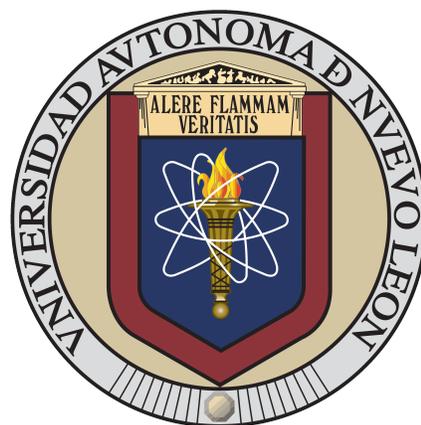


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INTERACCIÓN DE UN DISTINTO ARREGLO CONFORMACIONAL
TRIMÉRICO ENTRE ANTENNAPEDIA-TFIIIE β Y LA PROTEÍNA DE UNIÓN A
CAJA TATA (TBP) EN CÉLULAS HEK293 MEDIANTE BIFC/N_{FRET}.**

Por

Q.B.P. Roberto Manuel González Rodríguez

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

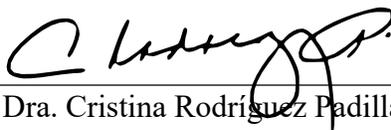
2024

Interacción de un distinto arreglo conformacional trimérico entre Antennapedia-TFIIIE β y la proteína de unión a caja TATA (TBP) en células HEK293 mediante BiFC/N_{FRET}

Comité de tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez
Director



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dra. Vianey González Villasana
Vocal



Dra. Claudia Dafila Altamirano Torres
Vocal



Dr. Gustavo Jiménez Mejía
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) por conferirme una beca (2022-000018-02NACF-00191) que me permitiera desarrollar el proyecto experimental durante los dos años del posgrado.

Agradezco a la Unidad de Biología Molecular dentro del Laboratorio de Inmunología y Virología, de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo la investigación científica.

PERSONALES

Gracias a la Dra. Diana Reséndez Pérez por confiar y darme un espacio en su laboratorio para continuar con su proyecto de investigación. A la Dra. Claudia por recibirme, introducirme y enseñarme el conocimiento básico acerca del mundo de biología del desarrollo y sus constantes consejos acerca de mi desarrollo profesional. Al Dr. Gustavo por la paciencia de enseñarme lo esencial para los experimentos de microscopía confocal e introducirme al área de ingeniería genética.

Agradezco a mi mejor amigo Daniel por mantenerme de pie cada que decidía rendirme durante el proceso. Sinceramente, eres una de las personas más importantes y a quien más estimo, gracias por creer en mí aun cuando yo no me sentía lo suficientemente capaz para continuar cuando decidía rendirme. Gracias por siempre alentarme, escucharme y calmarme en momentos cuando ni yo podía encontrar tranquilidad. A Rodolfo y Andrea por escucharme, aconsejarme y apoyarme frecuentemente, además de hacerme sentir a salvo y en casa. A todos ustedes gracias por enseñarme “la otra cara de la moneda” y a mantenerme en alto. A Ana por todo el conocimiento transmitido en cultivo celular. A Misael que estuvimos trabajando juntos entre clases, almorzando después de clases y acompañándonos mutuamente en nuestros experimentos para hacer menos pesada la chamba la carga.

Y un importante agradecimiento a toda mi familia que amo. A mi mamá que me sostuvo en momentos críticos y a través de los cuáles fuimos aprendiendo cada vez más uno del otro, una de las personas que más me alentó para recordarme lo mucho que puedo lograr si me lo propongo, y quien siempre me demostró que no siempre se está uno solo. A mi papá que me brindo su apoyo incondicional, los consejos y la tranquilidad que tras todo este proceso siempre habrá alguien en quien contar y que siempre confiará en todo lo que me proponga por hacer. A mi hermana, a quien aprecio y estimo bastante, que estuvo ahí para escucharme, ayudarme en momentos críticos, y recordarme que no porque parezca difícil algo quiera decir que sea imposible.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Este trabajo va dedicado a ellos porque a pesar de que me han visto caer varias ocasiones no dejaron de creer en mí, por sostenerme cuando lo necesitaba y todo el apoyo que me han estado brindando en todo este tiempo. No solo eso, sino también el cariño, amor y sobre todola fe que han mantenido en mí para alcanzar las metas que me he propuesto, espero que esténorgullosos de lo que he logrado plasmar en este trabajo. Mas bien, espero que estén orgullososde todo el trabajo y proceso que he logrado en este último tiempo.

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido el uso de imágenes, fragmentos de vídeos, 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.

Este trabajo fue financiado por el programa de Ciencia de Frontera de CONAHCyT bajo el número de proyecto 2280.

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en la unidad de Biología del Desarrollo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, perteneciente a los departamentos de Microbiología e Inmunología y Biología celular y genética, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	4
LUGAR DE TRABAJO	5
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Biología molecular implicada en el desarrollo del eje anteroposterior (AP).....	16
2.2 Genes homeóticos.....	18
2.2.1. Homeosis y mutaciones homeóticas.....	19
2.2.2. Genes homeóticos en <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.2.3. Principios de regulación en la expresión de los genes homeóticos	21
2.3 Homeoproteínas.....	23
2.4 Soluciones a la paradoja HOX.....	25
2.4.1 Interacciones proteicas HOX-TALE	26
2.4.2 Interacciones proteicas HOX-GTFs	28
2.5 Técnicas moleculares para la evaluación de interacciones entre proteínas.....	30
2.5.1 Técnica de complementación de fluorescencia Bimolecular (BiFC).....	30
2.5.2 Técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).....	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general	35
5.2 Objetivos específicos	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Establecimiento de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con TBP en células HEK293, mediante el método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N _{FRET})	36
6.1.1 Propagación de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-N1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP para los ensayos de co-transfección.....	36

6.1.2 Extracción del ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	37
6.1.3 Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP	37
6.1.4 Realización de los ensayos de co-transfección de los plásmidos en células HEK293	38
6.1.5 Evaluación de la interacción trimérica de Antp-TFIIE β -TBP, a través del nivel de transferencia de energía no radioativa mediante BiFC/N _{FRET}	39
6.1.6 Obtención de las imágenes FRET y los valores de N _{FRET} mediante el plugin PixFRET en el software Fiji	40
6.2.1 Obtención y caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp ^{H32A-I36A} , pCS2VC155-Antp Δ HD para los ensayos de co- transfección.....	41
6.2.2 Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155- AntpH32A-I36A y pCS2VC155-Antp Δ HD	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Establecimiento de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con TBP en células HEK293, mediante el método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N _{FRET})	43
7.1.1. Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-N1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP.....	43
7.1.2. Establecimiento de un control positivo de transferencia de energía no radioativa para la normalización de FRET	44
7.1.3. Interacción trimérica del nuevo arreglo conformacional Antp-TFIIE β con TBP usando un método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N _{FRET}).	45
7.2. Validación de la formación del complejo trimérico en células HEK293, utilizando clonas mutagénicas que disrumpan la interacción entre las proteínas Antp-TFIIE β -TBP.	48
7.2.1. Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp ^{H32A- I36A} , pCS2VC155-Antp Δ HD mediante PCR punto final	48
7.2.2. Validación de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con dTBP mediante el uso de mutantes de Antp y BiFC/N _{FRET}	49
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIÓN	58
10. PERSPECTIVAS.....	59
11. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Representación esquemática de las divisiones y subdivisiones en el organismo de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2	Representación esquemática del patrón de expresión entre los principales genes maternos a lo largo del eje anteroposterior en <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3	Distribución de los genes homeóticos entre especies	18
4	Mutaciones homeóticas presentes en <i>Drosophila melanogaster</i>	20
5	Distribución de los complejos ANTENNAPEDIA (ANTP-C) y BITHORAX (BX-C) en el embrión de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
6	Principios de regulación en la expresión de los genes homeóticos	23
7	Representación gráfica de la conservación entre los homeodominios de diferentes homeoproteínas en <i>Drosophila melanogaster</i>	24
8	Diagrama acerca de la especificidad que confiere extradenticle (exd) en la identidad de segmentos	27
9	Esquema ilustrativo del ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) en la secuencia promotora	29
10	La interacción de Antp-TFIIE β es esencial para la función homeótica de Antp	30
11	Diagrama acerca de la técnica de complementación de fluorescencia bimolecular BiFC	31
12	Diagrama acerca de la técnica de transferencia de energía no radioactiva de Förster	32
13	Esquema del proceso de co-transfección y su distribución de los complejos triméricos en placa de 6 pozos	39

14	Caracterización molecular de los plásmidos pCS2VC155Antp, pCS2VNm9TBP, pCS2VNm9TFIIE β y pCerulean-N1-TFIIE β por PCR; y el plásmido pCerulean-N1-dTBP mediante enzimas de restricción	44
15	Cuantificación del nivel de transferencia de energía no radioactiva del plásmido C5V1 mediante el método N _{FRET}	45
16	Interacción trimérica del dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP mediante un método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N _{FRET}) a través de PixFRET	47
17	Caracterización molecular mediante PCR punto final de las variantes mutagénicas de Antp	48
18	Validación en la interacción del dímero Ant-TFIIE β con la proteína dTBP mediante BiFC/N _{FRET} al utilizar variantes mutagénicas	51

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

PPIs	Interacciones proteína-proteína.
CDK1	Cinasa dependiente de ciclina 1.
AP	Eje anteroposterior.
pb	Pares de bases.
<i>bx</i>	<i>bithorax</i> .
HOM-C	Complejo homeótico.
ANT-C	Complejo de Antennapedia.
Antp	Antennapedia.
BX-C	Complejo de Bithorax.
HP	Homeoproteínas.
HD	Homeodominio.
HOXL	Homeoproteínas tipo HOX.
TALE	Homeoproteínas con extensión en el bucle de tres aminoácidos.
YPWM	Motivo estructural tirosina-prolina-triptófano-metionina.
exd	extradenticle.
hth	homothorax.
Scr	Sex comb reduced.
Ubx	Ultrabithorax.
abd-A	abdominal A.
GTFs	Factores de transcripción general.
PIC	Complejo de preiniciación.
TBP	Proteína de unión a caja TATA.
TAFs	Factores asociados a la proteína TBP.
TFIIIE β	Subunidad beta del factor de transcripción general II E.
CAK7	Módulo de quinasa activadora dependiente de ciclinas.
CTD	Dominio C-terminal.

BIP2	Factor asociado a TBP 155.
BiFC	Complementación de fluorescencia Bimolecular.
VC	Dominio C-terminal de Venus.
VN	Dominio N-terminal de Venus.
nm	nanómetros.
μm	micrómetros.
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster.
SE-FRET	Emisión sensibilizada de FRET.
N_{FRET}	Método de normalización de eficiencia de FRET.
SFB	Suero Fetal Bovino.
CO ₂	Dióxido de carbono.
μl	microlitros.
mM	milimolar.
HCl	Ácido clorhídrico.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NaCl	Cloruro de sodio.
PEI	Polietilenimina.
rpm	revoluciones por minuto.
SBT	Sangrado espectral.
ROIs	Regiones de interés.
SLiM	Pequeños motivos lineales.

RESUMEN

En esta tesis, se estudió un distinto arreglo conformacional trimérico de Antp en el que se analizó la interacción irreversible del dímero Antp-TFIIE β con la proteína de unión a caja TATA de *D. melanogaster* (dTBP) mediante un método de normalización de eficiencia FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}), utilizando ahora las proteínas fluorescentes mCerulean-Venus. Los resultados demuestran que la interacción del dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP exhibe un valor N_{FRET} 57.18% \pm 6.69, el cual es significativamente mayor al descrito previamente en otra conformación. Este resultado sugiere que el arreglo conformacional pudiera influir en la estructura tridimensional del complejo trimérico, ocasionando una mayor proximidad entre las proteínas fluorescentes que se denota en los valores superiores del N_{FRET}. Además, confirmamos la interacción trimérica de ésta nueva conformación al utilizar variantes mutagénicas que interrumpen las interacciones diméricas entre Antp-TBP y Antp-TFIIE β . Los resultados muestran que el valor N_{FRET} del trímero AntpHD-TFIIE β -TBP disminuye a 29.22% \pm 7.49, mientras que el trímero Antp^{H32A-I36A}-TFIIE β -TBP se reduce a 30.72% \pm 6.7 y Antp Δ HD-TFIIE β -TBP hasta 32.8% \pm 7.2. Aunque la disminución del valor N_{FRET} es significativa, no es total. Por lo tanto, se puede hipotetizar que existen otros dominios de interacción en el complejo trimérico; o bien, que puede existir una modificación estructural que expone un nuevo dominio de interacción al ensamblar el complejo trimérico. Asimismo, estos resultados abren la posibilidad de estudiar la funcionalidad o capacidad de interactuar de este complejo trimérico con los sitios blanco a través de diferentes arreglos conformacionales de interacción.

ABSTRACT

In this project, we analyzed a different conformational trimeric array from Antennapedia, in which we evaluated the interaction of Antp-TFIIE β dimer with the TATA-box binding protein (TBP) by a normalized FRET efficiency method (N_{FRET}) with BiFC (BiFC/ N_{FRET}) using different fluorescent proteins as the FRET pair (mCerulean-Venus). The results exhibit a N_{FRET} value of $57.18\% \pm 6.69$ from the interaction of Antp-TFIIE β with TBP, which is significantly higher than the N_{FRET} value ($40.35\% \pm 12.55$) from the Antp-TBP dimer with TFIIE β . Hence, we infer that conformation array might influence in the tridimensional structure of the complex that enhance a major fluorescent proteins proximity, corresponding to the superior N_{FRET} values we obtained here. Furthermore, we found that N_{FRET} values significantly decreased when we used Antp mutagenic variants that interrupt the interaction between Antp-TBP (AntpHD) and Antp-TFIIE β (Antp^{H32A-I36A} and Antp Δ HD). The results show that all the mutagenic variants significantly reduced the NFRET values, the trimeric complex AntpHD-TFIIE β -TBP into $29.22\% \pm 7.49$, the trimer Antp^{H32A-I36A}-TFIIE β -TBP into $30.72\% \pm 6.7$, and Antp Δ HD-TFIIE β -TBP into $32.8\% \pm 7.2$. Even if the N_{FRET} values significantly decreased, it did not achieve a total or almost a total reduction. Thus, we hypothesize that are other domains of interaction within the trimeric complex that overcome the interaction rupture of Antp-TBP and Antp-TFIIE β , or there are incoming domains of interaction as a result of an Antp structural modification, such as SLiMs. With all of those results, it opens the possibility to study the functionality or interaction capability of Antp at different conformational arrays.

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas tipo HOX (HOX) son factores de transcripción que regulan el desarrollo e identificación de las estructuras sobre los segmentos a lo largo del eje anteroposterior (A/P) durante la embriogénesis de una gran variedad de especies animales, principalmente en los organismos bilaterales. Éstas se caracterizan por la presencia de un dominio constituido por 60 residuos aminoacídicos dispuestos entre tres alfa-hélices, conocido como homeodominio (HD), el cual promueve la interacción con secuencias cortas de adenina y timina (AT) en el ADN a través de la tercera alfa-hélice. No obstante, surge una paradoja conocida como paradoja HOX en donde se cuestiona cómo es posible que las diferentes proteínas HOX reconozcan genes blanco-específicos, si en principio comparten una estructura proteica similar y una misma afinidad hacia las regiones AT, aunado a que éstas se encuentran frecuentemente repetidas en el genoma. En este sentido, se propuso que la especificidad de las proteínas HOX esta mediada por un interactoma, es decir, la previa interacción con otros componentes moleculares como otras homeoproteínas (Exd y Hth) u otros factores de transcripción general (GTFs) confieren una mayor o menor afinidad para reconocer regiones específicas. De modo que, al interactuar con otros componentes pudiera implicar en que la proteína HOX reconozca al sitio promotor con mayor afinidad, o que se una a un sitio potenciador o represor de un mismo gen blanco.

Las proteínas HOX se estudiaron inicialmente en *Drosophila melanogaster*, en donde se reportaron ocho proteínas distribuidas en dos grandes complejos: ANTENNAPEDIA (ANTP-C) y BITHORAX (BX-C). ANTP-C incluye a la proteína Antennapedia (Antp) que se encarga del correcto desarrollo de las patas en el segmento mesotorácico (T2). A través de ensayos de BiFC (en cultivo celular) se reportó que interactúa con el cofactor extradenticle (Exd); con otros factores de transcripción general como: la proteína de interacción Bric-a-brac 2 (BIP2), la subunidad beta del factor transcripcional general E (TFIIE β), la proteína de unión a caja TATA (TBP); y con otras proteínas HOX como Abdominal B (Abd-B) y Sex comb reduced (Scr). Posteriormente, se reportó el ensamblaje trimérico mediante la técnica FRET acoplada a BiFC (BiFC/FRET) del dímero Antp-TBP con la proteína TFIIE β y que este trímero potenciaba su actividad transcripcional hacia un 200%, un valor bastante superior en comparación a los complejos dimérico. Eventualmente, surgió la incógnita si el

orden de interacción a través del cual se pudiera concebir un arreglo conformacional distinto influiría en los niveles de transferencia de energía no radioactiva, es decir, si observaríamos algo diferente a lo reportado previamente que nos arroje indicios de que el arreglo conformacional influye en la dinámica del complejo trimérico.

Por lo tanto, en esta tesis se evaluó otra conformación de interacción del dímero Antp-TFIIE β que se une a la proteína dTBP, utilizando una estrategia diferente de evaluación intercambiando la proteína donadora de ECFP por mCerulean y manteniendo a Venus como proteína aceptora. Asimismo, optamos por utilizar otra estrategia de análisis del FRET acoplado al BiFC, el método normalizado de FRET (N_{FRET}). Según la literatura, este método confiere valores más homogéneos a través de la reducción de la variabilidad en las imágenes obtenidas, la aminoración de la interferencia cruzada de las proteínas fluorescentes entre los canales de detección y la normalización de la intensidad de fluorescencia en las muestras de interés. Todo esto con la intención de proponer un método más eficiente para analizar las interacciones PPIs mediante FRET en nuestro laboratorio y que pudiera trascender hacia otros experimentos futuros.

2. ANTECEDENTES

El desarrollo embrionario o embriogénesis es un proceso estrictamente regulado por la acción de diversos factores de transcripción en los organismos multicelulares. Entre los cuales uno de los mayormente descritos pertenece a *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), debido a la sencillez experimental de éste como modelo de estudio en comparación con organismos más complejos. Además, que es uno de los modelos de estudio cuya organización estructural es simple y está bastante bien estudiada, en donde se han reportado tres secciones en la mosca: cabeza, tórax y abdomen, como se puede observar en la Figura 1. La formación de estas regiones estriba en el proceso embrionario, a partir de las vías de señalización suscitadas por la activación o represión de factores de transcripción, que se mencionarán más adelante. Sin embargo, es importante destacar que todo este proceso exhibe cierto grado de conservación con otros animales vertebrados e invertebrados, principalmente entre aquellos que disponen de una simetría bilateral. Y gracias a las herramientas dentro del área de biología molecular se ha permitido elucidar que este proceso acontece desde la ovogénesis y procede en tres etapas principales: segmentación, gastrulación y organogénesis.

