

# *Drosophila* en el estudio de las interacciones proteicas de hTBP en el desarrollo y modelaje de SCA17

Rubén J. Montalvo-Méndez, Marcela Cárdenas-Tueme y Diana Reséndez-Pérez\*

Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

## Resumen

**Antecedentes:** Las interacciones proteicas participan en una gran cantidad de mecanismos moleculares que rigen los procesos celulares. La proteína de unión a la caja TATA humana (hTBP) interacciona con Antennapedia (Antp) a través de su extremo N-terminal, específicamente a través de sus homopéptidos de glutaminas. Esta región PolyQ sirve como sitio de unión a factores de transcripción en condiciones normales, pero cuando se expande genera la ataxia espinal cerebelosa 17 (SCA17), cuyos agregados proteicos en el cerebro impiden su funcionamiento correcto. **Objetivo:** Determinar si la región rica en glutaminas de hTBP interviene en su interacción con homeoproteínas y el papel que tiene en la formación de agregados proteicos en SCA17. **Material y métodos:** Se caracterizó la interacción de hTBP con otras homeoproteínas usando BiFC y se modeló SCA17 en *Drosophila melanogaster* dirigiendo hTBPQ80 al cerebro de las moscas usando UAS/GAL4. **Resultados:** Existió interacción de hTBP con homeoproteínas a través de su región rica en glutaminas. Los agregados proteicos de hTBP con las glutaminas expandidas afectaron la capacidad locomotriz de las moscas. **Conclusiones:** El estudio de las interacciones de hTBP abre la posibilidad para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en patologías neurodegenerativas como SCA17.

**PALABRAS CLAVE:** Homeoproteínas. hTBP. Interacciones proteicas. SCA17.

## *Drosophila* in the study of hTBP protein interactions in the development and modeling of SCA17

### Abstract

**Background:** Protein interactions participate in many molecular mechanisms involved in cellular processes. The human TATA box binding protein (hTBP) interacts with Antennapedia (Antp) through its N-terminal region, specifically via its glutamine homopeptides. This PolyQ region acts as a binding site for other transcription factors under normal conditions, but when it expands, it generates spinocerebellar ataxia 17 (SCA17), whose protein aggregates in the brain prevent its correct functioning. **Objective:** To determine whether the hTBP glutamine-rich region is involved in its interaction with homeoproteins and the role it plays in the formation of protein aggregates in SCA17. **Material and methods:** We characterized hTBP interaction with other homeoproteins using BiFC, and modeled SCA17 in *Drosophila melanogaster* by targeting hTBPQ80 to the fly brain using UAS/GAL4. **Results:** There was hTBP interaction with homeoproteins through its glutamine-rich region, and hTBP protein aggregates with expanded glutamines were found to affect the locomotor capacity of flies. **Conclusions:** The study of hTBP interactions opens the possibility for the search for new therapeutic strategies in neurodegenerative pathologies such as SCA17.

**KEYWORDS:** Homeoproteins. hTBP. Protein interactions. SCA17.

#### \*Correspondencia:

Diana Reséndez-Pérez

E-mail: diana.resendezpr@uanl.edu.mx

0016-3813/© 2024 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 02-06-2023

Fecha de aceptación: 05-01-2024

DOI: 10.24875/GMM.23000214

Gac Med Mex. 2024;160:1-9

Disponible en PubMed

[www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)

## Antecedentes

Estudiar las interacciones proteicas en las células es importante ya que participan en diversos mecanismos moleculares en condiciones normales. La función de las proteínas se afecta cuando cambia la estructura de estas, lo que ocasiona distintas enfermedades neurodegenerativas como ataxias, enfermedades de Alzheimer o Parkinson e, incluso, el desarrollo de neoplasias.<sup>1-3</sup>

La proteína de unión a la caja TATA humana (TBP) forma un complejo multiproteico que determina el sitio de unión de las ARN polimerasas al reconocer el promotor basal. En su estructura, el extremo C-terminal altamente conservado de TBP constituye el sitio de unión al ADN formado por 180 aminoácidos, con una similitud de 100 % con el ratón y 88 % con la mosca de la fruta. El extremo N-terminal varía en su longitud y secuencia y se caracteriza por tener una región rica en glutaminas en el humano (29-42Q), el ratón (13Q) y la mosca de la fruta (6Q y 8Q).<sup>4-6</sup> Se ha sugerido que esta región funciona como un puerto de interacción en el complejo de preiniciación para interactuar con otras proteínas reguladoras de la transcripción.<sup>7,8</sup>

Las homeoproteínas son factores de transcripción que interactúan con otros factores transcripcionales para aumentar su especificidad de unión al ADN o para regular la expresión de genes que determinan el desarrollo corporal en los organismos. Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que hTBP establece interacción proteína-proteína con Antennapedia (Antp) a través de su extremo N-terminal, específicamente a través de sus homopéptidos de glutaminas, interacción que modula la actividad transcripcional de Antp.<sup>9</sup> Debido a la alta conservación evolutiva de las homeoproteínas, surge la pregunta de si hTBP interacciona a través de su región rica en glutaminas (PolyQ). En condiciones normales, esta región tiene una alta importancia funcional, ya que se ha reportado su interacción con otras proteínas reguladoras de la transcripción.<sup>10-16</sup> El estudio de las interacciones proteicas de hTBP a través de su región rica en glutaminas es altamente relevante, ya que el incremento del número de glutaminas puede alterar la función de esta proteína y ocasionar una enfermedad neurodegenerativa llamada ataxia espinocerebelosa 17 (SCA17), caracterizada por síntomas como ataxia, demencia, movimientos coreicos y distonia, epilepsia, señales piramidales y extrapiramidales, discapacidad cognitiva e, incluso, trastornos psiquiátricos.<sup>17</sup>

