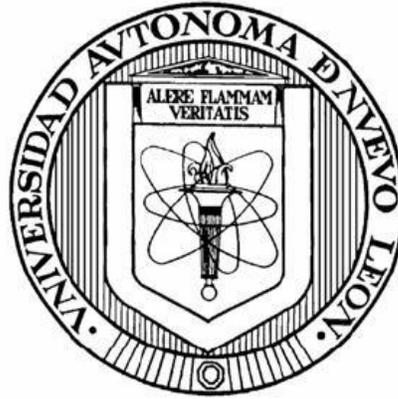


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



La actividad transcripcional de Antp es modulada por la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd, pero por el complejo Antp-TBP-BIP2.

POR

L.B.G. NORMA CAROLINA HERNÁNDEZ BAUTISTA

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

DICIEMBRE, 2020

La actividad transcripcional de Antp es modulada por la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd, pero no por el complejo Antp-TBP-BIP2.

COMITÉ DE TESIS



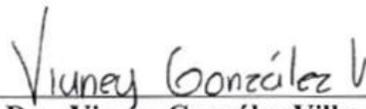
Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de Tesis



Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal



Dra. Vianey González Villasana
Vocal



Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a la Dra. Diana Reséndez Pérez por invitarme a unirme a su grupo de trabajo y brindarme la confianza de trabajar en el área de biología del desarrollo que tanto le apasiona, además quiero agradecerle por siempre buscar que desempeñemos un excelente trabajo de investigación y formarnos en el área de la ciencia.

También quiero agradecer a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme formar parte del Laboratorio de Inmunología y Virología, haciendo uso de las instalaciones y equipos de trabajo. Igualmente me gustaría agradecer a los miembros de mi comité, la Dra. Claudia Altamirano, Dra. Vianey Gzz y el Dr. Fermín Mar

A mis compañeros que siempre me brindaron su apoyo para poder desarrollar mi trabajo de investigación, especialmente a mis colegas en el área, Rubén y Gustavo, a Citlali quien siempre estuvo pendiente de mí. A Nancy y Nide quienes nos apoyaron en asunto administrativo y de papelería. E igualmente a los demás compañeros del L8.

Por último, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para la realización de mi maestría.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis va principalmente dedicado a mis padres, quienes desde siempre me han brindado su apoyo a través de las diferentes etapas de mi vida, y que además han fungido como los principales responsables de instruirme de que con trabajo y perseverancia todo se puede conseguir.

A mi hermano quien siempre me ha estado a mi lado en los momentos buenos y malos momentos.

También quiero agradecer a los miembros de mi familia que estuvieron al pendiente de mí siempre, finalmente a mis amigos quienes me brindaron su opinión, consejo y apoyo durante todo este proceso.

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS	2
AGRADECIMIENTOS	3
LUGAR DE TRABAJO	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. HOMEOSIS Y GENES HOX.....	2
2.2 EVOLUCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS GENES HOX	5
2.3 HOMEOPROTEÍNAS	6
2.4 PARADOJA HOX.....	9
2.5 ESPECIFICIDAD DE LAS HOMEOPROTEÍNAS.....	10
2.6 COFACTORES DE UNIÓN COOPERATIVA	11
2.7 INTERACTOMA HOX.....	14
2.9 INTERACTOMA DE ANTENNAPEDIA	18
2.9.1 TBP	20
2.9.2 TFIIIE β	20
2.9.3 BIP2	21
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 HIPÓTESIS.....	23
5 OBJETIVO	23
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
6. ESTRATEGIA GENERAL	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
7.1 Obtención y purificación de plásmidos productores y reporteros.....	25
7.1.1 Transformación de plásmidos en bacterias <i>E. Coli</i> DH5 α Ca ⁺⁺	25
7.1.2 Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina a pequeña escala (Minipreparación)	26
7.1.3 Caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos productores y reportero.....	26
7.2 Transfección en células HEK-293	27
7.2.1 Preparación de extractos celulares	28
7.2.2 Cuantificación de la expresión de los genes informadores β -Galactosidasa y Luciferasa.....	28

7.3. Determinar si las interacciones trimétricas de Antp-TBP-TFIIE β afectan la actividad transcripcional de Antp	30
7.4 Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP-Exd ₁₄₄₋₃₇₆ mediante ensayo de transactivación en células HEK-293.	31
7.5 Análisis de la interacción molecular Antp-TBP-BIP2 ₂₋₈₉ mediante ensayos de transactivación en células HEK293.	32
7.6 Análisis de los dominios funcionales que participan en la regulación transcripcional de Antp, en el complejo trimérico con TBP y TFIIE β	33
7.7 Análisis del efecto en la actividad transcripcional de los complejos triméricos de TBP-Exd y TBP-BIP2 con mutantes de Antp.....	34
8. RESULTADOS.....	35
8.1 Obtención y caracterización de los plasmídicos para los ensayos de transactivación	35
8.2 Incremento de la transactivación de Antp en presencia de los factores TBP y TFIIE β	37
8.3 Recuperación parcial de la actividad transcripcional de Antp por el complejo trimérico Antp, TBP y Exd.....	40
8.4 La interacción de Antp con los factores TBP y BIP2 disminuye la actividad transactivadora de Antp	42
8.5 La región del extremo N-terminal y el HD de Antp son importantes en la regulación de la actividad transcripcional de Antp en interacción con TBP y TFIIE β	44
8.6 Análisis de los complejos triméricos de las mutantes Antp ^{AAAA} y Antp Δ HD en los complejos TBP-Exd y TBP-BIP2.	51
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	59
11. PERSPECTIVAS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la Maquinaria Basal de Transcripción.....	16
Tabla 2. Lista de plásmidos utilizados para los ensayos de Transfección	25
Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas en la caracterización enzimática de los plásmidos.	27
Tabla 4. Esquema de transfección de los plásmidos de pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIE β , pGLH1	30
Tabla 5. Esquema de transfección de los plásmidos pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC-EXD144-376.	31
Tabla 6. Esquema de transfección de los plásmidos Antp, TBP y BIP22-89	32
Tabla 7. Esquema de transfección para evaluación de las mutantes pPAC-Antp Δ HD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp ³²⁻³⁶	33
Tabla 8. Esquema de transfección de los complejos triméricos TBP-Exd y TBP-BIP2 con las mutantes pPAC-Antp Δ HD/pPAC-Antp ^{AAAA}	34
Tabla 9. Pureza y concentración de los plásmidos para el ensayo de transactivación.....	35
Tabla 10. Ensayos de transactivación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β	38
Tabla 11. Ensayo de transactivación de la interacción triméricas de Antp con TPB y Exd	40
Tabla 12. Ensayo de transactivación de Antp en presencia de la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2.....	42
Tabla 13. Ensayo de transactivación de la mutante Antp Δ HD en complejo trimérico con TBP.TFIIE β	45
Tabla 14. Ensayos de transactivación de AntpHD-TBP-TFIIE β	47
Tabla 16. Ensayo de transactivación de la mutante Antp ³²⁻³⁶ -TBP-TFIIE β	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutación homeótica de Bithorax en <i>Drosophila melanogaster</i>	2
Figura 2. Esquema de organización de los Genes Hox en <i>D. melanogaster</i>	4
Figura 3. Conservación evolutiva y organización genómica de los genes homeóticos	6
Figura 4. Interacción del Homeodominio con el DNA.....	7
Figura 5. Alineamiento y comparación aminoacídica de las homeoproteínas de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
Figura 6. La paradoja de los genes homeóticos.	9
Figura 7. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas.....	10
Figura 8. Especificidad y afinidad de las homeoproteínas.....	11
Figura 9. Unión cooperativa Ubx-Exd -DNA.....	12
Figura 10. Interacciones proteínas-proteína de las homeoproteínas.	14
Figura 11. Ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción de la RNA Pol II.....	17
Figura 12. Mutante homeótico de Antennapedia	18
Figura 13. Interactoma de Antp	19
Figura 14. Geles de caracterización enzimática de los plásmidos pGLH11, pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIIE β , pPAC-Exd ₁₄₄₋₃₇₆ y pPAC-BIP ₂₂₋₈₉	36
Figura 15. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β aumenta la actividad transcripcional de Antp.....	39
Figura 16. La actividad transactivadora de Antp disminuye debido a la formación del complejo trimérico Antp-TBP-BIP2.....	43
Figura 17. Importancia del HD de Antp.....	46
Figura 18. Efecto del extremo N-terminal de Antp en la transactivación.....	48
Figura 19. Mutante de los residuos 32-36 de la hélice II de HD de Antp.....	50
Figura 20. Interacciones triméricas de TBP-Exd y TBP-BIP2 con mutantes de Antp	52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AAAA	Alanina-alanina-alanina-alanina
abdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
Abs	Absorbancia
ANT-C	Complejo Antennapedia
Antp	Antennapedia
BiFC	Complementación de Fluorescencia Bimolecular
BIP2	Factor Asociado a TBP 155 (TAFII155)
BX-C	Complejo Bithorax
Dll	Distalless
Dfd	Deformed
Exd	Extradenticle
FBS	Suero Fetal Bovino
GTF	Factores de Transcripción Generales
HD	Homeodominio
HOM-C	Complejo Homeótico
Hth	Homothorax
LB	Luria-Bertani
Lab	Labial
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
ng/μl	Nanogramos por microlitos
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaOAc	Acetato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
N-terminal	Amino terminal

pb	Pares de bases
Pb	Proboscipedia
PIC	Complejo de Pre-iniciación
RLU	Unidades Relativas de Luminiscencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
Scr	Sex-combs-reduced
TBP	Proteína de Unión a Caja TATA
TF	Factor Transcripcional
Ubx	Ultrabithorax
μg	Microgramo
μl	Microlitro
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina

RESUMEN

Las homeoproteínas presentan estructuras tan similares y reconocen secuencias de DNA prácticamente idénticas, por lo cual es necesario determinar el mecanismo funcional que les permite llevar a cabo la regulación de la expresión de los genes del desarrollo en el lugar y momento apropiado. Comparaciones realizadas entre las secuencias codificantes de los genes de estas proteínas han mostrado, que comparten dominios altamente conservados como el homeodominio (HD), el tetrapéptido YPWM y regiones Poly-Q. Se ha demostrado que la homeoproteína Antennapedia puede establecer interacciones diméricas con cofactores y factores transcripcionales como TBP, TFIIE β , BIP2, Exd, Scr y Ubx; sin embargo, éstas interacciones no logran explicar cómo se lleva a cabo la regulación transcripcional. Más recientemente hemos comprobado que Antp puede formar complejo con más de un factor, como se confirmó mediante FRET-BiFC, Antp-TBP forman complejos triméricos con TFIIE β , Exd y BIP2. Debido a que se desconoce el papel que tiene las interacciones multiprotéicas en la regulación, en este trabajo de tesis analizamos la actividad transcripcional de los complejos triméricos de Antp-TBP-TFIIE β Antp-TBP-Exd y Antp-TBP-BIP2. La estrategia experimental consistió en ensayos de transactivación, en realizados mediante transfecciones de los plásmidos productores de Antp con los factores TBP, TFIIE β , Exd y BIP2 para determinar el efecto de estos complejos en la actividad transcripcional de Antp. Los resultados obtenidos muestran que la interacción trimérica de Antp-TBP-TFIIE β incrementa de manera altamente significativa la actividad transactivadora de Antp en un 138%. En contraste, Antp-TBP-Exd muestra un rescate parcial (80%) de la transcripción en comparación con los complejos diméricos Antp-TBP (73%) y Antp-Exd (61%). Sin embargo, con el complejo trimérico de Antp-TBP-BIP2 obtuvimos una disminución significativa de la capacidad transactivadora de Antp (26%). También logramos determinar los dominios funcionales involucrados en la actividad transcripcional de Antp en el complejo Antp-TBP-TFIIE β , así como también la importancia que tiene el motivo YPWM en las interacciones de Antp con TBP-Exd y TBP-BIP2. Los resultados reportados en la transactivación por las interacciones triméricas abre la posibilidad de analizar el efecto funcional en la regulación génica *in vivo* en *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Homeoproteins have such similar structures and recognize almost identical DNA sequences, which is why it is necessary to determine the functional mechanism that allows them to carry out the regulation of the expression of developmental genes in the appropriate place and time. Comparisons made between the coding sequences of the genes of these proteins have shown that they share highly conserved domains such as the homeodomain (HD), the YPWM tetrapeptide and Poly-Q regions. It has been shown that the homeoprotein Antennapedia can establish dimeric interactions with cofactors and transcriptional factors such as TBP, TFIIE β , BIP2, Exd, Scr and Ubx; however, these interactions fail to explain how transcriptional regulation takes place. More recently we have verified that Antp can complex with more than one factor, as confirmed by FRET-BiFC, Antp-TBP form trimeric complexes with TFIIE β , Exd and BIP2. Because the role of multiproteic interactions in regulation is unknown, in this thesis work we analyze the transcriptional activity of the trimeric complexes of Antp-TBP-TFIIE β Antp-TBP-Exd and Antp-TBP-BIP2. The experimental strategy consisted of transactivation assays, transfecting the Antp plasmids with the factors TBP, TFIIE β , Exd and BIP2 to determine the effect of these complexes on the transcriptional activity of Antp. The results obtained show that the trimeric interaction of Antp-TBP-TFIIE β highly significantly increases the transactivating activity of Antp by 138%. In contrast, Antp-TBP-Exd shows a partial rescue (80%) of transcription compared to the dimeric complexes Antp-TBP (73%) and Antp-Exd (61%). However, with the Antp-TBP-BIP2 trimeric complex we obtained a significant decrease in the transactivating capacity of Antp (26%). We were also able to determine the functional domains involved in the transcriptional activity of Antp in the Antp-TBP-TFIIE β complex, as well as the importance of the YPWM motif in the interactions of Antp with TBP-Exd and TBP-BIP2. The results reported in the transactivation by trimeric interactions opens the possibility of analyzing the functional effect on in vivo gene regulation in *Drosophila melanogaster*.

1. INTRODUCCIÓN

Las homeoproteínas son factores transcripcionales (TFs) responsables de regular la expresión de distintos sets de genes responsables de dar identidad a los segmentos del eje anteroposterior en los organismos bilaterales. Estos TFs se caracterizan por poseer un dominio altamente conservado de 60 aminoácidos conocido como el Homeodominio (HD), mediante el cual llevan a cabo el reconocimiento y unión con el surco mayor del DNA en una secuencia consenso TAAT (Kaolionis & O'Farrel,1993). Debido a que esta secuencia se encuentra altamente repetida en los genomas y a el alto grado de conservación del HD, se ha intentado explicar cómo es que estos factores transcripcionales adquieren su especificidad funcional. Una de las respuestas a esta interrogante es su interacción con otros cofactores y/o factores transcripcionales (Biggin & McGinnis,1997). Se ha encontrado que las homeoproteínas interaccionan con cofactores como Exd y Hth de forma dimérica y trimérica (Mann & Affolter, 1998; Mann & Chan, 1996; Dong et.al.,2002) y de esta manera adquieren especificidad de unión al DNA. Adicionalmente se ha encontrado que son capaces de interaccionar con factores de la maquinaria basal de transcripción, el complejo mediador, factores de pausa de la polimerasa, así como proteínas de remodelación de la cromatina, de manera que no solo interaccionan para brindar especificidad de unión, sino también para regular la transcripción de forma directa e indirecta. Antennapedia es una proteína homeótica encargada de brindar identidad a los segmentos torácicos 2 y 3 en *Drosophila melanogaster*. Además, se ha determinado que esta homeoproteína es capaz de interaccionar con cofactores como Exd y Hth, pero también con componentes de la maquinaria basal de transcripción como BIP2, TFIIE β y TBP. Estudios previos han demostrado que la interacción de Antp con cofactores y factores transcripcionales es importante para la regulación de la actividad transactivadora y de su unión con al DNA; más recientemente se comprobó que tiene capacidad de formar interacciones triméricas con otros TFs. Por lo que en esta tesis se determinará el efecto transcripcional que tienen las interacciones de Antp con los factores TBP-TFIIE β , TBP-Exd y TBP-BIP sobre su capacidad transcripcional.

2. ANTECEDENTES

2.1. HOMEOSIS Y GENES HOX

El termino “Homeosis” surge por William Bateson, quien en 1894 publicó el libro *Materials for the Study of Variation, Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species*, en donde acuña el termino para hacer referencia a una variación, que genera que una parte del cuerpo adquiera la identidad de otra. (Bateson,1894).

Casi dos décadas después en 1915 Calvin Bridges, realizo la primera descripción de una mutante homeótica de *Drosophila melanogaster*, una mosca con 4 alas causada por la duplicación del segundo segmento torácico (T2) en el segmento T3, generando la aparición de un segundo par de alas en donde normalmente se encontrarían ubicados los halterios (Figura 1), dicha mutación recibió el nombre de *Bithorax* (Bridges & Morgan, 1923). Y como esta otras muchas mutantes homeóticas de la mosca se describieron posteriormente, algunos ejemplos fueron *Aristapedia* (Balkashina,1929) *Proboscipedia* (Bridges & Dobzhansky,1933), *Hexaptera* (Herskowitz,1948) y *Antennapedia* (Le Calvez,1948) entre otras.

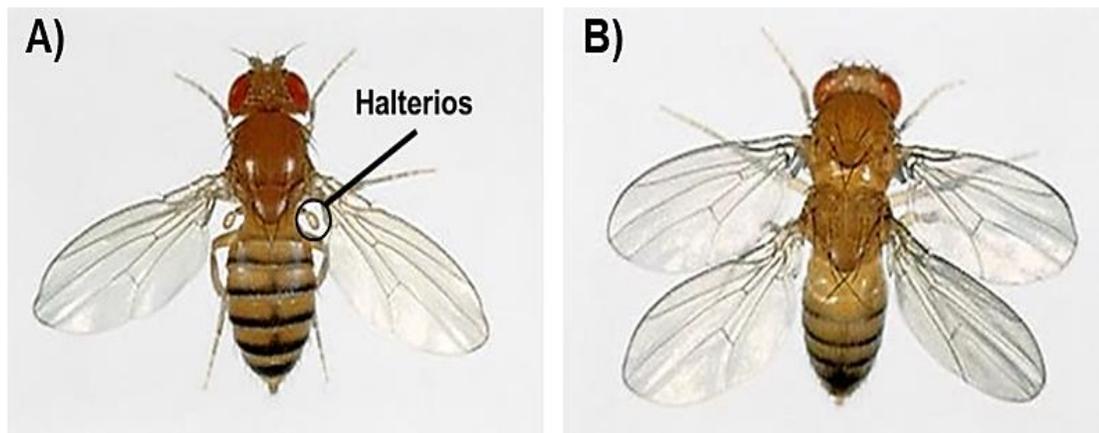


Figura 1. Mutación homeótica de Bithorax en *Drosophila melanogaster*. A) Fotografía de una mosca silvestre que muestra la presencia normal de los halterios en el tercer segmento torácico (T3) B) Mutante homeótica Bithorax, en la que se han desarrollado un segundo par de alas (segmento T2 →T3) en donde deberían estar ubicados los halterios. Tomada y modificada de Lewis, 2004.

Los primeros abordajes realizados para entender cómo es que se generan los cambios homeóticos, llevo a sugerir la presencia de “sustancias evocadoras” encargadas de controlar el destino celular y el desarrollo de los diferentes segmentos (Goldschmidt,1938). Sin embargo, años más tarde luego del descubrimiento del DNA, se sugirió que la diferenciación celular era regulada por la actividad de los genes (Britten & Davidson 1969).

En 1973 el español García-Bellido a partir de análisis genéticos y estudios de mutantes de la mosca de la fruta, propuso la existencia de subdivisiones de los segmentos corporales en “compartimentos” o grupos de células, los cuales se encargaba de brindar identidad a las diferentes regiones anatómicas (García-Bellido,1973). Dada la restricción de linaje observada, también propuso la idea de la existencia de grupos de “genes selectores”, los cuales se encargaban de dirigir la diferenciación embrionaria en la que cada uno de los compartimientos correspondería a una unidad de desarrollo discreta, definida por la expresión de los genes homeóticos (García-Bellido,1975).

Fue así como luego de múltiples trabajos con *Drosophila melanogaster*, Edward Lewis y sus colaboradores lograron ubicar en el cromosoma 3 de la mosca, un conjunto de genes encargados de regular el desarrollo de los apéndices torácicos y abdominal, el complejo de estos genes fue nombrado como “complejo Bithorax” (BX-C), fue ahí cuando se determinó que la mutación en el gen *Ubx*, era el responsable del fenotipo observado en la mutante homeótica de *Bithorax*, descrita por Bridges 55 años antes (Lewis *et.al.*,1978). Dos años más tarde, Kaufman y colaboradores lograron establecer la existencia de un segundo complejo de genes en el cromosoma 3 de la mosca, el “complejo Antennapedia” (ANT-C) encargado de especificar la formación de la región anterior del cuerpo, correspondiente a la cabeza y los segmentos T1 y T2 (Kaufman *et.al.*,1980). De manera colectiva podemos decir el complejo Bithorax y Antennapedia forma el complejo homeótico (HOM-C) encargado de determinar el desarrollo de la estructura corporal de *Drosophila melanogaster* a lo largo del eje anteroposterior (A/P) del cuerpo (Figura 2).

Dentro de los genes que conforman cada uno de estos complejos encontramos los genes homeóticos *labial (lab)*, *Proboscipedia (Pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* y *Antennapedia (Antp)* como parte del ANT-C; y *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abdA)*, *Abdominal B (AbdB)* como parte del BX-C (Sparmann & Van-Lohuizen 2006; Lemons & McGinnis 2006; Gilbert y Barresi, 2016).

