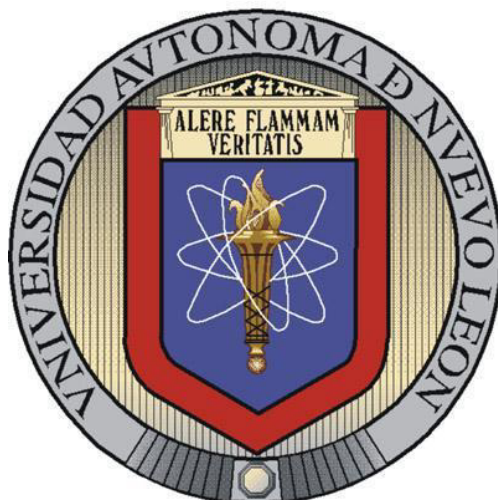


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Interacciones triméricas del complejo Antp-TBP con los factores TFIIIE β ,
BIP2 y la homeoproteína Exd**

POR

Q.F.B. GUSTAVO JIMÉNEZ MEJÍA

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

JULIO, 2018

Interacciones triméricas del complejo Antp-TBP con los factores TFIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd

COMITÉ DE TESIS

Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal

Dra. Vianey González Villasana
Vocal

Dra. Diana Caballero Hernández
Vocal

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un
Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura,
la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que
sucede.”*

Jacques Yves Cousteau

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

LUGAR DE TRABAJO

Esta tesis fue realizada 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

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS	1
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
LUGAR DE TRABAJO.....	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Homeosis y genes homeóticos	16
2.2 Homeoproteínas	19
2.3 Paradoja Hox.....	20
2.3.1 Interactoma Hox.....	22
2.4 Interactoma de Antennapedia.....	24
2.4.1 Interacciones triméricas	25
2.5 FRET/BiFC	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS.....	28
6. ESTRATEGIA GENERAL.....	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Estandarización del sistema de FRET/BiFC con la interacción trimérica Jun-Fos-p65	30
7.1.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag- p65RHRCerulean, -p65ΔRHRCerulean, pBiFC- bFosΔZipVC155, -bJunVN173 y -bFosVC155	30
7.1.2 Transfección plasmídica en la línea celular HEK293	31

7.1.3 Visualización de las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante microscopía confocal para el sistema FRET/BiFC.....	34
7.1.4 Cuantificación de las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante ImageJ.....	34
7.2 Interacción trimérica de TFIIIEβ con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	35
7.2.1 Construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β	35
7.2.1.1 Extracción de DNA	37
7.2.2 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP	38
7.2.3 Análisis de la interacción trimérica del complejo Antp-TBP-TFIIIE β mediante FRET/BiFC	39
7.3 Interacción trimérica de BIP2 con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	40
7.3.1 Construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2 ₁₋₈₉	40
7.3.2 Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP/BIP2 mediante FRET/BiFC.....	42
7.4. Interacción trimérica de Exd con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	44
7.4.1. Construcción del plásmido pECFP-N1-Exd ₁₄₄₋₃₇₆	44
7.4.2. Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP/Exd mediante FRET/BiFC.....	46
8. RESULTADOS.....	48
8.1 Estandarización del sistema FRET/BiFC con la interacción trimérica de Jun-Fos-p65	48
8.1.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, -p65 Δ RHRCerulean, pBiFC-bFos Δ ZipVC155, -bJunVN173 y -bFosVC155	48
8.1.2 Estandarización del sistema FRET/BiFC usando Jun-Fos-p65	49
8.2 Interacción trimérica del factor transcripcional TFIIIEβ con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	56
8.2.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP.....	56
8.2.2 Construcción del plásmido recombinante pECFP-N1-TFIIIE β	58

8.2.3 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-TFIIIE β en la línea celular HEK293.....	59
8.2.4 Interacción trimérica Antp-TBP/TFIIIE β	60
8.3 Interacción trimérica de BIP2 con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	62
8.3.1 Construcción del plásmido recombinante pEFCP-N1-BIP2 ₁₋₈₉	62
8.3.2 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-BIP2 en HEK293	63
8.3.3 Interacción trimérica Antp-TBP/BIP2.....	64
8.4 Interacción molecular trimérica de Exd con Antp-TBP mediante FRET/BiFC	66
8.4.1 Construcción del plásmido recombinante pEFCP-N1-Exd ₁₄₄₋₃₇₆	66
8.4.2 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-Exd en HEK293.....	67
8.4.3 Interacción trimérica Antp-TBP/Exd	68
9. DISCUSIÓN	70
10. CONCLUSIONES.....	76
11. PERSPECTIVAS	77
APÉNDICE I	78
APENDICE II.....	79
12. BIBLIOGRAFIA.....	88

NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA

FT	Factor transcripcional
HD	Homeodominio
Antp	Antennapedia
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TFIIE β	Subunidad β del Factor Transcripcional IIE
ECFP	Proteína Fluorescente Cian Mejorada
Exd	Extradenticle
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Kb	Kilobase
Pb	Pares de bases
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
BX-C	Complejo Bithorax
ANT-C	Complejo Antennapedia
Hth	Homothorax
BiFC	Complementación Bimolecular Fluorescente
TriFC	Complementación Trimolecular Fluorescente
TFIIE	Factor Transcripcional IIE
nm	Nanómetros
μ m	Micrómetros
μ L	Microlitros
ROIs	Regiones de Interés
PEI	Polietiliminina
EtBr	Bromuro de Etidio
PPIs	Interacciones Proteína-Proteína
PIC	Complejo de Pre-iniciación

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutación homeótica Bithorax	16
Figura 2. Esquema de colinealidad de los genes Hox.....	17
Figura 3. Conservación de los genes Hox.....	18
Figura 4. Esquematización de unión HD de Antp con el DNA.	19
Figura 5. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas.	21
Figura 6. Especificidad de unión del homeodominio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	22
Figura 7. Interacciones de las homeoproteínas.	22
Figura 8. Interactoma de Antp mediante BiFC <i>in vivo</i>	23
Figura 9. Esquema de la técnica de FRET basado en BiFC (FRET/BiFC).	27
Figura 10. Estrategia general para el análisis de la interacción trimérica Antp-TBP/TFII β /BIP2/Exd.....	29
Figura 11. Estrategia de transfección en células HEK293 para la interacción trimérica Jun-Fos-p65.	33
Figura 12. Estrategia de transfección de los plásmidos codificante para las proteínas de fusión TFII β , Antp y TBP.....	39
Figura 13. Estrategia de transfección de los plásmidos codificantes para BIP2-ECFP, VCAntp, VNTBP	43
Figura 14. Estrategia de transfección para la interacción trimérica Antp-TBP/Exd.....	46
Figura 15. Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, pBiFCbFos Δ ZipVC155, - bJunVN173 y -bFosVC155.....	49
Figura 16. Estandarización del sistema FRET/BiFC mediante la interacción trimérica Jun-Fos-p65 con 5% de potencia de láser	51
Figura 17. Estandarización del sistema FRET/BiFC mediante la interacción trimérica Jun-Fos-p65 con 10% de potencia de láser	53
Figura 18. Interacción trimérica de los factores Jun-Fos- p65 mediante FRET/BiFC	55
Figura 19. Cuantificación de la interacción trimérica de los factores transcripcionales Jun-Fos-p65	56
Figura 20. Caracterización de los plásmidos pCS2VNm9TBP y pCS2VC155Antp.....	57

Figura 21. Construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIEβ	59
Figura 22. Expresión y localización nuclear de la proteína de fusión TFIIIEβ-ECFP	60
Figura 23. Interacción trimérica Antp-TBP/TFIIIEβ mediante FRET/BiFC	61
Figura 24. Construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉.....	63
Figura 25. Expresión de la secuencia codificante para BIP2-ECFP..	64
Figura 26. Interacción trimérica Antp-TBP/BIP2 mediante FRET basado en BiFC.	65
Figura 27. Construcción del plásmido pECFP-N1-Exd	67
Figura 28. Expresión de la secuencia codificante para Exd-ECFP	68
Figura 29. Interacción trimérica Antp-TBP/Exd mediante FRET/BiFC.....	69
Figura 30. Esquema de interacción probable de Antp-TBP/TFIIIEβ en el complejo transcripcional.	72
Figura 31. Esquema de la probable interacción Antp-TBP/BIP2	73
Figura 32. Interacción probable de Antp-TBP/Exd.	74
Figura 33. Esquematización de los posibles escenarios en un ensayo de FRET basado en BiFC	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para la digestión con enzimas de restricción.....	31
Tabla 2. Concentración y pureza de los plásmidos transfectados en células HEK293	32
Tabla 3. Programa de amplificación mediante PCR para el factor transcripcional TFIIIEβ.....	36
Tabla 4. Programa de amplificación del factor BIP2 mediante PCR	41
Tabla 5. Programa de amplificación por PCR para Exd	45

RESUMEN

Las homeoproteínas son factores transcripcionales altamente conservados, cuya principal función es determinar la identidad en el plan corporal de los organismos. Estas poseen un dominio conservado de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD), mediante el cual reconoce secuencias ricas en TA ampliamente distribuidas en el DNA. Antennapedia (Antp) es una homeoproteína de *Drosophila melanogaster* que además de su unión al DNA presenta interacción con otras proteínas para llevar a cabo su función. Interacciones moleculares proteína-proteína de Antp han mostrado su interacción con el factor transcripcional TBP a través de la región rica en glutaminas de ambas proteínas y abren la posibilidad de que sea mediada por un tercer elemento. Debido a lo anterior en esta tesis se determinaron las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores TFIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd. La estrategia experimental consistió en analizar las interacciones triméricas usando el sistema de Transferencia de Energía por Resonancia basado en la Complementación Bimolecular Fluorescente (FRET/BiFC). Para ello, se estandarizó el sistema FRET/BiFC con la detección de la interacción trimérica Jun-Fos-p65 usando un 10% de potencia de los láseres, 200nm de apertura confocal, 0% de offset y 1x de ganancia. Las interacciones obtenidas fueron analizadas en el software de uso libre ImageJ utilizando el plug-in FRETTY. Para determinar las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales, se construyeron los plásmidos pECFP-N1-TFIIE β , pECFP-N1-BIP2 y pECFP-N1-Exd, los cuales se cotransfectaron con los plásmidos codificantes a VCantp y VNTBP. Los resultados obtenidos usando el sistema FRET/BiFC mostraron exitosamente en las células transfectadas la formación de los tres complejos triméricos Antp-TBP/TFIIE β , Antp-TBP/BIP2 y Antp-TBP/Exd con valores de transferencia de energía correspondientes a $E=0.50\pm 0.05$, $E=0.15\pm 0.03$ y $E=0.43\pm 0.18$, respectivamente. La formación de los complejos triméricos con factores transcripcionales juegan un papel importante en la regulación de la transcripción además de brindar especificidad en los sitios de unión al DNA, por lo que la presencia de interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β , BIP2 y Exd en el interactoma de Antp, mostradas en esta tesis, abren la posibilidad de analizar su efecto funcional en la regulación génica en un modelo *in vivo* en *D. melanogaster*.

ABSTRACT

Homeoproteins are highly conserved transcriptional factors whose principal function is to determine the segment identity in the body plan of the organisms. They have a 60 aminoacids domain better known as homeodomain (HD) that recognizes TA-rich sequences widely distributed in the DNA. Antennapedia (Antp) is a *D. melanogaster* homeoprotein that interact directly with DNA as well as another transcriptional factors to carry out its function. Previous reports had demonstrated that the glutamine-rich regions in Antp and TBP are important in the establishment of their interaction, but the absence of these regions doesn't abolish completely their interaction, leading the hypothesis that exist a third element mediating this interaction. Due to the above, this thesis proposed to determine if trimeric interactions occur between Antp-TBP and TFIIEB/BIP2/Exd by using a BiFC-based FRET approach. For this purpose, the BiFC/FRET system was standarized with the previous reported trimeric interaction Jun-Fos-p65. Then, we demonstrated that the transcriptional factor TFIIE β , BIP2 and Exd form ternary complexes with Antp-TBP through the cotransfection of recombinant plasmids bearing the coding sequences of TFIIE β , BIP2 and Exd fused to ECFP and the coding sequences of VCantp and VNTBP. The results were analyzed with the free using software ImageJ and the plug-in FRETYY and evidenced the formation of the trimeric complexes Antp-TBP-TFIIE β ($E=0.50\pm0.05$), Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉($E=0.15\pm0.03$) y Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ ($E=0.43\pm0.18$) with FRET/BiFC. According to the results obtained in this work, the evidence of trimeric interactions of Antp-TBP with TFIIE β , BIP2 and Exd open the possibility of analyze the functional effect in the genetic regulation *in vivo* in *D. melanogaster*.

1. INTRODUCCIÓN

Los genes Hox codifican proteínas, denominadas homeoproteínas, que funcionan como factores transcripcionales (FT). Estos contienen una secuencia que codifica 60 aminoácidos altamente conservada conocida como homeodominio (HD), responsable del reconocimiento de la secuencia consenso “TAAT” en el DNA. Debido a que esta secuencia es altamente frecuente en los genomas y a que las homeoproteínas deben ser altamente específicas tanto espacial como temporalmente, se han propuesto distintos mecanismos para explicar su especificidad funcional, entre estos las interacciones proteína-proteína. Estas interacciones ocurren con proteínas de distintas clases, como homeoproteínas y otros factores transcripcionales, incluidos los de la maquinaria basal de transcripción. En el caso de la homeoproteína Antennapedia (Antp) de *Drosophila melanogaster* se ha encontrado que tiene la capacidad de interactuar con el cofactor transcripcional BIP2 y la homeoproteína Exd mediante su motivo YPWM, así como con el factor transcripcional TFIIE β a través de la segunda hélice del HD, y con TBP mediante su región rica en glutaminas. Así mismo, TBP a su vez contiene en su extremo N-terminal una región rica en glutaminas y se ha determinado que tiene un papel importante en la regulación de la transcripción, así como en su interacción con otras proteínas. Recientemente en el laboratorio se determinó que la interacción proteína-proteína Antp-TBP se ve afectada al suprimir el homopéptido de 40 glutaminas de TBP mientras que la expansión a 80 glutaminas no afectó esta interacción. Estos resultados sugieren que los homopéptidos de glutaminas de ambas proteínas son importantes para la interacción Antp-TBP y que probablemente requieren de otros dominios adicionales y/o factores transcripcionales que estabilicen su interacción. Debido a lo anterior, estos resultados abren la posibilidad para analizar la presencia de interacciones triméricas, así como determinar su relevancia funcional por lo que en este proyecto de tesis se llevará a cabo el análisis de interacciones triméricas en Antp-TBP con diversos factores transcripcionales como Exd, TFIIE β y Bip2 usando el sistema FRET basado en BiFC en cultivo celular.

2. ANTECEDENTES

2.1 Homeosis y genes homeóticos

El término “homeosis” fue introducido por William Bateson en 1894, para referirse a una mutación en donde un segmento del cuerpo no solo ha cambiado, sino que ha tomado la identidad de otro segmento (Bateson, 1894). Posteriormente, Calvin B. Bridges en 1915 describió un primer ejemplo de homeosis en *Drosophila melanogaster* con un fenotipo aberrante, caracterizado por el desarrollo de un segundo par de alas en el segmento donde originalmente deben desarrollarse halterios (Fig. 1), al cual denominó como Bithorax (Bridges & Morgan, 1923). De igual manera, fueron describiéndose distintas mutaciones homeóticas en *D. melanogaster*, como lo son Antennapedia (Le calvez, 1948) y Hexaptera (Herskowitz, 1948) entre otras.

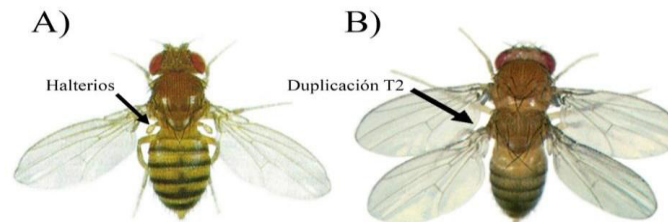


Figura 1. Mutación homeótica Bithorax. A) Fenotipo silvestre de *D. melanogaster*, que muestra la presencia de halterios. B) Fenotipo de mutación homeótica Bithorax, donde se observa la duplicación del segmento torácico (T2) sustituyendo los halterios por un segundo par de alas.

Tomado y modificado de: Lewis, 2004

Posteriormente, a mediados de 1970, García-Bellido propuso varios modelos de desarrollo proporcionados por un conjunto de genes denominados “genes selectores” (García-Bellido, 1975; Morata & Lawrence, 1977). En el primer modelo describe genes que tienen la capacidad de actuar como interruptores dirigiendo el desarrollo de grupos celulares en distintas vías; en el segundo propone que los patrones celulares son heredados y estos mismos irreversibles durante un desarrollo normal; y en el tercero que las combinaciones de distintos genes selectores activos especifican la identidad de todas las células en *D. melanogaster*. Esto proporcionó una relación entre el genotipo y fenotipo de la mosca de la fruta, determinándose que los genes selectores contribuyen en la regulación genética y cualquier cambio que altere este equilibrio puede generar una mutación tolerada por selección natural (Akam, 2002). En 1978 Lewis demostró la existencia de genes

homeóticos en el complejo Bithorax (BX-C) que contribuyen en el desarrollo de la mosca para determinar la identidad de la porción posterior. En consecuencia, la mutación homeótica Bithorax encontrada en *D. melanogaster* se debe a aberraciones cromosómicas en este complejo (Lewis, 1978). Por su parte, el grupo encabezado por Kaufman en 1980 estudió otra región del cromosoma 3 de *D. melanogaster*, responsable de la mutación Antennapedia, por lo cual denominaron complejo Antennapedia (ANT-C), encontrando que los genes de este complejo determinan la identidad de la porción anterior del cuerpo de la mosca (Kaufman *et al.*, 1980). El complejo ANT-C se compone de los genes *labial* (*Lab*), *Proboscipedia* (*Pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex Combs Reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*) y el complejo BX-C se compone de los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) y *Abdominal B* (*AbdB*) (Fig. 2A).

Una característica de los genes homeóticos es la relación entre su ordenamiento genómico y su expresión (Duboule & Morata, 1994), es decir, el orden de expresión de los genes homeóticos se asemeja al acomodo cromosómico que tienen estos en el genoma. Este fenómeno es mejor conocido como ley de colinealidad, la cual se ha conservado a lo largo de la evolución (Lewis, 1978). Esto indica que entre más cercano este el gen del extremo 3' en el cromosoma, la expresión será más próxima a la parte anterior del organismo y entre más cercano este al 5' su expresión se localizará más adyacente a la parte posterior del organismo (Fig. 2) (Zurita, 2002).

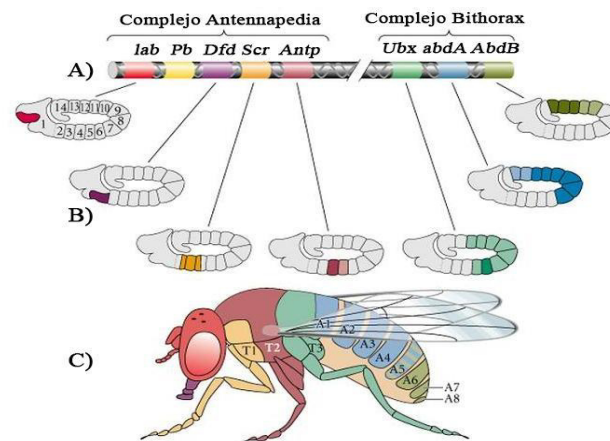


Figura 2. Esquema de colinealidad de los genes Hox. En la imagen se ejemplifica el orden cromosómico de los genes homeóticos en *Drosophila melanogaster* y su relación con la expresión génica. **A)** El diagrama muestra el orden de los genes en los complejos Antennapedia (ANT-C) y Bithorax (BX-C). **B)** Colinealidad de la expresión de los genes Hox en los segmentos embrionarios de *D. melanogaster* en el mismo orden espacial cromosómico. **C)** Se representa en colores el orden de la expresión y la identidad de los segmentos a lo largo del eje anteroposterior en *Drosophila*

Tomado y modificado de Gilbert, 2005

Los genes homeóticos se caracterizan por poseer una secuencia altamente conservada de 180 pb a la cual se denominó *caja homeótica*, y esta misma ha sido utilizada para determinar secuencias ortólogas en diferentes organismos (McGinnis *et al.*, 1984, Scott & Weiner, 1984). El uso de la caja homeótica como sonda para rastrear los genes Hox en distintos organismos resultó en la identificación de los mismos en diferentes especies, encontrando mayor cantidad de parálogos en organismos de mayor complejidad, pero predominando su conservación evolutiva (Fig. 3) y destacando su importante función en el desarrollo embrionario de distintas especies además del hombre, animales vertebrados como peces y distintos mamíferos e invertebrados como insectos e incluso microorganismos eucariotas como levaduras (Heffer, & Pick, 2013). En otros estudios se han comparado los genes homeóticos de mamíferos con los dos complejos homeóticos de *Drosophila melanogaster* donde se encontró que, las secuencias nucleotídicas, las proteínas codificantes, la organización génica y los patrones de expresión son similares en ambas especies sugiriendo que la organización de estos complejos pre-data a la diferencia evolutiva entre insectos y vertebrados, proviniendo de un organismo ancestral en común (Akam, 1989; Hayashi & Scott, 1990; Patel & Prince, 2000).

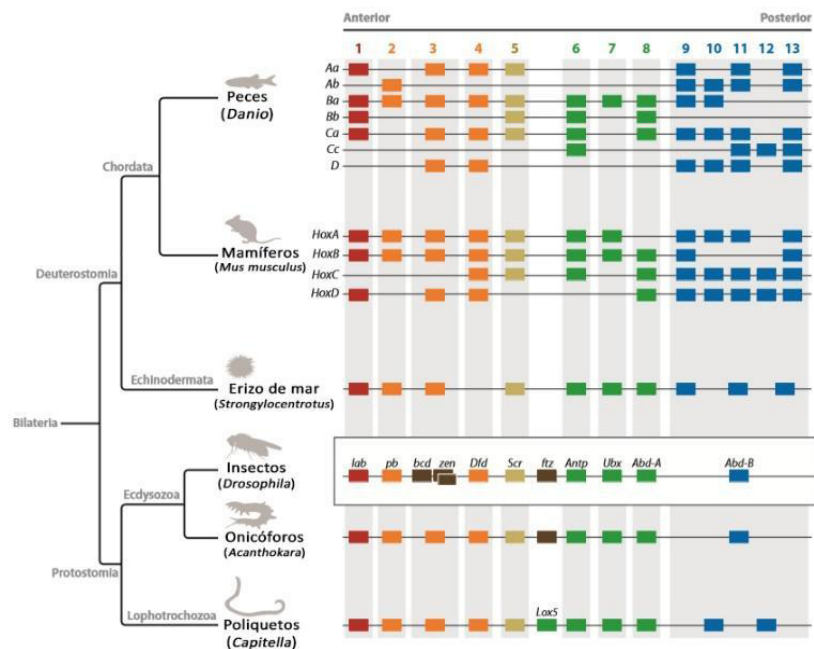


Figura 3. Conservación de los genes Hox. En la imagen se esquematiza un árbol filogenético mostrando la evolución y conservación de los genes Hox en diferentes especies, observándose mayor cantidad de genes Hox en organismos más complejos.

Tomada y modificada de Heffer & Pick, 2013

2.2 Homeoproteínas

Los genes homeóticos codifican proteínas, mejor conocidas como homeoproteínas que presentan distintas funciones celulares (Miotto & Graba, 2010; Reszohazy, 2014). Sin embargo, su función como factores transcripcionales es la que más ha destacado, dada su importancia en la embriogénesis, regulando una gran cantidad de genes diana que determinan los patrones del desarrollo de los organismos (Gehring *et al.*, 1994). Estos factores transcripcionales se caracterizan por poseer un dominio codificado por la caja homeótica, conocido como Homeodominio (HD), compuesto de 60 aminoácidos. Este es responsable de las interacciones proteína-DNA reconociendo la secuencia "TAAT" o "ATTA" del DNA (Scott *et al.*, 1989).

La estructura terciaria del homeodominio se compone por 3 alfa-hélices, en donde la tercera hélice (conocida como hélice de reconocimiento) presenta afinidad con el surco mayor del DNA en la región consenso "TAAT" interactuando a través de sus residuos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54, y el brazo N-terminal en la hélice 1, y con el surco menor del DNA mediante el residuo Arg-5 (Mann *et al.*, 2009), tal como se muestra en la Figura 4.

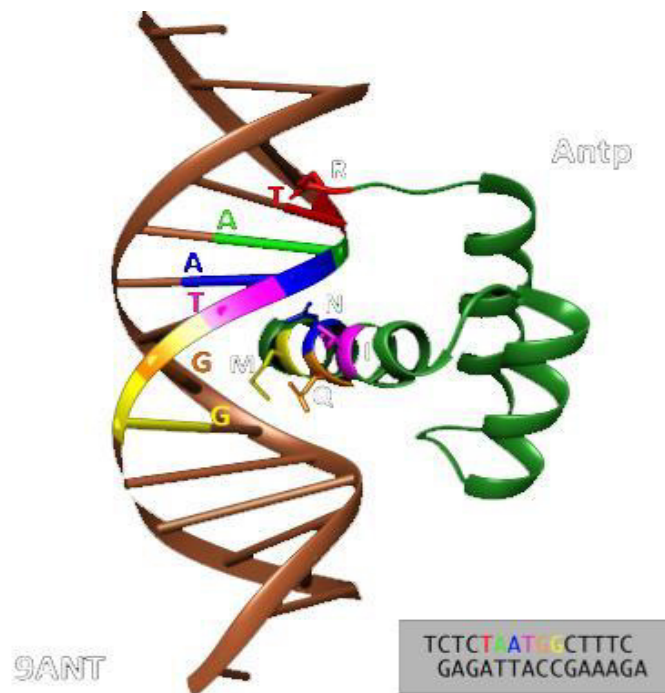


Figura 4. Esquemización de unión HD de Antp con el DNA. La imagen muestra la unión específica que tiene el homeodominio (HD) en este caso de la proteína Antp con la secuencia altamente conservada "TAAT" / "ATTA" del DNA.

Tomada y modificada de Ortiz-Lombardia *et al.*, 2017

Las homeoproteínas son factores transcripcionales altamente conservados en los organismos (McGinnis & Krumlauf, 1992; Biggin & McGinnis, 1997; Manak & Scott, 1994) (Fig. 3), reconocen secuencias cortas altamente repetidas en el DNA (Scott *et al.*, 1989; Gehring *et al.*, 1994; Biggin & McGinnis, 1997) y paradójicamente activan o reprimen distintos grupos de genes en el lugar y tiempo exacto para determinar la identidad del plan en el cuerpo de los diferentes organismos. A esto se le conoce como paradoja hox.

2.3 Paradoja Hox

La paradoja de Hox aparece con el descubrimiento de las distintas homeoproteínas altamente conservadas que participan en el desarrollo de diferentes organismos como gusanos, moscas, anfibios, ratones, peces y humanos llevando a la pregunta de cómo proteínas tan similares permiten la identidad de diferentes estructuras en el cuerpo de organismos tan distintos (Heffer & Pick, 2013). Las homeoproteínas se unen al DNA reconociendo la secuencia consenso "TAAT" con una afinidad similar (Gehring *et al.*, 1994) y debido a que esta secuencia se repite en promedio cada kilobase, surge la cuestión de cómo es que las homeoproteínas pueden ser específicas con su sitio de unión en el lugar y tiempo adecuado.

La paradoja de la especificidad de las homeoproteínas se ha abordado desde hace tiempo. En 1990, con la escasa información que había hasta entonces, se propusieron 3 posibles vías por las cuales las homeoproteínas podrían adquirir especificidad en su interacción con el DNA. La primera posibilidad planteó la idea de que existe diferencia en la afinidad de las proteínas y el sitio de unión, y esta afinidad es promovida por la actividad del promotor (Fig. 5A); La segunda posibilidad es que la formación del complejo DNA-HD este dictada por distintas proteínas que actúen como cofactores incrementando la afinidad y/o especificidad involucrada en esta unión (Fig. 5B); y la última propuesta considera que las secuencias del sitio de unión pueden cambiar la conformación del homeodominio de las proteínas, alterando la habilidad de unión de estas mismas y por consiguiente afectando la transcripción (Fig. 5C) (Hayashi & Scott, 1990).