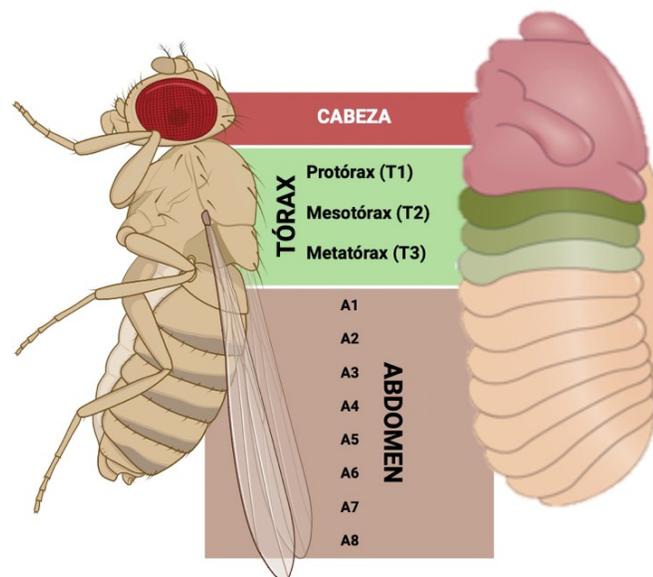


Figura 1. Representación esquemática de los segmentos y subsegmentos en el organismo de *Drosophila melanogaster*. La estructura del cuerpo de la mosca se encuentra dividido en tres porciones: cabeza, tórax y abdomen y cada porción presenta subdivisiones; por ejemplo, el tórax presenta tres segmentos y el abdomen cuenta con ocho segmentos. La imagen permite comparar la posición de las regiones estructurales en el adulto (izq.) y en el embrión (der.).

A inicios tempranos de la embriogénesis, los ovocitos se consideran inmaduros debido a que se encuentran en un estado de arresto en la profase I del ciclo celular; que promueve varias divisiones mitóticas dentro de la porción central del cigoto, es decir, se desarrollan varios ciclos de división nuclear dentro de un mismo citoplasma (Avilés-Pagán & Orr-Weaver, 2018). Entre el doceavo y catorceavo ciclo de división se consigue la maduración del ovocito al avanzar hacia la metafase I en el ciclo celular mediante la activación de las ciclinas A, B3 y CDK1, y así descender hacia el oviducto donde se consigue su activación (Von Stetina & Orr-Weaver, 2011). Se consiguen aproximadamente 256 núcleos, los cuáles se dirigen hacia la periferia de la célula y se moldea el blastodermo sincitial, paulatinamente se concibe la celularización por acción de las fuerzas mecánicas presentes en el oviducto, en dado caso que se conciba la fecundación (Gilbert, 2005). Es importante destacar que los ovocitos poseen ciertos mRNAs provenientes de la madre, que durante el estadio del blastodermo sincitial o el estadio temprano de la celularización comienzan a activarse y moldear a los ejes anteroposterior y dorsoventral.

2.1 Biología molecular implicada en el desarrollo del eje anteroposterior (AP)

El eje anteroposterior (AP) se concibe como un patrón de desarrollo a lo largo del cigoto, sobre el cual cada segmento posee una identidad tisular que recorre desde la porción anterior hacia la posterior del cigoto, es decir el crecimiento o elongación de tejidos se da de atrás hacia adelante. El eje AP se establece inicialmente mediante un gradiente de concentración dependiente de los genes maternos en el ovocito, de modo que la expresión de cada gen predomina específicamente en una región y suprime la expresión de otros. Por ejemplo, el gen *bicoid* impera en la región anterior, mientras que los genes *nanos* y *oskar* en la región posterior, por ende entre ellos mismos se inhibe la expresión, de encontrarse en la región alterna correspondiente (Chang *et al.*, 2011). Los genes maternos codifican y traducen hacia proteínas que fungirán como factores de transcripción y serán responsables de activar a los genes cigóticos de segmentación o genes gap, que subsecuentemente éstos últimos activarán los genes de la regla de par, y que en conjunto con los genes de polaridad de segmentos se formarán 14 bandas o para-segmentos a lo largo del cigoto; tal como se observa en la fig. 2 (Gheisari *et al.*, 2020). Sobre los cuales se expresarán los genes que les conferirán la identidad de las estructuras que se desarrollarán, entre ellos destacan los genes homeóticos.

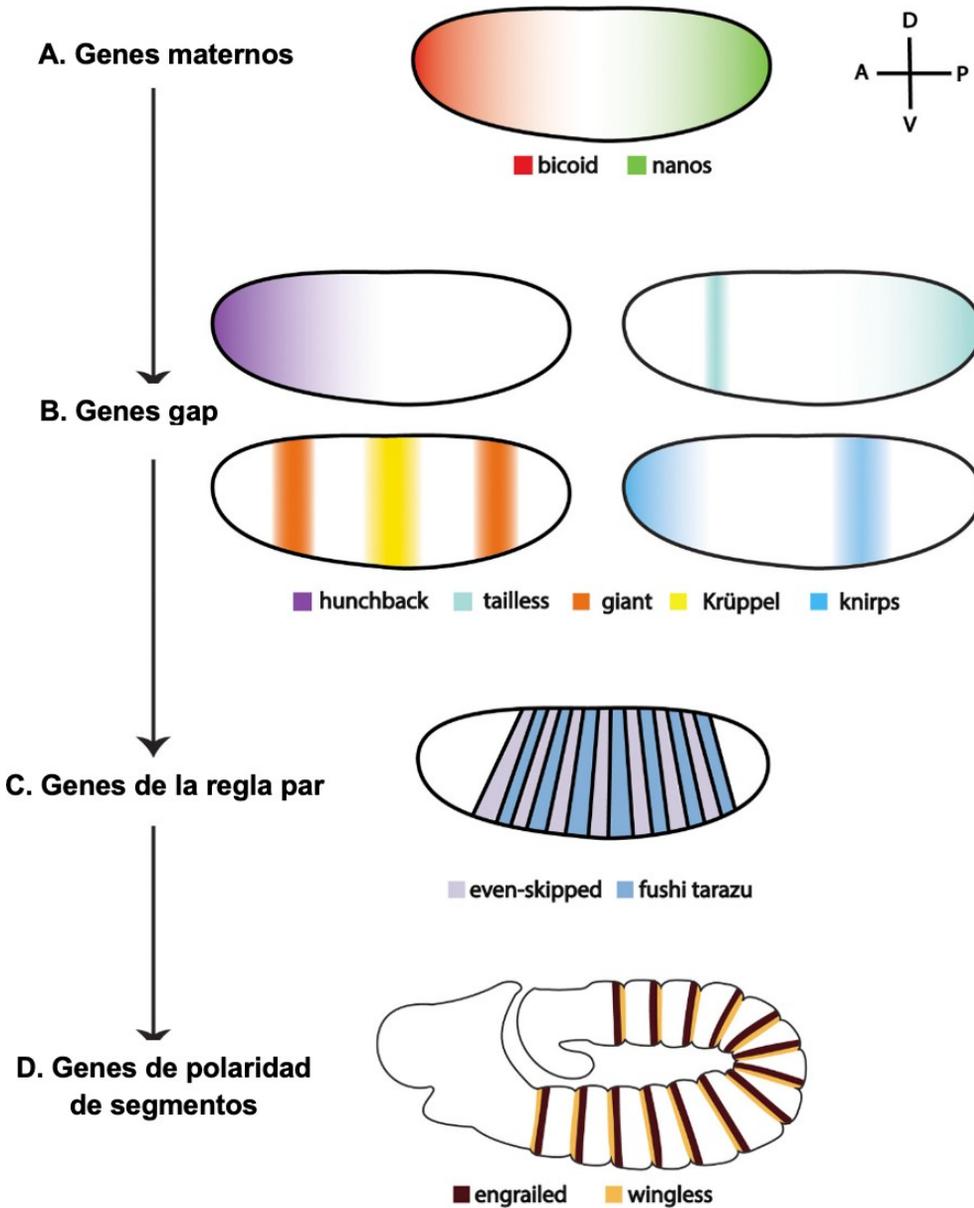


Figura 2. Representación esquemática del patrón de expresión entre los principales genes maternos a lo largo del eje anteroposterior en *Drosophila melanogaster*. A) Los mensajeros maternos son los primeros en traducirse en locaciones específicas para formar un gradiente de concentración y contribuir en la diferenciación anteroposterior. B) Posteriormente se expresan los genes gap que divide al embrión en las regiones anterior, media y posterior. C) A continuación, se activan los genes de la regla de par (pair-rule) donde se establecen los 7 segmentos y que en conjunto con los genes de polaridad de segmentos (D) se delimitan los para-segmentos para formar 14 bandas. Imagen tomada y modificada de Gheisari *et al.*, (2020).

2.2 Genes homeóticos

Los genes homeóticos se consideran maestros reguladores del desarrollo embrionario y son fundamentales durante el proceso de gastrulación ya que le confiere la especificidad a cada segmento a través del eje A/P sobre el que se generarán las estructuras del organismo adulto. Inicialmente se describieron en *D. melanogaster* por Lewis hacia finales de 1970, y eventualmente se encontraron altamente conservados entre diferentes especies desde invertebrados hasta vertebrados, además se ha determinado que la complejidad estructural de los animales está relacionada con la mayor cantidad de genes homeóticos y una distribución más compleja a lo largo del genoma, como se esquematiza en la Figura 3 (Hajirnis & Mishra, 2021).

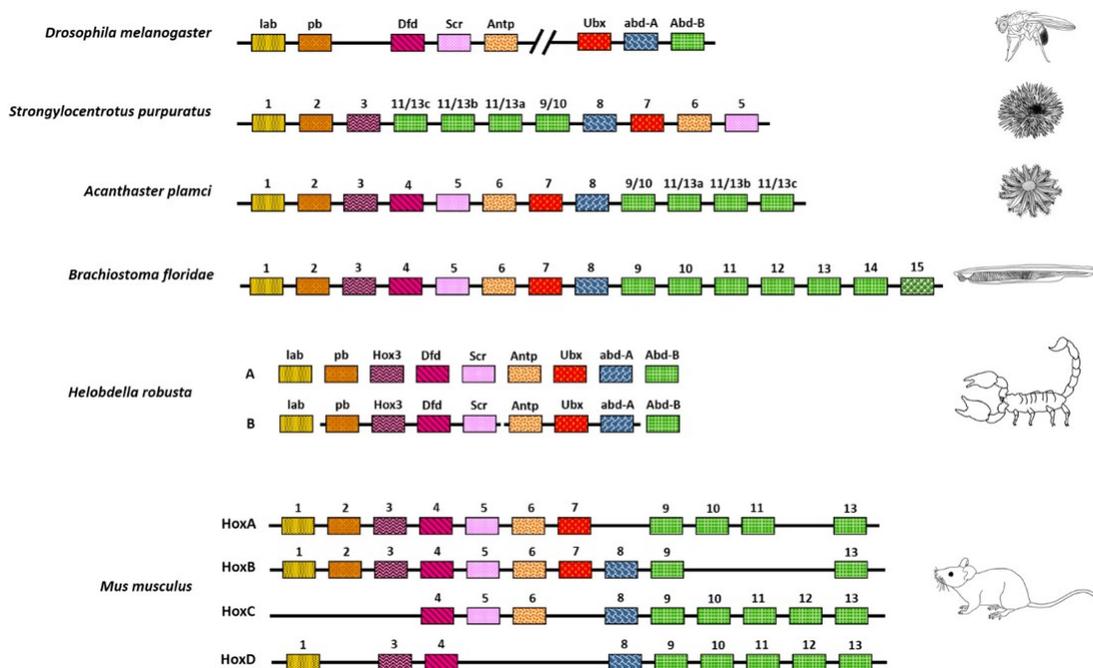


Figura 3. Distribución de los genes homeóticos entre especies. La imagen esquematiza una comparación entre organismos invertebrados con menor complejidad estructural, con organismos vertebrados más complejos como el ratón (*Mus musculus*), en el que se puede ver que hay una mayor cantidad de genes homeóticos y están distribuidos entre un mayor número de complejos. Imagen tomada de Hajirnis & Mishra, (2021).

Los genes homeóticos se caracterizan por una extensión total media de aproximadamente 300 pares de bases, distribuidos entre dos exones y un solo intrón, en donde destaca la presencia de una caja homeótica compuesta por 180pb en el segundo exón que codificarán un dominio de interacción con regiones del ADN (Lappin *et al.*, 2006). Su expresión se

encuentra estrictamente regulada sobre la posición en la que se localizan y la alteración en sus elementos de regulación (cis o trans) promueve un cierto tipo de mutaciones conocidas como mutaciones homeóticas.

2.2.1. Homeosis y mutaciones homeóticas

William Bateson (1894) estableció el término “homeosis” refiriéndose a una mutación que transforma la identidad de un segmento, en el sentido que no desaparece el segmento, sino que es destinado a desarrollar una estructura parcial o totalmente diferente a la nativa (Lewis, 1994). Un mejor entendimiento de este concepto se logró hacia 1915, en donde Calvin Bridges describe la transformación del segmento torácico T3 hacia uno con identidad del segmento T2 en *D. melanogaster*, es decir, fenotípicamente observó una conversión de los halterios hacia una estructura total o parcial de alas en la mosca de la fruta (Robertson & Mahaffey, 2017). Estas alteraciones en el fenotipo se deben a modificaciones espontáneas alélicas de los genes *bithorax* durante el estadio como blastodermo, ocasionando un redirección del destino celular del T3 hacia vías de señalización asociadas con la especificidad tisular de alas en lugar de halterios; la primera mutación descrita fue nombrada *bithorax* (*bx¹*) (Lewis, 1998; Morata & García-Bellido, 1976). Eventualmente se elucidaron otras mutantes cuyo impacto en la transformación homeótica era más notoria, entre las cuales, destacó aquella variante que presentaba simultáneamente las mutantes *bx³* y *pbx* y cuyo fenotipo es la conversión total del segmento T3 en T2, esto es, que se observó una mosca con dos pares de alas como se observa en la Figura 4A (Bender *et al.*, 1983).

Por otro lado, el estudio de otras mutaciones ha incrementado el entendimiento del concepto de homeosis son también las alteraciones que estriban en el gen *Antennapedia* (*Antp*). Se ha reportado que la pérdida de función derivado de una modificación alélica en *Antp* conduce a la transformación del segmento mesotorácico hacia uno con características protorácicas (Schneuwly *et al.*, 1987). Por ejemplo, el fenotipo dado por la mutación *Antp^{Sex}* demuestra dicha transformación, aunque en ocasiones puede presentar un cierto grado de letalidad recesiva al presentarse simultáneamente con otras mutantes como es el caso del genotipo *EfW15/ Antp^{Sex}* (Wakimoto & Kaufman, 1981). Asimismo, se ha observado también que al expresar *Antp* ectópicamente en los discos imaginales de la antena, se promueve una transformación de la antena hacia una pata mesotorácica, como se observa en la figura 4B (Casares & Mann, 1998). Algunas de las mutantes reportadas para este tipo de transformación

son *Antp⁵⁰*, *Antp^{73b}* y *Antp^{Ns}*, de las cuáles las primeras dos se caracterizan por exhibir cierto grado de letalidad en la larva al presentarse como una alteración homocigótica (Denell, 1973; Denell *et al.*, 1981).

El entendimiento del concepto de homeosis se ha comprendido mejor gracias a los estudios de transformaciones homeóticas, y con ello se ha permitido elucidar la diversidad de genes homeóticos presente en *D. melanogaster*. Gracias a ello, es que actualmente se tienen definidos los ocho genes presentes en la mosca, los cuales están distribuidos en dos grandes complejos: ANTENNAPEDIA (ANT-C) y BITHORAX (BX-C).

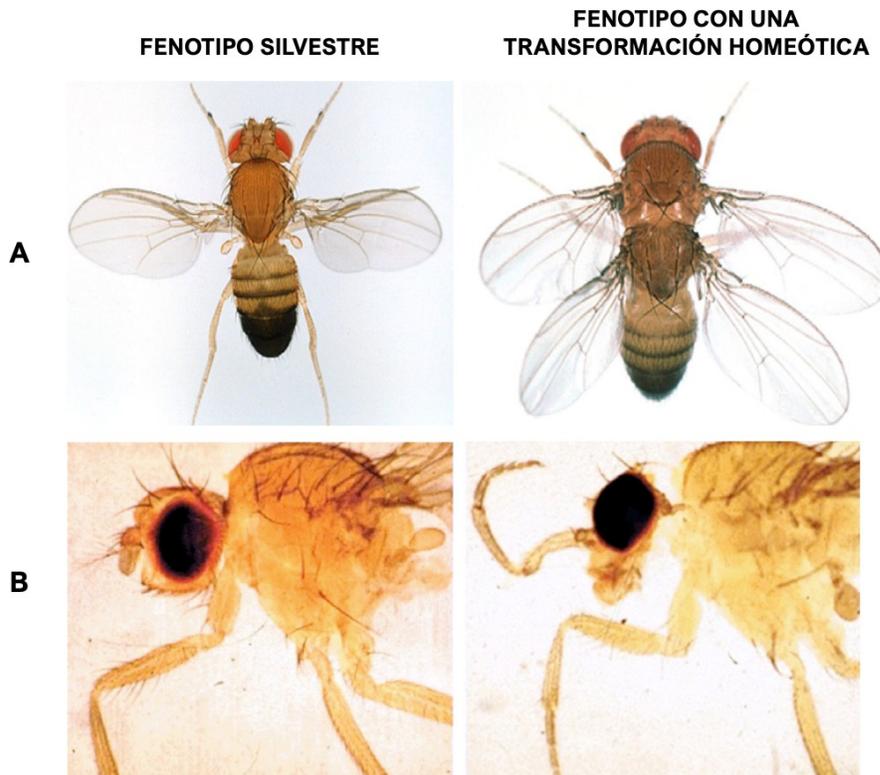


Figura 4. Mutaciones homeóticas presentes en *Drosophila melanogaster*. A) En la primera imagen se observa el fenotipo silvestre que presenta la mosca, mientras que en la segunda columna se tiene el fenotipo de dos pares de alas, dado por la mutación *bx3/pbx*. B) En la primera imagen se observa la presencia de la antena en la cabeza de la mosca, mientras que en la segunda se exhibe la conversión total de la antena a pata, dado por una expresión ectópica de *Antp* en los discos imaginales de antena.

Imagen modificada y tomada de Morata & Lawrence, (2022).

2.2.2. Genes homeóticos en *Drosophila melanogaster*

En *D. melanogaster*, existen ocho genes homeóticos dispuestos en el brazo derecho del tercer cromosoma, que se encuentran agrupados en un gran complejo homeótico (HOM-C), y que a su vez éste está dividido en otros dos complejos: ANTP-C y BX-C (Buffry & McGregor, 2022). El ANTP-C es responsable de especificar los segmentos que abarcan desde la porción

de la cabeza hasta el segmento torácico T2 de la mosca (Fig. 5), en el cual se incluyen a los genes *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex comb reduced* y *Antennapedia* (Randazzo *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1983). Entre los cuales, por sentido del proyecto en cuestión, destaca el gen *Antennapedia* (*Antp*), el cual se ha reportado su expresión predominante sobre la epidermis de la región mesotóraca y en menor proporción sobre el tejido nervioso somático y visceral del mesodermo (Plaza *et al.*, 2001). *Antp* es responsable de promover el desarrollo de las patas y suprimir el desarrollo de tejido antenal en el segmento T2 del tórax o mesotórax (Abbott & Kaufman, 1986; Carroll *et al.*, 1986).

