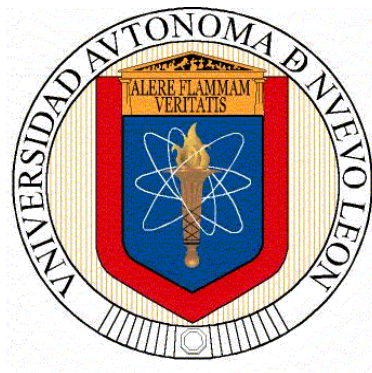


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**LOS COMPLEJOS TRIMÉRICOS DE ANTENNAPEDIA
Y ULTRABITHORAX CON LA PROTEÍNA DE UNIÓN
A CAJA TATA Y EXTRADENTICLE REGULAN LA
FUNCIÓN HOMEÓTICA DE ANTP EN *D. melanogaster***

POR

M.C. ALELY CECILIA VILLARREAL PUENTE

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

2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Los complejos triméricos de Antennapedia y Ultrabithorax con la proteína
de unión a caja TATA y Extradenticle regulan la función homeótica de
Antp en *D. melanogaster*

Por

M.C. Alely Cecilia Villarreal Puente

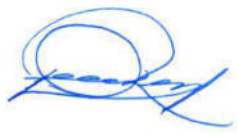
Como requisito parcial obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN
INMUNOBIOLOGIA

2025

Los complejos triméricos de Antennapedia y Ultrabithorax con la proteína de unión a caja TATA y Extradenticle regulan la función homeótica de Antp en *D. melanogaster*

Comité de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez
Presidente



Dr. Fermín Mar Aguilar
Secretario



Dra. Vianey González Villasana
Vocal



Dra. Jannet Edith Salinas Hernández
Vocal



Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Nieto
Subdirección de posgrado

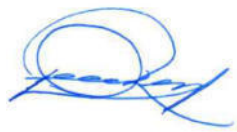


**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

Los complejos triméricos de Antennapedia y Ultrabithorax con la proteína de unión a caja TATA y Extradenticle regulan la función homeótica de Antp en *D. melanogaster*

Dirección de Tesis

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



Dra. Diana Reséndez Pérez

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT mediante el Proyecto Ciencia de Frontera #2280, así como por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT UANL, CN892-19 y 342-CN-2022.

LUGAR DE TRABAJO

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por dirigirme por tercera vez en la realización de una tesis, por permitirme formar parte de su laboratorio y por el apoyo tanto académico como profesional, siempre le estaré agradecida.

A mis compañeros y co-autores del artículo producto de esta tesis, Claudia, Rubén, Gustavo y Carolina, así como a Ale Arreola por su apoyo en la redacción del mismo; saben que ese artículo fue un trabajo en equipo, ¡gracias!

A los miembros de mi comité, Dr. Fermín, Dra. Vianey, Dra. Claudia y Dra. Jannet por sus observaciones y apoyo a lo largo de mi formación académica.

Al resto de mis compañeros de la Unidad de Biología del Desarrollo por su apoyo y amistad durante tantos años.

DEDICATORIA

A mi familia por siempre ser un impulso y un soporte. Por su paciencia y sus ánimos para continuar desarrollándome académica y profesionalmente, su apoyo es invaluable.

INDICE

LUGAR DE TRABAJO.....	6
AGRADECIMIENTOS	7
DEDICATORIA	8
INDICE DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1. RESUMEN	15
1.1 ABSTRACT	16
2. INTRODUCCIÓN	17
1. ANTECEDENTES	19
3.1 Genes Hox (organización y función) en <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3.2 Interacciones moleculares proteína-proteína.....	22
3.3 Interactoma de Antennapedia	23
3.4 Interacciones proteína-proteína	26
3.5 Interacciones triméricas.....	28
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
6.1 Objetivo general	35
6.2 Objetivos particulares.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 Estrategia general	36
7.2 Determinación de dominios clave del dímero Antp-Ubx en cultivo celular usando BiFC	37
7.2.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ H ₁ , Δ H ₁ -2, Δ H ₁ y pCS2VNm9Ubx	37
7.2.2 Preparación plasmídica de los vectores BiFC.....	37
7.3 Análisis de las interacciones triméricas del complejo Antp-Ubx-BIP2/TFIIE β /TBP/Exd en cultivo celular mediante FRET/BiFC	38
7.3.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx.....	39

7.3.2 Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP y pEFCP-N1- Exd.....	40
7.33 Preparación plasmídica de los vectores BiFC pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx y donadores pECFP-N1-TFIIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP.....	40
7.3.4 Determinación de las interacciones triméricas del complejo Antp-Ubx con los GTFs	40
7.4 Análisis funcional de las interacciones triméricas en la transformación homeótica torácica de <i>Drosophila melanogaster</i>	41
7.4.1 Esquema de cruas genéticas para la expresión tejido específica de las homeoproteínas Ubx, Antp y Exd así como el factor transcripcional TBP	41
7.4.2 Efecto de las interacciones triméricas de Antp y Ubx con los GTFs en las transformaciones homeóticas torácicas y antena-pata	42
6. RESULTADOS	45
8.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ HD, Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx.	45
8.2 Las hélices 1 y 2 del HD de Antp son requeridas en la interacción Antp-Ubx.....	46
8.3 Caracterización enzimática de los plásmidos aceptores pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx	47
8.4 Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-Exd y pEFCP-N1-dTBP.	47
.....	48
.....	48
8.5 El dímero Antp-Ubx forma trímeros con TBP y Exd	49
8.6 BIP2 y TFIIIE β no forman complejos triméricos con Antp-Ubx.....	51
8.7 Exd y TBP afectan la función ectópica de Antennapedia en la involución de la cabeza	53
8.8 El dímero Antp-Ubx y los trímeros Antp-Ubx/TBP/Exd afectan la función de Antp en la transformación antena-pata.....	56
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIONES.....	63
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. REFERENCIAS.....	65
ANEXO 1	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios en el ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .	20
Figura 2. Patrón de expresión de genes homeóticos en la mosca.	21
Figura 3. Estructura del homeodominio.	22
Figura 4. Los cofactores a los que se une una homeoproteína modulan su especificidad.	23
Figura 5. Interacciones de Antp analizadas en laboratorio.	25
Figura 6. Factores que interactúan con Antp.	26
Figura 7. La homeoproteína AbdA forma dímeros a través del HD.	26
Figura 8. Factores que interaccionan con Ubx.	27
Figura 9. Motivo UbdA localizado en Ubx y AbdA.	30
Figura 10. Antp y Ubx interactúan en embriones y discos imaginales <i>in vivo</i> por BiFC.	31
Figura 11. La mutante AntpHDE19G redujo el porcentaje de interacción de Antp-Ubx por BiFC.	32
Figura 12. Diagrama del principio de la combinación de las técnicas FRET y BiFC en el dímero Antp-Ubx y los GTFs.	39
Figura 13. Sistema binario UAS-GAL4.	41
Figura 14. Producción de la línea reportera UASVNUbx-UASVCAntp.	42
Figura 15. Generación de las líneas productoras o driver Nullo/Dll-GAL4;UASCFPGTFs.	42
Figura 16. Diagrama de cruce que dirija la expresión de VCAntp, VNUbx y CFP al embrión de <i>Drosophila</i> .	43
Figura 17. Protocolo de cruce genética para el análisis de cutículas embrionarias.	43
Figura 18. Esquema de cruce genética que permite la expresión de VCAntp, VNUbx y GTFs a discos imaginales en <i>Drosophila</i> .	44
Figura 19. Protocolo de cruce genética para el análisis de las transformaciones antena-pata.	44
Figura 20. Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ HD, Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx.	46
Figura 21. Las hélices 1 y 2 del HD de Antp son importantes en la interacción Antp-Ubx.	47
Figura 22. Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-Exd y pEFCP-N1-dTBP.	48
Figura 23. Detección del trímero Antp-Ubx/TBP usando BiFCFRET.	49
Figura 24. Exd forma complejos triméricos con Antp-Ubx.	51
Figura 25. BIP2 no interacciona de forma trimérica con Antp-Ubx mediante BiFC-FRET.	52
Figura 26. TFIIIE β no mostró transferencia de energía con el dímero Antp-Ubx.	53

Figura 27. El heterodímero Antp-Ubx afecto la función de Antp en la involución de las estructuras bucales y la cabeza.....	54
Figura 28. El trímero Antp-Ubx/TBP inhibe la función de Antp en la involución de la cabeza.....	55
Figura 29. El complejo Antp-Ubx/Exd afecta la función de Antp en las cabezas de las larvas.	56
Figura 30. La expresión ectópica de TBP de forma dímica y trimérica inhibe la transformación antena-pata.	57
Figura 31. Expresión ectópica de Exd en el dímero y trímero inhibe la transformación antena-pata.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

µg Microgramos
µl Microlitros
AbdA Abdominal A
AbdB Abdominal B
ANT-C Complejo Antennapedia
Antp Antennapedia
BiFC Fluorescencia por Complementacion por Bimolecular
BIP2 Proteina asociada a TBP (TAFII155)
BX-C Complejo bithorax
Dfd Deformed
Dll Distalless
DNA Ácido Desoxirribonucleico
ECFP Proteina fluorescente cyan
Exd Extradenticle
FRET Transferencia de energia por resonancia de Foster
GTFs Factores generales de la maquinaria transcripcional
HD Homeodominio
Hth Homothorax
Lab Labial
mg Miligramos
ml Mililitros
mM Milimolar
ng Nanogramos
Pb Probocipedia
pb Pares de bases
rpm Revoluciones por minuto
Scr Sex comb reduced
TBP Proteina de union a caja TATA
Ubx Ultrabithorax
VC Extremo C-Terminal de venus
VN Extremo N-Terminal de venus

1. RESUMEN

Las homeoproteínas especifican la identidad de los segmentos en el eje antero-posterior durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Esto lo hacen gracias a que codifican un Homeodominio (HD) conservado, que reconoce secuencias de nucleótidos muy similares y que se repiten constantemente en los diversos genomas, por lo que llevan a cabo interacciones proteína-proteína con complejos de regulación transcripcional para alcanzar su especificidad funcional. Por lo anterior es que presentan alta plasticidad en los interactomas Hox y es necesario entender dichas interacciones entre homeoproteínas y con otros factores transcripcionales que dirige el desarrollo de los organismos. En la presente tesis determinamos que Antp y Ubx establecen complejos triméricos con el factor transcripcional TBP así como con la homeoproteína Exd y su función homeótica en *Drosophila melanogaster*. La estrategia experimental permitió determinar la importancia de las hélices 1 y 2 presentes en el HD de Antennapedia en su interacción con Ubx usando un ensayo de Sistema de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC, por sus siglas en inglés) en cultivo celular. Posteriormente, se investigó la formación de los trímeros usando el sistema FRET basado en BiFC y su función en la involución de las estructuras bucales y cabeza en larvas, así como en la homeosis antena-pata en organismos adultos mediante cruza genéticas. Los resultados mostraron que la interacción molecular de Antennapedia con Ultrabithorax requiere la presencia de las hélices 1 y 2 del HD de Antennapedia. Así mismo se encontró la presencia de dos nuevos complejos triméricos: Antp-Ubx con TBP y la homeoproteína Exd. Para ello se utilizó BiFC-FRET, mientras que no se detectaron los trímeros Antp-Ubx con BIP2 y TFIIEB. Funcionalmente, los complejos triméricos redujeron el efecto homeótico de Antp en la involución de la cabeza, así como la transformación torácica en larvas, observando un mayor efecto en el trímero Antp-Ubx/Exd que en las interacciones con TBP. El efecto de estos complejos nuevos en la homeosis antena-pata en individuos adultos, mostró que la expresión de TBP y Exd en los trímeros rescataron el fenotipo al inhibir la transformación antena-pata. La detección de las dos nuevas interacciones triméricas de Antp-Ubx con TBP y Exd contribuyen a la comprensión de la función de las proteínas Hox en el complejo interactoma HOX.

1.1 ABSTRACT

Homeoproteins specify the identity of the segments along the antero-posterior axis through development on *Drosophila melanogaster*. They do it because codify a conserved Homeodomain (HD) that recognizes to very similar and constantly repeated nucleotide sequences on the diverse genomes, so they carry out protein-protein interactions with regulation transcriptional complexes to achieve their functional specificity. This is way they present high plasticity on the Hox interactomes and understand interactions between homeoproteins and with other transcriptional factors that drive development in the organisms is necessary. In this thesis, we determine that Antp and Ubx establish trimeric complexes with the transcriptional factor TBP and with the homeoprotein Exd, also their homeotic function in *Drosophila melanogaster*. The experimental strategy allowed us to determine the importance of 1 and 2 helixes of the AntpHD in its interaction with Ubx through the system Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) on cell culture. Subsequently, formation of trimers was investigated, using FRET system based on BiFC, and their function on head involution in larvae as well as in the antennae-leg transformation on adult flies through genetic crosses. The results showed that Antp-Ubx molecular interaction requires the helixes 1 and 2 of AntpHD presence. As well as the presence of two new trimeric complexes was found: Antp-Ubx with TBP and with the homeoprotein Exd. For this, BiFC-FRET system was used, although trimers with Bip2 and TFIIEB were not detected. Functionally, the trimeric complexes diminished the homeotic effect of Antp on head involution, as well as the thoracic transformation on larvae, observing a higher effect in Antp-Ubx/Exd trimer than the interactions with TBP. The effect of these new complexes on antenna-leg homeosis showed that TBP and Exd expression rescue the phenotype to inhibit antenna-leg transformation. The two new trimeric interactions, Antp-Ubx con TBP y Exd, help to understanding the protein Hox function on complex HOX interactome.

2. INTRODUCCIÓN

Los genes Hox son genes reguladores maestros cuyos productos proteicos funcionan como factores de transcripción, de esta manera regulan la expresión de genes indispensables en el desarrollo del eje antero-posterior de diversos organismos multicelulares. Estos genes cuentan con una secuencia muy conservada, la cual se denomina “caja homeótica” que traduce para un producto proteico de ~60-61 aminoácidos llamado “homeodominio” (HD), el cual consta de tres α -hélices y se une a una secuencia conservada (TAAT) en el ADN (Gehring *et al.*, 1994, Carnesecchi *et al.*, 2018). A pesar de ello, las homeoproteínas muestran alta especificidad regulando sus genes blanco (Mann *et al.*, 2009). Por ello, las homeoproteínas participan en interacciones proteína-proteína mediante el HD o bien, otros dominios proteicos, ya sea con más homeoproteínas, algunas de las cuales actúan de cofactores aumentando la afinidad y especificidad al unirse al ADN. Un ejemplo es la unión de Extradenticle (Exd) con Ubx, mediante el motivo UbdA, y Antp a través del YPWM, respectivamente, aumentando su afinidad al ADN en *D. melanogaster* (Merabet *et al.*, 2016). Antp también interacciona con BIP2 (también conocido como TAF_{II}155, TAF3 del factor TFIID en *Drosophila*) a través del motivo YPWM así como con TFIIE β mediante el HD y lo hace con TBP por la región de poliglutaminas (Altamirano-Torres *et al.*, 2018, Jiménez Mejía *et al.*, 2022). El interactoma de Ubx también ha sido analizado, mostrando la versatilidad de las proteínas con las que interacciona, como remodeladores de la cromatina, reguladores de la traducción, etc. (Carnesecchi *et al.*, 2020). Así mismo se ha concluido que Ubx interactúa con la maquinaria basal a través de su interacción con la ARN pol II mediante el residuo N51 del HD (Carnesecchi *et al.*, 2022). Se ha detectado también la formación de complejos triméricos *in vitro*, por ejemplo, se determinó que Abdominal B (AbdB) interactúa con el ADN junto con Exd y Homothorax (Hth) (Kannan *et al.*, 2010) y que Labial (Lab), Sex Comb Reduced (Scr), Antp, Ubx y Abdominal A (AbdA) forman dímeros con Exd, y de forma trimérica con Exd y Hth (Hudry *et al.*, 2012). En 2015 se concluyó que el complejo trimérico Ubx-Exd-Hth se une a determinadas secuencias en el ADN (Crocker *et al.*, 2015). Exd y Homothorax (Hth) interactúan con PBX-MEIS *in vitro*, y Antp establece complejos triméricos con el dímero TBP-TFIIE β y TBP-Exd, los

cuales modulan las funciones transcripcionales de Antp en cultivo celular. (Shanmugam *et al.*, 1999, Jiménez-Mejía., *et al* 2022). Previamente determinamos que la interacción Antp-Ubx se lleva a cabo por el HD de ambas homeoproteínas, específicamente mediante el residuo E19 de la hélice 1 del HD de Antp. En la presente tesis, se determinó que las hélices 1 y 2 de Antp son importantes en la interacción Antp-Ubx, y dicha interacción forma complejos triméricos de TBP y Exd, así como su papel en las transformaciones homeóticas y torácicas en *Drosophila melanogaster*. Nuestros resultados además de incrementar los interactomas de Antp y Ubx, aportan evidencia del dinamismo y la participación de los complejos formados por las homeoproteínas en la regulación funcional las proteínas Hox en el desarrollo.

3. ANTECEDENTES

3.1 Genes Hox (organización y función) en *Drosophila melanogaster*

William Bateson acuñó el término “homeosis” en 1894, para describir la transformación de una parte del cuerpo en otra estructura homóloga (Bateson, 1894). Posteriormente, mutaciones espontáneas en *Drosophila* permitieron trazar redes de genes importantes en el desarrollo del plan corporal, descubriendo así los genes homeóticos, cuyo nombre se debe al término “Homeosis” de Bateson (García-Bellido, 1977).

La mosca de la fruta posee importantes características, como un ciclo de vida corto (Figura 1), gran número descendientes, fácil cultivo en el laboratorio, etc, por lo que es considerado como un modelo en investigación básica y aplicada, así como en el área de genética.

El cuerpo de *Drosophila* se compone de segmentos, los cuales se establecen desde el embrión temprano, por lo que se pueden apreciar las células que pertenecerán a cada segmento desde este momento. Cada segmento se desarrolla específicamente tanto en las características externas como en las estructuras internas. (Weigmann *et al.*, 2003).

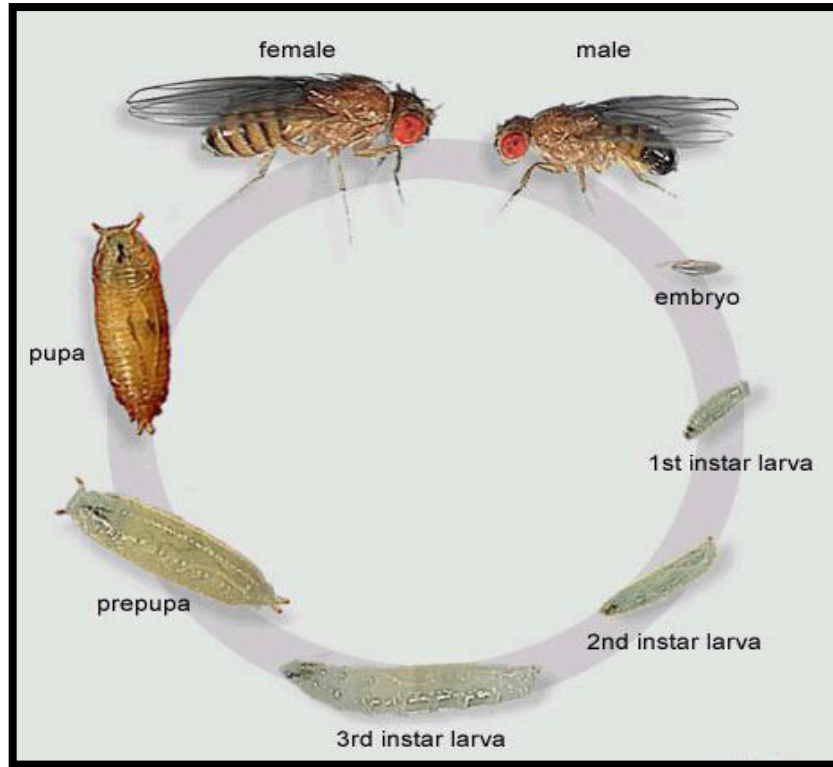


Figura 1. Estadios en el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. En la imagen se observa el ciclo de vida de *D. melanogaster*, este abarca de 10 a 12 días a temperatura ambiente 25°C y atraviesa varios estadios: embrión, estadios larvales 1, 2 y 3, prepupa, pupa (aquí se lleva a cabo la metamorfosis), para después eclosionar como organismo adulto. Tomado de Weigmann *et al.*, 2003

Los genes homeóticos (también llamados “Hox”) brindan la identidad a los ejes antero-posterior (*Drosophila*) y dorso-ventrales (vertebrados) determinando la forma del cuerpo, ya que se encargan de seleccionar entre las diferentes rutas de desarrollo; estas rutas modulan genes río abajo, por tanto, en cada segmento de la mosca, cierta proteína hox regula la activación de genes responsables de convertir las diversas señales que culminaran en la conformación de estructuras específicas del tejido en cuestión, llamados genes realizadores (García-Bellido, 1975).

La organización de los genes homeóticos en *Drosophila* es en 2 “clusters” o complejos ubicados en el tercer cromosoma. Labial (Lb), Proboscipedia (Pb), Deformed (Dfd), Sex combs reduced (Scr) y Antennapedia (Antp), son los genes que pertenecen al “Complejo Antennapedia” (ANT-C) y otorgan la forma a la cabeza, así como a los segmentos del tórax 1 y 2, mientras que desde el primer parasegmento y hasta el quinto, participan en el

desarrollo del sistema nervioso central (epidermis). El segundo complejo, “Complejo Bithorax” (BX-C), presenta a Ultrabithorax (Ubx), Abdominal-A (AbdA) y Abdominal-B (AbdB), estos encargados de especificar el abdomen, sistema nervioso central y epidermis en los parasegmentos del 5 al 14 y por lo tanto brindan la identidad al segmento torácico número 3 (Figura 2) (Lewis, 1978).