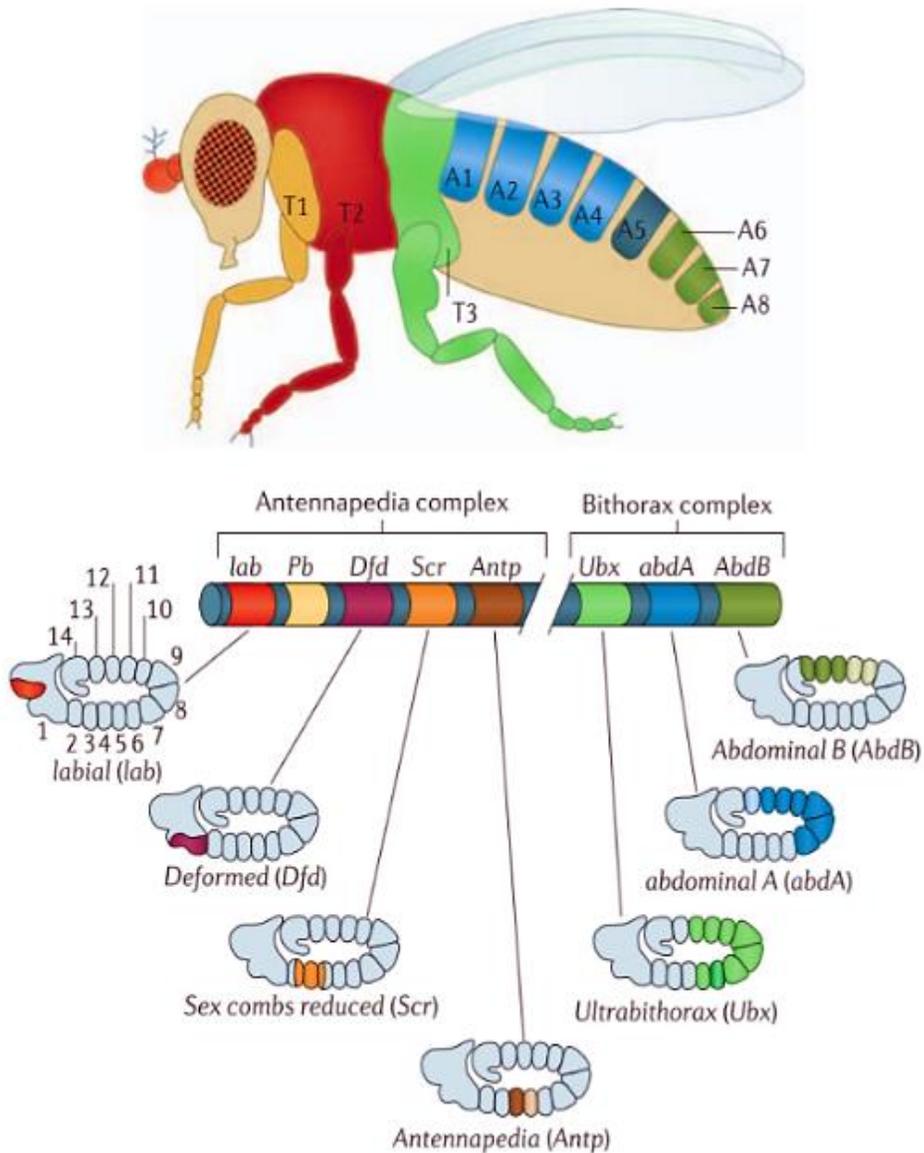


Figura 2. Esquema de organización de los Genes Hox en *D. melanogaster*. Los genes homeóticos de la mosca de la fruta se encuentra agrupados en dos complejos: ANT-C encargado de la formación de la cabeza y segmentos torácicos T1-T2 y el complejo BX-C, encargado de dar identidad a el segmento torácico T3 y la región Abdominal A1-A8. Tomada de Sparmann, A., & Van-Lohuizen, M. 2006.

Una característica importante de los genes Hox es su acomodo en el genoma. Análisis genéticos mostraron que genes homeóticos no solo se encuentran organizados en complejos dentro del mismo cromosoma, sino que además el orden en el que se encuentran corresponde también con su orden de expresión a lo largo eje anteroposterior; de tal manera que los genes Hox ubicados en el extremo 3' se expresan antes y más anteriormente que los genes ubicados más cerca del extremo 5'; a este fenómeno se le conoce como “colinealidad espacial”. Este acomodo particular de los genes homeóticos permite que exista una jerarquía en la que la actividad de las proteínas Hox posteriores es dominante sobre la actividad de las anteriores (Duboule & Morata, 1994).

2.2 EVOLUCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS GENES HOX

A través del aislamiento y secuenciación de los complejos de BX-C y ANT-C (Bender *et.al.*,1983; Garber *et.al.*,1983), se determinó que los genes homeóticos presentan hibridación cruzada entre regiones homologas de los genes *Antennapedia*, *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* (Kuroiwa *et.al.*,1984). Fue así como en 1984 McGinnis y colaboradores localizaron una secuencia de DNA altamente conservada dentro de los genes del HOM-C, los cuales parecían desempeñar un papel fundamental en la formación de las estructuras anatómicas en una amplia variedad de organismos, incluido el *Homo sapiens* (McGinnis *et.al.*,1994); secuencias similares también se localizaron en otros organismos simples como levaduras y algunos hongos (Shepherd *et al.*,1984, Shulz *et al.*,1990).

La similitud entre los genes Hox de diferentes organismos, reveló que estos genes comparten una secuencia altamente conservada de alrededor 180 pb conocida como caja homeótica (Homeobox), (McGinnis *et.al.*,1984 Scott & Weiner, 1984 Gehring, *et.al.*,1994) la cual se encuentra presente en todos los genes Hox. Esto permitió sugerir el origen de los genes homeóticos en diferentes organismos es debido a de un proceso de duplicación y divergencia, en la cual un solo gen ancestral se duplicó varias veces, y fue adquiriendo cambios graduales, dando lugar a la diversificación morfogénica de los organismos, y a la formación de estructuras corporales más compleja (Akam,1989; García- Fernández 2005; Ikuta & Saiga 2005, Pearson *et.al.*,2005).

Comparaciones entre los genes homeóticos presentes en la mosca de la fruta *D. melanogaster* y otros vertebrados (Figura 3) como el ratón y los seres humanos, han demostrado similitudes no solo en secuencia, sino también en la organización y patrones de expresión de los genes homeóticos (Akam,1969; Wright et.al., 1990, Nitta et.al., 2015).

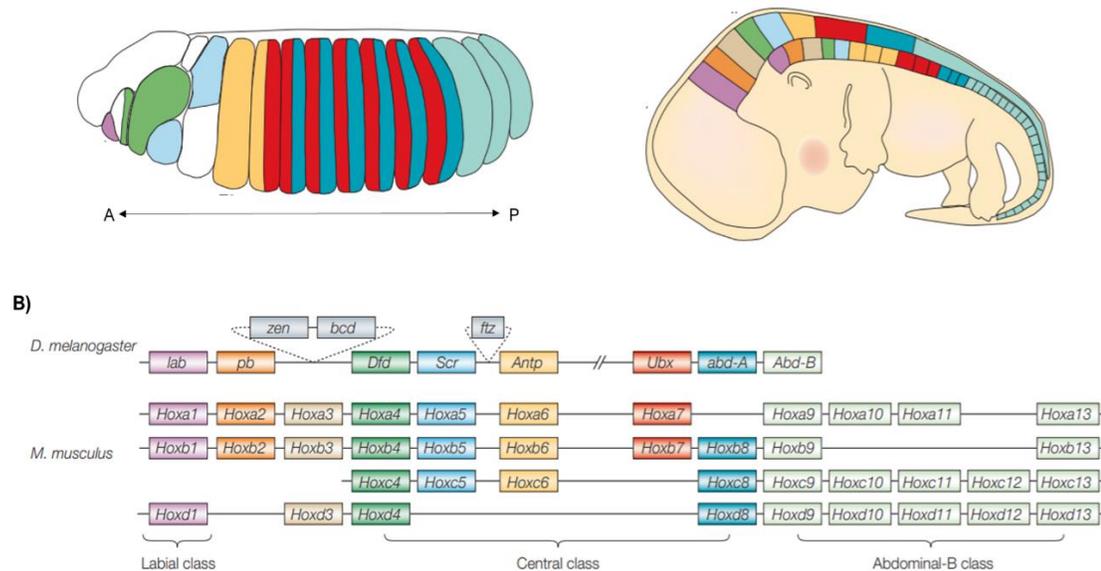


Figura 3. Conservación evolutiva y organización genómica de los genes homeóticos. A) A la izquierda se muestra la distribución de los genes homeóticos a lo largo del eje anteroposterior (A-P) en un embrión *Drosophila* en estadio 13, a la derecha un embrión de ratón (*Mus Musculus*) de 12 y media semanas. B) Esquema de los genes homeóticos de *D.melanogaster* y *Mus musculus*, los colores de etiquetado muestran la distribución de los en orden colineal de expresión en el embrión, además representan los parálogos de cada gen entre la mosca y los vertebrados superiores. Estos mismos colores muestran la duplicación de genes en ratón (genes ortólogos).
Modificada de Pearson, et al., 2005.

2.3 HOMEOPROTEÍNAS

Los genes homeóticos codifican para proteínas conocidas como homeoproteínas o proteínas Hox. Su función principal es como factores de transcripción regulando la expresión de genes que brindaran especificidad al plano corporal de los organismos durante el desarrollo (Gehring et.al.,1994). Esto a través de un dominio de unión DNA de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD), que les permite unirse al DNA para llevar a cabo la regulación de los genes del desarrollo (Levine *et.al.*,1984; Scott & Weiner,1984, McGinnis & Krumlauf, 1992).

La estructura tridimensional de las homeoproteínas muestra que estas están formadas de tres α -hélices unidas mediante bucles cortos y un N-terminal libre. Las hélices 1 y 2 las cuales se unen en un motivo hélice-giro-hélice están conformadas por los residuos 10 a 22 y 28 a 38 respectivamente. La hélice 3 del homeodominio (hélice de reconocimiento) conformada por los residuos 42 a 59 es la encargada llevar a cabo el reconocimiento y unión de las homeoproteínas con el surco mayor del DNA, a través de los residuos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54 de la hélice 3 y el brazo N-terminal en la hélice 1 (Svingen & Tonissen, 2006, Mann et al., 2009). Tal como se esquematiza en la figura 4.

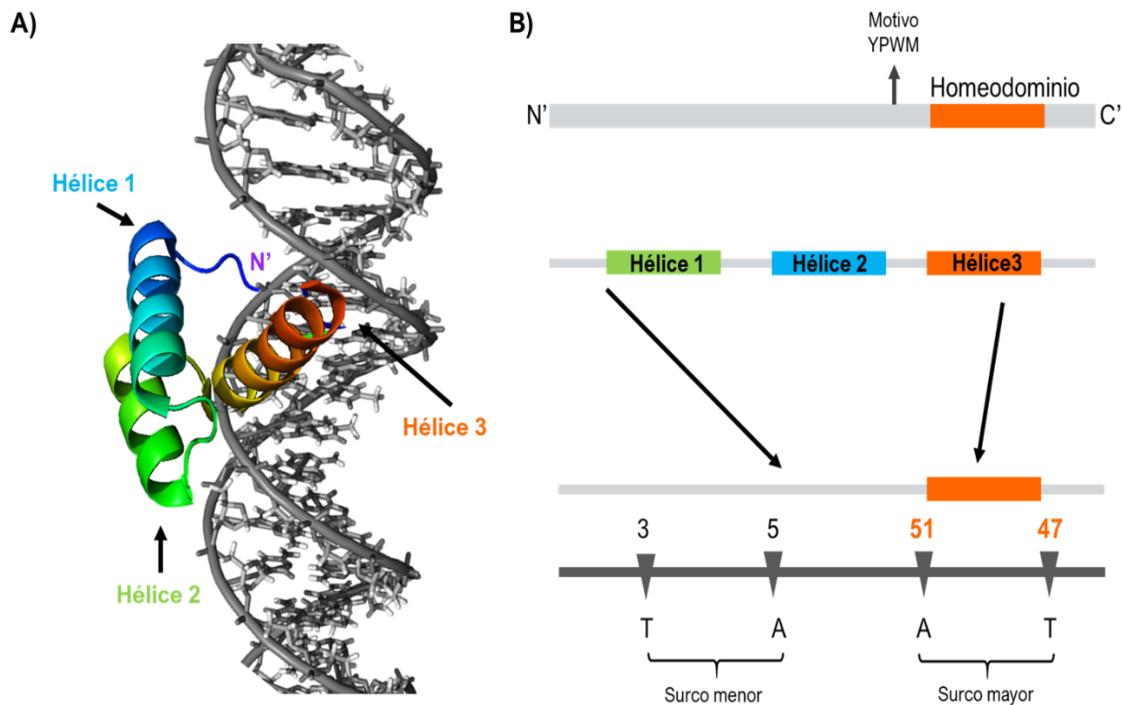


Figura 4. Interacción del Homeodominio con el DNA. A) El homeodominio (HD) tiene una estructura tridimensional formada de 3 α -hélices unidas por bucles cortos y un extremo terminal libre mediante el cual establecen interacción con el DNA. La hélice 3 del homeodominio identificada en color naranja establece interacción con el surco mayor del DNA a través de los residuos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54. El brazo libre del extremo N-terminal del HD etiquetado como N' morado se marca el extremo N-terminal libre del HD unido a surco menor del DNA. B) Representación esquemática de los dominios de las proteínas HOX. Se indica el motivo YPWM y el HD conformado por las 3 α -hélices. En la parte inferior se esquematizan los sitios de interacción entre los residuos 3 y 5 del extremo N terminal en el surco menor y los residuos 47 y 51 de la hélice 3 en el surco mayor del DNA. Imagen modificada de Hueber, 2009.

Otro elemento presente de manera conservada entre las proteínas Hox (excepto abdA) es el tetrapéptido “YPWM”, cuyo nombre viene dado por la secuencia consenso Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina (Gehring et.al.,1994, Shen et al.,1997). El tetrapéptido YPWM de las homeoproteínas se localiza rio arriba del HD unido mediante el brazo N-terminal de la hélice I, sin embargo, la distancia que separa el tetrapéptido del HD en cada homeoproteína depende del número de aminoácidos presentes en cada una (Figura 5).

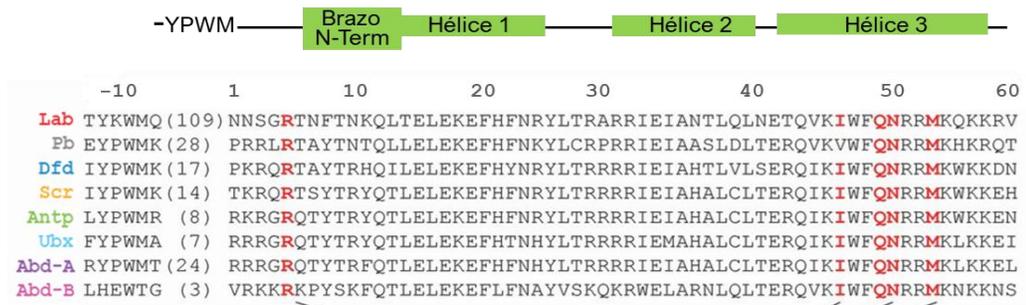


Figura 5. Alineamiento y comparación aminoacídica de las homeoproteínas de *Drosophila melanogaster*. El homeodominio se muestra del 1 al 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM. En paréntesis se marca el número de aminoácidos que separa el tetrapéptido YPWM del homeodominio y en rojo los residuos de contacto con el DNA para cada una de las homeoproteínas. Modificada de Mann,2008.

A través de técnicas como la cristalografía de rayos X o la espectrofotometría de resonancia magnética nuclear (RMN), se han determinado los sitios preferenciales de unión de las homeoproteínas. Debido a su estructura tridimensional hélice-giro-hélice las homeoproteínas son capaces de reconocer secuencias de unión consenso en el DNA. Ensayos *In-vitro* muestran que la mayoría de las homeoproteínas tiene una alta afinidad por sitios de reconocimiento con secuencias cortas de alrededor de 6pb ricas en Adenina y Timina, con motivos consenso como TAAT/GC/G (Ekker et.al.,1991, Gehring et al.,1994). Este tipo de secuencias ricas en A/T se encuentran altamente distribuidas en el genoma de *Drosophila* al menos 1 vez cada kilobase, por lo que existen alrededor de ~122,653 copias de este tipo de secuencias (Ortiz-Lombardia et al., 2017).

2.4 PARADOJA HOX

Debido a que las homeoproteínas presentan un alto grado de conservación entre sus homeodominios y llevan a cabo el reconocimiento de secuencias cortas altamente repetidas en el genoma con una especificidad deficiente (Hoey & Levine, 1988), surge la pregunta fundamental de cómo es que las homeoproteínas adquieran su especificidad transcripcional y biológica en los diferentes organismos durante el desarrollo (Figura 6). Tomando en cuenta que sabemos que una misma proteína Hox puede activar o reprimir la transcripción dependiendo de las circunstancias precisas (Krasnow et al., 1989), de manera tal que una misma homeoproteína puede regular de manera diferencial la expresión de sus genes blanco, estableciendo patrones de expresión celular para los diferentes segmentos del cuerpo. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos mediante los cuales llevan a cabo sus funciones precisas siguen siendo aún desconocido. Esta interrogante se conoce como la “paradoja Hox”. (Prince et al., 2002).

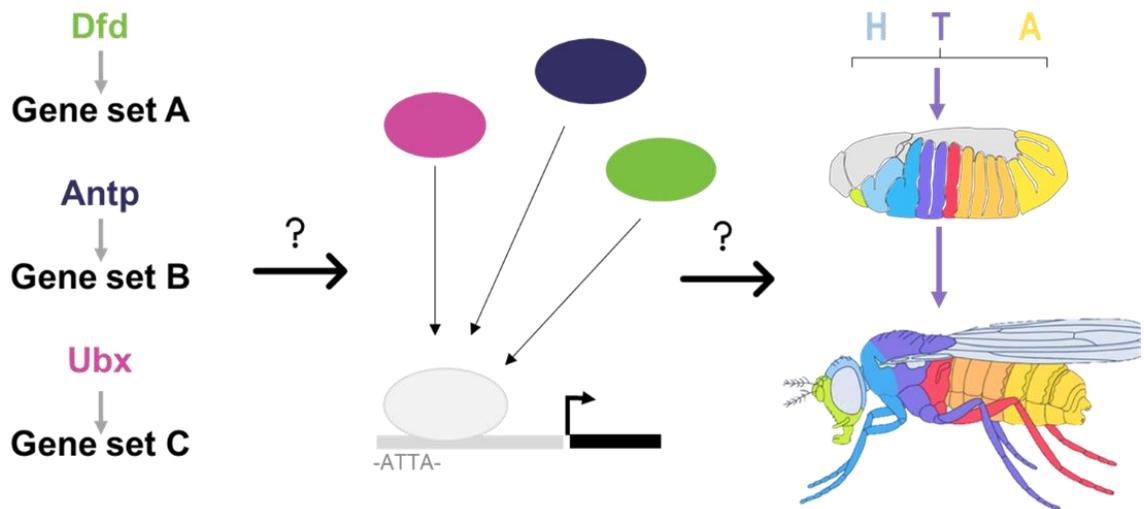


Figura 6. La paradoja de los genes homeóticos. Diferentes homeoproteínas regulan de manera diferencial la expresión de diferentes sets de genes durante el desarrollo. Debido a las similitudes estructurales de las homeoproteínas y su preferencia por secuencias cortas altamente distribuidas en el genoma, resulta interesante analizar cómo es que estas homeoproteínas son capaces de expresarse en el momento y lugar preciso permitiendo el desarrollo de los diferentes segmentos de eje antero-posterior (A-P) de los organismos. Modificada de Hueber & Lohmann, 2008.

2.5 ESPECIFICIDAD DE LAS HOMEOPROTEÍNAS

La cuestión fundamental sobre como las homeoproteínas seleccionan sus sitios *in vivo* sugiere que, las homeoproteínas adquieren especificidad de unión al DNA de múltiples formas (Pearson et al., 2005). A través de los años se han sugerido diversos modelos de especificidad para la homeoproteínas. Tomado en cuenta que un mismo sitio de unión puede ser regulado de forma diferencial por diferentes homeoproteínas, Hayashi y Scott en 1990 establecieron algunos posibles modelos de cómo es que las homeoproteínas podrían adquirir especificidad de unión al DNA. La primera de las propuestas menciona que las diferencias de afinidad entre las homeoproteínas por sitios de unión cercanos al promotor regulan su actividad (Figura 7A). La segunda posibilidad establece que las homeoproteínas interaccionan con cofactores para incrementar su afinidad y especificidad por secuencias de unión más concretas en el genoma (Figura 7B). La última propuesta de regulación considera que los sitios a los cuales se unen las proteínas Hox pueden modificar la conformación del HD, permitiendo que estas se unan a diferentes secuencias con diferente afinidad modificando la transcripción de sus genes blancos (Figura 7C) (Hayashi & Scott, 1990).

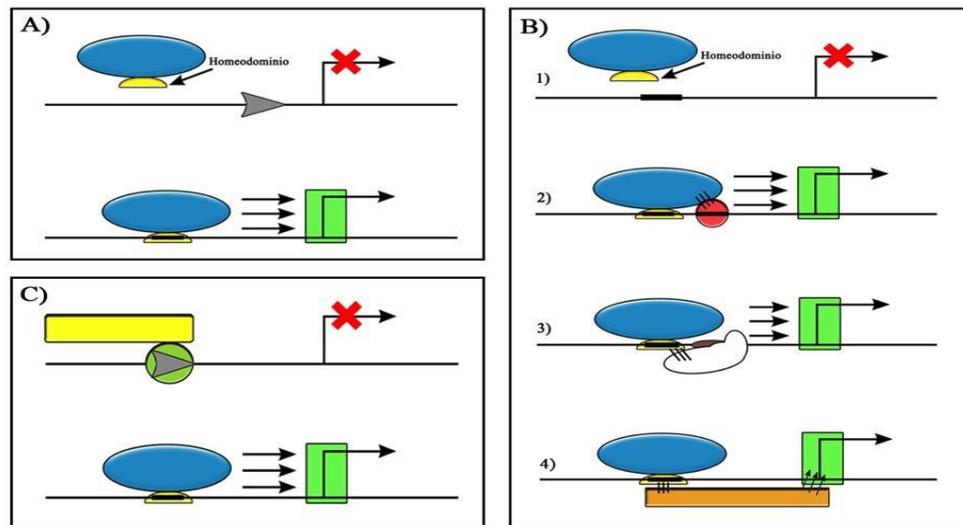


Figura 7. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas. En la imagen se esquematizan tres posibles mecanismos que determinan la especificidad de las homeoproteínas. **A)** La afinidad de las homeoproteínas es el resultado de la actividad del promotor, **B)** La afinidad y especificidad de las proteínas, involucra la participación de otros factores de unión cooperativa o cofactores y **C)** El sitio de unión puede modificar la conformación proteica del HD, que modifican la capacidad de unión afectando la transcripción de los genes.

Tomado de Jiménez-Mejía, 2018.