Por otro lado, el BX-C se encarga de aquellos segmentos que recorren desde el segmento torácico T3 hasta el resto de la porción abdominal de la mosca, e incluye a los genes *Ultrabithorax*, *abdominal-A* y *Abdominal-B* (Maeda & Karch, 2009). La expresión de los ocho genes homeóticos está estrictamente regulada sobre el eje AP (como se observa en la Figura 5) mediante tres principios de colinealidad.

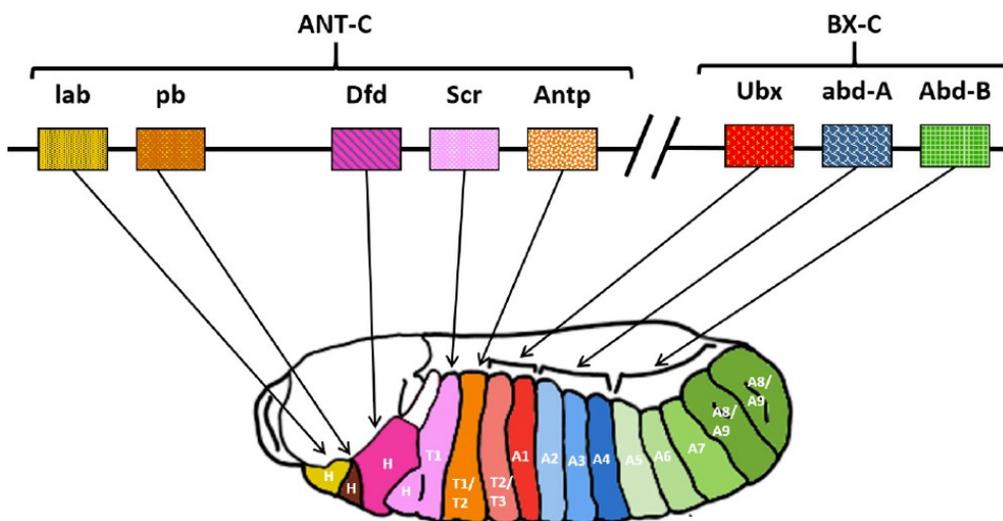


Figura 5. Distribución de los complejos ANTENNAPEDIA (ANT-C) y BITHORAX (BX-C) en el embrión de *Drosophila melanogaster*. En la imagen se observa que los genes labial (*lab*), proboscipedia (*pb*) y Deformed (*Dfd*) corresponden a los segmentos que desarrollarán la porción de la cabeza que se señalan con la letra H. Los genes Sex comb reduced (*Scr*), Antennapedia (*Antp*) y Ultrabithorax (*Ubx*) se presentan entre los segmentos que especificarán las regiones T1, T2 y T3, respectivamente, del tórax en la mosca. Los genes abdominal A (*abd-A*) y Abdominal B (*Abd-B*) se responsabilizan de desarrollar los ocho segmentos (A1-A8) que constituyen la porción abdominal.
Imagen modificada y tomada de Hajirnis & Mishra, (2021).

2.2.3. Principios de regulación en la expresión de los genes homeóticos

El principio de colinealidad data de los estudios que llevó a cabo Lewis hacia 1978, en el que buscó responder al cuestionamiento del por qué los genes homeóticos se encontraban

delimitados en clústeres. La colinealidad permite explicar cómo se modula la expresión de los genes homeóticos entre regiones o clústeres a lo largo del eje AP, y a partir del cual se suscitaron tres conceptos de colinealidad como se ve en la figura 6. El primero establece una correlación entre el posicionamiento cromosómico y el sitio donde se expresaría. Así surge el concepto de colinealidad espacial en el que se demuestra que el sitio de expresión a lo largo del eje AP de los genes coincide con su locación en el cromosoma (Monteiro & Ferrier, 2006). Por ejemplo, el complejo ANTP-C se encuentra más cercano al extremo 3' mientras que entre más se avanza hacia el extremo 5' se encuentran los genes del complejo BX-C. Esto se volvió una propiedad inherente de los genes homeóticos no solo en *D. melanogaster* sino en muchas especies de animales invertebrados y vertebrados, en estos últimos, posteriormente, se encontraron también otras características de regulación en dichos genes. En vertebrados, se ha estudiado un segundo principio de regulación en donde el orden en que se van expresando los genes homeóticos radica en la posición sobre el cromosoma, es decir, primero se expresan los genes cercanos al extremo 3' y así consecutivamente hasta dejar al final los genes cercanos al extremo 5' (Kmita & Duboule, 2003). Esto se conoce como colinealidad temporal, el cual se ha propuesto como un evento relacionado a una transición progresiva del estado inactivo a activo de la cromatina mediante la modificación de histonas a lo largo del extremo 3' y 5' (Chambeyron & Bickmore, 2004). Asimismo, existe un tercer principio denominado como colinealidad cuantitativa, sobre el que se describe la prevalencia posterior y menciona que al tener una co-expresión de genes en una misma región, aquellos localizados más hacia el extremo 5' inhiben a los genes anteriores a ello (Papageorgiou, 2011).

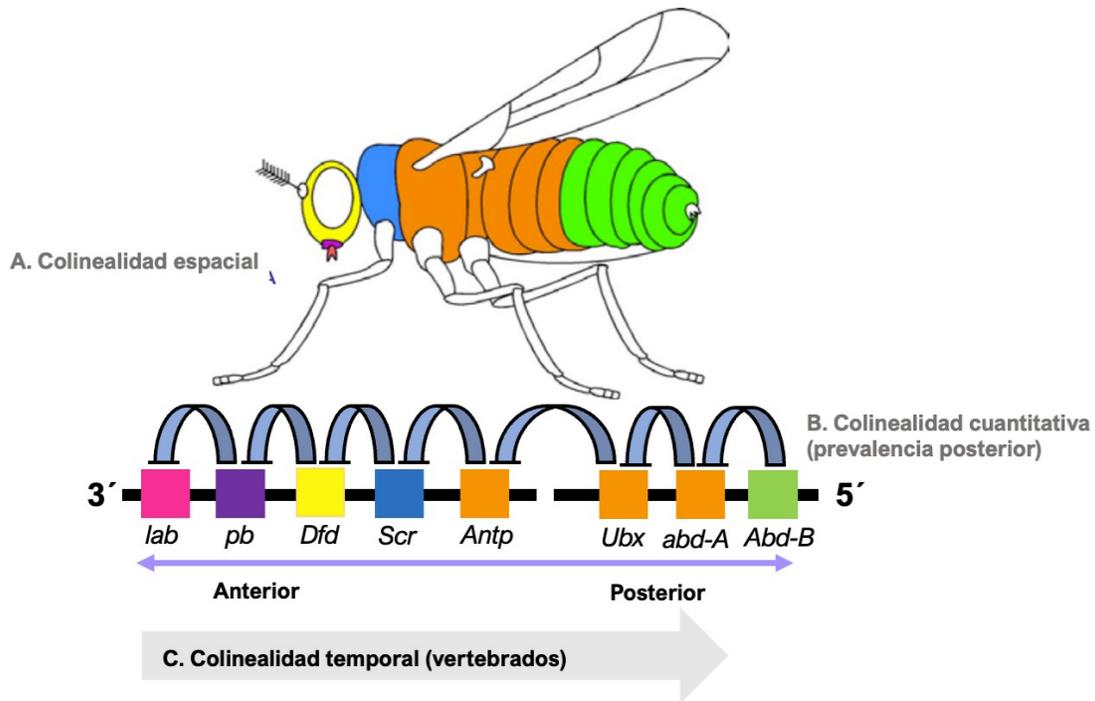


Figura 6. Principios de regulación en la expresión de los genes homeóticos. A) La colinealidad espacial describe que la posición de las estructuras sobre el eje AP coinciden con la localización en el cromosoma, en la imagen cada color sobre el cromosoma coincide con la región en el adulto, entre más cercano a la porción anterior se ubican más cercano en el extremo 3'. B) La colinealidad cuantitativa señala que los genes más cercanos al extremo posterior inhiben al gen inmediato del segmento anterior. C) La colinealidad temporal, que esta descrito en vertebrados, señala que los genes del extremo 3' se expresan primero y se van expresando en secuencia conforme se va desplazando hacia el extremo 5'.
 Imagen modificada de Lappin *et al.*, (2006).

2.3 Homeoproteínas

Las homeoproteínas (HPs) son factores de transcripción imprescindibles en la especificación de las estructuras que se formaran sobre los segmentos embrionarios a lo largo del eje AP, por lo tanto se expresan mayormente a inicios de la gastrulación (Imura & Pourquié, 2007). Las HPs se caracterizan por la presencia de un homeodominio (HD), que es un dominio globular constituido por 60 residuos aminoacídicos dispuestos en tres α -hélices, en donde secuenta con el motivo estructural hélice-giro-hélice mediante el cual se establece la interacción con el ADN (Bürglin & Affolter, 2016). Se ha demostrado que el HD se encuentra bastante similar entre diferentes HPs, específicamente se observa una mayor conservación en la tercera α -hélice, principalmente entre los residuos 45 y 55, como se puede observar en la Figura 7.

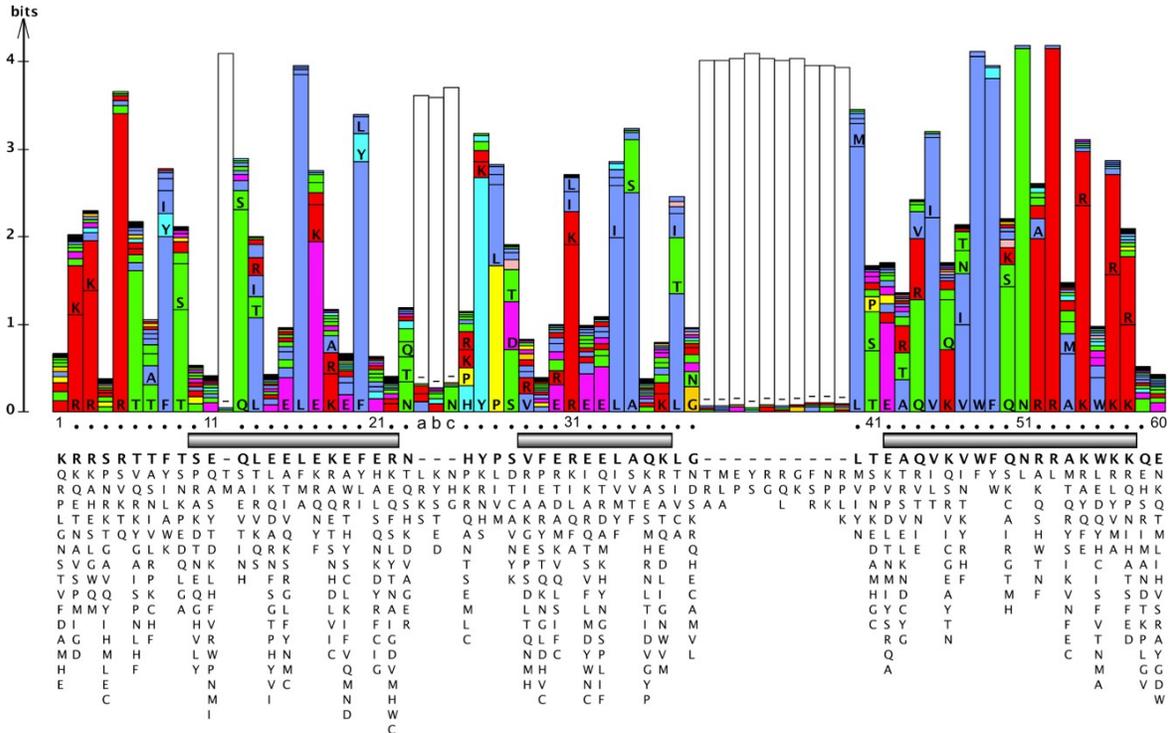


Figura 7. Representación gráfica de la conservación entre los homeodominios de diferentes homeoproteínas en *Drosophila melanogaster*. La imagen corresponde a la comparación entre los 60 aminoácidos del homeodominio entre diferentes clases de homeoproteínas, en donde el tamaño de las barras es proporcional al grado de conservación. Las barras grises en la porción inferior de la gráfica corresponden a la región comprendida por cada una de las tres α -hélices, en donde se puede observar que el mayor grado de conservación es en la tercera, que es a la que se le atribuye mayormente la unión al ADN.

Imagen tomada de Bürglin & Affolter, (2016).

Las HPs se encuentran agrupadas entre diferentes clases, con respecto a las características estructurales similares que presentan entre ellas y de entre las cuales, por interés del proyecto, destacan la clase ANTENNAPEDIA y la superclase TALE. La clase ANTENNAPEDIA comprende a aquellas proteínas que comparten similitud con ciertas características estructurales de Antp y esta clase se subdivide en los grupos HOXL y NKL; entre ellas, en el grupo tipo HOX (HOXL) se encuentran todas las proteínas obtenidas de la traducción de los genes homeóticos (Bürglin & Affolter, 2016). Por otro lado, la superclase TALE es un grupo peculiar de HPs que contienen una extensión del HD, ya que presentan tres aminoácidos adicionales entre la primera y segunda α -hélices; cuyos ejemplos más comunes son los conocidos cofactores extradenticle y homothorax (Burglin, 1997).

Entre las homeoproteínas pertenecientes al grupo tipo HOX, se ha asumido que el HD es considerado el principal sitio de interacción con secuencias cis-reguladoras en el ADN, como

las regiones cortas de adenina y timina. No obstante, se ha cuestionado que este motivo estructural no es lo suficiente para concebir la unión y la modulación de sus respectivos genes blanco, ya que el HD presenta una afinidad hacia regiones nucleotídicas cortas frecuentemente repetidas a lo largo del genoma y éste tiene una gran similitud entre las diferentes HPs. Entonces, emerge el cuestionamiento de cómo es posible que cada homeoproteína tipo HOX pueda reconocer específicamente y modular las vías de señalización correspondientes para la estructura que va a desarrollar en su sitio de expresión, dicho cuestionamiento es considerado como la paradoja HOX.

Así que, para responder a dicho cuestionamiento se planteó la presencia de otros dominios o motivos estructurales adyacentes al HD que promueven la unión con otros componentes moleculares. Por ejemplo, Rohs *et al.*, (2009) proponen que la abundancia de argininas en el extremo N-terminal del surco menor en las proteínas HOX son responsables de la interacción con regiones tetra nucleotídicas conformadas por adenina y timina en el ADN, como la caja TATA. Asimismo, también se ha descrito la presencia de un hexapéptido adyacente al HD, el cual dispone del motivo YPWM que facilita la interacción con otras proteínas como los cofactores (Prince *et al.*, 2008; Wilson & Desplan, 1999); de los que se hablarán más adelante. Por lo tanto, a partir del descubrimiento de otros dominios de interacción en las proteínas HOX, se planteó que una de las soluciones hacia la paradoja HOX es la interacción con otros componentes moleculares que potencien la afinidad de una proteínas HOX hacia su respectivo gen blanco.

2.4 Soluciones a la paradoja HOX

Como se mencionó anteriormente, el HD de las proteínas HOX presentan una alta conservación entre los residuos de la tercera α -hélice, los cuáles exhiben una gran afinidad hacia secuencias cortas que se repiten frecuentemente en el ADN. Entonces surge el cuestionamiento propuesto por la paradoja HOX, en donde se ha respondido que podrían ser las ligeras variaciones en las secuencias de las proteínas HOX que le confieren una afinidad específica a cada proteína. Por lo tanto, surgen dos postulados diferentes: el primero menciona que estas secuencias afectan la habilidad de reprimir o activar sus respectivos genes blanco, mientras que la segunda (a la que más se tiene en consideración) propone que al momento de unirse con ciertas proteínas o cofactores, modifican la afinidad de interacción

con el ADN (Slattery *et al.*, 2011). En este último modelo, se han estudiado mayormente las interacciones con las proteínas TALE (Bridoux *et al.*, 2021), y en nuestro equipo de trabajo se han estudiado con los factores de transcripción general (GTFs).

2.4.1 Interacciones proteicas HOX-TALE

Las principales interacciones con proteínas TALE o cofactores se estudiaron inicialmente en *D. melanogaster* y posteriormente se encontraron sus respectivos homólogos en vertebrados, las cuales son Exd/Pbx y Hth/Meis.

Extradenticle (Exd) es una proteína citoplásmica que inicialmente es heredada como un transcrito por el genoma materno en el ovocito, el cual a partir del estadio 12 emerge su expresión, predominando en los segmentos de la cabeza y tórax, aunque también se ha observado posteriormente en los segmentos viscerales y somáticos del mesodermo (Rauskolbet *al.*, 1993). Exd interactúa con el motivo estructural YPWM presente en el hexapéptido de algunas homeoproteínas, modificando así el arreglo estructural de la proteína; por ejemplo, se ha visto que en Scr reorganiza el dominio N-terminal a modo que las argininas puedan promover la interacción con el surco menor de la primera α -hélice (Slattery *et al.*, 2011). Por lo tanto, se ha planteado que su actividad efectora estriba en la remodelación estructural para favorecer una interacción específica con genes blanco, pero, sin alterar el nivel de expresión proteica. Esto surge a partir de estudios *in vivo* donde se han inducido mutaciones génicas en *exd* y en donde se han observado alteraciones fenotípicas en ciertos para-segmentos, sin embargo, ni los niveles de expresión ni las delimitaciones establecidas por las proteínas HOX entre cada para-segmento se vieron afectadas por estas mutaciones (Peifer & Wieschaus, 1990). Por ejemplo, en dichos experimentos se describen que las deleciones totales o casi totales de *exd* no alteran el patrón de expresión de las proteínas Scr, Antp, Ubx y abd-A sobre sus segmentos habituales pero si alteran la identidad de dichos segmentos, como se observa en la Figura 8.