En nuestro laboratorio utilizamos el modelo de la mosca de la fruta para estudiar las interacciones de Antp con TBP en el control genético del desarrollo, por lo que en este trabajo determinamos la interacción entre la TBP humana (hTBP) con las homeoproteínas Sex combs reduced (Scr), Ultrabithorax (Ubx) y Abdominal B (AbdB), mediada por la región rica en glutaminas. Realizamos el modelaje de SCA17 en la mosca de la fruta ocasionado por una expansión de 80 glutaminas en hTBP.

## Materiales y métodos

### Construcción de los plásmidos recombinantes

Para analizar las interacciones proteicas se realizó la construcción de los plásmidos codificantes a las homeoproteínas y hTBP. La construcción de pCS2VC155-Ubx, pCS2VC155-UbxHD y pCS2VC155-AbdBHD se realizó mediante subclonación a partir de los vectores pCS2VNm9-Ubx, pCS2VNm9-UbxHD, pCS2VNm9-AbdBHD, utilizando las enzimas de restricción *AgeI* y *XbaI* (Thermo Scientific, Estados Unidos). Estos vectores, junto con los ya construidos pCAG-mCherry, pCS2VNm9-hTBP, pCS2VNm9-hTBPΔQ40, pCS2VC155-Antp, pCS2VC155-AbdB, pCS2VC155-Scr, pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-ScrHD, se propagaron en bacterias *Escherichia coli* TOP10 calcio competentes y se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina.<sup>18</sup>

### Análisis de las interacciones proteicas mediante BiFC

Las interacciones proteicas de hTBP con las homeoproteínas se analizaron mediante técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en células de epitelio renal humano HEK293.<sup>19</sup> Las células se cultivaron en medio DMEM pH 7.3 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de penicilina-estreptomina en una atmósfera de 95 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las células HEK293 se sembraron durante 72 horas antes de realizar la transfección en placas de cultivo de seis pozos (Corning Life Sciences, Lowell, Massachusetts, Estados Unidos) a una densidad de 1.6 × 10<sup>5</sup> células/pozo.

Se realizaron co-transfecciones de los plásmidos pCS2VNm9-hTBP o pCS2VNm9-hTBP $\Delta$ Q40 en distintas combinaciones con pCS2VC155-Antp, pCS2VC155-Scr, pCS2VC155-Ubx, pCS2VC155-AbdB, o sus versiones que expresan solo el HD: pCS2VC155-UbxHD pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-AbdBHD y pCS2VC155-ScrHD, junto con el plásmido pCAG-mCherry como control de eficiencia de transfección. La transfección se llevó a cabo agregando 2  $\mu$ g de cada plásmido (VN-, VC- y Cherry) por pozo y 1  $\mu$ L de polietilimina a 15 mM por cada  $\mu$ g de ADN. Después de 48 horas de incubación, se observó la señal fluorescente en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemania) con un objetivo 20x. Se tomaron fotografías de tres campos en los canales de Venus (BiFC) y de Cherry (control) utilizando tiempos de exposición de 100 y 30 ms, respectivamente. Las imágenes de las células transfectadas con la reconstitución de Venus fluorescente se analizaron con el programa ImageJ. El porcentaje de interacción se obtuvo con el siguiente cálculo:

$$\text{Venus/Cherry} \times 100$$

Estos ensayos se realizaron tres veces por triplicado y se llevó a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), así como una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 5.0.

### **Mantenimiento y generación de cruza genéticas de *Drosophila melanogaster***

Para la generación de líneas de moscas que expresaran hTBP con la region PolyQ normal y expandida, se utilizaron los plásmidos pUASTattB-hTBP34Q y pUASTattB-hTBP80Q, respectivamente, donados amablemente por el doctor Jun-Ma.<sup>20</sup> La integridad de estos plásmidos se confirmó mediante secuenciación por parte de la compañía Macrogen (Estados Unidos); la microinyección para la generación de las moscas transgénicas se realizó en la compañía Best Gene Inc. (Chino Hills, California, Estados Unidos). Las líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas se mantuvieron a 20 °C en tubos con comida estándar (agar, harina de maíz, azúcar, levadura y propionato de sodio) suplementada con levadura activa seca. Para dirigir de forma tejido-específica la expresión de las proteínas de interés, se utilizó el sistema binario UAS-GAL4.<sup>21</sup> Para ello se realizaron cruza genéticas de las moscas transgénicas con la línea productora ELAV-GAL4 que dirige la expresión de hTBP en células progenitoras neurales y gliales del cerebro de *Drosophila*.<sup>22</sup>