2.6 COFACTORES DE UNIÓN COOPERATIVA

Uno de los modelos de regulación dominantes es que la interacción con cofactores les confiere propiedades específicas de unión al ADN en diferentes proteínas Hox. En ausencia de cofactores las homeoproteínas reconocen sitios de unión muy similares (Figura 8), sin embargo, ensayo *in-vitro* han demostrado que los cofactores pueden favorecer la especificidad de reconocimiento y unión a través de una unión cooperativa, que incrementa la preferencia de las homeoproteínas por sitios de unión compuestos diferentes de los sitios de reconocimiento de cada TF (Mann & Affolter 1998, Mann et al., 2009, Merabet & Mann 2016).

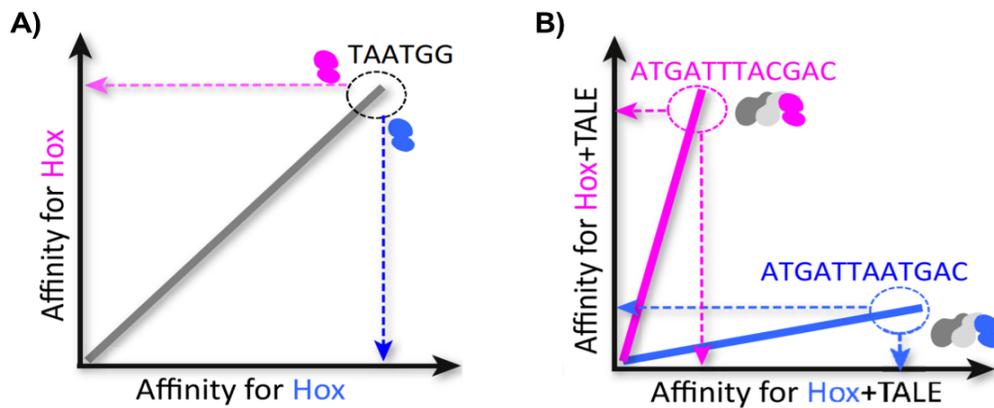


Figura 8. Especificidad y afinidad de las homeoproteínas. A) Dos homeoproteínas diferentes (rosa y azul) pueden reconocer sitios de unión al DNA con una especificidad muy baja. B) Al interactuar con cofactores, se incrementa la especificidad de reconocimiento ocasionado preferencia por sitios de unión diferentes. Modificada de Merabet & Mann., 2016.

La especificidad de unión de las homeoproteínas Hox al DNA se ve favorecida por las interacciones con dos familias de cofactores, PBC y Meis (Mukherjee & Bürglin, 2007). Los cofactores pueden unirse al DNA, esto debido a la presencia de un homeodominio similar al de las homeoproteínas Hox. Es ello que se sugiere que los cofactores podrían participar como un segundo factor transcripcional, que junto a las homeoproteínas regulen de manera diferencial la expresión de los genes del desarrollo (Joshi et al., 2007, Merabet & Mann., 2016).

Extradenticle (Exd) fue el primer cofactor Hox identificado en *Drosophila melanogaster* (Moens & Selleri, 2006). Esto a partir de la determinación de mutaciones que generaban transformación homeótica de diferentes segmentos corporales, sin alterar el patrón de expresión de los genes homeóticos (Peifer y Wieschaus, 1990; Rauskolb et al., 1993). Tanto Exd como Pbx son proteínas ortólogas perteneciente a la subclase PBC de las proteínas con HD TALE (por sus siglas en inglés: three amino acid loop extensión). Las proteínas PBC presenta una “extensión” de tres aminoácidos extra entre el bucle de las hélices uno y dos de HD, mediante los cuales pueden interaccionar con el motivo YPWM de las homeoproteínas (Passner et al., 1999; Chang et al., 1995).

Exd establece interacción con las homeoproteínas Ultrabithorax, Abdominal-A (Chan *et al.*, 1994) y Antennapedia (Papadopoulos *et al.*, 2011), que son importantes en la determinación de los sitios de unión de las homeoproteínas, modificando su actividad funcional.

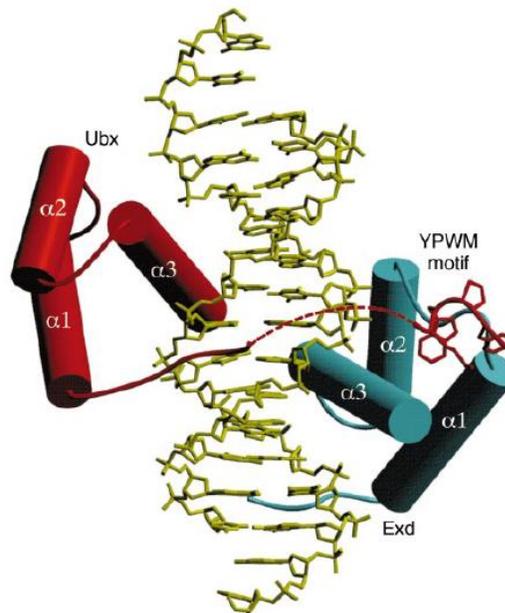


Figura 9. Unión cooperativa Ubx-Exd-DNA. El esquema muestra la unión cooperativa de los homeodominios de las proteínas Ubx (rojo) y Exd (Cian) al DNA (amarillo). La línea punteada representa los residuos de enlace entre la hélice I del HD de UBx y el motivo YPWM, por medio de los cuales se establece la interacción con Exd. Tomada de Passner et al., 1999.

La familia Meis conformada por Meis y Prep en vertebrados, tiene sólo un representante en la mosca, *homotórax (hth)*, el cual participa en la translocación de la homeoproteínas al núcleo a través de un dominio conservado en el extremo N-terminal (Mann & Affolter, 1998). Y aunque si bien en las interacciones de las homeoproteínas y cofactores como Exd pueden incrementar la “especificidad latente” propia de cada homeoproteína, estas interacciones no son suficiente para explicar cómo es que los complejos HOX-Cofactor, seleccionan sus sitios de unión cooperativa.

2.7 INTERACTOMA HOX

El modelo de regulación actual para las homeoproteínas contempla la formación de complejos reguladores multicomponentes (figura 10) por lo que, además de su interacción con cofactores la homeoproteínas también establecen interacciones con factores transcripcionales y otros elementos para llevar a cabo su regulación n transcripcional (Badis et al.,2009; Bobola & Merabet, 2017).

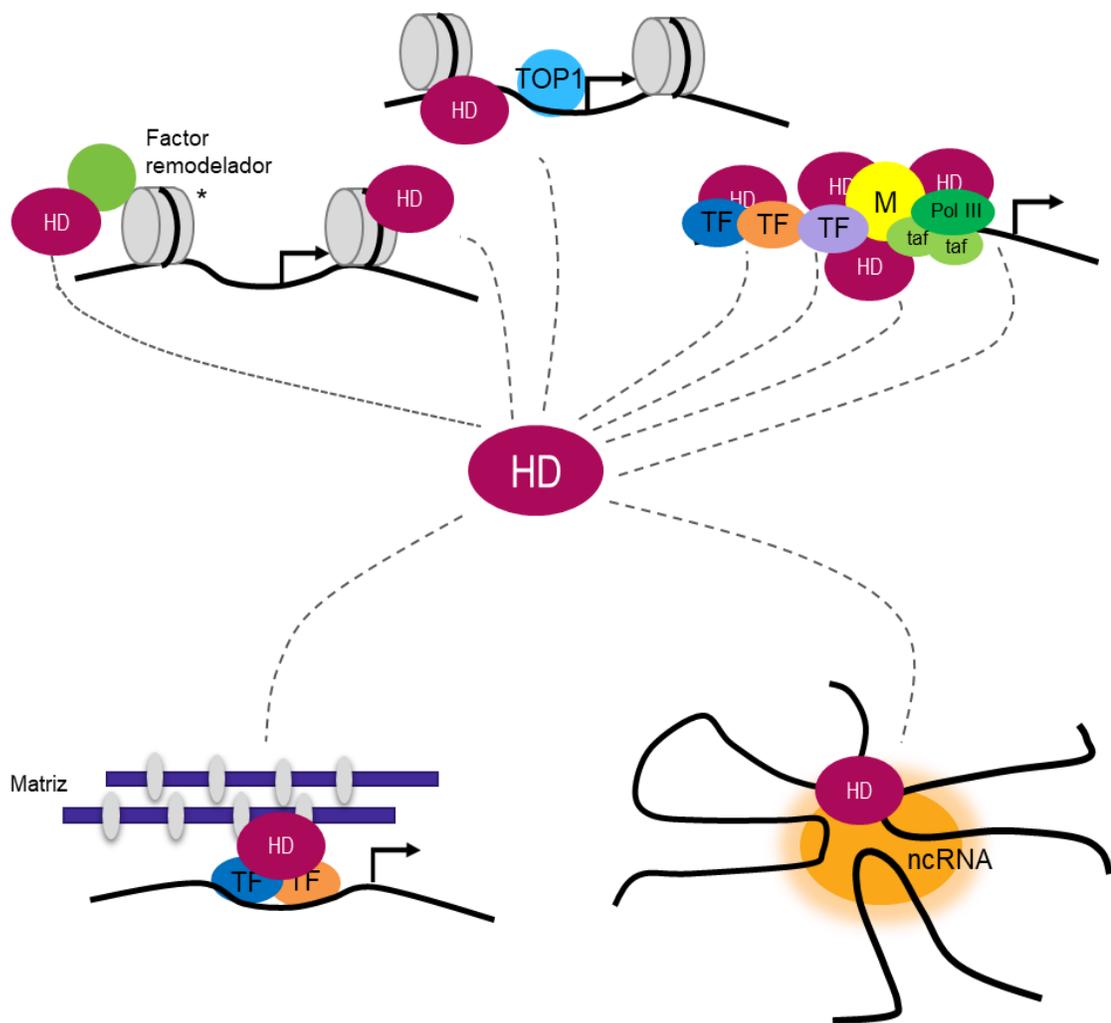


Figura 10. Interacciones proteínas-proteína de las homeoproteínas. La figura ilustra la multiplicidad de interacciones que tiene el HD para interactuar con complejos de remodelación de la cromatina, Histonas, Topoisomerasas de tipo 1, proteínas de unión a DNA (cofactores y factores transcripcionales), RNA no codificantes y proteínas de matriz.
Modificada de Bobola & Merabet, 2017

. 2.8 FACTORES GENERALES DE TRANSCRIPCIÓN

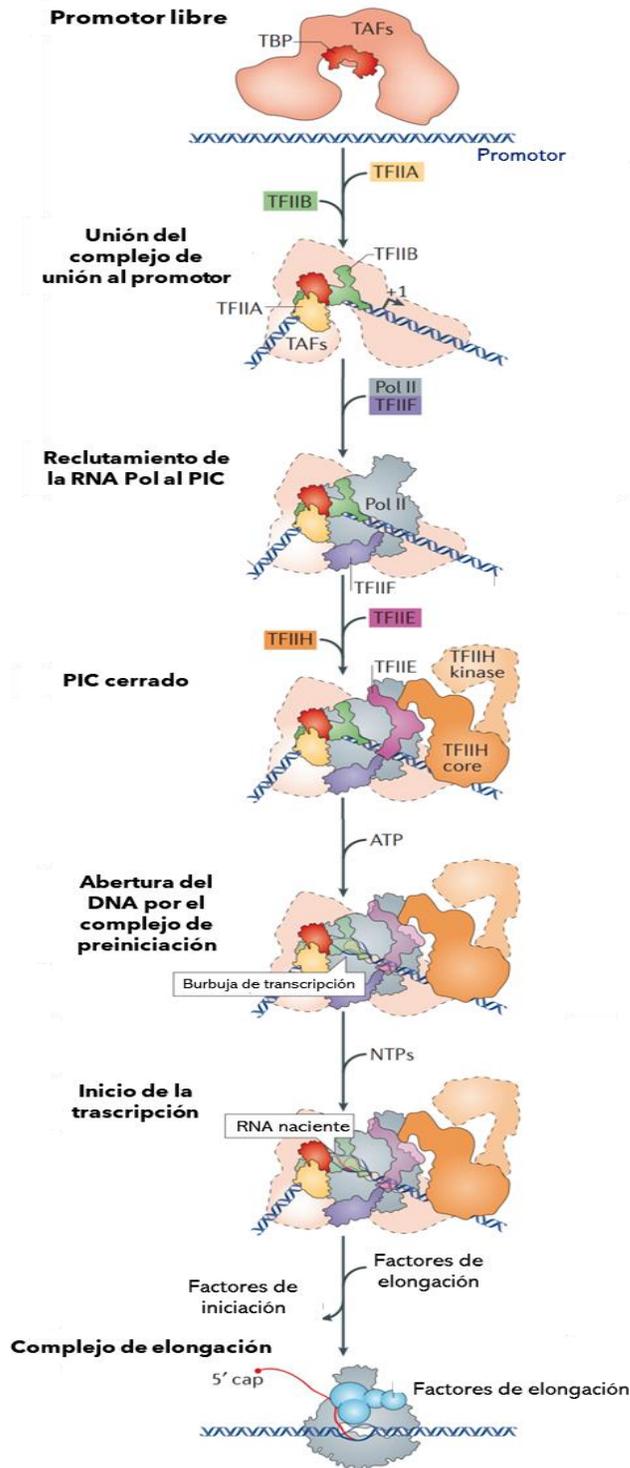
Las homeoproteínas necesitan establecer interacción con factores de transcripción para llevar a cabo la regulación transcripcional durante el desarrollo embrionario. En eucariotas el proceso de transcripción de genes codificantes para proteínas es llevado a cabo por la RNA polimerasa II (Pol II). Para el inicio de transcripción es necesaria la presencia de factores generales de transcripción (GTF's por sus siglas en inglés). Los factores generales de transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH se encuentran conservados evolutivamente y son necesarios para la formación del complejo de preiniciación (PIC) para iniciar la transcripción. La formación del PIC es dependiente del reclutamiento secuencial de los GTFs alrededor del punto de inicio cercano al promotor. Basados en análisis con promotores se determinó que los GTF's presentan una función específica en la transcripción entre las que se encuentran el reclutamiento y unión de la RNA pol II y la abertura de la hebra de DNA para iniciar con la síntesis de RNA (Tabla 1).

El factor TFIID conformado por la proteína de unión a caja TATA (TBP) y varios factores asociados a TBP (TAFs) son los primeros en reclutarse en la formación del PIC. Estructuralmente TBP presenta una forma de silla de montar que le permite unirse al surco menor del DNA en la caja TATA causando la flexión del DNA (Kim *et al.*, 1993). Para que la RNA pol II reconozca la secuencia consenso río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), es necesario reclutar el factor TFIIA. El papel de TFIIA en el brindan estabilidad a la unión de TBP al DNA (Buratowski, 1994; Imbalzano *et al.*, 1994), posteriormente se recluta el factor TFIIB para seleccionar los de unión y junto a TFIIIF reclutar a la RNA polimerasa. Finalmente, TFIIE y TFIIH abren el DNA promotor. A través de su actividad ATPasa y helicasa, además el factor TFIIH participa también en la desnaturalización del DNA, permitiendo la formación de la “burbuja de transcripción” generando un complejo abierto, en donde la hebra de DNA plantilla se acerca al sitio activo de la RNA Pol II iniciando la síntesis de la cadena de RNA Finalmente, el desacoplamiento de los GTFs del PIC y el escape de la RNA pol II permite continuar con la fase de elongación transcripcional (Figura 11).

Tabla 1. Componentes de la Maquinaria Basal de Transcripción

Factor	Subunidad	Función
TFIIA	p35 (α), p19 (β) y p12 (γ)	-Anti-represor de la transcripción. -Estabiliza el complejo TBP-TATA. Coactivador de la transcripción.
TFIIB	p33	Selección del sitio de unión, estabiliza con el complejo TBP-TATA, recluta pol-II y TFIIF
TFIID	TBP +TAFs (TAF1-TAF14)	Factor de unión a elemento de promotor mínimo, coactivador, actividad proteína quinasa, activador de la ubiquitina, interacción con histona acetiltransferasa.
TFIIE	p56(α) p34(β)	-Recluta a TFIIF -Promueve el ensamblaje de la ARN polimerasa II
TFIIF	RAP30 Rap74	Se une a la ARN pol-II y facilita su reclutamiento al promotor, recluta TFIIE y TFIIF, participa en la selección del sitio de unión, facilita la transición a la etapa de elongación.
TFIIH	P89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38, Ciclina H, p34, p32/MAT1, p8/TFB5	Actividad ATPasa para la iniciación de la transcripción, actividad helicasa, reparación de ADN acoplada a la transcripción, actividad quinasa para la fosforilación del sitio CTD de la ARN polimerasa II, actividad ubiquitina ligasa E3.
Pol II	RPB1-RPB12	Iniciación de la transcripción, elongación y terminación, reclutamiento de enzimas modificadoras de ARN mensajero (unión de CAP), reclutamiento de factores de splicing, reclutamiento de factores de modificación de extremo 3, fosforilación, glicosilación y ubiquitinación de sitio CTD.

Tomado y modificado de Thomas & Chiang 2002.



- El factor TFIID se une a el surco menor del DNA, mediante **TBP**.
- El factor **TFIIA** se une corriente arriba del factor TFIID, para estabilizar la unión TBP-DNA.
- **TFIIB** se une corriente debajo de TFIID para definir el sitio de inicio de la transcripción, atrayendo a la **RNA pol II**.
- El factor **TFIIF** se une formado un complejo con la RNA polimerasa, aumentando la afinidad de por el promotor.
- **TFIIE** interacciona con la RNA pol II para permitir la unión del siguiente factor para favorecer la desnaturalización del promotor.
- El factor **TFIIH** se une para separar las hebras de DNA mediante su actividad helicasa, formando la burbuja de transcripción
- Una vez formado el complejo la **RNA pol II** comienza la transcripción, además se lleva a cabo la polimerización de la hebra de RNA naciente, acabo y la fosforilación de dominio CTD por la actividad quinasa del factor **TFIIH**, permitiendo la liberación de la RNA pol del complejo.
- Inicio a la fase de elongación

Figura 11. Ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción de la RNA Pol II. Modelo canónico del de orden ensamblaje de los factores generales de transcripción y la RNA Pol II, para formar el complejo de pre-iniciación (PIC) y el inicio de la transcripción
Modificado de Sainsbury et al., 2015.

2.9 INTERACTOMA DE ANTENNAPEDIA

El gen homeótico Antennapedia (*Antp*) descrito a partir de la mutante homeótica de Antennapedia en 1948, es una mutante de la mosca que presenta el desarrollo ectópico de un par de patas en donde normalmente se encontrarían las antenas (Le Calvez, 1948), esto como resultado de la pérdida de función del gen (Figura 12). *Antp* ubicado en el cromosoma 3 de *Drosophila* controla la diferenciación celular de células del tórax y abdomen, específicamente suprimiendo el desarrollo de la cabeza y promoviendo el desarrollo de los apéndices torácicos.

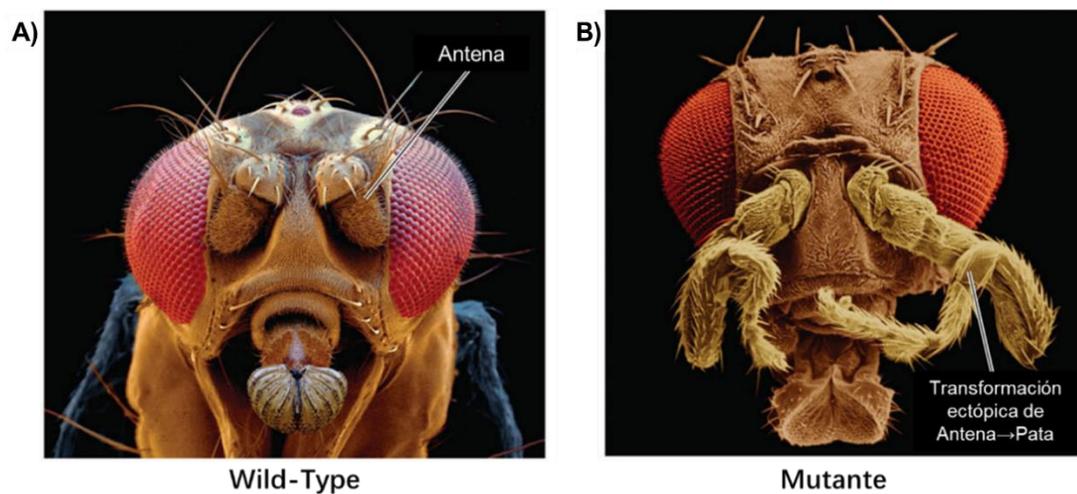


Figura 12. Mutante homeótico de Antennapedia. A) Una mosca de la fruta de tipo salvaje. B) Transformación Antena-Pata en la mutación homeótica Antennapedia. Jürgen Berger, Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany. Visuals Unlimited.

A través de los años se ha determinado que la interacción del Antennapedia con la maquinaria basal de transcripción y homeoproteínas son importantes para su regulación, como lo demostró Emili y colaboradores en 1994, Antennapedia interacciona con la maquinaria basal mediante su unión TBP (por sus siglas en inglés, TATA-Binding protein). Un año más tarde mediante ensayos de pulldown, también se confirmó que *Antp* se a la subunidad β del factor de la maquinaria basal TFIIE (Zhu & Kuriora 1996). BIP2, un factor asociado a la proteína de unión a caja TATA también se une que a *Antp* (Prince et.al., 2008).

En 2015 Baëza y colaboradores en un macroproyecto evaluaron la interacción molecular de Antp con un numero amplio de factores transcripcionales de la maquinaria basal. Y interacciona con un amplio número de factores de trascrición a traves del motivo YPWM de Antp. Confirmando interacción con 32 de los 35 factores analizados, entre los que se encuentran Dll, Eve, Sal, Tsh, TFIIEβ y Bin) Figura 13A mientras que Antp con el motivo YPWM mutado (Antp^{HX}) mostró alteraciones en las interacciones, Figura 13B.

