (43%), TFIIB (51%), EXD (49%) y AbdB (41%), o significativa; TBP (56%) y TFIIA γ (57%). El hecho de que la interacción no haya sido abatida en ninguno de los casos indica que el FT adicional podría estar interactuando con Antp, TFIIE β o ambos sin inhibir por completo la interacción dimérica Antp-TFIIE β . Estos resultados

postulan la posibilidad de la formación de complejos triméricos entre Antp-TFIIE β y los FTs añadidos. Análisis previos de interacciones diméricas han mostrado que Bip2, TBP, EXD y AbdB interactúan con Antp (Prince *et al.*, 2008; Cárdenas-Chávez, 2012), y que TFIIE β es capaz de unirse con AbdB y TBP (Yokomori *et al.*, 1998; Baeza *et al.*, 2015). EXD y Bip2 se unen únicamente a Antp, aunque esta reportada la interacción de TFIIE β con el holo-complejo TFIID, de manera específica con dTAF_{II}60 (Maxon *et al.*, 1994; Hisatake *et al.*, 1995), por lo que existe la posibilidad de que Bip2 también interactúe con TFIIE β . AbdB y TBP se unen a ambos miembros del dímero Antp-TFIIE β convirtiéndolos en los candidatos más fuertes para formar complejos triméricos con Antp y TFIIE β . En el caso de TBP recientemente se confirmó la interacción trimérica Antp-TBP/TFIIE β mediante BiFC/FRET en cultivo celular junto con las interacciones triméricas Antp-TBP/EXD y Antp-TBP/Bip2 (Jiménez-Mejía, 2018). De acuerdo con ensayos de BiFC en cultivo celular, los GTFs TFIIB y TFIIA γ no interactúan con Antp, y no existen reportes de su interacción con TFIIE β , resulta interesante que también hayan afectado la interacción, por lo que es necesario realizar ensayos que permitan confirmar si realmente éstos GTFs participan en complejos proteicos con Antp. El ensayo de BiFC competitivo no permite confirmar ni descartar la participación de ninguno de los FTs en la formación de complejos triméricos con Antp-TFIIE β , por lo que es necesaria la realización de ensayos específicos de interacciones triméricas, tal como BiFC/FRET tanto en cultivo celular como *in vivo*.

En conjunto, nuestros resultados claramente muestran que la interacción entre el HD de Antp y TFIIE β contribuye con la regulación transcripcional y las actividades funcionales de Antp, por lo que surge entonces la pregunta de cómo es que esta interacción contribuye con las actividades de Antp a nivel del PIC. El factor general de transcripción TFIIE es un heterotetrámero que consiste en dos subunidades α y dos subunidades β , TFIIE se encarga de regular las actividades de TFIIH como cinasa en la fosforilación del CTD de la RNA Pol II, ATPasa y DNA helicasa (Drapkin *et al.*, 1994; Ohkuma *et al.*, 1994). De manera particular, TFIIE β se une tanto a TFIIB como TFIIF para contribuir en actividades como apertura y estabilización del promotor, así como la transición de la etapa de iniciación a elongación de la transcripción. Por lo tanto, la interacción Antp-TFIIE β podría representar

un punto de control para la modulación de factores de transcripción involucrados en funciones de activación o represión. Actividades de represión de la interacción Antp-TFIIE β podrían implicar desestabilización del PIC o la inhibición de las funciones de TFIIE β en la promoción de TFIIH como ATPasa, cinasa o helicasa. Por ejemplo, mediante ensayos co-inmunoprecipitación se ha determinado que el FT de dedos de zinc Krüppel (Kr), proteína de segmentación de *Drosophila* en estadios tardíos del desarrollo, interactúa de forma dimérica con TFIIE β y esta interacción tiene una función represora en ensayos de transcripción *in vitro* (Sauer *et al.*, 1995). Otro ejemplo de represión transcripcional a nivel de la maquinaria basal está representado por la homeoproteína Even-skipped (Eve), factor primario de regla de par que actúa como represor en la embriogénesis de *Drosophila*, Eve interactúa con TBP, y evidencia *in vitro* indica que esta homeoproteína bloquea la transcripción mediante su unión con TBP evitando que ésta se una a TFIID o a la caja TATA en el promotor (Li y Manley, 1998). Dado lo anterior, y teniendo en cuenta que Antp determina el destino de patas mesotorácicas reprimiendo la transcripción de genes determinantes de la antena como *Hth* y *Dll* en discos imaginales (Cásares y Mann, 1998; Emerald *et al.*, 2003), podría ser razonable pensar que la interacción Antp-TFIIE β participa en actividades represoras para estos casos y otros genes blanco de represión. Los ensayos de transactivación en los que la presencia de TFIIE β redujeron a un 47% la expresión del reportero LUC por parte de Antp también respaldan la noción represora, no obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos para definir con claridad el mecanismo de acción de esta interacción durante la transcripción génica.