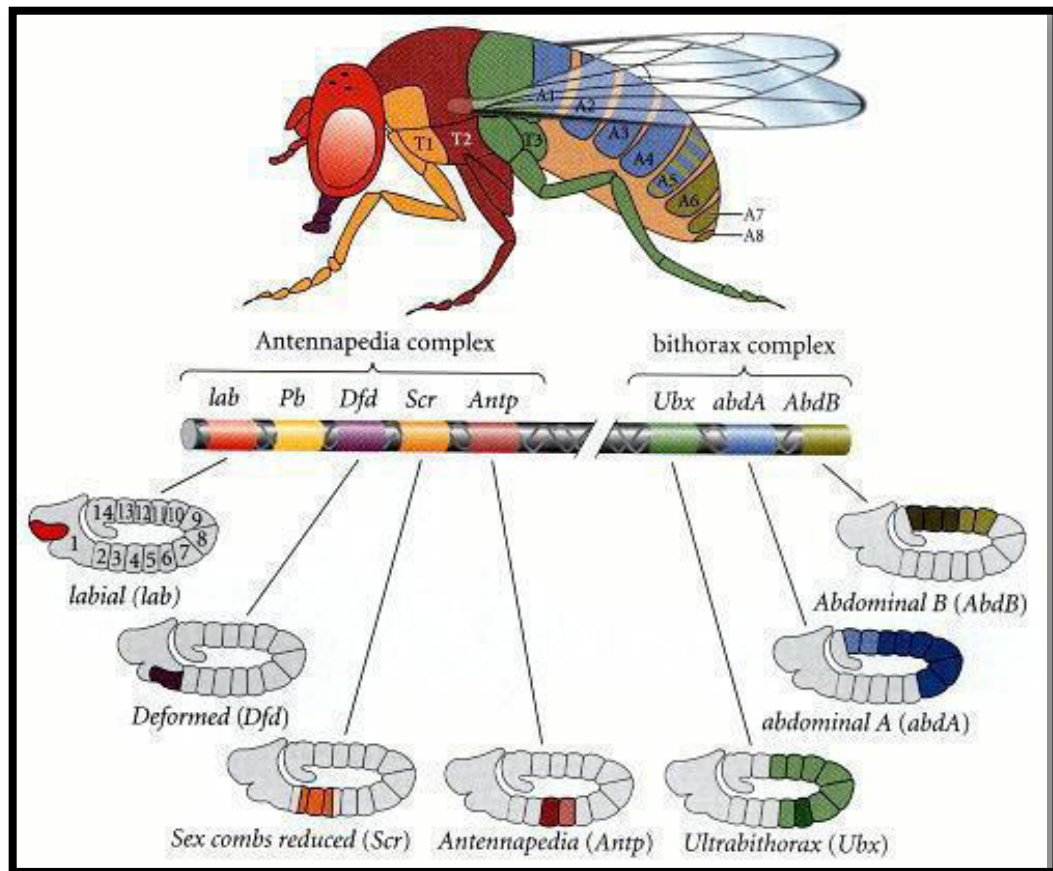


Figura 2. Patrón de expresión de genes homeóticos en la mosca. El esquema muestra las áreas de expresión de cada uno de los genes Hox en el embrión, ubicación, así como los apéndices a los que les brindan la identidad en el cuerpo adulto de la mosca. Tomado de Gilbert, 2003.

Los genes homeóticos constan de aproximadamente 180 pb de longitud, altamente conservados (homeobox o caja homeótica) y codifican una proteína de 60 aminoácidos (Homeodominio o HD) compuesto de 3 hélices alfa localizadas hacia el extremo Carboxilo terminal (C-terminal) además de una secuencia sin conformación particular ubicada el extremo Amino terminal (N-terminal) (Figura 3). La hélice de reconocimiento (tercer alfa hélice) se une a la hendidura mayor del ADN gracias a los aminoácidos Ile47,

Asn51, Gln50 y Met54 y por el residuo Arg5 que se localiza en el extremo amino del HD, se une al surco menor del ADN (Mann *et al.*, 2009).

Las homeoproteínas son factores de transcripción, ya que el homeobox se ha localizado en otras especies, en especial en vertebrados, por lo que el HD exhibe poca especificidad al ADN, ya que generalmente reconoce una secuencia con alto grado de distribución en el genoma (TAAT) (Figura 3) (Mann *et al.*, 2009). Por lo tanto, las homeoproteínas ayudan a controlar cómo y cuándo se activan o desactivan redes de genes, al unirse al ADN circunvecino y a otras proteínas (Gehring *et al.*, 1994).

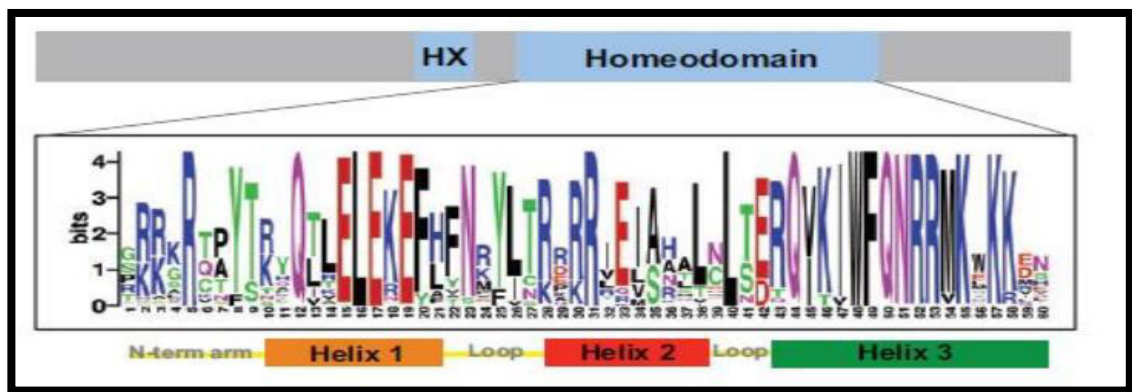


Figura 3. Estructura del homeodominio. En la imagen se observan los dominios de las homeoproteínas, estos son el tetrapéptido YPWM (HX en vertebrados) y el homeodominio (HD), codificado por la caja homeótica (homeobox) y formado por tres hélices alfa. Tomado de Rezsóhazy *et al.*, 2015

3.2 Interacciones moleculares proteína-proteína

La homeoproteínas están altamente conservadas y por lo tanto se unen a secuencias consenso en el ADN sin alcanzar su especificidad (Scott *et al.*, 1989; Bobola *et al.*, 2017).

Se ha descrito que el contexto de la cromatina determina que sitios reconocerán las homeoproteínas, ya que cuando los nucleosomas están altamente compactados, por lo general no se establecen interacciones ADN-homeoproteína, concluyendo que muchos factores transcripcionales reconocen cromatina relajada, destacando así el rol que juega en la especificidad, el estado de la cromatina (Li & Reinberg, 2011; Wunderlich & Mirny, 2009).

Además del contexto de la cromatina, es importante mencionar que una homeoproteína puede reconocer al ADN por sí sola o bien, en conjunto, reclutando proteínas (cofactores) que les permiten unirse a diferentes secuencias de las que podría unirse una sola homeoproteína. Por lo anterior, el tipo celular o bien el tejido influyen en la afinidad de las homeoproteínas, ya que depende de esto, qué factores estarán presentes y por lo tanto de las interacciones que establezcan entre sí y con el dímero proteína Hox-cofactor. La incorporación de cofactores depende de su unión al ADN o bien de la interacción entre proteínas (Figura 4). (Mann *et al.*, 2009, Jolma *et al.*, 2015).

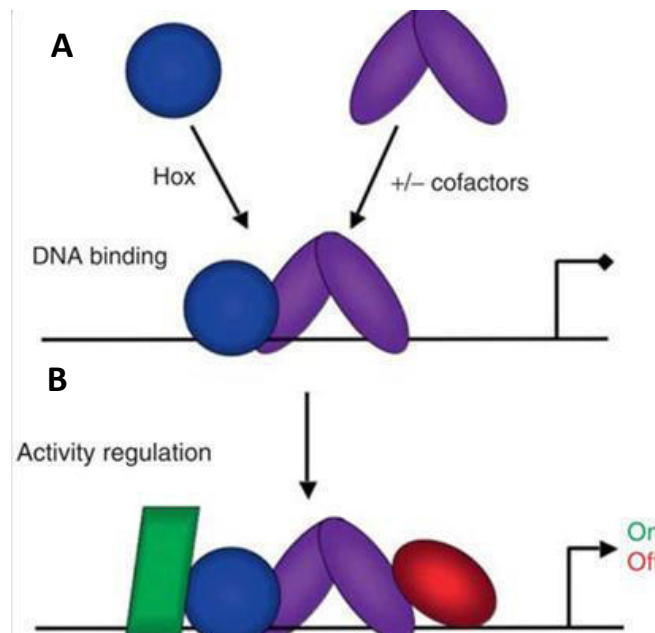


Figura 4. Los cofactores a los que se une una homeoproteína modulan su especificidad. A) Las homeoproteínas pueden reconocer al ADN individualmente o en grupos, al interaccionar con cofactores. B) La formación de complejos multiméricos modula la regulación transcripcional. Tomado de Mann *et al.*, 2009

3.3 Interactoma de Antennapedia

La interacción entre Antp y TBP fue la primera evidencia de contacto de una proteína Hox con factores pertenecientes a la maquinaria de transcripción basal (Emili *et al.*, 1994). Un par de años más tarde, se detectó la interacción de Antp con la subunidad β del factor TFIIE (Zhu y Kuziora, 1996) así como la interacción entre Antp y BIP2 *in vivo*, importante en una transformación homeótica: la de ojo por ala. (Prince *et al.*, 2008).

Jimenez-Mejía y colaboradores llevaron a cabo la disección de la interacción Antp-TBP en el 2022, mostrando que las regiones poly Q de ambas proteínas juegan un rol importante; mientras que BIP2 interacciona mediante el tetrapéptido YPWM con Antp (Cárdenas-Chávez, 2012) y con TFIIE β por el HD de Antp, exactamente los aminoácidos 32 y 36 de la hélice 2 participan en dicha interacción (Altamirano-Torres, 2016).

Otras interacciones entre homeoproteínas se han determinado, por ejemplo, la interacción entre Antennapedia y Eyeless (Eye), para la cual se analizó el motivo TLELEKEF ubicado en la hélice 1 de Antp y se introdujeron mutaciones al azar para evaluar si se veía afectada la capacidad de Antp de reprimir genes blanco. Las mutantes que fueron menos eficientes en esto se seleccionaron como candidatas en mediar interacciones proteína-proteína. Tal fue el caso de la mutante E19G, posición aminoacídica ubicada en la hélice 1 de Antp, la cual fue analizada en la interacción con Eye (Plaza *et al.*, 2008), demostrando jugar un papel importante en dicha interacción y abriendo la posibilidad de que esta posición participará en más interacciones como se observó posteriormente por Papadoupulos (2011) quien determinó que la homeoproteína Scr forma dímeros y que lo hace a través de sus HDs, específicamente a través del aa no. 19 de la hélice 1. Como se ejemplifica en la Figura 5, en la interacción Antp-Scr también participó el aa no. 19 de ambas homeoproteínas (Elizondo-Rodríguez, 2016). Otra interacción dímica es la interacción entre Antp y AbdB en la cual participa el HD de Antp (Cárdenas-Chávez, 2012).

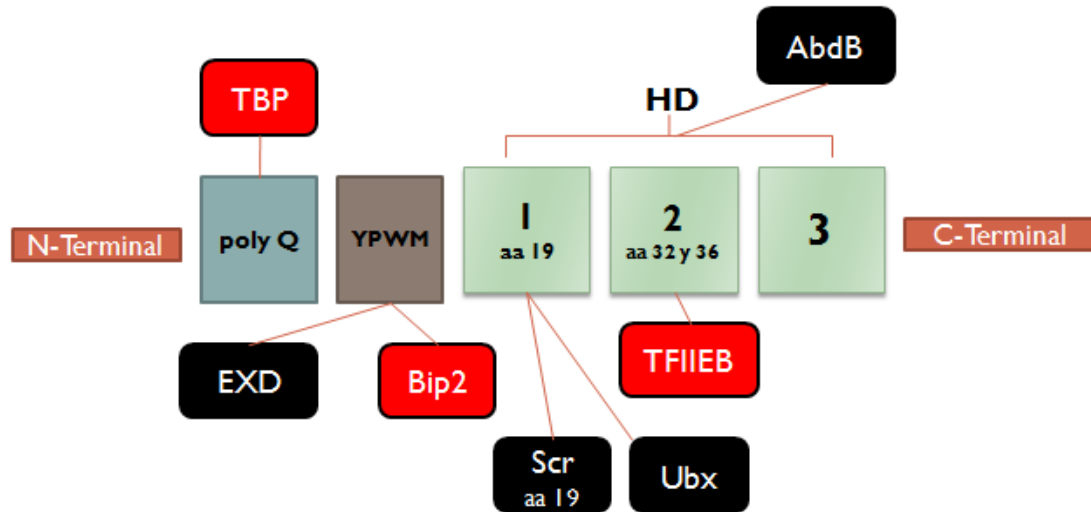


Figura 5. Interacciones de Antp analizadas en laboratorio. El diagrama muestra las interacciones de Antp con los GTFs y homeoproteínas, mostrando que TBP interacciona vía las regiones poly Q, mientras que Exd y BIP2 lo hacen a través del tetrapéptido YPWM. AbdA por su parte interacciona a través del HD, así como Scr y Ubx específicamente mediante el residuo 19 de Antp. Se observa que los residuos 32 y 36 localizados en la hélice 2 del Homeodominio de Antp participan en esta interacción.

Baeza y colaboradores han enriquecido el interactoma de Antp, analizando la importancia del motivo YPWM, ya que la versión wt de Antp se unió a 18 factores de los 35 analizados, entre los cuales destaca TFIIE β (Figura 6A). Cuando se mutó el motivo YPWM (Antp^{HX}) se observaron en las interacciones establecidas ya que algunas permanecieron, mientras que otras se detectaron de novo o se potenciaron e inclusive unas cuantas disminuyeron o no pudieron detectarse más, como se observa en la Figura 6B (Baeza *et al.*, 2015).

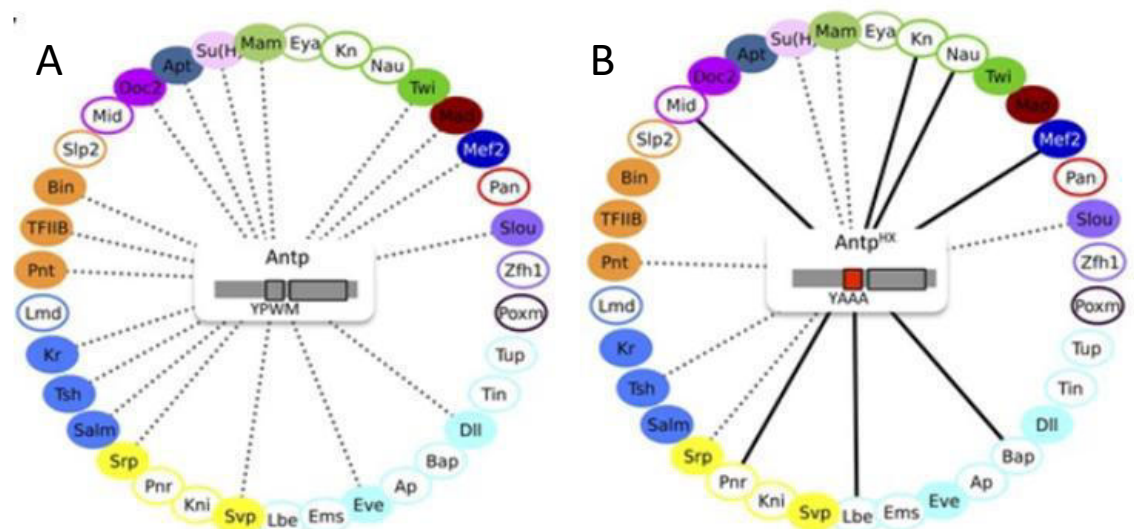


Figura 6. Factores que interactúan con Antp. El esquema ejemplifica las interacciones establecidas por Antp wt; de los 35 factores analizados, se muestra en línea punteada con cuales hubo interacción. B) Al mutar el tetrapéptido (YAAA) el patrón de interacciones se vio afectado, esto es, algunas interacciones se mantuvieron (línea punteada), algunas se intensificaron (línea negra solida) otras se perdieron (ausencia de línea).

Modificado de Baeza *et al.*, 2015.

3.4 Interacciones proteína-proteína

Como se ha mencionado previamente, el HD ha mostrado tener un papel importante en las interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, la formación de dímeros por AbdA (Figura 7).

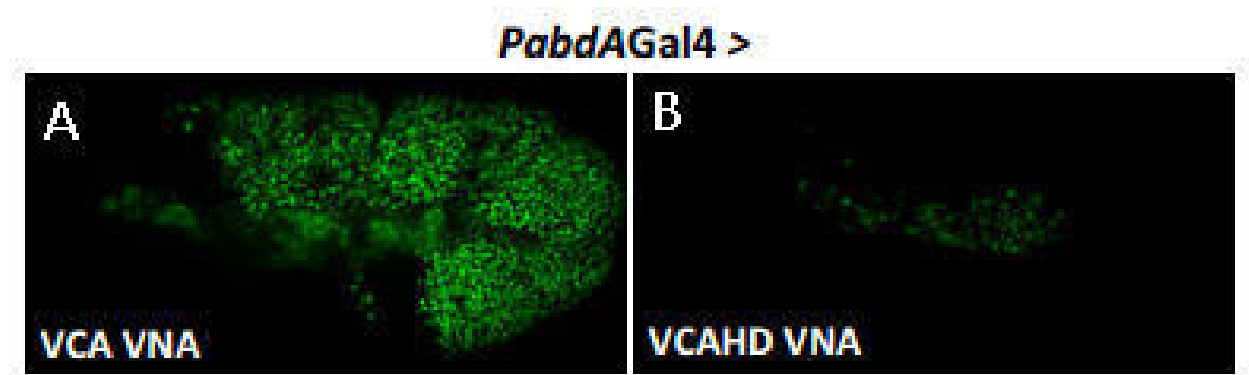


Figura 7. La homeoproteína AbdA forma dímeros a través del HD. A) Se observa la fluoerescencia de la proteína Venus por la formación debido al dímero de AbdA. B). Cuando se delete el homeodominio, la interacción se pierde.
Tomado de Hudry *et al.*, 2011

Baeza y colaboradores determinaron en el 2015 que AbdA establece otras interacciones entre homeoproteínas, en las cuales también participa su HD, como las que establece con Distaless (Dll), Tailup/isled (Tup) y Apterous todas wt, analizadas mediante BiFC, en embriones de *Drosophila* y utilizando la versión de AbdA que solo cuenta con HD.

Otra liga de las proteínas Hox con la maquinaria de transcripción basal son las interacciones de AbdA, Ubx y Dfd con el Complejo Mediador de la transcripción, específicamente con la subunidad 19 (Med19), mediante BiFC, incluso se identificó el motivo proteico clave de AbdA y Ubx que participa en dichas interacciones: el HD. Esto analizado en embriones de la *Drosophila* (Boube *et al.*, 2014).

Otra interacción detectada es en la que participa Ubx con TFIIE β , analizada por pulldown por Bondos y cols., en el 2004 y posteriormente por Baëza y cols., en el 2015 mediante BiFC, ensayo en el cual se determinaron las interacciones de Ubx con diversos factores como: Bin, Mid, Apt, Nau, Mad, Pan, Tup, Bap, Eve, Tsh, entre otros, como se observa en la Figura 8A. Al analizar las mutantes Ubx^{HX} y Ubx^{UbdA} algunas interacciones permanecieron, otras se originaron y también algunas se inhibieron. Todos los cambios se mostraron en un mapa de calor. (Figura 8B).

Lo anterior permite concluir que tanto el motivo YPWM y el motivo UbdA juegan un rol importante en las interacciones que Ubx establece con diversos factores (Baeza *et al.*, 2015).

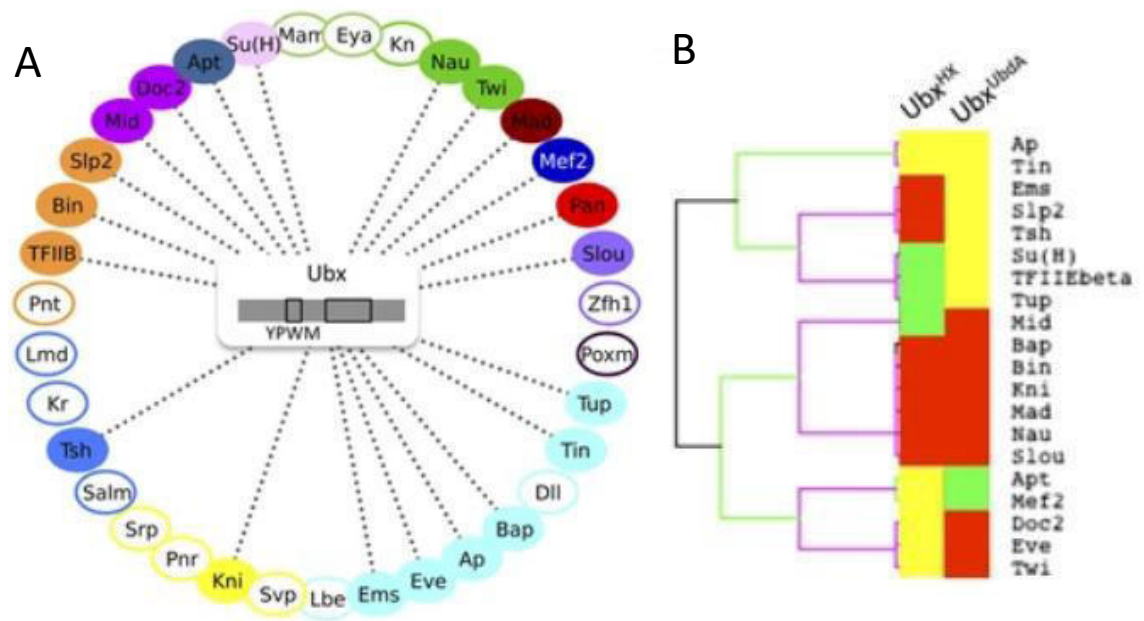


Figura 8. Factores que interaccionan con Ubx. A) El diagrama circular indica a los 35 factores que se analizaron con Ubx; 21 factores mostraron interacción con Ubx y se representan con línea punteada. B) Las mutantes Ubx^{HX} y Ubx^{UbdA} tuvieron efecto en la formación de dímeros. Las interacciones que se potenciaron se observan en amarillo, así como las recién generadas, mientras que las que se inhibieron se muestran en rojo y las que no cambiaron, en verde. Modificado de Baeza *et al.*, 2015

En 2017 se detectó un nuevo cofactor, la proteína de pausa de la transcripción M1BP, quien no pertenece a la clase PBC. M1BP interactúa con AbdA y Ubx en promotores blanco de proteínas del grupo Polycomb Group (PcG) en embriones de *Drosophila*, mostrando que M1BP regula *in vivo* procesos dirigidos por homeoproteínas en base al estado de la cromatina (Zouaz *et al.*, 2017).