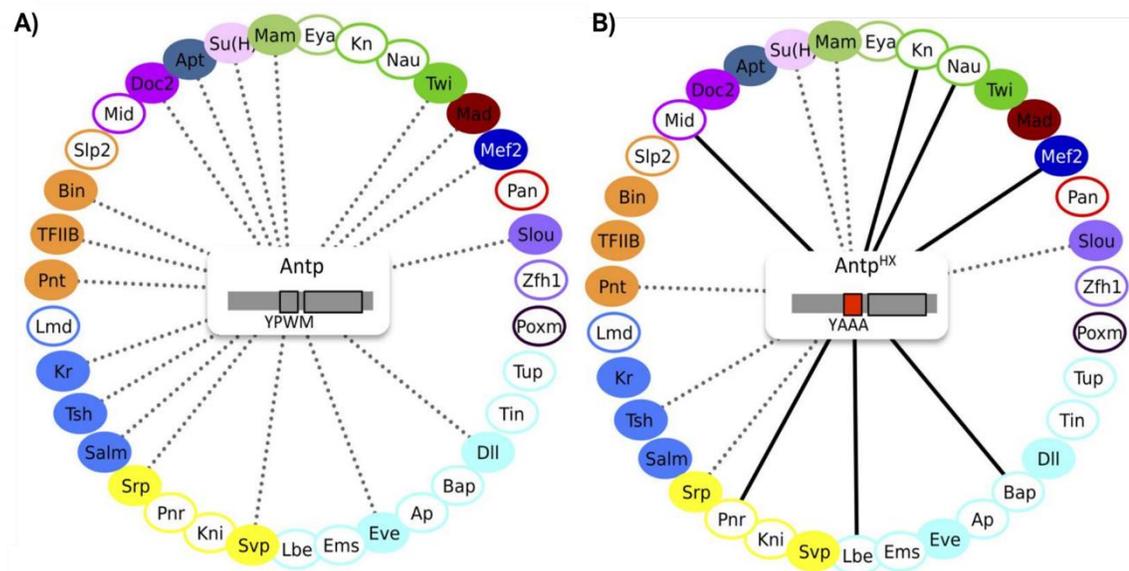


Figura 13. Interactoma de Antp. Interacción de Antp WT con 32 factores de 35 factores transcripcionales evaluados, la línea punteada marca los factores que interaccionaron con Antp. B) interacción de los 35 factores evaluado con, Antp^{HX} en la que el motivo YPWM fue sustituido por (YAAA). La línea punteada muestra la interacción; la línea sólida muestra nuevas interacciones o incremento de las ya detectadas, mientras que la ausencia de la línea muestra la pérdida de la interacción. Modificado de Baeza *et.al.*, 2015

En nuestro laboratorio también mediante la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), se confirmaron las interacciones diméricas de Antp con otras homeoproteínas, como por ejemplo la interacción de la homeoproteína Antp con AbdB, interacción con Exd en la región aminoacídica 144-376(Cárdenas-Chavez,2012). La interacción de Antp y Scr, específicamente por el residuo 19 de la hélice I (Elizondo Rodríguez, 2015). Y la interacción Antp-Ubx a través del HD (Villareal-Puentes 2015).

Otras interacciones reportadas en nuestro laboratorio son, las interacciones de Antp con los factores generales de transcripción (GTFs) TBP, TFIIA γ , TFIIB, TFIIE β y BIP2

2.9.1 TBP

La proteína de unión a caja TATA (TBP) es un importante factor transcripcional que junto a otras proteínas asociadas a TBP (TAFs) conforman el factor transcripcional general (GTFs) TFIID, un factor miembro de complejo de pre-iniciación de a transcripción de la ARN polimerasa II. A través de TBP, TFIID se une la secuencia consenso TATA (TATAa/tAa/t) ubicada río arriba de la secuencia promotora del gen iniciando el reclutamiento de otros GTFs requeridos para el inicio de la transcripción (Lee & Young, 2000).

La interacción de Antp con TBP es llevada a cabo a través el extremo N-terminal (Cárdenas-Chávez, 2012). Específicamente a través de los homopéptido de glutaminas en su extremo N-terminal, Adicionalmente se determinó la cantidad de glutaminas presentes tanto en Antp como TBP, son importante para su interacción (Ovalle-Maqueo,2015). Sin embargo, aún en ausencia de los homopéptido de glutaminas en ambas proteínas, la interacción no presenta un abatimiento completo, por lo cual existe la posibilidad de esta interacción involucre la participación de un tercer elemento (Moltalvo-Méndez,2016).

2.9.2 TFIIE β

El factor TFIIE es un heterotetámero que al igual que TBP actúa como factor general de transcripción durante la etapa de inicio (iniciación) y elongación (Lee & Young, 2000). TFIIE está conformado por dos subunidades TFIIE- α y TFIIE- β , mediante las cuales establece estable interacción con el DNA (Qian et.al., 1993 Forget et.al.,2004). De acuerdo con la evidencia el factor TFIIE β podría reclutarse al sitio de inicio de la transcripción a través de los HD de Antp y AbdB (Zhu & Kuziora, 1996) y AbdA (Hudry et.al., 2011). La subunidad β de TFIIE (TFIIE β) ha demostrado ser importante no solo en el reclutamiento y regulación de TFIIH, factor encargado de promover la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la RNA Pol II (Ohkuma y Roeder 1994; Okuda et.al., 2008), sino también inhibiendo la actividad helicasa de TFIIH necesaria para el desenrollamiento del DNA previo al inicio de la transcripción. (Flores et.al., 1992).

La interacción entre la homeoproteína Antp y la subunidad β del factor TFIIE se describió inicialmente in-vitro mediante ensayos pull down (Zhu & Kuziora 1994) y más recientemente mediante ensayos BiFC en nuestro laboratorio, estableciendo TFIIE β interacciona con Antp a través del HD específicamente a través los residuos 32 y 36 de la hélice II de HD (Cárdenas-Chávez, 2012, Altamirano Torres, 2014).

2.9.3 BIP2

Otro miembro importante del complejo TFIID, es el factor transcripcional BIP2 (Bric-à-brac 2) o también conocido como dTAFII3 (factor 3 asociado a TBP) es un factor asociado a la proteína de unión a caja TATA (Gangloff et.al., 2001). Al igual que TBP, BIP2 forma parte actúa como un TAF vestigial que permite el reclutamiento de proteínas de regulación transcripcional cerca al PIC. Existe evidencia in-vitro de interacción molecular entre la región aminoacídica 2-235 de BIP2 y el motivo YPWM de Antp, In-vivo a través de experimentos de ganancia y pérdida de función se estableció que BIP2 actúa como cofactor de Antp en el desarrollo ectópico de ojo por alas en mutante homeóticas adultas de la mosca de la fruta (Prince et.al., 2008; Cárdenas-Chávez, 2012).

2.10 INTERACCIONES TRIMÉRICAS

Las proteínas HOX también forman complejos triméricos con cofactores PBX y MEIS (Shanmugam et al., 1999). La homeoproteína Hox AbdB ha mostrado unirse al DNA en interacción trimérica con los cofactores Exd y Hth (Kannan *et.al.*,2010). Estudios realizados mediante EMSA han confirmado que otras homeoproteínas como Antp, AbdB, Scr, Ubx y Lab puede unirse al DNA en complejo dimérico con Exd o bien unirse de forma trimétricas con Exd y Hth (Hudry *et.al.*,2012) También se ha reportado que Ubx forma complejos triméricos Exd-Ubx-Hth para el reconocer sitios de unión cooperativa en el DNA (Crocker *et.al.*,2015).

A pesar de que la formación de complejos triméricos supone un paso importante en el establecimiento de un modelo de regulación para las homeoproteínas, estas interacciones aun se encuentran muy poco estudiados.

Hace falta mucha validación experimental, pero los pocos resultados disponibles permiten sugerir que la interacción de Hox con cofactores clave en algunas de las funciones desarrolladas por las proteínas Hox (Merabet y Mann, 2016).

Considerando la determinación reciente realizada en nuestro laboratorio sobre la formación de complejos triméricos entre las proteínas Antp-TBP con los factores Exd, TFIIE β y BIP2 mediante FRET-BiFC en la línea celular HEK293 (Jiménez-Mejía 2018). Para este trabajo de tesis se propuso analizar el efecto de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β , Antp-TBP-Exd, y Antp-TBP-BIP2 en cultivo celular.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que han mostrado tener las interacciones multiprotéicas en la regulación transcripcional, así como a la creciente evidencia de la importancia de estas interacciones en la regulación mediada por homeoproteínas, es importante estudiar la manera en que las interacciones triméricas regulan la transcripción durante el desarrollo.

4 HIPÓTESIS

Las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores TFIIE β , Exd₁₄₄₋₃₇₆ y BIP₂₋₈₉ son importantes en la activación de la transcripción de Antp.

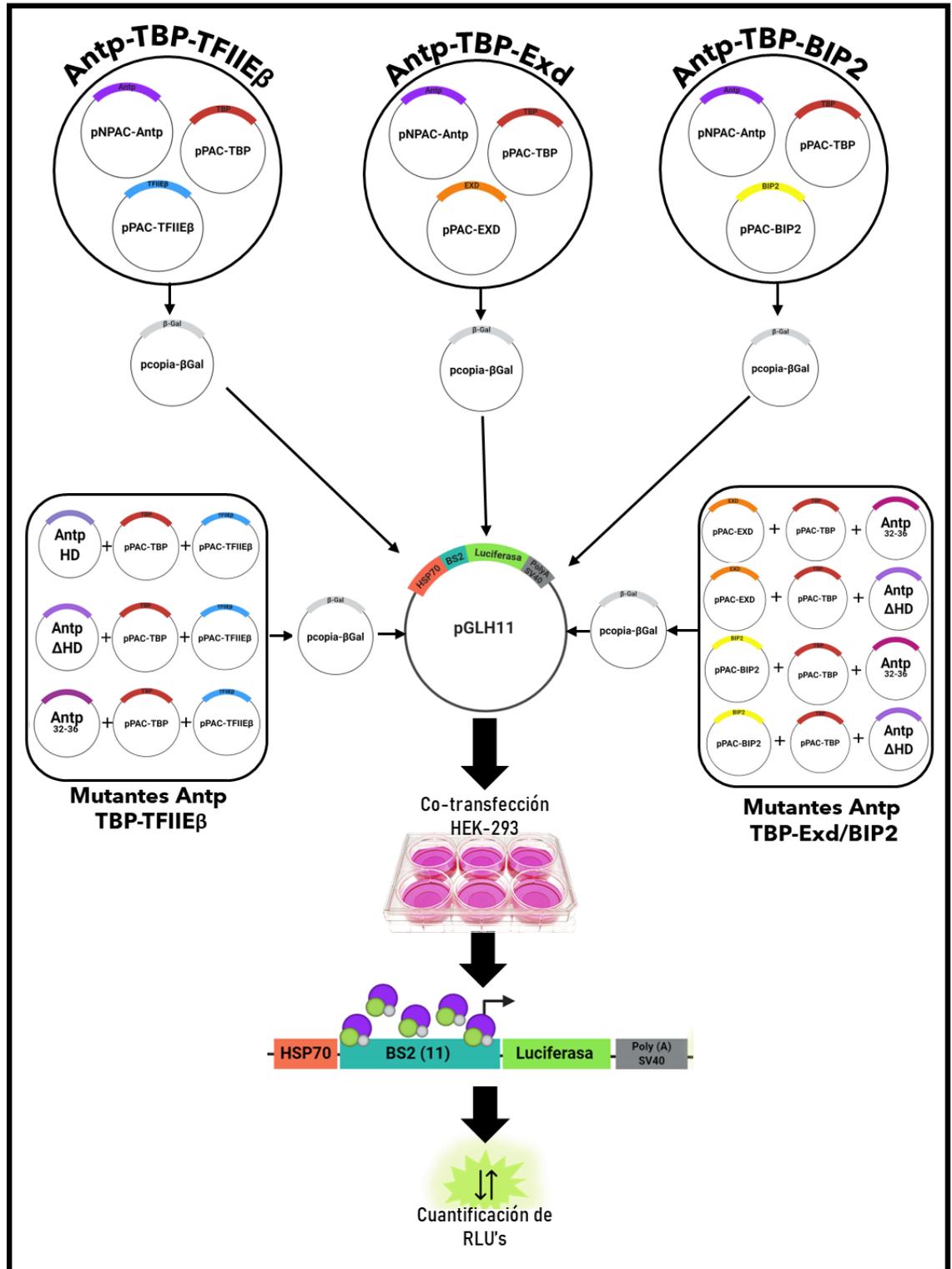
5 OBJETIVO

Elucidar la manera en que las interacciones triméricas de Antp-TBP con TFIIE β , Exd₁₄₄₋₃₇₆ y BIP₂₋₈₉ regulan su actividad transcripcional.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si las interacciones trimétricas de Antp-TBP-TFIIE β afectan la actividad transcripcional de Antp.
2. Analizar si la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ regula la actividad transactivadora de Antp.
3. Evaluar el efecto funcional del complejo trimérico Antp-TBP-BIP₂₋₈₉ sobre la actividad transcripcional mediada por Antp.
4. Determinar los motivos funcionales que participan en el efecto transcripcional observado por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β .
5. Establecer la importancia del motivo YPWM y el HD en la actividad transcripcional de Antp en los complejos triméricos Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y Antp-TBP-BIP₂₋₈₉.

6. ESTRATEGIA GENERAL



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención y purificación de plásmidos productores y reporteros

7.1.1 Transformación de plásmidos en bacterias *E. Coli* DH5 α Ca $^{++}$

Los plásmidos para los ensayos de transactivación (Tabla 2) se obtuvieron mediante el protocolo estándar de transformación bacteriana, utilizando bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes (Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μg de DNA). Para ello se tomó 1 μL de cada plásmido y 50 μl de bacterias DH5 α Ca $^{++}$, y se incubaron durante 30 minutos en hielo, posteriormente se sometieron a choque térmico a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minutos; transcurrido ese tiempo se incubaron en hielo durante 5 minutos. A cada tubo se le añadieron 200 μL de medio LB, y se incubaron en agitación constante a 180 rpm a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora para permitir el restablecimiento celular. Transcurrido la hora de incubación, se llevó a cabo la centrifugación de los tubos durante un 1 min a 14,000 rpm y se descartaron 200 μL del sobrenadante. Los 50 μL restantes se resuspendieron y se sembraron en placas de agar LB con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y se incubando a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las colonias obtenidas se seleccionaron y se inocularon en tubos de ensayo con 3 mL de medio LB y 8 μL de ampicilina [50 mg/mL] y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 12-16 horas en agitación constante.

Tabla 2. Lista de plásmidos utilizados para los ensayos de Transfección

pNPAC-Antp	Cárdenas-Chávez, 2007
pPAC-TBP	Cárdenas-Chávez, 2007
pPAC TFIIIEβ	Jiménez-Mejía, 2018
pPAC Exd₁₄₄₋₃₇₆	Cárdenas-Chávez, 2012
pPAC-BIP₂₋₈₉	Cárdenas-Chávez, 2012
pcopia-βgal	Cárdenas-Chávez, 2007
pPAC-AntpΔHD	Cárdenas-Chávez, 2007
pPAC-AntpHD	Cárdenas-Chávez, 2007
pPAC-Antp³²⁻³⁶	Altamirano-Torres 2014
pPAC-Antp^{AAAA}	Cárdenas-Chávez, 2007

7.1.2 Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina a pequeña escala (Minipreparación)

La extracción de DNA plasmídico de los inóculos se realizó mediante el método de lisis alcalina (modificado Sambrook et.al., 1989). En un tubo de microcentrífuga se tomaron 1.5 μL del crecimiento bacteriano y se centrifugo a 1300 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante; y al precipitado celular se añadieron 100 μL de solución de lisis alcalina I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, pH 8) con RNasa A [0.02 mg/mL] (Invitrogen, Carlsbad, CA.), se homogenizo mediante vórtex y se incubo durante 5 min a 25°C. Posteriormente, se colocaron 200 μL de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló por inversión y se incubo en hielo por 5 minutos. Se adicionaron 150 μL de Solución III (5 M, CH₃-COOH) se mezcló por inversión, y se incubo durante 10 min en hielo. Para todos los tubos se realizó una centrifugación de 5 minutos a 14,000 rpm, y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 500 μL) a tubos nuevos añadiendo 1 volumen de isopropanol al 100%, se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min, al término de este tiempo se realizó una centrifugación de 10 min a 14,000 rpm, se descartaron los sobrenadantes. Las pastillas de DNA plasmídico se lavaron añadiendo 200 μL de etanol al 70% y centrifugando a 14,000 rpm durante 1 min, se retiró el sobrenadante y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente por evaporación. Finalmente, las pastillas de DNA se resuspendieron en 20 μL de H₂O mili-Q y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

7.1.3 Caracterización mediante enzimas de restricción de los plásmidos productores y reportero.

La identidad de los plásmidos se confirmó mediante la comparación del patrón de bandeo de las digestiones *in-silico* realizados mediante ApE (A Plasmid Editor) y las caracterizaciones enzimáticas realizadas con enzimas de restricción diagnosticas. Para todas las reacciones de digestión se utilizaron 7.7 μL de H₂O Mili-Q, 1 μL de Buffer 10X, 0.3 μL de la enzima de restricción (10U/ μL) y 1.0 μL de DNA plasmídico. Las enzimas seleccionadas para cada plásmido se muestran en la Tabla 3. Todas las digestiones se incubaron a 37°C, y posteriormente se cargaron en un gel de agarosa 0.8% para su visualización.

Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas en la caracterización enzimática de los plásmidos.

PLÁSMIDO	ENZIMA
pGLH11	<i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>
pNPAC-Antp	<i>SmaI</i> , <i>HindII</i> y <i>PstI</i>
pPAC-TBP	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> , <i>SacI</i> y <i>HindIII</i>
pPAC-TFIIIE β	<i>BamHI</i> , <i>BglII</i> , <i>PvuII</i> , <i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i>
pPAC-Exd ₁₄₄₋₃₇₆	<i>BamHI/EcoRI</i> , <i>BamHI/PstI</i> y <i>BamHI/HindIII</i>
pPAC-BIP ₂₂₋₈₉	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SacI</i> y <i>HindIII</i>

7.2 Transfección en células HEK-293

Los ensayos transactivación se realizaron utilizando la línea celular HEK-293 de epitelio renal humano, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) y 1% de ampicilina/estreptomicina. El mantenimiento de las células se realizó de acuerdo con lo reportado en la ATCC para esta línea celular (95% de humedad, 5% CO₂ y 37 °C de temperatura). Para los ensayos de transactivación se utilizó el plásmido reportero pGLH11 el cual contiene once copias del sitio de unión BS2 un sitio Hox consenso reconocido por múltiples homeoproteínas como Antp, AbdB, Exd y los Hox HoxB7, HoxB8 y HoxC8 (Otting *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 1995; Adachi *et al.*, 2012), en combinación con los plásmidos productores pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIIE β , pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y pPAC-BIP₂₂₋₈₉, además en todas las transfecciones se añadió el plásmido pcopia- β gal para la normalización de los datos.

También se analizaron combinaciones de los plásmidos mutantes pPAC-Antp Δ HHD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp³²⁻³⁶ con pPAC-TBP y pPAC-TFIIIE β . Y para los triméricos de pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y pPAC-BIP₂₂₋₈₉, con pPAC-TBP se probó la mutante homeótica de pPAC-Antp^{AAA} y pPAC-Antp Δ HHD.

Para todas las combinaciones las células HEK-293 se sembraron 48 horas previas a la transfección a una densidad de 2×10^5 células/pozo en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de SFB y 1% de ampicilina. Para la incubación de las células se consideró 37°C, con una atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO₂.

Las soluciones de ADN para el ensayo de transfección se prepararon diluyendo un volumen de 2µg de cada plásmido en 100 µl de NaCl 150 mM. En un segundo tubo de 1.5mL se tomaron 6 µL de PEI (Polietilenimina) 15 mM con 100 µL de NaCl 150 mM. La preparación de ambas soluciones se combinó añadiendo el contenido del tubo de PEI al tubo con DNA plasmídico e incubando durante 15 minutos en oscuridad. La solución DNA-PEI de cada ensayo se añadió a los pozos de la placa mediante goteo suave. Finalmente, las células transfectadas se incubaron a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 48 horas.

7.2.1 Preparación de extractos celulares

La preparación de los extractos celulares consistió en la remoción total del medio de cultivo de cada pozo y la adición de 150 µl de Buffer de Lisis Pasiva 1X (Promega, Madison, WI, E.U.A.). La reacción de lisis celular se incubó en agitación constante por 15 minutos a 25°C, para después realizar la lisis mecánica mediante pipeteo. El contenido de cada pozo se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron durante 5 minutos a 14,000 rpm para obtener los sobrenadantes en los cuales se encuentra las proteínas de interés. Se recuperaron los sobrenadantes y se transfirieron a tubos nuevos, etiquetados y para almacenarse a -70°C evitando la inactivación de las proteínas.

7.2.2 Cuantificación de la expresión de los genes informadores β-Galactosidasa y Luciferasa

La determinación de bioluminiscencia se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, EE. UU.), utilizando la función de luminiscencia del lector de placas Synergy™ HT (BioTek® Instruments, Inc. Winooski, VT, E.U.A.) Para esto se colocaron 20 µl de los extractos

celulares de cada pozo en una placa de 96 pozos, y se añadiendo 50 μ l sustrato del kit a cada pozo para su lectura inmediata. La reacción enzimática entre el sustrato y las proteínas permitió determinar el porcentaje de unidades relativas de luz (%RLU) de cada ensayo.

La actividad del gen reportero β -galactosidasa (β -gal) para la normalización de los datos, se realizó cuantificando los niveles de β -gal mediante una reacción enzimática descrita por Tokunaga-Furukubo en 1991. Para ello se mezcló 211 μ l de PBS 1X (0.1 M, pH 7.3), 3 μ l de buffer de magnesio ($MgCl_2$ 0.1 M, β -mercaptoetanol 5M), 66 μ l de CPRG (clorofenol rojo β -D-galactopiranosido) 4mg/ml (Roche, Penzberg, Alemania) y 50 μ L de extracto celular. La reacción fue incubada por 2 horas a 37°C. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la reacción a 574 nm.

7.2.3. Normalización de los valores de Luciferasa

La normalización de los valores de luminiscencia se realizó multiplicando el valor de RLUs de cada pozo por el valor de β -Galactosidasa obtenidos para esa misma muestra, y dividido entre el promedio de los valores obtenidos en el ensayo de β -Galactosidasa. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) en el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.0 y como análisis post-hoc se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey, utilizando los valores de tres ensayos independientes con tres repeticiones por tratamiento.