Por otra parte, también podría ser posible que Antp facilite la llegada de TFIIE β al PIC y a su vez el subsecuente reclutamiento o la activación de TFIIH, permitiendo así una eficiente transición hacia la elongación de la transcripción. La mutación de *Med19* en discos imaginales de halterio demostró que la proteína Med19 es necesaria para la activación de genes blanco de Ubx (Boube *et al.*, 2014), y cuando Kr se une de forma monomérica a TFIIB activa la transcripción *in vitro* (Sauer *et al.*, 1995). Más aun, el cofactor positivo 4 (PC4) de humanos y *C. elegans* es un FT que permite la transcripción dependiente de activadores, y en la presencia de TFIIE β , PC4 promueve la transcripción basal y en curso durante la transición de inicio a elongación promoviendo la función de

TFIIE β para estabilizar la región abierta del promotor (Akimoto *et al.*, 2014). Es necesario determinar el mecanismo molecular fino mediante el cual la interacción entre Antp y TFIIE β contribuye con la regulación de la transcripción ya sea activando, reprimiendo, o ambas.

En esta tesis, se presenta de forma clara, la evidencia *in vivo* que demuestra la interacción proteína-proteína de TFIIE β con dos residuos de la hélice 2 del HD de Antp que además son clave para la función homeótica de Antp, y esta interacción es esencial en la transformación antena-tarso. Estos resultados proveen conocimiento valioso sobre la interface entre el HD de Antp y TFIIE β para evaluar hasta qué punto esta interacción se traduce en propiedades funcionales durante la activación o represión de genes blanco. Debido a la alta conservación de los HDs de las proteínas Hox, el papel de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD puede extrapolarse a la interacción de TFIIE β con otras proteínas, como Scr, Ubx y AbdB (Bondos *et al.*, 2006; Hudry *et al.*, 2012; Baeza *et al.*, 2015). Nuestros resultados también abren la posibilidad de explorar la interacción de Antp con otros factores generales de transcripción en forma dimérica o trimérica como parte del interactoma Hox que dirige el control genético del desarrollo en *Drosophila*.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis sobre la interacción Antp-TFIIE β permitieron concluir:

1. La hélice 2 del HD de Antp interactúa con el Factor General de Transcripción TFIIE β , específicamente a través de los residuos 32 y 36 *in vivo* en embriones y discos imaginales de *Drosophila*.
2. La doble mutación del HD en la hélice 2 no afectó las funciones de Antp en la internalización al núcleo, unión al DNA, capacidad de activación de la transcripción e interacción molecular proteína-proteína con EXD.
3. La doble mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice 2 del HD afectó severamente la actividad funcional de Antp *in vivo* en la involución de la cabeza y transformación T1-T2 en embriones, así como en la transformación antena-tarso en adultos.
4. La interacción AntpHD-TFIIE β es necesaria para la actividad funcional homeótica de Antp en la transformación antena-tarso.
5. Los GTFs TBP, Bip2, TFIIB y TFIIA γ , así como las homeoproteínas EXD y AbdB afectan la interacción proteína-proteína entre Antp y TFIIE β en cultivo celular postulándolos como probables colaboradores triméricos de la interacción Antp-TFIIE β .

10. PERSPECTIVAS

El trabajo desarrollado en esta tesis demostró por primera vez que la interacción proteína-proteína de TFIIE β con Antp depende de dos residuos de la hélice 2 del HD *in vivo* en *Drosophila* y son clave para la función homeótica de Antp. Así mismo, se demostró que la interacción Antp-TFIIE β es esencial en la transformación antena-tarso y se presenta evidencia de la probable formación de complejos triméricos con otros FTs; lo abre la posibilidad de una nueva serie de interrogantes para:

- Analizar el efecto de la doble mutante de la hélice 2 del HD en la capacidad activadora o represora de Antp sobre sus genes blanco *in vivo*.
- Establecer si la interacción Antp-TFIIE β posee propiedades funcionales durante la activación o represión de genes blanco de Antp para el control genético del desarrollo en *Drosophila*.
- Determinar la existencia de interacciones triméricas entre Antp y otras homoproteínas y/o GTFs mediante FRET basado en BiFC en cultivo celular e *in vivo*, así como determinar si estas afectan la actividad funcional de Antp.
- Definir la dinámica de la interacción Antp-TFIIE β con el PIC mediante ensayos de transcripción *in vitro*.