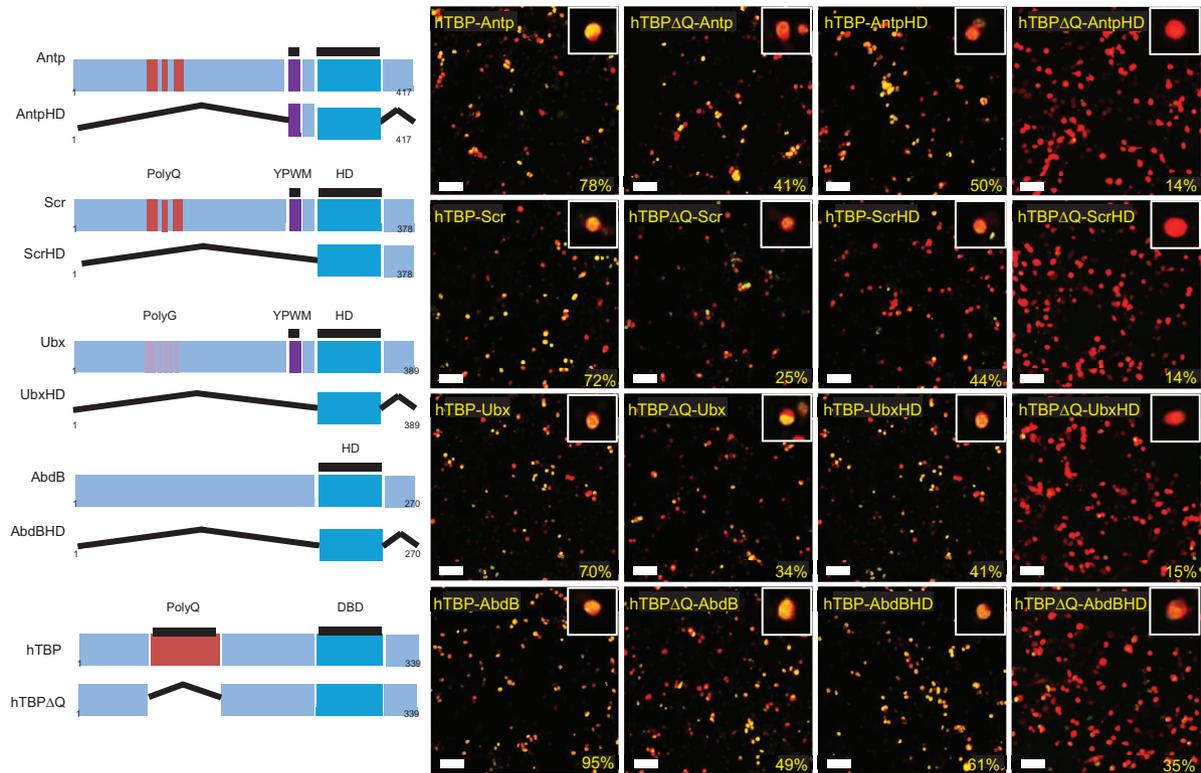
### **Detección de hTBP mediante inmunofluorescencia en el cerebro de *Drosophila***

Los cerebros de las moscas adultas de cada grupo de edad (dos, 10, 20 y 50 días) que expresaban hTBP34Q o hTBP80Q se disecaron en paraformaldehído a 4 % diluido en PBS 1X con Tritón pH 7 a 0.1 %; posteriormente se fijaron en paraformaldehído a 4 % (peso/volumen) en PBS 1X a temperatura ambiente durante 60 minutos de acuerdo con Tito *et al.*<sup>23</sup> Los cerebros fijados se bloquearon durante tres horas en PBT 1X con 5 % de suero de caballo, 5 % de suero de cabra y 5 % de suero fetal bovino, después se añadió el anticuerpo primario anti-TATA binding protein (Abcam, ab818) (1:200) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al término de la incubación, los cerebros se lavaron cinco veces en PBT 1X, se les agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (1:1000) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y los cerebros se incubaron con DAPI 1:10000 en PBS 1X; finalmente, se montaron en Vectashield (Vector Laboratories).

Las micrografías de las inmunofluorescencias fueron obtenidas a través de microscopia confocal láser con un microscopio Olympus BX61W1 con un módulo FV1000. Se procesaron seis cerebros por grupo de edad para cada variante de hTBP expresada y se analizaron en tres experimentos independientes. Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el programa ImageJ y los resultados se analizaron con ANOVA de dos vías seguido por correcciones de Bonferroni en el programa GraphPad Prism.

### **Prueba de escalada en *Drosophila***

Se utilizaron 20 moscas para cada versión de hTBP (hTBP34Q y hTBP80Q) y de cada grupo de edad (dos, 10, 20 y 50 días). Estas moscas se monitorearon durante 55 días y la prueba de escalada se realizó cada dos días. La prueba se llevó a cabo en tubos de vidrio conforme el método descrito por Barone y Bohmann.<sup>24</sup> Se tomó nota del total de moscas que pasaron los 3 cm en cinco segundos o menos y las diez repeticiones se promediaron para después comparar los grupos con análisis de ANOVA de dos vías seguido de correcciones de Bonferroni.