7.3. Determinar si las interacciones trimétricas de Antp-TBP-TFIIE β afectan la actividad transcripcional de Antp.

Para determinar el efecto que tiene la interacción trimérica de Antp-TBP-TFIIE β sobre la actividad transcripcional de Antp, se realizaron ensayos de transactivación co-transfectando el plásmido reportero pGLH11 y los plásmidos productores pNPAC- Antp, pPAC-TBP y pPAC-TFIIE β . 48h previas a la transfección se realizó la siembra en placa de células HEK-293. En placas de 6 pozos con medio DMEM se sembraron 2×10^5 células por pozo. Las placas con las células se incubaron a 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37°C por 48 hrs. Posteriormente se realizaron las co-transfecciones del plásmido reportero y productores utilizando PEI, las combinaciones de DNA-PEI se sembraron en las placas mediante goteo suave.

La Tabla 4 muestra el esquema de las transfecciones realizadas para el analizar el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β . Las combinaciones realizadas incluyeron Antp (monomérica), el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β y los complejos Antp-TBP y Antp-TFIIE β . También se incluyeron los controles negativos y el control positivo de la luciferasa.

Tabla 4. Esquema de transfección de los plásmidos de pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIE β , pGLH11

Número de plásmidos	Plásmidos productores			Plásmido Reportero	Plásmido Control
3	pNPAC-Antp			pGLH11	pcopia β gal
		pPAC-TBP			
			pPAC-TFIIE β		
4	pNPAC-Antp	pPAC-TBP			
	pNPAC-Antp		pPAC-TFIIE β		
5	pNPAC-Antp	pPAC-TBP	pPAC-TFIIE β		
3	pPAC				
	pPAC-Antp Δ H Δ D				
	p-MiR-Luc				

7.4 Análisis de la interacción trimérica Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ mediante ensayo de transactivación en células HEK-293.

Para analizar el efecto funcional de la interacción trimérica de Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ se realizaron ensayos de transactivación combinando el plásmido reportero pGLH11 y los productores de pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC- Exd₁₄₄₋₃₇₆. Para ello en placas de 6 pozos se sembró una densidad de 2×10^5 células por pozo utilizando la línea celular HEK-293; la cual se mantuvo a las condiciones de cultivo de 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37°C por 48 hrs. Posterior a esto las co-transfecciones se realizaron mediante la preparación de las combinaciones de los DNAs plasmídicos combinados con el agente de transfección PEI, y sembrado en las placas de cultivo siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.1. Las combinaciones de los plásmidos para esta interacción se reportan en la tabla 5.

La lectura de las placas de cultivo se realizó a través de la obtención de los extractos celulares utilizando el Buffer de Lisis Pasiva 1X de Promega. La cuantificación de β -Galactosidasa y luciferasa para cada muestra se trabajó conforme a lo previamente descrito en el apartado 6.2.4. Los datos normalizados de los ensayos se analizaron mediante la prueba estadística de varianza de un factor (ANOVA) y la comparación múltiple de medias de Tukey, utilizando los valores de tres ensayos independientes con tres repeticiones por tratamiento.

Tabla 5. Esquema de transfección de los plásmidos pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC-EXD144-376.

Número de plásmidos	Plásmidos productores			Plásmido Reportero	Plásmido Control
3	pNPAC-Antp			pGLH11	pcopia β Gal
		pPAC-TBP			
		-	pPAC-Exd ₁₄₄₋₃₇₆		
4	pNPAC-Antp	pPAC-TBP			
	pNPAC-Antp		pPAC-Exd ₁₄₄₋₃₇₆		
5	pNPAC-Antp	pPAC-TBP	pPAC-Exd ₁₄₄₋₃₇₆		
3	pPAC				
	pPAC-Antp Δ HHD				
	p-MiR-Luc				

7.5 Análisis de la interacción molecular Antp-TBP-BIP2₂₋₈₉ mediante ensayos de transactivación en células HEK293.

La determinación de la actividad funcional de Antp en la interacción trimérica de Antp con los factores TBP-BIP2₂₋₈₉ por transactivación se realizó mediante la siembra en placa de las células HEK-293 en las condiciones antes mencionadas. Posterior a 48hrs se llevó a cabo la co-transfección de las combinaciones de los plásmidos productores de pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC-BIP2₂₋₈₉ con el plásmido reportero PGLH11.

La preparación de mezcla de DNA plasmídico con el vector reportero y las diferentes combinaciones de plásmidos productores, se combinó con PEI para su ingreso en las células, para posteriormente realizar la determinación de las RLU. La obtención del extracto celular, medición de luciferasa y normalización de los datos se realizó siguiendo la estrategia previamente mencionada. La tabla 6 muestra las diferentes combinaciones de plásmidos utilizados para la transfección

Tabla 6. Esquema de transfección de los plásmidos Antp, TBP y BIP22-89

Número de plásmidos	Plásmidos productores			Plásmido Reportero	Plásmido Control
3	pNPAC-Antp			pGLH11	pcopiaβGal
		pPAC-TBP			
		-	pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
4	pNPAC-Antp	pPAC-TBP			
	pNPAC-Antp		pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
5	pNPAC-Antp	pPAC-TBP	pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
3	pPAC			pGLH11	pcopiaβGal
	pPAC-AntpΔHD				
	p-MiR-Luc				

7.6 Análisis de los dominios funcionales que participan en la regulación transcripcional de Antp, en el complejo trimérico con TBP y TFIIIE β

Para determinar dominios de interacción que participan en la regulación transcripcional de la homeoproteína Antp; para la interacción trimérica de Antp con TBP-TFIIIE β , se realizaron ensayos de transactivación utilizando los plásmidos mutantes Antp Δ HD el cual presenta la delección de la región correspondiente al HD de Antp, la mutante AntpHD en la cual se eliminó la región rica en glutaminas del extremo N-terminal y la mutante Antp³²⁻³⁶ que presenta cambios en los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD. El plásmido reportero pGLH11 y el plásmido pcopia β -gal se co-transfectaron con las mutantes pPAC-Antp Δ HD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp³²⁻³⁶ en combinación con los plásmidos productores pPAC-TBP y pPAC-TFIIIE β en placas de 6 pozos utilizando células HEK293 y el polímero sintético de PEI siguiendo la metodología describe en la sección 7.2. La tabla 7 describe el esquema de transfecciones realizados.

De todas las combinaciones se realizó la obtención de los extractos celulares, utilizando el Buffer de Lisis Pasiva 1X de Promega (sección 2.2.1).

Tabla 7. Esquema de transfección para evaluación de las mutantes pPAC-Antp Δ HD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp³²⁻³⁶

Plásmidos productores			Plásmido Reportero	Plásmido Control
pNPAC-Antp			pGLH11	pcopia β gal
	pPAC-TBP	pPAC-TFIIIE β		
pPAC-Antp Δ HD				
	pPAC-TBP	pPAC-TFIIIE β		
pPAC-AntpHD				
	pPAC-TBP	pPAC-TFIIIE β		
pPAC-Antp ³²⁻³⁶				
	pPAC-TBP	pPAC-TFIIIE β		

7.7 Análisis del efecto en la actividad transcripcional de los complejos triméricos de TBP-Exd y TBP-BIP2 con mutantes de Antp

Exd y BIP2 interaccionan con Antp a través del motivo YPWM, por lo que en este objetivo se analizó la importancia del motivo YPWM en las interacciones de Antp con TBP-Exd y TBP-BIP2. Para ello se realizaron los ensayos de transactivación utilizando la mutante Antp^{AAAA}, la cual presenta la sustitución del motivo YPWM por Alaninas. Para el análisis del complejo trimérico de Exd, se realizaron co-transfecciones del plásmido pPAC-Exd, pPAC-TBP con las mutante pPAC-Antp^{AAAA}/pPAC-Antp Δ HHD, junto a los plásmidos reportero PGLH11 y pcopia pcopia β -gal. Y para el complejo trimérico con BIP2, se combinaron los mismos plásmidos sustituyendo el plásmido pPAC-Exd por pPAC-BIP2. La tabla 8 muestra el esquema de transfecciones realizadas, en la parte superior (blanco) se muestra las combinaciones para el complejo trimérico de TBP-Exd con las mutantes, y en la parte inferior (gris) las combinaciones de TBP-BIP2

Tabla 8. Esquema de transfección de los complejos triméricos TBP-Exd y TBP-BIP2 con las mutantes pPAC-Antp Δ HHD/pPAC-Antp^{AAAA}

Plásmidos productores			Plásmido Reportero	Plásmido Control
pPAC-Antp Δ HHD	pPAC-TBP		pGLH11	pcopia β gal
		pPAC-Exd ¹⁴⁴⁻³⁷⁶		
	pPAC-TBP	pPAC-Exd ¹⁴⁴⁻³⁷⁶		
pPAC-Antp ^{AAAA}	pPAC-TBP			
		pPAC-Exd ¹⁴⁴⁻³⁷⁶		
	pPAC-TBP	pPAC-Exd ¹⁴⁴⁻³⁷⁶		
pPAC-Antp Δ HHD	pPAC-TBP		pGLH11	pcopia β gal
		pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
	pPAC-TBP	pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
pPAC-Antp ^{AAAA}	pPAC-TBP			
		pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		
	pPAC-TBP	pPAC-BIP2 ²⁻⁸⁹		

8. RESULTADOS

8.1 Obtención y caracterización de los plasmídicos para los ensayos de transactivación

Para analizar el efecto funcional de las interacciones triméricas se obtuvo el plásmido reporte pGLH11 y los plásmidos productores pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIIE β , pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆, pPAC-BIP₂₂₋₈₉ y los plásmidos de las mutante de Antp, pPAC-Antp Δ HHD, pPAC-AntpHD, pPAC-Antp³²⁻³⁶ y pPAC-Antp^{AAAA}.

Para el ensayo también se obtuvo el plásmido pcopia β Gal para la normalización de los resultados, y los controles el plásmido pPAC vacío como control negativo y como control positivo de la expresión de luciferasa el plásmido p-MiR-LUC. En todos los casos los plásmidos productores y reporteros utilizados presentaron buena calidad en el DNA como lo muestra la relación de absorbancia 260/280 de 1.8 a 1.94 en la tabla 9.

Tabla 9. Pureza y concentración de los plásmidos para el ensayo de transactivación

PLÁSMIDOS	CONCENTRACIÓN (ng/ μ l)	ABSORBANCIA 260/280
pNPAC-ANTP	1067	1.80
pPAC-TBP	1034	1.83
pPAC- TFIIIE β	1203	1.91
pPAC-Exd	1053	1.85
pGLH11	1300	1.88
pcopia- β gal	1005	1.82
pPAC	1256	1.80
pPAC-Antp Δ HHD	1042	1.94
pPAC-AntpHD	1023	1.89
pPAC-Antp ³²⁻³⁶	1035	1.86
pPAC-Antp ^{AAAA}	1011	1.80
p-MiR-Luc	993	1.84

La identidad molecular de los plásmidos productores y reporteros utilizados para la transfección se confirmó mediante caracterización enzimática con enzimas de restricción diagnósticas. La figura 14 muestra las caracterizaciones correspondientes al plásmido pGLH11 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Figura 15A), pNPAC-Antp con *HindIII* y *PstI* (Figura 15B), pPAC-TBP con *BamHI* y *PstI* (Figura 15C), pPAC-TFIIE β con *EcoRI* y *HindIII* (Figura 15D), pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ con las combinaciones de las enzimas *BamHI/EcoRI* y *BamHI/HindIII* (Figura 15E) y pPAC-BIP₂₋₈₉ con *HindIII* y *EcoRI* (Figura 15F).

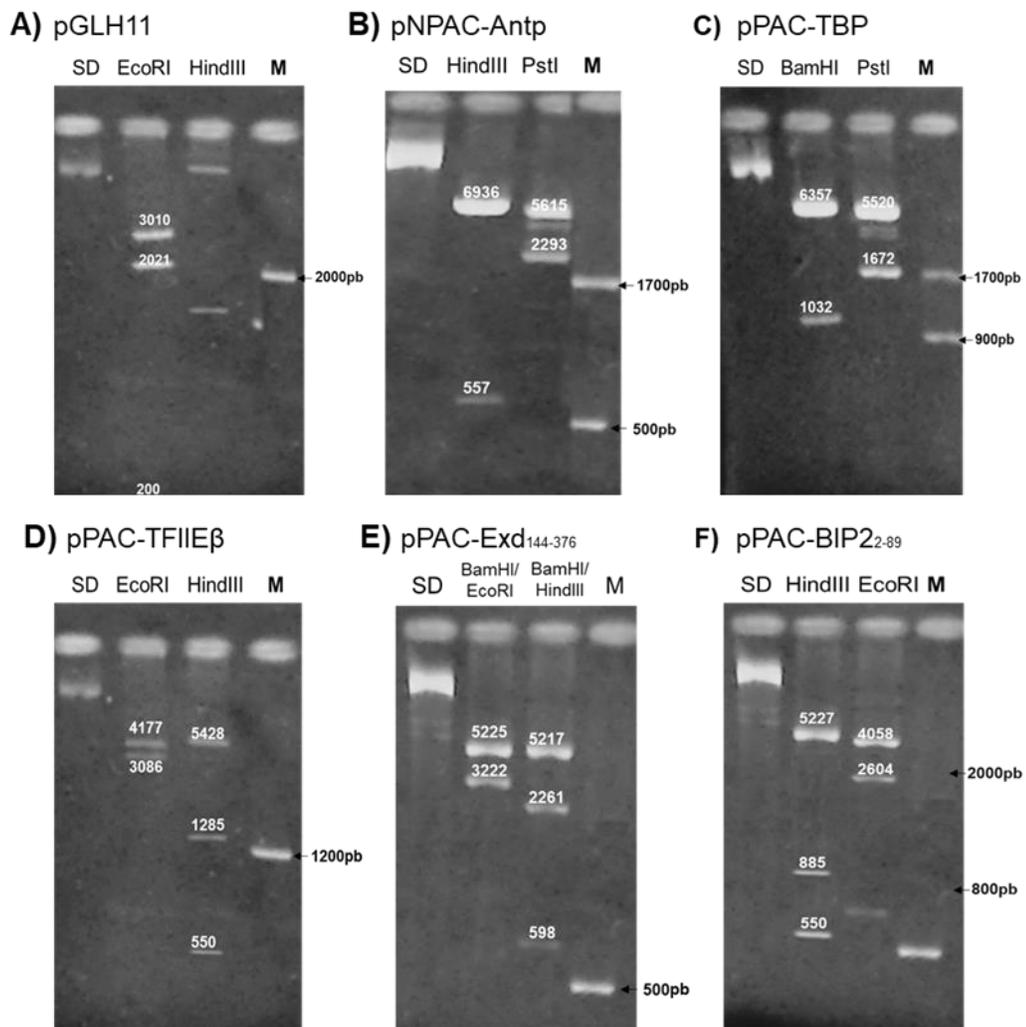


Figura 14. Geles de caracterización enzimática de los plásmidos pGLH11, pNPAC-Antp, pPAC-TBP, pPAC-TFIIE β , pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ y pPAC-BIP₂₋₈₉. A) El plásmido reportero pGLH11 caracterizado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. B) El plásmido pNPAC cortado con las enzimas *HindIII* y *PstI*. C) Digestión enzimática del plásmido pPAC-TBP con las enzimas *BamHI* y *PstI*. D) Plásmido pPAC-TFIIE β cortado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. E) Patrón de bandas de la caracterización del plásmido pPAC-Exd₁₄₄₋₃₇₆ cortado con las enzimas *BamHI/EcoRI* y *BamHI/HindIII*. E) Caracterización enzimática del plásmido BIP₂₋₈₉ digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*.

8.2 Incremento de la transactivación de Antp en presencia de los factores TBP y TFIIE β

Los ensayos de transactivación para la interacción trimérica de Antp con los factores transcripcionales TBP y TFIIE β , se basaron en la introducción del plásmido reportero pGLH11 que contiene 11 sitios (BS2) de unión a Antp fusionados a la secuencia codificante de luciferasa, co-transfectado con el plásmido pNPAC productor de Antp, los plásmidos productores de los factores pPAC-TBP y pPAC-TFIIE β . El plásmido pcopia- β gal se incluyó como control interno para la normalización de los datos.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la transactivación de Antp en interacción con TBP y TFIIE β muestran que los niveles de transactivación de Antp debido a la formación del complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β incrementaron de forma altamente significativa ($p < 0.001$) la actividad transcripcional hasta un 238%. La interacción de Antp en los complejos diméricos de Antp-TBP y Antp-TFIIE β disminuyen de manera altamente significativa ($p < 0.001$) la actividad transcripcional de Antp, obteniendo valores de transactivación de 73% y 52% para la interacción con TBP y TFIIE β respectivamente (Figura 15).

Esta transactivación se validó con los niveles de transactivación de los factores transcripcionales individuales TBP y TFIIE β que mostraron que para ambos casos existe una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) del 12% comparado con Antp wt. Lo que indica que como era de esperarse que TBP y TFIIE β no son capaces de unirse a la secuencia del plásmido reportero pGLH11 en ausencia de Antp. Como se esperaba valores bajos de transactivación también se obtuvieron en de los controles negativos, el plásmido pPAC vacío (8%) y la mutante Antp Δ HD (5%). El control positivo de la expresión de luciferasa el plásmido p-MiR-Luc que contiene una secuencia de expresión constitutiva de gen de luciferasa, mostró valores de 94% similares a los obtenidos de la transactivación del plásmido pNPAC productor de Antp y su interacción con el reportero pGLH11 (100%).

La tabla 10 muestra los tres experimentos (n=3) independientes realizados que permitieron determinar la media, desviación estándar, coef. de variación, así como significancia en las transfecciones celulares. Estos datos se obtuvieron a través del programa estadístico de GraphPad mediante las pruebas de ANOVA y Tukey.

Los resultados obtenidos indica claramente que la capacidad transactivadora de Antp se ve potenciada debido a la formación del complejo trimérico de Antp con los factores TBP y TFIIE β , incrementando la afinidad por el promotor con los 11 sitios BS2. Estos resultados son contrastantes con las interacciones de las interacciones proteína-proteínas reportadas para los complejos diméricos de Antp-TBP y Antp-TFIIE β en la que interacción de estos factores con la homeoproteína Antp disminuyen su actividad transactivadora. Con base a estos resultados podemos sugerir que la interacción del factor general de transcripción TFIIE β con Antp-TBP incrementa capacidad transcripcional de Antp favoreciendo la expresión de sus genes blanco.

Tabla 10. Ensayos de transactivación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β

Factor transcripcional	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
Antp-TBP-TFIIE β	417008	9070	26878	19.34%	Yes	***	<.001
Antp-TBP	133793	6459	2153	4.83%	Yes	**	<.001
Antp-TFIIE β	94310	7455	2485	7.90%	Yes	**	<.001
TBP	19638	4908	1636	24.99%	Yes	***	<.001
TFIIE β	21226	2057	685.8	9.69%	Yes	***	<.001
pMIR-LUC	173160	8837	2946	5.10%	No	ns	>.999
pPAC	15193	5592	1864	36.81%	Yes	***	<.001
Antp Δ HD	8533	1003	334.3	11.45%	Yes	***	<.001

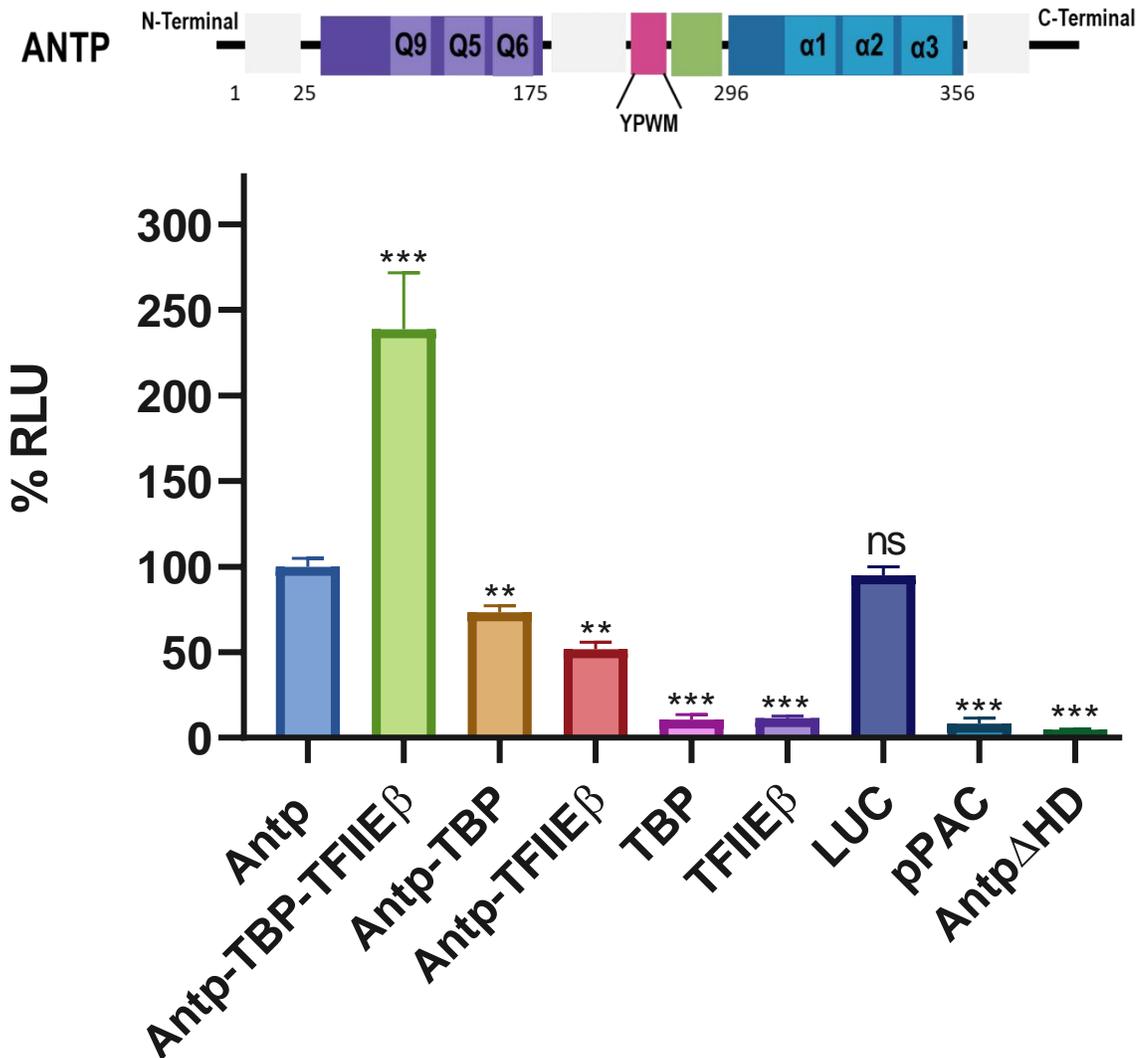


Figura 15. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β aumenta la actividad transcripcional de Antp. El esquema de la parte superior muestra la homeoproteína Antp la cual posee un dominio polyQ (morado) en la región N-terminal y el tetrapéptido YPWM (rosa) río arriba de homeodominio (azul). La gráfica muestra el porcentaje de la actividad transcripcional en unidades relativas de luminiscencia (% RLU) de las proteínas Antp en presencia de los factores transcripcionales. La transactivación de Antp en complejo trimérico con los factores de TBP y TFIIE β es 239%, significativamente mayor (***; $p < 0.001$) en comparación con Antp (barra negra). Los complejos diméricos Antp-TBP 73% y Antp-TFIIE β 52% mostraron una disminución altamente significativa en los niveles de transactivación (**; $p < 0.001$). Los valores individuales de los factores transcripcionales individuales TBP y TFIIE β dieron un valor de 12% para ambos factores. Se utilizaron como controles negativos el vector vacío pPAC (8%), y la mutante de Antp Δ HHD (5%). El control positivo de luciferasa p-miR-Luc (LUC) (94%). El plásmido pcpia- β gal fue transfectado en todas las combinaciones para normalizar los datos. Cada barra corresponde a la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y la desviación estándar

8.3 Recuperación parcial de la actividad transcripcional de Antp por el complejo trimérico Antp, TBP y Exd

Los niveles de transactivación de la interacción de la interacción trimérica de Antp con el factor TBP y la homeoproteína Exd en células HEK-293, se analizaron en ensayos de transactivación con los plásmidos productores Antp, TBP y Exd, así como el reportero pGLH11.

