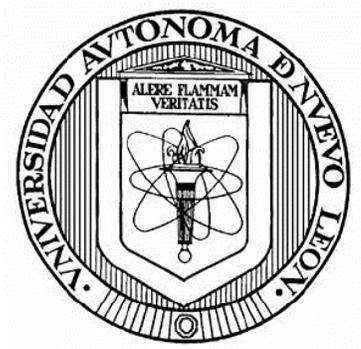


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DISECCIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE TBP CON LAS
HOMEOPROTEÍNAS SCR, UBX Y ABDB MEDIANTE BIFC
EN LA LÍNEA CELULAR HEK293

Por:

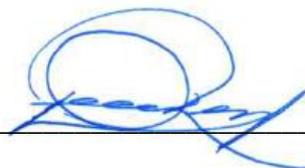
LBG. RUBEN DE JESUS MONTALVO MENDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Diciembre 2020

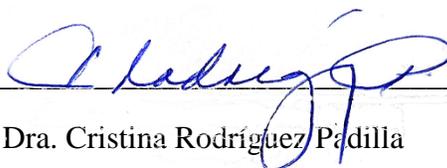
DISECCIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE TBP CON LAS
HOMEOPROTEÍNAS SCR, UBX Y ABDB MEDIANTE BIFC
EN LA LÍNEA CELULAR HEK293

Comité de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez

Director de Tesis



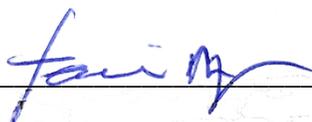
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



Dra. Vianey González Villasana

Vocal



Dr. Fermín Mar Aguilar

Vocal



Dra. Claudia Dálila Altamirano Torres

Vocal

LUGAR DE TRABAJO

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

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS.....	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
1. RESUMEN.....	IX
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1 Genes homeóticos.....	3
3.2 Homeoproteínas.....	6
3.3 Paradoja Hox.....	8
3.4 Interactoma Hox.....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPÓTESIS.....	18
6. OBJETIVOS.....	18
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
8.1 Determinación de la interacción entre TBP y las homeoproteínas Sex combs reduced, Ultrabithorax y Abdominal-B.....	20
8.1.1 Construcción del vector de expresión pCS2VC155-Ubx.....	20
8.1.2 Propagación y caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155- AbdB y pCS2VC155-Antp.....	21
8.1.3 Análisis de la interacción molecular mediante la técnica BiFC en células HEK293... ..	22
8.1.4 Análisis de la interacción TBP-Scr/Ubx/AbdB mediante BiFC en la línea celular HEK293.....	23
8.2 Determinación del papel del homeodominio en la interacción TBP-Hox.....	24
8.2.1 Construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD.....	24
8.2.2 Propagación y caracterización de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-AntpHD.....	25
8.2.3 Análisis de la interacción de TBP y ScrHD, UbxHD y AbdBHD mediante BiFC en la línea celular HEK293.....	25
8.3 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB.....	26
8.3.1 Propagación y caracterización del vector pCS2VNm9-TBPΔQ40.....	26
8.3.2 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con Scr, Ubx y AbdB.....	26

8.4 Determinación del efecto de la ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD	27
8.4.1 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD	27
9. RESULTADOS	29
9.1 Determinación de la interacción TBP- Scr, Ubx y AbdB	29
9.1.1 Construcción del vector de expresión pCS2VC155-Ubx	29
9.1.2 Caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155-Antp y pCS2VC155- AbdB	30
9.1.3 TBP establece interacción proteína-proteína con Scr, Ubx y AbdB en la línea celular HEK293	32
9.2 Determinación del papel del homeodominio en la interacción de TBP con Scr, Ubx y AbdB	34
9.2.1 Construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD	34
9.2.2 Caracterización de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD	36
9.2.3 El homeodominio de Scr, Ubx y AbdB no es suficiente para establecer interacción con TBP en la línea celular HEK293	38
9.3 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB	40
9.3.1 Caracterización del vector pCS2VNm9-TBPΔQ40	40
9.3.2 El homopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción con Scr, Ubx y AbdB	41
9.4 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD	44
10. DISCUSIÓN	49
11. CONCLUSIONES	58
13. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutantes homeóticas en <i>Drosophila melanogaster</i> .	3
Figura 2. Los genes homeóticos se agrupan en los complejos ANT-C y BX-C.	5
Figura 3. El Homeodominio de las homeoproteínas.	7
Figura 4. Representación esquemática de la Paradoja Hox.	8
Figura 5. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas.	9
Figura 6. Interacción dimérica entre Hox y Exd.	10
Figura 7. Especificidad latente en las homeoproteínas.	11
Figura 8. Modelos de regulación Hox.	12
Figura 9. Las homeoproteínas presentan una gran multiplicidad de interacciones.	13
Figura 10. Las homeoproteínas regulan la expresión génica en diferentes niveles.	15
Figura 11. Estructura de la proteína de unión a la caja TATA.	16
Figura 12. Modelo de la estructura del complejo de preiniciación de la transcripción y sus proteínas reguladoras.	17
Figura 13. Esquematización del fundamento de la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente.	22
Figura 14. Construcción del vector pCS2VC155-Ubx.	29
Figura 15. Caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-Antp, pCS2VC155-AbdB y pCS2VC155-SynthScr.	31
Figura 16. TBP interacciona con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB.	33
Figura 17. Análisis estadístico de la interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp.	34
Figura 18. Estrategia de subclonación para la construcción del vector pCS2VC155-UbxHD.	35
Figura 19. Caracterización enzimática de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-AntpHD.	37
Figura 20. TBP interacciona con Scr y AbdB a través de sus homeodominios.	39
Figura 21. Análisis estadístico de la interacción entre TBP y el HD de las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp.	40
Figura 22. Caracterización enzimática del vector pCS2VNm9-TBP Δ Q40.	41
Figura 23. El homopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB.	43
Figura 24. Análisis estadístico de las interacciones entre TBP Δ Q40 con las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp.	44
Figura 25. La ausencia de los dominios de interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB afecta de forma aditiva la reconstitución de Venus.	46
Figura 26. Análisis estadístico de las interacciones entre TBP Δ Q y el homeodominio de las homeoproteínas Antp, Ubx, Scr y AbdB.	47
Figura 27. Análisis estadístico de la comparación sobre el efecto del HD, de la ausencia de las glutaminas en TBP o la combinación de ambos en la interacción entre TBP y Antp/Ubx/Scr/AbdB.	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBP-Hox.....	32
Tabla 2. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBP-HD.....	38
Tabla 3. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBPΔQ-Hox.....	42
Tabla 4. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBPΔQ-HoxHD....	45

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

TBP.....	Proteína de unión a caja TATA (TATA-Binding Protein)
Lab.....	labial
Df.....	Deformed
Pb.....	Probocipedia
Scr.....	Sex combs reduced
Antp.....	Antennapedia
Ubx.....	Ultrabithorax
Abd A	Abdominal A
Abd B.....	Abdominal B
TAF.....	TBP-Associated Factor
Q.....	Glutamina
PXT.....	Prolina-cualquier aminoácido- Tirosina
GTFs.....	Factores Generales de la Transcripción (General Transcription Factors)
PIC.....	Complejo de preiniciación (Preinitiation Complex)
HD.....	Homeodominio
BX-C.....	Complejo Bithorax
ANT-C.....	Complejo Antennapedia
YPWM.....	Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina
Exd.....	Extradenticle
BiFC.....	Complementación Bimolecular Fluorescente (Bimolecular Fluorescent Complementation)
%GC.....	Porcentaje de guaninas y citosinas de una secuencia nucleotídica
PEI.....	Polietilenimina
dNTP.....	Desoxinucleotidos trifosfatados
Kb.....	Kilobase
LB.....	Medio Luria-Bertani
miliQ.....	Agua ultrapurificada

PBS.....Buffer Salino de Fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
PCR.....Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
rpm.....Revoluciones por minuto
SFB.....Suero Fetal Bovino
Tm.....Temperatura media de alineamiento
VC155Fragmento C-terminal de la proteína Venus
VNm9Fragmento N-terminal de la proteína Venus

1. RESUMEN

Las homeoproteínas son factores transcripcionales que regulan la expresión de genes que definen la identidad de los segmentos en los organismos. Estos factores transcripcionales presentan una amplia multiplicidad de interacciones con otras moléculas como cofactores que aumentan su especificidad de unión al DNA y proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica, entre las que se incluyen las de la maquinaria basal de transcripción como lo son BIP2, Med19, TFIIE β , M1BP y TBP. En nuestro laboratorio se ha determinado que TBP interacciona con Antennapedia (Antp) y Abdominal A (AbdA) a través de la región rica en glutaminas de Antp y el HD de AbdA. Adicionalmente, existe evidencia de que los homopéptidos de glutaminas de TBP tienen una función transactivadora y son un dominio de interacción con TFs como TFIIB y Antp. Debido a la importancia de la interacción entre homeoproteínas y la maquinaria basal de transcripción en la regulación de la expresión génica y a la poca evidencia que existe, el propósito de esta tesis fue elucidar si TBP interacciona con Sex combs reduced (Scr), Ultrabithorax (Ubx) y Abdominal-B (AbdB), así como determinar los dominios funcionales involucrados. Para determinar las interacciones proteicas mediante Complementación Bimolecular Fluorescente en la línea celular HEK293 se cotransfectó el vector que codifica el extremo N-terminal de la proteína fluorescente Venus fusionado con TBP (o TBP Δ Q) con los vectores que codifican al extremo C-terminal de Venus fusionado a las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB o sus homeodominios. En todos los casos la interacción se determinó mediante el análisis de la reconstitución de la fluorescencia de Venus con respecto a la fluorescencia de mCherry, utilizado como control. Los resultados obtenidos indican que TBP interacciona con Scr, Ubx y AbdB dando 72.39%, 70% y 94.91%, respectivamente, muy similar a la interacción con Antp. Estas interacciones son afectadas significativamente en ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP disminuyendo a 24.57%, 34.16% y 49.22%, respectivamente. Además, al probar la interacción con los homeodominios se encontró que la interacción de estas homeoproteínas con TBP se reduce de forma significativa, dando 44.12%, 41% y 60.55%, respectivamente, indicando que otras regiones están involucradas en estas interacciones. Estos resultados indican que hay cierta similitud en los mecanismos interacción y por lo tanto en la regulación génica durante el desarrollo en *Drosophila*.

2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los organismos se rige por la expresión diferencial de genes que dirigen el destino celular de cada tejido específico, permitiendo el desarrollo de diversas estructuras anatómicas (Lewis, 1978). La expresión diferencial de estos genes es regulada por factores transcripcionales específicos conocidos como Homeoproteínas. Estas proteínas están altamente conservadas y se caracterizan por poseer un dominio conocido como homeodominio (HD). El HD es un dominio de unión al DNA que permite a estos factores transcripcionales reconocer los sitios de unión y regular la expresión génica de distintas casadas génicas (Gehring et al., 1994). Históricamente, se ha encontrado que las homeoproteínas se unen a la secuencia consenso TAAT (Kalionis & O'farrel, 1996; Slattery et al., 2011), sin embargo, debido a que esta secuencia se repite frecuentemente en el genoma en promedio cada kilobase, es difícil imaginar de qué manera proteínas con un alto grado de similitud reconocen secuencias tan pequeñas y frecuentes en el genoma para regular de forma diferencial distintos sets de genes que dirigen el desarrollo de distintos tejidos (Lappin, Grier, Thompson, & Halliday, 2006). Para intentar explicar esta paradoja se han propuesto distintos mecanismos de regulación por homeoproteínas, como su interacción de forma dimérica o incluso en forma trimérica con cofactores como Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth) (Hudry et al., 2012). Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que la variabilidad de la secuencia aminoacídica que se ubica entre el tetrapéptido YPWM y el HD es la que define cual dímero va a unirse al DNA ya que esta secuencia enlazadora se posiciona en el surco menor del DNA brindando especificidad (Joshi et al., 2007), de manera que la interacción Hox-Exd aumenta la especificidad de unión al DNA y que cada dímero tiene distinta afinidad por distintas secuencias (Slattery et al., 2011). Por otro lado, se ha observado que las secuencias de baja afinidad que están cercanas a los sitios de unión Hox/Ex/Hth son esenciales para brindar especificidad a las homeoproteínas (Crocker et al., 2015). Además de la especificidad que estos factores transcripcionales deben tener con el DNA, una gran cantidad de estudios han demostrado que son capaces de regular la transcripción gracias a la multiplicidad de interacciones que presentan con diversas clases de proteínas involucradas con la regulación transcripcional, como complejos remodeladores de la cromatina, topoisomerasas, elementos del complejo mediador, factores de pausaje de la polimerasa,

lncRNAs y componentes de la maquinaria basal de la transcripción (Bobola & Merabet, 2017). La maquinaria basal de transcripción son el conjunto de factores transcripcionales mínimos requeridos para dar inicio a la transcripción, estos se unen al promotor en un orden específico de manera que puedan reclutar a la polimerasa al promotor para formar el Complejo de Preiniciación (PIC, por sus siglas en inglés). Diversos estudios *in vitro* han demostrado que las homeoproteínas son capaces de establecer interacciones proteína-proteína con componentes de la maquinaria basal de transcripción tanto de forma dimérica como trimérica y que además estas interacciones son capaces de regular la transcripción (Prince et al, 2007; Boube *et al.*, 2014; Capella et al., 2014; Baëza *et al.*, 2015; Montalvo-Méndez, 2016; Benitez et al., 2016; Zouaz et al, 2017; Altamirano-Torres et al., 2018; Jiménez-Mejía, 2018). Un componente clave en el PIC es la proteína de unión a caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés). Esta proteína es fundamental en el factor transcripcional TFIID, ya que le brinda la capacidad de interactuar con la región promotora en el DNA, permitiendo el establecimiento del PIC y el comienzo de la transcripción. En la estructura primaria de TBP el extremo C-terminal posee un dominio de interacción con el DNA altamente conservado, mientras que el extremo N-terminal presenta una estructura desordenada que se caracteriza por poseer una región rica en glutaminas y un motivo PXT (Prolina-aminoácido variable- Tirosina), particularmente presente en mamíferos que se ha descrito como un dominio de interacción con otras proteínas, que además tiene capacidad transactivadora. Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que hTBP establece interacciones proteína-proteína con homeoproteínas como abdominal A (abdA) y Antennapedia (Antp), y que además su interacción con Antp es mediada por sus homopéptidos de glutaminas. Debido a la creciente evidencia de interacciones Hox-GTFs y a su relevancia en el control transcripcional, en este trabajo se pretende esclarecer si existe interacción dimérica entre TBP y las homeoproteínas Sex Combs Reduced (Scr), Ultrabithorax (Ubx) y Abdominal B (AbdB) y además de determinar los dominios de TBP involucrados en estas interacciones.

3. ANTECEDENTES

3.1 Genes homeóticos

Los genes homeóticos deben su nombre a “*Homeosis*”, un término acuñado en 1894 por el naturalista inglés William Bateson, quien en el estudio de las formas en que varía la morfología observó mutaciones en los segmentos de los organismos y propuso que “*el fenómeno esencial no es que haya habido un cambio, sino que algo se ha cambiado a la semejanza de otra cosa*” (Bateson, 1894). Esta clase de mutaciones fueron luego descritas por Calvin Bridges, quien encontró una mutación en la mosca de la fruta, que se caracteriza por tener un segundo par de alas en el segmento donde normalmente se desarrollan los halterios en el fenotipo silvestre, fenotipo al que denominó Ultrabithorax (Figura 1A) (Bridges & Morgan, 1923). Posterior se fueron descubriendo distintas mutaciones homeóticas en *Drosophila melanogaster* como la mutación Antennapedia, caracterizada por el desarrollo de patas en el segmento donde normalmente se desarrollan antenas (Figura 1B). Este tipo de mutaciones se les denominó “mutaciones homeóticas”, haciendo alusión al término introducido por Bateson años atrás.

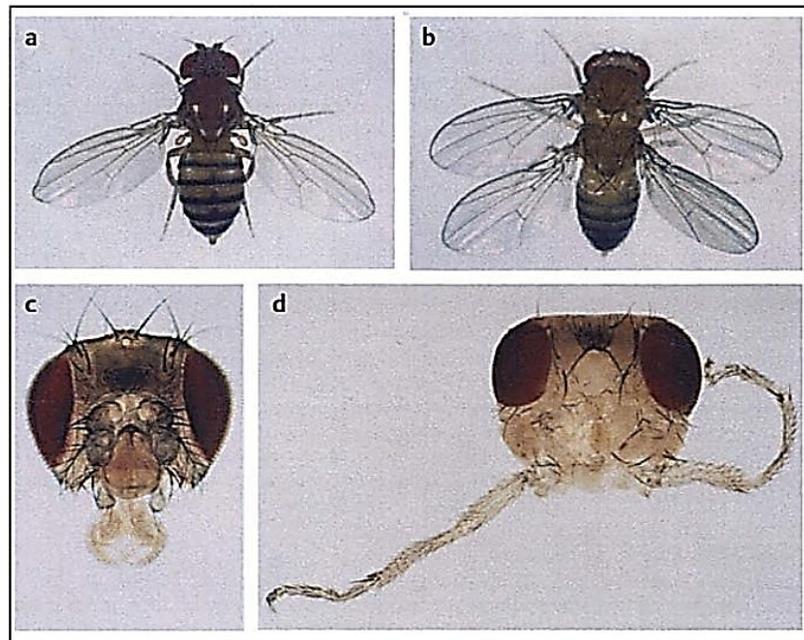


Figura 1. Mutantes homeóticos en *Drosophila melanogaster*. A) Fenotipo silvestre, B) Fenotipo de la mutación homeótica Ultrabithorax, caracterizada por el desarrollo de un segundo par de alas en el segmento donde normalmente se desarrollan los halterios. C) Fenotipo silvestre de la cabeza de *D. melanogaster*. D) Transformación Antena-Pata en la mutación homeótica Antennapedia. Tomado de Gehring et al., 2007

En la década de los 70's, García-Bellido y sus colaboradores observaron que las mutaciones homeóticas ocurren en dominios que son coextensivos con los segmentos del cuerpo de la mosca, lo cual los llevó a proponer que debe existir un conjunto de “genes selectores” que actúa en las células fundadoras de dichos segmentos para especificar las partes del cuerpo que deberán constituir (García-Bellido et al., 1975). Posteriormente, en la misma década se llevaron a cabo distintas investigaciones para tratar de elucidar las regiones del genoma de la mosca que son responsables de las mutaciones homeóticas. En 1978, Edward Lewis y sus colaboradores estudiaron distintas regiones en el cromosoma 3 de *D. melanogaster* encontrando la existencia de un conjunto de genes que participa en la diferenciación de la parte media y posterior; complejo al que se denominó “Complejo bithorax” o BX-C. En este trabajo se observó que las moscas mutantes en el gen Ubx (responsable de la diferenciación del tercer segmento torácico) poseen una duplicación en el segundo segmento torácico, dando lugar al desarrollo de un par de alas en el lugar donde normalmente se desarrollan halterios, tal como lo había observado Bridges años atrás (Lewis, 1978). Por otra parte, Kaufman y colaboradores definieron otro complejo de genes en el mismo cromosoma que especifica el desarrollo corporal más anteriormente en el embrión, brindándole identidad a los segmentos de la cabeza y los dos primeros segmentos torácicos. A este complejo se le llamó “Complejo Antennapedia” o ANT-C, concluyendo así que los genes que conforman estos complejos especifican el plan corporal de la mosca (Kaufman et al., 1980; Scott et al., 1983). Estos genes fueron posteriormente denominados genes homeóticos (o genes Hox).

En *Drosophila melanogaster*, el ANT-C se compone de los genes labial (lab), proboscipedia (pb), Deformed (Dfd), Sex combs reduced (Scr) y Antennapedia (Antp), mientras que el BX-C está conformado por los genes Ultrabithorax (Ubx), abdominal A (abd-A) y Abdominal B (Abd-B) como se muestra en la Figura 2.

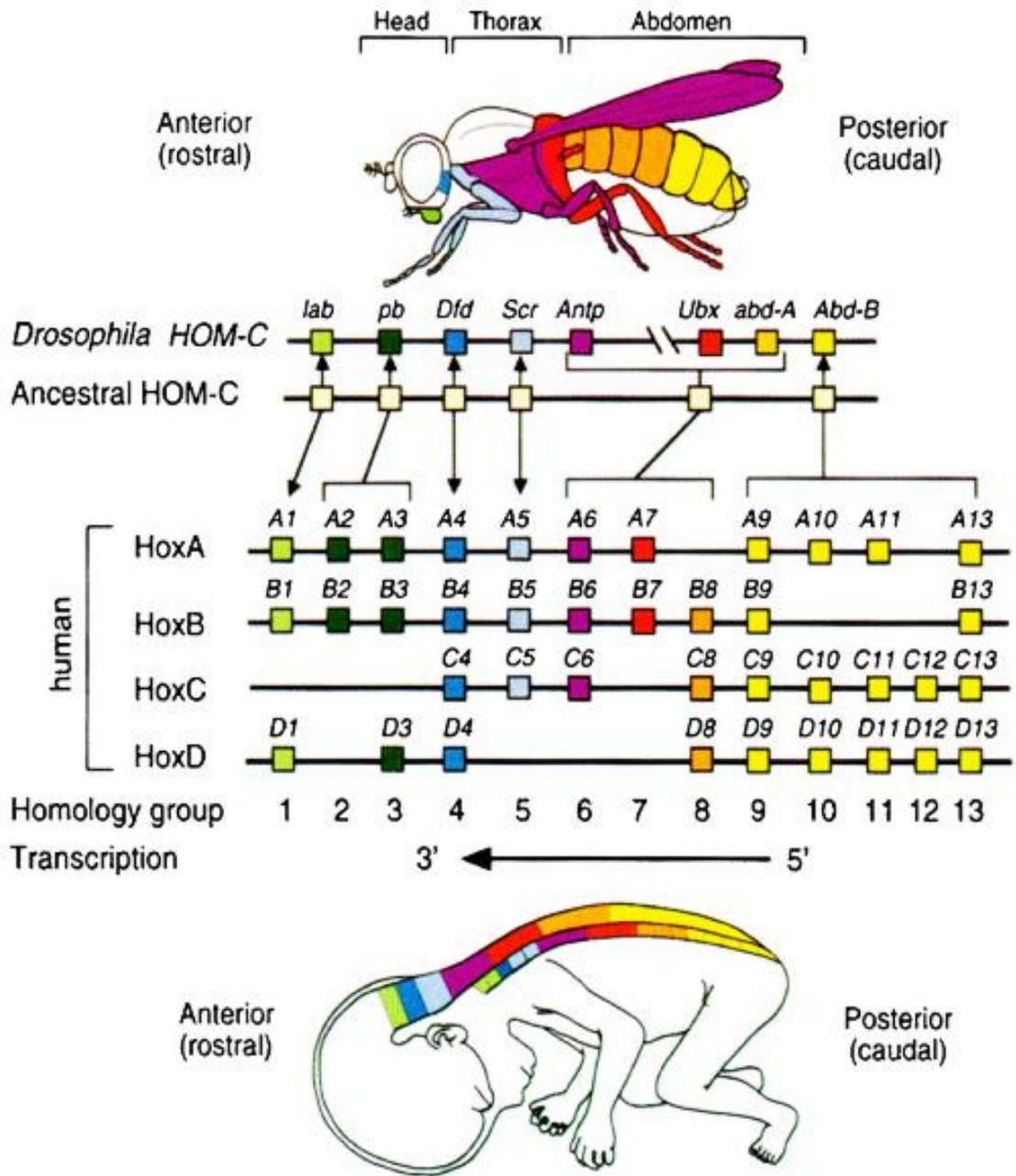


Figura 2. Los genes homeóticos se agrupan en los complejos ANT-C y BX-C. El diagrama muestra el agrupamiento de los genes Hox en el ANT-C y en el BX-C. Los genes Hox se muestran en código de colores para evidenciar su orden en el HOM-C que es coextensivo con el segmento del cuerpo en el que se expresan, característica denominada “colinealidad”. La figura muestra además los ortólogos y parálogos de los genes Hox en humano, evidenciando su conservación, su posición en el genoma y el aumento de parálogos en humano. Tomado de Domsch et al., 2015; Horabin, 2013

Los genes homeóticos tienen una organización distintiva en el genoma, en la cual el orden de los genes dentro de los complejos corresponde a algunos aspectos de su expresión. A esta característica se le conoce como colinealidad. Se han descrito tres tipos de colinearidad en estos genes: La colinealidad espacial, la cual se refiere a que el orden en el que estos genes son expresados a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo es el mismo al orden de su posición en el cromosoma (Figura 2) (Lewis, 1978); La colinealidad temporal (que ocurre principalmente en vertebrados) se refiere a que los genes que están ubicados hacia el extremo 3' del clúster son activados primero y luego, progresivamente son activados los genes que se ubican hacia el extremo 5' (Dolle et al., 1989); La colinealidad cuantitativa se refiere a que la proximidad al potenciador determina los niveles de expresión de un gen, de manera que mientras más cercano esté un gen al potenciador su expresión será más alta (Kmita et al., 2002; Spitz et al., 2003).