**Figura 1.** hTBP interacta con homeoproteínas a través de su región rica en glutaminas. Para el análisis de interacción mediante BiFC se realizó la coexpresión de las proteínas hTBP y las homeoproteínas Scr/Ubx/AbdB o sus versiones mutantes (diagrama izquierdo). La reconstitución de la fluorescencia verde de Venus en las células transfectadas de la imagen derecha es indicativa de las interacciones proteína-proteína. El recuadro superior derecho indica la interacción en una sola célula. La expresión de la proteína fluorescente Cherry se empleó como control interno de transfección y la interacción con Antp se utilizó como control positivo (78 %). En todos los casos se muestra el porcentaje de interacción en la esquina inferior derecha de la imagen. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

## Resultados

### Interacción de hTBP con Scr, Ubx y AbdB a través de las regiones PolyQ

El análisis de interacción realizado mediante BiFC en la línea celular HEK293 indica que hTBP interacta con las homeoproteínas Scr, Ubx, y AbdB mostrando la señal fluorescente de Venus en el núcleo de la célula, ya que al ser factores de transcripción se ubican en el núcleo celular. Scr y Ubx presentaron un porcentaje de interacción con hTBP de 72 y 70 %, respectivamente (Figura 1), de forma muy similar al porcentaje de la interacción entre hTBP-Antp que se utilizó como control positivo.<sup>9</sup> Por otra parte, la interacción con AbdB presentó 95 % de interacción con hTBP, lo que indica una mayor afinidad en la interacción. También se evaluó la implicación de la región PolyQ de hTBP al probar el efecto de la delección de esta región de glutaminas en hTBPΔ40 para su interacción con las homeoproteínas. Los resultados

muestran una reducción significativa en el porcentaje de interacción de hasta 25 % para Scr, 34 % para Ubx y 49 % para AbdB. Estos resultados fueron similares al decremento obtenido con la delección de PolyQ en hTBP para su interacción con Antp, que disminuyó de 78 % a 41 %.

Debido a que la región N-terminal de algunas homeoproteínas contiene regiones PolyQ y otros dominios funcionales relacionados con la regulación de la transcripción, probamos la interacción de hTBP con mutantes que solo contienen la región C-terminal con el HD de la homeoproteína. Los resultados mostraron una disminución en el porcentaje de interacción: 44 % en Scr, 50 % en Ubx y 61 % en AbdB (Figura 1). Cuando se probó hTBPΔ40 con las versiones mutadas de las homeoproteínas, se presentó un porcentaje aún más bajo de interacción, de hasta 14 % en Scr, 15 % en Ubx y 35 % en AbdB, lo que evidenció el efecto combinado de la delección de las regiones PolyQ, tanto de hTBP como de las homeoproteínas en las interacciones.

## **Modelaje de SCA17 y formación de agregados en el cerebro**

Para modelar SCA17, se dirigió la expresión de dos versiones de hTBP en células progenitoras neurales y células gliales embrionarias del cerebro de la mosca. La inmunodetección mostró que a los dos días de edad no se formaron agregados de hTBP en el cerebro de moscas que expresaron hTBP34Q (Figura 2A), mientras que las que expresaron hTBP80Q mostraron pequeños agregados (Figura 2B). De la misma forma, a los 10 días de edad, los cerebros con hTBP34Q expusieron una expresión homogénea sin agregados (Figura 2C), mientras que los cerebros con la expansión de glutaminas 80Q (hTBP80Q) mostraron agregados de forma focalizada en regiones cerebrales como el centro motor y antenal mecanosensorial, el neuropilo ventrolateral “wedge”, el neuropilo ventromedial “vest”, protocerebro ventrolateral anterior, ganglio gnatal adulto y comenzaron a aparecer en médula y lóbulo (Figura 2D’). A los 20 días, hTBP34Q presentó una distribución uniforme de fluorescencia ligera (Figura 2E’), mientras que hTBP80Q se encontró en agregados más grandes e intensos (Figura 2F’). A los 50 días, los cerebros que expresaron hTBP34Q presentaron pequeños agregados, principalmente en el ganglio gnatal adulto (Figura 2G’), mientras que los agregados en el cerebro de moscas que expresaron hTBP80Q no mostraron cambio en el tamaño ni en la intensidad comparados con los de moscas de 20 días de edad (Figura 2H’).