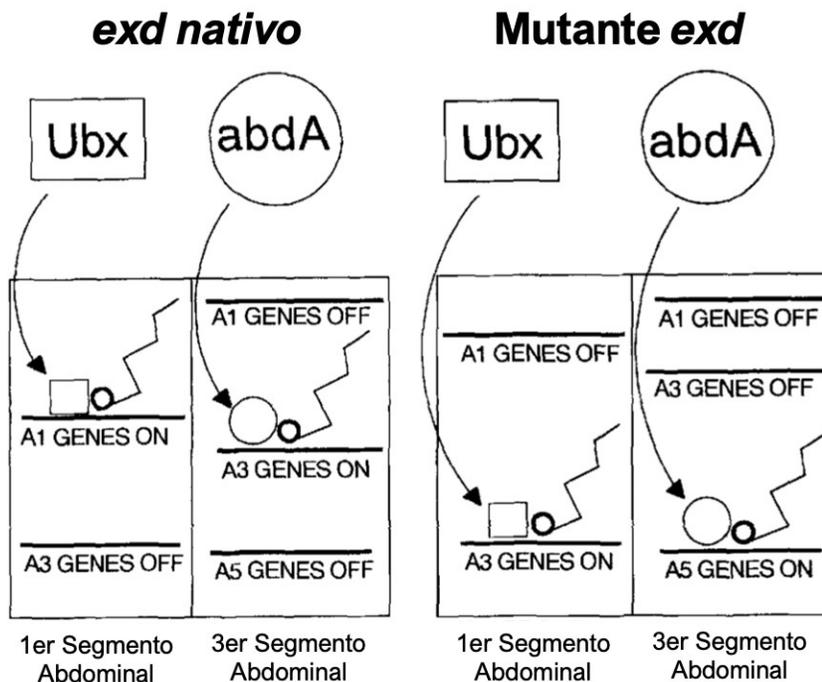


Figura 8. Diagrama acerca de la especificidad que confiere extradenticle (*exd*) en la identidad de segmentos. En la imagen se observa que cuando *exd* se encuentra en su forma nativa se concibe la especificación de los segmentos adecuada, por ejemplo en el primer segmento abdominal Ubx activa los genes correspondientes A1 pero con la delección de *exd* se activan ahora los genes A3 en el mismo sitio. Por otro lado, en el tercer segmento abdominal, abdA activa los genes correspondientes A3 en presencia de *exd*, pero al deletarlo, en el mismo sitio se activan ahora los genes A5. Esta imagen fue tomada y traducida de Peifer & Wieschaus, (1990).

Homothorax (Hth) es otra proteína perteneciente a la superfamilia TALE que se localiza a nivel nuclear, principalmente en células del disco imaginal ocular y cuya actividad efectora es imprescindible en el desarrollo del ojo en *D. melanogaster* al interactuar con la proteína Dfd (Pai *et al.*, 1998). Asimismo, se ha estudiado que Hth interactúa con Exd y promueve la traslocación de éste al núcleo, e incluso se ha visto que este dímero modula la interacción y actividad con otras proteínas HOX formando un complejo trimérico, siendo éste el primer trímero reportado entre proteínas HOX (Porcelli *et al.*, 2019; Rivas *et al.*, 2013).

2.4.1.1 Interacciones diméricas entre las proteínas HOX-TALE

Una de las proteínas HOX de *Drosophila melanogaster* que hemos estudiado en nuestro equipo de trabajo es Antennapedia (Antp), la cual como ya se mencionó es responsable del desarrollo del segmento torácico T2. De acuerdo con Cárdenas-Chávez (2012), Antp se une al cofactor Exd mediante el motivo estructural YPWM del hexapéptido localizado arriba del

homeodominio, así mismo este motivo es responsable de la interacción con la proteína BIP2. Por otro lado, también se ha observado que la expresión de Antp es promovida al interactuar con Hth en el disco imaginal de la ala de la mosca (Paul *et al.*, 2021).

2.4.2 Interacciones proteicas HOX-GTFs

Nuestro equipo de trabajo ha estudiado la interacción de las proteínas HOX con los factores de transcripción general, tanto en la formación de los complejos diméricos como triméricos.

2.4.2.1 Factores de transcripción general (GTFs)

La transcripción es un proceso estrictamente regulado, en donde se obtiene una molécula de ARN (transcrito primario) a partir de la región codificante de un gen (Herráez, 2012). Este proceso está mediado por la acción de tres polimerasas, de entre las cuales, la ARN polimerasa II es la que se encarga de sintetizar los mRNA a partir de los genes que codifican hacia proteínas. Sin embargo, para el correcto funcionamiento de la ARN Pol II se requiere previamente el ensamblaje del complejo de preiniciación en la secuencia promotora del gen, a partir del reclutamiento de seis factores de transcripción general: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIH y TFIIE (Schier & Taatjes, 2020); como se observa en la Figura 9. Por relevancia de este proyecto, se ahondará en la subunidad TBP del complejo TFIID y en TFIIE.

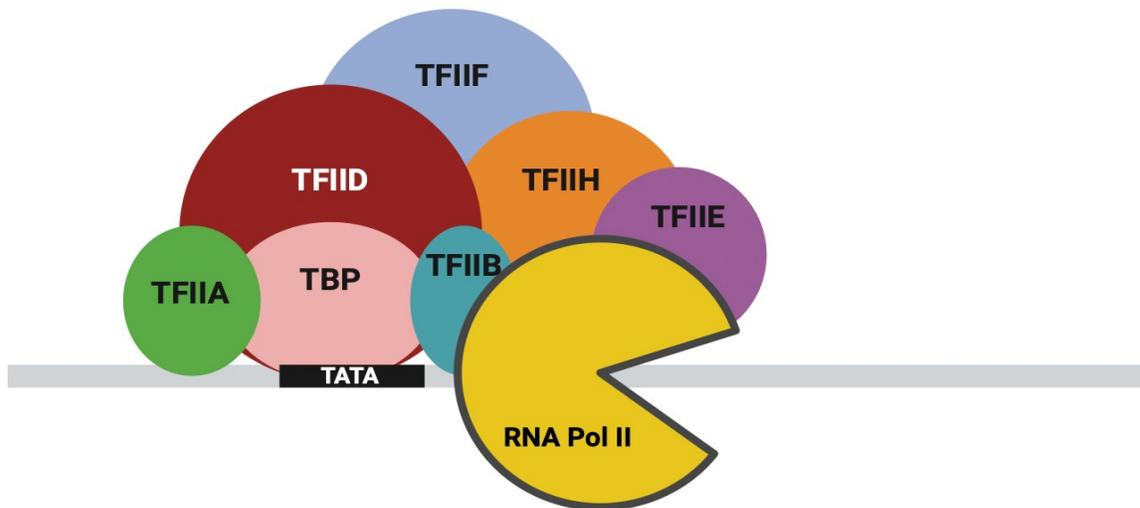


Figura 9. Esquema ilustrativo del ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) en la secuencia promotora. El reclutamiento de los factores de transcripción general lleva un orden estrictamente regulado, iniciando por la interacción de la subunidad TBP del factor TFIID en la secuencia TATA del promotor. Posteriormente, se reclutan los factores TFIIA y TFIIB. Luego, el factor TFIIF es reclutado y se encarga de estabilizar el PIC e interactuar con la ARN Pol II para promover su unión con un mediador. Finalmente, se unen los factores TFIIH

y TFIIE que fosforilan a la ARN Pol II en su dominio CTD para comenzar y potenciar la actividad de la polimerasa en cuestión. Imagen adaptada de Chen *et al.*, (2021).

El factor TFIID es un complejo multiproteico imprescindible para el inicio del ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC). Para ello cuenta con la proteína de unión a caja TATA o TBP que promueve la interacción con la secuencia promotora en el gen, y una vez unido, se promueve el reclutamiento con los factores TFIIA y TFIIB (Patel *et al.*, 2018). No obstante, aproximadamente un 80% de los promotores eucariotas carecen de la caja TATA y aun así es requerido la proteína TBP para inicializar la transcripción, ya sea directa o indirectamente por los factores asociados a TBP o TAFs (Patel *et al.*, 2020). Por otro lado, el factor TFIIE es un hetero tetrámero formado por dos subunidades (alfa y beta), el cual es importante para el reclutamiento del factor TFIIH (Okamoto *et al.*, 1998). Además, se ha descrito que la subunidad TFIIE β funciona como un mediador entre el factor TFIIH y la ARN Pol II, potenciando así la actividad del módulo de quinasa activadora dependiente de ciclinas modulo CAK para lograr que la ciclina CDK7 en el factor TFIIH fosforile el sitio CTD en la ARN Polimerasa II (Compe *et al.*, 2019).

2.4.2.2 Interacciones diméricas de las proteínas HOX-GTFs

Una de las homeoproteínas HOX de *D. melanogaster* estudiadas por nuestro equipo de trabajo es Antennapedia (Antp), la cual se ha analizado su interacción dimérica con las proteínas TBP y TFIIE β . Esto mediante la técnica de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) utilizando Venus como proteína fluorescente, de la cual se hablará más adelante.

Por un lado, en ensayos de cultivo celular se ha observado que Antp interactúa con la proteína TBP a través del dominio N-terminal donde se sitúa una región rica en residuos de glutamina (Emili *et al.*, 1994). Asimismo, se describió que Antp interactúa con el factor TFIIE β mediante el residuo 32 y 36 de la segunda alfa-hélice, cuya interacción es requerida para la función homeótica de Antp (Altamirano-Torres *et al.*, 2018); como se observa en la Figura 10.

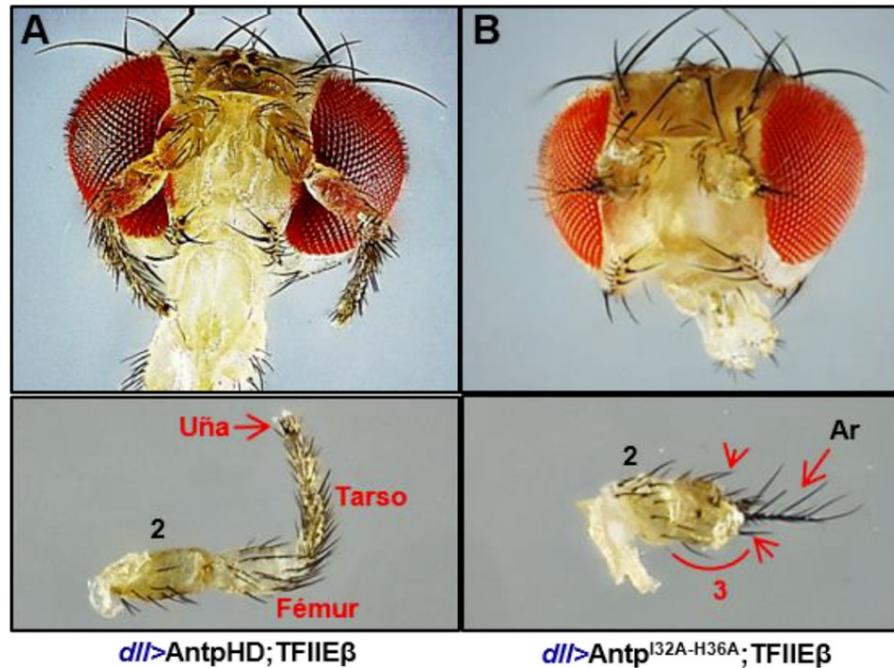


Figura 10. La interacción de Antp-TFIIE β es esencial para la función homeótica de Antp. A) La expresión ectópica en la cabeza de la mutante AntpHD, en donde se deleta la región rica en glutaminas, no impide la interacción con el factor TFIIE β , por lo tanto se observa una conversión de la antena hacia pata. B) La expresión ectópica de la mutante Antp^{I32A-H36A}, donde se transforman los residuos 32 y 36 en alaninas, impide la interacción con el factor TFIIE β , y se observa solo un leve engrosamiento del 3er segmento de la antena.

Imagen tomada de Altamirano-Torres *et al.*, (2018)

2.4.2.2 Interacciones triméricas de las proteínas HOX-GTFs

En nuestro equipo de trabajo se han estudiado las interacciones triméricas de Antp en ensayos de cultivo celular mediante la técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) acoplado con BiFC, utilizando la proteína EFCP como donadora y Venus como aceptora. Jiménez-Mejía (2018) reportó que el dímero Antp-TBP interactúa con otras proteínas como TFIIE β , BIP2 y Exd, sin embargo, el mayor porcentaje de eficiencia de FRET se reportó con el trímero Antp-TBP/TFIIE β .

2.5 Técnicas moleculares para la evaluación de interacciones entre proteínas

Como se mencionó anteriormente, la interacción entre proteínas se ha evaluado mediante las técnicas BiFC y FRET.

2.5.1 Técnica de complementación de fluorescencia Bimolecular (BiFC)

La técnica de complementación de fluorescencia Bimolecular (BiFC) utiliza dos fragmentos de una proteína fluorescente, un dominio N-terminal y C-terminal, que son acoplados

respectivamente a dos proteínas de interés que se piensa se unen entre sí. Estos dominios no fluorescen por separado, pero, si estas proteínas interactúan entre sí los dominios se fusionarán y se reestablecerá la fluorescencia que se puede observar por microscopía, como se ve en el diagrama de la figura 11 (Kodama & Hu, 2012). Este ensayo ha sido utilizado ampliamente para evaluar la interacción proteína-proteína (PPIs) debido a su simplicidad y alta sensibilidad. Se utilizan diferentes proteínas fluorescentes, entre las cuales destacan Cerulean, Citrina y Venus debido a su aprovechamiento bajo en condiciones fisiológicas celulares normales sin requerir una preparación previa, como lisis o fijación, o el uso de agentes externos (Chu et al., 2009; Miller *et al.*, 2015).

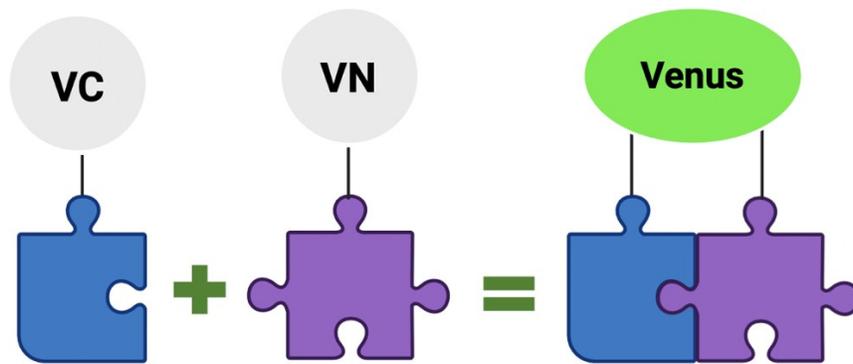


Figura 11. Diagrama acerca de la técnica de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). La técnica se basa en dividir una proteína fluorescente en dos fragmentos: C-terminal y N-terminal, en los que cada uno se acopla dos proteínas de interés. En dado caso que se unan las proteínas, se recupera la fluorescencia de la proteína. En nuestro equipo de trabajo se utiliza la proteína fluorescente Venus.

2.5.2 Técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

La técnica de FRET evalúa la proximidad entre dos proteínas acopladas o asociadas cada una a proteínas fluorescentes. El principio se basa en medir el nivel de transferencia de energía no radioactiva entre una proteína fluorescente donadora, al estar excitada en su respectiva longitud de onda (λ), hacia una proteína aceptora que se encuentre en una distancia no mayor

a 10 nm, entre menor sea la distancia mayor será el nivel de transferencia de energía, como se observa en la figura 12 (Chen *et al.*, 2006).

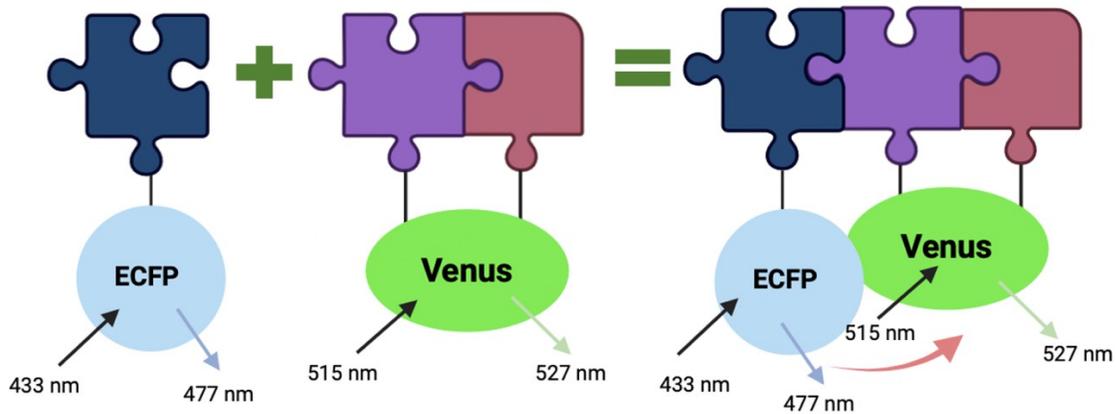


Figura 12. Diagrama acerca de la técnica de transferencia de energía no radioactiva de Förster. La técnica se basa en el medir la transferencia de energía entre dos proteínas fluorescentes cercanas. En el caso de nuestro equipo de trabajo, se utilizó la proteína ECFP como donadora, la cual esta acoplada a una proteína de interés (Jiménez-Mejía, 2018). Por otro lado, Venus funciona como aceptora, la cual siguiendo el principio de BiFC se partió en dos fragmentos para dos proteínas de interés y al unirse estas dos se recupera la fluorescencia. Así que al interactuar las tres proteínas, por cercanía y acorde al arreglo que establecen se consigue la transferencia de energía.

La técnica de FRET puede ser asistida con un microscopio confocal o inclusive por citometría de flujo. De esta medición se obtiene el valor de eficiencia de FRET (E), el cual tiene varias interpretaciones ya que si bien puede entenderse como el valor relativo que señala la fracción de energía absorbida por el donador que sería transferida hacia el aceptor, o bien, como la medición de la fluorescencia relativa del donador en presencia y ausencia del aceptor (Berney & Danuser, 2003). FRET puede evaluarse a través de dos acercamientos, ya sea evaluando el cambio de intensidad de fluorescencia, ya que se supone que al haber transferencia de energía la intensidad del donador disminuye, mientras que la del aceptor aumenta; o bien se puede medir las variaciones en la intensidad de la fluorescencia del donador a través del tiempo (Coulomb *et al.*, 2020). En cuestión a nuestro proyecto nos enfocaremos en el primer acercamiento utilizando un análisis de emisión sensibilizada (SE-FRET).