Posterior a su descubrimiento y caracterización, la tecnología del DNA recombinante permitió aislar y secuenciar los complejos BX-C y ANT-C mediante caminata y salto cromosómicos (Bender et al., 1983; Garber et al., 1983) y estos estudios permitieron encontrar que estos genes tienen una secuencia codificante en el extremo 3' conservada a nivel de aminoácidos en *Antp*, *ftz* y *Ubx* (Scott & Weiner, 1984). La secuenciación de esta región de homología permitió el descubrimiento de un segmento de DNA altamente conservado de 180 pares de bases (pb) denominado "homeobox" o caja homeótica, que al utilizarse como sonda se encontró que está presente en otras regiones de los complejos homeóticos, así como otros organismos invertebrados y vertebrados, incluyendo al humano (McGinnis et al., 1984). Mientras que en los organismos invertebrados existe solamente un grupo de genes homeóticos, a través de la evolución se han llevado a cabo duplicaciones genómicas en vertebrados de manera que éstos contienen parálogos de genes *hox* que varían en número dependiendo del taxón (Figura 2).

3.2 Homeoproteínas

El producto de los genes homeóticos son las homeoproteínas. Estas tienen funciones clave en el desarrollo embrionario, por lo cual tienen una presión selectiva que las conserva a lo largo de todo el reino animal (McGinnis et al., 1984). Las homeoproteínas son factores transcripcionales que regulan la unión de la maquinaria basal

de transcripción a sus sitios regulatorios correspondientes, permitiendo la expresión de genes realizadores (Felipe, García, & Larios, 2003). Se caracterizan por poseer un dominio de 60 aminoácidos altamente conservado denominado homeodominio (HD), el cual es codificado por la caja homeótica u “Homeobox”. El homeodominio es un dominio de unión al DNA que se une al surco mayor en secuencias ricas en Timina y Adenina con una secuencia consenso TAAT. Se pliega en forma de 3 a-hélices conectadas por bucles cortos y un brazo N-terminal sin plegamiento específico. La primera hélice se conforma desde el residuo 10 al 22, la segunda del 28 al 38 y la tercera del 42 al 59. (Vella, 1992) Las primeras dos hélices se pliegan en un motivo estructural hélice-asa-hélice y la tercera se encarga de la unión del homeodominio al sitio de reconocimiento interaccionando con el surco mayor del ADN, lo cual se logra por medio de los residuos conservados Ile47, Gln50, Asn51 y Met54 como se muestra en la Figura 3 (Ortiz-Lombardia, Foos, Maurel-Zaffran, Saurin, & Graba, 2017).

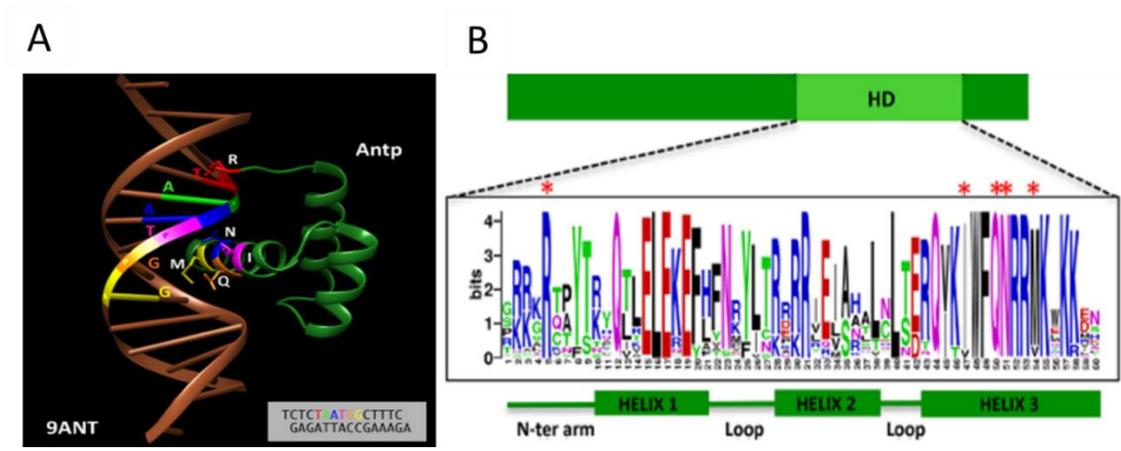


Figura 3. El Homeodominio de las homeoproteínas. El HD se pliega en 3 a-hélices. Las letras blancas indican los residuos involucrados en interacciones base- específicas, tanto en el surco menor con un residuo de arginina (R) del brazo N-terminal del HD o en el surco mayor con los residuos Ile (I), Gln (Q), Asn (N) y Met (M) de la tercer hélice. Los residuos de unión al DN están altamente conservados en todos los HD (asteriscos rojos) lo que resulta en una preferencia de unión al DNA similar. En la figura se ilustra la interacción HD-DNA de la homeoproteína Antp al interaccionar con la secuencia TAATGG. El número de acceso PDB y la secuencia utilizadas para esta ilustración se muestran en las esquinas inferior izquierda y superior derecha de la imagen, respectivamente. Los pares de bases que interaccionan con los residuos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54 se muestran en un código de colores. Tomado de Ortiz-Lombardia et al., 2017.

3.3 Paradoja Hox

Como se ha descrito anteriormente, el HD es un dominio de unión al DNA altamente conservado que es responsable de reconocer secuencias cortas, ricas en Timina y Adenina (TAAT, por ejemplo) (Gehring et al., 1994). Se ha observado que presenta una afinidad de unión muy alta y una especificidad muy baja (Merabet & Mann et al., 2016) ya que tiene capacidad de unirse a secuencias muy similares *in vitro* como TAAT y TTAT (Noyes et al., 2008), razón por la cual es paradójico que estos factores transcripcionales con gran similitud en su dominio de unión al DNA y que reconocen secuencias tan similares y altamente distribuidas en el genoma puedan regular distintos sets de genes para dar origen a diferentes apéndices en el cuerpo de los organismos de forma precisa, a este cuestionamiento se le conoce como paradoja Hox (Figura 4) (Prince et al., 2002; Hueber & Lohman, 2008).

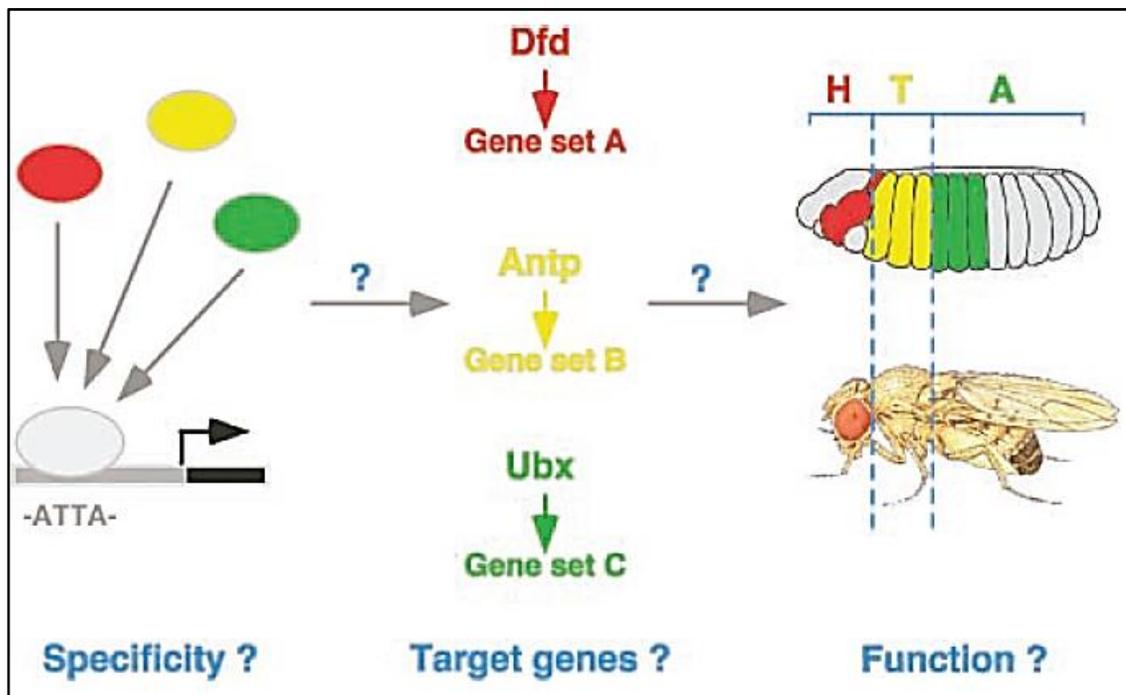


Figura 4. Representación esquemática de la Paradoja Hox. Las homeoproteínas son capaces de reconocer secuencias cortas, similares y muy frecuentes en el DNA con una afinidad alta. Esto ha llevado a preguntarse cómo es que estos factores transcripcionales pueden regular distintos sets de genes de manera específica llevando al desarrollo de distintos apéndices en los distintos segmentos del eje antero-posterior en los organismos. Tomado de Hueber & Lohmann, 2008

Diversos estudios se han enfocado en tratar de elucidar cuales son los mecanismos que le confieren a las homeoproteínas su especificidad de unión y con ello su especificidad funcional. Al principio, en la década de 1990 se propusieron tres posibles mecanismos por los cuales las homeoproteínas podrían adquirir especificidad de unión al DNA. Se planteó que la diferencia en la afinidad de las proteínas y el sitio de unión debería ser exclusivamente debida a la secuencia del homeodominio o por otras partes de la proteína que puedan alterar la estructura del homeodominio y con ello su especificidad (Fig. 5A); Se propuso también que la interacción DNA-HD es debida a la unión de proteínas que actúan como cofactores incrementando la afinidad y/o especificidad involucrada en esta unión (Fig. 5B); y la última propuesta considera que la actividad de la homeoproteína depende de su conformación y su conformación depende de la secuencia del sitio de unión de las proteínas, alterando la habilidad de unión de estas mismas y por consiguiente afectando la transcripción (Fig. 5C) (Hayashi & Scott, 1990).

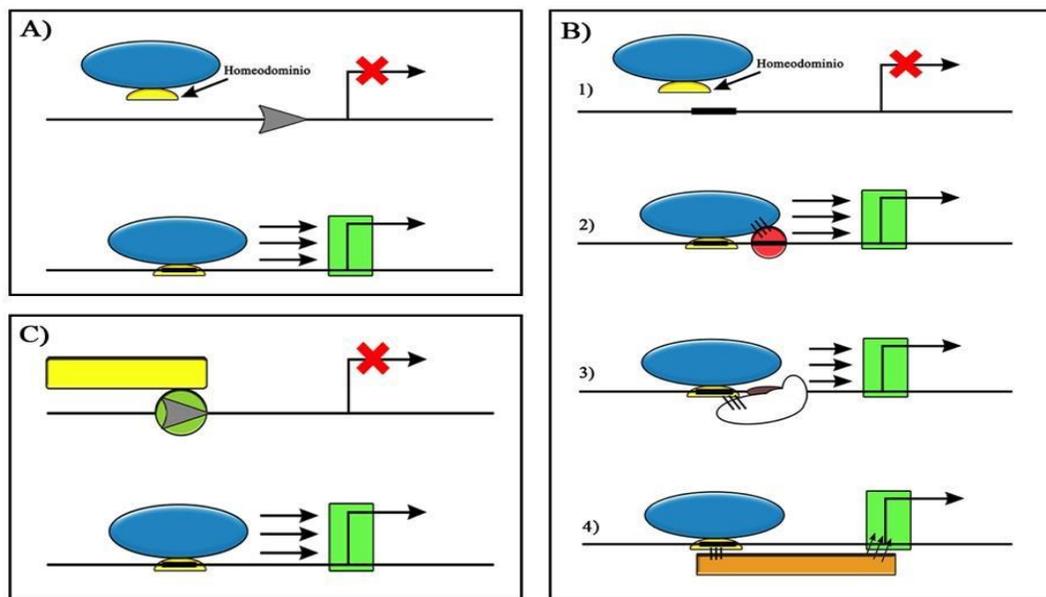


Figura 5. Modelos de la especificidad de las homeoproteínas. En la imagen se esquematizan tres posibles mecanismos que determinan la especificidad de las homeoproteínas. A) La afinidad de las homeoproteínas es el resultado de la actividad del promotor, B) la afinidad y especificidad de las proteínas, no solo se relaciona con la interacción DNA-HD, más bien involucra a otros factores que influyen en este complejo participando como cofactores y C) El sitio de unión tiene la capacidad de cambiar la conformación proteica del HD, y de esta manera se ve alterada su habilidad en la interacción con el DNA afectando la transcripción génica. Tomado y modificado de Jimenez-Mejia, 2018

La propuesta de Hayashi & Scott (1990) de que la especificidad de las homeoproteínas podría deberse a su interacción con otras proteínas como cofactores ganó relevancia con la observación de que una reducción en la función del gen *extradenticle* causa transformaciones homeóticas similares a las observadas debido a mutaciones en los genes *Hox*, proponiendo que su producto génico podría afectar la especificidad de las homeoproteínas (Peifer & Wieschaus, 1990). Aunado a esto, debido a que *Extradenticle* (*Exd*) es una proteína con homeodominio, se sugirió que podría tener función como factor transcripcional y que podría interactuar con las homeoproteínas en la regulación de la expresión génica (Rauskolb et al., 1993; Rauskolb & Wieschaus, 1994) demostrándose posteriormente mediante el uso de un sistema de Y2H que *Exd* interactúa con las homeoproteínas y que además el motivo YPWM (tirosina-prolina-triptófano-metionina) es importante para esta interacción (Johnson et al., 1995). La interacción de *Exd* con diversas homeoproteínas fue demostrada mediante cristalografía de rayos X a finales de 1990 (Figura 6) (Passner et al., 1999; Piper et al., 1999; LaRonde-LeBlanc & Wolberger, 2003).

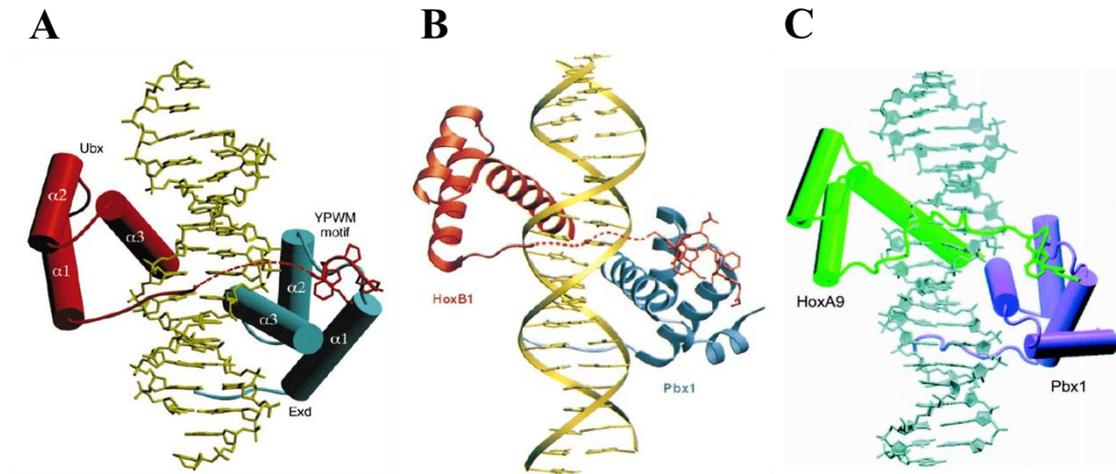


Figura 6. Interacción dimérica entre Hox y Exd. A) Se observa el complejo ternario Ubx-Exd-DNA. El diagrama muestra los HDs de Ubx (rojo) y Exd (Cian) unidos en tándem en caras opuestas del DNA (amarillo). La línea punteada representa el linker desordenado entre el HD de Ubx y su motivo YPWM, el cual se inserta en el pocket hidrofóbico en la superficie del HD de Exd. B) Se muestra el diagrama de interacción de HoxB1 y Pbx1 (ortólogo de Exd) unidos al DNA. El motivo YPWM de HoxB1 que está concetado al brazo N-terminal de su HD por un linker flexible interactúa con el dominio de unión al DNA de Pbx. C) Se muestra el complejo HoxA9-Pbx-DNA. HoxA9 es mostrado en color verde y Pbx en azul. El linker y el motivo YPWM de HoxA9 ocupan el surco menor del DNA y el triptófano se muestra insertado en el binding pocket de Pbx. Tomado de Passner et al., 1999; Piper et al., 1999; LaRonde-LeBlanc & Wolberger, 2003

El descubrimiento de la interacción de las homeoproteínas con el cofactor Exd podría explicar la paradoja Hox ya que se ha observado que la formación de estos dímeros potencia la especificidad en el DNA comparado con su forma monomérica (Chan et al., 1994; van Djirk & Murre, 1994; Johnson et al., 1995; Chang et al., 1996; Shen et al., 1996; Neuteboom & Murre, 1997). Sin embargo, esta interacción no explica completamente como es que las homeoproteínas seleccionan estos sitios de unión dimérica Hox-Exd. Diversos estudios realizados con quimeras Hox han encontrado que el brazo N-terminal del HD es importante para su especificidad (Mann, 1995; Mann & Morata, 2000; Chauvet et al., 2000; Zhao & Potter., 2002). Se realizó un estudio en el que no solo se analiza la interacción Hox-Exd en su especificidad al DNA sino que además se encuentra que los residuos de la región enlazadora entre el HD y el motivo YPWM seleccionan entre los sitios de unión Hox-Exd mediante diferencias en estructura y potencial electrostático en el surco menor, de manera que aun cuando un dímero pueda unirse a múltiples sitios de reconocimiento Hox-Exd, solo pueda posicionarse firmemente a las secuencias que le permitan al brazo N-terminal introducirse al surco menor (Joshi et al., 2007). En concordancia con esto, experimentos *in vitro* han demostrado que las homeoproteínas reconocen sus sitios de unión con la misma afinidad, pero su especificidad de unión con diversos sitios de reconocimiento incrementa al interaccionar con el cofactor Exd “especificidad latente” (Figura 7) (Slattery et al., 2011; Merabet & Mann, 2016).

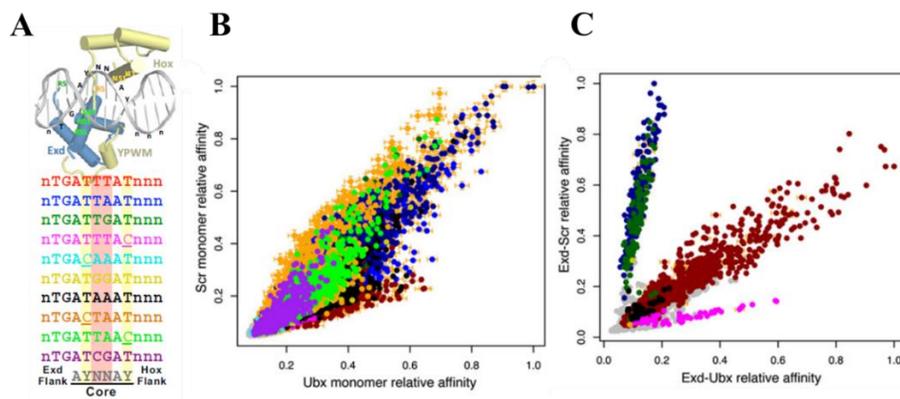


Figura 7. Especificidad latente en las homeoproteínas. A) Se muestra en un código de colores las secuencias de los sitios de unión Hox utilizados en el análisis. B) Dos homeoproteínas diferentes (Ubx y Scr) pueden unirse a los mismos sitios de unión con la misma afinidad. C) Las mismas homeoproteínas, al estar unidas al cofactor Exd presentan una afinidad distinta por diferentes secuencias. Tomado y modificado de Slattery et al., 2011

Posteriormente, después de todos los estudios concernientes a elucidar cuáles son los mecanismos que brindan especificidad de unión de las homeoproteínas con el DNA, en 2015 se encontró que en los potenciadores que regulan genes blanco de homeoproteínas hay sitios de unión homotípicos de Hox-Exd y que no todos estos sitios de unión tienen una secuencia eficiente, sino que conforman sitios de unión de baja afinidad, que juegan un papel importante en la especificidad de unión (Crocker et al., 2015). Por otra parte, si bien se ha encontrado que los sitios de unión de homeoproteínas están ampliamente distribuidos en el genoma, y que además las homeoproteínas interactúan con el DNA con cofactores (Extradenticle y Homotorax) de forma dimérica y trimérica, existe evidencia de que el mismo trimero Hox-Exd-Hth puede activar o reprimir distintos genes, según el módulo de regulación en cis (CRM) en el que se encuentre. Un caso recientemente estudiado es el de AbdA-Exd-Hth que al unirse al CRM DCRE reprime la transcripción, pero cuando se une al RhoA la transcripción se activa. En este estudio se determinó que la unión específica del trimero Hox-Exd-Hth no es suficiente para dictar la respuesta transcripcional, sino que los factores transcripcionales que se unen al mismo CRM son quienes definen el resultado (Zandvakili et al., 2019). De esta manera, se puede concluir que aunque la interacción de Hox con cofactores decide en buena medida la especificidad de unión al DNA, existen muchos sitios de unión Hox-Cofactor ampliamente distribuidos en el genoma, por lo cual la interacción de TFs adicionales es necesaria para regular la respuesta transcripcional (Figura 8).