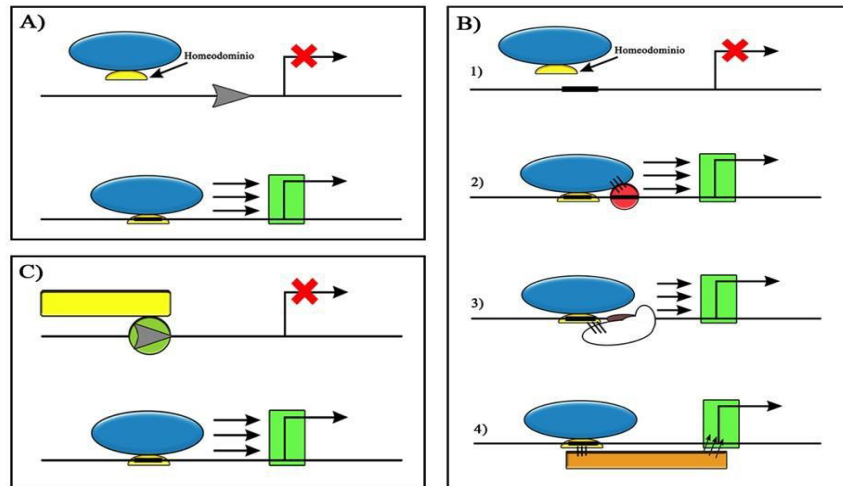


Figura 5. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas. En la imagen se esquematizan tres posibles mecanismos que determinan la especificidad de las homeoproteínas. **A)** La afinidad de las homeoproteínas es el resultado de la actividad del promotor, **B)** la afinidad y especificidad de las proteínas, no solo se relaciona con la interacción DNA-HD, más bien involucra a otros factores que influyen en este complejo participando como cofactores y **C)** El sitio de unión tiene la capacidad de cambiar la conformación proteica del HD, y de esta manera se ve alterada su habilidad en la interacción con el DNA afectando la transcripción génica.

Tomado y modificado de Hayashi & Scott, 1990

La especificidad de las homeoproteínas se ha abordado ampliamente en cuanto al análisis de su interactoma (Wilson & Desplan, 1999), encontrándose que las homeoproteínas interactúan con el DNA en forma dimérica (Passner *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1999). Posteriormente, se encontró que esta interacción dimérica adquiere especificidad interactuando con el surco menor del DNA, pero solo cuando se presenta la secuencia de DNA correcta (Joshi *et al.*, 2007) y que las diferencias en la secuencia aminoacídica de las homeoproteínas afectan al reconocimiento del DNA cuando están unidas a otros factores (Joshi *et al.*, 2007; Slattery *et al.*, 2011). Además de que los sitios de unión de baja afinidad en las secuencias reguladoras en el DNA le confieren a las homeoproteínas especificidad *in vivo* (Crocker *et al.*, 2015).

Por otro lado, la especificidad y afinidad del complejo DNA-HD *in vivo*, se rige también por la estructura de la cromatina, el contexto de la cromatina y la forma del DNA. Es decir: la conformación en la que se encuentran las cadenas de DNA para que las homeoproteínas puedan unirse al sitio blanco, la forma en la que se encuentra el DNA y las posibles interacciones proteicas que puedan influir (Fig. 6) (Bobola & Merabet, 2017).

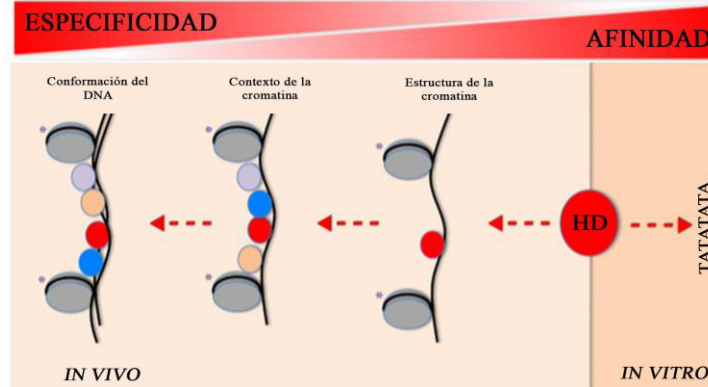


Figura 6. Especificidad de unión del homeodominio *in vivo* e *in vitro*. En la imagen se esquematiza la afinidad y especificidad presentada en situaciones distintas. *In vitro*: la afinidad de las homeoproteínas es mediada por secuencias ricas en AT. Sin embargo, la especificidad *in vivo* puede llegar a ser mediada por diferentes factores adicionales, como: la estructura de la cromatina (accesibilidad a la región blanco), el contexto de la cromatina (presencia del alguno otro factor que influya en la unión) y la forma de la doble hélice del DNA.

Tomado y modificado de Bobola & Merabet, 2017

2.3.1 Interactoma Hox

Las homeoproteínas han mostrado tener una amplia multiplicidad de interacciones proteína-proteína. Tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas de unión al DNA como factores transcripcionales (Bobola & Merabet, 2017), histonas, complejos relacionados en la remodelación de la cromatina (Gatchalian *et al.*, 2016), topoisomerasas tipo I (Puc *et al.*, 2015), entre otros, como se muestra en la Figura 7.

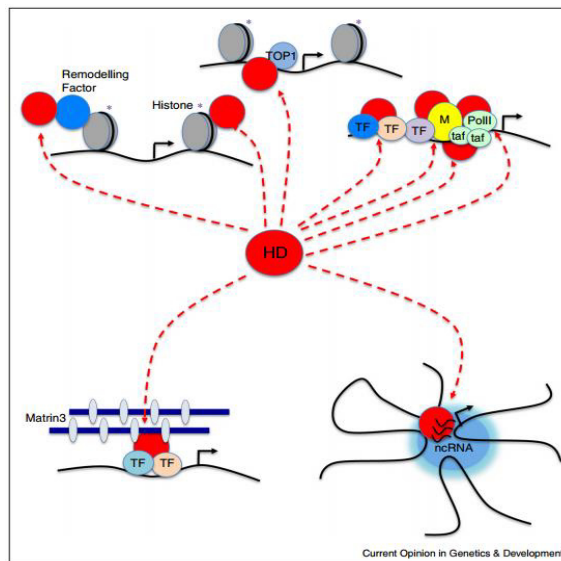


Figura 7. Interacciones de las homeoproteínas. En el diagrama se muestra que el HD tiene la capacidad para interactuar con complejos asociados a la remodelación de la cromatina, así como en la activación de estas mismas, se unen con enzimas como las topoisomerasas, con diferentes proteínas asociadas a la unión del DNA, también cuentan con la capacidad de reconocer y unirse a moléculas de RNA no codificante.

Tomado de Bobola & Merabet, 2017

Las homeoproteínas necesitan interactuar con factores de transcripción para llevar a cabo funciones transcripcionales principalmente en el desarrollo embrionario. Sin embargo, muy pocos factores han sido descritos y el mecanismo por el cual interactúan las homeoproteínas con estos no está del todo claro (Baëza *et al.*, 2015).

Existe evidencia de que su interacción con otros factores transcripcionales puede controlar la expresión génica (Shanmugam *et al.*, 1999), por lo cual se ha puesto un especial interés en evaluar estas interacciones proteína-proteína. Estas interacciones son mediadas por pequeños péptidos comúnmente denominados motivos lineales o motivos lineales cortos (LMSs o SLiMs, por sus siglas en inglés) (Neduva & Russell, 2005; Baëza, *et al.*, 2015) para los cuales se ha descubierto que la generación de estos mismos, resultantes de splicing alternativos se asocian en posibles interacciones proteína-proteína involucradas en mecanismos de regulación tejido-específicos (Buljan *et al.*, 2013).

En 2015, Baëza y colaboradores evaluaron el interactoma de diferentes homeoproteínas, entre ellas Antp, tanto en su versión silvestre como con el motivo YPWM mutado (YAAA) encontrando interacción con distintos factores transcripcionales y que además estas interacciones pueden abatirse o modificarse en ausencia del tetrapéptido YPWM, como se muestra en la Figura 8 (Baëza *et al.*, 2015).

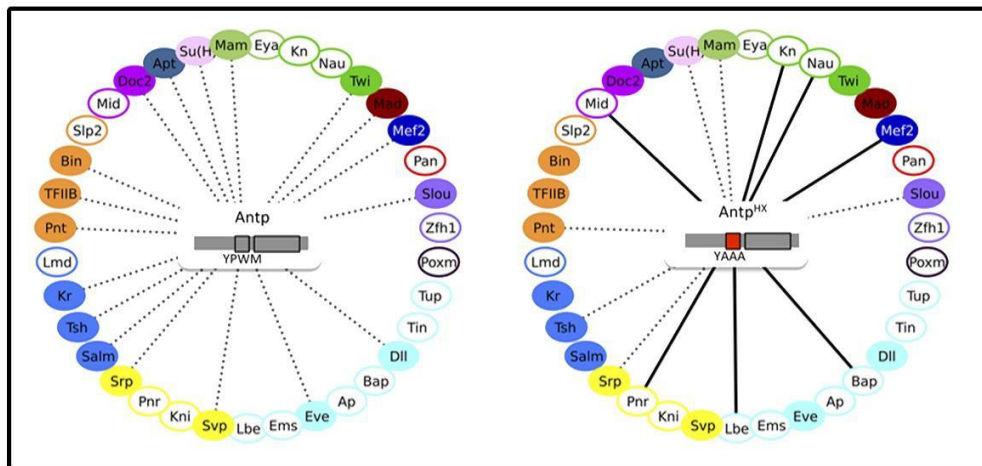


Figura 8. Interactoma de Antp mediante BiFC in vivo. En el diagrama se representa la interacción de Antp con distintos factores transcripcionales (línea punteada) en su versión silvestre y en su versión con el motivo YPWM mutado (YAAA, en color rojo). Se muestra que al suprimir el motivo YPWM algunas interacciones se pierden, pero también puede dar origen a nuevas interacciones (línea negra).

Tomada de Baëza *et al.*, 2015

2.4 Interactoma de Antennapedia

Se ha determinado la capacidad de interacción que tiene la homeoproteína Antp con diferentes factores en la maquinaria basal de transcripción. Emili y cols., en 1994 evidenciaron por primera vez la interacción entre Antp con componentes de la maquinaria basal de transcripción, específicamente con TBP (Emili *et al.*, 1994). Consecutivamente, mediante ensayos de pulldown se determinó que Antp tiene la capacidad de interactuar con la subunidad β del factor TFIIE (Zhu & Kuziora, 1996) y en 2008, mediante ensayos de pérdida y ganancia de función, se encontró que Antp interactúa con Bip2 *in vivo* (Prince *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio se han demostrado diversas interacciones de Antp con diferentes homeoproteínas y factores transcripcionales. Usando ensayos de BiFC en cultivo celular se determinó que la interacción entre Antp y Scr es mediada por el HD, específicamente por la posición 19 de la hélice I (Elizondo-Rodríguez, 2015). Adicionalmente, mediante BiFC *in vivo* se demostró que la interacción Antp-Ubx en *D. melanogaster* también es mediada por sus homeodominios (Villarreal-Puente, 2015).

Además, también se encontró que Antp interactúa específicamente con los factores transcripcionales TBP, TFIIE β , AbdB, Bip2 y Exd regulando su actividad transcripcional. Las interacciones proteína-proteína con Bip2 y Exd mostraron un requerimiento total del motivo YPWM de Antp mientras que la interacción de Antp con TBP requiere la región aminoácida 66-116 de su región rica en glutaminas. Por otro lado, la interacción proteica entre Antp-TFIIE β es mediada por la hélice II del homeodominio, específicamente los residuos 32 y 36 (Cárdenas-Chávez 2012; Altamirano-Torres, 2014).

Se determinó que en la interacción Antp-TBP existe una relación entre la cantidad de glutaminas suprimida y el efecto en su interacción (Ovalle-Maqueo, 2015). Adicionalmente, mediante un análisis mutacional, se observó que la región rica en glutaminas de TBP también participa en su interacción con Antp. Sin embargo, aun en ausencia de los homopéptidos de glutaminas en ambas proteínas, la interacción no se abate por completo, abriéndose la posibilidad de que esta interacción esté mediada por un tercer elemento (Montalvo-Méndez, 2016).

2.4.1 Interacciones triméricas

Se ha descrito anteriormente que las homeoproteínas pueden interactuar con el DNA en forma dimérica interaccionando con el cofactor Exd (Passner *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1999) contribuyendo a la especificidad. Sin embargo, se ha demostrado que las interacciones triméricas de las homeoproteínas juegan un papel importante en el control transcripcional. Se ha reportado que cuando se expresa Hth, Exd (proteína exclusiva de citoplasma) se traslada al núcleo celular (Rieckhof *et al.*, 1997) evidenciando la participación de 3 componentes en la regulación por homeoproteínas. Mediante ensayos *in vitro* se determinó que el dominio N-terminal de Hth se une con Exd y esto es suficiente para inducir la translocación nuclear de Exd *in vivo*. Sin embargo, mutaciones en los residuos de unión al DNA del homeodominio de Hth reprimen la función de esta homeoproteína. Hth se une al DNA como parte del complejo trimérico Hth-Hox-Exd, siendo este complejo fundamental para la activación de diferentes genes Hox, evidenciando que las homeoproteínas funcionan en un complejo multiproteico compuesto por proteínas Hth, Hox y Exd unidas al DNA. (Ryoo *et al.*, 1999). Posteriormente, mediante mutaciones puntuales en células beta y células acinares, se determinó que miembros de las subclases PBX y MEIS forman complejos multiméricos con la homeoproteína PDX1, activando la transcripción. La acción es dada por la homeoproteína pancreática PDX1 al formarse un complejo trimérico con PBX1B y MRG1 (Swift *et al.*, 1998).

PBX y MEIS se unen al DNA mediante un complejo trimérico con HOXB1, el cual media la transcripción de HOXB1 *in vivo* (Jacobs *et al.*, 1999). Así mismo se ha descrito que existe interacción trimérica de MEIS con los complejos PBX-HOXD4 y PBX-HOXD9 unidos al DNA (Shanmugam *et al.*, 1999).

Existe evidencia de la formación de un complejo trimérico corresponde a Prep1-Pbx1-Hoxb1 *in vitro*, en el cual la interacción con Prep1 potencia la habilidad del complejo Hoxb1-Pbx1 para la activación transcripcional del sitio blanco, por lo que se sugiere que Prep1 es un componente adicional en la regulación transcripcional de proteínas Hox (Berthelsen *et al.*, 1998). Mediante ensayos *in vitro*, se encontró que AbdB interacciona con el DNA en conjunto con Exd y Hth (Kannan *et al.*, 2010) y que Lab, Scr, Antp, Ubx, AbdA y AbdB interaccionan con Exd en forma dimérica y con Exd y Hth en

forma trimérica (excepto AbdB) (Hudry *et al.*, 2012). Adicionalmente, Crocker y colaboradores encontraron que la interacción trimérica Ubx-Exd-Hth reconoce secuencias específicas en el DNA (Crocker *et al.*, 2015).

2.5 FRET/BiFC

La técnica de Complementación Biomolecular Fluorescente (BiFC) permite detectar la interacción entre dos proteínas en células o en organismos, para determinar si la interacción probable ocurre en un ambiente celular normal y a su vez evidenciando su localización intracelular. BiFC está basada en el descubrimiento de que una proteína fluorescente dividida en 2 fragmentos pierde su fluorescencia, pero si estos fragmentos se acercan entre sí, la fluorescencia se reconstituye (Fig. 9). De manera que si cada fragmento es unido a una proteína de interés y ambas proteínas interaccionan, la unión de los fragmentos es facilitada por la interacción entre proteínas unidas a estos fragmentos (Kerppola, 2008). Por otra parte, como se muestra en la Fig. 9 la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluoróforos consiste en la transferencia de energía de un fluoróforo en estado excitado (conocido como donador) a un fluoróforo aceptor, por lo que hay una reducción en la emisión del donador y un consecuente incremento en la fluorescencia del aceptor (Ciruela, 2008).

En las últimas décadas se han desarrollado diversas tecnologías para describir PPIs utilizando proteínas fluorescentes, utilizando principalmente adaptaciones de FRET y BiFC. Se han desarrollado estrategias para observar múltiples interacciones diméricas, como BiFC multicolor y BiFC Rainbow. (Hu & Kerppola. 2003 Wang *et al.*, 2018), o interacciones triméricas, como FRET de tres fluoróforos, TriFC, TFFC y FRET basado en BiFC (Galperin *et al.*, 2004; Offenborn *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Shyu *et al.*, 2008)

En el sistema de FRET basado en BiFC (FRET/BiFC) propuesto por Shyu y colaboradores en 2008 (Fig. 33 del Apéndice I). En el sistema FRET/BiFC utiliza la proteína fluorescente Cerulean fusionada a NFAT1 y los fragmentos VC y VN fusionados a las proteínas Fos y Jun, de manera que la interacción dimérica de Fos-Jun permite reestablecer la fluorescencia de Venus y la interacción de la tercera proteína NFAT1 con

el dímero Fos-Jun va a permitir su detección mediante la transferencia de detectada mediante FRET como se muestra en la Figura 9 (Shyu *et al.*, 2008). Dado lo anterior en esta tesis analizamos la utilización de este sistema FRET/BiFC para la caracterización de interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIIE β , BIP2 y Exd como se muestra en la estrategia general descrita en detalle en la Fig. 10.

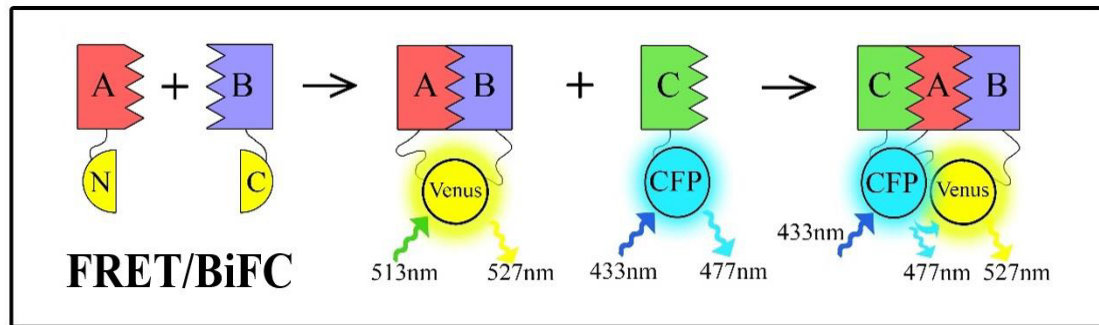


Figura 9. Esquema de la técnica de FRET basado en BiFC (FRET/BiFC). De izquierda a derecha se muestra la interacción entre las proteínas marcadas como A y B fusionadas a los extremos N y C de Venus, reconstituyendo la fluorescencia de Venus (BiFC). La presencia de tercer factor representado como C fusionado a CFP cuando interacciona con el complejo AB permite la aproximación de las proteínas fluorescentes de tal manera que interaccionan la tres donde CFP actúa como donador y Venus como aceptor.

Tomado y modificado de Ciruela 2008

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de las interacciones existentes entre las homeoproteínas y los factores transcripcionales de la maquinaria basal de transcripción en el desarrollo de distintos organismos, activando o reprimiendo distintos genes que contribuyen a la regulación génica, además de la creciente evidencia de la formación de distintos complejos multiméricos. Por lo que el estudio de las interacciones triméricas de Antp-TBP con homeoproteínas y factores transcripcionales de la maquinaria basal de transcripción permitirán aportar mayor información al interactoma de Antp, así como el mejor entendimiento de los mecanismos de regulación génica y el control genético que rigen el desarrollo de los organismos.

4. HIPÓTESIS

El complejo Antp-TBP presenta interacciones triméricas con homeoproteínas y factores transcripcionales de la maquinaria basal de transcripción.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar si el complejo Antp-TBP presenta interacciones triméricas con factores transcripcionales y homeoproteínas.

Objetivos Particulares:

1. Determinar si el factor transcripcional TFIIIE β interactúa con el dímero Antp-TBP.
2. Establecer la presencia de la interacción trimérica Antp-TBP/BIP2.
3. Analizar la interacción de forma trimérica de Exd con el complejo Antp-TBP.

6. ESTRATEGIA GENERAL

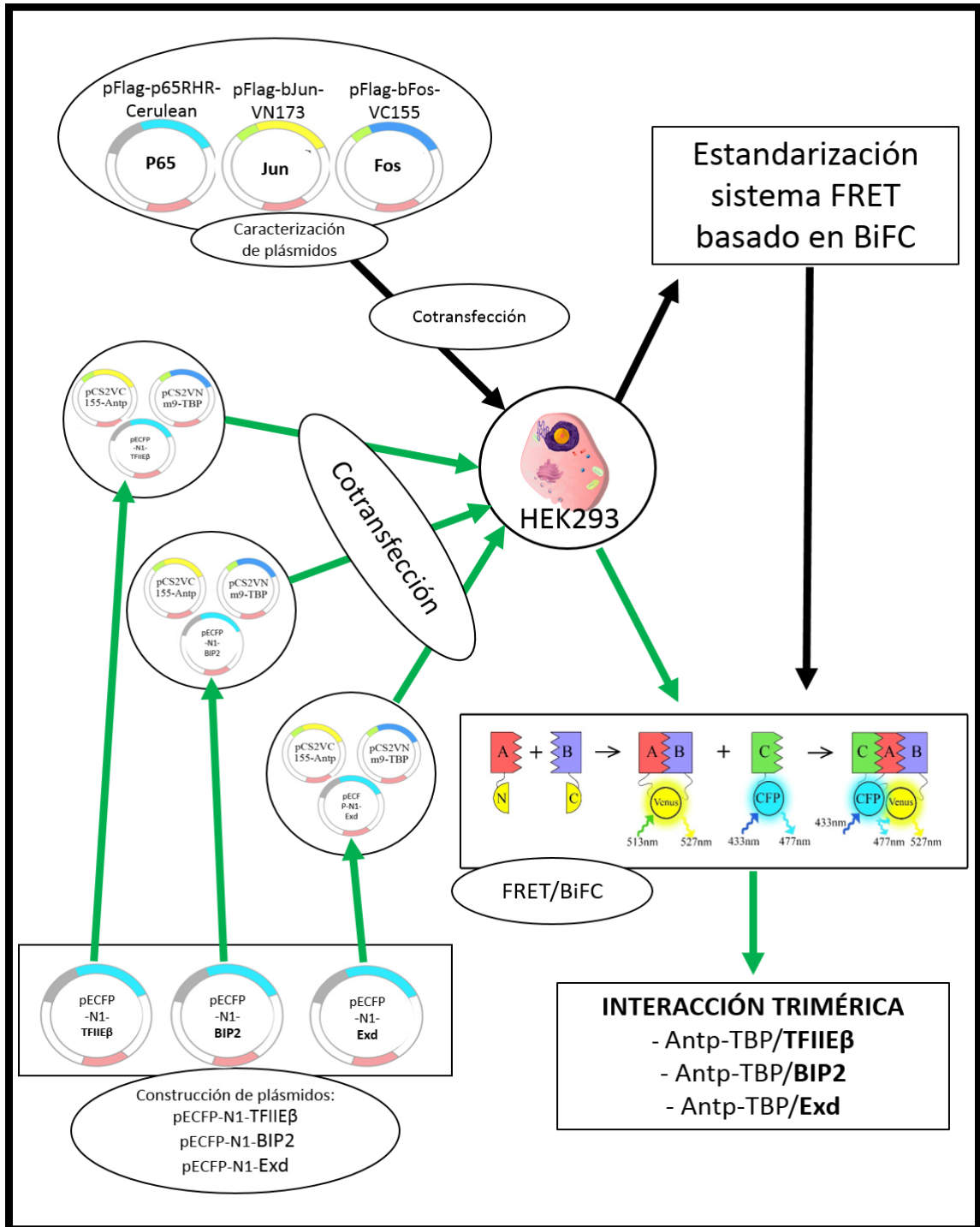


Figura 10. Estrategia general para el análisis de la interacción trimétrica Antp-TBP/TfIIeβ/BIP2/Exd. En el diagrama se esquematiza la construcción de los plásmidos pECFP-N1-TfIIeβ, pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ y pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ así como la cotransfección de los plásmidos pCS2VC155-Antp y pCS2VN119-TBP en la línea celular HEK293 para posteriormente determinar las interacciones trimétricas mediante el sistema FRET/BiFC estandarizado con la interacción trimétrica Jun-Fos-p65.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Estandarización del sistema de FRET/BiFC con la interacción trimérica Jun-Fos-p65

7.1.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, -p65ΔRHRCerulean, pBiFC-bFosΔZipVC155, -bJunVN173 y -bFosVC155

Los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, pFlag-p65ΔRHRCerulean, pBiFC-bFosΔZipVC155, pBiFC-JunVN173 y pBiFC-bFosVC155 donados amablemente por el Dr. Chang-Deng Hu codificantes para las proteínas p65Cerulean, p65ΔCerulean, ΔFosVC, JunVN y FosVC respectivamente, fueron propagados en 50 μL de bacterias *Escherichia coli* TOPO10 calcio-competentes (Ca⁺⁺) mediante choque térmico. La mezcla de bacterias con DNA se incubó 10 minutos en hielo, 1 minuto a 42°C en baño maría y 5 minutos en hielo. Se adicionaron 200 μL de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 1 hora a 180 rpm, posteriormente fueron sembradas en placas de agar LB adicionado con ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 horas. Algunas colonias de bacterias resultantes, fueron seleccionadas e inoculadas en tubos con 3 mL de LB con 5 μL de ampicilina [50 mg/mL] e incubados toda la noche a 37°C en agitación constante a 180 rpm y posteriormente se realizaron extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala mediante lisis alcalina. La pureza y cantidad de DNA obtenido fue cuantificada mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000.

La identidad molecular de cada plásmido fue confirmada mediante caracterización enzimática, utilizando enzimas de restricción diagnósticas. El plásmido pBiFC-bFosΔZipVC155 fue digerido con las enzimas *TaqI*, *BamHI*, *EcoRI* y *XhoI*; pBiFC-bJunVN173 fue caracterizado con *TaqI*, *AgeI-HindIII* y *EcoRI*; pBiFC-bFosVC155 se digirió con *TaqI*, *BamHI* y *EcoRI*. Los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean y pFlag-Δp65RHRCerulean fueron caracterizados con las enzimas *PstI*, *AgeI-EcoRI* y *XbaI-KpnI*.

Para todas las digestiones enzimáticas se consideraron las cantidades mostradas en la tabla 1. Se digirieron 3500ng de DNA plasmídico en un volumen de reacción de 10 μL en todos los casos aforando con H₂O miliQ.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la digestión con enzimas de restricción

Reactivos	Cantidad (μL)
DNA (3500ng)	~1.0
Enzima (10 U/ μL)	0.3
Buffer 10X	1.0
H ₂ O	7.7
Volumen Total	10.0

Todas las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 16 horas, y fueron cargadas en agarosa al 0.8% para evidenciar su identidad molecular. Una vez confirmada la identidad molecular de los cinco plásmidos, las bacterias que contenían cada plásmido fueron sembrados en 100mL de medio LB (Luria Bertani) adicionando 100 μL de ampicilina [50 mg/mL] y se incubaron 16 horas a 37°C, posteriormente las bacterias resultantes fueron empaquetadas en tubos de 50 mL y se les realizo extracción de DNA a mediana escala con el kit comercial QIAGEN (QIAGEN® Plasmid Handbook, Valencia, CA, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA obtenido fue suspendido en 50 μL de H₂O miliQ estéril y la cantidad del DNA así como su pureza obtenida fue cuantificada mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000, aquellas muestras que contuvieran valores de pureza superiores a 1.75 en una absorbancia entre 260 y 280nm fueron considerados libres de contaminantes proteicos, y valores superiores a 2.0 en una absorbancia entre 260-230nm fueron considerados libres de contaminantes de tipo carbohidratos (Miesfeld, 1999). Las muestras de DNA con estas características fueron seleccionadas para ser transfectadas en células HEK293 de riñón embrionario humano.