## **Efecto de la expresión de hTBP80Q en la habilidad de escalada de la mosca**

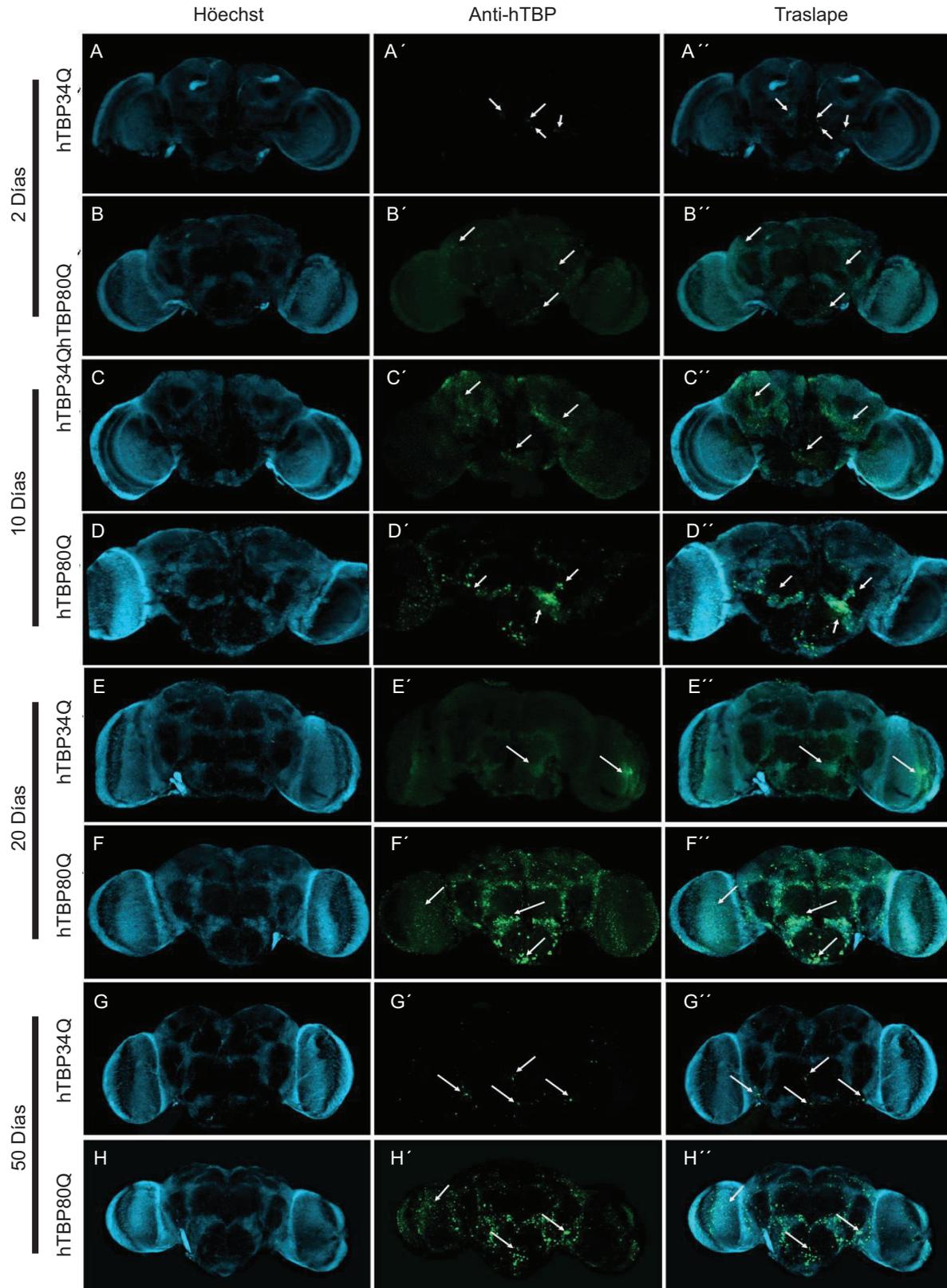
El efecto de la expresión de hTBP34Q y hTBP80Q en la función locomotora de *Drosophila* no es evidente en los primeros 15 días de vida, pues todos los grupos experimentales se comportaron de forma normal. A partir de los días 16, 17 o 18 se presentó un declive en la habilidad de escalar en las moscas que expresaron hTBP80Q, en comparación con las moscas que expresaron hTBP34Q. Al día 37, solo 70 % de las moscas que expresaron hTBP80Q lograron pasar la línea de 3 cm en menos de cinco segundos en comparación con los otros grupos experimentales, en los cuales más de 95 % logró pasar la marca en el mismo lapso de tiempo. En el día 55, se observó un declive casi total en la habilidad de escalada de la línea que

expresaba hTBP80Q, donde menos de 10 % pudo superar la prueba, mientras que cerca de 40 % de las moscas que expresaron hTBP34Q y aproximadamente 70 % de las moscas de los grupos control aún lograban escalar (Figura 3). Estos resultados indican que las moscas presentan un impedimento locomotor tardío cuando expresan hTBP80Q, de manera similar a lo que ocurre en humanos con la patología neurodegenerativa SCA17.