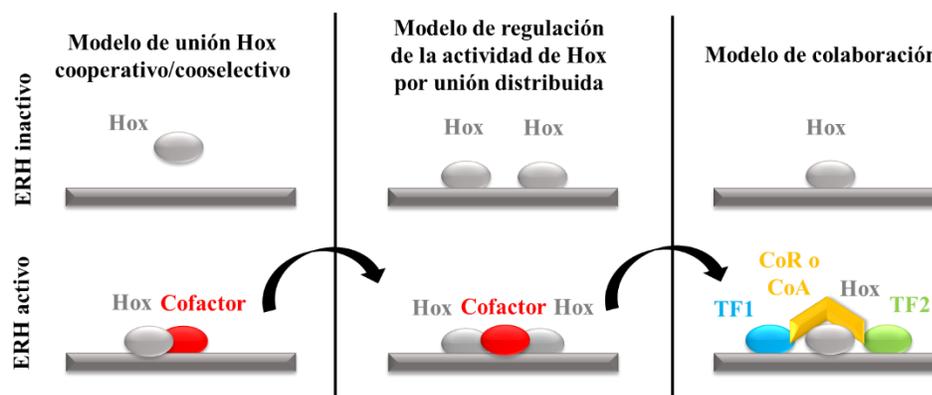


Figura 8. Modelos de regulación Hox. En el modelo de unión cooperativa/coselectiva la interacción Hox-Exd ayuda a lograr especificidad de unión al DNA. El modelo de regulación por unión distribuida asume que las homeoproteínas se unen muchos sitios de regulación de manera que la unión de Exd a las homeoproteínas pueda cambiar el estado activado-reprimido y viceversa. En el modelo de colaboración la unión Hox-Exd explica la especificidad a las homeoproteínas pero no explica la regulación, de manera que debe haber otros TFs que le permitan mediar la activación o represión contexto-específica de los genes blanco. ERH = Elemento de Respuesta a Hox. Tomado de Hueber & Lohmann, 2008

3.4 Interactoma Hox

Aunque se han descrito distintos mecanismos en los que las homeoproteínas regulan la transcripción, todos tienen en común que estos TFs presentan interacción proteína-proteína con otros TFs o con otros elementos involucrados en la regulación transcripcional, de manera que elucidar el interactoma Hox se ha vuelto una tarea elemental en el estudio de la regulación transcripcional durante el desarrollo. A partir de la descripción de Exd como cofactor, se ha descrito su interacción con homeoproteínas como Ubx, Abd-A, Scr, Ftz, entre otras (Ryoo & Mann, 1999; van Dijk & Murre, 1994; Brouns et al., 1993; Chan, Jaffe, Capovilla, Botas, & Mann, 1994; Johnson et al., 1995). Incluso se han descrito interacciones entre homeoproteínas, como la interacción de Engrailed con Ubx y AbdA, la interacción de Antp con Ubx, Scr o AbdB, o incluso la homodimerización de Scr (Elizondo-Rodríguez, 2016; Villarreal-Puente, 2015; Cárdenas-Chávez, 2012; Gebelein & Mann, 2007; Papadopoulos et al., 2012). Debido a la relevancia que tienen las interacciones proteína-proteína en la regulación de Hox, se han realizado diversos estudios en los que se demuestra la interacción entre homeoproteínas con distintos elementos involucrados en la regulación de la transcripción como (Figura 9).

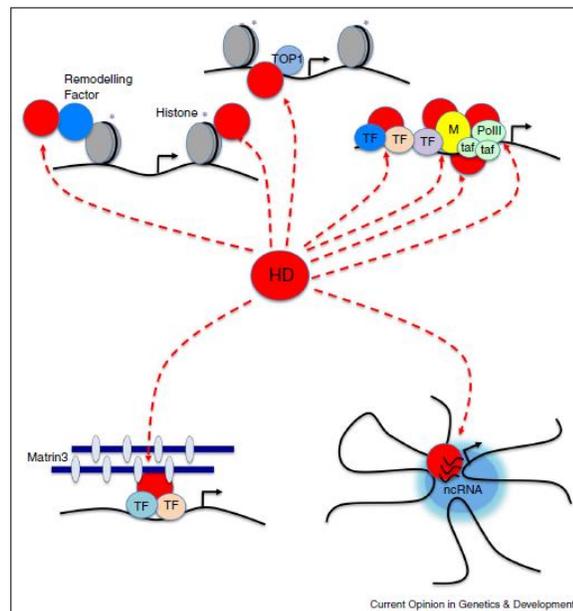


Figura 9. Las homeoproteínas presentan una gran multiplicidad de interacciones. El control de la expresión génica mediado por homeoproteínas se basa en interacciones específicas con marcas de histonas, complejos remodeladores de la cromatina, topoisomerasa I, varios tipos de proteínas de unión al DNA (TFs tejido/sitio-específicos, proteínas del complejo Mediador, GTFs, DNA pol II), proteínas de matriz (Matrin 3) y RNAs no codificantes (ncRNA). Estas interacciones resultan en la activación o represión génica. Tomado de Bobola & Merabet, 2017

Para que los factores transcripcionales puedan acceder a sus sitios de unión en regiones compactas en la cromatina, es necesario el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina (Zaret & Mango, 2016). Se ha demostrado que homeoproteínas de la clase ANT-C, así como miembros de la superclase TALE, pueden inducir la modificación de la cromatina para regulación de genes específicos (Agelopoulos, McKay, & Mann, 2012; Beh et al., 2016). Una vez que las homeoproteínas tienen acceso al genoma pueden regular la transcripción de genes efectores interaccionando directa o indirectamente con los componentes fundamentales para la expresión de genes (Choe, Ladam, & Sagerström, 2014). Existe evidencia de que la interacción entre homeoproteínas y el complejo Mediador, específicamente Ubx y AbdA con la subunidad Med19 (Boube et al., 2014) así como su interacción con el factor de pausa de la polimerasa M1BP y su implicación en la regulación transcripcional (Zouaz et al., 2019).

Estudios *in vitro* han demostrado la interacción de Antp y AbdB con TFIIE β a través del HD (Zhu & Kuziora, 1996). Sin embargo, la primera liga directa entre Hox y la maquinaria basal de transcripción se encontró al describir la interacción entre Antp y BIP2 a través de su motivo YPWM y que además esta interacción es relevante en el desarrollo de *D. melanogaster* (Prince et al., 2008). Mas recientemente, en un esfuerzo por elucidar parte del interactoma Hox *in vivo*, se observó que existe interacción entre Antp, Scr, Ubx y Abd-A con el factor TFIIE β , utilizando la técnica BiFC en embriones de *D. melanogaster* (Baëza et al., 2015; Altamirano-Torres et al., 2018). Existe evidencia también de que la homeoproteína represora Msx2 interacciona con las subunidades RAP74 y RAP30 de TFIIF a través de los residuos 132-148 ubicados río arriba del homeodominio (Newberry et al., 1997). Adicionalmente, también se ha descrito que otros factores transcripcionales involucrados en el desarrollo presentan interacciones con GTFs, como en el caso de Krüppel (Kr), el cual al estar en forma de monómero interacciona con TFIIB y activa la transcripción, mientras que cuando está en forma de dímero interacciona con TFIIE β resultando en la represión de la transcripción (Sauer et al., 1995) o bien fushi tarazu, que a través de su dominio de activación rico en glutaminas interacciona con el extremo N-terminal de TFIIB (Colgan et al., 1993 y 1995).

Debido a lo anterior, se ha propuesto que aunque las homeoproteínas interactúan con distintos factores y pueden tener distintos mecanismos para regular la transcripción, pueden funcionar como elementos de regulación a distintos niveles (Figura 10).

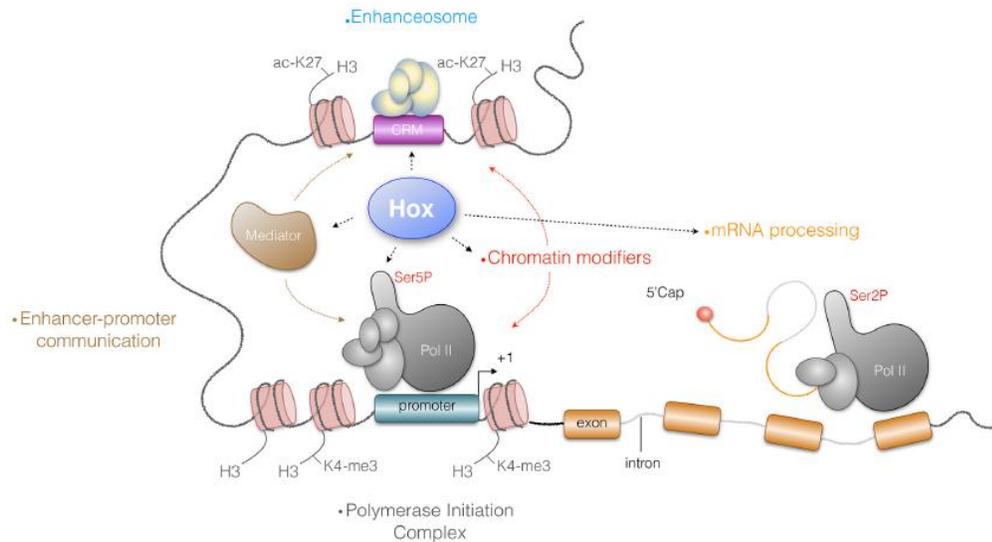


Figura 10. Las homeoproteínas regulan la expresión génica en diferentes niveles. Las homeoproteínas están involucradas en diversos pasos en la regulación génica. En primera instancia pueden interactuar con complejos remodeladores de la cromatina, que les permita acceder, reconocer y activar distintos CRMs específicos, ensamblar y activar complejos transcripcionales en el promotor, servir como punto de anclaje del complejo Mediador en la comunicación potenciador-promotor o incluso están involucradas en el procesamiento del mRNA. Tomado de Carnesecchi et al., 2018

3.5 Interacción TBP-Hox

La proteína se unió a la caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés) participa en la transcripción por las tres RNA polimerasas en eucariotas (Hernandez, 1993; Akhtar & Veenstra, 2011), conforma el complejo TFIID (Dymlacht et al., 1991) y su función es unirse al DNA mediante el reconocimiento de la secuencia consenso TATA (TATAa/tAa/t) ubicada 25-35 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de algunos promotores, uniéndose al surco menor del DNA y provocándole una deformación (Nikolov et al., 1996).

El extremo C-terminal de TBP está altamente conservado entre los eucariotas (Hoffmann et al., 1990) y el extremo N-terminal, aunque es divergente entre los organismos en general (Hernandez, 1993; Zhou et al., 1993; Nikolov et al., 1996), muestra cierto grado de conservación en su estructura, particularmente en vertebrados (Bondareva & Schmidt, 2003). El extremo C-terminal tiene en su secuencia dos dominios que son

responsables de su interacción con el DNA (DR1 y DR2), así como una región entre ambas regiones, conocida como repetición básica (RB) (Horikoshi et al., 1990; Hernandez, 1993; Nikolov et al., 1996), mientras que el extremo N-terminal de TBP se caracteriza por tener un homopéptido de glutaminas (Q) (Bonadeva & Schmidt, 2003; Thomas & Chiang, 2006).

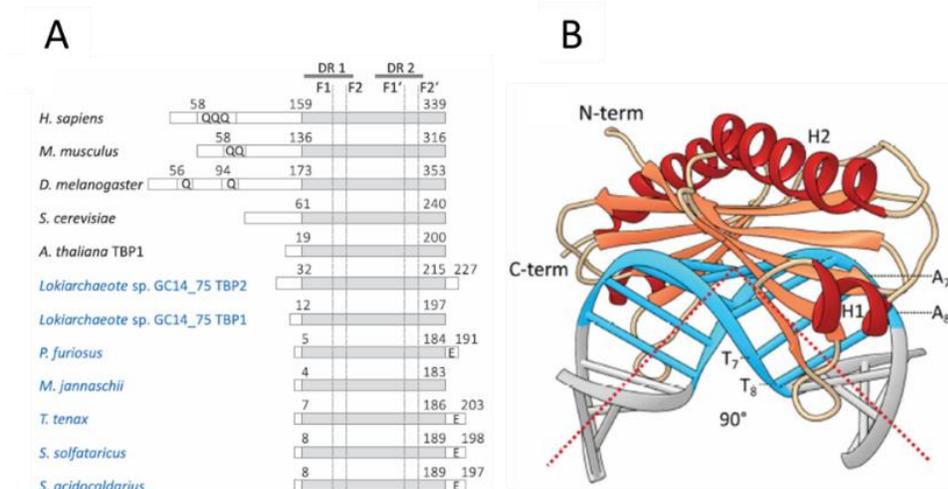


Figura 11. Estructura de la proteína de unión a la caja TATA. A) Se esquematiza un alineamiento de la estructura primaria de TBP. El extremo C-terminal está altamente conservado entre las especies, mientras que el extremo N-terminal muestra alta variabilidad, aunque tiene cierto grado de conservación entre vertebrados. B) La figura muestra la estructura tridimensional del extremo C-terminal posicionado en el DNA. Tomado de Kramm et al., 2019

Se ha reportado que el extremo N-terminal de TBP, el cual contiene el homopéptido de glutaminas, es requerido para la activación de la transcripción por Sp1 (Peterson *et al.*, 1990; Seipel *et al.*, 1993; Lescure *et al.*, 1994) lo que podría indicar que el extremo N-terminal es mediador de la interacción con otros factores transcripcionales. Se ha hipotetizado incluso que el mecanismo de transcripción ha evolucionado y ha ido necesitando de la interacción de más proteínas como nuevos medios de interacción con otras proteínas y el extremo N-terminal funciona como un puerto de interacción, similar a un TAF unido covalentemente a TBP, de manera que está disponible para interaccionar con otras proteínas reguladoras de la transcripción, como se muestra en la Figura 12 (Hobbs *et al.*, 2002).

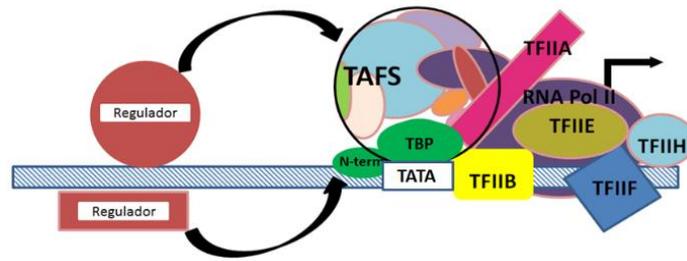


Figura 12. Modelo de la estructura del complejo de preiniciación de la transcripción y sus proteínas reguladoras. El diagrama muestra un modelo hipotético de la manera en que los reguladores transcripcionales pueden interaccionar con el TFIID, ya sea a través de la interacción con las TAFs o mediante el extremo N-terminal de TBP. Tomado y modificado de Hobbs et al., 2002

Existe evidencia de que TBP presenta interacciones con homeoproteínas. La homeoproteína murina Msx1 establece interacción con TBP a través del brazo N-terminal del HD y se ha encontrado que logra reprimir la transcripción (Zhang et al., 1996; Park et al., 2015). Por otra parte, también se ha reportado que homeoproteínas de la familia HD-Zip I en plantas también presentan interacciones con componentes de la maquinaria basal transcripcional como TFIIB y TBP, y además estas interacciones son relevantes en la regulación transcripcional (Capella et al., 2014). Otras proteínas con HDs pueden interaccionar con TBP, por ejemplo Pax-5 (Eberhard & Busslinger, 1999), Oct-1 y Oct-2 (Zwilling et al., 1994) o incluso la homeoproteína represora Even Skipped de *D. melanogaster* (Um, et al., 1998). Previamente en nuestro laboratorio se ha encontrado que TBP logra establecer interacción proteína-proteína con abdA a través de su HD (Benitez, 2016), así como con Antp, a través de su extremo N-terminal (Cádernas-Chávez, 2012). Específicamente, Antp interacciona con TBP a través de sus homopéptidos de glutaminas en su extremo N-terminal (Q9, Q5 y Q6) y la importancia de estos homopéptidos en su interacción con TBP es dosis-dependiente (Ovalle-Maqueo, 2015). Posteriormente, debido a la importancia que tiene el extremo N-terminal de TBP en la regulación de la transcripción, se determinó que también es importante en su interacción con Antp (Montalvo-Méndez, 2016). Debido a que se ha demostrado que las homeoproteínas logran establecer interacción con componentes de la maquinaria basal transcripcional y que estas interacciones son importantes para la regulación de la expresión génica y que además no existe suficiente información sobre la interacción de TBP con homeoproteínas en *Drosophila*, en este trabajo se pretende elucidar si TBP interacciona con otras proteínas Hox de *D. melanogaster* como Scr, Ubx y AbdB, así como determinar los dominios involucrados en estas interacciones.

4. JUSTIFICACIÓN

Drosophila melanogaster es un modelo muy utilizado para el estudio de algunos de los mecanismos que regulan la especificación celular durante el desarrollo. Aunque se conocen algunas interacciones de las homeoproteínas con cofactores o proteínas implicadas en la regulación transcripcional, aun no se comprende del todo la relación que guardan las homeoproteínas con componentes de la maquinaria basal de transcripción en la regulación de la expresión génica. Por lo que dilucidar la interacción que tiene lugar entre Hox y TBP, componente clave en el establecimiento del complejo de preiniciación, permitirá comprender más sobre la manera en que las homeoproteínas no solo adquieren especificidad, sino también la manera en que regulan el proceso de transcripción.

5. HIPÓTESIS

TBP es capaz de establecer interacción proteína-proteína con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB a través de distintos dominios funcionales.

6. OBJETIVOS

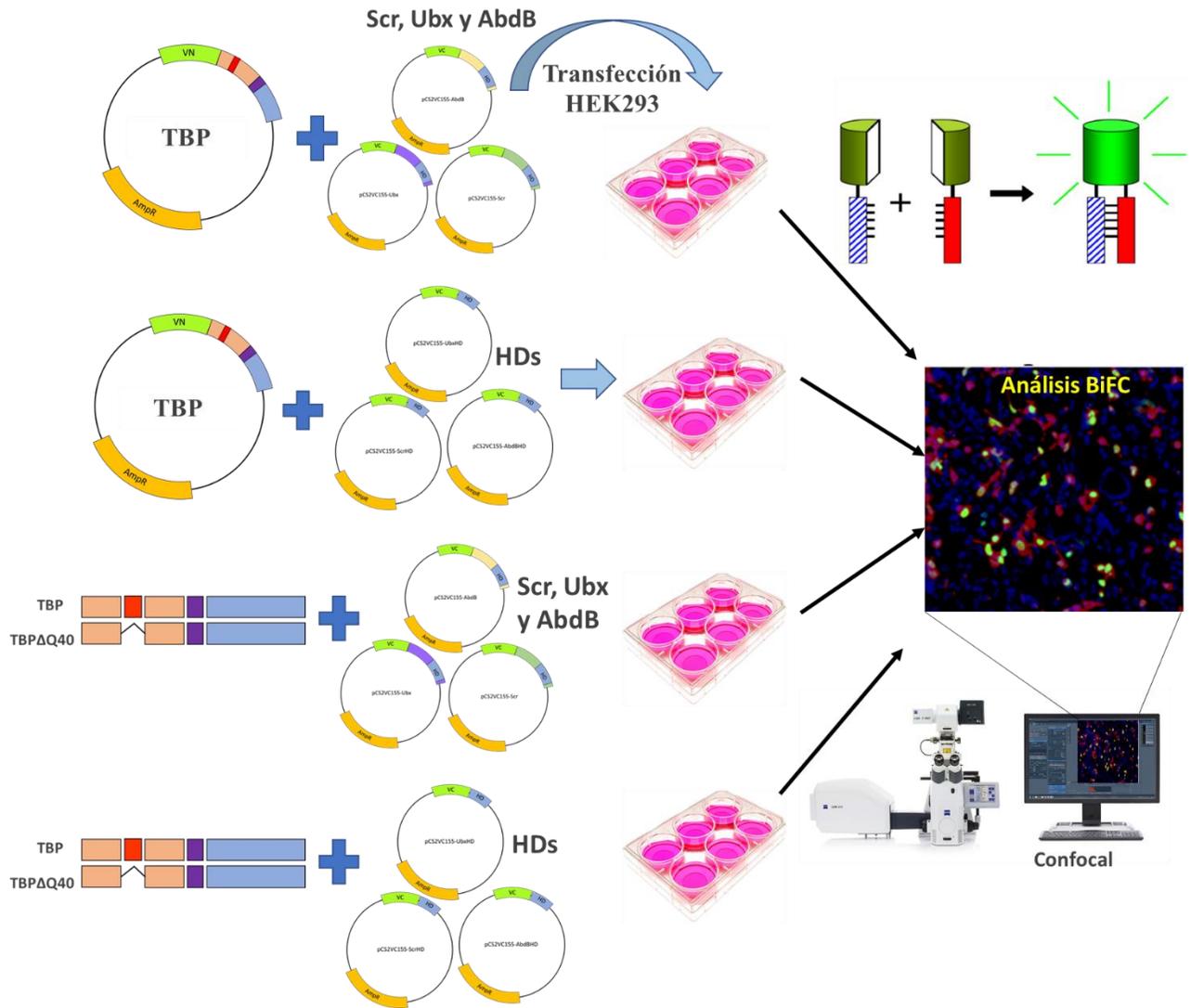
Objetivo General

Determinar si existe interacción proteína-proteína entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB así como determinar los dominios involucrados en estas interacciones.

Objetivos particulares

- Determinar si existe interacción proteína-proteína entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB.
- Esclarecer si la interacción entre homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB y TBP es mediada por el homeodominio.
- Analizar la importancia de la región rica en glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB.
- Determinar si la ausencia de la región rica en glutaminas y los dominios adyacentes al homeodominio tienen un efecto aditivo en la interacción proteína-proteína entre TBP y Scr/Ubx/AbdB

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Determinación de la interacción entre TBP y las homeoproteínas Sex combs reduced, Ultrabithorax y Abdominal-B

8.1.1 Construcción del vector de expresión pCS2VC155-Ubx

Para llevar a cabo la construcción del plásmido pCS2VC155-Ubx se realizó una subclonación de la secuencia codificante de Ultrabithorax desde el plásmido pCS2VNm9-Ubx (Villarreal-Puente., 2015) al vector pCS2VC155. Se realizó una digestión doble en ambos vectores utilizando las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI* (Thermo Scientific, USA) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Ambas digestiones se corrieron en una electroforesis utilizando un gel de agarosa de 0.8% y posteriormente se visualizó bajo luz ultravioleta. Se cortaron las bandas correspondientes al vector pCS2VC155 abierto y la secuencia de Ubx mediante un escalpelo y posteriormente el DNA fue recuperado utilizando el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) para luego realizarse la ligación de Ubx en el plásmido pCS2VC155 con la enzima T4 ligasa, siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de dicha ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α Ca⁺⁺ competentes (Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μ g de DNA). Posteriormente, se utilizaron las colonias resultantes para inocular tubos de ensayo con 3 mL de LB y 6 μ L de ampicilina [50 μ g/ μ L], se incubaron a 37°C y 180 rpm por toda la noche. Se realizó una extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina modificado (Sambrook et al., 1989). Se empaquetaron las bacterias en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mediante centrifugación para luego desechar el sobrenadante y resuspender agregando 100 μ L de Solución I (Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con RNAsa A de la marca Invitrogen a una concentración final de 0.02 mg/mL y agitando con el vortex hasta homogenizar. Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se añadieron 200 μ L de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron por inversión y se incubaron 5 min en hielo. Posteriormente se añadieron 150 μ L de Solución III (KOAc 5M, CH₃COOH), se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Después de la incubación en hielo, se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se volvió a centrifugar 10 min a 14,000 rpm y se transfirió a otro tubo. Al sobrenadante obtenido se le agregó un volumen de isopropanol

al 100% (~500 μ L), se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó 14 min a 14,000 rpm y se descarta en sobrenadante. Para lavar la pastilla de DNA resultante se agregaron 400 μ L de etanol al 70% y se centrifuga 10 min a 14,000 rpm, se extrae el sobrenadante y se repite la operación. Después de la segunda centrifugación se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 15 min para luego resuspenderla en 20 μ L de H₂O miliQ. El DNA purificado de la clona positiva fue caracterizado con las enzimas de restricción *Pst*I, *Age*I-*Xba*I, *Bam*HI-*Pst*I y *Bgl*II asegurando la incorporación de la secuencia codificante de Ubx en el plásmido pCS2VC155.