El método SE-FRET mediante 3-filtros o 3-cubos se ha consagrado como uno de los métodos más eficientes para evaluar las interacciones PPIs en muestras que no requieren fijación, además de resultar sencillo al momento de adquirir las fotografías para analizar. La metodología estriba en detectar los cambios en la intensidad en el rango de emisión del

donador y el aceptor. Para ello, se deben tomar fotografías o imágenes (I) en tres canales: I_{DD} , excitado y detectado entre el rango de longitud de onda del donador; I_{DA} , excitado en condiciones del donador y detectado entre el rango de longitud de onda del aceptor; e I_{AA} , excitado y detectado entre el rango de longitud de onda del aceptor (Vereb & Rebenku, 2023; Zal & Gascoigne, 2004). El método SE-FRET se puede evaluar mediante cuatro enfoques: N_{FRET} , FRET_N, FR y el FRET radiométrico; entre los cuáles por fines del proyecto destaca el método N_{FRET} , el cual es bastante útil para las interacciones intermoleculares (Bajar *et al.*, 2016). Mediante el método N_{FRET} se logra calcular dos factores de corrección que corresponden al sangrado espectral del aceptor ($\alpha = \frac{I_{DA}}{I_{AA}}$) y donador ($\beta = \frac{I_{DA}}{I_{DD}}$), los cuáles permiten reducir las interferencias cruzadas de las proteínas fluorescente entre los canales de detección (Hoppe *et al.*, 2002). Esto con la finalidad de conseguir la normalización en la intensidad de la fluorescencia en el par FRET y con ello reducir la variabilidad entre las imágenes obtenidas del FRET, de modo que se perciban resultados concisos y comparables entre ensayos que mantienen las mismas condiciones experimentales (Gordon *et al.*, 1998; Xia & Liu, 2001)

A través de los años, se han desarrollado diferentes algoritmos y herramientas para el análisis de las PPIs mediante el método de normalización N_{FRET} , y uno de los más sencillos a utilizar es el software gratuito PixFRET incluido en el software ImageJ. Éste es una herramienta desarrollada por la Universidad de Lausanne que realiza el análisis pixel por pixel de las fotografías adquiridas de una misma muestra, o bien de diferentes ensayos realizados con las mismas condiciones (Feige *et al.*, 2005). PixFRET utiliza factores de corrección constantes a través de la cuantificación del sangrado espectral del aceptor (Acceptor SBT) y del donador (Donnor SBT) mediante imágenes de muestras que únicamente expresan la proteína fluorescente aceptora y donadora, respectivamente. Luego de haber calculado todo ello, se obtienen las imágenes FRET y se cuantifican los valores N_{FRET} mediante la siguiente fórmula:

$$N_{FRET} = \frac{I_{DA} \cdot (I_{DD} \cdot \text{Donnor SBT}) \cdot (I_{AA} \cdot \text{Acceptor SBT})}{3 I_{DD} \cdot I_{AA}}$$

3. JUSTIFICACIÓN

Las interacciones proteína-proteína (PPIs) resultan de gran interés para entender mejor la capacidad de cada proteína tipo HOX para reconocer sus respectivos genes blanco y con ello desarrollar diferentes estructuras a lo largo del eje anteroposterior (AP). A través del tiempo, se ha descrito un modelo de cooperación entre las proteínas tipo HOX y otras proteínas, como los cofactores u otros factores de transcripción general (GTFs) para reconocer, interactuar y modular específicos genes blanco. Sin embargo, las interacciones diméricas no resultan suficientes para comprender el amplio panorama que abarca la paradoja HOX. De modo que se postuló la capacidad que pueden tener las proteínas para formar complejos proteicos y regular su actividad efectora, tal es el caso del primer complejo trimérico estudiado en *Drosophila melanogaster*: Hth-Exd-HOX. Recientemente nuestro equipo de trabajo ha estudiado el complejo trimérico: Antennapedia-TBP con la proteína TFIIE β mediante la técnica de BiFC acoplado a FRET. Sin embargo, surge la incógnita si los niveles de transferencia de energía resultan similares si intercambiamos el arreglo conformacional y modificamos alguno de los sitios de interacción entre dos proteínas del trímero. Esto nos permitiría ahondar más en la dinámica de las PPIs de Antennapedia y con ello poder estudiar si el arreglo conformacional pudiera influir en la funcionalidad o interacción a los sitios blanco. Asimismo, para concebir esto se pretende modificar tanto el método de análisis previamente utilizado por uno que en literatura ha sido reportado como de los más eficientes: el método de normalización de FRET (N_{FRET}); así como también, el par de proteínas fluorescentes hacia mCerulean y Venus, los cuales acorde en literatura son considerados los segundos más eficientes para evaluar la transferencia de energía FRET. Todo ello con la finalidad de implementar un nuevo método de estudio de FRET en el laboratorio, compararlo con los resultados previamente obtenidos y mejorar el enfoque de estudio para posteriores ensayos en diferentes condiciones como ensayos *in vivo*.

4. HIPÓTESIS

El dímero de Antp-TFIIE β forma un complejo trimérico con la proteína de unión a caja TATA (TBP).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Determinar la formación de un diferente arreglo conformacional trimérico entre el complejo Antp-TFIIE β y la proteína de unión a caja TATA (TBP) en cultivo celular, mediante BiFC/N_{FRET}.

5.2 Objetivos específicos.

1. Establecer la interacción del dímero Antp-TFIIE β con TBP en células HEK293, mediante el método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}).
2. Validar la formación del complejo trimérico en células HEK293, utilizando clonas mutagénicas que disrumpan la interacción entre las proteínas Antp-TFIIE β -TBP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Establecimiento de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con TBP en células HEK293, mediante el método de normalización de FRET acoplado a BiFC(BiFC/N_{FRET})

Para determinar la formación del complejo trimérico entre Antp-TFIIE β y dTBP se realizó un acoplamiento de la técnica de BiFC con el método de normalización de FRET (BiFC/N_{FRET}). Este ensayo consistió en disrumpir la proteína fluorescente Venus en dos dominios: VC-terminal y VN-terminal, cada una acoplado a una proteína de interés, esperando a que interactuarán y se reconstituiera la fluorescencia verde de Venus, en este sentido se utilizó VC-fusionado a Antp y VN-fusionado a TFIIE β . Al mismo tiempo, se utilizó a mCerulean fusionado a dTBP. Una vez, co-transfectados se tomaron fotografías en el microscopio confocal en tres canales de detección (I_{DD}, I_{AA} e I_{DA}) previamente mencionados. Con ellas, se evaluó la disminución de intensidad de fluorescencia de la proteína donadora (mCerulean) dado a la transferencia de energía no radioactiva hacia la proteína aceptora (Venus) y para su cuantificación se utilizó el algoritmo PixFRET diseñado por Feige *et al.*, 2005, que se encuentra como una herramienta de uso libre dentro del programa ImageJ.

6.1.1 Propagación de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-N1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP para los ensayos de co-transfección

Se obtuvieron los plásmidos de la plasmidoteca en nuestro laboratorio, los cuales fueron construidos previamente por nuestro equipo de trabajo. Los plásmidos utilizados para este objetivo fueron pCS2VC155Antp, pCS2VNm9TFIIE β , pCS2VNm9TBP, pCerulean-N1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP. Una vez obtenidos, se realizó la transformación por choque térmico utilizando bacterias *Escherichia coli* TOPO10 Ca²⁺-competentes (Ca⁺⁺). Para esto, se mezcló 1 μ L de cada plásmido individualmente en tubos eppendorf y 70 μ L de bacterias calcio-competentes, y cada tubo se mantuvo a 42°C en baño María durante 1 min. y después se incubaron en hielo por 10 min. Posteriormente, se añadió 200 μ L de medio LB estéril a cada tubo y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 40 min. Luego, se inocularon los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TBP, pCS2VNm9-

TFIIE β en placas de agar LB adicionado con ampicilina; y los plásmidos pCer-N1-dTBP y pCer-N1-TFIIE β en placas de agar LB adicionado con kanamicina. Todas las placas se incubaron por 18 h a 37°C.

6.1.2 Extracción del ADN plasmídico mediante lisis alcalina

En las placas que si hubo crecimiento, se seleccionó una de las colonias blanquecinas por punción y se inoculó en tubos de ensayo con medio LB y el antibiótico correspondiente. Se incubaron por 18 h a 37°C. Después, en los tubos de ensayo que presentan turbidez (debido al crecimiento bacteriano) se tomaron 1.5 mL del medio y se depositaron en tubos eppendorf, cada plásmido en diferente tubo, los cuales se centrifugaron a 13.5 rpm por 5 min. Luego, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 150 μ L de la solución 1 o de resuspensión (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM y RNasa A de Invitrogen). Se homogeneizó la mezcla, se añadió 200 μ L de la solución 2 o de lisis (NaOH 2 N y SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó por 10 min. en hielo. Posteriormente, se añadió 150 μ L de la solución 3 o neutralizante (Acetato de potasio 3 M) y se incubó durante 10 min. en hielo. Una vez concluido esto, se centrifugaron los tubos eppendorf a 13 rpm x 5 min., el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, se mezcló con 600 μ L de isopropanol y se incubó al menos por 10 min. a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 13 rpm x 10 min., se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet celular con 300 μ L de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 13 rpm x 10 min., se retiró el etanol 70% y se dejó secar el pellet celular para adicionar 25 μ L de agua destilada. El ADN plasmídico obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en una absorbancia entre 260 y 280 nm utilizando el equipo NanoDrop modelo ND-1000. Finalmente, se almacenaron a -20°C.

6.1.3 Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP

Los plásmidos previamente obtenidos se caracterizaron mediante PCR punto final, utilizando diferentes oligonucleótidos (obtenidos de la oligoteca del laboratorio) para cada plásmido. Para el plásmido pCS2VC155-Antp, se utilizaron los oligonucleótidos VCAntpFwd y AntpRevNheI. Para pCS2VNm9-TFIIE β se utilizaron VNFwdSpeI y TFIIE β NotI. En cuestión a pCS2VNm9-hTBP se emplearon VNFwdSpeI y TBPRevHindIII. Mientras que para pCerulean-N1-TFIIE β se usaron TFIIE β FwdXhoI y CerTFIIE β RevNotI. Finalmente

se caracterizó el plásmido pCerulean-N1-dTBP mediante digestiones enzimáticas utilizando los sitios de restricción *Bgl*III, *Apa*I y *Pvu*II.

6.1.4 Realización de los ensayos de co-transfección de los plásmidos en células HEK293

Los ensayos de co-transfección para la realización de la técnica BiFC/N_{FRET} se llevaron a cabo en la línea celular HEK293 (línea celular inmortalizada de riñón embrionario humano). El mantenimiento del cultivo celular se realizó bajo los lineamientos establecidos por la ATCC. El cultivo celular se mantuvo en cajas de cultivo tamaño chico (Thermofisher 25cm²) en medio DMEM (SIGMA, Saint Louis, Missouri USA) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO, Carlsbad, CA. USA). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera controlada y humidificada con 5% de CO₂. El pase de células se realizaba cada 5 días o cuando se consiguiera una confluencia cercana al 90%. Se desechaba el medio de cultivo DMEM en la caja de cultivo celular, se añadía 1.5 mL de tripsina 1x y se dejaba en incubación a 37°C por 5 min. Las células se despegaron del fondo de la caja y se recuperó el volumen de tripsina en un tubo estéril (Thermofisher 15 mL). Los tubos se centrifugaban a 1,500 rpm por 5 min. Se desechaba el sobrenadante y se resuspendía el pellet celular en 1 mL del medio DMEM + 10% SFB. Finalmente, se hicieron los cálculos para devolver a una nueva caja estéril una confluencia de 1×10^5 células por mL, considerando 5 mL como volumen final.

Las células que no son devueltas a la caja de cultivo se utilizaron para realizar los ensayos de co-transfección. Para esto, se sembraron 1×10^5 células por mL en cada pozo de una placa de 6 pozos estéril y se incubaron por 48 h hasta que alcanzaron una confluencia mayor al 70%. Después, se retiró el medio y se adicionó nuevo DMEM + 10% SFB para realizar la co-transfección por triplicado de cada conformación. Para esto, se prepararon los plásmidos entubos eppendorf individualmente, considerando una concentración final de 6×10^3 ng de ADN. Por lo que, se depositaron 2×10^3 ng de cada ADN plasmídico que conforman los arreglos conformacionales del trímero, como se muestra en la Figura 13. Se utilizó como control positivo del complejo trimérico los plásmidos para pCS2VC155Antp, pCS2VNm9TBP y pCerulean-N1-TFIIE β y paralelamente el nuevo arreglo conformacional utilizando los plásmidos pCS2VC155Antp, pCS2VNm9TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP. En cada tubo eppendorf se depositó una solución de NaCl 150 mM, considerando un volumen

final de 200 μL por pozo (V_{Final} de 600 μL por triplicado). Finalmente, se adicionó la solución de polietilenimina (PEI 15 mM de 25 kDa; (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL USA) en proporción de 1:2, es decir, por cada 1×10^3 ng de ADN se colocaron 2 μL de PEI (15 mM). Una vez preparadas las soluciones de transfección, se depositaron 200 μL por goteo suave sobre cada pozo y se dejó en incubación durante 48 h a 37°C y 5% de CO_2 .

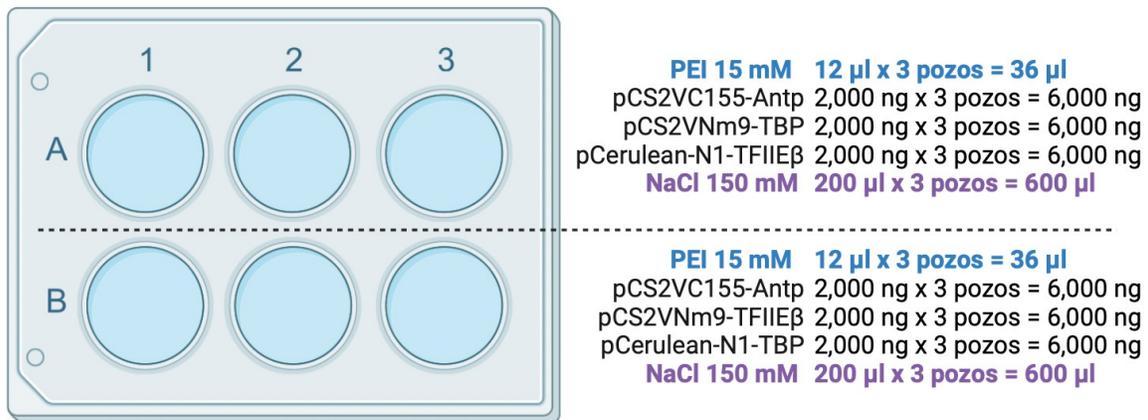


Figura 13. Esquema del proceso de co-transfección y su distribución de los complejos triméricos en placa de 6 pozos. En una placa de 6 pozos estéril se sembraron 2×10^5 células HEK293 en cada pozo. A. Se co-transfectó en cada pozo los plásmidos pCS2VC155-Antp (2,000 ng), pCS2VNm9-TBP (2,000 ng) y p-Cerulean-N1-TFIIIE β (2,000 ng), con 200 μL de NaCl 150 mM y 12 μL de PEI 15 mM, esto se realizó por triplicado. B. Se co-transfectó en cada pozo los plásmidos pCS2VC155-Antp (2,000 ng), pCS2VNm9-TFIIIE β (2,000 ng) y p-Cerulean-N1-dTBP (2,000 ng), con 200 μL de NaCl 150 mM y 12 μL de PEI 15 mM, esto se realizó por triplicado.

6.1.5 Evaluación de la interacción trimérica de Antp-TFIIIE β -TBP, a través del nivel de transferencia de energía no radioactiva mediante BiFC/N_{FRET}

El análisis de la interacción trimérica se llevó a cabo mediante la técnica BiFC/N_{FRET}, en donde se cuantificó el nivel de transferencia de energía no radioactiva de mCerulean fusionada a dTBP hacia Venus (una vez que se reconstituyera la fluorescencia en verde) fusionada al dímero Antp-TFIIIE β . Las células se observaron en el microscopio confocal láser multifotón (FV-100) Olympus y se utilizaron los láseres 405 y 473. Las células se fotografiaron a 512 píxeles (20 μm /píxel) en modo espectral (variable acorde a las condiciones de cada imagen) cada 5 nm con un ancho de 20 nm. Se delimitaron los siguientes parámetros 615 v de voltaje, 3x de ganancia y 0% de offset con 10% de potencia de láser.

Las imágenes se tomaron en la siguiente forma:

1. **Canal de donador (I_{DD}).** Las células se excitaron en el rango de longitud para mCerulean (láser 405) y se detectó en el rango de longitud de emisión para mCerulean (455-555 nm).
2. **Canal del aceptor (I_{AA}).** Las células se excitaron en el rango de longitud para Venus (láser 473) y se detectó en el rango de longitud de emisión para Venus (515-615 nm).
3. **Canal de transferencia (I_{DA}).** Las células se excitaron en el rango de longitud para mCerulean (láser 405) y se detectó en el rango de longitud de emisión para Venus (515-615 nm).

Todas las imágenes se utilizaron para desarrollar el método N_{FRET} mediante el plugin PixFRET.

6.1.6 Obtención de las imágenes FRET y los valores de N_{FRET} mediante el plugin PixFRET en el software Fiji.

Cada compendio de 24 imágenes que se tomaron individualmente para cada muestra se obtuvo una imagen promedio de la intensidad de fluorescencia, utilizando el software Fiji. Para esto se abrieron cada uno de los archivos y se siguió este orden **Images > Stacks > Z project > Average > OK**; la imagen obtenida se guardó con el formato .tiff y así se realizó con todos los archivos. Una vez que se obtuvieron las fotografías, se procedió a seguir el procedimiento descrito por Feige *et al.*, (2005).

Primero, se crearon stacks de dos imágenes para calcular el sangrado espectral del donador y aceptor, en donde se siguió el orden de selección **Images > Stacks > Images to stack**.

- a) **Para el análisis del sangrado espectral (Donador SBT).** Se utilizaron células a las que únicamente se les transfeció el plásmido p-Cerulean-N1-dTBP y se seleccionaron las fotografías en el canal I_{DA} e I_{DD} .
- b) **Para el análisis del sangrado espectral (Aceptor SBT).** Se utilizaron células a las que únicamente se les transfeció el dímero fusionado a los dominios C y N - terminal de Venus y se seleccionaron las fotografías en el canal I_{DA} e I_{AA} .

En cada apartado se seleccionó una o varias regiones de interés (ROIs) que delimitaron el fondo donde no se encuentran células que florezcan para estimar el ruido de fondo. Posteriormente, se aceptó el valor y se seleccionó ahora otras regiones de interés (ROIs) donde se incluya las células que florecen, se seleccionó la tendencia que sigue el donador o

aceptor (constante) y se aceptó. Con estos datos, se utilizaron para calcular el factor de corrección respectivamente.

Una vez que se delimitaron los factores de corrección, se procedió a realizar el análisis de la transferencia de energía N_{FRET} en las muestras de interés. Para ello se creó un stack de tres imágenes:

- c) **FRET stack.** Se utilizaron células a las que se co-transfectaron los tres plásmidos para el complejo trimérico con la proteína normal o con las proteínas mutantes y se seleccionaron las fotografías en el canal I_{DA} , I_{DD} e I_{AA} .

Los factores de corrección ya deben estar establecidos, se mantiene la corrección Gaussiana en 2.0 y solo el Treshold varió dependiendo a nuestras muestras. Se seleccionaron varias regiones de interés (ROIs) para considerar el ruido de fondo cada muestra. Se seleccionó la opción FRET/sqrt(Donor*Aceptor) para obtener las imágenes de N_{FRET} . En la penúltima imagen (N_{FRET}) se seleccionó con un recuadro toda la imagen, se ajustó el treshold que considere a las células de interés y se procedió a obtener las mediciones: Analyze > Measure. El valor obtenido en otra pestaña nos indica el valor N_{FRET} en porcentaje del 0 al 100.

6.2. Validación del complejo trimérico Antp-TFII β -TBP en células HEK293, utilizando clonas mutagénicas que disrumpan la interacción entre las proteínas

Para validar la interacción del complejo trimérico se evaluó el nivel de transferencia de energía no radioactiva mediante BiFC/ N_{FRET} y siguiendo una metodología bastante similar a como se describió anteriormente, con la diferencia de utilizar ahora las clonas mutagénicas en el dominio VC: pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A}, pCS2VC155-Antp Δ HD. Estas rompen la interacción entre Antp y TBP, las últimas dos clonas entre Antp-TFII β .

6.2.1 Obtención y caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A}, pCS2VC155-Antp Δ HD para los ensayos de co-transfección

Se utilizaron los plásmidos previamente construidos en el laboratorio y almacenados en nuestra plasmidoteca, los cuales son pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A} y pCS2VC155-Antp Δ HD. Una vez obtenidos, se transformaron mediante choque térmico utilizando las bacterias *E. coli* TOPO10 Ca²⁺-competentes como se describió anteriormente,

y después se obtendrá el ADN plasmídico por lisis alcalina, siguiendo el protocolo que previamente se describió.