La actividad transcripcional de Antp mostro una disminución ($p < 0.001$) del 18% debido a la formación del complejo trimérico de Antp-TBP-Exd (82%). Disminuciones significativas ($p < 0.001$) en la actividad transcripcional de Antp también resultaron de las interacciones Antp-TBP 73% y Antp-Exd 61% (Figura 16). Sin embargo, aunque TBP mostró niveles muy bajos de transactivación (12%) la homeoproteínas Exd si logro activar la transcripción del gen reportero de luciferasa, reportando un 40% de RLU's para el factor individual. Los controles negativos del plásmido reportero vacío (pPAC) y la versión de Antp sin HD (Antp Δ HD), conservaron valores bajos de transactivación de un 8% y 5% respectivamente. Mientras que el control positivo pMiR-Luc mostró un 94% de transactivación sin diferencia significativa (ns) con AntpWT.

Tabla 11. Ensayo de transactivación de la interacción triméricas de Antp con TPB y Exd

	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
Antp-TBP-Exd	146039	6536	2179	4.47%	Yes	*	<.001
Antp-TBP	133793	6459	2153	4.83%	Yes	**	<.001
Antp-Exd ₁₄₄₋₃₇₆	111649	4924	1641	4.419%	Yes	**	<.001
TBP	19638	4908	1636	4.99%	Yes	***	<.001
Exd	79990	4409	2946	5.13%	Yes	*	<.001
pMiR-LUC	173160	8837	2946	5.10%	No	ns	>.999
pPAC	15193	5592	1864	6.81%	Yes	***	<.001
Antp Δ HD	8533	1003	334.3	11.45%	Yes	***	<.001

El conjunto de estos resultados muestra que la interacción trimérica de Antp-TBP-Exd₁₄₄₋₃₇₆ presenta una capacidad transactivadora muy similar a las interacciones diméricas de Antp-TBP y Antp-Exd, logrando rescatar de forma parcial la capacidad transactivadora de Antp. Los resultados estadísticos de media, desviación estándar, coeficiente de variación y significancia de tres experimentos independientes se muestran en la tabla 11. Estos resultados en conjunto mostraron que la actividad transactivadora de Antp disminuye debido a la presencia del cofactor Exd en el complejo trimérico Antp-TBP-Exd.

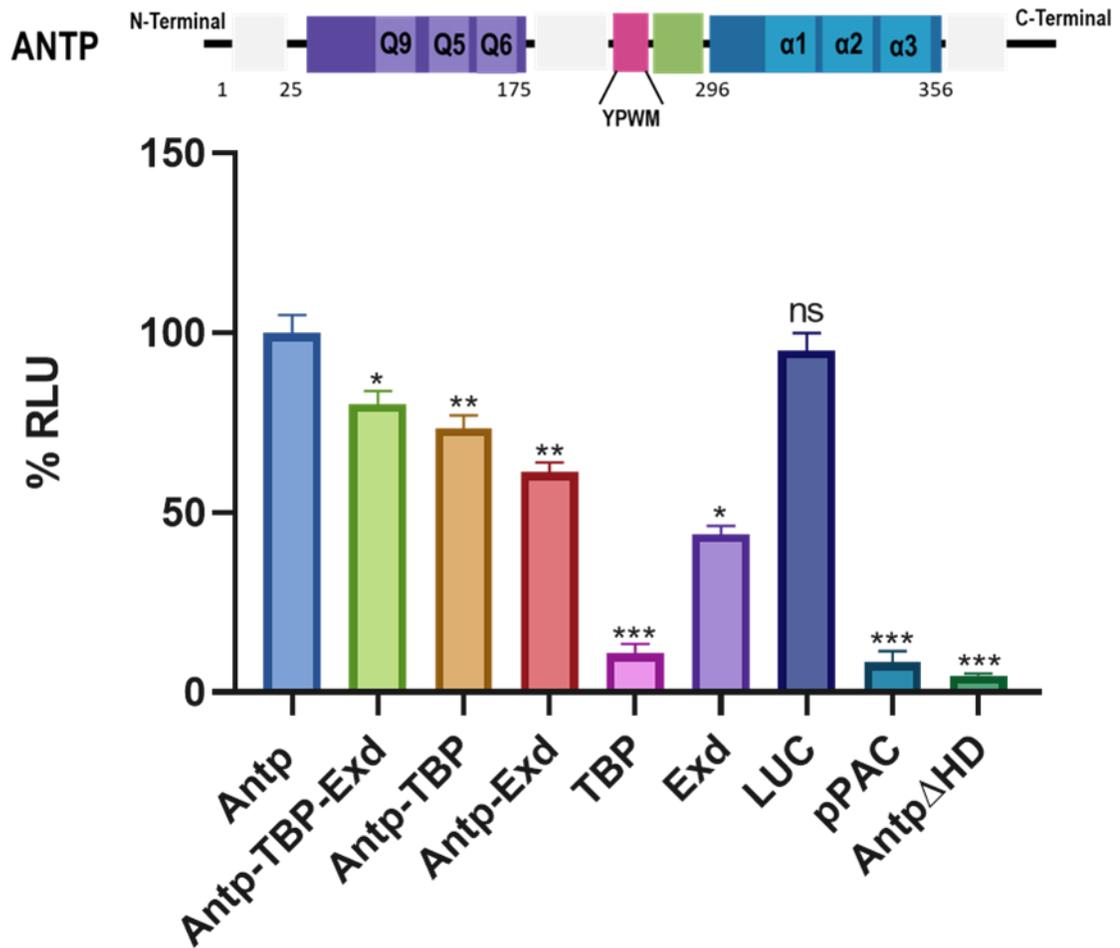


Figura 16. La interacción trimérica de Antp con TBP y Exd disminuye los niveles de transactivación de Antp. El esquema de la parte superior muestra la homeoproteína Antp la cual posee un dominio polyQ (morado) en la región N-terminal y el tetrapéptido YPWM (rosa) río arriba de homeodominio (azul). La transactivación se analizó utilizando la línea HEK-293 co-transfectada con diferentes combinaciones de los plásmidos productores y el reportero PGLH11. La interacción trimérica Antp con TBP y Exd disminuyó un 18% (**, $p < 0.001$) la capacidad transactivadora de Antp debido a la formación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd (82%). Así mismo los dímeros Antp-TBP (73%), Antp-Exd (61%) disminuyen de manera altamente significativa los valores de transactivación de Antp (***, $p < 0.001$). Los valores individuales de TBP (12%) y Exd (40%) disminuyen drásticamente las RLU, similar a los controles negativos pPAC y Antp Δ HD (8% y 5%). El control positivo p-MiR-Luc mostró valores altos de RLU (94%) similares a Antp-WT. El plásmido p β gal se usó para normalizar las transfecciones y las barras corresponden a la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y la desviación estándar.

8.4 La interacción de Antp con los factores TBP y BIP2 disminuye la actividad transactivadora de Antp

Para determinar el efecto de la formación del complejo trimérico Antp-TBP-BIP2 sobre la actividad transactivadora de Antp, se realizaron co-transfecciones de los plásmidos productores de los factores de interés junto al plásmido reportero PGLH11. Los resultados estadísticos de tres experimentos (n=3) independientes (Tabla 12) incluidos la media, desviación estándar y significancia se utilizaron para graficar los resultados.

En la figura 17 se observa que la actividad transactivadora de Antp en presencia de los factores TBP y BIP2 muestra una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de la actividad transactivadora con un valor de 74% para el trímero Antp-TBP-BIP2 en comparación con el valor de transactivación de Antp WT (100%).

Los niveles de transactivación para las interacciones diméricas de Antp con TBP (73%) y Antp-BIP2 (62%), también demostraron una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de la actividad transcripcional del Antp. Como se esperaba, los valores de los factores individuales TBP (12%) y BIP2 (5%) mostraron niveles de RLU basales, con una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) con respecto al valor de Antp. Porcentajes de transactivación igualmente bajos se obtuvieron con los controles negativos de pPAC y Antp Δ HHD con valores basales de 5% y 8%. Nuevamente el control positivo de luciferasa p-MiR-Luc (94%) no mostró diferencia significativa en comparación con los niveles de RLU de Antp wt.

Tabla 12. Ensayo de transactivación de Antp en presencia de la interacción trimérica Antp-TBP-BIP2

Factor transcripcional	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
Antp-TBP-BIP2	161229	4076	1359	2.528%	Yes	**	<.001
Antp-TBP	133793	6459	2153	4.83%	Yes	**	<.001
Antp-BIP2 ₂₋₈₉	113253	3807	1269	3.362%	Yes	**	<.001
TBP	19638	4908	1636	24.99%	Yes	***	<.001
BIP2 ₂₋₈₉	9721	205.8	68.59	2.117%	Yes	***	<.001
LUC	173160	8837	2946	5.10%	No	ns	>.999
pPAC	15193	5592	1864	36.81%	Yes	***	<.001
Antp Δ HHD	8533	1003	334.3	11.45%	Yes	***	<.001

Los resultados obtenidos muestran que la participación de BIP2 como un tercer factor en el complejo Antp-TBP no muestra diferencias significativas sobre la actividad transcripcional de Antp, reportando valores de transactivación muy similares a los complejos diméricos Antp-TBP y Antp-BIP2 lo cual sugiere que la formación de los complejos triméricos de Antp con TBP y BIP2, no participan en la modulación de la actividad transcripcional de la homeoproteína Antp.

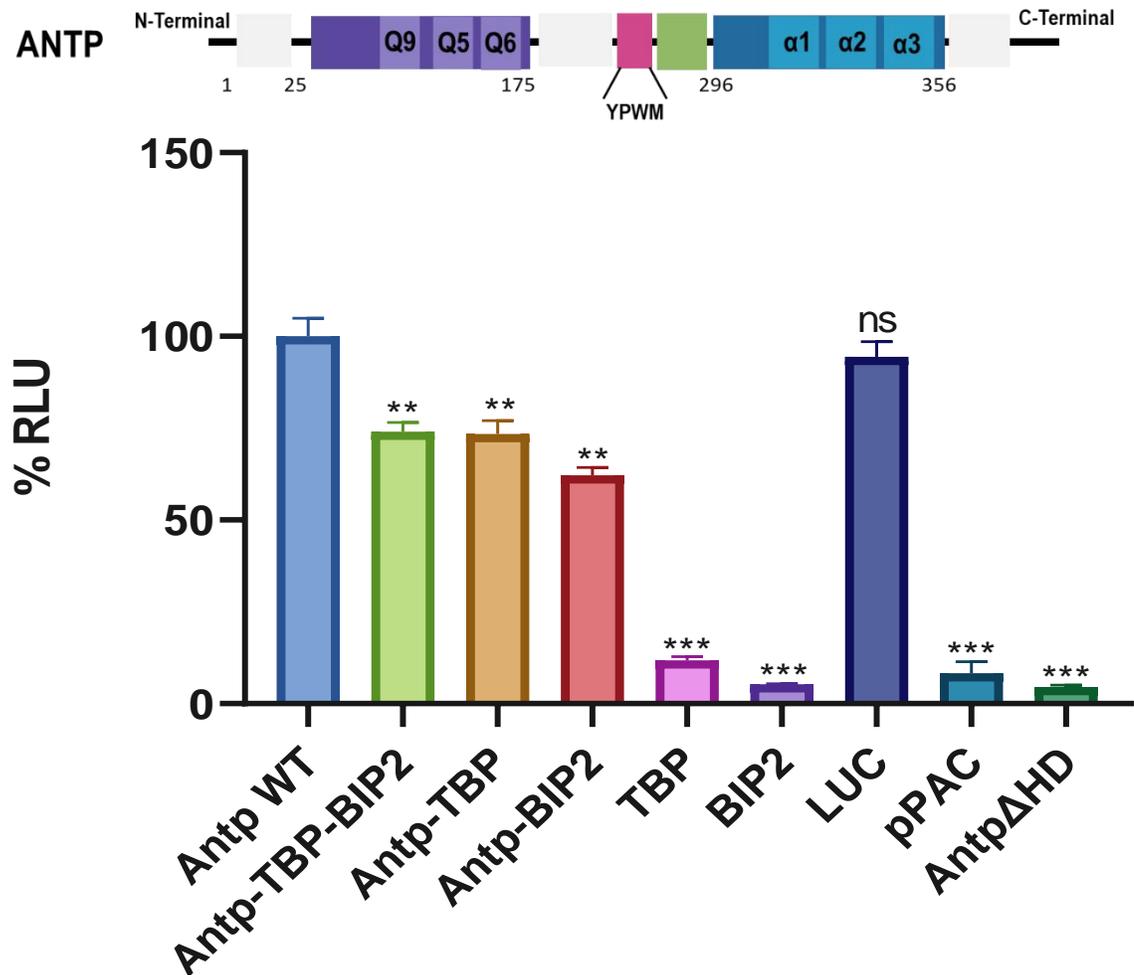


Figura 16. La actividad transactivadora de Antp disminuye debido a la formación del complejo trimérico Antp-TBP-BIP2. El esquema de la parte superior muestra la homeoproteína AntpWT. La transactivación se analizó mediante co-transfección de los plásmidos productores y el plásmido reportero PGLH1 en la línea celular HEK-293. La presencia del complejo trimérico de Antp-TBP-BIP2 disminuye de manera significativa (***, $p < 0.001$) la actividad transcripcional de Antp hasta un 74% con respecto a Antp wt. De igual manera las interacciones diméricas de Antp-TBP (73%) y Antp-BIP2 (62%) disminuyeron los valores de transactivación significativamente (**, $p < 0.001$). Los valores individuales de los factores TBP (12%) y BIP2 (5%) muestran niveles bajos, similares a los de los controles negativos de pPAC (5%) y AntpΔHD (8%). El control positivo pMiR-Luc conserva valores altos de transactivación (94%). Para todos los casos se normalizaron los datos utilizando los valores de la determinación de β-Gal obtenidos con el plásmido pcopia-βGal. Las barras obtenidas en la gráfica representan la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y la desviación estándar.

8.5 La región del extremo N-terminal y el HD de Antp son importantes en la regulación de la actividad transcripcional de Antp en interacción con TBP y TFIIE β

Debido al incremento de la actividad transcripcional de Antp debido a la formación de complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β , para este objetivo nos planteamos determinar el papel que tiene los dominios funcionales de Antp, sobre su regulación. Debido a que la formación del complejo trimérico tiene como efecto un incremento altamente significativo en la actividad transcripcional de Antp, se analizaron variantes de Antp con mutaciones en el homeodominio (Antp Δ HD), la región N-terminal (AntpHD) y los residuos 36 y 36 de la hélice II (Antp³²⁻³⁶). Los ensayos de transactivación se realizaron co-trasfectando cada una de las mutantes (pPAC-Antp Δ HD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp³²⁻³⁶) con los plásmidos productores de TBP y TFIIE β en combinación con el plásmido PGLH11 y p $\text{copia}\beta$ Gal.

Para determinar la importancia del HD en la modulación de la actividad transcripcional de Antp mostrada por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β , se realizó el análisis de transactivación usando el plásmido mutante Antp Δ HD. Los resultados obtenidos mostraron que la delección del HD de Antp es importante en la regulación de la transcripción de Antp. Como era de esperarse la delección del HD de Antp disminuye su actividad transcripcional a niveles basales (8%); este mismo efecto se observó al comparar la actividad funcional de Antp en complejo trimérico con TBP-TFIIE β . La eliminación de la región del HD de Antp (Antp Δ HD) disminuyó de manera altamente significativa la actividad transcripcional de Antp hasta 13% en la interacción de Antp Δ HD-TBP-TFIIE β , en comparación con el valor de 238% mostrado por el complejo de Antp-TBP-TFIIE β . De igual manera la ausencia del HD nos permite activar la transcripción mediada por Antp generando niveles bajos de transactivación al analizar la actividad transcripcional de las interacciones de Antp Δ HD-TBP (14%) y Antp Δ HD-TFIIE β (12%). Esto resultados nos permiten confirmar que la presencia del HD de Antp es estrictamente necesario para la unión de Antp y la regulación de la transcripción de sus genes blanco (Figura 17).

La tabla 13 muestra estadísticos de la media, desviación estándar, coef. de variación, y significancia de tres experimentos (n=3) independientes obtenidos de las transfecciones celulares.

Tabla 13. Ensayo de transactivación de la mutante Antp Δ H Δ D en complejo trimérico con TBP.TFII β

	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
Antp Δ H Δ D	11099	634	211	5.716%	Yes	***	<.001
Antp-TBP-TFII β	417008	9070	26878	19.34%	Yes	***	<.001
Antp Δ H Δ D-TBP-TFII β	24151	679.9	227	2.815%	Yes	***	<.001
Antp Δ H Δ D-TBP	25575	1295	432	5.065%	Yes	***	<.001
Antp Δ H Δ D-TFII β	21226	2057	686	9.693%	Yes	***	<.001

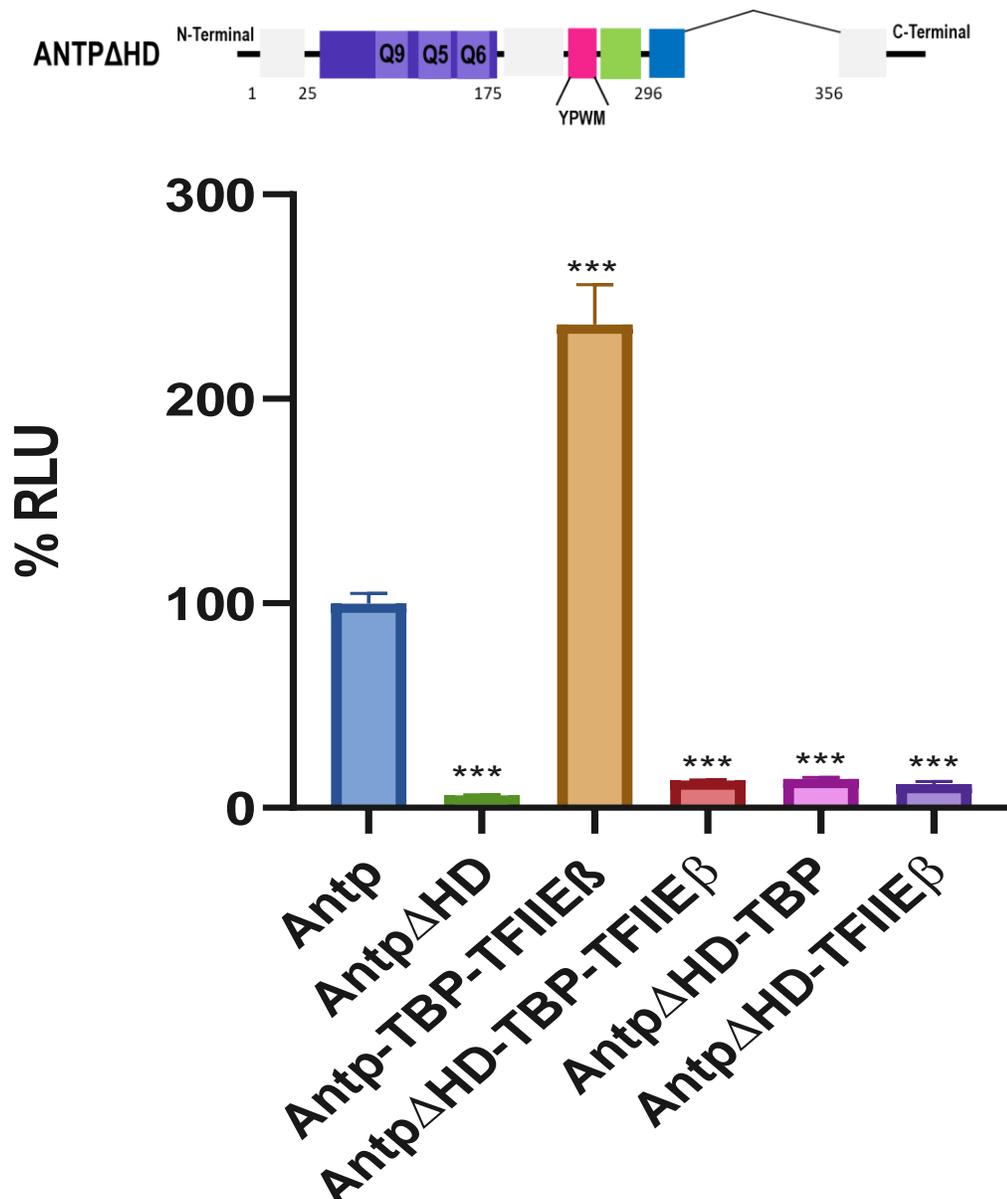


Figura 17. Importancia del HD de Antp. El esquema de la parte superior muestra la homeoproteínas Antp el dominio polyQ (morado) en la región N-terminal, el tetrapéptido YPWM (rosa) y la delección del HD. Los ensayos de transactivación realizados en celular HEK-293 utilizando la mutantes de Antp Δ HD revelaron que existe un decremento altamente significativo (***, $p < 0.001$) de la actividad transcripcional de Antp en ausencia del HD (8%), además la delección de esta región también afecta la transactivación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIΕ β (238%) disminuyendo de manera altamente significativa (***, $p < 0.001$) la transactivación hasta niveles basales de 13% en la prueba de la mutante Antp Δ HD con TBP y TFIIΕ β . De igual manera la delección del HD afecta la transactivación obtenida con TBP y TFIIΕ β hasta niveles basales de 14% y 12% respectivamente. Cada barra corresponde a la media de tres experimentos independientes ($n=3$) y su desviación estándar.

