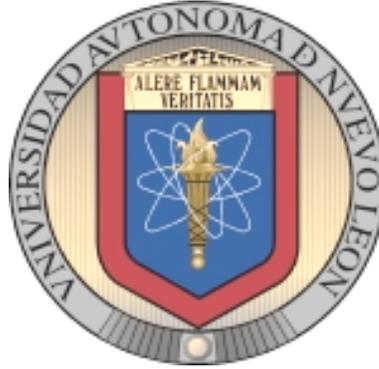


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTENNAPEPIA, GAL4 Y
MUTANTES EN EL TETRAPÉPTIDO “YPWM”: DOMINIO DE
REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL EN ANTENNAPEPIA**

Por

DIANA LINDA CÁRDENAS CHÁVEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS**

Enero 2007

**PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTENNAPEDIA, GAL4 Y
MUTANTES EN EL TETRAPÉPTIDO “YPWM”: DOMINIO
DE REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL
EN ANTENNAPEDIA**

Comité de Tesis

**Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de Tesis**

**Dr. Jorge Verduzo Martinez
Vocal**

**Dr. Mario Morales Vallarta
Secretario**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por compartir conmigo su conocimiento, experiencia y sabios consejos que me permitieron crecer como profesionalista y persona.

Al Dr. Mario Morales que me inició en la investigación y que posteriormente me orientó al área de Biología del Desarrollo.

A M.C Maribel Luna y M.C. Claudio Moreno por sus conocimientos aportados a la realización de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio 8: Jeannie, Karina, Porfi, Efrén, Ricardo, Miguel, especialmente a Argentina “Titi” por ser más que una compañera, una amiga.

A Fisher y cols. por la donación de algunos plásmidos utilizados en este proyecto.

A todos aquellos investigadores cuyos conocimientos generados son el soporte de esta investigación.

A la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* por permitir descubrir la intimidad de su naturaleza.

A la vida misma por ser, evolucionar y seguir siendo una pregunta a la ciencia.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. IMPORTANCIA.....	4
5. ANTECEDENTES.....	5
5.1 Genes homeóticos.....	5
5.2 Antennapedia.....	9
5.3 Tetrapéptido YPWM.....	11
5.3.1 Interacción proteína-proteína.....	12
5.3.2 Unión al DNA.....	14
5.4 Represión transcripcional.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
6.1 Análisis de la activación de la transcripción en cultivo celular.....	19
6.1.1 Construcción de plásmidos recombinantes.....	19
6.1.1.1 Plásmido pNPACAntp Δ H.....	19
6.1.1.2 Plásmido pPACTGAL4-AAAA.....	20
6.1.2 Obtención y purificación de los DNAs plasmídicos recombinantes y reporteros	23
6.1.3 Ensayos de transfección en células Schneider.....	24
6.1.4 Preparación de extractos celulares totales.....	24

6.1.5	Análisis de la expresión de los genes reporteros.....	25
6.2	Expresión y purificación de Antp y sus mutantes	25
6.2.1	Construcción de plásmidos recombinantes.....	25
6.2.1.1	Plásmidos pMALcAntp y Antp ^{AAAA}	25
6.2.1.2	Plásmido pMALcAntpΔHD.....	27
6.2.2	Expresión de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes en YPWM.....	28
6.2.3	Purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes.....	29
6.3	Expresión y purificación de GAL4 y sus mutantes.....	30
6.3.1	Construcción de plásmidos recombinantes.....	30
6.3.1.1	Plásmido pGEX-CS-GAL4-DBD.....	30
6.3.1.2	Plásmidos pGEX-GAL4-YPWM y pGEX-GAL4-AAAA.....	30
6.3.2	Expresión de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes en YPWM.....	32
6.3.3	Purificación de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes.....	32
6.4	Análisis electroforético de las proteínas de fusión mediante SDS-PAGE.....	33
6.5	Inmunodetección de las proteínas de fusión mediante Western-Blot.....	33
6.6	Análisis de interacción proteína-DNA mediante ensayos de retardación en gel.....	34
6.6.1	Preparación de las sondas de unión a Antp y GAL4.....	34
6.6.2	Ensayos de interacción de las proteínas Antp y GAL4 y sus mutantes con el DNA.....	37
7.	RESULTADOS.....	39
7.1	Actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM de Antp en células Schneider.....	39
7.1.1	Construcción de los plásmidos recombinantes.....	39
7.1.1.1	Plásmido pNPACAntpΔHD.....	39
7.1.1.2	Plásmido pPACTGAL4-AAAA.....	39
7.1.2	Obtención y purificación de los DNAs plasmídicos recombinantes.....	45
7.1.3	Efecto del tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional de Antp.....	45
7.1.4	Actividad transcripcional represora del tetrapéptido YPWM de Antp en GAL4.....	47
7.2	Expresión y purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes.....	49
7.2.1	Construcción de los plásmidos recombinantes pMALc-Antp y pMALcAntp ^{AAAA}	49
7.2.2	Expresión y purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y MBP-Antp ^{AAAA}	52

7.2.3 Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp Δ HD.....	55
7.2.4 Expresión de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD.....	57
7.3 Expresión y purificación de las proteínas de fusión GAL4 y sus mutantes en YPWM.....	57
7.3.1 Proteína de fusión GST-GAL4.....	57
7.3.2 Proteína de fusión GST-GAL4 ^{YPWM}	59
7.3.3 Proteína de fusión GST-GAL4 ^{AAAA}	63
7.4 Inmunodetección de las proteínas de fusión Antp, GAL4 sus mutantes en YPWM.....	66
7.5 Análisis de interacción con el DNA de las proteínas recombinantes Antp, GAL4 y sus mutantes en YPWM.....	67
7.5.1 Preparación de las sondas de unión de Antp y GAL4.....	67
7.5.2 Ensayos de interacción a los sitios de unión BS2 de Antp y sus mutantes.....	69
7.5.3 Ensayos de interacción a los sitios UAS de GAL4 y sus mutantes.....	69
8. DISCUSIÓN.....	72
9. CONCLUSIONES.....	81
APÉNDICE.....	83
LITERATURA CITADA.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Lista de genes blanco regulados por genes HOX en mamíferos.....	8
II. Reacciones de digestión plasmídica con <i>Not</i> I.....	19
III. Reacción de ligación pNPAC-Antp Δ HD.....	20
IV. Reacción de digestión plasmídica con <i>Bam</i> HI / <i>Bgl</i> II.....	21
V. Programa de Alineamiento del producto de doble cadena dcAAAA5,3'....	22
VI. Reacción de ligación pPACTGAL4-AAAA.....	22
VII. Reacciones de PCR para amplificación del inserto AAAA.....	23
VIII. Programa de PCR para amplificación del inserto AAAA.....	23
IX. Reacción colorimétrica para β -galactosidasa.....	25
X. Reacciones de digestión plasmídica con <i>Sal</i> I / <i>Xmn</i> I	26
XI. Reacción de ligación pMALc-Antp / Antp ^{AAAA}	27
XII. Reacción de digestión plasmídica con <i>Sal</i> I / <i>Sma</i> I.....	27
XIII. Reacción de ligación pMALc-Antp Δ HD.....	28
XIV. Reacción de digestión plasmídica con <i>Eco</i> R I.....	30
XV. Reacción de ligación pGEX-GAL4-YPWM / AAAA.....	31
XVI. Gradiente de temperaturas mediante PCR.....	35
XVII. Reacciones de PCR para amplificar las sondas de DNA.....	36
XVIII. Reacciones de marcaje de las sondas de DNA con DIG.....	36
XIX. Pureza y concentración de los DNAs purificados.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mutaciones homeóticas Ultrabithorax y Antennapedia en <i>D. melanogaster</i>	5
2. Los genes homeóticos regulan la identidad de los segmentos a lo largo del eje antero-posterior en <i>Drosophila</i>	6
3. Evolución de los genes Hox.....	7
4. Participación de los genes Hox en diversos procesos celulares.....	8
5. Organización estructural del gen Antennapedia.....	9
6. Interacción del homeodominio de Antennapedia con el DNA.....	10
7. Alineamiento y comparación aminoácidica de homeoproteínas en <i>Drosophila</i>	11
8. Interacción de Ultrabithorax y Extradenticle.....	13
9. Construcción del plásmido recombinante pNPACAntp Δ HHD.....	41
10. Construcción del plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA.....	42
11. Caracterización del plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA Mediante PCR y secuenciación.....	44
12. Activación de la transcripción por las proteínas Antp y sus mutantes en células Schneider.....	46
13. Activación de la transcripción con las proteínas GAL4 y sus mutantes En células Schneider.....	48
14. Porcentaje de activación de la transcripción de GAL4 en presencia de Antp y sus mutantes.....	49
15. Construcción de los plásmidos pNPACAntp-Xmn I y pNPACAntp ^{AAA} -Xmn I.....	50
16. Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp.....	51

17.	Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp ^{AAAA}	53
18.	Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp en columna de amilosa.....	54
19.	Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp ^{AAAA}	55
20.	Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp Δ HHD.....	56
21.	Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HHD.....	58
22.	Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 DBD.....	59
23.	Construcción del plásmido recombinante pGEX-GAL4-YPWM.....	61
24.	Mutagénesis sitio dirigida del plásmido recombinante PGEX-GAL4-YPWM.....	61
25.	Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 ^{YPWM}	62
26.	Construcción del plásmido pGEX-GAL4-AAAA.....	64
27.	Mutagénesis sitio dirigida del plásmido recombinante pGEX-GAL4-AAAA....	65
28.	Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 ^{AAAA}	65
29.	Inmunodetección de las proteínas de fusión MBP-Antp, MBP-Antp ^{AAAA} y MBP-Antp Δ HHD.....	66
30.	Inmunodetección de las proteínas de fusión GST-GAL4, GST-GAL4 ^{YPWM} y GST-GAL4 ^{AAAA}	66
31.	Análisis de la temperatura media óptima para amplificar la sonda de unión de Antp.....	67
32.	Análisis de la temperatura media óptima para amplificar la sonda de unión de GAL4.....	68
33.	Eficiencia de marcaje de las sondas s5X y s11.....	69
34.	Análisis de la interacción de Antp y sus mutantes con la sonda de DNA.....	70
35.	Análisis de la interacción de GAL4 y sus mutantes con la sonda s5X.....	71

NOMENCLATURA

AbdA	Abdominal A
Abs	Absorbancia
Antp	Antennapedia
°C	Grados centígrados
Conc	Concentración
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DIG	Dioxigenina
Exd	Extradenticle
FBS	Suero Fetal bovino
Fkh	Forkhead
Fmol	Fentomoles
Ftz	Fushi-tarazu
FRPW	Fenilalanina-Arginina-Prolina-Triptofano
hr	Hora
Hth	Homothorax
H ₂ O _m Q	Agua miliQ
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosidasa
kcal	Kilocalorías
kDa	Kilodaltons
Kb	Kilobases
Lab	Labial

LB	Medio Luria-Bertani
mA	Miliamperios
MBP	Proteína de unión a Maltosa
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
ng	Nanogramo
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
Scr	Sex-Combs reduced
Tsh	Teashirt
U	Unidades
uv	Ultravioleta
V	Voltios
WRPW	Triptofano-Arginina-Prolina-Triptofano
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina

RESUMEN

Durante el complejo desarrollo de los organismos multicelulares, la expresión génica debe ser regulada de forma eficiente, tanto espacial como temporalmente. Para ello existen un conjunto de factores transcripcionales que son codificados por los genes HOX que participan en el desarrollo embrionario y en numerosos procesos celulares en el organismo adulto. Las homeoproteínas HOX presentan estructuras similares y reconocen secuencias de DNA prácticamente idénticas, por lo que una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo consiste en determinar como estos factores transcripcionales presentan esta amplia diversidad funcional durante la compleja selección de los genes blanco. Interesantemente, estudios realizados en embriones de *Drosophila melanogaster* con la mutación en el tetrapéptido YPWM de Antennapedia (Antp) mostraron un efecto dramático en la actividad funcional de Antp ya que este dominio fue indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco *tsh*, *fxh* y *scr* en estadios tempranos de *D. melanogaster*. Debido a lo anterior, en la presente tesis analizamos la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en Antp y fusionada a la proteína heteróloga GAL4 así como su participación en la afinidad de unión al DNA para la selección de los genes blanco de Antp.

La estrategia general utilizada para determinar el efecto del tetrapéptido YPWM en Antennapedia consistió en determinar la actividad transcripcional de este motivo mediante la co-transfección de Antp y GAL4 con o sin el tetrapéptido YPWM en células Schneider S2 en cultivo celular. Así mismo se realizó la purificación de las proteínas Antp, GAL4 y sus mutantes en el motivo YPWM para analizar la habilidad de estas proteínas de reconocer sus sitios de unión al DNA mediante ensayos de retardación en gel.

Los resultados obtenidos en ensayos de transfección en células Schneider permitieron concluir que el tetrapéptido YPWM actúa como un dominio de represión transcripcional en Antp y en la proteína transactivadora GAL4 de levaduras probablemente mediante interacción con la maquinaria transcripcional basal. Además, el análisis de interacción al DNA de las proteínas Antp y GAL4 purificadas sugieren que el motivo YPWM podría modificar la estructura tridimensional de éstas proteínas en la selección de los genes blanco. Lo anterior sugiere que este tetrapéptido es esencial en la especificidad funcional de Antp modulando la activación y/o represión de los genes blanco de Antp.

La represión transcripcional observada en la proteína heteróloga GAL4 en presencia del tetrapéptido YPWM permite sugerir un modelo de represión directa como probable mecanismo de regulación de la expresión de los genes blanco de Antp *in vivo*. Debido a lo anterior sería conveniente analizar la interacción de este motivo con los diferentes factores generales de la maquinaria basal para confirmar esta hipótesis. El análisis de si el tetrapéptido YPWM afecta o favorece la afinidad de unión de Antp deberá ser confirmado determinando las constantes de afinidad de las diferentes proteínas Antp y GAL4 en comparación con las mutantes en YPWM.

1. INTRODUCCIÓN

La familia de genes HOX codifican para un grupo de factores transcripcionales responsables de regular la morfogénesis y de conferir la identidad axial para el desarrollo del embrión. Estos genes tienen en común una secuencia de DNA altamente conservada denominada homeobox que codifica a una región peptídica de 60 aminoácidos conocida como homeodominio presente en las homeoproteínas. Lo más interesante del homeodominio es su alto grado de conservación evolutiva en organismos tan diversos que van desde levaduras hasta organismos superiores incluyendo al hombre. En vertebrados los 39 genes Hox están organizados en cuatro grupos cromosómicos: HoxA, HoxB, HoxC y HoxD. Este arreglo estructural surgió evolutivamente por duplicación y divergencia de un grupo Hox ancestral que condujo a la generación de 13 subgrupos de genes parálogos.

Un aspecto importante sobre la especificidad funcional de las homeoproteínas es su habilidad para actuar como represores ó activadores en un tejido específico a través de mecanismos aun desconocidos por lo que otras regiones fuera del homeodominio podrían estar implicadas en este tipo de regulación. El análisis de las secuencias aminoacídicas adyacentes al homeodominio de diferentes homeoproteínas han revelado que existe una región altamente conservada encontrada a una distancia variable río arriba del homeodominio, llamado motivo YPWM el cual no presenta interacción con el DNA pero interactúa con cofactores que regulan la especificidad de las homeoproteínas. Inicialmente se propuso que la heterodimerización del cofactor Extradenticle con diferentes homeoproteínas abolía su actividad represora intrínseca que presentan cuando se unen al DNA como monómeros. Sin embargo, estudios recientes demostraron que el heterodímero de Exd y Homothorax presentan interacción con la homeoproteína Ultrabithorax para la represión del gen blanco distales lo que indica que estos heterodímeros pueden actuar como represores.

2. HIPÓTESIS

La homeoproteína Antennapedia es un potente activador transcripcional que contiene dominios de unión a co-activadores y co-represores donde el tetrapéptido YPWM muestra actividad represora transcripcional en cultivo celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en Antennapedia y en el contexto de la proteína transactivadora GAL4, así como la purificación de Antp, GAL4 y sus mutantes en YPWM para el análisis de interacción al DNA.

3.2 Objetivos particulares

1. Construcción de los plásmidos recombinantes pPACTGAL4-AAAA y pNPACAntp Δ HD
2. Cotransfección de los plásmidos productores y reporteros pGL2 5X GAL4 promoter y pF11CAT
3. Análisis en cultivo celular del efecto del tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional de Antp así como de la fusión de YPWM en GAL4
4. Construcción de los plásmidos recombinantes pMALcAntp, Antp^{AAAA}, Antp Δ HD y pGEX-GAL4-YPWM y GAL4-AAAA
5. Expresión y purificación de las proteínas Antp, Antp^{AAAA}, Antp Δ HD, GAL4, GAL4^{YPWM} y GAL4^{AAAA} en un sistema bacteriano
6. Análisis de la actividad funcional de las proteínas Antp, GAL4 y sus mutantes en YPWM mediante ensayos de interacción con el DNA.

4. IMPORTANCIA

Los genes Hox codifican a factores transcripcionales que regulan la expresión génica durante el desarrollo embrionario y en numerosos procesos celulares en el organismo adulto como división celular, adhesión y migración celular y apoptosis. Las homeoproteínas Hox presentan estructuras similares como el homeodominio altamente conservado y reconocen secuencias de DNA prácticamente idénticas por lo que es importante estudiar el mecanismo molecular a través del cual se presenta esta amplia diversidad funcional. La presente propuesta esta basada en que la mayoría de las homeoproteínas contienen dominios como el tetrapéptido YPWM que modulan la activación-represión de genes blanco en una forma dinámica que permite la especificidad funcional de las proteínas Hox.

5. ANTECEDENTES

5.1 Genes homeóticos

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha sido un modelo clave para determinar los mecanismos del control genético del Desarrollo que ha permitido el estudio de genes importantes en el control del desarrollo, cuya función específica es la de determinar el patrón corporal de diversos organismos. La combinación de la genética clásica y la genética molecular han demostrado en *D. melanogaster* como actúan estos genes específicos en la determinación del plan corporal así como sus homólogos en vertebrados.

Desde inicios del siglo pasado el grupo de H. Morgan analizó en *D. melanogaster* un tipo de mutaciones que presentan la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo (García-Bellido, 1977). Estas mutaciones fueron denominadas mutaciones homeóticas en base al término “Homeosis” descrito por William Bateson en 1894 que describe el remplazamiento de una estructura del cuerpo por otra homóloga. El primer mutante homeótico referido en *Drosophila* fue Bithorax descrito por Calvin Bridges en 1919 con una transformación del tercer segmento torácico hacia el segundo donde los halterios son sustituidos por un segundo par de alas (Figura 1). Posteriormente, se describió la mutación homeótica Antennapedia (Antp) que presenta la sustitución de las antenas por un par de patas (LeCalvez *et al.*, 1984).

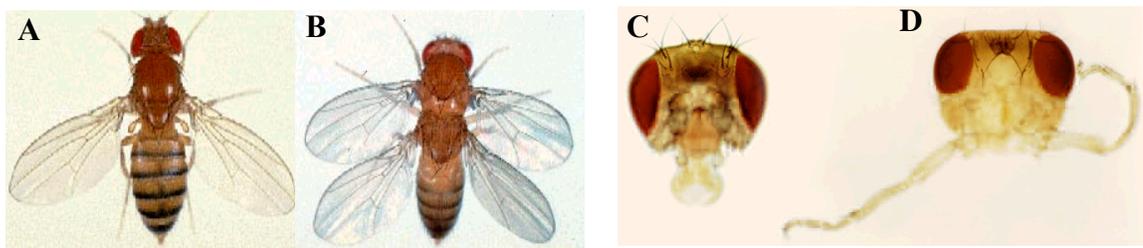


Figura 1. Mutaciones homeóticas Ultrabithorax y Antennapedia en *D. melanogaster*. A) La mosca *Drosophila melanogaster* tipo silvestre presenta un par de alas en el segundo segmento torácico (T2) y halterios en el tercer segmento torácico (T3) y B) una triple mutación en el gen *Ultrabithorax* suprime su función en T3 y causa la transformación de la identidad T3→T2 lo que ocasiona la aparición de un par extra de alas. C) La mosca normal presenta un par de antenas normales y D) en la mutante *Antennapedia* las antenas han sido transformadas en un par de patas debido a la expresión ectópica de la proteína *Antennapedia*.

Edward Lewis en 1978 demostró que la identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca son determinados por los genes que conforman el complejo Bithórax (BX-C), mientras que la identidad de los dos primeros segmentos torácicos y los segmentos de la cabeza son el resultado de la expresión de los genes del complejo Antennapedia (ANT-C; Figura 2). El complejo ANT-C se compone de los genes homeóticos Labial (Lab), Proboscipedia (Pb), Deformed (Dfd), Sex-combs-reduced (Scr) y Antennapedia. El complejo BX-C incluye los genes Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (AbdA) y Abdominal B (AbdB) (Lewis, 1978).

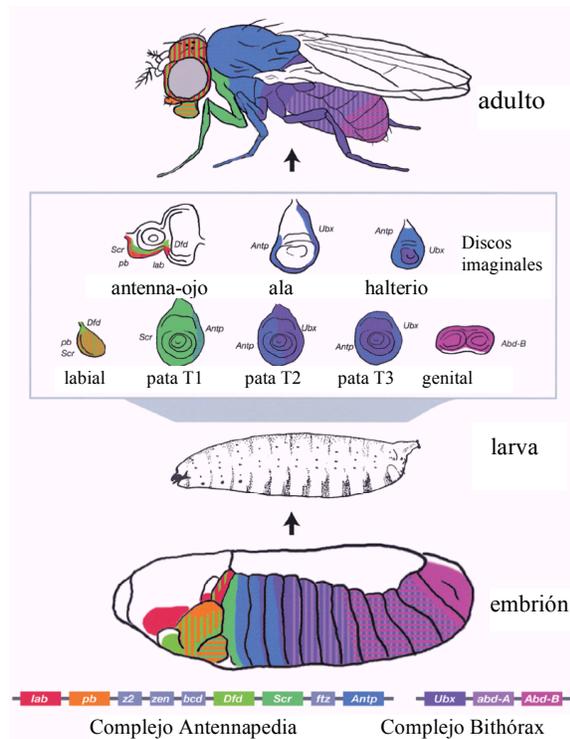


Figura 2. Los genes homeóticos regulan la identidad de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior en *Drosophila*. El color representa el segmento en donde se expresan cada uno de los genes homeóticos durante el desarrollo embrionario y en los discos imaginarios en el estadio larvario (a partir de donde se desarrollan los apéndices). Nótese que la disposición en el cromosoma de los genes homeóticos es el mismo orden que las partes del cuerpo que definen.

El uso de la tecnología del DNA recombinante permitió aislar los complejos Bithórax (Bender *et al.*, 1983) y Antennapedia (Garber *et al.*, 1983) en *Drosophila*. Estos experimentos mostraron hibridaciones cruzadas que se debieron a la presencia de regiones homólogas entre los genes Antennapedia, fushi tarazu y Ultrabithorax (Kuroiwa *et al.*, 1984), esta región de homología fue mapeada y secuenciada permitiendo el descubrimiento de un segmento de DNA altamente conservado de 180 pares de bases (pb) que fue denominado “homeobox” porque se encuentra en los genes homeóticos y codifica para una región de 60 aminoácidos denominado homeodominio (Gehring *et al.*, 1987). Esta región fue usada posteriormente como sonda o rastreador molecular para detectar secuencias homólogas en otros organismos como levaduras y vertebrados superiores, incluyendo al humano (McGinnis *et al.*, 1984).

Interesantemente, la organización de los genes homeóticos es colinear con su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo, de tal manera que se expresa en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran en el cromosoma, fenómeno denominado Colinearidad en la expresión (Lewis, 1963; Duboule y Dolle, 1989). El alto grado de similitud en la secuencia de los genes homeóticos agrupados y su distribución co-lineal confirma el alto grado de conservación evolutiva de los homeodominios (Gehring *et al.*, 1994).

Durante la última década, varios cientos de genes homeóticos (Hox) han sido aislados de organismos tan diversos que van desde las levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo el hombre (Sheperd *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993; Wysocka *et al.*, 1989; Holland *et al.*, 1992; Acampora *et al.*, 1989). Una de las características más importantes de los genes *Hox* es que estos siempre se encuentran agrupados en el genoma de diferentes especies de animales. Las especies de invertebrados analizadas contienen un solo grupo de genes *Hox*, mientras que en vertebrados varían en número: se han identificado cuatro en mamíferos y siete grupos en diferentes peces (Figura 3; Meyer y Schartl, 1999). Sin embargo, la familia de los genes *Hox* ha mantenido esta organización en grupos en el genoma durante cientos de millones de años de evolución a través de diversas rondas de duplicación genética, lo que refleja su importancia en el desarrollo de todos los organismos (Patel y Prince, 2000).

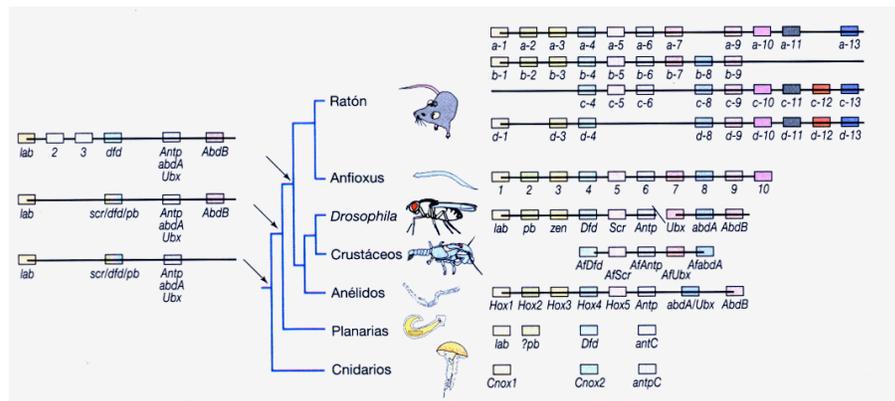


Figura 3. Evolución de los genes *Hox*. Árbol filogenético que muestra la evolución de los genes *Hox* en diferentes filums. A la derecha se muestran los genes *Hox* encontrados en cada uno de los taxones del árbol filogenético, los genes homólogos están alineados verticalmente y los que se muestran a la izquierda señalan aquellos que se encontraban presentes en los puntos de ramificación antes de la duplicación y divergencia. Tomado de Meyer y Schartl, 1999.

Dada la naturaleza compleja de la morfogénesis, se ha propuesto que los genes *Hox* actúan como genes maestros en el control de la identidad celular así como en la regulación de la división celular, adhesión y migración celular, diferenciación morfológica y apoptosis además de su importancia durante el desarrollo embrionario (Figura 4; Ulijaszek *et al.*, 1998; Svingen *et al.*, 2006). Recientemente, se han identificado numerosos genes blancos de los genes *Hox* que presentan una amplia variedad de funciones en el organismo adulto (Tabla 1; Svingen *et al.*, 2006). Se estima que el número de genes blanco regulados por homeoproteínas en un tejido/embrión en

particular debe ser de al menos un ciento en *Drosophila* (Mastick *et al.*, 1995) o más en mayor número en vertebrados (Zhao y Potter, 2001).

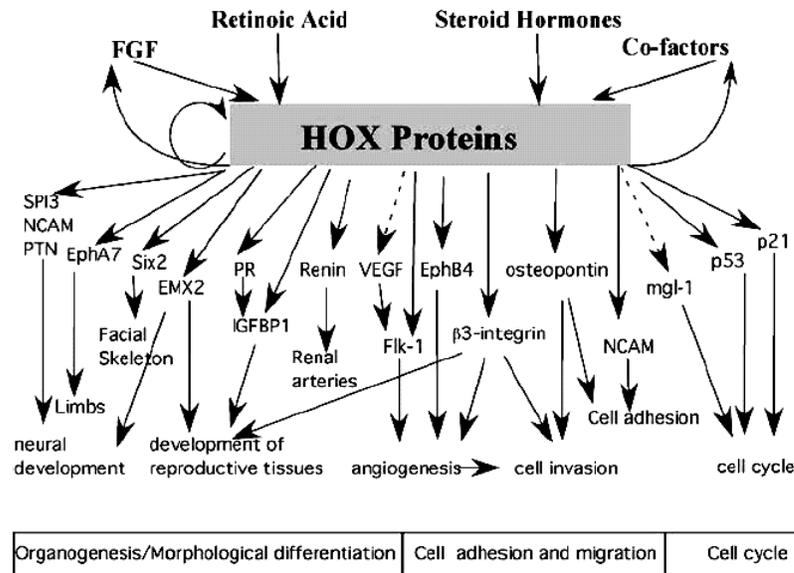


Figura 4. Participación de los genes Hox en diversos procesos celulares. Se han identificado numerosos genes blanco de los genes Hox que participan en distintos procesos celulares como en el desarrollo neural, desarrollo del sistema reproductivo, angiogenesis, invasión celular, adhesión celular, ciclo celular y su propia autorregulación. Tomado de Svingen y Tonissen, 2006.

Tabla I
Lista de genes blanco regulados por genes Hox en mamíferos

Hox protein	+/-	Target	Species	Reference
Hoxa2	-	Six2	Mouse	Kutejova <i>et al</i> (2005)
Hoxa5	+	p53	Mouse	Raman <i>et al</i> (2000a)
HOXA5			Human	
HOXA5	+	Progesterone receptor	Human	Raman <i>et al</i> (2000b)
HOXA5	+	Pleiotrophin	Human	Chen <i>et al</i> (2005)
HOXA5	+	IGFBP-1	Human	Foucher <i>et al</i> (2002); Gao <i>et al</i> (2002)
HOXA10				
HOXB4				
Hoxa9	-	Osteopontin	Mouse	Shi <i>et al</i> (1999, 2001)
Hoxc8				
HOXA9	+	EphB4	Human	Bruhl <i>et al</i> (2004)
HOXA10	+	p21	Human	Bromleigh and Freedman (2000)
HOXA10	+	β 3-Integrin	Human	Daftary <i>et al</i> (2002)
HOXA10	-	EMX2	Human	Troy <i>et al</i> (2003)
Hoxa10	+	IGFBP-1	Baboon	Kim <i>et al</i> (2003)
Hoxa13, Hoxd13	+	EphA7	Mouse	Salsi and Zappavigna (2006)
HOXB1	+	COL5A2	Human	Penkov <i>et al</i> (2000)
Hoxb3	+	TTF-1	Rat	Guazzi <i>et al</i> (1994)
Hoxb5	+	SPI3	Mouse	Safaei (1997)
Hoxb5	+	Flk1	Mouse	Wu <i>et al</i> (2003)
HOXB7	+	BFGF	Human	Carè <i>et al</i> (1996)
Hoxb8	-	N-CAM	Mouse	Jones <i>et al</i> (1992)
Hoxb9	+	N-CAM	Mouse	Jones <i>et al</i> (1992)
Hoxc8	?	mgl-1	Mouse	Tomotsune <i>et al</i> (1993)
Hoxc13	-	Keratins	Mouse	Tkatchenko <i>et al</i> (2001)
Hoxd10, b6, b7, b9, c8	+	Renin	Mouse	Pan <i>et al</i> (2004)

5.2 Antennapedia

En 1948, LeCalvez describió la mutación homeótica Antennapedia en *D. melanogaster*, esta mutante dominante transformaba las antenas en un par de patas del segundo segmento torácico (Figura 1). Otros fenotipos que se presentan son la reducción de los ojos, transformación de la identidad de la región dorsal de la cabeza en tipo tórax y ocasionalmente los palpos maxilares no se alcanzan a desarrollar (Duncan, 1982). El estudio de varias mutantes de este tipo mostró que una inversión cromosomal deja en la mayoría de los casos al gen completo Antp bajo la regulación de otra región de control (enhancer).

La proteína Antennapedia actúa principalmente sobre los segmentos mesotorácicos. Struhl y cols. en 1981 realizaron experimentos en clonas de tejido mesotorácico de las patas que eran deficientes para Antp observando que desde la embriogénesis temprana el tejido se transformó en antena. En embriones mutantes que carecen del gen Antp los segmentos mesotorácicos se desarrollan como el primer segmento (protórax) y en clonas mutantes de adultos (carecen de Antp) las células de la pata se diferencian como estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981).

La inserción del DNA complementario de Antp en un vector de expresión bajo la regulación de un promotor sensible a choques térmicos y su posterior introducción en la línea germinal de *Drosophila* para la generación de moscas transgénicas indujo la transformación de antena por pata como resultado de la sobre-expresión ectópica de la proteína Antennapedia. Este experimento constituyó el primer experimento exitoso del re-diseño del cuerpo de un organismo (Schneuwly *et al.*, 1987).

La clonación del complejo Antennapedia permitió determinar el locus del gen Antp que se extiende en una región de 100 Kilopares de bases (Kb) del cromosoma 3 y contiene dos promotores, 8 exones, siete intrones tan grandes como 60 Kb y dos regiones de procesamiento-terminación (Figura 5; Schneuwly *et al.*, 1986). El RNAm de Antp contiene dos diferentes sitios de splicing en la región codificante (Stroehrer *et al.*, 1988) y las proteínas resultantes presentan cuatro sitios de fosforilación (Jaffe *et al.*, 1997).

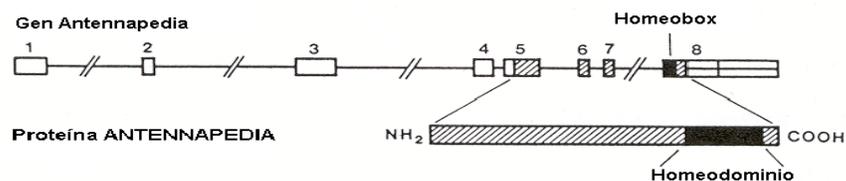


Figura 5. Organización estructural del gen Antennapedia. Los exones 1-8 están separados por siete intrones. El homeobox está localizado en el exón 8, por lo que el homeodominio se localiza cerca del extremo carboxilo terminal (COOH) de la proteína Antp.

Los homeodominios (HD) analizados hasta la fecha mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución y Cristalografía de Rayos X muestran homologías estructurales, conteniendo tres-cuatro α -hélices bien definidas donde la cuarta hélice es una continuación de la tercera y un brazo amino-terminal flexible que no asume una estructura definida en solución es decir presenta una alta flexibilidad (Gehring *et al.*, 1990). El análisis de los complejos Antp-DNA mostró que los contactos principales se localizan en la hélice de reconocimiento (3/4) que se une al surco mayor del DNA y el extremo N-terminal se une a bases específicas del surco menor del DNA (Figura 6; Otting *et al.*, 1990). La mayoría de estos ensayos de unión al DNA usaron las secuencias “TAAT” en la hebra líder así como las “ATTA” en la hebra complementaria como sitios de unión al homeodominio (Kalions y O’Farrell, 1993).