6.2.2 Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155Antp^{H32A-I36A} y pCS2VC155-AntpΔHD

Los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A}, pCS2VC155-AntpΔHD se caracterizaron mediante PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos VCAnpFwd y AntpRev*NheI*. Una vez que se confirmó la identidad de los plásmidos, se procedió a utilizarla estrategia experimental para los ensayos de co-transfección mencionada anteriormente, salvo que en esta cuestión se intercambié la proteína normal pCS2V155-Antp por sus respectivas clonas mutagénicas.

7. RESULTADOS

7.1. Establecimiento de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con TBP en células HEK293, mediante el método de normalización de FRET acoplado a BiFC(BiFC/N_{FRET})

Para determinar la interacción en un distinto arreglo conformacional, se intercambió el orden de interacción al que previamente se trabajó en nuestro equipo. En este sentido, se utilizó como par BiFC a las proteínas Antp-TFIIE β fusionadas a los dominios C y N-terminal de Venus respectivamente, las cuales se unen irreversiblemente entre sí; y en este mismo contexto se adicionó a mCerulean fusionada a dTBP. Por lo tanto, se cuantificó la transferencia de energía no radioactiva entre mCerulean y Venus mediante la técnica de N_{FRET} a través de un acercamiento de tres canales, con la intención de evaluar la interacción trimérica entre estas proteínas. En estos ensayos, se utilizó paralelamente el plásmido C5V1 el cual presenta fusionadas la proteína mCerulean y Venus con un linker de 5 de aminoácidos que en otros experimentos se maneja como un control positivo de transferencia FRET.

7.1.1. Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-Antp, pCS2VNm9-TFIIE β , pCS2VNm9-hTBP, pCerulean-N1-TFIIE β y pCerulean-N1-dTBP

La caracterización de los plásmidos se llevó a cabo mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos, que previamente fueron reportados, o mediante restricción enzimática. El plásmido pCS2VC155-Antp se caracterizó utilizando los oligonucleótidos VCAntp*Fwd* y AntpRev*NheI*, los cuales hibridan en la región entre el dominio C-terminal de Venus y la proteína Antp. El templado se reveló mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%), en donde se obtuvo el fragmento 1438 pb tal como se observa en el carril 6 de la Figura 14B. Para el plásmido pCS2VNm9-TFIIE β se utilizaron los oligonucleótidos VNFwd*SpeI* y TFIIE β *NotI* y mediante el cual se obtuvo un templado de 1347 pb, como se observa en el carril 3 de la Figura 14A. Para el plásmido pCS2VNm9-hTBP se utilizaron los oligonucleótidos VNFwd*SpeI* y TBPRev*HindIII* con los que se obtuvo una banda de 1506 pb como se observa en el carril 4 de la Figura 14A. En el plásmido p-Cerulean-N1-TFIIE β se usaron los oligonucleótidos TFIIE β *FwdXhoI* y CerTFIIE β *RevNotI* y mediante los cuales se obtuvo un templado de 1617 pb como se observa en el carril 2 de la Figura 14A.

Por otro lado, el plásmido p-Cerulean-N1-dTBP se caracterizó por digestión enzimática como se observa en la Figura 14C. En el primer carril se obtuvieron las bandas 4746 y 1053, que resultaron de la digestión con *Bgl*II; en el segundo carril se obtuvieron las bandas 5320 y 479 pb, que resultaron de la digestión con *Ap*I; y en el tercer carril se tienen las bandas 5191 y 608 pb.

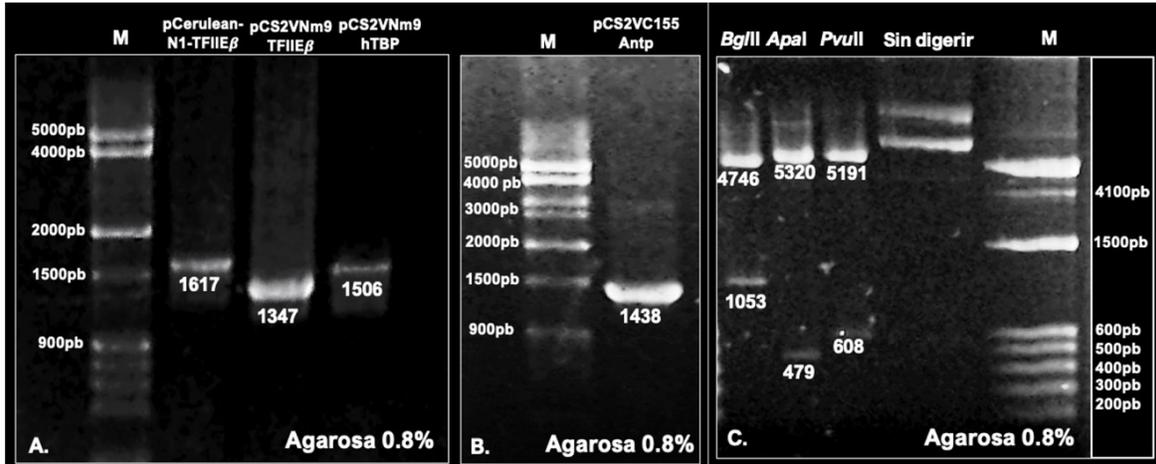


Figura 14. Caracterización molecular de los plásmidos pCS2VC155Antp, pCS2VNm9TBP, pCS2VNm9TFII β y pCerulean-N1-TFII β por PCR; y el plásmido pCerulean-N1-dTBP mediante enzimas de restricción. A. El gel de agarosa muestra las amplificaciones obtenidas al realizar la PCR punto final de los plásmidos pCerulean-N1-TFII β (segundo carril), pCSVNm9-TFII β (tercer carril) y pCS2VNm9hTBP (cuarto carril). B. Se muestra el amplicón obtenido para el plásmido pCS2VC155Antp (segundo carril). C. Se observa la caracterización del plásmido pCerulean-N1-dTBP por enzimas de restricción digerido con *Bgl*II (primer carril), *Ap*I (segundo carril) y *Pvu*II (tercer carril).

7.1.2. Establecimiento de un control positivo de transferencia de energía no radioactiva para la normalización de FRET

El plásmido C5V1 expresa simultáneamente las proteínas mCerulean y Venus debido a la fusión mediante un linker de cinco aminoácidos entre ellas dos (Figura 15^a). C5V1 representa una proximidad bastante cercana entre las dos proteínas fluorescentes, por lo tanto, en otras investigaciones se utiliza como un estándar de altos niveles de transferencia de energía no radioactiva en diferentes ensayos FRET. Asimismo, en nuestra investigación nos permitió obtener un valor de referencia asociado a niveles positivos de transferencia de energía no radioactiva que utilizamos como comparativo en nuestros ensayos posteriores de N_{FRET} . Para esto, se tomaron las fotografías bajo el microscopio confocal láser multifotón (FV-100) Olympus utilizando los láseres 405 y 473 en modo espectral cada 5 nm con un ancho de 20 nm y posteriormente se separaron en los tres canales: I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} . En la primera

columna de la Figura 15 se observa la fluorescencia celeste del plásmido en las células bajo las condiciones de excitación (láser 405) y emisión (455-555 nm) de mCerulean, en la segunda columna se visualiza las células fluoresciendo de color verde bajo las condiciones de excitación (láser 473) y emisión (515 – 615 nm) de Venus. En la tercera columna se observa la imagen N_{FRET} obtenida al introducir el stack de tres imágenes (en canal I_{DA} , I_{DD} , I_{AA}) en el plugin PixFRET, siguiendo la estrategia que se describió previamente. A partir de la cual se cuantificó un nivel de $26.13\% \pm 4.88$ y que en la imagen se puede ver que las regiones color violeta demuestran el menor grado de transferencia de energía, mientras que entre más anaranjado sea mayor será el nivel de transferencia de energía no radioactiva. Con esto, se estableció un valor de control positivo para determinar en qué escenarios sucede una interacción proteína-proteína al tener valores similares o superiores de N_{FRET} .

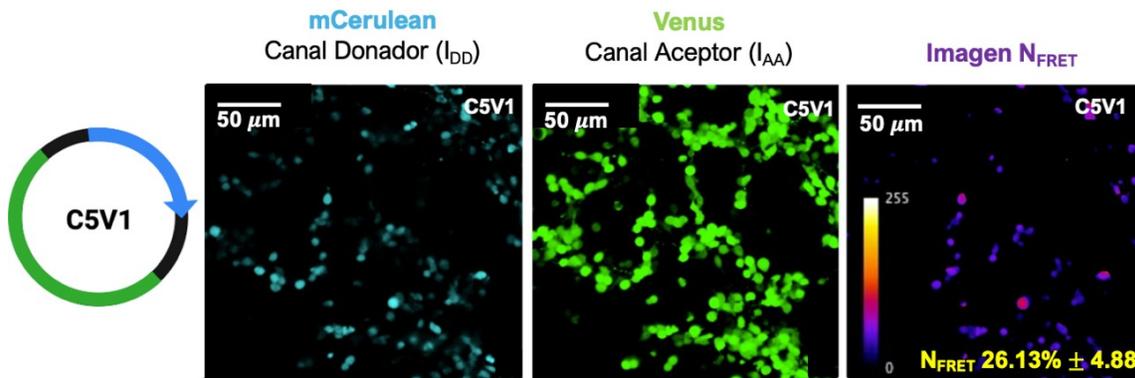


Figura 15. Cuantificación del nivel de transferencia de energía no radioactiva del plásmido C5V1 mediante el método N_{FRET} . El plásmido C5V1 tiene las proteínas mCerulean (celeste) y Venus (verde) fusionadas por un linker de cinco aminoácidos. La primera columna es la visualización de la fluorescencia celeste de las células excitadas (láser 405) y emitidas (455 – 555 nm) en el rango de mCerulean. La segunda columna es la observación de la fluorescencia verde de las células excitadas (láser 473) y emitidas (515 – 615 nm) en el rango de Venus. La tercera columna es la imagen N_{FRET} obtenida con el plugin PixFRET en la que el color violeta representa un bajo nivel de transferencia de energía y entre más anaranjado sea el color mayor será el nivel de transferencia.

7.1.3. Interacción trimérica del nuevo arreglo conformacional Antp-TFIIE β con TBP usando un método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/ N_{FRET})

El análisis de un nuevo arreglo conformacional se realizó mediante un intercambio en el orden de interacción, de modo que como dímero BiFC se utilizó a VCantp-VNTFIIE β y se adicionó la proteína dTBP fusionado a mCerulean (Figura 16B). Previamente, se había analizado por Jiménez-Mejía (2018) en donde se utilizó VCantp-VNTBP como dímero BiFC y el plásmido TFIIE β fusionado a ECFP. Por lo tanto, se evaluó paralelamente ambos arreglos conformacionales con un distinto método de FRET: el método de normalización de

FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}). Se realizó para analizar si existe una diferencia significativa en el nivel de transferencia de energía no radioactiva al intercambiar el orden de interacción y la proteína fluorescente que funciona como donadora esto con la finalidad de comparar.

Los resultados obtenidos demuestran que el nivel de transferencia de energía no radioactiva entre ambos arreglos conformacionales es superior al obtenido por C5V1, por lo tanto se confirma que existe una interacción entre dichas proteínas. Por un lado, el dímero BiFC Antp-TBP interactúa con la proteína TFIIE β (Figura 16^a) logrando un complejo trimérico que promueve un nivel de transferencia de energía $40.35\% \pm 12.55$. Por otro lado, se observó que el dímero BiFC Antp-TFIIE β interactúa con la proteína dTBP (Figura 16B) y exhibe un nivel de transferencia de energía significativamente superior de $57.18\% \pm 6.69$. En este sentido, se comprueba que sucede el establecimiento de un complejo trimérico sin importar el orden de interacción al analizarlo con un método distinto (BiFC/N_{FRET}) por PixFRET. Sin embargo, si se exhibe una diferencia significativa entre los niveles de transferencia de energía no radioactiva al intercambiar por un distinto orden de interacción (el dímero Antp- TFIIE β interactúa con dTBP).

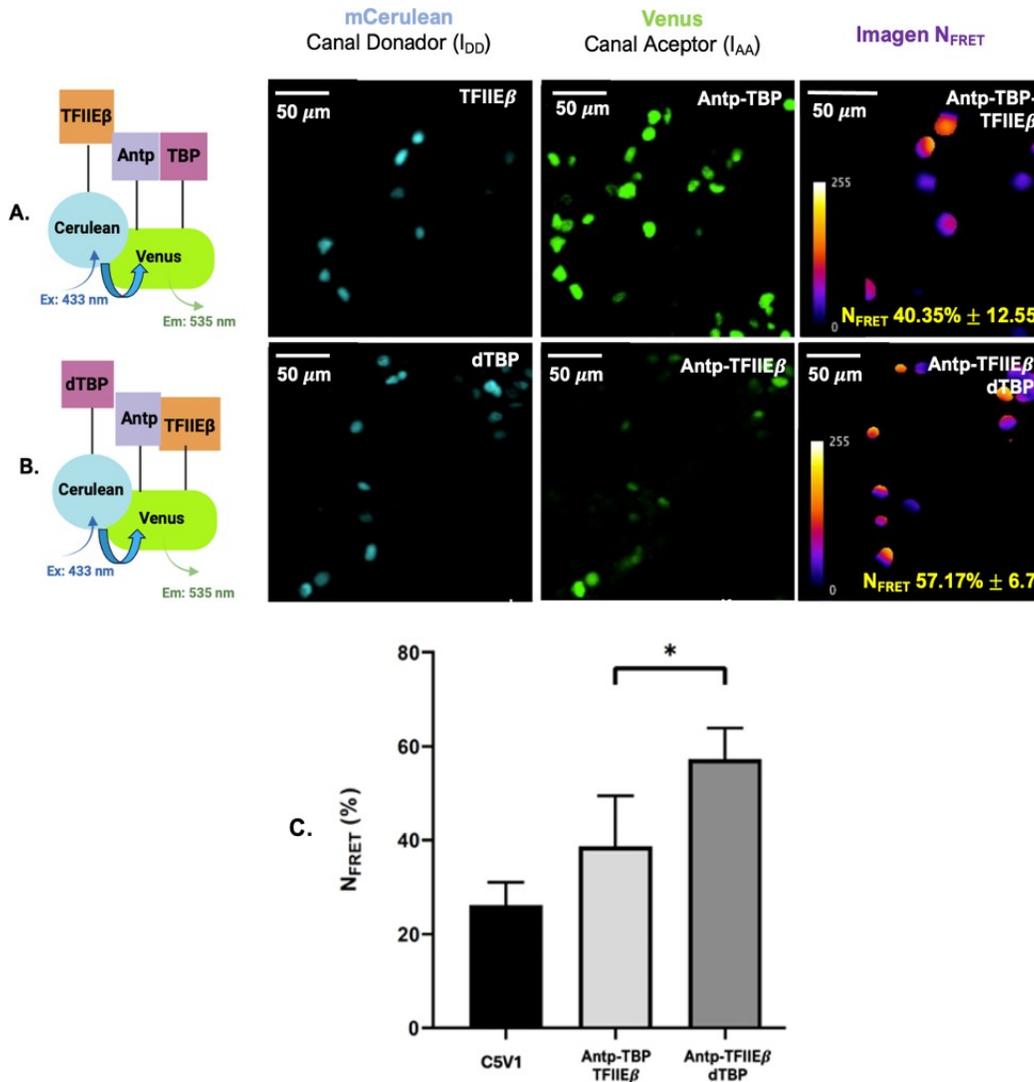


Figura 16. Interacción trimérica del dímero Antp-TFIIβ con la proteína dTBP mediante un método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}) a través de PixFRET. A. Se evaluó el nivel de transferencia de energía del arreglo conformacional entre el dímero Antp-TBP con la proteína TFIIβ. B. Se evaluó el nivel de transferencia de energía del nuevo arreglo conformacional entre el dímero Antp-TFIIβ con la proteína dTBP. La primera columna es la visualización de la fluorescencia celeste de las células excitadas (láser 405) y emitidas (455 – 555 nm) en el rango de mCerulean. La segunda columna es la observación de la fluorescencia verde de las células excitadas (láser 473) y emitidas (515 – 615 nm) en el rango de Venus. La tercera columna es la imagen N_{FRET} obtenida con el plugin PixFRET en las que el color violeta representa un bajo nivel de transferencia de energía y entre más anaranjado sea el color mayor será el nivel de transferencia. C. Los ensayos de co-transfección se realizaron por triplicado y se graficó la media \pm desviación estándar, a partir de los cuáles se analizó mediante un prueba t-student considerando un $\alpha=0.05$. (*) = 0.04.

7.2. Validación de la formación del complejo trimérico en células HEK293, utilizando clonas mutagénicas que disrumpan la interacción entre las proteínas Antp-TFIIE β - TBP

Con la finalidad de confirmar el ensamblaje trimérico entre el dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP se utilizaron clonas mutagénicas que interrumpen la interacción entre Antennapedia con dTBP (pCS2VC155-AntpHD) y entre Antennapedia con TFIIE β (pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A} y pCS2VC155-Antp Δ HD). Asimismo, la ruptura entre dos proteínas que constituyen el complejo proteico nos confiere información acerca de la dinámica en la integridad del ensamblaje trimérico.

7.2.1. Caracterización de los plásmidos pCS2VC155-AntpHD, pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A}, pCS2VC155-Antp Δ HD mediante PCR punto final

La caracterización de las clonas mutagénicas de Antennapedia se llevó a cabo mediante PCR punto final utilizando los oligonucleótidos VCAntp Fwd y AntpRev $NheI$. El plásmido pCS2VC155-AntpHD tiene deletada la región rica en glutaminas por lo que exhibe un amplicón de 650 pb en el carril 4 de la Figura 17A. El plásmido pCS2VC155-Antp^{H32A-I36A} tiene una modificación en los residuos 32 y 36 de la segunda alfa-hélice por lo que exhibe una banda de 1438 pb en el carril 3 de la Figura 17A. El plásmido pCS2VC155-Antp Δ HD no cuenta con el homeodominio y expone un amplicón de 801 pb en el carril 2 de la figura 17B.

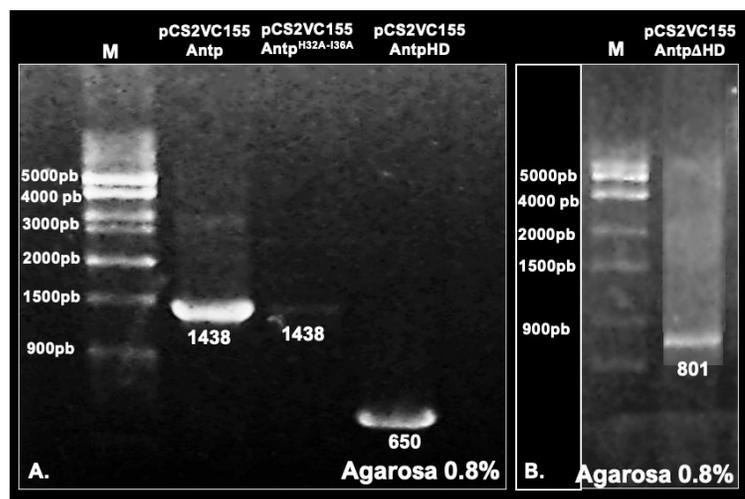


Figura 17. Caracterización molecular mediante PCR punto final de las variantes mutagénicas de Antp.