7.1.2 Transfección plasmídica en la línea celular HEK293

Los ensayos de transfección se realizaron en células HEK293 en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA). Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/pozo en 2mL medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) y 1% de antibiótico (ampicilina/estreptomocina). Las células fueron mantenidas en una atmósfera

constante de 95% de humedad, 5% CO₂ y 37°C de temperatura. Las concentraciones de los DNAs transfectados en la línea celular HEK293 variaron de 1500-2500ng con una pureza de 1.80-1.99nm como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración y pureza de los plásmidos transfectados en células HEK293

Plásmido	Concentración (ng/uL)	Pureza 260-280nm	Pureza 260-230nm
pFlag-p65RHRCerulean	2183.0	1.88	2.22
pFlag-p65ΔRHRCerulean	1779.8	1.98	2.45
pBiFC-bFosVC155	1790.0	1.98	2.43
pBiFC-bFosΔZipVC155	1820.0	1.96	2.46
pBiFC-JunVN173	2400.0	1.83	2.22
pCS2VC155-Antp	1823.0	1.95	2.36
pCS2VNm9-TBP	1860.0	1.90	2.31
pECFP-N1-TFIIIEβ	3144.8	1.87	2.28
pECFP-N1-BIP2 ₁₋₈₉	1672.0	1.99	2.45
pECFP-N1-Exd ₁₄₄₋₃₇₆	3000.0	1.89	2.28
pCAGmCherry	3500	1.85	2.21

Las cotransfecciones fueron realizadas al obtener un 50% de confluencia celular, utilizando el polímero catiónico polietiliminina (PEI) 15mM de 25kD (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL USA). La transfección se basa en la formación de aglomerados de DNA/PEI que se internalizan en la célula vía endocitosis (Demeneix *et al.*, 1997). Para realizar la transfección se preparó una solución de PEI/NaCl la cual consistió en agregar 2 μL de PEI [15 mM] por cada μg de DNA a transfectar en un volumen final de 100μL de NaCl [150 mM] por pozo, homogenizado con vortex. En un tubo eppendorf se añadieron 6000 ng de DNA (fraccionando en cantidades iguales en caso de ser diferentes plásmidos) en un volumen de 100 μL de NaCl [150mM]. Posteriormente, se agregaron 100 μL de la solución PEI/NaCl, se homogeniza con vortex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución resultante fue añadida al cultivo celular como se esquematiza en la Figura 11 mediante goteo suave y se incubó durante 48 horas a 37°C en una atmósfera constante de 95% de humedad y 5% CO₂ antes de la toma de fotografías mediante microscopía confocal.

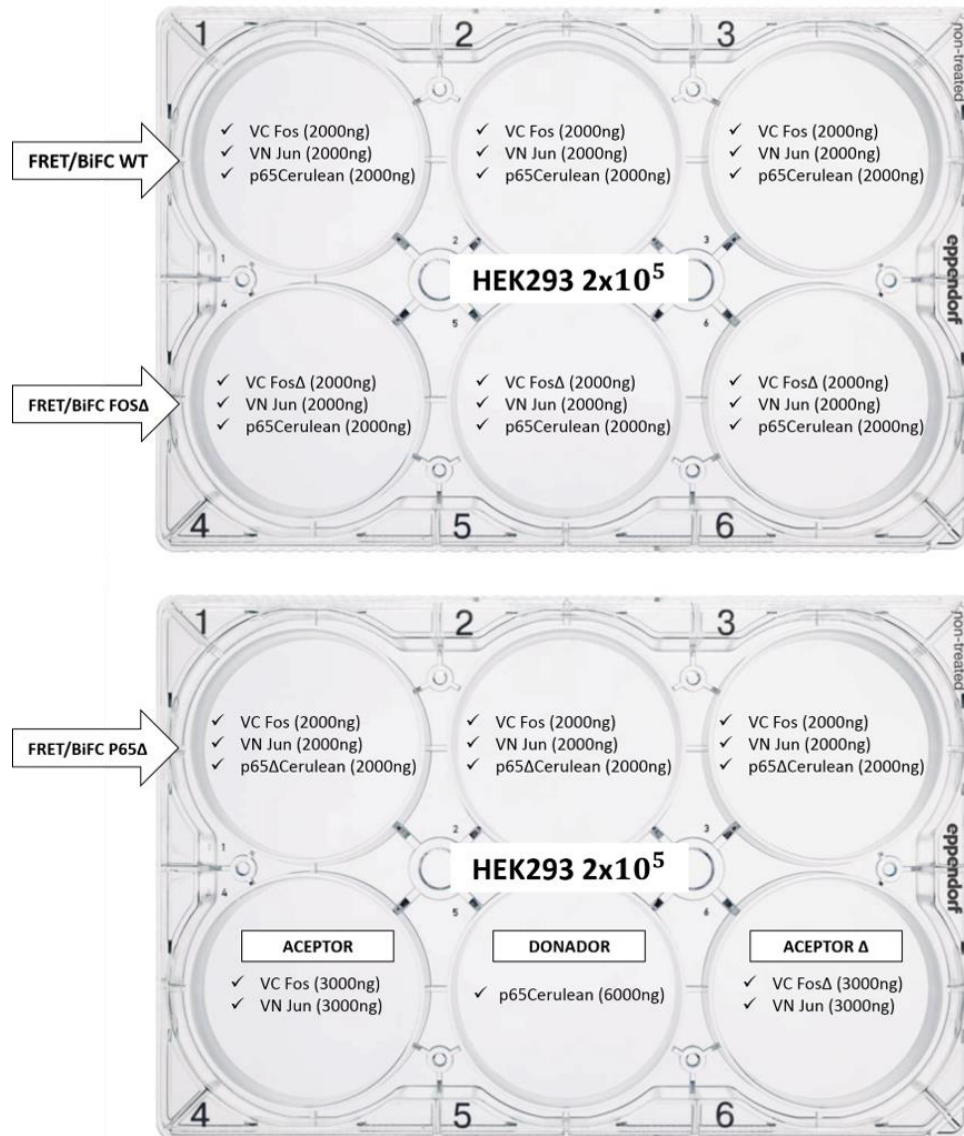


Figura 11. Estrategia de transfección en células HEK293 para la interacción trimérica Jun-Fos-p65.

El diagrama muestra la estrategia de transfección de los plásmidos utilizados para la estandarización del sistema FRET/BiFC. En la placa de arriba los pozos 1-3 muestran un triplicado de la transfección de los plásmidos codificantes para los factores Fos y Jun fusionados a VC y VN respectivamente además de p65Cerulean (2000ng de cada plásmido), correspondiente a FRET/BiFC WT. Los pozos 4-6 de la placa superior muestran la transfección de los plásmidos codificantes para las proteínas de fusión ΔFosVC, JunVN y p65Cerulean que corresponden a FRET/BiFC disminuido por falta de aceptor (FRET/BiFC FOSΔ). La placa de abajo en los pozos 1-3 se muestra la transfección por triplicado de los plásmidos codificantes para: FosVC, JunVN y p65ΔCerulean correspondientes a un FRET/BiFC P65Δ. Los pozos 4, 5 y 6 muestran la transfección de Fos VC (3000ng), Jun VN (3000ng) para la reconstitución de Venus (Aceptor); p65Cerulean para obtener la fluorescencia de Cerulean (Donador) y FosΔ VC (3000ng) y Jun VN (3000ng) correspondiente a reconstitución disminuida de Venus (Aceptor).

7.1.3 Visualización de las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante microscopía confocal para el sistema FRET/BiFC

Para el análisis de las interacciones Jun-Fos-p65 mediante microscopía confocal usando el sistema FRET/BiFC (FRET basado en BiFC) se visualizaron las células transfectadas utilizando los láseres 405 y 473. Las fotografías de las células fueron tomadas de 512 pixeles a 20 μs /pixel en modo espectral de 420 a 660 cada 10 nm con un ancho de 10 nm. Se utilizó 600v de voltaje, 1x de ganancia y 0% de offset con 5 y 10% de potencia de láser, además de 100 y 200 nm de apertura confocal para comparar la mejor calidad en las fotografías. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal láser multifotón (FV-1000) marca Olympus y se utilizaron los láseres 405, 473 y 559 para excitar a las proteínas fluorescentes Cerulean, Venus y Cherry, respectivamente.

7.1.4 Cuantificación de las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante ImageJ

Para determinar las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante el sistema de FRET/BiFC, se cuantificó la eficiencia de la transferencia de energía mediante el desmezclado espectral simultaneo de los espectros de emisión y excitación utilizando el plug-in FRETTY en el programa de uso libre ImageJ. Para llevar a cabo el análisis de las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65 se realizó la toma de 5 espectros.

1. S_D^D Espectro de referencia 1, muestra sólo con donador (Cerulean), excitada como donador (405 nm)
2. S_D^A Espectro de referencia 2, muestra sólo con aceptor (Venus), excitada como donador (405 nm)
3. S_A^A Espectro de referencia 3, muestra sólo con aceptor (Venus), excitada como aceptor (473 nm)
4. S_D^{DA} Espectro de FRET/BiFC muestra con donador y aceptor (Cerulean y Venus), excitada como donador (405 nm)
5. S_A^{DA} Espectro de FRET/BiFC, muestra con donador y aceptor (Cerulean y Venus), excitada como aceptor (473 nm)

Para mantener la nomenclatura de las fotografías designada por Mustafa *et al.*, en el 2013, S es designado como espectro (spectrum, intensidad de la fluorescencia en diferentes longitudes de onda), los superíndices se refieren a las muestras (D para la

muestra solo con donador, A para la muestra solo con aceptor y DA para la muestra con ambos fluoróforos) y los subíndices se refieren a la longitud de onda de la luz de excitación utilizada para obtener el espectro, que serán designadas para excitar el fluoróforo donador D (405 nm) y el fluoróforo aceptor A (473 nm).

Los espectros fueron tomados utilizando los mismos parámetros (potencia del láser, longitudes de onda de detección, apertura confocal, voltaje, offset, etc.) y los espectros de las muestras sólo con el aceptor (S_D^A y S_D^A), así como las interacciones triméricas mediante FRET (S_D^{DA} y S_D^{DA}) fueron tomados en el mismo campo y con el mismo enfoque. Se tomaron fotografías de 3 a 5 campos de los espectros S_D^{DA} y S_D^{DA} , de manera que se encontraran al menos 50 células que contuvieran fluorescencia de Venus y Cerulean. En el análisis de FRETYY se consideró un rendimiento cuántico de 0.62 para el donador (ECFP) y 0.57 para el aceptor (Venus).

El procesamiento consistió en determinar el espectro de emisión del fluoróforo donador excitado con el láser 405 nm y el espectro del aceptor excitado con los láseres 405 y 473 nm, para posteriormente poder determinar la transferencia de energía en los espectros de las muestras con los dos fluoróforos. Se realizaron correcciones de ruido de fondo de todos los espectros antes de determinar las interacciones triméricas mediante FRET/BiFC mediante la herramienta de “background reduction” del software ImageJ. Una vez obtenida la imagen representativa de las interacciones triméricas FRET/BiFC de cada campo se seleccionaron cuidadosamente ROIS (Regions of interest por sus siglas en inglés) que corresponden a FRET para cuantificar el valor de E (E =transferencia de energía donador \rightarrow aceptor) de al menos 50 células con FRET en cada pozo y posteriormente los datos obtenidos fueron graficados en Excel, a los cuales se les determinó la media por repetición y la desviación estándar de la media. El uso de FRETYY en ImageJ se describe con mayor detalle en el apéndice II.

7.2 Interacción trimérica de TFIIIE β con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

7.2.1 Construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β

Para la construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β , se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaron la secuencia codificante de TFIIIE β de tal

manera que se excluyera el codón de paro. Así mismo se incluyeron los nucleótidos necesarios para completar una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos entre el factor de transcripción y la proteína ECFP. El plásmido pPAC-TFIIIE β construido por Cárdenas-Chávez, 2012 en nuestro laboratorio se utilizó como molde para la reacción de PCR, la cual se realizó agregando 2.5 μ L de los oligonucleótidos forward y reverse [5mM], 1 μ L de DNA molde, 0.1 μ L de Taq polimerasa (Invitrogen), 2.5 μ L de buffer Taq polimerasa 10X, 0.75 μ L de MgCl₂ [50mM], 0.25 μ L de dNTPs [10 mM] aforando a un volumen de 25 μ L con H₂O MiliQ. Las condiciones de amplificación y secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia codificante al factor TFIIIE β se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de amplificación mediante PCR para el factor transcripcional TFIIIE β

PROGRAMA		Secuencia codificante: TFIIIE β			
		Tiempo	Temperatura	Oligo 5´	Oligo 3´
Desnaturalización inicial		0:03:00	94°C	ATG GGC CCG GGA TCC ATC CAA GCC TGT TGA GA	GCA CCG GTG CTC CAC CTG ATT TGC TGG AAG TAA TGT CAG AGT AAT C
30 C I C L O S	Desnaturalización	0:00:30	94°C		
	Alineamiento	0:00:30	55°C		
	Elongación	0:00:45	72°C		
Elongación final		0:05:00	72°C		

El amplicón de 926 pb obtenido codificante a TFIIIE β fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con EtBr (Bromuro de etidio) y visualizado en un fotodocumentador de la marca BIORAD. La banda del amplicón correspondiente a 926 pb fue recortada del gel y purificada con ayuda del kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. La banda correspondiente a TFIIIE β previamente purificada fue ligada al vector de clonación comercial pCR2.1TOPO siguiendo las indicaciones por el proveedor. La ligación fue propagada mediante transformación bacteriana por choque térmico, en 50 μ L de *E. coli* TOPO10 Ca⁺⁺ como se describió anteriormente en la sección 8.1.1. Posteriormente fueron sembradas en placas de agar LB adicionado con ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 horas. Algunas colonias de bacterias resultantes, fueron seleccionadas e inoculadas en tubos con 3 mL de LB con 5 μ L de ampicilina [50 mg/mL]

e incubados toda la noche a 37°C en agitación constante a 180 rpm y posteriormente se realizaron extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala mediante lisis alcalina.

7.2.1.1 Extracción de DNA

Todas las extracciones de DNA plasmídico fueron realizadas por el método de lisis alcalina modificado (Sambrook *et al.*, 1989). Se inició empaquetando las bacterias en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL mediante centrifugaciones sucesivas para luego desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular agregando 100 µL de Solución I (Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con RNAsa A de la marca Invitrogen a una concentración final de 0.02 mg/mL. Se resuspendió el botón resultante con vortex hasta homogenizar, para luego incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µL de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron por inversión y se incubaron durante 5 minutos en hielo. Terminada la incubación, se agregaron 150 µL de Solución III (KOAc 5M, CH₃COOH), se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a tubos nuevos con un volumen de isopropanol al 100% (~500 µL). Se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante quedando solamente una pastilla de material genético. El DNA resultante fue lavado agregando 400 µL de etanol al 70% y centrifugando 10 minutos a 14,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 15 minutos para después resuspenderla en 20 µL de H₂O miliQ. El DNA purificado fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Para determinar la presencia del inserto en el vector de clonación comercial pCR2.1TOPO las muestras seleccionadas fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI* y visualizadas en un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. Las clonas positivas fueron confirmadas mediante secuenciación en la compañía MACROGEN USA. Una vez confirmada la secuencia nucleotídica de TFIIEβ mediante secuenciación, se realizó la subclonación al vector pECFP-N1 utilizando las enzimas *ApaI* y *AgeI*. Se digirieron los plásmidos pCR2.1TOPO-TFIIEβ y pECFP-N1, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para después realizar una purificación de los fragmentos de interés mediante el kit comercial de Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega,

Madison, WI, USA). Se realizó una ligación en una proporción 1:10 (Vector:Inserto) y se incubó a 24°C durante toda la noche.

La ligación fue transformada en bacterias *E. coli TOP10* Ca⁺⁺ competentes como se describió anteriormente, se sembraron en placas de agar LB con kanamicina [50 mg/mL] e incubadas a 37°C durante 16 horas. Las colonias obtenidas fueron utilizadas para inocular 3 mL de medio LB con 3 µL de kanamicina y se incubaron a 37°C durante 16 horas a 180 rpm. Posteriormente se realizó extracción de DNA mediante lisis alcalina a pequeña escala como se describió en la sección 7.2.1.1. La construcción pECFP-N1-TFIIIEβ fue caracterizada utilizando las enzimas diagnósticas *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* y *AgeI-ApaI*. Todas las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 16 horas y los patrones de restricción fueron observados en un gel de agarosa al 0.8% tenidos con EtBr y visualizados en un fotodocumentador marca BIORAD.

Una vez caracterizada la construcción pECFP-N1-TFIIIEβ fue transformada en bacterias *E. coli TOP10* Ca⁺⁺ competentes como se describió anteriormente y sembradas en un matraz con 100mL de medio LB con 100 µL de kanamicina [50 mg/mL]. El matraz se incubó a 180 rpm durante 16 horas, posteriormente las bacterias resultantes fueron empaquetadas utilizando tubos de 50mL y se procedió a realizar extracción de DNA a mediana escala con el kit comercial QIAGEN (QIAGEN® Plasmid Handbook, Valencia, CA, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA obtenido fue suspendido en 50 µL de agua miliQ estéril, la pureza y cuantificación del DNA fue cuantificada mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000, las muestras de DNA con valores superiores a 1.75 y 2.0 en una absorbancia de 260-280nm y 260-230nm respectivamente fueron considerados libres de contaminantes por lo que las muestras que cumplieron con estas características fueron consideradas para transfectar en células HEK293.

7.2.2 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP

Los plásmidos pCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP construidos en nuestro laboratorio (Cárdenas-Chávez, 2012) fueron caracterizados utilizando las enzimas de restricción: *BamHI*, *PvuII*, *HindIII* y *XbaI* para pCS2VNm9TBP y *BamHI*, *SmaI*, *KpnI* y

*Pst*I para pCS2VC155Antp. Las caracterizaciones fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.8% tenidos con EtBr y visualizados en un fotodocumentador marca BIORAD.

7.2.3 Análisis de la interacción trimérica del complejo Antp-TBP-TFIIIE β mediante FRET/BiFC

Para confirmar la expresión de la proteína de fusión TFIIIE β -ECFP, así como la reconstitución de Venus mediada por la interacción dimérica Antp-TBP, los plásmidos pECFP-N1-TFIIIE β , pCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP fueron cotransfectados en la línea celular HEK293 junto con el plásmido pCAGmCherry, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 7.1.2. Posteriormente, las células fueron transfectadas de acuerdo a la estrategia mostrada en la Figura 12.

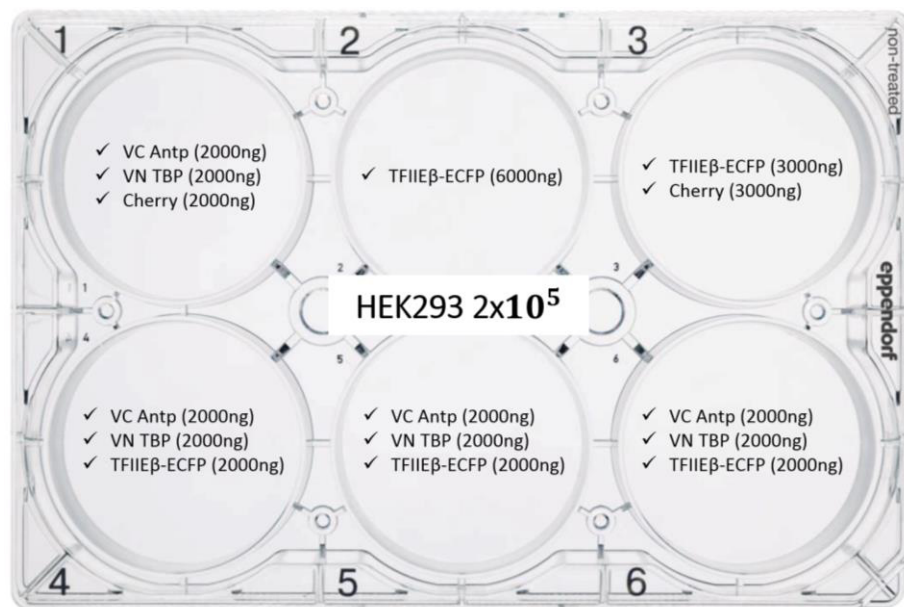


Figura 12. Estrategia de transfección de los plásmidos codificante para las proteínas de fusión TFIIIE β , Antp y TBP. La figura muestra la estrategia de transfección en células HEK293 a una densidad de 2×10^5 con los plásmidos: **1)** pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TBP y pCAGmCherry (2000ng de cada plásmido). **2)** pECFP-N1-TFIIIE β (6000ng). **3)** pECFP-N1-TFIIIE β (3000ng) y pCAGmCherry (3000ng). **4-6)** pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TBP y pECFP-N1-TFIIIE β (2000ng de cada plásmido).

Para el análisis de la interacción trimérica de Antp-TBP-TFIIIE β mediante FRET/BiFC las células transfectadas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera constante de 95% de humedad y 5% CO₂ para posteriormente ser observados y documentadas mediante microscopia confocal de acuerdo con las características descritas en la sección 7.1.3. Los detalles de la transfección en la Figura 12 muestran un total de 6000ng de DNA por pozo dividido entre la cantidad de los plásmidos transfectados. Todos

los ensayos de transfección fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Para determinar la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIE β , mediante el sistema de FRET/BiFC, se cuantificó la eficiencia de la transferencia de energía mediante el desmezclado espectral simultaneo de los espectros de emisión y excitación utilizando el plug-in FRETYY en el programa de uso libre ImageJ utilizando las fotografías previamente capturadas con una apertura confocal de 200nm y 10% de la potencia de los láseres utilizados, como se describió previamente en la sección 7.1.4.

7.3 Interacción trimérica de BIP2 con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

7.3.1 Construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉

Para la construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 4) que excluyeron el codón de paro e incluyeron los nucleótidos necesarios para completar una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos entre el factor de transcripción y ECFP. En la reacción de PCR se utilizó como molde el plásmido pPAC-BIP2₁₋₉₈ (Cárdenas-Chávez, 2012) disponible en nuestro laboratorio. Para la reacción de PCR, se agregaron 2.5 μ L de los oligonucleótidos forward y reverse [5mM], 1 μ L de DNA molde, 0.1 μ L de Taq polimerasa (Invitrogen), 2.5 μ L de buffer Taq polimerasa 10X, 0.75 μ L de MgCl₂ [50mM], 0.25 μ L de dNTPs [10 mM] aforando a un volumen de 25 μ L de H₂O MiliQ, los detalles del programa utilizado para amplificar el factor BIP2₁₋₈₉ se muestra en la Tabla 4. El amplicón resultante de 303 pb fue confirmado mediante electroforesis, cargado en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con EtBr y visualizado a través de un fotodocumentador marca BIORAD. La banda correspondiente al factor transcripcional BIP2₁₋₈₉ fue purificada con el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Tabla 4. Programa de amplificación del factor BIP2 mediante PCR

PROGRAMA		Secuencia codificante: BIP2 ₁₋₈₉			
		Tiempo	Temperaturas	Oligo 5´	Oligo 3´
Desnaturalización inicial		0:03:00	94°C	ATG GGC CCG GGA TGA TGG CAG ACA GAT ACG CT	GCA CCG GTG CTC CAC CTG AAG GCT CGA CAT TAC CTA TGT AGT C
30 C I C L O S	Desnaturalización	0:00:30	94°C		
	Alineamiento	0:00:30	55°C		
	Elongación	0:00:30	72°C		
Elongación final		0:05:00	72°C		

El producto de PCR codificante a BIP2₁₋₈₉ de 303 pb fue ligado al vector comercial pCR2.1TOPO siguiendo las indicaciones de proveedor. Las ligaciones fueron transformadas en 50 µL de bacterias *E. coli TOPO10* Ca⁺⁺ (calcio-competentes) mediante choque térmico, como se describió anteriormente, después de la transformación se adicionaron 200 µL de medio LB sin antibiótico y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante de 180 rpm, posteriormente fueron sembradas en placas de agar LB adicionado con ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 horas. Algunas colonias de bacterias previamente transformadas, fueron seleccionadas e inoculadas en tubos con 3 mL de LB con 5 µL de ampicilina [50 mg/mL] e incubados toda la noche a 37°C en agitación constante a 180 rpm para posteriormente realizar extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala mediante lisis alcalina, como se describió anteriormente.

Para determinar la presencia del inserto en el vector de clonación comercial pCR2.1TOPO las muestras fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI* y visualizadas en un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. Las clonas que dieron el patrón esperado fueron confirmadas mediante secuenciación en la compañía MACROGEN USA. Previamente confirmada la secuencia nucleotídica correspondiente a BIP2₁₋₈₉ (303pb) en el vector de clonación pCR2.1TOPO. La clona positiva de pCR2.1TOPO-BIP2₁₋₈₉ y el vector pECFP-N1 se digirieron con las enzimas *ApaI* y *AgeI*, las digestiones fueron realizadas basadas en la Tabla 1 y se incubaron a 37°C durante 16 horas.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para después realizar una purificación de los fragmentos de interés mediante el kit comercial de Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). El inserto purificado

correspondiente a BIP2₁₋₈₉ de 298pb fue ligado al plásmido pECFP-N1 digerido con las enzimas *ApaI* y *AgeI* en una proporción 1:10 (Vector:Inserto) e incubado a 24°C durante toda la noche.

La reacción de ligación resultante fue utilizada para transformar bacterias *E. coli TOP10* Ca⁺⁺ competentes como se describió anteriormente, y sembradas en placas de agar LB con kanamicina [50 mg/mL] e incubadas a 37°C durante 16 horas. Las colonias resultantes fueron inoculadas en 3 mL de medio LB con 3 µL de kanamicina e incubadas a 37°C durante 16 horas a 180 rpm. Posteriormente se realizó extracción de DNA mediante lisis alcalina a pequeña escala como se describió en la sección 8.2.1.1. La construcción pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ se caracterizó utilizando las enzimas: *XhoI*, *PvuII*, *NdeI* y *NsiI*. Todas las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 16 horas y los patrones de restricción fueron observados en un gel de agarosa al 0.8% tenidos con EtBr y visualizados en un fotodocumentador marca BIORAD.

Una vez caracterizada la construcción pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ fue transformada en bacterias *E. coli TOP10* Ca⁺⁺ y se realizó extracción de DNA a mediana escala con el kit comercial QIAGEN (QIAGEN® Plasmid Handbook, Valencia, CA, EUA) como se describió anteriormente, la pureza y cuantificación del DNA obtenido fueron evaluadas mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000. Considerando valores superiores a 1.75 y 2.0 con una absorbancia entre 260-280nm y 260-230nm respectivamente como libres de contaminantes proteicos y de carbohidratos, las muestras que contenían estas características fueron consideradas para transfectar en células HEK293.

7.3.2 Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP/BIP2 mediante FRET/BiFC

Para confirmar la expresión de BIP2₁₋₈₉ fusionado a ECFP, la construcción pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ fue cotransfectada con el plásmido pCAGmCherry en la línea celular HEK293, de acuerdo al procedimiento previamente descrito en la sección 7.1.2. Posteriormente, las células fueron transfectadas de acuerdo a la estrategia mostrada en la Figura 13.

Para el análisis de la interacción trimérica de Antp-TBP-BIP₂₁₋₈₉ mediante FRET/BiFC las células transfectadas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera constante de 95% de humedad y 5% CO₂ para posteriormente ser observados y documentadas mediante microscopia confocal de acuerdo con las características descritas en la sección 7.1.3. Los detalles de la transfección en la Figura 13 muestran un total de 6000ng de DNA por pozo dividido entre la cantidad de los plásmidos transfectados. Todos los ensayos de transfección fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes



Figura 13. Estrategia de transfección de los plásmidos codificantes para BIP2-ECFP, VCantp, VNTBP. La imagen muestra la estrategia de transfección en células HEK293 a una densidad de 2×10^5 con: **1-3)** pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TBP y p pECFP-N1-BIP₂₁₋₈₉ (2000ng/pozo de cada plásmido). **4)** PCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP (3000ng de cada plásmido). **5)** 6000ng del plásmido pECFP-N1-BIP₂₁₋₈₉. **6)** pECFP-N1-BIP₂₁₋₈₉ y pCAGmCherry (3000ng de cada plásmido).

Para determinar las interacciones triméricas Antp-TBP-BIP₂₁₋₈₉, mediante el sistema de FRET/BiFC, se cuantificó la eficiencia de la transferencia de energía mediante el desmezclado espectral simultaneo de los espectros de emisión y excitación utilizando el plug-in FRETYY en el programa de uso libre ImageJ, utilizando las fotografías previamente capturadas con una apertura confocal de 200nm y 10% de la potencia de los láseres utilizados, como se describió previamente en la sección 7.1.4.

7.4. Interacción trimérica de Exd con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

7.4.1. Construcción del plásmido pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆

Para construir el plásmido pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 5) para amplificar la secuencia codificante de la homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ de tal manera que excluya el codón de paro e incluya los nucleótidos necesarios para completar una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos entre el factor de transcripción y la proteína ECFP.

En la reacción de PCR se utilizó como molde el plásmido pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ (Cárdenas-Chávez, 2012) disponible en nuestro laboratorio y se amplificó con 55°C como temperatura de alineamiento. Para la reacción de PCR, se agregaron 2.5 µL de los oligonucleótidos forward y reverse [5mM], 1 µL de DNA molde, 0.1 µL de Taq polimerasa (Invitrogen), 5 µL de buffer Taq polimerasa 10X, 0.25 µL de MgCl₂ [50mM], 1 µL de dNTPs [10 mM] aforando a un volumen de 25 µL de H₂O MiliQ. El programa de amplificación se detalla en la Tabla 5. El amplicón resultante de 734 pb fue purificado con ayuda del kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor y clonado al vector pCR2.1TOPO siguiendo las indicaciones de proveedor. Las ligaciones fueron transformadas en 50 µL de bacterias *E. coli TOPO10* Ca⁺⁺ (calcio-competentes) mediante choque térmico como se describió anteriormente. Algunas colonias resultantes, fueron seleccionadas e inoculadas en tubos con 3 mL de LB con 5 µL de ampicilina [50 mg/mL] e incubados toda la noche a 37°C en agitación constante a 180 rpm para posteriormente realizar extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala mediante lisis alcalina.