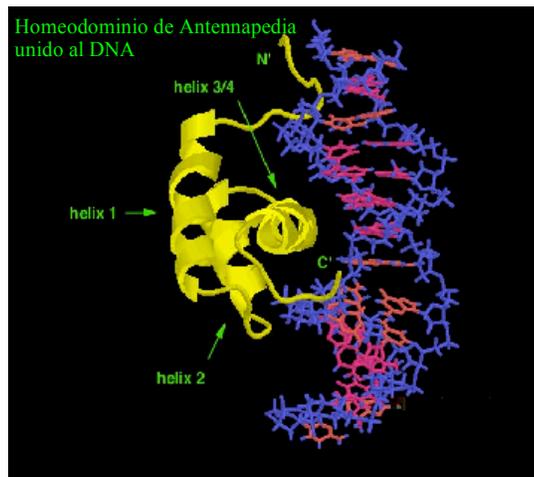


Figura 6. Interacción del homeodominio de Antennapedia con el DNA. Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3/4 con el surco mayor del DNA y el extremo amino terminal del homeodominio con el surco menor. Tomado de Qian y cols, 1992.

El análisis de la estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear del homeodominio de Antp con una deleción en el brazo N-terminal mostró que la estructura de este homeodominio truncado permanece intacta. Sin embargo, la afinidad de unión al DNA de este homeodominio truncado muestra una disminución que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal de Antp (Qian *et al.*, 1994). Experimentos genéticos realizados *in vivo* en la mosca *D. melanogaster* mediante sustitución recíproca de cuatro residuos en el extremo amino-terminal entre Antp y Sex comb reduced (Scr), modificaron la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993). Estos experimentos demuestran la importancia funcional de estos residuos y sugieren fuertemente que el extremo amino-terminal de los homeodominios está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de los mismos.

5.3 Tetrapéptido “YPWM”

Comparaciones en la secuencia de aminoácidos de las diferentes homeoproteínas, mostraron que además del homeodominio, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina) es otra región peptídica altamente conservada. Este motivo se encuentra localizado río arriba de los genes homeóticos y se conecta al HD mediante el brazo amino terminal flexible (Figura 7; Burglin, 1994). El número de aminoácidos que separan este tetrapéptido de la región N-terminal flexible es variable en las distintas homeoproteínas. Estudios realizados por Qian y cols. demostraron que el extremo amino-terminal de la homeoproteína Antp, formado por los residuos 1 a 6 de su HD, es flexible en solución y que al unirse al DNA establece contacto con el surco menor (Qian *et al.*, 1989).

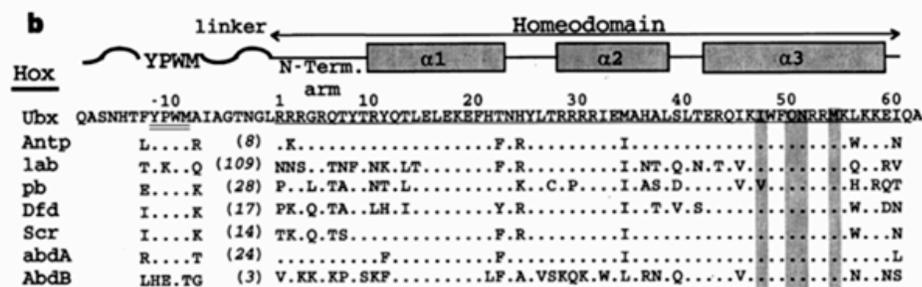


Figura 7. Alineamiento y comparación aminoácidica de homeoproteínas en *Drosophila*. El homeodominio se muestra del 1 a 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aminoácidos entre YPWM y el homeodominio se muestra en los paréntesis. Tomado de Passner y cols, 1999.

El estudio sobre la evolución del dominio YPWM en las homeoproteínas Fushi tarazu (Ftz) de *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Schistocherca americana* reveló su importancia funcional. La proteína Ftz de *Drosophila melanogaster* que carece de un motivo YPWM es incapaz de activar a Teashirt (Tsh), sin embargo Ftz de *Trilobium castaneum* que contiene YPWM si activa a Tsh (Löhr *et al.*, 2001). Además, la expresión ectópica de la proteína Ftz de *Drosophila* no induce una transformación homeótica al contrario de Ftz de *T. castaneum* y *S. americana* que si transforman la antena en pata. En base a estas observaciones se postuló que la función de Ftz evolucionó de un gen homeótico a un gen de segmentación, esto probablemente sea debido a la pérdida del motivo YPWM y la ganancia del dominio LXXLL (Alonso *et al.*, 2001 y Löhr *et al.*, 2001).

La mutagénesis del hexapéptido que contiene el motivo YPWM de HOXB8 en ratones reveló que la expresión de esta proteína mutante acarrea mutaciones homeóticas similares a aquellas observadas cuando había una pérdida de función de los genes Hoxa7, HOXB7 y HOXB9. Esto revela que la mutación en el hexapéptido esta afectando la función de otros genes que se encuentran en el locus HOXB. Por lo que se postuló que este motivo es necesario para la interacción con cofactores que seleccionan

los DNA blanco naturales debido a que esta mutación interfirió con la función de otras homeoproteínas al unirse a su genes blanco (Medina-Martínez *et al.*, 2004).

En nuestro laboratorio para analizar el papel funcional de esta región altamente conservada en Antp se realizó un análisis mutacional mediante sustituciones de alanina en el tetrapéptido YPWM y sus regiones flanqueantes en embriones de *D. melanogaster*. La expresión ectópica de Antp silvestre y las mutantes en los cuatros aminoácidos flanqueantes a YPWM produjo la transformación homeótica esperada con una pérdida total de la involución de la cabeza y una transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2). La mutación en el motivo YPWM en Antp mostró un fenotipo larvario normal, y fenotipos con leves transformaciones homéoticas. Estos resultados sugieren que el motivo YPWM es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp (Resendéz-Pérez, en preparación).

El análisis de la expresión de Antp ectópica en embriones de *D. melanogaster* activó a los genes blanco Tsh y las secuencias reguladoras Fkh[250^{con}]-lacZ en regiones anteriores de la cabeza y reprimió drásticamente la expresión de Scr. Interesantemente, la proteína mutante en YPWM (Antp^{AAAA}) fue incapaz de activar a Tsh y al elemento Fkh y de reprimir la expresión de Scr. Lo anterior es altamente relevante ya que la actividad funcional de los diferentes genes blanco puede ser regulada por interacciones proteína-proteína a través del tetrapéptido YPWM permitiendo la selección de los genes blanco de Antp que permiten el desarrollo del tórax y reprimen los genes de la cabeza en *D. melanogaster*. Estos resultados permiten concluir que el tetrapéptido YPWM de Antp es indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco Tsh, Fkh y Scr, mediante un mecanismo de activación-represión con la interacción con cofactores en una forma dinámica en los diferentes genes blanco para permitir la especificidad funcional de Antp durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* (Canales *et al.*, en preparación).

5.3.1 Interacción proteína-proteína

Algunas proteínas Hox, como Ultrabithorax, tienen baja especificidad de unión al DNA por sí mismas pero incrementan su afinidad y especificidad cuando se unen con otra homeoproteína (Extradenticle o PBX en mamíferos). El homeodominio de la proteína Extradenticle interacciona de forma selectiva con las proteínas Ultrabithorax y abdominal-A (Johnson *et al.*, 1995). La fuerte interacción de Exd con Ultrabithorax requiere únicamente del homeodominio de Ultrabithorax y una porción del extremo amino-terminal que incluye el motivo YPWM (Johnson *et al.*, 1995). Passner y cols en 1999 realizaron estudios mediante cristalografía de Rayos X con los homeodominios Ultrabithorax y Extradenticle. Estos resultados muestran que estas homeoproteínas se unen en caras opuestas del DNA y sus hélices de reconocimiento se conectan entre ellas. Esta interacción proteína-proteína está dada por el motivo peptídico YPWM de Ultrabithorax que se inserta en una hendidura hidrofóbica formada en la superficie del homeodominio de Extradenticle (Figura 8).

La represión observada del gen Labial cuando se sobre-expresó Ubx con el tetrapéptido YPWM mutado es igual que Ubx silvestre, sin embargo esta represión fue revertida cuando se expresó Ubx ectópicamente junto con Exd y Homothorax (Hth), y no así cuando se expresó Ubx con el tetrapéptido mutado. Lo que indica que el motivo YPWM no es necesario para esta represión. Sin embargo, la sobre-expresión de los cofactores Exd y Hth evitó la actividad represora de Ubx donde el tetrapéptido YPWM está implicado en esta interacción (Sprecher *et al.*, 2004).

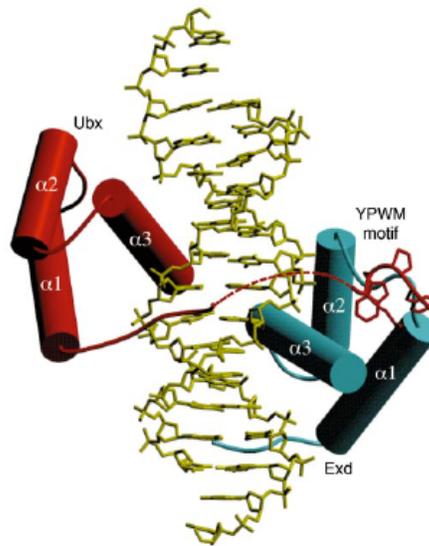


Figura 8. Interacción de Ultrabithorax y Extradenticle. El diagrama muestra que los homeodominios Ubx (rojo) y Exd (azul) se unen de forma conjunta en caras opuestas del DNA (amarillo). La línea punteada roja representa el puente flexible entre el homeodominio de Ubx y el motivo YPWM. Tomado de Passner y cols, 1999.

Cuando se analizó la importancia del tetrapéptido YPWM de Antp en transformaciones homeóticas en el estadio larvario se demostró que este dominio es necesario en la transformación ojo-ala y en menor grado en la transformación antena-pata. Utilizando el sistema de levadura de dos híbridos, se identificó una nueva proteína que interactúa con Antp a través del motivo YPWM: la proteína TAF_{II}155 asociada a la proteína de unión a la caja TATA. Ensayos de ganancia y pérdida de función demostraron que TAF_{II}155 interactúa con Antp en la transformación ojo-ala (Prince *et al.*, En preparación).

Las proteínas HOX dependen de los cofactores de la familia PBX para su unión específica al DNA. Dos regiones implicadas en las interacciones HOX/PBX son el motivo YPWM encontrado en el extremo amino-terminal del homeodominio HOX y el dominio GKFQ encontrado en el extremo carboxilo-terminal del homeodominio de PBX. Green y cols en 1998 usando derivados de la oncoproteína E2-PBX encontraron que el dominio GKFQ no es esencial para la interacción cooperativa con HOXA1 pero contribuye a la estabilidad del complejo, mientras que el motivo YPWM es estrictamente requerido para estas interacciones cooperativas *in vitro* e *in vivo*.

Estudios realizados en otras homeoproteínas han señalado que el tetrapéptido YPWM esta involucrado en interacciones proteína-proteína como es el caso del heterodímero Ubx y el cofactor Exd en donde se ha demostrado que el mayor contacto se realiza a través del tetrapéptido (Johnson *et al.*, 1995, Passner *et al.*, 1999). Análisis *in vitro* mediante el uso de anticuerpo dirigidos contra el motivo YPWM han confirmado que este es necesario para la cooperación de los homeoproteínas con el cofactor de PBX (Shanmugam *et al.*, 1997). Estudios *in vitro* han mostrado que la formación del heterodímero entre la homeoproteína HOXB1 y el cofactor PBX esta mediado por la interacción con el hexapéptido “-Y/F-P-W-M/R-” de HoxB1 (Pipper *et al.*, 1999). Sin embargo, las interacciones entre PBX/HOX no se dan únicamente a través del tetrapéptido YPWM como se observa en el heterodímero PBX-HOXB1 en donde la cuarta hélice que se encuentra en el extremo C-terminal de PBX incrementa la afinidad al DNA y a la proteína HOXB1 (Sprules. *et al.*, 2000).

5.3.2 Unión al DNA

La proximidad del motivo YPWM al sitio de unión del HD al DNA sugería la posibilidad de que este tetrapéptido pudiera estar involucrado en la regulación de unión al DNA. Estudios mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución realizados por Qian y cols permitieron determinar la estructura secundaria de un polipéptido elongado que posee el motivo conservado -Tyr-Pro-Trp-Met- (YPWM) río arriba del brazo amino-terminal de Antp. Estos resultados de la estructura de la proteína, así como el análisis de unión al DNA mostraron que el motivo YPWM no presenta interacción con el DNA y constituye un puente flexible de conexión entre el homeodominio y la proteína completa y sugiere que este motivo participa en la especificidad de unión de esta proteína homeótica al DNA (Qian *et al.*, 1992).

Las interacciones de las homeoproteínas y Extradenticle (Exd) son mediadas precisamente por un hexapéptido que contiene el motivo YPWM. Chan y cols en 1996 demostraron que la proteína LABIAL (Lab) con una mutación en el hexapéptido se unía al DNA en ausencia de Exd e incrementaba la habilidad para activar la transcripción *in vivo*. Estos resultados sugieren que el hexapéptido de la proteína Lab inhibe la unión al DNA y que Exd puede inducir un cambio conformacional en Lab promoviendo así, interacciones altamente específicas con el DNA.

El análisis del motivo YPWM de Abd-A en la transformación homeótica de los segmentos en el desarrollo larvario reveló que este motivo no es necesario en esta transformación. Además, la proteína mutante fue capaz de formar complejos diméricos en el DNA con Exd, lo que indica que existen otras regiones en Abd-A capaces de reclutar a esta proteína. Asimismo, la mutación en el tetrapéptido no afectó la selección de unión al DNA, como se observó en la unión a secuencias blanco *in vitro*, y el control de genes blanco *in vivo*. Sin embargo, la mutación en este tetrapéptido si modifico la actividad reguladora de Abd-A en el gen decapentaplegic (dpp), que es independiente de Exd y de acuerdo a estos resultados se propuso un modelo en donde el tetrapéptido tiene un papel dual; reprimir la función de la región de activación, rica en glutaminas, y la de promover un dominio de represión aun no identificado (Merabet *et al.*, 2003).

Estudios realizados por Sprules y cols en el año 2000 mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear determinaron que el homeodominio de PBX hace contacto con el sitio 5-'TGAT-3' del DNA y con el tetrapéptido YPWM de la proteína HOX. Comparaciones de análisis de unión al DNA *in vitro* usando 5 péptidos YPWM derivados de diferentes proteínas HOX mostraron que la unión a PBX esta localizada en el mismo sitio 5-'TGAT-3' del DNA, diferenciándose únicamente en la capacidad de unión (Sprules *et al.*, 2000).

El análisis del complejo ternario entre la homeoproteína HOXA9, el cofactor PBX y una secuencia consenso de DNA reveló que el hexapéptido adquiría una conformación alterada comparada con los complejos anteriormente analizados. Además, se describen interacciones inespecíficas y una alteración en la conformación del DNA, lo cual parece indicar una mayor afinidad de unión al DNA por parte de estos complejos (La Ronde-LeBlanc *et al.*, 2003).

5.4 Represión Transcripcional

En la actualidad se conocen otros tetrapéptidos altamente conservados que llevan a cabo funciones biológicas importantes y que presentan semejanza con el motivo YPWM. Un ejemplo es el motivo WRPW encontrado en las proteínas Hairy-related que regulan diferentes procesos en el desarrollo de *Drosophila* incluyendo la segmentación y neurogenesis, estas proteínas se unen al DNA en sitios específicos dependiendo de la presencia del dominio de unión de la proteína bHLH represora específica y el motivo WRPW en el carboxilo terminal. Jiménez y cols en 1996 analizaron la represión transcripcional de las proteínas Hairy y Runt durante la segmentación en *Drosophila* donde muestran que Hairy actúa normalmente como un represor de unión al promotor de Fushi tarazu, Runt y Even-skipped. Se ha demostrado que algunos represores que participan en la segmentación como Krüppel y Knirps son capaces de reprimir a activadores localizados río arriba a una distancia corta de 50-100 pb, este modo de represión permite que múltiples enhancers ó potenciadores trabajen de forma independiente sobre un promotor. Barolo y Levine en 1997 presentaron evidencia de que Hairy actúa como un potente represor a distancias grandes para bloquear múltiples enhancers. Fisher y cols en 1996 demostraron que el motivo WRPW es el dominio de represión transcripcional responsable de conferir actividad represora a las proteínas Hairy-related y otras proteínas heterólogas como la proteína transactivadora de levaduras GAL4. Además, previamente se demostró que este motivo es necesario para su interacción con la homeoproteína Groucho (Paraoush *et al.*, 1994).

El co-represor Groucho modula la regulación transcripcional negativa en asociación con varias proteínas que se unen al DNA en diferentes etapas del desarrollo. Por otro lado, Goldstein y cols en 1999 identificaron un dominio de represión funcional en Huckebein, el cual contiene el tetrapéptido FRPW, similar al motivo WRPW de las proteínas represoras Hairy-related o al motivo YPWM de la proteína Antp. Mutaciones en el tetrapéptido FRPW eliminaron la unión de Groucho y la actividad represora *in*

vivo, lo que indica que la unión de Groucho por medio del motivo FRPW es necesario para la actividad represora de Hucklebein (Goldstein *et al.*, 1999).

Se han propuesto diferentes modelos para los mecanismos de represión transcripcional por proteínas de unión al DNA en eucariotes. Primeramente, algunos represores compiten con activadores transcripcionales específicos por un sitio de unión en el DNA. A este modelo se le conoce como de competencia por ejemplo la proteína Engrailed que compete con el activador Fushi-tarazu por un sitio común de unión (Ohkuma *et al.*, 1990; Descombes-Schibler, 1991; Foulkes *et al.*, 1991; Jaynes *et al.*, 1988). Segundo, ciertos represores interactúan específicamente con activadores y ambos se unen al DNA pero el activador no es capaz de establecer ciertas interacciones requeridas para llevar a cabo su función, por ejemplo la proteína de levadura MAT α 2. Este tipo de represión se denomina quenching (Keler *et al.*, 1988 y 1992). Tercero, algunos represores pueden interferir directamente con la formación o actividad de la maquinaria general transcripcional al unirse a la secuencia de DNA e interactuar con los factores transcripcionales o co-represores, este mecanismo se conoce como represión directa. La represión directa se clasifica a su vez en tres tipos: interacción con la RNA polimerasa II, interacción con TBP e interacción con los factores generales transcripcionales (GTFs).

La proteína Srb10 actúa como un represor transcripcional de la transcripción de genes involucrados en especificar el tipo celular, meiosis y metabolismo de carbohidratos mediante fosforilación del dominio CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II previo a la asociación de la holoenzima con el promotor de DNA inhibiendo así la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (Hengartner *et al.*, 1998). Experimentos genéticos y bioquímicos demostraron una interacción de la proteína Srb10 con el represor de levaduras Tup1 el cual pertenece a la familia Groucho y esta interacción incrementa la actividad de fosforilación por Srb10 (Zaman *et al.*, 2001).

Ensayos de expresión en cultivo celular para estudiar la represión transcripcional de la homeoproteína Even-skipped (Eve) que participa en el control de la segmentación durante el desarrollo embrionario temprano mostraron que Eve reprime los promotores con sitios de unión para Eve mediante interacción con TBP y esta interacción anula la unión del complejo TFIID a la caja TATA evitando el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción así como promotores que son activados por diferentes clases de proteínas activadoras (Li y Manley, 1998). La fosforilación de la proteína Eve bloquea la interacción con el factor transcripcional TBP resultando en una pérdida de represión transcripcional lo cual confirma el mecanismo de represión (Li y Manley, 1999). Posteriormente, el análisis de mutantes Eve permitió identificar un dominio de represión transcripcional independiente del dominio de unión al DNA el cual presenta un alto porcentaje de Prolina y residuos hidrofóbicos (Kyuhung y Manley, 1992).

La proteína Krüppel en monómeros activa la transcripción mediante interacción con el factor general transcripcional TFIIB y en forma dimerica se une a la subunidad β del factor transcripcional TFIIB inhibiendo la formación del complejo de preiniciación

de la transcripción (Sauer *et al.*, 1995). La fusión de una región α hélice que comprende los aminoácidos 62 a 92 de la proteína Krüppel a la proteína de unión al DNA LacI permitió identificar un dominio de represión transcripcional de 30 aminoácidos en el extremo N-terminal de Kr que comprende una región rica en Glutamina y Alaninas que presenta la interacción con componentes de la maquinaria transcripcional basal (Licht *et al.*, 1994).

Algunas proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina reprimen la transcripción mediante interacción con factores generales transcripcionales (GTFs). Un ejemplo es la proteína MeCP2 que pertenece a las proteínas del grupo Polycomb (PcG) que son reclutadas a promotores específicos mediante interacción con el factor transcripcional TFIIB u otros GTFs para inhibir la transcripción basal (Kaludov *et al.*, 2000).

Un aspecto importante sobre la especificidad transcripcional de las homeoproteínas es su habilidad para actuar como represores ó activadores en un tejido específico a través de mecanismos aun desconocidos por lo que se han postulado algunos modelos. Pinsonneault en 1997 propuso un modelo en el cual la heterodimerización de la proteína Exd con las proteínas Hox abolía su actividad represora intrínseca que presentan cuando se unen al DNA como monómeros. Recientemente, estudios realizados por Gebelein y cols en 2002 demostraron que el heterodímero de Extradenticle y Homothorax presentan interacción con la homeoproteína Ultrabithorax para la represión del gen distales lo que indica que los heterodímeros pueden actuar como complejos represores en la expresión de los genes blanco. El descubrimiento de la interacción de la proteína Hox con la proteína de unión a CREB (CBP) en la regulación de la actividad acetil-transferasa de histonas indica que las homeoproteínas pueden regular la expresión génica mediante remodelación de la cromatina sin necesidad de unirse al DNA (Shen y cols., 2001).

La homeoproteína murina “homeobox msh-like 1” (Msx-1) presenta un papel importante en la regulación de la diferenciación y proliferación de ciertas poblaciones celulares durante la embriogénesis. Msx-1 es un potente represor transcripcional *in vivo* e *in vitro* y esta represión ocurre en la ausencia de sitios de unión al DNA por parte del homeodominio de Msx-1. Además, diferentes dominios con un alto porcentaje de alanina, glicina y prolina localizados en el extremo C-terminal y N-terminal son los responsables de esta represión. Estos dominios, al igual que la proteína Msx-1, retienen su función represora cuando se fusionan a una proteína heteróloga de unión al DNA. Además, se demostró que Msx-1 reprime la transcripción *in vitro* en un sistema reconstituido e interactúa el complejo transcripcional basal TBP-TFIIA-TFIIB en ensayos de retardación en gel (Catron *et al.*, 1995).

En nuestro laboratorio se realizó la adición del dominio de represión WRPW en el extremo C-terminal de Antp para analizar el efecto de esta fusión en la actividad transactivadora de esta homeoproteína en células Schneider de *D. melanogaster*. La actividad transcripcional de la proteína de fusión Antp-WRPW mostró una reducción de la transcripción de un 35% mientras que Antp mutada en el tetrapéptido YPWM fusionada al dominio WRPW no mostró reducción en la actividad transactivadora. Estos resultados sugieren que la ausencia del tetrapéptido no permite la interacción de Antp

con probables co-factores resultando en una mayor transactivación génica que no permite la actividad represora del dominio WRPW (Villanueva-Segura, 2004). Además, el análisis de transactivación de la fusión del tetrapéptido YPWM de Antp a la proteína transactivadora GAL4 sugiere que actúa como un dominio de represión transcripcional (Cárdenas-Chávez, 2003).

Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es analizar la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en *Antennapedia* y fusionada a la proteína heteróloga GAL4 en células Schneider de *D. melanogaster* así como su participación en la afinidad de unión al DNA para la selección de los genes blanco de Antp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis de la activación de la transcripción en cultivo celular

6.1.1 Construcción de los plásmidos recombinantes

6.1.1.1 Plásmido pNPACAntp Δ HD

El plásmido recombinante pNPACAntp Δ HD que dirige la expresión de la proteína Antp Δ HD en cultivo celular fue construido a partir de los DNAs plasmídicos pNPAC y pWTPAntp Δ HD obtenidos usando la técnica de Minipreparación previamente descrita. La preparación del vector se realizó a partir de la digestión del DNA plasmídico pNPAC con la enzima de restricción *Not* I. Por otra parte, la preparación del inserto correspondiente a la secuencia codificante a Antp Δ HD fue producto de la digestión del DNA plasmídico pWTPAntp Δ HD con la enzima *Not* I. Las reacciones de digestión (Tabla II) fueron incubadas a 37 °C por 4 horas para posteriormente ser visualizadas en electroforesis en agarosa al 0.7%.

Tabla II
Reacciones de digestión plasmídica con *Not* I

Componentes	Cantidad (μl)
H ₂ O mQ	22.4
Buffer3 10X NEB	4
<i>Not</i> I 10U/μl NEB	1.6
Plásmido pNPAC 0.8 μg/μl	12
Volumen final	40 μl

Componentes	Cantidad (μl)
H ₂ O mQ	22.4
Buffer3 10X NEB	4
<i>Not</i> I 10U/μl NEB	1.6
Plásmido pWTPAntp Δ HD 0.6 μg/μl	12
Volumen final	40 μl

Posteriormente, el vector pNPAC y el inserto codificante a Antp Δ HD fueron purificados mediante el uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). El procedimiento de purificación se basa principalmente en la unión del DNA a membranas de sílica en presencia de sales. Después de la

electroforesis, el fragmento de interés es recuperado del gel de agarosa y disuelto en un buffer de unión en presencia de tiocianato de guanidina y colocado en una columna con resina de silica para posteriormente realizar una serie de lavados y ciclos de centrifugación a 10,000xg para finalmente eluir el DNA unido a la resina en presencia de H₂O mQ.

La reacción de ligación a una relación molecular 1:8 del vector e inserto previamente purificados se describe en la Tabla III. La reacción de ligación fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se llevo a cabo la transformación, usando 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α calcio competente (Eficiencia= 1.08X10⁶ colonias/µg de DNA) y 4 µl de la reacción de ligación con su respectivo testigo negativo sin inserto. Las clonas resultantes de la transformación fueron sometidas a Minipreparación por Lisis alcalina para la extracción del DNA plasmídico el cual fue visualizado en electroforesis en agarosa al 0.8% y posteriormente caracterizado mediante digestión con las enzimas de restricción *Not* I, *EcoR* I, *Pst* I y *Sma* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

Tabla III
Reacción de ligación pNPAC-AntpΔHD

Componentes	Cantidad (µl)
H ₂ O mQ	11
Buffer 5X Invitrogen	4
Vector 10 ng/µl	1
Inserto 10 ng/µl	3
Ez. Ligasa Invitrogen 1 U/µl	1
Volumen final	20 µl

6.1.1.2 Plásmido pPACTGAL4-AAAA

El plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA dirige la expresión de la proteína heteróloga GAL4 fusionada a un bloque de cuatro Alaninas en cultivo celular. El DNA del plásmido pPACTGAL4 NS fue obtenido usando la técnica de Minipreparación por Lisis alcalina descrita por Birnboim y Dolly en 1979. El método de Lisis Alcalina se basa en la lisis de la células bacterianas con una solución que contiene Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM, luego se lleva a cabo la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH 0.2N y SDS 1% y finalmente se neutraliza el medio y al añadir Acetato de sodio 5M se produce la precipitación de gran parte de las proteínas y DNA cromosómico de la bacteria por lo que se forman agregados insolubles que permiten que el DNA plasmídico quede en el sobrenadante y se pueda realizar la purificación del plásmido mediante precipitación con Etanol 100%. La preparación del vector se realizó a partir de la digestión del DNA plasmídico

pPACTGAL4 NS con las enzimas de restricción *BamH* I y *Bgl* II como se describe en la Tabla IV.

Tabla IV
Reacción de digestión plasmídica con *BamH* I / *Bgl* II

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	136
Buffer3 10X NEB	20
BSA 100X NEB	2
<i>BamH</i> I 20U/ μ l NEB	6
<i>Bgl</i> II 10U/ μ l NEB	6
Plásmido 0.5 μ g/ μ l	30
Volumen final	200 μ l

Posteriormente, se tomaron 100 μ l (~7.5 μ g) de la reacción de digestión y se precipitaron con 2.5 volúmenes de Etanol 100% y 1/10 volumen de NaOAc 3M. Después, se incubó a -20°C por 1 hora, al término de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C y la pastilla resultante se lavó con 200 μ l de Etanol 70%, se eliminó el etanol y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderla en 90 μ l de H₂O mQ (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA resultante de la precipitación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar su integridad.

Para la preparación del inserto codificante a un bloque de cuatro alaninas más aminoácidos flanqueantes al motivo YPWM de Antennapedia, se diseñaron 2 oligonucleótidos sintéticos de 44 nucleótidos cada uno usando para ello la secuencia de Antennapedia (Antp) y el programa Oligo 4.0 (National Biosciences, Plymouth, M.M USA). Posteriormente, se enviaron sintetizar a la casa comercial Byo-shyntesis. Estos oligonucleótidos sintéticos se denominaron dcAAA5' y dcAAA3'.

El oligonucleótido dcAAA5' (**G ATC CCG TCT CCA CTG GCT GCC GCG GCG CGA AGT CAG TTT TAG A**) posee una T_m de 91.2° y un %GC de 61.36%, no presenta formación de dímeros y tiene una tendencia moderada ($^2G = -2.4$ kcal/mol) a formar una estructura secundaria.

El oligonucleótido dcAAA3' (**GA TCT CTA AAA CTG ACT TCG CGC CGC GGC AGC CAG TGG AGA CGG**) posee una T_m de 90.2° y un %GC de 61.36%, no presenta formación de dímeros y tiene una tendencia moderada ($^2G = -0.6$ kcal/mol) a formar una estructura secundaria.

Estos oligonucleótidos sintéticos dcAAA5' y dcAAA3' fueron alineados mediante el uso de un buffer salino y el uso de temperaturas decrecientes en un programa de PCR para la obtención del producto de doble cadena alineado (dcAAA5,3'). La reacción de alineamiento de los oligos contiene 5 μ g del oligo 5' (1 μ g/ μ l), 5 μ g del oligo 3' (1 μ g/ μ l), 6.6 μ l de Tris-HCl 1M, 5.2 μ l de MgCl₂ 0.025M, 0.6 μ l de DTT 1M, 0.26 μ l

de EDTA 0.5M pH 8.0 y 77.34 μ l de H₂O mQ. Esta reacción fue sometida a un programa de PCR en el termociclador (PCR Express, HYBAID) como se describe en la Tabla V.

Tabla V
Programa de alineamiento del producto de doble cadena dcAAA5,3'

A : 37 YADL	
Temperatura (°C)	Tiempo
94	5 min
65	10 min
55	1 min
37	10 min

Después del alineamiento se llevó a cabo la ligación del vector previamente precipitado con el producto del alineamiento dcAAA5,3', esta reacción fue incubada a 37°C por 10 minutos y posteriormente se llevo a cabo la transformación, usando para ello 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes (Eficiencia= 1.08 X 10⁶ colonias/ μ g de DNA) y 3 μ l de la reacción de ligación como se detalla en la Tabla VI.

Tabla VI
Reacción de ligación pPACTGAL4-AAAA

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	13
Buffer 5X Invitrogen	4
Ez. Ligasa Invitrogen 1 U/ μ l	1
Vector 50 ng/ μ l	1
Inserto dcAAA5,3' 50 ng/ μ l	1
Volumen final	20 μ l

Las clonas resultantes de la transformación fueron sometidas a Minipreparación por Lisis alcalina para la obtención del DNA plasmídico que fue caracterizado mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*H I, *Bgl* II y *Cla* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Para la caracterización del plásmido recombinante y su posterior secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos VD5', VU3' y CU3' (Cárdenas-Chávez, 2003). El uso de los oligonucleótidos VD5' y VU3' generan un producto amplificado de 307 pb en la reacción en la que se utiliza el DNA del vector como DNA templado a diferencia de los oligonucleótidos VD5' y CU3' que amplifican un producto de 314 pb debido a la presencia del inserto en el DNA plasmídico pPACTGAL4-AAAA a una temperatura media óptima de 59 °C (Tabla VIII). Los diferentes productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Las reacciones utilizadas de PCR se describen en la Tabla VII.

El producto de PCR generado por los oligos VD5' y CU3' fue clonado en el vector PCR TOPO 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) de acuerdo al protocolo de clonación de la casa comercial y posteriormente fue enviado a secuenciar. Para obtener la secuencia nucleotídica de las clonas positivas se prepararon 2 µg del DNA obtenido mediante la técnica de Minipreparación por Lisis Alcalina previamente descrito. Para la confirmación de los insertos mediante secuenciación se utilizó el oligonucleótido Reverse 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' derivado del fago M13 marcados con un cromóforo IR-800 que es detectado por luz infrarroja utilizando la técnica descrita por Sanger en 1977. Se utilizó el secuenciador " DNA Sequencer Long reader 4200 Licor IR2 semiautomático (LI-COR).

Tabla VII
Reacciones de PCR para amplificación del inserto AAAA

Componentes	Cantidad (µl)	Componentes	Cantidad (µl)
DNA vector 10 ng/µl	1	DNA clona 10 ng/µl	1
Buffer 10X	2.5	Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 25mM	1.5	MgCl ₂ 25mM	1.5
DNTP 25 mM	0.25	DNTP 25 mM	0.25
Oligo VD5' 1µg/µl	0.5	Oligo VD5' 1µg/µl	0.5
Oligo VU3' 1µg/µl	0.5	Oligo CU3' 1µg/µl	0.5
Ez. Taq Polimerasa	0.25	Ez. Taq Polimerasa	0.25
H ₂ O mQ	18.5	H ₂ O mQ	18.5
Volumen final	25 µl	Volumen final	25 µl

Tabla VIII
Programa de PCR para amplificación del inserto AAAA

E : 24 GRAD		
	Temperatura	Tiempo
Etap 1 (30 ciclos)		
Desnaturalización	94 °C	30seg
Alineamiento	59 °C	30 seg
Síntesis	72 °C	30 seg
Etap 2 (1 ciclo)		
	72 °C	5 min

6.1.2 Obtención y purificación de los DNAs plasmídicos recombinantes y reporteros

La obtención de los DNA plasmídicos se realizó mediante preparación a mediana escala usando columnas de QIAGEN (QIAGEN ®Plásmid Handbook, January 1997)

cuyo protocolo se basa en un procedimiento descrito por el proveedor que corresponde a la técnica de Lisis Alcalina previamente descrita seguido de la unión del DNA plasmídico a una resina de intercambio iónico bajo condiciones apropiadas de pH y sales. Finalmente, la columna fue lavada con Buffer QF y el DNA recolectado fue precipitado con 1 volumen de Isopropanol, luego fue lavada la pastilla de DNA con 5ml de Etanol 70% para posteriormente secarla a temperatura ambiente y se llevo a cabo el análisis de la calidad y cantidad mediante absorbancia con luz ultravioleta y confirmación de la concentración de los DNAs mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior cotransfección.

