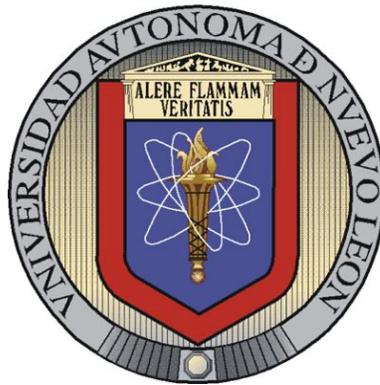


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Los complejos triméricos de Antennapedia con la proteína de unión a
caja TATA y el factor transcripcional TFIIE β o Extradenticle regulan
la actividad homeótica en *D. melanogaster***

Por:

M.C. Gustavo Jiménez Mejía

Como requisito para obtener el grado de:
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

2022

Los complejos triméricos de Antennapedia con la proteína de unión a caja TATA y el factor transcripcional TFIIIE β ó Extradenticle regulan la actividad homeótica en *D. melanogaster*

COMITÉ DE TESIS



Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de tesis



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal



Dra. Vianey González Villasana
Vocal



Dra. Claudia Dafila Altamirano Torres
Vocal

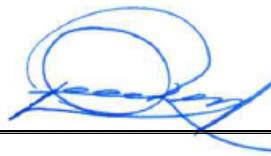


Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirección de posgrado

Los complejos triméricos de Antennapedia con la proteína de unión a caja TATA y el factor transcripcional TFIIE β ó Extradenticle regulan la actividad homeótica en *D. melanogaster*

Dirección de Tesis

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología y fue dirigido por la Dra. Diana Reséndez Pérez



Dra. Diana Reséndez Pérez

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fué financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT mediante el Proyecto Ciencia de Frontera #2280, así como por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT UANL, CN892-19.

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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Reséndez Pérez, por todas sus valiosas enseñanzas durante estos años en el laboratorio, muchas gracias por apoyarme y corregirme durante mi formación en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de manutención de doctorado durante estos 4 años.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) por el uso de las instalaciones, equipos y la colaboración de todos sus integrantes.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, quien me abrió la puerta del LIV y a esta extraordinaria carrera en ciencias.

Al Dr. Fermín Mar y Dra. Vianey González, por compartir su conocimiento en clases y seminarios.

Al M.C. Rubén Montalvo y la Dra. Claudia Altamirano, muchas gracias por su amistad, consejos y discusiones tanto personales como científicas durante la realización de este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros del 4to piso, Alely, Marcela, Citlali, Carito, Ale Arreola, Azeneth y Paco.

DEDICATORIAS

A mi familia, mis logros siempre serán de ustedes.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO.....	5
AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Homeosis y genes homeóticos	18
2.2. Homeoproteínas	21
2.3. Paradoja Hox	22
2.3.1. Interactoma Hox.....	24
2.4. Interactoma de Antennapedia.....	26
2.4.1. Interacciones triméricas	27
2.5. BiFC-FRET	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo General	31
5.2. Objetivos Particulares	31
6. ESTRATEGIA GENERAL	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1. Validación de los complejos Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2 usando versiones mutantes de Antp en cultivo celular	33
7.1.1. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> TOP10 Ca ⁺⁺	33
7.1.2. Extracción de DNA plasmídico	33
7.1.3. Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2- VC155Antp Δ H Δ D, -VC155Antp ^{I32A-H36A} , -VC155Antp Δ N, - VC155Antp ^{AAAA} , -VC155Antp, -VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIE β , - Exd y -BIP2.....	34
7.1.4. Cotransfección plasmídica en células HEK293	36

7.1.5. Captura de imágenes mediante microscopía confocal para el sistema BiFC-FRET	37
7.1.6. Cuantificación de las interacciones triméricas mediante ImageJ	37
7.2. Análisis del efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIE β en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de <i>D. melanogaster</i>	39
7.2.1. Construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIE β	39
7.2.1.2. Caracterización enzimática del plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIE β	40
7.2.1.3. Microinyección de embriones para obtener las líneas de moscas transgénicas UAS-ECFP-TFIIE β	41
7.2.1.4. Mantenimiento y amplificación de moscas transgénicas	41
7.2.1.5. Sexado, colecta y realización de cruzas	41
7.2.1.6. Detección del transgén ECFP-N1-TFIIE β en <i>D. melanogaster</i>	42
7.2.1.7. Sistema Binario UAS/GAL4.....	43
7.2.1.8. Cruzas genéticas para determinar el efecto del complejo Antp-TBP-TFIIE β en larvas de 1er estadio de <i>D. melanogaster</i>	44
7.2.1.9. Colecta y procesamiento de embriones para el análisis de cutículas embrionarias.....	46
7.2.1.10. Preparación de embriones para la visualización de cutículas embrionarias	47
7.3. Análisis del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de <i>D. melanogaster</i>	47
7.3.1. Cruzas genéticas para determinar el efecto del complejo Antp-TBP-Exd en larvas de 1er estadio de <i>D. melanogaster</i>	47
7.4. Efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIE β sobre la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i>	49
7.4.1. Cruzas genéticas para analizar el efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIE β en la transformación antena-pata de <i>D. melanogaster</i>	49
7.4.2. Disección de discos imagínales.....	50
7.4.3. Inmunodetección en discos imagínales	51
7.4.4. Disección de cabezas y antenas de <i>D. melanogaster</i>	52
7.5. Efecto funcional del trímero Antp-TBP-Exd sobre la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i>	52

7.5.1. Cruzas genéticas para analizar el efecto funcional de las interacciones triméricas en la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i>	53
8. RESULTADOS	55
8.1. Confirmación de las interacciones triméricas de Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2 usando versiones mutantes de Antp	55
8.1.1. Caracterización molecular de los plásmidos pCS2-VC155Antp Δ H Δ D, Antp ^{I32A-H36A} , Antp Δ N, Antp ^{AAAA} , Antp, pCS2VNm9TBP y pECFP-N1-TFIIE β , -Exd, y BIP2	55
8.1.2. Confirmación de la formación del complejo Antp-TBP-TFIIE β usando versiones mutantes de Antp	56
8.1.3. Validación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd usando versiones mutantes de Antp	58
8.1.4. BIP2 no forma complejos triméricos con Antp y TBP	59
8.2. Actividad funcional del trímero Antp-TBP-TFIIE β en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de <i>D. melanogaster</i>	61
8.2.1. Construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIE β	61
8.2.2. Generación de la línea transgénica UAS-ECFP-N1-TFIIE β	62
8.2.3. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β reduce el efecto homeótico en larvas de primer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i>	63
8.3. El complejo trimérico Antp-TBP-Exd afecta la involución de la cabeza y transformación T1-T2 en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	67
8.4. Antp-TBP-TFIIE β afecta la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i>	70
8.5. La expresión del trímero Antp-TBP-Exd no permitió la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i>	74
9. DISCUSIÓN	77
10. CONCLUSIONES	83
11. PERSPECTIVAS	84
12. BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO I	92
RESUMEN BIOGRÁFICO	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos para la caracterización por PCR de VCAntp y versiones mutantes	36
Tabla 2. Condiciones de amplificación para VCAntp y versiones mutantes	36
Tabla 3. Reacciones de digestión enzimática para los plásmidos pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIE β , -Exd y -BIP2	37
Tabla 4. Reacción para la digestión de pUASTattB y pECFP-N1-TFIIE β con enzimas de restricción	40
Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación para la detección del transgén ECFP-N1-TFIIE β	44
Tabla 6. Líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> para UAS-ECFP-N1-TFIIE β	63
Tabla 7. Los complejos con TFIIE β reducen la transformación T1-T2 en larvas de <i>D. melanogaster</i>	68
Tabla 8. El complejo Antp-TBP-Exd disminuye la transformación T1-T2 en larvas de <i>D. melanogaster</i>	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mutación homeótica Bithorax	19
Figura 2. Colinealidad de los genes Hox	20
Figura 3. Conservación de los genes Hox.....	21
Figura 4. Unión al DNA mediante el HD de Antp.....	22
Figura 5. Mecanismos de especificidad de las homeoproteínas	24
Figura 6. Especificidad y afinidad de unión del homeodominio <i>in vivo</i> <i>e in vitro</i>	25
Figura 7. Interacciones de las homeoproteínas	25
Figura 8. Interactoma de Antp <i>in vivo</i>	26
Figura 9. Esquema de la técnica de FRET basado en BiFC.....	29
Figura 10. Dimorfismo sexual de <i>Drosophila melanogaster</i>	43
Figura 11. Sistema Binario UAS-GAL4	45
Figura 12. Esquema de cruzas genéticas para obtener las líneas UAS- VCAntp;UAS-VNTBP, UAS-ECFP-TFIIIE β ;null-GAL4 y UAS- VCAntp;UAS-ECFP-TFIIIE β	46
Figura 13. Esquema de cruzas para dirigir la expresión ectópica del complejo Antp-TBP-TFIIIE β en embriones de <i>D. melanogaster</i>	47
Figura 14. Esquema de cruzas genéticas para obtener las líneas UAS- VNExd;null-GAL4 y UAS-VCAntp;UAS-VNExd	49
Figura 15. Esquema de cruce para dirigir la expresión ectópica de los transgenes ECFP-Exd, VCAntp y VNTBP en embriones de <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	49
Figura 16. Esquema de cruzas para integrar VCAntp;VNTBP, VCAnp;ECFP-TFIIIE β y ECFP-TFIIIE β ;dll-GAL4/dpp-GAL4	50
Figura 17. Estrategia genética para analizar el efecto del complejo Antp-TBP-TFIIIE β en la transformación antena-pata.....	51
Figura 18. Esquema de cruzas para integrar los transgenes VCAnp;VNTBP, VCAntp;VNExd, VNExd;dll-GAL4/dpp-GAL4	54
Figura 19. Estrategia para analizar el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en la transformación antena-pata	55
Figura 20. Caracterización molecular de los plásmidos pCS2- VC155Antp Δ HD, -Antp ^{I32A-H36A} , -Antp Δ N, -Antp ^{AAAA} , -Antp, pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIIE β , -Exd y -BIP2	57
Figura 21. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β es dependiente de la región polyQ y de los residuos 32 y 36 de la hélice 1 del HD de Antp	58
Figura 22. La formación de Antp-TBP-Exd es dependiente de la región polyQ y el motivo YPWM de la homeoproteína Antp	60

Figura 23. El factor BIP2 no forma complejos triméricos con Antp-TBP en cultivo celular	61
Figura 24. Construcción del vector pUASTattB-ECFP-TFIIE β	62
Figura 25. Detección del transgen ECFP-N1-TFIIE β en DNAg de <i>Drosophila melanogaster</i>	64
Figura 26. Detección de GFP en embriones de <i>Drosophila</i>	65
Figura 27. El trímero Antp-TBP-TFIIE β disminuye la pérdida de involución causado por Antp en larvas de <i>D. melanogaster</i>	66
Figura 28. Los dímeros Antp-TBP y Antp-TFIIE β afectan la función de Antp en larvas en <i>D. melanogaster</i>	67
Figura 29. El trímero Antp-TBP-Exd disminuye el efecto de Antp en larvas de <i>D. melanogaster</i>	69
Figura 30. Los dímeros Antp-TBP y Antp-Exd afectan la función dada por Antp en la involución de la cabeza de larvas en <i>D. melanogaster</i>	70
Figura 31. Expresión de GFP con el driver <i>dll</i> -GAL4 en discos imaginales de <i>Drosophila</i>	71
Figura 32. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β inhibió la transformación antena-pata en <i>Drosophila melanogaster</i>	72
Figura 33. Amplificación de los transgenes Antp, TBP, TFIIE β y GAL4 de DNAg mediante PCR.....	73
Figura 34. Inmunodetección de Antp, TBP y TFIIE β en discos de ojo-antena de <i>Drosophila</i>	73
Figura 35. Expresión de GFP con el driver <i>dpp</i> -GAL4 en discos imaginales de ojo-antena y ala de <i>Drosophila</i>	74
Figura 36. La expresión de Antp-TBP-TFIIE β inhibió la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i> utilizando el driver <i>dpp</i> -GAL4.....	75
Figura 37. Antp-TBP-Exd inhibió la transformación antena-pata en <i>Drosophila melanogaster</i>	76
Figura 38. Inmunodetección de Antp, TBP y Exd en discos de ojo-antena de <i>Drosophila</i>	76
Figura 39. El trímero Antp-TBP-Exd inhibió la transformación antena-pata en <i>D. melanogaster</i> bajo el control del driver <i>dpp</i> -GAL4.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramos
μl	Microlitros
AbdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
ANT-C	Complejo Antennapedia
Antp	Antennapedia
BiFC	Fluorescencia por Complementacion por Bimolecular
BIP2	Proteina asociada a TBP (TAFII155)
BX-C	Complejo bithorax
Dfd	Deformed
Dll	Distalless
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
Dpp	Decepentaplegic
ECFP	Proteina fluorescente cyan
Exd	Extradenticle
FRET	Transferencia de energia por resonancia de Foster
FTs	Factores transcripcionales
GFP	Proteina verde fluorescente
GTFs	Factores generales de la maquinaria transcripcional
HD	Homeodominio
Hth	Homothorax
Lab	Labial
LB	Luria-bertoni
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
Pb	Probocipedia
pb	Pares de bases
PBS	Bufer salino de fosfatos
PBT	PBS + Triton
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paramormaldehido
rpm	Revoluciones por minuto
Scr	Sex comb reduced
TBP	Proteina de union a caja TATA
Ubx	Ultrabithorax
VC	Extremo C-Terminal de venus
VN	Extremo N-Terminal de venus

RESUMEN

Las homeoproteínas son factores transcripcionales (FTs) que especifican el plan corporal de los organismos mediante la regulación de cascadas génicas subsecuentes. Estas proteínas se unen al DNA mediante una región conocida como homeodominio (HD) reconociendo secuencias cortas y altamente repetitivas en el genoma. Para explicar la especificidad de los HDs, se han propuesto distintos mecanismos, destacando aquellos que involucran la interacción con otros FTs, como por ejemplo Antennapedia (Antp) que interacciona con otras homeoproteínas y componentes de la maquinaria transcripcional. Aunque el mecanismo molecular no es claro, estas interacciones evidencian la regulación transcripcional, reclutando selectivamente factores generales de la maquinaria transcripcional (GTFs) para modular su especificidad funcional mediante activación y/o represión de genes blanco en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. En esta tesis confirmamos la formación de los complejos triméricos mutando distintos dominios de interacción, y determinamos su importancia funcional en *D. melanogaster*. Nuestros resultados confirman la formación de los complejos triméricos de Antp-TBP con TFIIE β y Exd, pero no con BIP2. Los resultados muestran que la formación del trímero Antp-TBP-TFIIE β depende de las regiones polyQ, del HD y específicamente los residuos 32 y 36 de Antp, mientras que Antp-TBP-Exd depende de las regiones polyQ y el tetrapéptido YPWM de Antp. Los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β y Exd, así como los dímeros de Antp con TBP y con TFIIE β y Exd disminuyen el efecto homeótico dado por Antp en larvas de 1er estadio, promoviendo la correcta involución de la cabeza y evitando la transformación torácica de T1 a T2. Resultados similares fueron obtenidos en la transformación antena-pata, donde también los complejos triméricos evitaron la transformación antena-pata, con excepción del dímero Antp-Exd que aumentó el efecto homeótico. Nuestros resultados indican que los complejos triméricos de Antp-TBP con TFIIE β y Exd pueden regular la actividad funcional de Antp, y abren la posibilidad de analizar su función como un puente entre promotores y enhancers en la regulación génica del desarrollo embrionario en *D. melanogaster*.

ABSTRACT

Homeoproteins are transcriptional factors (TFs) that specify the body plan of organisms by regulating subsequent gene cascades. These proteins bind to DNA through a region known as the homeodomain (HD), recognizing short and highly repetitive sequences in the genome. To explain the specificity of HDs, different mechanisms have been proposed, highlighting those that involve interaction with other TFs, such as Antennapedia (Antp), which interacts with other homeoproteins and components of the transcriptional machinery. Although the molecular mechanism is not clear, these interactions evidence transcriptional regulation, selectively recruiting general factors of the transcriptional machinery (GTFs) to modulate their functional specificity through activation and/or repression of target genes in *Drosophila melanogaster* development. Since in our laboratory trimeric interactions of Antp with the TATA box binding protein (TBP) and with the transcriptional factors TFIIE β , Exd and BIP2 were found by means of FRET-BiFC In this thesis we confirm the formation of the trimeric complexes with mutating different domains of interaction, and we determined its functional importance in *D. melanogaster*. Our results confirm the formation of trimeric Antp-TBP complexes with TFIIE β and Exd, but not with BIP2. The formation of the Antp-TBP-TFIIE β trimer depends on the polyQ regions, HD and specifically residues 32 and 36 of Antp, while Antp-TBP-Exd depends on the polyQ regions and the YPWM tetrapeptide of Antp. The trimeric complexes Antp-TBP-TFIIE β , Antp-TBP-Exd, as well as Antp dimers with TBP, TFIIE β and Exd decrease the homeotic effect given by the Antp homeoprotein in 1st instar larvae, promoting the correct involution of the head and avoiding the thoracic transformation of T1-T2. Similar results were obtained in the antenna-leg transformation, where also the trimeric complexes prevented the homeotic transformation, except for the Antp-Exd dimer that increased the homeotic effect of Antp in the antenna-leg transformation. Our results indicate that the trimeric Antp-TBP- complexes with TFIIE β and Exd can regulate the activity of Antp and open the possibility of analyzing its function as a bridge between promoters and enhancers in the gene regulation of embryonic development in *D. melanogaster*.

1. INTRODUCCIÓN

Los homeoproteínas son factores de transcripción altamente conservados cuya función principal es determinar la identidad en el plano corporal de los distintos organismos. Estas se caracterizan por poseer un dominio de 60 aminoácidos altamente conservado conocido como homeodominio (HD) que actúa reconociendo la secuencia “TAAT” en el DNA. Debido a que esta secuencia es muy frecuente en los genomas y que las homeoproteínas regulan la expresión de manera específica en el espacio y tiempo correcto, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar su función tan específica destacando las interacciones con otras proteínas de forma dimérica y/o trimérica contribuyendo de esta manera en la especificidad. Se ha determinado que Antennapedia (Antp) una homeoproteína exclusiva de *Drosophila melanogaster* asociada en el desarrollo larvario normal y la correcta formación de la región torácica de moscas adultas, interacciona con otras homeoproteínas como Abdominal A (AbdA), Ultrabithorax (Ubx) y Extradenticle (Exd), así como con otros factores transcripcionales, incluidos los factores generales de la transcripción (GTFs) como los factores transcripcionales BIP2, TFIIE β , Med19 y la proteína de unión a caja TATA (TBP). Estas interacciones ocurren a través de distintos dominios de interacción presentes en la homeoproteína Antp, como el HD, el tetrapéptido YPWM y su región rica en glutaminas. Recientemente en nuestro laboratorio evidenciamos las interacciones triméricas Antp-TBP con BIP2, TFIIE β y Exd en cultivo celular mediante la estandarización del sistema de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluoróforos combinado con la Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC-FRET). La presencia de las interacciones triméricas de Antp-TBP con BIP2, TFIIE β y Exd detectadas en cultivo celular permite la realización de esta tesis doctoral para dilucidar el panorama *in vivo* de la importancia funcional de las interacciones triméricas del complejo Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β y Exd mediante el análisis de las transformaciones homeóticas torácicas y de antena-pata en *Drosophila melanogaster*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Homeosis y genes homeóticos

William Bateson en 1894 introdujo el término "homeosis" para referir a un cambio corporal en donde una región ha tomado características de otra (Bateson, 1894). Fue hasta 1915 cuando Calvin B. Bridges mostró un primer ejemplo de homeosis en *D. melanogaster* con un fenotipo aberrante, caracterizado por la duplicación del segmento T2 generando la formación de un segundo par de alas en el lugar donde originalmente deben desarrollarse halterios como se muestra en la figura 1, al cual denominó como Bithorax (Bridges & Morgan, 1923). Posteriormente, fueron describiéndose distintas mutaciones homeóticas en *D. melanogaster*, como lo son Hexaptera (Herskowitz, 1948) y Antennapedia (Le calvez, 1948) entre otras.

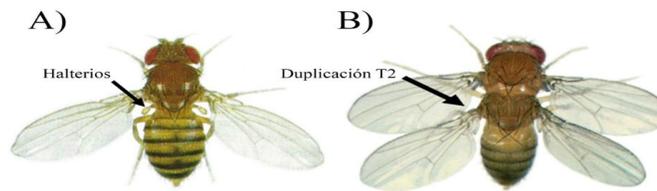


Figura 1. Mutación homeótica Bithorax. A) La flecha indica los halterios, mostrando el fenotipo WT de *D. melanogaster*, que muestra la presencia de halterios. B) Fenotipo homeótico Bithorax, la flecha indica la formación de alas en el segundo segmento torácico (T2).

Modificado de: Lewis, 2004

Posteriormente, García-Bellido a mediados de 1970, propuso algunos modelos de desarrollo proporcionados por un conjunto de genes que denominó como "genes selectores" (García-Bellido, 1975; Morata & Lawrence, 1977). En el primer modelo propone la capacidad de algunas proteínas para actuar como interruptores y de esta manera dirigir el desarrollo celular en distintas vías; en el segundo modelo describe que las rutas para el desarrollo son heredadas e irreversibles en el desarrollo normal; y en el tercero postula la activación de genes selectores que se pueden combinar para especificar la identidad celular en organismos como *D. melanogaster*. Estos hallazgos proporcionaron una relación entre el fenotipo con el genotipo de la mosca de la fruta, determinándose que la existencia de genes selectores que participan en la regulación genética y cualquier cambio que llegue alterar este equilibrio puede generar una mutación tolerada por selección natural (Akam, 2002). Posteriormente, Lewis en 1978 demostró la existencia de

los genes homeóticos del complejo Bithorax (BX-C), los cuales participan en el desarrollo de la región posterior de la mosca de la fruta, proporcionando la identidad segmentaria. La mutación homeótica Bithorax encontrada en *Drosophila* es debido a aberraciones cromosómicas en el complejo BX-C (Lewis, 1978). Por otro lado, el grupo de Kaufman en 1980 estudió otra región del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*, causante de la mutación Antennapedia, por lo cual fue denominada como complejo Antennapedia (ANT-C), encontrando que las secuencias génicas encontradas dentro de este complejo especifican la identidad de la región anterior del cuerpo de la mosca de la fruta (Kaufman *et al.*, 1980). El complejo ANT-C está constituido por los genes labial (Lab), Proboscipedia (Pb), Deformed (Dfd), Sex Combs Reduced (Scr) y Antp, y el complejo BX-C, se forma por los genes Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (AbdA) y Abdominal B (AbdB) (Fig. 2A).

La relación entre el ordenamiento genómico y la expresión de los genes homeóticos es una de sus características importantes (Duboule & Morata, 1994), es decir, el orden en el que se van expresando durante el desarrollo embrionario es muy similar al acomodo cromosómico en el genoma de los organismos. Este evento también es nombrado ley de colinealidad, la cual se ha visto conservada a lo largo de la evolución (Lewis, 1978). Esto refleja que los genes más cercanos al extremo 3' en el cromosoma, su expresión será más próxima a la región anterior del organismo, y por consecuencia entre más alejado al extremo 3' y más cercano al 5' su expresión será más adyacente a la región posterior del organismo, como se esquematiza en la figura 2 (Zurita, 2002).

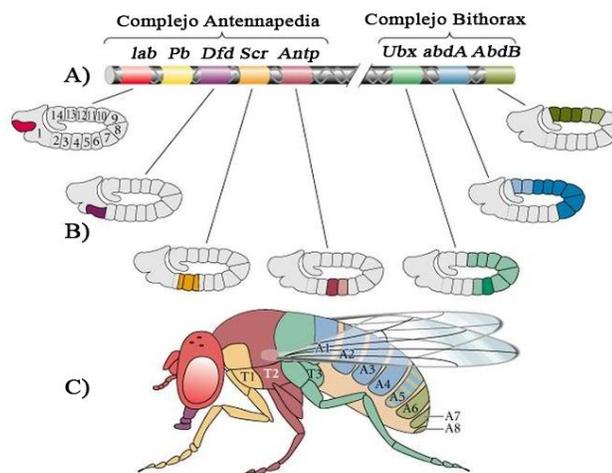


Figura 2. Colinealidad de los genes Hox. La figura esquematiza el orden de los genes Hox en el cromosoma de *D. melanogaster* y su relación con la expresión génica. A) Muestra el orden génico de los

complejos ANT-C y BX-C. **B)** Se ejemplifica la ley de colinealidad de la expresión de los genes Hox en el espacio y tiempo correcto durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. **C)** Se muestra el resultado de la correcta expresión de la ley de colinealidad de los genes Hox en *Drosophila*, dando como resultado la identidad de los segmentos corporales de la mosca de la fruta.

Modificado de Gilbert, 2005

Los genes homeóticos poseen una secuencia conocida como *caja homeótica*, esta es una región altamente conservada que se encuentra constituida por 180 pb, y es a través de esta secuencia reportada que se ha logrado determinar secuencias ortólogas en otros organismos (McGinnis *et al.*, 1984, Scott & Weiner, 1984). El utilizar a la caja homeótica como sonda para poder identificar genes Hox en diferentes organismos, permitió identificar diversos grupos Hox en diferentes especies, resultando el descubrimiento de una mayor cantidad de genes parálogos en organismos con una complejidad mayor, pero predominando su grado de conservación evolutiva (Fig. 3), destacando su función principal en el desarrollo embrionario de distintos organismos desde mamíferos, peces, e insectos hasta microorganismos como levaduras (Heffer, & Pick, 2013). Distintos genes homeóticos se han comparado entre organismos de mayor y menor complejidad estructural, y se encontró que, las secuencias nucleotídicas, organización génica, proteínas codificantes, así como sus patrones de expresión son muy similares entre especies, sugiriendo que la organización de estos complejos podría iniciar de un organismo ancestral en común (Akam, 1989; Hayashi & Scott, 1990; Patel & Prince, 2000).

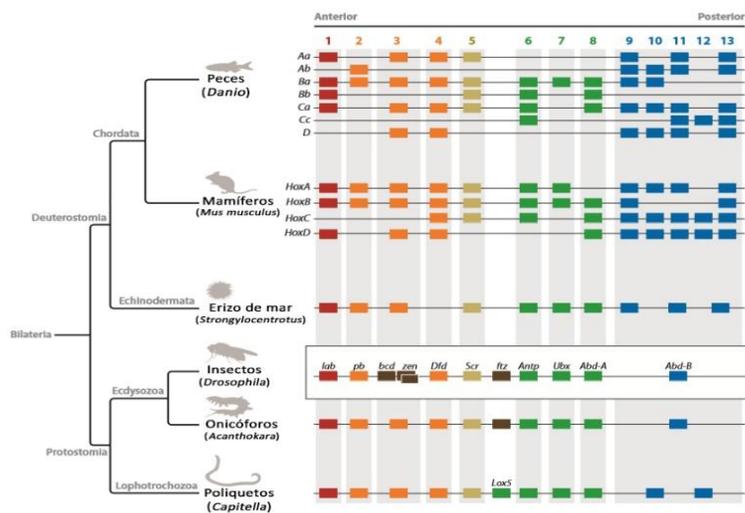


Figura 3. Conservación de los genes Hox. La imagen muestra un árbol filogenético de la conservación de distintos genes Hox en diferentes especies, observándose mayor cantidad de parálogos Hox en organismos estructuralmente más complejos.

Modificada de Heffer & Pick, 2013

2.2. Homeoproteínas

Los genes homeóticos codifican para homeoproteínas, las cuales participan en diferentes funciones celulares (Miotto & Graba, 2010; Reszohazy, 2014). Sin embargo, la función más destacada durante el desarrollo embrionario ha sido como factores transcripcionales, mediante dicha función participan regulando una gran cantidad de genes blanco para contribuir en la determinación de patrones clave del desarrollo (Gehring *et al.*, 1994). Estos factores transcripcionales de clase Hox, poseen un dominio compuesto por 60 aminoácidos, codificado por la caja homeótica conocido como Homeodominio (HD). Se ha reportado que el HD es responsable de interacciones proteína-DNA mediante el reconociendo de secuencias ricas en TA en el DNA (Scott *et al.*, 1989).

La estructura terciaria del HD está constituida por tres hélices alfa, es a través de la tercera hélice mediante la cual se lleva a cabo la afinidad con el surco mayor del DNA reconociendo la región consenso “TAAT” interactuando mediante los aminoácidos Ile47, Gln50, Asn51 y Met54, y el brazo N-terminal en la hélice 1, y con el surco menor del DNA a través del residuo Arg-5 (Mann *et al.*, 2009), como se ilustra en la figura 4.

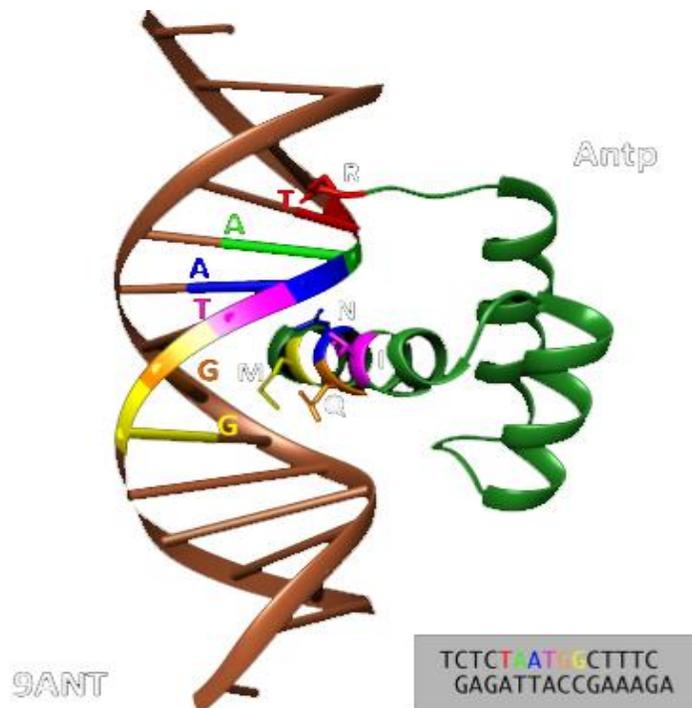


Figura 4. Unión al DNA mediante el HD de Antp. La figura muestra la unión específica el reconocimiento de las secuencias conservadas “TAAT” / “ATTA” mediante el homeodominio (HD) de la proteína Antp
Modificada de Ortiz-Lombardia *et al.*, 2017

Las homeoproteínas son factores de transcripción conservados en los organismos (McGinnis & Krumlauf, 1992; Biggin & McGinnis, 1997; Manak & Scott, 1994) (Fig. 3), que mediante el reconocimiento de secuencias cortas y altamente repetidas en el DNA (Scott *et al.*, 1989; Gehring *et al.*, 1994; Biggin & McGinnis, 1997) pueden activar o reprimir distintos genes en el tiempo y espacio exacto para determinar la identidad corporal de los diferentes organismos. Esto también es mejor conocido como la paradoja de Hox.

2.3. Paradoja Hox

Mediante el descubrimiento de las homeoproteínas, así como su alto grado de conservación y que además juegan un papel primordial en el desarrollo embrionario de los organismos es como aparece la paradoja de Hox, llevando al cuestionamiento de cómo estas proteínas altamente conservadas tan similares contribuyen en la identidad de diferentes estructuras corporales en diferentes organismos (Heffer y Pick, 2013). La secuencia consenso “TAAT” del DNA es reconocida por las homeoproteínas con similar afinidad (Gehring *et al.*, 1994) y dado que esta secuencia consenso es altamente repetitiva, surge la pregunta de cómo las homeoproteínas pueden ser específicas al sitio donde se unen en el espacio y tiempo adecuado.

La especificidad es un tema paradójico de las homeoproteínas que se ha abordado desde hace tiempo. En 1990, con los pocos reportes que había hasta entonces, se lograron proponer algunos mecanismos mediante los cuales las homeoproteínas podrían adquirir su especificidad con el DNA. La primera posibilidad dictaba que existe diferencia en la afinidad de las proteínas con el sitio de unión, la cual es dada particularmente por el homeodominio o por dominios proteicas capaces de alterar la estructura del homeodominio (Fig. 5A). La segunda posibilidad mencionada postulaba la existencia de otras proteínas que pueden actuar como cofactores para regular la afinidad o especificidad en el complejo HD-DNA (Fig. 5B); y por último se consideró la conformación estructural de homeodominio es clave para el reconocimiento y su unión al DNA, por lo que las secuencias de unión pueden cambiar la conformación estructural, alterando su habilidad de unión y afectando el proceso transcripcional (Fig. 5C) (Hayashi & Scott, 1990).