Los ensayos de transactivación con la mutante AntpHD demostraron que región del extremo N-terminal de Antp es importante en la regulación de la actividad transcripcional mostrada por el complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β . Para esta determinación se realizaron ensayos de transactivación en los que se utilizó el plásmido pPAC-AntpHD el cual presenta la delección de la región N-terminal de Antp; a través de transfecciones se realizaron las combinaciones de los plásmidos pPAC-AntpHD, pPAC-TBP y pPAC-TFIIE β . Utilizando los valores de la transactivación del plásmido de Antp WT (100%) y la mutante AntpHD la cual disminuyó la actividad transcripcional de Antp a 61% siguiendo la tendencia reportada por Cárdenas-Chávez en 2012. Se determinó que la ausencia de la región N-terminal de Antp (AntpHD) disminuye de manera altamente significativa los valores de transactivación de 238% para el complejo Antp-TBP-TFIIE β , a 40% para el trimérico AntpHD-TBP-TFIIE β (Figura 18). Como se esperaba la transactivación de los complejos entre TBP y TFIIE β con AntpHD también disminuyen la actividad transcripcional de Antp a 32% con TBP y 52% con TFIIE β . Tomando en consideración que Antp interactúa con TBP a través de la región rica en glutaminas ubicada en el extremo N terminal; la presencia del factor TFIIE β no logra rescatar la actividad de Antp sobre el gen reportero; al contrario parece disminuir más su capacidad transactivadora, de manera similar al efecto de la interacción Antp-TFIIE β .

La tabla 14 incluye los datos estadísticos obtenidos para estadísticos de tres experimentos (n=3) independientes obtenidos de las transfecciones celulares.

Tabla 14. Ensayos de transactivación de AntpHD-TBP-TFIIE β

	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
AntpHD	111532	15892	5297	14.25%	Yes	**	<.001
Antp-TBP-TFIIE β	417008	9070	26878	19.34%	Yes	***	<.001
AntpHD-TBP-TFIIE β	70373	8676	2892	12.33%	Yes	***	<.001
AntpHD-TBP	59648	3256	1085	5.459%	Yes	***	<.001
AntpHD-TFIIE β	96088	6349	2116	6.607%	Yes	**	<.001

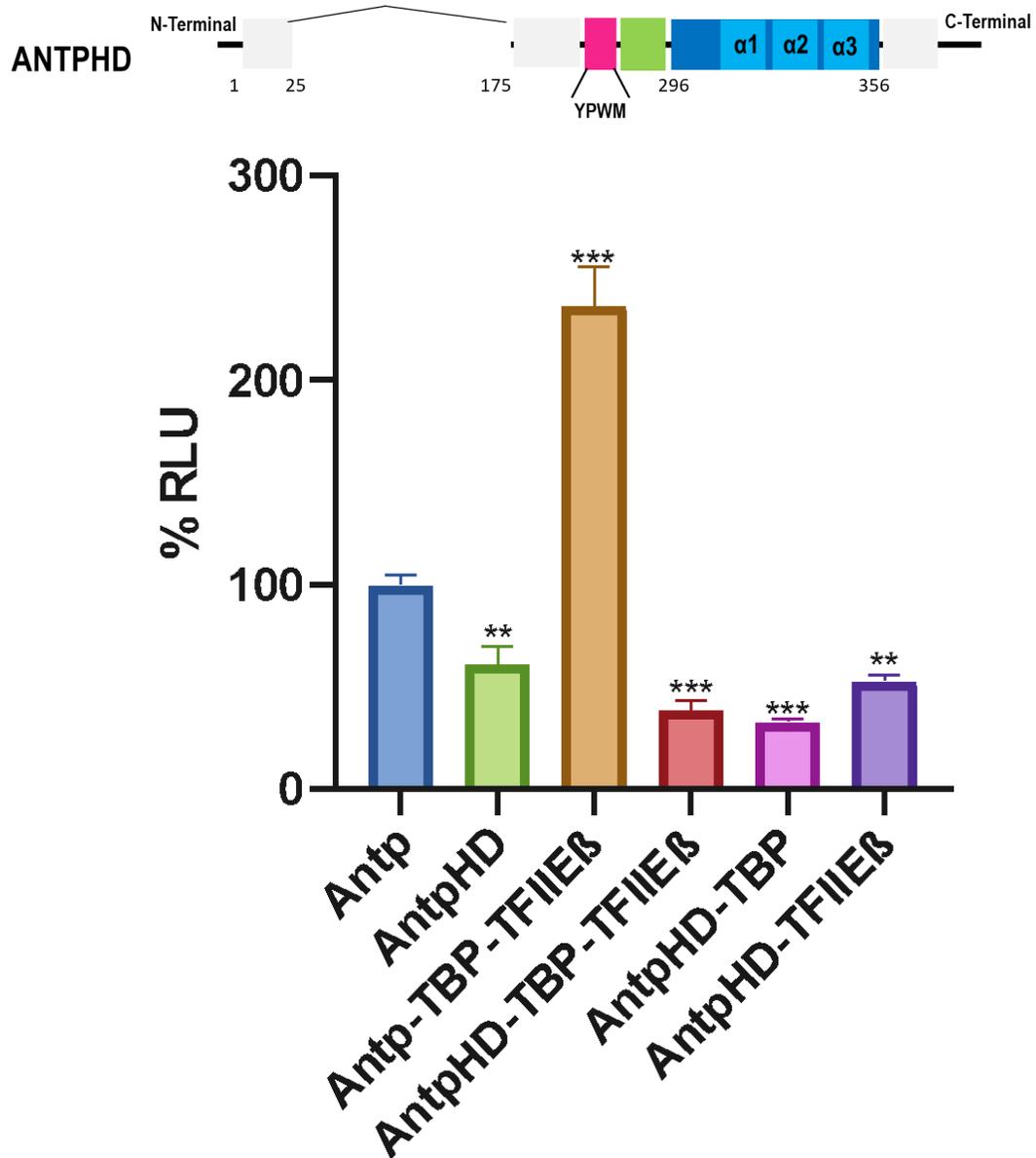


Figura 18. Efecto del extremo N-terminal de Antp en la transactivación. El esquema de la parte superior muestra la homeoproteínas Antp, del lado izquierdo ausencia de la región de poliglutaminas, contando únicamente por la presencia del el tetrapéptido YPWM (rosa) y homeodominio (azul). Para determinar el papel que tiene el extremo N-terminal en la regulación transcripcional de Antp en complejo con TBP y TFIIIEβ, se realizaron ensayos de transactivación en célula HEK-293 con la mutante de AntpHD (delección de la región N-terminal de Antp). La ausencia de la región amino terminal de Antp (AntpHD) disminuye su capacidad de transactivadora a un 61%. Esta misma delección afecta la transactivación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIEβ (238%) disminuyendo de manera altamente significativa (***, $p < 0.001$) la transactivación a 39% (AntpHD-TBP-TFIIIEβ). Esta repercusión en la transactivación también se ve reflejada en las interacciones diméricas con TBP y TFIIIEβ en donde la ausencia N-terminal disminuye la transcripción a 32% y 52% respectivamente. Cada barra corresponde a la media de tres experimentos independientes (n=3) y su desviación estándar

Finalmente debido a que sabemos que Antp interactúa con TFIIE β a través de los residuos 32 y 36 presentes en la segunda hélice del HD (Altamirano-Torres; 2018), nos propusimos determinar el papel que tiene estos residuos en la actividad transcripcional de Antp, así como su efecto en la transactivación mostrado por el complejo Antp-TBP-TFIIE β .

Para ello realizamos los ensayos de transactivación transfectando el plásmido mutante pPAC-Antp³²⁻³⁶ en combinación con los plásmidos productores pPAC-TBP y pPAC-TFIIE β . La mutante de Antp³²⁻³⁶ de forma monomérica disminuye la actividad transcripcional de Antp a 74%. Por otro lado, la mutación de estos mismos residuos también afecta de manera altamente significativa los resultados previos obtenidos del complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β (238%) disminuyendo la actividad transcripcional de Antp hasta un 61% al evaluar el complejo trimérico con la mutante Antp³²⁻³⁶-TBP-TFIIE β . Las Interacciones de Antp³²⁻³⁶ también disminuyeron los valores de transactivación de Antp a un 76% para Antp³²⁻³⁶-TBP y 36% para Antp³²⁻³⁶-TFIIE β (Figura 19).

Tomando en consideración estos resultados podemos establecer que los residuos 32 y 36 de la hélice II son importantes en la actividad transcripcional de Antp y su interacción con TFIIE β . Además, estos mismos residuos son necesarios para la regulación transcripcional de Antp dada por el complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β .

Tabla 15. Ensayo de transactivación de la mutante Antp32-36-TBP-TFIIE β

	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coefficiente Variación	Significancia	Nivel de significancia	Valor de P
Antp	182126	9070	3023	4.98%			
Antp ³²⁻³⁶	134837	27306	9102	20.25%	Yes	***	<.001
Antp-TBP-TFIIE β	417008	9070	26878	19.34%	Yes	***	<.001
Antp ³²⁻³⁶ -TBP-TFIIE β	131769	7412	2471	5.625%	Yes	***	<.001
Antp ³²⁻³⁶ -TBP	139754	11261	3754	8.057%	Yes	***	<.001
Antp ³²⁻³⁶ -TFIIE β	66874	13592	4531	20.32%	Yes	***	<.001

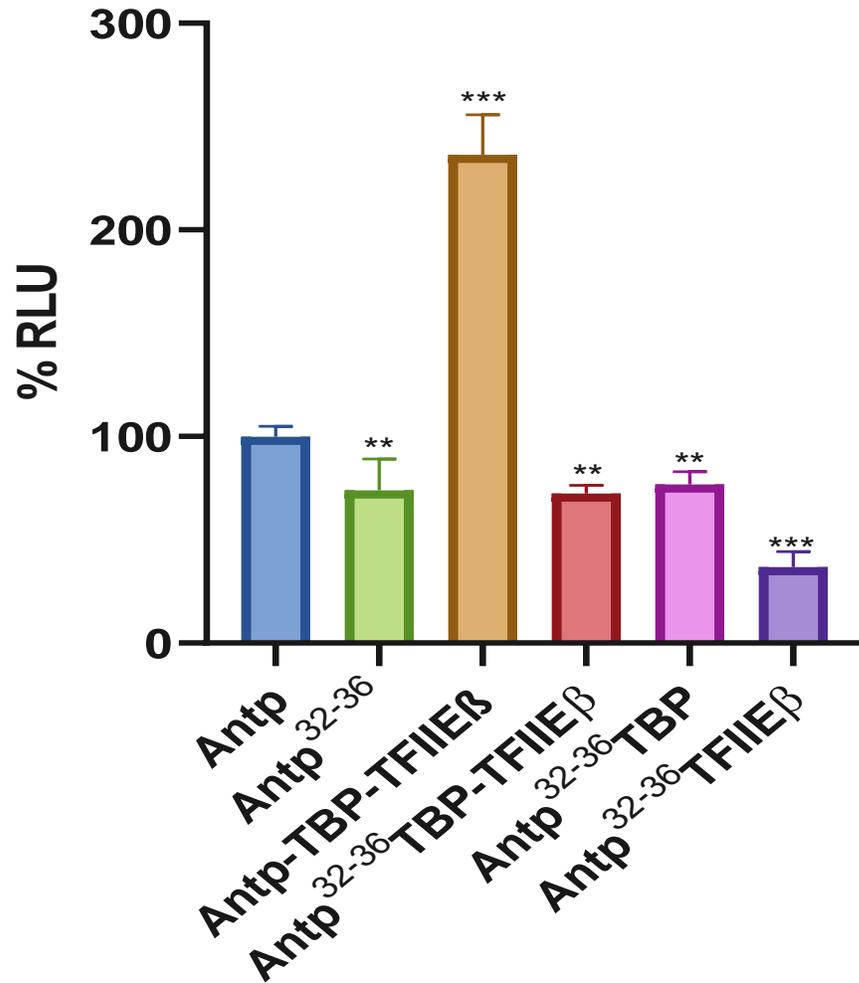
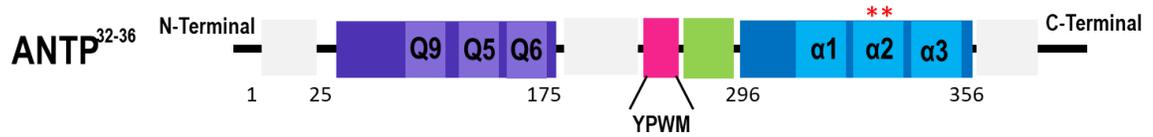


Figura 19. Mutante de los residuos 32-36 de la hélice II de HD de Antp. El superior muestra la región rica en glutaminas (morado) en el extremo región N-terminal y el tetrapéptido YPWM (rosa) la mutación de los residuos 32 y 36 de la hélice II del HD (azul). Para analiza la importancia de los residuos 32 y 36 de la segunda hélice del homeodominio, realizamos ensayos de transactivación transfetando la mutante Antp³²⁻³⁶ con TBP y TFIIΕβ, y observamos que la mutación de estos residuos de disminuye la actividad transcripcional de Antp a un 74%. Por otro lado, la comparación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIΕβ (238%) y Antp³²⁻³⁶-TBP-TFIIΕβ mostro una disminución altamente significativa de actividad transcripcional de Antp (61%). Las interacciones diméricas de la mutante Antp³²⁻³⁶ con TBP y TFIIΕβ también disminuyeron la transactivación a 76% y 36% respectivamente. Cada barra corresponde a la media de tres experimentos independientes (n=3) y su desviación estándar

8.6 Análisis de los complejos triméricos de las mutantes Antp^{AAAA} y Antp Δ HD en los complejos TBP-Exd y TBP-BIP2.

Para determinar la importancia del motivo YPWM y el HD sobre la capacidad transactivadora de los complejos triméricos de Antp en los complejos triméricos con TBP-Exd y TBP-BIP2. Se realizaron los ensayos de transactivación sustituyendo el plásmido de la Antp^{WT} por las mutantes Antp^{AAAA} y Antp Δ HD en los complejos triméricos con TBP-Exd y TBP-BIP2.

Los resultados obtenidos para los complejos triméricos de TBP-Exd y TBP-BIP2 con la mutante del tetrapéptido mutado (Antp^{AAAA}), mostraron un incremento en la disminución de la actividad transactivadora generada por el complejo trimérico Antp-TBP-Exd (80%) obteniendo un valor de transactivación de 67% para el complejo de la mutante Antp^{AAAA} TBP-Exd (Figura 20A). Mientras que para las diméricas de Antp^{AAAA} con TBP y Antp^{AAAA} con BIP2 los valores de transactivación reportados fueron de 69% y 48%.

Para los resultados el complejo Antp^{AAAA} con TBP y BIP2, nos encontramos que los valores de transactivación de este complejo presentaron una disminución de la actividad transactivadora dada por el complejo Antp-TBP-BIP2, disminuyendo la transactivación de un 74% a 63% (Figura 20B) con el tetrapéptido mutado. De las interacciones diméricas de la mutante Antp^{AAAA}, observamos que ausencia del tetrapéptido los niveles de transactivación de del complejo Antp^{AAAA}-TBP muestra un nivel de transactivación de 69%, mientras que el caso de la mutante con BIP2 los niveles de transactivación de son aún menos obteniendo un valor de 34%

En el caso de los resultados obtenidos de las mutante Antp Δ HD con TBP-Exd y TBP-BIP2, pudimos determinar que para todas las interacciones analizadas la ausencia del HD muestra disminuciones considerables de la capacidad transactivadora de Antp. De la transactivación de Antp-TBP-Exd (80%) observamos que en ausencia del HD la actividad transactivadora de Antp Δ HD-TBP-Exd (Figura 20C) es de 22%, para Antp Δ HD-TBP se reportó 14% y para Antp Δ HD-Exd 34%. Este último resultado de la mutante Antp Δ HD con Exd podría ser producto de la capacidad de unión de Exd por los sitios BS2 del plásmido reportero.

Para BIP2, con la mutante *Antp* Δ HD, observamos que los valores de transactivación del complejo trimérico con *Antp*WT disminuyen un 74% correspondiente al complejo *Antp*-TBP.BIP2 hasta un 17 para *Antp* Δ HD-TBP-BIP2. Para las interacciones *Antp* Δ HD con TBP y con BIP2 también encontramos niveles de transactivación bajos de un 14% y un 12% respectivamente (Figura 20D).

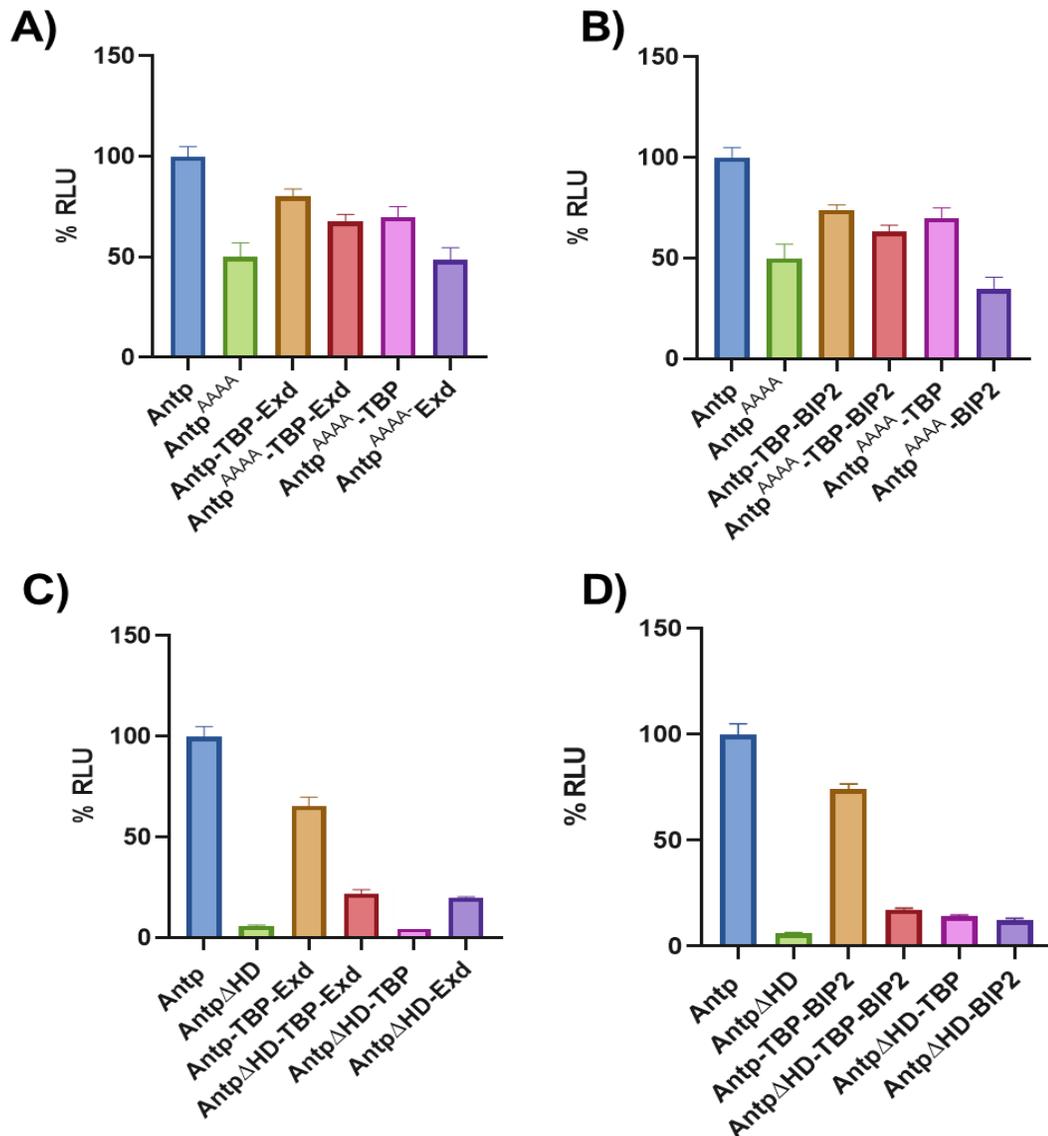


Figura 20. Interacciones triméricas de TBP-Exd y TBP-BIP2 con mutantes de *Antp*. Las gráficas muestran los resultados de los ensayos de transactivación de los complejos triméricos con mutantes las *Antp*^{AAA} y *Antp* Δ HD. El papel superior los resultados de la actividad transcripcional de los complejos triméricos de la mutante *Antp*^{AAA} con A) TBP-Exd y B) TBP-BIP2. El papel inferior muestra los complejos triméricos de *Antp* Δ HD con C) TBP-Exd y D) TBP-BIP2. Todos los resultados mostrados se normalizaron y analizados mediante las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. Cada barra corresponde a la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado.

9. DISCUSIÓN

En la presente tesis se evaluó el efecto funcional de las interacciones triméricas de Antp-TBP-TFIIE β , Antp-TBP-Exd y Antp-TBP-BIP2 en cultivo celular mediante ensayos de transactivación. Los resultados obtenidos mostraron que las interacciones Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd participan en la modulación de la actividad transcripcional de Antp, sin embargo, esta regulación no ocurre por la participación de BIP2 en complejo con Antp-TBP.

El análisis de la actividad transcripcional de los complejos triméricos en cultivo celular se realizó a través del ensayo de transactivación, el cual se fundamenta en la habilidad de Antp para la promoción de la transcripción de genes próximos a su secuencia de reconocimiento. Debido a que la homeoproteína Antp tiene la capacidad de dirigir la expresión del gen reportero de luciferasa presente el plásmido reportero pGLH11, es posible establecer el efecto de la interacción de Antp con otros factores transcripcionales a través de los cambios en los niveles de expresión de luciferasa reportados a través de las Unidades Relativas de Luz (RLUs).