Tabla 5. Programa de amplificación por PCR para Exd

PROGRAMA	Secuencia codificante: Exd ₁₄₄₋₃₇₆				
	Tiempo	Temperaturas	Oligo 5´	Oligo 3´	
Desnaturalización inicial	0:03:00	94°C	ATG GGC CCG GGA TGG GTG CTG ACA ATG CCA TTG A	GCA CCG GTG CTC CAC CTG AGG GGC TTA GAT CCT GAT GGA GAT TTG G	
3 0 C I C L O S	Desnaturalización	0:00:30			94°C
	Alineamiento	0:00:30			55°C
	Elongación	0:00:45			72°C
	Elongación final	0:05:00			72°C

Para determinar la presencia del inserto en el vector de clonación comercial pCR2.1TOPO las muestras seleccionadas fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI* y visualizadas en un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. Las clonas positivas fueron confirmadas mediante secuenciación en la compañía MACROGEN USA. Una vez confirmadas las secuencias, se realizó la subclonación al vector pECFP-N1, utilizando las enzimas *ApaI* y *AgeI*. Se digirió la clona positiva, así como el vector pECFP-N1. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para purificar de los fragmentos de interés mediante el kit comercial de Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). El inserto purificado fue ligado al plásmido pECFP-N1 en una proporción 1:10 (Vector:Inserto) e incubado a 24°C durante toda la noche. La ligación resultante fue transformada en bacterias *E. coli TOP10 Ca⁺⁺* competentes como se describió anteriormente, y sembradas en placas de agar LB con kanamicina [50 mg/mL] e incubadas a 37°C durante 16 horas. Las colonias resultantes fueron utilizadas para inocular 3 mL de medio LB con 3 µL de kanamicina e incubadas a 37°C durante 16 horas a 180 rpm. Posteriormente, se realizó extracción de DNA mediante lisis alcalina a pequeña escala como se describió anteriormente. La construcción pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ fue caracterizada utilizando las enzimas: *PvuII*, *SalII*, *ApaI-AgeI*. Todas las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 16 horas y los patrones de restricción fueron observados en un gel de agarosa al 0.8% tenidos con EtBr y visualizados en un fotodocumentador marca BIORAD.

Una vez caracterizada la construcción pECFP-N1- Exd₁₄₄₋₃₇₆ fue transformada en bacterias *E. coli TOP10 Ca⁺⁺* y se realizó extracción de DNA a mediana escala con el kit

comercial QIAGEN (QIAGEN® Plasmid Handbook, Valencia, CA, EUA) como se describió anteriormente. Para evaluar la pureza y cantidad del DNA obtenido se utilizó espectrofotometría mediante el equipo NanoDrop modelo ND-1000. Considerando valores superiores a 1.75 y 2.0 con una absorbancia entre 260-280nm y 260-230nm respectivamente como libres de contaminantes proteicos y de carbohidratos, las muestras que contenían estas características fueron consideradas para transfectar en células HEK293.

7.4.2. Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP/Exd mediante FRET/BiFC

Para confirmar la expresión de Exd₁₄₄₋₃₇₆ fusionado a ECFP, la construcción pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ fue cotransfectada junto con el plásmido pCAGmCherry en la línea celular HEK293, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 7.1.2. La Figura 14 muestra los detalles y la estrategia de transfección en placas de cultivo de seis pozos con una densidad óptica de 2×10^5 células por mL.



Figura 14. Estrategia de transfección para la interacción trimérica Antp-TBP/Exd. En la imagen se muestra una placa de cultivo de seis pozos, con la estrategia de transfección en 2×10^5 células HEK293 con los plásmidos: **1-3**) pCS2VC155-Antp (2000ng), pCS2VNm9-TBP (2000ng) y pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ (2000ng). **4**) pCS2VC155-Antp (3000ng) y pCS2VNm9-TBP (3000ng). **5**) pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ (6000ng). **6**) pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y pCAGmCherry (3000ng en cada uno).

Para llevar a cabo el análisis de la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ mediante FRET/BiFC las células transfectadas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera constante de 95% de humedad y 5% CO₂ para posteriormente ser observados y documentados mediante microscopia confocal de acuerdo con las características descritas en la sección 7.1.3. Los detalles de la transfección en la Figura 4. muestran un total de 6000ng de DNA por pozo dividido entre la cantidad de los plásmidos transfectados. Todos los ensayos de transfección fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Para determinar las interacciones triméricas Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆, mediante el sistema de FRET/BiFC, se cuantificó la eficiencia de la transferencia de energía mediante el desmezclado espectral simultaneo de los espectros de emisión y excitación utilizando el plug-in FRETYY en el programa de uso libre ImageJ, utilizando las fotografías previamente capturadas, como se describió anteriormente en la sección 7.1.3. Se utilizaron 200nm de apertura confocal y 10% de la potencia de los láseres en todas las fotografías.

Todos los datos obtenidos de las interacciones triméricas Antp-TBP-TFIIE β /BIP2₁₋₈₉/Exd₁₄₄₋₃₇₆ analizadas en esta tesis fueron vaciados en una base de datos realizada en el programa de Excel del paquete de Office Microsoft 2016, para lo cual se obtuvieron la media y desviación estándar de las repeticiones que graficadas en el programa OriginPro Versión 8.0.

8. RESULTADOS

En esta tesis se analizaron las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β y BIP2 además de la homeoproteína Exd usando la técnica de FRET basado en BiFC (FRET/BiFC). Primeramente, se estandarizó el sistema de interacción trimérica FRET/BiFC utilizando el complejo Jun-Fos-p65 previamente descrita por Shyu *et al.*, 2008 y posteriormente se analizaron las interacciones triméricas de Antp-TBP con TFIIE β /BIP2/Exd.

8.1 Estandarización del sistema FRET/BiFC con la interacción trimérica de Jun-Fos-p65

8.1.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, -p65 Δ RHRCerulean, pBiFC-bFos Δ ZipVC155, -bJunVN173 y -bFosVC155

La interacción trimérica Jun-Fos-p65 se analizó utilizando los plásmidos pFlag-p65RHRCerulean, pFlag-p65 Δ RHRCerulean, pBiFC-bJunVN173, pBiFC-bFosVC155, y pBiFC-bFos Δ ZipVC155 fueron provistos amablemente por el Dr. Chang-Deng Hu y utilizados como controles para estandarizar los ensayos del sistema FRET/BiFC. La identidad molecular de los plásmidos controles fue confirmada mediante caracterización enzimática con enzimas de restricción diagnósticas. En la Figura 15 se muestran las caracterizaciones correspondientes para pFlag-p65RHRCerulean con las enzimas *Pst*I, *Age*I-*Eco*RI y *Xba*I-*Kpn*I (Fig. 15A), pFlag-p65RHRCerulean con las enzimas *Pst*I, *Age*I-*Eco*RI y *Xba*I-*Kpn*I (Fig. 15B), pBiFC-JunVN173 con las enzimas *Taq*I, *Bam*HI, *Eco*RI y *Xho*I (Fig. 15C), pBiFC-bFosVC155 con las enzimas *Taq*I, *Age*I-*Hind*III y *Eco*RI (Fig. 15D) y pBiFC-bFos Δ ZipVC155 con las enzimas *Taq*I, *Bam*HI y *Eco*RI (Fig. 15E). La digestión con las enzimas de restricción diagnósticas usadas en los cinco plásmidos analizados muestra que los fragmentos esperados en los geles (lado derecho) coincidieron en el tamaño en pb con las bandas esperadas en el diagrama virtual de la caracterización mostrado en lado izquierdo de todos los geles.

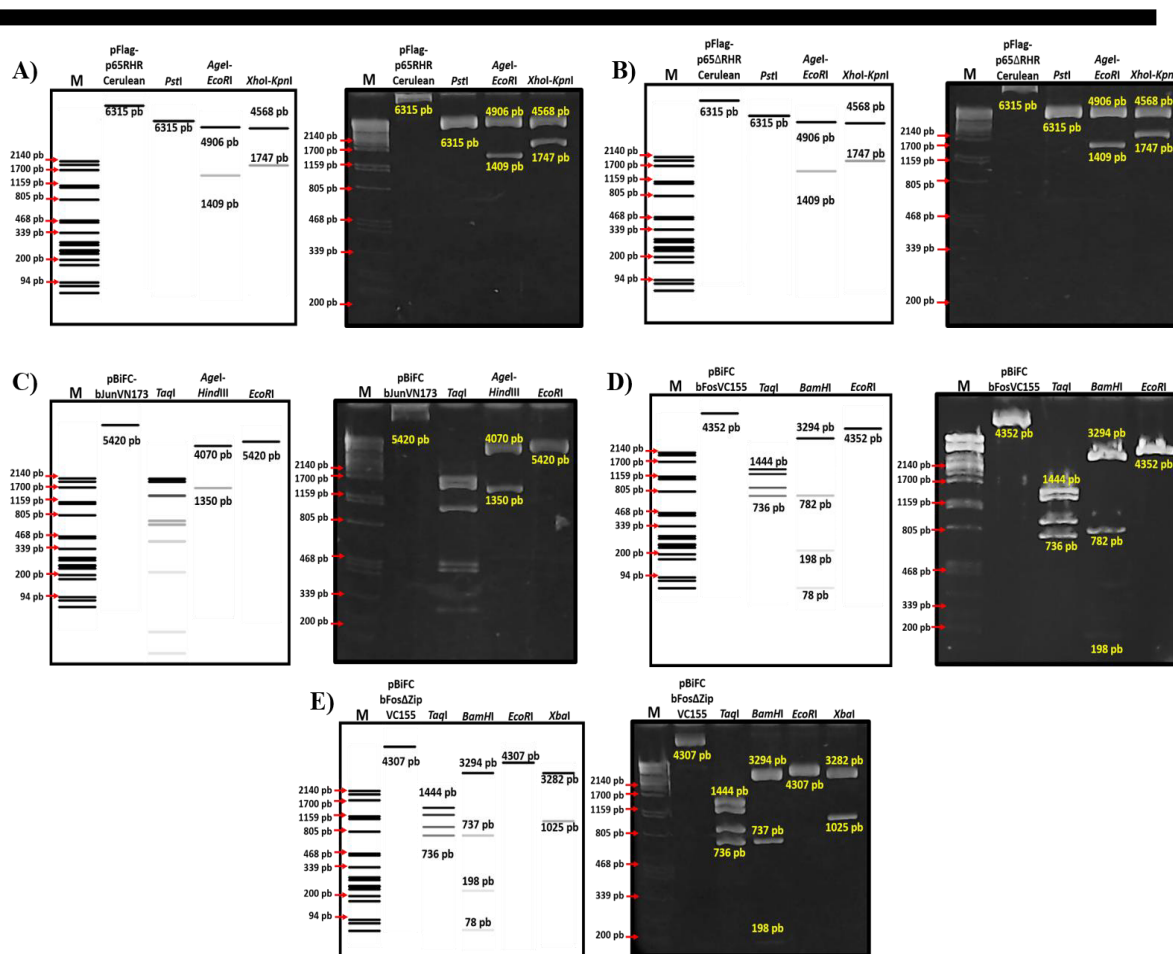


Figura 15. Caracterización enzimática de los plásmidos pFlag-p65RHR Cerulean, pBiFCbFosΔZipVC155, -bJunVN173 y -bFosVC155. A) El plásmido pFlag-p65RHR Cerulean cortado con las enzimas *PstI*, *AgeI-EcoRI* y *XbaI-KpnI*. B) El plásmido pFlag-p65ΔRHR Cerulean cortado con las enzimas *PstI*, *AgeI-EcoRI* y *XbaI-KpnI*. C) El plásmido pBiFC-bFosΔZipVC155 digerido con las enzimas *TaqI*, *BamHI*, *EcoRI* y *XhoI*. D) El plásmido pBiFC-bJunVN173 caracterizado con las enzimas *TaqI*, *AgeI-HindIII* y *EcoRI*. E) El plásmido pBiFC-bFosVC155 con las enzimas *TaqI*, *BamHI* y *EcoRI*. En todos los casos el diagrama en el lado izquierdo muestra la caracterización in silico esperada y en lado derecho el corrimiento en gel de la caracterización del plásmido correspondiente. Las caracterizaciones in silico se realizaron utilizando el software ApE-plasmid Editor v2.0.51.

8.1.2 Estandarización del sistema FRET/BiFC usando Jun-Fos-p65

Para analizar las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65 se llevó a cabo la estandarización de las transfecciones en la línea celular HEK293 y se ajustaron diferentes parámetros como la apertura confocal y la potencia del láser para establecer una calidad adecuada en las imágenes necesarias para realizar las interacciones triméricas de FRET/BiFC. Una vez tomadas las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ con el plug-in FRETYY tal como se describe en la sección de metodología. Para el análisis cuantitativo se utilizó el script FRETYY (Mustafa *et al.*, 2013) en el programa de uso libre

ImageJ. Para la utilización de este script la toma de fotografías de las células transfectadas se realizó en modo espectral.

En la estandarización de la interacción trimérica Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC se analizaron tres escenarios: 1) FRET/BiFC WT corresponde a la interacción trimérica entre los factores transcripcionales Jun-Fos-p65; 2) FRET Fos Δ , donde se muestra una disminución en la interacción trimérica Jun-Fos-p65 debido a una mutación en el dominio de interacción del factor transcripcional Fos con Jun resultando en una menor eficiencia en la reconstitución de Venus (aceptor); 3) FRET p65 Δ donde existe una disminución en la interacción de p65 con el dímero Jun-Fos debido a una mutación en p65 dando como resultado una menor eficiencia en la transferencia de energía de Cerulean a Venus.

En la Figura 16 se muestran células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos codificantes para p65Cerulean, Δ p65Cerulean, JunVN, FosVC y Fos Δ VC analizadas con una potencia de laser del 5% y una apertura confocal de 100 nm. La figura 16A en las imágenes I, IV y VII muestran células con poca visibilidad de la fluorescencia de Cerulean fusionado a p65 y p65 Δ . En las imágenes II, V y VIII se muestra la fluorescencia de Venus reconstituida debido a la interacción Jun-Fos, observándose en el caso de Jun-Fos Δ una disminución en la fluorescencia debido a una mutación en el factor Fos. Las imágenes de las células III, VI y IX muestran poca visibilidad de señal de interacción trimérica Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC. La Figura 16B muestra la misma distribución de las imágenes con una potencia de laser del 5% y una apertura confocal de 200 nm, observándose un poco más de señal de Cerulean y Venus, así como una incipiente interacción trimérica. Debido a los resultados obtenidos con una potencia de laser del 5% con 100 y 200 nm de apertura confocal, se incrementó la potencia de laser al 10%.

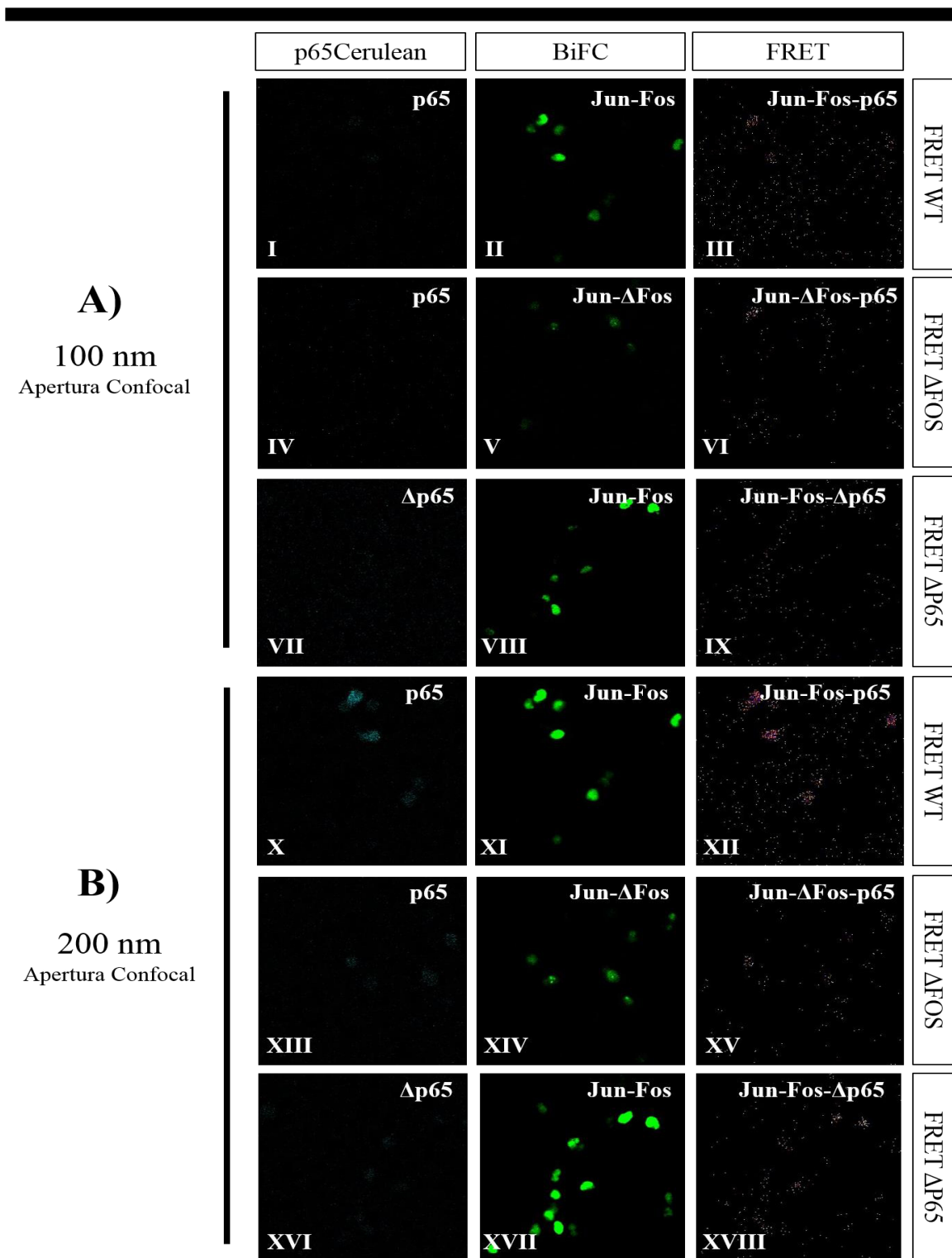


Figura 16. Estandarización del sistema FRET/BiFC mediante la interacción trimérica Jun-Fos-p65 con 5% de potencia de láser. La cotransfección de los plásmidos en las células HEK permitió el análisis de la interacción trimérica Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC con el 5% de la potencia de los láseres utilizados. **A)** Se observa la reconstitución de Venus como el resultado de la interacción dimérica Jun-Fos con una apertura confocal de 100nm. **B)** Se muestra un incremento leve en la señal de la fluorescencia de la reconstitución de Venus con una apertura confocal de 200nm.

En la Figura 17A muestra la misma distribución de las imágenes, pero con una apertura confocal de 100 nm observándose poca visibilidad en la fluorescencia de Cerulean, y por ende se muestra una señal disminuida en las imágenes representativas al FRET, un resultado similar comparado con las imágenes mostradas en la Figura 16B.

La Figura 17B muestran imágenes de las células capturadas con una potencia de laser del 10% y una apertura confocal de 200 nm. En la primera columna las células transfectadas X, XIII y XVI muestran la fluorescencia de Cerulean, las imágenes de las células XI, XIV y XVII muestran Venus reconstituida debido a la interacción Jun-Fos fusionados a los extremos amino y carboxilo de Venus (BiFC), observándose una disminución en la señal de Venus en la sección XIV debida a una mutación en el factor transcripcional Fos. En la tercera columna correspondiente a las secciones XII, XV y XVIII se muestra las células con las interacciones triméricas el FRET/BiFC correspondiente a FRET WT, FRET Fos Δ y FRET p65 Δ , donde se puede observar una señal más clara y definida de las interacciones triméricas en los escenarios mostrados. Todas las imágenes de las células capturadas bajo los parámetros mostrados en la Figura 7B correspondientes a las secciones X-XVIII muestran una fluorescencia mejor definida comparada con los resultados obtenidos en las Figuras 16A-B y 17A. En los tres casos mostrados para la estandarización, se muestran imágenes que representan el mismo campo con diferentes parámetros.

Con la finalidad de mejorar la calidad visual en las interacciones triméricas se realizaron capturas de las células transfectadas con una apertura confocal de 300 nm y una potencia de láser superior al 10%, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron un aumento excesivo de fluorescencia (Resultados No mostrados).

Considerando los resultados obtenidos en las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC se determinó que 200 nm de apertura confocal y 10% de la potencia del láser (Fig. 17B) brindan una buena calidad en las imágenes capturadas, así como su cuantificación (detallada en Materiales y Métodos) para realizar el análisis de las interacciones triméricas mediante FRET/BiFC.

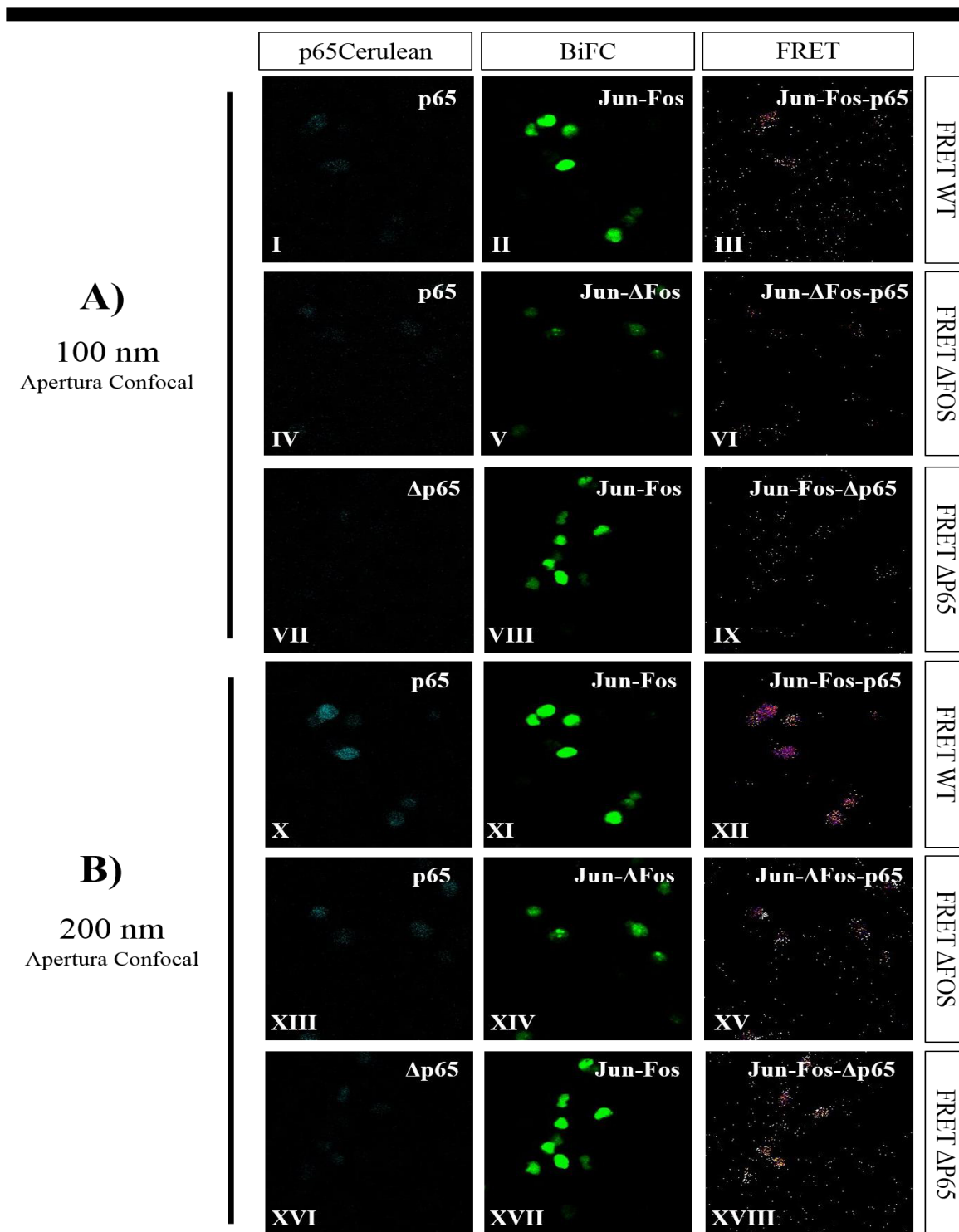


Figura 17. Estandarización del sistema FRET/BiFC mediante la interacción trimérica Jun-Fos-p65 con 10% de potencia de láser. La cotransfección de los plásmidos permitieron el análisis de la interacción trimérica Jun-Fos-p65 mediante FRET basado en BiFC con el 10 % de la potencia de los láseres utilizados. **A)** Las células cotransfectadas muestran un leve incremento en la reconstitución de Venus como el resultado de la interacción dimérica Jun-Fos con una apertura confocal de 100nm. **B)** Las células transfectadas muestran la fluorescencia de las proteínas de fusión Cerulean y reconstitución de Venus, así como la interacción trimérica Jun-Fos-p65 con una apertura confocal de 200nm.

El resumen de los resultados de la estandarización del sistema del sistema de FRET basado en BiFC de acuerdo a los parámetros mostrados en la Figura 17B con 200 de apertura confocal y 10% de potencia del láser se muestran con mayor detalle en la Figura 18. Las representaciones diagramáticas de la Figura 18A muestran de izquierda a derecha la proteína de fusión Cerulean en p65 o p65 Δ , la interacción dimérica Jun-Fos y las interacciones triméricas Jun-Fos-p65.

En la figura 18B se muestran células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos control correspondientes a la interacción trimérica Jun-Fos-p65 y sus versiones de interacción FRET/BiFC Jun-Fos-p65 Δ y Jun-Fos Δ -p65 disminuidas. En la columna izquierda se observa la fluorescencia de p65Cerulean (I y VII) y p65 Δ Cerulean (IV), la columna central muestra la fluorescencia de Venus reconstituida por la interacción dimérica Jun-Fos (II y V), así como la interacción disminuida de Jun-Fos Δ (VIII). En la tercera columna se muestra el resultado de la interacción trimérica FRET en color *Fire* después de ser analizado en ImageJ utilizando el plug-in FRETYY, la interacción trimérica Jun-Fos-p65 (III) y dos escenarios de reducción de la transferencia de energía (VI y IX). El primero dado por una disminución en la afinidad de p65 con el dímero Jun-Fos, debido a una mutación en p65 (p65 Δ) que impide la interacción trimérica (VI) y el segundo por una disminución en la reconstitución de la fluorescencia de Venus (aceptor) debido a una mutación en Fos (Fos Δ) que dificulta la interacción dimérica Jun-Fos (IX). Se observa claramente la reducción de las interacciones triméricas Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC en las versiones mutantes previamente descritas (VI y IX) comparadas con la interacción trimérica Jun-Fos-p65 (III) sin versiones mutantes. Del lado derecho de la figura se aprecian esquemas del resultado de FRET WT, FRET p65 Δ y FRET Fos Δ después de ser analizados en ImageJ con el plug-in FRETYY.