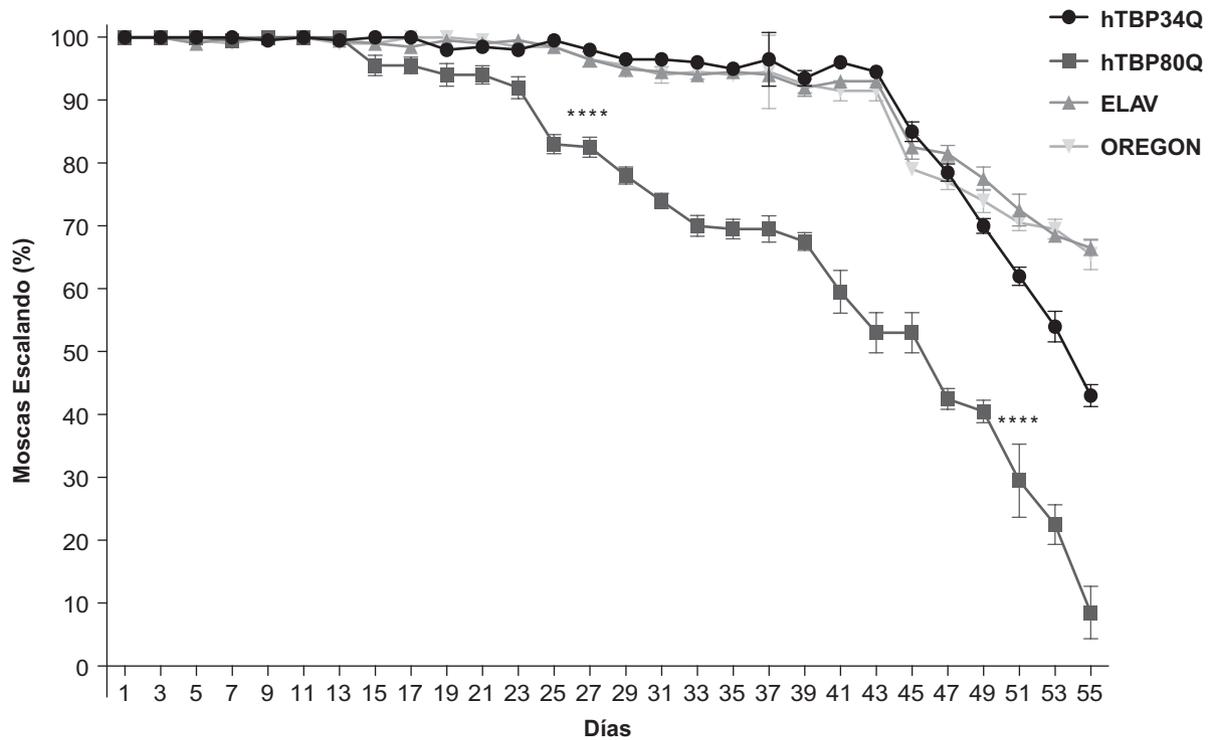
## **Discusión**

En este trabajo mostramos la interacción proteica entre hTBP y las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB, evidenciando la relevancia de la región PolyQ de TBP en estas interacciones. La interacción de TBP con otros factores está implicada en la regulación de la transcripción; se cree que la región rica en glutaminas podría funcionar como un puerto de acceso al PIC, influyendo en la regulación de la expresión génica.<sup>7,8,25,26</sup> La ausencia del extremo N-terminal de las homeoproteínas en su interacción con hTBP mostró una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de interacción, lo que sugiere que las homeoproteínas poseen, además de la región PolyQ, otros motivos implicados en la interacción tales como PolyG, YPWM y SSYF.<sup>27-30</sup> Esto es relevante debido a la conservación de la función transactivadora de los dominios amino-terminales de las homeoproteínas probadas en este trabajo en *Drosophila*, así como las proteínas Hox en humanos.<sup>9,31</sup> Notoriamente, las deleciones de la región PolyQ de hTBP y el extremo N-terminal en las homeoproteínas analizadas mostraron una reducción aun mayor en el porcentaje de interacción. Estos resultados sugieren que los dominios conservados en la región N-terminal de las homeoproteínas interaccionan con la región PolyQ de hTBP, de forma similar a lo descrito previamente en Antp con sus homopéptidos Q9 y Q6.<sup>9</sup>

En el modelaje de SCA17 se tomó en cuenta que el extremo C-terminal de hTBP tiene 88 % de similitud con el de *Drosophila* y aunque el N-terminal no está tan conservado, ambos tienen una región rica en glutaminas que puede tener una función similar en ambas especies.<sup>5</sup> En el presente trabajo, el modelaje de SCA17 con hTBP en *Drosophila* mostró que los cerebros de las moscas que expresaron hTBP80Q presentaron agregados desde el día 2, los cuales se incrementaron progresivamente hasta el día 50. Se ha reportado que la formación de agregados de proteínas con la PolyQ expandida también provoca muerte celular y reduce la expectativa de vida de la mosca.<sup>32-34</sup>



**Figura 2.** Los agregados de hTBP34Q y 80Q se incrementan con la edad de los cerebros de *Drosophila melanogaster*. La inmunodetección de hTBP mediante fluorescencia permitió visualizar los agregados de hTBP en diferentes tiempos (dos, 10, 20 y 50 días). A-H: cerebros marcados con DAPI. A'-H': inmunofluorescencia para hTBP34Q y hTBP80Q. A''-H'': traslape de las marcaciones de DAPI, hTBP34Q y hTBP80Q. Las flechas blancas indican algunos de los agregados presentes en los cerebros. Los agregados hTBP80Q incrementan en concordancia con la edad de la mosca hasta el día 20, después, al día 50, no se observan cambios.



**Figura 3.** La expresión de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* afecta su habilidad de escalada. Grupos de 20 moscas de los genotipos hTBP 34 y 80Q se sometieron a los ensayos de escalada en comparación con moscas de las líneas ELAV-GAL4 y Oregon (silvestre). La prueba de escalada se realizó cada dos días durante 55 días. Las diferencias significativas entre las moscas que expresaron hTBP80Q y hTBP34Q están marcadas con asteriscos, en donde  $p < 0.0001$  (ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni). Se realizaron 10 repeticiones por cada grupo.