Dilucidar dichas interrogantes sumará información valiosa a la determinación de los mecanismos moleculares finos que dan lugar a la especificidad funcional de las homeoproteínas durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

APÉNDICE I

Tabla VIII. Listado de oligonucleótidos diseñados

Nombre	Secuencia	T_m °C
VenusAntp5'	5' GCGGCCGCATCTCCCGGGGGATCCACC 3'	73.3
AntpNot5	5' GCGGCCGCATGACGATGAGTACAAAC 3'	48.8
AntpNot3	5' GCGGCCGCCGATCCTACTGCG 3'	54.3
ATTB5	5' CTCTGAATAGGGAATTGGG 3'	49.7
ATTB3	5' GTCACACCACAGAAGTAAGGTTCC 3'	57.4

APÉNDICE II

Tabla IX. Líneas de moscas transgénicas utilizadas en esta tesis

Nombre y #stock UBD	Descripción	Cromosoma/Marcador fenotípico	Obtención
<i>dll</i>-Gal4 (113D)	Línea productora que expresa Gal4 bajo el control del potenciador <i>distalless</i> en el primordio antenal del disco ojo-antena.	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center #3083
<i>dpp</i>-Gal4 (54D)	Línea productora que expresa Gal4 bajo el control del potenciador de <i>decapentaplegic</i> en la línea medio-ventral del disco de ala	Ch III <i>TM3</i> y <i>Tb</i> Cerdas escutelares cortas Cuerpo pequeño y grueso	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center #7007
<i>ptc</i>-Gal4 (62D)	Línea productora que expresa Gal4 bajo el control del potenciador de <i>patched</i> , en la región anterior de cada parasegmento embrionario	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center #3083
UAS-<i>Antp</i> (27D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> bajo el control de UAS	Ch II	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center #7301
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (152D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (153D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (154D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (155D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (156D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (157D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (158D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-<i>Antp</i>^{I32A-H36A} (158D)	Línea reportera que expresa <i>Antp</i> ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VC<i>Antp</i> (106D)	Línea reportera que expresa VC <i>Antp</i> bajo el control de UAS	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Donada por Samir Merabet

UAS-VCAntpHD (128D)	Línea reportera que expresa VCAntpHD bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM6</i> Cerdas escutelares cortas	Donada por Yoshi Adachi
UAS-VCAntp^{I32A-H36A} (147D)	Línea reportera que expresa VCAntp ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VCAntp^{I32A-H36A} (148D)	Línea reportera que expresa VCAntp ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VCAntp^{I32A-H36A} (149D)	Línea reportera que expresa VCAntp ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VCAntp^{I32A-H36A} (150D)	Línea reportera que expresa VCAntp ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VCAntp^{I32A-H36A} (151D)	Línea reportera que expresa VCAntp ^{I32A-H36A} bajo el control de los sitios UAS	Ch III <i>TM3</i> Cerdas escutelares cortas	Microinyección BestGene Company
UAS-VNEXD (101D)	Línea reportera que expresa VN-EXD bajo el control de los sitios UAS	Ch IV	Donada por Samir Merabet
UAS-VNTFIIIEβ (110D)	Línea reportera que expresa VN-TFIIIE β bajo el control de los sitios UAS	Ch II <i>CyO</i> Alas rizadas	Donada por Samir Merabet