Basados en los resultados obtenidos de los ensayos de FRET basado en BiFC, en donde se comprobó que el dímero de Antp-TBP establece interacciones triméricas con los factores: TFIIE β , BIP2 y Exd (Jiménez-Mejía, 2018). Para la realización de este trabajo de tesis se propagaron y caracterizaron los plásmidos recombinantes pNPAC-Antp, pPAC TBP, pPAC-TFIIE β , pPAC-Exd y pPAC-BIP2, así como también de los plásmidos mutantes pPAC-Antp Δ HHD, pPAC-HD, pPAC-Antp³²⁻³⁶ y pPAC-Antp^{AAAA}. La identidad de todos los plásmidos se confirmó mediante digestiones enzimáticas (Figura 15) de acuerdo con lo previamente reportado (Cárdenas-Chávez, 2012, Jiménez-Mejía, 2018).

La actividad transcripcional de Antp es modulada por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β

Para el primer objetivo que consistió en analizar el efecto transcripcional del complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β sobre la actividad transcripcional de Antp, se realizaron ensayos de transactivación en células HEK-293 utilizando el plásmido reportero pGLH11, en combinación con los plásmidos pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC-TFIIE β .

De forma individual Antp actúa como un potente activador transcripcional, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la interacción trimérica de Antp-TBP-TFIIE β incrementan de manera altamente significativa la actividad transcripcional de Antp aumentado en un 138% la transactivación (Figura 16). El efecto observado de la interacción de TFIIE β como un tercer factor en la interacción Antp-TBP, muestra resultados contrarios a los previamente reportados para las interacciones de Antp-TBP y Antp-TFIIE β (Cárdenas-Chávez; 2012) los cuales disminuyeron actividad transcripcional de Antp a un 27% para la interacción Antp-TBP y 48% para Antp-TFIIE β .

Para tomar en cuenta todos los factores involucrados en la interacción se determinó la capacidad transcripcional individual de los factores TBP y TFIIE β , los cuales muestran niveles de transactivación bajos (12%) para ambos factores. Los controles negativos del plásmido productor pPAC y el plásmido de Antp sin HD (Antp Δ HD) también mostraron niveles de transactivación bajos (8% y 5%). Los resultados obtenidos confirman que la activación del gen reportero de luciferasa es consecuencia de la capacidad transactivadora de Antp y que además la interacción trimérica con TBP y TFIIE β potencia esta actividad.

De acuerdo con los resultados podemos concluir que la interacción de Antp-TBP- TFIIE β tiene un papel importante en la modulación de la actividad transcripcional de la homeoproteínas Antp, potenciando su capacidad transactivadora. Los resultados obtenidos fueron tomados de 3 experimentos de transactivación independientes realizados por triplicado para obtener las medias y desviaciones estándar de cada combinación.

La homeoproteína Exd participa en la modulación de la actividad transcripcional de Antp en el complejo trimérico Antp-TBP-Exd.

La co-transfección de los plásmidos pNPAC-Antp, pPAC-TBP y pPAC-Exd junto al plásmido pGLH11 en células HEK-293 mostraron que el complejo trimérico Antp-TBP-Exd participa en la modulación de la actividad transcripcional de Antp, recuperando de forma parcial la actividad transactivadora (82%) en comparación a el efecto de las interacciones Antp-TBP (73%) y Antp-Exd (61%) , lo que corresponde a un incremento de 7% y 19% respectivamente (Figura 17).

Por su parte los resultados de la transactivación de los factores individuales muestran que, aunque TBP no es capaz de activar la expresión del gen reportero de la luciferasa (12%), Exd por su parte muestra valores de transactivación de 40%, esto puede a que Exd presenta un HD similar al de las homeoproteínas Hox, por lo cual pueden unirse a los sitios BS2 del plásmido reportero utilizado en el ensayo.

Nuestro resultados y los resultados de transactivación obtenidos con anterioridad sobre las interacciones diméricas de Antp, muestra que ausencia de TBP las interacción de Antp-Exd genera disminuciones de la actividad transactivadora de Antp (Cárdenas-Chávez 2012) sin embargo en presencia de TBP, la interacción trimérica Antp-TBP-Exd parece incrementar de forma parcial la transactivación, sin embargo es necesario indagar más a fondo si, los porcentajes obtenidos de los ensayo podrían representar una mejoría significativa en la transactivación, y si la presencia Exd junto con TBP son los responsables de la modificación en la actividad transcripcional, exponiendo que en presencia de TPB, Exd y Antp podrían participar de forma cooperativa potenciando la transactivación como se observo claramente en el complejos trimérico como TFIIE β .

Recordemos que PBC como Exd se unen a factores distintos de las proteínas Hox y desempeñan funciones importantes en la incorporación de dichos factores a los complejos de transcripción Hox (Ladam & Sagerström,2014). Por lo cual no podemos descartan su participación en el reclutamiento de otras componentes del interactoma de Hox.

El complejo trimérico de Antp-TBP con BIP2 disminuye la capacidad transactivadora de Antp.

Para el tercer objetivo que consistió en evaluar el efecto funcional de la interacción de Antp-TBP-BIP2₂₋₈₉ sobre la actividad transactivadora de Antp.

Los resultados obtenidos de las interacciones muestran que la co-expresión de los plásmidos de Antp, TBP y BIP2₂₋₈₉ en ensayos de transactivación disminuye la capacidad transactivadora de Antp en un 26% (Figura 9). Disminuciones en la actividad funcional de Antp también se observaron de la evaluación de las interacciones diméricas entre Antp-TBP y Antp-BIP2₂₋₈₉ los cuales disminuyen la transcripción mediada por Antp en un 27% y 38% respectivamente. Mientras que de forma individual tanto TBP, como BIP no

mostraron capacidad para activar la expresión del gen reportero de la luciferasa obteniendo niveles basales de expresión (8% y 5%). Para darle validez a los resultados, se contemplaron los niveles de transactivación de los controles negativos los plásmidos pPAC y pNPAC-Antp Δ HD, y como control positivo el p-MiR-Luc codificante para luciferasa.

Tomando en cuenta el valor de $E=0.15\pm 0.03$ para la interacción trimérica de Antp-TBP-BIP₂₋₈₉ reportado mediante FRET/BiFC (Jiménez-Mejía, 2018), y la diferencia de 1% entre la transactivación del complejo trimérico con BIP₂₋₈₉ y la interacción de Antp-TBP. Podemos hasta el momento sugerir que BIP2 no participa junto a TBP en la activación transcripcional de Antp, sino que podrían estar más involucrado al reclutamiento de otros GTFs del PIC. También sería interesante evaluar la proteína completa de BIP2 y no solo la región 2-89, para poder determinar si los residuos faltantes de la proteína tuvieran participación con Antp-TBP en el proceso de regulación transcripcional.

El efecto transcripcional observado por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β depende del extremo N-terminal, el HD y los residuos 32 y 36 de la hélice II

Para analizar los dominios funcionales involucrados en la actividad transcripcional producto de la interacción trimérica de Antp con TBP y TFIIE β . Se realizaron los ensayos de transactivación con las mutantes Antp Δ HD, pPAC-AntpHD y pPAC-Antp³²⁻³⁶.

Como se era de esperarse la ausencia del HD de Antp disminuye de forma drástica la actividad transcripcional del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β , ocasionado la obtención de niveles de transactivación basales (13%), esta misma tendencia se conserva en los complejos diméricos de Antp Δ HD-TBP (14%) y Antp Δ HD-TFIIE β (12%). Estos resultados confirman la importancia del HD para el reconocimiento de los sitios de unión y la activación de la transcripción. En lo que respecta al extremo N terminal de Antp los resultados obtenidos muestran que la interacción del complejo trimérico de AntpHD-TBP-TFIIE β (39%) disminuye un casi un 200% en comparación a complejo trimérico WT. En ausencia de la región rica en glutamina, observamos modificaciones en la transactivación de los complejos diméricos, principalmente con TBP, obteniendo un 32% en comparación con el 73% de la interacción de TBP con AntpWT, obtenido previamente (Figura 15).

Como mencionamos antes la región rica en glutaminas de Antp es importante para su interacción con TBP, sin embargo, es necesario recordar que aun en ausencia de glutaminas la interacción no se abate por completo (Montalvo-Mendez, 2016). Sin embargo, si representa un elemento clave en efecto potenciador de la actividad transcripcional del complejo trimérico.

Finalmente, con la mutante de Antp³²⁻³⁶, confirmamos la importancia de los residuos de la hélice II. En comparación al complejo trimérico (238%), las modificaciones en estos residuos revelan un porcentaje de RLU de 72% para el complejo con la mutante, estos resultados son similar a los obtenido en la interacción dimérica con TBP (74%). Por lo cual estos resultados corresponden con lo previamente reportado de la interacción de Antp-TFIIE β dependiente de los residuos 32 y 36 de la hélice II (Altamirano-Torres, 2014). Los resultados del complejo trimérico con la mutante cobran sentido si consideramos la perdida en interacción de Antp-TFIIE β

La sustitución del motivo YPWM por alaninas disminuye la capacidad transcripcional de los complejos Antp-TBP-Exd y Antp-TBP-BIP2

Los resultados de la mutante de Antp^{AAAA} para las interacciones triméricas de Antp-TBP-Exd y Antp-BIP2, mostraron la importancia del motivo YPWM para la interacción trimérica.

Realizando nuevamente los ensayos de transactivación analizamos la importancia del motivo YPWM en la interacción con Antp-TBP. Sabemos que Antp y otras homeproteínas establecen interacciones con Exd a través de el motivo YPWM y la región enlazadora adyacente al brazo N-terminal de la hélice I del HD (Ladam & Sagerström, 2014). Los resultados obtenidos de la mutante Antp^{AAAA} con TBP-Exd y TBP-BIP revelo que modificaciones en el tetrapetido, disminuyen la actividad transcripcional esto complejos triméricos en comparación con el complejo WT, posiblemente relacionado con la perdida de interacción de Exd y BIP2 con el motivo YPWM de Antp (Figura 21). Para el complejo trimérico con Exd nos encontramos una disminución del 13% en comparación con el complejo trimérico Antp-TBP-Exd (80%).

Esta disminución entre ambos complejos triméricos permite sugerir que la disminución en la transactivación está relacionado con la pérdida de interacción entre Antp-Exd por las modificaciones en el motivo YPWM. Estos resultados además son consistentes con la transactivación mostrada por Antp con TBP (69%).

Perdidas en la transactivación también se observaron en la comparación de complejo trimérico Antp-TBP-BIP (74%) y el complejo trimérico de Antp^{AAAA}-TBP-BIP2 63%. La importancia del tetrapéptido YPWM para la interacción con BIP2 también se confirma al comparar los valores de transactivación de Antp obtenidos del tetrapéptido mutado (Antp^{AAAA}) con BIP2, la cual mostró resultados de transactivación de 34%, lo cual confirma la importancia del motivo YPWM para la interacción con BIP2 (Figura 21).

Con estos ensayos hemos comprobado lo reportado en la literatura, en donde se dice que la unión al ADN y la especificidad funcional de Antennapedia (Antp) residen en el HD y su brazo N-terminal terminal, respectivamente (Gehring *et al.*, 1994, Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993, Gibson *et al.*, 1990), y que el motivo YPWM une directamente Antp con factores de la maquinaria transcripcional. (Prince, 2008). A pesar de que se sugiere que los complejos triméricos forman parte importante de la regulación transcripcional diferencial de los genes del desarrollo. La regulación por complejos triméricos está muy poco estudiada. Por lo cual es necesario analizar otro aspecto relacionados con la regulación.

10. CONCLUSIONES

- El complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β participan en la activación de la capacidad transcripcional de Antp.
- Los complejos triméricos Antp-TBP-Exd y -BIP2 no parecen modular la actividad transcripcional de Antp.
- El extremo N-terminal, el HD y los residuos 32 y 36 de la hélice II, son importante en el efecto transcripcional mostrado por el complejo trimérico de Antp-TBP-TFIIE β .
- En ausencia del motivo YPWM los complejos triméricos Antp-TBP-Exd y Antp-TBP-BIP2 muestran valores de transactivación similares al complejo Antp-TBP.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto transactivador de estos complejos sobre la capacidad transactivadora de Antp utilizando un plásmido reportero que contenga los elementos de un promotor basal (TATA, Inr y DPE)
- Determinar la actividad funcional de las interacciones triméricas Antp-TBP-TFIIIE β /Exd/BIP2 en la activación y/o represión de genes blanco de Antp.

REFERENCIAS:

1. Akam M. 1989. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell*, 57(3), 347-349
2. Altamirano-Torres CD. 2014. Interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con el factor TFIIIE- β a través de los residuos 32 y 36 del homeodominio. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León
3. Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., & Merabet, S. (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*, 4, e06034.
4. Balkashina, E. I., 1929 Ein Fall der Erbhomoösis (die Genovariation "aristapedia") bei *Drosophila melanogaster*. *Arch. Entw. Mech.Org* 115:448.463.
5. Bateson, W. 1894 Materials for the Study of Variation Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species.
6. Bender, W., Spierer, P., Hogness, D. S., & Chambon, P. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Journal of molecular biology*, 168(1), 17-33.
7. Biggin, M. D., & McGinnis, W. (1997). Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development*, 124(22), 4425-4433.
8. Bridges CB. & Morgan TH. 1923. The third chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington.
9. Bridges, CB. & Dobzhansky T. 1933. The mutant "proboscipedia" in *Drosophila melanogaster*- A case of hereditary homoösis. *Development Genes and Evolution*, 127(4), 575-590.
10. Britten, R. J., & Davidson, E. H. (1969). Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, 165(3891), 349-357.

11. Calon, A., Gross, I., Davidson, I., Kedingler, M., Duluc, I., Domon-Dell, C., & Freund, J. N. (2007). Functional interaction between the homeoprotein CDX1 and the transcriptional machinery containing the TATA-binding protein. *Nucleic acids research*, 35(1), 175-185.
12. Cárdenas-Chávez DL. 2012. Interacciones moleculares de Antennapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
13. Casares, Fernando, and Richard S. Mann. "Control of antennal versus leg development in *Drosophila*." *Nature* 392.6677 (1998): 723.
14. Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., ... & Mann, R. S. (2015). Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell*, 160(1-2), 191-203.
15. Deschamps, Jacqueline, & Johan van Nes. "Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse." *Development* 132.13 (2005): 2931-2942.
16. Dong, P. D., Chu, J., & Panganiban, G. (2000). Coexpression of the homeobox genes *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development*, 127(2), 209-216.
17. Dong, PD Si, Jennifer Scholz Dicks, and Grace Panganiban. "*Distal-less* and *homothorax* regulate multiple targets to pattern the *Drosophila* antenna." *Development* 129.8 (2002): 1967-1974.
18. Ekker, S. C., Young, K. E., von Kessler, D. P., & Beachy, P. A. (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *The EMBO journal*, 10(5), 1179-1186.
19. Elizondo-Rodríguez FS. 2016. Los homeodominios de Antennapedia y Sex comb reduced son requeridos en su interacción molecular proteína-proteína. Tesis de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León
20. Emili, A. N. D. R. E. W., Greenblatt, J. A. C. K., & Ingles, C. J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 14(3), 1582-1593.
21. Forget, D., Langelier, M. F., Thérien, C., Trinh, V., & Coulombe, B. (2004). Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIE in initiation mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 24(3), 1122-1131.
22. Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S., & Gehring, W. J. (1993). Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6360-6364.

23. Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S., & Gehring, W. J. (1993). Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6360-6364.
24. Garber, R.L., Kuroiwa, A. and Gehring, W.J. (1983) *EMBO J.*, 2, 2027-2036.
25. García-Bellido A. Ripoll, P. Morata, G. 1973. Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*". *Nature New Biology*, 245: 251-253.
26. Garcia-Bellido A. 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In *Ciba Found Symp* (Vol. 29, pp. 161-182).
27. Garcia-Fernandez, J. (2005). Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity*, 94(2), 145.
28. Garcia-Fernández, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 881.
29. Gaunt, S.J. (2015). The significance of Hox gene collinearity. *International Journal of Developmental Biology*, 59(4-5-6), 159-170.
30. Gehring, W. J., Affolter, M., & Bürglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annual review of biochemistry*, 63(1), 487-526.
31. Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* 11th.
32. Goldschmidt, R. 1938. Physiological genetics. *Physiological genetics*.
33. Hayashi, S., & Scott, M. P. (1990). What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins?. *Cell*, 63(5), 883-894.
34. Herskowitz IH. 1948. Hexaptera, a homoeotic mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 34(1), 10.
35. Hoey, T., & Levine, M. (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature*, 332(6167), 858-86
36. Hueber, S. D. (2009). Identification and functional analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Eberhard Karls University of Tuebingen, Biology Department*.
37. Ikuta, T., & Saiga, H. (2005). Organization of Hox genes in ascidians: present, past, and future. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(2), 382-389.
38. Izpisua-Belmonte, J. C., Tickle, C., Dolle, P., Wolpert, L., & Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature*, 350(6319), 585.
39. Kaufman, T. C., Lewis, R., & Wakimoto, B. (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84a-B. *Genetics*, 94(1), 115-133.
40. Kmita, M., & Duboule, D. (2003). Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science*, 301(5631), 331-333.
41. Kuroiwa A, Hafen E. and Gehring W. 1984. Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene Fushi tarazu of *Drosophila*. *Cell* 37:825-831.
42. Ladam, F., & Sagerström, C. G. (2014). Hox regulation of transcription: more complex (es). *Developmental Dynamics*, 243(1), 4-15.

43. Le Calvez, J. 1948. Aristapedia: heterozygote dominante homozygote lethale chez *Drosophila melanogaster*. Inversion dans le bras droit du chromosome III. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*, 82, 97-113.
44. Lee, T. I., & Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*, 34(1), 77-137.
45. Lelli, K.M., Noro, B., and Mann, R.S. (2011). Variable motif utilization in homeotic selector (Hox)-cofactor complex formation controls specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 21122–21127.
46. Lemons, D., & McGinnis, W. (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, 313(5795), 1918-1922.
47. Levine, M., & Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*, 55(4), 537-540.
48. Levine, Michael, Gerald M. Rubin, and Robert Tjian. "Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*." *Cell* 38.3 (1984): 667-673.
49. Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
50. Liu, Y., MacDonald, R. J., & Swi, G. H. (2001). DNA Binding and Transcriptional Activation by a PDX1· PBX1b· MEIS2b Trimer and Cooperation with a Pancreas-specific Basic Helix-Loop-Helix Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17985-17993.
51. Mann RS, Lelli KM and Joshi R. 2009. Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Topics in Development Biol.* **88**: 63-101.
52. Mann, Richard S., and Markus Affolter. "Hox proteins meet more partners." *Current opinion in genetics & development* 8.4 (1998): 423-429.
53. Mann, Richard S., and Siu-Kwong Chan. "Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins." *Trends in Genetics* 12.7 (1996): 258-262.
54. Mark, M., Rijli, F. M., & Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric research*, 42(4), 421.
55. Maxon, M. E., Goodrich, J. A., & Tjian, R. (1994). Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIID: a model for promoter clearance. *Genes & development*, 8(5), 515-524.
56. McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, 37(2), 403-408.
57. Merabet, S., & Mann, R. S. (2016). To be specific or not: the critical relationship between Hox and TALE proteins. *Trends in Genetics*, 32(6), 334-347.

58. Miotto, Benoit, and Yacine Graba. "Control of DNA replication: a new facet of Hox proteins?." *Bioessays* 32.9 (2010): 800-807.
59. Montalvo-Méndez RJ. 2016. El homeopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción molecular proteína-proteína con Antennapedia. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
60. Nitta, K. R., Jolma, A., Yin, Y., Morgunova, E., Kivioja, T., Akhtar, J., ... & Taipale, J. (2015). Conservation of transcription factor binding specificities across 600 million years of bilateria evolution. *Elife*, 4, e04837.
61. Ovalle-Maqueo A. 2015. Identificación de los homeopeptidos de glutaminas de Antennapedia responsables de su interacción molecular con el factor transcripcional TBP. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
62. Passner JM, Ryoo HD, Shen L, Mann RS, Aggarwal AK. 1999. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*. 297: 649-651.
63. Passner, J. M., Ryoo, H. D., Shen, L., Mann, R. S., & Aggarwal, A. K. (1999). Structure of a DNA-bound Ultrabithorax–Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, 397(6721), 714.
64. Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 893.
65. Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 893-904.
66. Peifer, M., & Wieschaus, E. (1990). Mutations in the *Drosophila* gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes & Development*, 4(7), 1209-1223.
67. Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., ... & Gehring, W. J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal
68. Prince, V. E. (2002). The Hox Paradox: More complex (es) than imagined. *Developmental biology*, 249(1), 1-15.
69. Rauskolb, C., Smith, K. M., Peifer, M., & Wieschaus, E. (1995). extradenticle determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development*, 121(11), 3663-3673.
70. Reuter, R. S. M. P., & Scott, M. P. (1990). Expression and function of the homoeotic genes Antennapedia and Sex combs reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development*, 109(2), 289-303.
71. Rezsohazy, René. "Non-transcriptional interactions of Hox proteins: Inventory, facts, and future directions." *Developmental Dynamics* 243.1 (2014): 117-131.
72. Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C., Chen, H., Lorincz, A., ... & Hanakahi, L. A. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer research*, 67(4), 1527-1535.

73. Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C., Chen, H., Lorincz, A., ... & Hanakahi, L. A. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer research*, 67(4), 1527-1535.
74. Scott MP, Wainer A. 1984. Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4115-4119.
75. Shanmugam, G. (1997). The Bouma sequence and the turbidite mind set. *Earth-Science Reviews*, 42(4), 201-229.
76. Sparmann, A., & van Loon, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 846.
77. Svingen, T., & Tonissen, K. F. (2006). Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity*, 97(2), 88-96.
78. Thomas, M. C., & Chiang, C. M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 41(3), 105-178.
79. Verrijzer, C. P., & Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends in biochemical sciences*, 21(9), 338-342
80. Villarreal-Puente AC. 2015. Interacción molecular de Ubx con Antp mediante BiFC in vivo. Tesis de Licenciatura en Biotecnología Genómica, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.
81. Watanabe, T., Hayashi, K., Tanaka, A., Furumoto, T., Hanaoka, F., & Ohkuma, Y. (2003). The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2914-2926.
82. Zhu A, Kuziora MA. 1996. Homeodomain Interaction with the β Subunit of the General Transcription Factor TFIIE. *J. Biol. Chem.* 271: 20993-20996.