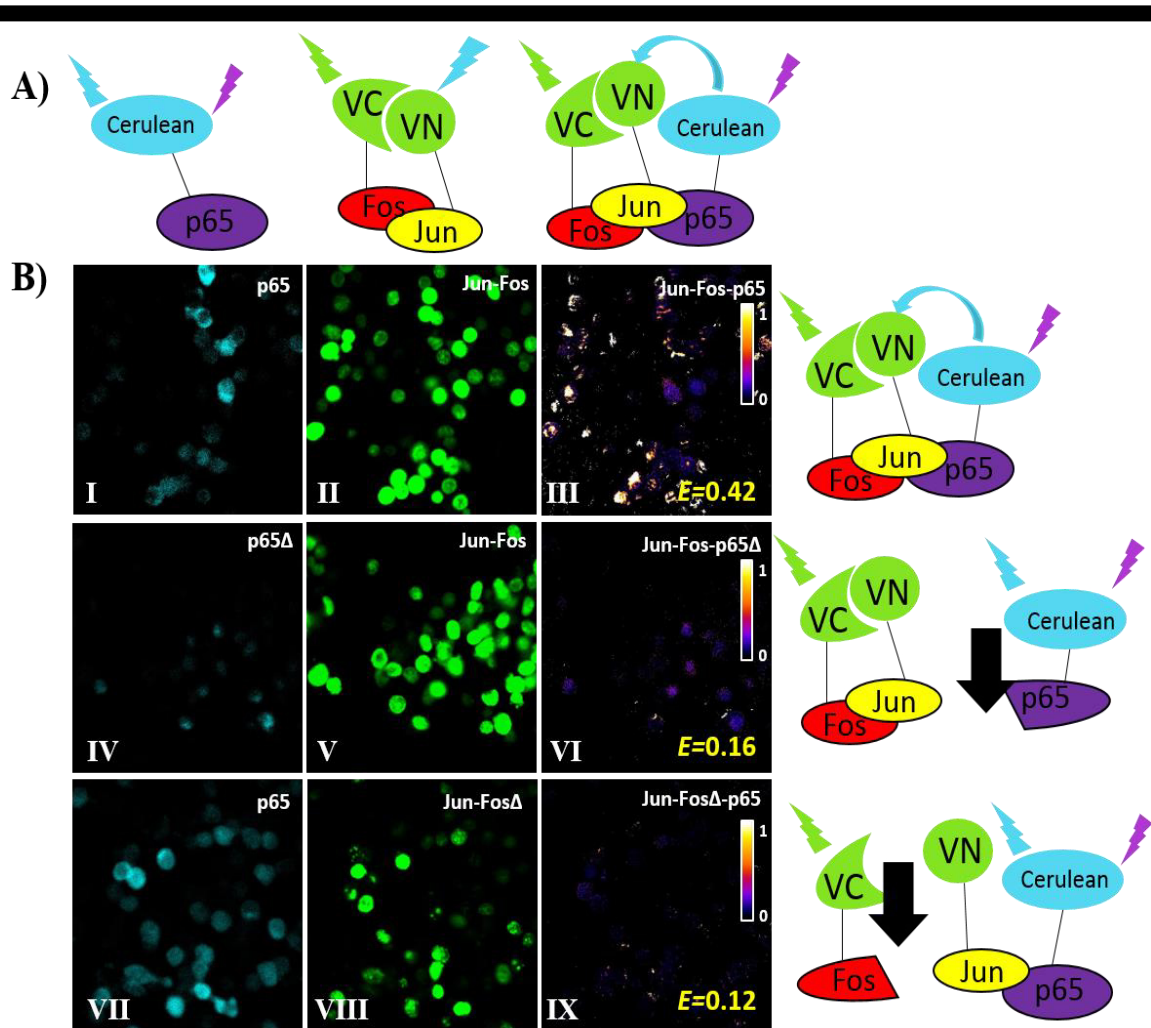


Figura 18. Interacción trimérica de los factores Jun-Fos-p65 mediante FRET/BiFC. A) De izquierda a derecha, se esquematiza: el factor transcripcional p65RHRCerulean, la interacción dimérica entre las proteínas JunVN y FosVC, reconstituyendo la fluorescencia de Venus mediante BiFC, así como la interacción trimérica de p65RHRCerulean con el dímero Jun-Fos. La interacción trimérica es determinada por la transferencia de energía de la molécula donadora (Cerulean) a la molécula aceptora (Venus reconstituido). Por lo tanto, al excitar a Cerulean y debido a la proximidad entre las proteínas fluorescentes (menor a 10nm), la energía emitida excita a Venus, resultando en una disminución de la fluorescencia de Cerulean y un aumento en la fluorescencia de Venus. B) Se observan células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos que codifican para p65Cerulean, (I y VII) y p65ΔCerulean (IV). En las imágenes II y V se observa la fluorescencia de Venus, resultado de la interacción de Jun y Fos. VIII muestra la interacción entre Jun y FosΔ mediante BiFC. III muestra la interacción trimérica de Jun-Fos-p65 ($E=0.42$) VI y IX muestran la disminución de las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65Δ ($E=0.16$) y Jun-FosΔ-p65 ($E=0.12$) debido a las mutaciones presentes en p65Δ y FosΔ respectivamente, en todos los casos la barra de colores hacer referencia a interacciones débiles (0) e interacciones más fuertes representadas en colores más claros desde rojos hasta blancos (1). El lado derecho muestra los escenarios observados en la tercera columna correspondiente a FRET WT, p65Δ y FosΔ.

Los resultados cuantitativos de la estandarización del sistema FRET basado en BiFC con la interacción trimérica Jun-Fos-p65 se muestran en la Figura 19. La gráfica muestra el valor de E , correspondiente a la energía transferida de Cerulean a Venus

reconstituido. Los valores de E se muestran en tres repeticiones por triplicado, apreciándose notablemente valores de FRET más altos en la versión WT del complejo trimérico Jun-Fos-p65 (barra azul) con un promedio de 0.42 ± 0.22 , comparado con las versiones mutantes que muestran de acuerdo con lo esperado un promedio de FRET de 0.14 ± 0.04 para FRET p65 Δ (barra naranja) y 0.13 ± 0.07 para FRET Fos Δ (barra verde).

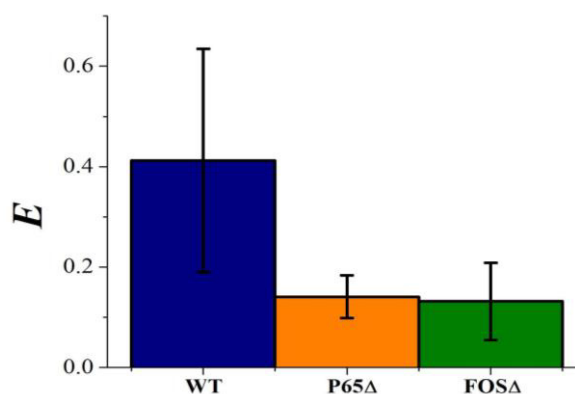


Figura 19. Cuantificación de la interacción trimérica de los factores transcripcionales Jun-Fos-p65. La gráfica muestra el valor de E , correspondiente a la energía transferida de Cerulean a Venus reconstituido en las interacciones triméricas mediante FRET/BiFC. La barra azul representa la interacción trimérica Jun-Fos-p65, la barra naranja representa el valor de E en la interacción trimérica Jun-Fos-p65 Δ por deficiencia de donador (p65 Δ Cerulean) y la barra verde representa el valor de E por baja eficiencia del fluoróforo aceptor (Jun-Fos Δ).

8.2 Interacción trimérica del factor transcripcional TFIIE β con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

8.2.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP

Para realizar los ensayos de interacción trimérica de Antp-TBP con el factor transcripcional TFIIE β se confirmó la identidad molecular de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP previamente construidos en nuestro laboratorio, (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016) mediante caracterización enzimática. Estos plásmidos mostraron los fragmentos esperados en las digestiones enzimáticas utilizadas. La Figura 20A muestra la caracterización del plásmido pCS2VNm9TBP con las enzimas de restricción: *Bam*HI, *Pvu*II, *Xho*I y *Hind*III y en la Figura 20B se muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155Antp con las enzimas de restricción: *Kpn*I, *Sma*I y *Bam*HI.

Los plásmidos codificantes para VCAntp y VNTBP previamente caracterizados fueron cotransfectados en células HEK293 junto con el plásmido pCAG-mCherry, el cual codifica para la proteína fluorescente Cherry. En la Figura 20C se muestra la expresión de la fluorescencia de la proteína Cherry ubicada en citoplasma y la reconstitución de Venus en el núcleo mediante BiFC, evidenciando la interacción Antp-TBP (Fig. 20D). También se muestra el empalme de la fluorescencia de Venus debido a la interacción Antp-TBP y Cherry, observándose la localización de la interacción de Antp-TBP en núcleo (Fig. 20D).

Para determinar la interacción trimérica del factor transcripcional TFIIIE β con el complejo Antp-TBP mediante FRET basado en BiFC, se realizó la construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β y se co-transfectó con los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP en células HEK293.

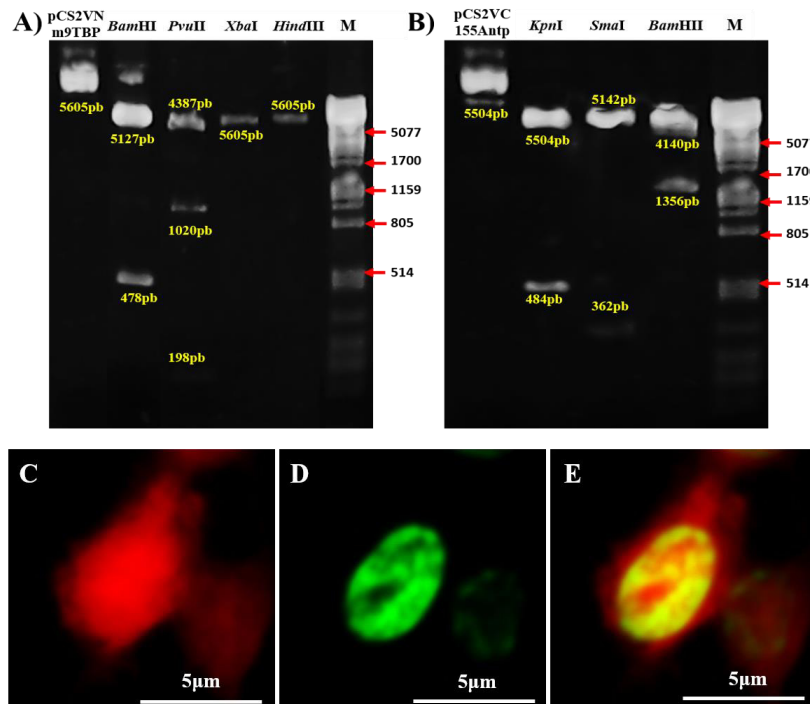


Figura 20. Caracterización de los plásmidos pCS2VNm9TBP y pCS2VC155Antp. A) El gel muestra la caracterización enzimática del plásmido pCS2VNm9TBP digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Pvu*II, *Xba*I y *Hind*III. B) El gel muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155Antp con las enzimas de restricción, *Kpn*I, *Sma*I y *Bam*HI. El primer carril muestra el plásmido sin digerir y el carril M corresponde al genoma del fago Lambda digerido con *Pst*I. Las células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos pCS2VNm9TBP, pCS2VC155Antp y pCAG-mCherry. C) La célula muestra la fluorescencia citoplasmática de la proteína fluorescente Cherry en la línea celular HEK293. D) La reconstitución de la proteína fluorescente Venus a través de la interacción dimérica Antp-TBP en el núcleo celular. E) Se observa el empalme de la fluorescencia de Cherry (citoplasma) y Venus (Núcleo) en la línea celular HEK293.

8.2.2 Construcción del plásmido recombinante pECFP-N1-TFIIIE β

Para la construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β se siguió la estrategia que se muestra en la Figura 21A, la secuencia codificante para TFIIIE β fue amplificada por PCR excluyendo el codón de paro, agregando sitios de restricción *ApaI/SmaI* y *AgeI*, y una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos (24 nucleótidos) entre el factor transcripcional y ECFP (Fig. 21B). Se utilizó como molde el plásmido pPAC-TFIIIE β disponible en nuestro laboratorio (Cárdenas-Chávez, 2012). El amplicón resultante se ligó al vector pCR2.1TOPO (Fig. 21C) para ser secuenciado y posteriormente subclonado al vector de expresión pECFP-N1 utilizando los sitios *ApaI* y *AgeI*. Finalmente, la construcción resultante fue caracterizada con las enzimas de restricción *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* y *AgeI-ApaI* que liberaron los fragmentos esperados como se observa en la Figura 21D.

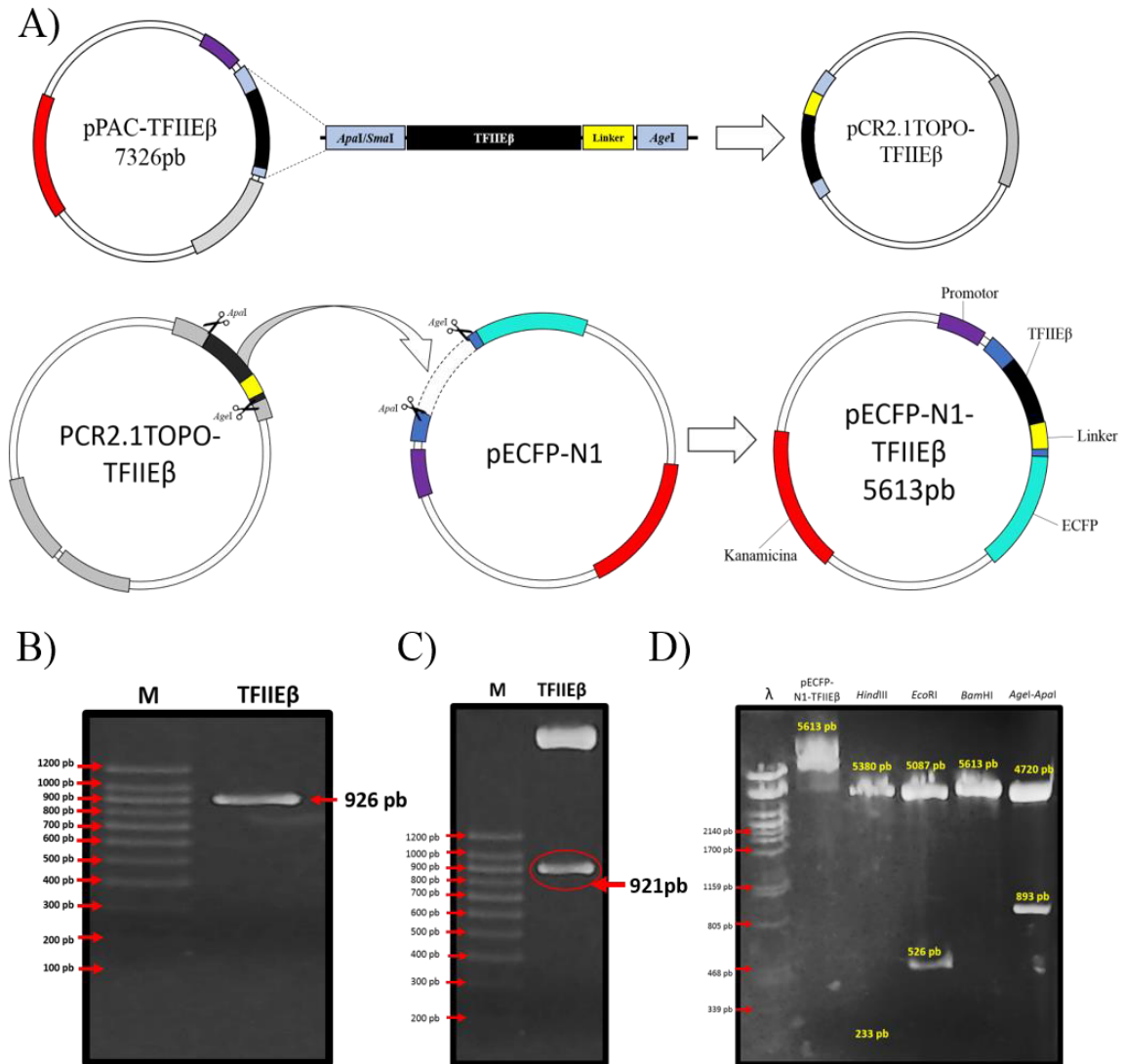


Figura 21. Construcción del plásmido pECFP-N1-TFIIβ. A) El diagrama representa la amplificación del factor TFIIβ a partir de pPAC-TFIIβ. El amplicón resultante es ligado al vector pCR2.1TOPO, secuenciado y subclonado al vector pECFP-N1 con las enzimas *Apal* y *AgeI*, resultando la construcción pECFP-N1-TFIIβ. B) El gel muestra el amplicón del factor transcripcional TFIIβ de 926 pb, M muestra el marcador de 1.2Kb C) Se observa en el gel la digestión de pCR2.1TOPO-TFIIβ con las enzimas *Apal* y *AgeI* evidenciando la presencia del fragmento TFIIβ de 921 pb. D) El gel muestra la caracterización enzimática del vector pECFP-N1-TFIIβ, observando las bandas esperadas con las enzimas: *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* y *Apal-AgeI*. El carril λ corresponde al genoma del fago Lambda digerido con *PstI* y el segundo carril corresponde al vector pECFP-N1-TFIIβ sin digerir.

8.2.3 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-TFIIβ en la línea celular HEK293

Para confirmar la expresión de la proteína de fusión TFIIβ-ECFP, el plásmido pECFP-N1-TFIIβ previamente construido fue cotransfectado en células HEK293 junto con el plásmido pCAG-mCherry codificante para la proteína fluorescente Cherry. En la

Figura 22A se muestra la fluorescencia de la proteína Cherry en el citoplasma de las células transfectadas. La fluorescencia de la proteína de fusión TFIIIE β -ECFP se muestra en el núcleo de las células transfectadas (Fig. 22B) y el traslape de la fluorescencia de ECFP y Cherry de color blanco muestra que la proteína TFIIIE β -ECFP se localiza exclusivamente en el núcleo celular de las células transfectadas (Fig. 22C).

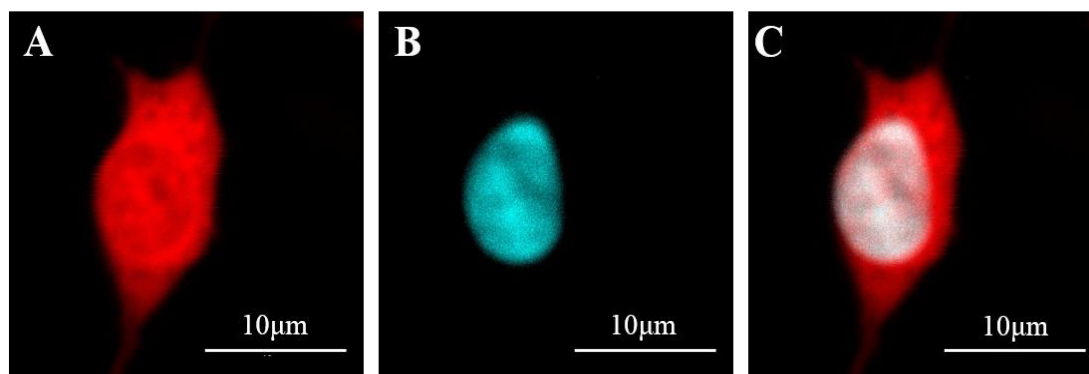


Figura 22. Expresión y localización nuclear de la proteína de fusión TFIIIE β -ECFP. Las células HEK293 fueron cotransfectadas con los plásmidos codificantes para TFIIIE β -ECFP y la proteína fluorescente Cherry. **A)** En la imagen se observa la fluorescencia de Cherry en citoplasma. **B)** muestra la fluorescencia de TFIIIE β -ECFP en el núcleo de las células transfectadas. **C)** muestra el empalme entre TFIIIE β -ECFP y Cherry, demostrando la localización nuclear de TFIIIE β . Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal láser multifotón (FV-1000) marca Olympus utilizando los láseres 405 y 559 con un módulo de detección espectral ajustado a 455 ± 20 nm y 615 ± 30 .

8.2.4 Interacción trimérica Antp-TBP/TFIIIE β

Para determinar la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIIE β mediante FRET/BiFC, se utilizaron los parámetros establecidos en la estandarización con Jun-Fos-p65. En la Figura 23 se muestra la interacción trimérica del complejo Antp-TBP con el factor transcripcional TFIIIE β mediante FRET/BiFC.

La Figura 23A de la izquierda esquematiza el factor TFIIIE β fusionado a ECFP, el esquema intermedio indica la interacción dimérica Antp-TBP mediante BiFC y el esquema de la derecha representa la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIIE β mediante el sistema FRET/BiFC. La Figura 23B muestra la fluorescencia de TFIIIE β en las células transfectadas, la reconstitución de Venus evidencia la interacción dimérica Antp-TBP y la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIIE β se visualiza en las células transfectadas indicadas en modo *Fire* correspondiente a la barra localizada en la esquina superior derecha de la imagen. En la Figura 23C se muestra la gráfica de la cuantificación de los valores de E

obtenidos en tres experimentos independientes por triplicado. Cada una de las barras muestra la media de las repeticiones realizadas por triplicado que corresponden a los promedios de 0.48 ± 0.14 , 0.57 ± 0.09 y 0.46 ± 0.17 .

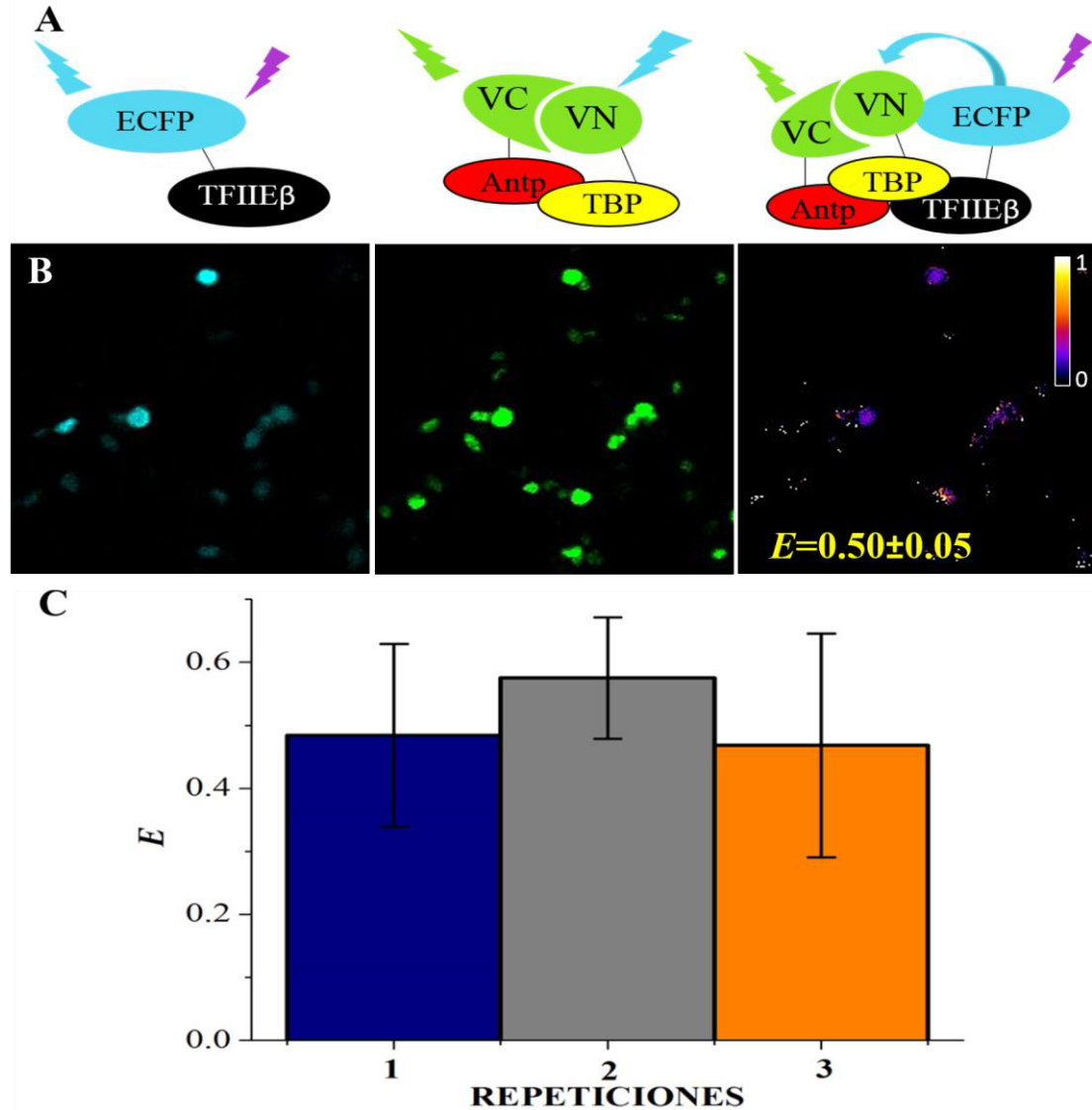


Figura 23. Interacción trimétrica Antp-TBP/TFIIIE β mediante FRET/BiFC. Las células HEK293 transfectadas con los plásmidos pCS2VNm9TBP, pCS2VC155Antp y pECFP-N1-TFIIIE β muestran la interacción trimétrica entre Antp-TBP-TFIIIE β mediante FRET/BiFC. **A)** El primer esquema muestra la fluorescencia de la proteína de fusión TFIIIE β -ECFP, el siguiente esquema muestra la interacción dimérica Antp-TBP que reconstituye la fluorescencia de Venus (BiFC) y el último esquema muestra la interacción trimétrica Antp-TBP-TFIIIE β mediante el sistema de FRET basado en BiFC. **B)** Se muestra la transfección en células HEK293 de TFIIIE β -ECFP y Antp-TBP, confirmando su expresión mediante su fluorescencia ECFP y Venus respectivamente, la última imagen muestra el FRET de Antp-TBP/TFIIIE β en modo *Fire* después de ser analizado en el software ImageJ con el plug-in FRETYY. **C)** Los ensayos de transfección en células HEK293 se realizaron por triplicado en tres repeticiones donde el valor de E que representa la transferencia de energía de ECFP a Venus debido a la proximidad menor de 10 nm entre las proteínas

fluorescentes fusionadas a las proteínas de interés, La barra azul correspondiente a la primera repetición representa un promedio de 0.48 ± 0.14 , 0.57 ± 0.09 correspondiente a la segunda repetición (barra gris) y 0.46 ± 0.17 para la tercera repetición por triplicado (barra naranja). El promedio general de $E=0.50 \pm 0.05$ muestra la interacción trimérica Antp-TBP/TFIIE β

Los resultados obtenidos muestran un promedio de transferencia de energía de ECFP a Venus de $E=0.50 \pm 0.05$ que indican claramente la presencia de la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIE β .

8.3 Interacción trimérica de BIP2 con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

Para determinar la interacción trimérica del factor BIP2 con el complejo Antp-TBP mediante FRET/BiFC, se realizó la construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ y se co-transfectó con los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP en células HEK293.

8.3.1 Construcción del plásmido recombinante pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉

La estrategia utilizada en la construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ se muestra en la Figura 24A. La secuencia codificante para BIP2₁₋₈₉ se amplificó por PCR excluyendo el codón de paro, agregando sitios de restricción *ApaI/SmaI* y *AgeI*, y una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos (24 nucleótidos) entre el factor transcripcional y ECFP (Fig. 24B). Como molde se utilizó el plásmido pPAC-BIP2₁₋₈₉ disponible en nuestro laboratorio. El amplicón resultante fue ligado al vector pCR2.1TOPO (Fig. 24C), y posteriormente subclonado al vector de expresión pECFP-N1 a través de los sitios *ApaI* y *AgeI*. Finalmente, la construcción resultante fue caracterizada con las enzimas de restricción diagnósticas *XhoI*, *PvuII*, *NdeI* y *NsiI* que mostraron los fragmentos esperados como se muestra en la Figura 24D.