A. El gel de agarosa muestra las amplificaciones obtenidas al realizar la PCR punto final de los plásmidos pCS2VC155Antp (segundo carril), pCS2VC155AntpH32A-I36A (tercer carril) y pCS2VC155AntpHD (cuarto carril). B. Se muestra el amplicón obtenido para el plásmido pCS2VC155Antp Δ HD (segundo carril).

7.2.2. Validación de la interacción del dímero Antp-TFIIE β con dTBP mediante el uso de mutantes de Antp y BiFC/N_{FRET}

Para validar la interacción trimérica del nuevo arreglo conformacional del dímero Antp- TFIIE β con la proteína dTBP se utilizaron mutantes de Antp que interrumpen su interacción con TFIIE β (Antp^{H32A-I36A} y Antp Δ HD) o con dTBP (AntpHD). Al utilizar diferentes clones mutagénicos de Antennapedia se observa que el nivel de transferencia de energía disminuye significativamente al ensamblarse el complejo trimérico con respecto al complejo trimérico en el que Antennapedia no se encuentra mutada. El nivel de transferencia de energía no radioactiva obtenido con la mutante AntpHD disminuye significativamente a 29.22% \pm 7.49 (Figura 18B). Por otro lado, el nivel N_{FRET} al usar la variante Antp^{H32A-I36A} disminuye a 30.72% \pm 6.7 (Figura 18C). Finalmente, al trabajar con el plásmido Antp Δ HD se redujo el nivel N_{FRET} hacia 32.8 \pm 7.5 (Figura 18D). Es importante destacar que la reducción significativa del valor N_{FRET} al trabajar con variantes mutagénicas de Antp con respecto a la proteína normal nos permite confirmar que si sucede el ensamblaje del complejo trimérico.

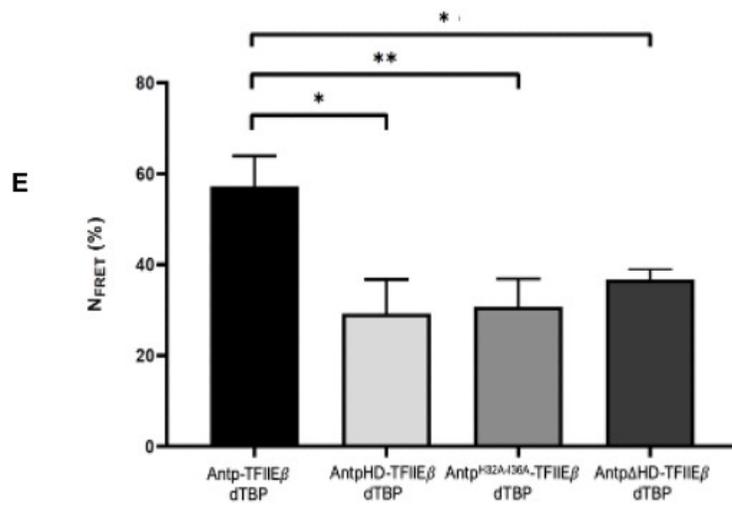
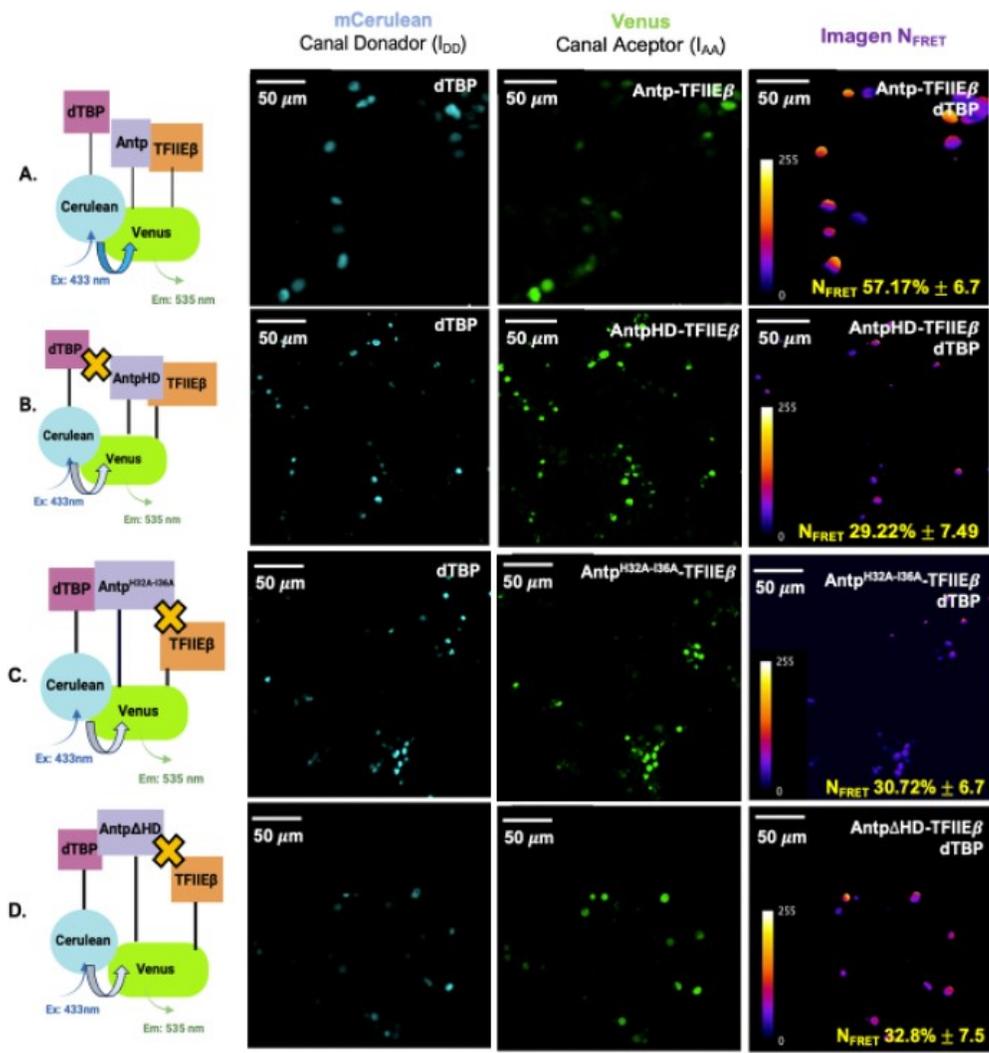


Figura 18. Validación en la interacción del dímero Ant-TFII β con la proteína dTBP mediante BiFC/N_{FRET} al utilizar variantes mutagénicas. A. Se evaluó el nivel de transferencia de energía del nuevo arreglo conformacional entre el dímero Antp-TFII β con la proteína dTBP. B. Se midió el nivel N_{FRET} al utilizar la variante AntpHD. C. Se utilizó la variante Antp^{H32A-I36A} para medir el nivel N_{FRET}. D. Se trabajó con la mutante Antp Δ HD para evaluar el nivel N_{FRET}. La primera columna es la visualización de la fluorescencia celeste de las células excitadas (láser 405) y emitidas (455 – 555 nm) en el rango de mCerulean. La segunda columna es la observación de la fluorescencia verde de las células excitadas (láser 473) y emitidas (515 – 615 nm) en el rango de Venus. La tercera columna es la imagen N_{FRET} obtenida con el plugin PixFRET en las que el color violeta representa un bajo nivel de transferencia de energía y entre más anaranjado sea el color mayor será el nivel de transferencia. E. Los ensayos de co-transfección se realizaron por triplicado y se graficó la media \pm desviación estándar, a partir de los cuáles se analizó mediante un ANOVA de entrada simple, considerando un $\alpha=0.05$. (*) = 0.0182, (**)=0.0036

8. DISCUSIÓN

En esta tesis, se confirmó la interacción trimérica de un nuevo arreglo conformacional, en el que el dímero Antp-TFIIE β se une con la proteína dTBP en cultivo celular, y esta nueva información fue validada con variantes mutagénicas de Antp que disrumpen las interacciones dimericas con TFIIE β o TBP. Además, para el análisis de la interacción trimérica se implementó un nuevo método que consiste en la normalización de eficiencia de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}). En este sentido, se estableció un nuevo par FRET con las proteínas fluorescentes mCerulean-Venus ya que la proteína mCerulean exhibe un mayor grado de intensidad en comparación con ECFP. Nuestros resultados claramente indican que los complejos triméricos de Antp pueden establecerse en diferentes conformaciones organizacionales para la selección de los genes blanco.

Los resultados obtenidos mediante el método BiFC/N_{FRET} en el plugin PixFRET nos demostró la interacción entre el dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP y que este valor es significativamente superior al orden de interacción entre el dímero Antp-TBP con la proteína TFIIE β , que fue evaluado anteriormente por Jiménez-Mejía (2018). El valor superior de N_{FRET} pudiera estar correlacionado con un arreglo tridimensional diferente que promueve una mayor proximidad entre las proteínas fluorescentes mCerulean y Venus, como lo propone Coullomb *et al.*, (2020). En este sentido, se llega a inferir también que el orden de interacción pudiera influir sobre el arreglo tridimensional del complejo trimérico, esto quiere decir que probablemente el acomodo entre el dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP posicione a las proteínas fluorescentes más cerca una de la otra, en comparación con el otro orden de interacción (Antp-TBP con TFIIE β) y por lo que veamos un valor más alto de N_{FRET}. No obstante, sería necesario evaluar mediante una técnica de cristalografía para destacar estas diferencias puntuales. Además, es interesante encontrar valores significativamente diferentes entre dos órdenes de interacción diferentes entre los arreglos conformacionales ya que pudiera haber incluso una diferencia en la funcionalidad o la afinidad que exhibe Antp de unirse a sus genes blanco. Se ha observado que la afinidad de las proteínas tipo HOX puede ser mejorada o disminuida dependiendo de la proteína con la que colabore.

Al utilizar como nuevo método de análisis en nuestro equipo de trabajo, el método BiFC/ N_{FRET} requiere el establecimiento de un control positivo de referencia para el análisis de transferencia de energía no radioactiva para corroborar la interacción trimérica entre Antp-TFIIE β y dTBP. En el diseño estratégico para evaluar las interacciones proteína-proteína (PPIs), mediante cualquier enfoque de FRET, es importante seleccionar un par de proteínas fluorescentes que exhiban un fuerte sobre posicionamiento entre sus espectros de excitación y emisión, específicamente en donde el rango de emisión o detección de la proteína donadora sea traslapado sobre el rango de excitación del aceptor (Bajar *et al.*, 2016). El par más comúnmente utilizado en experimentos FRET es utilizando como donador las proteínas fluorescentes cian y como aceptor proteínas fluorescentes verdes o amarillas (Miyawaki, 2003; Sarkar *et al.*, 2009). Asimismo, es imperante considerar también la distancia entre las dos proteínas fluorescentes para transferir la mitad del nivel máximo de energía (R_0), porque esto influye en que tan accesible será la medición del FRET (Müller *et al.*, 2013). En este sentido, los valores R_0 oscilan entre el 1-6 , así que entre más cercano sea al 6 mayor será la eficiencia al momento de evaluarlo, y entre los pares FRET destacan mCerulean como donadora y Venus como aceptora dado al $R_0 \sim 5.4$. Por un lado, mCerulean exhibe una mejor resolución en la fluorescencia bajo el microscopio y un incremento tanto en el coeficiente de absorción como en el rendimiento cuántico (Rizzo *et al.*, 2006), mientras que Venus expone una mayor eficiencia en la maduración y una baja sensibilidad a condiciones del medio como pH (Day *et al.*, 2008). Es por todo esto que se decidió intercambiar a la proteína mCerulean como donadora y acoplarla al factor dTBP, mientras que Venus se mantiene como la proteína aceptora que fue acoplada al dímero BiFC Antp-TFIIE β .

Al haber seleccionado el par FRET adecuado, se seleccionó el método de normalización de FRET (N_{FRET}) para evaluar las interacciones triméricas. Como se mencionó, este método sigue un análisis tipo SE-FRET y se decidió realizarlo utilizando el algoritmo empleado por el plugin PixFRET dentro del software ImageJ, esto con la finalidad de cuantificar el sangrado espectral entre las proteínas fluorescentes para realizar las correcciones y aminorar las variaciones presentes entre las imágenes FRET (Hochreiter *et al.*, 2019). La ventaja de analizar mediante el método normalizado de FRET (N_{FRET}) a través de PixFRET, es el análisis desarrollado pixel por pixel de cada célula y en el que se busca descartar el ruido emitido del fondo, señales externas a la células y señales entrecruzadas (cross-talk) de las

proteínas fluorescentes entre los espectros de emisión (Xia & Liu, 2001). Además, de que los resultados obtenidos se considerarían valores más concisos que pudieran ser comparables entre repeticiones de diferentes células dentro de un mismo ensayo o repeticiones independientes, pero, manteniendo las mismas condiciones o parámetros en el microscopio (Shrestha *et al.*, 2015). Al implementar este nuevo método por primera vez en nuestro equipo de trabajo se dejó de lado el análisis simple de la eficiencia de FRET (E) y se requirió utilizar un control positivo para evaluar la transferencia de energía no radioactiva. En ese sentido, el plásmido C5V1 contiene fusionadas las proteínas mCerulean y Venus mediante un linker de cinco aminoácidos y acorde a Coullomb *et al.*, (2020) es un excelente evaluador para los niveles de transferencia FRET. En esta tesis, se señala que entre mayor sea la proximidad entre las dos proteínas fluorescentes mayor será el nivel de transferencia de energía, esto debido a que al utilizar plásmidos donde el linker de aminoácidos fuera mayor entre mCerulean y Venus bajaba el nivel FRET cuantificado. Por lo tanto, los niveles N_{FRET} obtenidos en esta tesis de 26.13% (fig. 15) nos sirven para comparar en que escenarios sucede la transferencia de energía, considerando un valor mayor a este porcentaje como positivo.

De manera experimental, se consiguieron cambios favorables en los resultados obtenidos debido a que PixFRET arroja imágenes con mayor delimitación del margen entre células y se puede distinguir ligeramente una región intracelular donde mayormente sucede la transferencia de energía de color anaranjado, cuestión que no se distinguía tanto con el plugin FRETYY. Otra de las ventajas analíticas otorgadas por PixFRET es que resulta suficiente realizar una sola vez el análisis del sangrado espectral de mCerulean y Venus considerando varias regiones de interés para conseguir una tendencia lineal o constante en la intensidad de fluorescencia de cada fluoróforo para ser utilizada como factor de corrección en los ensayos posteriores.

Los resultados obtenidos mediante el método N_{FRET} en el plugin PixFRET nos demostró la interacción trimérica entre el dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP. El valor obtenido con el nuevo arreglo conformacional ($57.17\% \pm 6.7$) es significativamente superior al evaluado previamente por Jiménez-Mejía (2018). Por lo tanto, se infiere que al momento de unirse irreversiblemente Antp con TFIIE β , este dímero se asocia tridimensionalmente con dTBP en una manera que posicione a las proteínas fluorescentes (mCerulean – Venus) más

cercanas una con la otra y de esta forma se vea un mayor nivel de N_{FRET} . Coullomb *et al.*, (2020) menciona que entre mayor sea la cercanía entre dos proteínas fluorescentes, mayor será el nivel de N_{FRET} que obtengamos. Asimismo, la asociación tridimensional pudiera estar mediando la orientación entre las proteínas a modo que mejore la transferencia de energía no radioactiva tipo FRET (Fujimoto *et al.*, 2022). No obstante, sería necesario evaluar mediante una técnica de cristalografía para corroborar estas características puntuales. Además, es interesante encontrar valores significativamente diferentes entre dos órdenes de interacción distintos entre los arreglos conformacionales ya que esto pudiera tener alguna implicación sobre la afinidad al reconocer su secuencia blanco. Es importante destacar que la actividad transcripcional de Antp es potenciada en un 200% al formarse este complejo trimérico, cuestión que no se observa cuando se encuentra como dímero o monómero (Hernández- Bautista, 2021). Entonces, el intercambio en el arreglo conformacional puede no modificar la actividad transcripcional propia de Antp, pero, si pudiera modular la afinidad en la que se une a un gen en específico. Esto debido a que se ha visto que dependiendo al factor al que se une la proteína HOX es como se modula la especificidad hacia una secuencia, lo que se conoce como especificidad latente (Zeiske *et al.*, 2018). O bien, pudiera suponer un enfoque diferente de mediar la maquinaria implicada en el complejo de preiniciación y que con ello modular en diferentes etapas la actividad transcripcional de su gen blanco. Por un lado, TBP promueve el reclutamiento de otros GTFs, mientras que el factor TFIIE se encarga de potenciar la actividad cinasa de TFIIH y facilita la activación de la ARN Polimerasa II (Okamoto *et al.*, 1998). Por lo que, el arreglo conformacional previo, en donde Antp se une inicialmente a TBP, pudiera estar modulando desde el reclutamiento y ensamblaje del PIC. Mientras que en nuestro arreglo conformacional, la interacción inicial de Antp con TFIIE β pudiera modular la actividad cinasa del factor TFIIH y activar así la ARN Polimerasa II para comenzar la transcripción de su gen blanco (Altamirano-Torres *et al.*, 2018). De igual forma, para poder comparar ello sería imperante realizar ensayos con los diferentes arreglos conformacionales para comparar el nivel de afinidad hacia otros genes blanco.

Además del control positivo del nuevo método BiFC/ N_{FRET} , también se validó la interacción trimérica mediante mutantes de Antp que impiden el ensamble del trímero al interferir las interacciones diméricas Antp-TBP (AntpHD) o Antp-TFIIE β (Antp^{H32A-I36A} o Antp Δ HD) confirmadas previamente por BiFC (Altamirano-Torres, 2014; Altamirano-Torres *et al.*,

2018; Cárdenas-Chávez, 2012). Los resultados obtenidos demuestran que al utilizar la mutante AntpHD disminuye a 29.22%, con la mutante Antp^{H32A-I36A} a 30.72% y con la mutante Antp Δ HD baja hasta 32.8%. Estos valores son significativamente menores al valor obtenido por N_{FRET} del complejo trimérico con la proteína normal. Sin embargo, esta disminución no llega a ser total o casi en su totalidad como se esperaría. Lo anterior, podría deberse a que el arreglo conformacional trimérico expuesto por este nuevo orden de interacción resulta ser más estable o más bien considerarse “más difícil de desensamblar” dado a la posibilidad que surjan otros sitios de interacción que sobrepasen la interrupción de la interacción entre Antp y alguno de los dos factores. Por ejemplo, pudiera inferirse que exista una interacción entre los factores de transcripción general TBP y TFIIE β ya que Maxon *et al.*, (1994) ha reportado que el factor transcripcional TFIIE se puede unir a través del dominio C-terminal de la proteína TBP. Por lo tanto, se piensa que si se rompe la interacción entre Antp – TBP o Antp – TFIIE β , son los dos factores TBP y TFIIE β los que mantienen la interacción dimerica y mantienen cercano a Antennapedia al unirse éste con el otro factor donde no se interviene su interacción. De esta forma, habría menor transferencia de energía dado a que no están interactuando las tres proteínas entre sí.