El interactoma de Ubx continúa siendo analizado, Carnesecchi y col. en el 2020 realizaron un análisis el cual mostró interacciones tejido-específicas en embriones de *Drosophila melanogaster*, incluyendo remodeladores de la cromatina, así como reguladores de la traducción, además de recalcar la importancia del extremo amino terminal de Ubx, en el cual se encuentran regiones clave en interacciones.

Es notable la versatilidad de las homeoproteínas en sus interacciones, una prueba de ello es la interacción de Ubx con el factor de exportación nuclear Embargoed, interacción importante en la represión de la autofagia en *Drosophila* (Duffraisse *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se relacionó a Ubx con la maquinaria de transcripción basal a través de su interacción con la ARNpol II, mediante el residuo N51 del HD (Carnesecchi *et al.*, 2022).

3.5 Interacciones triméricas

Las homeoproteínas interactúan con el cofactor Extradenticle (Exd), quien forma parte de la subclase PBC de proteínas que poseen HD tipo TALE (*three amino acid loop extension*, por sus siglas en inglés). Además, estas proteínas cuentan con el motivo PBC hacia el extremo N-terminal del HD (Burglin, 1997; Moens & Salleri, 2006). Al dímero Hox-Exd, se suma Homothorax (Hth) fortaleciendo la unión de las homeoproteínas a una variedad de blancos, estableciendo interacciones triméricas. Un ejemplo de lo anterior es el trímero Ubx-Exd-Hth (Beh *et al.*, 2016)

Exd es una proteína citoplásmica que se traslada al núcleo celular únicamente después de haberse unido a Hth mediante su dominio N-terminal (Rieckhof *et al.*, 1997) y se une al ADN junto con Exd y las proteínas Hox formando el trímero Hox-Exd-Hth, el cual es

necesario para activar genes homeóticos, mostrando que las proteínas Hox forman complejos multiproteicos (Ryoo *et al.*, 1999). Un ejemplo de ello es la unión, determinada *in vitro* del trímero AbdB-Exd-Hth al ADN (Kannan *et al.*, 2010) donde además se analizaron las interacciones de varios genes homeóticos (Antp, Ubx, Lab, Scr, AbdA y AbdB) con Exd así como con el dímero Exd y Hth determinando la formación de complejos triméricos.

Además, se encontró que la interacción entre Ubx y el dímero Exd-Hth se une a blancos específicos en el ADN (Crocker *et al.*, 2015).

Sin embargo, las proteínas Hox presentan plasticidad, ya que se ha detectado la interacción de Ubx, AbdA y AbdB a secuencias específicas sin la presencia del dímero Exd/Hth, por ejemplo, Ubx modula la activación de genes diana que forman los halterios, esto tras cambiar la ruta de señalización que resulta en el desarrollo de alas (Galant *et al.*, 2002; Papadopoulos & Akam *et al.*, 2011).

En cuanto a los dominios que participan en las interacciones, se sabe de la existencia de motivos lineales cortos (SLiMs, por sus siglas en inglés) como el motivo YPWM (dominio conservado que se localiza río arriba del HD) que medía la formación del dímero Antp-Exd (Baeza *et al.*, 2015).

Otro motivo proteico importante, presente en Ubx y AbdA es el denominado UbdA (cuya secuencia aminoacídica es: KEL/INEQ), también ubicado río abajo del HD tal como el YPWM (Figura 9) (Merabet *et al.*, 2007). El motivo UbdA establece un puente flexible con la hélice 3 del HD permitiendo así la interacción entre homeoproteínas y miembros de la clase PBC como la interacción con Exd (Johnson *et al.*, 1995, Foos *et al.*, 2015).

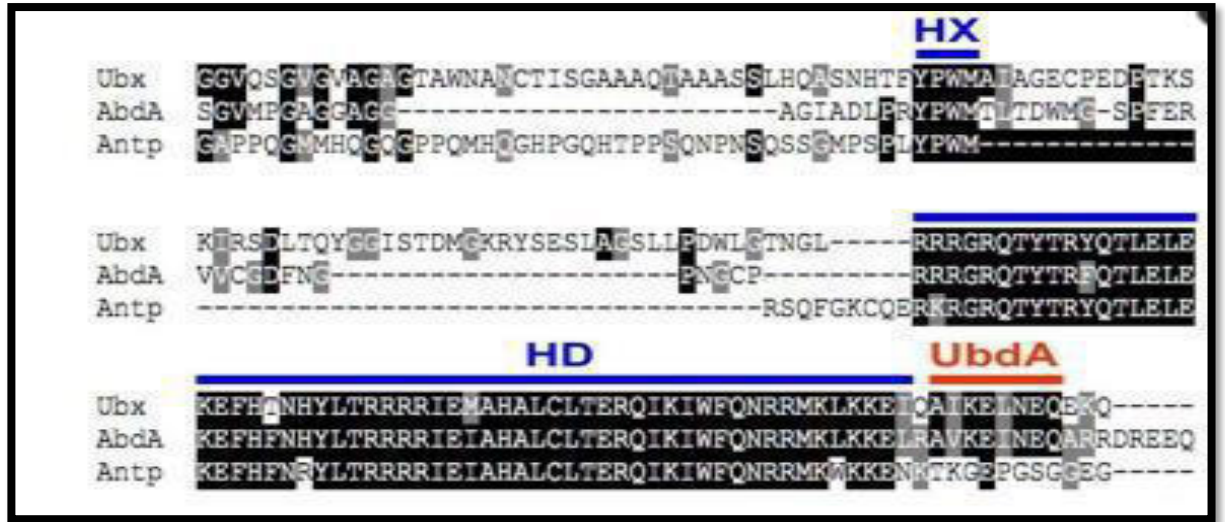


Figura 9. Motivo UbA localizado en Ubx y AbdA. El alineamiento muestra los aminoácidos de las proteínas Ubx, AbdA y Antp. Subrayado en color azul se indica primeramente el motivo YPWM (HX), seguido por el homeodominio (HD), mientras que el motivo UbA, señalado en color rojo, no se encuentra en Antp. Tomado de Merabet *et al.*, 2007

Se ha descrito que tanto Ubx como Abd-A forman complejos con Exd y Hth para reprimir el gen selector de la pata Dll a través del elemento DCRE, mientras que Abd-A interactúa también con Exd y Hth uniéndose al elemento RhoA para activar el gen Rhomboid (Zandvakili *et al.*, 2019). Además, se describió que el HD de HoxA9 es capaz de interaccionar con PBX1 y MEIS1, destacando que el complejo se forma siempre y cuando este se una al ADN (Dard *et al.*, 2019). Ubx interactúa con Exd y Hth a través de sitios de baja afinidad de Ubx-Exd para reprimir Ubx (Delker *et al.*, 2019).

De forma interesante, encontramos que los HDs de Antp y Ubx interactúan *in vivo*, tanto en embriones como en discos imaginales en *Drosophila*. (Villarreal-Puente., 2015 y 2018), tal como se observa en la Figura 10.

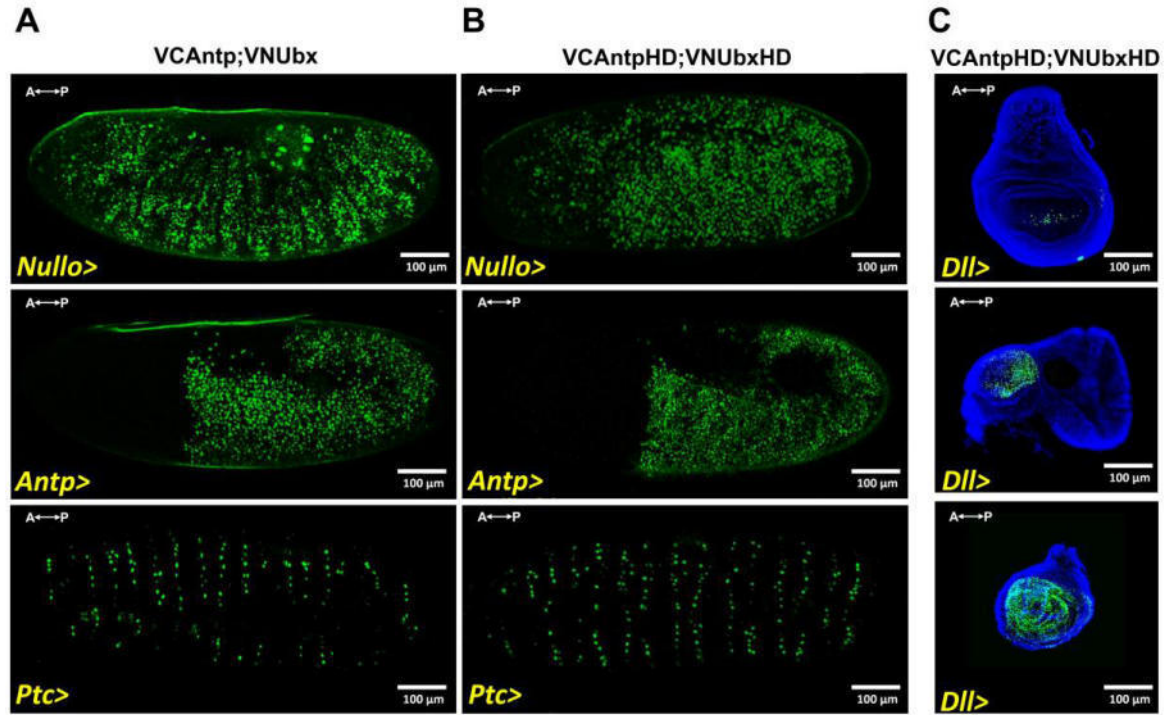


Figura 10. Antp y Ubx interactúan en embriones y discos imaginales *in vivo* por BiFC. A) Los embriones muestran la interacción del dímero Antp-Ubx y B) del dímero AntpHD-UbxHD dirigidos con los drivers *Nullo*-, *Antp*- y *Ptc*-*GAL4* (en los parasegmentos). C) En los discos imaginales de ala, ojo antena y pata se observa la interacción de los HDs de las proteínas Antp y Ubx dirigidas por *Dll*-*GAL4*. Se utilizó tinción con DAPI (azul) para la visualización completa del disco. Modificado de Villarreal-Puente, 2015 y 2018.

Estas interacciones se visualizaron también en cultivo celular y adicional se analizó si el aminoácido 19 de la hélice 1 del HD de ambas homeoproteínas es relevante. Antp y Ubx wt, mostraron un 89% de interacción mediante BiFC, mientras que los HDs aumentaron el porcentaje de interacción a 96%. Así mismo, se observó que el aminoácido 19 de Antp redujo el porcentaje de interacción hasta 60% (Figura 11A). En contraste la posición 19 de Ubx no mostró diferencia significativa (Figura 11B).

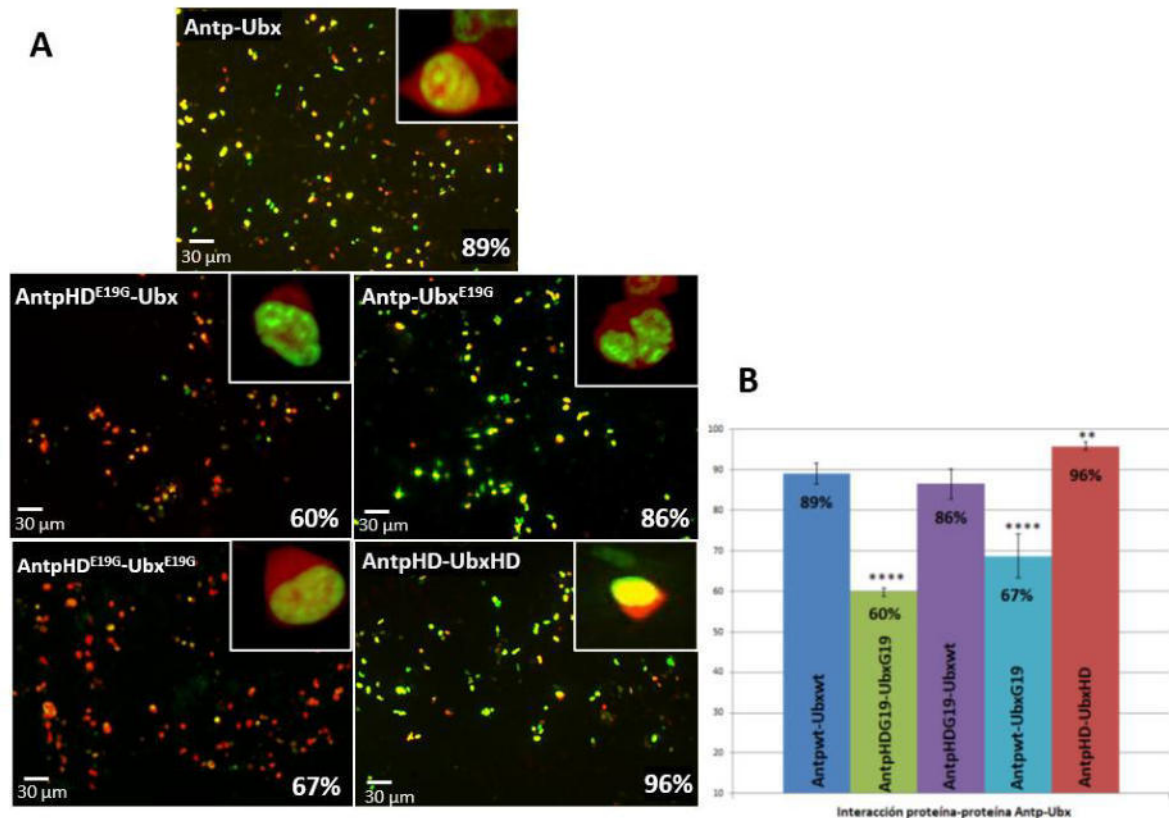


Figura 11. La mutante AntpHDE19G redujo el porcentaje de interacción de Antp-Ubx por BiFC. A) Se muestra la interacción de Antp-Ubx mediante BiFC en cultivo celular (complementación de Venus se observa en color verde). La mutación del aminoácido 19 de la hélice 1 del HD de Antp redujo el porcentaje de interacción, aunque el mismo aminoácido en Ubx no tuvo efecto. La mutante doble mostró un porcentaje similar al de la posición E19G de Antp. El análisis de las versiones que solo cuentan con los HDs mostró un incremento en la interacción, respecto a las proteínas wt. B) Análisis estadístico de tres experimentos BiFC independientes usando ANOVA de una vía y Tukey para la comparación de medias, altamente significativo se muestra con **** ($p < 0.05$). pCAG-mCherry fue utilizado como control de transfección (fluorescencia roja). Barra de escala, 30mm.

Posteriormente se analizó la función de la interacción Antp-Ubx y para ello se dirigió su expresión a la cabeza de *Drosophila*. Los resultados mostraron una transformación antena-pata parcial por lo que concluimos que el dímero si afectó, aunque no inhibió por completo la transformación antena-pata, evidenciando la interacción llevada a cabo entre Antp y Ubx por lo que la transformación no se dio completamente como cuando se origina al dirigir únicamente la expresión del gen Antp a la antena de *Drosophila*.

Posteriormente, para proponer opciones de factores que podrían participar en interacciones triméricas con Antp-Ubx, realizamos un ensayo por competencia usando BiFC en células, el cual consistió en agregar al pozo de transfección los plásmidos BiFC

(VNUbx y VCAntp) así como un tercer plásmido codificante de cada uno de los factores de transcripción adicionales, por lo que, si alguno de ellos competía por el contacto con Ubx o Antp, se observaría una disminución en la interacción de Antp-Ubx. Los factores que causaron esta reducción en el porcentaje de interacción fueron BIP2, TBP, TFFIIE β y Exd, permitiendo postularlos como opciones a formar complejos triméricos con el dímero Antp-Ubx.

Por lo anterior es de mucho interés analizar la función de la interacción Antp-Ubx no solo en la transformación antena-pata, sino también en el desarrollo del tórax de *Drosophila melanogaster*, ahora desde una perspectiva de interacciones triméricas.

Con base a lo anterior, en esta tesis analizamos la participación de las hélices 1 y 2 de Antp en su interacción con Ubx, así como la detección de complejos triméricos usando la técnica FRET basada en BiFC con los factores transcripcionales TBP, TFFIIE β , BIP2 y la homeoproteína Exd, representado en la estrategia general ubicada en la sección de Materiales y métodos y más específicamente en la Figura 12 ubicada en la sección 7.2 de Materiales y Métodos.

4. JUSTIFICACIÓN

Las homeoproteínas modulan la expresión de los genes que se necesitan para especificar los segmentos del eje antero-posterior en *Drosophila melanogaster*, Sin embargo, el HD posee alta homología en los diferentes organismos, además de que reconoce sitios muy similares en el ADN, por ello el establecer interacciones proteína-proteína es de suma importancia para alcanzar su especificidad y realizar sus múltiples funciones *in vivo*. Se han descrito múltiples interacciones diméricas en las que participan las homeoproteínas con el fin de reconocer sus sitios blanco, sin embargo, debido a la complejidad transcripcional, son múltiples los factores transcripcionales involucrados en las interacciones de las proteínas Hox, por lo que es importante detectar no solo interacciones diméricas si no determinar complejos triméricos así como analizar su posible función *in vivo* para tratar de comprender los mecanismos moleculares que llevan a cabo las proteínas Hox en el desarrollo del embrión en la morfogénesis de *D. melanogaster*.

5. HIPÓTESIS

Los complejos triméricos de Antp-Ubx con los factores transcripcionales TBP, Exd, BIP2 y TFIIE β modulan la expresión de genes en el desarrollo en *D. melanogaster*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

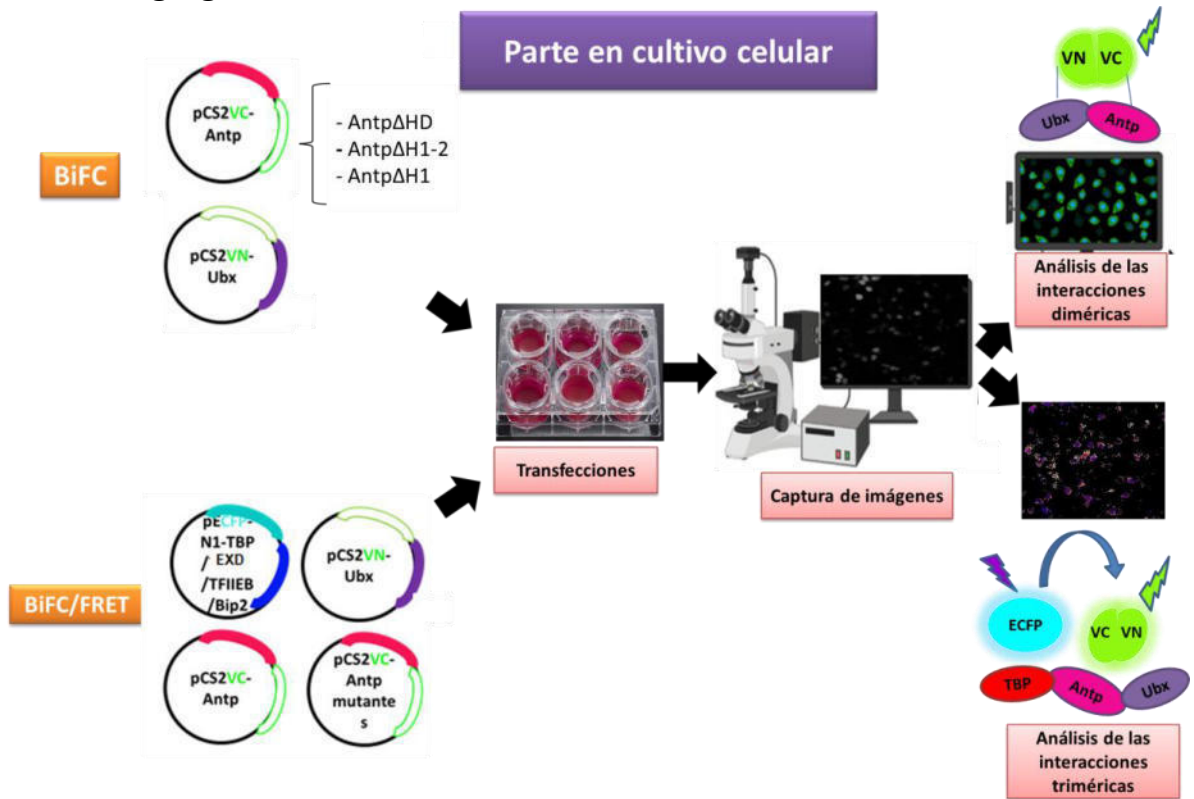
Detectar los complejos triméricos Antp-Ubx con los factores transcripcionales BIP2, TFIIE β y TBP así como la homeoproteína Exd y su relevancia funcional en el desarrollo del tórax y la transformación antena por pata en *Drosophila melanogaster*.

6.2 Objetivos particulares

- Disección molecular de las hélices 1 y 2 de Antp en su interacción con Ubx usando BiFC en cultivo celular.
- Analizar la participación de los factores TBP, BIP2, TFIIE β y la homeoproteína Exd en interacciones triméricas con Antp-Ubx mediante BiFC/FRET en cultivo celular.
- Confirmar los complejos triméricos Antp-Ubx/ TBP, BIP2, TFIIE β , Exd al mutar dominios clave en interacciones dimericas.
- Determinar la función de los trímeros confirmados en la transformación torácica de *Drosophila melanogaster*.
- Analizar la actividad funcional de las interacciones triméricas en la transformación antena-pata de *Drosophila*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Estrategia general



7.2 Determinación de dominios clave del dímero Antp-Ubx en cultivo celular usando BiFC

La confirmación de la participación del HD, así como de las hélices 1 y 2 del HD de Antp en la formación del dímero Antp-Ubx, se realizó en cultivo celular mediante Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC). Dicha técnica se basa en unir los genes que codifican a las proteínas que se analizarán a cada uno de los extremos (amino y carboxilo) de una proteína fluorescente, en este caso, Venus. Si Antp (plásmidos con las versiones deletadas) y Ubx, nuestras proteínas de interés establecen interacción, permitirán que los extremos de la proteína Venus se aproximen para restablecer su fluorescencia. Lo anterior se representa en la Figura 12. Para llevar a cabo el análisis, se utilizó el plásmido pSC2VNUbx, que porta el gen que codifica Ubx y esta fusionado a uno de los extremos de Venus (N-terminal), así como los plásmidos de las versiones de Antp fusionadas al extremo carboxilo terminal de Venus (pSC2VCAntp Δ H1-2, Antp Δ H1-2 y Antp Δ H1). Posteriormente, se realizó la transfección de los plásmidos en la línea celular HEK293 para permitir la producción de las proteínas Ubx y Antp y analizar su interacción.