8.1.2 Propagación y caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155- AbdB y pCS2VC155-Antp

Se realizó la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes (Eficiencia $\geq 1 \times 10^6$ colonias/ μ g de DNA) utilizando 1 μ L de cada plásmido (pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155-AbdB, pCS2VC155-Antp y pCAGmCherry) [10 ng/ μ L] e incubándose 30 min en hielo. Se sometió a un choque térmico de 42°C por 1 min para luego incubarse en hielo 5 min. Después de la incubación se agregaron 200 μ L de medio LB y se incubó a 37°C por 30 min en agitación a 180 rpm para luego centrifugar durante 1 min a 10,000 rpm. Se extrajeron 200 μ L del sobrenadante y se resuspendió en los 50 μ L restantes para luego usarse como inóculo en placas de agar LB con ampicilina [100 μ g/mL] e incubarse toda la noche. Las colonias obtenidas de la transformación se utilizaron para inocular tubos de ensayo con 3 mL de LB y 6 μ L de ampicilina [50 mg/mL] y a los cultivos resultantes se les realizó una extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina modificado (Sambrook et al., 1989), como se describió anteriormente. La integridad del DNA plasmídico obtenido se verificó en una electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% y fue caracterizado con enzimas de restricción y PCR.

8.1.3 Análisis de la interacción molecular mediante la técnica BiFC en células HEK293

La técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) permite detectar la interacción entre dos proteínas en células vivas y así determinar si la interacción ocurre en un ambiente celular normal, además de determinar la localización celular de estas interacciones. Esta técnica está basada en el descubrimiento de que dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente pueden producir un complejo fluorescente y que esta asociación puede ser facilitada por una interacción entre proteínas unidas a estos fragmentos (Kerppola, 2008).

Para llevar a cabo esta técnica, se une mediante ingeniería genética la secuencia codificante del extremo N-terminal de una proteína fluorescente a una de las proteínas de interés y la secuencia que produce el extremo C-terminal a otra proteína. Posteriormente se coexpresan cada una de esas proteínas de fusión en cultivo celular de manera que si hay interacción proteína-proteína, los dos fragmentos se unen y la fluorescencia se reconstituye, como se muestra en la figura 13.

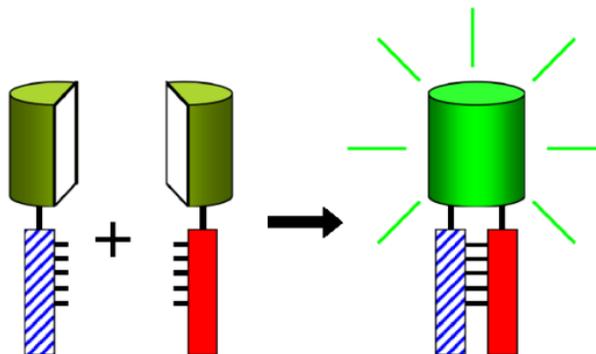


Figura 13. Esquematación del fundamento de la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente. En el diagrama los rectángulos (rojo y rayado) representan a las proteínas que van a ser analizadas y los cilindros verdes los fragmentos amino y carboxilo terminal de Venus. Las proteínas de interés van unidas a uno de los fragmentos de la proteína Venus de manera tal que si las proteínas en cuestión interactúan, los fragmentos van a acercarse entre sí dando lugar a la reconstitución de la fluorescencia de la proteína Venus que se muestra como una señal de fluorescencia. Tomado de Kerppola, 2008

La transfección de los vectores de expresión se realizó en células de epitelio renal humano HEK293 cultivadas en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de ampicilina en una atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37°C.

Se sembraron las células HEK293 72 h antes de realizar la transfección en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA) a una densidad de 1.6×10^5 células/pozo en medio DMEM pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de SFB y 1% de ampicilina en una atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37°C.

Para analizar la interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, se realizaron cotransfecciones de los plásmidos pCS2VNm9-TBP y pCS2VC155-SynthScr/ pCS2VC155-Ubx/ pCS2VC155-AbdB en la línea celular HEK293. Como control de la interacción se realizó además una cotransfección de los plásmidos pCS2VNm9-TBP y pCS2VC155-Antp, ya que se ha determinado anteriormente la interacción entre estas proteínas mediante esta técnica (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016). A las cotransfecciones para estos ensayos se les añadió además el plásmido pCAG-mCherry como control de eficiencia de transfección.

Para cada triplicado del ensayo de transfección se agregaron 6 µg de cada plásmido (VN-, VC- y Cherry) a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 300 µL de NaCl 150 mM. En un segundo tubo de 1.5 mL se agregó 1 µL de Polietilenimina (PEI) por cada µg de DNA en 300 µL de NaCl a 150 mM. Se mezclaron ambas soluciones añadiendo el contenido del segundo tubo al primero y posteriormente se incubó la mezcla durante 15 min. Se agregaron 200 µL de la mezcla a cada pozo de la placa mediante goteo suave. Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 48 h.

8.1.4 Análisis de la interacción TBP-Scr/Ubx/AbdB mediante BiFC en la línea celular HEK293

Después de la incubación se observó la señal fluorescente de las células en un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemania) utilizando un aumento de 20X. Se tomaron fotografías de tres campos en los canales de Venus (producto de la interacción de las proteínas), de Cherry (como control de transfección) y de Hoechst (que indica la localización de los nucleos) utilizando tiempos de exposición de 100 ms, 30 ms y 5 ms, respectivamente. Se realizó el procesamiento de las imágenes utilizando el software de uso libre ImageJ. Primero se convirtieron las imágenes RGB en imágenes de 8 bits, se cambió el color de verde o rojo (según el caso)

a color Fuego (Fire). Posteriormente se ajustó el brillo y contraste para eliminar el ruido de fondo y discriminar la señal fluorescente considerada como positiva. En el caso de la fluorescencia de Cherry se utilizó un rango entre 15 y 255 y en el caso de Venus se utilizó un rango de 20-255 para considerarse positivas. Posteriormente se utilizó el plug-in Cell counter para realizar el conteo de las células que presenten la fluorescencia de Cherry y de Venus en todos los campos. El porcentaje de interacción se obtuvo al dividir Venus/Cherry. Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado para conseguir un total de 9 repeticiones.

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 5.0.

8.2 Determinación del papel del homeodominio en la interacción TBP-Hox

8.2.1 Construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD

Para llevar a cabo la construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD se realizó la digestión de los vectores pCS2VNm9-UbxHD (Villarreal-Puente., 2015), pCS2VNm9-AbdBHD (Cárdenas-Chávez., 2012) y pCS2VC155 con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI* (Thermo Scientific, USA) según las indicaciones de la casa comercial. Se realizó una electroforesis de las digestiones usando un gel de agarosa de 0.8%. Las bandas correspondientes de UbxHD, AbdBHD y pCS2VC155 se recuperaron con ayuda de un escalpelo y los fragmentos de DNA se purificaron utilizando el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Se llevaron a cabo las ligaciones correspondientes para unir los fragmentos UbxHD y AbdBHD al vector pCS2VC155 en una proporción 10:1 utilizando la enzima T4 ligasa (Jena Biosciences, USA). Se transformaron bacterias *E. coli* calciocompetentes y fueron inoculadas en placas de agar con ampicilina [50µg/mL]. Las colonias resultantes de inocularon en tubos de ensayo con 3 mL de medio LB y ampicilina [100 µL/ mL] y se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook., 1989). El análisis de las clonas resultantes se realizó mediante PCR.

8.2.2 Propagación y caracterización de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-AntpHD

Los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-AntpHD (Cárdenas-Chávez., 2012), pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD fueron propagados mediante transformación de bacterias calciocompetentes como se mencionó anteriormente. Se utilizaron las colonias resultantes para inocular tubos de ensayo con medio LB con ampicilina [100µg/mL] y se incubaron toda la noche en agitación a 180 rpm. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook.,1989) modificada, como se menciona anteriormente. Una vez realizada la extracción, se procedió a cuantificar mediante espectrofotometría y a evaluar la integridad de los plásmidos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Todos los vectores fueron caracterizados mediante enzimas de restricción para asegurar su identidad. El plásmido pCS2VC155-AntpHD fue caracterizado con las enzimas de restricción *PvuII*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI* y *SmaI-StuI*. El plásmido pCS2VC155-ScrHD fue caracterizado con las enzimas de restricción *HindIII BgIII-PvuII*, *XbaI-SmaI*, *AgeI-ApaI*, *HindIII-PvuII*. El plásmido pCS2VC155-UbxHD fue caracterizado con las enzimas de restricción *SmaI*, *HindIII-PvuII*, *HindIII-KpnI*, *ApaI-AgeI*, *ApaI-SmaI*. El plásmido pCS2VC155-AbdBHD fue caracterizado con las enzimas de restricción *PvuII*, *BamHI-XbaI*, *AgeI-StuI*, *BamHI-KpnI* y *KpnI*

8.2.3 Análisis de la interacción de TBP y ScrHD, UbxHD y AbdBHD mediante BiFC en la línea celular HEK293

Para analizar el papel de los HDs en la interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, se cotransfectaron los plásmidos pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD con el vector pCS2VNm9-TBP en la línea celular HEK293, como se describió anteriormente. La interacción TBP-AntpHD sirvió como control de disminución en el porcentaje de interacción. A las cotransfecciones se les añadió además el plásmido pCAG-mCherry como control de eficiencia de transfección. La señal fluorescente de las células se observó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemania) utilizando un aumento de 20X. Se tomaron fotografías de tres campos en los canales de Venus (producto de la interacción de las proteínas) y Cherry (como control de transfección)

utilizando tiempos de exposición de 100 ms y 30 ms. Se realizó el procesamiento de las imágenes utilizando el software de uso libre ImageJ. Primero se convirtieron las imágenes RGB en imágenes de 8 bits, se cambió el color de verde o rojo (según el caso) a color Fuego (Fire). Posteriormente se ajustó el brillo y contraste para eliminar el ruido de fondo y discriminar la señal fluorescente considerada como positiva. En el caso de la fluorescencia de Cherry se utilizó un rango entre 15 y 255 y en el caso de Venus se utilizó un rango de 20-255 para considerarse positivas. Posteriormente se utilizó el plug-in Cell counter para realizar el conteo de las células que presenten la fluorescencia de Cherry o de Venus en todos los campos. El porcentaje de interacción se obtuvo al dividir Venus/Cherry. Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado para conseguir un total de 9 repeticiones. Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 5.0.

8.3 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB

8.3.1 Propagación y caracterización del vector pCS2VNm9-TBPΔQ40

El vector pCS2VNm9-TBPΔQ40 (Montalvo-Méndez., 2016) se propagó mediante transformación bacteriana como se mencionó anteriormente. Se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook., 1989) y se cuantificó mediante espectrofotometría. Posteriormente, el vector fue caracterizado mediante las enzimas de restricción *XbaI*, *BamHI*, *PstI*, *PvuII* y *StuI* para confirmar su identidad.

8.3.2 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con Scr, Ubx y AbdB

Para analizar la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en la interacción proteína-proteína con Scr, Ubx y AbdB, se cotransfectó el plásmido pCS2VNm9-TBPΔQ40 con los plásmidos pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155-Ubx y pCS2VC155-AbdB en la línea celular HEK293, como se describió anteriormente. Como control se utilizó la interacción TBPΔQ40-Antp, que muestra una reducción en el porcentaje de interacción (Montalvo-Méndez, 2016). A las cotransfecciones se les añadió además el plásmido pCAG-mCherry como control de eficiencia de transfección. Se

tomaron fotografías de tres campos en los canales de Venus (producto de la interacción de las proteínas), de Cherry (como control de transfección) y de Hoechst (que indica la localización de los núcleos) utilizando tiempos de exposición de 100 ms, 30 ms y 5 ms, respectivamente. Se realizó el procesamiento de las imágenes utilizando el software de uso libre ImageJ. Primero se convirtieron las imágenes RGB en imágenes de 8 bits, se cambió el color de verde, rojo o azul (según el caso) a color Fuego (Fire). Posteriormente se ajustó el brillo y contraste para eliminar el ruido de fondo y discriminar la señal fluorescente considerada como positiva. En el caso de la fluorescencia de Cherry se utilizó un rango entre 15 y 255 y en el caso de Venus se utilizó un rango de 20-255 para considerarse positivas. Posteriormente se utilizó el plug-in Cell counter para realizar el conteo de las células que presenten la fluorescencia de Cherry o de Venus en todos los campos. El porcentaje de interacción se obtuvo al dividir Venus/Cherry. Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado para conseguir un total de 9 repeticiones. Para el análisis estadístico de los datos, se realizará un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 5.0.

8.4 Determinación del efecto de la ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD

8.4.1 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD

Para analizar la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en la interacción proteína-proteína con ScrHD, UbxHD y AbdBHD, se cotransfectó el plásmido pCS2VNm9-TBP Δ Q40 con los plásmidos pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD en la línea celular HEK293, como se describió anteriormente. Como control en la disminución de la fluorescencia se utilizó la interacción TBP Δ Q40-AntpHD, que muestra una reducción en el porcentaje de interacción (Montalvo-Méndez, 2016). A las cotransfecciones se les añadió además el plásmido pCAG-mCherry como control de eficiencia de transfección. Se tomaron fotografías de tres campos en los canales de Venus (producto de la interacción de las proteínas) y de Cherry (como control de transfección) utilizando tiempos de exposición de 100 ms y 30 ms, respectivamente. Se

realizó el procesamiento de las imágenes utilizando el software de uso libre ImageJ. Primero se convirtieron las imágenes RGB en imágenes de 8 bits, se cambió el color de verde o rojo (según el caso) a color Fuego (Fire). Posteriormente se ajustó el brillo y contraste para eliminar el ruido de fondo y discriminar la señal fluorescente considerada como positiva. En el caso de la fluorescencia de Cherry se utilizó un rango entre 15 y 255 y en el caso de Venus se utilizó un rango de 20-255 para considerarse positivas. Posteriormente se utilizó el plug-in Cell counter para realizar el conteo de las células que presenten la fluorescencia de Cherry o de Venus en todos los campos. El porcentaje de interacción se obtuvo al dividir Venus/Cherry. Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado para conseguir un total de 9 repeticiones. Para el análisis estadístico de los datos, se realizará un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 5.0.

9. RESULTADOS

9.1 Determinación de la interacción TBP- Scr, Ubx y AbdB

9.1.1 Construcción del vector de expresión pCS2VC155-Ubx

Para generar el plásmido pCS2VC155-Ubx se llevó a cabo una subclonación a partir del plásmido pCS2VNm9-Ubx al vector pCS2VC155 utilizando las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. La Figura 14A muestra la estrategia de subclonación que se siguió para la construcción del vector pCS2VC155-Ubx. La Figura 14B muestra el gel de electroforesis de las digestiones donde se observa una banda de 1180 pb y una banda de 4354 pb que corresponden a la secuencia codificante de Ubx y el vector pCS2VC155 linearizado. Después de la subclonación, se realizó una caracterización mediante digestión enzimática utilizando las enzimas: *HindIII*, *AgeI-XbaI*, *BamHI-PstI* y *BglIII*, como se muestra en la Figura 14C.

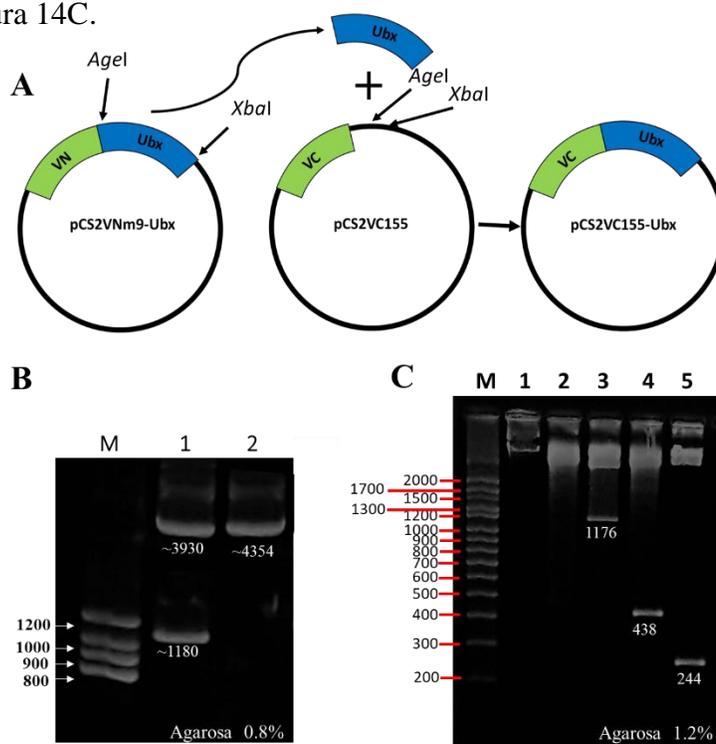


Figura 14. Construcción del vector pCS2VC155-Ubx. A) Esquematación de la estrategia para la construcción del vector pCS2VC155-Ubx. B) Se muestra el resultado de una electroforesis de la digestión de los vectores pCS2VNm9-Ubx (carril 1) y pCS2VC155 (carril 2) con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. En el carril 1 se observa que el vector libera una banda de 1180 pb correspondiente a la secuencia codificante de Ubx y en el carril 2 se observa la linearización del vector pCS2VC155 mostrando una banda de 4354 pb. C) Se observa el gel de electroforesis de la caracterización enzimática del vector pCS2VC155-Ubx (carril 1) con las enzimas de restricción *HindIII* (carril 2), *AgeI-XbaI* (carril 3), *BamHI-PstI* (carril 4) y *BglIII* (carril 5). En ambos geles el carril M corresponde al marcador de peso molecular.

9.1.2 Caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-SynthScr, pCS2VC155-Antp y pCS2VC155- AbdB

Antes de realizar los ensayos de interacción dimérica entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB también se confirmó la identidad molecular de los plásmidos pCS2VNm9TBP, pCS2VC155SynthScr, pCS2VC155Antp y pCS2VCAbdB previamente construidos y disponibles en nuestro laboratorio (Cárdenas-Chávez, 2012; Papadopoulos et al., 2012; Hernández-Ledezma, 2020) mediante caracterización enzimática. La Figura 15A muestra la caracterización del plásmido pCS2VNm9TBP con las enzimas de restricción *XbaI*, *BamHI*, *PstI*, *PvuI* y *StuI*. La Figura 15B muestra la caracterización enzimática de pCS2VC155Antp con las enzimas de restricción: *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *AgeI-StuI* y *PvuII*. La Figura 15C muestra los patrones de bandeo de la caracterización del vector pCS2VC155AbdB usando las enzimas *HindIII*, *AgeI*, *PvuII*, *BamHI-StuI* y *BamHI-XbaI*. La Figura 15D muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155SynthScr con las enzimas de restricción *AgeI-StuI*, *NdeI*, *EcoRV* y *PvuI*. En todos los casos se confirmó la identidad de las bandas obtenidas en la digestión de los vectores al comparar con caracterizaciones *in silico*.

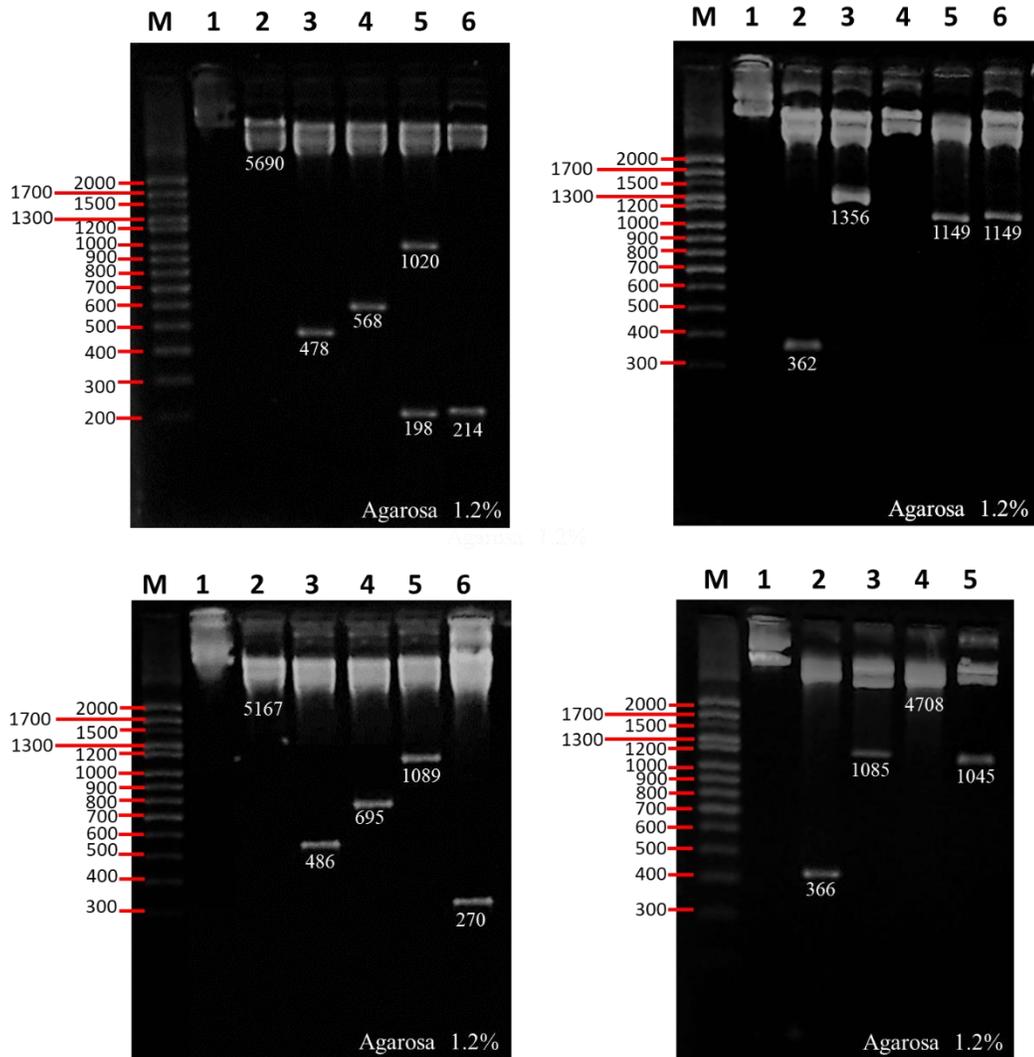


Figura 15. Caracterización de los vectores pCS2VNm9-TBP, pCS2VC155-Antp, pCS2VC155-AbdB y pCS2VC155-SynthScr. A) Se muestra el resultado de la caracterización del plásmido pCS2VNm9-TBP (carril 1) digerido con las enzimas: *Xba*I (carril 2), *Bam*HI (carril 3), *Pst*I (carril 4), *Pvu*I (carril 5) y *Stu*I (carril 6). B) El plásmido pCS2VC155-Antp (carril 1) digerido con las enzimas *Sma*I (carril 2), *Bam*HI (carril 3), *Xba*I (carril 4), *Age*I-*Stu*I (carril 5) y *Pvu*II (carril 6). C) Se muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155-AbdB (carril 1) digerido con las enzimas *Hind*III (carril 2), *Age*I (carril 3), *Pvu*II (carril 4), *Bam*HI-*Stu*I (carril 5) y *Bam*HI-*Xba*I (carril 6). D) El plásmido pCS2VC155-SynthScr (carril 1) fue digerido con las enzimas *Age*I-*Stu*I (carril 2), *Nde*I (carril 3), *Eco*RV (carril 4) y *Pvu*I (carril 5). En todos los casos se muestra el marcador de peso molecular en el carril M. En la esquina inferior derecha se muestra la concentración de agarosa utilizada.