Asimismo, se piensa también que el modificar un sitio de interacción en Antennapedia no es suficiente para romper en su totalidad la interacción con otra proteína, y que se requiere modificar también el sitio de unión de la contraparte, es decir, utilizar dos proteínas mutadas en el dímero como lo hizo Montalvo-Méndez (2019) con el dímero AntpHD - TBP Δ Q80.

Por otro lado, se piensa que pudieran existir otros sitios de interacción de menor afinidad que se sobrepongan a la intervención en uno de los principales dominios de interacción. Esto se basa en que se ha reportado la existencia de pequeños péptidos, constituidos por entre tres y diez aminoácidos, que puedan interactuar transitoriamente y con una muy baja afinidad (entre 0.5 y 1 μm) con otras proteínas, los cuales se nombraron como motivos lineales cortos o SLiMs (Van Roey *et al.*, 2012). Los SLiMs se caracterizan por su plasticidad dado a que su funcionalidad estriba a una situación específica, es decir, que un SLiM esté presente o sea activado en una proteína pueda deberse a una mutación (Neduva & Russell, 2005). De acuerdo con Baëza *et al.*, (2015), se ha reportado que al deletar o modificar el homeodominio el hexapéptido se han mantenido las interacciones entre AbdA y otros factores de

transcripción dependiendo del contexto celular embrionario en que se analice la expresión, dando como sugerencia la presencia de otros sitios o SLiMs, como UbdA, que contribuyan a las PPIs. Por lo tanto, retomando nuestros resultados se pudiera inferir que al inducir una mutación en Antennapedia se generaría la activación de otro sitio de interacción, como los SLiMs, con menor afinidad pero que contribuya a mantener la interacción entre Antp-TBP o Antp-TFIIE β , por lo que pudiera explicar también esto que se vea una disminución tanto en la intensidad de fluorescencia del BiFC como una menor transferencia de energía FRET entre las proteínas dentro del arreglo conformacional tridimensional del trímero.

9. CONCLUSIONES

En la presente tesis se evaluó la interacción en un distinto arreglo conformacional, en el que se intercambiò el orden de interacción, a partir del cual el dímero Antp-TFIIE β (fusionado a Venus) se une con la proteína dTBP (fusionado a mCerulean). Esto se realizó en cultivo celular mediante un método de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/N_{FRET}), y con ello podemos concluir lo siguiente:

- Se implementó el método N_{FRET} para la cuantificación de transferencia de energía no radioactiva en cultivo celular, utilizando como control positivo el plásmido C5V1, en el que se encuentran fusionadas las proteínas mCerulean y Venus entre un linker de 5 aminoácidos.
- El dímero Antp-TFIIE β se une a la proteína dTBP, formando así un complejo trimérico con una nueva conformación que exhibe un valor N_{FRET} (57.17%) significativamente superior al arreglo conformacional evaluado anteriormente en nuestro equipo de trabajo.
- El complejo trimérico Antp-TFIIE β -dTBP se confirmó al utilizar variantes mutagénicas de Antp, obteniendo valores significativamente inferiores de 29.22%, 30.72% y 32.8% para los complejos AntpHD-TFIIE β -dTBP, Antp^{H32A-I36A}-TFIIE β -dTBP y Antp Δ HD-TFIIE β -dTBP, respectivamente.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos por cristalografía para determinar si existen algunas diferencias en el arreglo tridimensional al intercambiar los órdenes de interacción.
- Encontrar si existen otros sitios o motivos de unión dentro de la estructura de Antp.
- Demostrar si hay variaciones en la afinidad de interacción de Antennapedia al momento de presentar diferentes ordenes de interacción del complejo trimérico.
- Analizar la interacción del dímero Antp-TFIIE β con la proteína dTBP mediante la técnica de normalización de FRET acoplado a BiFC (BiFC/NFRET) en un organismo *in vivo*.
- Observar la funcionalidad del arreglo conformacional con este orden de interacción del proyecto en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.
- Determinar si al momento de utilizar una clona mutagénica afecta la funcionalidad del trímero en el desarrollo embrionario.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, M. K., & Kaufman, T. C. (1986). The relationship between the functional complexity and the molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics Society of America*.

Altamirano-Torres, C. (2014). *Interacciones moleculares proteína-proteína de Antp con el factor TFIIIE β a través de los residuos 32 y 36 del homeodominio*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Altamirano-Torres, C., Salinas-Hernández, J. E., Cárdenas-Chávez, D. L., Rodríguez-Padilla, C., & Reséndez-Pérez, D. (2018). Transcription factor TFIIIE β interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in *Drosophila*. *PLOS ONE*, *13*(10), e0205905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205905>

Avilés-Pagán, E. E., & Orr-Weaver, T. L. (2018). Activating embryonic development in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *84*, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.019>

Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M., & Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors*, *16*(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>

Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P., Peifer, M., Spierer, P., Lewis, E. B., & Hogness, D. (1983). Molecular Genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. *Science*, *221*.

Berney, C., & Danuser, G. (2003). FRET or No FRET: A Quantitative Comparison. *Biophysical Journal*, *84*(6), 3992–4010. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75126-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75126-1)

Bridoux, L., Gofflot, F., & Rezsóhazy, R. (2021). HOX Protein Activity Regulation by Cellular Localization. *Journal of Developmental Biology*, *9*(4), 56. <https://doi.org/10.3390/jdb9040056>

Buffry, A. D., & McGregor, A. P. (2022). Micromanagement of *Drosophila* Post-Embryonic Development by Hox Genes. *Journal of Developmental Biology*, *10*(1), 13. <https://doi.org/10.3390/jdb10010013>

Burglin, T. R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research*, *25*(21), 4173–4180. <https://doi.org/10.1093/nar/25.21.4173>

Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: An update. *Chromosoma*, 125(3), 497–521. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8>

Cárdenas-Chávez, D. (2012). *Interacciones moleculares de Antennapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Carroll, S. B., Laymon, R. A., McCutcheon, M. A., Riley, P. D., & Scott, M. P. (1986). The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* sp. Embryos. *Cell*, 47(1), 113–122. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90372-7)

Casares, F., & Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, 392(6677), 723–726. <https://doi.org/10.1038/33706>

Chambeyron, S., & Bickmore, W. A. (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the *HoxB* locus upon induction of transcription. *Genes & Development*, 18(10), 1119–1130. <https://doi.org/10.1101/gad.292104>

Chang, C.-W., Nashchekin, D., Wheatley, L., Irion, U., Dahlgard, K., Montague, T. G., Hall, J., & St. Johnston, D. (2011). Anterior–Posterior Axis Specification in *Drosophila* Oocytes: Identification of Novel *bicoid* and *oskar* mRNA Localization Factors. *Genetics*, 188(4), 883–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.129312>

Chen, H., Puhl, H. L., Koushik, S. V., Vogel, S. S., & Ikeda, S. R. (2006). Measurement of FRET Efficiency and Ratio of Donor to Acceptor Concentration in Living Cells. *Biophysical Journal*, 91(5), L39–L41. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.088773>

Chen, M., Qu, Y., Yue, P., & Yan, X. (2021). The Prognostic Value and Function of HOXB5 in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Genetics*, 12, 678368. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678368>

Chu, J., Zhang, Z., Zheng, Y., Yang, J., Qin, L., Lu, J., Huang, Z.-L., Zeng, S., & Luo, Q. (2009). A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.06.008>

Compe, E., Genes, C. M., Braun, C., Coin, F., & Egly, J.-M. (2019). TFIIIE orchestrates the recruitment of the TFIIH kinase module at promoter before release during transcription. *Nature Communications*, 10(1), 2084. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10131-1>

Coullomb, A., Bidan, C. M., Qian, C., Wehnekamp, F., Oddou, C., Albigès-Rizo, C., Lamb,

Don, C., & Dupont, A. (2020). QuanTI-FRET: A framework for quantitative FRET measurements in living cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 6504. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62924-w>

Day, R. N., Booker, C. F., & Periasamy, A. (2008). Characterization of an improved donor fluorescent protein for Förster resonance energy transfer microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *13*(3), 031203. <https://doi.org/10.1117/1.2939094>

Denell, R. E. (1973). Homeosis in *Drosophila* I. Complementation studies with revertants of Nasobemia. *Genetics*, *75*(2), 279–297. <https://doi.org/10.1093/genetics/75.2.279>

Denell, R. E., Hummels, K. R., Wakimoto, B. T., & Kaufman, T. C. (1981). Developmental studies of lethality associated with the Antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, *81*(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90346-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90346-8)

Feige, J. N., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B., & Gelman, L. (2005). PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microscopy Research and Technique*, *68*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1002/jemt.20215>

Feige, J., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B., & Gelman, L. (2005). *Pixel by Pixel analysis of sensitized-emission FRET with the ImageJ PixFRET plug-in.*

Fujimoto, K. J., Miyashita, T., Dewa, T., & Yanai, T. (2022). Determination of FRET orientation factor between artificial fluorophore and photosynthetic light-harvesting 2 complex (LH2). *Scientific Reports*, *12*(1), 15091. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19375-2>

Gheisari, E., Aakhte, M., & Müller, H.-A. J. (2020). Gastrulation in *Drosophila melanogaster*: Genetic control, cellular basis and biomechanics. *Mechanisms of Development*, *163*, 103629. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103629>

Gilbert, S. F. (2005). *Biología del Desarrollo* (7a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., & Herman, B. (1998). Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, *74*(5), 2702–2713. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77976-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77976-7)

Hajirnis, N., & Mishra, R. K. (2021). Homeotic Genes: Clustering, Modularity, and Diversity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 718308. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.718308>

Hernández-Bautista, C. (2021). *La actividad transcripcional de Antp es modulada por la formación de los complejos triméricos Antp-TBP con TFIIIE β , Exd y BIP2*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Herráez, Á. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética* (2da ed.). ElSevier.

Hochreiter, B., Kunze, M., Moser, B., & Schmid, J. A. (2019). Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells. *Scientific Reports*, 9(1), 8233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44650-0>

Hoppe, A., Christensen, K., & Swanson, J. A. (2002). Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Stoichiometry in Living Cells. *Biophysical Journal*, 83(6), 3652–3664. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75365-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75365-4)

Iimura, T., & Pourquié, O. (2007). Hox genes in time and space during vertebrate body formation: Hox genes and vertebrate body formation. *Development, Growth & Differentiation*, 49(4), 265–275. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00928.x>

Jimenez-Mejía, G. (2018). *Interacciones triméricas del complejo Antp-TBP con los factores TFIIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Jiménez-Mejía, G. (2022). *Los complejos triméricos de Antennapedia con la proteína de unión a caja TATA y el factor transcripcional TFIIIE β o Extradenticle regulan la actividad homeótica en D. melanogaster*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Kmita, M., & Duboule, D. (2003). Organizing Axes in Time and Space; 25 Years of Colinear Tinkering. *Science*, 301(5631), 331–333. <https://doi.org/10.1126/science.1085753>

Kodama, Y., & Hu, C.-D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 53(5), 285–298. <https://doi.org/10.2144/000113943>

Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A., & Halliday, H. L. (2006). HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms. *The Ulster Medical Journal*, 75(1), 23–31.

Lewis, E. B. (1994). Homeosis: The first 100 years. *Trends in Genetics*, 10(10), 341–343. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90117-1)

Lewis, E. B. (1998). The bithorax complex: The first fifty years. *International Journal of Developmental Biology*, 42, 403–415.

Maeda, R. K., & Karch, F. (2009). Chapter 1 The Bithorax Complex of *Drosophila*. En *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 88, pp. 1–33). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88001-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88001-0)

Maxon, M. E., Goodrich, J. A., & Tjian, R. (1994). *Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF: a model for promoter clearance.*

Miller, K. E., Kim, Y., Huh, W.-K., & Park, H.-O. (2015). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *Journal of Molecular Biology*, 427(11), 2039–2055. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.005>

Miyawaki, A. (2003). Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling. *Developmental Cell*, 4(3), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00060-1)

Montalvo-Méndez, R. (2019). *Diseción molecular de la interacción de TBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB mediante BiFC en la línea celular HEK293.* Universidad Autónoma de Nuevo León.

Monteiro, A. S., & Ferrier, D. E. K. (2006). Hox genes are not always Colinear. *International Journal of Biological Sciences*, 95–103. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.95>

Morata, G., & Garcia-Bellido, A. (1976). Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 179(2), 125–143. <https://doi.org/10.1007/BF00848298>

Morata, G., & Lawrence, P. (2022). An exciting period of *Drosophila* developmental biology: Of imaginal discs, clones, compartments, parasegments and homeotic genes. *Developmental Biology*, 484, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.01.008>

Müller, S. M., Galliardt, H., Schneider, J., Barisas, B. G., & Seidel, T. (2013). Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00413>

Neduvu, V., & Russell, R. B. (2005). Linear motifs: Evolutionary interaction switches. *FEBS Letters*, 579(15), 3342–3345. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.005>

Okamoto, T., Yamamoto, S., Watanabe, Y., Ohta, T., Hanaoka, F., Roeder, R. G., & Ohkuma, Y. (1998). Analysis of the Role of TFIIE in Transcriptional Regulation through Structure-Function Studies of the TFIIE β Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19866–

19876. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19866>

Pai, C.-Y., Kuo, T.-S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C.-T., Bessarab, D. A., Salzberg, A., & Sun, Y. H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, Extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila* sp. *Genes & Development*, *12*(3), 435–446. <https://doi.org/10.1101/gad.12.3.435>

Papageorgiou, S. (2011). Physical forces may cause *Hox* gene collinearity in the primary and secondary axes of the developing vertebrates. *Development, Growth & Differentiation*, *53*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01218.x>

Patel, A. B., Greber, B. J., & Nogales, E. (2020). Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. *Current Opinion in Structural Biology*, *61*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.10.001>

Patel, A. B., Louder, R. K., Greber, B. J., Grünberg, S., Luo, J., Fang, J., Liu, Y., Ranish, J., Hahn, S., & Nogales, E. (2018). Structure of human TFIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA. *Science*, *362*(6421), eaau8872. <https://doi.org/10.1126/science.aau8872>

Paul, R., Giraud, G., Domsch, K., Duffraisse, M., Marmigère, F., Khan, S., Vanderperre, S., Lohmann, I., Stoks, R., Shashidhara, L. S., & Merabet, S. (2021). Hox dosage contributes to flight appendage morphology in *Drosophila*. *Nature Communications*, *12*(1), 2892. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23293-8>

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. <https://doi.org/10.1101/gad.4.7.1209>

Plaza, S., Prince, F., Jaeger, J., Kloter, U., Flister, S., Benassayag, C., Cribbs, D., & Gehring, W. J. (2001). Molecular basis for the inhibition of *Drosophila* sp. Eye development by Antennapedia. *The EMBO Journal*, *20*(4), 802–811. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.802>

Porcelli, D., Fischer, B., Russell, S., & White, R. (2019). Chromatin accessibility plays a key role in selective targeting of Hox proteins. *Genome Biology*, *20*(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1721-4>

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

Randazzo, F. M., Seeger, M. A., Huss, C. A., Sweeney, M. A., Cecil, J. K., & Kaufman, T. C. (1993). Structural changes in the antennapedia complex of *Drosophila pseudoobscura*.

Genetics, 134(1), 319–330. <https://doi.org/10.1093/genetics/134.1.319>

Rauskolb, C., Peifer, M., & Wieschaus, E. (1993). Extradenticle, a Regulator of Homeotic Gene Activity, Is a Homolog of the Homeobox-Containing Human Proto-Oncogene Pbx1. *Cell*, 74, 1101–1112.

Rivas, M. L., Espinosa-Vázquez, J. M., Sambrani, N., Greig, S., Merabet, S., Graba, Y., & Castelli-Gair Hombria, J. (2013). Antagonism Versus Cooperativity with TALE Cofactors at the Base of the Functional Diversification of Hox Protein Function. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003252. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003252>

Rizzo, M. A., Springer, G., Segawa, K., Zipfel, W. R., & Piston, D. W. (2006). Optimization of Pairings and Detection Conditions for Measurement of FRET between Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Microscopy and Microanalysis*, 12(03), 238–254. <https://doi.org/10.1017/S1431927606060235>

Robertson, L. K., & Mahaffey, J. W. (2017). Insect Homeotic Complex Genes and Development, Lessons From Drosophila and Beyond ☆. En *Reference Module in Life Sciences* (p. B9780128096338040085). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.04008-5>

Rohs, R., West, S. M., Sosinsky, A., Liu, P., Mann, R. S., & Honig, B. (2009). The role of DNA shape in protein–DNA recognition. *Nature*, 461(7268), 1248–1253. <https://doi.org/10.1038/nature08473>

Sarkar, P., Koushik, S. V., Vogel, S. S., Gryczynski, I., & Gryczynski, Z. (2009). Photophysical properties of Cerulean and Venus fluorescent proteins. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3), 034047. <https://doi.org/10.1117/1.3156842>

Schier, A. C., & Taatjes, D. J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes & Development*, 34.

Schneuwly, S., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1987). Molecular analysis of the dominant homeotic, Antennapedia, phenotype. *The EMBO Journal*, 6(1), 201–206. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04739.x>

Scott, M. P., Weiner, A. J., Hazelrigg, T. I., Polisky, B. A., Pirrotta, V., Scalenghe, F., & Kaufman, T. C. (1983). The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila* sp. *Cell*, 35(3), 763–776. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90109-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90109-5)

Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2015). Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12),

6718–6756. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>

Slattery, M., Riley, T., Liu, P., Abe, N., Gomez-Alcala, P., Dror, I., Zhou, T., Rohs, R., Honig, B., Bussemaker, H. J., & Mann, R. S. (2011). Cofactor Binding Evokes Latent Differences in DNA Binding Specificity between Hox Proteins. *Cell*, 147(6), 1270–1282. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.053>

Van Roey, K., Gibson, T. J., & Davey, N. E. (2012). Motif switches: Decision-making in cell regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(3), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.03.004>

Vereb, G., & Rebenku, I. (2023, junio 16). Measuring FRET on samples with high or spatially varying autofluorescence and/or low (physiological) expression level? No need to fret anymore! [Springer Nature.Research Communities].*Protocols Methods*. <https://communities.springernature.com/posts/measuring-fret-on-samples-with-high-or-spatially-varying-autofluorescence-and-or-low-physiological-expression-level-no-need-to-fret-anymore>

Von Stetina, J. R., & Orr-Weaver, T. L. (2011). Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a005553–a005553. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005553>

Wakimoto, B. T., & Kaufman, T. C. (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the Antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 81(1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90347-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90347-X)

Wilson, D. S., & Desplan, C. (1999). Structural basis of Hox specificity. *Nature Structural Biology*, 6(4).

Xia, Z., & Liu, Y. (2001). Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes. *Biophysical Journal*, 81(4), 2395–2402. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75886-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75886-9)

Zal, T., & Gascoigne, N. R. J. (2004). Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells. *Biophysical Journal*, 86(6), 3923–3939. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.022087>

Zeiske, T., Baburajendran, N., Kaczynska, A., Brasch, J., Palmer, A. G., Shapiro, L., Honig, B., & Mann, R. S. (2018). Intrinsic DNA Shape Accounts for Affinity Differences between Hox-Cofactor Binding Sites. *Cell Reports*, 24(9), 2221–2230. <https://doi.org/>