APÉNDICE III

Construcción del plásmido pNPAC-Antp^{I32A-H36A}

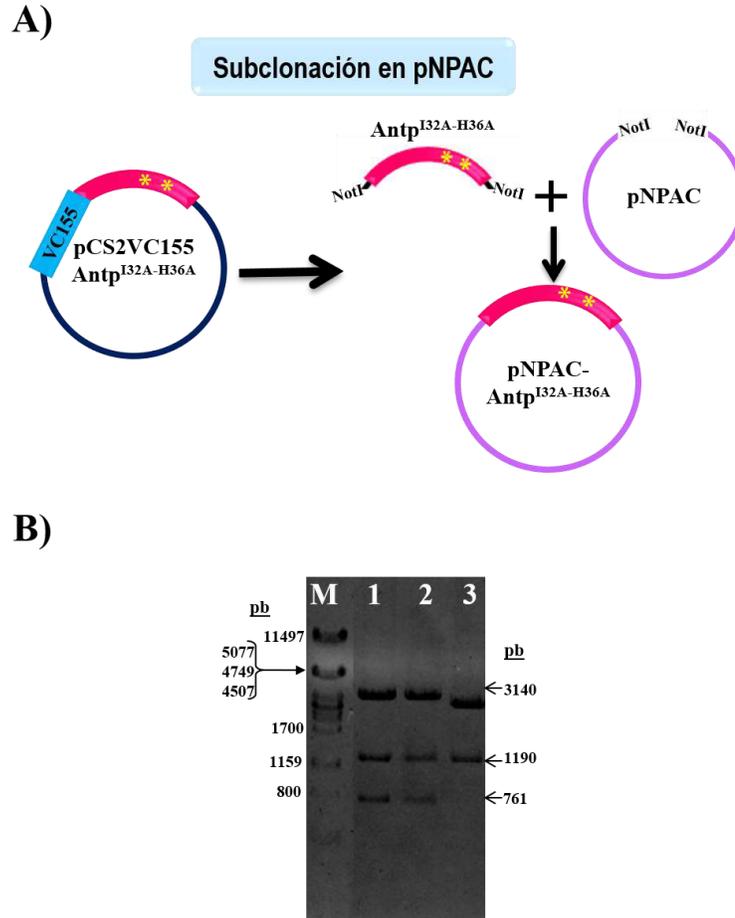


Figura 33. Construcción del plásmido recombinante pNPAC-Antp^{I32A-H36A}. La caracterización enzimática fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. **A)** Esquematación de la estrategia de construcción del vector pNPAC-Antp^{I32A-H36A}, el fragmento Antp^{I32A-H36A} se subclonó a partir de pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A} en el vector pNPAC usando los sitios de restricción NotI. **B)** Caracterización del vector pNPAC-Antp^{I32A-H36A} con la enzima de restricción PstI correspondiente a los fragmentos de 3140, 1190 y 761 pb, se observan dos clones positivos en los carriles 1 y 2. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ PstI.

11. BIBLIOGRAFIA

Akam M. 1989. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell*, 57(3), 347-349.

Akimoto Y, Yamamoto S, Iida S, Hirose Y, Tanaka A, Hanaoka F, Ohkuma Y. 2014. Transcription cofactor PC 4 plays essential roles in collaboration with the small subunit of general transcription factor TFIIE. *Genes to Cells*, 19(12), 879-890.

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

Altamirano-Torres CD. 2014. Interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con el factor TFIIE- β a través de los residuos 32 y 36 del homeodominio. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Baëza M, Viala S, Heim M, Dard A, Hudry B, Duffraisse M, Rogulja A, Brun C, Merabet S. 2015. Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*, 4, e06034.

Bateson W. 1894. Materials for the Study of Variation, treated with special regard to discontinuity in the Origin of Species. Recuperado de: <https://archive.org/details/materialsforstud00bate>

Bermingham JR, Martinez-Arias A, Petitt MG, Scott MP. 1990. Different patterns of transcription from the two Antennapedia promoters during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 109(3), 553-566.

Bobola N, Merabet S. 2017. Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 1-8.

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

Bondos SE, Tan XX, Matthews KS. 2006. Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell signaling proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 5(5): 824-834

Boube M, Hudry B, Immarigeon C, Carrier Y, Bernat-Fabre S, Merabet S, Graba Y, Bourbon HM, Cribbs DL. 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

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

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

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

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

Cerdá-Esteban N, Spagnoli FM. 2014. Glimpse into Hox and tale regulation of cell differentiation and reprogramming. *Developmental Dynamics* 243(1): 76-87

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

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem.* 269(14): 10444-10450

Dubnau J, Struhl G. 1996. RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* 379(6567): 694.