9.1.3 TBP establece interacción proteína-proteína con Scr, Ubx y AbdB en la línea celular HEK293

Para determinar si TBP interacciona con las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB se cotransfectó el vector pCS2VNm9-TBP en diferentes combinaciones con los vectores pCS2VC155-ScrSynth, pCS2VC155-Ubx y pCS2VC155-AbdB. Como control positivo también se realizó la cotransfección con el vector pCS2VC155Antp, debido a que la interacción TBP-Antp ya ha sido previamente reportada mediante esta técnica (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016; Jimenez-Mejía, 2018). Como control interno de transfección y para el cálculo del porcentaje de interacción se cotransfectó el plasmido pCAG-mCherry, codificante para la proteína fluorescente Cherry citoplásmica. Se realizó el conteo de las células que presentan fluorescencia de Cherry, Venus y Hoescht de todos los campos para determinar la eficiencia de transfección y el porcentaje de interacción. Todos los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos del análisis de las imágenes. En el canal “Cherry” se observa la fluorescencia roja del control interno de transfección, en el canal “Hoescht” se observa el total de núcleos presentes en la monocapa de cada campo y en el canal “Venus” se observa la fluorescencia verde, que indica la reconstitución de Venus, producto de la interacción entre las proteínas de interés. La interacción TBP-Antp resultó en 77.98%, muy similar al porcentaje reportado anteriormente (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015;). Mientras que la interacción de TBP con Scr, Ubx y AbdB resultó en 70.02%, 72.39% y 94.91%, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se muestra de forma gráfica en la Figura 17.

Tabla 1. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBP-Hox				
Interacción	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	\bar{X} (σ)
TBP-Antp	86.52%	79.56%	67.85%	77.98(9.75±)
TBP-Ubx	75.62%	74.33%	60.09%	70.02(9.37±)
TBP-SynthScr	68.52%	72.03%	76.60%	72.39(5.64±)
TBP-AbdB	101.84%	100.3%	82.58%	94.91(10.98±)

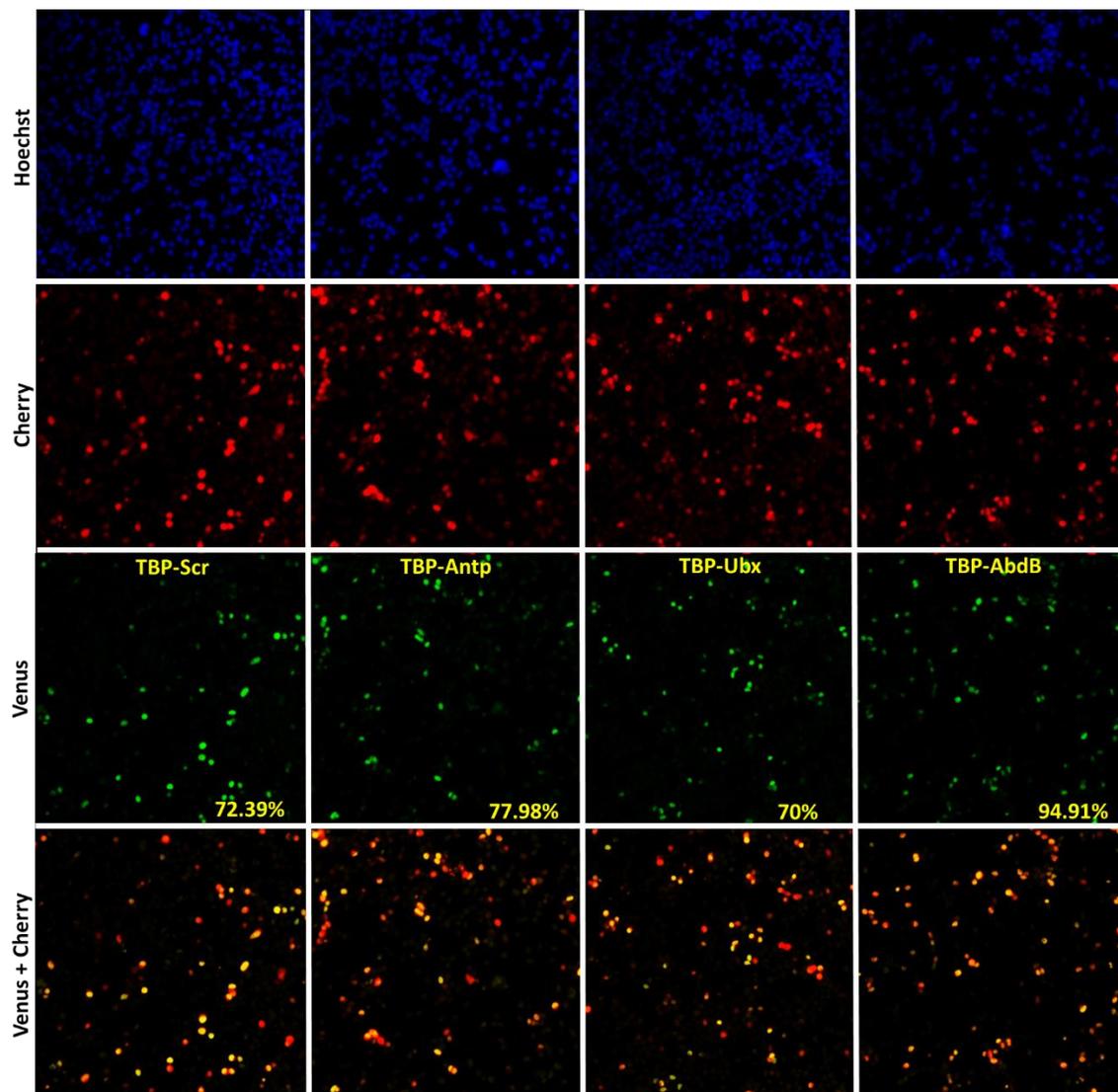


Figura 16. TBP interacta con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB. El ensayo de BiFC se realizó mediante la coexpresión de las proteínas VNTBP y VCSer/VCUbx/VCAbdB y VCAntp fue utilizada como control. El canal Cherry muestra la fluorescencia roja del control de transfección, el canal Hoescht muestra la fluorescencia azul, indicativa de viabilidad celular y el canal Venus muestra la fluorescencia verde indicativa de las interacciones entre TBP y Scr, Ubx o AbdB. La expresión de la proteína fluorescente Cherry fue empleada como control interno de transfección. En todos los casos se observa el porcentaje de interacción en la esquina inferior derecha.

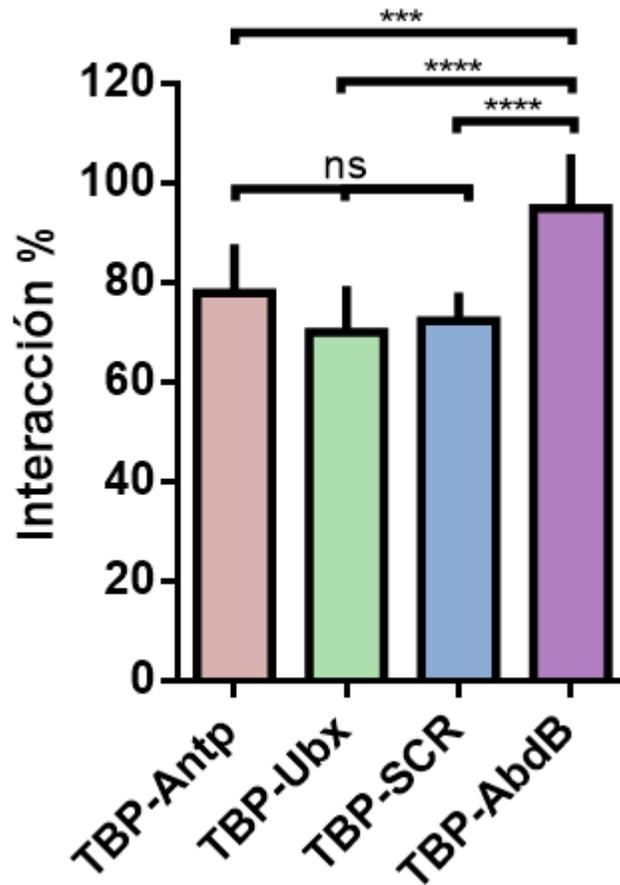


Figura 17. Análisis estadístico de la interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp. La gráfica indica los porcentajes de interacción de las interacciones entre TBP y Antp, Ubx, Scr y AbdB. En la parte superior de cada barra se muestra la desviación estándar. La significancia de la comparación múltiple de medias mediante un análisis de Tukey se muestra como ****= $p < 0.0001$, ***= $p \leq 0.001$, ns=no significativo.

9.2 Determinación del papel del homeodominio en la interacción de TBP con Scr, Ubx y AbdB

9.2.1 Construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD

Para generar los plásmidos pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD se llevaron a cabo subclonaciones a partir de los plásmidos pCS2VNm9-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD al vector pCS2VC155 utilizando las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. La Figura 18A y 18C muestran la estrategia de subclonación que se siguió para la construcción de los vectores pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD. La Figura 18B y 18D muestran los gels resultantes de la electroforesis de las digestiones donde se

observan bandas de ~200 pb y 4564 pb que corresponden a las secuencias codificantes de UbxHD, AbdBHD y el vector pCS2VNm9, así como una banda de 4354 pb que corresponde al vector pCS2VC155 linearizado.

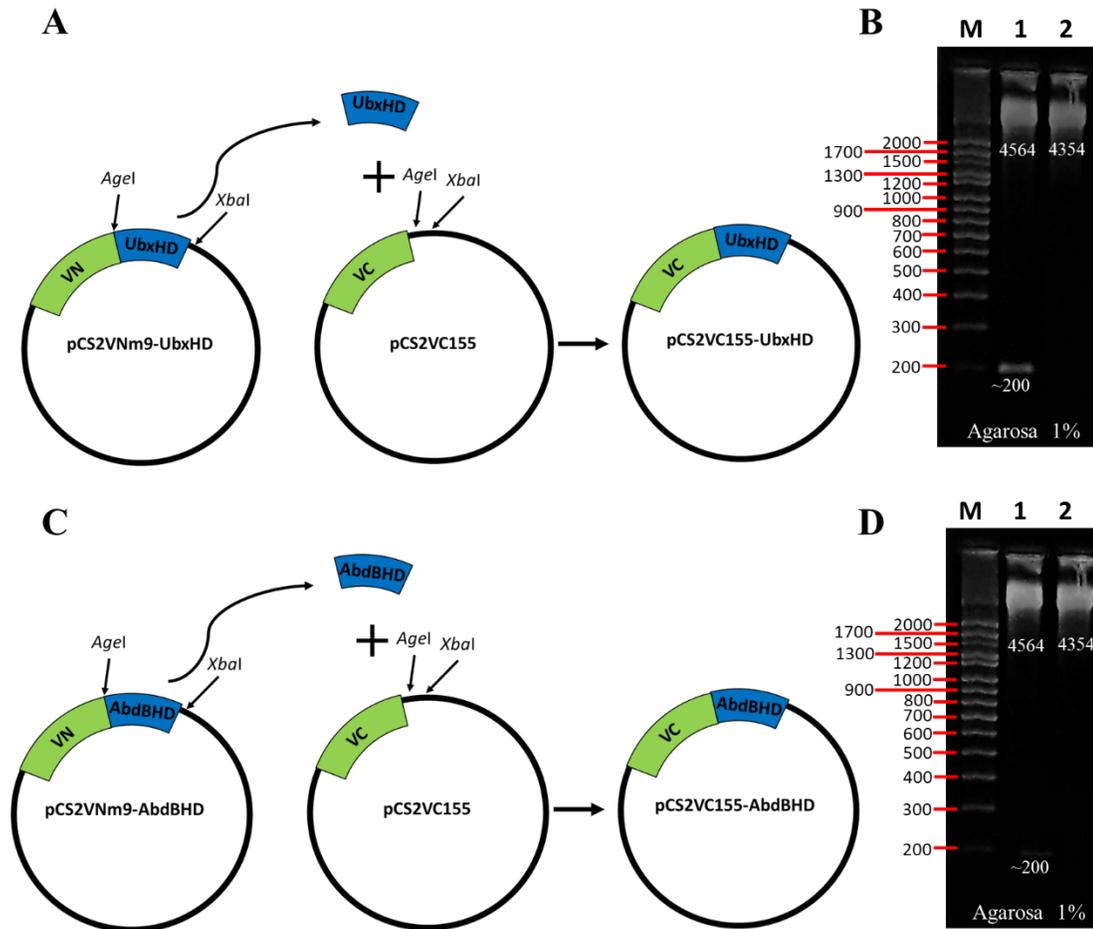


Figura 18. Estrategia de subclonación para la construcción del vector pCS2VC155-UbxHD. **A)** Se esquematiza la estrategia de subclonación que se siguió para la construcción del vector pCS2VC155-UbxHD. **B)** Se observa el resultado de una electroforesis de la digestión de los vectores pCS2VC155 y pCS2VNm9-UbxHD con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. El carril M muestra el marcador de peso molecular. El carril 1 muestra el resultado de la digestión del vector pCS2VNm9-UbxHD que libera una banda de ~200 pb. El carril 2 muestra la digestión del vector pCS2VC155 linearizado, mostrando una banda de 4354 pb. **C)** Se muestra la estrategia de la construcción del vector pCS2VC155-AbdBHD. **D)** Se observa el resultado de la digestión de los vectores pCS2VC155 y pCS2VNm9-AbdBHD con las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI*. El carril M muestra el marcador de peso molecular. El carril 1 muestra el resultado de la digestión del vector pCS2VNm9-AbdBHD que libera una banda de ~200 pb. El carril 2 muestra la digestión del vector pCS2VC155 linearizado, mostrando una banda de 4354 pb.

9.2.2 Caracterización de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD

La identidad molecular de los plásmidos pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-Antp previamente construidos y disponibles en nuestro laboratorio (Cárdenas-Chávez, 2012; Papadopoulos et al., 2012; Hernández-Ledezma, 2020) fue confirmada mediante caracterización enzimática. La Figura 19A muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155-AntpHD con las enzimas de restricción *PvuII*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI* y *SmaI-StuI*. La Figura 19B muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155-ScrHD con las enzimas de restricción: *BglII-PvuII*, *XbaI-SmaI*, *AgeI-ApaI*, *HindIII-PvuII*. La Figura 19C muestra la caracterización enzimática de pCS2VC155-UbxHD con las enzimas de restricción: *SmaI*, *HindIII-KpnI*, *ApaI-AgeI*, *ApaI-SmaI* y *PvuII-HindIII*. La Figura 19D muestra los patrones de bandeo en la caracterización del vector pCS2VC155-AbdBHD usando las enzimas *KpnI*, *BamHI-KpnI*, *AgeI-XbaI* y *PvuII*. En todos los casos se confirmó la identidad de los vectores al compararlos con las caracterizaciones *in silico*.

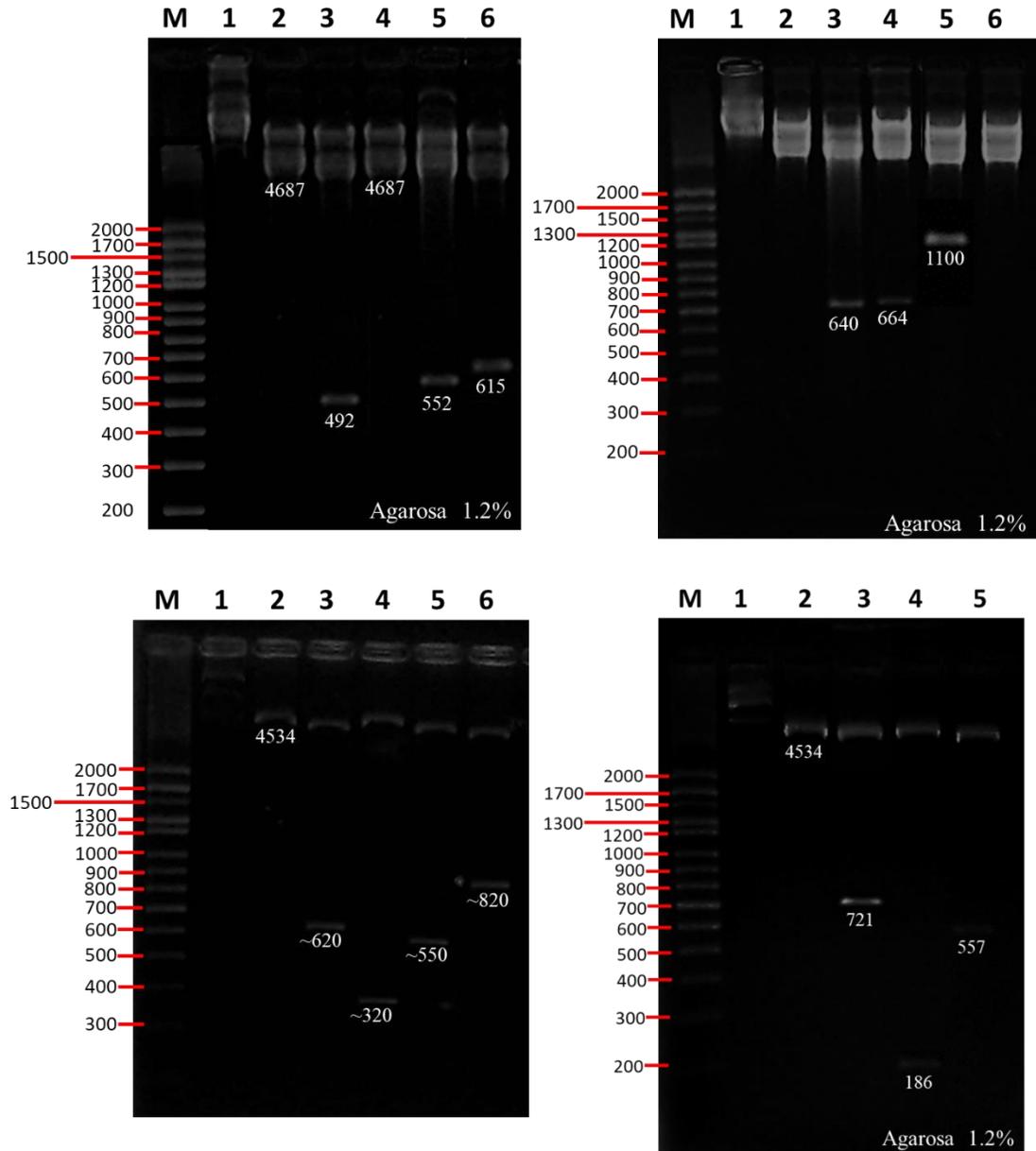


Figura 19. Caracterización enzimática de los vectores pCS2VC155-ScrHD, pCS2VC155-UbxHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-AntpHD. A) El plásmido pCS2VC155-AntpHD (carril 1) fue digerido con las enzimas *PvuII* (carril 2), *KpnI* (carril 3), *SmaI* (carril 4), *BamHI* (carril 5) y *SmaI-StuI* (carril 6). B) Se muestra el resultado de la caracterización del plásmido pCS2VC155-ScrHD (carril 1) digerido con las enzimas *BglIII* (carril 2) *BglIII-PvuII* (carril 3), *XbaI-SmaI* (carril 4), *AgeI-ApaI* (carril 5), *HindIII-PvuII* (carril 6). C) El plásmido pCS2VC155-UbxHD (carril 1) digerido con las enzimas *SmaI* (carril 2), *HindIII-KpnI* (carril 3), *ApaI-AgeI* (carril 4), *ApaI-SmaI* (carril 5) y *PvuII-HindIII* (carril 6) D) Se muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155-AbdBHD (carril 1) digerido con las enzimas *KpnI* (carril 2), *BamHI-KpnI* (carril 3), *AgeI-XbaI* (carril 4) y *PvuII* (carril 5). En todos los casos el carril M es el marcador de peso molecular. En la esquina inferior derecha se muestra la concentración de agarosa utilizada.

9.2.3 El homeodominio de Scr, Ubx y AbdB no es suficiente para establecer interacción con TBP en la línea celular HEK293

Para analizar el papel del homeodominio en la interacción de TBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, se realizó la cotransfección de los plásmidos que codifican el extremo N-terminal de la proteína Venus fusionado a TBP y el extremo C-terminal fusionado a AntpHD, ScrHD, UbxHD y AbdBHD. En todos los casos fue cotransfectado el plásmido que codifica para la proteína fluorescente mCherry, como control interno de la transfección para calcular el porcentaje de interacción. Se realizó el conteo de las células que presentan fluorescencia de Cherry, Venus y Hoescht de todos los campos para determinar la eficiencia de transfección y el porcentaje de interacción. Todos los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBP-HD				
Interacción	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	\bar{X} (σ)
TBP-AntpHD	54.50%	49.67%	45.82%	50(5.70±)
TBP-UbxHD	43.02%	38.62%	41.30%	40.99(4.22±)
TBP-ScrHD	43.71%	43.12%	45.51%	44.12(3.63±)
TBP-AbdBHD	54.08%	65.69%	61.86	60.55(6.24±)

La Figura 20 muestra los resultados obtenidos en el análisis de imagen. En el canal “Cherry” se observa la fluorescencia roja del control interno de transfección, en el canal “Hoescht” se observa el total de núcleos presentes en la monocapa de cada campo y en el canal “Venus” se observa la fluorescencia verde, que indica la reconstitución de Venus, producto de la interacción entre las proteínas de interés. La interacción TBP-AntpHD resultó en 50%, muy similar al porcentaje reportado anteriormente (Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016). Mientras que la interacción de TBP con ScrHD, UbxHD y AbdBHD resultaron en 44.12%, 40.99% y 66.55.1% respectivamente, indicando que otras regiones fuera del HD están implicadas en la interacción de estas homeoproteínas con TBP. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se muestra de forma gráfica en la Figura 21.