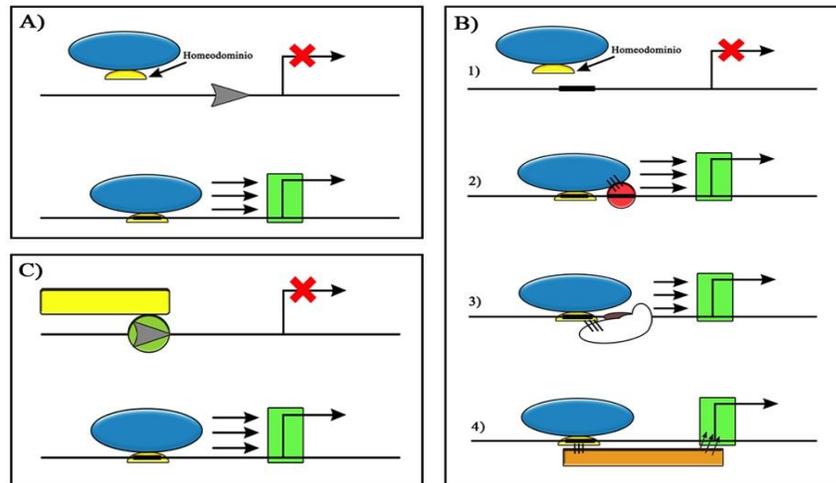


Figura 5. Mecanismos de especificidad de las homeoproteínas. Se esquematizan posibles mecanismos para determinar la especificidad de unión de las homeoproteínas. **A)** La afinidad de las homeoproteínas es dada por el reconocimiento y la actividad del promotor. **B)** La especificidad de las homeoproteínas, no solo se relaciona con la interacción HD-DNA, también involucra la presencia de factores que contribuyen en la regulación y **C)** El sitio de unión puede cambiar la conformación proteica del HD, alterando su habilidad de interacción con el DNA afectando regulación génica.

Modificado de Hayashi y Scott, 1990

La especificidad de las homeoproteínas se ha abordado ampliamente mediante el análisis de su interactoma (Wilson & Desplan, 1999), destacándose que las homeoproteínas pueden interactuar con el DNA mediante la formación de dímeros (Passner *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1999). Además, se ha destacado que la formación de dímeros contribuye en determinar especificidad de unión con el surco menor del DNA, únicamente cuando se presenta una secuencia de DNA específica (Joshi *et al.*, 2007) y que las diferencias aminoacídicas de las homeoproteínas pueden afectar al reconocimiento del DNA al estar unidas a otros factores (Joshi *et al.*, 2007; Slattery *et al.*, 2011). Además, también se ha determinado que sitios de unión de baja afinidad en las secuencias reguladoras en el DNA pueden contribuir en la especificidad de las homeoproteínas en modelos *in vivo* (Crocker *et al.*, 2015).

La afinidad y especificidad del complejo HD-DNA *in vivo*, puede ser dictada por la estructura de la cromatina, la presencia de otros factores en los sitios de unión de la cromatina y la forma del DNA. Es decir: la conformación en que las cadenas de DNA se encuentran para que las homeoproteínas se puedan unir al sitio, la forma en la que se encuentra el DNA y las posibles interacciones proteína-proteína (Fig. 6) (Bobola & Merabet, 2017).

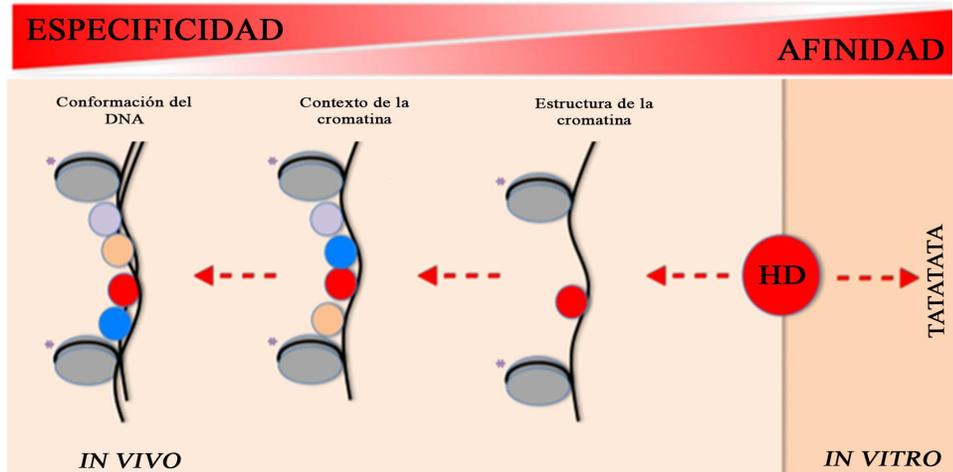


Figura 6. Especificidad y afinidad de unión del homeodominio *in vivo* e *in vitro*. La imagen ilustra la afinidad y especificidad dada en situaciones distintas. *In vitro* la afinidad de las homeoproteínas es dictada únicamente por el reconocimiento de secuencias ricas en AT. La especificidad *in vivo* es mediada por factores adicionales, como: el contexto de la cromatina (presencia del alguno otro factor que influya en la unión), la estructura de la cromatina (accesibilidad a la región blanco) y la forma del DNA.

Modificado de Bobola & Merabet, 2017

2.3.1. Interactoma Hox

La multiplicidad de interacción ha sido una característica importante que han logrado tener las homeoproteínas. Tienen la capacidad de interactuar con otros factores transcripcionales (Bobola & Merabet, 2017), histonas y proteínas asociadas, complejos remodeladores de la cromatina (Gatchalian *et al.*, 2016), topoisomerasas tipo I (Puc *et al.*, 2015), entre otros (Fig. 7)

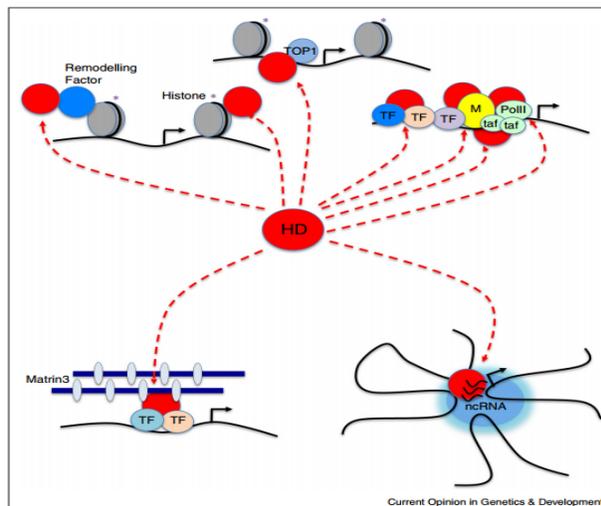


Figura 7. Multiplicidad de interacción de las homeoproteínas. Se esquematiza la capacidad del HD para interactuar con enzimas como las topoisomerasas, factores asociados a la remodelación de la cromatina, proteínas asociadas a la unión del DNA, así como a moléculas de RNA no codificante.

Tomado de Bobola & Merabet, 2017

Para llevar a cabo su función en la regulación transcripcional, las homeoproteínas deben colaborar con factores de transcripción principalmente durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual actúan las homeoproteínas aun no es del todo comprendido (Baëza *et al.*, 2015).

Reportes previos indican que la comunicación entre diversos factores de transcripción es clave para contribuir en la expresión génica (Shanmugam *et al.*, 1999), por lo que se ha dado un interés especial en evaluar estas interacciones proteína-proteína. Las interacciones pueden llegar a ser mediadas por péptidos comúnmente denominados como motivos lineales cortos (LMSs o SLiMs, por sus siglas en inglés) (Neduva & Russell, 2005; Baëza, *et al.*, 2015) mediante los cuales se ha descubierto que la generación de estos es el resultado de mecanismos de splicing alternativos asociados a posibles interacciones proteína-proteína (PPIs) involucradas en la regulación de tejidos específicos (Buljan *et al.*, 2013).

Baëza y colaboradores en 2015, mostraron el interactoma de algunas homeoproteínas, incluyendo Antp, en su versión silvestre como con el tetrapéptido YPWM mutado (YAAA), donde encontraron la interacción con distintos factores transcripcionales dependientes del motivo YPWM, ya que, en ausencia de este, pueden abatirse o modificarse, como se esquematiza en la Figura 8 (Baëza *et al.*, 2015).

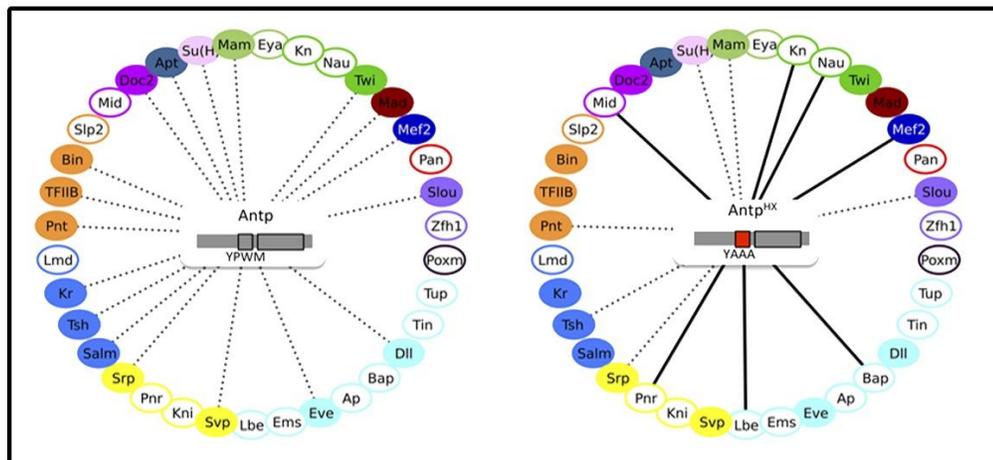


Figura 8. Interactoma de Antp *in vivo*. La figura esquematiza la interacción entre Antp con distintos factores de transcripción (línea punteada) en su versión silvestre. Al modificar el motivo YPWM (YAAA, en color rojo), se muestra la pérdida de algunas interacciones, pero también se muestra el origen de nuevas interacciones (línea negra).

Tomada de Baëza *et al.*, 2015

2.4. Interactoma de Antennapedia

La homeoproteína Antp ha destacado por su capacidad para interactuar algunos factores de la maquinaria transcripcional. En 1994 se evidenció por primera vez que Antp colabora con factores basales de transcripción como TBP (Emili *et al.*, 1994). Posteriormente, al utilizar ensayos de pull-down determinó que Antp puede interactuar con el factor TFIIE β (Zhu & Kuziora, 1996) y más recientemente, en 2008, usando ensayos *in vivo* de ganancia y pérdida de función, se encontró que Antp interactúa con el factor BIP2 (Prince *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio se ha demostrado algunas de las interacciones de Antp con diferentes factores transcripcionales y homeoproteínas. Mediante ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en células se determinó que la interacción entre Scr y Antp es mediada por la posición 19 de la hélice I del HD (Elizondo-Rodríguez, 2015). Adicionalmente, mediante BiFC *in vivo* se demostró que la interacción Antp-Ubx en *D. melanogaster* también es mediada por su homeodominio (Villarreal-Puente, 2015). Posteriormente se dilucidó que Antp interactúa con los factores transcripcionales TFIIE β , TBP, BIP2 y Exd modificando su actividad transcripcional. El tetrapéptido YPWM de Antp mostró ser un motivo clave en la interacción proteína-proteína con los factores BIP2 y Exd, mientras que la interacción proteica de TBP con Antp depende la región rica en glutaminas. Por otro lado, la interacción entre el factor TFIIE β con Antp es mediada específicamente los residuos 32 y 36 de la hélice II del homeodominio, (Cárdenas-Chávez 2012; Altamirano-Torres, 2014).

Nuestro grupo de trabajo también determinó que en la interacción Antp-TBP está relacionada con la cantidad de glutaminas suprimida y el efecto en su interacción (Ovalle-Maqueo, 2015). Resultados obtenidos mediante un análisis mutacional, evidenciaron que la región polyQ de TBP es también participe en su interacción con Antp. Sin embargo, al evaluar la ausencia de los homopéptidos de glutaminas en ambas proteínas, la interacción no desaparece, más bien disminuye, estos resultados abrieron la posibilidad de postular que esta interacción podría ser mediada por un tercer elemento (Montalvo-Méndez, 2016).

2.4.1. Interacciones triméricas

Se ha dilucidado que el cofactor Exd puede interactuar de forma dimerica con homeoproteínas, y mediante estos dímeros interactuar con el DNA (Passner *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1999) contribuyendo en la especificidad de unión. Sin embargo, se ha demostrado que las interacciones triméricas entre homeoproteínas con factores de transcripción participan en el control transcripcional. Cuando se expresa Hth, la homeoproteína Exd (proteína citoplásmica) es importada al núcleo (Rieckhof *et al.*, 1997) evidenciando la participación de tres componentes en la regulación por homeoproteínas. Utilizando ensayos *in vitro* se ha logrado demostrar que el cofactor Exd es reclutado por la región N-terminal de Hth para inducir su traslocación nuclear *in vivo*. Además, se ha mostrado que la unión al DNA es dependiente de residuos específicos de Hth, esto fue evidenciado al mutar residuos de unión al DNA, que como consecuencia resultó en la alteración de su función. Reportes realizados por Ryoo y colaboradores destacan la formación del complejo Hth-Hox-Exd dependiente de la unión al DNA, el cual es fundamental para la regulación de diferentes genes, mostrando de esta manera que las homeoproteínas pueden funcionar como un complejo multiprotéico constituido por Hox y cofactores como Exd y Hth (Ryoo *et al.*, 1999). Posteriormente, mediante el análisis puntual de mutaciones en células, se determinó que miembros de las subclases PBX y MEIS colaboran en la regulación transcripcional, mediante la formación de complejos proteicos con homeoproteínas como PDX1, donde la homeoproteína pancreática PDX1 dicta la función al establecerse el complejo trimérico con PBX1B y MRG1 (Swift *et al.*, 1998).

La homeoproteína HOXB1 forma complejos triméricos con las proteínas PBX y MEIS para unirse al DNA y modular la transcripción *in vivo* (Jacobs *et al.*, 1999). Se ha descrito que la proteína MEIS puede participar con los complejos dimericos PBX-HOXD4 y PBX-HOXD9 unidos al DNA destacando la función transcripcional mediada por complejos proteicos (Shanmugam *et al.*, 1999).

Hay evidencia *in vitro* del establecimiento del complejo trimérico corresponde a Prep1-PBX1-HOXB1, donde la interacción con la proteína Prep1 potencia la habilidad del complejo para aumentar la activación transcripcional, debido a esto se postuló que la participación de proteínas como Prep1 podrían ser componentes adicionales en la

regulación mediada por proteínas Hox (Berthelsen *et al.*, 1998). Experimentos *in vitro*, han mostrado que la homeoproteína AbdA puede formar complejos con Exd y Hth para interactuar con el DNA (Kannan *et al.*, 2010) y que las homeoproteínas Lab, Scr, Antp, Ubx, AbdA y AbdB interactúan en forma dimérica con Exd, y trimérica con los cofactores Hth y Exd (excepto AbdB) (Hudry *et al.*, 2012). Adicionalmente, se demostró que el trímero Ubx-Exd-Hth puede reconocer secuencias específicas de DNA, respaldando la especificidad de unión al DNA mediada por cofactores (Crocker *et al.*, 2015).

La estandarización del sistema de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluoróforos combinado con la Complementación Bimolecular Fluorescente (FRET/BiFC). en nuestro laboratorio nos permitió determinar la formación de complejos triméricos de Antp-TBP con los factores TFIIE β , Exd y BIP2 en cultivo celular (Jiménez-Mejía, 2018) como se esquematiza en la Figura 9.

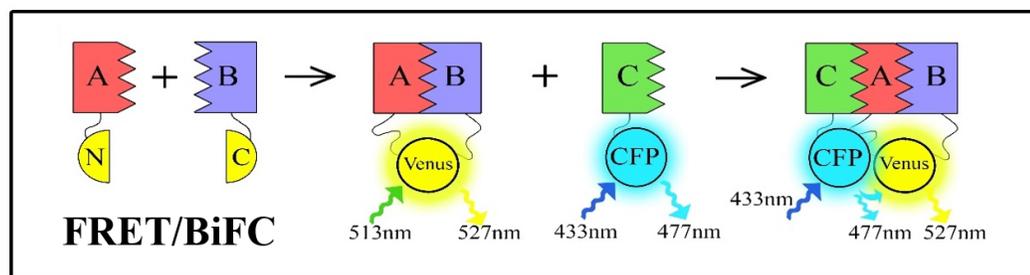


Figura 9. Esquema de la técnica de FRET basado en BiFC. De izquierda a derecha se muestra la interacción entre las proteínas etiquetadas como A y B fusionadas al N- y C-Terminal de Venus, reconstituyendo la fluorescencia de Venus (BiFC) evidenciando la interacción dimérica. La presencia del tercer factor etiquetado como C fusionado a CFP cuando interacciona con el complejo AB permite la aproximación de las proteínas fluorescentes, esquematizando la formación del complejo trimérico donde CFP actúa como donador y Venus como aceptor.

Modificado de Ciruela 2008

2.5. BiFC-FRET

La técnica de BiFC permite la detección de interacciones dimericas entre dos proteínas en cultivo celular o en organismos vivos, para determinar si la probable interacción ocurre bajo condiciones naturales, y de esta forma también evidenciar su localización subcelular. La técnica de BiFC se basa en el descubrimiento de una proteína fluorescente que al dividirla en dos fragmentos, por consecuencia pierde su capacidad de fluorescer, pero si ambos fragmentos se encuentran en un ambiente estable, la fluorescencia se reconstituye (Fig. 9). De manera que si cada fragmento es unido a una proteína de

interés y ambas proteínas interactúan, los fragmentos N- y C-terminal de la proteína fluorescente se unen, reconstituyendo su capacidad de fluorescer (Kerppola, 2008). Por otra parte, la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluoróforos (FRET) consiste en la transferencia de energía de un fluoróforo en estado excitado (llamado donador) a un fluoróforo aceptor, propiciando una reducción en la emisión del donador y un consecuente incremento en la fluorescencia del aceptor como se esquematiza en la figura 9 (Ciruela, 2008).

Diversas tecnologías han sido desarrolladas para describir PPIs en las últimas décadas que involucran el uso de proteínas fluorescentes, utilizando principalmente adaptaciones de las técnicas FRET y BiFC. Se han mejorado novedosas estrategias para el análisis de múltiples interacciones diméricas, como BiFC Rainbow y BiFC multicolor. (Wang *et al.*, 2017; Hu & Kerppola. 2003), o interacciones triméricas, como FRET de tres fluoróforos, TriFC, TFFC y FRET basado en BiFC (Galperin *et al.*, 2004; Offenborn *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Shyu *et al.*, 2008). En el sistema de BiFC-FRET propuesto en 2008 por Shyu y colaboradores muestran el uso de la proteína fluorescente Cerulean fusionada a NFAT1 y los fragmentos VC y VN fusionados a las proteínas Fos y Jun, de manera que la interacción dimérica de Fos-Jun permite reestablecer la fluorescencia de Venus y la interacción de la tercera proteína NFAT1 con el dímero Fos-Jun va a permitir su detección mediante la transferencia de energía detectada por FRET como se muestra en la Figura 9 (Shyu *et al.*, 2008). En nuestro grupo de trabajo, recientemente se utilizó esta estrategia, donde se logró determinar exitosamente las interacciones triméricas de Antp-TBP con -BIP2 ($E=0.15\pm 0.03$), -TFIIE β ($E=0.50\pm 0.05$) y -Exd ($E=0.43\pm 0.18$) en células (Jiménez-Mejía, 2018). Dado lo anterior en esta tesis doctoral confirmamos las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β , BIP2 y Exd en cultivo celular utilizando mutantes de Antp que disrumpen la formación de los complejos, así como dilucidar su importancia funcional en *D. melanogaster* de estas interacciones triméricas en las transformaciones homeóticas torácicas y de antena-pata.

3. JUSTIFICACIÓN

Drosophila melanogaster ha sido un modelo de estudio ampliamente utilizado para determinar la importancia de factores transcripcionales como homeoproteínas, que están involucradas en el desarrollo de los organismos. Existen reportes previos que indican la importancia de las interacciones entre homeoproteínas como Antp y factores de la maquinaria basal de transcripción, así como la participación de cofactores como Exd que contribuyen en la especificidad de unión al DNA. Debido a lo anterior, es importante dilucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo embrionario. Por lo que el estudiar las interacciones triméricas de Antp-TBP con factores de transcripción basales como TFIIE β así como el cofactor Exd, nos permitirá dilucidar mayor información del interactoma de Antp así como su efecto *in vivo* para entender los mecanismos de regulación genética dado por complejos triméricos, y debido a la alta conservación entre las homeoproteínas estos hallazgos se podrían extrapolar a otros grupos de organismos incluido el humano.

4. HIPÓTESIS

La formación de los complejos triméricos Antp-TBP con BIP2, TFIIE β y Exd contribuyen en el control genético del desarrollo en *D. melanogaster*.

5. OBJETIVOS

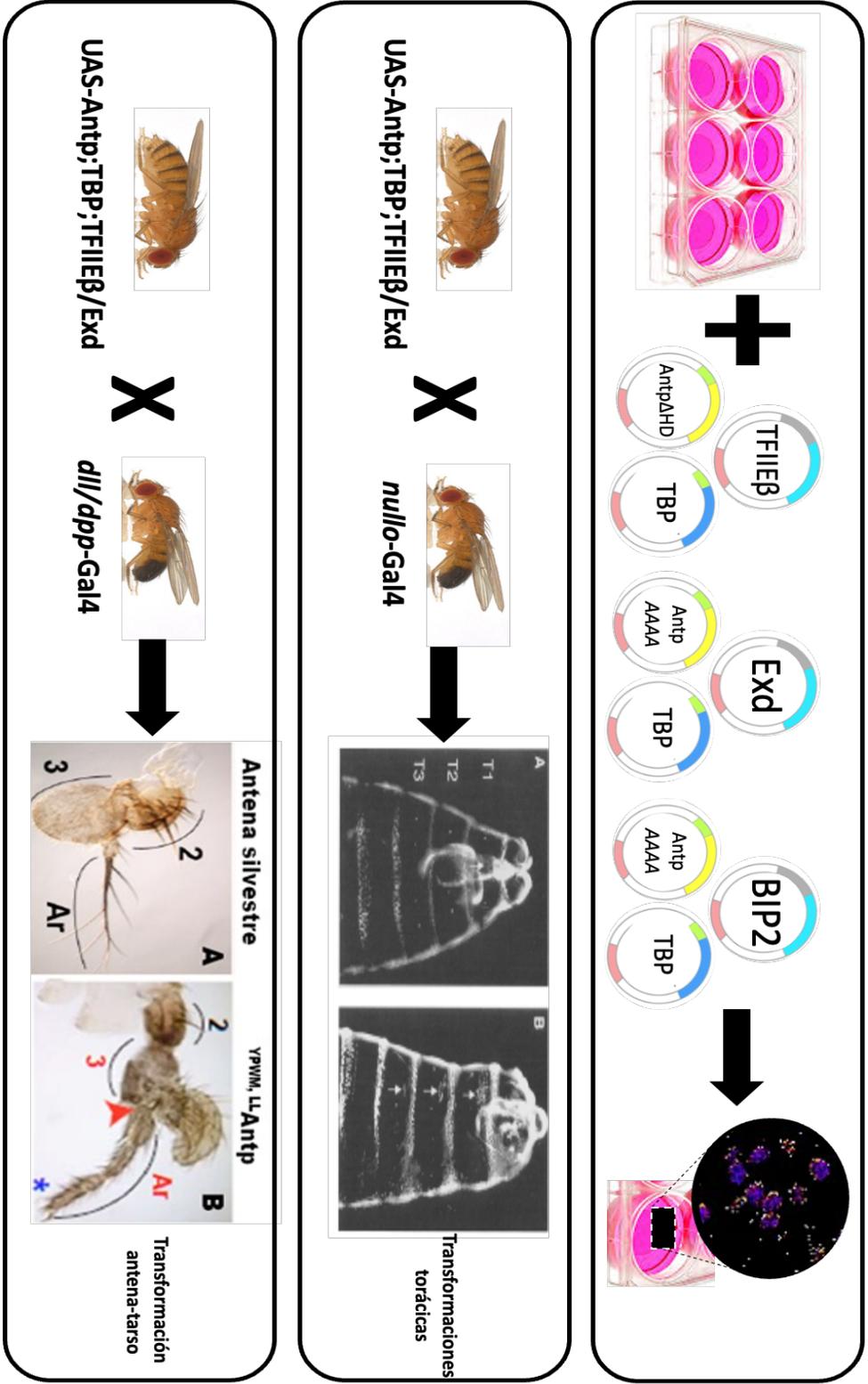
5.1. Objetivo General

Determinar la formación de los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2, para evaluar su relevancia funcional *in vivo*, en transformaciones homeóticas torácicas y de antena-pata usando como modelo *D. melanogaster*.

5.2. Objetivos Particulares

- Confirmar las interacciones triméricas Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2 usando versiones mutantes de Antp en cultivo celular.
- Determinar el efecto funcional del trímero Antp-TBP-TFIIE β en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*.
- Analizar el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*.
- Evaluar la actividad del complejo Antp-TBP-TFIIE β en la transformación antena-pata *in vivo* en *D. melanogaster*.
- Determinar si el complejo trimérico Antp-TBP-Exd participa en la transformación antena-pata *in vivo* en *D. melanogaster*.

6. ESTRATEGIA GENERAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Validación de los complejos Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2 usando versiones mutantes de Antp en cultivo celular

Para confirmar las interacciones triméricas de Antp-TBP con los factores TFIIE β , Exd y BIP2 en cultivo celular, los plásmidos construidos previamente en nuestro laboratorio: pCS2VC155-Antp^{I32A-H36A}, -Antp Δ N, -Antp Δ HD, -Antp^{AAAA}, -Antp, pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIE β , -Exd y -BIP2, fueron caracterizados mediante PCR y enzimas de restricción diagnósticas para evidenciar su identidad. Posteriormente se realizaron cotransfecciones en cultivo celular para evaluar la formación de los complejos triméricos mediante microscopia confocal, utilizando el software ImageJ.

7.1.1. Transformación de bacterias *E. coli* TOP10 Ca⁺⁺

Los plásmidos fueron propagados en 50 μ l de bacterias *E. coli* TOP10 Ca⁺⁺ competentes mediante choque térmico. La mezcla de bacterias con DNA se incubó 10 minutos en hielo, 1 minuto a 42°C en baño maría y nuevamente en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 200 μ l de medio Luria-Bertani (LB) sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 1 hora a 180 rpm, posteriormente las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de agar LB adicionado con ampicilina [50 mg/ml] e incubadas a 37°C durante 16 horas.

Las colonias resultantes se inocularon en 3 ml de medio LB con 3 μ l de ampicilina [50 mg/ml] y se incubaron a 37°C durante 16 horas a 180 rpm. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina a pequeña escala. La pureza y cantidad del DNA fue determinada mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000.

7.1.2. Extracción de DNA plasmídico

Todas las extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala (Minipreps) se realizaron por el método de lisis alcalina modificado (Sambrook *et al.*, 1989). Iniciando con el empaquetado de las bacterias en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 5 minutos, para luego desechar el sobrenadante y re-suspender el paquete celular mediante vórtex en 100 μ l de Solución I (Tris HCl 25 mM

pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con RNAsa A (Invitrogen, Massachusetts, USA) a una concentración final de 0.02 mg/ml, la re-suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 02 N, SDS 1%), se mezclarán por inversión y se incubó 5 minutos en hielo. Terminada la incubación, se agregaron 150 µl de Solución III (KOAc 5M, CH₃COOH), se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos con un volumen de isopropanol al 100% (~500 µl). Se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó nuevamente 10 minutos a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante quedando solamente la pastilla de material genético. El DNA resultante fue lavado agregando 400 µl de etanol al 70% y centrifugando 10 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante se desechó y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 5 minutos para después re-suspenderla en 20 µl de H₂O miliQ. El DNA purificado fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

7.1.3. Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2-VC155AntpΔHD, -VC155Antp^{I32A-H36A}, -VC155AntpΔN, -VC155Antp^{AAAA}, -VC155Antp, -VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIIEβ, -Exd y -BIP2

Para evidenciar la identidad de los plásmidos: pCS2-VC155AntpΔHD, pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}, pCS2-VC155AntpΔN, pCS2-VC155Antp^{AAAA} se realizaron ensayos de PCR, para amplificar la secuencia codificante para AntpΔHD del plásmido pCS2-VC155AntpΔHD utilizamos los oligonucleótidos AntpNot5' y Venus3' (Tabla 1). La identidad de las mutantes de Antp, así como de VCAntp fue determinada utilizando los oligonucleótidos Venus5' y AntpNot3' mostrados en la Tabla 1. Los amplicones resultantes fueron visualizadas en membranas de agarosa al 0.8% teñidas con solución de bromuro de etidio (EtBr) y reveladas con un transiluminador de la marca BIORAD.

Tabla 1. Oligonucleótidos para la caracterización por PCR de VCAntp y versiones mutantes

DNA templado	Oligonucleotido 5'	Oligonucleotido 3'
pCS2-VC155AntpΔHD	AntpNot5'	Venus3'
	GCGGCCGCATGACGATGAGTAC AAAC	GCGGCCGCCTAGTCAGGCCTTC TAGAACCGG
pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A}		
pCS2-VC155AntpΔN	Venus5'	AntpNot3'
pCS2-VC155Antp^{AAAA}	GCGGCCGCATCTCCGGGGGAT CCACC	GCGGCCGCCGATCCTACTGCG
pCS2-VC155Antp		

La reacción de amplificación mediante PCR así como las condiciones de amplificación para VCAntp^{I32A-H36A}, VCAntp Δ N, VCAntp^{AAAA} y VCAntp, se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para VCAntp y versiones mutantes

Condiciones de amplificación		
Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	56 °C	30 seg
Elongación	72 °C	1 min
Elongación Final	72 °C	5 min

Los plásmidos pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIE β , -Exd y -BIP2 fueron caracterizados utilizando enzimas de restricción, las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l con un promedio de concentración de 2000 ng/ μ l para cada plásmido, todas las digestiones se incubaron a 37°C durante 2 horas, los detalles de las reacciones se muestran en la Tabla 3.

Todas las digestiones fueron corridas en agarosa al 0.8%, teñidas con EtBr y visualizadas en un transiluminador marca BIORAD. Los plásmidos caracterizados fueron propagados en 100 ml de caldo LB adicionado con ampicilina [50 mg/ml] para los plásmidos PCS2VC155 y pCS2VNm9, y kanamicina [50 mg/ml] para los plásmidos pECFP-N1. La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante columnas de afinidad utilizando el kit Qiagen Plasmid Midi (QIAGEN®Plasmid Handbook, 1997) siguiendo las instrucciones del proveedor, el DNA plasmídico fue resuspendido en 50 μ l de agua miliQ, cuantificado y preparado para los ensayos de cotransfecciones en cultivo celular.

Tabla 3. Reacciones de digestión enzimática para los plásmidos pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFII β , -Exd y -BIP2

pCS2VNm9TBP				pECFP-N1-BIP2			
	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>		<i>PvuII</i>	<i>XhoI</i>	<i>NdeI</i>
DNA (1500 ng/μl)	3.5 μ l	3.5 μ l	3.5 μ l	DNA (1500 ng/μl)	3.5 μ l	3.5 μ l	3.5 μ l
Buffer 10X	1 μ l	1 μ l	1 μ l	Buffer 10X	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Enzima (10 U/μl)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	Enzima (10 U/μl)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
H₂O	5 μ l	5 μ l	5 μ l	H₂O	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Total	10 μ l	10 μ l	10 μ l	Total	10 μ l	10 μ l	10 μ l

pECFP-N1-TFIIβ				pECFP-N1-Exd			
	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>		<i>PvuII</i>	<i>SalI</i>	<i>EcoRI</i>
DNA (1500 ng/μl)	3.5 μ l	3.5 μ l	3.5 μ l	DNA (1500 ng/μl)	3.5 μ l	3.5 μ l	3.5 μ l
Buffer 10X	1 μ l	1 μ l	1 μ l	Buffer 10X	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Enzima (10 U/μl)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	Enzima (10 U/μl)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
H₂O	5 μ l	5 μ l	5 μ l	H₂O	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Total	10 μ l	10 μ l	10 μ l	Total	10 μ l	10 μ l	10 μ l

7.1.4. Cotransfección plasmídica en células HEK293

Los ensayos de transfección se realizaron en células HEK293 utilizando placas de 6 pozos (Corning Life Sciences, Lowell, MA. USA). Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/pozo en 2 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) pH 7.3 (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Carlsbad, CA. USA) y 1% de antibiótico (ampicilina/estreptomina). Las células fueron mantenidas en una atmósfera constante de 95% de humedad, 5% CO₂ y 37°C de temperatura. Las concentraciones de los DNAs transfectados en la línea celular HEK293 variaron de 1500-2500ng con una pureza de 1.80-1.99nm.