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

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

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

- García BA. 1977. Homeotic and atavic mutations in insects. *Amer. Zool.* 17: 613-630.
- Gehring WJ. 1987. Homeoboxes in the study of development. *Science* 236: 1245-1252.
- Gehring WJ, Müller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Qian YQ, Otting G, Wüthrich K. 1990. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.* 6: 323-329.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Reséndez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. 1995. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78: 211-223.
- Gibson G, Gehring WJ. 1988. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during *Drosophila* development. *Development.* 1988;102(4): 657-675.
- Gilbert SF, Barresi MJ. *Developmental biology.* 2016. *Sinauer Associates, Inc.*, p. 243.
- Grienemberger A, Merabet S, Manak J, Iltis I, Fabre A, Bérenger H, Scott MP, Pradel J, Graba Y. 2003. Tgfb signaling acts on a Hox response element to confer specificity and diversity to Hox protein function. *Development* 130: 5445-5455.
- Hafen E, Levine M and Gehring WJ. 1984. Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 307: 287-289.
- Harding K, Wedeen C, McGinnis W and Levine M. 1985. Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* 229: 1236-1242.
- Harding K and Levine M. 1988. Gap genes define the limits of Antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *EMBO J.* 7: 205-214.
- Hayashi S, Scott MP. 1990. What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? *Cell* 63: 883-894.
- Heffer A, Pick L. 2013. Conservation and variation in Hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field. *Annual review of entomology*, 58, 161-179.
- Heuer JG, Kaufman TC. 1992. Homeotic genes have specific functional roles in the establishment of the *Drosophila* embryonic peripheral nervous system. *Development* 115: 3547.
- Hisatake K, Ohta T, Takada R, Guermah M, Horikoshi M, Nakatani Y, Roeder RG. 1995. Evolutionary conservation of human TATA-binding-polypeptide-associated factors TAFII31 and TAFII80 and interactions of TAFII80 with other TAFs and with

general transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8195-8199.

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.

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

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

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

Jiménez-Mejía G. 2018. Interacciones triméricas del complejo Antp-TBP con los factores TFIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc of the Nat Acad of Sci* 88(5): 1864-1868

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

Kerppola TK. 2008. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol.* 85: 431-470.

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

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

Lai JS, Cleary MA, Herr W. 1992. A single amino acid exchange transfers VP16-induced positive control from the Oct-1 to the Oct-2 homeodomain. *Genes & Development* 6(11): 2058-2065.

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

Li C, Manley JL. 1998. Even-skipped represses transcription by binding TATA binding protein and blocking the TFIID-TATA box interaction. *Molecular and cellular biology*, 18(7), 3771-3781.

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

Mann RS, Lelli KM, 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.

Maxon ME, Goodrich JA, Tjian R. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIE: a model for promoter clearance. *Genes & development*, 8(5), 515-524.

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

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

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

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

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

Patel NH, Prince VE. 2000. Beyond the Hox complex. *Genome biology*, 1(5), reviews1027-1.

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

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

Papadopoulos DK, Skouloudaki K, Adachi Y, Samakovlis C, Gehring WJ. 2012. Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. *Dev Biol.* 367(1): 78-89

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

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

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

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

Pomerantz JL, Kristie TM, Sharp PA. 1992. Recognition of the surface of a homeodomain protein. *Genes & development* 6(11): 2047-2057

Prince F, Katsuyama T, Yoshiteru O, Plaza S, Reséndez-Pérez D, Berry M, Kurata S, Gehring WJ. 2008. The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* 135: 1669-1679.

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

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

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

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

Reuter R, Scott MP. 1990. Expression and function of the homeotic genes *Antennapedia* and *Sex Combs Reduced* in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development* 109: 289303.

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

Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(3), 129.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sauer F, Fondell JD, Ohkuma Y, Roeder RG & Jäckle H. 1995. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIE β . *Nature*, 375(6527), 162.

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

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

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

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

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

Taniguchi Y. 2014. Hox transcription factors: modulators of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion. *BioMed research international*.

Yokomori K, Verrijzer CP, Tjian R. 1998. An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6722-6727.

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

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

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

Zouaz A, Auradkar A, Delfini MC, Macchi M, Barthez M, Akoa SE, et al. 2017. The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription. *The EMBO journal* e201695751.

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Claudia Dalila Altamirano Torres

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: LOS RESIDUOS 32 Y 36 DE LA HÉLICE 2 DEL HOMEODOMINIO DE ANTENNAPEDIA SON NECESARIOS PARA LA INTERACCIÓN CON TFIIE β Y PARA SU ESPECIFICIDAD FUNCIONAL EN *D. MELANOGASTER*

Campo de Estudio: Ciencias Naturales/Biología Molecular y del Desarrollo

Datos Personales: Nacida en San Luis Potosí el 9 de enero de 1987, hija de Ismael Altamirano Modad y María Torres Gaytan.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), grado obtenido Biólogo en 2009. Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología con Mención Honorífica por la UANL en 2014.

Experiencia profesional: Investigador No Docente en la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la UANL desde 2016. Docente por horas en la FCB de la materia de Biología del Desarrollo desde 2016. Docente a nivel licenciatura de la materia de Inmunología en la Universidad del Valle de México (UVM) Campus Norte durante el semestre Enero-Junio 2017, y de la materia de Bioquímica en la UVM Campus Cumbres durante el semestre Agosto-Diciembre 2017.