Nuestros resultados están en concordancia con la patología de las ataxias espinocerebelosas dependientes de la edad, es decir, a mayor edad, mayor manifestación de la enfermedad y, además, a mayor expansión de glutaminas, mayor toxicidad.<sup>1,2,20,33-35</sup>

La habilidad de escalada de las moscas que expresaban hTBP34Q o hTBP80Q a través de la prueba de geotaxis negativa<sup>24</sup> se comparó con los grupos ELAV-GAL4 y Oregon para evitar tener falsos positivos causados por la línea productora. Es importante indicar que las moscas se consideran adultos jóvenes a los 10 días,<sup>36</sup> por lo que de acuerdo con la naturaleza de la patología se obtuvieron resultados negativos en este intervalo de edad como se esperaba.<sup>37</sup> A partir del día 15, el deterioro locomotor del grupo que expresaba hTBP80Q en el cerebro fue en incremento y al día 55 solo 10 % de las moscas podía pasar la marca de 3 cm. Estos resultados nos permitieron concluir que la expansión de 80Q provoca una afección locomotora severa en comparación con la 34Q, de forma similar a lo descrito previamente en otras enfermedades neurodegenerativas.<sup>20,33-35,38,39</sup>

El efecto neuropatológico de la agregación de hTBP en el modelaje de SCA17 puede deberse a la transcripción alterada debida a un cambio conformacional de TBP que afecta su unión al ADN, a una desregulación de la expresión génica debida a la interacción anormal con otros factores de transcripción, al secuestro de otros factores de transcripción con regiones PolyQ o al decremento en la viabilidad celular y el crecimiento de neuritas.<sup>40,41</sup>

El modelaje de la patología neurodegenerativa de SCA17 en *Drosophila* mostrado en este trabajo se ha utilizado en distintas enfermedades neurodegenerativas como SCA1, SCA3, SCA6 y Huntington,<sup>42-45</sup> y puede ser utilizado en otras enfermedades humanas debido a su fácil manejo, ciclo de vida corto y sistema nervioso sencillo, entre otras ventajas.

## Conclusiones

En este trabajo mostramos la interacción proteica de hTBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB a través de la región PolyQ de hTBP, lo que sugirió que

los dominios conservados en la región N-terminal de las homeoproteínas interactúan con la región PolyQ de hTBP. La importancia funcional de las regiones PolyQ en estas interacciones contribuye al complejo y fascinante rompecabezas de la especificidad de las homeoproteínas en el control genético del desarrollo en *Drosophila*. Además, al expandir la región rica en glutaminas de hTBP fue posible modelar la patología neurodegenerativa de SCA17 en *Drosophila*. El estudio de los dominios proteicos involucrados en estas interacciones proteína-proteína abre la posibilidad para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan bloquear las interacciones que causan el desarrollo de patologías neurodegenerativas como SCA17.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del CONAHCYT CF-2019 proyecto 2280, así como a la maestra en ciencias Alejandra Arreola Triana, por su apoyo en la revisión del manuscrito. Rubén J. Montalvo Méndez y Marcela Cárdenas Tueme agradecen el apoyo de las becas CONAHCYT 814714 y 650620, respectivamente.

## Conflicto de intereses

Los autores no manifiestan conflicto de intereses.

## Financiamiento

Se recibió financiamiento CONAHCYT CF-2019 proyecto 2280.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Uso de inteligencia artificial para generar textos.** Los autores declaran que no han utilizado ningún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes pies o leyendas.

## Bibliografía

1. Duenas AM. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*. 2006;129(6):1357-1370. DOI: 10.1093/brain/awl081
2. Fan HC, Ho LI, Chi CS, Chen SJ, Peng GS, Chan TM, et al. Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):441-458. DOI: 10.3727/096368914x678454
3. Bondos SE, Geraldo Mendes G, Jons A. Context-dependent HOX transcription factor function in health and disease. En: Uversky VN, editor. *Dancing protein clouds: intrinsically disordered proteins in health and disease, part B*. [Lugar desconocido]: Elsevier; 2020. Vol. 174. p. 225-262. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2020.05.003
4. van Roon-Mom WMC, Reid SJ, Faull RLM, Snell RG. TATA-binding protein in neurodegenerative disease. *Neuroscience*. 2005;133(4):863-72.
5. Hernández N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev*. 1993;7(7B):1291-308. DOI: 10.1101/gad.7.7b.1291
6. Kramm K, Engel C, Grohmann D. Transcription initiation factor TBP: old friend new questions. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(1):411-423. DOI: 10.1042/bst20180623
7. Hobbs NK, Bondareva AA, Barnett S, Capecchi MR, Schmidt EE. Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental  $\beta$ 2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell*. 2002;110(1):43-54. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00806-1
8. Bondareva AA, Schmidt EE. Early vertebrate evolution of the TATA-binding protein, TBP. *Mol Biol Evol*. 2003;20(11):1932-1939. DOI: 10.1093/molbev/msg205
9. Jiménez-Mejía G, Montalvo-Méndez R, Hernández-Bautista C, Altamirano-Torres C, Vázquez M, Zurita M, Reséndez-Pérez D. Trimeric complexes of Antp-TBP with TFIIE $\beta$  or Exd modulate transcriptional activity. *Hereditas*. 2022;159(1). DOI: 10.1186/s41065-022-00239-8
10. 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 National Acad Sci*. 1996;93(5):1764-1769. DOI: 10.1073/pnas.93.5.1764
11. Park KS, Kim KK, Kim KE. Msx1 homeodomain transcription factor and TATA-binding protein interact to repress the expression of the glycoprotein hormone  $\alpha$  subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468(1-2):326-330. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.102
12. Capella M, Ré DA, Arce AL, Chan RL. Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant Cell Rep*. 2014;33(6):955-967. DOI: 10.1007/s00299-014-1576-9
13. 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):1716s-1725s. Disponible en: [https://aacrjournals.org/cancerres/article/59/7\\_Supplement/1716s/506011](https://aacrjournals.org/cancerres/article/59/7_Supplement/1716s/506011)
14. Zwilling S, König H, Wirth T. High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J*. 1995;14(6):1198-1208. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07103.x
15. Um M, Li C, Manley JL. The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1995;15(9):5007-5016. DOI: 10.1128/mcb.15.9.5007
16. 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):3771-3781. DOI: 10.1128/mcb.18.7.3771
17. Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zühlke C, Nakamura K, Rasmussen A, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet*. 2007;16(2):215-222. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201954
18. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cuarta edición. Nueva York: Cold Spring Harbor; 2012.
19. Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*. 2008;37(1):465-487. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842
20. 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 RBP-J/Su(H) in modulating the pathological outcome. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17):3424-3436. DOI: 10.1093/hmg/ddr251
21. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993;118(2):401-415. DOI: 10.1242/dev.118.2.401
22. Berger C, Renner S, Lüer K, Technau GM. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev Dyn*. 2007;236(12):3562-3568.
23. Tito AJ, Cheema S, Jiang M, Zhang S. A simple one-step dissection protocol for whole-mount preparation of adult *Drosophila* brains. *J Vis Exp*. 2016;(118). DOI: 10.3791/55128
24. Barone MC, Bohmann D. Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. *J Vis Exp*. 2013;74). DOI: 10.3791/50339