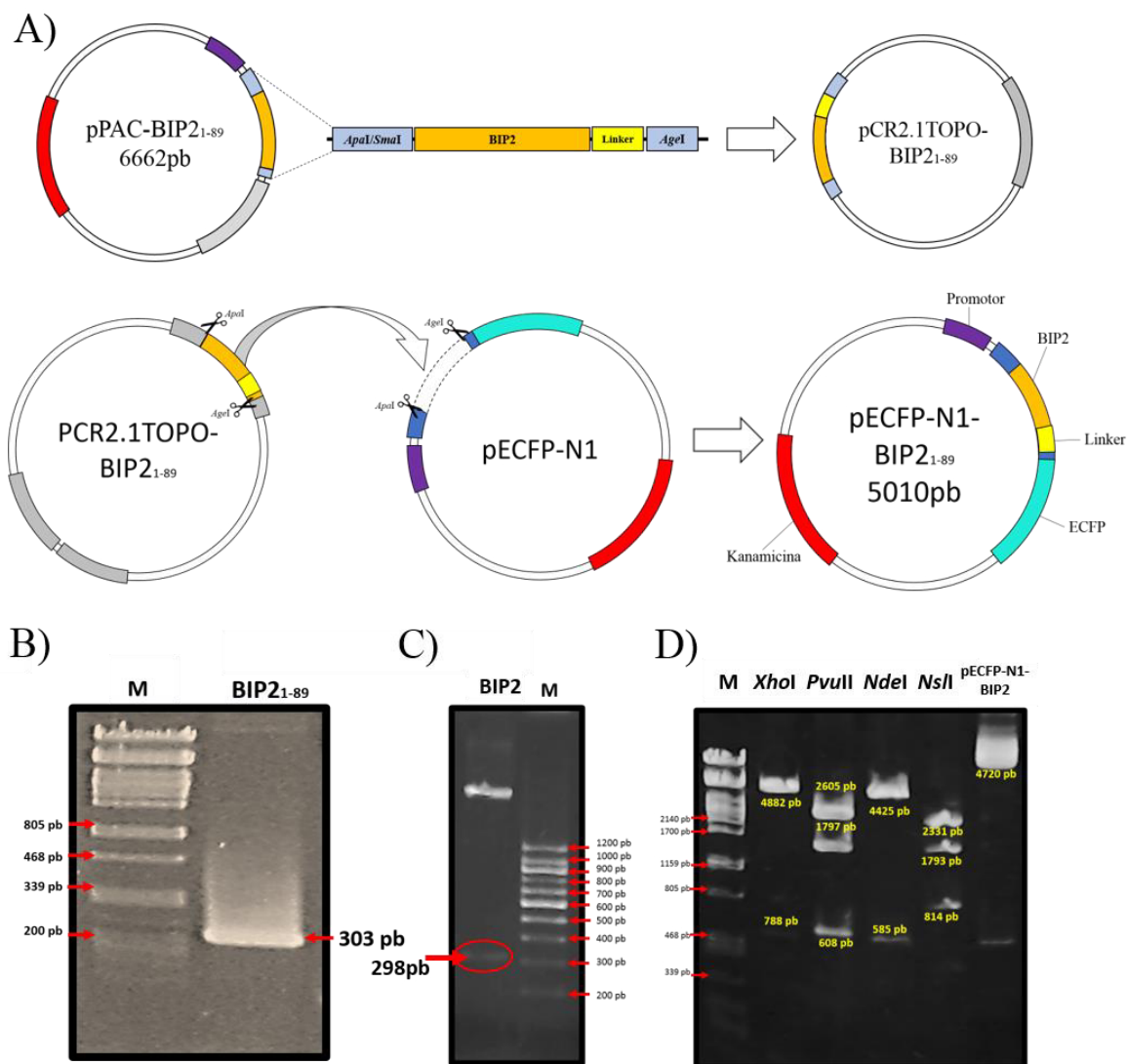


Figura 24. Construcción del plásmido pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉. A) El diagrama esquematiza la amplificación de la secuencia codificante de BIP2₁₋₈₉ a partir de pPAC-BIP2₁₋₈₉. El amplicón resultante de 303 pb es ligado al vector pCR2.1TOPO y subclonado en el vector pECFP-N1 entre los sitios *ApaI* y *AgeI*, resultando la construcción pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉. B) El gel muestra el amplicón obtenido de 303 pb, M corresponde al genoma del fago Lambda digerido con *PstI*. C) En el gel se observa la digestión de pCR2.1TOPO-BIP2₁₋₈₉ con las enzimas *ApaI* y *AgeI* evidenciando la liberación del fragmento BIP2₁₋₈₉ de 298 pb, M corresponde al marcador de 1.2Kb. D) El gel muestra la caracterización enzimática del vector pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ mostrando las bandas esperadas con las enzimas *XhoI*, *PvuII*, *NdeI* y *NsiI*. En los extremos del gel se muestran pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉ sin digerir y M que corresponde al genoma del fago Lambda digerido con *PstI*.

8.3.2 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-BIP2 en HEK293

Para confirmar la expresión de la proteína de fusión BIP2₁₋₈₉-ECFP, el plásmido pECFP-N1- BIP2₁₋₈₉ previamente construido fue transfectado en células HEK293, junto

con el plásmido pCAG-mCherry codificante para la proteína fluorescente Cherry (Fig. 25). En la Figura 25A se muestra la fluorescencia de Cherry en el citoplasma de las células transfectadas mientras que la fluorescencia de la proteína de fusión BIP2₁₋₈₉-ECFP se muestra en el núcleo de las células (Fig. 25B). En la Figura 25C se muestra un empalme de la fluorescencia de BIP2-ECFP con Cherry, donde se observa que la proteína BIP2₁₋₈₉-ECFP es localizada principalmente en el núcleo y ligeramente en el citoplasma.

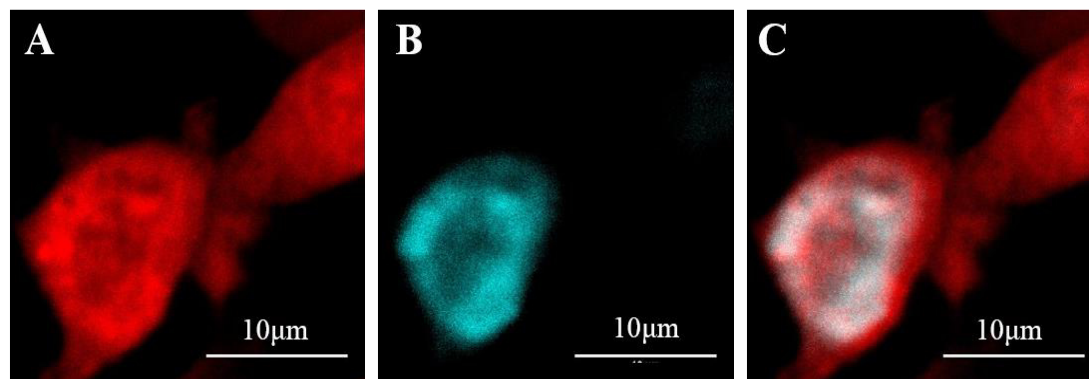


Figura 25. Expresión de la secuencia codificante para BIP2-ECFP. En la figura se observan células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos codificantes para BIP2₁₋₈₉-ECFP y la proteína fluorescente Cherry. A) Se observa la expresión de Cherry. B) Se muestra la expresión de la proteína de fusión BIP2₁₋₈₉-ECFP. C) Se muestra el empalme entre ECFP y Cherry, mostrando la localización de BIP2₁₋₈₉-ECFP. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal láser multifotón (FV-1000) marca Olympus utilizando los láseres 405 y 559 con un módulo de detección espectral ajustado a 455±20 nm y 615±30.

8.3.3 Interacción trimérica Antp-TBP/BIP2

Los parámetros de la estandarización del complejo Jun-Fos-p65 fueron utilizados para determinar la formación del complejo trimérico Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉ en la línea celular HEK293. La Figura 26 muestra la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉ mediante FRET/BiFC. En el diagrama 26A de la izquierda se esquematiza la proteína de fusión BIP2₁₋₈₉-ECFP, el esquema intermedio muestra la reconstitución de Venus mediante la interacción dimérica Antp-TBP mediante BiFC y el esquema de la derecha representa la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉ mediante el sistema FRET/BiFC. La Figura 26B muestra fluorescencia de BIP2₁₋₈₉-ECFP en las células transfectadas, la reconstitución de Venus evidencia la interacción dimérica Antp-TBP y la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉ es visualizada en las células transfectadas indicadas en modo *Fire* correspondiente a la barra localizada en la esquina superior derecha de la imagen. En la Fig. 26C se muestra la gráfica de la cuantificación de los valores de *E* obtenidos en tres

experimentos independientes por triplicado. Cada una de las barras muestra la media de las repeticiones realizadas por triplicado que corresponden a los promedios de E indicando la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉ como se muestra en las barras los valores 0.19 ± 0.08 , 0.12 ± 0.01 y 0.14 ± 0.02 .

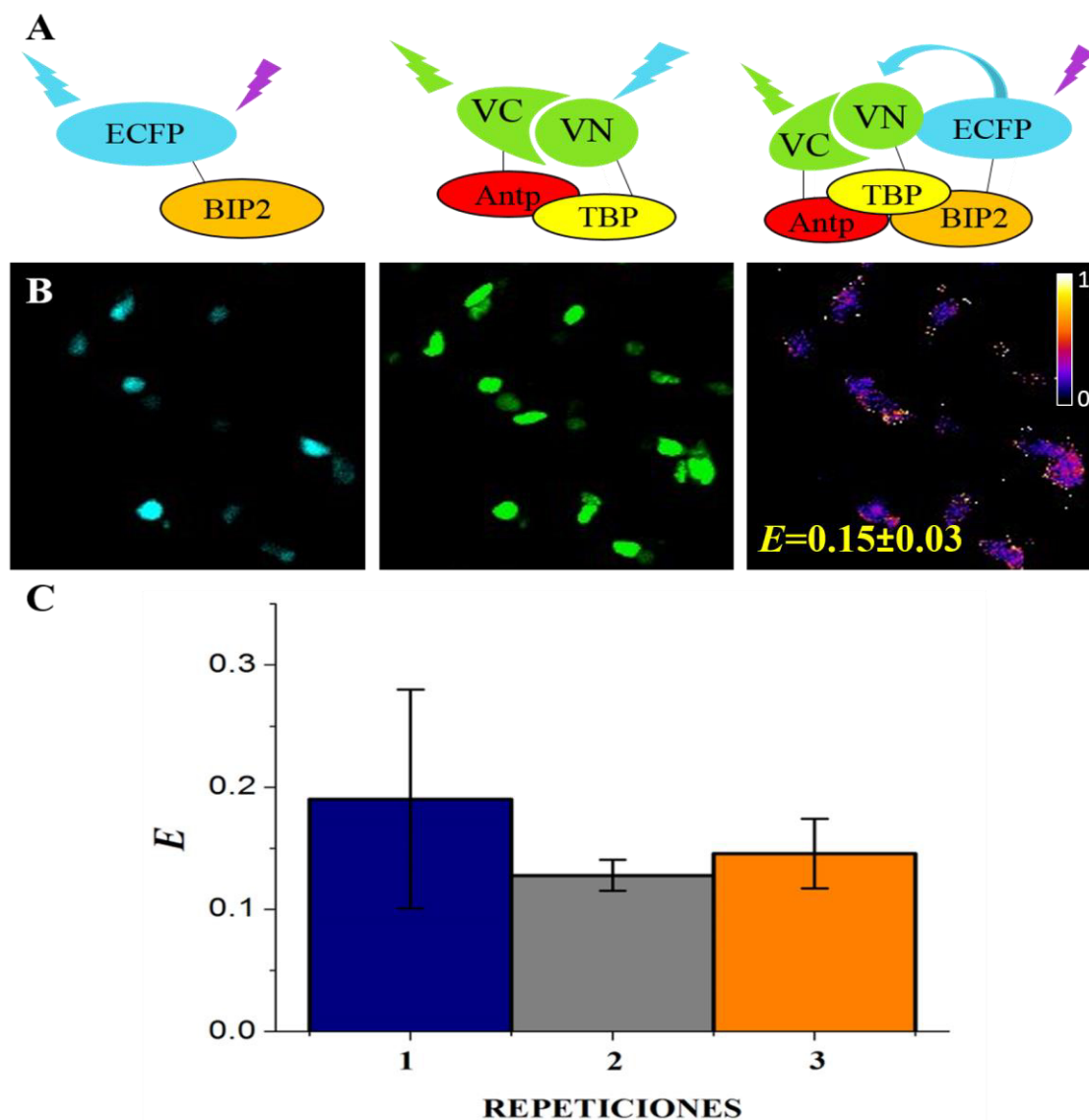


Figura 26. Interacción trimérica Antp-TBP/BIP2 mediante FRET basado en BiFC. Las células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos pCS2VNm9TBP, pCS2VC155Antp y pECFP-N1-BIP2₁₋₈₉, muestra la interacción trimérica entre Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉, mediante FRET basado en BiFC. **A)** El primer esquema muestra el factor BIP2₁₋₈₉ fusionado a la proteína ECFP, el siguiente esquema representa la interacción dimérica de las proteínas Antp-TBP fusionadas a los extremos VC y VN de la proteína fluorescente Venus y el tercer esquema muestra la transferencia de energía de ECFP hacia Venus debido a la interacción trimérica Antp-TBP/BIP2₁₋₈₉. **B)** Se observa la expresión de BIP2₁₋₈₉-ECFP mediante la fluorescencia de ECFP, la fluorescencia de Venus debida a la interacción Antp-TBP y en la tercera imagen se muestra el FRET en modo *Fire* después de ser analizado mediante el software ImageJ con el plug-in FRETYY evidenciando la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2₁₋₈₉. **C)** En la gráfica se muestran las medias

de E correspondiente a FRET en 3 repeticiones por triplicado. La barra azul muestra un promedio de 0.19 ± 0.08 , la barra gris 0.12 ± 0.01 y la barra naranja 0.14 ± 0.02 .

8.4 Interacción molecular trimérica de Exd con Antp-TBP mediante FRET/BiFC

Para determinar la interacción trimérica de la homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ con el complejo Antp-TBP mediante FRET basado en BiFC, se realizó la construcción del plásmido pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y se cotransfectó con los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9TBP en células HEK293.

8.4.1 Construcción del plásmido recombinante pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆

Para la construcción del plásmido pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ se siguió la estrategia mostrada en la Figura 27A. La secuencia codificante para Exd₁₄₄₋₃₇₆ se amplificó por PCR excluyendo el codón de paro, agregando sitios de restricción *ApaI/SmaI* y *AgeI*, y una secuencia espaciadora de 8 aminoácidos (24 nucleótidos) entre el factor transcripcional y ECFP (Fig. 27B) como molde se utilizó el plásmido pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ disponible en nuestro laboratorio. El amplicón de 734 pb resultante fue ligado al vector pCR2.1TOPO (Fig. 27C) y secuenciado para confirmar su identidad. Posteriormente fue suclonado al vector de expresión pECFP-N1 a través de los sitios *ApaI* y *AgeI* y la construcción resultante fue caracterizada con las enzimas: *PvuII*, *SalII* y *ApaI-AgeI* como se muestra en la Figura 27D.

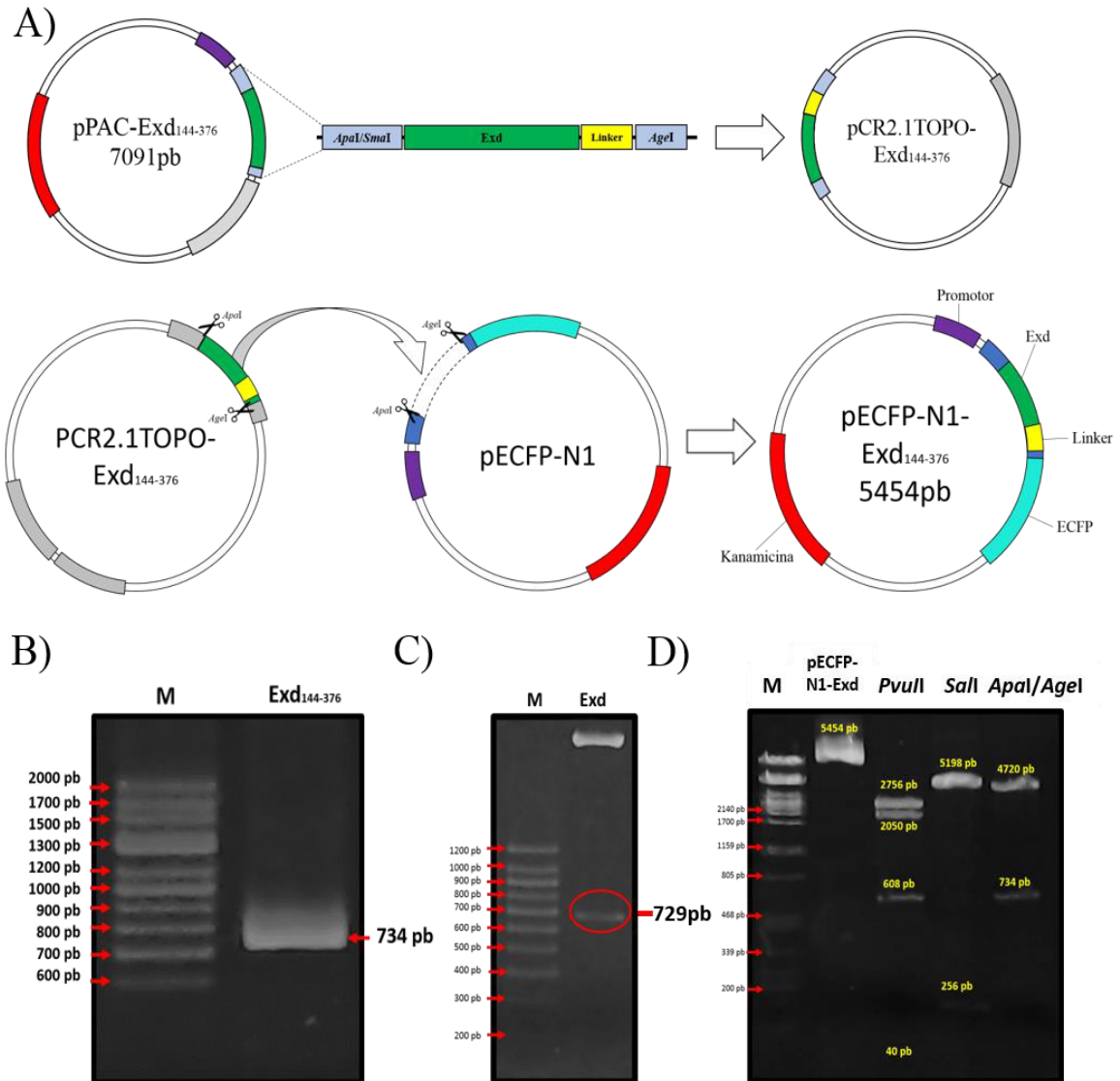


Figura 27. Construcción del plásmido pECFP-N1-Exd. A) El diagrama esquematiza la amplificación de la secuencia codificante para Exd₁₄₄₋₃₇₆ a partir de pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ usando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción *Apal/SmaI* en el oligonucleótido 5' y el sitio *AgeI* en el oligonucleótido 3' que añade una secuencia de 8 aminoácidos. El amplicón resultante de 734 pb es ligado al vector pCR2.1TOPO, secuenciado y posteriormente subclonado en el vector pECFP-N1 resultando la construcción pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆. B) El gel muestra el amplicón de Exd₁₄₄₋₃₇₆ correspondiente a 734 pb, M corresponde a un marcador de 2Kb. C) El gel muestra la digestión del vector pCR2.1TOPO-Exd₁₄₄₋₃₇₆ con las enzimas *Apal/AgeI* evidencia la presencia del fragmento Exd₁₄₄₋₃₇₆ de 729 pb, M corresponde al marcador de 1.2Kb. D) En el gel se observa la caracterización enzimática del vector pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆, mostrando los tamaños esperados con: *PvuII*, *SalI* y *Apal-AgeI*. M corresponde al genoma del fago Lambda digerido con *PstI*.

8.4.2 Expresión del plásmido recombinante pECFP-N1-Exd en HEK293

Para confirmar la expresión de la proteína de fusión Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP, el plásmido pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆ previamente construido fue transfectado en células HEK293, junto

con el plásmido pCAG-mCherry codificante para la proteína fluorescente Cherry (Fig. 28). En la Figura 28A se muestra la fluorescencia de Cherry en el citoplasma de las células transfectadas, la fluorescencia de la proteína de fusión Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP se muestra en el núcleo y ligeramente en el citoplasma (Fig. 28B). El empalme de la fluorescencia de Exd expresada en núcleo y parcialmente en citoplasma (Fig. 28C).

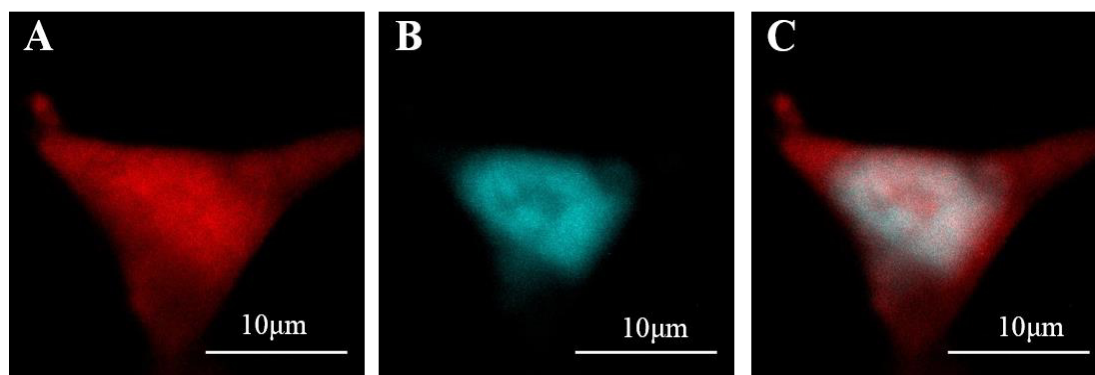


Figura 28. Expresión de la secuencia codificante para Exd-ECFP. En la figura se observan células HEK293 cotransfectadas los plásmidos Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP y pCAG-mCherry que contiene la secuencia codificante para la proteína fluorescente Cherry expresada en el citoplasma. **A)** Se observa la expresión de Cherry. **B)** Se muestra la expresión de la proteína de fusión Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP. **C)** se observa el empalme entre los canales de ECFP y Cherry, mostrando la localización de Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal láser multifotón (FV-1000) marca Olympus utilizando los láseres 405 y 559 con un módulo de detección espectral ajustado a 455±20 nm y 615±30.

8.4.3 Interacción trimérica Antp-TBP/Exd

Para determinar la interacción trimérica entre la homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ con el complejo Antp-TBP mediante el sistema de FRET/BiFC se utilizaron los parámetros establecidos en la estandarización con Jun-Fos-p65. En la Figura 29 se muestra la interacción trimérica del complejo Antp-TBP con la homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ mediante FRET/BiFC. El diagrama 29A de la izquierda muestra la proteína de fusión Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP, el esquema intermedio indica la interacción dimérica Antp-TBP mediante BiFC y el esquema de la derecha representa la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ mediante el sistema FRET/BiFC. La Figura 29B muestra la fluorescencia de Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP en células HEK293 transfectadas, Venus reconstituido evidenciando la interacción dimérica Antp-TBP y la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ se visualiza en las células transfectadas indicadas en modo *Fire* correspondiente a la barra localizada en la esquina superior derecha de la imagen. En la Figura 29C se muestra la gráfica de la cuantificación de los valores de *E* obtenidos en tres experimentos independientes por

triplicado. Cada una de las barras muestra la media de las repeticiones realizadas por triplicado que corresponden a al promedio del valor de E indicando la formación de interacciones triméricas (Fig. 29)

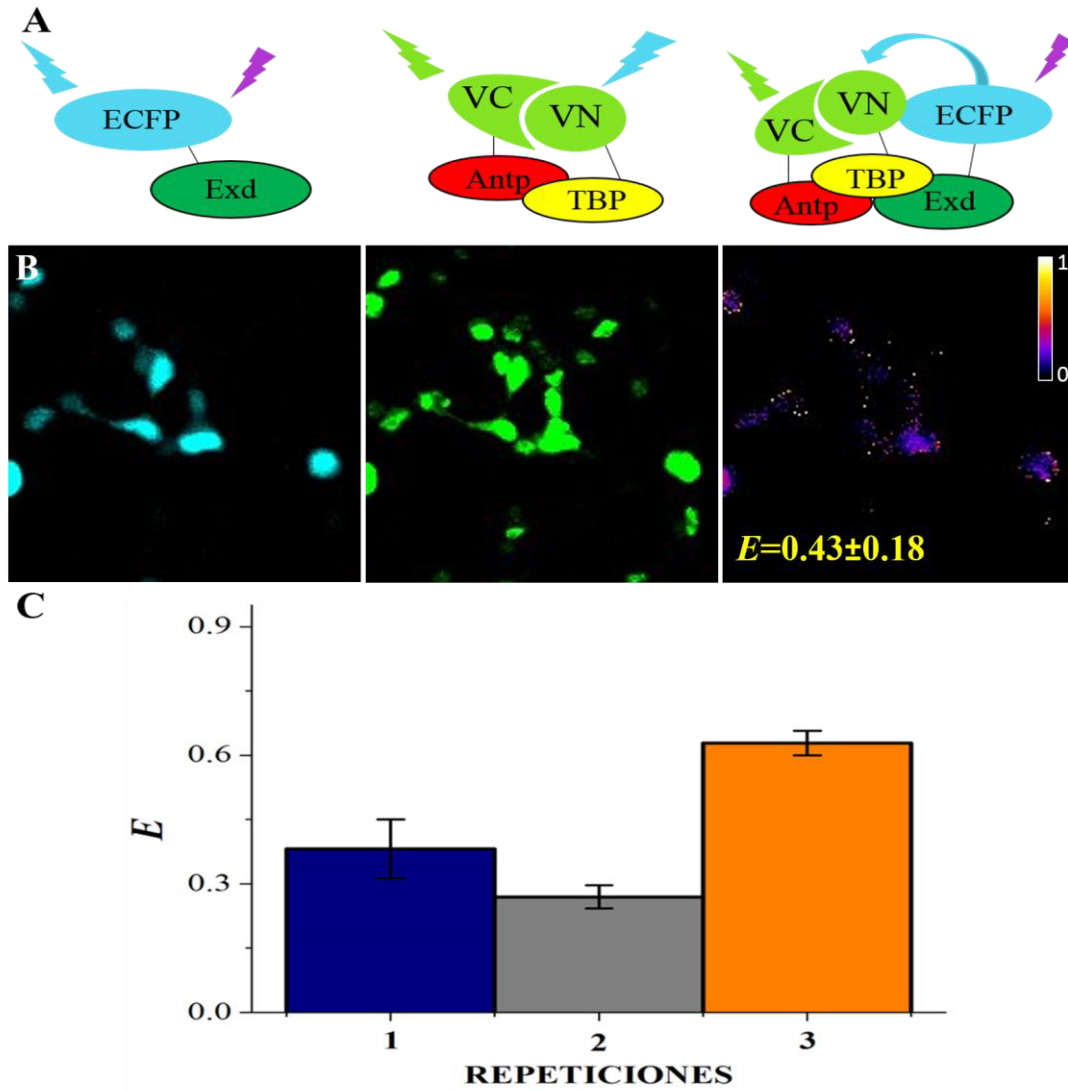


Figura 29. Interacción trimérica Antp-TBP/Exd mediante FRET/BiFC. Las células HEK293 cotransfectadas con los plásmidos pCS2VNm9TBP, pCS2VC155Antp y pECFP-N1-Exd₁₄₄₋₃₇₆, muestra la interacción trimérica entre Antp-TBP/Exd₁₄₄₋₃₇₆, mediante FRET basado en BiFC **A)** Se muestran esquemas representativos a las imágenes inferiores. El primer esquema muestra el factor Exd₁₄₄₋₃₇₆ fusionado a la proteína ECFP, el siguiente esquema representa la reconstitución de Venus por la interacción dimérica de las proteínas Antp-TBP y el tercer esquema muestra la transferencia de energía de ECFP hacia Venus visualizada en modo *Fire*, debido a la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆. **B)** Se observa la expresión de Exd₁₄₄₋₃₇₆-ECFP mediante la fluorescencia ECFP, la fluorescencia de Venus debida a la interacción Antp-TBP y en la tercera imagen se muestra el FRET en modo *Fire* después de ser analizado mediante el software ImageJ con el plug-in FRETYY evidenciando la interacción trimérica Antp-TBP/Exd₁₄₄₋₃₇₆. **C)** En la gráfica se muestran la media del FRET en 3 repeticiones. La barra azul muestra un promedio de 0.38±0.06, la barra gris 0.27±0.02 y la barra naranja 0.63±0.26.

9. DISCUSIÓN

En esta tesis se estandarizó el sistema FRET basado en BiFC (FRET/BiFC) mediante el cual se determinó la formación de complejos triméricos entre el dímero Antp-TBP previamente reportado y los factores transcripcionales TFIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd.