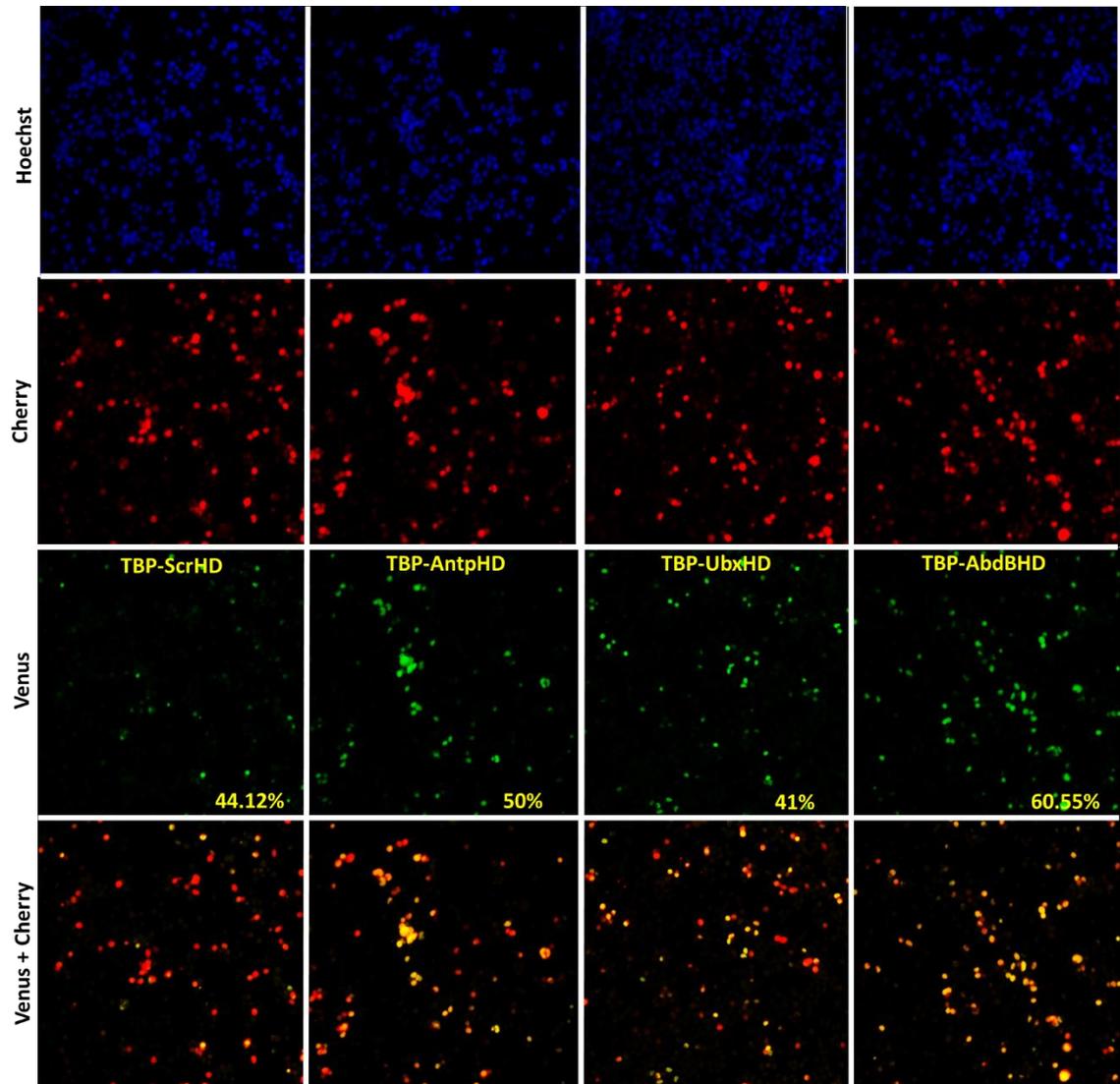


Figura 20. TBP interacta con Scr y AbdB a través de sus homeodominios. El ensayo de BiFC se realizó mediante la coexpresión de las proteínas VNTBP y VScrHD/VUbxHD/VAbdBHD y VAntpHD como control. En todos los casos la expresión de la proteína fluorescente Cherry fue empleada como control interno de transfección. El canal Cherry muestra la fluorescencia roja del control de transfección, el canal Hoescht muestra la fluorescencia azul, indicativa de viabilidad celular y el canal Venus muestra la fluorescencia verde indicativa de las interacciones proteína-proteína. En todos los casos se observa el porcentaje de interacción en la esquina inferior derecha.

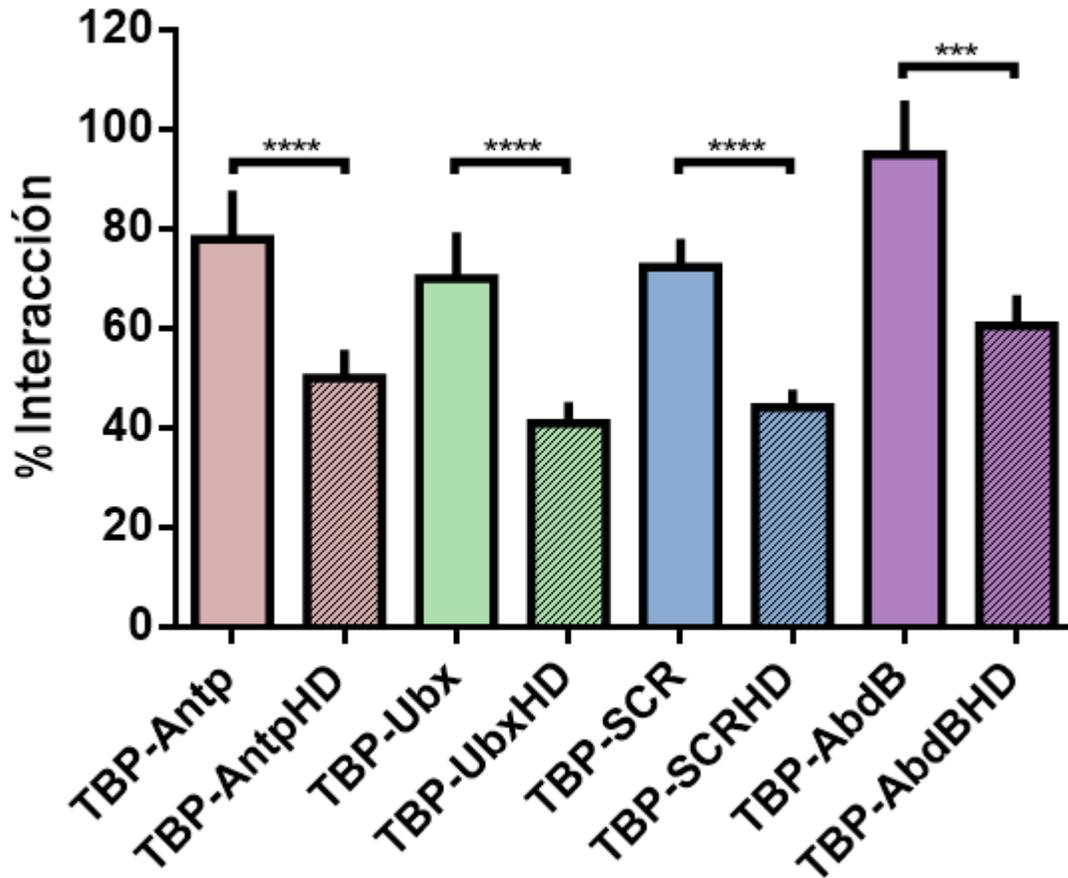


Figura 21. Análisis estadístico de la interacción entre TBP y el HD de las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp. La gráfica muestra el porcentaje de interacción obtenido entre TBP y las homeoproteínas Antp, Ubx, Scr y AbdB así como con sus homeodomios. Los resultados indican una disminución en el porcentaje de interacción en todos los casos. En la parte superior de cada barra se muestra la desviación estándar. La significancia de la comparación múltiple de medias mediante un análisis de Tukey se muestra como ****= $p < 0.0001$, ***= $p \leq 0.001$.

9.3 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB

9.3.1 Caracterización del vector pCS2VNm9-TBPΔQ40

Antes de determinar la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción dimérica con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB se confirmó la identidad molecular del plásmido pCS2VNm9-TBPΔQ40 (Montalvo-Méndez, 2016) mediante caracterización enzimática. La Figura 22 muestra la caracterización del plásmido pCS2VNm9-TBPΔQ40 con las enzimas de restricción: *Bam*HI, *Pvu*II, *Xho*I y *Hind*III. En

todos los casos las bandas obtenidas con las digestiones confirmaron la identidad de los vectores al comparar con las caracterizaciones *in silico*.

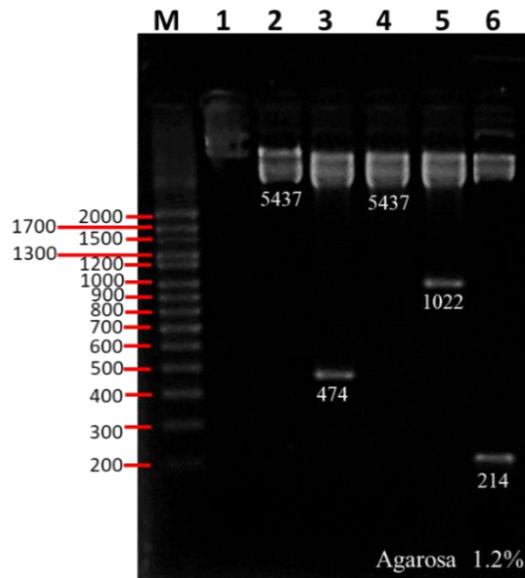


Figura 22. Caracterización enzimática del vector pCS2VNm9-TBPΔQ40. Se muestra el resultado de la caracterización del plásmido pCS2VNm9-TBPΔ (carril 2) digerido con las enzimas (carril 3), (carril 4) y (carril 5). Se muestra el marcador de peso molecular en el carril M. En la esquina inferior derecha se muestra la concentración de agarosa utilizada

9.3.2 El homopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción con Scr, Ubx y AbdB

Para determinar el papel del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, se realizó la cotransfección de los plásmidos que codifican el extremo N-terminal de la proteína Venus fusionado a TBPΔQ y el extremo C-terminal fusionado a Scr, Ubx, AbdB y Antp como control de disminución de la fluorescencia (Montalvo-Méndez, 2016). En todos los casos fue cotransfectado el plásmido que codifica para la proteína fluorescente mCherry, como control interno de la transfección para calcular el porcentaje de interacción. Se realizó el conteo de las células que presentan fluorescencia de Cherry y Venus de todos los campos para determinar el porcentaje de interacción. Todos los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBPΔQ-Hox

Interacción	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	$\bar{X} (\sigma)$
TBPΔQ-Antp	25.34%	49.65%	49.88%	40.63(12.11±)
TBPΔQ-Ubx	26.37%	33.30%	42.78%	34.16(8.69±)
TBPΔQ-Scr	17.91%	30.55%	25.23%	24.57(6.32±)
TBPΔQ-AbdB	47.06%	58.19%	42.39%	49.22(7.68±)

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos del análisis de las imágenes. En el canal “Cherry” se observa la fluorescencia roja del control interno de transfección, en el canal “Hoescht” se observa el total de núcleos presentes en la monocapa de cada campo y en el canal “Venus” se observa la fluorescencia verde, que indica la reconstitución de Venus, producto de la interacción entre las proteínas de interés. La interacción TBPΔQ40-Antp resultó en 40.63%, muy similar al porcentaje reportado anteriormente (Montalvo-Méndez, 2016). Mientras que la interacción de TBPΔQ40 con Scr, Ubx y AbdB resultó en 24.57%, 34.16% y 49.22%, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se muestra de forma gráfica en la Figura 24.

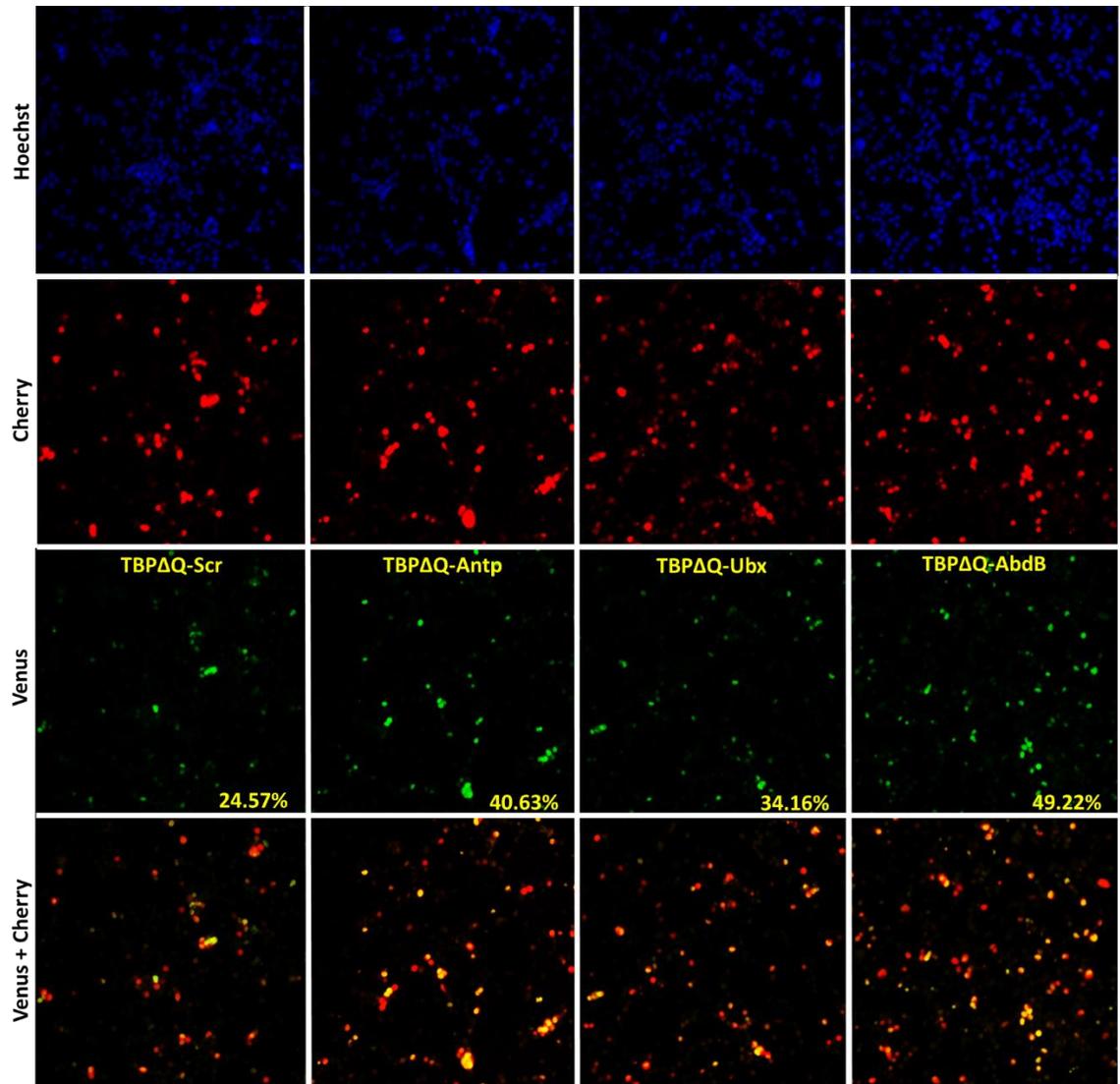


Figura 23. El homopéptido de glutaminas de TBP está involucrado en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB. El ensayo de BiFC se realizó mediante la coexpresión de las proteínas VNTBP y VScrHD/VCUbxHD/VCAbdBHD y VCAntpHD como control. En todos los casos la expresión de la proteína fluorescente Cherry fue empleada como control interno de transfección. El canal Hoescht muestra la fluorescencia azul, indicativa de viabilidad celular y el canal Venus muestra la fluorescencia verde indicativa de las interacciones proteína-proteína. En todos los casos se observa el porcentaje de interacción en la esquina inferior derecha.

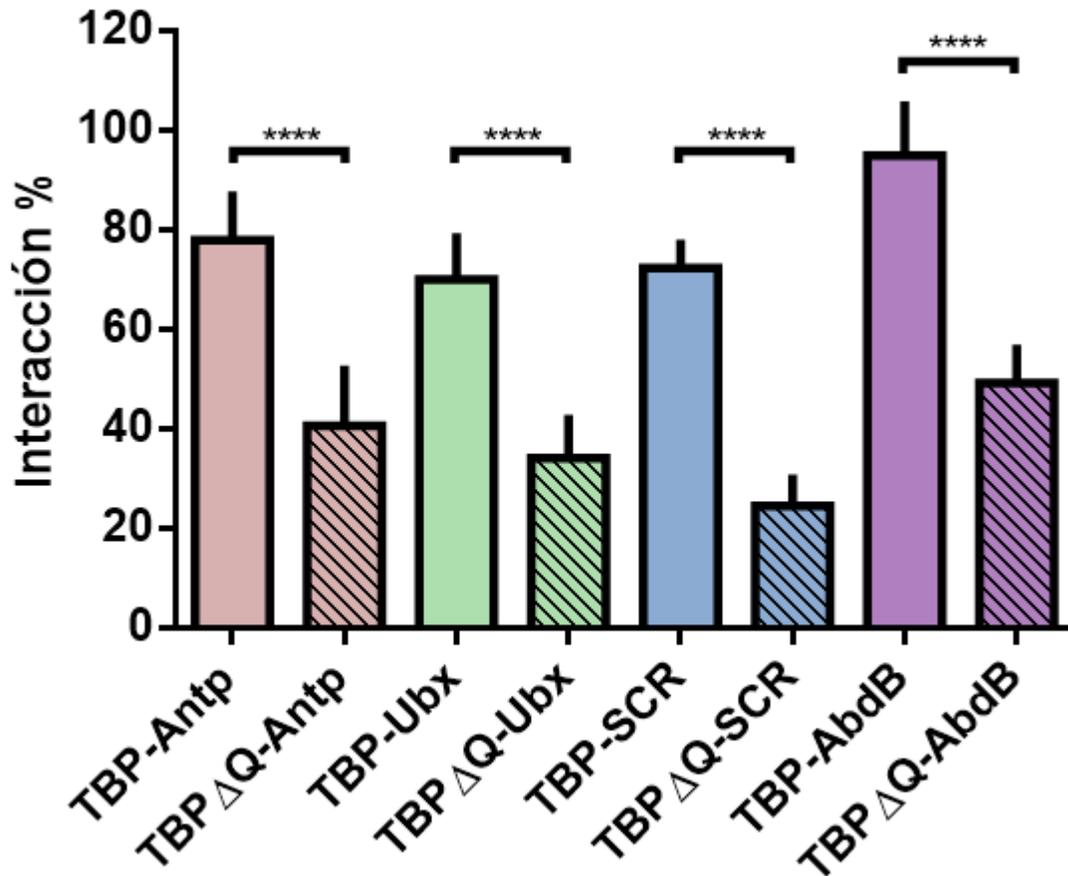


Figura 24. Análisis estadístico de las interacciones entre TBPΔQ40 con las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB y Antp. La gráfica muestra el porcentaje de interacción obtenido entre TBP o TBPΔQ y las homeoproteínas Antp, Ubx, Scr y AbdB. Los resultados indican una disminución en el porcentaje de interacción en todos los casos. La gráfica muestra los porcentajes de interacción de las interacciones entre TBP o TBPΔQ y Antp/Ubx/Scr/AbdB. En la parte superior de cada barra se muestra la desviación estándar. La significancia de la comparación múltiple de medias mediante un análisis de Tukey se muestra como ****= $p < 0.0001$.

9.4 Determinación de la importancia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con ScrHD, UbxHD y AbdBHD

Para determinar el papel del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con el homeodominio de las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, se realizó la cotransfección de los plásmidos que codifican el extremo N-terminal de la proteína Venus fusionado a TBPΔQ y el extremo C-terminal fusionado a ScrHD, UbxHD, AbdBHD y AntpHD como control de disminución de la fluorescencia (Montalvo-Méndez, 2016). En todos los casos fue cotransfectado el plásmido que codifica para la proteína fluorescente

mCherry, como control interno de la transfección para calcular el porcentaje de interacción. Se realizó el conteo de las células que presentan fluorescencia de Cherry y Venus de todos los campos para determinar el porcentaje de interacción. Todos los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de cada ensayo en los análisis e interacción TBPΔQ-HoxHD				
Interacción	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	\bar{X} (σ)
TBPΔQ-AntpHD	19.99%	15.28%	6.88%	14.05(6.20±)
TBPΔQ-UbxHD	12.33%	16.14%	15.66%	14.72(2.88±)
TBPΔQ-ScrHD	12.21%	12.31%	12.49%	14.34(2.93±)
TBPΔQ-AbdBHD	36.65%	32.83%	35.59%	34.69(6.17±)

La Figura 25 muestra los resultados obtenidos del análisis de las imágenes. En el canal “Cherry” se observa la fluorescencia roja del control interno de transfección, en el canal “Hoescht” se observa el total de núcleos presentes en la monocapa de cada campo y en el canal “Venus” se observa la fluorescencia verde, que indica la reconstitución de Venus, producto de la interacción entre las proteínas de interés. La interacción TBPΔQ40-AntpHD resultó en 14.05%, mientras que la interacción de TBPΔQ40 con ScrHD, UbxHD y AbdBHD resultó en 14.34%, 14.72% y 34.69%, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se muestra de forma gráfica en la Figura 26.