25. 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):1166-1675. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06366.x
26. 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):5609-5615. DOI: 10.1093/nar/21.24.5609
27. 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. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001351
28. Furukubo-Tokunaga K, Flister S, Gehring WJ. Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc National Acad Sci.* 1993;90(13):6360-6364. DOI: 10.1073/pnas.90.13.6360
29. Sivanantharajah L, Percival-Smith A. Differential pleiotropy and HOX functional organization. *Dev Biol.* 2015;398(1):1-10. DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.11.001
30. Tan XX, Bondos S, Li L, Matthews KS. Transcription activation by ultrabithorax I $\beta$  protein requires a predicted alpha-helical region. *Biochemistry.* 2002;41(8):2774-2785. DOI: 10.1021/bi011967y
31. Breiting C, Maethner E, García-Cuellar MP, Slany RK. The homeodomain region controls the phenotype of HOX-induced murine leukemia. *Blood.* 2012;120(19):4018-4027.
32. Krench M, Cho RW, Littleton JT. A Drosophila model of Huntington disease-like 2 exhibits nuclear toxicity and distinct pathogenic mechanisms from Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 2016;25(15):3164-3177. DOI: 10.1093/hmg/ddw166
33. 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):6878-6893.
34. Patel N, Alam N, Kozeta Libohova, Dulay R, Todi SV, Sujkowski A. Phenotypic defects from the expression of wild-type and pathogenic TATA-binding proteins in new Drosophila models of spinocerebellar ataxia type 17. *G3.* 2023;13(10):jkad180. DOI: 10.1093/g3journal/jkad180
35. Xu Z, Joel Tito A, Rui YN, Zhang S. Studying polyglutamine diseases in Drosophila. *Exp Neurol.* 2015;274:25-41. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.08.002
36. Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD. Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. *J Vis Exp.* 2013;(71). DOI: 10.3791/50068
37. Taroni F, DiDonato S. Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(8):641-655. DOI: 10.1038/nrn1474
38. Krench M, Littleton JT. Neurotoxicity Pathways in Drosophila models of the polyglutamine disorders. En: *Current topics in developmental biology.* [Lugar desconocido]; Elsevier; 2017. p. 201-223. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.07.006
39. Maas RP, van Gaalen J, Klockgether T, van de Warrenburg BP. The preclinical stage of spinocerebellar ataxias. *Neurology.* 2015;85(1):96-103. DOI: 10.1212/wnl.0000000000001711
40. Liu Q, Pan Y, Shengbo Eben Li. Molecular mechanisms and therapeutics for SCA17. *Neurotherapeutics.* 2019;16(4):1097-1105.
41. Basu S, Mackowiak SD, Niskanen H, Knezevic D, Asimi V, Grosswendt S, et al. Unblending of transcriptional condensates in human repeat expansion disease. *Cell.* 2020;181(5):1062-1079.e30.
42. Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. Neurodegenerative models in Drosophila: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):29-39.
43. Fernández-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, She WC, Luchak JM, Martinez P, et al. Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature.* 2000;408(6808):101-106.
44. Tsou W, Hosking RR, Burr AA, Sutton JR, Ouyang M, Du X, et al. DnaJ-1 and karyopherin  $\alpha$ 3 suppress degeneration in a new Drosophila model of spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet.* 2015;24(15):4385-4396.
45. Zhang S, Binari R, Zhou R, Perrimon N. A Genomewide RNA interference screen for modifiers of aggregates formation by mutant huntingtin in Drosophila. *Genetics.* 2010;184(4):1165-1179.