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

7.1.5. Captura de imágenes mediante microscopía confocal para el sistema BiFC-FRET

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

7.1.6. Cuantificación de las interacciones triméricas mediante ImageJ

Para determinar las interacciones triméricas mediante el sistema de FRET/BiFC, se realizó la cuantificación de la eficiencia de transferencia de energía mediante el desmezclado espectral simultaneo de los espectros de emisión y excitación utilizando el

plug-in FRETYY en el programa de uso libre ImageJ. Para llevar a cabo el análisis de las interacciones triméricas se realizó la toma de 5 espectros.

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

Para mantener la nomenclatura de las fotografías designada por Mustafa *et al.*, en el 2013, S es designado como espectro (spectrum, intensidad de la fluorescencia en diferentes longitudes de onda), los superíndices se refieren a las muestras (D para la muestra solo con donador, A para la muestra solo con aceptor y DA para la muestra con ambos fluoróforos) y los subíndices se refieren a la longitud de onda de la luz de excitación utilizada para obtener el espectro, que serán designadas para excitar el fluoróforo donador D (405 nm) y el fluoróforo aceptor A (473 nm).

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

El procesamiento consistió en determinar el espectro de emisión del fluoróforo donador excitado con el láser 405 nm y el espectro del aceptor excitado con los láseres 405 y 473 nm, para posteriormente poder determinar la transferencia de energía en los

espectros de las muestras con los dos fluoróforos. Se realizaron correcciones de ruido de fondo de todos los espectros antes de determinar las interacciones triméricas mediante FRET/BiFC mediante la herramienta de “background reduction” del software ImageJ. Una vez obtenida la imagen representativa de las interacciones triméricas FRET/BiFC de cada campo se seleccionaron cuidadosamente ROIS (Regions of interest por sus siglas en inglés) que corresponden a FRET para cuantificar el valor de E (E =transferencia de energía donador \rightarrow aceptor) de al menos 50 células con FRET en cada pozo y posteriormente los datos obtenidos fueron graficados en Excel, a los cuales se les determinó la media por repetición y la desviación estándar de la media. El uso de FRETYY en ImageJ se describe con mayor detalle en Jiménez-Mejía, 2018.

7.2. Análisis del efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIE β en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*

Para determinar el efecto del complejo Antp-TBP-TFIIE β en transformaciones homeóticas torácicas, se realizaron cruza genéticas para dirigir la expresión ectópica del complejo trimérico, bajo la dirección del promotor tejido específico *nullo* para analizar su efecto funcional en la involución de la cabeza, así como en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*.

7.2.1. Construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIE β

La construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIE β se realizó mediante subclonación a partir del plásmido pECFP-N1-TFIIE β (Jiménez-Mejía, 2018) utilizando los sitios de restricción *Bg*III-*Not*I. El vector pUASTattB, así como pECFP-N1-TFIIE β fueron digeridos con las enzimas *Bg*III-*Not*I, las digestiones fueron realizadas en un volumen final de 10 μ l incubadas a 37°C durante 2 horas (Tabla 4).

Tabla 4. Reacción para la digestión de pUASTattB y pECFP-N1-TFIIE β con enzimas de restricción

Reactivos	Cantidades
DNA (2000 ng/ μ l)	3 μ l
Buffer “O” 10X	1 μ l
<i>Bg</i> III (10 U/ μ l)	0.5 μ l
<i>Not</i> I (10 U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	5 μ l
Total	10 μl

Las digestiones se incubaron a 37°C durante 2 horas y posteriormente fueron cargadas y corridas en un gel de agarosa al 0.8% y finalmente reveladas con una solución de EtBr y visualizadas en un transiluminador-UV (BIORAD), los fragmentos de interés correspondientes a 1642pb (ECFP-N1-TFIIE β) y 8489pb (pUASTattB) se purificaron utilizando el kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente el inserto (ECFP-N1-TFIIE β) fue ligado al vector pUASTattB en una proporción 1:10 (Vector-Inserto), se realizó una reacción estándar utilizando la enzima DNA T4 Ligasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), la ligación fue incubada a 18°C durante toda la noche y posteriormente se tomaron 5 μ l de la reacción para transformar bacterias TOP10 Ca⁺⁺ y sembrarlas en placas de agar LB con ampicilina (50 μ g/ μ l), las colonias bacterianas resultantes fueron levantadas e inoculadas en tubos de ensayo con medio LB con ampicilina (50 μ g/ μ l) incubados a 37°C durante 16 h, para posteriormente extraer el DNA plasmídico a pequeña escala (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA plasmídico pUASTattB-ECFP-TFIIE β fue caracterizado utilizando enzimas de restricción.

7.2.1.2. Caracterización enzimática del plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIE β

Para determinar la presencia del inserto ECFP-N1-TFIIE β en el vector pUASTattB, las extracciones de DNA a pequeña escala se cargaron en un gel de agarosa al 0.8% junto con un control (pUASTattB vacío), y se realizó una selección por peso molecular a través del corrimiento en el gel de agarosa, esperando que las construcciones, pUASTattB-ECFP-N1-TFIIE β (9966pb) se encuentren por encima del plásmido control pUASTattB vacío (8489pb) en el gel de agarosa. Las clonas seleccionadas por diferencias en el peso molecular fueron digeridas con la enzima *Xho*I, de aquellas clonas que liberaron los insertos correspondientes ECFP-TFIIE β (1642pb) se seleccionó una y se transformó en bacterias *E. coli* TOP10 Ca⁺⁺, las bacterias transformadas fueron sembradas en un matraz con 100ml de medio LB con 100 μ l de kanamicina [50 mg/ml]. El matraz se incubó a 180 rpm durante 16 horas, posteriormente las bacterias resultantes fueron empaquetadas utilizando tubos de 50ml y se procedió a realizar extracción de DNA a mediana escala utilizando el kit comercial QIAGEN (QIAGEN® Plasmid Handbook, Valencia, CA, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA obtenido se suspendió en 50 μ l de agua miliQ estéril, la pureza y cuantificación del DNA se determinó mediante

espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000, las muestras de DNA con valores superiores a 1.75 y 2.0 en una absorbancia de 260-280nm y 260-230nm respectivamente fueron consideradas libres de contaminantes, posteriormente se realizaron alícuotas a una concentración de 100 ng/μl y las secuencias plasmídicas se mandaron a confirmar mediante secuenciación en la compañía MACROGEN USA.

7.2.1.3. Microinyección de embriones para obtener las líneas de moscas transgénicas UAS-ECFP-TFIIIEβ

Para la obtención de moscas transgénicas, se realizaron alícuotas de 50 μg del DNA plasmídico en tubos de 1.5 ml estériles y se enviaron a la compañía Best Gene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) donde se llevó a cabo la microinyección en embriones de *D. melanogaster* y el balanceo genético de cromosomas. Las líneas transgénicas de los embriones que alcanzaron la etapa adulta después de la microinyección y balanceo cromosómico fueron enviadas por la compañía de microinyección a nuestro laboratorio donde se añadieron al stock general de la Unidad de Biología del Desarrollo.

7.2.1.4. Mantenimiento y amplificación de moscas transgénicas

Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas fueron mantenidas a 18°C en viales con comida estándar y transferidas a comida fresca una vez a la semana. Las amplificaciones masivas de moscas se realizaron en frascos con comida estándar suplementada con levadura activada y se incubaron a 25°C.

7.2.1.5. Sexado, colecta y realización de cruza

Para la selección de moscas transgénicas, se utilizó CO₂ para anestesiarse los individuos en una plataforma porosa de polietileno donde fueron observadas al estereoscopio. La selección entre hembras y machos fue realizada con base en el dimorfismo sexual de acuerdo con las siguientes características (Fig. 10).

- a) El tamaño de las hembras (♀) es mayor que el de los machos (♂).
- b) Las hembras tienen los últimos tres segmentos abdominales separados y de coloración uniforme; mientras que los machos presentan los tres segmentos abdominales fusionados y melanizados.
- c) La punta del abdomen en las hembras es puntiaguda en contraste con la de los machos que es redondeada.

d) Los machos presentan peines sexuales en la región basal del tarso del primer par de patas observables como una hilera de 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine.

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

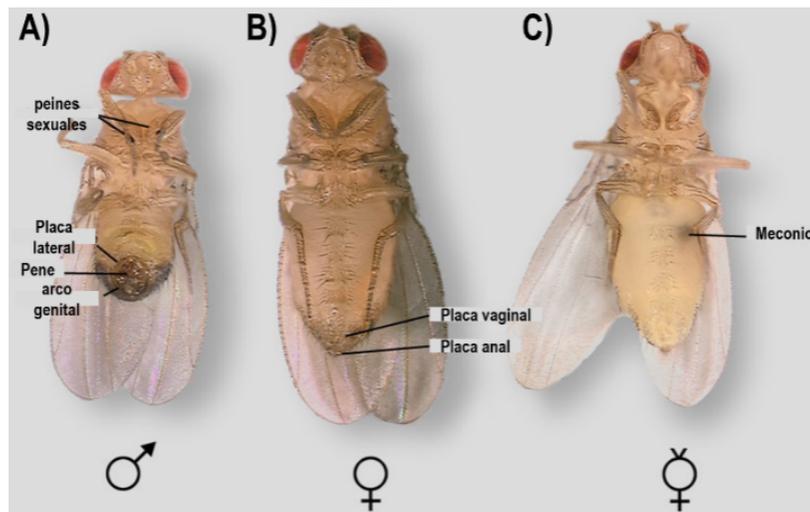


Figura 10.- Dimorfismo sexual de *Drosophila melanogaster*. Vista ventral de individuos de *Drosophila*. **A)** Se muestra un macho de *Drosophila*, el tamaño es menor respecto a la hembra de la derecha, la terminación roma del abdomen y el área genital al final de éste, y en el primer par de patas se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

Tomada de Altamirano-Torres 2019

7.2.1.6. Detección del transgén ECFP-N1-TFIIIE β en *D. melanogaster*

Para confirmar la presencia de la secuencia codificante para ECFP-N1-TFIIIE β en moscas transgénicas, se realizó la extracción de DNA genómico (DNAG) de individuos

adultos que presentaban el marcador fenotípico CiD⁺ visualizado en la cuarta vena longitudinal del ala de *Drosophila melanogaster*. Para la extracción del DNAg se colectaron 10 moscas que contenían el marcador fenotípico por tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubaron en hielo durante 30 minutos, posteriormente los individuos fueron triturados con ayuda de pistilos de plástico para microtubos estériles con 200 µl de Buffer A (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% SDS), para homogeneizar correctamente el tejido triturado se agregaron 200 µl de Buffer A. La muestra fue incubada por 30 minutos a 65°C. Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron 800 µl del Buffer B (Acetato de potasio 5M, LiCl 6M) posteriormente las muestras fueron mezcladas por inversión e incubadas en hielo durante 10 minutos. Al término de la incubación se realizó una centrifugación de 5 minutos a 12,000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante fue retirado y mezclado con 600 µl de isopropanol en tubos nuevos de 1.5 ml. Los tubos fueron mezclados por inversión y se incubaron durante 1 hora en hielo, posteriormente fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue desechado y el pellet se lavó con 100 µl de etanol 70% centrifugando a 12,000 rpm por 5 minutos, Finalmente se retiró el etanol 70% y el DNA fue resuspendido en 50 µl de agua miliQ. El DNAg previamente obtenido fue utilizado como templado para detectar por PCR el transgén ECFP-N1-TFIIIEβ, la reacción de PCR, así como los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación para la detección del transgén ECFP-N1-TFIIIEβ

Oligonucleótidos	Condiciones de amplificación		
	Proceso	Temperatura	Tiempo
Oligo 5' Venus 5' GCGGCCGCATCTCCCGGG GGATCCACC	Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
	Desnaturalización	94 °C	30 seg
Oligo 3' hTFIIIEβ3' Agel GCACCGGTGCTCCACCTAA TTTGCTGGAAGTAATGTCA GAGTAATC	Alineamiento	50.7/53.5/56.0/59.8 °C	30 seg
	Elongación	72 °C	1.30 min
	Elongación Final	72 °C	5 min

7.2.1.7. Sistema Binario UAS/GAL4

Para determinar el efecto de los complejos triméricas Antp-TBP-TFIIIEβ/Exd *in vivo* se realizaron cruza genéticas de *D. melanogaster* con la finalidad de dirigir la

expresión de las proteínas de interés en embriones y discos imaginales utilizando el sistema binario UAS-GAL4 (Brand y Perrimon, 1993) basado en la cruce de una línea productora o driver, la cual contendrá en su genoma una región potenciadora (Enhancer) tejido-específica que controla la expresión de la proteína transactivadora GAL4 (Figura 11A) y una línea reportera la cual contiene una sitios UAS (Upstream Activator Sequence, por sus siglas en inglés) donde se une el transactivador GAL4 para promover la expresión del transgén de interés rio abajo (Figura 11B). En la descendencia de dichas cruza la proteína GAL4 expresada de forma tejido-específica se anclará en las regiones UAS ubicadas rio arriba del gen de interés, activando la trascrición de nuestro gen de interés en las regiones específicas del driver (Figura 11C).

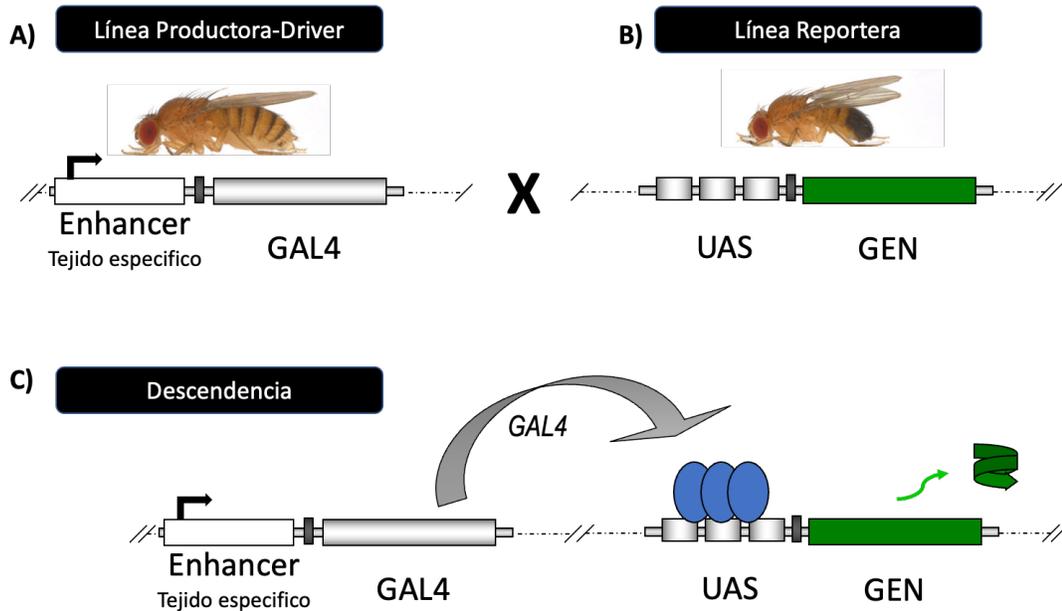


Figura 11.- Sistema Binario UAS-GAL4. En la figura se esquematiza el sistema binario UAS/GAL4 el cual se basa en cruza de moscas transgénicas. **A)** Muestra línea productora o driver que expresa la proteína transactivadora GAL4 regulada por un promotor o potenciador tejido-específico. **B)** Línea reportera que codifica la proteína de interés bajo el control de sitios UAS ubicados rio arriba, a los que se une la proteína GAL4. **C)** La cruce entre ambas líneas permitirá que en la progenie que contenga ambos transgenes exprese la proteína de interés tejido-específico del promotor o enhancer de la línea GAL4.

7.2.1.8. Cruzas genéticas para determinar el efecto del complejo Antp-TBP-TFII β en larvas de 1er estadio de *D. melanogaster*

Para determinar el efecto del complejo trimérico en *D. melanogaster* se dirigió la expresión de VCantp, VNTBP junto con el factor transcripcional TFII β fusionado a ECFP en embriones de *Drosophila melanogaster*, utilizando el driver *nullo*-GAL4. Para

ello se realizaron cruzas genéticas, para la 1er crza se seleccionaron 100 hembras vírgenes UAS-VCAntp y 35 machos UAS-VNTBP para obtener individuos que contenían los transgénos codificantes para VCAntp y VNTBP, mediante esta crza se obtuvo la línea UAS-VCAntp;UAS-VNTBP (Figura 12A). En paralelo se realizaron las cruzas: *nullo*-GAL4 por UAS-ECFP-TFIIIE β y VCAntp por UAS-ECFP-TFIIIE β (Figura 12B-C respectivamente), así como la amplificación de las líneas VCAntp y *nullo*-GAL4. Todas las cruzas fueron mantenidas en frascos con comida estándar y levadura seca granulada activa a 25°C.

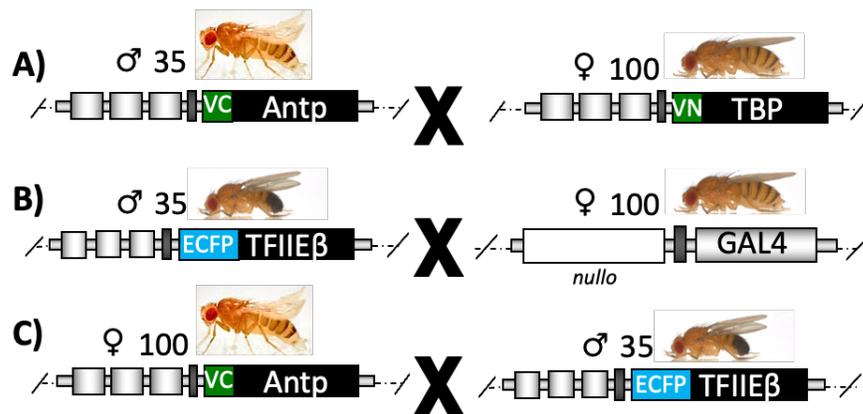


Figura 12.- Esquema de cruza genética para obtener las líneas UAS-VCAntp;UAS-VNTBP, UAS-ECFP-TFIIIE β ;nullo-GAL4 y UAS-VCAntp;UAS-ECFP-TFIIIE β . La figura muestra la estrategia genética para integrar los transgenes de interés. **A)** El esquema muestra la crza entre las líneas reporteras UAS VCAntp y UAS VNTBP mostrando como resultado la generación de moscas con ambos transgenes. **B)** Se ilustra la crza entre las líneas UAS-ECFP-TFIIIE β con la línea productora *nullo*-GAL4 para la obtención de individuos que contengan los transgenes en conjunto con la proteína transactivadora y el driver tejido específico. **C)** El esquema muestra la crza entre individuos con los transgenes UAS-VCAntp y UAS-ECFP-TFIIIE β para generar la línea UAS-VCAntp;UAS-ECFP-TFIIIE β .

Finalmente, para la siguiente crza se seleccionaron individuos con ausencia de marcadores fenotípicos, se realizaron cruza en proporción 3:1 para lo cual se colectaron 150 hembras y 50 machos de las líneas UAS-ECFP-TFIIIE β ;nullo-GAL4 y UAS-VCAntp;UAS-VNTBP respectivamente como se esquematiza en la figura 13A. Para determinar que el efecto encontrado fue dado por el complejo trimérico se incluyeron las cruza de complejos diméricos VCAntp;UAS-VNTBP y VCAntp;UAS-ECFP-TFIIIE β por *nullo*-GAL4, y como controles se incluyeron las cruza VCAntp y *nullo*-GAL4 por *nullo*-GAL4 en las mismas proporciones (Figura 13B-E). Todas las cruza fueron mantenidas en frascos con comida estándar suplementada con levadura seca activa a 25°C durante 3 días para permitir el apareamiento.

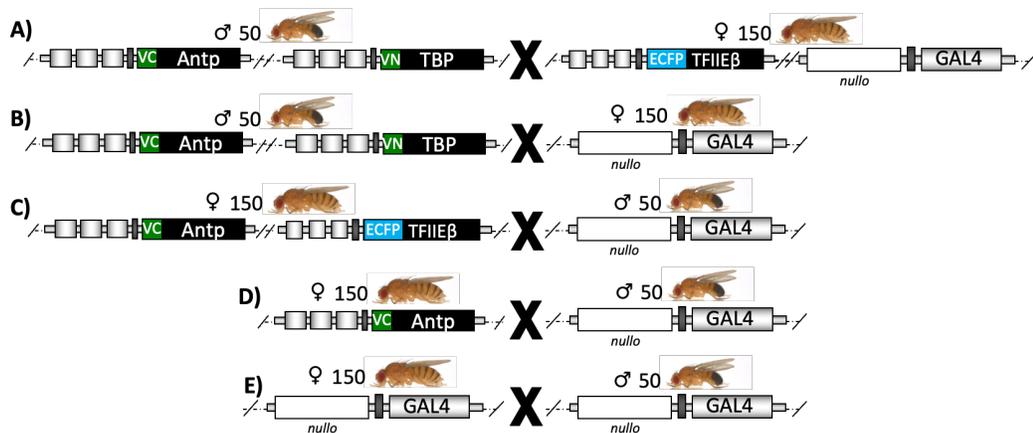


Figura 10.- Esquema de cruzas para dirigir la expresión ectópica del complejo Antp-TBP-TFIIIEβ en embriones de *D. melanogaster*. La figura muestra la estrategia genética para dirigir los complejos proteicos en estadio embrionario utilizando el driver *nullo*-GAL4. **A)** El esquema muestra la cruce de 50 machos UAS-VCAntp;UAS-VNTBP con 150 hembras UAS-ECFP-TFIIIEβ;*nullo*-GAL4. **B)** Se esquematiza la cruce entre machos UAS-VCAntp;UAS-VNTBP con hembras *nullo*-GAL4. **C)** El diagrama muestra la cruce entre machos UAS-VCAntp;UAS-VNTBP con machos *nullo*-GAL4. **D-E)** El esquema ilustra la cruce entre hembras UAS-VCAntp y *nullo*-GAL4 con machos *nullo*-GAL4.

7.2.1.9. Colecta y procesamiento de embriones para el análisis de cutículas embrionarias

Las cruzas genéticas descritas anteriormente fueron transferidas a matraces de plástico con perforaciones en la base y se les colocara en la boca del matraz una placa de Petri con agar de puesta suplementado con jugo de uva y levadura seca granulada, las cruzas se incubaron a 25°C toda la noche. Al día siguiente, las cruzas se colocaron en nuevas placas de puesta y se incubaron para la ovoposición durante 2 horas a 25°C. Transcurrido ese tiempo los adultos fueron retirados y las placas de puesta con embriones se incubaron a 25°C durante 5.5 horas para permitir el desarrollo de los embriones. Posteriormente, los embriones se decorionizaron cuidadosamente con hipoclorito de sodio (Cloralex) al 4% durante 3 min y se pasarán a través de un filtro/embudo con una malla para retenerlos, se lavarán con abundante agua destilada, buffer PBX (NaCl, 140 mM; Na₂HPO₄, 7 mM; KH₂PO₄, 3 mM; TRITON X-100, 0.1%) y se enjuagarán nuevamente con agua destilada. Las mallas con los embriones decorionizados se retiraron de los embudos, se colocarán en placas de puesta sobre agar cubierto con papel filtro humedecido en agua destilada y se sellaron con Parafilm para incubarlos a 25°C durante 24 horas para permitir el desarrollo hasta el primer estadio larvario antes de la eclosión (Gibson & Gehring, 1988).

7.2.1.10. Preparación de embriones para la visualización de cutículas embrionarias

Para la observación de las cutículas embrionarias, las larvas del primer estadio contenidos en la malla previamente incubada, se sumergieron dentro de tubos de 1.5 ml con una solución de 500 µl de heptano y 500 µl de metanol absoluto usando pinzas de disección, las larvas fueron desprendidas cuidadosamente de la malla mediante inversión y agitación, posteriormente los tubos se colocarán en un brazo de rotación durante 5 min a 90 rpm, transcurrido el tiempo ambos solventes se retiraron mediante pipeteo teniendo cuidado de no aspirar las larvas, enseguida las larvas se lavaron 3 veces con 500 µl de metanol absoluto, los tubos se colocaron en el brazo de rotación por 10 min a 40 rpm. Finalmente, para observar el fenotipo, las larvas embebidas en metanol se colocaron en un portaobjetos permitiendo la evaporación del metanol y las larvas se cubrieron con Visikol (New Brunswick, NJ, USA) para clarificarlas, se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con barniz transparente. Las laminillas fueron analizadas en un microscopio ZEISS Axioskop 40 con objetivos 10X y 40X para la observación y clasificación de los fenotipos obtenidos.

7.3. Análisis del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*

Para determinar el efecto del complejo trimérico en *in vivo* se dirigió la expresión de los transgenes VCAnp, VNTBP y ECFP-Exd en embriones de *Drosophila melanogaster*, utilizando el driver *nullo*-GAL4 para analizar su efecto funcional en la involución de la cabeza, así como en la transformación T1-T2 en larvas de 1er estadio.

7.3.1. Cruzas genéticas para determinar el efecto del complejo Antp-TBP-Exd en larvas de 1er estadio de *D. melanogaster*

Para integrar los transgenes de interés se inició realizando la cruce entre 100 hembras vírgenes UAS-VNTBP y 35 machos UAS-VCAnp para obtener individuos que contenían los transgenes codificantes para VCAnp y VNTBP, mediante esta cruce se obtuvo la línea UAS-VCAnp;UAS-VNTBP como se muestra en la figura 12A. En paralelo se realizaron las cruces: *nullo*-GAL4 por UAS-VNExd y VCAnp por UAS-VNExd (Figura 14A-B respectivamente), así como la amplificación de las líneas VCAnp y *nullo*-GAL4. Todas las cruces fueron mantenidas en frascos con comida estándar y levadura seca granulada activa a 25°C.

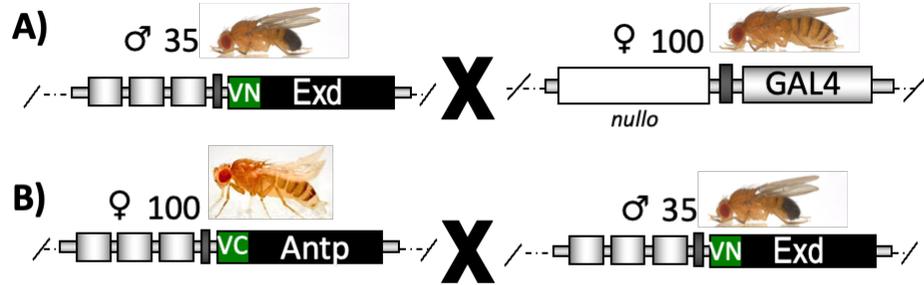


Figura 14.- Esquema de cruza genéticas para obtener las líneas UAS-VNExd;nullo-GAL4 y UAS-VCAntp;UAS-VNExd. La figura ilustra la estrategia genética para la integración de los transgenes mediante cruza. **A)** Muestra la cruz entre la línea reportera UAS-VNExd con la línea productora *nullo-GAL4*. **B)** Esquematiza las cruza entre las líneas reporteras UAS-VCAntp y UAS-VNExd.

Para analizar el efecto del trímero Antp-TBP-Exd se seleccionaron individuos con ausencia de marcadores fenotípicos resultantes de las primeras cruza, en proporción 3:1 se colectaron 150 hembras y 50 machos de las líneas UAS-VNExd;nullo-GAL4 y UAS-VCAntp;UAS-VNTBP respectivamente como se esquematiza en la figura 15A. Para determinar que el efecto encontrado fue dado por el complejo trimérico se incluyeron las cruza de complejos diméricos VCAntp;UAS-VNTBP y VCAntp;UAS-VNExd por *nullo-GAL4* (Fig. 15B-C), y como controles se incluyeron las cruza VCAntp y *nullo-GAL4* por *nullo-GAL4* en las mismas proporciones (Fig. 13D-E). Todas las cruza fueron mantenidas en frascos con comida estándar suplementada con levadura seca activa a 25°C durante 3 días para permitir el apareamiento.

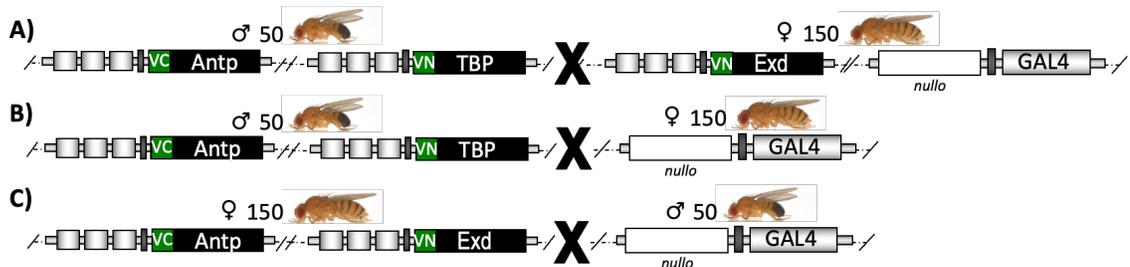


Figura 15.- Esquema de cruz para dirigir la expresión ectópica de los transgenes ECFP-Exd, VCAntp y VNTBP en embriones de *D. melanogaster*. La figura muestra la estrategia para dirigir la expresión ectópica del complejo Antp-TBP-Exd bajo el control del driver *nullo*. **A)** Se muestra la cruz la estrategia para generar la línea UAS-VCAntp;UAS-VNTBP;UAS-ECFP-TFIIIEβ;nullo-GAL4. **B)** Se esquematiza la cruz entre machos UAS-VCAntp;UAS-VNTBP con hembras *nullo-GAL4*. **C)** El diagrama muestra la cruz entre hembras UAS-VCAntp;UAS-ECFP-TFIIIEβ con machos *nullo-GAL4*.

La colecta y el procesamiento de los embriones, así como el montaje de las cutículas resultantes se realizó de acuerdo con la metodología descrita previamente.

7.4. Efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIIE β sobre la transformación antena-pata en *D. melanogaster*

Para determinar el efecto del trímero Antp-TBP-TFIIIE β en transformaciones antena-pata, se realizaron cruzas genéticas para dirigir la expresión ectópica de los complejos triméricos, utilizando los drivers tejido específico *dll*-GAL4 y *dpp*-GAL4 para analizar su participación en la transformación antena-pata en adultos de *D. melanogaster*.

7.4.1. Cruzas genéticas para analizar el efecto funcional del complejo Antp-TBP-TFIIIE β en la transformación antena-pata de *D. melanogaster*

Para analizar el efecto de los complejos triméricos en la transformación antena-pata de *D. melanogaster* se dirigió la expresión ectópica de VCantp, VNTBP y ECFP-TFIIIE β al tercer segmento antenal de *D. melanogaster* utilizando los drivers *dll*-GAL4 y *dpp*-GAL4. Se realizaron cruzas genéticas para la obtención de individuos que contenían los transgenes codificantes para VCantp y VNTBP, colectando 24 hembras vírgenes de la línea UAS-VCantp y 8 machos de la línea UAS-VNTBP para generar la línea UAS-VCantp;UAS-VNTBP como se esquematiza en la Figura 16A. Al mismo tiempo se realizaron las cruzas para integrar los transgenes UAS-VCantp;UAS-ECFP-TFIIIE β , UAS-ECFP-TFIIIE β ; *dll*-GAL4 y UAS-ECFP-TFIIIE β ; *dpp*-GAL4 como se esquematiza en la figura 16B-D. Las cruzas fueron realizadas en tubos con comida estándar suplementada con levadura seca activa y mantenidas a 25°C.