6.1.3 Ensayos de transfección en células Schneider

Las transfecciones fueron realizadas en células Schneider línea 2 de *Drosophila melanogaster* adaptadas a crecer en medio de Schneider pH 7.0 (SIGMA, Saint Louis, Missouri 63103 USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SIGMA, Saint Louis, Missouri 63103 USA) a 25°C. Se usó el método de precipitación-fosfato de calcio-DNA con 10 µg de DNA plasmídico (Graham y Van der Eb, 1973). Las cotransfecciones celulares se basaron en la introducción de los plásmidos productores pPACTGAL4-YPWM (Cárdenas-Chávez, 2003), pPACTGAL4-AAAA, pPACTGAL4 y/o pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} y pNPACAntpΔHD y de los plásmidos reporteros pGL2 5X GAL4 Promoter y pF11CAT para GAL4 y Antp respectivamente. Además, se cotransfectó en la misma reacción con el plásmido pcopiaβ-gal como testigo interno para determinar la eficiencia de transfección.

Las transfecciones celulares se realizaron en frascos de cultivo de 25cm² (SIGMA) a un 80% de confluencia celular con 10 µg de los DNAs plasmídicos en total para cada caja. Primeramente, se eliminó el medio a cada una de las cajas a transfectar mediante el uso de una pipeta Pasteur y después se le agregó 1 ml de la solución fosfato de calcio-DNA (500 µl CaCl₂ 0.25 M, 10 µg DNA y 500 µl HBS 2X pH 6.9) a cada caja. Esta mezcla de reacción se incubó con las células a 25 °C por 4 horas, al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante y se agregó Medio Schneider con 10% de FBS para posteriormente incubar a 25 °C por 3-5 días. Finalmente, se colectaron las células para la preparación de extractos celulares.

6.1.4 Preparación de extractos celulares totales

La preparación de extractos celulares consistió en remover las células de cada caja mediante pipeteo fuerte y pasarlas a un tubo Falcon de 15 ml para posteriormente centrifugar por 2 minutos a 5,000 rpm a 25 °C, se eliminó el sobrenadante y cada pastilla celular se resuspendió en 200µl de Buffer de Lisis Pasiva 1X (PROMEGA, Madison, WI U.S.A.). Posteriormente, se llevo a cabo un ciclo de congelación en Nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente y se centrifugó a 5,000 rpm por 2

minutos a 25 °C para obtener los sobrenadantes en los cuales se encuentran las proteínas de interés, estos fueron etiquetados y almacenados a -70 °C para evitar la inactivación de las proteínas.

6.1.5 Análisis de la expresión de los genes reporteros

La actividad del gen reportero β -galactosidasa (β -gal) fue detectada mediante una reacción enzimática colorimétrica descrita por Tokunaga-Furukubo en 1991. La reacción fue incubada a 37°C por 20 minutos, al término de este tiempo fue detenida al agregar 500 μ l de NaOAC 1M. La reacción colorimétrica se describe en la Tabla IX.

Tabla IX
Reacción colorimétrica para β -galactosidasa

Componentes	Cantidad (μ l)
Buffer Fosfato de Sodio 0.1M	211
Buffer Mg 100X	3
CPRG 4 mg/ml (Boeringer)	66
Extractos celulares	20
Volumen final	300

La actividad del gen reportero Cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se determinó mediante el método de Difusión usando el contador de centelleo líquido (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1992).

La bioluminiscencia fue determinada mediante el uso de un luminómetro siguiendo las instrucciones descritas en el kit de Luciferasa (Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega). El tiempo entre la preparación de la reacción y la medición no fue mayor a 2 segundos y el tiempo de medición en el luminómetro fue de 20 segundos. La reacción enzimática fue descrita como porcentaje de Unidades Relativas de Luminiscencia (%RLU).

6.2 Expresión y purificación de Antp y sus mutantes

6.2.1 Construcción de plásmidos recombinantes

6.2.1.1 Plásmidos pMALcAntp y Antp^{AAAA}

La técnica de mutagénesis sitio dirigida permitió la inserción de un sitio de restricción para la enzima *Xmn* I antes del codón de inicio de la secuencia a Antp y

Antp^{AAAA} en los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} respectivamente y así construir los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-Xmn I y pNPACAntp^{AAAA}-Xmn I requeridos para la construcción de los plásmidos recombinantes pMALcAntp y pMALcAntp^{AAAA}. Esta técnica se llevó a cabo utilizando el kit QuikChange II Site-Directed Mutagénesis (Stratagene, La Jolla, Ca. USA) la cual consistió en utilizar DNA de doble cadena (pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA}) y dos oligonucleótidos sintéticos los cuales contienen el nuevo sitio Xmn I: el oligonucleótido AntpX5' (**GC AGA CGC TGA GGA AGG ATT TCA ATG ACG ATG AGT AC**) posee una Tm de 79.5 °C y un %GC de 48.6%, tiene una tendencia moderada a formar dímeros (²G= -3.6 kcal/mol) y no presenta estructuras secundarias y el oligonucleótido AntpX3' (**CG TCT GCG ACT CCT TCC TAA AGT TAC TGC TAC TCA TG**) posee una Tm de 76.2 °C y un %GC de 48.6%, tiene una tendencia moderada a formar dímeros (²G= -5.3 kcal/mol) y no presenta estructuras secundarias. Los oligonucleótidos, los cuales poseen una secuencia complementaria entre si, fueron extendidos mediante ciclos de diferentes temperaturas por la enzima DNA polimerasa *PfuUltra*, la extensión de los primers generó un plásmido mutagénico que contiene el sitio *Xmn* I deseado. Posterior al ciclo de PCR el producto fue tratado con la endonucleasa *Dpn* I usada para digerir el DNA utilizado como templado y seleccionar el plásmido mutagénico. El DNA resultante con el nuevo sitio *Xmn* fue transformado en bacterias supercompetentes XL1-Blue de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Las clonas resultantes fueron sometidas a Minipreparación por Lisis alcalina y posteriormente caracterizadas con la enzima de restricción *Xmn* I.

Los DNAs de los plásmidos pMALc 2X, pNPACAntp-Xmn I y pNPACAntp^{AAAA}-Xmn I fueron obtenidos mediante la técnica de Minipreparación ya descrita. La preparación del vector se realizó a partir de la digestión del DNA plasmídico pMALc 2X con las enzimas de restricción *Xmn* I y *Sal* I. Los insertos que presentan las secuencias codificantes a Antp y Antp^{AAAA} fueron producto de la digestión de los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-Xmn I y pNPACAntp^{AAAA}-Xmn I con las enzimas de restricción *Sal* I y *Xmn* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Las reacciones de digestión (Tabla X) fueron incubadas a 37°C por 12 horas para posteriormente ser visualizadas en electroforesis en agarosa al 0.8% y purificadas mediante el uso del Kit Wizard ya descrito.

Tabla X
Reacciones de digestión plasmídica con *Sal* I / *Xmn* I

Componentes	Cantidad (µl)
H ₂ O mQ	18.3
Buffer2 10X NEB	3
BSA 100X NEB	0.3
<i>Sal</i> I 10U/µl NEB	1.2
<i>Xmn</i> I 10U/µl NEB	1.2
Plásmido pMALc 0.5 µg/µl	6
Volumen final	30 µl

Componentes	Cantidad (µl)
H ₂ O mQ	22.2
Buffer2 10X NEB	3
BSA 100X NEB	0.3
<i>Sal</i> I 10U/µl NEB	1.2
<i>Xmn</i> I 10U/µl NEB	1.2
Plásmido mutagénico 1 µg/µl	2.1
Volumen final	30 µl

La reacción de ligación a una relación molecular 1:8 del vector con los diferentes insertos previamente purificados se detalla en la Tabla XI. Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se llevo a cabo la transformación, usando bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes y 2 μ l de la reacción de ligación. El DNA plasmídico de las clonas resultantes fue caracterizado mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *Xmn* I, *Sal* I y *Pst* I.

Tabla XI.
Reacción de ligación pMALc-Antp / Antp^{AAAA}

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	12
Buffer 5X Invitrogen	4
Vector 30 ng/ μ l	1
Inserto 30 ng/ μ l	2
Ez. Ligasa Invitrogen 1U/ μ l	1
Volumen final	20 μ l

6.1.1.2 Plásmido pMALcAntp Δ HD

La estrategia de construcción del plásmido recombinante pMALcAntp Δ HD consistió en sustituir el extremo 3' de Antp del plásmido pMALcAntp por el extremo 3' de Antp Δ HD ya que la delección de la secuencia codificante al homeodominio se ubica en el extremo C-terminal. Para ello, se realizó la preparación del vector pMALcAntp5' y del inserto codificante a Antp Δ HD mediante digestión de los plásmidos pMALcAntp y pNPACAntp Δ HD respectivamente con las enzimas de restricción *Sma* I y *Sal* I. Las reacciones de digestión se incubaron toda la noche a 37 °C para posteriormente purificar los fragmentos de interés mediante el kit Wizard ya descrito. Las mezclas de reacción de digestión del vector e inserto se describen en la Tabla XII.

Tabla XII
Reacciones de digestión plasmídica con *Sal* I / *Sma* I

Componentes	Cantidad (μ l)	Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	37	H ₂ O mQ	30.5
Buffer4 10X NEB	5	Buffer4 10X NEB	5
BSA 100X NEB	0.5	BSA 100X NEB	0.5
<i>Sal</i> I 10U/ μ l NEB	2	<i>Sal</i> I 10U/ μ l NEB	2
<i>Sma</i> I 10U/ μ l NEB	2	<i>Sma</i> I 10U/ μ l NEB	2
Plásmido pNPACAntp Δ HD 1.5 μ g/ μ l	3.5	Plásmido pMALcAntp 0.6 μ g/ μ l	10
Volumen final	50 μ l	Volumen final	50 μ l

Para la ligación del vector previamente digerido *Sma* I-*Sal* I con el inserto codificante a Antp Δ HD a una relación molecular 1:12 se realizó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla XIII. La reacción se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se dejó almacenada a 4 °C toda la noche.

Tabla XIII
Reacción de ligación pMALc-Antp Δ HD

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	11
Buffer 5X Invitrogen	4
Vector 20 ng/ μ l	2
Inserto 40 ng/ μ l	2
Ez. Ligasa Invitrogen 1U/ μ l	1
Volumen final	20 μ l

Para la transformación se tomaron 3 μ l de la reacción de ligación y se colocaron en 50 μ l de bacterias DH5 α calcio competentes de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook en 1989. Posteriormente, se realizó la extracción del DNA plasmídico de las clonas resultantes de la transformación mediante Minipreparación por lisis alcalina, los DNAs obtenidos fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y caracterizados con las enzimas de restricción *Sma* I, *Sal* I y *Pst* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

6.2.2 Expresión de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes en YPWM

Para la expresión de las proteínas de fusión MBP, MBP-Antp y sus mutantes se siguieron las recomendaciones descritas en el protocolo del kit de pMALc de New England Biolabs. Los DNAs plasmídicos recombinantes pMALcAntp, pMALcAntp^{AAA} y pMALcAntp Δ HD se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* TB1 calcio-competente. Una vez que se obtuvieron las clonas positivas para estos plásmidos, se tomó una colonia y se inoculó en 3 ml de medio LB + 3 μ l de ampicilina 50 mg/ml, incubando toda la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 0.5 ml del cultivo y se inocularon en 5 ml de medio LB + 5 μ l de ampicilina 50 mg/ml, incubando a 37 °C a 200 rpm por aproximadamente 2 horas hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a una Absorbancia de 600 nm. Una vez alcanzada la absorbancia se tomo una muestra de 1 ml y se centrifugo por 2 min a 14,000 rpm. El paquete celular obtenido se resuspendió en 50 μ l de buffer de muestra para SDS-PAGE 2X y se almacenó a -20°C, con la finalidad de tener una muestra sin inducción de la proteína de fusión. Al resto del cultivo se le añadió 15 μ l de Isopropiltio- β -D-galactosidasa (IPTG) 0.1 M. Después se realizaron varias tomas de muestras de 0.5 ml del cultivo a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas. El paquete celular obtenido se

resuspendió en 100 μ l de buffer de muestra para SDS-PAGE 2X y se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE al 7.5%.

6.2.3 Purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes

Para la preparación del extracto que contiene las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes en mayor volumen se prepararon 3 litros del cultivo para cada una de las clonas seleccionadas para la expresión, a los cuales se les añadió 30 ml del pre-inoculó, 3 ml de ampicilina 50 mg/ml y 6 gr de glucosa. Posteriormente se incubó a 37 °C hasta alcanzar un D.O de 0.5 a una Absorbancia de 600 nm, se añadieron 9 ml de IPTG 0.1M y se incubó por 4 horas a 37 °C a 200 rpm. También se sacaron las muestras correspondientes antes y después de inducir con IPTG como se describió en la sección anterior. El paquete celular fue centrifugado a 4,000 xg por 20 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante para posteriormente ser almacenado a -20 °C toda la noche. Al día siguiente el paquete celular fue resuspendido en 150 ml de buffer de columna y se disgregó el contenido celular utilizando 300 μ l de Triton X-100 y el sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Chicago, USA) con pequeños pulsos de 15 seg con un control de salida (output control) de 80 y un tono (Tune) entre 80-100, este procedimiento se realizó 15 veces. El paquete celular sonificado se centrifugó utilizando la ultracentrifuga Beckman (Beckman Instruments, California, USA) a 9,000 xg por 30 min a 4 °C y el extracto obtenido fue diluido con buffer de columna a una relación 1:1 y filtrado utilizando una unidad de filtración de 0.45 μ m y se transfirió a la columna de afinidad.

La columna (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden) se empacó directamente con 10 ml de resina de amilosa NEB la cual tiene una afinidad de 3 mg/ml de extracto protéico, posteriormente se lavó con 8 volúmenes (80 ml) de buffer de columna a un flujo de 3 ml por min. Una vez lavada la columna se cargó el extracto de las proteínas de fusión con un flujo de 1 ml por min y se lavo con 12 volúmenes de buffer de columna (120 ml) para eliminar las proteínas que no se unieron a la resina de amilosa. Las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes unidas a la resina se eluyeron utilizando el colector de fracciones (Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Sweden) por lo que el detector se programó a una longitud de onda de 1 nm y el flujo de elusión fue de 1 ml por min con maltosa 10 mM en buffer de columna.

6.3 Expresión y purificación de GAL4 y sus mutantes

6.3.1 Construcción de plásmidos recombinantes

6.3.1.1 Plásmido pGEX-CS-GAL4 DBD

El plásmido pGEX-CS-GAL4-DBD proporcionado amablemente por el Dr. Johnston (Johnston *et al.*, 1994) dirige la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4. Este plásmido fue transformado en bacterias DH5 α calcio competentes y las clonas resultantes fueron sometidas a Minipreparación por lisis alcalina. El DNA plasmídico obtenido fue caracterizado con las enzimas de restricción *EcoR* I, *Hinc* II, *BamH* I-*Nco* I y *Nco* I-*Sma* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

6.3.1.2 Plásmidos pGEX-GAL4-YPWM y GAL4-AAAA

Para la expresión de las proteínas de fusión GST-GAL4^{YPWM} y GST-GAL4^{AAAA} se realizó la clonación de las secuencias codificantes al tetrapéptido YPWM o a un bloque de Alaninas en el extremo C-terminal de GAL4 fusionada a GST. Para ello, se realizó la preparación del vector mediante digestión del DNA plasmídico pGEX-CS-GAL4 DBD con la enzima de restricción *EcoR* I y posteriormente fue purificado mediante el kit Wizard. Los insertos codificantes al motivo YPWM o su testigo negativo (AAAA) fueron purificados de la digestión de los plásmidos pPACTGAL4-YPWM y pPACTGAL4-AAA con la enzima *EcoR* I respectivamente. Las reacciones de digestión (Tabla XIV) se incubaron toda la noche a 37 °C y posteriormente fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

Tabla XIV
Reacciones de digestión plasmídica con *EcoR* I

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	22.5
Buffer3 10X NEB	3
<i>EcoR</i> I 20U/ μ l NEB	1.5
Plásmido pGEX-CS-GAL4 0.8 μ g/ μ l	3
Volumen final	30 μ l

Componentes	Cantidad (μ l)
H ₂ O mQ	23
Buffer3 10X NEB	5
<i>EcoR</i> I 10U/ μ l NEB	2
Plásmido pPACTGAL4-YPWM ó AAAA 0.2 μ g/ μ l	20
Volumen final	50 μ l

Posteriormente, se llevó a cabo la ligación del vector pGEX-GAL4 previamente purificado con los diferentes insertos (YPWM ó AAAA) a una relación molecular 1:8

(Tabla XV), las reacciones fue incubadas a 37 °C por 10 minutos y posteriormente se llevo a cabo la transformación, usando para ello 50 µl de bacterias *E. coli* DH5α calcio competentes (Eficiencia= 1.08 X 10⁶ colonias/µg de DNA) y 3 µl de la reacción de ligación.

Tabla XV
Reacción de ligación pGEX-GAL4-YPWM / AAAA

Componentes	Cantidad (µl)	Componentes	Cantidad (µl)
H ₂ O mQ	9	H ₂ O mQ	9
Buffer 5X Invitrogen	4	Buffer 5X Invitrogen	4
Vector 15 ng/µl	2	Vector 20 ng/µl	2
Inserto YPWM 30 ng/µl	4	Inserto AAAA 30 ng/µl	4
Ez. Ligasa Invitrogen 1U/µl	1	Ez. Ligasa Invitrogen 1U/µl	1
Volumen final	20 µl	Volumen final	20 µl

El DNA plasmídico de las clonas obtenidas para las construcciones pGEX-GAL4^{YPWM} ó pGEX-GAL4^{AAAA} se caracterizaron mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoR* I, *Hinc* II, *Nco* I-*BamH* I y *Sma* I-*Nco* I de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial y posteriormente fueron visualizadas en electroforesis en agarosa al 0.8%.

La introducción de los diferentes insertos alteró el marco de lectura en los plásmidos recombinantes pGEX-GAL4YPWM y pGEX-GAL4AAAA, por lo que fueron sometidos a mutagénesis sitio dirigida empleando el kit QuikChange®XL Site Directed Mutagénesis y los oligonucleótidos GYA5' y GYA3' que permitieron la inserción del nucleótido citosina (C) en el extremo 3' de GAL4 antes del sitio de restricción *EcoR* I para recuperar el marco de lectura. El oligonucleótido GYA5' (**AA GGT CAA AGA CAG TTG ACT CGT ATC GGG GAA**) posee una Tm de 75.9°C y un %GC de 46.9% y presenta una tendencia moderada a formar estructuras secundarias (²G= -6.7 kcal/mol) y el oligonucleótido GYA3' (**AGT CAA CTG TCT TTG ACC TTT GTT ACT ACTC**) posee una Tm de 75.6 °C, un %GC de 38.7% y presenta una tendencia moderada a formar estructuras secundarias (²G= -6.7 kcal/mol).

Además, se realizó nuevamente mutagénesis sitio dirigida en la construcción pGEX-GAL4AAA para la introducción de un nucleótido Timina (T) antes de la secuencia codificante al bloque de alaninas que permita conservar el marco de lectura para la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA}. Esta técnica utilizó el kit de mutagénesis ya descrito y los oligonucleótidos GA5' y GA3'. El oligonucleótido GA5' (**G ATC CCG TCT CCA CTG GCT GCC GC**) posee una Tm de 70.8°C y un %GC de 70.8% y presenta una tendencia moderada a formar estructuras secundarias (²G= -6.2 kcal/mol) y el oligonucleótido GA3' (**GC GGC AGC CAG TGG AGA CGG GAT C**) posee una Tm de 70.8 °C, un %GC de 70.8% y presenta una tendencia moderada a

formar estructuras secundarias ($\Delta G = -6.7$ kcal/mol). La confirmación de la mutagénesis sitio dirigida se realizó mediante secuenciación utilizando el oligonucleótido VD5' de acuerdo a la técnica previamente descrita.

6.3.2 Expresión de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes en YPWM

Para la expresión de las proteínas de fusión GAL4, GAL4^{YPWM} y GAL4^{AAAA} se transformaron los DNAs plasmídicos pGEX-GAL4-CS-GAL4, pGEX-GAL4YPWM y pGEX-GAL4AAA en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS calcio competente. Una vez que se obtuvieron las clonas positivas para cada uno de los plásmidos, se tomó una colonia y se inoculó en 3 ml de medio LB + 3 μ l de ampicilina 50 mg/ml, incubando toda la noche a 37 °C a una velocidad de agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 0.5 ml del cultivo y se inocularon en 5 ml de medio LB + 5 μ l de ampicilina 50mg/ml, incubando a 37 °C a una velocidad de agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8 a una Absorbancia de 600 nm. Una vez alcanzada la densidad se tomó una muestra de 1 ml y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm, el paquete celular obtenido se resuspendió en 50 μ l de buffer de muestra para SDS-PAGE 2X con la finalidad de tener un control negativo de la expresión de nuestras proteínas de fusión. Al resto del cultivo se le añadió 15 μ l de IPTG 0.1 M. Después se realizaron varias tomas de muestras de 0.5 ml del cultivo a las 2, 4, 6 y 8 horas de inducción. El paquete celular obtenido de cada muestra se resuspendió en 100 μ l de buffer de muestra para SDS-PAGE 2 X.

6.3.3 Purificación de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes

Para la preparación del extracto de las proteínas de fusión GST-GAL4, GAL^{YPWM} y GAL4^{AAAA} en mayor cantidad se preparó un litro de cultivo de la clona seleccionada para la expresión, al cual se le añadió 10 ml del pre-inoculo y 1 ml de ampicilina 50mg/ml. Posteriormente se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O de 0.6-0.8 a una Absorbancia de 600 nm, se añadieron 3 ml de IPTG 0.1 M y se incubó por 4 horas a 37 °C a 200 rpm. También se sacaron las muestras correspondientes antes y después de inducir como se describió anteriormente y se analizó la expresión en electroforesis SDS-PAGE al 7.5%. Al término de este tiempo el cultivo inducido fue centrifugado a 4,000 xg por 20 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular fue almacenado a -20°C toda la noche. Al día siguiente se descongeló el paquete celular y se resuspendió mediante pipeteo fuerte en 50 ml PBS 1X , 0.05 ml de MgCl₂ 1M y 0.5 ml de Triton X-100 y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. El paquete celular disuelto se centrifugó a 12,000 xg por 30 min a 4 °C y el extracto obtenido fue filtrado utilizando una unidad de filtración 0.45 μ m.

La columna previamente empaquetada con 2 ml de resina Sepharosa 4B (Amersham, England) la cual tiene una afinidad de 5 mg/ml de extracto proteico fue

lavada con 20 ml de PBS 1X para remover el líquido en el que se preserva y posteriormente equilibrada con 6 ml de PBS 1X + 1% Tritón X-100. Una vez equilibrada la columna se cargó el extracto de las proteínas de fusión con un flujo de 1.5 ml por min y se lavo con 20 ml de PBS 1X para eliminar las proteínas que no se unieron a la resina. Las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes unidas a la resina se eluyeron con 10 ml de Buffer de elusión (5mM glutation reducido en 50 mM Tris-HCl pH 8.0) y se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo de 1.5 ml por min que fueron visualizadas en electroforesis SDS-PAGE 7.5%.

6.4 Análisis electroforético de las proteínas de fusión mediante SDS-PAGE

El análisis y visualización de las proteínas de fusión por electroforesis SDS-PAGE consistió en elaborar geles de poliacrilamida al 7.5 %. El gel separador al 7.5% se realizó con una mezcla de 2.75 ml de H₂O mQ, 1.25 ml del buffer Tris-SDS 4X pH 8.8, 0.937 ml de acrilamida al 40%, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 10µl de TEMED (N-N-N-N-tetrametiletilendiamina). La mezcla correspondiente al gel concentrador al 5% contenía 1.88 ml de H₂O mQ, 0.750 ml del buffer Tris-SDS 4X pH 6.8, 0.370 ml de acrilamida al 40%, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 10 µl de TEMED. Una vez realizadas ambas mezclas se llenaron los vidrios con la mezcla correspondiente al gel separador dejando aproximadamente 1.5 cm para el gel concentrador y esperando 10 min para su polimerización. Después se le añadió la parte correspondiente al gel concentrador y se colocaron los peines con cuidado y los carriles se lavaron con H₂O mQ, colocándolo dentro de la mini cámara vertical de electroforesis (E-C 120 Apparatus, NY, USA) cubriendo el gel con el buffer de corrida Tris-glicina 1X. Las muestras se prepararon agregando buffer de muestra 2X y se mezclaron mediante pipeteo y posteriormente se sometieron a ebullición por 5 min. Las muestras se depositaron en los carriles del gel de poliacrilamida corriendo inicialmente a 80 V por 10 min y después se incrementó el voltaje a 100 V hasta que el frente de corrida llego al final del vidrio. Una vez concluida la electroforesis, el gel se colocó en la solución de tñido durante 30 min y posteriormente se depositó en la solución decolorante durante un par de horas hasta detectar las bandas de interés bien definidas.

6.5 Inmunodetección de las proteínas de fusión mediante Western-Blot

Las muestras de proteínas se corrieron en electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7.5%. Una vez terminado el corrimiento electroforético se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de inmobilón (Millipore Corporation, MA, USA) acomodando el gel y la membrana en una cámara de transferencia húmeda vertical EC 142 (EC-Apparatus Corporation, NY, USA). La membrana fue tratada previamente con metanol al 100% para aumentar su permeabilidad, las esponjas y los papeles filtro se trataron con el buffer de transferencia 1X. La cámara de electroforesis se llenó con buffer de transferencia hasta cubrirla totalmente y se corrió a 25 V por 2

horas. Posteriormente, se tomó la membrana y se enjuagó con H₂O mQ y se tiñó con una solución rojo de Ponceu concentrado (Sigma-Aldrich Química, Toluca, México) por 5 min para verificar la transferencia, se bloqueó con la solución TBS-T 1X con 5% de leche descremada (Carnation Instant Nonfat Dry) por 2 hr a temperatura ambiente. Terminando el bloqueo se incubó con los anticuerpos primarios anti-Antp 4C3 de ratón (Referencia) disuelto en TBS-T 1X a una dilución 1:10,000 para la detección de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes y anti-GAL4 DBD de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, USA) a una dilución 1:10,000 para la detección de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes. Al término de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X. Posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG HRP a una dilución 1:20,000 (Promega, Madison, Wi, USA) y anti-conejo ECL IgG HRP (Amersham, England) a una dilución 1:7,500 disueltos en TBS-T 1X a temperatura ambiente por 2 horas en agitación constante a 80 rpm. Se dieron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X. Enseguida la membrana se puso en contacto con 500 µl (V/V) con los sustratos de quimioluminiscencia solución 1 y 2 de ECL (Amersham Biosciences, Buckingham, England) por 1 min. La membrana se expuso a diferentes tiempos (1,5 y 10 minutos) hasta detectar las bandas de interés en oscuridad dentro del cassette y sobre un film (Daigger, IL, USA. El film se colocó por 1 min en la solución reveladora (Estman Kodak Company, NY, USA) agitando suavemente, después se enjuagó con agua corriente por 1 min y se colocó en la solución fijadora (Estman Kodak Company, NY, USA) por 1 minuto.

6.6 Análisis de interacción proteína-DNA mediante ensayos de retardación en gel

6.6.1 Preparación de las sondas de unión a Antp y GAL4

Los ensayos de interacción de las proteínas recombinantes Antp y GAL4 con el DNA requieren la unión a un fragmento de DNA denominado sonda el cual debe presentar sitios de unión para estos factores transcripcionales. La preparación de las sondas (s11 y s5X) que contienen un promotor y los sitios de unión para Antp o GAL4 y sus mutantes se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de los plásmidos reporteros pF11CAT y pGL2 5X GAL4 promoter respectivamente. Para la amplificación de las sondas se diseñaron cuatro diferentes oligonucleótidos sintéticos que fueron analizados en el programa Oligo 4.0 (National Biosciences, Plymouth, MN. USA) con los siguientes resultados:

El oligo s5X5' (**5'-CTGTAAGCTGAGCTAAC-3'**) contiene 16 nucleótidos y tiene una T_m teórica de 57.2 °C y reconoce una secuencia específica antes de los 5 sitios de unión de GAL4 denominados UAS localizados río arriba del promotor temprano SV40 del plásmido pGL2 5X GAL4 promoter.

El oligo s5X3' (**5'-GCGTCTTCCATTTTAC-3'**) contiene 16 nucleótidos y tiene una T_m teórica de 57.2 °C y reconoce una secuencia específica al extremo 3' de la secuencia del promotor SV40 del plásmido pGL2 5X GAL4 promoter.

El oligo s115' (5'-AATGCCTCAAAATGTTC-3') contiene 17 nucleótidos y tiene una Tm teórica de 56.3 °C y reconoce una secuencia específica antes de los 11 sitios de unión de Antp denominados BS2 (Binding Site) localizados río arriba del promotor del plásmido pF11CAT.

El oligo s113' (5'-GTCTTAGAGCCAGATA-3') contiene 16 nucleótidos y tiene una Tm teórica de 57.2 °C y reconoce una secuencia específica al extremo 3' de la secuencia del promotor SV40 del plásmido pF11CAT.

Se realizó un PCR virtual empleando los oligos s5X5', s5X3', s115' y s113' y las secuencias de los plásmidos pGL2 5X GAL4 promoter y pF11CAT como secuencias blanco usando el programa Amplify 1.2 (University Wisconsin, Madison, WI USA). Los resultados del análisis virtual empleando los oligos s5X5' y s5X3' muestran como se esperaba un fragmento de 385 pb correspondiente a la sonda s5X que comprende el promotor SV40 y cinco sitios de unión de GAL4 (UAS). Por otra parte, el PCR virtual empleando los oligos s115' y s113' muestra el fragmento esperado de aproximadamente 750 pb de la sonda s11 que corresponde al promotor SV40 y once sitios BS2 de unión de Antp.

Posteriormente, se llevó a cabo un gradiente de PCR para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cuatro oligonucleótidos previamente descritos. El gradiente empleado presentó un rango de temperatura de alineamiento que va desde los 52°C a 57°C y de 46°C a 61°C que se describe en la Tabla XVI. Los productos de PCR se visualizaron en electroforesis en geles de agarosa 0.8%.

Tabla XVI
Gradiente de temperaturas mediante PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Etapa 1 (30 ciclos)			Etapa 1 (30 ciclos)		
Desnaturalización	94	30 seg	Desnaturalización	94	30 seg
Alineamiento	52-57	30 seg	Alineamiento	46-61	30 seg
Síntesis	72	30 seg	Síntesis	72	30 seg
Etapa 2 (1 ciclo)	72	5 min	Etapa 2 (1 ciclo)	72	5 min

La reacción de PCR se llevó a cabo usando la temperatura media óptima para cada par de oligonucleótidos como se muestra en la Tabla XVII. Los diferentes productos de PCR fueron purificados mediante el uso del Kit Wizard ya descrito en el cual los DNAs fueron eluidos con el buffer TEN 1X.

Tabla XVII
Reacciones de PCR para amplificar las sondas de DNA

Componentes	Cantidad (µl)	Componentes	Cantidad (µl)
DNA pGL2 5X GAL4 promoter 10 ng/µl	18	DNA pF11CAT 16 ng/µl	18
Buffer 10X	15	Buffer 10X	15
MgCl ₂ 25mM	9	MgCl ₂ 25mM	9
dNTP's 20 mM	1.8	dNTP's 25 mM	1.8
Oligo s5X5' 1µg/µl	3	Oligo s115' 1µg/µl	3
Oligo s5X3' 1µg/µl	3	Oligo s113' 1µg/µl	3
Taq Polimerasa	1.5	Taq Polimerasa	1.5
H ₂ O mQ	98.7	H ₂ O mQ	98.7
Volumen final	150 µl	Volumen final	150 µl

Posteriormente, las sondas fueron marcadas en sus extremos 3' con dioxigenina-11-ddUTP mediante el uso del kit DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) que incluye una Terminal transferasa la cual transfiere una molécula de dioxigenina (DIG) por cada 12 nucleótidos del fragmento de DNA de la sonda. Las reacciones del marcaje se incubaron a 37°C por 1 hora y al término de este tiempo la reacción fue detenida con 2 µl de EDTA 0.2M y se agregaron 3 µl de H₂O mQ a cada reacción a un volumen final de 25 µl con una concentración de 155 pmol/µl como se resume en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII
Reacciones de marcaje de las sondas de DNA con DIG

Componentes	Cantidad (µl)	Componentes	Cantidad (µl)
s5X 100 ng/µl (0.38pmol)	10	s11 100ng/µl (0.22 pmol)	10
Labeling Buffer 5X	4	Labeling Buffer 5X	4
CoCl ₂ solution 25 mM	4	CoCl ₂ solution 25 mM	4
DIG-ddUTP 1mM	1	DIG-ddUTP 1mM	1
Terminal transferasa (400U/µl)	1	Terminal transferasa (400U/µl)	1
H ₂ O mQ	0	H ₂ O mQ	0
Volumen final	20 µl	Volumen final	20 µl

Posteriormente, se analizó la eficiencia de marcaje con dioxigenina de las sondas de DNA s5X y s11 mediante una serie de diluciones en TEN 1X aplicadas sobre una membrana Hybond-XL de Nylon con carga positiva en comparación con la sonda Oct2A disponible por el Kit DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation. Las diluciones empleadas

corresponden a 155, 15, 1.5 y 0.15 fmol equivalentes a 40, 4, 0.4 y 0.04 ng de las sondas s5X y s11 respectivamente. Finalmente, la membrana fue sometida a inmunodetección con el anticuerpo Anti-Dioxigenina-AP conjugado y el sustrato CSPD (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) para la visualización de las sondas de DNA.

6.6.2 Ensayos de interacción de las proteínas Antp y GAL4 y sus mutantes con el DNA

Para analizar la habilidad de las proteínas recombinantes Antp y GAL4 y sus mutantes de reconocer sus sitios de unión al DNA se realizaron ensayos de retardación en gel utilizando las sondas s11 y s5X respectivamente. Esta rápida y sencilla técnica se basa en la separación del DNA libre de los complejos DNA-proteínas debido a diferencias en su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida o agarosa en condiciones nativas (Hendrickson, 1985; Garner *et al.*, 1986; Crothers, 1987).

El análisis de interacción de las proteínas recombinantes Antp y sus mutantes con el DNA se realizó en 20 μ l de Binding Buffer 1X (100 mM HEPES pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT, 1% Tween 20, 150 mM KCl), 1 μ l poly dI-dC [1 μ g/ μ l], 15 pmol sonda s11 (4 ng) y 46, 143 y 286 ng de Antp, Antp^{AAAA} ó Antp Δ HHD previamente digeridas con la proteasa Xa y posteriormente desaladas. La reacción de unión fue incubada a temperatura ambiente por 15 minutos y al término de este tiempo se le agregaron 5 μ l del Buffer de carga sin bromofenol. La reacción fue transferida a un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones nativas y sometido a electroforesis a 100 voltios por 7 horas a 4°C.