Las interacciones proteína-proteína se han estudiado tradicionalmente utilizando técnicas *in vitro* como EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assay, por sus siglas en inglés), GST-pulldown e Inmunoprecipitación (Hudry *et al.*, 2011; Berthelsen *et al.*, 1998; Emili *et al.*, 1994; Zhou & Kuziora, 1996; Saleh *et al.*, 2000). Aunque estas técnicas han sido ampliamente utilizadas para identificar un gran número de interacciones proteína-proteína (PPIs, por sus siglas en inglés), los resultados no permiten determinar la localización subcelular y además presentan la desventaja de que pueden alterar el estado natural de la célula de manera que no representan su estructura real ya que la naturaleza invasiva de estas técnicas podría obstaculizar el estudio de las PPIs (Ciruela, 2008). En contraste, se han desarrollado nuevas tecnologías para estudiar las PPIs utilizando el marcaje genético con proteínas fluorescentes, por ejemplo, la proteína Venus fraccionada en su región amino y carboxilo terminal que al complementarse reconstituye la fluorescencia, permitiendo el análisis de las interacciones proteína-proteína en la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (Kerppola, 2008). Algunas de estas técnicas se han adaptado para describir interacciones diméricas simultáneas o incluso interacciones multiméricas (BiFC multicolor, BiFC Rainbow, FRET trimérico, TFFC y la combinación BiFC/FRET) (Hynes *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Galperin *et al.*, 2004 y Shyu *et al.*, 2008, Hudry *et al.*, 2011). Estas nuevas estrategias no solo permiten observar las PPIs *in vivo*, sino que además brindan información de la ubicación subcelular y la dinámica en que estas ocurren. Además de que no requieren de lisis celular, purificación de proteínas ni el uso de anticuerpos, por lo que son menos costosas. Debido a todas las ventajas anteriores, el uso de métodos basados en la transfección de secuencias codificantes para proteínas marcadas con fluoróforos brindan un panorama del entorno celular debido a la detección de la fluorescencia en un ambiente

celular *in vivo*. Debido a lo anterior en esta tesis seleccionamos el sistema de análisis de interacciones triméricas FRET basado en BiFC (Shyu *et al.*, 2008).

Para estandarizar el sistema de FRET/BiFC mediante desmezclado espectral se utilizaron como control las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65, Jun-Fos Δ -p65 y Jun-Fos-p65 Δ previamente descritas por Shyu *et al.*, 2008. Los resultados obtenidos mostraron concordancia con lo reportado previamente con valores de las interacciones triméricas de Jun-Fos-p65 relativamente altas en la interacción WT comparado con las versiones mutantes. Los resultados mostraron el mismo comportamiento en experimentos independientes, concluyendo que el software utilizado FRETYY descrito por Mustafa *et al.*, 2013 funciona y es suficientemente sensible para mostrar no solo la transferencia de energía, sino también una diferencia entre la interacción Jun-Fos-p65 y las versiones mutantes por lo que consideramos que fue estandarizando exitosamente en nuestro laboratorio.

La homeoproteína Antp es exclusiva de *Drosophila* y se expresa en las células de la epidermis torácica embrionaria y en algunos segmentos del sistema nervioso (Carrol *et al.*, 1986) donde es localizada específicamente en el núcleo celular y tiene acción sobre los segmentos mesotorácicos. Por otro lado, TBP forma parte del complejo de preiniciación, específicamente del factor TFIID, y contribuye confiriendo afinidad en el reconocimiento del promotor (caja TATA) flexionando la doble hélice cuando este se une al surco menor del DNA (Kim *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993b). En nuestro laboratorio se ha determinado mediante ensayos de interacción BiFC en cultivo celular la interacción dimérica entre la homeoproteína Antp con el factor transcripcional TBP (Cárdenas-Chávez 2012). Esta interacción esta mediada parcialmente por las regiones ricas en glutamina ya que al suprimir la región rica en glutaminas tanto de Antp como TBP su interacción no fue abatida por completo, sino atenuada, sugiriendo que esta interacción podría estar mediada por un tercer elemento ya sea otro dominio proteico de cualquiera de las dos proteínas, mediante la interacción con el DNA que podría modificar su afinidad de unión al DNA, o bien la interacción con otra proteína (Ovalle-Maqueo 2015; Montalvo-Méndez 2016).

Para determinar las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β /BIP2/Exd se realizaron tres construcciones plasmídicas que correspondieron a pECFP-N1-TFIIE β , pECFP-BIP2 y pECFP-N1-Exd. La identidad de estos plásmidos fue confirmada detalladamente mediante caracterización enzimática y secuenciación. Posteriormente estas construcciones fueron cotransfectadas con los plásmidos pCS2VC155-Antp y pCS2VNm9-TBP codificantes para las proteínas de fusión VCAntp y VNTBP en células HEK293 y las interacciones triméricas fueron determinadas mediante el sistema FRET/BiFC utilizando el Script FRETTEY y el software de uso libre ImageJ previamente estandarizado.

Los resultados muestran claramente que existen interacciones triméricas entre el dímero Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β , BIP2 y Exd. La interacción trimérica detectada de Antp-TBP/TFIIE β fue la que dió mayor señal de interacción trimérica con el sistema FRET/BiFC con un valor de transferencia de energía de $E=0.50\pm 0.05$. Esto podría explicarse debido a la posición de TFIIE en el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC) en donde se observa que TFIIE se posiciona adyacente a TFIID de manera que se encuentra suficientemente próximo a TBP facilitando la transferencia de energía entre las proteínas ECFP y Venus. Debido a lo anterior, el complejo trimérico Antp-TBP/TFIIE β podría ser dado por la cercanía de Antp-TBP con el factor TFIIE β en el complejo de pre-iniciación de la transcripción como se muestra en la Fig. 30 (Louder *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2013).

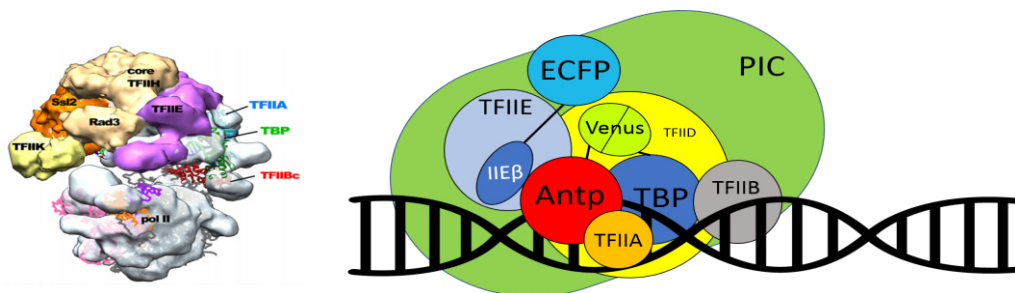


Figura 30. Esquema de interacción probable de Antp-TBP/TFIIE β en el complejo transcripcional.

El factor TFIIE es un heterotetrámero componente del complejo de pre-iniciación de la transcripción, que contiene dos subunidades TFIIE- α y TFIIE- β . La subunidad β de TFIIE interacciona con la hélice 2 del HD de AbdB y Antp, específicamente a través de

Los resultados obtenidos de la interacción trimérica Antp-TBP/BIP2 mediante FRET/BiFC mostraron un valor de $E=0.15\pm 0.03$ inferior a los valores obtenidos en los dos complejos triméricos Antp-TBP-TFII β ($E=0.50\pm 0.05$) y Antp-TBP-Exd ($E=0.43\pm 0.18$) analizados. Este valor de FRET relativamente bajo podría deberse a que la proteína BIP2 utilizada en nuestros ensayos no está completa (1-89) o a la posición del fluoróforo con respecto a BIP2, ya que se ha descrito anteriormente que la posición del fluoróforo en la proteína de fusión es importante en este tipo de ensayos, dada la función de cada proteína y la naturaleza de cada interacción (Kerppola, 2008).

La interacción trimérica Antp-TBP/Exd presentó un valor de $E=0.43\pm 0.18$ muy similar al obtenido con TFII β y a Jun-Fos-p65, podría deberse a que se ha observado que algunas homeoproteínas interaccionan con el DNA formando dímeros con Exd, confiriéndoles especificidad funcional (Passner *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1999; Joshi *et al.*, 2007; Merabet, 2007; Slattery *et al.*, 2011 y Crocker *et al.*, 2015). Antp podría unirse al DNA en forma de dímero con Exd, adyacente al PIC, posicionándose cerca de TBP para permitir la interacción trimérica Antp-TBP/Exd como se describe en la Fig. 32.

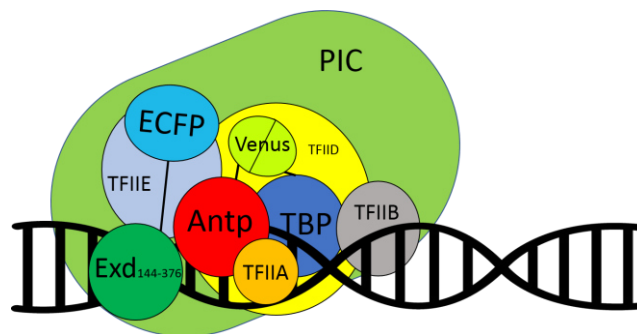


Figura 32. Interacción probable de Antp-TBP/Exd.

Se ha descrito que proteínas con homeodominio como Pbx interaccionan con homeoproteínas solo en presencia de una región de unión al DNA (Chan *et al.*, 1995). Existe evidencia de que algunos complejos triméricos contribuyen en la activación de la transcripción (Swift *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1999; Besthelsen *et al.*, 1998). Los complejos triméricos HTH/Hox/Exd han mostrado que potencian la actividad de sitios blanco de labial *in vivo* (Ryoo *et al.*, 1999; Shanmugam *et al.*, 1999), por lo que la participación de la interacción trimérica de Antp-TBP con Exd podrían brindar especificidad, así como potenciar la transcripción.

La formación del complejo trimérico Antp-TBP/Exd muestra que el trímero proteico compuesto de homeodominios y un factor transcripcional puede reconocer el DNA además de las interacciones proteína-proteína detectadas en esta tesis. Los homeodominios reconocen secuencias ricas en TA (Scott *et al.*, 1989; Gehring *et al.*, 1994; Biggin & McGinnis, 1997) y TBP también lo hace (Nikolov *et al.*, 1996), de manera que el complejo trimérico Antp-TBP/Exd podría unirse a una región promotora DNA, de igual manera que el complejo trimérico HTH/Hox/Exd descrito previamente por Ryoo *et al.*, 1999. Así mismo, se ha evidenciado que la importancia de la interacción trimérica AbdA/Exd/Hth se encuentra en la unión a elementos potenciadores para el gen regulador del ciclo celular *Dcyclin E* (CycE) (Kannan *et al.*, 2010) mostrando el mismo patrón que se reporta con la interacción trimérica Ubx/Exd/Hth, donde la participación de Exd en el anclaje del DNA contribuye en la regulación positiva de la transcripción (Crocker *et al.*, 2015) por lo que la interacción de Exd con el dímero Antp-TBP podría influir en la regulación positiva de la transcripción en los genes blanco de Antp.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis permitieron concluir:

- La estandarización del sistema de interacciones proteicas FRET/BiFC en la línea celular HEK293 mediante la detección del complejo trimérico Jun-Fos/p65 con los parámetros 600v de voltaje, 1x de ganancia, 0% de offset, 10% de potencia de láser y 200 nm de apertura confocal, usando microscopía confocal láser.
- La presencia del complejo trimérico Antp-TBP/TFIIE β en las células transfectadas ($E=0.50\pm 0.05$) usando el sistema FRET/BiFC
- La detección del complejo trimérico Antp-TBP/BIP2₁₋₈₉ ($E=0.15\pm 0.03$) en las células HEK293 transfectadas usando FRET/BiFC.
- La homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ presenta interacción trimérica con el complejo Antp-TBP ($E=0.43\pm 0.18$) en las células transfectadas usando FRET/BiFC

11. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos de las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β y BIP2, así como con la homeoproteína Exd abren la posibilidad para:

- Realizar el análisis funcional de las interacciones triméricas Antp-TBP/TFIIE β /BIP2₁₋₈₉/Exd₁₄₄₋₃₇₆ en un modelo *in vivo* de *D. melanogaster*.
- Determinar interacciones triméricas de Antp con otros factores de la maquinaria basal de transcripción.
- Establecer los dominios de interacción trimérica de los factores transcripcionales: TFIIE β , BIP2₁₋₈₉ y la homeoproteína Exd₁₄₄₋₃₇₆ con el complejo Antp-TBP en cultivo celular.
- Realizar ensayos de transactivación para determinar la actividad de los factores transcripcionales unidos a ECFP relacionadas con Antp.

APÉNDICE I

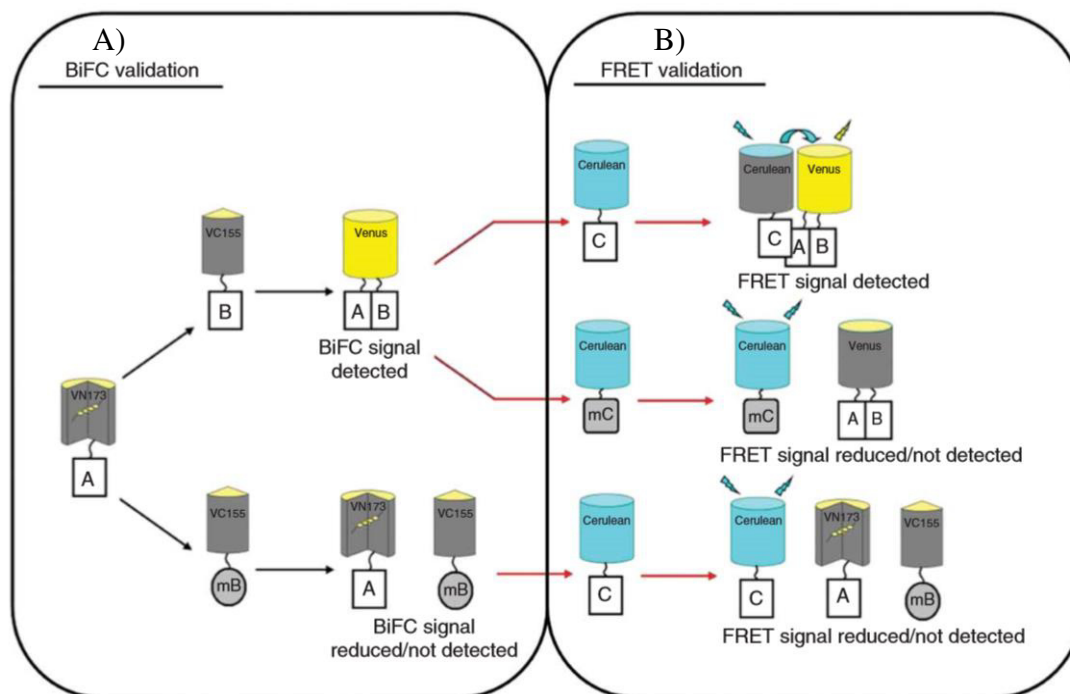


Figura 33. Esquemización de los posibles escenarios en un ensayo de FRET basado en BiFC. A) El diagrama representa la interacción dímérica mediante BiFC. En la parte superior se muestra la interacción de las proteínas de fusión VN-A y VC-B resultando en la reconstitución de la proteína fluorescente Venus (color amarillo), en la parte inferior se muestra la falta de interacción entre VN-A y VC-mB, por lo cual la señal fluorescente de Venus se ve disminuida o no se emite señal alguna. B) Se esquematizan los posibles escenarios en un ensayo de interacción trimérica FRET basado en BiFC. En la parte superior se esquematiza la interacción de la proteína C (fusionada a la proteína fluorescente Cerulean), con el complejo VN-A/VC-B, de tal manera que al excitar la proteína fluorescente Cerulean, esta excitará a Venus reconstituida. En el segundo caso se muestra la falta de interacción entre la proteína mC (fusionada con Cerulean) y el complejo VN-A/VC-B, por lo que al excitar a Cerulean esta misma no podrá excitar a Venus. Por otro lado, en la parte inferior se esquematiza la falta de transferencia de energía de Cerulean a Venus debido a que las proteínas VN-A y VC-mB no interaccionan y por lo tanto Venus no se reconstituye, de manera que, aunque la proteína C interaccione con VN-A o VC-mB no se podrá evidenciar la interacción, dada la ausencia del aceptor (Venus) en el sistema FRET.

Tomado de Shyu *et al.*, 2008

APÉNDICE II

Sistema de FRET/BIFC

Para el análisis de las interacciones triméricas mostradas en esta tesis, se utilizó el programa de uso libre ImageJ con el plug-in FRETYY disponible en: <http://karri.anu.edu.au/corry/software.html#fretty>. El proceso de análisis de las fotografías capturadas de acuerdo a las características detalladas en la sección 7.1.3 de Materiales y Métodos se describe en las siguientes capturas.

En ImageJ se selecciona plug-in FRETYY previamente instalado siguiendo el proceso mostrado en la Figura 1. Plugins+FRETYY+2D Deconvolution. Después de seleccionar la opción 2D Deconvolution, se desplegará una ventana en la que más adelante ingresaremos las fotografías con las siguientes características: SDD Espectro del Donador excitado como Donador, SAD Espectro del Aceptor excitado como Donador y SAA Espectro del Aceptor excitado como Aceptor (Fig. 1).

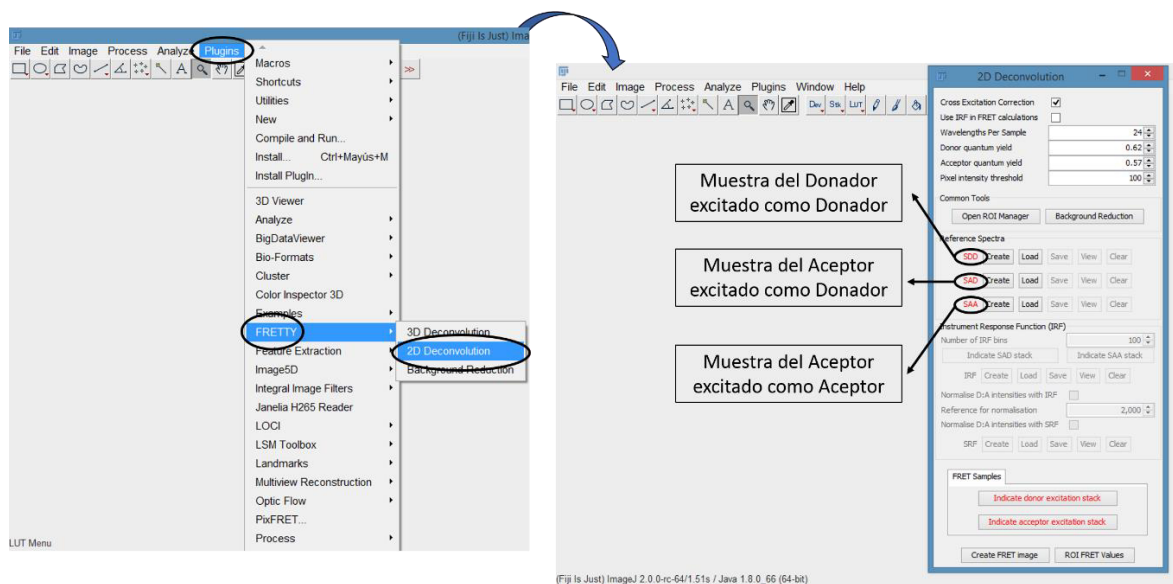


Figura 1

Se cargan las imágenes correspondientes, como se muestra en la Figura 2. File+Open y seleccionamos las imágenes que corresponden a las fotografías, Aceptor excitado como Aceptor, Aceptor excitado como Donador y Donador excitado como Donador, así como se indica en la Figura 2.

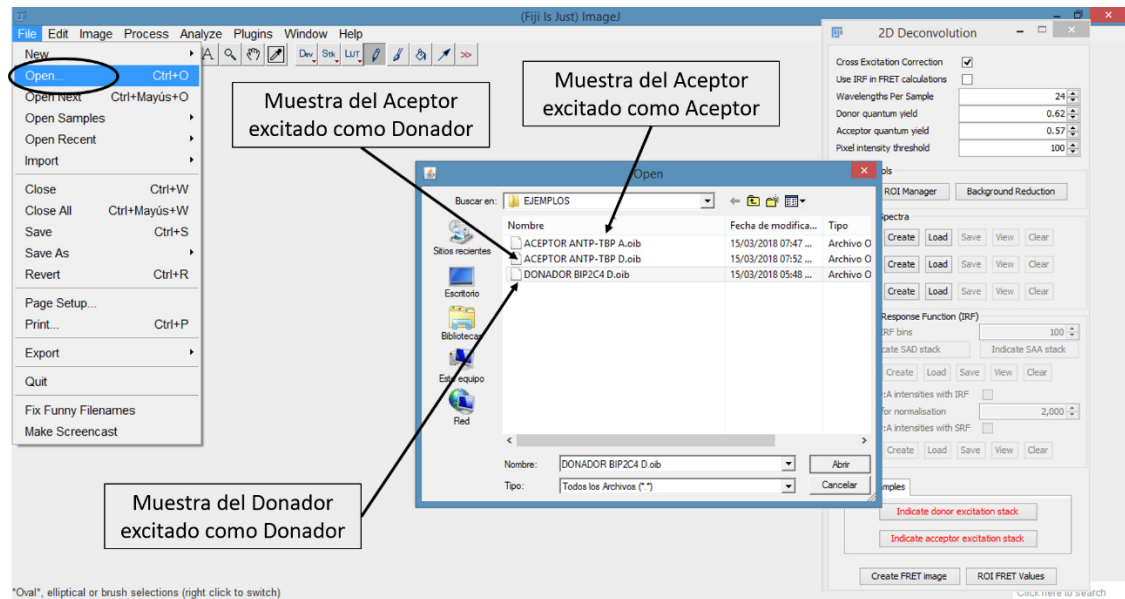
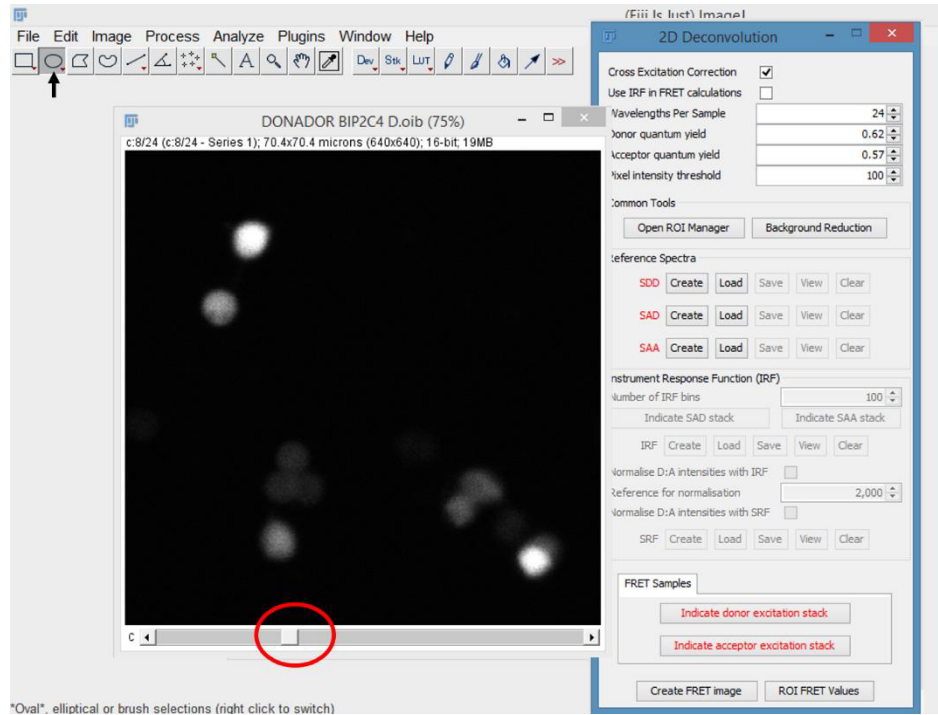


Figura 2

Una vez abiertas las imágenes en el software ImageJ, con ayuda de la barra de desplazamiento localizada bajo la imagen, se selecciona la imagen con mejor señal de fluorescencia. Posteriormente seleccionamos la herramienta círculo localizada en la barra de herramientas indicada con una flecha en la Figura 3.



Oval: elliptical or brush selections (right click to switch)

Figura 3

Con la ayuda de la herramienta círculo seleccionamos una región de la imagen en negro, es decir una región que no presente fluorescencia. Esta región, nos servirá para señalar el background y posteriormente se presiona la opción “Background Reduction” (Esta acción es importante porque de esta manera determinamos la señal que no es de nuestro interés y debe ser aplicada cada vez que se crea un espectro) señalada en la Figura 4.

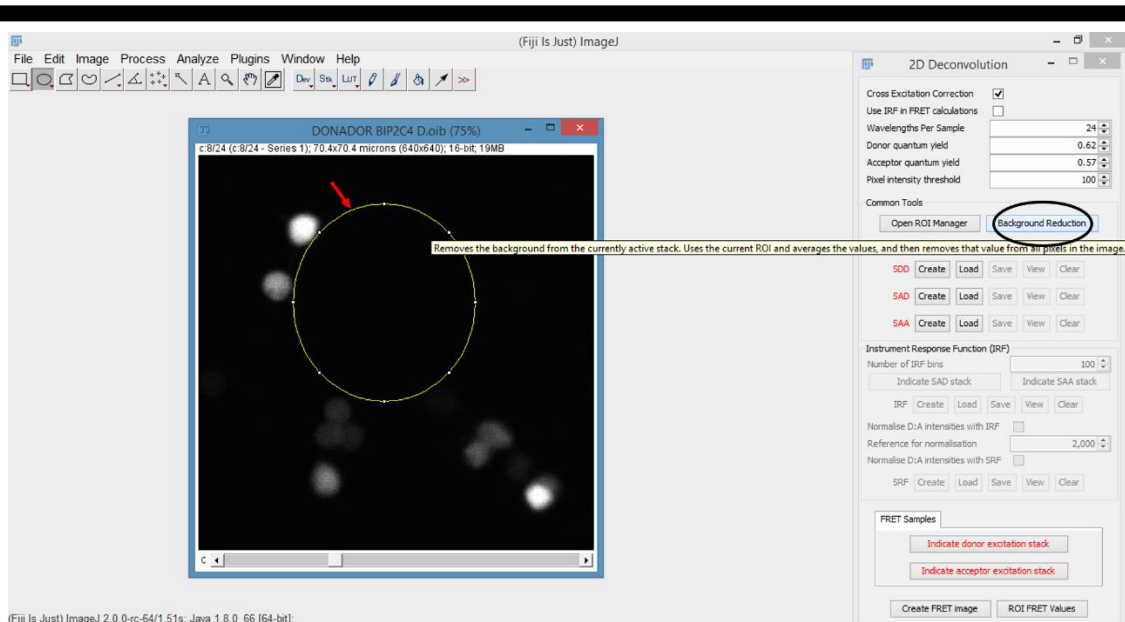


Figura 4

Una vez determinando el blanco de la imagen, se procede a seleccionar las regiones de interés (ROIs). Para ello se oprime “Open ROI Manager” y se abrirá una ventana que mostrará los ROIs seleccionados, posteriormente con ayuda de la herramienta círculo se seleccionan las regiones con señal fluorescente y se oprime la opción “Add” localizada en la ventana de “ROI Manager”. Para visualizar los ROIs seleccionados las opciones “Show all” y “Labels” deben estar seleccionadas (Figura 4).

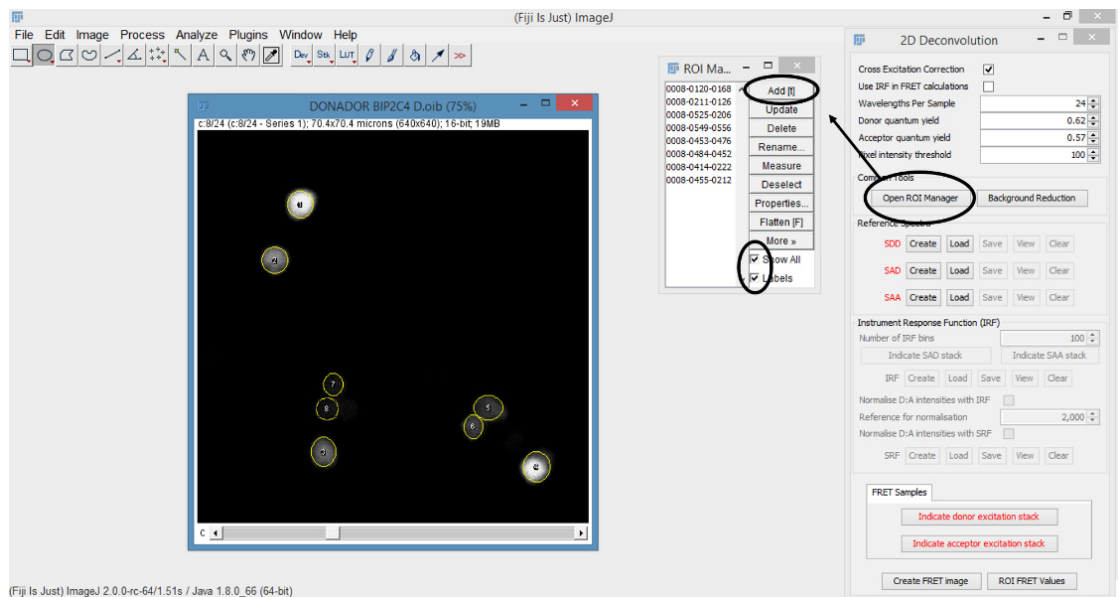


Figura 5

Posteriormente, al terminar de seleccionar y añadir los ROIs, se selecciona la opción “Create” teniendo especial cuidado en crear el espectro correspondiente, en este ejemplo el espectro corresponde a Donador excitado como Donador por lo que presionamos “Create” en la opción SDD (Figura 6), al cambiar las letras de color rojo a verde, cerramos la ventana de “ROI Manager” y la imagen correspondiente, para continuar con las 2 fotografías restantes.