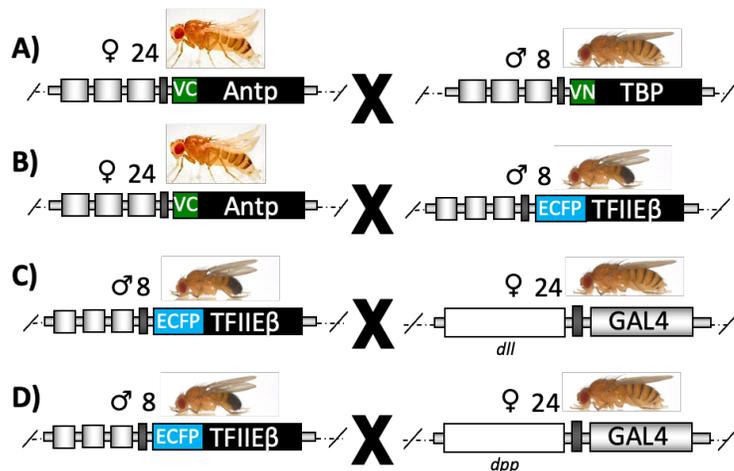


Figura 16. Esquema de cruzas para integrar VCantp;VNTBP, VCantp;ECFP-TFIIIE β y ECFP-TFIIIE β ; *dll*-GAL4/*dpp*-GAL4. A) Se muestra la cruce la estrategia para generar la línea UAS-VCantp;UAS-VNTBP. B) UAS-VCantp;UAS-ECFP-TFIIIE β . C) UAS-ECFP-TFIIIE β ; *dll*-GAL4 y D) UAS-ECFP-TFIIIE β ; *dpp*-GAL4.

La descendencia de cada cruce que contenían ambos transgenes se seleccionó mediante la ausencia de marcadores fenotípicos. Finalmente la 3er cruce, se realizó con las líneas UASVCAntp;UASVNTBP e individuos de las líneas UAS-ECFP-TFIIIE β ;dll-GAL4 ó UAS-ECFP-TFIIIE β ;dpp-GAL4 (Fig. 16A-B). Los controles experimentales se realizaron mediante las siguientes cruces: 8 machos UASVCAntp;UASVNTBP por 24 hembras *dpp-GAL4/dll-GAL4*, 24 hembras UASVCAntp;UAS-ECFP-TFIIIE β con 8 machos *dpp-GAL4/dll-GAL4*, 24 hembras UASVCAntpHD por 8 machos *dll-GAL4*, 24 hembras UASVCAntp por 8 machos *dpp-GAL4* como se muestra en la figura 17C-G. Todas las cruces se mantuvieron a 25°C en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

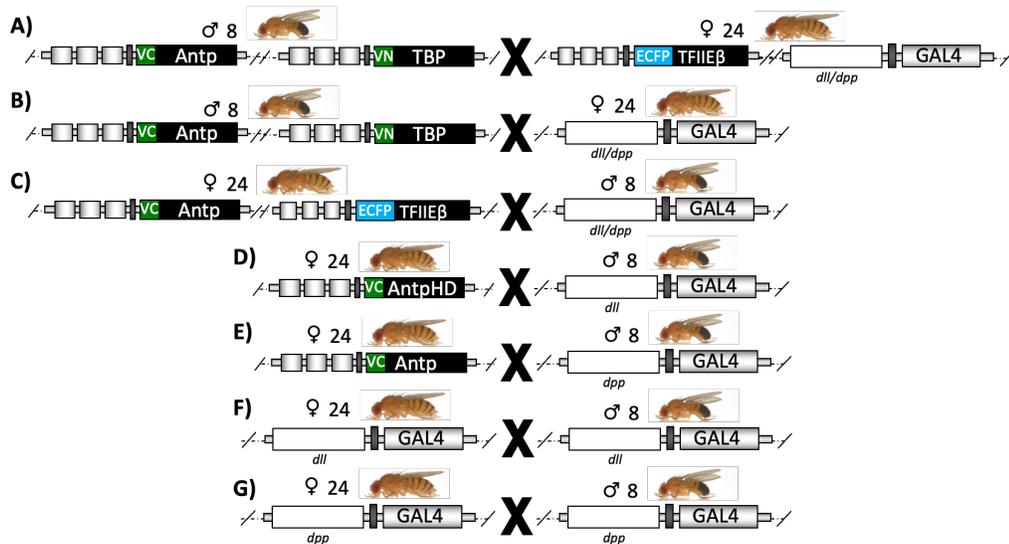


Figura 17. Estrategia genética para analizar el efecto del complejo Antp-TBP-TFIIIE β en la transformación antena-pata. La figura muestra el esquema de cruces para generar las líneas **A)** VCAntp;VNTBP;ECFP-TFIIIE β ;dll-GAL4/dpp-GAL4, **B)** VCAntp;VNTBP;dll-GAL4/dpp-GAL4, **C)** VCAntp; ECFP-TFIIIE β ;dll-GAL4/dpp-GAL4, **D)** VCAntpHD;dll-GAL4, **E)** VCAntp;dpp-GAL4, **F)** dll-GAL4;dll-GAL4 y **G)** dpp-GAL4;dpp-GAL4.

7.4.2. Disección de discos imaginales

Para la disección de discos imaginales, 30 larvas de 3er estadio fueron seleccionadas y colocadas en un portaobjetos con una gota de PBS pH 7.5, las larvas fueron disectadas con agujas de insulina para el aislamiento del racimo de discos imaginales, posteriormente los discos fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 μ l de PBS a 4 °C por 12 h o hasta su uso.

7.4.3. Inmunodetección en discos imagínales

Los discos imagínales una vez aislados del resto de la larva, fueron lavados con PBS pH 7.5 y fijados con 100 µl de paraformaldehído (PFA) durante 10 minutos a temperatura ambiente, una vez fijados los discos se permeabilizaron con 200 µl de PBT (PBS + Triton X-100 al 0.1%) durante 1 h a 50 rpm, posteriormente se retiró la solución permeabilizadora y se añadieron 500 µl de solución de bloqueo (PBT + BSA 10%) y se incubó 1 h a 50 rpm, transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución de bloqueo y se colocaron los anticuerpos primarios: ratón anti-Antp 4C3 1:50 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa), conejo anti-TBP 1:350 (ab171969, abcam, Cambridge, MA, USA), conejo anti-TFIIEβ 1:350 (ab187143, abcam, Cambridge, MA, USA) y pollo anti-GFP 1:500 (ab13970, abcam, Cambridge, MA, USA) diluidos en 80 µl de solución de anticuerpo (PBT + BSA 1%), los discos fueron incubados a 4°C toda la noche a 50 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el anticuerpo fue retirado y se realizó un lavado rápido con 500 µl de PBT, seguidos de 3 lavados por 30 minutos a 50 rpm. Una vez eliminado el anticuerpo primario se colocó el anticuerpo secundario correspondiente: Alexa Fluor plus 555 anti-ratón 1:1000 (A32727, Invitrogen, USA), Alexa Fluor plus 488 anti-ratón 1:1000 (A32731, Invitrogen, USA) y Alexa Fluor plus 488 anti-pollo 1:1000 (ab150173, abcam, Cambridge, MA, USA), diluido en 80 µl de solución de anticuerpo (PBT + BSA 1%), los tubos fueron envueltos en papel aluminio e incubados a temperatura ambiente durante 3 h a 50 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un lavado rápido por inversión y 2 lavados de 3 minutos a 50 rpm con PBT, posteriormente se realizó un lavado rápido con 500 µl de PBS + Tween 20 (0.05%). En este punto los discos pueden ser almacenados a -20°C en 200 µl de metanol absoluto. Finalmente, los discos fueron montados en portaobjetos con solución Vectashield (Vector Laboratories, Southfield, MI, USA), se colocó encima un cubreobjetos cuidando de no dañar los discos imagínales, la fluorescencia fue observada y la foto documentada en un microscopio de EPI fluorescencia ZEISS. Las imágenes adquiridas fueron analizadas en el programa de uso libre ImageJ (NIH).

7.4.4. Disección de cabezas y antenas de *D. melanogaster*

Los individuos de la 3er cruza se transfirieron cada 24 horas a nuevos tubos de comida durante 4 días consecutivos y la progenie resultante se dejaron desarrollar hasta individuos adultos, para posteriormente ser anestesiados con CO₂ y observados al estereoscopio, de esta manera se identificaron los fenotipos resultantes de los complejos analizados.

La disección de las cabezas y antenas se realizó con ayuda de agujas para insulina y se transfirieron a portaobjetos para observarlas al microscopio de luz y fotografiarlas, una vez capturadas las imágenes de las cabezas se retiraron las antenas para foto documentarlas. Se utilizó un microscopio ZEISS Axioskop 40 con un objetivo 10X, las fotografías se realizaron con una cámara Canon Power Shot A640 montada al microscopio y modificada con un lente de 52 mm. Las fotografías fueron tomadas sin encender la luz del microscopio en un cuarto bien iluminado, se colocó una hoja blanca en la platina sobre la que se posaron las laminillas. Se utilizaron los siguientes parámetros en la cámara:

- a) Sin flash
- b) Modo retrato y para tomas cercanas
- c) El tamaño de la imagen se estableció en S (superfina) y L (máximos pixeles)

Las fotografías se capturaron recorriendo el eje en Z de las cabezas girando el micrométrico del microscopio, en promedio fueron capturadas de 50-60 fotografías de cada cabeza y 20-30 de cada antena. El grupo de fotografías de cada cabeza y antena se procesaron con el software de procesamiento de imagen Helicon Focus 6 (Helicon Soft) usando el método C (pyramid) para crear una única imagen nítida.

7.5. Efecto funcional del trímero Antp-TBP-Exd sobre la transformación antena-pata en *D. melanogaster*

Para determinar el efecto del trímero Antp-TBP-Exd en transformaciones antena-pata, se realizaron cruza genéticas para dirigir la expresión ectópica del complejo trimérico previamente evidenciado, con los drivers tejido específico *dll-GAL4* y *dpp-GAL4* para analizar su efecto funcional en la transformación antena-pata en adultos de *D. melanogaster*.

7.5.1. Cruzas genéticas para analizar el efecto funcional de las interacciones triméricas en la transformación antena-pata en *D. melanogaster*

Para analizar el efecto las interacciones triméricas en la transformación antena-pata en *D. melanogaster* se dirigió la expresión de VCAntp, VNTBP y VNExd al tercer segmento antenal de *D. melanogaster* utilizando los drivers *dll*-GAL4 y *dpp*-GAL4. Para ello se realizaron cruzas genéticas, en la 1er crusa se colectaron individuos que contenían los transgenes VCAntp y VNTBP; VCAntp y VNExd, de esta manera tendremos la línea UASVCAntp;UASVNTBP y UASVCAntp;UASVNExd como se esquematiza en la Figura 12A-B. Al mismo tiempo se realizó una 2da crusa, entre individuos que contenían el transgén VNExd con aquellos individuos que contenían el driver *dll*-GAL4 ó *dpp*-GAL4 para obtener líneas UAS-VNExd;*dll*-GAL4 y UAS-VNExd;*dpp*-GAL4 (Figura 18C-D).

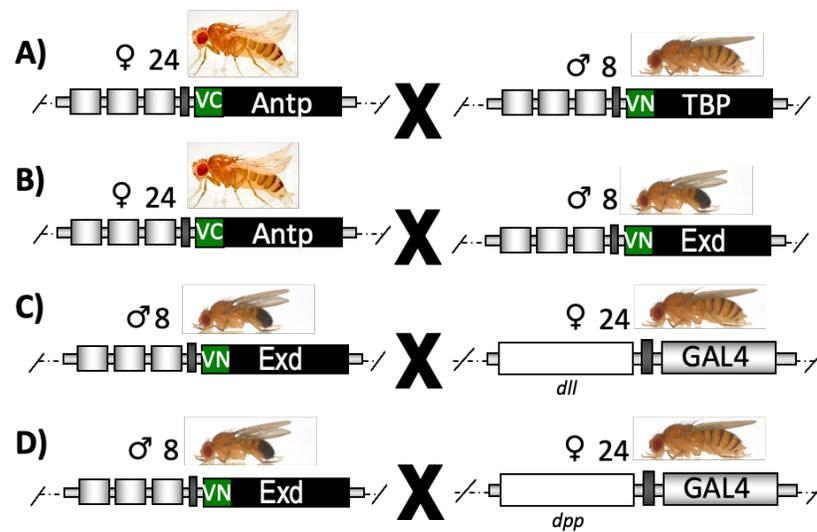


Figura 18. Esquema de cruzas para integrar los transgenes VCAntp;VNTBP, VCAntp;VNExd, VNExd;*dll*-GAL4/*dpp*-GAL4. La figura esquematiza las cruzas genéticas para generar las líneas A) UAS-VCAntp;UAS-VNTBP, B) UAS-VCAntp;UAS-VNExd, C) UAS-VNExd;*dll*-GAL4 y D)UAS-VNExd;*dpp*-GAL4.

La descendencia de cada crusa que contenían ambos transgenes se seleccionó mediante la ausencia de marcadores fenotípicos. Finalmente la 3er crusa, se realizó con las líneas UAS-VCAntp;UAS-VNTBP e individuos de las líneas UAS-VNExd;*dll*-GAL4 ó UAS-VNExd;*dpp*-GAL4 como se muestra en la figura 19A-B, como controles experimentales se incluyen las cruzas UAS-VCAntp;UAS-VNTBP;*dll*-GAL4/*dpp*-GAL4, UAS-VCAntpHD;*dll*-GAL4, UAS-VCAntp;*dpp*-GAL4, *dll*-GAL4;*dll*-GAL4 y

dpp-GAL4/dpp-GAL4 (Fig. 17B, D-G). Todas las cruzas se mantuvieron a 25°C en frascos con comida suplementada con levadura seca activa.

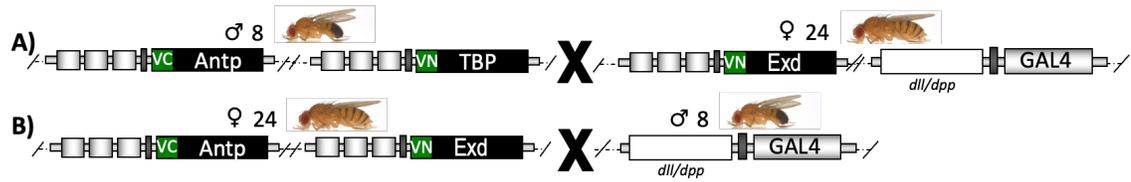


Figura 19. Estrategia para analizar el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en la transformación antena-pata. La figura esquematiza las cruzas genéticas para generar las líneas **A)** VCAntp;VNTBP;VNExd;*dll-GAL4/dpp-GAL4* y **B)** VCAntp;VNExd;*dll-GAL4/dpp-GAL4*.

La disección de cabezas y antenas se realizó de acuerdo como se describió anteriormente.

8. RESULTADOS

8.1. Confirmación de las interacciones triméricas de Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2 usando versiones mutantes de Antp

8.1.1. Caracterización molecular de los plásmidos pCS2-VC155Antp Δ HD, Antp^{I32A-H36A}, Antp Δ N, Antp^{AAAA}, Antp, pCS2VNm9TBP y pECFP-N1-TFIIE β , -Exd, y BIP2

Para confirmar la formación de los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β , Exd y BIP2, primero realizamos la caracterización molecular de los plásmidos utilizados para las cotransfecciones en células HEK293. La identidad de los plásmidos utilizados en los ensayos de BiFC-FRET fue determinada por ensayos de PCR y enzimas diagnósticas de restricción. Los plásmidos que contenían las secuencias codificantes para VCantp, así como las versiones mutantes utilizadas, fueron caracterizados mediante PCR permitiéndonos confirmar la presencia de las secuencias correspondientes. Para Antp Δ HD se utilizaron oligonucleótidos que hibridan en la región N-terminal de Antp y la secuencia C-terminal de Venus obteniendo un amplicón correspondiente para 801pb (Fig. 20A). Para las versiones: VCantp^{I32A-H36A} (1438pb), VCantp Δ N (650pb), VCantp^{AAAA} (1438pb) y VCantp (1438pb) se utilizaron oligonucleótidos específicos que hibridan en la secuencia codificante para VC y en la región C-Terminal de Antp como se muestra en la Figura 20A.

La caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VNm9TBP fue realizada con las enzimas de restricción *Hind*III, *Eco*RI y *Bam*HI (Fig. 20B), pECFP-N1-BIP2 fue caracterizado con *Pvu*II, *Xho*I y *Nde*I, pECFP-N1-TFIIE β fue caracterizado con las enzimas *Hind*III, *Eco*RI y *Bam*HI, el plásmido pECFP-N1-Exd se caracterizó con *Pvu*II, *Sal*I y *Eco*RI como se muestra en la figura 20C-E.

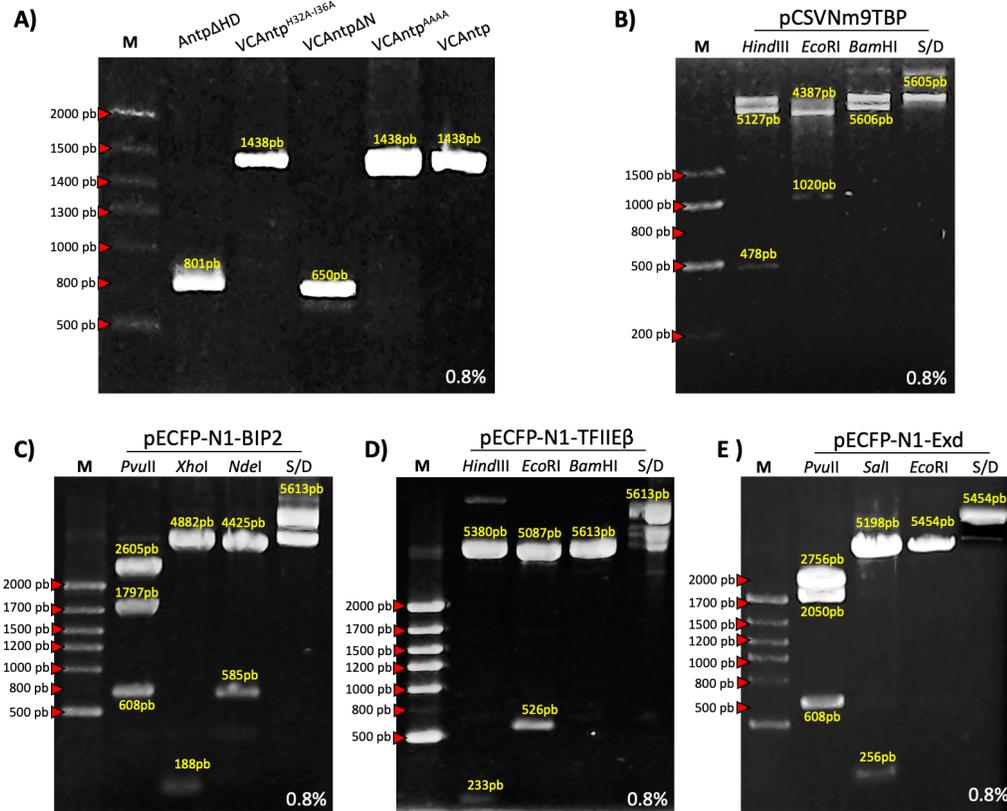


Figura 20. Caracterización molecular de los plásmidos pCS2-VC155AntpΔHD, -Antp^{I32A-H36A}, -AntpΔN, -Antp^{AAAA}, -Antp, pCS2VNm9TBP, pECFP-N1-TFIIIEβ, -Exd y -BIP2. A) El gel muestra la caracterización molecular por PCR de los plásmidos: pCS2VC155AntpΔHD carril 2 (801pb), carril 3 pCS2-VC155Antp^{I32A-H36A} (1438pb), carril 4 pCS2-VC155AntpΔN (650pb), carril 5 pCS2-VC155Antp^{AAAA} (1438pb), carril 6 pCS2-VC155Antp (1438pb). B) pCS2VNm9VNTBP fue digerido con *Hind*III (5124 y 478pb) carril 2, *Eco*RI (4387 y 1020pb) carril 3, *Bam*HI (5606pb) carril 4, en el carril 5 se muestra el plásmido sin digerir (S/D). C) pECFP-N1-BIP2 caracterizado con *Pvu*II (2605, 1797 y 608pb) carril 2, *Xho*I (4882 y 188pb) carril 3, *Nde*I (4425 y 585pb) carril 4, en el carril 5 se muestra el plásmido sin digerir (S/D). D) pECFP-N1-TFIIIEβ fue digerido con *Hind*III (5380 y 233pb) carril 2, *Eco*RI (5087 y 526pb) carril 3, *Bam*HI (5613pb) carril 4, el carril 5 muestra el plásmido sin digerir (S/D). E) pECFP-N1-Exd caracterizado con *Pvu*II (2756, 2050 y 608pb) carril 2, *Sal*I (5198 y 256pb) carril 3, *Eco*RI (5454pb) carril 4, el carril 5 muestra el plásmido sin digerir (S/D). M indica marcador de peso molecular en pares de bases, usando agarosa al 0.8%.

8.1.2. Confirmación de la formación del complejo Antp-TBP-TFIIIEβ usando versiones mutantes de Antp

Para confirmar la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIIEβ en cultivo celular se cotransfectaron los plásmidos codificantes para versiones mutantes de Antp que comprometen la interacción trimérica con las proteínas de fusión VNTBP y ECFP-TFIIIEβ. Los resultados obtenidos indicaron que el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIEβ mostró una interacción trimérica fuerte obteniendo un valor de $E=0.48\pm 0.25$ (Fig 21B). La confirmación de formación del complejo trimérico se realizó al utilizar una mutante de

Antp ausente de glutaminas en el extremo N-terminal que disrrumpe la formación del dímero Antp Δ N-TBP. Como lo esperabamos, encontramos una disminución en el valor de transferencia de energía $E=0.17\pm0.10$ (Fig. 21C), indicando que la región polyQ de Antp es importante para la formación del complejo trimérico (Fig. 21F).

Además, cuando analizamos la mutante de Antp con el HD deletado, encontramos una disminución en la formación del complejo triméricos indicado por un valor de transferencia de energía dramáticamente disminuido $E=0.13\pm0.09$ (Fig. 21D), debido a que Antp Δ HD afecta la formación del dímero con TFIIE β . Estos resultados indican que además de las glutaminas de Antp, el HD es otro dominio clave importante para la formación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β . En paralelo decidimos analizar si los residuos aminoácidos 32 y 36 de la hélice 1 de Antp también son importantes para esta interacción trimérica, ya que estos dos residuos aminoácidos afectan también la formación dimérica de Antp-TFIIE β . Nuestros resultados muestran un valor de $E=0.17\pm0.10$ (Fig. 21E), indicando una disminución de la transferencia de energía, comparado con el trímero Antp-TBP-TFIIE β ($E=0.48\pm0.25$), revelando que específicamente los residuos aminoácidos 32 y 36 del HD de Antp son pieza clave para establecer la formación trimérica Antp-TBP-TFIIE β (Fig. 21F).

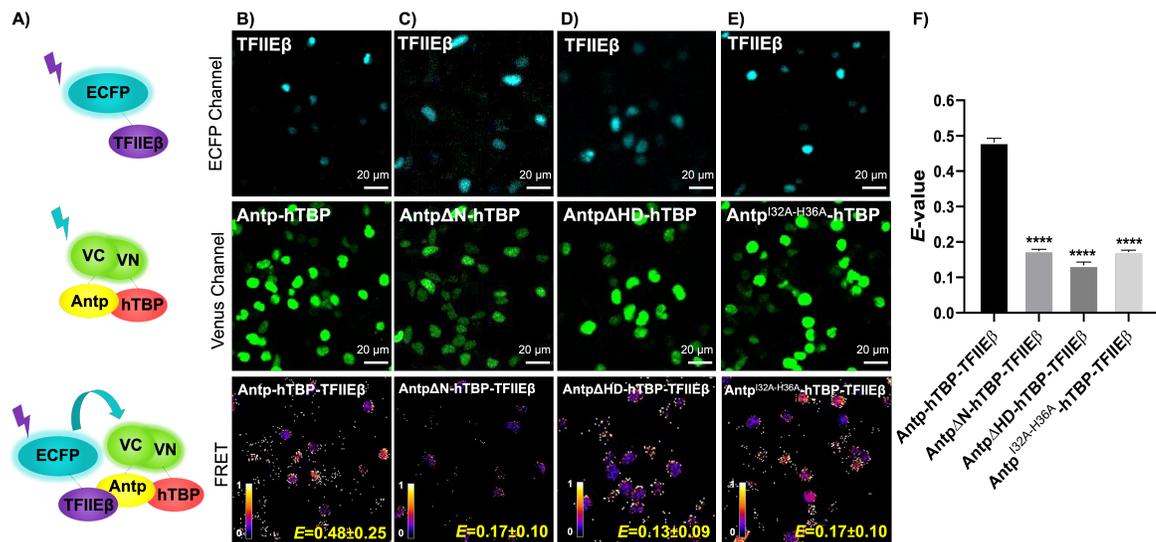


Figura 21. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β es dependiente de la región polyQ y de los residuos 32 y 36 de la hélice 1 del HD de Antp. La figura muestra la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIE β . A) Se esquematiza de arriba hacia abajo la fluorescencia de ECFP-TFIIE β , la interacción dimérica Antp-TBP y la interacción trimérica Antp-TBP-TFIIE β . Los campos superiores muestran la expresión de ECFP-TFIIE β , las imágenes centrales muestran la interacción dimérica Antp-TBP, Antp Δ N-TBP, Antp Δ HD-TBP y Antp^{I32A-H26A}-TBP, respectivamente. Las imágenes inferiores muestran las interacciones

triméricas: **B)** Antp-TBP-TFIIE β ($E=0.48\pm0.25$), **C)** Antp Δ N-TBP-TFIIE β ($E=0.17\pm0.10$), **D)** Antp Δ HD-TBP-TFIIE β ($E=0.13\pm0.09$) y **E)** Antp^{I32A-H26A}-TBP-TFIIE β ($E=0.17\pm0.10$). **F)** La gráfica representa tres ensayos por triplicado y muestra diferencias altamente significativas (****= $p\leq 0.001$) entre el trímero Antp-TBP-TFIIE β con los trímeros Antp Δ HD-TBP-TFIIE β , AntpHD-TBP-TFIIE β , y Antp^{I32A-H26A}-TBP-TFIIE β analizado con ANOVA de una vía por comparación de medias. La barra de colores representa la intensidad de FRET (modo fire) colores oscuros representan interacciones triméricas débiles, mientras que colores más claros representan interacciones triméricas más fuertes.

8.1.3. Validación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd usando versiones mutantes de Antp

Para confirmar la interacción trimérica Antp-TBP-Exd en cultivo celular se co-transfectaron plásmidos codificantes para versiones mutantes de VCAntp que comprometen la interacción trimérica con las secuencias codificantes para VNTBP y ECFP-Exd. Nuestros resultados mostraron un valor alto de $E=0.41\pm0.23$, indicando la formación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd como se muestra en la figura 22B. Al utilizar una mutante de Antp con el extremo N-terminal deletado que afecta el dímero AntpHD-TBP, encontramos una disminución en el valor de transferencia de energía $E=0.14\pm0.09$ (Fig. 22C), indicando que la región polyQ de Antp es importante para la formación del complejo trimérico con Exd (Fig. 22E).

Adicionalmente, cuando analizamos la mutante de Antp con el motivo YPWM mutado sustituido por AAAA (Antp^{AAAA}), que afecta la interacción con Exd, también encontramos una disminución en el valor de transferencia de energía $E=0.21\pm0.13$ (Fig. 22D), indicando que además de las glutaminas de Antp el motivo YPWM también es un dominio importante para la formación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd. (Fig. 22E).

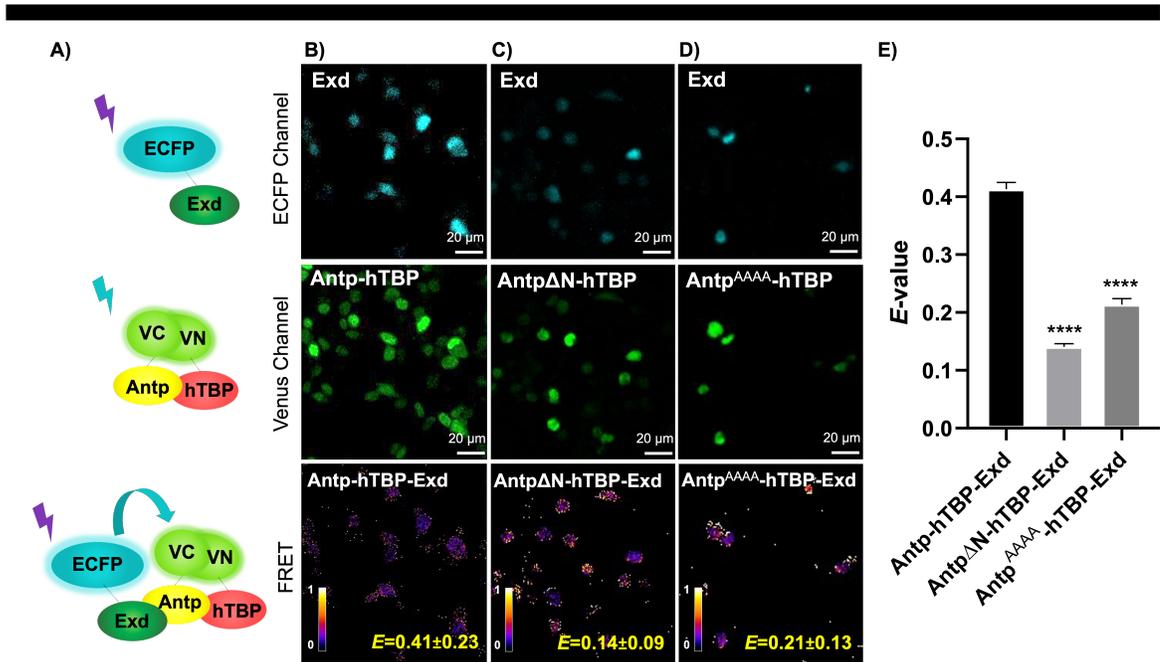


Figura 22.- La formación de Antp-TBP-Exd es dependiente de la región polyQ y el motivo YPWM de la homeoproteína Antp. La figura muestra la interacción trimérica Antp-TBP-Exd. A) de la parte superior a inferior se esquematiza la fluorescencia de ECFP-Exd, las interacciones dimerica Antp-TBP y trimérica Antp-TBP-Exd. Los campos superiores muestran la expresión de ECFP-Exd, las imágenes centrales muestran la interacción dimerica Antp-TBP, Antp Δ N-TBP y Antp^{AAAA}-TBP, respectivamente. Las imágenes inferiores muestran las interacciones triméricas: **B)** Antp-TBP-Exd ($E=0.41\pm0.23$), **C)** Antp Δ N-TBP-Exd ($E=0.14\pm0.09$), **D)** Antp^{AAAA}-TBP-Exd ($E=0.21\pm0.13$). **E)** La gráfica representa tres experimentos por triplicado y muestra diferencias altamente significativas (****= $p \leq 0.001$) entre el trímero Antp-TBP-Exd con los trímeros Antp Δ N-TBP-Exd y Antp^{AAAA}-TBP-Exd analizados con ANOVA de una vía por comparación de medias. La barra de colores representa la intensidad de FRET (modo fire) colores oscuros representan interacciones triméricas débiles, mientras que colores más claros representan interacciones triméricas más fuertes.

8.1.4. BIP2 no forma complejos triméricos con Antp y TBP

Para confirmar la interacción de Antp con TBP y BIP2 se cotransfectaron los plásmidos codificantes para las versiones mutantes de VCAntp que comprometen la interacción trimérica con VNTBP y ECFP-BIP2. Los resultados de Antp con TBP y BIP2 mostraron un valor muy bajo de $E=0.14\pm0.10$ (Fig. 23B). Al utilizar una mutante de Antp con el extremo N-terminal deletado (Antp Δ N) que afecta la formación del dímero Antp-TBP, encontrando un valor de transferencia de energía $E=0.15\pm0.08$ (Fig. 23C). Resultados similares fueron obtenidos cuando analizamos la versión mutante de Antp con el motivo YPWM sustituido por AAAA que afecta su interacción con BIP2 obteniendo un valor de $E=0.18\pm0.14$ (Fig. 23D). El análisis estadístico de los ensayos no mostró diferencias significativas entre las proteínas WT y usando las mutantes Antp Δ N y

Antp^{AAAA}. Estos resultados nos indican claramente que el factor BIP2 no forma complejos triméricos con el heterodímero Antp-TBP en células HEK293 (Fig. 23E).