Por otra parte, las reacciones de interacción de las proteínas recombinantes GAL4 y sus mutantes con el DNA se realizaron en 20 μ l de Binding Buffer 1X, 1 μ l poly dI-dC [1 μ g/ μ l], 15 pmol sonda s5X (4 ng) y 45, 90 y 267 ng de GST-GAL4, GST-GAL4^{YPWM} ó GST-GAL4^{AAAA}. Estas reacciones de unión se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos y fueron detenidas con 5 μ l del Buffer de carga sin bromofenol. Posteriormente, las reacciones fueron transferidas a un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas y sometido a electroforesis a 100 voltios por 2 horas 53 min.

Una vez terminado el corrimiento electroforético se realizó la transferencia de los complejos proteína-DNA a una membrana Hybond-XL para ácidos nucleicos (Amersham Pharmacia Biotech) acomodando el gel y la membrana en una cámara de transferencia húmeda vertical EC142 (EC-Apparatus Corporation, NY, USA). La membrana fue equilibrada previamente en TBE 0.5X por 5 minutos, las esponjas y el papel filtro 3MM se trataron con el buffer de transferencia TBE 0.5X. La cámara de electroforesis se llenó con buffer de transferencia hasta cubrirla totalmente y se corrió a 400 mA por 30 min. Posteriormente, se realizó la fijación del DNA a la membrana mediante UV-crosslinking a 120 mJ en el SpectroLinker XL-100 (Spectronics Corporation). La membrana se enjuagó con el Buffer de lavado 1X pH 7.5 por 5 min. y se bloqueó con 10 ml de

Solución de bloqueo 1X pH 7.5 por 30 min a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo se realizó la inmunodetección de los complejos proteína-DNA incubando la membrana con el anticuerpo Anti-Dioxigenina-AP conjugado a una dilución 1:10,000 en Solución de bloqueo 1X por 30 min a temperatura ambiente en agitación constante. Al término de la incubación se realizaron 2 lavados de 15 min cada uno con el Buffer de lavado 1X pH 7.5. Posteriormente, se incubó la membrana en 10 ml de Buffer de detección 1X pH 9.5 por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida la membrana se puso en contacto con 700 μ l del sustrato CSPD diluido 1:100 en Buffer de detección 1X en una bolsa de hibridación y se incubó por 5 min a temperatura ambiente y 10 min a 37°C para potenciar la reacción de luminiscencia. La membrana se expuso por 8 a 14 horas para detectar los complejos proteína-DNA sobre un film (Daigger, IL, USA) dentro de un cassette para película de rayos X en condiciones de oscuridad. El film se colocó por 1 min en la solución reveladora (Estman Kodak Company, NY, USA) agitando suavemente, después se enjuagó con agua corriente por 1 min y se colocó en la solución fijadora (Estman Kodak Company, NY, USA) por 1 minuto.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM de Antp en células Schneider

7.1.1 Construcción de los plásmidos recombinantes

Los plásmidos requeridos en las transfecciones celulares para el análisis de la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en *Antennapedia* fueron previamente construidos a excepción de los controles negativos pNPACAntp Δ HD y pPACTGAL4-AAAA que son necesarios para el apropiado análisis de los resultados.

7.1.1.1 Plásmido pNPACAntp Δ HD

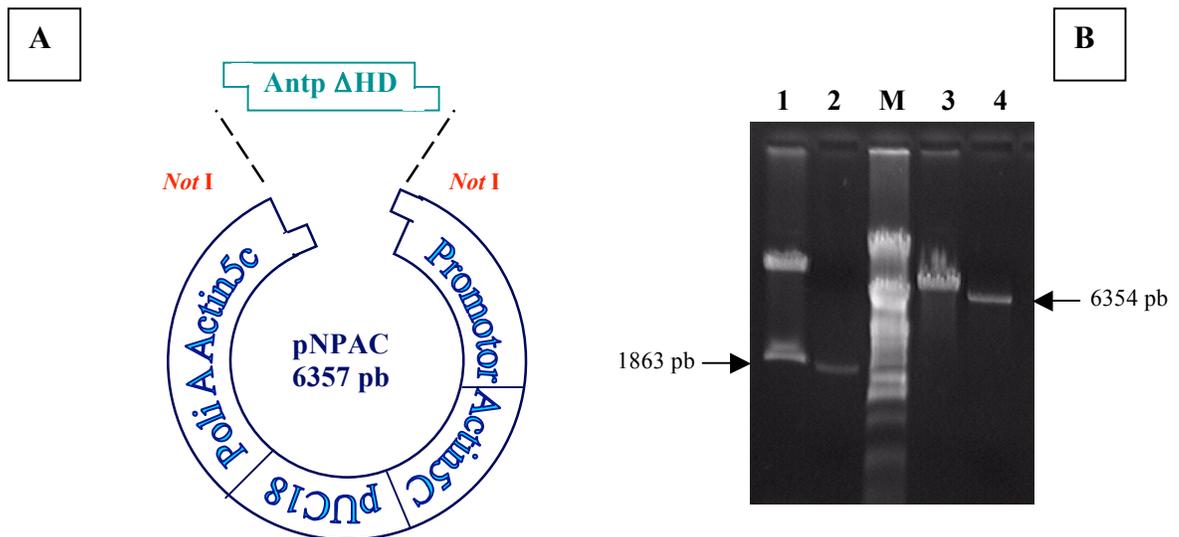
Para la construcción del plásmido pNPACAntp Δ HD se realizó la preparación del inserto con la secuencia codificante para Antp Δ HD mediante digestión del plásmido pWTPAntp Δ HD con la enzima de restricción *Not* I que liberó el fragmento de 1863 pb (Figura 9B; carril 2). La linearización del vector pNPAC de 6354 se realizó mediante digestión con *Not* I como se muestra en la figura 9B (carril 4). Posteriormente, la ligación del vector linearizado de 6354 pb con la secuencia codificante a Antp Δ HD (Figura 9A) fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes que mostraron 18 clonas probables, a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación y los DNAs recombinantes fueron caracterizados mediante digestión con enzimas de restricción diagnósticas. La caracterización de una de las clona recombinantes utilizando las enzimas *Not* I, *EcoR* I, *Pst* I y *Sma* I mostró la liberación de los fragmentos de restricción esperados (Figura 9D) en comparación con la linearización del vector sin inserto (Figura 9C).

7.1.1.2 Plásmido pPACTGAL4-AAAA

En la construcción del plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA la preparación del vector se realizó mediante digestión del plásmido pPACTGAL4 NS de 7.8 Kb con las enzimas de restricción *BamH* I y *Bgl* II para la obtención del vector de 7764 pb como se muestra en la Figura 10A (carril 2). El inserto de 39 pb (dcAAA5,3')

se obtuvo mediante el alineamiento de los oligonucleótidos dcAAA5' y dcAAA3' correspondiente a 24 pb de la secuencia de Antennapedia de las posiciones 3676 a 3687 y de 3700 a 3711 pb como se muestra en la figura 10C. Este fragmento codifica un péptido de 13 aminoácidos donde los cuatro aminoácidos centrales codifican a un bloque de 4 alaninas en lugar del motivo YPWM y posee los extremos cohesivos para las enzimas *BamH* I y *Bgl* II y el codón de terminación. El análisis del producto de alineamiento confirmó el peso molecular del inserto mediante su visualización en un gel de poliacrilamida mostrando el inserto esperado de 39 pb (Figura 10B).

La reacción de ligación del vector-inserto se usó en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α calcio competente para la obtención del plásmido recombinante del cual se extrajo el DNA plasmídico mediante la técnica de Minipreparación ya descrita en material y métodos. El plásmido recombinante obtenido fue caracterizado mediante digestión con las enzimas de restricción *BamH* I, *Bgl* II y *Cla* I como se muestra en la figura 10E. Las enzimas *BamH* I y *Bgl* II linearizaron el plásmido recombinante debido a que se restituyen estos sitios de restricción como producto de la ligación (carriles 2 y 3). Por otra parte, el plásmido pPACTGAL4 NS fue linearizado con ambas enzimas debido a que posee ambos sitios de restricción en su secuencia (Figura 10D; carriles 2 y 3). Además, el plásmido recombinante fue digerido con la enzima de restricción *Cla* I generando 2 fragmentos de 5300 y 2500 pb como se esperaba (Figura 10E; carril 4) a diferencia de la digestión del vector pPACTGAL4 NS con la misma enzima que liberó 3 fragmentos de 5300, 1400 y 1100 pb (Figura 10D; carril 4). Estos resultados muestran que el plásmido obtenido corresponde a la construcción pPACTGAL4-AAAA debido a que la presencia del inserto elimina un sitio de corte *Cla* I entre los sitios de restricción *BamH* I y *Bgl* II del vector.



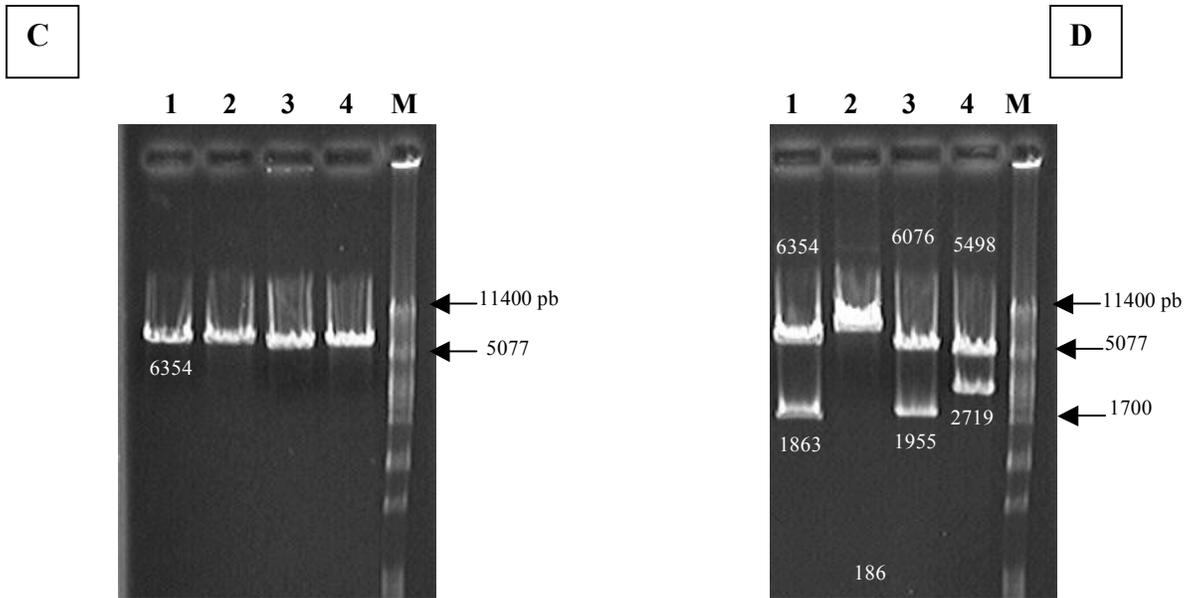
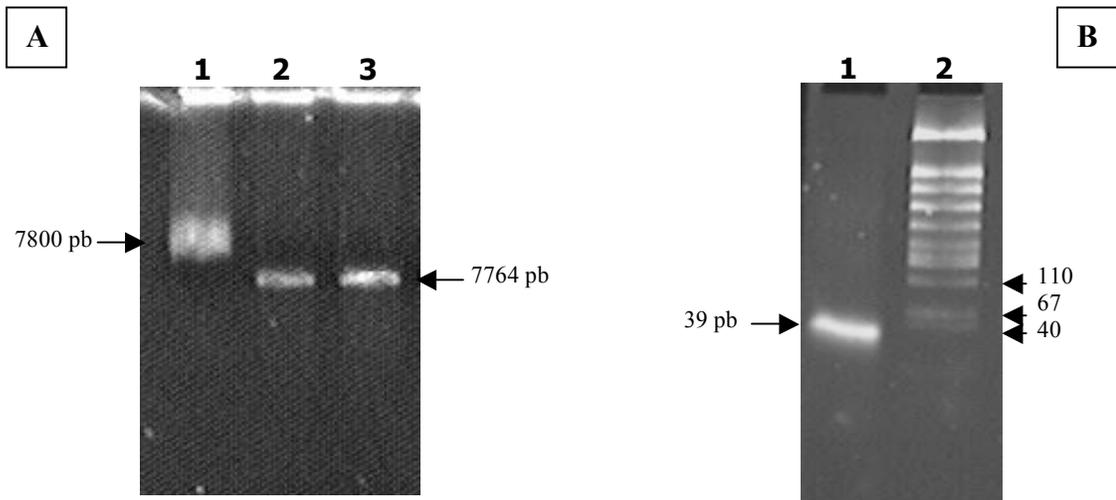


Figura 9. Construcción del plásmido recombinante pNPACAntpΔHD. El esquema en A representa la ligación de la secuencia codificante a AntpΔHD en el vector de expresión pNPAC. En B se muestra la digestión del DNA plasmídico pWTPAntpΔHD con la enzima de restricción *Not* I que libera un fragmento de 1743 pb correspondiente a la secuencia codificante a AntpΔHD (carril 1) que fue posteriormente purificado (carril 2) así como la digestión del vector pNPAC con la enzima *Not* I (carril 3) y su purificación (carril 4). C muestra el DNA plasmídico del vector pNPAC linearizado con las enzimas de restricción *Not* I (carril 1), *EcoR* I (carril 2), *Pst* I (carril 3) y *Sma* I (carril 4) y en D se confirma el patrón de restricción esperado del plásmido recombinante pNPACAntpΔHD con las enzimas *Not* I (carril 1), *EcoR* I (carril 2), *Pst* I (carril 3) y *Sma* I (carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ + *Pst* I.



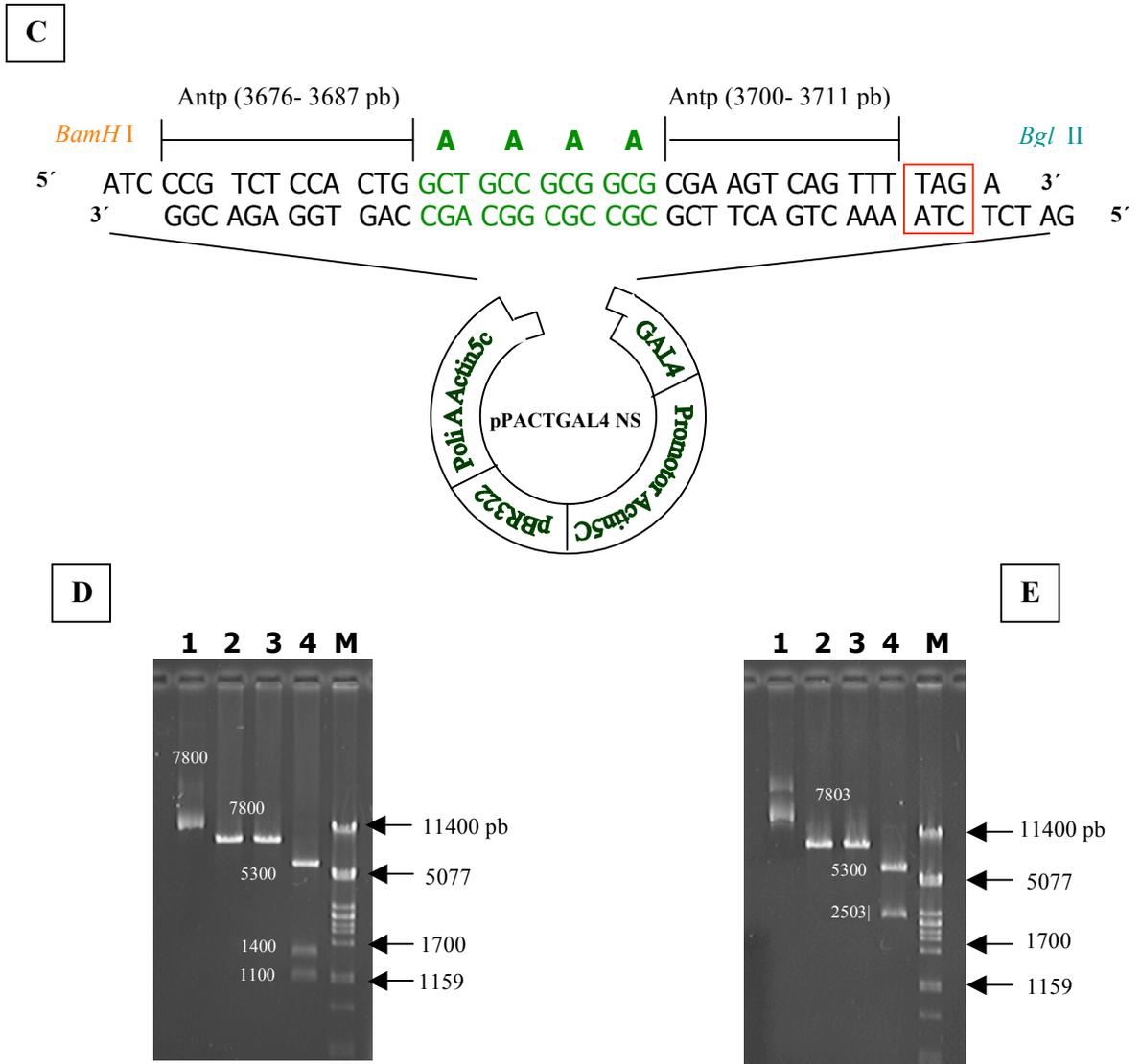
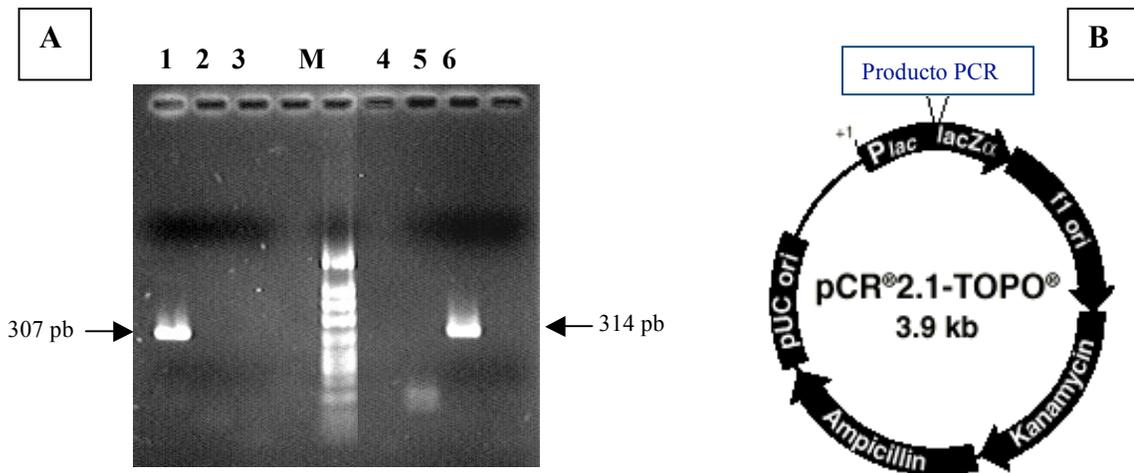


Figura 10. Construcción del plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA. En **A** se muestra un gel de agarosa al 0.8% con el vector plasmídico pPACTGAL4 NS sin digerir (carril 1) y digerido con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Bgl* II (carril 2) y después de ser precipitado (carril 3). En **B** se muestra el inserto en un gel de poliacrilamida al 6% con el alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos dcAAA5' y dcAAA3' que originan un fragmento de DNA de 39 pb (carril 1) y el marcador de peso molecular pBluescript + *Msp* I (carril 2). El esquema en **C** representa la ligación del vector con el inserto que indica la secuencia nucleotídica mutante en el tetrapéptido YPWM por Alaninas (AAAA) en color verde, el codon de terminación en rojo y los sitios de restricción *Bam*H I y *Bgl* II. En **E** se muestra el plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA (carril 1) digerido con *Bam*H I y *Bgl* II (carriles 2 y 3) y *Cla* I (carril 4) que indica el tamaño de los fragmentos en comparación con los obtenidos con el vector pPACTGAL4 sin inserto (**D**; carril 1) y digerido con *Bam*H I (**D**; carril 2), *Bgl* II (**D**; carril 3) y *Cla* I (**D**; carril 4). El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ + *Pst* I.

Además, para verificar la construcción recombinante pPACTGAL4-AAAA se diseñaron 3 oligonucleótidos sintéticos que permitieron amplificar el inserto mediante PCR. En la Figura 11A los primers VD5' y VU3' permitieron amplificar un fragmento de 307 pb correspondiente a GAL4 sin inserto (carril 1) y los primers VD5' y CU3' no

presentaron un producto amplificado (carril 2). Los resultados mostraron la presencia del fragmento esperado de 314 pb en el plásmido recombinante con los primers VD5' y CU3' a una temperatura media óptima de 59°C (Figura 11A; carril 5) y la ausencia del fragmento de 307 pb utilizando los oligos VD5' y VU3' (Figura 11A; carril 4). Estos resultados confirman la presencia del inserto en el plásmido recombinante.

Posteriormente, el producto de PCR obtenido de la clona recombinante fue clonado en el vector pCR®2.1-TOPO® (Figura 11B) dando como resultado 6 clonas que fueron caracterizadas mediante digestión con la enzima de restricción *EcoR* I, de las cuales 4 clonas positivas liberaron el fragmento esperado de 314 pb correspondiente al producto de PCR (Figura 11C; carriles 2-5) y 2 clonas negativas liberaron un fragmento inesperado (Figura 11C; carriles 6 y 7). La determinación de la secuencia nucleotídica de una clona positiva confirmó la inserción y orientación correcta del producto alineado que codifica para el péptido de 13 aminoácidos con el bloque de alaninas. Desafortunadamente, la secuencia nucleotídica muestra la delección de una Timina en el codón indicado antes de la secuencia codificante a alaninas; lo cual alteró el marco de lectura de la proteína de fusión produciendo una proteína de mayor peso molecular debido a la pérdida del codón de terminación localizado en el extremo C-terminal del fragmento dcAAA5,3' (Figura 11D). Debido a lo anterior, se realizó mutagénesis sitio dirigida empleando el kit QuikChange®XL Site Directed Mutagénesis kit y los oligonucleótidos GA5' y GA3' para introducir el nucleótido Timina faltante. Este plásmido mutagénico pPACTGAL4-AAAA fue analizado mediante secuenciación para confirmar la recuperación del marco de lectura (Figura 11E).



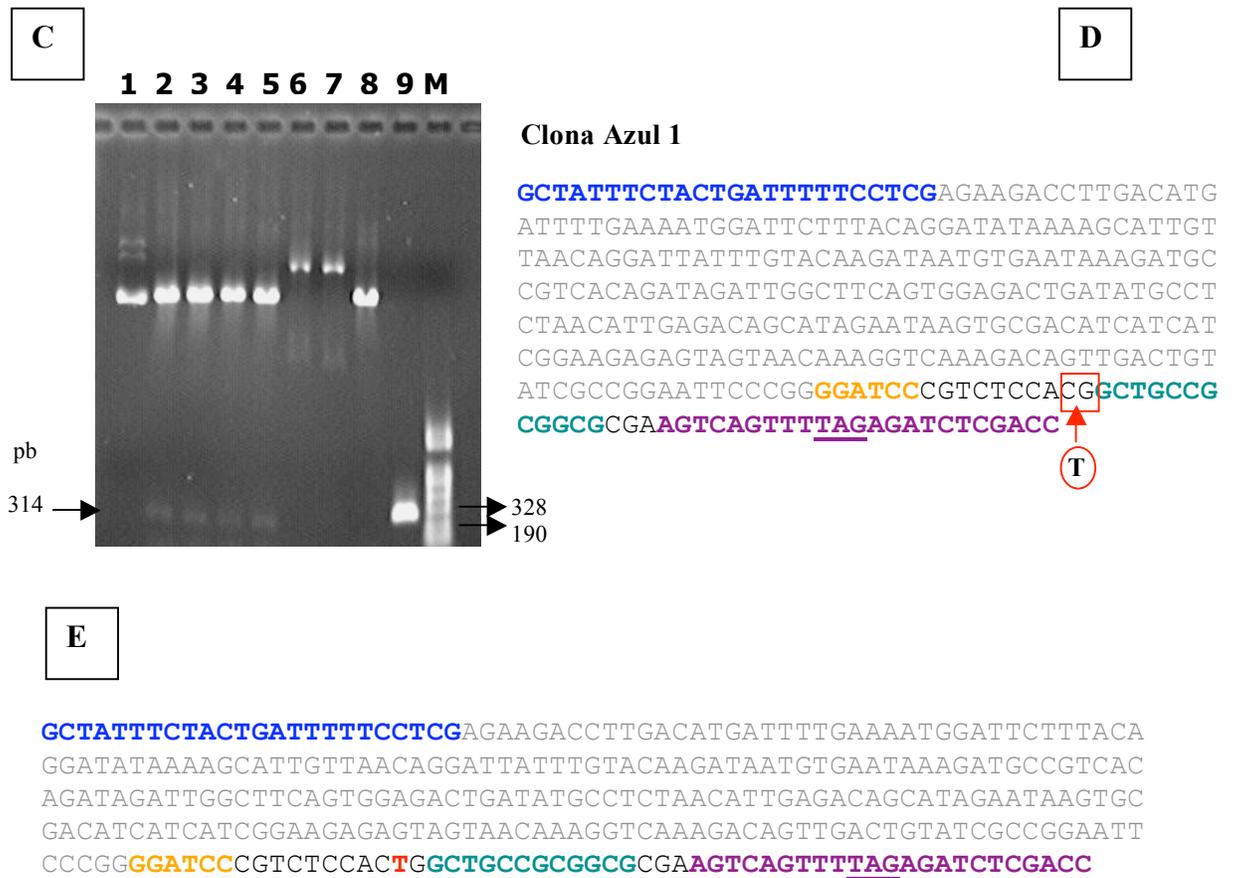


Figura 11. Caracterización del plásmido pPACTGAL4-AAAA mediante PCR y secuenciación. En **A** se muestra el fragmento de 314 pb amplificado mediante PCR usando el DNA plasmídico pPACTGAL4-AAAA como DNA blanco, los oligos VD5' y CU3 (carril 5) y la ausencia de amplificación con los oligos VD5' y VU3'(carril 4). Estos oligos con el DNA del vector como templado amplificaron un fragmento de 307 pb (carril 1) mientras que los oligos VD5' y CU3' no mostraron amplificación debido a la ausencia del inserto (carril 2). Las reacciones de PCR sin DNA blanco se muestran en los carriles 3 y 6. El diagrama en **B** esquematiza la clonación del producto de PCR de 314 pb en el vector pCR 2.1 TOPO y **C** muestra el vector sin digerir (carril 1) y digerido con *EcoR* I (carril 8), los DNAs plasmídicos de las clonas digeridas con *EcoR* I liberaron el fragmento de 314 pb (carril 2-5) correspondiente al producto de PCR (carril 9) mientras que la digestión de las clonas negativas (carriles 6 y 7) liberaron un fragmento inesperado. El carril M corresponde al marcador de peso molecular pBluescript + *Msp* I. En **D** se muestra la secuenciación de una clona positiva que presenta el sitio de restricción *BamH* I (amarillo), la secuencia de los oligonucléotidos VD5'(azul) y CU3'(morado), la secuencia codificante a GAL4 (gris) y al bloque de Alaninas (verde) así como una deleción (Timina) indicada en el codón CTG (rojo). En **E** se muestra la secuenciación del plásmido mutagénico pPACTGAL4-AAAA que presenta el sitio de restricción *BamH* I (amarillo), la secuencia de los oligonucléotidos VD5'(azul) y CU3'(morado), la secuencia codificante a GAL4 (gris) y al bloque de Alaninas (verde) así como el nucleótido Timina introducido mediante mutagénesis sitio dirigida (rojo).

7.1.2 Obtención y purificación de los DNAs plasmídicos recombinantes

Los DNAs plasmídicos recombinantes fueron obtenidos y purificados mediante el uso del kit QIAGEN ya descrito en la sección de materiales y métodos y cuantificados mediante Espectrofotometría en luz ultravioleta para determinar la concentración y calidad de los mismos. La Tabla XIX muestra que la concentración de DNA de los plásmidos a usar en las transfecciones celulares. Los resultados mostraron concentraciones de DNA consideradamente altas que varían de 0.4 a 2.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La relación Abs 260/280 en todos los casos fue mayor de 1.8 lo que indica un bajo contenido de proteínas contaminantes y una buena calidad de los DNAs productores y reporteros para el análisis de transfección en células Schneider.

7.1.3 Efecto del Tetrapéptido YPWM en la actividad transcripcional de Antp

Para analizar la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM de Antennapedia se llevo a cabo la co-transfección de los plásmidos pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} y pNPAC Δ HD así como los plásmidos reporteros pF11CAT y pcopia β -gal en cultivo de células Schneider usando el método de precipitación fosfato de calcio-DNA como se describe en la sección de materiales y métodos. Como se observa en la Figura 12A, los plásmidos productores codifican a la proteínas Antp silvestre; la mutante con sustitución en el tetrapéptido YPWM y la mutante con el homeodominio deletado que se unen al plásmido reportero pF11CAT en los 11 sitios oligomerizados de unión a Antp que dirigen la expresión de la enzima cloranfenicol acetyl transferasa (CAT).

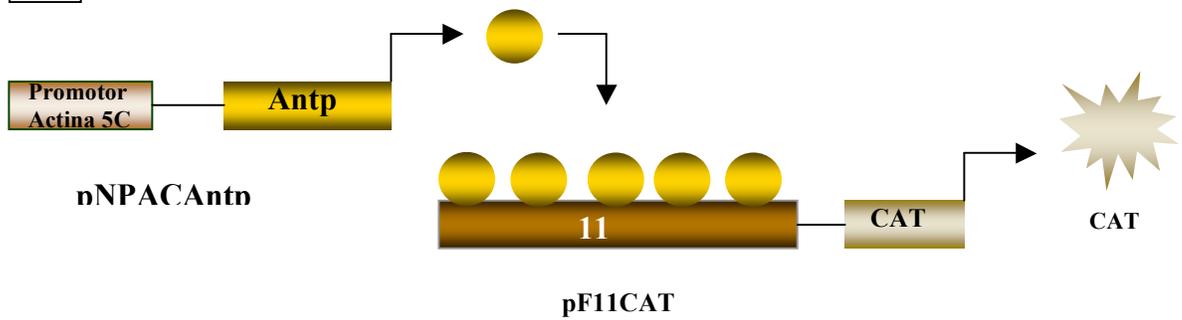
Los resultados obtenidos en la transactivación de Antennapedia y sus mutantes en las células Schneider muestran que la proteína Antennapedia mutante Antp^{AAAA} presentó un aumento en la activación de la transcripción de un 56% en comparación con el 100% dado por Antennapedia silvestre. Como se esperaba el testigo negativo (Antp Δ HD) mostró una actividad de transactivación del 11.4% como se muestra en la figura 12B. Estos resultados sugieren que el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antp presenta probablemente una actividad transcripcional represora en células Schneider.

Tabla XIX
Pureza y concentración de los DNAs purificados

Plásmido	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Concentración $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Abs (260/280)
pNPACAntp	0.337	0.170	1.7	1.982
pNPACAntp ^{AAAA}	0.158	0.081	0.82	1.951

pNPACAntp Δ HHD	0.150	0.075	0.8	2.0
pF11CAT	0.657	0.361	1.6	1.82
pPACTGAL4	0.167	0.081	0.4	2.06
pPACTGAL4-YPWM	0.182	0.100	0.5	1.820
pPACTGAL4-AAAA	0.837	0.443	2.1	1.889
pGL2 5X GAL4 promoter	0.384	0.201	1.0	1.910
pcopia β -gal	0.448	0.248	1.0	1.806

B



B

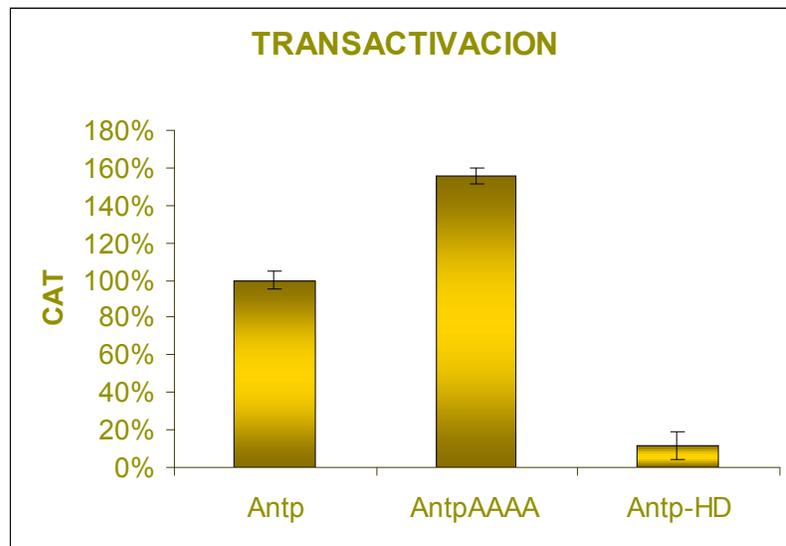


Figura 12. Activación de la transcripción por las proteínas Antp y sus mutantes en células Schneider. El esquema en A representa el mecanismo de transactivación de Antp producida por el

plásmido pNPACAntp con el promotor Actina 5C que dirige la expresión de Antp, que reconoce 11 sitios de unión (BS2) presentes en el plásmido pF11CAT para la activación de la expresión del gen reportero Cloramfenicol-acetil-transferasa (CAT). Los resultados en **B** muestran la media y desviación estándar de la activación del gen reportero CAT por las proteínas Antp, Antp^{AAAA} y Antp Δ HHD producidas por los plásmidos productores pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} y pNPACAntp Δ HHD respectivamente. Cada barra representa la media de tres ensayos independientes y la desviación estándar.

7.1.4 Actividad transcripcional represora del tetrapéptido YPWM de Antp en GAL4

Para analizar la posible actividad represora del tetrapéptido YPWM de Antp se fusionó este motivo a la proteína transactivadora GAL4 de levaduras y se realizaron ensayos de transfección con construcciones recombinantes usando el plásmido productor pPACTGAL4 NS que dirige la expresión de la proteína transactivadora GAL4 así como las mutantes, con y sin el tetrapéptido YPWM en los plásmidos productores pPACTGAL4-YPWM (Cárdenas, 2003) ó pPACTGAL4-AAAA que codifican para las proteínas de fusión GAL4-YPWM ó GAL4-AAAA respectivamente. En el diagrama de la figura 13A se muestra la estrategia experimental que incluye el plásmido reportero pGL25XGAL4promoter con los 5 sitios de unión de la proteína transactivadora GAL4 (UAS) que dirige la expresión del gen reportero Luciferasa.

La figura 13B muestra la activación de la transcripción dada por las proteínas GAL4 en tres experimentos independientes donde la reducción en la transactivación por GAL4-YPWM fue de un 55.3 % en comparación con la activación del 100% dada por la proteína GAL4 sin la fusión y la proteína de fusión GAL4-AAAA no mostró una diferencia significativa (105%). Estos resultados corroboraron que el tetrapéptido YPWM de Antp actúa como un motivo de represión transcripcional en la proteína transactivadora GAL4.