7.2.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx

Para realizar los ensayos BiFC y determinar la participación de las hélices 1 y 2 en la interacción Antp-Ubx, se caracterizaron mediante digestión enzimática los plásmidos pCS2VC155Antp, Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx ya disponibles en nuestro laboratorio por Cárdenas-Chávez, 2012 y Villarreal-Puente, 2018, respectivamente. Se utilizaron las enzimas BglII y StuI, para el vector pCS2VNm9Ubx, mientras que el plásmido pCS2VC155Antp se digirió con las enzimas de restricción BamHI, KpnI y PstI. El vector VCAntp- Δ H1 se digirió con la enzima KpnI, mientras que los vectores Δ H1-2, Δ H1 se digirieron con la enzima BamHI.

7.2.2 Preparación plasmídica de los vectores BiFC

Para la obtención de los plásmidos mencionados previamente, los cuales fueron contruidos en el laboratorio, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α Ca⁺⁺ (Villarreal-Puente, 2018; Cárdenas-Chávez, 2012) y se inocularon las colonias obtenidas en tubos con 3 ml de medio LB (Luria-Bertoni) y 3 μ L de ampicilina, en el caso de los plásmidos BiFC y kanamicina para los plásmidos donadores. Se incubaron por 12 horas en agitación continua de 180 rpm a 37 °C. A continuación, se purificarón los ADNs siguiendo el protocolo modificado de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) el cual indica centrifugar las bacterias en un tubo de 1.5 mL, desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100 μ L de Solución I (Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con RNAsa A (Invitrogen) obteniendo una concentración final de 0.02 mg/mL. El pellet resultante se resuspendió con vortéx para homogenizar e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 μ L de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos en hielo. Al concluir la incubación, se añadieron 150 μ L de Solución III (KOAc 5M, CH₃COOH), se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos en hielo. Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos con un volumen de isopropanol al 100% (~500 μ L). Se mezcló por inversión, se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante fue desechado permitiendo recuperar la pastilla de material genético la cual se lavó en 400 μ L de etanol al 70% y se centrifugo por 2 minutos a 14,000 rpm. Se desechó nuevamente el sobrenadante para permitir la evaporación del etanol a temperatura ambiente y resuspender en 20 μ L de H₂O miliQ. El ADN purificado fue almacenado a -20°C hasta su utilización. A los ADN's purificados fueron analizados en cuanto a calidad y concentración mediante espectrofotometría en un equipo marca NanoDrop modelo ND-1000 y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

7.3 Análisis de las interacciones triméricas del complejo Antp-Ubx-BIP2/TFIIE β /TBP/Exd en cultivo celular mediante FRET/BiFC

Para determinar los complejos triméricos de Antp-Ubx con los GTFs BIP2, TFIIE β , TBP y Exd se utilizó la combinación de las técnicas Transferencia de energía de resonancia de

Förster (FRET) y BiFC para así lograr que la energía de un fluorocromo donador, el cual tiene fusionada una proteína de interés, se transfiera a un fluoróforo aceptor, el cual fue fragmentado y cada uno de los fragmentos están fusionados a otras dos proteínas de interés, si estas dos proteínas interaccionan, permiten que el fluoróforo aceptor reconstituya su fluorescencia y si las dos proteínas interaccionan con la proteína fusionada al donador, estarán lo suficientemente cerca a una distancia no mayor de diez nm para que cuando este se excite, la energía que emita sea suficiente para excitar al fluorocromo aceptor, por lo que se observa menos emisión de energía por la parte donante y por lo tanto un aumento en la fluorescencia de la proteína aceptora, evidenciando la presencia de una interacción trimérica (Figura 12).

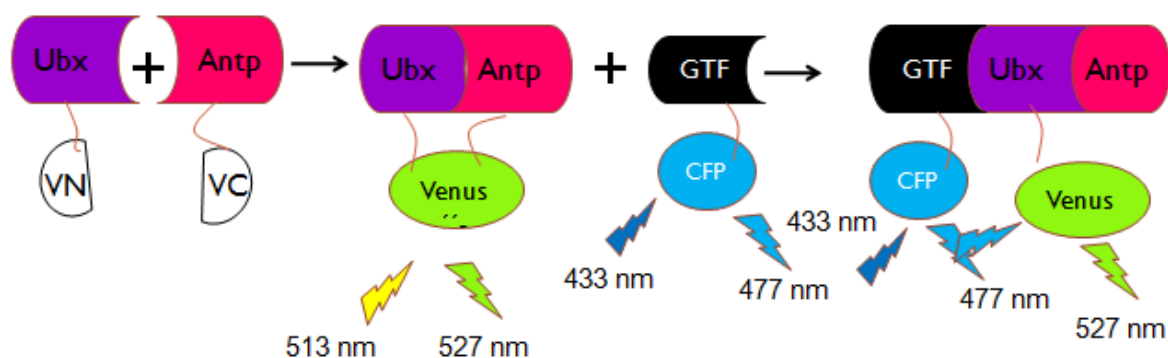


Figura 12. Diagrama del principio de la combinación de las técnicas FRET y BiFC en el dímero Antp-Ubx y los GTFs. Se representan las proteínas Ubx en morado y Antp en rosa, fusionadas a los extremos amino y carboxilo de Venus, respectivamente. La interacción entre Ubx y Antp favorece que la distancia entre los extremos de Venus sea corta y así reconstituir su fluorescencia (BiFC). El tercer elemento (factor general de transcripción) está representado en negro y se encuentra fusionado a la proteína fluorescente CFP quien funge como donador. Si el GTF interacciona con el complejo Antp-Ubx, al excitar CFP, la fluorescencia que emita será suficiente para excitar a Venus reconstituido, provocando la desaparición de la fluorescencia del donador (CFP) y la subsecuente emisión de la proteína aceptora (Venus).

7.3.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx

Para analizar la posible formación de complejos triméricos de Antp-Ubx con los factores TFIIE β , BIP2, TBP, y la homeoproteína Exd se hizo uso de los plásmidos pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx mencionados anteriormente en la sección 7.2.1.

7.3.2 Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP y pEFCP-N1- Exd

Los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP, previamente contruidos en el laboratorio (Jiménez-Mejía,2018) fueron caracterizados mediante digestión enzimática para confirmar su identidad. El vector pECFP-N1-TFIIE β se digirió con las enzimas HindIII, EcoRI, BamHI; para el vector pEFCP-N1-dTBP se usaron las enzimas ApaI, HindIII, PstI y SmaI-AgeI; el vector pEFCP-N1-BIP21-89 se digirió con las enzimas NdeI, PvuII y las enzimas PvuII y AgeI-ApaI se usaron para pEFCP-N1- Exd. Todas las digestiones se realizaron siguiendo las indicaciones de la marca y se observaron los patrones de restricción mediante gel de agarosa al 0.8% y se visualizaron en un fotodocumentador BIORAD.

7.33 Preparación plasmídica de los vectores BiFC pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx y donadores pECFP-N1-TFIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP.

Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 7.2.2 agregando los plásmidos donadores.

7.3.4 Determinación de las interacciones triméricas del complejo Antp-Ubx con los GTFs

Para determinar las interacciones triméricas se realizó la siembra de la línea HEK293 en placas de 6 pozos a una concentración de 150,000 células por pozo, 72 h después se transfectaron con los plásmidos BiFC (pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx), así como con cada uno de los plásmidos donadores (pECFP-N1-TFIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-dTBP) a una concentración de 6000 ng de ADN por pozo (2000 por cada plásmido) utilizando el reactivo PEI el cual forma agregados con el ADN permitiendo su internalización a la célula. 48 h después se observaron las células al microscopio de fluorescencia para realizar la captura de imágenes y posteriormente se realizó el análisis FRET/BiFC utilizando el software de uso libre ImaJ mediante el pluging FRETYY.

7.4 Análisis funcional de las interacciones triméricas en la transformación homeótica torácica de *Drosophila melanogaster*

El análisis funcional en la transformación homeótica torácica de las interacciones triméricas se realizó mediante el sistema UAS-GAL4 descrito en la Figura 13, el cual consta en una línea que dirige la expresión tejido-específica de las proteínas de interés, llamada productora o driver, así como una línea reportera que posee dichas proteínas de interés río debajo de los sitios UAS los cuales son activados por la proteína transactivadora GAL4 presente en la línea reportera

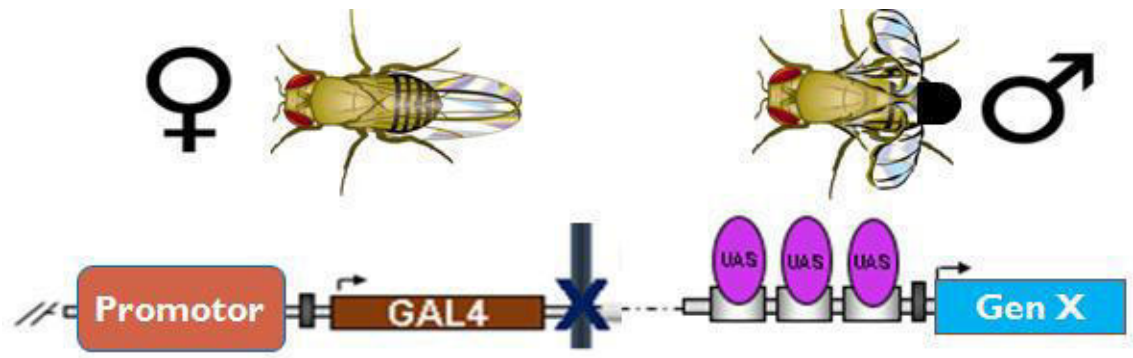


Figura 13. Sistema binario UAS-GAL4. El esquema representa el sistema UAS-GAL4; consta de una línea con un promotor o enhancer específico de tejido (productora/driver) y río abajo la secuencia que codifica a GAL4 (proteína transactivadora), que se une a las secuencias UAS presentes en la línea reportera. Realizar esta cruce permite la expresión de los genes ubicados río abajo.

7.4.1 Esquema de cruces genéticas para la expresión tejido específica de las homeoproteínas Ubx, Antp y Exd así como el factor transcripcional TBP

Para los objetivos 4 y 5 se realizó una cruce entre las líneas UASVNUbx y UASVCAntp para la integración de ambos transgenes en un solo individuo, el esquema se observa en la Figura 14. A la par se realizó otra cruce entre las líneas driver *Null*-GAL4 o *Dll*-GAL4 y cada una de las UAS-ECFPTBP, UAS-ECFPExd, tal como se observa en la Figura 15.

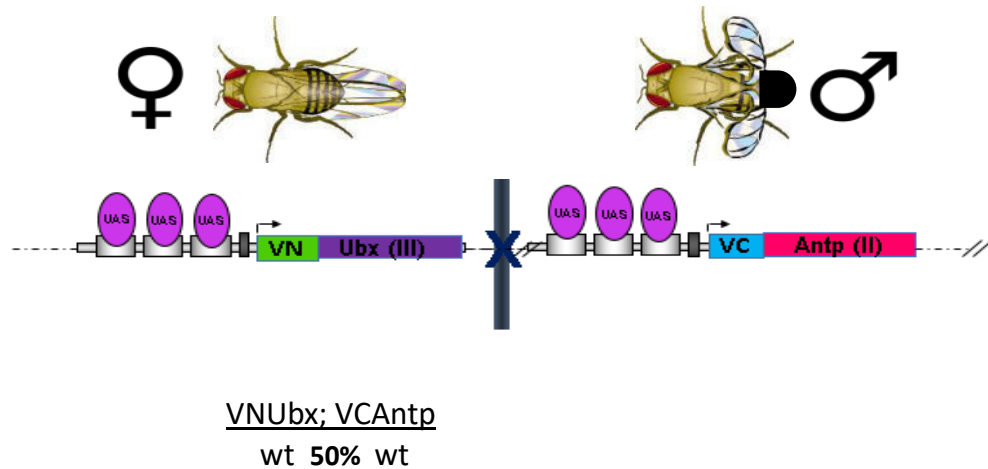


Figura 14. Producción de la línea reportera UASVNUbx-UASVCAntp. El esquema muestra la cruce entre 150 hembras vírgenes de la línea UASVNUbx y 50 machos la línea UASVCAntp. El 50% de la progenie presentará ambos transgenes.

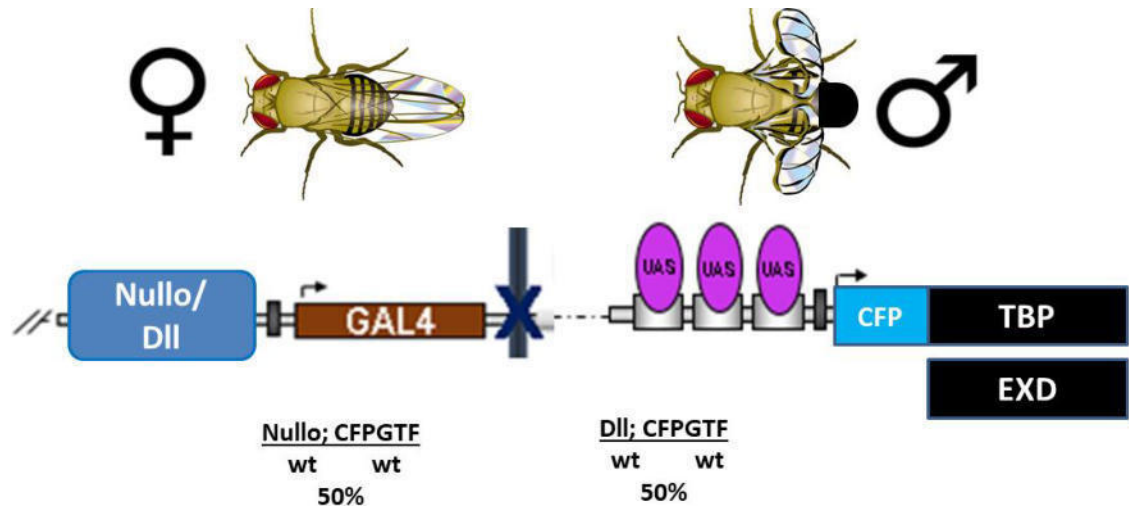


Figura 15. Generación de las líneas productoras o driver Nullo/Dll-GAL4;UASCFPGTFs. El esquema representa la cruce entre la línea *Nullo*-GAL4 o la línea *Dll*-GAL4 con las líneas UASCFPExd, UASCFPTBP y el 50% de la progenie presentará ambos transgenes.

7.4.2 Efecto de las interacciones triméricas de Antp y Ubx con los GTFs en las transformaciones homeóticas torácicas y antena-pata

Para analizar cómo afectan las interacciones triméricas del complejo Antp-Ubx /TBP/Exd en las transformaciones torácicas se realizó el análisis de cutículas embrionarias. Para ello se montaron cruza genéticas que dirigen la expresión de Antp, Ubx y los GTFs al embrión de *Drosophila* (Figura 16), donde se analizó el efecto de las tres proteínas en la involución

de la cabeza y en el desarrollo del tórax. El protocolo de cruce se muestra en la Figura 17, en el cual se indica sincronizar mediante una pre-colecta de embriones durante dos horas para obtener embriones de un mismo estadio. Pasadas las dos horas se retiraron los adultos para dejar incubar los embriones ovopositados para que se desarrollen hasta el estadio larvario 1 antes de la eclosión del huevecillo y proceder a su decorionización.

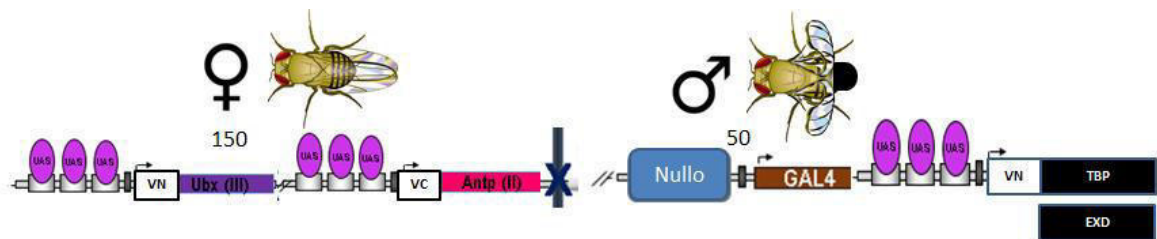


Figura 16. Diagrama de cruce que dirige la expresión de VCNubx, VCNubx y CFP al embrión de *Drosophila*. Se muestran las cruces entre 150 hembras vírgenes de la línea UASVNubx;UASVCAntp y 50 machos de las líneas, *NulloGAL4VNTBP* y *NulloGAL4VNExd* para dirigir la expresión de Venus y CFP y sus proteínas de función (Antp, Ubx y los GTFs) al embrión de *Drosophila*.



Figura 17. Protocolo de cruce genético para el análisis de cutículas embrionarias. Las cruces UASVNubx-UASVCAntp;*NulloGAL4-VNGTFs* se montaron en frasco con comida estándar y se incubaron a 25 °C; 24 hr después se pasaron a placas de puesta y se realizó una pre-colecta de embriones, 2 hr después se retiraron los adultos y los embriones se dejaron incubar por 5 hr y media. Se procedió a su decorionización e incubación por 24 hr. Pasado este tiempo se fijaron y montaron en laminillas para el análisis de cutículas.

A continuación, se estudió como los complejos triméricos Antp-Ubx /TBP/Exd afectaron la transformación antena-pata y para ello se hicieron cruces genéticas que dirigen la expresión de Antp, Ubx y los GTFs al segmento antenal 3 de la cabeza de *Drosophila*. Para ello, la línea driver que se utilizó fue *Dll-GAL4*. El esquema de cruce que observa en la Figura 18 y el protocolo en la Figura 19. Los adultos eclosionados se colocaron en un

portaobjetos para disectar primeramente la cabeza, separándola del cuerpo con ayuda de jeringas de insulina. Una vez separada la cabeza se procedió a separar las antenas para su documentación mediante una serie de fotografías sucesivas en las que se tomaron diferentes capas con ayuda del enfoque en un microscopio Axioscope de la marca Zeiss para posteriormente realizar el empalme de las capas haciendo uso del programa Helicon Focus.

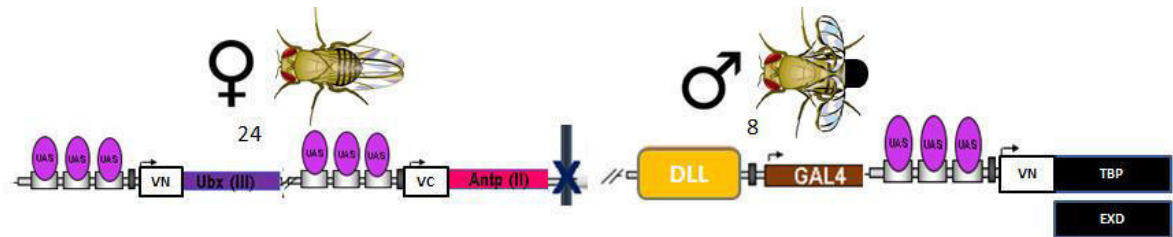


Figura 18. Esquema de cruce genético que permite la expresión de VCAntp, VNUbx y GTFs a discos imaginales en *Drosophila*. La cruce genética se hizo con 24 hembras vírgenes de la línea UASVNUbx;UASVCAntp y 8 machos de las líneas, *Dll*GAL4-VNTBP, *Dll*GAL4-VNExd para dirigir la expresión de Venus y CFP y sus proteínas de función (Antp, Ubx y los GTFs) a discos imaginales en *Drosophila*.

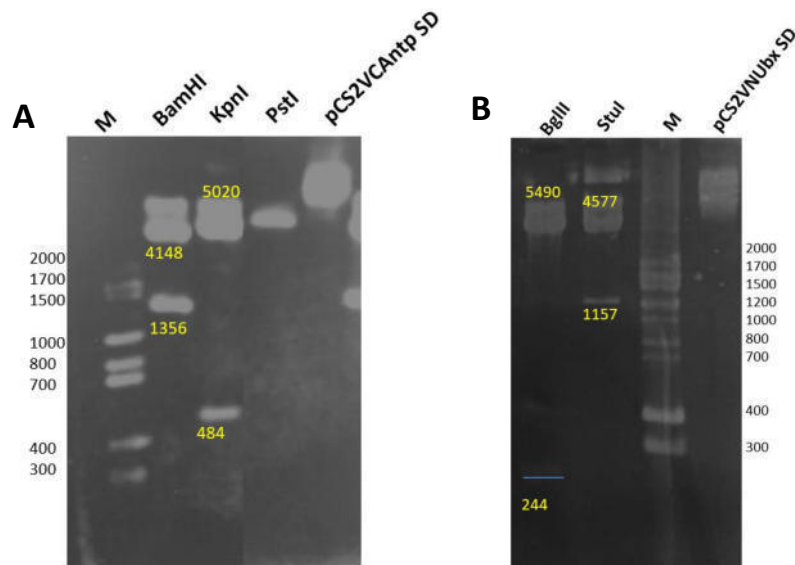


Figura 19. Protocolo de cruce genético para el análisis de las transformaciones antena-pata. Las cruces se realizaron en tubo con comida estándar manteniéndose a 25°C hasta que los embriones progresaron a tercer estadio larvario. Las larvas se observaron por microscopía y se seleccionaron las que presentaron fluorescencia dejándolas desarrollar hasta eclosionar y posteriormente analizar los fenotipos.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ HD, Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx.

Para analizar la participación de las hélices 1 y 2 del HD en la interacción dimérica Antp-Ubx, se caracterizaron mediante digestión enzimática los plásmidos pCS2VC155Antp/ Δ HD, Δ H1-2, Δ H1 y pCS2VNm9Ubx. Para el plásmido pCS2VC155Antp se usaron las enzimas BamHI, KpnI y PstI; los patrones de restricción se observan en la Figura 20A. Para el plásmido pCS2VC155AntpHD se usó la enzima KpnI la cual solo corta una vez en el vector por lo que el gel muestra el plásmido linearizado (Figura 20C). Los plásmidos pCS2VC155Antp Δ H1 y Δ H1-2 se digirieron con la enzima KpnI; los patrones de digestión se muestran en la Figura 20D. Por último, para el vector pCS2VNm9Ubx se usaron las enzimas BglII y StuI (Figura 20B).