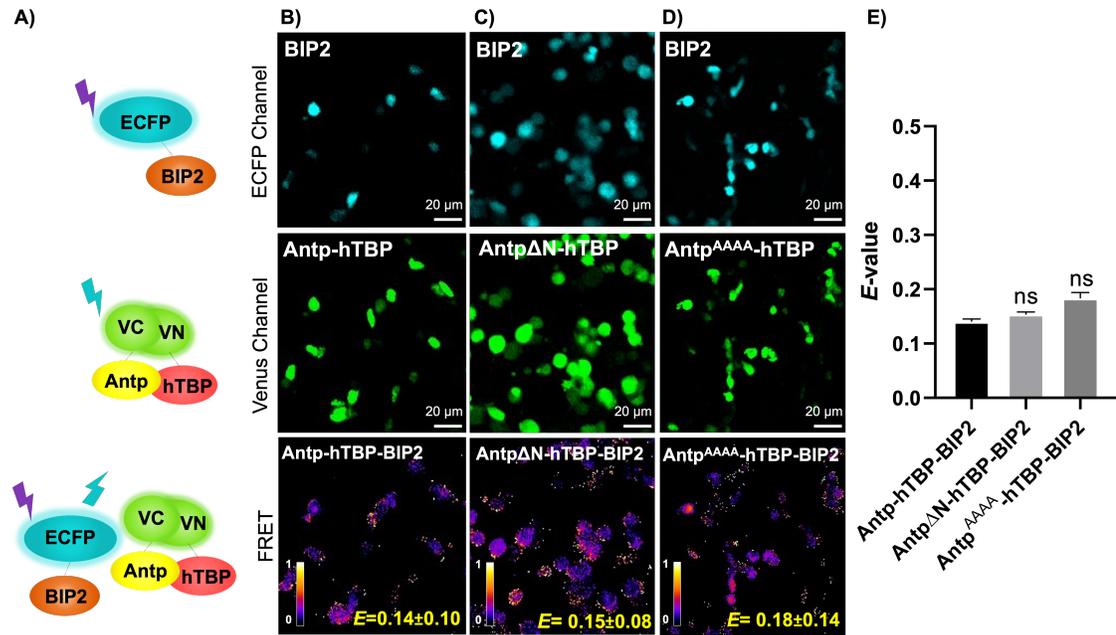


Figura 23.- El factor BIP2 no forma complejos triméricos con Antp-TBP en cultivo celular. La figura muestra bajos niveles de transferencia de energía entre BIP2 y el dímero Antp-TBP. **A)** de arriba hacia abajo se esquematiza la fluorescencia de ECFP-BIP2, la interacción dimérica Antp-TBP y la ausencia de interacción trimérica Antp-TBP-BIP2. Los campos superiores muestran la expresión de ECFP-BIP2, las imágenes centrales muestran la interacción dimérica Antp-TBP, Antp^{ΔN}-TBP y Antp^{AAAA}-TBP, respectivamente. Las imágenes inferiores muestran la cotransfección de: **B)** Antp-TBP-BIP2 ($E=0.14\pm0.10$), **C)** Antp^{ΔN}-TBP-BIP2 ($E=0.15\pm0.08$), **D)** Antp^{AAAA}-TBP-BIP2 ($E=0.18\pm0.14$). **E)** La gráfica representa tres ensayos por triplicado y no muestra diferencias significativas entre Antp-TBP-BIP2 con Antp^{ΔN}-TBP-BIP2 y Antp^{AAAA}-TBP-BIP2 analizado con ANOVA de una vía por comparación de medias. La barra de colores representa la intensidad de FRET (modo fire) colores oscuros representan interacciones triméricas débiles, mientras que colores más claros representan interacciones triméricas más fuertes.

8.2. Actividad funcional del trímero Antp-TBP-TFIIIE β en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*

8.2.1. Construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIIE β

Para determinar el efecto del trímero Antp-TBP-TFIIIE β *in vivo* sobre la involución de la cabeza y transformación antena-pata, se realizó la construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIIE β necesario para la generación de individuos transgénicos.

La construcción del plásmido pUAST-attB-ECFP-TFIIIE β se realizó mediante subclonación, los plásmidos pUASTattB y pECFP-N1-TFIIIE β fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Not*I, para abrir el vector pUASTattb y liberar el inserto ECFP-N1-TFIIIE β (Fig. 24A). El plásmido pUASTattB linearizado, así como el inserto ECFP-TFIIIE β fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%, las bandas correspondientes para el inserto y vector fueron purificadas y ligadas a una proporción de 1:5 (Vector:Inserto), las posibles clonas positivas fueron identificadas por peso molecular en un gel de agarosa al 0.8% (Fig. 24B), y posteriormente se realizó la caracterización del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIIE β construido, con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Xba*I obteniendo las bandas esperadas de 8461 y 1693 pb (carril 2), la digestión con las enzimas *Bgl*III y *Not*I permitió la liberación de bandas de 8483 y 1671pb (carril 3), el corte con la enzima *Xho*I mostró bandas de 1677 y 8474 pb (carril 5), el carril 4 muestra el plásmido sin digerir (S/D) como se muestra en la figura 24B. El plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIIE β caracterizado fue propagado para confirmar su identidad mediante secuenciación.

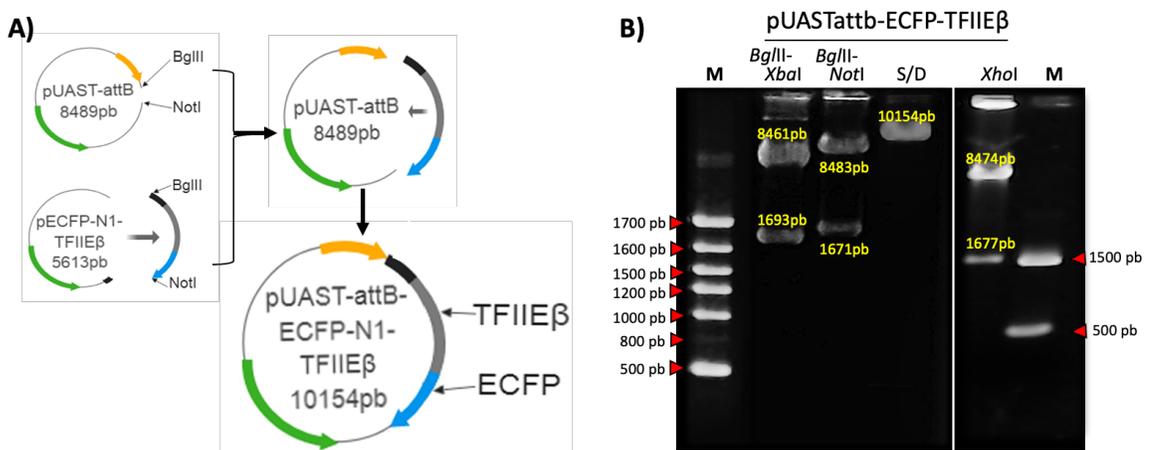


Figura 24. Construcción del vector pUASTattB-ECFP-TFIIIE β . **A)** Se esquematiza la estrategia de subclonación, con los sitios *Bg*II y *Not*I para la construcción del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIIE β . **B)** Se muestra la caracterización del plásmido pUASTattB-ECFP-TFIIIE β , en el carril 2 se muestra la digestión con las enzimas *Bg*II y *Xba*I obteniendo bandas de 8461 y 1693 pb, *Bg*II y *Not*I obteniendo bandas de 8483 y 1671pb (carril 3), *Xho*I liberando bandas de 1677 y 8474 pb (carril 5), el carril 4 muestra el plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIIE β sin digerir (S/D). El carril M indica el marcador de peso molecular en pares de bases.

8.2.2. Generación de la línea transgénica UAS-ECFP-N1-TFIIIE β

Una vez confirmada la identidad del plásmido pUASTattb-ECFP-N1-TFIIIE β mediante secuenciación, se realizó su propagación y purificación a mediana escala como se describe en Materiales y Métodos. El vector purificado resultó con una pureza de 1.95 (relación 260/280 nm) y una concentración final de 1820 ng/ μ l apropiadas para la microinyección en embriones de *D. melanogaster*. El plásmido pUASTattB-ECFP-N1-TFIIIE β fue enviado a la compañía BestGene Inc. (Chino Hillis, California, USA) para la obtención de individuos transgénicos, el resultado se muestra en la Tabla 6, se obtuvieron 4 líneas transgénicas con el transgén ECFP-N1-TFIIIE β insertado en el cromosoma IV identificadas con el marcador de selección CiD⁺. Cada línea fue numerada y agregada al stock general de líneas transgénicas de la Unidad de Biología del Desarrollo.

Tabla 6. Líneas transgénicas de *D. melanogaster* para UAS-ECFP-N1-TFIIIE β

Numeración de stock en UBD	Transgén	Cromosoma de inserción	Marcador fenotípico
209D	UAS-ECFP-N1-TFIIIE β	IV	Cuarta vena longitudinal de alas truncada (CiD ⁺)
210D	UAS-ECFP-N1-TFIIIE β	IV	Cuarta vena longitudinal de alas truncada (CiD ⁺)
211D	UAS-ECFP-N1-TFIIIE β	IV	Cuarta vena longitudinal de alas truncada (CiD ⁺)
212D	UAS-ECFP-N1-TFIIIE β	IV	Cuarta vena longitudinal de alas truncada (CiD ⁺)
213D	UAS-ECFP-N1-TFIIIE β	IV	Cuarta vena longitudinal de alas truncada (CiD ⁺)

Para confirmar la presencia del transgén ECFP-N1-TFIIIE β en las moscas transgénicas, se realizó la extracción de DNAG de los individuos que presentaban el marcador fenotípico CiD⁺ para detectar la secuencia del transgén por PCR, utilizando los oligonucleótidos Venus5'y hTFIIIE β AgeI3' probando diferentes temperaturas de alineamiento.

La figura 25 muestra la amplificación de la secuencia codificante para ECFP-N1-TFIIE β a una temperatura de alineamiento óptima de 53.5°C obteniendo un amplicón de 1637 pb correspondiente al transgén de interés. Como controles de amplificación se incluyó el plásmido pECFP-N1-TFIIE β como templado bajo las mismas condiciones de amplificación. La banda correspondiente a 1637 pb indica la presencia del transgén ECFP-N1-TFIIE β en los individuos que presentan el marcador fenotípico CiD $^+$.

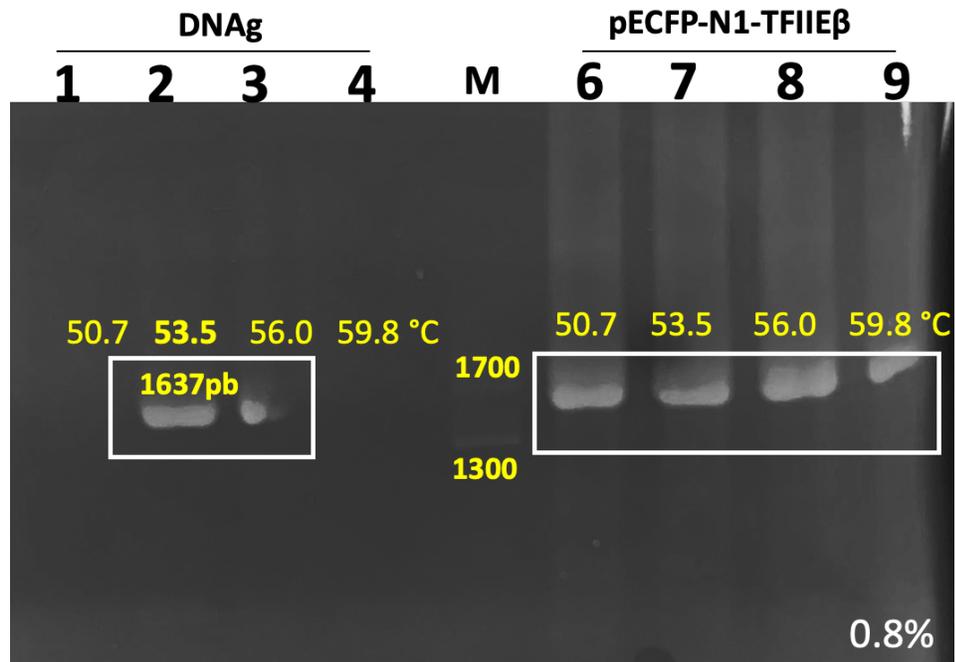


Figura 25. Detección del transgen ECFP-N1-TFIIE β en DNAg de *Drosophila melanogaster*. La imagen muestra la detección del transgen ECFP-N1-TFIIE β en individuos con el marcador fenotípico CiD $^+$. En los carriles 1-4 se indican las temperaturas de alineamiento para la amplificación por PCR utilizando DNAg de individuos CiD $^+$, el amplicón de 1637 pb se muestra en el carril 2. Los carriles 6-9 muestran el amplicón de 1637 pb correspondiente para ECFP-N1-TFIIE β utilizando el plásmido pECFP-N1-TFIIE β como templado. El carril M corresponde a bandas conocidas de 1700 y 1300 pb.

8.2.3. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β reduce el efecto homeótico en larvas de primer estadio de *Drosophila melanogaster*

Para analizar el efecto del complejo trimérico en la involución de la cabeza y transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*. Primeramente, probamos la función del driver *nullo*-GAL4, para esto dirigimos la expresión de la proteína GFP por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*, en embriones de *D. melanogaster* utilizando el driver tejido específico *nullo*-GAL4 (Fig. 26).

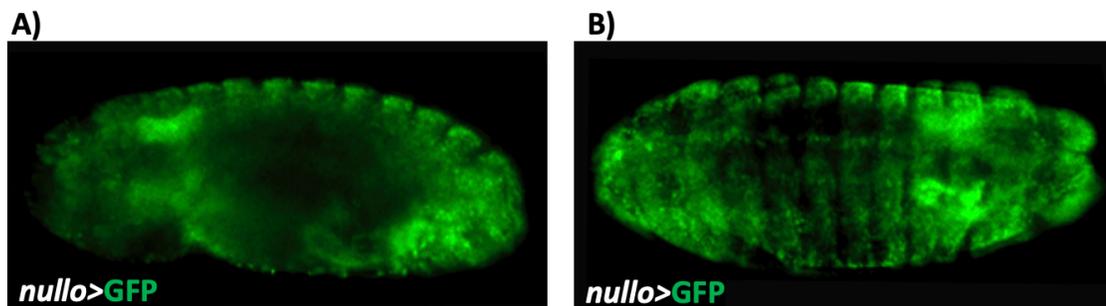


Figura 26. Detección de GFP en embriones de *Drosophila*. La imagen muestra la expresión de la proteína GFP dirigida en embriones de *D. melanogaster* utilizando el driver *nullo*-GAL4. **A)** Vista dorsal **B)** Vista ventral de embriones en estadio 14.

Una vez que confirmamos la correcta función del driver, dirigimos la expresión ectópica del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β con el driver tejido específico *nullo*-GAL4. Los resultados obtenidos muestran una reducción en el porcentaje de individuos que presentaron fallas en la involución de la cabeza, el 12% de las larvas analizadas presentaron una involución de la cabeza normal, características de involución similares a los individuos WT correspondiente a la cruce *nullo*>*nullo* (Fig. 27B), mientras que el 11% de la población larvaria presentó fenotipos intermedios caracterizados por la presencia de ganchos bucales sin descender completamente, como se muestra en la figura 27A. El 77% de la población larvaria analizada mostró fallo completo en la involución de la cabeza, fenotipos muy similares se encontraron el control positivo de homeosis *nullo*>Antp donde el 100% de los individuos con la homeoproteína Antp presentaron fallo completo en la involución de la cabeza como se muestra en la figura 27C.

Para confirmar que la disminución en el porcentaje de larvas con falta de la involución de la cabeza era dada por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β , dirigimos los complejos diméricos Antp-TBP y Antp-TFIIE β con el driver *nullo*-GAL4. Los resultados mostrados en la figura 28A muestran el que en el dímero Antp-TBP un 21% de la población presenta involución normal, el 7% de las larvas analizadas mostraron un fenotipo de involución intermedia como se muestra señalado con rojo en la figura 28A y el 72% total de las larvas analizadas para el dímero Antp-TBP mostró un fenotipo homeótico.

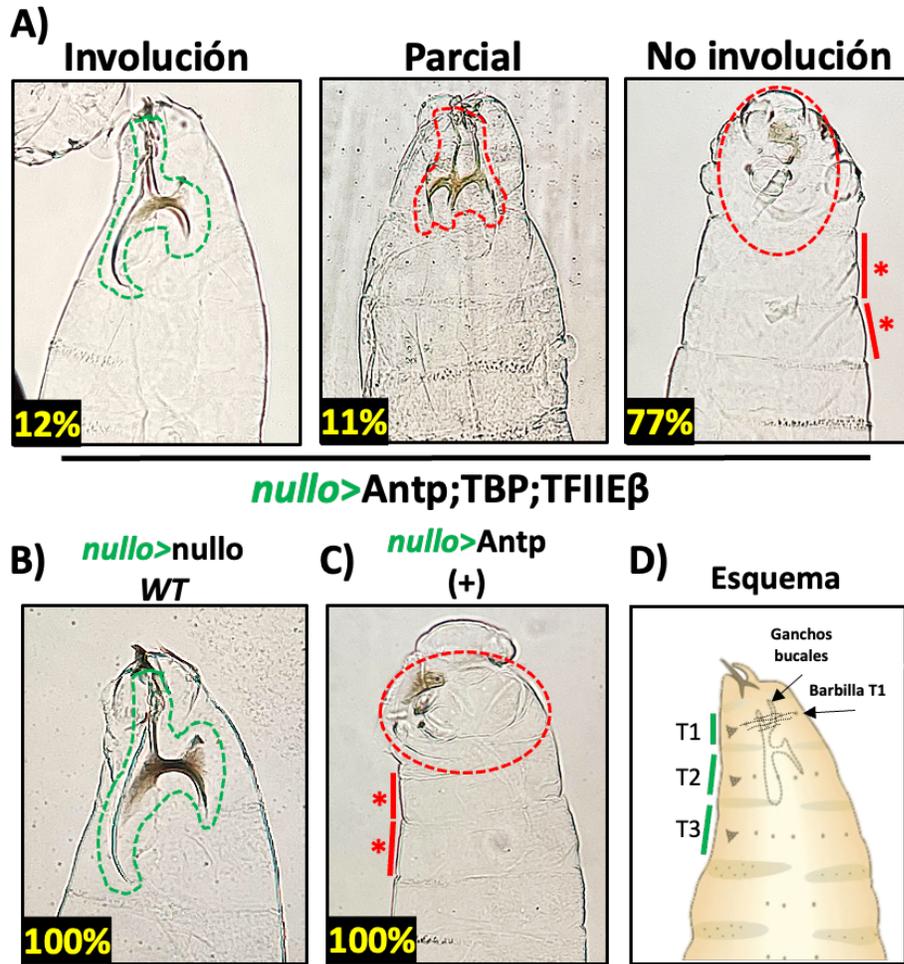


Figura 27. El trómero Antp-TBP-TFIIIE β disminuye la pérdida de involución causado por Antp en larvas de *D. melanogaster*. La imagen muestra efecto del trómero Antp-TBP-TFIIIE β en larvas de primer estadio. **A)** El complejo Antp-TBP-TFIIIE β mostró un 12% de la población analizada con involución normal (línea punteada verde), 11% corresponde a fenotipos intermedios y 77% de la población analizada mostró fenotipo homeótico (línea punteada roja). **B)** Involución normal de la cabeza (línea verde) 100% de la población larvaria. **C)** Se muestra el fenotipo causado por la expresión ectópica de Antp, los asteriscos en rojo muestran la transformación T1 \rightarrow T2 en el 100% de la población analizada. **D)** Se esquematiza la región larvaria donde se muestra el efecto de Antp y el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β , así como los segmentos T1, T2, T3, la barbilla del segmento T1 y los ganchos bucales.

Sorpresivamente cuando dirigimos el complejo dimérico Antp-TFIIIE β encontramos hasta un 62% de la población larvaria analizada con una involución de la cabeza normal, muy parecido al control negativo (Fig. 28B), solo el 9% exhibió un fenotipo intermedio de involución de la cabeza, resaltado en rojo (Fig. 28B) y el 29% de las larvas restantes mostraron un fenotipo homeótico (Fig. 28).

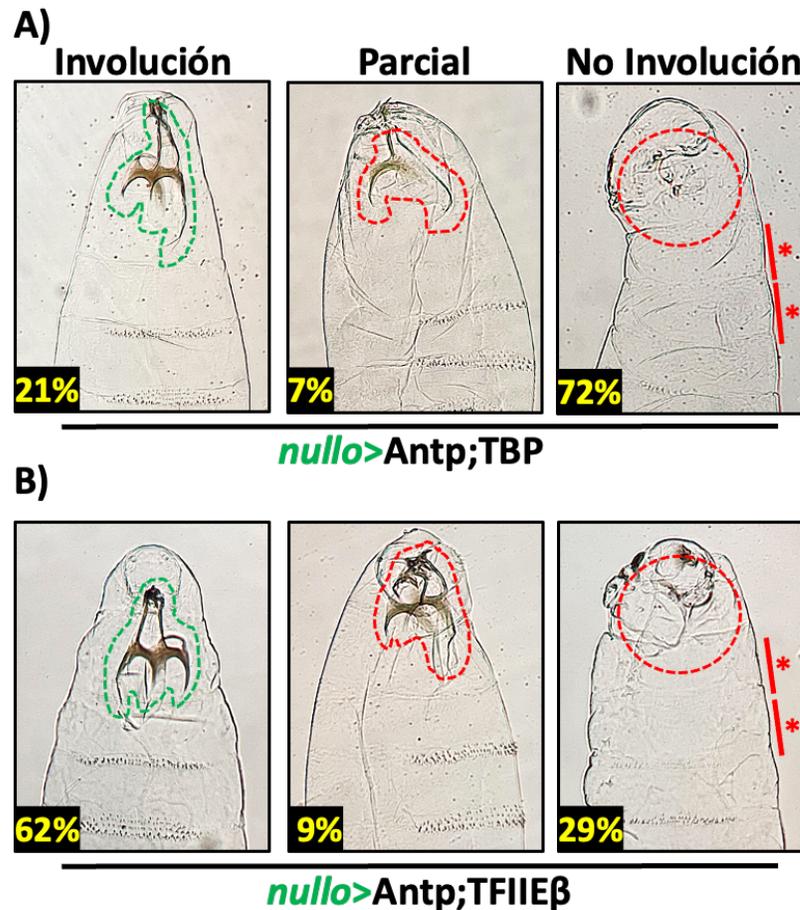


Figura 28. Los dímeros Antp-TBP y Antp-TFIIIEβ afectan la función de Antp en larvas en *D. melanogaster*. La figura muestra el efecto de complejos diméricos sobre la involución de la cabeza en larvas de 1er estadio. **A)** El complejo Antp-TBP mostró un 21% de fenotipos normales, 7% de la población larvaria mostró fenotipos intermedios y 72% resultó con fallos en la involución de la cabeza. **B)** El dímero Antp-TFIIIEβ muestra un 62% de larvas con involución de la cabeza normal, 9% con fallos intermedios de involución y 29% de la población larvaria con inhibición de involución de la cabeza. Los asteriscos muestran la transformación del segmento T1-T2 en fenotipos homeóticos.

Para confirmar la pérdida de la identidad del segmento T1 reemplazado por T2, se analizaron las laminillas con la población larvaria, en busca de barbilla característica de T1 como se ilustra en la figura 27D, como control positivo de homeosis se dirigió la homeoproteína Antp con el driver *nullo*, donde el 100% de las larvas presentaron pérdida de caracteres distintivos de T1 (ausencia de barbilla). El trímero Antp-TBP-TFIIIEβ mostró una disminución en el porcentaje de larvas que presentaron ausencia de barbilla de un 83% (n=69) comparado con nuestro control positivo *nullo*>Antp 100% (n=75), sorpresivamente encontramos un rescate total del fenotipo homeótico únicamente en el 17% (n=19) de las larvas analizadas (Tabla 7).

Estos resultados indican que el complejo Antp-TBP-TFIIE β contribuye en la regulación homeótica dada por Antp.

Por otro lado, los complejos diméricos también presentaron efecto. Con Antp-TBP encontramos un 17% (n=9) de larvas con caracteres distintivos de T1, 25% (n=13) mostró una reducción en la barbilla y un 58% (n=31) de larvas no presentaban barbilla. Así mismo, el dímero Antp-TFIIE β presentó un efecto más leve, un 43 % (n=16) de larvas con barbilla característica de T1, 8% (n=3) de larvas con la barbilla reducida y 49% (n=18) de las larvas restantes presentaron ausencia de barbilla (Tabla 7).

Tabla 7. Los complejos con TFIIE β reducen la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*

Transformación T1→T2				
Barbilla T1	Antp	Antp-TBP-TFIIE β	Antp-TFIIE β	Antp-TBP
Normal	0%	17% (n= 19)	43% (n= 16)	17% (n= 9)
Reducida	0%	0% (n= 0)	8% (n= 3)	25% (n= 13)
Ausente	100%	83% (n= 69)	49% (n= 18)	58% (n= 31)
n=	75	88	37	53

8.3. El complejo trimérico Antp-TBP-Exd afecta la involución de la cabeza y transformación T1-T2 en larvas de *Drosophila melanogaster*

Para analizar el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd sobre la involución de la cabeza y transformación T1-T2 en larvas de primer estadio de *D. melanogaster*, dirigimos la expresión ectópica del complejo Antp-TBP-Exd utilizando el driver *nullo*. Los resultados obtenidos mostraron que el 27% de la población larvaria analizada exhibió una involución de la cabeza normal, similar al fenotipo WT mostrado en la figura 29A, el 1% de las larvas analizadas mostró un fenotipo intermedio de involución y el 72% restante exhibió fallas en el proceso de involución de la cabeza, así como en la transformación T1-T2. En el control positivo de homeosis *nullo>Antp* el 100% de los individuos con la homeoproteína Antp presentaron fallos completos en la involución de la cabeza como se muestra en la figura 29C.

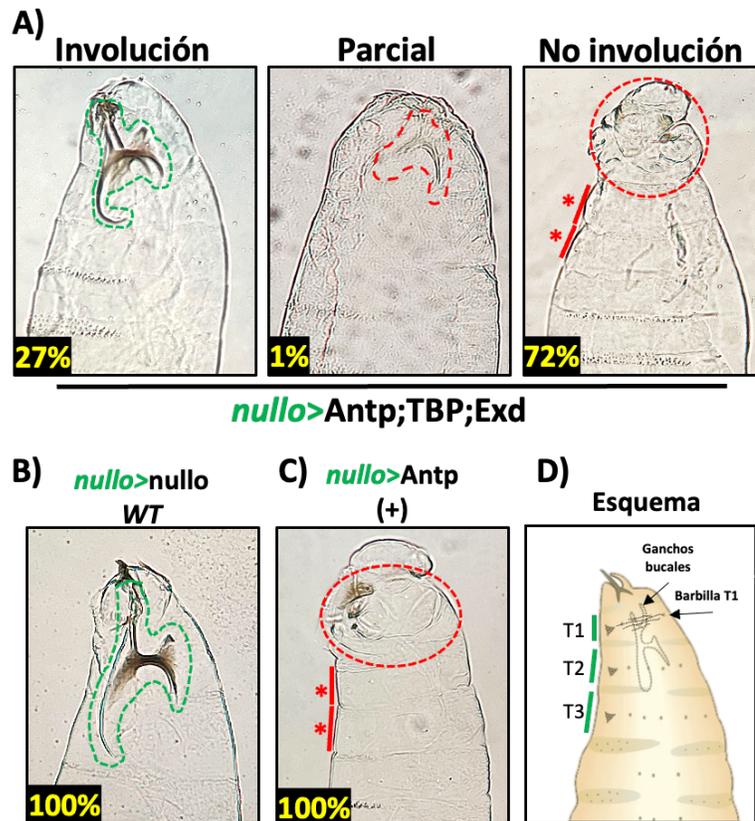


Figura 29. El trímero Antp-TBP-Exd disminuye el efecto de Antp en larvas de *D. melanogaster*. La imagen muestra efecto del trímero Antp-TBP-TFIIE β en larvas de primer estadio. **A)** El complejo Antp-TBP-TFIIE β mostró un 12% de la población analizada con involución normal (línea punteada verde), 11% corresponde a fenotipos intermedios y 77% de la población analizada mostró fenotipo homeótico (línea punteada roja). **B)** Involución normal de la cabeza (línea verde) 100% de la población larvaria. **C)** Se muestra el fenotipo homeótico causado por la expresión ectópica de Antp, los asteriscos en rojo muestran la transformación T1 \rightarrow T2 en el 100% de la población analizada. **D)** Se esquematiza la región larvaria donde se muestra el efecto homeótico de Antp y el complejo trimérico Antp-TBP-Exd, así como los segmentos T1, T2, T3, la barbilla del segmento T1 y los ganchos bucales.

Para analizar si el efecto de involución de la cabeza es dado por el complejo trimérico Antp-TBP-Exd, dirigimos también los complejos diméricos Antp-TBP y Antp-Exd con el driver *nullo*-GAL4. Los resultados con Antp-TBP mostraron que el 7% de la población analizada presentó fenotipos intermedios, un 72% de las larvas presentaron fallas en el desarrollo de las estructuras anteriores mientras que el 21% de la población larvaria analizada presentó una involución normal caracterizada por el correcto establecimiento de los ganchos bucales como se muestra en la Figura 30A. El dímero Antp-Exd mostró un 8% de las larvas con involución normal, 2% de las larvas exhibieron una involución intermedia mientras que el 90% de los individuos presentaron fallos completos en la involución de la cabeza (Fig. 30B).

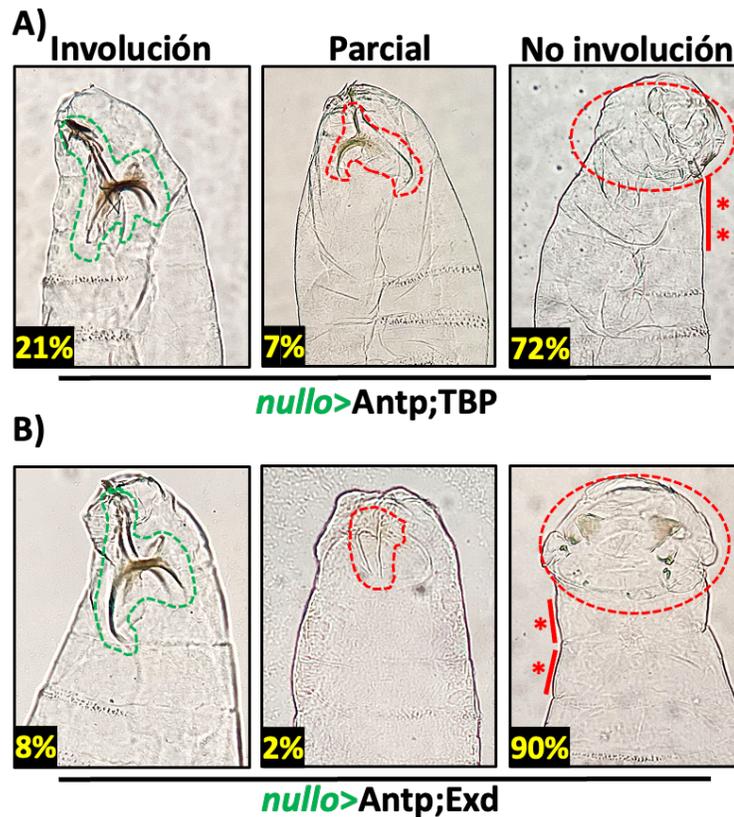


Figura 30. Los dímeros Antp-TBP y Antp-Exd afectan función dada por Antp en la involución de la cabeza de larvas en *D. melanogaster*. La figura muestra el efecto de complejos diméricos sobre la involución de la cabeza en larvas de 1er estadio. **A)** El complejo Antp-TBP mostró un 21 % de fenotipos normales, 7 % de la población larvaria mostró fenotipos intermedios y 72 % resultó con fallos en la involución de la cabeza. **B)** El dímero Antp-Exd mostró un 8% de larvas con involución de las estructuras anteriores, 2 % con fallos intermedios de involución y 90 % de la población larvaria con homeosis. Los asteriscos muestran la transformación del segmento T1-T2 en fenotipos homeóticos.

Para analizar la transformación T1-T2 los fenotipos larvarios fueron analizados en busca de características propias del segmento larvario T1, la homeoproteína Antp se dirigió con el driver *nullo* como control positivo de homeosis, donde el 100% de las larvas resultantes presentaron la pérdida de la barbilla en el segmento T1. El complejo trimérico Antp-TBP-Exd mostró una disminución en el porcentaje de larvas que presentaron ausencia de barbilla hasta un 76% (n=52) comparado el control positivo *nullo*>Antp 100% (n=75). Sorpresivamente encontramos un rescate total del fenotipo homeótico en el 19% (n=24) de las larvas analizadas como se muestra en la tabla 8.