Además, la actividad represora del tetrapéptido YPWM de Antp fue confirmada mediante ensayos de co-expresión de la proteína GAL4 con el plásmido pPACTGAL4 NS en presencia de Antp silvestre (pNPACAntp). Los resultados mostraron un incremento en la transactivación de GAL4 de 115%, mientras que la co-expresión de GAL4 y Antp^{AAAA} mostró un mayor incremento en la transactivación de 184% (Fig. 14). Estos resultados indican la capacidad transactivadora de las homeoproteínas Antp y Antp^{AAAA} en la actividad transcripcional de GAL4 y corroboran que el tetrapéptido YPWM nuevamente mostró una importante función represora en Antp y en la proteína transactivadora GAL4.

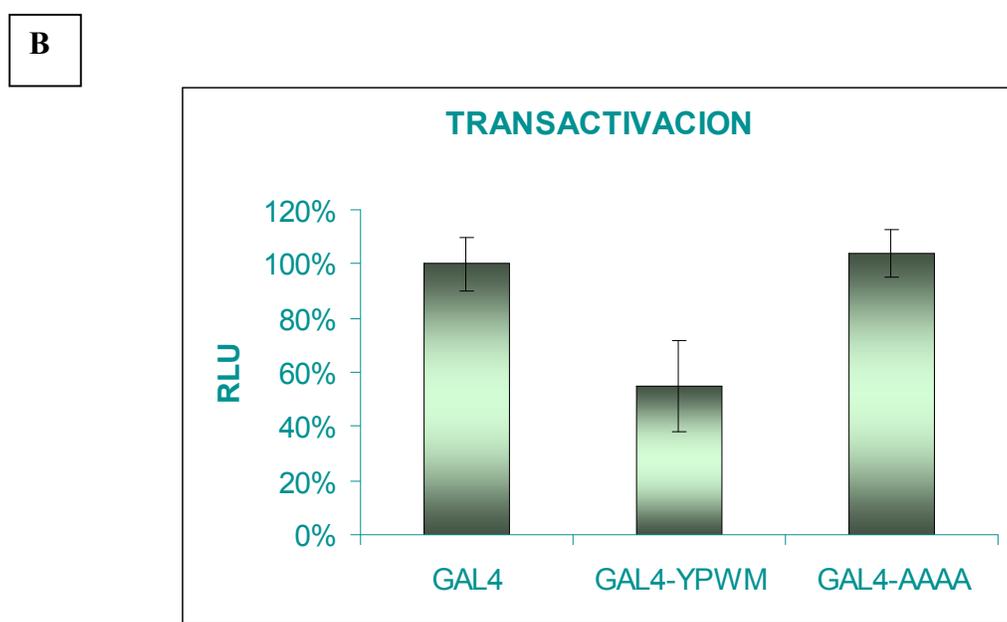
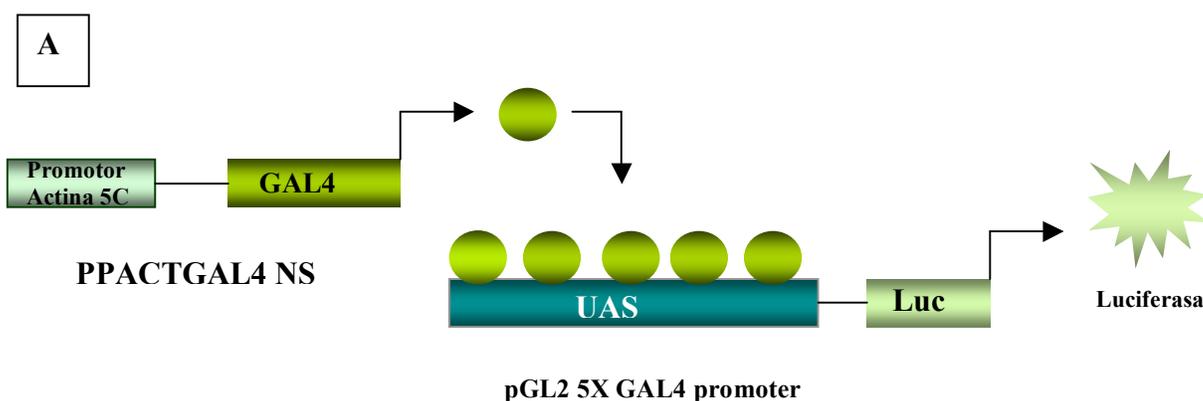


Figura 13. Activación de la transcripción con las proteínas GAL4 y sus mutantes en células Schneider. El esquema en **A** representa el mecanismo de transactivación de la proteína GAL4 donde el plásmido pPACTGAL4 que contiene el promotor de Actina 5C dirige la expresión de la proteína GAL4, la cual se une a los 5 sitios UAS que se encuentran en el plásmido pGL25XGAL4 promoter para activar la expresión del gen reportero Luciferasa (Luc). Los resultados en **B** muestran la media y desviación estándar de activación en porcentaje de Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) de la transcripción producida por la proteína GAL4 y las proteínas de fusión GAL4-YPWM y GAL4-AAAA producidas por los plásmidos recombinantes pPACTGAL4-YPWM y pPACTGAL4-AAAA respectivamente. Cada barra muestra la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

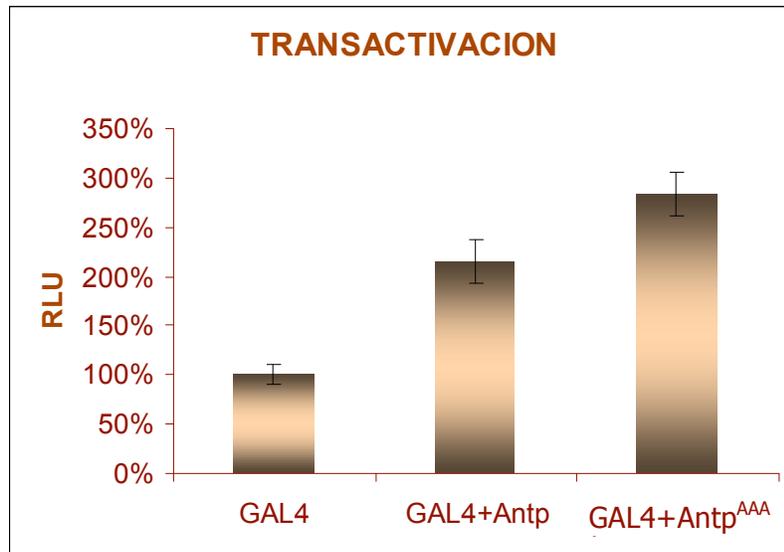


Figura 14. Porcentaje de activación de la transcripción de GAL4 en presencia de Antp y sus mutantes. La gráfica muestra el porcentaje de activación de la transcripción dada por la proteína GAL4 producida por el plásmido pPACTGAL4 NS en ausencia ó presencia de las proteínas Antp y Antp^{AAAA} producidas en la misma célula por los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} respectivamente. Cada barra representa la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

7.2 Expresión y purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y sus mutantes

Con el objetivo de analizar la probable interacción de las proteínas Antp y GAL4 así como sus mutantes en YPWM con los componentes de la maquinaria transcripcional se realizó la expresión y purificación de estas proteínas y su posterior análisis de unión al DNA.

7.2.1 Construcción de los plásmidos recombinantes pMALcAntp y Antp^{AAAA}

Para la construcción de los plásmidos pMALcAntp y pMALcAntp^{AAAA} se requirió inicialmente realizar mutagénesis sitio dirigida en los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} para la introducción de un nuevo sitio de restricción *Xmn* I. La mutagénesis sitio dirigida se realizó empleando el kit QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagénesis Kit con los oligonucleótidos AntpX5' y AntpX3' que permitieron generar un nuevo sitio de restricción para la enzima *Xmn* I antes del codón de inicio de la secuencia codificante a Antp ó Antp^{AAAA} como se muestra en la figura 15A. Los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-*Xmn* I y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I (Figuras 15B y C) fueron analizados mediante Minipreparación para posteriormente ser caracterizados mediante digestión con la enzima de restricción *Xmn* I. En la figura 15B y C la digestión muestra los dos fragmentos esperados de 3737 y 1165 pb liberados en las clonas

positivas para pNPACAntp-*Xmn* I (carriles 2 y 3) y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I (carriles 3-5) en comparación con los fragmentos de 4896 y 3716 pb generados en la digestión de los plásmidos no mutagénicos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} (carril 1).

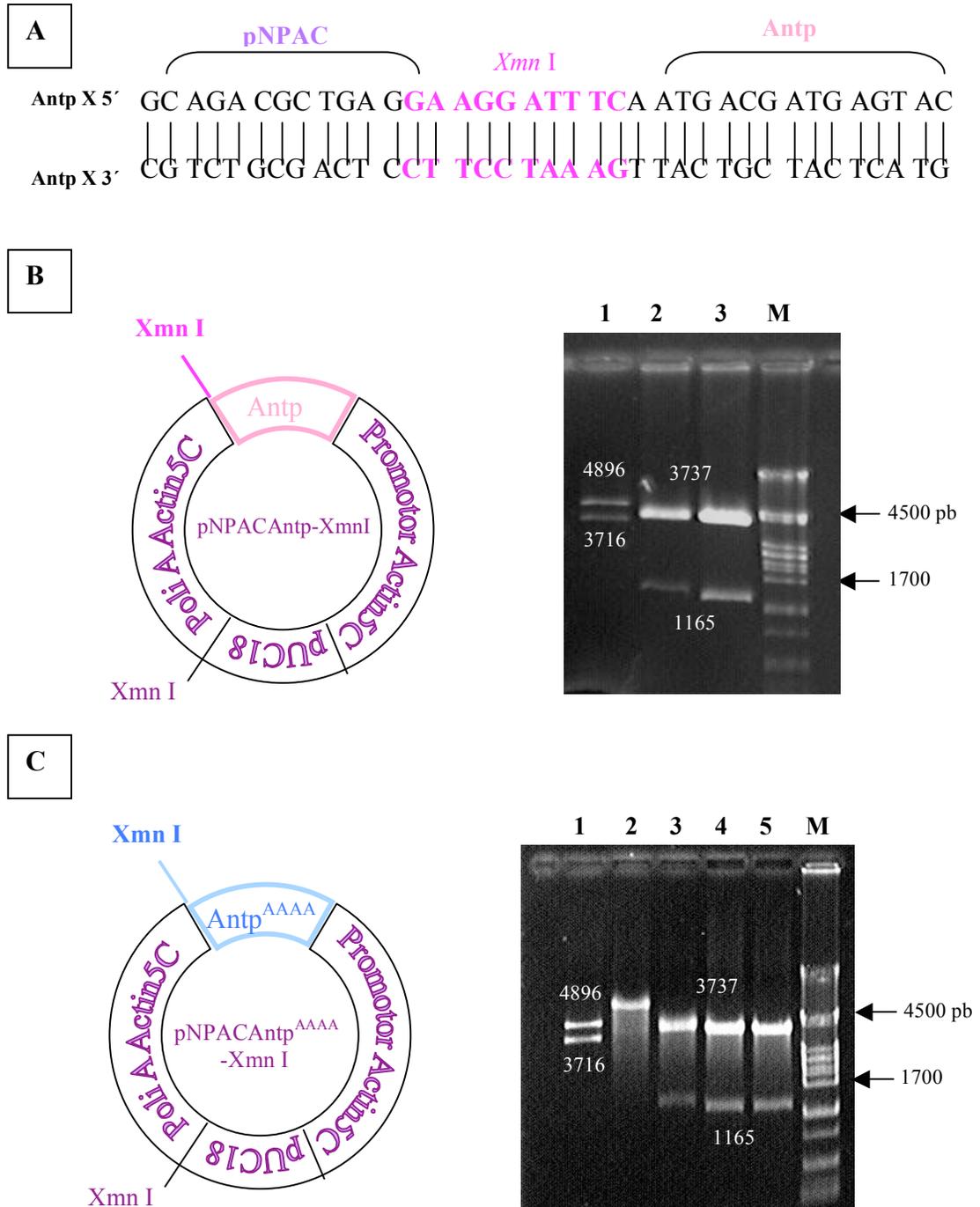


Figura 15. Construcción de los plásmidos pNPACAntp-*Xmn* I y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I. La mutagénesis sitio dirigida para la introducción de un nuevo sitio de restricción de la enzima *Xmn* I (rosa) antes del codón de inicio de la secuencia codificante a *Antp* y *Antp*^{AAAA} se realizó usando los oligonucleótidos sintéticos AntpX 5' y AntpX 3' cuya secuencia nucleotídica se muestra en A. Los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-*Xmn* I (B) y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I (C) se caracterizaron

mediante digestión con la enzima de restricción *Xmn* I liberando los 2 fragmentos esperados de 3737 y 1165 pb (carriles 2-5) a diferencia de los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} (carril 1) que liberan 2 fragmentos de 4896 y 3716p. El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ + *Pst* I.

Para la construcción del plásmido recombinante pMALcAntp (Figura 16A) se realizó la preparación del vector de expresión pMALc-2X mediante digestión con las enzimas de restricción *Xmn* I y *Sal* I, que permitieron obtener el fragmento linearizado de 6723 pb como se muestra en la figura 16B. La preparación del inserto con la secuencia codificante para Antp se obtuvo de la digestión del plásmido mutagénico pNPACAntp-*Xmn* I con las enzimas *Xmn* I y *Sal* I que liberaron 5 fragmentos de 3695, 1171, 1819, 1118 y 815 pb (Figura 16C; carril 1) y el fragmento codificante a Antp de 1819 pb fue posteriormente purificado (Figura 16C; carril 2). Posteriormente, la ligación del vector con la secuencia codificante a Antp fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes. La transformación resultó en una clona positiva a la cual se le extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación y fue caracterizada utilizando enzimas de restricción diagnósticas que mostraron la linearización del plásmido con *Xmn* I y *Sal* I (Figura 16D; carriles 2 y 3) y la digestión con *Pst* I liberó los 2 fragmentos esperados de 7119 y 1423 pb (Figura 16D; carril 1) .

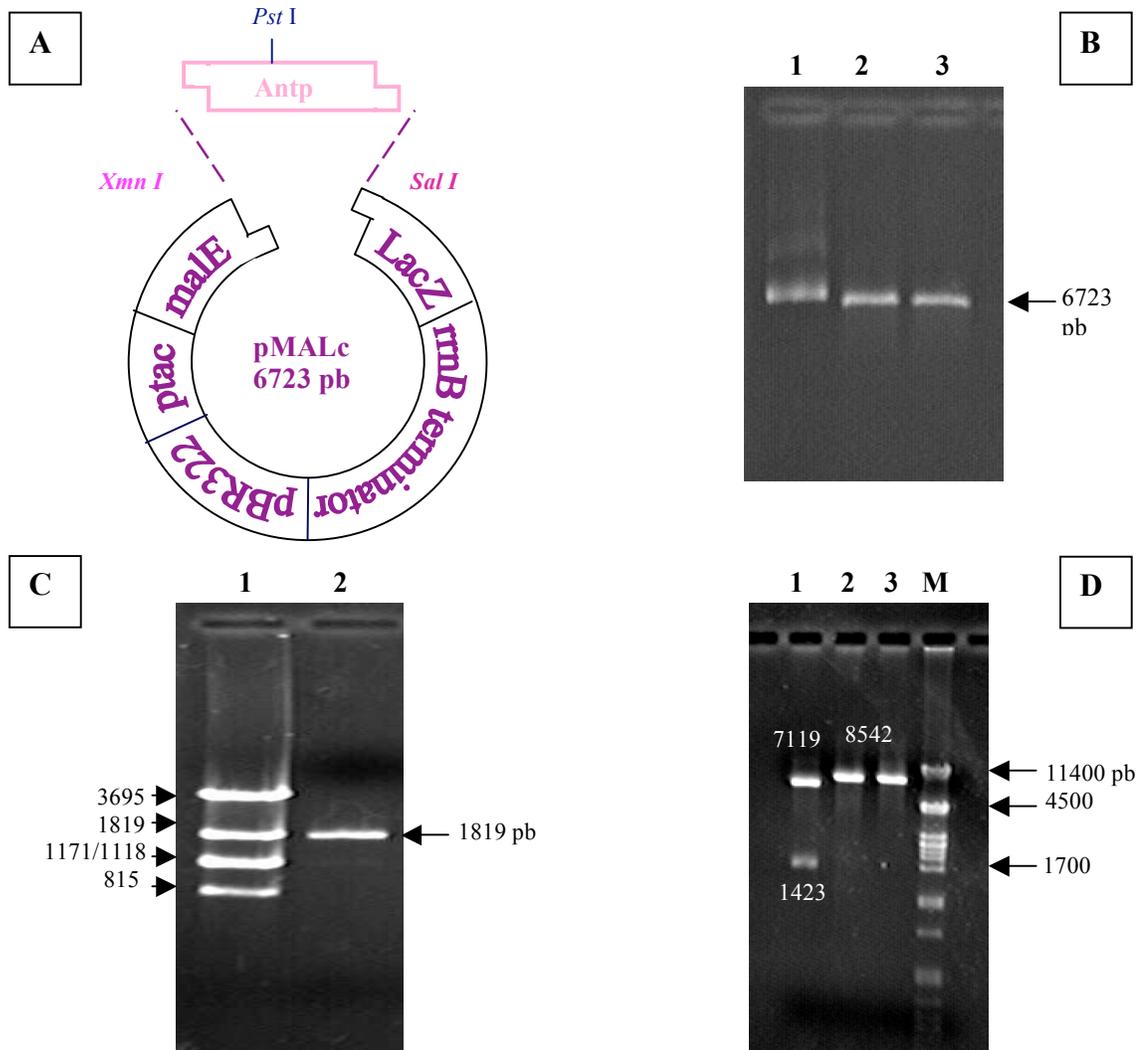


Figura 16. Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp. El diagrama esquemático en **A** representa la ligación de la secuencia codificante a Antp en el vector de expresión pMALc-2X en los sitios *Xmn* I y *Sal* I. En **B** se muestra el vector plasmídico pMALc sin digerir (carril 1) y digerido con las enzimas *Xmn* I y *Sal* I (carril 2) y después de ser precipitado (carril 3). En **C** se muestra la digestión del plásmido pNPACAntp-*Xmn* I con las enzimas *Xmn* I y *Sal* I (carril 1) así como la purificación del fragmento de 1819 pb correspondiente a Antp (carril 2). La caracterización enzimática del plásmido recombinante pMALcAntp se visualiza en **D** donde se muestra linearización con las enzimas *Xmn* I (carril 2), *Sal* I (carril 3) y *Pst* I liberando 2 fragmentos de 7119 y 1423 pb (carril 1). El carril M corresponde al marcador de peso molecular $\lambda + Pst$ I.

Para la construcción del plásmido recombinante pMALcAntp^{AAAA}, el vector plasmídico pMALc-2X fue preparado mediante digestión con las enzimas de restricción *Xmn* I y *Sal* I (Figura 17B; carril 1). El inserto con la secuencia codificante para la proteína mutante Antp^{AAAA} se obtuvo del plásmido mutagénico pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I digerido con las enzimas *Xmn* I y *Sal* I liberando 5 fragmentos de 3695, 1819, 1171, 1118 y 815 pb para posteriormente purificar el fragmento codificante a Antp^{AAAA} de 1819 pb (Figura 17C; carril 2). La ligación del vector linearizado con el inserto fue utilizada en la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes, obteniéndose una clona positiva que fue procesada para la extracción del DNA plasmídico mediante Minipreparación, esta clona fue linearizada con las enzimas *Xmn* I, *Sal* I y *Sma* I y la digestión con *Pst* I liberó los 2 fragmentos de 7119 y 1423 pb como se esperaba para el plásmido recombinante pMALcAntp^{AAAA} (Figura 17D; carril 1).

7.2.2 Expresión y purificación de las proteínas de fusión MBP-Antp y MBP-Antp^{AAAA}

La expresión de la proteína de fusión MBP-Antp fue realizada a partir del plásmido recombinante pMALcAntp en la cepa de expresión *Escherichia coli* TB1 calcio-competente. La figura 18A ilustra la estrategia de expresión y purificación de la proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a Antennapedia con un peso molecular de 84.7 kDa. Para ello, la expresión de los extractos bacterianos mostró la inducción de la proteína de fusión MBP-Antp a diferentes horas con IPTG como se esperaba a 84.7 kDa (Figura 18B; carril 4-7), mientras que la expresión de la proteína MBP no fusionada fue de 42 kDa (carril 2). La purificación de la proteína de fusión MBP-Antp se realizó a partir del extracto protéico de expresión en una columna de amilosa por cromatografía de afinidad donde las fracciones colectadas fueron eluidas con maltosa 10 mM (Figura 18C). La producción de la proteína de fusión purificada de 84.7 kDa fue de 120 μ g por litro de cultivo con un total de 360 μ g totales.

La expresión de la proteína Antp^{AAAA} fusionada a MBP a partir del plásmido recombinante pMALcAntp^{AAAA} así como la estrategia de purificación se muestran en la figura 19A. La figura 19B muestra la expresión de la proteína de fusión MBP-Antp^{AAAA} a diferentes horas de inducción con IPTG con el tamaño esperado de 84.7 kDa (carriles 3-6) en comparación con la proteína MBP no fusionada de 42 kDa (carril 2). La purificación de la proteína de fusión se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando una resina de amilosa y elución con maltosa 10mM, las fracciones colectadas

de la elusión se muestran en la figura 19C donde la mayor concentración de proteína esta presente en las elusiones 6-8 (carriles 2-4). La producción de la proteína purificada MBP-Antp^{AAAA} fue de un total de 0.6 mg por litro de cultivo con un total de 1.8 mg totales.

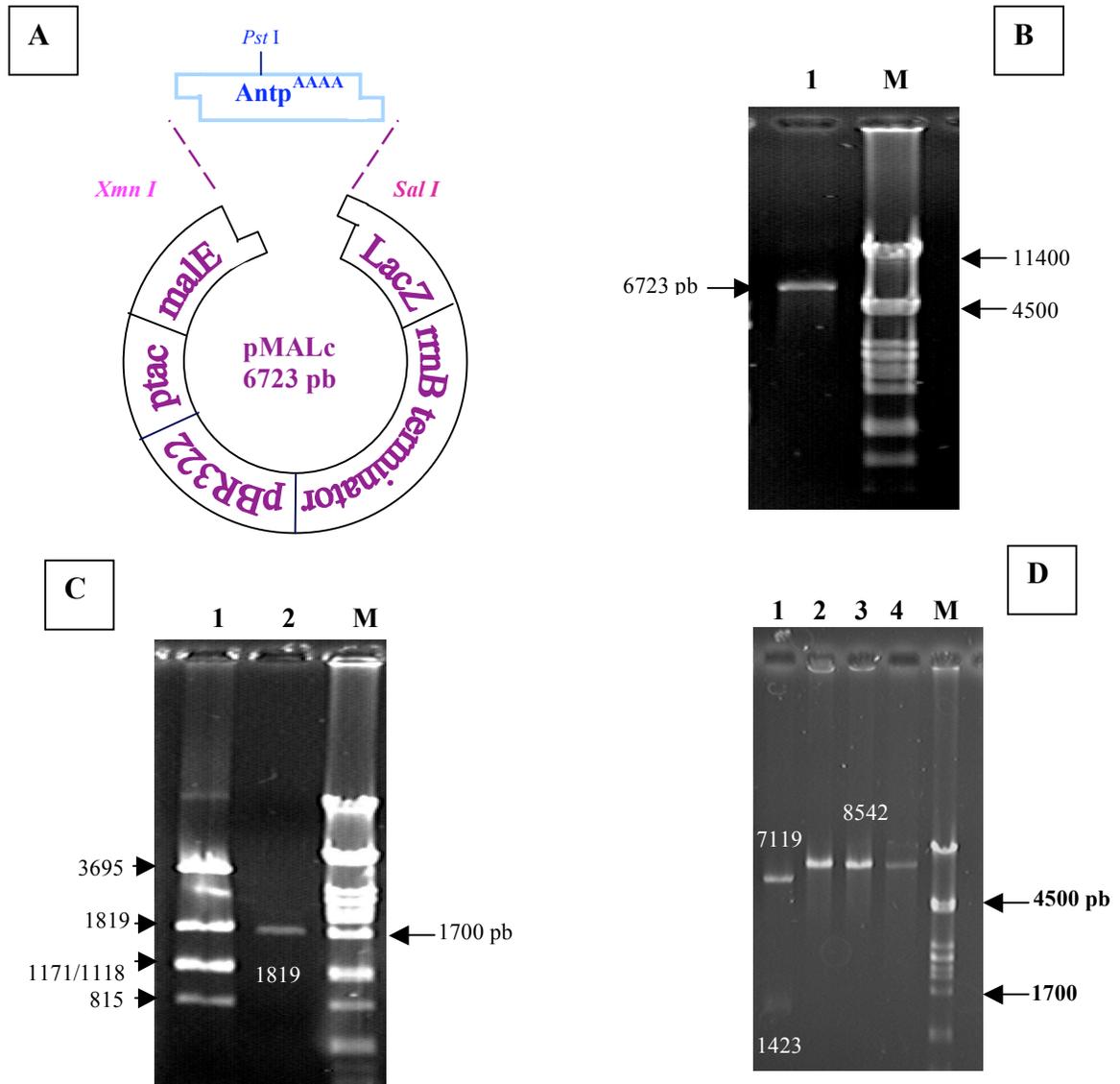


Figura 17. Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp^{AAAA}. El diagrama esquemático en **A** representa la clonación de la secuencia codificante a Antp^{AAAA} en el vector de expresión pMALc-2X en los sitios *Xmn* I y *Sal* I. En **B** se muestra un gel de agarosa al 0.8% con el vector plasmídico pMALc digerido con *Xmn* I y *Sal* I después de ser precipitado (carril 1). En **C** se muestra la digestión del plásmido mutagénico pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I con las enzimas *Xmn* I y *Sal* I (carril 1) y la purificación del inserto de 1819 pb correspondiente a Antp^{AAAA} (carril 2). En **D** se muestra la caracterización enzimática del plásmido pMALcAntp^{AAAA} linearizado con *Xmn* I (carril 2), *Sal* I (carril 3), *Sma* I (carril 4) y *Pst* I que liberó 2 fragmentos de 1423 y 7119 pb (carril 1). El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ +*Pst* I.

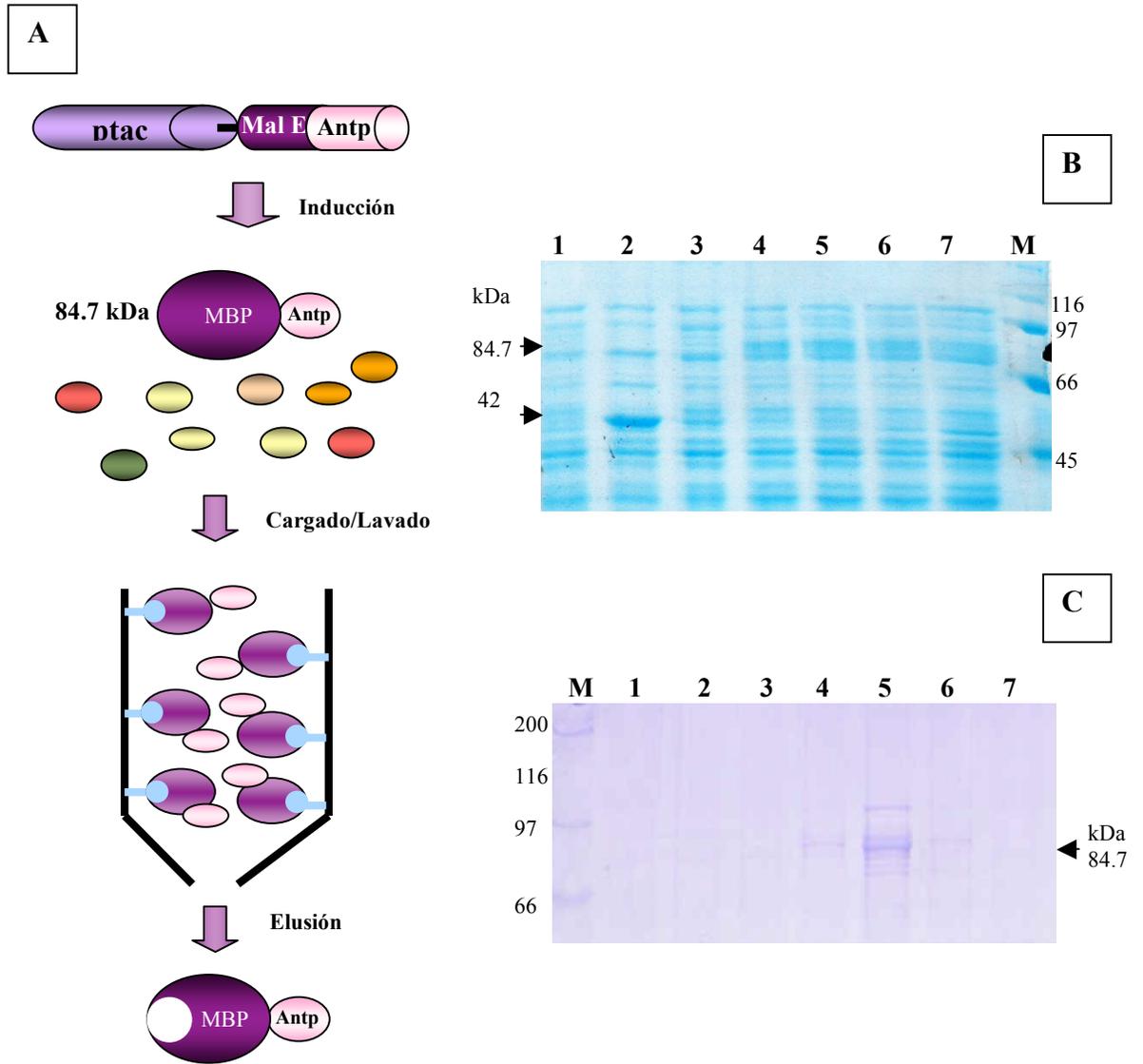


Figura 18. Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp en columna de amilosa. El diagrama esquemático en A representa el fragmento del plásmido pMALcAntp que posee el promotor ptac para la producción de la proteína recombinante MBP-Antp de 84.7 kDa, la cual será purificada por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa. El gel de poliacrilamida al 7.5% en B muestra 10 μ l del extracto bacteriano de *E. coli* TB1 transformado con el vector pMALc sin inducir (carril 1) e inducido 2 horas con IPTG donde mostró la expresión de la proteína MBP de 42 kDa (carril 2). El carril 3 contiene el extracto de pMALcAntp sin inducir y los carriles 4 al 7 muestran la inducción de la proteína de fusión MBP-Antp de 84.7 kDa a 2, 4, 6 y 8 horas respectivamente. En C se muestran en un gel de poliacrilamida al 7.5% las fracciones 7 al 13 colectadas en la elusión de la proteína de fusión MBP-Antp de la columna de amilosa utilizando maltosa 10mM (carriles 1-7). El carril M corresponde al marcador de amplio espectro molecular (Biorad).

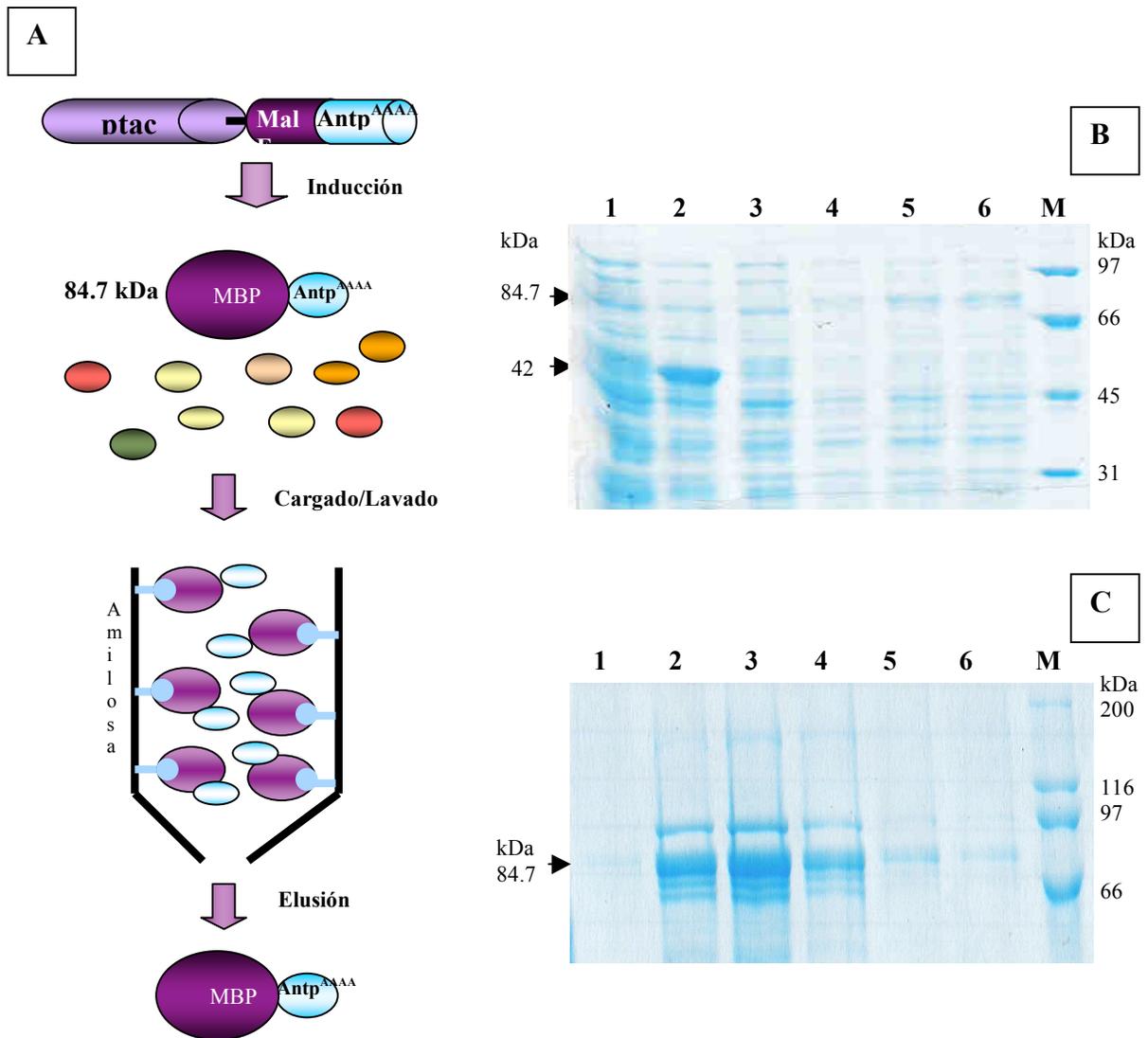


Figura 19. Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp^{AAAA}. El diagrama esquemático en A representa el fragmento del plásmido pMALcAntp^{AAAA} que codifica para la proteína recombinante MBP-Antp^{AAAA} de 84.7 kDa. En B el gel de poliacrilamida al 7.5% contiene 10 µl del extracto bacteriano transformado con el vector sin inducir (carril 1) e inducido 2 horas con IPTG con la expresión abundante de la proteína MBP de 42 kDa (carril 2). Los extractos de pMALcAntp^{AAAA} sin inducir (carril 3) e inducidos por 2, 4, 6 horas (carriles 4-6) muestran la expresión de la proteína MBP-Antp^{AAAA} de 84.7 kDa. En C el gel de poliacrilamida al 7.5% muestra las fracciones colectadas 5 al 10 en los carriles 1-6 respectivamente en la elusión de la proteína de fusión MBP-Antp^{AAAA} de la columna de amilosa. M= marcador de amplio espectro molecular (Biorad).