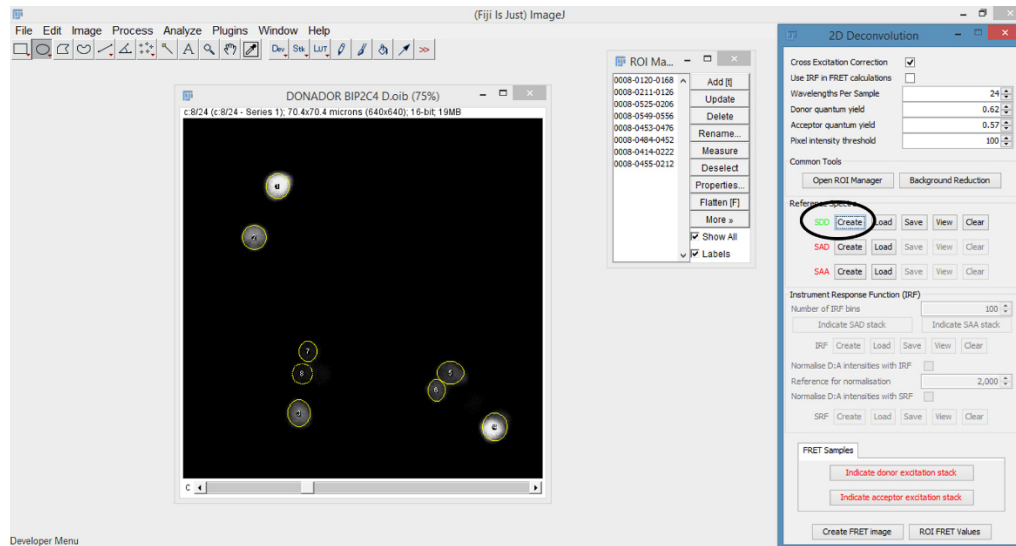


Figura 6

Para crear los 2 espectros restantes se repite el procedimiento descrito anteriormente. Se sugiere continuar con la fotografía del Aceptor excitado como Aceptor (SAA) y al finalizar solo se cierra la venta correspondiente a la fotografía SAA y se deja la ventana de “ROI Manager” abierta para utilizar los mismo ROIs en el espectro de las fotografías correspondientes para Aceptor excitado como Donador. (Fig. 7)

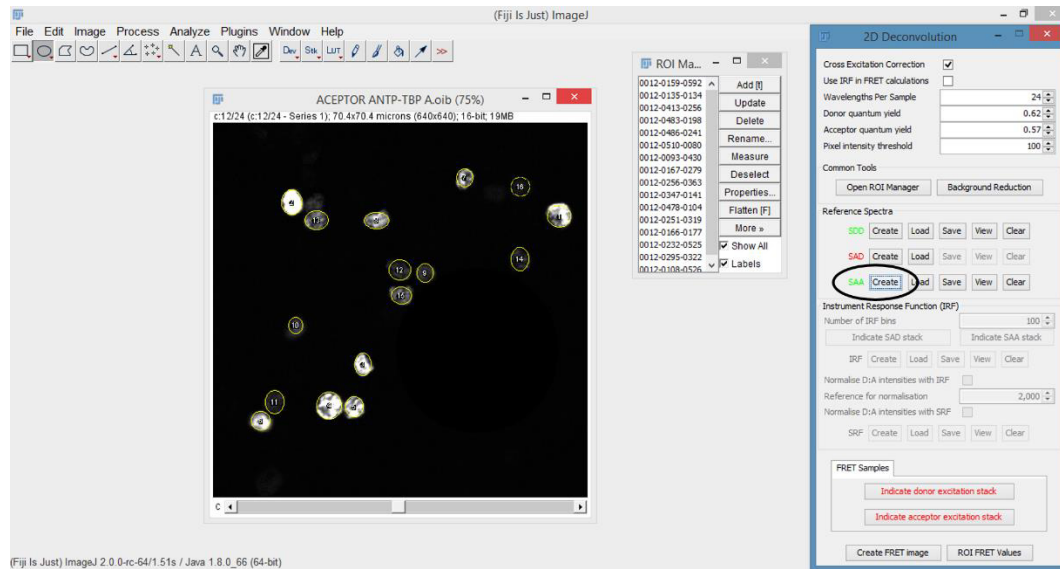


Figura 7

Posteriormente se abre la última fotografía correspondiente al Aceptor excitado como Donador (SAD), teniendo abierta la ventana “ROI Manager” seleccionamos “Show All” y nos mostrara los ROIs seleccionados en la imagen SAA, se selecciona la opción “Create” y se cierran las ventanas de las fotografías y “ROI Manager” (Fig. 8)

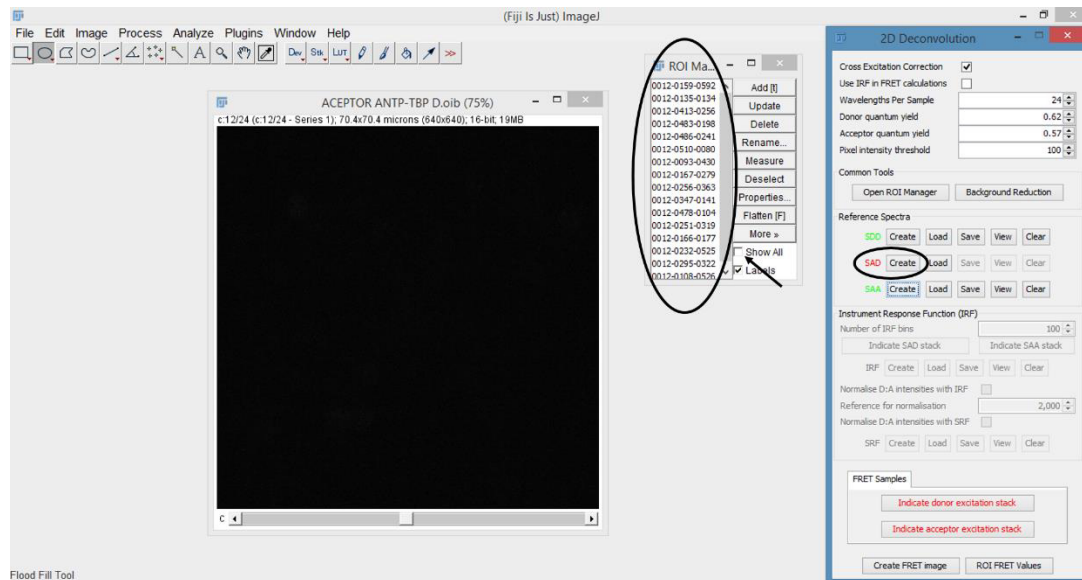


Figura 8

Para proceder a procesar las muestras correspondientes a FRET/BiFC, se siguen los pasos descritos anteriormente. Se abren las fotografías tomadas como FRET excitada como Donador y FRET excitada como Aceptor (En este punto el orden no es importante. Basta con señalar adecuadamente en el programa cual fotografía es excitada como Donador y cual es excitada como Aceptor).

Teniendo las fotografías abiertas se selecciona una región que no contengan fluorescencia como muestra la flecha en la Figura 9 y posteriormente se selecciona el botón “Background Reduction”. Enseguida se selecciona la opción “Indicate donor excitation stack” y la imagen restante se procesa de la misma manera indicando la opción “Indicate acceptor excitation stack”

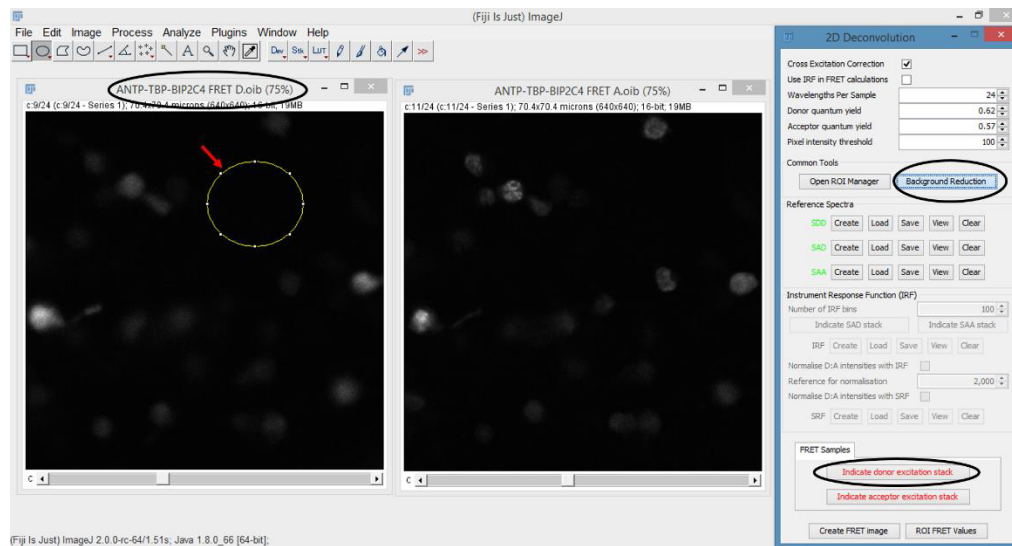


Figura 9

Después de determinar cuál imagen corresponde a la excitación como Donador y Aceptor queda una ventana similar a la mostrada en la Figura 10 y enseguida se selecciona la

opción “Create FRET image”. Esta acción abrirá una ventana nueva correspondiente a la señal de FRET (Fig. 10).

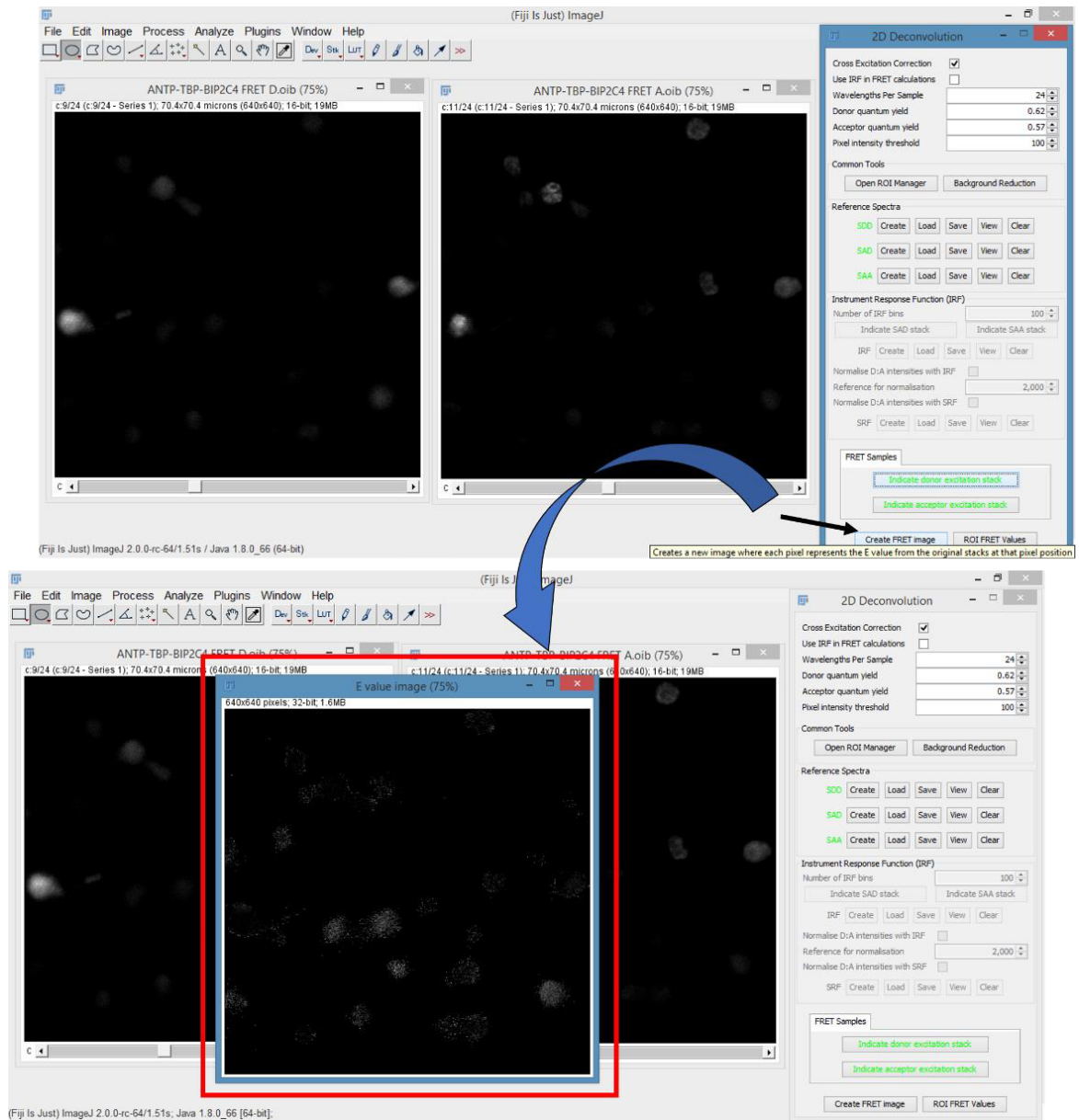


Figura 10

Para mayor comodidad de visualización, se selecciona el modo “Fire” siguiendo la siguiente ruta: en la barra de herramientas del programa ImageJ se selecciona la opción Image+Lookup Tables+Fire (Fig. 11). Esta acción arrojará una imagen como se muestra en la Figura 11 donde se aprecia visualmente la señal de FRET en colores azul, morado,

rojo y hasta blanco. Estos representan la intensidad de FRET, colores más oscuros representan FRET bajo y colores más claros representan FRET más fuerte.

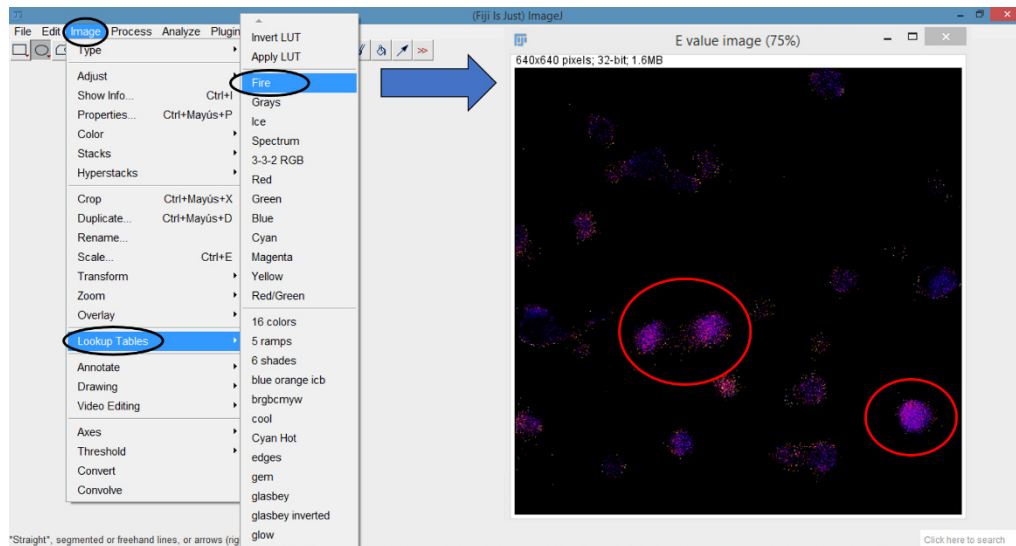


Figura 11

Finalmente, para cuantificar FRET se necesita determinar los valores de E . Para esto se abre la ventana “ROI Manager” y se seleccionan ROIs en la imagen correspondiente a FRET visto en modo “Fire”. Al terminar de seleccionar se oprime la opción “ROI FRET Values” y enseguida se desplegará una tabla correspondiente a los valores de E que servirán para cuantificar FRET.

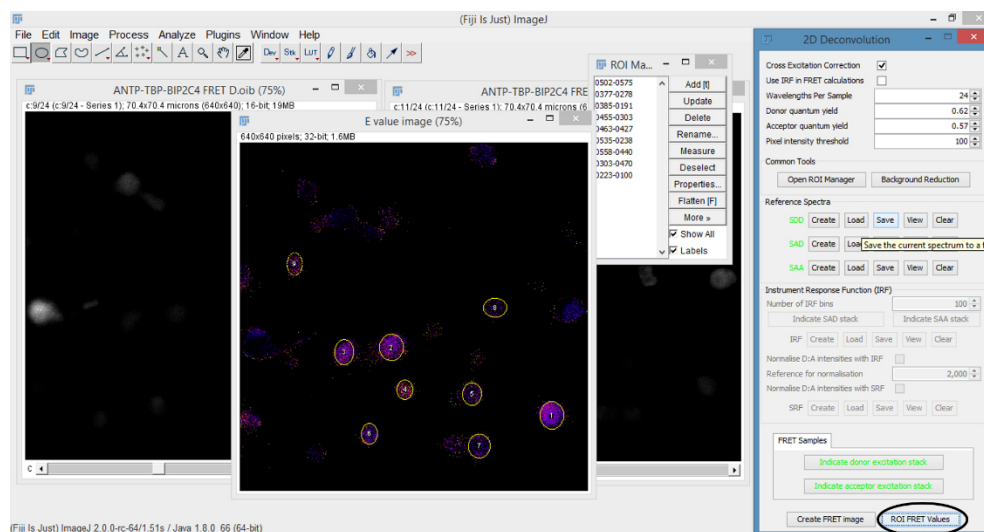


Figura 12

12. BIBLIOGRAFIA

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

Akam M. 2002. Los genes Hox, homeosis y la evolución de la identidad del segmento: sin necesidad de monstruos sin esperanza. *International Journal of Developmental Biology*, 42 (3), 445-451.

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>

Berthelsen J, Zappavigna V, Ferretti E, Mavilio F, Blasi F. 1998. The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *The EMBO journal*, 17(5), 1434-1445.

Biggin MD, McGinnis W. 1997. Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development*, 124(22), 4425-4433.

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

Bridges CB, Morgan TH. 1923. *Third-Chromosome Group Of Mutant Characters Of Drosophila Melanogaster*.

Buljan M, Chalancon G, Dunker AK, Bateman A, Balaji S, Fuxreiter M, Babu MM. 2013. Alternative splicing of intrinsically disordered regions and rewiring of protein interactions. *Current opinion in structural biology*, 23(3), 443-450.

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.

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

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.

Chen M, Liu S, Li W, Zhang Z, Zhang X, Zhang XE, and Cui Z. 2016. Three-Fragment Fluorescence Complementation Coupled with Photoactivated Localization Microscopy for Nanoscale Imaging of Ternary Complexes. *ACS Nano* 10, 8482–8490.

Ciruela F. 2008. Fluorescence-based methods in the study of protein–protein interactions in living cells. *Current opinion in biotechnology*, 19(4), 338-343

Crocker J, Abe N, Rinaldi L, McGregor AP, Frankel N, Wang S, Alsawadi A, Valenti P, Plaza S, Payre F, Mann, RS. 2015. Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell*, 160(1), 191-203.

Demeneix BA, Boussif O, Zanta MA, Remy JS, y Behr JP. 1997. Entrega de polinucleótidos con lípidos y polímeros de poliamina. *Nucleósidos, Nucleótidos y Ácidos Nucleicos*, 16 (7-9), 1121-1127.

Duboule D, Morata G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics*, 10(10), 358-364.

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

Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. 1994. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 14(3), 1582-1593.

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

Galperin E, Verkhusha VV & Sorkin A. 2004. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nature methods*, 1(3), 209.

Gangloff YG, Pointud JC, Thuault S, Carré L, Romier C, Muratoglu S & Davidson I. 2001. The TFIID Components Human TAFII140 and *Drosophila* BIP2 (TAFII155) Are Novel Metazoan Homologues of Yeast TAFII47 Containing a Histone Fold and a PHD Finger. *Molecular and cellular biology*, 21(15), 5109-5121.

García-Bellido A. 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. Volume 29, CIBA Foundation Symposium Edition. Elsevier, Amsterdam

Gatchalian J, Gallardo CM, Shinsky SA, Ospina RR, Liendo AM, Krajewski K, Klein BJ, Andrews FH, Strahl BD, Wely KHM, Kutateladze TG. 2016. Chromatin condensation and recruitment of PHD finger proteins to histone H3K4me3 are mutually exclusive. *Nucleic acids research*, gkw193.

Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. 1994. Homeodomain proteins. *Annual review of biochemistry*, 63(1), 487-526.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78(2), 211-223.

Gilbert SF. 2005. *Biología del Desarrollo*. 7^o edición. Ed. Médica Panamericana.
Gill G. & Ptashne M. 1988. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*. Vol 334. Pp 721-724

Hayashi S, Scott MP. 1990. What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins?. *Cell*, 63(5), 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.

Herskowitz IH. 1948. Hexaptera, a homeotic mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 34(1):10-25

Hobbs NK, Bondareva AA, Barnett S, Capecchi MR, Schmidt EE. 2002. Removing the vertebrate-specific TBP N-terminus disrupts placental β 2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell*, 110:43-54

Hu CD & Kerppola TK. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology*, 21(5), 539.

Hudry B, Remacle S, Delfini MC, Rezsóhazy R, Graba Y, Merabet S. 2012. Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. *PLoS Biol*, 10(6), e1001351.

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.

Hynes TR, Yost E, Mervine S & Berlot CH. 2008. Multicolor BiFC analysis of competition among G protein β and γ subunit interactions. *Methods*, 45(3), 207-213.

Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. 1999. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 5134-5142.

Joshi R, Passner JM, Rohs R, Jain R, Sosinsky A, Crickmore MA, Jacob V, Aggarwal AK, Honig B, Mann RS. 2007. Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure. *Cell*, 131(3), 530-543.

Kannan R, Berger C, Myneni S, Technau GM, Shashidhara LS. 2010. Abdominal-A mediated repression of Cyclin E expression during cell-fate specification in the *Drosophila* central nervous system. *Mechanisms of development*, 127(1), 137-145.

Kaufman TC, Lewis R, Wakimoto B. 1980. El análisis citogenético del cromosoma 3 en *Drosophila melanogaster*: el complejo de genes homeoic en polytene intervalo de cromosomas 84a-B. *Genética*, 94 (1), 115-133

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. 1993. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365: 520-27.

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

Le Calvez J. 1948. In (3R) SSAr: Mutation Aristapedia, heterozygote dominante, homozygote lethal chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 82: 97-113

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

Lewis EB. 2004. The bithorax complex: the first fifty years. In *Genes, Development and Cancer* (pp. 503-526). Springer US.

Louder RK, He Y, López-Blanco JR, Fang J, Chacón P & Nogales E. 2016. Structure of promoter-bound TFIID and model of human pre-initiation complex assembly. *Nature*, 531(7596), 604.

Manak JR, Scott MP. 1994. A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Development*, 1994 (Supplement), 61-77.

Mann RS, Lelli KM, Joshi R. 2009. Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology*, 88, 63-101.

McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ. 1984. Una secuencia de codificación de la proteína homóloga de genes homeoicos de *Drosophila* y su conservación en otros metazoos. *Cell*, 37 (2), 403-408.

McGinnis W, Krurnlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68,283-302.

Merabet S, Kambris Z, Capovilla M, Bérenger H, Pradel J, Graba Y. 2003. The hexapeptide and linker regions of the AbdA hox protein regulate its activating and repressive functions. *Developmental Cell*, 4: 761-768

Merabet S, Saadaoui M, Sambrani N, Hudry B, Pradel J, Affolter M, y Graba Y. 2007. A unique Extradenticle recruitment mode in the Drosophila Hox protein Ultrabithorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 16946-16951.

Miesfeld R. 1999. *Applied Molecular Genetics*. New York, USA. John Wiley & Sons, INC. 293p.

Miotto B, Graba Y. 2010. Control of DNA replication: A new facet of Hox proteins? *Bioessays*, 32: 800-807

Montalvo-Méndez RJ. 2016. El homeopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción molecular proteína-proteína con Antennapedia. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León

Morata G, Lawrence PA. 1977. Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature*, 265, 211-216.

Murakami K, Elmlund H, Kalisman N, Bushnell DA, Adams CM, Azubel M & Levitt M. 2013. Architecture of an RNA polymerase II transcription pre-initiation complex. *Science*, 342(6159), 1238724.

Neduva V, Russell, RB. 2005. Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS letters*, 579(15), 3342-3345.

Offenborn JN, Waadt R, & Kudla J. 2015. Visualización y translocación de complejos ternarios de proteína Calcineurina-A/Calcineurina-B/Calmodulina-2 mediante complementación de fluorescencia trimolecular de dos colores. *Nueva Phytologist*, 208 (1), 269-279.

Ortiz-Lombardia M, Foos N, Maurel-Zaffran C, Saurin AJ, Graba Y. 2017. Hox functional diversity: Novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *BioEssays*.

Ovalle-Maqueo A. 2015. Identificación de los homeopéptidos de glutaminas de Antennapedia responsables de su interacción molecular con el factor transcripcional TBP. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Passner JM, Ryoo HD, Shen L, Mann RS, Aggarwal AK. 1999. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax–Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, 397(6721), 714-719.

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

Piper DE, Batchelor AH, Chang CP, Cleary ML, Wolberger C. 1999. Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell*, 96(4), 587-597.

Pointud JC, Larsson J, Dastugue B, Couderc JL. 2001. The BTB/POZ domain of the regulatory proteins Bric a brac 1 (BAB1) and Bric a brac 2 (BAB2) interacts with the novel *Drosophila* TAF(II) factor BIP2/ dTAF(II)155. *Dev Biol* 237(2):368-380.

Prince F, Katsuyama T, Oshima Y, Plaza S, Resendez-Perez D, Berry M, Kurata S, Gehring WJ. 2008. The YPWM motif links *Antennapedia* to the basal transcriptional machinery. *Development*, 135(9), 1669-1679.

Puc J, Kozbial P, Li W, Tan Y, Liu Z, Suter T, Ohgi KA, Zhang J, Aggarwi AK, Rosenfeld MG. 2015. Ligand-dependent enhancer activation regulated by topoisomerase-I activity. *Cell*, 160(3), 367-380.

Rezsohazy R. 2014. Non-transcriptional interactions of Hox proteins: inventory, facts, and future directions. *Developmental Dynamics*. 243: 117-131.

Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS. 1997. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*, 91(2), 171-183

Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS. 1999. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development*, 126(22), 5137-5148.

Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ & Featherstone MS. 2000. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Molecular and cellular biology*, 20(22), 8623-8633.

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.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji - an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW. 1989. The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 989(1), 25-48.

Scott MP, Weiner AJ. 1984. Las relaciones estructurales entre los genes que controlan el desarrollo: una homología de secuencia entre el Antennapedia, Ultrabithorax, y loci fushi Tarazu de *Drosophila*. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 81 (13), 4.115 - 4.119.

Shanmugam K, Green NC, Rambaldi I, Saragovi HU, Featherstone MS. 1999. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7577-7588.

Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. 2008. Visualization of AP-1–NF- κ B ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 151-156.

Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. 2008. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. *Nature protocols*, 3(11), 1693-1702.

Slattery M, Riley T, Liu P, Abe N, Gomez-Alcala P, Dror I, Zhou T, Rohs R, Honig B, Bussemaker HJ, Mann RS. 2011. Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins. *Cell*, 147(6), 1270-1282.

Swift GH, Liu Y, Rose SD, Bischof LJ, Steelman S, Buchberg AM, Wright CVE, MacDonald RJ. 1998. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Molecular and cellular biology*, 18(9), 5109-5120.

Villareal-Puente AC. 2015. Interacciones de Ubx con Antp mediante BiFC in vivo. Tesis de licenciatura, FCB UANL, Monterrey Nuevo León, México

Wang S, Ding M, Xue B, Hou Y, & Sun Y. 2017. Visualización de células vivas de múltiples interacciones proteína-proteína con BiFC Rainbow. *Biología química de ACS*.

Wilson DS, Desplan C. 1999. Structural basis of Hox specificity. *Nature structural biology*, 6(4), 297-300.

Zaballos MA, Cantero W, Azpiazu N. 2015. The TALE transcription factor homothorax functions to assemble heterochromatin during *Drosophila* embryogenesis. *PloS one*, 10(3), e0120662.

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

Zurita M. 2002. Los genes homeóticos y el desarrollo de la mosca de la fruta. *Ciencias*, (065).