Así mismo, el complejo dimérico Antp-Exd mostró un 7% (n=7) de larvas con barbilla característica de T1, 2% (n=2) correspondieron a larvas con la barbilla reducida y el 91% (n=18) de las larvas mostraron ausencia de barbilla. Por otro lado, para el complejo Antp-TBP encontramos un 17% (n=9) de larvas con caracteres distintivos de T1, 25% (n=13) lo que mostró una reducción en la barbilla y un 58% (n=31) de larvas no presentaban barbilla (Tabla 8).

Tabla 8. El complejo Antp-TBP-Exd disminuye la transformación T1-T2 en larvas de *D. melanogaster*

Transformación T1→T2				
Barbilla T1	Antp	Antp-TBP-Exd	Antp-Exd	Antp-TBP
Normal	0%	19% (n= 24)	7% (n= 7)	17% (n= 9)
Reducida	0%	5% (n= 4)	2% (n= 2)	25% (n= 13)
Ausente	100%	76% (n= 52)	91% (n= 85)	58% (n= 31)
n=	75	80	94	53

8.4. Antp-TBP-TFIIIE β afecta la transformación antena-pata en *D. melanogaster*

Para evaluar el efecto de los complejos triméricos en la transformación antena-pata en *D. melanogaster* primeramente probamos la función del driver *dll*-GAL4, para esto dirigimos la expresión de la GFP en larvas de 3er estadio de *D. melanogaster* utilizando el driver tejido específico *dll*-GAL4 (Fig. 31A-B).

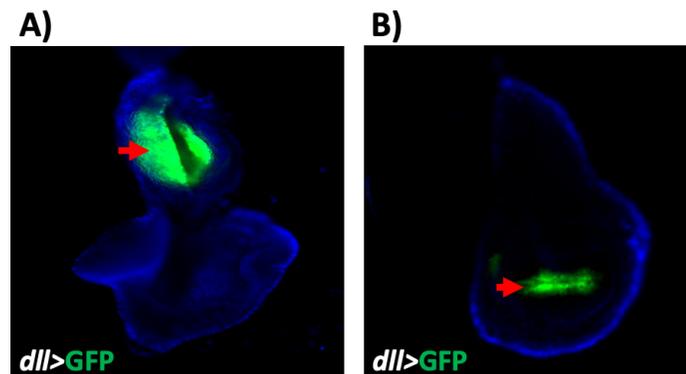


Figura 31. Expresión de GFP con el driver *dll*-GAL4 en discos imaginales de *Drosophila*. La imagen muestra la expresión de la proteína GFP utilizando el driver *dll*-GAL4 dirigida a los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* **A)** Se muestra la expresión de GFP en los anillos del primordio antenal del disco ojo-antena indicado con la flecha roja. **B)** La expresión de GFP en el margen presuntivo alar del disco de ala, señalado con la flecha roja.

Una vez que confirmamos la función del driver, dirigimos la expresión ectópica del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β con el driver tejido específico *dll*-GAL4. Los resultados obtenidos muestran la inhibición de la transformación antena por pata como se muestra en la figura 31C, indicando que el complejo trimérico impide la transformación homeótica dado por la homeoproteína Antp comparado con el control positivo (Fig. 31B). Cuando analizamos los complejos diméricos Antp-TFIIIE β y Antp-TBP encontramos de igual forma un rescate del fenotipo homeótico, encontrando únicamente un engrosamiento en la base de la arista como se muestra en la figura 31D-E.

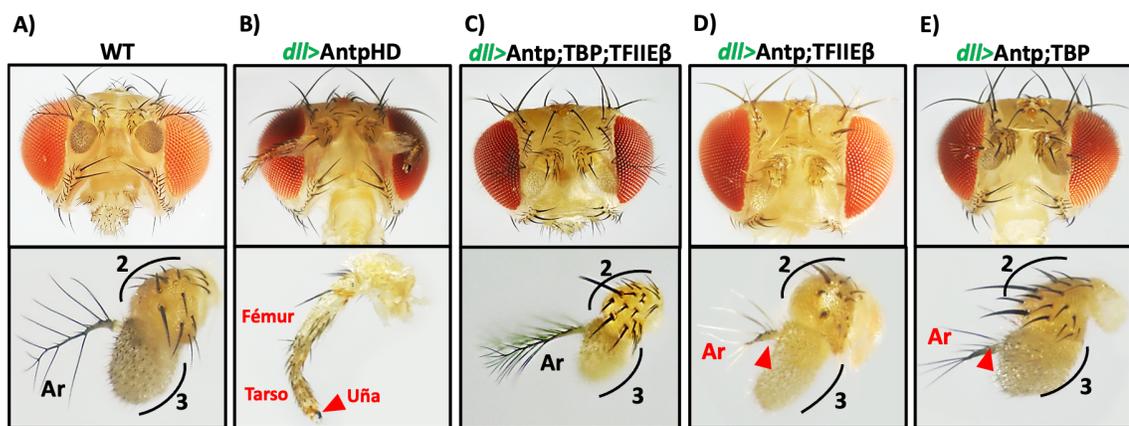


Figura 32. El complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β inhibió la transformación antena-pata en *Drosophila melanogaster*. La figura muestra el efecto ectópico del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β en el desarrollo de la antena de *D. melanogaster*. **A)** Se muestra un fenotipo WT de *D. melanogaster*. **B)** La imagen muestra la transformación antena por pata causada por AntpHD, en rojo se indican caracteres propios del tejido de la pata. **C)** La imagen muestra el desarrollo normal de antenas en individuos adultos con el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β . **D)** Se muestra únicamente la alteración en la base de la arista (Ar) indicado con la flecha roja con los complejos diméricos Antp-TFIIIE β y **E)** Antp-TBP.

Para confirmar la presencia de los transgenes Antp, TBP, TFIIIE β así como la proteína transactivadora GAL4, realizamos la extracción de DNAg de individuos *dll*>Antp;VNTBP;ECFP-TFIIIE β sin transformación antena-pata (Fig. 33A). El DNAg obtenido fue utilizado como templado para la detección por PCR de los transgenes de interés, se utilizaron oligonucleótidos específicos previamente descritos en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran la presencia de los transgenes: Antp, TBP, TFIIIE β y GAL4, los amplicones correspondientes para cada transgén como se muestran en la figura 33B.

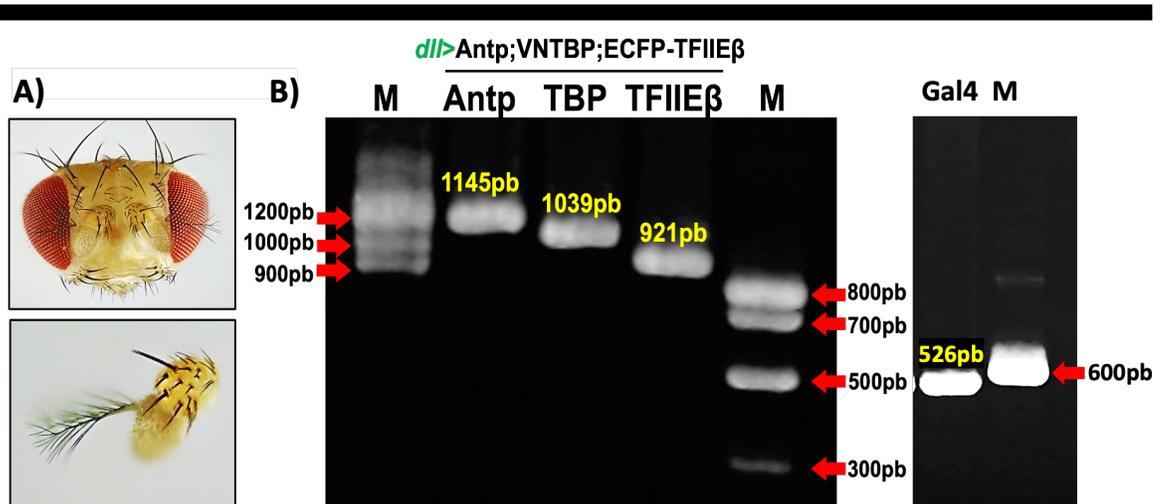


Figura 33. Amplificación de los transgenes Antp, TBP, TFIIIEβ y GAL4 de DNAg mediante PCR. La figura muestra los amplicones correspondientes para los transgenes de interés. A) Se esquematiza la selección de individuos *dll>Antp;VNTBP;ECFP-TFIIIEβ* sin transformación antena-pata. B) El gel muestra la detección por PCR de los transgenes: Antp (1145pb), TBP (1039pb), TFIIIEβ (921pb) y GAL4 (526pb). Los carriles M muestra un marcador de peso molecular en pb.

Para confirmar la expresión de los transgenes Antp, TBP y TFIIIEβ, se realizaron las cruza genéticas *dll>Antp;VNTBP* y *dll>ECFP-TFIIIEβ* que permitieron confirmar su expresión en discos imaginales mediante inmunodetección, utilizando los anticuerpos Anti-Antp, Anti-hTBP y Anti-hTFIIIEβ. La figura 34 muestra la expresión de TBP, Antp y TFIIIEβ respectivamente en los anillos del primordio antenal del disco ojo-antena de larvas de *Drosophila melanogaster*, estos resultados muestran la expresión de las proteínas expresadas de forma ectópica Antp, TBP y TFIIIEβ.

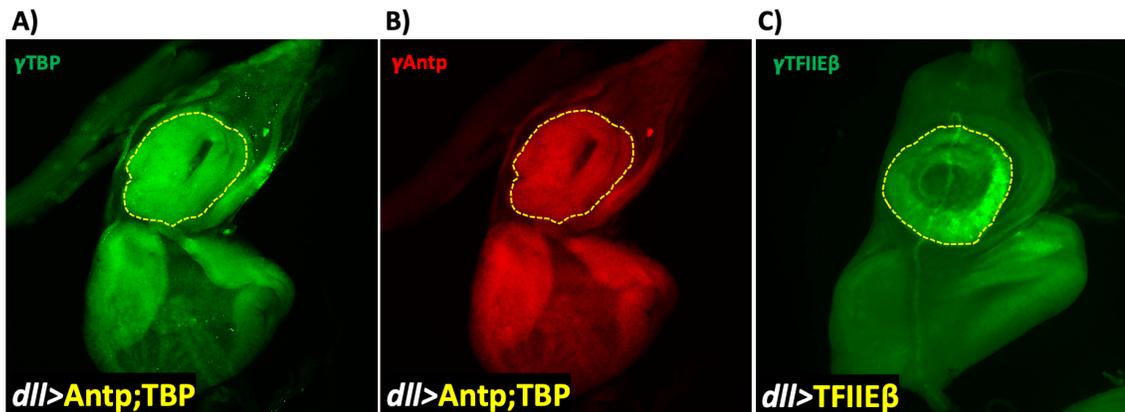


Figura 34. Inmunodetección de Antp, TBP y TFIIIEβ en discos de ojo-antena de *Drosophila*. La figura muestra la expresión de los transgenes A) TBP (señal verde) B) Antp (señal roja) y C) TFIIIEβ (señal verde), dirigida con el driver *dll*-GAL4 en discos imaginales de ojo-antena señalado con línea punteada.

El efecto del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β en la transformación antena-pata en *D. melanogaster* también fue evaluado usando el driver *dpp*-GAL4. Para probar el driver tejido específico *dpp*-GAL4, dirigimos la expresión de GFP en larvas de 3er estadio de *D. melanogaster* como se muestra en la figura 35A-B.

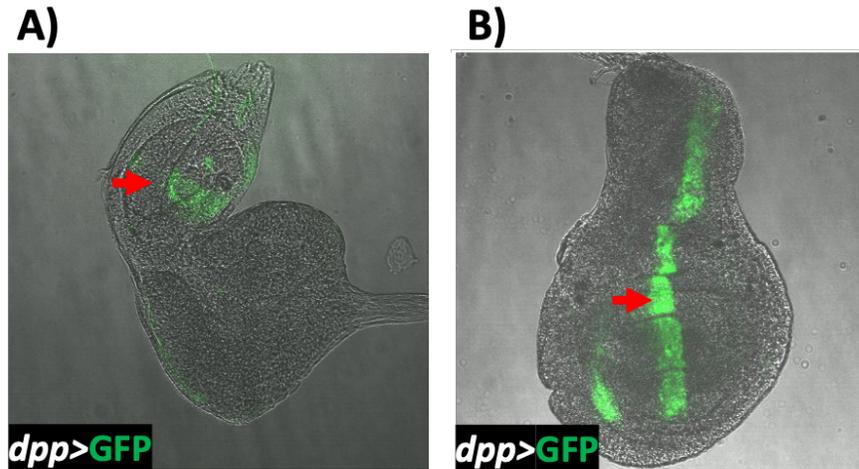


Figura 35. Expresión de GFP con el driver *dpp*-GAL4 en discos imaginales ojo-antena y ala de *Drosophila*. La imagen muestra la expresión de la proteína GFP utilizando el driver *dpp*-GAL4 en discos imaginales de *Drosophila melanogaster* **A)** Se muestra la expresión de GFP en los anillos del primordio antenal del disco ojo-antena indicado con la flecha roja. **B)** La expresión de GFP en el límite anteroposterior del disco de ala, señalado con la flecha roja.

Una vez que confirmamos la correcta función del driver, dirigimos la expresión ectópica del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β con el driver tejido específico *dpp*-GAL4. Los resultados obtenidos muestran la inhibición de la transformación antena por pata como se muestra en la figura 36C, indicando que el complejo trimérico impide la transformación homeótica dado por Antp comparado con el control positivo (Fig. 36B). Para confirmar que la inhibición homeótica era dada por el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β decidimos analizar el efecto de los complejos diméricos Antp-TFIIE β y Antp-TBP, sorpresivamente encontramos que los complejos dirigidos con el driver *dpp*-GAL4 lograron inhibir la transformación antena por pata en individuos adultos de *Drosophila melanogaster* como se muestra en la figura 36D-E.

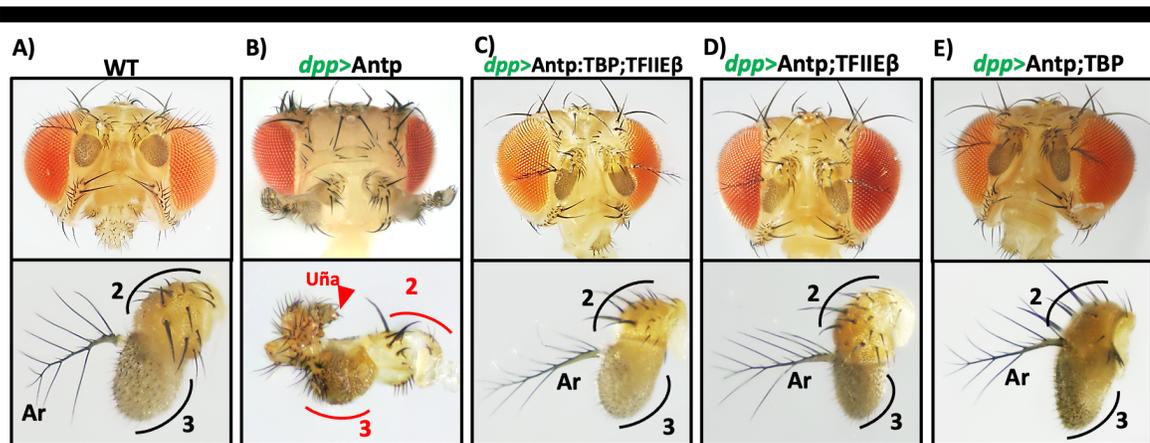


Figura 36. La expresión de Antp-TBP-TFIIIE β inhibió la transformación antena-pata en *D. melanogaster* utilizando el driver *dpp-GAL4*. La figura muestra el efecto ectópico del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIIE β bajo la dirección del driver *dpp-GAL4* en *D. melanogaster*. A) Se muestra un fenotipo WT de *D. melanogaster*. B) La imagen muestra la transformación antena por pata causada por Antp, en rojo se indican rasgos específicos de pata, así como el engrosamiento de los segmentos antenales 2 y 3. Se muestra el desarrollo normal de antenas en individuos adultos C) con el complejo Antp-TBP-TFIIIE β , D) Antp-TFIIIE β y E) Antp-TBP.

8.5. La expresión del trímero Antp-TBP-Exd no permitió la transformación antena-pata en *D. melanogaster*

La función del complejo trimérico Antp-TBP-Exd fue analizada mediante la expresión ectópica con el driver *dll-GAL4* para observar el efecto en la transformación antena-pata. Los resultados obtenidos mostraron que el complejo Antp-TBP-Exd evita la transformación de antena por pata en individuos adulto de *Drosophila melanogaster* (Fig. 37C). Para confirmar que el efecto es dado propiamente por el complejo trimérico Antp-TBP-Exd, dirigimos la expresión ectópica de los dímeros Antp-Exd y Antp-TBP. La expresión de Antp-Exd no mostró transformación antena por pata, indicando que el cofactor Exd evita que Antp transforme la antena en pata (Fig. 37D). De igual forma, Antp-TBP, inhibió la formación de extremidades en la región antenal, sin embargo, se encontró un engrosamiento en el 3er segmento antenal, así como en la base de la arista, indicando que el factor TBP impide la transformación homeótica causada por Antp como se muestra en la figura 37E.

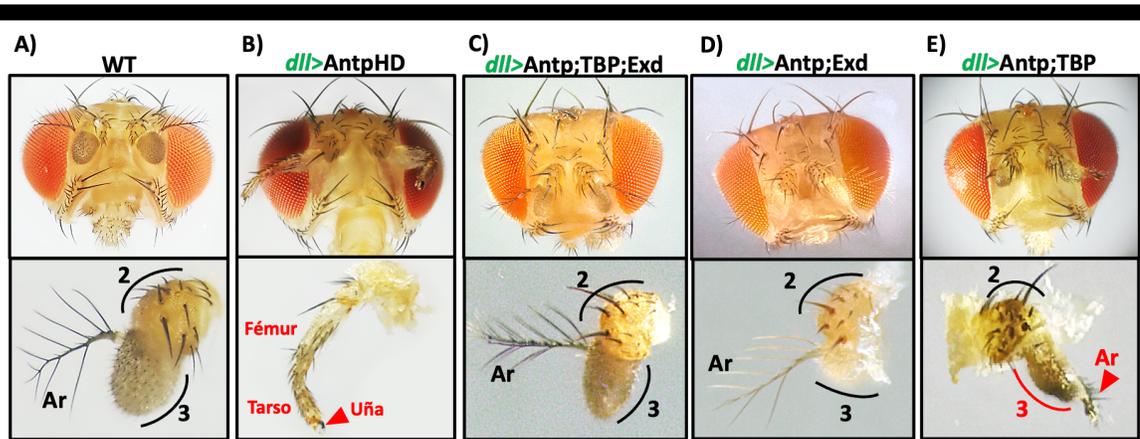


Figura 37. Antp-TBP-Exd inhibió la transformación antena-pata en *Drosophila melanogaster*. La figura muestra el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd en el desarrollo de la antena de *D. melanogaster*. **A)** Se muestra un fenotipo WT de *D. melanogaster*. **B)** La imagen muestra la transformación antena por pata causada por AntpHD, en rojo se indican caracteres propios del tejido de la pata. Se muestra el desarrollo normal de antenas en individuos adultos con el complejo trimérico **C)** Antp-TBP-Exd, así como el dímero **D)** Antp-Exd. **E)** Antp-TBP muestra únicamente la alteración en la base de la arista (Ar) indicado con la flecha roja.

Para confirmar la expresión de los transgenes Antp, TBP y TFIIE β , se realizaron las cruces genéticas *dll>Antp;VNTBP* y *dll>Exd* para analizar su expresión en discos imaginales mediante inmunodetección, utilizando los anticuerpos Anti-TBP, Anti-Antp y Anti-GFP. La figura 38 muestra la expresión de TBP, Antp y Exd en la región antenal del disco ojo-antena en larvas de *Drosophila melanogaster*, estos resultados muestran la expresión de las proteínas Antp, TBP y Exd expresadas de forma ectópica.

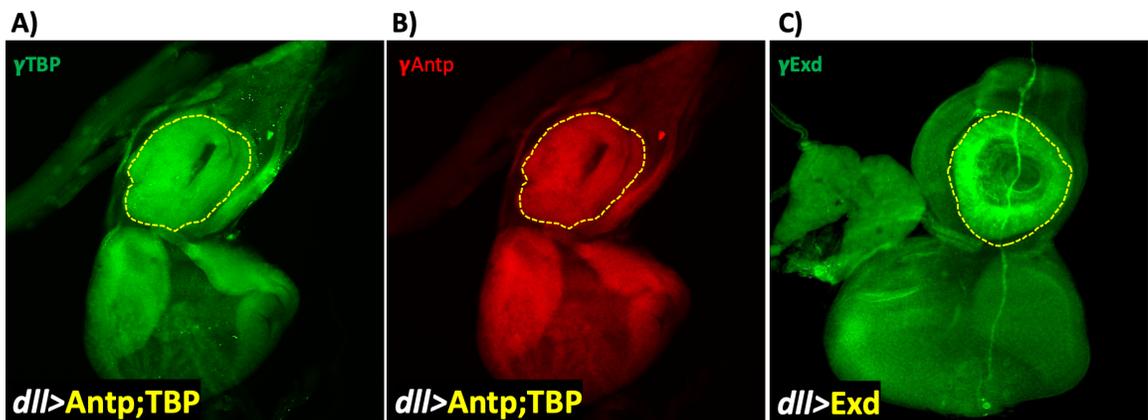


Figura 38. Inmunodetección de Antp, TBP y Exd en discos de ojo-antena de *Drosophila*. La figura muestra la expresión de los transgenes **A)** TBP (señal verde) **B)** Antp (señal roja) y **C)** Exd (señal verde), dirigida con el driver *dll*-GAL4 en discos imaginales de ojo-antena señalado con línea punteada.

Para confirmar el efecto del complejo trimérico Antp-TBP-Exd sobre la transformación antena-pata, también dirigimos la expresión ectópica del complejo trimérico con el driver *dpp*-GAL4. Los resultados obtenidos muestran que el complejo Antp-TBP-Exd evita la transformación antena por pata (Fig. 39A). Es importante indicar que cuando dirigimos el dímero Antp-Exd encontramos una transformación antena-pata pronunciada, la figura 39D muestra la formación de dos estructuras con características de pata en la región donde se debe desarrollar la antena. Por el contrario, el complejo dimérico Antp-TBP evitó la formación de estructuras de pata en la región de la antena en individuos adultos de *Drosophila melanogaster* (Fig. 39E). Estos resultados muestran que el trímero Antp-TBP-Exd está involucrado en la regulación dada por Antp en un contexto *in vivo*.

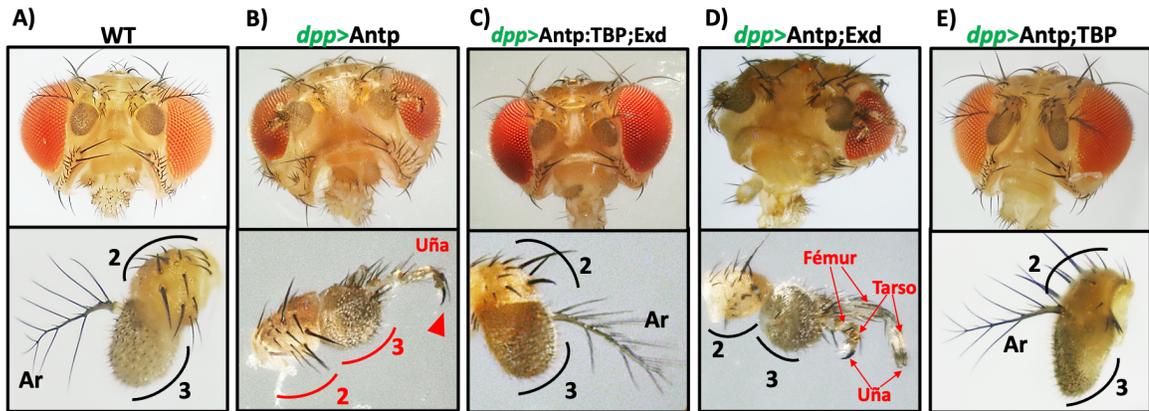


Figura 39. El trímero Antp-TBP-Exd inhibió la transformación antena-pata en *D. melanogaster* bajo el control del driver *dpp*-GAL4. La figura muestra el efecto ectópico del complejo trimérico Antp-TBP-Exd dirigido por el driver *dpp*-GAL4 en *D. melanogaster*. **A)** Se muestra un fenotipo WT de *D. melanogaster*. **B)** La imagen muestra la transformación antena por pata causada por Antp, en rojo se indican rasgos específicos de pata, así como el engrosamiento de los segmentos antenales 2 y 3. **C)** La imagen muestra el desarrollo normal de antenas en individuos adultos con el complejo Antp-TBP-TFIIE β , **D)** El dímero Antp-Exd muestra el efecto transformante antena-pata. **E)** El dímero Antp-TBP muestra en desarrollo antenal normal.

9. DISCUSIÓN

En esta tesis se confirmó la formación de los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β y Exd en cultivo celular, utilizando versiones mutantes de Antp que causan su disrupción. Nuestros resultados confirman la formación de los complejos triméricos de Antp-TBP con TFIIE β y Exd, pero no con BIP2 e indican los dominios importantes en las interacciones triméricas. La formación del trímero Antp-TBP-TFIIE β depende de las regiones polyQ, del HD y específicamente de los residuos 32 y 36 de Antp mientras que el trímero Antp-TBP-Exd depende de las regiones polyQ y el tetrapéptido YPWM de Antp. Además, se encontró que los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β y Exd afectaron las transformaciones homeóticas torácicas T1 a T2 y la transformación antenapata *in vivo* utilizando como modelo *Drosophila melanogaster*. Nuestros resultados indican que los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIE β y Exd pueden regular la actividad de Antp, y abren la posibilidad de analizar la formación de complejos *in vivo* en contexto endógeno, así como la regulación a nivel transcripcional.

Para validar la formación de dicho complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β se utilizaron versiones mutantes de Antp con la finalidad de disrumpir la interacción proteína-proteína. Reportes previos indican que la interacción entre la homeoproteína Antp y el factor TFIIE β es dependiente del HD de Antp y que específicamente los residuos 32 y 36 de la hélice I del HD son los responsables de la interacción física (Baeza *et al.*, 2015; Altamirano-Torres 2018 y Zhu *et al.*, 1996). Además, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la interacción dimérica entre la homeoproteína Antp con el factor TBP es dependiente de ambas regiones de glutaminas denominadas regiones polyQ (Ovalle-Maqueo 2015; Montalvo-Méndez 2016). Los resultados obtenidos con las mutantes utilizadas mostraron un decremento altamente significativo en el valor de *E*, indicando que específicamente los residuos 32 y 36 del HD, así como la región PolyQ de Antp, son dominios de interacción importantes para la formación del complejo trimérico de Antp-TBP con TFIIE β . Debido a que se ha determinado mediante ensayos de BiFC en cultivo celular que TBP no interacciona con el factor TFIIE β (Salinas-Rodríguez 2021), nuestros resultados proponen que el complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β esta mediado por Antp ya que interacciona con TBP mediante su región polyQ y con TFIIE β mediante los

residuos 32 y 36 del HD. De acuerdo con los resultados mostrados por Hernández-Bautista donde la actividad transcripcional de Antp es potenciada por la formación del complejo trimérico Antp-TBP-TFIIE β *in vitro*, podríamos sugerir que las posiciones aminoacídicas que median la interacción física del complejo trimérico, no son un impedimento para que Antp pueda reconocer y unirse al DNA, así como para que el reclutamiento de factores como TFIIH por parte de TFIIE β se vea comprometido.

La formación del complejo trimérico Antp-TBP con Exd fue analizada utilizando las versiones mutantes Antp^{AAAA} con el tetrapéptido YPWM sustituido por AAAA y Antp Δ N con la delección en el extremo amino terminal incluyendo la región polyQ, para disrumpir su interacción física con Exd y TBP respectivamente (Papadopoulus *et al.*, 2011; Ovalle-Maqueo 2015; Montalvo-Méndez 2020). Los resultados del trímero Antp-TBP-Exd con el uso de las mutantes de Antp mostraron la disminución de la formación del complejo trimérico indicado por un valor de *E* menor y estadísticamente significativo, debido a la eliminación de los dominios de interacción importantes para la formación del complejo. Estos resultados nos permitieron determinar que el motivo YPWM y la región polyQ de Antp, son dominios clave en la formación del complejo trimérico Antp-TBP-Exd.

Cuando las mutantes Antp^{AAAA} y Antp Δ N fueron utilizadas para disrumpir la interacción con BIP2 (Papadopoulus *et al.*, 2011) y TBP (Ovalle-Maqueo 2015) respectivamente, encontramos valores de *E* ligeramente más elevados que en la versión de Antp^{WT}. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las proteínas WT y usando las mutantes Antp Δ N y Antp^{AAAA}, lo que indica claramente que el factor BIP2 no forma complejos triméricos con Antp y TBP en las condiciones utilizadas en cultivo celular.

Una vez confirmada la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd decidimos analizar su efecto funcional *in vivo* en las transformaciones homeóticas torácicas y de antena-pata en embriones y adultos de *Drosophila melanogaster*.

Los resultados obtenidos muestran una reducción de la involución de la cabeza en larvas de 1er estadio, así como la aparición de fenotipos intermedios tanto en los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd (Fig. 27A y 29A,

respectivamente), como en los dímeros Antp-TBP, Antp-TFIIE β (Fig. 28A-B) y Antp-Exd (Fig. 30A) utilizados como controles de los complejos triméricos. Estos resultados nos indican que la presencia de los factores transcripcionales TFIIE β , TBP, así como un cofactor como Exd pueden interferir en la regulación génica de Antp en larvas de *D. melanogaster*. Aunque los mecanismos moleculares de regulación no están del todo claros, nuestros resultados proponen a los complejos triméricos como un mecanismo regulatorio transcripcional *in vivo*.

El análisis del complejo dimérico Antp-TFIIE β mostró una disminución en la población larvaria con involución de la cabeza, este resultado nos permite sugerir que la interacción con el factor TFIIE β le podría restar función a la homeoproteína Antp, ya sea en su capacidad para el reclutamiento de factores o en su unión al DNA, ya sea para activar o reprimir genes involucrados en el establecimiento de las regiones anteriores del estadio larvario. Recientes reportes muestran que la interacción entre AntpHD con el factor TFIIE β es requerida para la transformación homeótica antena-pata en individuos adultos (Altamirano-Torres *et al.*, 2018), sin embargo, también se ha determinado que las interacciones proteína-proteína pueden ser específicas del tejido, así como su función (Carnesecchi *et al.*, 2020); Estas recientes aportaciones científicas podrían explicar la disminución de la función homeótica de Antp en larvas con los complejos triméricos de Antp con TBP, TFIIE β o Exd, así como con los dímeros de Antp con TBP, TFIIE β o Exd.

Para confirmar el efecto homeótico dado por Antp y su disminución en presencia de factores adicionales, nos enfocamos en analizar la transformación del segmento T1 a T2 en larvas de *D. melanogaster*, mediante la identificación de barbilla en la región T1 (Zeng *et al.*, 1993 y Gehring *et al.*, 2009). Cuando dirigimos la homeoproteína Antp con el driver *nullo*-GAL4 encontramos que el 100% de las larvas analizadas mostraban un fenotipo de transformación T1-T2 de acuerdo con lo ya previamente reportado (Gehring *et al.*, 2009). Al analizar los complejos triméricos de Antp-TBP con TFIIE β y Exd encontramos una disminución en el porcentaje de larvas con transformación homeótica de un 83% y 76% respectivamente. Resultados similares en la disminución del fenotipo homeótico fueron encontrados cuando analizamos los dímeros Antp-TBP (58%) y Antp-TFIIE β (49%). Sin embargo, cuando analizamos el dímero Antp-Exd sorpresivamente encontramos una reducción a un 90% de la población larvaria con fenotipo homeótico.

Estos resultados son apoyados por reportes que indican que deficiencias de Exd causan fallos en la involución de la cabeza en embriones de *Drosophila* (Peifer *et al.*, 1990). Sin embargo, al ser Exd un cofactor puede contribuir en la función de una homeoproteína (Ryoo *et al.*, 1999), esto es respaldado por los resultados de Merabet y cols. quienes muestran que la función de Ubx o Antp en embriones usando el driver *arm-GAL4* es dependiente del cofactor Exd (Merabet *et al.*, 2007).