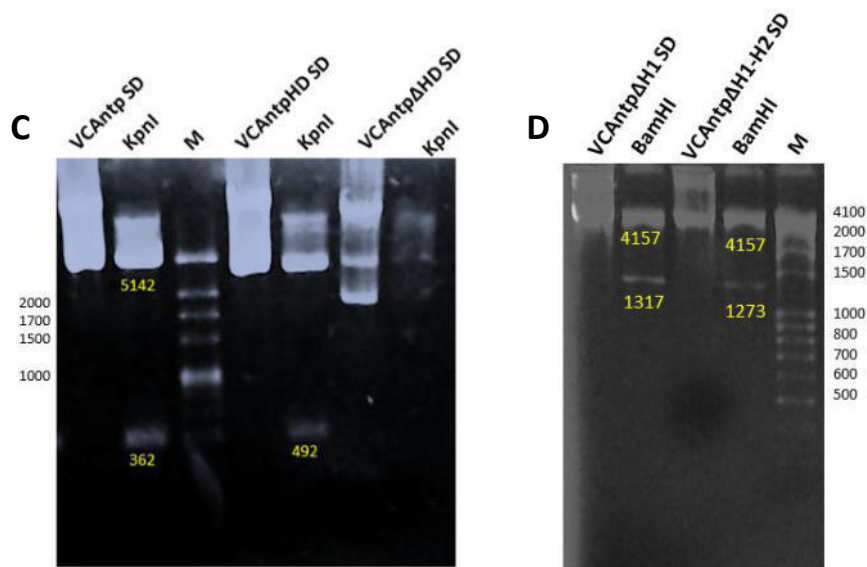


Figura 20. Caracterización enzimática de los plásmidos pCS2VC155Antp/ΔHD, ΔH1-2, ΔH1 y pCS2VNm9Ubx. A) El gel muestra la caracterización del plásmido pCS2VC155Antp; en el carril uno se muestra el marcador de peso molecular seguido del plásmido digerido con BamHI (4148 y 1356), con KpnI (5020 y 484), PstI (linear) y el vector sin digerir (SD). B) Se muestra la caracterización del plásmido pCS2VNm9Ubx; de izquierda a derecha: BglII (5490 y 244), StuI (4577 y 1157), M (marcador de peso molecular) y el vector sin digerir (SD). C) El gel muestra las digestiones con la enzima KpnI de los plásmidos VCAntp (carril 2, 5142 y 362), VCAntpHD (carril 5, libera una banda de 492) y VCAntpΔHD (carril 7, linear), a la izquierda se muestra cada plásmido sin digerir. D) Se muestra la digestión con la enzima BamHI de los plásmidos VC155AntpΔH1 (carril 2, 4157 y 1317) y ΔH1-2 (carril 4, 4157 y 1273), con el vector sin digerir a la izquierda, seguidas del marcador de peso molecular en pares de bases y en gel de agarosa al 0.8% (M).

8.2 Las hélices 1 y 2 del HD de Antp son requeridas en la interacción Antp-Ubx

Para observar el resultado de la ausencia del HD de Antp, así como de las hélices 1 y 2, en la formación del dímero Antp-Ubx, se utilizó el sistema BiFC, en el cual se fusionó la proteína Antp, así como las versiones mutantes (AntpΔHD, AntpΔH1-2, AntpΔH1) al extremo carboxilo del fluoróforo Venus y Ubx al extremo amino de Venus. Se realizaron co-transfecciones en células HEK293 y los resultados se compararon con el porcentaje de interacción de las proteínas wt, (Figura 21A). El dímero AntpΔHD-Ubx redujo drásticamente el porcentaje de interacción (Antp-Ubx 89%) hasta un 6%, mientras que al deletar la hélice 1 se observó un porcentaje de 24%; la delección de las hélices 1 y 2 mostró un 12% de interacción. Las tres interacciones con las versiones mutantes se compararon con el porcentaje de interacción de las Antp y Ubx wt mostrando diferencia significativa, mientras que la comparación entre ellas no mostró diferencia significativa (Figura 21B).

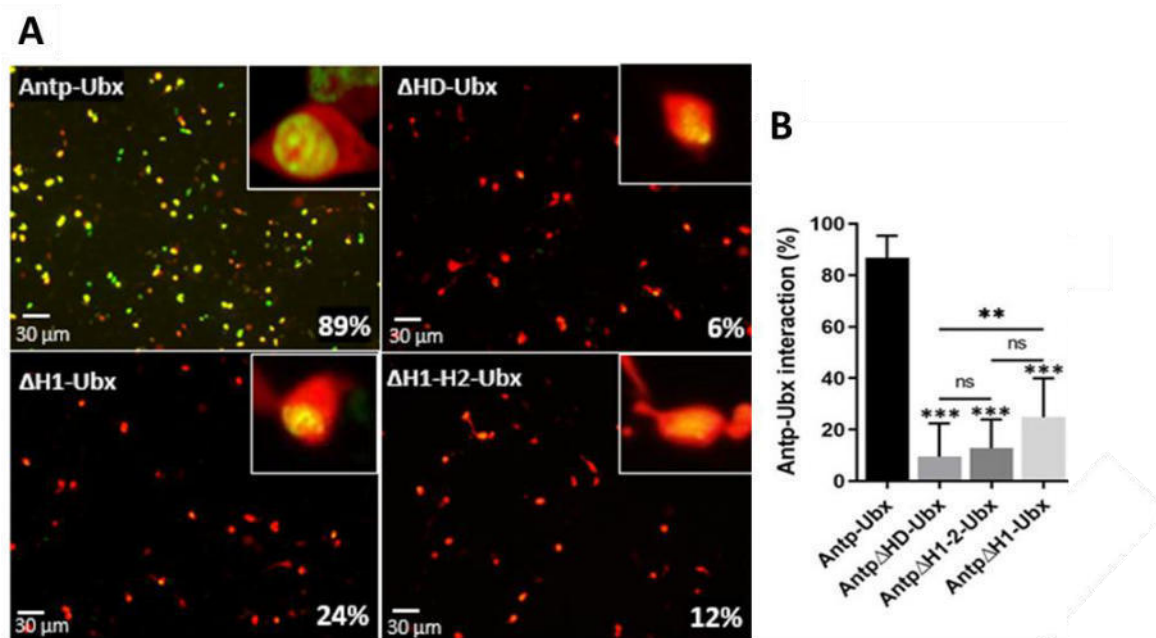


Figura 21. Las hélices 1 y 2 del HD de Antp son importantes en la interacción Antp-Ubx. A) Se muestra la interacción de Antp-Ubx en células HEK293 por BiFC (complementación de Venus se observa en color verde). La delección del HD de Antp bajo el porcentaje de interacción de 89% a 6%, mientras que la delección de las hélices 1 y 2 lo hizo hasta un 12%. La delección de la hélice 1 afectó la interacción hasta un 12%. B) Análisis estadístico de tres experimentos BiFC independientes usando ANOVA de una vía y Tukey para la comparación de medias, significativo se muestra con *** ($p < 0.05$). pCAG-mCherry fue utilizado como control de transfección (fluorescencia roja). Barra de escala, 30mm.

8.3 Caracterización enzimática de los plásmidos aceptores pCS2VC155Antp y pCS2VNm9Ubx

Los plásmidos aceptores se caracterizaron en base a lo descrito en la sección 8.1.

8.4 Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pECFP-N1-TFIIIE β , pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-Exd y pEFCP-N1-dTBP.

A continuación, se procedió a caracterizar por digestión enzimática los plásmidos donadores para analizar las interacciones triméricas. La caracterización del plásmido pECFP-N1-TFIIIE β se observa en la Figura 22A; se usaron las enzimas HindIII, BamHI, EcoRI y al final se cargó el plásmido sin digerir. La Figura 22B muestra la caracterización del plásmido pEFCP-N1-Bip21-89, en el carril 1 se observa el vector sin digerir, seguido de las enzimas PvuII, NdeI y del marcador de peso molecular. El vector pEFCP-N1-Exd se caracterizó con las enzimas PvuII y ApaI-AgeI, los patrones de restricción se muestran

en la Figura 22C. Por ultimo se muestran los patrones de digestión del vector pEFCP-N1-dTBP al usar las enzimas ApaI, HindIII, PstI y SmaI-AgeI.

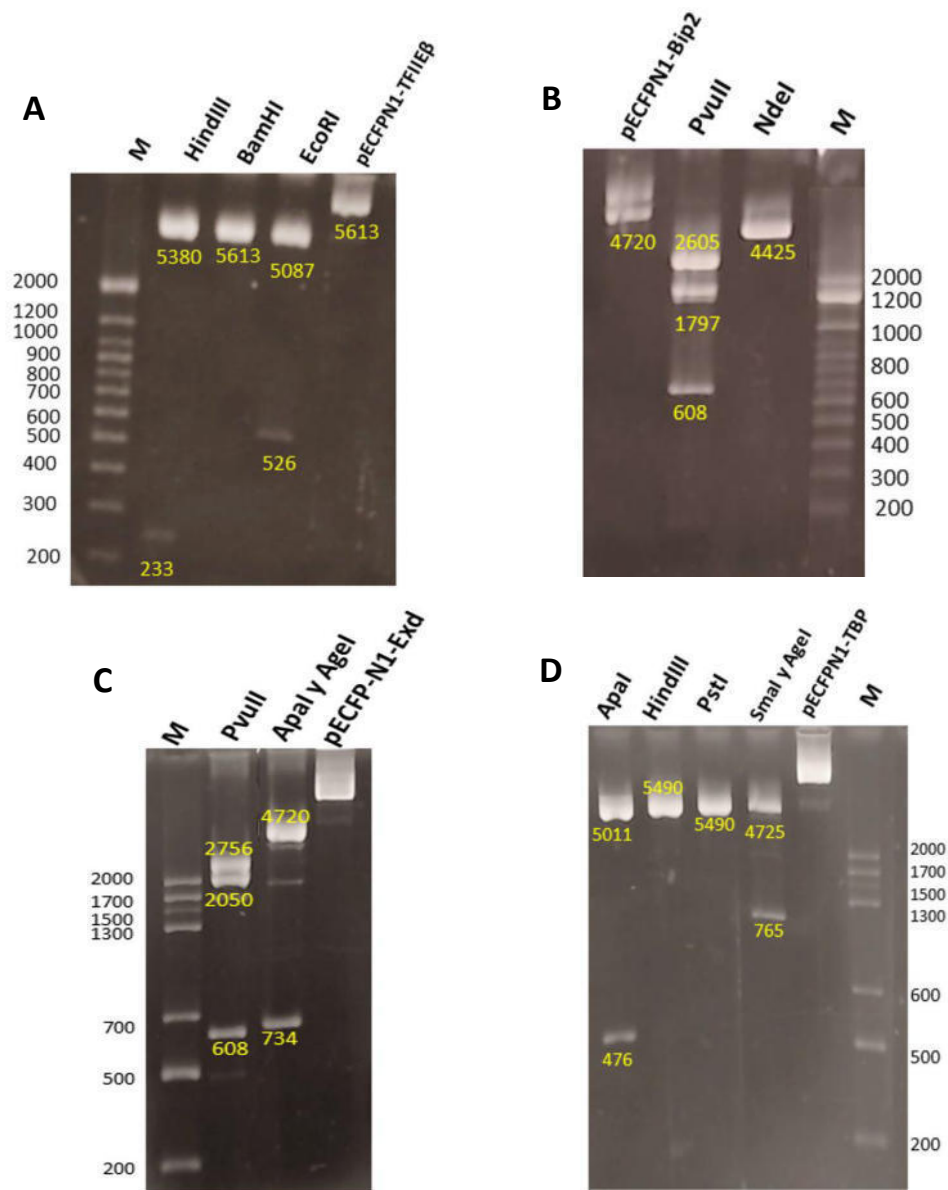


Figura 22. Caracterización enzimática de los plásmidos donadores pEFCP-N1-TFIIβ, pEFCP-N1-BIP21-89, pEFCP-N1-Exd y pEFCP-N1-dTBP. A) El gel muestra la caracterización del vector pEFCP-N1-TFIIβ con las enzimas HindIII (5380 y 233pb), BamHI (linear), EcoRI (5087 y 526 pb) y en el carril 5 se observa el plásmido sin digerir. B) Se observa el vector pEFCP-N1-BIP21-89 sin digerir en el carril 1, seguido de la digestión con las enzimas PvuII (2606, 1797 y 608 pb), NdeI (linear) y el marcador de peso molecular (M). C) El gel muestra el marcador de peso molecular en el carril 1 (M), seguido de las digestiones del vector pEFCP-N1-Exd con las enzimas PvuII (2756, 2050 y 608pb), ApaI-AgeI (4720 y 734pb) y el vector sin digerir (carril 4). D) Se observa la caracterización del vector pEFCP-N1-dTBP con las enzimas ApaI (5011 y 476pb), HindIII (linear), PstI (linear), SmaI-AgeI (4725 y 765), vector sin digerir (carril 5) y el marcador de peso molecular (M) en pb en un gel al 0.8% de agarosa.

8.5 El dímero Antp-Ubx forma trímeros con TBP y Exd

Para analizar si el dímero Antp-Ubx participa en interacciones triméricas con diferentes factores transcripcionales, utilizamos la combinación de técnicas BiFC y FRET *in vitro*. Los vectores ECFP-TBP, VN-Ubx y VC-Antp fueron co-transfectados en células HEK293 y los resultados mostraron que el complejo trimérico Antp-Ubx/TBP se estableció con un valor de E de 0.18 ± 0.006 (Fig. 23B). Para confirmar esta interacción, se sustituyó el vector codificante a Antp por la versión VCAntpHD que carece de las regiones ricas en glutaminas (polyQ) importantes en la interacción dimérica con TBP. El valor de E obtenido disminuyó a 0.08 ± 0.01 mostrando diferencia significativa (Fig. 23E). Resultados similares se observaron deletando el HD de Antp (VCAntp Δ HD), ya que se obtuvo un valor de E de 0.05 ± 0.003 (Fig. 23D) ya que el HD está involucrado en la formación del dímero Antp-Ubx. Por lo anterior, confirmamos la presencia del trímero Antp-Ubx/TBP.

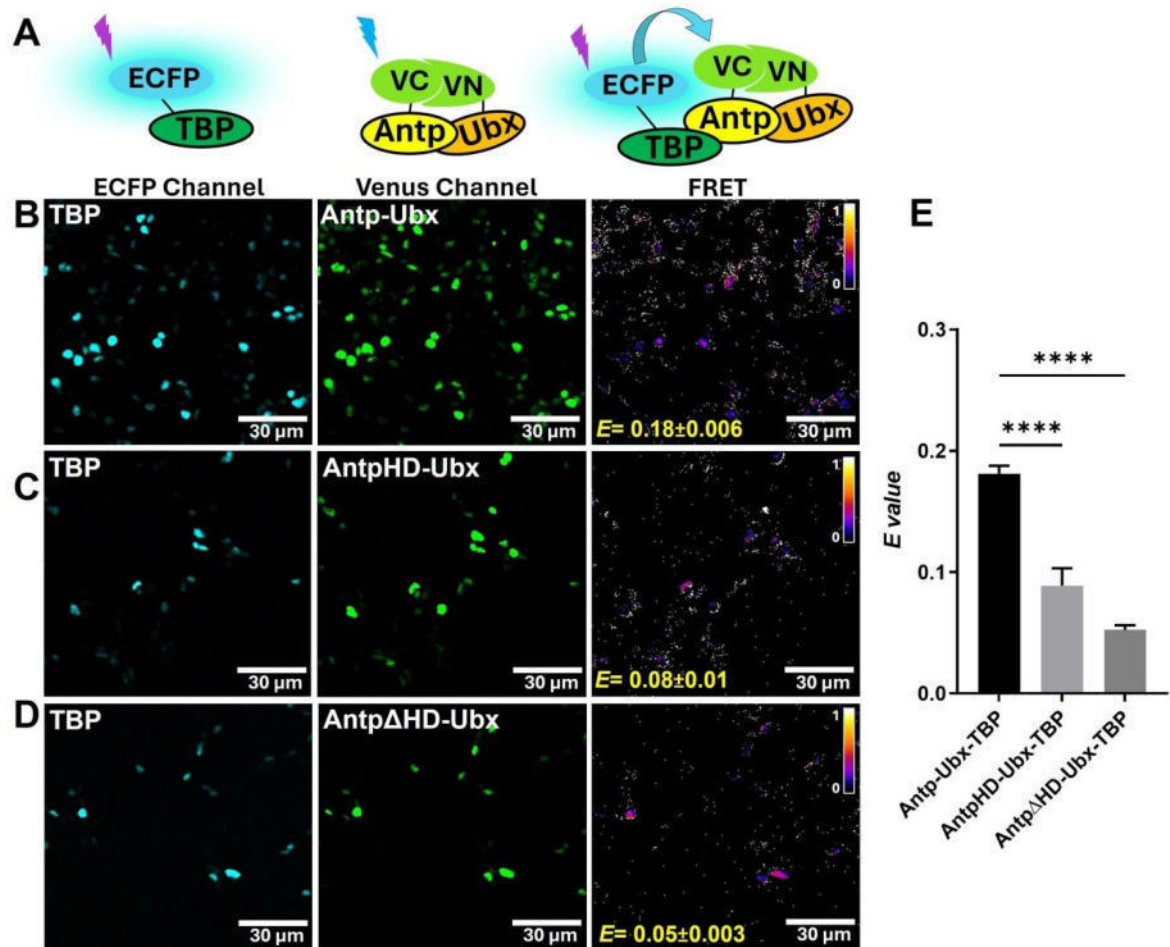


Figura 23. Detección del trímero Antp-Ubx/TBP usando BiFC-FRET. A) Representación esquemática de TBP fusionado a CFP (ECFP Channel), BiFC debido a la interacción Antp-Ubx (Venus Channel) y la

transferencia de energía debido a la formación del complejo Antp-Ubx/TBP (FRET). B) Interacción trimérica de TBP con Antp-Ubx (E de 0.18 ± 0.006). C) Un E value de 0.08 ± 0.01 fue obtenido usando el vector VCAntpHD. D) Antp Δ HD mostró un E value de 0.05 ± 0.003 . Las barras de color representan la intensidad del FRET (Fire mode) colores más claros indican fuerte interacción trimérica mientras que colores más oscuros, interacción débil. E) Análisis estadístico de tres experimentos independientes usando ANOVA de una vía y Tukey para la comparación de medias, altamente significativo se muestra con **** ($p < 0.0001$). Las barras de error corresponden al error estándar.

A continuación, se analizó si la homeoproteína Exd interaccionaba de forma trimérica con Antp y Ubx. Para ello se utilizó el vector ECFP- Exd mostrando la presencia del trímero con un valor de E de 0.2 ± 0.006 (Figura 24B). Para confirmar esta interacción, se utilizó el plásmido VCAntpAAAA el cual tiene el motivo YPWM mutagenizado el cual participa en la interacción con Exd. El valor de E disminuyó a 0.16 ± 0.01 . (Figura 24C). Cuando utilizamos el vector VCAntp Δ HD el valor de E bajo hasta 0.12 ± 0.01 mostrando diferencia significativa (Figura 24D y E), ya que el HD es importante en la interacción con Ubx. Fue

así como confirmamos que Exd forma complejos triméricos con Antp Ubx.

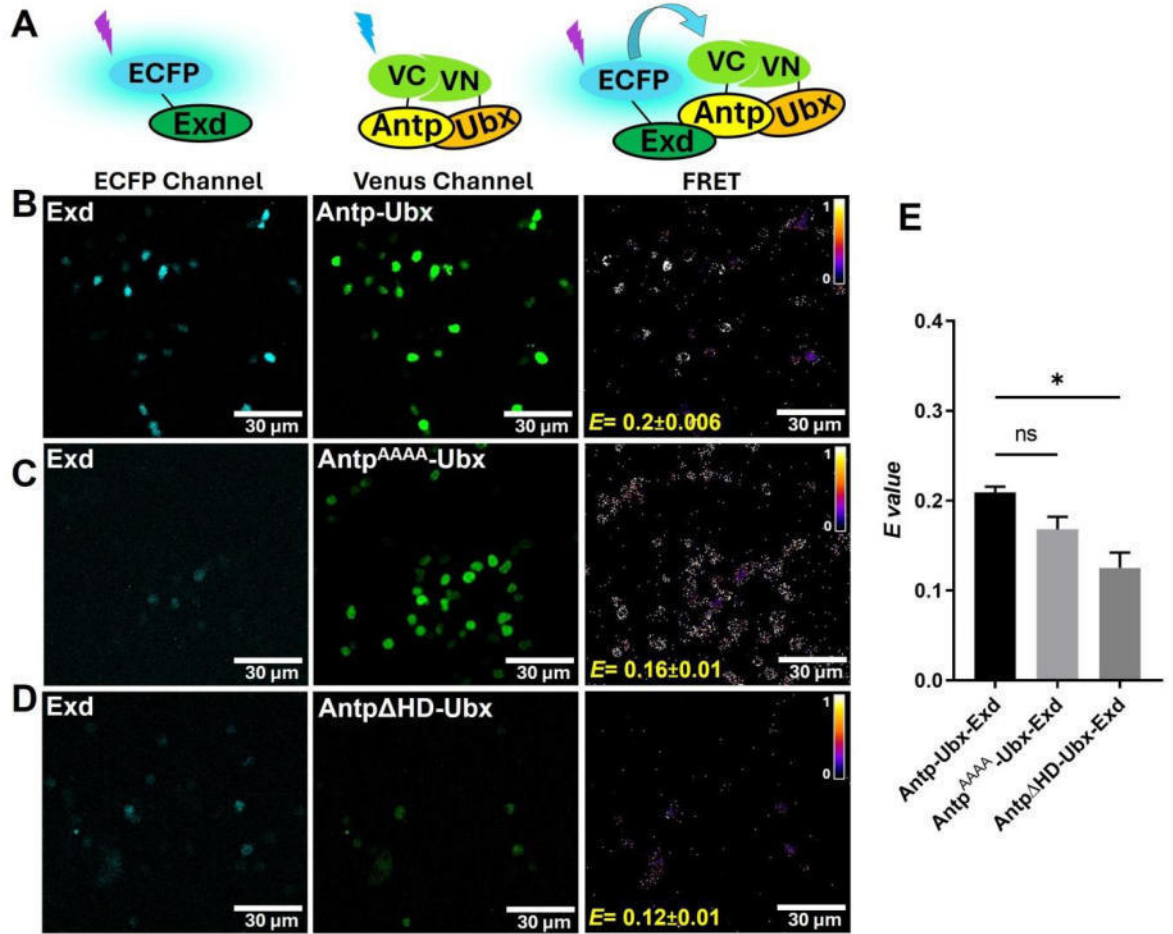


Figura 24. Exd forma complejos triméricos con Antp-Ubx. A) Representación esquemática de Exd fusionado a CFP (ECFP Channel), BiFC producto de la interacción Antp-Ubx (Venus Channel) y la transferencia de energía por la interacción Antp-Ubx/ Exd (FRET). B) Interacción trimérica de Exd con Antp-Ubx ($E=0.2 \pm 0.006$). C) La mutante VC Antp^{AAAA} redujo el valor de E a 0.16 ± 0.01 . D) La interacción de Antp Δ HD-Ubx con Exd mostró un E value de 0.12 ± 0.01 con diferencia significativa. Las barras de color representan la intensidad del FRET (Fire mode) colores más claros indican fuerte interacción trimérica mientras que colores más oscuros, interacción débil. E) Análisis estadístico de tres experimentos FRET independientes usando ANOVA de una vía y Tukey para la comparación de medias, la significancia se muestra con * ($p < 0.05$), las barras de error corresponden al error estándar.