7.2.3 Construcción del plásmido recombinante pMALcAntpΔHD

La estrategia de construcción del plásmido pMALcAntpΔHD consistió en sustituir el extremo 3' de Antp del plásmido pMALcAntp por el extremo 3' de AntpΔHD ya que ambas proteínas presentan el mismo extremo N-terminal y se diferencian solamente en

el extremo C-terminal (Figura 20A). La preparación del inserto con la secuencia codificante a Antp Δ HHD se obtuvo de la digestión del plásmido pNPACAntp Δ HHD con las enzimas *Sma* I y *Sal* I dando como resultado los 4 fragmentos esperados de 3047, 2719, 1272 y 1118 pb para la posterior purificación del fragmento de 1118 pb (figura 20B; carril 2). El vector plasmídico pMALcAntp se preparó mediante digestión con las enzimas *Sma* I y *Sal* I, liberando dos fragmentos de 1766 y 6776 pb que fue posteriormente purificado (Figura 20C; carril 2 y 3). La ligación del vector de 6776 pb con el inserto fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes y resultó en 4 colonias probables cuyo DNA plasmídico fue obtenido por Minipreparación y caracterizado con las enzimas *Sma* I, *Sal* I y *Pst* I. En la figura 20D se muestra la linearización de una clona recombinante con las enzimas *Sma* I y *Sal* I (carriles 3 y 4) así como los fragmentos de 7119 y 929 pb obtenidos en la digestión con *Pst* I (carril 2) lo que corrobora la identidad del plásmido pMALcAntp Δ HHD.

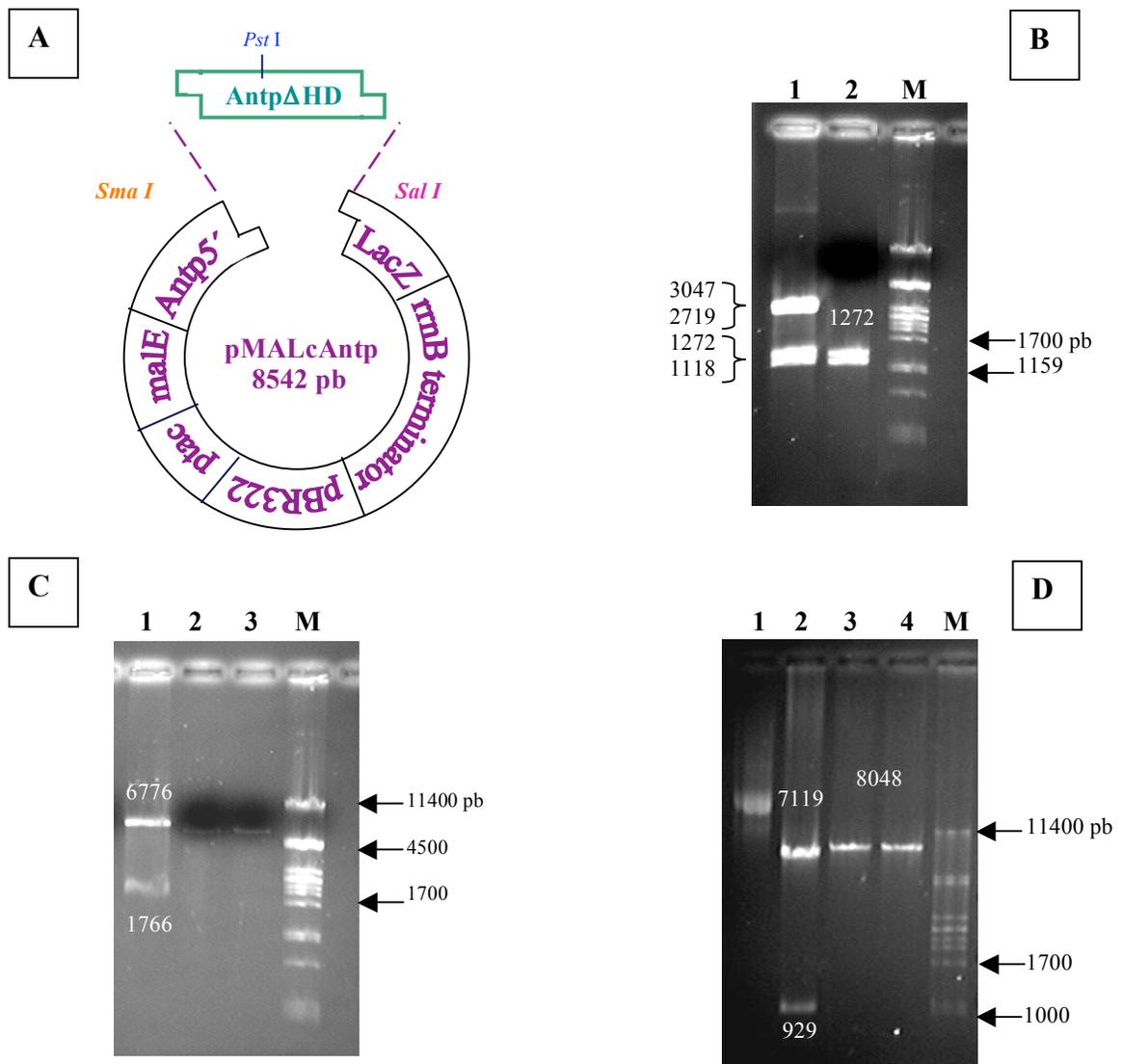


Figura 20. Construcción del plásmido recombinante pMALcAntp Δ HHD. El esquema en A representa la ligación de la secuencia codificante de Antp Δ HHD en el vector de expresión pMALc. En B se muestra la

digestión del DNA plasmídico pNPACAntp Δ HD con las enzimas de restricción *Sma* I y *Sal* I que libera cuatro fragmentos de 3047, 2719, 1272 y 1118 pb (carril 1) y la purificación de los fragmentos de 1272 (Antp Δ HD) y 1118 pb (carril 2). C muestra la digestión del plásmido pMALcAntp con las enzimas *Sma* I y *Sal* I (carril 1) y su purificación (carril 2 y 3). En D se muestra la construcción pMALcAntp Δ HD si digerir (carril 1) y linearizado con *Sma* I y *Sal* I (carriles 3 y 4) así como los fragmentos de 7119 y 929 pb de la digestión con *Pst* I (carril 2). El carril M corresponde al marcador de peso molecular λ +*Pst* I.

7.2.4 Expresión de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD

La expresión de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD fue obtenida mediante transformación del plásmido recombinante pMALcAntp Δ HD en la cepa de expresión *Escherichia coli* TB1 calcio-competente. La figura 21A ilustra la estrategia de expresión y purificación de la proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a Antp Δ HD con un peso molecular de 69.1 kDa. Para ello, se realizó la expresión en el cultivo bacteriano con IPTG mostrando la producción de la proteína MBP-Antp Δ HD con el peso molecular esperado de 69.1 kDa (Figura 21B; carriles 4-8). La proteína de fusión MBP-Antp Δ HD fue purificada en una columna de amilosa a partir del extracto protéico inducido, colectando 6 fracciones en las cuales se detectó la proteína de 69.1 kDa a diferentes concentraciones (Figura 21C; carriles 2-7). La producción obtenida de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD fue 3.8 mg por litro con un total de 11.4 mg totales.

7.3 Expresión y purificación de las proteínas de fusión GAL4 y sus mutantes en YPWM

7.3.1 Proteína de fusión GST-GAL4

El plásmido pGEX-CS-GAL4 DBD de 5393 pb donado amablemente por el Dr. Johnston (Li Q. *et al.*, 2001) contiene el promotor ptac que dirige la expresión de la proteína GST (Glutathione-S-transferasa) fusionada al dominio de unión al DNA (DBD) de GAL4 cuya secuencia codificante fue clonada en los sitios de restricción *Nco* I y *EcoR* I en el plásmido pGEX-CS (Figura 22A). La figura 22B muestra el DNA plasmídico caracterizado mediante digestión con enzimas de restricción resultando en la linearización del plásmido con *EcoR* I, *BamH* I-*Nco* I y *Nco* I-*Sma* (carriles 1, 3 y 4) y la digestión con *Hinc* II liberó los 5 fragmentos esperados de 2553, 1002, 991, 694 y 153 pb (carril 2).

La expresión del plásmido pGEX-CS-GAL4 DBD en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS calcio-competente mostró la proteína de fusión GST-GAL4 con el peso molecular esperado de 42 kDa en la inducción a 4 horas con IPTG (Figura 22C; carril 2). La purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 se realizó a partir del extracto protéico de expresión en una columna de Sepharosa 4B por cromatografía de afinidad donde las fracciones colectadas fueron eluidas con glutathion 5mM (Figura 22D;

carriles 1-7). La purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 de 42 kDa fue de un total de 230 μ g por litro de cultivo.

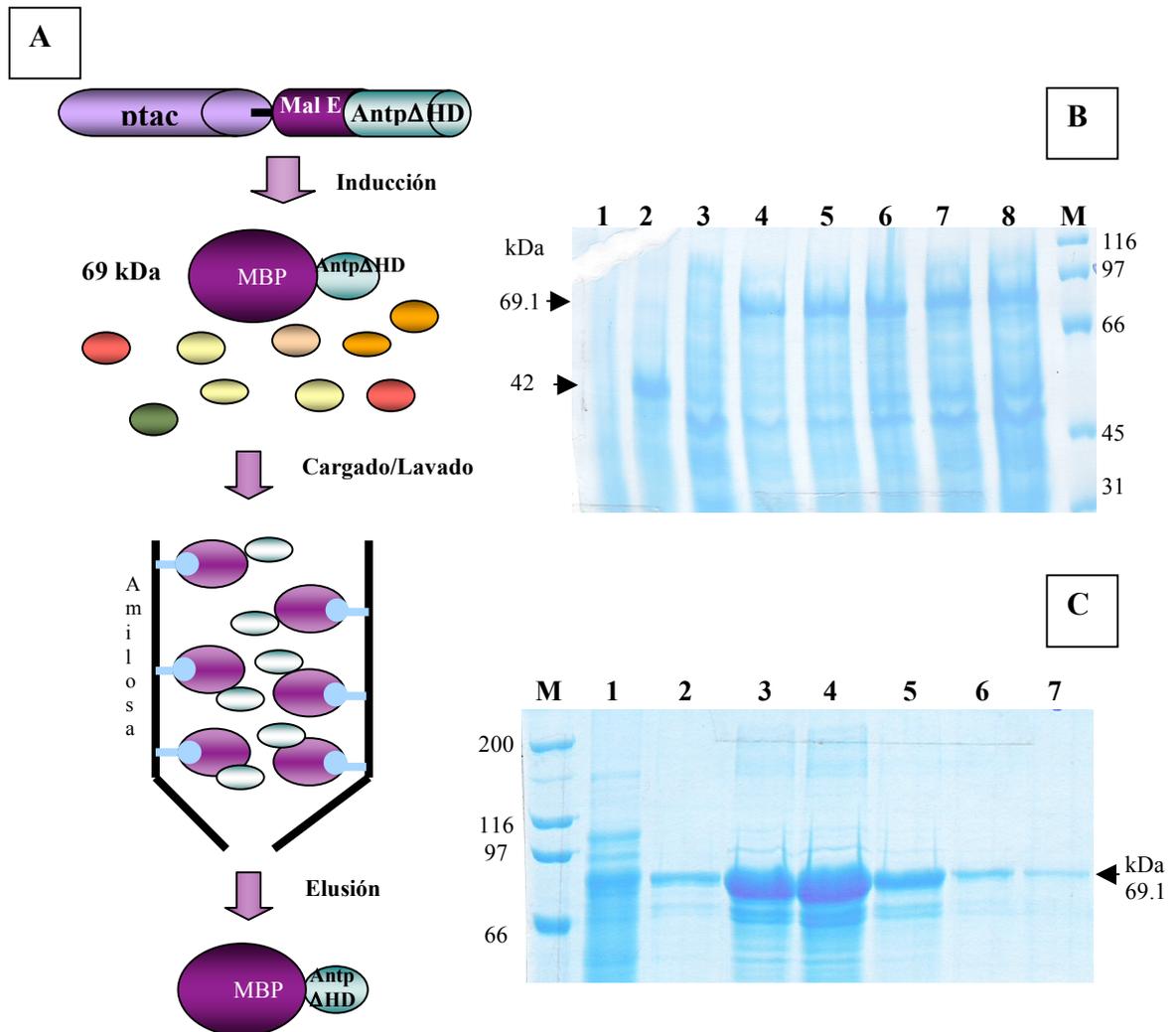


Figura 21. Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD. El esquema en A representa el fragmento del plásmido pMALcAntp Δ HD con el promotor ptac que dirige la expresión de la proteína recombinante para su purificación por una resina de amilosa. El gel de poliacrilamida al 7.5% en B contiene extracto bacteriano de *E. coli* TB1 transformado con el vector pMALc sin inducir (carril 1) e inducido 2 horas con IPTG donde mostró la expresión de la proteína MBP de 42 kDa (carril 2). El carril 3 contiene el extracto de pMALcAntp Δ HD sin inducir e inducido a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas (carriles 4-8) donde se observa la expresión de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD de 69.1 kDa. En C se muestra en un gel de poliacrilamida al 7.5% la inducción del extracto bacteriano de pMALcAntp Δ HD a las 4 horas (carril 1) y las fracciones 2 al 7 colectadas en la elusión de la proteína de fusión MBP-Antp Δ HD de la columna de amilosa (carriles 2-7). El carril M corresponde al marcador de amplio espectro molecular (Biorad).

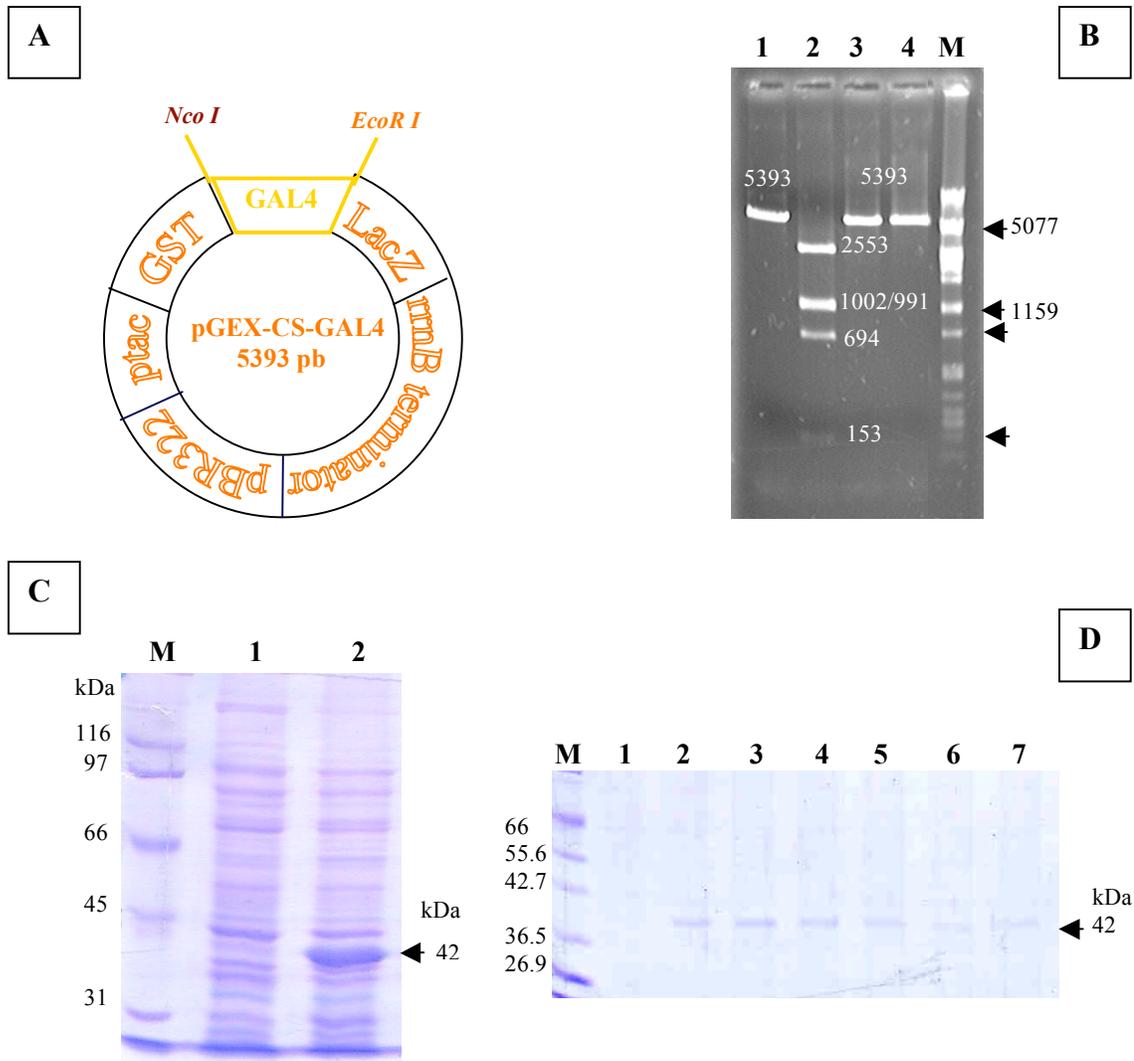


Figura 22. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4 DBD. El diagrama en **A** representa el plásmido pGEX-CS-GAL4 DBD con los sitios *Nco* I y *EcoR* I. El gel de agarosa al 0.7% en **B** muestra la linearización del plásmido pGEX-CS-GAL4DBD con las enzimas *EcoR* I (carril 1), *BamH* I-*Nco* I (carril 3), *Sma* I-*Nco* I (carril 4) y *Hinc* II que libera 5 fragmentos de 2553, 1002, 991, 694 y 153 (carril 2). El gel de poliacrilamida al 7.5% en **C** muestra 10 μ l del extracto bacteriano de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformado con el plásmido pGEX-CS-GAL4DBD sin inducir (carril 2) e inducido a 4 horas con IPTG con la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4DBD de 42 kDa (carril 3) y el carril M corresponde al marcador de amplio espectro molecular (Biorad). En **D** se muestran las fracciones 1 al 7 colectadas en la elución de la proteína de fusión GST-GAL4 de la columna de Sepharose 4B utilizando Glutation 5mM (carriles 1-7). M= marcador molecular Multimark (Invitrogen).

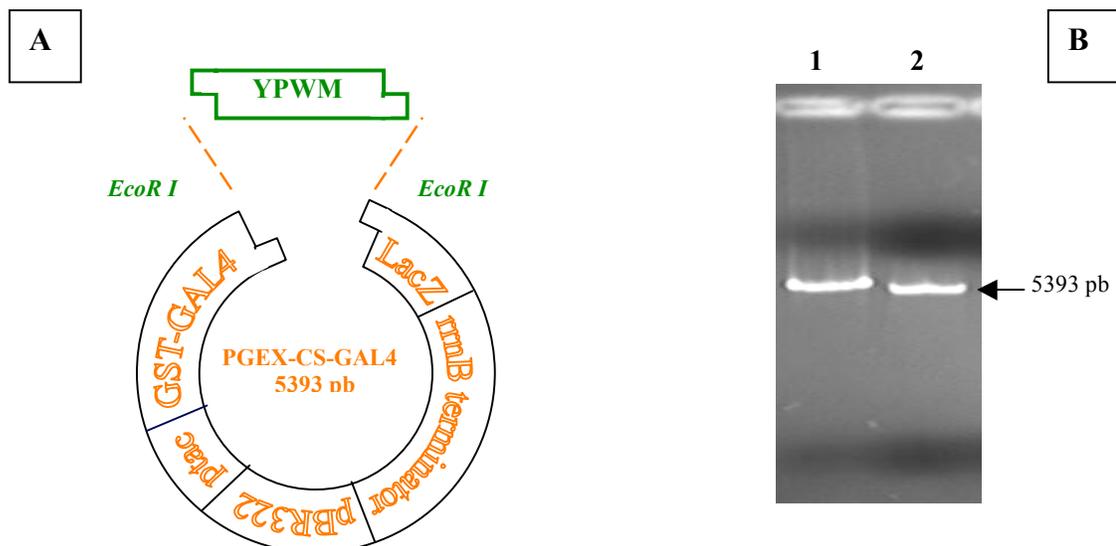
7.3.2 Proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM}

La construcción del plásmido recombinante pGEX-GAL4-YPWM se realizó mediante la clonación del inserto codificante a YPWM como se muestra en el diagrama de la figura 23A. Este inserto codifica a un péptido de 13 aminoácidos de los cuales 12

aminoácidos pertenecen a la proteína Antp con los aminoácidos centrales que corresponden al tetrapéptido YPWM y el último aminoácido corresponde al codón de terminación (Cárdenas-Chávez, 2003). La preparación del vector de expresión pGEX-CS-GAL4-DBD se realizó mediante linearización con la enzima de restricción *EcoR* I, liberando el fragmento de 5393 pb como se muestra en la figura 23B (carril 2). Por otra parte, la preparación del inserto se obtuvo de la digestión del plásmido pPACTGAL4-YPWM con la enzima *EcoR* I liberando un fragmento de 1121 pb correspondiente al motivo YPWM y aminoácidos flanqueantes (Figura 23C; carriles 2 y 3).

Posteriormente, la ligación del vector con el inserto fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes que mostraron 124 clonas a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico mediante Minipreparación y fueron diferenciadas del vector en base a su movilidad electroforética mostrando una clona probable para el plásmido pGEX-GAL4-YPWM que fue caracterizada con enzimas de restricción diagnósticas. La digestión muestra en la figura 23D un fragmento 1121 pb con *EcoR* I y otro de 466 pb en las digestiones BamH I-*Nco* I y *Nco* I-*Sma* I (carriles 1, 3 y 4) así como la liberación de 5 fragmentos de 2553, 1812, 1002, 991 y 153 pb con *Hinc* II (carril 2).

La introducción del inserto en el vector altera el marco de lectura en el plásmido recombinante, por lo que el plásmido pGEX-GAL4-YPWM fue sometido a mutagénesis sitio dirigida empleando el kit QuikChange[®] XL Site Directed Mutagénesis kit y los oligonucleótidos GYA5' y GYA3' para introducir un nucleótido extra (C) en el extremo 3' de GAL4 antes del sitio *EcoR* I (Figura 24A) que permita recuperar el marco de lectura. Este plásmido pGEX-GAL4-YPWM mutagénico fue analizado mediante secuenciación para confirmar la presencia del inserto así como la inserción del nucleótido de interés (Figura 24B).



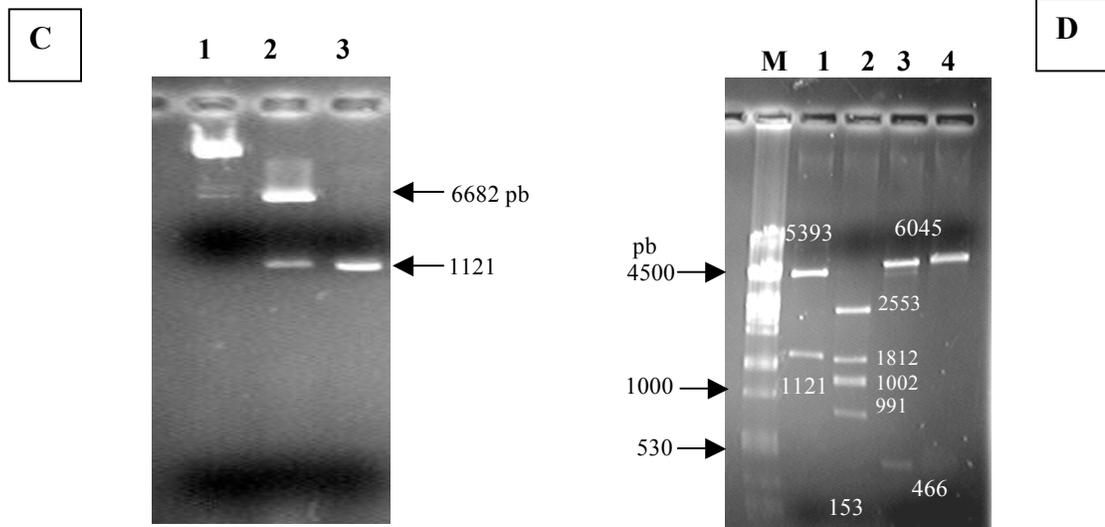


Figura 23. Construcción del plásmido recombinante pGEX-GAL4 YPWM. El esquema en **A** representa la estrategia usada para la ligación de la secuencia codificante al tetrapéptido YPWM en el extremo 3' de GAL4 del vector de expresión pGEX-CS-GAL4. En **B** se muestra un gel de agarosa al 0.8% de la preparación del vector pGEX-CS-GAL4 DBD digerido con la enzima de restricción *EcoR* I (carril 1) y su purificación (carril 2). **C** muestra la digestión del DNA plasmídico pPCTGAL4-YPWM con *EcoR* I que libera un fragmento de 1121 pb correspondiente al inserto (carril 2) que fue posteriormente purificado (carril 3) y en **D** se confirma el patrón de restricción esperado del plásmido recombinante pGEX-GAL4-YPWM con las enzimas *EcoR* I (carril 1), *Hinc* II (carril 2), *Nco* I-*Bam*H I (carril 3) y *Sma* I-*Nco* I (carril 4). M= marcador de peso molecular λ + *Pst* I.

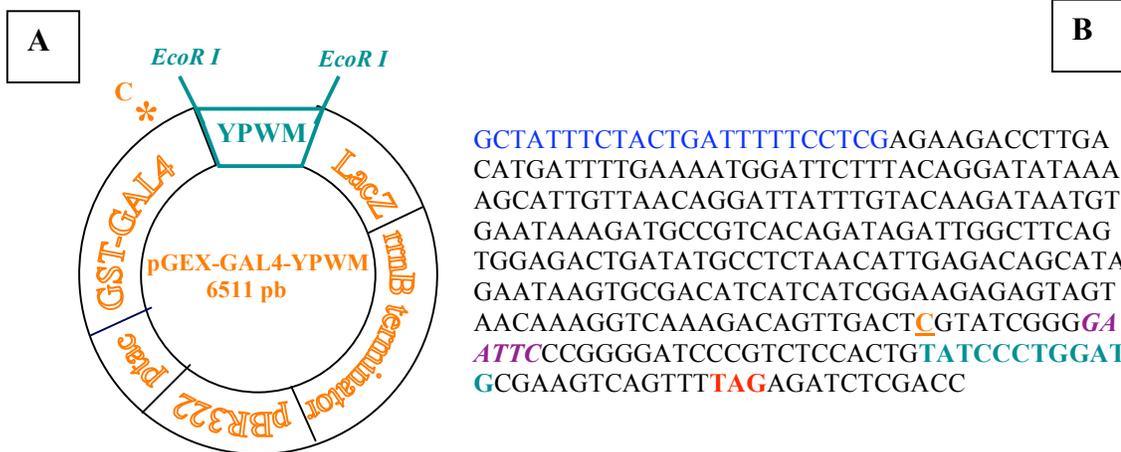


Figura 24. Mutagénesis sitio dirigida del plásmido recombinante pGEX-GAL4-YPWM. El esquema en **A** representa el sitio de inserción de un nucleótido (**C**) mediante mutagénesis sitio dirigida en el plásmido pGEX-GAL4-YPWM en el extremo 3' de GAL4 antes del sitio *EcoR* I para conservar el marco de lectura. La secuencia nucleotídica en **B** muestra el oligonucleótido VD5' empleado para secuenciar (azul), el sitio *EcoR* I (morado), la secuencia codificante al tetrapéptido YPWM (verde), codón de termino (rojo) y el nucleótido Citosina (naranja).

La expresión del plásmido mutagénico pGEX-GAL4-YPWM fue realizada en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS calcio-competente. La figura 25A ilustra la estrategia de expresión y purificación de la proteína recombinante GST-GAL4 fusionada al tetrapéptido YPWM con un peso molecular de 43.5 kDa. Para ello, la expresión de los

extractos bacterianos mostró la inducción de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM} como se esperaba de 43.5 kDa (Figura 25B; carriles 2-5). La purificación de la proteína de fusión se realizó a partir del extracto protéico de expresión mediante cromatografía de afinidad empleando una resina de Sepharosa 4B y elusión con glutatión 5mM, las fracciones colectadas de la elusión se muestran en la figura 25C (carriles 2-7). La purificación de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM} fue de un total de 210 µg por litro de cultivo.

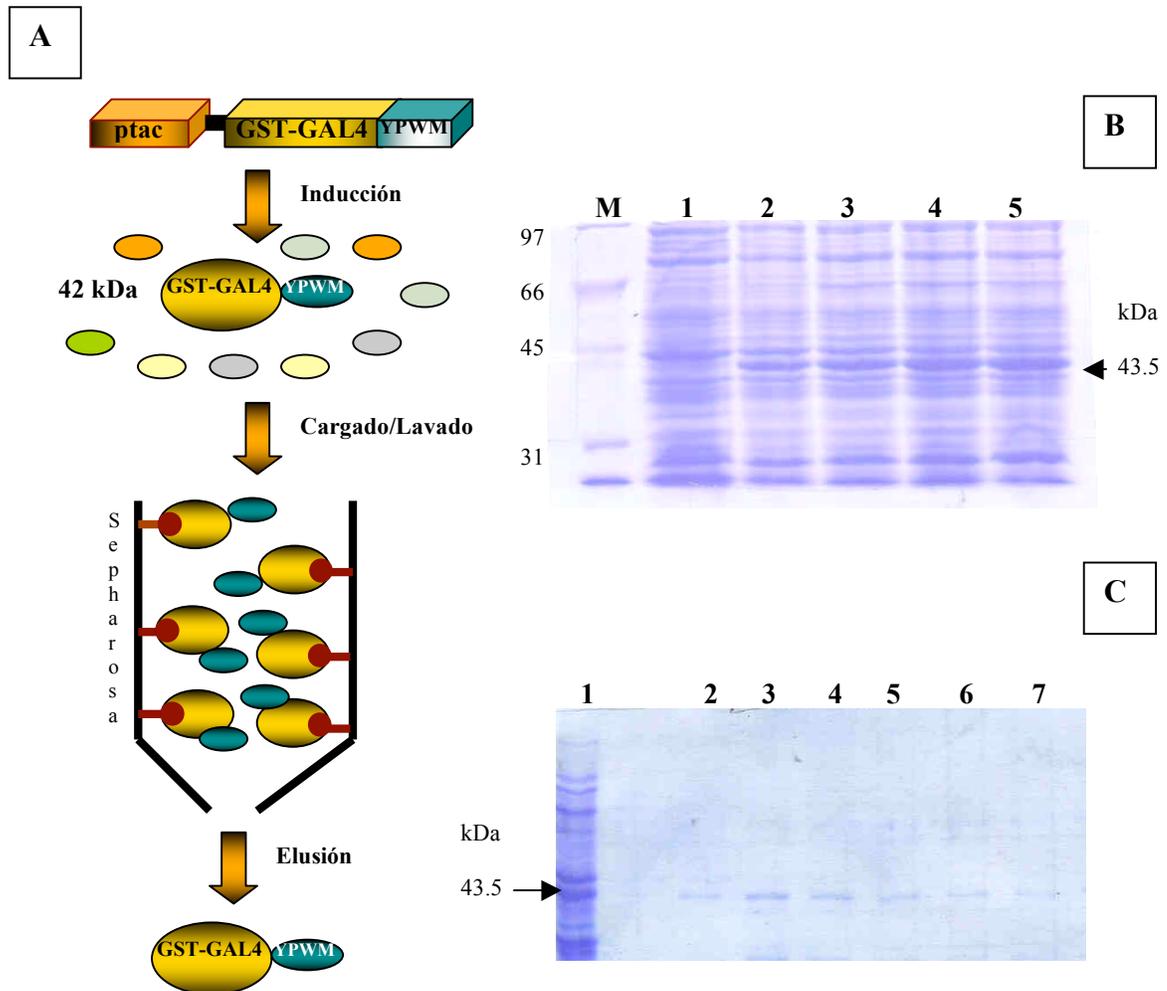


Figura 25. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM}. El diagrama esquemático en A muestra el fragmento del plásmido pGEX-GAL4-YPWM con el promotor *ptac* para la expresión de la proteína recombinante GST-GAL4-YPWM de 43.5 kDa y su purificación por cromatografía de afinidad utilizando una resina de Sepharosa 4B. En B se muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% contiene 10 µl del extracto bacteriano transformado con el plásmido pGEX-GAL4-YPWM sin inducir (carril 1) e inducido por 2, 4, 6 y 8 horas (carriles 2-5) donde se muestra la expresión de la proteína de fusión GAST-GAL4-YPWM de 43.5 kDa. El gel de poliacrilamida al 7.5% en C muestra las fracciones colectadas en la elusión de la proteína de fusión GST-GAL4-YPWM de la columna de Sepharosa (carriles 2-7) y el carril 1 contiene 10 µl del extracto crudo inducido utilizado. M= marcador de amplio espectro molecular (Biorad).

7.3.3 Proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA}

La construcción del plásmido recombinante pGEX-GAL4-AAAA se realizó mediante la clonación del inserto codificante a un bloque de alaninas como se muestra en la figura 26A. El inserto codifica para un péptido de 13 aminoácidos, de los cuales 8 aminoácidos pertenecen a la proteína Antp con los 4 aminoácidos centrales que codifican para un bloque de 4 alaninas en lugar del tetrapéptido YPWM y el último aminoácido corresponde al codón de terminación. La preparación del inserto se realizó mediante digestión del plásmido pPACTGAL4-AAAA con la enzima *EcoR* I liberando un fragmento de 1121 pb correspondiente al bloque de alaninas con los aminoácidos flanqueantes de Antp (Figura 26C; carril 2). La preparación del vector de expresión pGEX-CS-GAL4-DBD se realizó mediante linearización con la enzima de restricción *EcoR* I que liberó el vector de 5393 pb como se visualiza en la figura 26B (carril 2).

Posteriormente, la ligación del vector con el inserto fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α calcio-competentes obteniéndose 103 clonas probables que fueron procesadas para la extracción del DNA plasmídico mediante Minipreparación; de las cuales solamente una clona resultó positiva en base a su movilidad electroforética y fue caracterizada con enzimas de restricción diagnósticas para el plásmido pGEX-GAL4-AAAA. En la figura 26D se muestra la digestión con *EcoR* I que libera un fragmento de 1121 pb (carril 1), un fragmento de 466 pb en las reacciones *BamH* I-*Nco* I y *Nco* I-*Sma* I (carriles 3 y 4) y los 5 fragmentos esperados de 2553, 1812, 1002, 991 y 153 pb con *Hinc* II (carril 2).