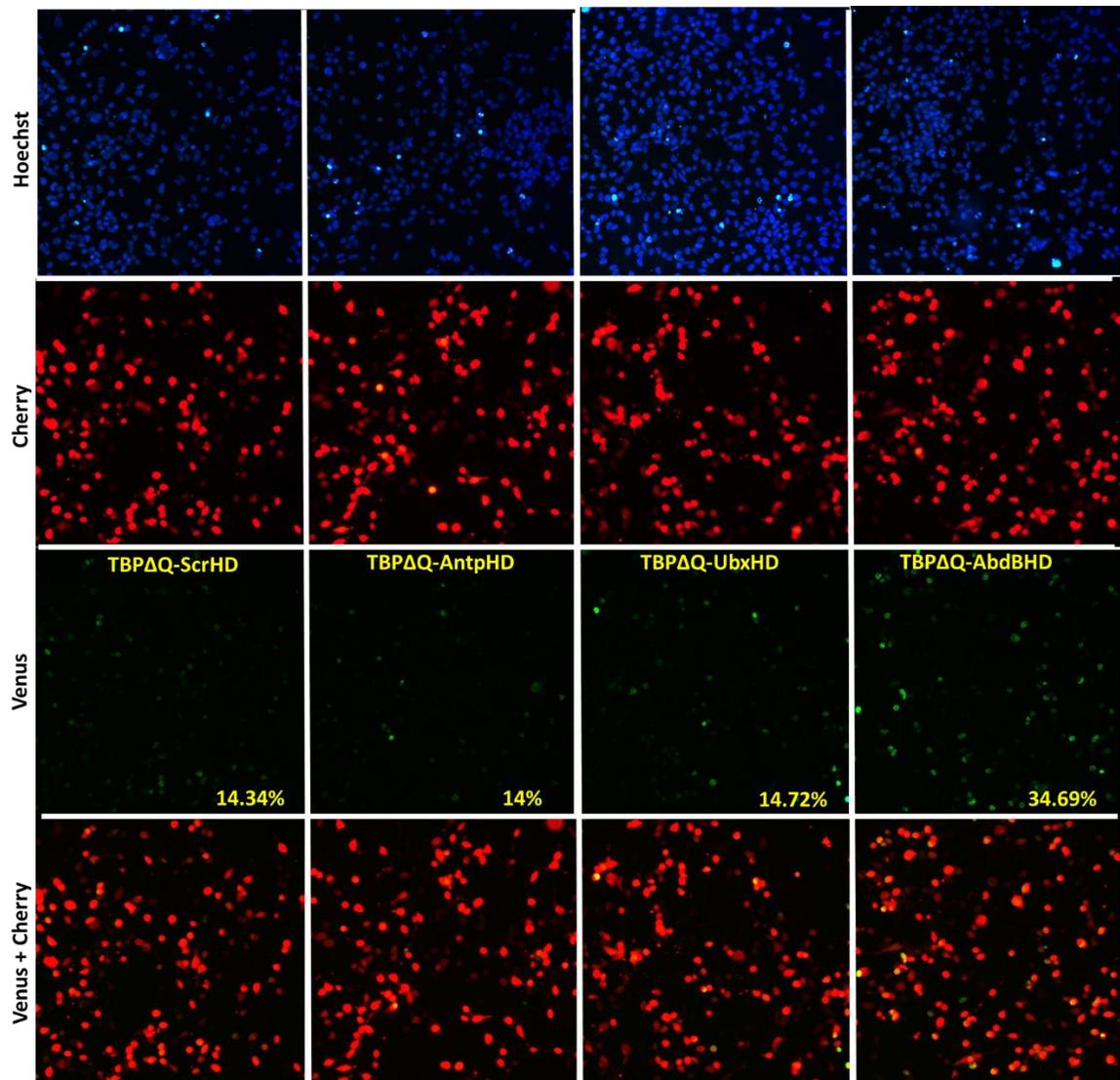


Figura 25. La ausencia de los dominios de interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB afecta de forma aditiva la reconstitución de Venus. El ensayo de BiFC se realizó mediante la coexpresión de las proteínas VNTBPΔQ y VCSrHD/VCUbxHD/VCAbdBHD y VCAntpHD como control. En todos los casos la expresión de la proteína fluorescente Cherry fue empleada como control interno de transfección. El canal Cherry muestra la fluorescencia roja del control de transfección, el canal Hoescht muestra la fluorescencia azul, indicativa de viabilidad celular y el canal Venus muestra la fluorescencia verde indicativa de las interacciones proteína-proteína. En todos los casos se observa el porcentaje de interacción en la esquina inferior derecha.

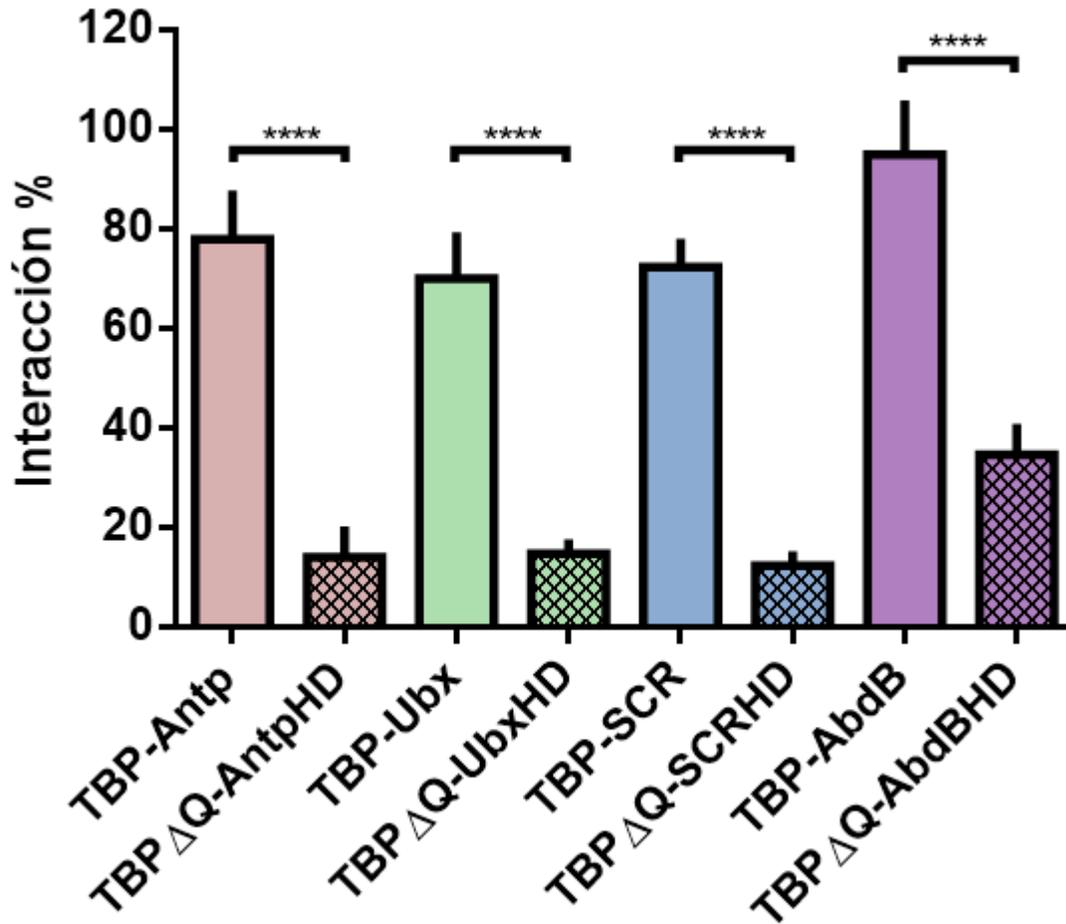


Figura 26. Análisis estadístico de las interacciones entre TBPΔQ y el homeodominio de las homeoproteínas Antp, Ubx, Scr y AbdB. La gráfica indica los porcentajes de interacción de las interacciones entre TBPΔQ y AntpHD, UbxHD, ScrHD y AbdBHD. En la parte superior de cada barra se muestra la desviación estándar. La significancia de la comparación múltiple de medias mediante un análisis de Tukey se muestra como ****= $p < 0.0001$

La interacción entre TBP y las homeoproteínas Antp, Ubx, Scr y AbdB se ve notoriamente afectada cuando solo están presentes los HDs de las homeoproteínas mencionadas, cuando está ausente el homopéptido de glutaminas de TBP y además la combinación de ambas variables tiene un efecto aditivo sobre estas interacciones, de manera que comparado con la interacción de las proteínas silvestres la diferencia es altamente significativa. La figura 27 muestra el análisis estadístico de la comparación entre las interacciones TBP-HD, TBPΔQ-Hox y TBPΔQ-HD. Los resultados indican que la interacción TBP-HD y TBPΔQ-Hox tienen estadísticamente el mismo efecto en la interacción, a excepción de la interacción TBP-Scr, en la cual la ausencia de las glutaminas

de TBP tiene un efecto estadísticamente mayor (****). La comparación entre el porcentaje obtenido en las interacciones TBP-HD y TBP Δ Q-HD indican que la diferencia es altamente significativa en todos los casos (****). La comparación entre TBP Δ Q-Hox y TBP Δ Q-HD también resultó ser altamente significativa en las interacciones TBP-Antp y TBP-Ubx, mientras que en las interacciones TBP-Scr y TBP-AbdB hubo una diferencia estadística menor (* y **, respectivamente).

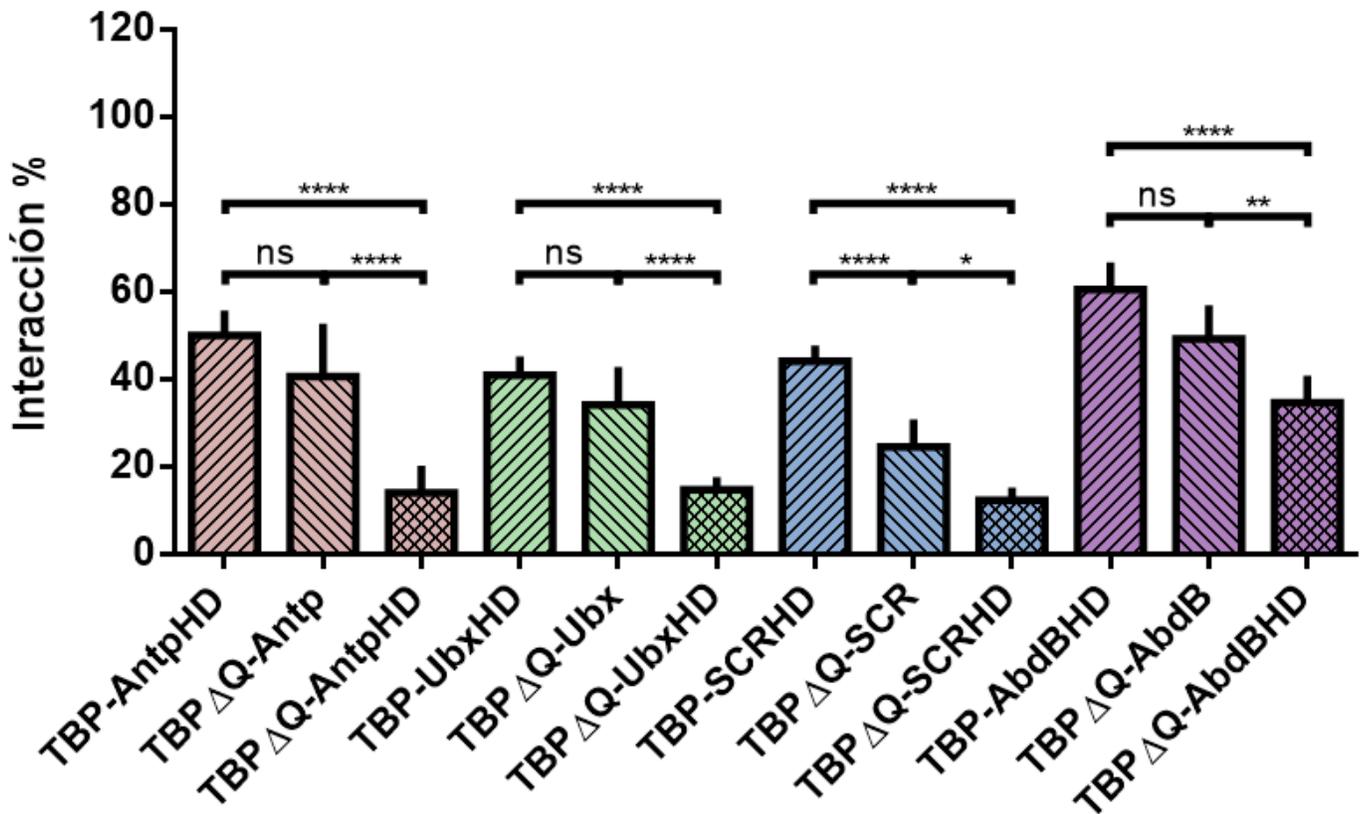


Figura 27. Análisis estadístico de la comparación sobre el efecto del HD, de la ausencia de las glutaminas en TBP o la combinación de ambos en la interacción entre TBP y Antp/Ubx/Scr/AbdB. La gráfica indica los porcentajes de interacción de las interacciones entre TBP Δ Q y AntpHD, UbxHD, ScrHD y AbdBHD. En la parte superior de cada barra se muestra la desviación estándar. La significancia de la comparación múltiple de medias mediante un análisis de Tukey se muestra como ****= $p < 0.0001$, **= $p \leq 0.01$, *= $p \leq 0.05$, ns=no significativo.

10. DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis consistió en determinar si TBP establece interacciones proteína-proteína con las homeoproteínas Sex combs reduced (Scr), Ultrabithorax (Ubx) y Abdominal B (AbdB) utilizando la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC). Además, con esta misma estrategia se analizó la importancia del HD de estas homeoproteínas y la región rica en glutaminas de TBP en estas interacciones, así como el efecto de ambas condiciones en cada interacción. Los resultados indican que efectivamente TBP interacciona con estas tres homeoproteínas. El homopéptido de glutaminas de TBP es muy importante para la interacción, mientras que el HD no es suficiente, de manera que la interacción se debe a otros dominios de estas homeoproteínas. Además, al estar ausente el homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con el HD de Scr, Ubx y AbdB el porcentaje de interacción se reduce más, confirmando que TBP y estas homeoproteínas interactúan a través de dominios fuera de su región de interacción con el DNA.

Actualmente existe una amplia variedad de estrategias para estudiar las interacciones proteína-proteína. Han sido ampliamente utilizados enfoques genéticos como el sistema de doble híbrido (Yeast two hybrid, Y2H) (Miller & Stagljar., 2004) y ensayos bioquímicos clásicos como coimmunoprecipitación o pull down (Selbach & Mann., 2006) y, aunque utilizando estas técnicas se ha logrado determinar una gran cantidad de interacciones proteína-proteína, se caracterizan por tener una naturaleza invasiva debido a que requieren ser extraídas, alterando el estado natural de la célula en la que se expresan las proteínas, lo cual puede no representar su estructura real impidiendo su uso eficiente en el estudio de las interacciones proteína-proteína (Nguyen & Goodrich., 2006). Debido a esto se han desarrollado nuevas estrategias de etiquetado genético con proteínas fluorescentes, como FRET, BRET y BiFC (Wu & Brand., 1997; Becker et al., 2006).

En esta tesis se utilizó la técnica de BiFC debido a que permite la visualización directa de las interacciones proteicas en un contexto celular normal y permite visualizar la localización subcelular en la que ocurren las interacciones en tiempo real, sin requerimientos invasivos que afecten el análisis (Kerppola, 2006; Ciruela., 2008).

Anteriormente se ha reportado la gran multiplicidad de interacciones que tienen las homeoproteínas y sus implicaciones en distintos niveles de la regulación transcripcional (Lambert et al., 2012; Carnesecchi et al., 2018). Estas interacciones ocurren con distintas proteínas como: los cofactores Extradenticle y Homothorax (Moens & Selleri, 2006), factores transcripcionales y coactivadores de la transcripción como Gli3, Maf, Smad, HMG1 y CREB/p300 (Chen et al., 2004; Kataoka et al., 2001; Bai et al., 2000; Li et al., 2006; Zappavigna et al., 1996; Chariot et al., 1999; Shen et al., 2004; Saleh et al., 2000), elementos de la maquinaria basal transcripcional como TFIIE β , BIP2, TFIIF, TFIIB, el complejo Mediador y el factor de pausa de la polimerasa M1BP (Zhu & Kuziora, 1996; Baëza et al., 2015; Altamirano-Torres et al., 2018; Prince et al., 2008; Newberry et al., 1997; Sauer et al., 1995; Colgan et al., 1993 y 1995; Boube et al., 2014; Zouaz et al., 2019) e incluso otras moléculas como complejos de remodelación de la cromatina, lncRNA y proteínas de matriz (Bobola & Merabet; 2017). A la fecha existen pocos estudios que hablen específicamente de la interacción entre las homeoproteínas y TBP. Se ha reportado la interacción de TBP la homeoproteína murina Msx1 (Zhang et al., 1996; Park et al., 2015), con las homeoproteínas HD-Zip I en plantas (Capella et al., 2014 las proteínas con homeodominio Pax-5 (Eberhard & Busslinger, 1999), Oct-1 y Oct-2 (Zwilling et al., 1994) y Even Skipped (Um, et al., 1998). Mas recientemente, en nuestro laboratorio hemos descrito la interacción de TBP con las homeoproteínas AbdA y Antp (Benitez, 2016; Cárdenas-Chávez, 2012; Montalvo-Méndez, 2016).

Los resultados del análisis de BiFC en la presente tesis muestran que TBP establece interacción molecular con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB en la línea celular HEK293. La señal fluorescente que evidencia la interacción se detectó en el núcleo celular, ya que todas las proteínas analizadas son factores transcripcionales. Para llevar a cabo la cuantificación del porcentaje de interacción, en todas las cotransfecciones se incluyó el vector pCAGmCherry, que codifica la proteína roja fluorescente mCherry, lo cual sirvió como control interno de transfección y punto de referencia para calcular los porcentajes de interacción. Como control positivo de interacción se utilizó la interacción entre TBP y la homeoproteína Antennapedia (Antp) previamente reportada con esta técnica (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016; Jimenez-Mejía, 2018; Larios-Colorado, 2019), la cual mostró un porcentaje de interacción

de 77.98%. Las interacciones TBP-Scr y TBP-Ubx dieron como resultado 72.39% y 70%, muy similar al porcentaje obtenido con el control positivo, mientras que la interacción TBP-AbdB resultó en un 94.91%.

Filogenéticamente hablando, Antp está relacionada con Scr en gran medida, seguido de Ubx, mientras que AbdB es más distante en el árbol filogenético de las homeoproteínas, todo esto evidenciado por la similitud de sus HDs (Bürglin & Affolter., 2015) que además, se correlaciona con la diferencia de los sitios de unión de las homeoproteínas Antp-class (TAAT) de las AbdB-class (TTAT) (Benson, et al., 1995). Las similitudes filogenéticas entre Antp, Scr y Ubx podrían explicar el comportamiento similar en su interacción con TBP

Para analizar el papel del HD en la interacción de TBP se realizaron ensayos de BiFC en los que se prueba la interacción de VNTBP con ScrHD, UbxHD y AbdBHD. Los resultados de estos experimentos mostraron una reducción en los porcentajes de interacción en todos los casos (44.12%, 40.99% y 60.55.%, respectivamente), de la misma manera en que se redujo el porcentaje de interacción TBP-AntpHD (50%), en concordancia con lo previamente reportado (Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016). Diversos estudios indican que las homeoproteínas tienen en su estructura distintos dominios y motivos funcionales que les permiten establecer interacciones proteína-proteína para aumentar su especificidad y/o regular la transcripción. Se sabe que el brazo N-terminal del HD juega un papel importante en la especificidad de interacción con el DNA y la regulación transcripcional (Schnabel & Abate-Shen., 1996; Chang., et al., 1996; Joshi et al., 2007) y que además el tetrapéptido YWPM (adyacente al brazo N-terminal del HD) es responsable de interactuar con cofactores que brinden especificidad de unión al DNA, de la misma forma que el motivo UbdA (específico de Ubx y AbdA, ubicado en el extremo C-terminal del HD) (Ortíz-Lombardia, et al., 2017). La homeoproteína murina Msx1 interactúa con TBP a través del brazo N-terminal de su HD para reprimir la transcripción (Zhang et al., 1996; Park et al., 2015) y la homeoproteína Even skipped (Eve) interactúa con TBP a través de sus dominios de represión ricos en alanina y prolina, ubicados río debajo de su homeodominio. Además, esta interacción reprime la transcripción por squelching (Um et

al., 1995). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que TBP interacciona con la homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB a través de otras regiones externas al HD, como homopéptidos, los motivos YPWM o UbdA o incluso la región C-terminal, río abajo del HD, entre otros. Anteriormente, hemos demostrado que TBP interacciona con la homeoproteína AbdA a través de su HD, mientras su interacción con Antp ocurre a través de la región rica en glutaminas de su extremo N-terminal (Benitez-Martínez, 2016; Cárdenas-Chávez, Ovalle-Maqueo, 2015; Montalvo-Méndez, 2016), lo que sugiere que las interacciones TBP-Hox ocurren de forma diferencial, utilizando distintos dominios funcionales.

La disminución el porcentaje de interacción en el dímero TBP-ScrHD ocurre de forma muy similar al de la interacción TBP-AntpHD, lo cual puede explicarse por el alto grado de similitud entre ambas proteínas (Papadopoulos, et al., 2012). Scr, además de su HD altamente conservado, tiene en su estructura otros motivos funcionales, como el octapéptido (MSSYQFVNS) y los motivos LASCY y DYTQL (ubicados en su extremo N-terminal), los motivos NEAGS, YPWM, NANGE y KMAS, así como su dominio C-terminal, que son importantes para su función (Banerjee & Percival-Smith, 2020; Percival-Smith et al., 2013; Ryoo & Mann, 1999; Tour et al., 2005; Sivanantharajah & Percival-Smith, 2009,2014 & 2015; Joshi et al., 2007). Adicionalmente, Scr contiene homopéptidos de glutaminas en la misma región que Antp (Papadopoulos et al., 2012), lo que indica que probablemente tengan la misma función como dominio activador de la transcripción. Todo lo anterior indica que la interacción TBP-Scr debe ocurrir con alguno de estos motivos funcionales en la regulación de la transcripción. Adicionalmente, se ha descubierto que el octapéptido MSSYQFVNS también es un dominio activador de la transcripción y está altamente conservado en las homeoproteínas, particularmente el submotivo SSY, presente en Scr, Antp, Dfd, Lab y Ubx (y ausente en AbdA, AbdB y Pb) (Sivanantharajah & Percival-Smith, 2015). La presencia de este motivo en Scr, Antp y Ubx, y su ausencia en AbdB se correlacionan con los resultados obtenidos en la interacción entre TBP y Scr, Antp, Ubx y AbdB así como las diferencias en la reducción al interaccionar con sus HDs.

Por otra parte, la homeoproteína Ubx además de su HD tiene en su estructura los motivos YPWM, UbdA (para su interacción con Exd), además del octapéptido y homopéptidos de glicina y alanina. La disminución en el porcentaje de interacción obtenida con el dímero TBP-UbxHD con respecto TBP-Ubx puede explicarse también por la ausencia de dominios activadores de la transcripción. En un estudio hecho por Tan y colaboradores en 2002 se realizó una disección molecular de Ubx para determinar la importancia de sus dominios en la activación transcripcional. En sus ensayos encontraron que al eliminar los primeros 102 aminoácidos (donde se ubica el motivo SSYF) su actividad transcripcional baja de 100 a 55%, al eliminar los primeros 148 aminoácidos (donde se ubica el motivo SSYF y los homopéptidos de alanina y glicina) su actividad decrece hasta 43% y si se eliminan los primeros 216 aminoácidos (de forma que solo se conserve desde YPWM, el HD y el dominio C-terminal) su actividad baja a <1% (Tan et al., 2002). Esto en concordancia con lo encontrado por Man & Hogness, quienes al eliminar la región aminoacídica 9-226 observaron que la función homeótica de Ubx se ve disminuida en la inhibición de la involución de la cabeza en larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster* (Mann & Hogness, 1990). Adicionalmente, en estudios *in vivo* en embriones de *D. melanogaster* se ha encontrado que la región aminoacídica 2-19 de Ubx es importante para la activación transcripcional de los genes *dpp* y *tsh* (Tour et al., 2005). En conjunto, estos datos confirman que el motivo SSYF y los homopéptidos de glicina y alanina son importantes en la regulación transcripcional de Ubx y podrían ser los motivos responsables de su interacción con TBP.