8.6 BIP2 y TFIIIE β no forman complejos triméricos con Antp-Ubx

En contraste, no detectamos complejos triméricos del dímero Antp-Ubx con BIP2 ya que se observó un E value de 0.08 ± 0.0005 (Figura 25B) indicando la falta de transferencia de energía. Además, cuando usamos el plásmido VC Antp^{AAAA} para afectar la interacción dimérica con BIP2, el E value obtenido fue de 0.06 ± 0.004 y no mostró diferencia significativa (Figura 25C y E). También utilizamos el vector VC Antp Δ HD, obteniendo un E value de 0.04 ± 0.001 y sin mostrar

diferencia significativa. Por lo tanto, concluimos que BIP2 en las condiciones analizadas no forma complejos triméricos con Antp y Ubx.

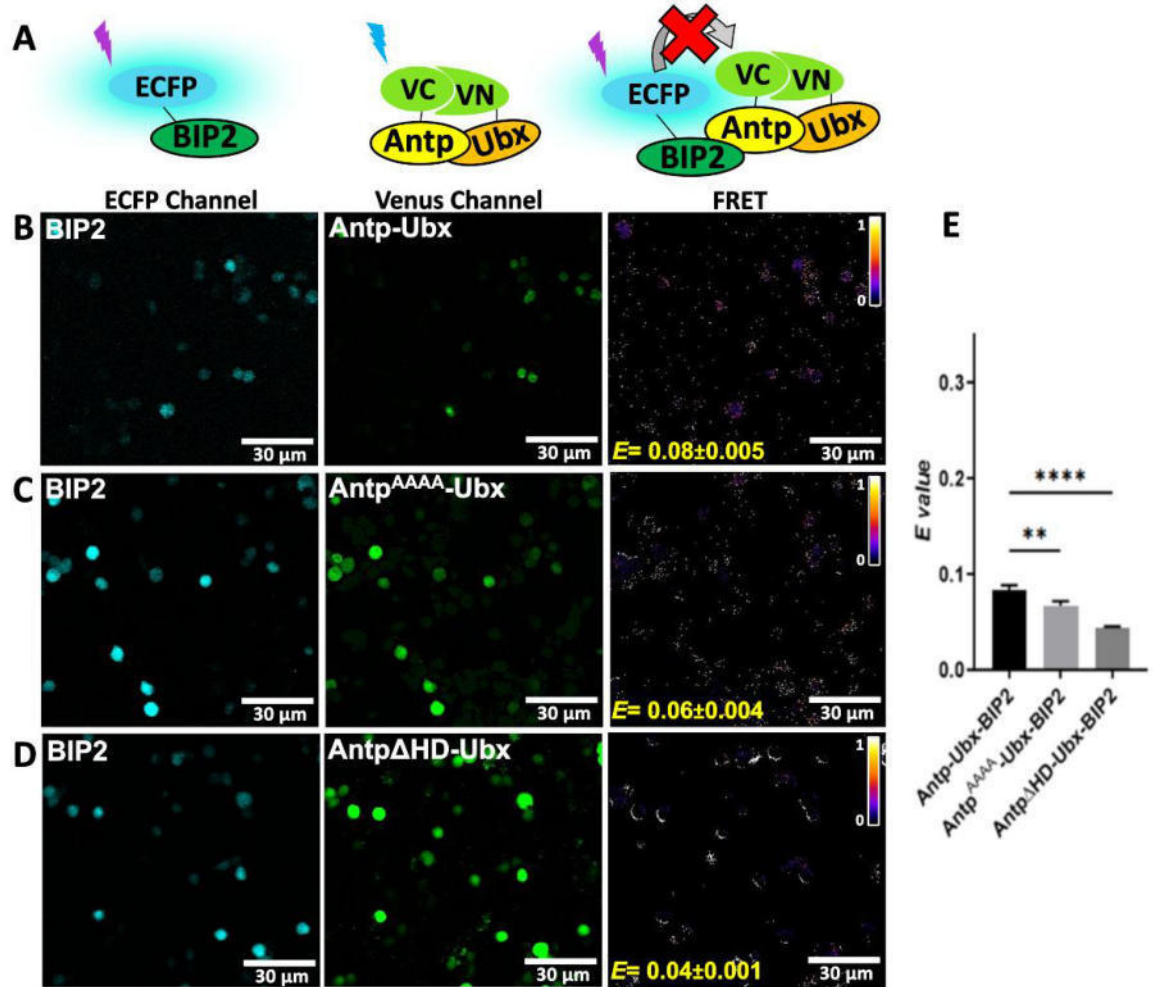


Figura 25. BIP2 no interacciona de forma trimérica con Antp-Ubx mediante BIFC-FRET. A) Representación esquemática de BIP2 fusionado a CFP (ECFP Channel), BiFC debido a la interacción de Antp con Ubx (Venus Channel) y falta de transferencia de energía de BIP2 con el heterodímero Antp-Ubx (FRET). B) BIP2 no interacciona de manera trimérica con Antp y Ubx ($E=0.08 \pm 0.005$). La interacción Antp^{AAAA}-Ubx-BIP2 mostró un valor de E de 0.06 ± 0.004 and y cuando probamos Antp Δ HD, el E value fue 0.04 ± 0.001 . Las barras de color representan la intensidad del FRET (Fire mode); colores más claros indican alta interacción trimérica mientras que colores más oscuros indican bajos niveles de interacción. E) Análisis estadístico de tres experimentos FRET independientes usando ANOVA de una vía y Tukey para la comparación de medias, altamente significativo se muestra con **** ($p < 0.0001$)), las barras de error corresponden al error estándar.

Para analizar si TFIIIE β forma complejos triméricos con Antp y Ubx , co-transfectamos los vectores ECFP- TFIIIE β , VN-Ubx y VC-Antp. El E value obtenido fue de 0.08 ± 0.01 , indicando la falta de transferencia de energía y por lo tanto la ausencia del complejo trimérico (Figura 26).

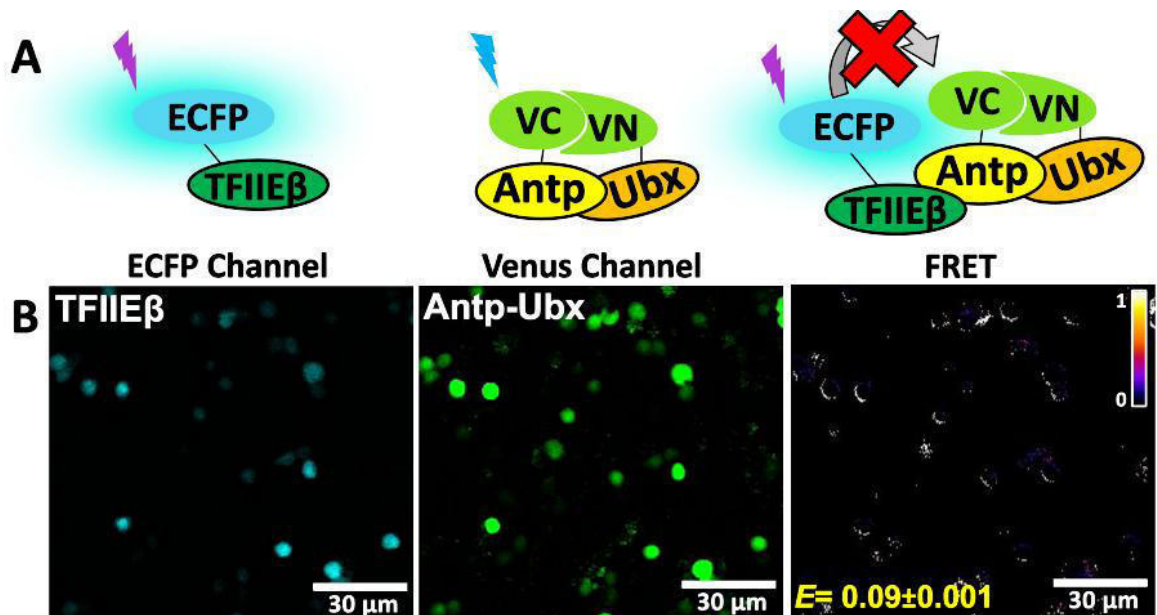


Figura 26. TFIIIEβ no mostró transferencia de energía con el dímero Antp-Ubx. A) Representación esquemática de la proteína de fusión ECFP- TFIIIEβ, la expresión de Venus por el dímero Antp-Ubx y la falta de interacción de TFIIIEβ con Antp-Ubx. B) TFIIIEβ no mostró interacción trimérica con el heterodímero Antp-Ubx al mostrar un *E value* de 0.08 ± 0.01 . Las barras de color representan la intensidad del FRET (Fire mode); colores más claros indican alta interacción trimérica mientras que colores más oscuros indican bajos niveles de interacción.

8.7 Exd y TBP afectan la función ectópica de Antennapedia en la involución de la cabeza

Para analizar la posible función de las interacciones triméricas, realizamos el análisis de cutículas embrionarias donde la expresión ectópica de Antp es dirigida a la cabeza del embrión e inhibe la correcta involución de las estructuras bucales; además causa la pérdida del cinturón de denticulas con transformación del segmento protorácico T1 en T2 en todos los embriones. Analizamos también el efecto de Ubx antes de analizar los trímeros y observamos un 10% de larvas con involución correcta, un 82% con homeosis y un 8% con fenotipo reducido (Fig. 27C). Resultados similares se observaron al expresar el heterodímero Antp-Ubx (Fig. 27D).

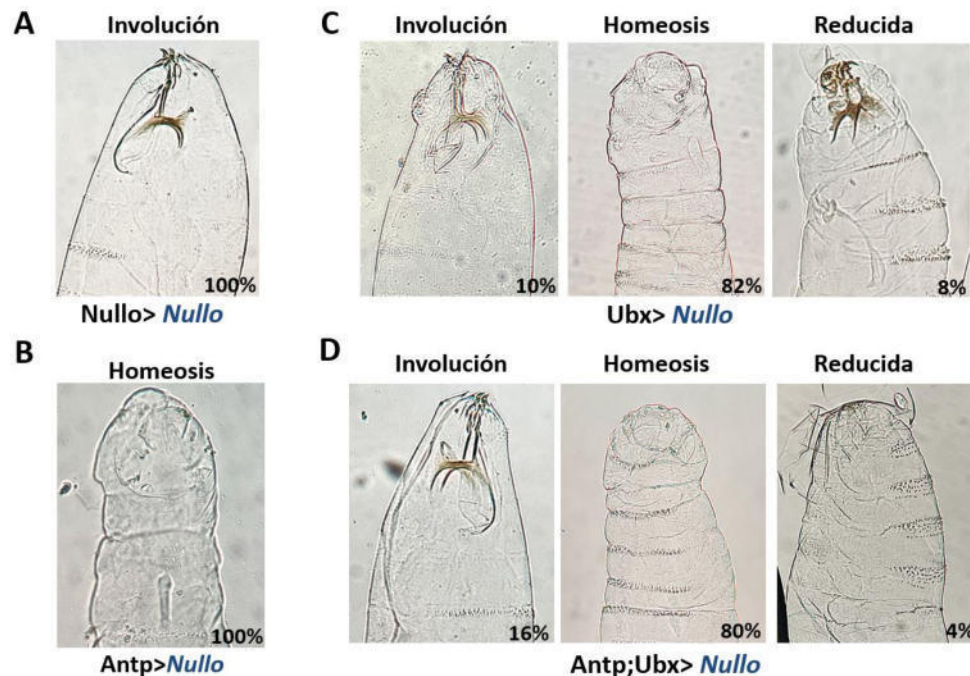


Figura 27. El heterodímero Antp-Ubx afecto la función de Antp en la involución de las estructuras bucales y la cabeza. A) La expresión de *Nullo* no afecta la involución de las estructuras vocales y la cabeza por lo que se observa un fenotipo normal. B) *Antp* causa inhibición de la involución y se observan larvas acefalas además de la transición del segmento protorácico T1 al segmento mesotorácico T2. C) La expresión de *Ubx* redujo el porcentaje de homeosis a un 82% y se observa la transformación de segmentos torácicos a un fenotipo similar al segmento A1. Se observa un fenotipo intermedio en 8% de las larvas. D) La expresión del heterodímero Antp-Ubx afectó la función de *Antp* y redujo el porcentaje de homeosis a un 80%; se observó transformación T1 a T2 así como un 16% de larvas que involucionaron correctamente y un 4% con fenotipo intermedio.

Enseguida analizamos la importancia funcional del trímero Antp-Ubx/TBP. Para ello primero revisamos el efecto de la expresión del dímero Antp-TBP en un ensayo ectópico. Los resultados mostraron que el 80% de las cutículas fallaron en involucionar correctamente y se observó un 10% de larvas con fenotipo wt y otro 10% con fenotipo intermedio. Resultados similares se observaron al sobre-expresar el trímero Antp-Ubx/TBP, mostrando un 80% de larvas con homeosis (Figura 28).

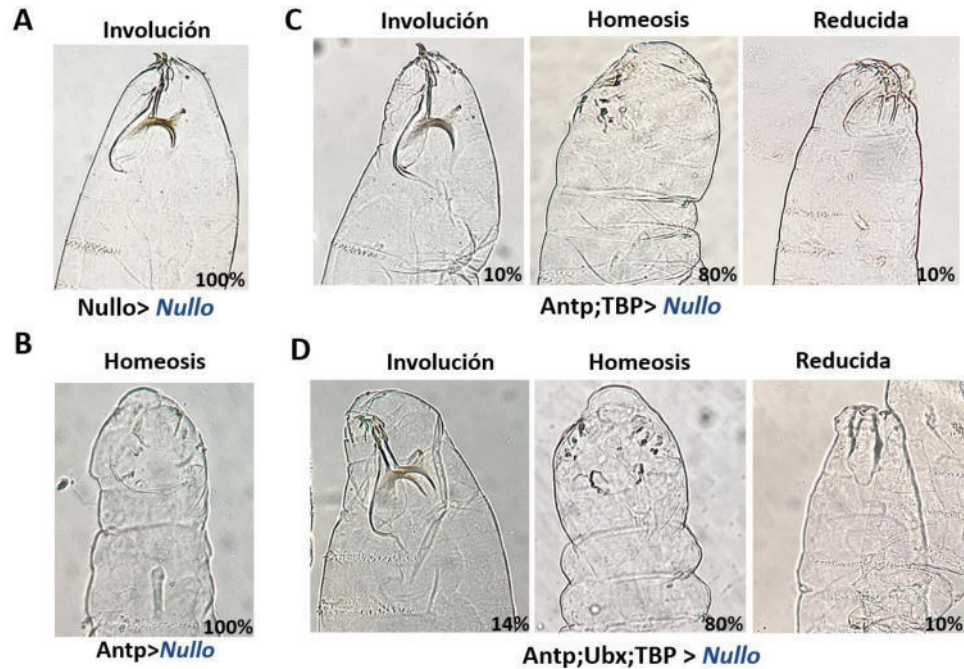


Figura 28. El trímero Antp-Ubx/TBP inhibe la función de Antp en la involución de la cabeza. A) La expresión de *Nullo* no afecta la correcta involución de la cabeza, observando un fenotipo normal B) *Antp* causa inhibición de la involución y se observan larvas acefalas además de transformación del segmento protorácico T1 al segmento mesotorácico T2. C) La expresión de *Antp-TBP* redujo el porcentaje de homeosis a 80% y se observó la transformación T1-T2. 10 de larvas presentaron fenotipo wt y otro 10% fenotipo intermedio. D) la expresión del trímero *Antp-Ubx/TBP* mostro 80% de larvas con homeosis y transformación T1-T2, 14% de las larvas mostraron correcta involución y 6% fenotipo intermedio.

La expresión ectópica del dímero *Antp-Exd* así como del trímero *Antp-Ubx/Exd* dirigidos por *Nullo* mostraron un efecto mayor en la función de *Antp* de inhibir la correcta involución de las estructuras bucales y las cabezas en las larvas ya que el porcentaje de larvas que mostraron homeosis se redujo hasta un 66% en el caso del dímero y hasta un 63% en el caso del trímero (Figura 29).

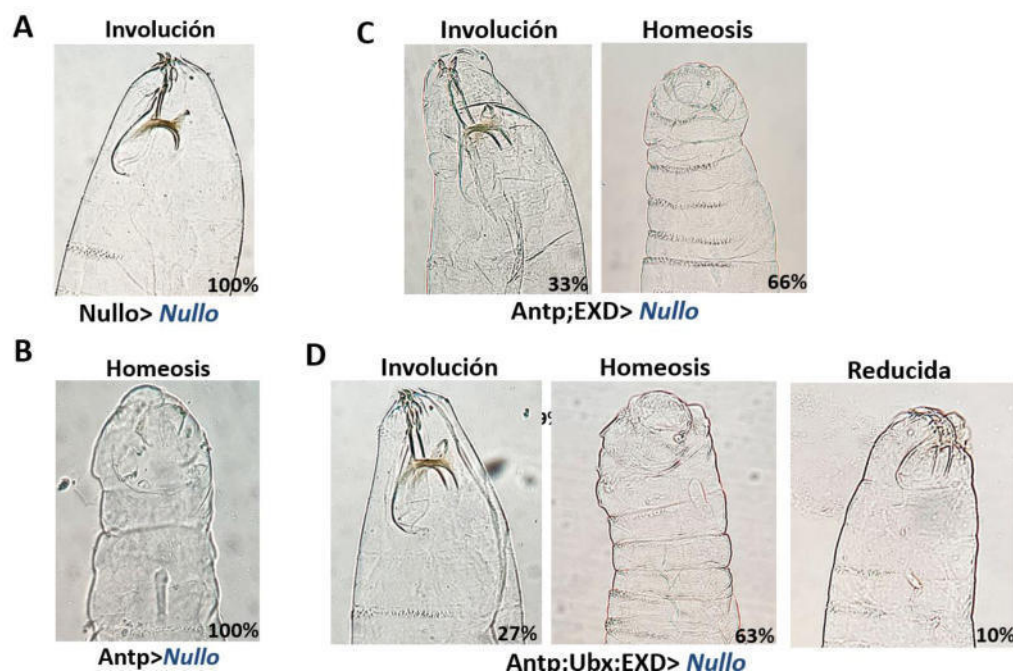


Figura 29. El complejo Antp-Ubx/Exd afecta la función de Antp en las cabezas de las larvas. A) La expresión de *Nullo* no afecta la involución de la cabeza, observando un fenotipo normal B) *Antp* causa inhibición de la involución y se observan larvas acéfalas además de que el segmento protorácico T1 se transformó al segmento mesotorácico T2. C) La expresión de *Antp-Exd* mostró un 66% de larvas con homeosis y transformación T1-T2 fue observada. Además, se obtuvo un 33% de larvas con fenotipo wt. D) la expresión del trímero *Antp-Ubx/Exd* afectó la involución en 63% de las larvas se observe transformación T1-T2. 27% de las larvas presentaron correcta involución y se observe un 10% con fenotipo intermedio.

8.8 El dímero Antp-Ubx y los trímeros Antp-Ubx/TBP/Exd afectan la función de Antp en la transformación antena-pata

También analizamos la función de los trímeros en la transformación antena pata. Para ello expreso el HD de *Antp* como control positivo utilizando el driver *Dll-GAL4* y se observó la transformación (Figura 30B) destacando el fémur, tarso y uña. Al dirigir a *AntpHD* y *UbxHD* juntos, la transformación se vio afectada (Figura 30C), pero se continuaron distinguiendo las estructuras previamente mencionadas. La expresión de *TBP*, como se esperaba no causó transformación y se observó una antena similar a la wt (Figura 30D). El dímero *AntpHD-TBP* tampoco causó transformación (Figura 30E) ni el trímero *Antp-Ubx/TBP* (Figura 30F) indicando la presencia de *TBP*.

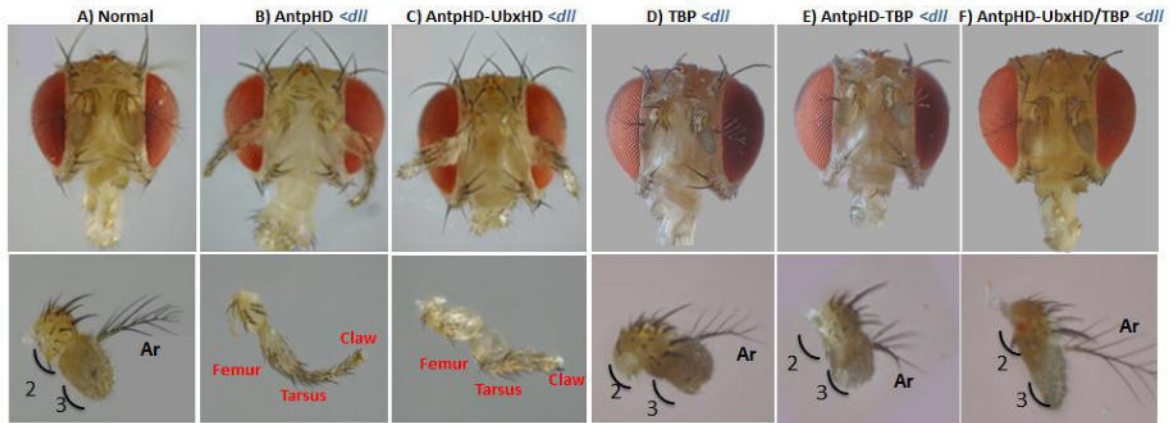


Figura 30. La expresión ectópica de TBP de forma dímérica y trimérica inhibe la transformación antena-pata. A) Se observa una antena con fenotipo normal con los segmentos 2 y 3 bien definidos, así como la arista. B) Se muestra la transformación de la antena por pata con estructuras bien definidas como el fémur, el tarso y la uña. C) El dímero AntpHD-UbxHD redujo el efecto observándose una transformación parcial. D) Se observa una antena tipo wt resultado de la expresión de TBP. E) TBP inhibió la transformación que causa el HD de Antp y se observa una antena tipo wt. F) La expresión del trímero AntpHD-UbxHD/TBP tampoco causó transformación. Los segmentos transformados se resaltan en rojo y los normales con curvas y números negros. 2, segundo segmento antenal; 3, tercer segmento antenal; Ar, arista.