La introducción del inserto alteró el marco de lectura en el plásmido recombinante, por lo que el plásmido pGEX-GAL4-AAAA fue sometido a mutagénesis sitio dirigida como se describió en la sección anterior. Los oligonucleótidos GYA5', GYA3', GA5' y GA3' permitieron introducir dos nucleótidos, una Citosina en el extremo 3' de GAL4 antes del sitio *EcoR* I y una Timina faltante antes de la secuencia codificante al bloque de Alaninas como se muestra en la figura 27A. Posteriormente, el plásmido pGEX-GAL4-AAAA mutagénico fue secuenciado para confirmar la presencia y orientación correcta del inserto así como la inserción de los dos nucleótidos de interés (Figura 27B).

El plásmido mutagénico pGEX-GAL4-AAAA fue expresado como se describió en la sección anterior mostrando la producción de la proteína GST-GAL4^{AAAA} con el peso molecular esperado de 42.5 kDa (Figura 28B; carriles 2-5). La proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA} fue purificada por una resina de Sepharosa 4B a partir del extracto protéico inducido, colectando 8 fracciones en las cuales esta presente la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA} a diferentes concentraciones (Figura 28C; carriles 1-8). La purificación de esta proteína de fusión fue de un total de 329 μ g por L.

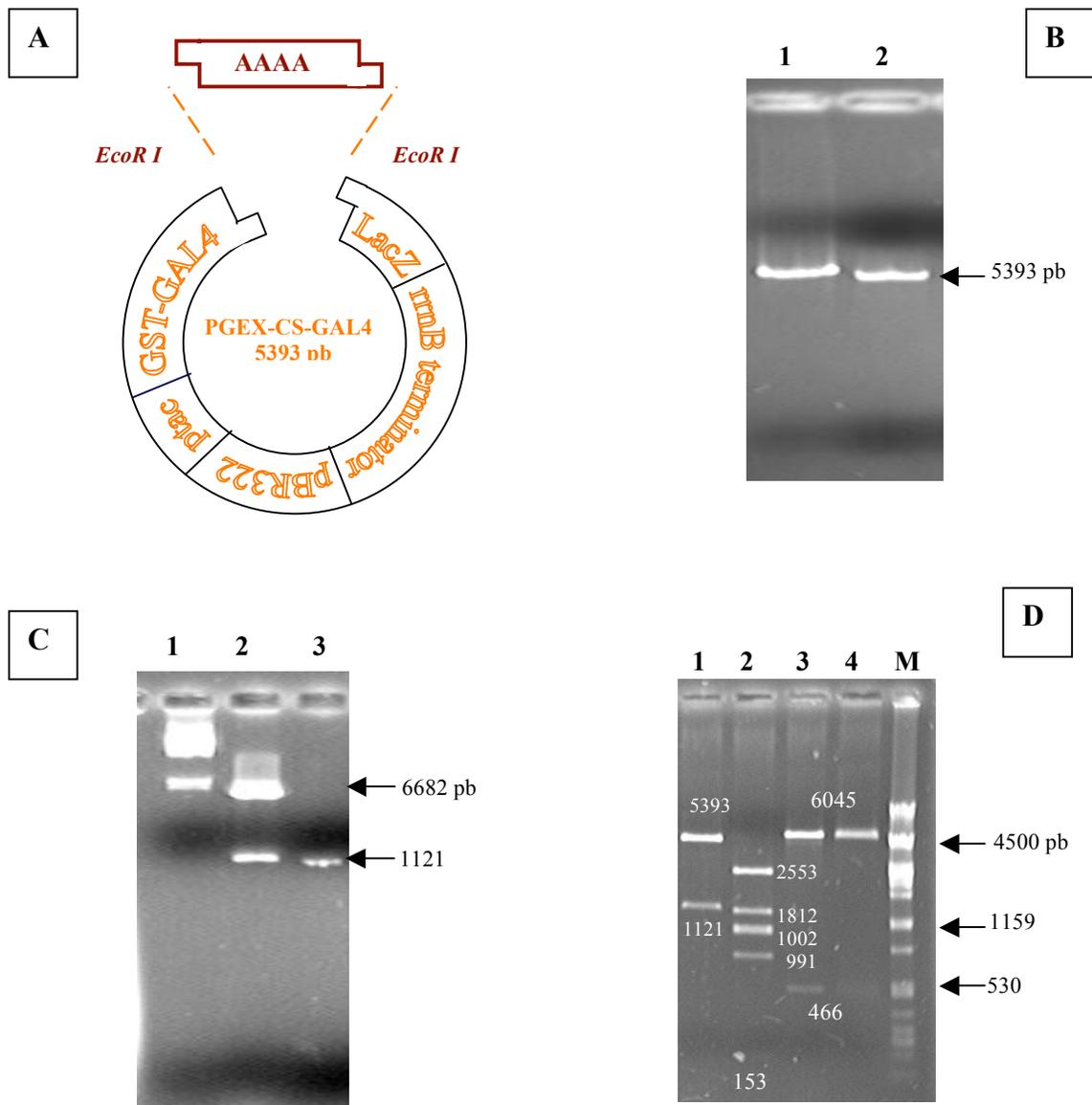
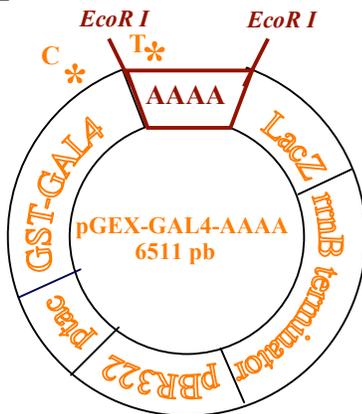


Figura 26. Construcción del plásmido pGEX-GAL4-AAAA. El diagrama esquemático en **A** representa la estrategia de clonación de la secuencia codificante a un bloque de Alaninas en el extremo 3' de GAL4 en el sitio *EcoR* I. En **B** se muestra el vector plasmídico pGEX-CS-GAL4 DBD digerido con la enzima *EcoR* I (carril 1) y su purificación (carril 2). En **C** se muestra el DNA plasmídico pPACTGAL4-AAAA sin digerir (carril 1) y digerido con *EcoR* I (carril 2) así como la purificación del fragmento de 1121 pb correspondiente al bloque de Alaninas (carril 3). La caracterización enzimática del plásmido pGEX-GAL4-AAAA se visualiza en **D** donde se muestra la digestión con las enzimas *EcoR* I (carril 1), *Hinc* II (carril 2), *Nco* I-*Bam*H I (carril 3) y *Sma* I-*Nco* I (carril 4). El carril **M** corresponde al marcador de peso molecular λ +*Pst* I.

C**D**

GCTATTTCTACTGATTTTTCTCGAGAAGACCTTGA
 CATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAA
 AGCATTGTAAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGT
 GAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAG
 TGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATA
 GAATAAGTGCGACATCATCATCGGAAGAGAGTAGT
 AACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTCGTATCGGGGA
 ATTCGGGGGATCCCGTCTCCACIGGCTGCCGCGG
 CGCGAAGTCAGTTTAGAGATCTCGACC

Figura 27. Mutagénesis sitio dirigida del plásmido recombinante pGEX-GAL4-AAAA. El diagrama esquemático en **C** muestra los sitios de inserción de 2 nucleótidos extras (C y T) en el extremo 3' de GAL4 antes del sitio *EcoR* I y antes de la secuencia codificante al bloque de Alaninas respectivamente. En **D** se muestra la secuenciación del plásmido mutagénico pGEX-GAL4-AAAA que presenta el oligonucleótido VD5' (azul), el sitio *EcoR* I (morado) la secuencia codificante al bloque de Alaninas (café), codon de termino (rojo) y los nucleótidos C y T introducidos por mutagénesis sitio dirigida (naranja).

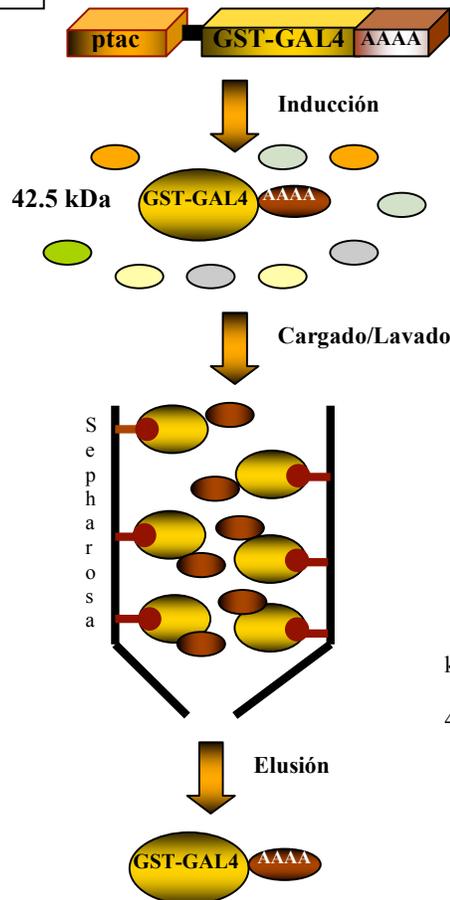
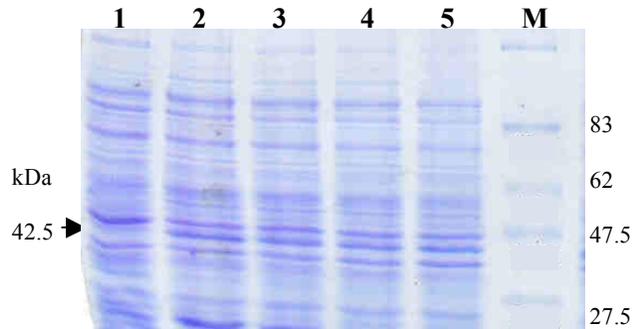
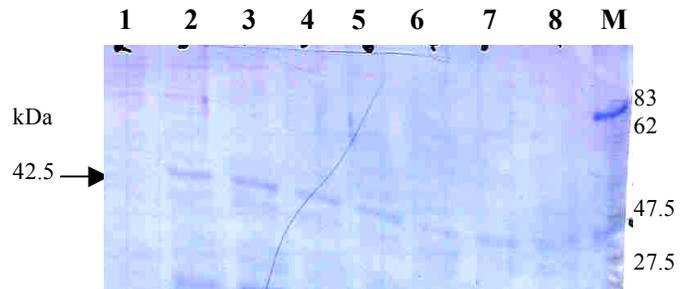
A**B****C**

Figura 28. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA}. El esquema en **A** representa el fragmento del plásmido pGEX-GAL4-AAAA con el promotor ptac que dirige la expresión de la proteína recombinante GST-GAL4-AAAA para su purificación por la resina de Sepharosa. El gel de poliacrilamida en **B** contiene extracto bacteriano de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformado con el plásmido pGEX-GAL4-AAAA sin inducir (carril 1) e inducido por 2, 4, 6 y 8 horas respectivamente (carriles 2-5) donde se observa la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4-AAAA de 42.5 kDa. En **C** se muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% con las fracciones colectadas en la elusión de la proteína de fusión GST-GAL4-AAAA de la columna de Sepharosa (carriles 1-8). El carril M corresponde al marcador molecular Multimark (Invitrogen).

7.4 Inmunodetección de las proteínas de fusión Antp, GAL4 y sus mutantes en YPWM

Para verificar que las proteínas fusionadas a MBP contenían la proteína Antp, Antp^{AAAA} ó Antp Δ HD se realizó la inmunodetección de las mismas utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-Antp 4C3 a una dilución 1:20,000. La detección de la proteína de fusión MBP-Antp en el carril 3, MBP-Antp^{AAAA} (carril 2) y de MBP-Antp Δ HD (carril 1) en la figura 29 mostró la presencia de Antp y sus mutantes.

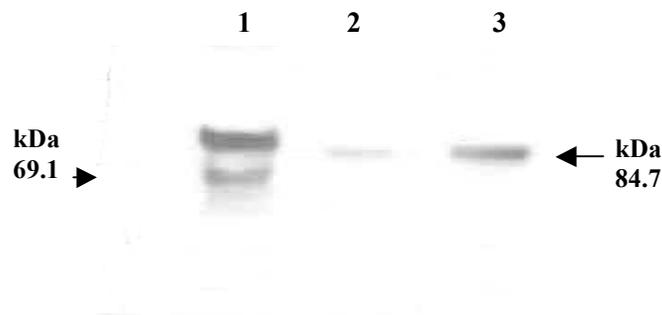


Figura 29. Inmunodetección de las proteínas de fusión MBP-Antp, MBP-Antp^{AAAA} y MBP-Antp Δ HD. El Western Blot de la proteína MBP-Antp de 84.7 kDa se realizó utilizando el anticuerpo anti-Antp 4C3 dilución 1:20,000 (carril 3) así como de las proteínas de fusión MBP-Antp^{AAAA} de 84.7 kDa (carril 2) y MBP-Antp Δ HD de 69.1 kDa (carril 1).

Para determinar la identidad de GAL4 y sus mutantes se realizó la inmunodetección de las proteínas de fusión GST-GAL4 de 42 kDa (carril 3), GST-GAL4^{YPWM} y GST-GAL4^{AAAA} de 43.5 y 42.5 kDa respectivamente (carriles 2 y 1), con el anticuerpo policlonal Anti-GAL4 DBD a una dilución 1:10,000 como se muestra en la figura 30 lo cual confirma la identidad de estas proteínas de fusión.

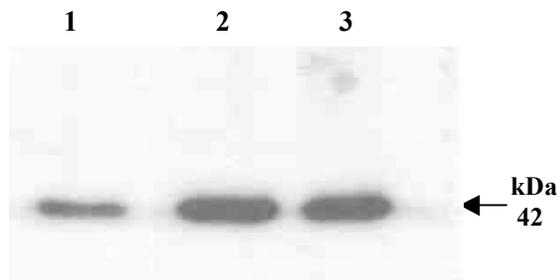


Figura 30. Inmunodetección de las proteínas de fusión GST-GAL4 y sus mutantes. El Western Blot de la proteína GST-GAL4 de 42 kDa se realizó utilizando el anticuerpo anti-GAL4 DBD dilución 1:10,000 (carril 3), así como de las proteínas de fusión GST-GAL4^{YPWM} (carril 2) y GST-GAL4^{AAAA} (carril 1).

7.5 Análisis de interacción con el DNA de las proteínas recombinantes Antp, GAL4 y sus mutantes en YPWM

7.5.1 Preparación de las sondas de unión de Antp y GAL4

Se diseñaron 4 oligonucleótidos sintéticos para llevar a cabo la amplificación mediante PCR de las sondas de DNA que presentan los sitios de unión de Antp ó GAL4 y el promotor SV40. Posteriormente, se realizó la amplificación con un gradiente de temperaturas mediante PCR utilizando los primers s115' y s113' y el plásmido pF11CAT para determinar la temperatura media óptima que permita amplificar el fragmento de DNA correspondiente a la sonda de unión s11 (Figura 31A). La amplificación muestra la banda de aproximadamente 750 pb correspondiente a los 11 sitios de unión de Antp denominados BS2 más el promotor SV40 con las temperaturas 52.1 a 57.1°C (Figura 31B; carriles 2-12).

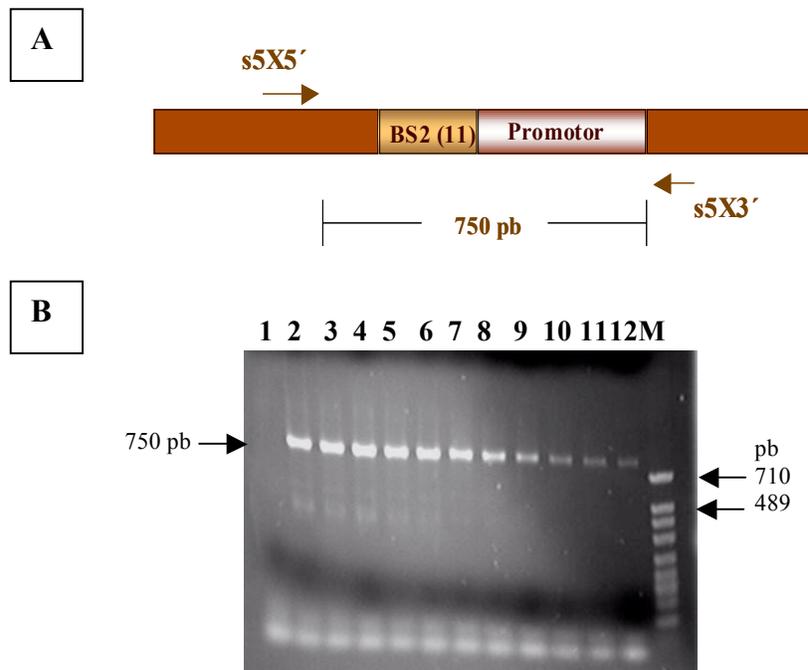


Figura 31. Análisis de la temperatura media óptima para amplificar la sonda de unión a Antp. El esquema en **A** muestra la sonda s11 de 750 pb que presenta 11 sitios BS2 y el promotor utilizando los primers s115' y s113'. Los productos de la amplificación a diferentes temperaturas fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% como se muestra en **B**. Las temperaturas corresponden a: 52.1, 52.4, 52.8, 53.4, 54, 54.9, 55.5, 56.1, 56.6, 56.9 y 57.1 °C en los carriles 2 al 12 respectivamente. El carril 1 corresponde a la reacción de PCR sin DNA blanco. El carril M corresponde al marcador de peso molecular pBS + *Msp* I.

Posteriormente, se estandarizó la amplificación del fragmento de 385 pb correspondiente a la sonda s5X que presenta 5 sitios de unión de GAL4 (UAS) más el promotor SV40 mediante un gradiente de temperaturas de PCR utilizando los oligonucleótidos s5X5' y s5X3' y el plásmido pGL2 5X GAL4 promoter (Figura 32A). La amplificación muestra la banda de 385 pb correspondiente al promotor y los 5 sitios UAS con las temperaturas 46.1 a 58.4 °C (Figura 32B; carriles 2-10).

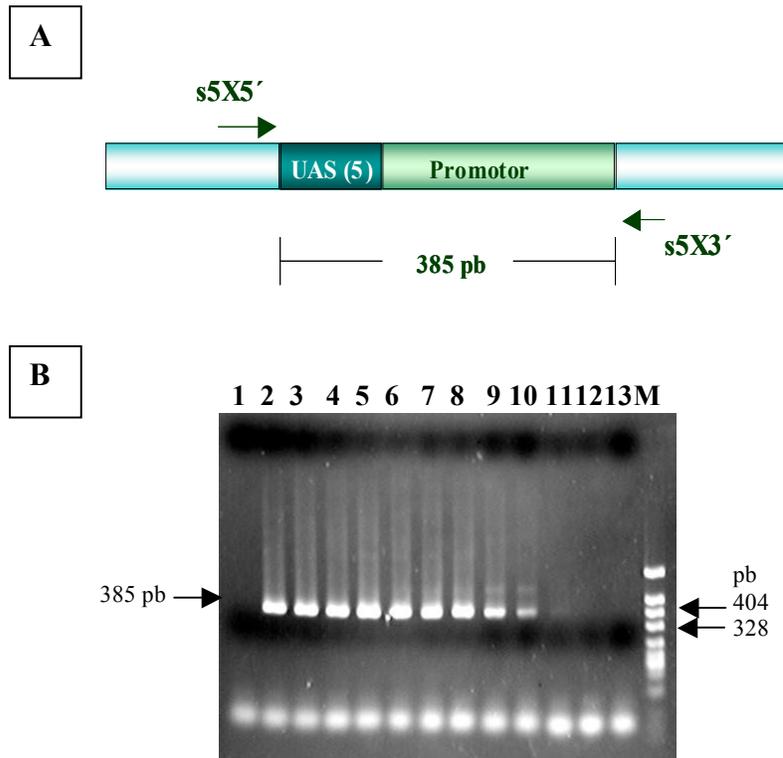


Figura 32. Análisis de la temperatura óptima para amplificar la sonda de unión para GAL4. El esquema en **A** muestra la sonda s5X de 385 pb que presenta 5 sitios UAS y el promotor utilizando los primers s5X5' y s5X3'. Los productos de la amplificación a diferentes temperaturas fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% como se muestra en **B**. Las temperaturas correspondieron a 46.1, 46.5, 47.4, 48.6, 50.2, 52.1, 54.8, 56.7, 58.4, 59.8, 60.9 y 61.3 °C en los carriles 2 al 13 respectivamente. El carril 1 corresponde a la reacción de PCR sin DNA blanco. El carril M corresponde al marcador de peso molecular pBS + *Msp* I.

Una vez estandarizadas las condiciones, se llevo a cabo una reacción de PCR usando 55.5 °C como la temperatura media óptima de amplificación de la sonda de unión s11 y 46.1 °C para la amplificación de la sonda s5X correspondiente a los sitios de unión a Antp y GAL4 respectivamente. Posteriormente, se realizó el marcaje de los extremos 3' de las sondas con dioxigenina (DIG) y su inmunodetección mediante el uso del kit DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation previamente descrito. La confirmación del marcaje de las sondas s11 y s5X se realizó a concentraciones de 0.15 a 155 fmol en comparación con la sonda Oct2A disponible por el kit DIG Gel Shift mostrando igual eficiencia de marcaje de las sondas de interés con respecto a la sonda control Oct2A (Figura 33).

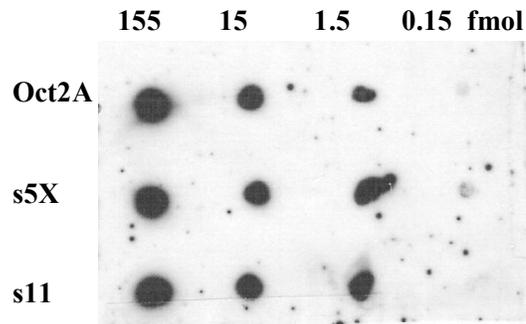


Figura 33. Eficiencia de marcaje de las sondas s5X y s11. El film muestra la inmunodetección de las sondas s5X y s11 marcadas con dioxigenina a una concentración de 155, 15, 1.5 y 0.15 fmol de cada una así como la sonda Oct2A a concentraciones de 155, 15, 1.5 y 0.5 fmol como control positivo de marcaje.

7.5.2 Ensayos de interacción a los sitios de unión BS2 de Antp y sus mutantes

Para analizar la habilidad de las proteínas recombinantes Antp y sus mutantes de reconocer sus sitios de unión al DNA se realizaron ensayos de retardación en gel utilizando para ello la sonda s11 con distintas concentraciones de las proteínas MBP-Antp, MBP-Antp^{AAAA} y MBP-Antp Δ HHD. La inmunodetección del ensayo de retardación muestra la formación de dos complejos proteína-DNA utilizando 46 ng de MBP-Antp y estos complejos se mantienen al incrementar la concentración de esta proteína a 143 y 286 ng mostrando una mayor estabilidad (Figura 34; carriles 2-4). El uso de la proteína MBP-Antp^{AAAA} presenta la formación de dos complejos proteína-DNA a una concentración de 46 ng y aproximadamente seis complejos al incrementar la concentración a 143 y 286 ng. Los resultados obtenidos con MBP-Antp mutada en YPWM (Antp^{AAAA}) presentaron una mayor afinidad al DNA que la proteína MBP-Antp que sugiere que el tetrapéptido YPWM probablemente participa negativamente en la afinidad de unión al DNA en Antp (Figura 34; carriles 5-7). Además, la proteína MBP-Antp Δ HHD no presenta la formación de un complejo Antp-DNA a una concentración de 46, 143 y 286 ng como se esperaba debido a la ausencia del homeodominio que permite la unión al DNA (Figura 34; carriles 8-10). Estos resultados demuestran que las proteínas Antp y sus mutantes producidas en *Escherichia coli* conservan su capacidad de reconocimiento y unión a sus sitios nativos en el DNA.

7.5.3 Ensayos de interacción a los sitios UAS de GAL4 y sus mutantes

El análisis de interacción de las proteínas recombinantes GAL4 y sus mutantes en YPWM con el DNA se realizó mediante ensayos de retardación en gel utilizando para ello distintas concentraciones de las proteínas de fusión GST-GAL4, GST-GAL4^{YPWM} y GST-GAL4^{AAAA} previamente purificadas usando la sonda s5X. La inmunodetección del ensayo de retardación muestra la formación de dos complejos proteína-DNA a una concentración de 45ng de GST-GAL4 y GST-GAL4^{AAAA} que son más estables cuando se incrementa la concentración a 90 y 267 ng de GST-GAL4 ó GST-GAL4^{AAAA} (Figura

35; carriles 2-4 y carriles 8-10). Sorprendentemente, la interacción de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM} con la sonda s5X presenta mayor afinidad con la formación de cinco complejos proteína-DNA a una concentración de 45 ng y el complejo de mayor tamaño es más estable a concentraciones de 90 y 267 ng de la proteína (Figura 35; carriles 5-7). Los resultados muestran que las proteínas GAL4 producidas en *Escherichia coli* como proteínas de fusión conservan su capacidad de reconocimiento y unión a sus sitios nativos en el DNA. Además, la fusión del motivo YPWM a GAL4 (GST-GAL4^{YPWM}) incrementa su capacidad de unión al DNA a diferencia del bloque de cuatro alaninas en sustitución de este motivo (GST-GAL4^{AAAA}) lo cual indica que el efecto observado no es producto de la adición de un dominio extra en el extremo C-terminal de GAL4. La mayor afinidad de la proteína GST-GAL4^{YPWM} por el DNA sugiere la importancia del tetrapéptido YPWM en la afinidad de unión al DNA de GAL4.

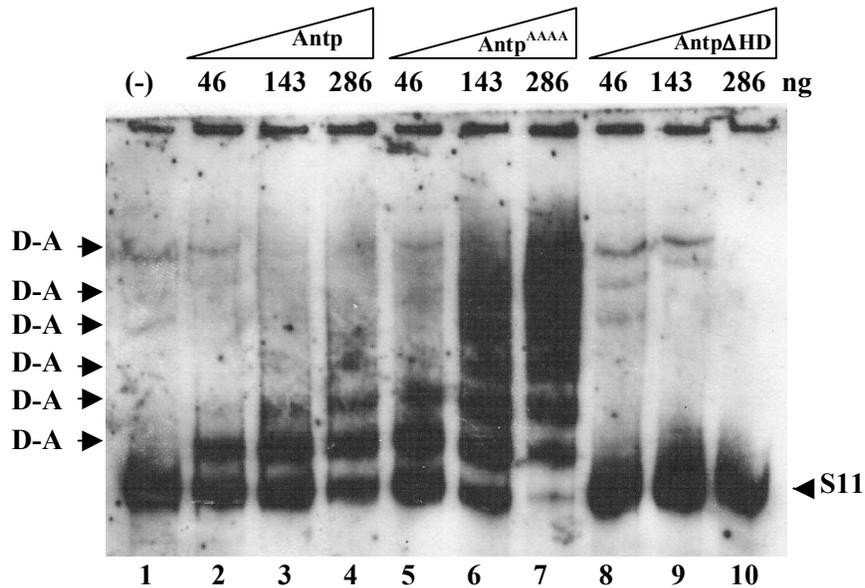


Figura 34. Análisis de la interacción de Antp y sus mutantes con la sonda de DNA (s11). La capacidad de Antp y sus mutantes en la formación de complejos DNA-proteína fue examinada mediante Gel-Shift en electroforesis de poliacrilamida al 8%. La sonda s11 fue incubada con 142, 426 y 578 ng de las proteínas Antp (carriles 2-4), Antp^{AAAA} (carriles 5-7) y Antp Δ HD (carriles 8-10) como se indica en los triángulos. Las flechas indican los complejos DNA-Antp formados en las distintas reacciones de unión (D-A). El carril 1 corresponde a la sonda libre en ausencia de proteínas (punta de flecha).

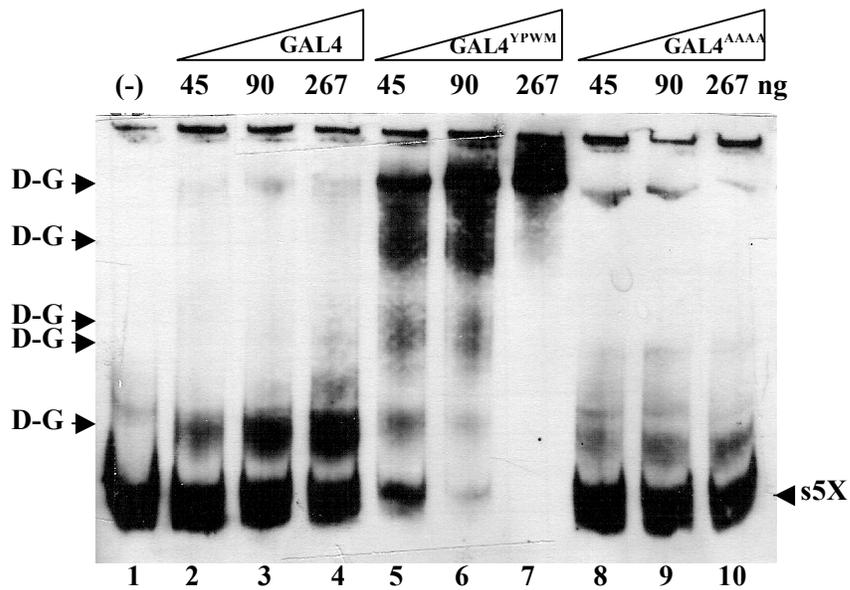


Figura 35. Análisis de la interacción de GAL4 y sus mutantes con la sonda s5X. La habilidad de unión de GAL4 y sus mutantes al DNA fue examinada mediante un ensayo de retardación en gel mediante electroforesis de poliacrilamida al 6%. La sonda s5X se incubó con 45, 90 y 267 ng de las proteínas GST-GAL4 (carriles 2-4), GST-GAL4^{YPWM} (carriles 5-7) y GST-GAL4^{AAAA} (carriles 8-10) como se indica en los triángulos. Las flechas indican los complejos DNA-GAL4 (D-G). El carril 1 corresponde a la sonda s5X en ausencia de proteínas (punta de flecha).

8. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar la actividad transcripcional del tetrapéptido “YPWM” de la homeoproteína Antennapedia. Para ello, se realizó la disección funcional del tetrapéptido YPWM mediante la mutación de este motivo en Antp y mediante la fusión de YPWM en la proteína heteróloga GAL4 de levaduras que presenta alta actividad transactivadora. Asimismo, se analizó la afinidad de unión al DNA de las proteínas Antp y GAL4 con o sin el tetrapéptido YPWM producidas en *Escherichia coli*. Para cumplir con los objetivos propuestos, utilizamos plásmidos previamente construidos en el laboratorio (pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} y pPACTGAL4-YPWM) y realizamos la construcción de los plásmidos recombinantes pNPACAntp Δ HD con delección del dominio de unión al DNA (homeodominio) y pPACTGAL4-AAAA que presenta la fusión de un bloque de cuatro Alaninas a la proteína transactivadora GAL4. Estos plásmidos fueron usados como testigos negativos en los ensayos de transactivación en cultivo celular. El análisis de la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en Antp y fusionado a GAL4 se realizó mediante la co-transfección de los plásmidos pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} ó pPACTGAL4 y pPACTGAL4-YPWM así como los controles negativos en células Schneider S2 de *D. melanogaster*. Adicionalmente, se realizó la producción de las proteínas Antp y GAL4 y sus mutantes mediante su expresión en un sistema bacteriano y su purificación por cromatografía de afinidad e identificación mediante Western blot. Finalmente, se analizó la interacción al DNA de las proteínas Antp, GAL4 purificadas así como sus respectivas mutantes en YPWM mediante ensayos de retardación en gel utilizando estas proteínas previamente purificadas con sondas de DNA que presenta sus sitios de unión.

La construcción del plásmido pNPACAntp Δ HD como testigo negativo de transfección se realizó mediante la ligación del vector pNPAC digerido con la enzima de restricción *Not* I y la secuencia codificante a Antp Δ HD producto de la digestión del plásmido pWTPAntp Δ HD con la enzima *Not* I (Figura 9B). La transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5 α calcio-competentes con la ligación resultó en 18 clonas que fueron diferenciadas del vector en base a su movilidad electroforética, obteniéndose una clona probable para el plásmido pNPACAntp Δ HD que fue caracterizada mediante digestión con cuatro enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos confirmaron la identidad del plásmido ya que fue linearizado con la enzima de restricción *EcoR* I y liberó los dos fragmentos esperados con *Not* I y *Sma* I así como la liberación de los 3 fragmentos esperados al ser digerido con *Pst* I (Figura 9D), mientras que la digestión del vector sin inserto con estas enzimas de restricción resultó en la linearización del plásmido (Figura 9C). La determinación de la secuencia nucleotídica de este plásmido

mediante secuenciación confirmó la inserción y orientación correcta del inserto codificante a Antp Δ HHD (Datos no mostrados).

La construcción del plásmido recombinante pPACTGAL4-AAAA permitió la fusión de la proteína transactivadora GAL4 a un péptido de 12 aminoácidos que corresponde a un bloque de cuatro Alaninas más los cuatro aminoácidos flanqueantes al motivo YPWM de la proteína Antp (Figura 10C). Este plásmido fue usado como testigo negativo en la transfección del plásmido pPACTGAL4-YPWM que dirige la expresión en cultivo celular de la proteína GAL4 fusionada al motivo YPWM más aminoácidos flanqueantes de Antp (Cárdenas-Chávez, 2003). El plásmido pPACTGAL4-AAAA fue construido mediante la inserción de un producto de alineación de oligonucleótidos sintéticos específicos (Figura 10B) en el vector pPACTGAL4 previamente digerido con las enzimas de restricción *BamH* I y *Bgl* II (Figura 10A). La transformación usando la reacción de ligación dio como resultado una clona positiva para la fusión GAL4-AAAA que fue caracterizada mediante digestión con 3 enzimas de restricción. El plásmido recombinante fue linearizado con las enzimas de restricción *BamH* I y *Bgl* II y liberó los dos fragmentos esperados al ser digerido con la enzima de restricción *Cla* I a diferencia del vector sin inserto que liberó los tres fragmentos de restricción esperados al ser digerido con esta enzima (Figuras 10B y C).

Además, se confirmó la identidad de este plásmido recombinante a nivel nucleotídico mediante secuenciación. Para ello, se realizó la amplificación mediante PCR del inserto del plásmido recombinante usando oligonucleótidos sintéticos específicos que mostraron la amplificación del fragmento esperado de 314 pb (Figura 11A). El producto de PCR fue clonado en el vector PCR-TOPO 2.1 resultando en 6 clonas que fueron caracterizadas mediante digestión con *EcoR* I mostrando 4 clonas positivas para la fusión GAL4-AAAA y una de estas clonas fue seleccionada para el análisis de secuenciación nucleotídica (Figura 11C). La secuenciación del inserto del plásmido pPACTGAL4-AAAA mostró una delección del nucleótido Timina en la posición 14 de los oligonucleótidos alineados que alteró el marco de lectura de la proteína (Figura 11D). Debido a lo anterior, se realizó mutagénesis sitio dirigida para introducir el nucleótido faltante en el plásmido pPACTGAL4-AAAA que permitió recuperar el marco de lectura que fue confirmado mediante secuenciación mostrando la fusión en fase de lectura del bloque de Alaninas a GAL4 (Figura 11E).