Nuestros resultados de función *in vivo* muestran que, aunque no contribuye a bajar la función homeótica hasta un 58 o 49% como TBP y TFIIE β respectivamente, si está participando en impedir que Antp actúe para transformar el segmento T1 en T2 en larvas de *Drosophila melanogaster*, mostrando claramente la disminución homeótica.

Al analizar el efecto de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd sobre el efecto homeótico de Antp en la transformación antena-pata, encontramos que ambos trímeros evitan la transformación antena por pata en adultos de *D. melanogaster*. Resultados muy parecidos fueron encontrados cuando analizamos los complejos diméricos Antp-TBP y Antp-TFIIE β con el driver *dpp-GAL4*, en donde no se observaron alteraciones en el fenotipo de la antena, sin embargo cuando los mismos dímeros fueron analizados utilizando el driver *dll-GAL4*, encontramos ligeras alteraciones en la base de la arista mostrados en la figura 32D-E, indicando que la presencia tanto de TBP como TFIIE β que interaccionan con Antp pueden interferir en la función homeótica de la misma. Altamirano-Torres y cols., en 2018 mostró que el HD de Antp al interaccionar con TFIIE β promueve la transformación antena-pata, sin embargo, en los ensayos realizados en esta tesis se utilizó la versión completa de Antp con el factor TFIIE β y no se obtuvieron fenotipos homeóticos de antena-pata, estos resultados sugieren que el N-terminal de Antp podría tener un papel importante en la inhibición de la transformación homeótica, cuando el factor TFIIE β se encuentra presente.

La participación de Exd como cofactor formando complejos triméricos con Antp-TBP mostró la reducción del efecto homeótico de Antp en involución y transformación T1-T2, al igual que en transformación antena-pata, sin embargo, el dímero Antp-Exd con el driver *dpp-GAL4* mostró un efecto pronunciado, como se muestra en la figura 39 D donde contribuyó a la formación de estructuras tarsales en el lugar donde se debería desarrollar la antena. Reportes previos muestran la participación del cofactor Hth con

Antp de forma ectópica en *in vivo*, mostrando una disminución del fenotipo homeótico dado por Antp. Además, la expresión ectópica de Hth mostró la duplicación del eje próximo distal de la antena, sugiriendo que Hth está involucrado en el desarrollo de la antena en *D. melanogaster* (Yao *et al.*, 1998; Caseres y Man 1998), aunque se ha demostrado que en conjunto Hth-Exd contribuyen en la formación de la antena (Morata *et al.*, 1998; Caseres y Man 1998), nuestros resultados muestran que la expresión ectópica de Exd y Antp podría estar aumentando el efecto homeótico de Antp en el tejido de la antena, promoviendo el desarrollo de la pata con el driver *dpp*-GAL4. Reportes *in vivo* de la participación de Exd en complejos triméricos muestran que está involucrado en la regulación transcripcional, evidenciando que el trímero Ubx-Exd-Hth puede contribuir reprimiendo la transcripción *in vivo* (Gebelein *et al.*, 2002).

Nuestros resultados muestran un efecto similar al utilizar los drivers *dll*-GAL4 y *dpp*-GAL4 que dirigen su expresión hacia la región antenal del disco ojo-antena. Estos resultados podrían explicarse con lo reportado por Carnecechi y cols., quienes postulan que el efecto de las interacciones puede ser dependiente del tejido a donde se dirija. Además, la reducción del fenotipo homeótico a causa de los complejos triméricos y diméricos protagonizados por la homeoproteína Antp, abren la posibilidad de postular que los complejos triméricos y diméricos participan en la regulación transcripcional en etapas tempranas del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

En contraste con nuestros resultados se ha evidenciado previamente la participación de TFIIE β formando complejos con dímeros de la proteína Krüppel, dicho complejo trimérico ha destacado reprimiendo la transcripción, mientras que la interacción dimérica TFIIE β -Krüppel se caracteriza por activar la transcripción (Sauer *et al.*, 1995), dichos aportes concuerdan con nuestros resultados, destacando la relevancia que pueden llegar a tener los complejos triméricos y diméricos entre factores de la maquinaria basal transcripcional con homeoproteínas como Antp.

Además, reportes recientes de nuestro grupo de trabajo demuestran que los complejos triméricos pueden modificar la actividad transcripcional de Antp *in vitro* (Hernández-Bautista 2020), lo cual concuerda con los resultados obtenidos *in vivo* en nuestros modelos de homeosis, donde se muestra claramente que el efecto de una proteína homeótica como Antp, en involución y transformación T1-T2, así como en la

transformación antena-pata, puede ser modificado por la presencia de factores como TBP, TFIIE β y Exd, sugiriendo que en el contexto *in vivo* en *D. melanogaster* los factores transcripcionales que llegan a formar complejos proteína-proteína afectan a la especificidad de unión al DNA (Slattery *et al.*, 2011; Kribelbauer *et al.*, 2020). Los resultados presentados en esta tesis confirman la formación de los complejos Antp-TBP con TFIIE β o Exd, así como su participación en la función homeótica de Antp en *D. melanogaster*, abriendo la posibilidad de que los trímeros reportados podrían funcionar como un puente entre promotores y enhancers para genes blanco de Antp, y de esta manera participar en la regulación génica del desarrollo embrionario en *D. melanogaster*.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permiten concluir lo siguiente:

- El dímero Antp-TBP forma complejos triméricos con el factor TFIIE β y el cofactor Exd, pero no con el factor BIP2.
- La formación del trímero Antp-TBP-TFIIE β depende de los dominios de las regiones polyQ, del HD y específicamente los residuos 32 y 36 de Antp.
- La formación del trímero Antp-TBP-Exd depende de las regiones polyQ y el tetrapéptido YPWM de Antp.
- Las interacciones Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd disminuyeron la función homeótica de Antp *in vivo* en la involución de la cabeza y en la transformación T1-T2 en larvas de 1er estadio.
- Los complejos dímicos Antp-TFIIE β , Antp-TBP y Antp-Exd contribuyeron en la disminución homeótica de la proteína Antp en larvas de 1er estadio.
- Los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd evitaron la transformación antena-pata causada por la homeoproteína Antp en individuos adultos.
- La expresión de los complejos Antp-TBP y Antp-TFIIE β redujeron drásticamente la transformación antena-pata causando únicamente un engrosamiento de la base de la arista en individuos adultos de *D. melanogaster*.
- La expresión del complejo dímico Antp-Exd permite la función homeótica de Antp, promoviendo la formación de pata en el segmento antenal.

11. PERSPECTIVAS

El desarrollo del presente trabajo de tesis demostró por primera los dominios de Antp clave para la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd en cultivo celular. Así mismo, se determinó que dichos complejos triméricos influyen en el efecto funcional *in vivo* de Antp en transformaciones torácicas y de antena-pata en *Drosophila melanogaster*, lo que abre la posibilidad de estudiar los siguientes cuestionamientos:

- Realizar análisis de expresión ectópica para detectar la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd *in vivo* mediante BiFC-FRET en *D. melanogaster*.
- Analizar la formación de complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd de forma endógena *in vivo*.
- Determinar los genes blanco de Antp regulados por los complejos triméricos *in vivo* en *D. melanogaster*.
- Analizar la formación de complejos triméricos de Antp con otros miembros de la maquinaria basal transcripcional.

Aclarar dichos cuestionamientos, brindará información valiosa sobre complejos proteicos implicados la regulación transcripcional de Antennapedia en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

12. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

Brand AH, & Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2), 401-415.

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

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

Cárdenas-Chávez DL. 2012. Interacciones moleculares de Antennapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Carroll SB, Laymon RA, McCutcheon MA, Riley PD, Scott MP. 1986. The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* embryos. *Cell* 47: 113-122.

Carnesecchi J, Sigismondo G, Domsch K, Baader CEP, Rafiee MR, Krijgsveld J, & Lohmann I. 2020. Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity. *Nature communications*, 11(1), 1-17.

Casares F, & Mann RS. 1998. Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, 392(6677), 723-726.

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

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

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

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

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

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

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

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

Gebelein B, Culi J, Ryoo HD, Zhang W, Mann RS. 2002. Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev Cell*. 3(4):487–98

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

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

Gehring WJ, Kloter U, & Suga H. (2009). Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state. Current topics in developmental biology, 88, 35-61.

Gibson G, Gehring WJ. 1988. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during Drosophila development. *Development*, 102(4), 657-675.

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

Hayashi S, Scott MP. 1990. What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins?. Cell, 63(5), 883-894.

Heffer A, Pick L. 2013. Conservation and variation in Hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field. Annual review of entomology, 58, 161-179.

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

Hernandez-Bautista NC. 2021. La actividad transcripcional de Antp es modulada por la formación de los complejos triméricos Antp-TBP-TFIIE β y Antp-TBP-Exd, pero por el complejo Antp-TBP-BIP2. Tesis de Maestría. FCB UANL, Monterrey, Nuevo León.

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

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

Hudry B, Viala S, Graba Y & Merabet S. 2011. Visualization of protein interactions in living Drosophila embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. BMC biology, 9(1), 5.

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

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

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

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

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

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

Kribelbauer JF, Loker RE, Feng S, Rastogi C, Abe N, Rube HT, Bussemaker HJ & Mann RS. (2020). Context-dependent gene regulation by homeodomain transcription factor complexes revealed by shape-readout deficient proteins. *Molecular cell*, 78(1), 152-167.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Montalvo-Méndez RJ. 2020. Disección molecular de la interacción de TBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB mediante BiFC en la línea celular HEK293. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Immunobiología, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León

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

Morata G, & Sánchez-Herrero E. 1998. Pulling the fly's leg. *Nature*, 392(6677), 657-658.

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

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

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

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

Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA, Funfschilling R. & Gehring, WJ. (2011). Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in transcriptional activation and repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 11959-11964.

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

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

Peifer M, & Wieschaus E. 1990. Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes & development*, 4(7), 1209-1223.

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

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

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

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

Ryoo HD, & Mann RS. 1999. The control of trunk Hox specificity and activity by *Extradenticle*. *Genes & development*, 13(13), 1704-1716.

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

Salinas-Rodríguez P. 2021. Formación de heterodímeros débiles de TBP con TFIIE β y Exd mediante Fluorescencia por Complementación Bimolecular. Tesis de licenciatura, FCB UANL. Monterrey, Nuevo León.

Sauer F, Fondell JD, Ohkuma Y, Roeder RG, & Jäckle H. (1995). Control of transcription by *Krüppel* through interactions with TFIIB and TFIIE β . *Nature*, 375(6527), 162-164.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Yao LC, Liaw GJ, Pai CY, & Sun YH. 1999. A common mechanism for antenna-to-leg transformation in *Drosophila*: suppression of homothorax transcription by four HOM-C genes. *Developmental biology*, 211(2), 268-276.

Zeng W, Andrew DJ, Mathies LD, Horner MA, & Scott MP. 1993. Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development*, 118(2), 339-352.

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

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

RESEARCH

Open Access



Trimeric complexes of Antp-TBP with TFIIIE β or Exd modulate transcriptional activity

Gustavo Jiménez-Mejía^{1,2†}, Rubén Montalvo-Méndez^{1,2†}, Carolina Hernández-Bautista^{1,2}, Claudia Altamirano-Torres^{1,2}, Martha Vázquez³, Mario Zurita³ and Diana Reséndez-Pérez^{1,2*}

Abstract

Background: Hox proteins finely coordinate antero-posterior axis during embryonic development and through their action specific target genes are expressed at the right time and space to determine the embryo body plan. As master transcriptional regulators, Hox proteins recognize DNA through the homeodomain (HD) and interact with a multitude of proteins, including general transcription factors and other cofactors. HD binding specificity increases by protein-protein interactions with a diversity of cofactors that outline the Hox interactome and determine the transcriptional landscape of the selected target genes. All these interactions clearly demonstrate Hox-driven transcriptional regulation, but its precise mechanism remains to be elucidated.

Results: Here we report Antennapedia (Antp) Hox protein-protein interaction with the TATA-binding protein (TBP) and the formation of novel trimeric complexes with TFIIIE β and Extradenticle (Exd), as well as its participation in transcriptional regulation. Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), we detected the interaction of Antp-TBP and, in combination with Förster Resonance Energy Transfer (BiFC-FRET), the formation of the trimeric complex with TFIIIE β and Exd in living cells. Mutational analysis showed that Antp interacts with TBP through their N-terminal polyglutamine-stretches. The trimeric complexes of Antp-TBP with TFIIIE β and Exd were validated using different Antp mutations to disrupt the trimeric complexes. Interestingly, the trimeric complex Antp-TBP-TFIIIE β significantly increased the transcriptional activity of Antp, whereas Exd diminished its transactivation.

Conclusions: Our findings provide important insights into the Antp interactome with the direct interaction of Antp with TBP and the two new trimeric complexes with TFIIIE β and Exd. These novel interactions open the possibility to analyze promoter function and gene expression to measure transcription factor binding dynamics at target sites throughout the genome.

Keywords: Antp, TBP, TFIIIE β , Exd, Trimeric complexes, BiFC-FRET

Introduction

Hox proteins are transcription factors (TFs) that coordinate antero-posterior morphogenesis during embryo development [1–5]. They are characterized by a highly conserved DNA-binding homeodomain (HD) that recognizes small, highly frequent DNA sequences [6]. Although HDs are highly similar in structure and affinity, they regulate targets in a very specific space- and time-dependent manner, which raises the question of how they can recognize similar DNA sequences with high affinity to modulate target genes for functional specificity,

[†]Gustavo Jiménez-Mejía and Rubén Montalvo-Méndez contributed equally to this work.

*Correspondence: diana.resendezpr@uanl.edu.mx

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Inmunología y Virología, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

leading to the so-called “Hox paradox”. It has been reported that protein–protein interactions are crucial for the specificity of homeoproteins including cell–matrix proteins, chromatin remodeling complexes, cofactors and even non-coding RNAs [7–11]. Interactions with cofactors such as Extradenticle (Exd) and other transcriptional factors through the Hox proteins short linear motifs like the YPWM or UbdA are essential for Hox activity [12–14].

Of particular interest are the protein interactions that occur between Hox proteins and general transcription factors (GTF) from the RNA Pol II basal transcription machinery. Homeoproteins like Msx-1, Even-skipped (Eve), Pax5 and Pax6 also interact with TATA-binding protein (TBP) for transcriptional regulation [15–18]. Several homeoproteins interact with the Med19 subunit of MED complex, TFIIE β and M1BP, a pausing Pol II factor involved in chromatin remodeling [14, 19, 20]. Antennapedia (Antp) interacts with the Bric-a-brac interacting protein (BIP2/TAF3) through the YPWM motif [21] and with TFIIE β , specifically through the 32 and 36 positions of HD helix 2 [22]. Additionally, *Drosophila* and mouse Hox proteins form trimeric complexes with Exd-Homothorax (Hth) and MEIS-PBX respectively [23, 24]. This plethora of Hox protein–protein interactions clearly points to a Hox-driven transcription process in which every Hox homeoprotein could selectively recruit GTFs to achieve specificity and activate or repress target genes during *Drosophila* development, although the precise molecular mechanisms remain elusive [25].

Here, we focused on the interplay between Antp and the basal transcription machinery and show the direct interaction of Antp with TBP through the poly-glutamine (PolyQ) regions of both proteins. Furthermore, we found new trimeric complexes between Antp-TBP and TFIIE β or Exd, which modulate Antp transcriptional activity. Our results provide important insights into the molecular mechanisms of the Antp interactome with the basal transcription machinery and contribute to the intriguing molecular mechanisms by which the Hox interactome drives transcriptional regulation.

Results

Antp directly interacts with TBP through its N-terminal region

To determine the interaction between Antp and the basal transcription factor TBP, we performed Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays in human HEK293 cells. Our results showed the interaction between Antp and TBP on 77% of transfected cells (Fig. 1B). In order to characterize the Antp-TBP protein–protein interaction, we carried out a series of deletions and site-directed mutagenesis on both proteins

(Fig. 1A, Fig. S1 and S2). The absence of Antp N-terminal (Antp Δ N) decreased the interaction with TBP to 51% with a highly significant difference compared to 77% of Antp and 74% of the YPWM-HD deletion in Antp Δ HD. We also analyzed the interaction of the Antp YPWM motif substitution with alanines (Antp^{AAAA}), which also showed no significant effect in the interaction with TBP (Fig. 1B and C). These results clearly indicate that the N-terminal of Antp is important for its interaction with TBP, and neither the HD nor the YPWM motif is required for this interaction in cell culture.

Polyglutamine stretches of Antp and TBP are required for interaction

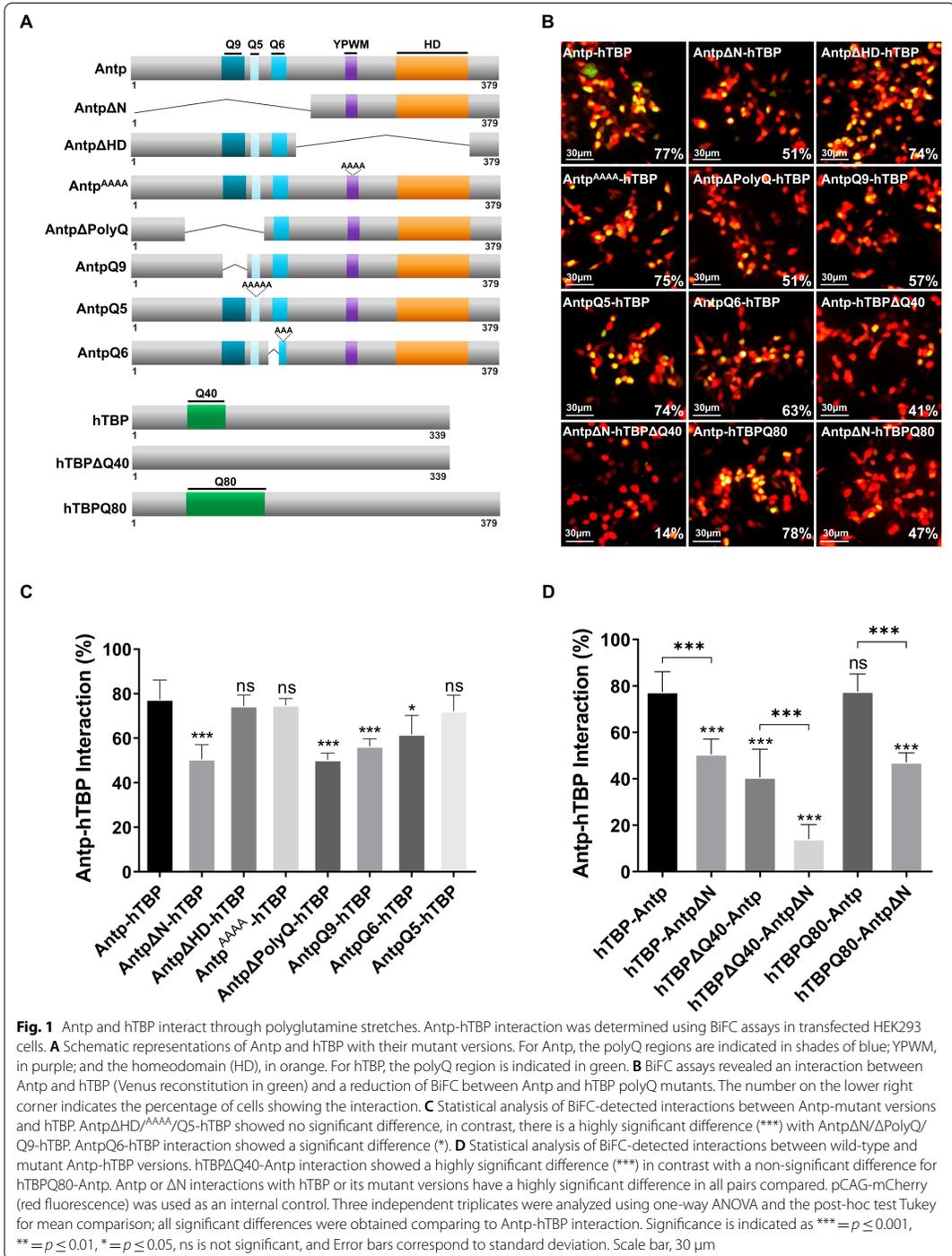
Since the Antp N-terminal is a PolyQ-rich region important for the interaction with TBP, we performed PolyQ stretch deletions (Antp Δ PolyQ and AntpQ9) or alanine substitutions (AntpQ6 and AntpQ5) on the Antp N-terminal (Fig. 1A and S1). A highly significant reduction to 57% with AntpQ9 and 51% with Antp Δ PolyQ was found (Fig. 1B and C). The simultaneous deletion and substitution of the AntpQ6 mutant version also significantly reduced the interaction to 63%, whereas mutagenesis of the AntpQ5 stretch maintained the interaction with TBP with non-significant difference (74%), compared to the wild-type Antp-TBP interaction (77%) (Fig. 1B and C). Our results indicated that Q9 and Q6 PolyQ stretches directly participate in the interaction with TBP and that Q5 stretch is not involved in the interaction.

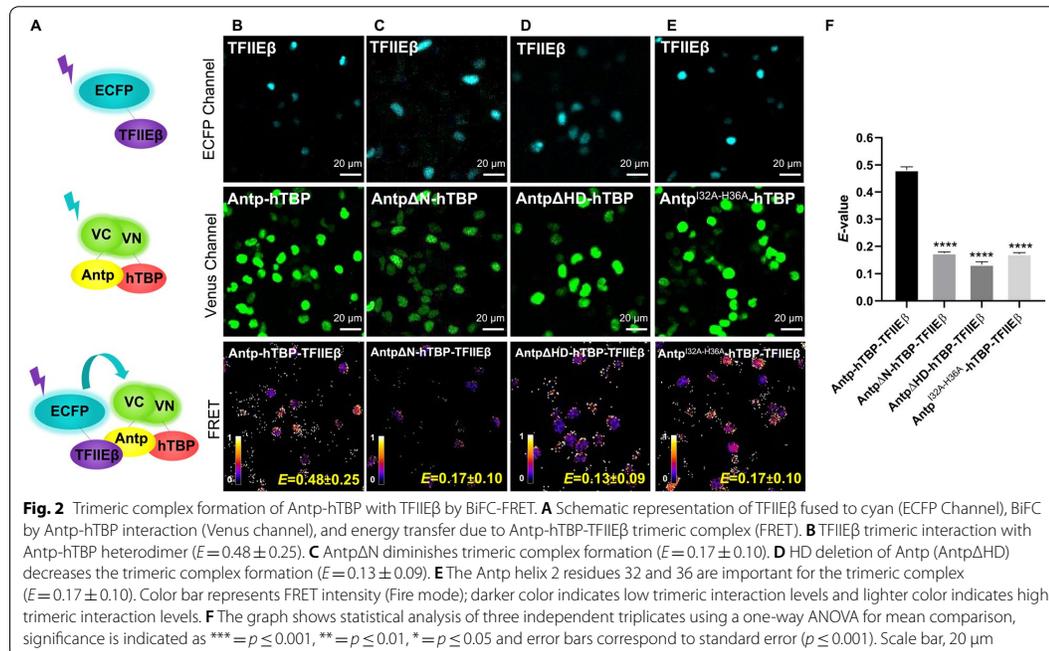
Given the importance of Antp PolyQ regions, we wondered whether TBP PolyQ is also involved in the interaction. Deletion of the TBP PolyQ (TBP Δ Q40) reduced its interaction with Antp to 41% with a highly significant difference (Fig. 1A, B, D and S2). Accordingly, the absence of both PolyQ regions from Antp (Antp Δ N) and TBP (TBP Δ Q40) caused a highly significant reduction to 14% (Fig. 1B and D). Additionally, an expanded TBP homopeptide (TBPQ80) did not affect the interaction, showing no significant difference (78%) compared to the wild-type Antp-TBP interaction (77%). In contrast, in absence of Antp PolyQs (Antp Δ N), the interaction with TBPQ80 diminished to 47% (Fig. 1B, D and S2). Altogether, these results indicate that PolyQ regions in both Antp and TBP are important for the interaction, and a longer TBPQ80 has no effect on it.

Trimeric complex formation of Antp-TBP with TFIIE β or Exd

To determine whether Antp-TBP could form trimeric complexes with other TFs, we first standardized a BiFC-FRET combination approach in living cells, using the Jun-Fos-p65 trimer (Fig. S3) as previously reported [26].

We used TFIIE β , Exd and BIP2 fused to ECFP as donors and VCAntp-VNTBP interaction (Venus





reconstitution) as acceptor (Fig. 2A, 3A and 4A). Formation of trimeric complexes between Antp-TBP and TFIIIE β was shown clearly with a high E value (0.48 ± 0.25) (Fig. 2B, lower panel). Disruption of Antp-TBP interaction by the Antp Δ N mutation caused a highly significant reduction of the trimeric complex ($E = 0.17 \pm 0.10$; Fig. 2C and F). In the same way, either the HD deletion of Antp in Antp Δ HD or the HD helix 2 mutant Antp^{I32A-H36A} [22] reduced the formation of the Antp-TBP-TFIIIE β trimer in a highly significant manner ($E = 0.13 \pm 0.09$ and $E = 0.17 \pm 0.10$ respectively; Fig. 2D-F). Together, these results validated the novel formation of the trimeric complex Antp-TBP-TFIIIE β , because the trimer is not formed when the domains involved in the dimeric interactions are missing in the Antp mutants.

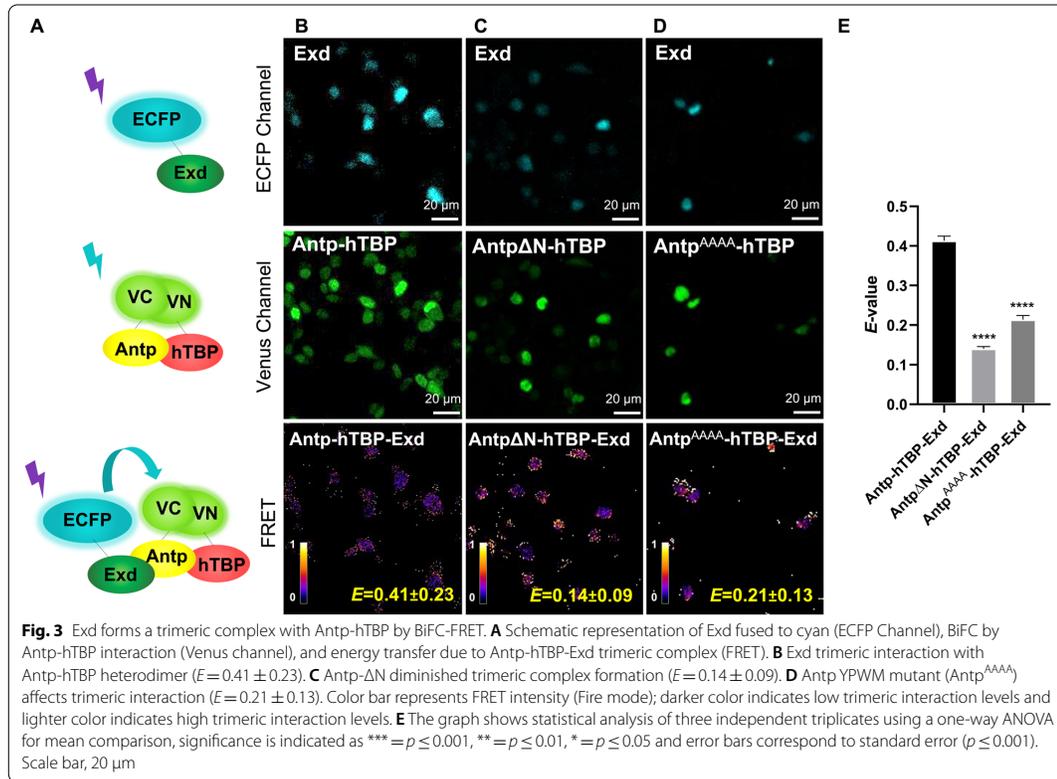
Next, we found the formation of Antp-TBP-Exd trimer ($E = 0.41 \pm 0.23$; Fig. 3A and B, lower panel). This trimeric interaction was corroborated by disruption of the Antp-TBP dimer using the Antp Δ N mutant, which showed a highly significant reduction of the trimeric complex ($E = 0.14 \pm 0.09$; Fig. 3C and E). Similarly, the Antp YPWM mutant (Antp^{AAAA}) decreased the formation of the trimeric complex in a highly significant manner ($E = 0.21 \pm 0.13$; Fig. 3D and E). Our results clearly corroborated the Antp-TBP-Exd trimer formation.

By contrast, we did not find the trimer formation between BIP2 and Antp-TBP ($E = 0.14 \pm 0.10$; Fig. 4A and B). Accordingly, both Antp Δ N and Antp^{AAAA} mutants used to disrupt dimeric interactions showed no significant difference ($E = 0.15 \pm 0.08$ and $E = 0.18 \pm 0.14$ respectively; Fig. 4C-E). These results corroborated that BIP2 does not form a trimeric complex with Antp-TBP.

Transcriptional function of Antp complexes with TBP, TFIIIE β or Exd

We next determined the effect of the complexes on Antp transcriptional activity using a luciferase (LUC) reporter (pGLH11) with a minimal Hsp70 promoter and eleven BS2 binding sites recognized by Antp helix 3 (Fig. S4). The relevance of PolyQ regions was confirmed with the Antp mutants Δ N, Δ PolyQ, Q9, and Q6 that reduced significantly Antp transactivation activity. Antp co-expressed with TBP had a statistically significant reduction to 76% of LUC expression compared to Antp, indicating that its transcriptional activity is affected by the presence of TBP. Moreover, there is no significant difference in the transcriptional activity between the mutant versions Antp Δ N, Δ PolyQ, Q9, and Q6 compared with their co-expression with TBP (Fig. 5A).

Interestingly, the Antp-TBP-TFIIIE β trimer shows a highly significant increase to 238% in Antp

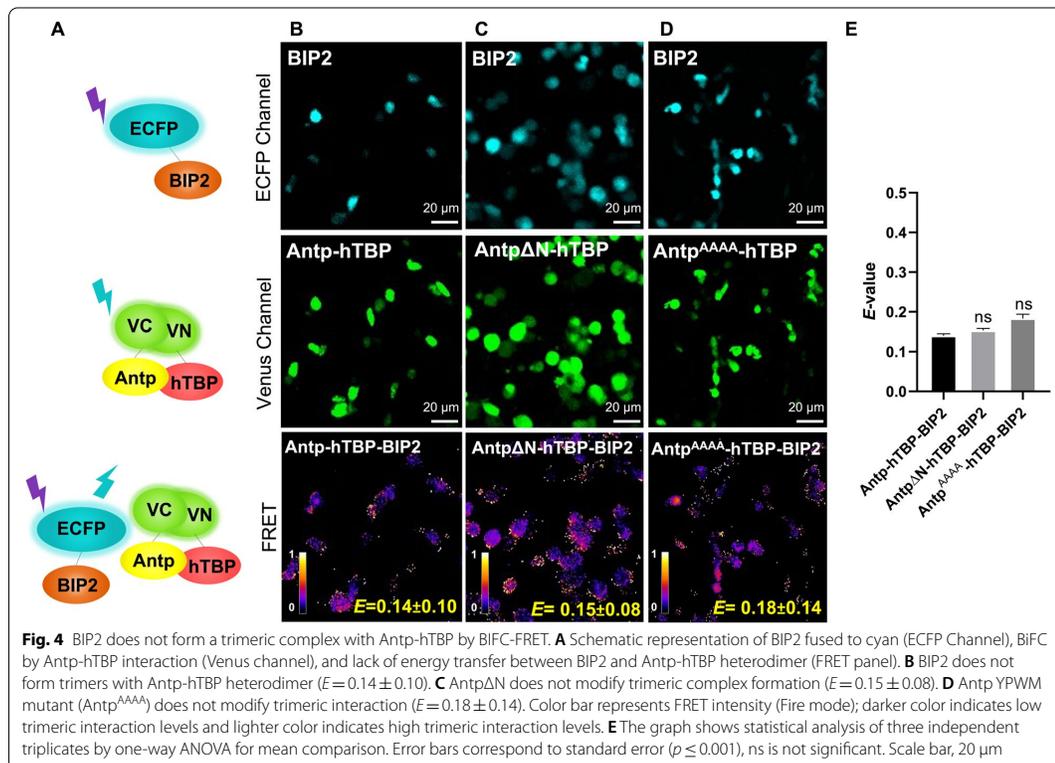


transcriptional activity (Fig. 5B). Trimer disruption with Antp mutants drastically decreases trimer transactivation levels to 49% (ΔN), 13% (ΔHD) and 72% (Antp^{I32A-H36A}). Antp transcriptional activity decreased to 73% for Antp-TBP and 52% for Antp-TFII β (Fig. 5B). Antp mutants with TBP or TFII β decreased transcriptional activity: Antp ΔN -TBP to 56%, and Antp ΔHD -TBP to 14%. In the same manner, Antp ΔN -TFII β was also reduced to 52%, and Antp ΔHD -TFII β to 32%. As expected, Antp^{I32A-H36A} with TFII β shows levels of transactivation very similar to Antp (90%). Our results clearly indicated that Antp-TBP-TFII β trimer significantly increased transcriptional activity whereas the dimers of Antp with TBP or TFII β diminish it. Altogether, these results support that the formation of trimer Antp-TBP-TFII β enhances Antp transcriptional activation.