Resultados similares se observaron al expresar ectópicamente al dímero Antp- Exd y el trímero Antp-Ubx/Exd, ya que ambos complejos inhibieron la homeosis antena por pata originada al expresar Antp y se observaron antenas similares a las wt (Figura 31).

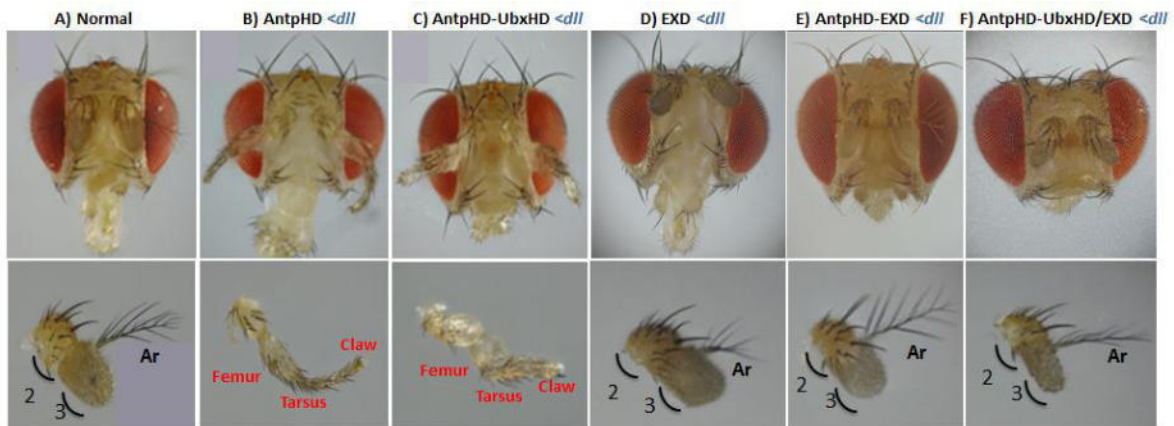


Figura 31. Expresión ectópica de Exd en el dímero y trímero inhibe la transformación antena-pata. A) Se observa una antena con fenotipo normal con los segmentos 2 y 3 bien definidos, así como la arista. B) Se muestra la transformación de la antena por pata con estructuras bien definidas como el fémur, el tarso y la uña. C) El dímero AntpHD-UbxHD redujo el efecto y se observa una transformación parcial. D) Se observa una antena tipo wt resultado de la expresión de Exd. E) Exd inhibió la transformación que causa el HD de Antp y se observa una antena tipo wt. F) La expresión del trímero AntpHD-UbxHD/Exd tampoco causó transformación. Los segmentos transformados se resaltan en rojo y los normales con curvas y números negros. 2, segundo segmento antenal; 3, tercer segmento antenal; Ar, arista.

9. DISCUSIÓN

En el análisis de los dominios involucrados en la interacción de Antennapedia con Ultrabithorax encontramos que la interacción es mediada por las hélices 1 y 2 del HD de Antp, específicamente la posición E19 de la hélice 1 de Antp mostró ser importante en la dicha interacción.

Para determinar los dominios involucrados se realizaron transfecciones en células HEK293 utilizando el Sistema de Complementación Bimolecular Fluorescente. Se analizaron las siguientes versiones mutantes de Antp: Antp Δ HD, Antp Δ H1-H2, Antp Δ H1, lo que permitió concluir que ambas hélices participan en la formación del dímero Antp-Ubx.

El HD ha mostrado ser importante en otras interacciones, por ejemplo, AntpHD es responsable de establecer el heterodímero Antp-Eyeless así como de la homodimerización de Scr, específicamente la posición aminoacídica E19 ubicada en la hélice 1, media estas interacciones (Plaza *et al.*, 2008 y Papadopoulos *et al.*, 2012). La hélice 1 participa en otras interacciones como en la de HOXD8 con HOXA9, mostrando ser importante también en sus actividades transcripcionales (Zappavigna *et al.*, 1994). De igual manera, resultados realizados en nuestro laboratorio mostraron la relevancia del residuo E19 de Antp al interactuar con Ubx, ya que la interacción disminuyó de 89% a 60% (Villarreal-Puente., 2018). Debido a que la interacción no se inhibió por completo, otros residuos aminoacídicos podrían estar involucrados, como los residuos 23 y 25 en la hélice 1, o el residuo 57 en la hélice 3, ya que estos participan al interaccionar *in vitro* con el cofactor Exd (Chan *et al.*, 1994). En el caso del HD de Ubx, los residuos 22 y 24 que están altamente conservados y expuestos, permitiendo postularlos como candidatos a participar en interacciones diméricas (Merabet *et al.*, 2009). La formación del dímero Antp-Ubx podría llevarse a cabo mediante secuestro y así prevenir su unión al ADN en los límites del segundo y terceros segmentos torácicos donde ambas están presentes. Además, ambas proteínas funcionan como activadoras y represoras y comparten dominios de unión al ADN e incluso blancos de regulación (Rosales-Vega *et al.*, 2023, McCormick *et al.*, 1995, Ekker *et al.*, 1994).

Además de las interacciones entre homeoproteínas, se han descrito interacciones con proteínas de la maquinaria de transcripción basal, por ejemplo, CDX1, Sp1, Antp y Ubx interactúan con la proteína de unión a caja TATA, TBP. (Calon *et al.*, 2007, Emili *et al.*, 1994, Jiménez-Mejía *et al.*, 2022, Montalvo-Mendez2024). Este último dímero, se forma a través de las regiones de glutaminas de TBP y el extremo amino terminal de Ubx. A pesar de que Ubx no contiene glutaminas, se ha determinado la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas que son importantes en interacciones diméricas (Hsiao *et al.*, 2014, Carnesecchi *et al.*, 2020) Por su parte, TFIIE β interactúa con la maquinaria de transcripción basal mediante la RNA polimerasa II (Altamirano-Torres *et al.*, 2018, Carnesecchi *et al.*, 2020, Bondos *et al.*, 2006) y esta última con el factor de pausa transcripcional M1BP (Zouaz *et al.*, 2017). De igual forma, tanto Antp como Ubx interaccionan con TFIIE β (Altamirano-Torres *et al.*, 2018, Baeza *et al.*, 2015) y con Exd (Papadopoulus *et al.*, 2011., Merabet *et al.*, 2007).

Debido a lo anterior, nos interesamos en determinar posibles interacciones triméricas que podría estar llevando a cabo el dímero Antp-Ubx. Previamente se detectaron en nuestro laboratorio los complejos triméricos de Antp-TBP con los factores transcripcionales TFIIE β y Exd (Jiménez-Mejía., 2022). Por lo que se analizaron los factores Exd, TFIIE β , TBP y BIP2, determinando las interacciones triméricas entre Antp-Ubx con TBP y Exd.

Estas interacciones triméricas se confirmaron utilizando una batería de mutantes de Antp en las que se deletaron dominios importantes en las interacciones diméricas, resaltando su importancia para que el complejo trimérico se forme, tal es el caso del HD de Antp, ya que ambas interacciones triméricas (Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/Exd) se vieron afectadas al usar el plásmido VC-Antp Δ HD donde el HD de Antp está ausente, el cual ha demostrado ser necesario para que la interacción con Ubx se lleve a cabo mediante la Técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (Kerppola, 2008) tanto *in vitro* en células (Villarreal-Puente, 2018) como *in vivo* en embriones y discos imaginales de *Drosophila* (Villarreal-Puente, 2015).

En el caso del trimero Antp-Ubx-TBP, también se utilizó la mutante VC-AntpHD, la cual tiene deletado el extremo amino terminal y por lo tanto se eliminaron las regiones polyQ, quienes median la interacción Antp-TBP (Jímenez-Mejía *et al.*, 2022) y se observó una reducción significativa en la energía que se transfirió en las proteínas wt. De este modo, confirmamos el establecimiento de la interacción trimérica, utilizando versiones de Antp que inhibían las interacciones diméricas Antp-Ubx y Antp-TBP.

Resultados similares se observaron al utilizar la mutante VC-Antp^{AAAA}, la cual tiene mutágenizado el tetrapéptido YPWM, afectando así la formación del dímero Antp-Exd (Papadopoulos *et al.*, 2011). Sin embargo, de manera interesante, esto no redujo significativamente la formación del trimero. Es importante recordar que Ubx también interacciona con Exd (Passner *et al.*, 1999, Merabet *et al.*, 2007) y que el *tetrapéptido* YPWM de Ubx no se modificó, además de que posee otros dominios importantes en su interacción con Exd como el motivo UbdA (Ortiz-Lombardia *et al.*, 2017). Por lo que probablemente Ubx permaneció en contacto con Exd, permitiendo la transferencia de energía. Lo anterior también indica que el trimero Antp-Ubx/ Exd se forma a través de diversos dominios, entre ellos el HD y la secuencia YPWM, como las interacciones triméricas Antp-Exd o Ubx-Exd con Hth (Gebelein *et al.*, 2002), y la formación del trimero Antp-Ubx/Exd propone la formación de otros complejos involucrando factores que participen en la regulación genética.

Por otro lado, la interacción del trimero de Antp-Ubx con el factor transcripcional TFIIE β mostró un valor de E de 0.08, indicando la falta de interacción. Esto puede ser debido a que tanto Ubx como Antp interaccionan con TFIIE β mediante del HD (Bondos *et al.*, 2004, Baeza *et al.*, 2015 y Altamirano-Torres, *et al.*, 2018) y este dominio ha mostrado ser clave en el dímero Antp-Ubx (Villarreal-Puente, 2015, Villarreal-Puente, 2018), por lo que al formarse este dímero, el cual es irreversible, ya que se reconstituye la proteína fluorescente Venus (Kerppola, 2008), no sería posible la interacción de, ya sea Antp o Ubx con TFIIE β . Sin embargo, también cabe la posibilidad de que la topología no favorezca la interacción (Hudry *et al.*, 2011), por lo que sería valioso modificar las proteínas de fusión, por ejemplo: CFP-Antp, VC-Ubx y VN-TFIIE β , por mencionar

alguna combinación y confirmar si esto es un factor determinante en la formación de este trímero.

Otro factor transcripcional que no formó complejos triméricos con el dímero Antp-Ubx fue BIP2, ya que al utilizar la mutante Antp^{AAAA} la interacción disminuyó, más no significativamente, a pesar de que el motivo YPWM media la interacción dímica Antp-BIP2 (Prince *et al.*, 2008). De la misma manera, al usar la mutante de Antp que carece del HD, la interacción siguió mostrando un valor de *E* menor a 0.1 indicando la ausencia de interacción trimérica. Resultados similares se observaron previamente en el laboratorio al analizar la interacción del dímero Antp-TBP con BIP2 (Jiménez-Mejía *et al.*, 2022) ya que no se observó la formación del trímero. Es importante indicar que la versión de BIP2 utilizada contiene del aminoácido 1 al 89, por lo que esto podría ser un factor a considerar así como la topología de las proteínas de fusión como se mencionó previamente con TFIIE β (Kerpola., 2008).

Para analizar la posible función de los trímeros detectados en esta tesis, se realizaron los ensayos de cutículas embrionarias y de transformación antena-pata. Para ambos ensayos se dirigió la expresión tejido-específica de las proteínas de interés mediante cruzas genéticas usando el driver *Null-GAL4* para dirigir a embriones y *Dll-GAL4* a las antenas de individuos adultos.

Cuando Antp es dirigida a la cabeza del embrión, inhibe la correcta involución de las estructuras bucales; además causa la pérdida del cinturón de dentículas con transformación del segmento protorácico T1 en T2 (Gehring *et al.*, 2009).

Primeramente, se realizó el ensayo dirigiendo la expresión de Ubx en larvas de *Drosophila*; se observó que 82% de larvas fueron acefalas así como que los segmentos torácicos adquirieron fenotipo del segmento abdominal A1 (González-Reyes y Morata 1990 y Mann y Hogness, 1990). Al dirigir el dímero Antp-Ubx se observó también la inhibición de la cabeza en las larvas, pero la transformación T1-T2 fue la que se observó en la mayoría de las larvas (80%) (Mann y Hogness en 1990).

Posteriormente, se analizaron los complejos Antp-Ubx/TBP/ Exd observando que Exd tuvo un mayor efecto en la actividad funcional de Antp que TBP, en la que mostró una

inhibición de la involución de las estructuras bucales, ya que se presentó un 63% de larvas que no involucionaron correctamente las estructuras bucales en contraste con el trímero Antp-Ubx/TBP, el cual mostró resultados similares al dímero Antp-Ubx, con un 80% de larvas con fenotipo similar al de la expresión individual de Antp, por lo que podríamos mencionar que el trímero Antp-Ubx/ Exd rescató el fenotipo wt en 27% de las larvas, ya que se observó un 10% de larvas con fenotipo intermedio. Es importante considerar que se requiere corroborar la expresión de los tres transgenes. En ambos trímeros, se observó la transformación T1 a T2 en las larvas con inhibición de la involución de la cabeza.

En el ensayo de transformación antena-pata ambas proteínas, TBP y Exd, inhibieron la homeosis resultado de expresar Antp. Previamente Altamirano-Torres en el 2018, analizó la interacción entre Antp y TFIIE β y se observó que la inhibición de la involución de la cabeza se mantuvo, así mismo ocurrió con la transformación antena-pata, indicando que TFIIE β propició dicho efecto.

En el caso de las interacciones triméricas analizadas en esta tesis, describimos previamente que al expresar Ubx junto con Antp, la transformación se ve ligeramente afectada (Villarreal-Puente *et al.*, 2018), pero al expresar los complejos triméricos las transformaciones homeóticas se inhiben, indicando probablemente que al interaccionar Antp con Ubx y Exd o TBP, no le sea posible regular la expresión de los genes blanco que culminan en la formación de la pata, recordando que esta función de Antp es ectópica, ya que se dirige a un lugar donde normalmente no se expresa como lo es la cabeza de *Drosophila* (Struhl, 1982), por lo que sería valioso analizar que efecto podrían presentar estos trímeros en otros panoramas como por ejemplo en la transactivación de Antp o bien en la regulación de sus genes blanco.

10.CONCLUSIONES

- Las hélices 1 y 2 así como la posición E19 de la hélice 1 de AntpHD es participan en la interacción dimérica Antp-Ubx.
- Se determinó la formación de los complejos triméricos de Antp-Ubx con TBP y Exd con valores de $E=0.18$ y $E=0.2$ respectivamente, las cuales fueron corroboradas con el uso de las mutantes Antp Δ HD, VC-AntpHD y Antp^{AAAA} que afectan la formación de los dímeros Antp-Ubx, Antp-TBP y Antp- Exd respectivamente.
- Antp y Ubx no mostraron la formación de complejos triméricos con BIP2 ni con TFIIE β al mostrar un valor de $E=0.09$ y 0.08 , respectivamente.
- El trímero Antp-Ubx/TBP mantuvo la función homeótica de Antp en 80% de las larvas analizadas, observando 10% de larvas con fenotipo wt y 10% con fenotipo intermedio.
- Al expresar el trímero Antp-Ubx/ Exd la función homeótica de Antp fue inhibida en 27% de las larvas, observando un 63% de larvas con transformaciones homeóticas y un 10% con fenotipo intermedio.
- La expresión ectópica de los trímeros Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/ Exd inhibieron el efecto de AntpHD en la transformación antena-pata en *Drosophila*.

11.PERSPECTIVAS

La realización de la presente tesis demostró por primera vez la participación del dímero Antp-Ubx en complejos triméricos con los factores transcripcionales TBP y Exd en cultivo celular. De la misma manera, se concluyó que dichos complejos triméricos afectaron la función homeótica de Antp en transformaciones torácicas y de antena pata en *Drosophila melanogaster*, abriendo la opción del estudio de los siguientes puntos

- Dirigir la expresión ectópica de las proteínas involucradas en la formación de los complejos triméricos Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/ Exd *in vivo* en *D. melanogaster* mediante BiFC-FRET.
- Determinar la formación de los trímeros Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/Exd de manera endógena en *D. melanogaster* mediante BiFC-FRET.
- Verificar la regulación de los genes blanco de Antp por los complejos triméricos Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/Exd.
- Analizar la formación de los complejos trímericos Antp-Ubx/TFIIE β y BIP2 realizando variaciones en la topología.
- Determinar la participación de dominios proteicos de Ubx en la formación de los trímeros Antp-Ubx/TBP y Antp-Ubx/Exd, así como el HD, YPWM y UbdA

El estudio a nivel molecular más fino de las interacciones triméricas de Antp-Ubx con TBP y Exd proporcionará importante información respecto a complejos proteicos implicados en la actividad transcripcional de Antennapedia en el desarrollo del embrión de *D. melanogaster*.

12.REFERENCIAS

- Altamirano-Torres, C., Salinas-Hernández, J. E., Cárdenas-Chávez, D. L., Rodríguez-Padilla, C., & Reséndez-Pérez, D. (2018). Transcription factor TFIIE β interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in *Drosophila*. *PLoS One*, 13(10), e0205905. doi:10.1371/journal.pone.0205905
- Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., ... Merabet, S. (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *eLife*, 4. doi:10.7554/eLife.06034
- Beh, C. Y., El-Sharnouby, S., Chatzipli, A., Russell, S., Choo, S. W., & White, R. (2016). Roles of cofactors and chromatin accessibility in Hox protein target specificity. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1), 1. doi:10.1186/s13072-015-0049-x
- Bondos, S. E., Catanese, D. J., Jr, Tan, X.-X., Bicknell, A., Li, L., & Matthews, K. S. (2004). Hox transcription factor ultrabithorax Ib physically and genetically interacts with disconnected interacting protein 1, a double-stranded RNA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26433–26444. doi:10.1074/jbc.M312842200
- Bondos, S. E., Tan, X.-X., & Matthews, K. S. (2006). Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell

signaling proteins. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5(5), 824–834. doi:10.1074/mcp.M500256-MCP200

Boube, M., Hudry, B., Immarigeon, C., Carrier, Y., Bernat-Fabre, S., Merabet, S., ... Cribbs, D. L. (2014). Drosophila melanogaster Hox transcription factors access the RNA polymerase II machinery through direct homeodomain binding to a conserved motif of mediator subunit Med19. *PLoS Genetics*, 10(5), e1004303. doi:10.1371/journal.pgen.1004303

Carnesecchi, J., Boumpas, P., van Nierop Y Sanchez, P., Domsch, K., Pinto, H. D., Borges Pinto, P., & Lohmann, I. (2022). The Hox transcription factor Ultrabithorax binds RNA and regulates co-transcriptional splicing through an interplay with RNA polymerase II. *Nucleic Acids Research*, 50(2), 763–783. doi:10.1093/nar/gkab1250

Carnesecchi, J., Pinto, P. B., & Lohmann, I. (2018). Hox transcription factors: an overview of multi-step regulators of gene expression. *The International Journal of Developmental Biology*, 62(11–12), 723–732. doi:10.1387/ijdb.180294il

Carnesecchi, J., Sigismondo, G., Domsch, K., Baader, C. E. P., Rafiee, M.-R., Krijgsveld, J., & Lohmann, I. (2020). Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity. *Nature Communications*, 11(1), 1388. doi:10.1038/s41467-020-15223-x

- Chan, S. K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J., & Mann, R. S. (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell*, 78(4), 603–615. doi:10.1016/0092-8674(94)90525-8
- Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A. P., Frankel, N., Wang, S., ... Stern, D. L. (2015). Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell*, 160(1–2), 191–203. doi:10.1016/j.cell.2014.11.041
- Delker, R. K., Ranade, V., Loker, R., Voutev, R., & Mann, R. S. (2019). Low affinity binding sites in an activating CRM mediate negative autoregulation of the Drosophila Hox gene Ultrabithorax. *PLoS Genetics*, 15(10), e1008444. doi:10.1371/journal.pgen.1008444
- Duffraisse, M., Paul, R., Carnesecchi, J., Hudry, B., Banreti, A., Reboulet, J., ... Merabet, S. (2020). Role of a versatile peptide motif controlling Hox nuclear export and autophagy in the Drosophila fat body. *Journal of Cell Science*, 133(18), jcs.241943. doi:10.1242/jcs.241943
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E., & Beachy, P. A. (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. *The EMBO Journal*, 13(15), 3551–3560. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06662.x

- Emili, A., Greenblatt, J., & Ingles, C. J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1582–1593. doi:10.1128/mcb.14.3.1582-1593.1994
- Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Maté, M. J., Vincentelli, R., Hainaut, M., Berenger, H., ... Graba, Y. (2015). A flexible extension of the *Drosophila* ultrabithorax homeodomain defines a novel Hox/PBC interaction mode. *Structure (London, England: 1993)*, 23(2), 270–279. doi:10.1016/j.str.2014.12.011
- Galant, R., Walsh, C. M., & Carroll, S. B. (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development (Cambridge, England)*, 129(13), 3115–3126. doi:10.1242/dev.129.13.3115
- García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundation Symposium*, 0(29), 161–182. doi:10.1002/9780470720110.ch8
- Garcia-Bellido, A. (1977). Homoeotic and atavic mutations in insects. *American Zoologist*, 17(3), 613–629. doi:10.1093/icb/17.3.613
- Gebelein, B., Culi, J., Ryoo, H. D., Zhang, W., & Mann, R. S. (2002). Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Developmental Cell*, 3(4), 487–498. doi:10.1016/s1534-5807(02)00257-5

- Gehring, W. J., Kloter, U., & Suga, H. (2009). Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 35–61. doi:10.1016/S0070-2153(09)88002-2
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., ... & Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78(2), 211-223.
- González-Reyes, A., & Morata, G. (1990). The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell*, 61(3), 515–522. doi:10.1016/0092-8674(90)90533-k
- Graba, Y., Aragnol, D., & Pradel, J. (1997). Drosophila Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 19(5), 379–388. doi:10.1002/bies.950190505
- Heinemann, J. A. (1993). Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species. William Bateson. *The Quarterly Review of Biology*, 68(3), 429–430. doi:10.1086/418200
- Hsiao, H.-C., Gonzalez, K. L., Catanese, D. J., Jr, Jordy, K. E., Matthews, K. S., & Bondos, S. E. (2014). The intrinsically disordered regions of the Drosophila melanogaster Hox protein ultrabithorax select interacting proteins based

on partner topology. *PLoS One*, 9(10), e108217.
doi:10.1371/journal.pone.0108217