Si bien se ha demostrado que el octapéptido no es esencial para la especificidad y función homeótica en Ubx, Antp y Scr (Chan & Mann, 1993; Papadopoulos, 2010, 2011), se ha demostrado que está implicado en la activación transcripcional. Se ha encontrado que en ausencia de esta región se disminuye la actividad transcripcional ectópica Scr y HoxA5 en la expresión de forkhead (Tour et al., 2005; Zhao & Pick, 1996). Actualmente no hay estudios que ligen el motivo SSYF con la maquinaria basal transcripcional o algún otro factor que justifique su función transactivadora. Sin embargo, un posible interactor de este motivo puede ser la histona-acetiltransferasa CBP (CREB binding protein) (Chan & La Thangue, 2001). Se ha encontrado que mutaciones en esta proteína de *Drosophila* son modificadoras de la función de la función biológica de Ubx y Dfd (Florence & McGinnis,

1998). Adicionalmente, existe evidencia de que CBP interacciona con los primeros 18 aminoácidos de HOXB7 en ensayos de pull-down y que además incrementa su actividad transactivadora en células de cáncer de mama (Chariot et al., 1999). De forma similar, en otro estudio se encontró que CBP de mamíferos interacciona con los primeros 141 aminoácidos del extremo N-terminal de HOXD4 mediante ensayos de coimmunoprecipitación y que también incrementa la actividad transactivadora de HOXD4 utilizando un sistema de transactivación en cultivo celular (Saleh et al., 2000). Por otro lado, anteriormente hemos encontrado que si bien Antp reduce su actividad transactivadora en ausencia de su región rica en glutaminas, aún en presencia de su octapéptido TBP no incrementa su actividad funcional (Cárdenas-Chávez, 2012), lo cual sugiere que este motivo interacciona con otros factores que modifiquen su actividad transcripcional. Dado lo anterior, si bien el octapéptido está involucrado en la actividad transcripcional de Scr y Ubx (Tour et al., 2005) es más probable que su interacción con TBP esté mediada por los homopéptidos presentes en sus estructuras, como ocurre en el caso de la interacción TBP-Antp, o bien fushi tarazu (ftz) con TFIIB, cuya interacción ocurre a través de su dominio de activación rico en glutaminas interacciona con el extremo N-terminal de TFIIB (Colgan et al., 1993 y 1995)

Por otra parte, Abdominal B es una homeoproteína relativamente distante a Antp en el árbol filogenético de las homeoproteínas. Tiene algunas diferencias estructurales y funcionales con respecto a las homeoproteínas Antp-class. Reconoce una secuencia consenso distinta a la que reconoce Antp, carece de un motivo YPWM del cual solo de conserva el triptófano (W) y tampoco tiene en su estructura el octapéptido (Shen et al., 1997; Sivanantharajah & Percival-Smith, 2015; Bürglin & Affolter, 2015). Abdominal B tiene dos isoformas con distintas actividades: la isoforma AbdBm (morfogenética) y la isoforma AbdBr (reguladora) (Ali & Bienz, 1991; Zhai et al., 2011). La isoforma m es 223 aminoácidos más larga que la isoforma r en su extremo N-terminal (Celniker et al., 1989) caracterizada por ser rica en glutaminas y tener una función transactivadora, mientras que la región N-terminal de la isoforma r (utilizada en este trabajo) contiene 3 secuencias codificadas por tres exones. La isoforma m es transcripcionalmente más activa que la isoforma r. En esta tesis se probó la interacción de TBP con AbdBr y se encontró que al estar presente solo el HD de AbdB el porcentaje de interacción disminuye

considerablemente de 94.91% a 60.55%. Aun en ausencia de la región transactivadora de la isoforma m (223 aas) la isoforma r tiene cierta actividad transcripcional que, al eliminar sus 3 secuencias del extremo N-terminal abate su actividad, lo cual sugiere que son importantes para la interacción con otros factores (Ali & Bienz., 1991; Zhai et al., 2011). Todo esto en concordancia con lo encontrado por Zhu & Kuziora que, mediante ensayos de pull-down encuentran que el HD de AbdB no establece interacción con TBP (Zhu & Kuziora, 1996).

Desde hace mucho tiempo se ha propuesto que las homeoproteínas interaccionan con componentes de la maquinaria basal transcripcional para regular la transcripción. Particularmente en el caso de Ubx al realizarse ensayos de transactivación se ha propuesto que une al DNA e interacciona con componentes de la maquinaria basal transcripcional para regular la expresión génica (Jhonson & Krasnow., 1990). Mediante ensayos de pull-down se ha demostrado que Antp y AbdB interaccionan con TFIIE β a través de su HD (Zhu & Kuziora, 1996) y más recientemente se ha encontrado que Ubx y AbdA interaccionan con la subunidad 19 del complejo mediador y que además Antp, Ubx, Scr, AbdA y AbdB interaccionan con TFIIE β *in vivo* mediante BiFC (Boube et al., 2014; Baëza et al., 2015). Todo lo anterior junto con los resultados de la presente tesis confirman la importancia del papel de las homeoproteínas en la regulación transcripcional a través de su interacción directa con distintos componentes de la maquinaria basal transcripcional.

Adicionalmente, además de determinar la interacción de TBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, así como la participación de sus HDs, en este trabajo se determinó la implicación de la región rica en glutaminas de TBP en estas interacciones. La estructura primaria de TBP se divide en un extremo C-terminal de TBP altamente conservado entre los eucariotas (Hoffmann et al., 1990) y un extremo N-terminal, divergente entre los organismos pero con cierto grado de conservación en vertebrados (Hernandez, 1993; Zhou et al., 1993; Nikolov et al., 1996; Bondareva & Schmidt, 2003). El extremo C-terminal tiene en su secuencia dos dominios que son responsables de su interacción con el DNA (Horikoshi et al., 1990; Hernandez, 1993; Nikolov et al., 1996), mientras que el extremo N-terminal de TBP se caracteriza por tener un homopéptido de glutaminas (Q) (Bonadeva & Schmidt, 2003; Thomas & Chiang, 2006).

Se ha encontrado que el extremo C-terminal de TBP establece interacción con las homeoproteínas Pax-5 y Even skipped (Eberhard & Busslinger., 1999; Un et al., 1995) y que estas interacciones tienen implicaciones en la regulación transcripcional. Por otra parte, se sabe que su extremo N-terminal está provisto de una región rica en glutaminas o bien, homopéptidos de glutaminas, que están particularmente conservados en *D. melanogaster* y mamíferos como *M. musculus* y *H. sapiens* (Kramm et al., 2019). Se ha encontrado que el homopeptido de glutaminas de TBP es importante en la activación de la transcripción y se ha propuesto que este dominio es el responsable de interactuar con otras proteínas unidas a secuencias de DNA cercanas al promotor e incluso se ha sugerido que esta región es un cofactor vestigial que permite la unión de otros factores al complejo de preiniciación, sirviendo así como un puerto de acceso para otros factores de transcripción (Seipel et al., 1993; Hobbs et al., 2002; Lambert & Nordeen, 2015).

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que el homopéptido de glutaminas de TBP está implicado en su interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB. En ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en todos los casos (24.57%, 34.16% y 49.22%, respectivamente), mientras que el control de disminución TBP Δ Q40-Antp resultó en un 40.63%, muy similar a lo anteriormente reportado (Montalvo-Méndez, 2016). Esto en concordancia con otros reportes de factores transcripcionales que interactúan con el extremo N-terminal de TBP o específicamente con el homopéptido de glutaminas, como el complejo SNAP, la proteína HMG1, TFIIB y Antp (Mittal & Hernández, 1999; Das & Scovell, 2001; Friedman, 2007; Yang, 2013; Cárdenas-Chávez, 2012; Ovalle-Maqueo, 2015).

Debido a que se ha encontrado que Antp, Scr y AbdB tienen en sus secuencias regiones ricas en glutaminas (Papadopoulos et al., 2012; Zavortink & Sakonju., 1989; Ali & Bienz., 1991) y a que hay evidencia que indica que los homopéptidos de glutaminas pueden interactuar entre sí y que además esta interacción tiene la capacidad de activar la transcripción (Chen et al., 2004; Atanesyan et al., 2011), es muy probable que la interacción de Scr y AbdB con TBP sea mediada por estas regiones en la regulación transcripcional. Por otro lado, Ubx tiene en su estructura regiones ricas en alanina y glicina

que están involucradas en la regulación transcripcional, por lo cual también podrían estar involucradas en su interacción con TBP.

Por último, se determinó el efecto de la ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP en su interacción con el HD de Scr, Ubx y AbdB, encontrándose un porcentaje de interacción incluso menor que la obtenida en las interacciones TBP Δ Q-Hox y TBP-HD, resultando en 14.34%, 14.72% y 34.69%, respectivamente. Mientras que el control TBP Δ Q-AntpHD mostró un 14.05%, significando un porcentaje menor al reportado anteriormente (Montalvo-Méndez, 2016). Estos resultados confirman que la interacción entre TBP y las homeoproteínas Scr, Ubx, AbdB requieren del homopéptido de glutaminas de TBP y de otras regiones independientes del HD, como las regiones ricas en glutaminas, alaninas o glicinas o incluso el octapéptido N-terminal de las homeoproteínas.

En conjunto, los datos aquí presentados junto con los antecedentes indican que las homeoproteínas interaccionan en buena medida con componentes de la maquinaria basal transcripcional, específicamente con elementos del complejo de preiniciación como TBP, lo cual sugiere que estas interacciones están involucradas en la regulación directa de la transcripción.

11. CONCLUSIONES

TBP establece interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, dando 72.39%, 70%, 94.91%, respectivamente

La interacción de TBP con el HD de las homeoproteínas Ubx, Scr y AbdB muestra una disminución en su interacción (44.12%, 41% y 60.55% respectivamente) sugiriendo la participación de otros dominios funcionales.

La ausencia del homopéptido de glutaminas de TBP disminuye el porcentaje de interacción con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB (24.57%, 34.16% y 49.22%, respectivamente), lo que sugiere su función como puerto de acceso de otros factores con la maquinaria basal transcripcional.

La interacción TBP Δ Q-HD disminuye de forma aditiva el porcentaje de interacción con Scr, Ubx y AbdB, dando 14.34%, 14.72% 34.69%, respectivamente. Esto indica que hay motivos o dominios de estas homeoproteínas que interaccionan con el homopeptido de glutaminas de TBP.

12. PERSPECTIVAS

- Determinar el papel de los homopéptidos de glutaminas de Scr y AbdB, así como los homopéptidos de alanina y glicina de Ubx en su interacción con TBP.
- Analizar la función del octapéptido de Antp, Scr, Ubx y AbdB en la interacción con componentes de la maquinaria basal de transcripción como TBP, TFIIE y TFIIB, así como su función en la transcripción.
- Determinar si TBP también establece interacción con AbdBm y analizar la función de esta interacción en la actividad transcripcional de AbdBm y AbdBr.
- Determinar si las interacciones de TBP con Scr, Ubx y AbdB ocurren *in vivo*, en *D. melanogaster*.

13. BIBLIOGRAFÍA

Ali, N., & Bienz, M. (1991). Functional dissection of *Drosophila* Abdominal-B protein. *Mechanisms of Development*, 35(1), 55–64. doi:10.1016/0925-4773(91)90041-4

Altamirano-Torres, C., Salinas-Hernández, J. E., Cárdenas-Chávez, D. L., Rodríguez-Padilla, C., & Reséndez-Pérez, D. (2018). Transcription factor TFIIIE β interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in *Drosophila*. *PloS one*, 13(10), e0205905.

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, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.06034>

Bai S, Shi X, Yang X, Cao X: Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem* 2000, 275(12):8267–8270.

Banerjee, A., & Percival-Smith, A. (2020). Post-translational modifications of *Drosophila melanogaster* HOX protein, Sex combs reduced. *PloS one*, 15(1), e0227642.

Bateson, W. (1894). Bateson's Dictionary of Variaton:Materials for the Study of Variation Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species. *The American Naturalist*, 28(332), 692. <https://doi.org/10.1086/275992>

Becker CF, Seidel R, Jahnz M, Bacia K, Niederhausen T, Alexandrov K, Schwille P, Goody RS, Engelhard M: C-terminal fluorescence labeling of proteins for interaction studies on the single-molecule level. *Chembiochem* 2006, 7:891-895.

Benítez-Martínez, A. R. 2016. El homeodominio interviene en la interacción proteína-proteína de Abdominal A con el factor de transcripción TBP. UANL. FCB.

Benson, G. V., Nguyen, T. H., & Maas, R. L. (1995). The expression pattern of the murine Hoxa-10 gene and the sequence recognition of its homeodomain reveal specific properties of Abdominal B-like genes. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1591-1601.

Bobola, N., & Merabet, S. (2017). Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Current Opinion in Genetics and Development*, 43, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.09.008>

Bondos SE. & Tan XX. 2001. Combinational transcriptional regulation: The interaction of transcription factors and cell signaling molecules with homeodomain proteins in *Drosophila* development. *Crit Rev Eukar Gene Expr*. 11(1-3).

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

Boube, M., Hudry, B., Immarigeon, C., Carrier, Y., Bernat-Fabre, S., Merabet, S., ... Cribbs, D. L. (2014). *Drosophila melanogaster* Hox Transcription Factors Access the RNA Polymerase II Machinery through Direct Homeodomain Binding to a Conserved Motif of Mediator Subunit Med19. *PLoS Genetics*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004303>

Bridges, C., & Morgan, T. (1923). The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Institute Publications* (Vol. 327). the Institution. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.24013>

Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3), 497-521.

Capella, M., Ré, D. A., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2014). Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant cell reports*, 33(6), 955-967.

Carnesecchi, J., Pinto, P. B., & Lohmann, I. (2018). Hox transcription factors: an overview of multi-step regulators of gene expression. *International Journal of Developmental Biology*, 62(11-12), 723-732.

Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB. 1989. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* 3:1424–1436.

Chan, H. M., & La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science*, 114(13), 2363-2373.

Chan, S. K., & Mann, R. S. (1993). The segment identity functions of Ultrabithorax are contained within its homeo domain and carboxy-terminal sequences. *Genes & Development*, 7(5), 796-811.

Chan, S.K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J. and Mann, R.S. (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with Extradenticle, another homeoprotein. *Cell* 78, 603-615

Chang, C. P., Brocchieri, L., Shen, W. F., Largman, C., & Cleary, M. L. (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Molecular and cellular biology*, 16(4), 1734-1745.

Chang, C.P., Brocchieri, L., Shen, W.F., Largman, C., and Cleary, M.L. (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1734–1745

Chariot A, van Lint C, Chapelier M, Gielen J, Merville MP, Bours V: CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* 1999, 18(27):4007–4014.

Chariot, A., van Lint, C., Chapelier, M., Gielen, J., Merville, M. P. and Bours, V. (1999b). CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* 18, 4007-4014

Chauvet, S., Merabet, S., Bilder, D., Scott, M.P., Pradel, J., and Graba, Y. (2000). Distinct hox protein sequences determine specificity in different tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4064–4069.

Chen Y, Knezevic V, Ervin V, Hutson R, Ward Y, Mackem S: Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development* 2004, 131(10):2339–2347.

Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., ... Stern, D. L. (2015). Low affinity binding site clusters confer HOX specificity and regulatory robustness. *Cell*, 160(1–2), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.041>

Dolle P., Izpisua-Belmonte JC., Falkenstein H., Renucci A., Duboule D. 1989. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*, 342 (6251): 767-772

Domsch, K., Papagiannouli, F., & Lohmann, I. (2015). *The HOX–Apoptosis Regulatory Interplay in Development and Disease. Apoptosis and Development*, 121–158. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.07.014

Felipe, L., García, J., & Larios, H. M. (2003). *Biología celular y molecular (Vol. 1)*. Pearson Educación. <https://doi.org/10:0-8400-5444-0>

García-Bellido A. 1975. A genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In *Cell patterning* (eds R Porter, J Rivers). CIBA Foundation Symp. 29: 161–178. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier

Garcia-Bellido, A. (1981). From the gene to the pattern: Chaeta differentiation. *Cellular Controls in Differentiation.*, 281–304.

Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., & Morata, G. (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 48(1), 132–147. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90052-X)

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

Johnson FB, Parker E, Krasnow MA. 1995. Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:739–743.

Johnson, F. B., & Krasnow, M. A. (1990). Stimulation of transcription by an Ultrabithorax protein in vitro. *Genes & development*, 4(6), 1044-1052.

Johnson, F.B., Parker, E., and Krasnow, M.A. (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 739–743.

Joshi R, Passner JM, Rohs R, Jain R, Sosinsky A, Crickmore MA, et al. Functional Specificity of a Hox Protein Mediated by the Recognition of Minor Groove Structure. *Cell*. 2007; 131: 530–543. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.024> PMID: 17981120

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

Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, Nishizawa M: A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J Biol Chem* 2001, 276(1):819–826.

Kaufman TC., Lewis R. & Wakimoto B. 1980. Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics*. 94: 115-133

Kmita M., Fraudeau N., Herault Y., Duboule D. 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of the *Hoxd* genes in limbs. *Nature*, 420 (6912): 145-150

LaRonde-LeBlanc, N.A., and Wolberger, C. (2003). Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.* 17, 2060–2072.

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565–570.

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565–570.

Li X, Nie S, Chang C, Qiu T, Cao X: Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp Cell Res* 2006, 312(6):854–864.

Mann, R. S., & Hogness, D. S. (1990). Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell*, 60(4), 597-610.

Mann, R. S., Lelli, K. M., & Joshi, R. (2009). Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 63–101.

Mann, R.S. (1995). The specificity of homeotic gene function. *Bioessays* 17, 855–863.

Mann, R.S., and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 243–271.

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. doi:10.1016/0092-8674(84)90370-2

Miller J, Stagljar I: Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 2004, 261:247-262

Moens, C. B., & Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental biology*, 291(2), 193-206.

Montalvo-Méndez R. 2016. Los homopéptidos de glutaminas son importantes en la interacción molecular TBP-Antennapedia. UANL. FCB

Neuteboom, S.T., and Murre, C. (1997). Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins. *Mol. Cell Biol.* 17, 4696–4706.

Nguyen TN, Goodrich JA: Protein–protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nat Methods* 2006, 3:135-139.

Noyes, M. B., Christensen, R. G., Wakabayashi, A., Stormo, G. D., Brodsky, M. H., & Wolfe, S. A. (2008). Analysis of Homeodomain Specificities Allows the Family-wide Prediction of Preferred Recognition Sites. *Cell*, 133(7), 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.023>

Ortiz-Lombardia, M., Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Saurin, A. J., & Graba, Y. (2017). Hox functional diversity: Novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *Bioessays*, 39(4), 1600246.

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

Percival-Smith A, Sivanantharajah L, Pelling JJH, Teft WA. Developmental competence and the induction of ectopic proboscises in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol.* 2013; 223: 375–387. <https://doi.org/10.1007/s00427-013-0454-8> PMID: 24121940

Piper, D.E., Batchelor, A.H., Chang, C.P., Cleary, M.L., and Wolberger, C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96, 587–597.

Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., ... Gehring, W. J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development*, 135(9), 1669–1679. <https://doi.org/10.1242/dev.018028>

Rauskolb, C., & Wieschaus, E. (1994). Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *The EMBO Journal*, 13(15), 3561-3569.

Rauskolb, C., Peifer, M., & Wieschaus, E. (1993). extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1. *Cell*, 74(6), 1101-1112.

Ryoo HD, Mann RS. The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev.* 1999; 13: 1704–1716. <https://doi.org/10.1101/gad.13.13.1704> PMID: 10398683

Saleh M, Rambaldi I, Yang X-J, Featherstone MS: Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol* 2000, 20(22):8623–8633.

Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X.-J. and Featherstone, M. S. (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8623-8633.

Schnabel, C. A., & Abate-Shen, C. (1996). Repression by HoxA7 is mediated by the homeodomain and the modulatory action of its N-terminal-arm residues. *Molecular and cellular biology*, 16(6), 2678-2688.

Scott MP., Weiner AJ., Hazelrigg TI., Polisky BA., Pirrota V., Scalenghe F., Kaufman TC. 1983 The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell*. 35: 763-776

Scott, M. P., & Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(13), 4115-4119.

Selbach M, Mann M: Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat Methods* 2006, 3:981-983.

Shen W, Chrobak D, Krishnan K, Lawrence HJ, Largman C: HOXB6 protein is bound to CREB-binding protein and represses globin expression in a DNA binding-dependent, PBX interaction-independent process. *J Biol Chem* 2004, 279(38):39895–39904.

Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C *J Biol Chem*. 1997 Mar 28; 272(13):8198-206.

Shen, W.F., Chang, C.P., Rozenfeld, S., Sauvageau, G., Humphries, R.K., Lu, M., Lawrence, H.J., Cleary, M.L., and Largman, C. (1996). Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Res*. 24, 898–906

Sivanantharajah L, Percival-Smith A. Acquisition of a leucine zipper motif as a mechanism of antimorphy for an allele of the *Drosophila* Hox gene *Sex combs reduced*. *G3-Genes Genom Genet*. 2014; 4: 829–838. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010769>

Sivanantharajah L, Percival-Smith A. Analysis of the sequence and phenotype of *Drosophila* *Sexcombs reduced* alleles reveals potential functions of conserved protein motifs of the *Sex combs reduced* protein. *Genetics*. 2009; 182: 191–203. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.100438> PMID:19293143

Sivanantharajah L, Percival-Smith A. Differential pleiotropy and HOX functional organization. *Dev Biol.* 2015; 398: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.001> PMID: 25448696

Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., ... Mann, R. S. (2011). Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between hox proteins. *Cell*, 147(6), 1270–1282. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.053>

Spitz F., Gonzalez F., Duboule D. 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell*, 113(3): 405-417

Tan, X. X., Bondos, S., Li, L., & Matthews, K. S. (2002). Transcription activation by Ultrabithorax Ib protein requires a predicted α -helical region. *Biochemistry*, 41(8), 2774-2785.

Tour E, Hittinger CT, McGinnis W. Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development.* 2005; 132: 5271–5281. <https://doi.org/10.1242/dev.02138> PMID: 16284118 transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* 114, 2363-2373.

Um M, Li C, Manley JL: The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1995, 15(9):5007–5016.

van Dijk, M.A., and Murre, C. (1994). extradenticle raises the DNA binding specificity of homeodomain selector gene products. *Cell* 78, 617–624.

Wu P, Brand L: N-terminal modification of proteins for fluorescence measurements. *Methods Enzymol* 1997, 278:321-330.

Zappavigna V, Falciola L, Helmer-Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME: HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J* 1996, 15(18):4981–4991.

Zavortink, M., & Sakonju, S. (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes & Development*, 3(12a), 1969-1981.

Zhai, Z., Yang, X., & Lohmann, I. (2011). Functional dissection of the Hox protein Abdominal-B in *Drosophila* cell culture. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(4), 761-766.

Zhao, J. J., Lazzarini, R. A. and Pick, L. (1996). Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *EMBO J.* 15, 1313-1322.

Zhao, Y., and Potter, S.S. (2002). Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev. Biol.* 244, 21–36

Zhu A, Kuziora MA: Homeodomain interaction with the beta subunit of the general transcription factor TFIIE. *J Biol Chem* 1996, 271(35):20993–20996.