We also found that Antp-TBP-Exd complex reduced significantly Antp transcriptional activity to 82% (Fig. 5C). The disruption of the trimer caused a significant reduction of transactivation to 65% (ΔN) and 70% (Antp^{AAAA}). Antp dimers also decrease activity to

73% with TBP and 61% with Exd. The use of Antp ΔN mutant to interfere with the formation of Antp-TBP showed a decrease of the transcriptional activity and does not have a significant effect on Antp-Exd as expected. Likewise, Antp^{AAAA} mutant with Exd has a transactivation level of 97%, very similar to Antp (Fig. 5C). These indicate that both trimeric and dimeric complexes between Antp, TBP and Exd reduced Antp transcriptional activity.

Furthermore, co-expression of Antp, TBP, and BIP2 reduced Antp transactivation to 74%, and the use of the mutant ΔN or Antp^{AAAA} did not show any significant difference (Fig. 5D), supporting the results described above for the lack of assembly of the trimeric complex. It is important to indicate that dimers showed the same transactivation activity. As expected, disrupting Antp-BIP2 dimer with Antp^{AAAA} mutant recovered Antp transactivation (Fig. 5D), indicating the YPWM effect on the dimer formation.



Discussion

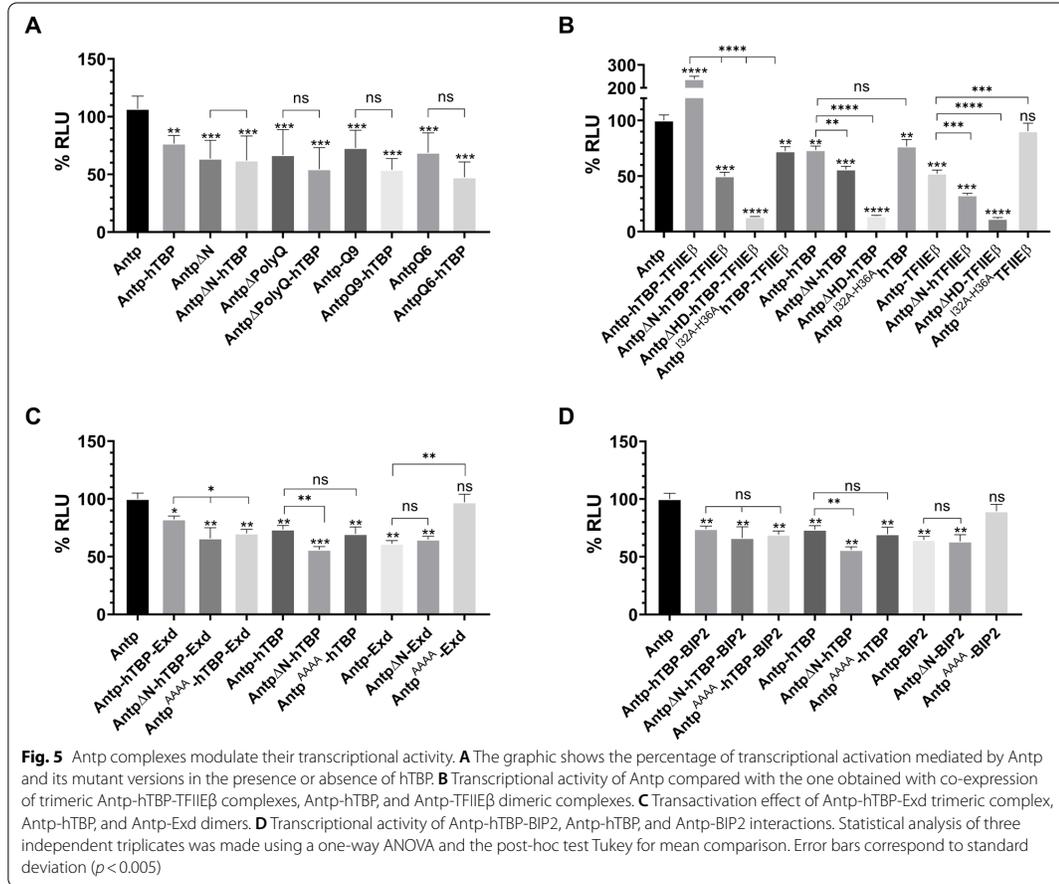
Here, we increased the repertoire of Hox interacting partners by identifying the interaction of Antp with TBP and the formation of novel trimeric complexes with TFIIE β and Exd, but not with BIP2 in living cells. Antp-TBP interaction involves both PolyQ regions, and they are also important for Antp transactivation activity. Furthermore, the trimeric complexes with TFIIE β and Exd modulate transcriptional regulation.

Antp-TBP interaction is relevant because TBP plays a central role in transcriptional regulation as a target for distinct activator and repressor proteins [27–33] and homeoproteins [15–18]. TBP interacts with CDX1 via the HD but not with CDX2, supporting the selective interaction of TBP with homeoproteins [34]. Like other homeoproteins, Antp interacts with other members of the basal transcription machinery as BIP2/TAF3, Med19, TFIIE β and M1BP [14, 19–22], denoting the implication of homeoproteins in the Preinitiation Complex (PIC).

The Antp PolyQ region is responsible for TBP interaction, as previously reported in pull-down assays [35], and this interaction is directly related to the number

of glutamines, supporting the function of the 9- and 6-PolyQ stretches. Previous studies point out that PolyQ stretches as protein–protein interaction motifs generally are related with transcriptional regulation [36, 37]. We also found that the PolyQ stretch of TBP is relevant for Antp interaction because its absence diminishes BiFC. This decrease is in accordance to a previous report of C-terminal domain of TBP involvement in Antp interaction [35]. Preliminary results of BiFC assays in *Drosophila melanogaster* TBP (dmTBP) showed similar percentage of interaction with Antp in a PolyQ-dependent manner, which is also supported by previous in vitro experiments due to the high structural similarity between hTBP and dmTBP [35, 38]. Antp-TBP interaction decreased even more in absence of both proteins' PolyQ regions. Similarly, it was previously reported that Ataxin 7 (SCA7) and the homeobox protein Crx interact through the PolyQ stretches from both proteins and this interaction can regulate transcriptional activity [39].

Our results show that Antp without its N-terminal region (Antp Δ N) reduced its transactivation activity in the same way as previously reported with HoxA5 [40],



indicating that PolyQ regions enhance transactivation activity, even though the HD is necessary for DNA-binding [6, 41]. These results are in concordance with previous reports indicating that the PolyQ region of Antp and Sp1 are required to activate transcription [42, 43].

Our results show that TBP decreases the Antp transcriptional activity in a similar manner as previously described with TFIIE β , Exd and BIP2 [13, 22]. These results are in accordance with Hox interactions that also decrease transactivation activity in presence of TBP [15–18]. In addition, the PolyQ mutants of Antp were not significantly affected by the presence of TBP, thus confirming the relevance of PolyQ in the Antp-TBP interaction. The PolyQ region of Fushi Tarazu interacts with TFIIB and the PolyQ region of AbdA acts as transcriptional activation domain in the regulation of *decapentaplegic* and *wingless* [44–46] indicating that they are

relevant for the interaction with the PIC for transcriptional regulation.

The PolyQ stretch of TBP is involved in the interaction with several TFs [31, 47, 48], leading repression and enhancing transcription [15–18, 49–51] and it has been proposed that it acts like a “communication port” for interaction with other TFs near the promoter in transcriptional regulation [52–55].

To our best knowledge, we describe for the first time the formation of trimeric complexes between Antp-TBP and TFIIE β or Exd using a combined BiFC-FRET assay.

In order to validate the new Antp-TBP-TFIIE β complex formation, we tested Antp mutations that disrupt protein–protein interactions and decrease FRET values. Previous reports both in vitro and in vivo show that Antp-TFIIE β interaction is HD-dependent, specifically through HD residues 32 and 36 [14, 22, 56]. These results clearly corroborate the trimer formation in a

similar way as described for Jun-Fos-p65 [26] and supports the importance of the PolyQ region as well as two single positions in the HD for the trimer formation. It was previously suggested that a trimeric complex can be formed by a protein that interacts with other proteins in an independent way acting as a bridge [23, 57, 58]. Given that BiFC assays have shown that TBP barely interacts with TFIIE β (unpublished results), it seems reasonable to speculate that Antp mediates the trimeric complex acting as a bridge between TBP through its PolyQ region and TFIIE β via its HD.

Interestingly, the Antp-TBP-TFIIE β complex shows a highly significant increase of Antp transcriptional activity (238%). This activity is due to the presence of the trimer, given the decrease of the transactivation activity when only the dimers are present, and the disruption of the interaction with TBP and TFIIE β by using Antp mutants. It is important to indicate that trimer-enhanced transactivation is dependent on protein-protein interaction with TFIIE β , since Antp^{I32A-H36A} mutant decreased the trimer activity as previously described for its co-expression with Antp [22]. These results support the key role of these two single HD amino acids in the assembly of the trimeric complex and its transcriptional function. In vivo, Antp-TFIIE β is required for antennae transformation into mesothoracic appendages, and this effect depends on residues 32 and 36 [22]. Our TFIIE β trimer results in Antp transactivation could suggest an in vivo scenario in which Antp potentiates its transcriptional function in target genes.

We also corroborated that Exd forms a trimeric complex with Antp-TBP using Antp mutants that decreased FRET values significantly by disrupting Antp-Exd and Antp-TBP interactions, suggesting that the PolyQ regions and the YPWM motif are important mediators in this complex [13]. The Exd trimer decreased transcriptional activity, in contrast to the TFIIE β trimer. This reduction is observed despite Exd binding to BS2 sites and partially activating LUC reporter compared to Antp (Fig. S4). In the same manner, other reports show that the trimer complex MEIS1-PBX-HOXA9 and the dimer PBX-HOXA9 did not transactivate a reporter gene with PBX-HOXA9 binding sites in myeloid leukemia [59]. On the other hand, Ubx-Exd-Hth can repress transcription, whilst Antp-Exd-Hth does not repress transcription in vivo [60].

When we analyzed whether Antp-TBP forms a trimer with BIP2, we did not find a positive FRET value compared to the Jun-Fos-p65 controls (Fig. S3). Additionally, we did not find significant differences between the Antp mutants used to disrupt its interaction with TBP and BIP2, when compared to Antp wild type.

Altogether, our results support that the trimeric complexes with TFIIE β and Exd could modulate gene expression by activation or repression.

Our results raised the question of how the dimeric and trimeric interactions of Antp with GTFs and Exd contribute to transcriptional regulation within the Pol II Preinitiation Complex (PIC) at promoters and enhancers. When Antp is co-expressed with TBP, TFIIE β , BIP2 or Exd, its transactivation activity is diminished [13, 22] hence we could speculate that Antp dimers are involved in repression transcriptional activities. Within the PIC, TBP recruits TFIIB by protein-protein interaction through the TBP PolyQ stretch [47]. Therefore, Antp interaction with TBP could inhibit transcription by a “squelching” effect, preventing the recruitment of TFIIB in the establishment of the PIC [61]. Similarly, Eve acts as a repressor in *Drosophila* embryogenesis, interacting with TBP and blocking transcription in vitro by preventing TFIID-TATA box interaction [62]. Other HD proteins like Msx1 or Pax5 also interact with TBP, leading to transcriptional repression [15–18]. In the same manner, it has been determined that the zinc-finger TF Krüppel (Kr), a *Drosophila* segmentation protein for early embryonic development, interacts with TFIIE β for transcription repression and this interaction is DNA-binding dependent [63].

The high level of transactivation activity of the Antp-TBP-TFIIE β trimer indicates an activation scenario for transcription in which Antp may serve as a GTF recruiter to assemble or stabilize the PIC. This can be done by allowing TBP to bind DNA for initiation, and/or TFIIE β to promote TFIID activities for transcriptional elongation. There are a number of HD TFs that participate in protein-protein interactions with activation functions, for instance, Kr interacts with TFIIB [63] and Med19 interacts with Antp and other homeoproteins for Ubx target gene activation in *Drosophila* [19].

The Antp trimeric complex with TBP and TFIIE β may operate as an anchor between promoters and enhancers at Antp target genes, potentiating transcription. Moreover, at the chromatin level, it has been established that Exd and Hth cooperate with Hox proteins in chromatin opening [64], and Ubx binds DNA to open and close chromatin and modulate transcription during *Drosophila* haltere development [65]. It would be of great interest to determine whether the Antp trimer complexes with TBP, TFIIE β and Exd participate in similar activities at the chromatin level.

Conclusions

In this paper we describe the direct interaction of Antp with TBP and the new trimeric complexes with TFIIE β and Exd but not with BIP2 in living cells. We also found

that the PolyQ region of both proteins are necessary for the Antp-TBP interaction and that other Antp interacting domains, like the HD and YPWM, are relevant for the formation of trimeric complexes. These trimeric complexes can modulate transcriptional regulation and open the possibility to further explore their function in PIC formation and at chromatin level throughout the *Drosophila* genome.

Methods

Plasmids constructs

For BiFC assays, Antp, Antp Δ N, Antp Δ HD, Antp^{AAAA}, Antp Δ polyQ as well as and hTBP coding sequences were generated by PCR from pPAC plasmids [13, 66] and hTBPQ80 was amplified from pUASTattB-hTBPQ80 [67]. The coding sequences were restriction-cloned in frame with C- or N-terminal of Venus (VC and VN, respectively) using the *Age*I and *Xba*I restriction sites of pCS2VNm9 and pCS2VC155 vectors [68]. Antp mutants (AntpQ5, AntpQ6, and AntpQ9) and hTBP Δ Q40 were generated by site-directed mutagenesis (Quickchange II XL kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA). For BiFC-FRET assays, BIP2 (2–89), Exd (144–376) and TFIIIE β coding sequences were PCR amplified and restriction-cloned in pECFP-N1 expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) using *Apal* and *Age*I (Table S1). For transactivation assays, we used the pNPAC-Antp, -Antp Δ N, -Antp Δ HD, -Antp^{AAAA}, -Antp^{I32A-H36A} and -Antp Δ PolyQ plasmids previously obtained [13, 22, 66]. pNPAC-AntpQ6 and pNPAC-AntpQ9 were constructed by PCR and restriction-cloned in *Not*I. Oligonucleotides used for cloning and site-directed mutagenesis in the constructs are listed in Table S1. All plasmid constructs were verified by DNA sequencing before cell co-transfections.

BiFC and transactivation assays in cell culture

HEK293 cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1% penicillin–streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA). For transfections, we seeded 2×10^5 HEK293 cells per well in 6-well plates with glass coverslips, cultured for 48 h and co-transfected with 6 μ g of DNA. The transfections were carried out with polietilenimine (PEI) 40 kDa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), using 1 μ L of PEI 15 mM for each microgram of DNA transfected. Interactions by BiFC were performed by co-transfecting the VC- and VN- constructs along with the plasmid pCAG-mCherry (donated by Ataúlfo Martínez-Torres) as a control for transfection efficiency and the BiFC percentage calculation, as previously described [22]. The coverslips were visualized 48 h after transfection using

Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Germany) microscope and four different fields of cells were acquired in the green and red channels using the same parameters with a 20X objective in three independent experiments. The quantification of green (BiFC) and red fluorescence (cherry, transfection efficiency) was performed in ImageJ by converting the RGB image to 8 bits and using the brightness and contrast tools to discriminate the positive BiFC signal from the background. Each fluorescent cell (red or green) was quantified using the cell counter plug-in. Interaction percentages were calculated by counting the number of green cells per 100 red cells [22]. Representative images were acquired using Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Germany) microscope. For the transactivation assays, we co-transfected HEK293 cells in 6-well plates as described above with pPAC, pGLH11 reporter and pcopia- β Gal (used to normalize the luciferase activity) as previously described [13]. The luminescence was determined 48 h after transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Transfections assays were performed in three independent experiments by triplicate.

BiFC-FRET assays

For the analysis of trimeric interaction, the BiFC-FRET assays were performed in HEK293 cells maintained under standard cell culture conditions. Cells were seeded on 6-well plates, 48 h later transfections were carried out using 1 μ L of PEI (40 kDa) 15 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) for each microgram of DNA. Trimeric interactions by BiFC-FRET were performed co-transfecting the VC-, VN- and EFCP- constructs. BiFC-FRET image acquisition was done 48 h after transfection in an Olympus BX61W1 microscope; 10 nm size photographs were collected in spectral mode (420–660 nm) using 10 nm of stepsize under the confocal parameters 600v, 1X gain, 0% offset, and 10% laser potency with 20X objective. The BiFC-FRET quantification (*E*-value) was performed using ImageJ and the FRETITY plug-in. This plug-in uses 2D deconvolution spectral unmixing by comparing the donor and acceptor images to measure the energy transfer between Venus and ECFP [69]. For all assays, three independent experiments were performed. pBiFC-bJun-VN173, pBiFC-bJun-YN173, pBiFC-bFos-VC155, pBiFC-bFos-VC155, pBiFC-bFos Δ ZIP-VC155, pFlag-p65-Cerulean and pFlag-p65 Δ 25-Cerulean expression vectors used for BiFC-FRET standardization were kindly provided by Hu Chang-Deng [26].

Abbreviations

BiFC: Bimolecular Fluorescent Complementation; FRET: Fluorophore Resonance Energy Transfer; ECFP: Enhanced Cyan Fluorescent Protein; Antp: Antennapedia; TBP: TATA binding protein; VN: N-terminal region of Venus fluorescent protein; VC: C-terminal region of Venus fluorescent protein.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s41065-022-00239-8>.

Additional file 1: Supplementary Figure 1. Alignment of amino acid sequences in Antp mutants. Antp WT sequence comparison with Antp mutants showed: Antp Δ N lacking the N-terminal region (amino acids 1–269), Antp Δ HD without the HD (amino acids 245–363), AntpAAAA in which the YPWM was substituted by alanines, Antp Δ PolyQ with deletion of PolyQ regions (amino acids 66–136), AntpQ9 with deletion of the 9-polyQ stretch (amino acids 110–118), AntpQ5 in which the 5-polyQ stretch was mutagenized to alanines (amino acids 123–127), AntpQ6 with deletion of three glutamines (amino acids 150–152) and substitution of three glutamines to alanines (amino acids 153–155).

Additional file 2: Supplementary Figure 2. Alignment of amino acid sequences in hTBP and mutants. hTBP protein sequence compared to hTBP mutants: TBP Δ Q40 lacking the Poly-glutamine region (amino acids 50–102), and hTBPQ80 has an extension of 80 glutamine residues (amino acids 50–142).

Additional file 3: Supplementary Figure 3. Trimeric interaction p65-Jun-Fos by BiFC-FRET by FRET algorithm. (A) Schematic representation of p65 fused to Cerulean (donor), BiFC by Jun-Fos interaction (acceptor), and energy transfer due to p65-Jun-Fos trimeric complex (FRET). (B) p65-Jun-Fos form a trimeric complex ($E=0.42\pm 0.22$). (C) Deletion of 25 amino acids from p65 (p65 Δ) decreased the trimeric complex formation ($E=0.13\pm 0.07$). (D) Fos mutation (Fos Δ) reduced the formation of the trimeric complex ($E=0.14\pm 0.04$). Color bar represents FRET intensity (Fire mode); darker color indicates low trimeric interaction levels and lighter color indicates high trimeric interaction levels. FRET images were acquired using the FRET algorithm. (E) The graph shows statistical analyses of three independent triplicates using a one-way ANOVA for mean comparison, significance is indicated as ***= $p \leq 0.001$, **= $p \leq 0.01$, *= $p \leq 0.05$ and Error bars correspond to standard error ($p \leq 0.001$). Scale bar, 20 μ m.

Additional file 4: Supplementary Figure 4. Transcription factors activity on pGLH11. (A) Schematic representation of pGLH11 luciferase reporter (LUC) containing a minimal Hsp70 promoter and eleven tandem copies of BS2 Antp binding sites. (B) The graphic shows the percentage of transactivation activity mediated by Antp, hTBP, TFIIIE β , Exd, and BIP2. pPAC shows the levels of transcription of the empty expression vector. Statistical analysis of three independent triplicates was made using a one-way ANOVA and the post-hoc test Tukey for mean comparison. Error bars correspond to standard deviation ($p < 0.005$).

Additional file 5: Supplementary Table 1. List of oligonucleotides sequences used for plasmid constructions.

Acknowledgements

We thank Amaury Ovalle Maqueo and Paulina Rodríguez Salinas for technical advice and support. We also appreciated the kind donation of plasmids from Dr. Jun Ma (TBP) and Dr. James Smith (VC and VN). Alejandra E. Arreola-Triana provided critical editing of the manuscript.

Authors' contributions

GJM, RMM, CAT and CHB performed experimental and statistical analysis. GJM, RMM, CHB, CAT, MZ, MV and DRP wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología project number 2280 granted to DRP and graduate fellowships 722363 and 790953 awarded to GJM and CHB.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Inmunología y Virología, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular y Genética, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ³Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Cuernavaca, Morelos, México.

Received: 7 April 2022 Accepted: 17 May 2022

Published online: 30 May 2022

References

- McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*. 1992;68(2):283–302.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*. 1994;78(2):191–201.
- Gellon G, McGinnis W. Shaping animal body plans by modulation of Hox in development and evolution expression patterns. *Bioessays*. 1998;20(1):116–25.
- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*. 2005;6(12):893–904.
- Hueber SD, Lohmann I. Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *BioEssays*. 2008;30(10):965–79.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, et al. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*. 1994;78(2):211–23.
- 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(3):530–43.
- Joshi R, Sun L, Mann R. Dissecting the functional specificities of two Hox proteins. *Genes Dev*. 2010;24(14):1533–45.
- Crocker J, Abe N, Rinaldi L, McGregor AP, Frankel N, Wang S, et al. Low affinity binding site clusters confer HOX specificity and regulatory robustness. *Cell*. 2015;160(1–2):191–203.
- Bobola N, Merabet S. Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;43:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.09.008>.
- Shokri L, Inukai S, Hafner A, Weinand K, Hens K, Vedenko A, et al. A Comprehensive Drosophila melanogaster Transcription Factor Interactome. *Cell Rep*. 2019;27(3):955–970.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.071>.
- Mann RS, Lelli KM, Joshi R. Hox Specificity: Unique Roles for Cofactors and Collaborators. *Curr Top Dev Biol*. 2010;88(63–101). Available from: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88003-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88003-4).
- Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DL, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Felix DA, et al. Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size

- in transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(29):11959–64.
14. Baēza M, Viala S, Heim M, Dard A, Hudry B, Duffraisse M, et al. Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife*. 2015;4:1–28.
 15. Park KS, Kim KK, Kim KE. Msx1 homeodomain transcription factor and TATA-binding protein interact to repress the expression of the glycoprotein hormone α subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468(1–2):326–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.102>.
 16. Um M, Li C, Manley JL. The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1995;15(9):5007–16.
 17. Eberhard D, Busslinger M. The partial homeodomain of the transcription factor Pax-5 (BSAP) is an interaction motif for the retinoblastoma and TATA-binding proteins. *Cancer Res*. 1999;59(7 SUPPL):1716–26.
 18. Cvekl A, Kashanchi F, Brady JN, Piatigorsky J. Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(7):1343–50.
 19. Boube M, Hudry B, Immarigeon C, Carrier Y, Bernat-Fabre S, Merabet S, et al. Drosophila melanogaster Hox Transcription Factors Access the RNA Polymerase II Machinery through Direct Homeodomain Binding to a Conserved Motif of Mediator Subunit Med19. *PLoS Genet*. 2014;10(5):e1004303.
 20. Zouz A, Auradkar A, Delfini MC, Macchi M, Barthez M, Akoa SE, et al. The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription. *EMBO J*. 2017;33:1–20.
 21. Prince F, Katsuyama T, Oshima Y, Plaza S, Resendez-Perez D, Berry M, et al. The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development*. 2008;135(9):1669–79.
 22. Altamirano-Torres C, Cárdenas-Chávez DL, Reséndez-Pérez D, Salinas-Hernández JE, Rodríguez-Padilla C. Transcription factor TFIIIE β interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in Drosophila. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205905.
 23. Shanmugam K, Green NC, Rambaldi I, Saragovi HU, Featherstone MS, PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7577–88.
 24. Hudry B, Remacle S, Delfini MC, Rezsohazy R, Graba Y, Merabet S. Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the pbc class cofactors. *PLoS Biol*. 2012;10(6):e1001351.
 25. Carnesecci J, Pinto PB, Lohmann I. Hox transcription factors: An overview of multi-step regulators of gene expression. *Int J Dev Biol*. 2018;62(11–12):723–32.
 26. Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. Visualization of AP-1-NF- κ B ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(1):151–6.
 27. Pugh BF. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*. 2000;255(1):1–14.
 28. Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohyama Y, Siponen M, Lundström P, et al. High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(8):1008–14.
 29. Jackson-Fisher AJ, Chitikila C, Mitra M, Pugh BF. A role for TBP dimerization in preventing unregulated gene expression. *Mol Cell*. 1999;3(6):717–27.
 30. Hsu JY, Juven-Gershon T, Marr MT, Wright KJ, Tjian R, Kadonaga JT. TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes Dev*. 2008;22(17):2353–8.
 31. Das D, Scovell WM. The Binding Interaction of HMG-1 with the TATA-binding Protein/TATA Complex. *J Biol Chem*. 2001;276(35):32597–605. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M011792200>.
 32. Wei Y, Resetca D, Li Z, Johansson-Åkhe I, Ahlner A, Helander S, et al. Multiple direct interactions of TBP with the MYC oncoprotein. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(11):1035–43.
 33. Mohibullah N, Hahn S. Site-specific cross-linking of TBP in vivo and in vitro reveals a direct functional interaction with the SAGA subunit Spt3. *Genes Dev*. 2008;22(21):2994–3006.
 34. Calon A, Gross I, Davidson I, Kedinger M, Duluc I, Domon-Dell C, et al. Functional interaction between the homeoprotein CDX1 and the transcriptional machinery containing the TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):175–85.
 35. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1582–93.
 36. Atanesyan L, Viola G, Dichtl B, Georgiev O, Schaffner W. Polyglutamine tracts as modulators of transcriptional activation from yeast to mammals activation from yeast to mammals. 2012. p. 393.
 37. Albà MM, Guigó R. Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. *Genome Res*. 2004;14(4):549–54.
 38. Kramm K, Engel C, Grohmann D. Transcription initiation factor TBP: Old friend new questions. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(1):411–23.
 39. Chen S, Peng GH, Wang X, Smith AC, Grote SK, Sopher BL, et al. Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization. *Hum Mol Genet*. 2004;13(1):53–67.
 40. Zhao JJ, Lazzarini RA, Pick L. Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *EMBO J*. 1996;15(6):1313–22.
 41. Baier LJ, Hannibal MC, Hanley EW, Nabel GJ. Lymphoid expression and TATAA binding of a human protein containing an Antennapedia homeodomain. *Blood*. 1991;78(4):1047–55. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.V78.4.1047.1047>.
 42. Couray AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*. 1989;59(5):827–36.
 43. Couray AJ, Tjian R. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. 1988;55(5):887–98.
 44. Colgan J, Wampler S, Manley JL. Interaction between a transcriptional activator and transcription factor IIB in vivo. *Nature*. 1993;362(6420):549–53.
 45. Colgan J, Ashali H, Manley JL. A direct interaction between a glutamine-rich activator and the N terminus of TFIIIB can mediate transcriptional activation in vivo. *Mol Cell Biol*. 1995;15(4):2311–20.
 46. Merabet S, Kambiris Z, Capovilla M, Bérenger H, Pradel J, Graba Y. The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell*. 2003;4(5):761–8.
 47. Friedman MJ, Shah AG, Fang ZH, Ward EG, Warren ST, Li S, et al. Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIIB interaction: Implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1519–28.
 48. Zhang H, Catron KM, Abate-Shen C. A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: Residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):1764–9.
 49. Mittal V, Ma B, Hernandez N. Snap(c): A core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain. *Genes Dev*. 1999;13(14):1807–21.
 50. Peterson MG, Tanese N, Franklin Pugh B, Tjian R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science*. 1990;248(4963):1625–30.
 51. Hsu TC, Wang CK, Yang CY, Lee LC, Hsieh-Li HM, Ro LS, et al. Deactivation of TBP contributes to SCA17 pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 2014;23(25):6878–93.
 52. Seipel K, Georgiev O, Gerber HP, Schaffner W. C-terminal domain (CTD) of RNA-polymerase II and N-terminal segment of the human TATA binding protein (TBP) can mediate remote and proximal transcriptional activation, respectively. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(24):5609–15.
 53. Lescure A, Lutz Y, Eberhard D, Jacq X, Krol A, Grummt I, et al. The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J*. 1994;13(5):1166–75.
 54. Manley JL. Mechanisms of transcriptional activation and repression can both involve TFIID. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 1996;351(1339):517–26.
 55. Hobbs NK, Bondareva AA, Barnett S, Capecchi MR, Schmidt EE. Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental β 2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell*. 2002;110(1):43–54.
 56. Zhu A, Kuziora MA. Homeodomain interaction with the β subunit of the general transcription factor TFIIE. *J Biol Chem*. 1996;271(35):20993–6. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.20993>.

57. Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS. Regulation of Hox target genes by a DNA bound homothorax/Hox/extradenticle complex. *Development*. 1999;126(22):5137–48.
58. Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. Trimeric Association of Hox and TALE Homeodomain Proteins Mediates Hoxb2 Hindbrain Enhancer Activity. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):5134–42.
59. Shen W-F, Rozenfeld S, Kwong A, Kömüves LG, Lawrence HJ, Largman C. HOXA9 Forms Triple Complexes with PBX2 and MEIS1 in Myeloid Cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19(4):3051–61.
60. Gebelein B, Culi J, Ryoo HD, Zhang W, Mann RS. Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev Cell*. 2002;3(4):487–98.
61. Gill G, Ptashne M. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*. 1988;334(6184):721–4.
62. Li C, Manley JL. Even-skipped Represses Transcription by Binding TATA Binding Protein and Blocking the TFIID-TATA Box Interaction. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):3771–81.
63. Sauer F, Fondell JD, Ohkuma Y, Roeder RG, Jäckle H. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIE β . *Nature*. 1995;375(6527):162–4.
64. Porcelli D, Fischer B, Russell S, White R. Chromatin accessibility plays a key role in selective targeting of Hox proteins. *Genome Biol*. 2019;20(1):1–19.
65. Loker R, Sanner JE, Mann RS. Cell-type-specific Hox regulatory strategies orchestrate tissue identity. *Curr Biol*. 2021;31(19):4246–4255.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.030>.
66. Cárdenas Chávez, DL. Interacciones moleculares de la antenapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional. [Dissertation on the Internet]. Monterrey (MX): Universidad Autónoma de Nuevo León; 2012 [cited 2022 May 10]. 137 p. Available from: <http://eprints.uanl.mx/2701>.
67. Ren J, Jegga AG, Zhang M, Deng J, Liu J, Gordon CB, et al. A Drosophila model of the neurodegenerative disease SCA17 reveals a role of RBJ-/Su(H) in modulating the pathological outcome. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17):3424–36.
68. Saka Y, Hagemann AI, Piepenburg O, Smith JC. Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in *Xenopus*. *Development*. 2007;134(23):4209–18.
69. Mustafa S, Hannagan J, Rigby P, Pflieger K, Corry B. Quantitative Förster resonance energy transfer efficiency measurements using simultaneous spectral unmixing of excitation and emission spectra. *J Biomed Opt*. 2013;18(2):026024.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Gustavo Jiménez Mejía

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: Los complejos triméricos de Antennapedia con la proteína de unión a caja TATA y el factor transcripcional TFIIE β ó Extradenticle regulan la actividad homeótica en *D. melanogaster*

Campo de estudio: Ciencias Naturales, Biología molecular y del Desarrollo

Datos personales: Nacido el 25 de Enero de 1991, hijo de Rafael Jiménez Salazar y Laura Alicia Mejía Medrano.

Educación: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo por la Universidad Autónoma de Tamaulipas en 2016. Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2018.

Experiencia profesional: Docente por horas en la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2019, impartiendo las materias de Proteómica y Biología del Desarrollo a nivel licenciatura.