Los DNAs plasmídicos utilizados en los ensayos de transfección fueron purificados mediante el uso del kit QIAGEN, mostrando concentraciones de DNA que variaron de 0.4 a 2.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La relación Absorbancia 260/280 en todas las preparaciones de DNA fueron mayores de 1.8 lo que indica buena calidad de los DNAs para los análisis de transfección en cultivo celular (Tabla XIX).

El análisis de activación de la transcripción por Antp fue realizado mediante ensayos de transfección de los plásmidos productores y reporteros introducidos en células Schneider. Estas células se derivan de embriones de *D. melanogaster* de 24 horas disgregadas enzimáticamente (Schneider, 1972). Para analizar la actividad transcripcional del tetrapéptido YPWM en Antp se llevó a cabo la cotransfección de los

plásmidos pNPACAntp, pNPACAntp^{AAAA} y pNPACAntpDHD que dirigen la expresión de las proteínas Antp, Antp con mutación en el motivo YPWM por un bloque de alaninas (Antp^{AAAA}) y Antp con el homeodominio deletado (Antp Δ HHD) respectivamente. En todas las transfecciones se incluyeron los plásmidos reporteros p β -gal y pF11CAT para estandarizar la eficiencia de transfección y analizar la unión de Antp a los sitios blanco respectivamente. Cada ensayo se realizó por triplicado y se obtuvo una media de cada grupo de ensayo así como la desviación estándar de cada grupo para determinar la significancia estadística del experimento. Los resultados de transactivación en unidades de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) mostraron que la proteína Antp y sus mutantes en YPWM fueron capaces de activar la transcripción en cultivo celular a diferentes niveles de expresión, ya que la transactivación de 156% dada por la proteína Antp que contiene el tetrapéptido YPWM sustituido por un bloque de cuatro Alaninas fue mayor que la proteína Antp silvestre (100%) lo que sugiere que el tetrapéptido YPWM de Antp presenta una actividad transcripcional represora (Figura 12).

Para analizar la posible actividad represora del tetrapéptido YPWM de Antp se fusionó este tetrapéptido a la proteína transactivadora GAL4. Estos plásmidos fueron usados en ensayos de transfección para dirigir la expresión de las proteínas transactivadoras GAL4, GAL4 fusionada al tetrapéptido YPWM (GAL4-YPWM) y GAL4 fusionado a un bloque de cuatro Alaninas (GAL4-AAAA) respectivamente. Además, se incluyeron los plásmidos reporteros pGL2 5X GAL4 promoter y p β -gal para estandarizar la eficiencia de transfección y analizar la capacidad de unión al DNA de GAL4 y sus mutantes en las células Schneider S2. Cada ensayo de transfección se realizó por triplicado y se obtuvo una media de cada grupo de ensayo así como la desviación estándar de cada grupo para determinar la significancia estadística del experimento. Los resultados en unidades relativas de luminiscencia (RLU) normalizada mostraron una reducción de 55.3 % en la actividad transactivadora de GAL4 debida a la fusión del tetrapéptido YPWM de Antennapedia a GAL4. Esta reducción de la actividad transactivadora no se presentó en la fusión del bloque de Alaninas a GAL4 utilizado como control negativo (Figura 13). El tetrapéptido YPWM de Antennapedia fue capaz de reprimir la transactivación de GAL4 de manera similar que el motivo WRPW de la proteína Hairy sugiriendo que el motivo YPWM actúa como un dominio de represión transcripcional de manera similar al obtenido con el motivo WRPW en la proteína Hairy que interacciona con el co-represor Groucho (Fisher *et al.*, 1996). Estos resultados en conjunto con el incremento observado en la transactivación dada por la proteína Antp que carece del tetrapéptido YPWM en nuestros experimentos confirman que el motivo YPWM presenta actividad represora en células Schneider S2 actuando como un dominio de represión transcripcional.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la co-expresión de las proteínas Antp y GAL4 en conjunto mostraron un incremento en la transactivación de GAL4 de 115%, mientras que la co-expresión de GAL4 y Antp^{AAAA} mostró un mayor incremento en la transactivación de 184% (Figura 14). Estos resultados apoyan los resultados previamente descritos en los que la diferencia entre Antp silvestre y Antp mutante en YPWM del 56% corresponde al 69% en la co-expresión. Por lo que, en conjunto indican que la

homeoproteína Antp y su mutante son potentes activadores transcripcionales en células Schneider destacando la alta capacidad transactivadora de Antp con mutación en el tetrapéptido YPWM en comparación con Antp silvestre y corroboran la importante función represora de este tetrapéptido como probable punto de regulación transcripcional en la proteína Antp probablemente mediante interacción con factores generales de la maquinaria transcripcional ya que Antp^{AAAA} fue capaz de incrementar la actividad transcripcional de la proteína heteróloga GAL4 de levaduras.

Los sistemas bacterianos como *Escherichia coli* han mostrado numerosas ventajas para la producción de niveles altos de expresión de proteínas recombinantes ya que es uno de los microorganismos huésped más usado, económicos y el más estudiado a nivel molecular ya que dispone de numerosos métodos de manipulación genética *in vitro* como ejemplo muchas de las proteínas y péptidos utilizadas industrialmente son producidas en bacterias entre las que destacan la insulina, hormonas humanas, moduladores inmunitarios y vacunas (Watson *et al.*, 1992). Por lo anterior, decidimos seleccionar un sistema de expresión procariótico para la producción de las proteínas Antp, GAL4 y sus mutantes como proteínas de fusión usando los sistemas pMAL y pGEX.

Para la expresión y purificación de las proteínas Antp y Antp con la mutación en YPWM (Antp^{AAAA}) se realizó primeramente la construcción de los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-*Xmn* I y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I que presentan un sitio de restricción para la enzima *Xmn* I antes del codón de inicio de las secuencias codificantes a Antp y Antp^{AAAA} que fueron obtenidos mediante mutagénesis sitio dirigida de los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} (Figura 15A). La transformación de la reacción de mutagénesis resultó en dos clonas probables para la construcción pNPACAntp-*Xmn* I y cuatro clonas probables para la construcción pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I, las cuales fueron caracterizadas mediante digestión con la enzima de restricción *Xmn* I. Los plásmidos mutagénicos mostraron la liberación de los 2 fragmentos esperados de 3737 y 1165 pb al ser digeridos con la enzima de restricción *Xmn* I, mientras que la digestión de los plásmidos pNPACAntp y pNPACAntp^{AAAA} con *Xmn* I liberaron los dos fragmentos esperados de 4896 y 3716 pb (Figura 15B y C).

A partir de los plásmidos mutagénicos pNPACAntp-*Xmn* I y pNPACAntp^{AAAA}-*Xmn* I se realizó la construcción de los plásmidos recombinantes pMALcAntp y pMALcAntp^{AAAA} respectivamente mediante la ligación del vector de expresión pMALc con las secuencias codificantes a Antp y Antp^{AAAA} productos de la digestión de los plásmidos mutagénicos descritos con las enzimas de restricción *Xmn* I y *Sal* I (Figuras 16 y 17). La transformación de las reacciones de ligación dieron como resultado una clona probable para la construcción pMALcAntp y una clona probable para la construcción pMALcAntp^{AAAA} que fueron caracterizadas mediante digestión con las enzimas de restricción *Xmn* I, *Sal* I y *Pst* I. Los fragmentos obtenidos confirmaron la identidad de los plásmidos recombinantes ya que fueron linearizados con las enzimas de restricción *Xmn* I y *Sal* I y liberaron los dos fragmentos esperados al ser digeridos con la enzima de restricción *Pst* I (Figura 16 y 17). La expresión del plásmido recombinante pMALcAntp en la cepa de expresión *E. coli* TB1 mostró la proteína Antp fusionada a MBP con el peso molecular esperado de 84.7 kDa a diferentes tiempos de inducción con

IPTG mientras que la expresión de la proteína MBP no fusionada fue de 42 kDa (Figura 18B). Una vez estandarizada el tiempo óptimo de expresión se prosiguió a escalar el proceso para la obtención del extracto proteico en suficiente cantidad para la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad. La producción de la proteína purificada MBP-Antp fue de 120 µg por litro de cultivo (Figura 18C). Por otra parte, la producción a pequeña escala de la proteína Antp^{AAAA} fusionada a MBP a diferentes tiempos de inducción mostró la expresión de esta proteína con el peso molecular esperado de 84.7 kDa, esta proteína MBP-Antp^{AAAA} fue purificada por cromatografía de afinidad obteniéndose una concentración de 600 µg de proteína de fusión por litro de cultivo (Figura 19B y C).

La producción de la proteína AntpΔHD se realizó a partir del plásmido pMALcAntpΔHD el cual fue construido mediante la sustitución del extremo 3' de Antp del plásmido pMALcAntp por el extremo 3' de la secuencia codificante a AntpΔHD producto de la digestión del plásmido pNPACAntpΔHD con las enzimas de restricción *Sma* I y *Sal* I (Figura 20B). La ligación de la secuencia codificante a AntpΔHD con el vector pMALcAntp previamente digerido con las enzimas *Sma* I y *Sal* I resultó en cuatro clonas probables que fueron caracterizadas mediante digestión con las enzimas de restricción *Sma* I, *Sal* I y *Pst* I. La caracterización enzimática mostró una clona positiva del plásmido pMALcAntpΔHD que fue linearizado con las enzimas *Sma* I y *Sal* I así como la liberación de los 2 fragmentos esperados en la digestión con *Pst* I que corroboran la identidad del plásmido (Figura 20D). El análisis de la expresión de la proteína de fusión MBP-AntpΔHD a diferentes tiempos de inducción mostró la producción de esta proteína con el peso molecular esperado de 69.1 kDa (Figura 21B). La producción obtenida de la proteína de fusión MBP-AntpΔHD fue de 3.8 mg por litro de cultivo (Figura 21C).

El sistema de expresión pMALc contiene un promotor muy fuerte e inducible por IPTG que produce un alto nivel de expresión de las proteínas de interés así como una rápida purificación de las proteínas de fusión con afinidad a maltosa que corresponde aproximadamente a 10-40 mg de proteína de fusión como mínimo y un máximo de 200 mg por litro de cultivo dependiendo de la proteína fusionada a MBP. Las proteínas de fusión MBP-Antp, Antp^{AAAA} y AntpΔHD purificadas por cromatografía de afinidad presentaron un concentración de 120, 600 y 3800 µg por litro de cultivo respectivamente lo que indica una baja producción de estas proteínas de fusión que puede deberse a que fueron degradadas o incorporados dentro de la bacteria afectando el metabolismo bacteriano. Esta baja producción de las proteínas de fusión MBP-Antp y MBP-Antp^{AAAA} en comparación con la proteína MBP-AntpΔHD en iguales condiciones de expresión puede deberse a que el homeodominio de Antp (aminoácidos 31-50) podría afectar el metabolismo de síntesis de la bacteria debido a su alta similitud estructural con el represor procariótico 434 (aminoácidos 17-36) en la formación de complejos proteína-DNA (Otting *et al.*, 1990).

La identidad de las proteínas de fusión purificadas MBP-Antp, MBP-Antp^{AAAA} y MBP-AntpΔHD fue confirmada mediante Western Blot empleando el anticuerpo monoclonal anti-Antp que confirma la expresión de Antp y sus mutantes en *E. coli*

(Figura 29). Por lo tanto, la utilización del sistema de expresión pMALc permitió la producción de las proteínas Antp y sus mutantes fusionadas a MBP con una buena calidad electroforética y sin degradación aparente.

La expresión de la proteína de fusión GST-GAL4 a partir del plásmido pGEX-CS-GAL4 DBD (Li Q. *Et al.*, 2001) en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS calcio competente mostró esta proteína de fusión con el peso molecular esperado de 42 kDa en la inducción a 4 horas con IPTG y la purificación de esta proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad presentó una concentración de 230 µg por litro de cultivo (Figura 22C y D).

La construcción del plásmido recombinante pGEX-GAL4-YPWM que dirige la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM} se realizó mediante la clonación de la secuencia codificante al tetrapéptido YPWM en el extremo C-terminal de GAL4 en el sitio de restricción *EcoR* I del vector de expresión pGEX-CS-GAL4 DBD (Figura 23B y C). La transformación en bacterias calcio-competentes mostraron 124 clonas que fueron diferenciadas del vector en base a su movilidad electroforética obteniendo una clona probable para el plásmido pGEX-GAL4-YPWM que fue caracterizada mediante digestión con cinco enzimas de restricción. Los fragmentos de restricción obtenidos confirmaron la identidad del plásmido ya que liberó los dos fragmentos esperados en las digestiones con *EcoR* I, *BamH* I-*Nco* I y *Sma* I-*Nco* I así como la liberación de los cinco fragmentos esperados al ser digerido con *Hinc* II (Figura 23D). La introducción del inserto en el vector alteró el marco de lectura en este plásmido recombinante por lo que fue sometido a mutagénesis sitio dirigida para introducir un nucleótido extra antes del sitio *EcoR* I que permitió recuperar el marco de lectura (Figura 24). La producción a pequeña escala de la proteína GST-GAL4^{YPWM} a diferentes tiempos de inducción mostró la expresión de esta proteína con el peso molecular esperado de 43.5 kDa la cual fue purificada por cromatografía de afinidad obteniéndose una concentración de 210 µg por litro (Figura 25B y C).

El plásmido recombinante pGEX-GAL4-AAAA que dirige la expresión de la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA} fue construido mediante la inserción de la secuencia codificante a un bloque de cuatro Alaninas en el extremo C-terminal de GAL4 del vector de expresión pGEX-CS-GAL4-DBD previamente digerido con la enzima de restricción *EcoR* I (Figura 26B y C). La transformación de la reacción de ligación resultó en 103 clonas que fueron caracterizadas en base a su movilidad electroforética mostrando una clona probable para el plásmido pGEX-GAL4-AAAA que fue caracterizada con cinco enzimas de restricción diagnósticas. Este plásmido recombinante liberó los dos fragmentos esperados con las enzimas de restricción *EcoR* I, *BamH* I-*Nco* I y *Sma* I-*Nco* I así como la liberación de los cinco fragmentos esperados en la digestión con *Hinc* II (Figura 26D). La introducción del inserto en el vector alteró el marco de lectura en este plásmido recombinante por lo que fue sometido a mutagénesis sitio dirigida para introducir dos nucleótidos extras que permitan recuperar el marco de lectura de la proteína. La secuenciación de este plásmido mutagénico confirmó la presencia y orientación correcta del inserto así como la mutación sitio dirigida (Figura 27). La expresión de la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA} a diferentes tiempos de inducción

mostró la producción de esta proteína con el peso molecular esperado de 42.5 kDa (Figura 28B). La purificación de la proteína de fusión GST-GAL4^{AAAA} fue de 329 µg por litro (Figura 28C).

Posteriormente, la inmunodetección de las proteínas de fusión GST-GAL4, GST-GAL4^{YPWM} y GST-GAL4^{AAAA} empleando el anticuerpo anti-GAL4 confirmaron la identidad de la proteína GAL4 y sus mutantes en YPWM (Figura 30) demostrando que la utilización del sistema de expresión pGEX permitió la producción de las proteínas GAL4 y sus mutantes fusionadas a GST con una buena calidad electroforética y sin degradación aparente.

Los ensayos de interacción al DNA de las proteínas recombinantes Antp y GAL4 con el DNA requieren la unión a un fragmento de DNA denominado sonda el cual debe presentar sitios de unión para estos factores transcripcionales. La preparación de la sonda s11 que contiene el promotor SV40 y 11 sitios BS2 de unión de Antp se realizó mediante amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos sintéticos s115' y s113'. Para ello, se realizó un gradiente de temperaturas mediante PCR que permitió amplificar el fragmento esperado de 750 pb correspondiente a la sonda s11 con las temperaturas 52 a 57 °C (Figura 31). La amplificación de la sonda s5X que contiene cinco sitios de unión de GAL4 (UAS) más el promotor SV40 se realizó usando un gradiente de temperaturas de PCR utilizando los oligonucleótidos sintéticos s5X5' y s5X3'. La amplificación mostró el fragmento esperado de 385 pb con las temperaturas 46 a 58 °C (Figura 32). Se seleccionaron las temperaturas 55.5 y 46.1 °C como la temperatura media óptima de amplificación de las sondas s11 y s5X respectivamente.

El marcaje de las sondas s11 y s5X de DNA se realizó mediante la adición de moléculas de dioxigenina (DIG) en los extremos 3' de las sondas empleando el kit DIG Gel Shift 2nd Generation (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). El análisis del marcaje mediante inmunodetección con el anticuerpo Anti-dioxigenina reveló un marcaje eficiente de las sondas en comparación con la sonda testigo Oct2A a diferentes concentraciones (Figura 33). Por lo tanto, esta técnica de marcaje con dioxigenina recomendada para sondas de DNA menores a 100 pb resultó efectiva en el marcaje de sondas de gran tamaño (750 y 385 pb).

La interacción de las proteínas recombinantes Antp y sus mutantes con el DNA fue analizada mediante ensayos de retardación en gel empleando la sonda s11 y distintas concentraciones de las proteínas recombinantes. Los resultados muestran la formación de dos complejos proteína-DNA utilizando 45 ng de la proteína Antp y estos complejos presentan mayor estabilidad al incrementar la concentración de esta proteína a 143 y 286 ng. Sorprendentemente, la interacción de la proteína Antp^{AAAA} a la misma sonda presenta una mayor afinidad al DNA con la formación de 2 complejos estables a una concentración de 45 ng y seis complejos al incrementar la concentración a 143 y 286 ng. Como se esperaba la proteína Antp Δ HHD no presenta la formación de complejos proteína-DNA a concentraciones de 46, 143 y 286 ng debido a la deleción del homeodominio que permite su unión al DNA (Figura 34). Por lo tanto, la formación de un mayor número de complejos proteína-DNA (6) utilizando la proteína Antp^{AAAA} en

comparación con la proteína Antp silvestre (2) a igual concentración de proteína sugiere una participación negativa del tetrapéptido YPWM en la afinidad de unión de Antp al DNA. Además, estos resultados demuestran que la proteína Antp y sus mutantes producidas en *E. coli* conservan su capacidad de reconocimiento y unión a sus sitios nativos en el DNA sin necesidad de una modificación post-traduccional como la fosforilación previamente descrita en Antp (Jaffe *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos sugieren que el motivo YPWM de Antp no presenta una interacción con el DNA ya que en su ausencia la proteína Antp mutante (Antp^{AAAA}) presenta unión al DNA lo cual confirma los resultados obtenidos por Qian y cols en 1992 que demostraron mediante Resonancia Magnética Nuclear que el motivo YPWM no presenta interacción con el DNA y constituye un puente flexible de conexión entre el homeodominio y la proteína completa. Además, los resultados obtenidos corresponden a lo descrito por Qian y cols en 1994 en los cuales un péptido elongado que corresponde al homeodominio y una porción del extremo amino-terminal de Antp incluyendo el tetrapéptido YPWM presenta una constante de afinidad ($1.0 \pm 0.1 \times 10^{-8}$ M) aproximadamente diez veces menor en comparación con un péptido elongado que carece del motivo YPWM ($2.3 \pm 0.5 \times 10^{-9}$) que sugiere que el motivo YPWM participa en la especificidad de unión de Antp al DNA a través de un mecanismo desconocido (Qian, *et al.*, 1994). Asimismo, la importancia del tetrapéptido YPWM en la afinidad de unión al DNA de las homeoproteínas también fue observado por Chan y cols en 1996 que demostró que el hexapéptido de la proteína Labial inhibe la unión al DNA y que Exd puede inducir un cambio conformacional en Lab promoviendo así interacciones altamente específicas con el DNA. El modelo propuesto por Pinsonneault en 1997 propone que las homeoproteínas presentan una actividad represora como monómeros y cuando heterodimerizan con co-factores como Exd abolían esta función represora, de esta manera se explica la habilidad de las homeoproteínas para actuar como activadores o represores *in vivo*.

Posteriormente, se analizó la habilidad de las proteínas recombinantes GAL4 y sus mutantes de reconocer sus sitios de unión al DNA mediante ensayos de retardación en gel empleando la sonda s5X. Los resultados muestran la formación de dos complejos proteína-DNA a una concentración de 45 ng de GST-GAL4 ó GST-GAL4^{AAAA} que presentan mayor estabilidad al incrementar la concentración a 90 y 267 ng de proteína. Mientras que la interacción de la proteína de fusión GST-GAL4^{YPWM} presentó mayor afinidad de unión al DNA con la formación de 5 complejos proteína-DNA a una concentración de 45 ng y el complejo de mayor peso molecular es más notable a una concentración de 90 y 267 ng de proteína de fusión (Figura 35). Estos resultados sugieren la participación positiva o negativa del tetrapéptido YPWM en la afinidad de unión al DNA de un factor transcripcional. Los resultados obtenidos confirman que las proteínas GAL4 producidas en *E. coli* como proteínas de fusión conservan su capacidad de reconocimiento y unión a sitios nativos en el DNA similar a lo descrito por Melcher en el 2000 quien analizó diferentes sistemas de expresión de la proteína GAL4 así como su actividad de unión al DNA e interacción con cofactores. Lo anterior, permite sugerir que la represión transcripcional observada no es resultado de la participación del tetrapéptido YPWM en la afinidad de unión de la proteína Antp ó GAL4, probablemente

esta represión es producto de la interacción de este motivo con factores generales de la maquinaria transcripcional basal en base a los resultados previamente descritos en la co-expresión de GAL4 y Antp en cultivo celular que podrían modificar la conformación de las proteínas.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la represión transcripcional observada podría ser resultado de la interacción de este motivo con represores ó factores generales de la maquinaria transcripcional basal que permiten que las homeoproteínas actúen como represores o activadores en la selección de los genes blanco.

9. CONCLUSIONES

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

- La actividad transcripcional de la homeoproteína Antennapedia con la mutación en el tetrapéptido YPWM mostró un incremento de un 56% en comparación con la transactivación dada por Antp silvestre.
- La actividad transcripcional de GAL4 en la co-expresión con Antp silvestre y Antp con mutación en el tetrapéptido YPWM mostraron un incremento del 69% que sugiere una probable actividad represora del motivo YPWM.
- La actividad transcripcional de la proteína transactivadora GAL4 fusionada al tetrapéptido YPWM mostró una reducción de un 55% en comparación con la proteína GAL4 fusionada a un bloque de cuatro Alaninas como testigo negativo lo que confirma la función transcripcional represora del motivo YPWM de Antp
- La expresión y purificación de las homeoproteínas Antp y Antp mutadas en YPWM (Antp^{AAAA}) en *Escherichia coli* demuestran su actividad funcional en el reconocimiento de sus sitios de unión al DNA.
- La expresión y purificación de las homeoproteínas GAL4, GAL4^{YPWM} y GAL4^{AAAA} en *E. coli* demuestran su actividad funcional en el reconocimiento de sus sitios de unión al DNA.
- La diferente afinidad de unión al DNA de las proteínas Antp y GAL4 en comparación a las mutantes en YPWM sugieren que probablemente el dominio YPWM podría modificar la conformación tridimensional de estas proteínas en la selección de los genes blanco

Los resultados obtenidos en la represión de la transcripción de la proteína heteróloga GAL4 en presencia del tetrapéptido YPWM permiten sugerir un modelo de represión transcripcional directa como probable mecanismo de regulación de la expresión de los genes blanco de Antp *in vivo*. Debido a lo anterior, sería conveniente analizar la interacción de este motivo con los diferentes factores generales de la maquinaria transcripcional basal para confirmar esta hipótesis. El análisis de si el tetrapéptido YPWM afecta o favorece la afinidad de unión de Antp al DNA deberá ser confirmado determinando las constantes de afinidad de las diferentes proteínas Antp y GAL4 en comparación con las mutantes en YPWM. Además, se han descrito que algunos factores transcripcionales como Extradenticle y BIP2 presentan interacción con

diversas homeoproteínas por ello sería interesante confirmar la posible interacción de estos factores con la proteína Antp para observar el efecto de esta interacción en la afinidad de unión al DNA.

APÉNDICE

Solución	Cantidades	Conc. Final
Acetato de Sodio pH 5.2	1L	3M
Acetato de Sodio	408.1 gr	
Agua destilada	800 ml	
Ampicilina	100 ml	100X
Ampicilina	1 gr	100 mg/ml
Buffer de cargado		2X
Tris-HCl pH 6.8		100 mM
β-mercaptoetanol		4%
SDS		1%
Azul de Bromofenol		0.02%
Glicerol		24%
Bromuro de Etidio	100 ml	10mg/ml
EtBr	1 gr	
Buffer Fosfato de sodio	100 ml	0.1M
Na ₂ HPO ₄ 0.1 M	38 ml	
NaH ₂ PO ₄ 0.1 M	24 ml	
Buffer de Lavado	200 ml	1X
Ácido Maleico	2.32 gr	0.1 M
NaCl	1.75 gr	0.15 M
Tween 20	0.6 ml	0.3%
Buffer Ácido Maleico	200 ml	1X
Ácido Maleico	23.2 gr	0.1 M
NaCl	1.75 gr	0.15 M
Buffer de Detección	200 ml	1X
Tris HCl	3.15 gr	0.1 M
NaCl	1.16 gr	0.1 M
Buffer Mg	1 ml	100X
MgCl ₂	100 μl	
β-mercaptoetanol 14.4 M	347 μl	
H ₂ O	553 μl	

Buffer TBE	1 L	5X
Tris Base	54 gr	
Ácido Bórico	27.5 gr	
EDTA 0.5 M	20 ml	
Buffer TEN	50 ml	1X
Tris Base	0.06 gr	10 mM
EDTA 0.5M	0.1 ml	1 mM
NaCl	0.292 gr	0.1 M
IPTG	50 ml	0.1M
IPTG	1.19 gr	
Medio LB	1 L	
Triptona	10 gr	
Extracto de Levadura	5 gr	
NaCl	10 gr	
Solución HBS	500 ml	2X
NaCl	8 gr	
KCl	0.35 gr	
Na ₂ HPO ₄	0.2 gr	
Dextrosa	1 gr	
Hepes	5 gr	
Solución CaCl₂	200 ml	0.25 M
CaCl ₂	7.35 gr	
Solución I	200 ml	
Tris-HCl (pH 8.0)	5 ml	25 mM
EDTA (pH 8.0)	4 ml	10 mM
Solución II	200 ml	
NaOH 10 N	5 ml	0.2 N
SDS	2 gr	1%
Solución III	100 ml	
Acetato de Potasio	29.4 gr	
Ácido acético	11.5 ml	
Tris-Glicina	1L	5X
Tris Base	15.1 gr	
Glicina	94 gr	
SDS 10%	50 ml	

LITERATURA CITADA

Alonso C, J. Maxton-Kuechenmei. 2001. Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol* 11(18): 1473-1478.

Bridges CB, and Morgan TH. 1923. The third-Chromosome Group of Mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Of Washington Publ. 327-393.

Burglin, T. 1994. A comprehensive classification of homeobox. In Guidebook of the homeobox genes (Duboule d, ed) Oxford University Press, pp. 26-71.

Cárdenas-Chávez DL. 2003. Análisis de la represión transcripcional *in vitro* del tetrapéptido YPWM de Antennapedia. Tesis de Licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León..

Catron KM, Zhang H, Marshall SC, Inostroza JA, Wilson JM. And Abate C. 1995. Transcriptional repression by Msx-1 does not require Homeodomain DNA-Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* 15: 861-871.

Chan SK, Popperl H, Krumlauf R and Mann RS. 1996. An extradenticle-induced conformational change in a HOX protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J* 15: 2476-87.

Crothers D. M. 1987. *Nature* 325-464-465.

Descombes P. and Schibler U. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67: 569-579.

Duboule D, Dollé P. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila homeótica* gene. *EMBO J.* 8: 1497-1505.

Fisher Alfred L, Shunji Ohsako and Michael Claudy. 1996. The WRPW of the Hairy-Related Helix-Loop-Helix Repressor Proteins Acts as a 4-Amino-Acid Transcription Repression and Protein-Protein Interaction Domain. 2670-2677.

Foulkes NS, Borrelli E. and Sassone-Corsi P. 1991. CREM gene: Use of alternative DNA-binding domain generates multiple antagonist of cAMP-induced transcription. *Cell* 54: 739-749.

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

Garber RL, Kuroiwa AY, Gehring WJ. 1983. Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. EMBO J. 2: 2027-36.

Garcia-Bellido, A. 1977. Homeotic and atavistic mutations in insects. Amer. Zool. 17: 613-630.

Garner MM. And Revzin A. 1981. Nucleic Acids Res. 9: 3047-3060.

Gehring, W J. 1987. Homeoboxes in the study of development. Science 236: 1245-1252.

Gehring WJ, Muller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Quian YQ, Otting Wuthrich K. 1990. The structure of the homeodomain and its functional implications. Trends Genet. 6: 323-329

Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. 1994. Homeodomain proteins. Annu. Rev. Biochem. 63: 437-526.

Goldstein RE, Jimenez G, Cook O, Gur D. and Paraoush Z. 1999. Hucklebein repressor activity in *Drosophila* terminal patterning is mediated by Groucho. Development. 17: 3747-55.

Green NC, Rambaldi I, Teakles J and Featherstone MS. 1998. A conserved C-terminal domain in PBX increases DNA binding by the PBX homeodomain and is not a primary site of contact for the YPWM motif of HOXA1. J. Biol. Chem. 273: 13273-9.

Hendrickson W. 1985. BioTechniques 3: 198-207

Hengartner CJ, Myer V, Liao M, Wilson CJ, Koh SS. And Young RA. 1998. Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. Mol. Cell. 2: 43-53.

Jaynes JB. And O'Farrell PH. 1988. Activation and Repression of transcription by homeodomain-containing proteins that bind a common site. Nature 336:744-749.

Johnson FB, Parker E, Krasnow MA. 1995. Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. Proc. Natl. Sci. USA 92: 739-43.

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

Kaludov NK. And Wolffe AP. 2000. MeCP2 driven transcriptional repression *in vitro*: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. Nucleic Acids Res. 28: 1921-1928.

Keleher CA, Goutte C. and Johnson AD. 1988. The yeast cell-type specific repressor a2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. *Cell* 53: 927-936.

Keleher CA, Redd MJ, Schultz J, Carlson M. and Johnson AD. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68:709-719.

Kyuhyung H. And Manley JL. 1993. Transcriptional repression by the *Drosophila* Even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. *Genes and Development* 7: 491-503.

LaRonde-LeBlanc NA. and Wolberger C. 2003. Structure of HoxA9 and PBX1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.* 17:2060-2072.

Levine M. and Manley JL. 1989. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59: 405-408.

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

Li C. and Manley JL. 1998. even-skipped repress transcription by binding and blocking the TFIID-TATA box interaction. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3771-3781.

Li C. and Manley JL. 1999. Allosteric regulation of even-skipped repression activity by phosphorylation. *Mol. Cell.* 3: 77-86.

Licht JD, Grossel MJ, Figge J. and Hansen UM. 1990. *Drosophila* krüppel protein is a transcriptional repressor. *Nature.* 346- 76-79.

Lôhr U, Yussa M. and Pick L. 2001. *Drosophila* fushi tarazu : a gene on the border of homeotic function. *Current biology* 11: 1403-1412.

McGinnis W, Levine M, Hefen E, Kuroiwa AY, Gehring W J. 1984. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *Bithorax* complexes. *Nature* 308: 428-433.

Medina-Martinez O. and Ramirez-Solis R. 2003. In vivo mutagenesis of the Hoxb8 hexapeptide domain leads to dominant homeotic transformations that mimic the loss-of-function mutations in genes of the Hoxb cluster. *Dev Biol* 264(1): 77-90.

Merabet S. and Kambris Z. 2003. The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell* 4(5): 761-8.

Ohkuma Y, Horikoshi M, Roeder RG. and C. Desplan. 1990. Binding site-dependent direct activation and repression of *in vitro* transcription by *Drosophila* homeodomain proteins. *Cell* 61: 475-484.

Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, Gehring WJ and Wüthrich K. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* 9: 3085-92.

Paraoush Z, Finley R, Kidd T, Wainwright SM, Ingham P, Brent R. and D. Ish-Horowitz. 1994 Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79: 319-329.

Passner Jonathan M., Hyung Don Ryoo, Leyi Shen, Richard S. Mann and Aneel K. Aggarwal. 1999. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature.* 297: 649-651.

Piper D. and Batchelor A. 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): 587-97.

Qian YQ, Billeter M, Otting G, Muller M, Gehring WJ and Wüthrich K. 1989. The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59: 573-580.

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

Qian YQ, Resendez PD, Gehring WJ. and Wüthrich K. 1994. The des(1-6)Antennapedia-homeodomain: Comparison of the NMR solution structure and the DNA-binding affinity the intact Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4091-4095.

Sauer F, Fondell JD, Ohkuma Y, Roeder RG. And Jackle H. 1995. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. *Nature* 375: 162-164.

Shanmugam K and Featherstone MS. 1997. Residues Flanking the HOX YPWM Motif Contribute to Cooperative Interactions with PBX. *J. Biol. Chem.* 272(30): 19081-19087.

Shepherd JC, McGinnis, Carrasco AE, DeRobertis EM, Gehring WJ. 1984. Fly and frog homeodomains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* 310: 70-71.

Schneuwly S, Kuroiwa A. Baumgartner P. and Gehring WJ. 1986. Structural organization and sequence of the homeotic genes Antennapedia of *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal* 5(4): 733-739.

Schneuwly S, Kuroiwa A. and Gehring WJ. 1987. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene Antennapedia. *Nature* 325: 816-818.

Sprecher S, Muller M. 2004. Hox gene cross-regulatory interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mech Dev* 121(6): 527-36.

Sprules T, Green N, Featherston M. and Gehring K. 2000. Conformational changes in the PBX Homeodomain and C-terminal extension upon binding DNA and Hox-derived YPWM peptides. *Biochemistry* 39: 9943-50.

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

Svingen T and Tonissen KF. 2006. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 97: 88-96

Ulijaszek SJ, Johnston FE, Preece MA. 1998. *The Cambridge Encyclopedia of Human Growth and Development*. Cambridge University Press: Cambridge.

Um M, Li C. and Manley JL. 1995. The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5007-5016.

Villanueva-Segura K. 2004. Modulación de la Represión Transcripcional de Antennapedia con el motivo WRPW en cultivo celular. Tesis de Licenciatura F.C.B. UANL.

Wakimoto BT. and Kaufman TC. 1981. Análisis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 81: 51-64.

Zaman Z, Ansari AZ, Koh SS, young R. and Ptashne M. 2001. Interaction of a transcriptional repression with the RNA polymerase plays a crucial role in repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2550-2554.