Hudry, B., Remacle, S., Delfini, M.-C., Rezsöházy, R., Graba, Y., & Merabet, S. (2012). Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. *PLoS Biology*, 10(6), e1001351. doi:10.1371/journal.pbio.1001351

Hudry, B., Viala, S., Graba, Y., & Merabet, S. (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biology*, 9(1), 5. doi:10.1186/1741-7007-9-5

Jiménez-Mejía, G., Montalvo-Méndez, R., Hernández-Bautista, C., Altamirano-Torres, C., Vázquez, M., Zurita, M., & Reséndez-Pérez, D. (2022). Trimeric complexes of Antp-TBP with TFIIE β or Exd modulate transcriptional activity. *Hereditas*, 159(1), 23. doi:10.1186/s41065-022-00239-8

Johnson, F. B., Parker, E., & Krasnow, M. A. (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 739–743. doi:10.1073/pnas.92.3.739

Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K. R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., ... Taipale, J. (2015). DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their

binding specificity. *Nature*, 527(7578), 384–388.
doi:10.1038/nature15518

Kannan, R., Berger, C., Myneni, S., Technau, G. M., & Shashidhara, L. S. (2010). Abdominal-A mediated repression of Cyclin E expression during cell-fate specification in the *Drosophila* central nervous system. *Mechanisms of Development*, 127(1–2), 137–145. doi:10.1016/j.mod.2009.09.008

Kaplan, T., Li, X.-Y., Sabo, P. J., Thomas, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Biggin, M. D., & Eisen, M. B. (2011). Quantitative models of the mechanisms that control genome-wide patterns of transcription factor binding during early *Drosophila* development. *PLoS Genetics*, 7(2), e1001290. doi:10.1371/journal.pgen.1001290

Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), 465–487. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565–570. doi:10.1038/276565a0

Li, G., & Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(2), 175–186. doi:10.1016/j.gde.2011.01.022

- Mann, R. S., & Hogness, D. S. (1990). Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell*, 60(4), 597–610. doi:10.1016/0092-8674(90)90663-y
- Mann, Richard S., Lelli, K. M., & Joshi, R. (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 63–101. doi:10.1016/S0070-2153(09)88003-4
- McCormick, A., Coré, N., Kerridge, S., & Scott, M. P. (1995). Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene. *Development (Cambridge, England)*, 121(9), 2799–2812. doi:10.1242/dev.121.9.2799
- Merabet, S., & Mann, R. S. (2016). To be specific or not: The critical relationship between Hox and TALE proteins. *Trends in Genetics: TIG*, 32(6), 334–347. doi:10.1016/j.tig.2016.03.004
- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M., & Graba, Y. (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16946–16951. doi:10.1073/pnas.0705832104
- Moens, C. B., & Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental Biology*, 291(2), 193–206. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.032

- Montalvo-Méndez, R. J., Cárdenas-Tueme, M., & Reséndez-Pérez, D. (2024). *Drosophila* in the study of hTBP protein interactions in the development and modeling of SCA17. *Gaceta Medica de Mexico*, 160(1), 1–8. doi:10.24875/GMM.M24000845
- Ortiz-Lombardia, M., Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Saurin, A. J., & Graba, Y. (2017). Hox functional diversity: Novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(4), 1600246. doi:10.1002/bies.201600246
- Papadopoulos, D. K., Skouloudaki, K., Adachi, Y., Samakovlis, C., & Gehring, W. J. (2012). Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 367(1), 78–89. doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.021
- Passner, J. M., Ryoo, H. D., Shen, L., Mann, R. S., & Aggarwal, A. K. (1999). Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, 397(6721), 714–719. doi:10.1038/17833
- Pavlopoulos, A., & Akam, M. (2011). Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2855–2860. doi:10.1073/pnas.1015077108

- Plaza, S., Prince, F., Adachi, Y., Punzo, C., Cribbs, D. L., & Gehring, W. J. (2008). Cross-regulatory protein-protein interactions between Hox and Pax transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13439–13444. doi:10.1073/pnas.0806106105
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C., & Graba, Y. (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development (Cambridge, England)*, *142*(7), 1212–1227. doi:10.1242/dev.109785
- Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., & Mann, R. S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*, *91*(2), 171–183. doi:10.1016/s0092-8674(00)80400-6
- Rosales-Vega, M., Reséndez-Pérez, D., Zurita, M., & Vázquez, M. (2023). TnaA, a trithorax group protein, modulates wingless expression in different regions of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Scientific Reports*, *13*(1), 15162. doi:10.1038/s41598-023-42169-z
- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., & Mann, R. S. (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development (Cambridge, England)*, *126*(22), 5137–5148. doi:10.1242/dev.126.22.5137

- Scott, M. P., Tamkun, J. W., & Hartzell, G. W., 3rd. (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 989(1), 25–48. doi:10.1016/0304-419x(89)90033-4
- Shanmugam, K., Green, N. C., Rambaldi, I., Saragovi, H. U., & Featherstone, M. S. (1999). PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7577–7588. doi:10.1128/MCB.19.11.7577
- Struhl, G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), 7380–7384. doi:10.1073/pnas.79.23.7380
- The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1 BP to regulate gene transcription.* (n.d.).
- The Role of Affinity and Arrangement of Transcription Factor Binding Sites in Determining Hox-regulated Gene Expression Patterns.* (n.d.).
- Wiegmann, B. M., Yeates, D. K., Thorne, J. L., & Kishino, H. (2003). Time flies, a new molecular time-scale for brachyceran fly evolution without a clock. *Systematic Biology*, 52(6), 745–756. doi:10.1093/sysbio/52.6.745
- Wunderlich, Z., & Mirny, L. A. (2009). Different gene regulation strategies revealed by analysis of binding motifs. *Trends in Genetics: TIG*, 25(10), 434–440. doi:10.1016/j.tig.2009.08.003

Zappavigna, V., Sartori, D., & Mavilio, F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes & Development*, 8(6), 732–744. doi:10.1101/gad.8.6.732

Zhu, A., & Kuziora, M. A. (1996). Homeodomain interaction with the β subunit of the general transcription factor TFIIE. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 20993–20996. doi:10.1074/jbc.271.35.20993

ANEXO 1

Villarreal-Puente et al. *Hereditas* (2024) 161:25
<https://doi.org/10.1186/s41065-024-00327-x>

Hereditas

RESEARCH

Open Access



Novel Antennapedia and Ultrabithorax trimeric complexes with TBP and Exd regulate transcription

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

Abstract

Background Hox proteins interact with DNA and many other proteins, co-factors, transcriptional factors, chromatin remodeling components, non-coding RNAs and even the extracellular matrix that assembles the Hox complexes. The number of interacting partners continues to grow with diverse components and more transcriptional factors than initially thought. Hox complexes present many activities, but their molecular mechanisms to modulate their target genes remain unsolved.

Results In this paper we showed the protein-protein interaction of Antp with Ubx through the homeodomain using BiFC in *Drosophila*. Analysis of Antp-deletional mutants showed that AntpHD helices 1 and 2 are required for the interaction with Ubx. Also, we found a novel interaction of Ubx with TBP, in which the PolyQ domain of TBP is required for the interaction. Moreover, we also detected the formation of two new trimeric complexes of Antp with Ubx, TBP and Exd using BiFC-FRET; these proteins, however, do not form a trimeric interaction with BIP2 or TFIIIEβ. The novel trimeric complexes reduced Antp transcriptional activity, indicating that they could confer specificity for repression.

Conclusions Our results increase the number of transcriptional factors in the Antp and Ubx interactomes that form two novel trimeric complexes with TBP and Exd. We also report a new Ubx interaction with TBP. These novel interactions provide important clues of the dynamics of Hox-interacting complexes involved in transcriptional regulation, contributing to better understand Hox function.

Keywords Antp, UBX, TBP, Exd, Trimeric complexes, BiFC-FRET

[†]Alely Villarreal-Puente and Claudia Altamirano-Torres contributed equally to this work.

*Correspondence:
Diana Reséndez-Pérez
diana.resendezp@uanl.edu.mx

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

²Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

³Instituto de Biotecnología, Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Introduction

Hox genes are master transcriptional factors that specify the antero-posterior axis of metazoans; they contain the highly conserved homeodomain (HD) responsible for DNA binding and target gene expression control [1, 2]. Despite the high structural and DNA-binding similarity of the HDs, homeoproteins achieve great levels of specificity to precisely regulate their target genes [3]. Such functional specificity is acquired via protein-protein interactions (PPIs), particularly, Extradenticle (Exd) interacts with homeoproteins through the YPWM motif, modifying their DNA-binding selectivity [4]. Several Hox interactors have been identified including diverse transcription factors (TFs), chromatin remodeling complexes, non-coding RNAs and even extracellular matrix [5]. Other important interacting partners are the homeoproteins themselves such as the homodimerization of Scr and Abda as well as Abda-Ubx heterodimerization in vivo [6, 7].

Transcription regulation by homeoproteins at the RNA Pol II basal machinery is of particular interest, and specific interactions have been identified. Antennapedia (Antp) interacts with BIP2 (also known as TAF₁₁₅, TAF3 in the *Drosophila* TFIID complex) through the YPMW motif, with TFIIE β via the HD and with TBP through polyQ stretches [8–10]. Ubx is linked to the basal machinery by its direct interaction with the RNA Pol II through the N51 residue of the HD [11]. A systematic analysis revealed a Ubx tissue-specific interactome in *Drosophila melanogaster* embryos with partners including chromatin remodelers and translation regulators [12]. In addition, protein complexes have also involved homeoproteins, cofactors and General Transcription Factors (GTFs); Exd and Homothorax (Hth) interact with MEIS-PBX in vitro, and Antp forms trimeric complexes with TBP-TFIIE β or TBP-Exd which also modulate the Antp transcriptional functions in living cells [10, 13]. All these data clearly point to diverse and tissue-specific Hox interactomes for functional specificity. The diversity of interactors as well as the complexity of Hox protein-protein associations plainly indicates that homeoproteins recruit specific GTFs or cofactors and arrange complexes to modulate their target genes during development.

Here, we dissected the interaction of Antp with Ubx showing that helices 1 and 2 of Antp, as well as residue E19 of helix 1, are involved in the interaction. Also, a novel interaction of Ubx with TBP was established,

in transcriptional regulation, and thus contribute to better understand Hox function in development.

Results

Antp and Ubx interaction through HD

To determine the interaction between Antp and Ubx we performed Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) in *Drosophila* embryos and imaginal discs using the UAS/Gal4 system. For BiFC assays, Antp and Ubx were fused either to N-terminal or C-terminal halves of the fluorescent protein Venus (VN and VC). The interaction of Antp with Ubx brings Venus fragments together, reconstituting the fluorescence. Co-expression of Antp and Ubx full-length (FL) proteins revealed interaction (Venus green fluorescence) in embryos under *nullo*-, *antp*- and *ptc*-Gal4 drivers (Fig. 1A). The HDs of Antp and Ubx showed BiFC fluorescence signal in embryos (*nullo*-, *antp*- and *ptc*-Gal4) and imaginal discs under *dll*-Gal4 indicating that the HDs are sufficient for the interaction in vivo (Fig. 1B–C). Our results clearly demonstrate that the HD is directly involved in Antp-Ubx interaction in *Drosophila*.

Antp HD helix 1 and 2 are required for the interaction with Ubx

Since the HD is required for Antp-Ubx interaction in vivo, we next performed BiFC assays in a HEK293 cell line to further analyze the putative domains involved in the interaction. To determine the regions required for the interaction, we used a battery of Antp and Ubx mutants previously reported (Fig. 2A and S2; 14,9) and the newly constructed Ubx^{FLG} (Fig. 2A). As expected, Antp-Ubx interaction was found in 89% of the transfected cells using FL proteins (Fig. 2B and S1A). Deletion of Antp HD (Antp Δ HD) greatly decreased the interaction to 6% (Fig. 2B) compared to Antp-Ubx interaction (Fig. 2B and S1), indicating that the Antp HD is required for the interaction with Ubx in living cells. According to this, the HDs from both proteins (AntpHD and UbxHD) showed a significant increase of interaction to 96% (Fig. 2B and S1) compared to FL proteins. Next, we aimed to identify the specific region of Antp HD involved in its interaction with Ubx using Antp mutants. Absence either of helix 1 (Antp Δ H1), or both helix 1 and 2 (Antp Δ H1-2) significantly decreased the interaction with Ubx to 24% and 12% respectively (Fig. 2B and S1). These findings suggest that Antp HD helices 1 and 2 are involved in this

in which the PolyQ domain of TBP is required for the interaction. Furthermore, we established the new Antp trimeric complexes with Ubx-TBP and Ubx-Exd, which reduced Antp transcriptional activity. By increasing the Antp and Ubx interactomes, our results provide important clues of Hox protein complexes dynamics involved

interaction.

Glutamic acid (E) at position 19 of the Antp HD is important for its functions and interactions. It was shown earlier that replacing the glutamate to glycine (G) interferes with the interaction between Hox and Pax proteins [7, 14]. The E is within the highly conserved HD motif TLELEKEE, which is shared by Antp and Ubx at identical

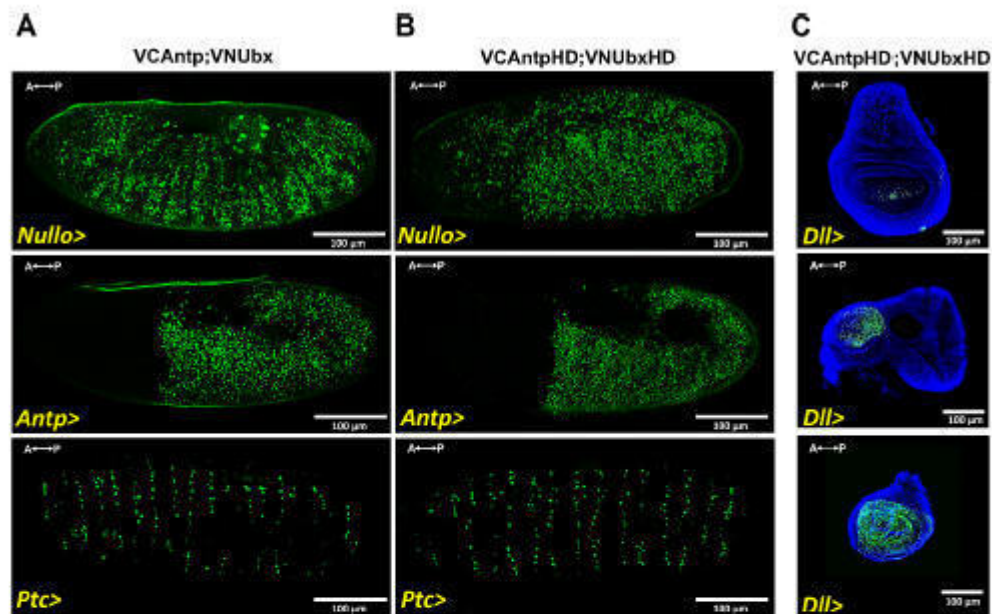


Fig. 1 The Antp and Ubx HDs are directly involved in the interaction in *Drosophila*. **A**) Antp-Ubx FL interaction was detected by co-expression using *nullo*, *antp*- and *ptc*-Gal4 drivers in embryos (green fluorescence). **B**) Interaction between Antp and Ubx HDs was detected in embryos. **C**) HDs Antp-Ubx interaction was detected in the eye-antenna, wing, and leg imaginal discs using the *dll*-Gal4 driver. DAPI staining (blue) was used for whole disc visualization. Anterior and posterior axes are indicated in the left superior corner. Scale bar, 100 μ m

positions. Therefore, we further analyzed the AntpHD^{E19G} and Ubx^{E19G} mutants in BiFC assays. The single mutant AntpHD^{E19G} showed a significant reduction of the interaction with Ubx to 60%, in contrast with Ubx^{E19G} which showed no effect in the interaction with Antp, maintaining 86% of BiFC positive cells (Fig. 2B and S1A), pointing out that Ubx E19 position is not required for this interaction. Co-transfection of both single mutants AntpHD^{E19G}-Ubx^{E19G} showed an interaction of 67%, similar to AntpHD^{E19G}, indicating that specifically the Antp position E19 on helix 1 is important for the interaction with Ubx.

We previously demonstrated Antp-TBP interaction by BiFC [10], and we wondered whether Ubx also interacts with TBP. BiFC assays in cell culture showed that TBP interacts with Ubx in 70% of transfected cells (Fig. 2C and S1B). Since the functional relevance of the

essential for its transcriptional activity [15], we proved that UbxHD affected its interaction with TBP, decreasing to 41% (Fig. 2C and S1B). According to this, using both TBP Δ Q and UbxHD mutant versions showed a significant decrease to 15% (Fig. 2C and S1B). Taken together, these results indicate that DNA binding domains in TBP and Ubx do not mediate the TBP-Ubx interaction, but rather their N-terminal domains as the PolyQ domain of TBP or the UbxA region in Ubx C-terminal.

Antp forms trimeric complexes with Ubx and TBP

Given that TBP interacts through its PolyQ region with Antp and Ubx, we next tested the hypothesis of a putative formation of trimeric complexes. We used the BiFC-FRET approach that was previously standardized in cell culture [10] with the reconstitution of the fluorescent protein Venus by BiFC interaction (VCAntp-VNUbx)

N-terminal located PolyQ stretch in TBP has been previously demonstrated, as well as its role in TBP-Antp interaction, we also tested if the TBP version without the PolyQ stretch affected its interaction with Ubx; this TBP mutant showed a decrease in BiFC interaction to 34% (Fig. 2C and S1B). Additionally, as it has been previously reported that N-terminal regions in Ubx are

used as acceptor and TBP fused to ECFP as donor (Fig. 3A). In a trimeric complex, the ECFP donor is in close proximity to the acceptor and catalyzes an energy transfer, which can be visualized by confocal microscopy as signal intensity and calculated and represented as an E -value. A trimeric complex of TBP with Antp-Ubx was clearly shown with a high E value of 0.18 ± 0.006 (Fig. 3B).

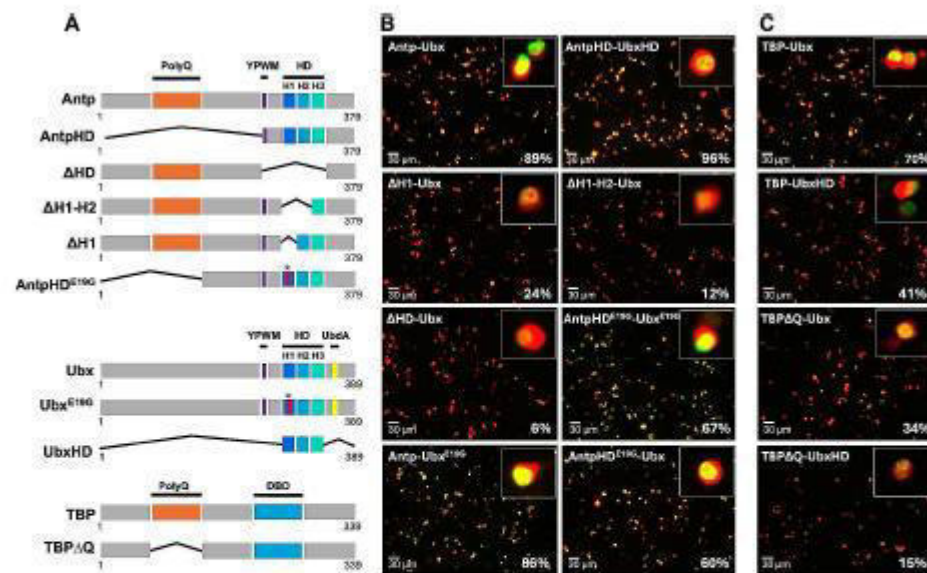


Fig. 2 Antp HD helices 1, 2 and PolyQ domain of TBP are necessary for interaction with Ubx. **A** Schematic representation of the Antp, Ubx and TBP wild type and mutants cloned downstream of Venus halves in pC52-VC155 (VC), and pC52-VNm9 (VN). Antp, Ubx and TBP regions are indicated as PolyQ, YPWM motif, homeodomain (HD), UbxA motif and DNA binding domain (DBD). Deletions are represented as black lines and site-directed mutagenesis of helix 1 residue 19 with an asterisk (*). **B** BiFC assays in the HEK293 cell line showing protein-protein interactions between Antp-Ubx and Ubx-TBP FL versions (Venus complementation in green). Antp deletion of HD or helices 1 and 2 and Antp^{E19G} affect the interaction with Ubx, while Ubx^{E19G} version had no effect. **C** Protein-protein interaction between TBP and Ubx by BiFC. Deletion of the N- and C-term of the Ubx as well as the PolyQ domain of TBP strongly affect the interaction. pCAG-mCherry was co-transfected as internal control (red fluorescence). Scale bar, 30 μm.

To validate this trimer formation, we prevent the Antp dimeric interactions using specific mutants. Disruption of the Antp-TBP interaction by PolyQ absence in AntpHD caused a significant reduction of trimer formation ($E=0.08 \pm 0.01$; Fig. 3C and E). Similarly, when we disrupted the Antp-Ubx dimer with AntpΔHD

dimer also showed a significant decrease of FRET signal ($E=0.12 \pm 0.01$; Fig. 4D and E). Our results confirmed that Exd forms trimeric complexes with Antp and Ubx.

In contrast, we did not detect formation of Antp-Ubx trimeric complexes with BIP2 and TFIIIEβ. The BiFC-FRET analysis showed BIP2 and TFIIIEβ E values of

there was significant reduction on the trimeric complex ($E=0.05\pm0.003$; Fig. 3D and E). The trimer E value declined due to interaction disruption that surely validated the Antp trimeric complex with Ubx and TBP in cell culture.

Trimeric complexes of Antp with Ubx and Exd

We also tested whether Antp-Ubx interacted in a trimeric way with Exd fused to ECFP as donor (Fig 4A). Results indicate the formation of an Antp-Ubx-Exd trimeric complex ($E=0.2\pm0.006$; Fig. 4B). To confirm this interaction, we disrupted the Antp-Exd dimer using the YPWM mutant Antp^{AAAA}; the FRET reduction is not significant compared to Antp-Ubx-Exd complex ($E=0.16\pm0.01$; Fig. 4C and E), however, this result is coherent with the fact that Exd also interacts with Ubx [16]. Conversely, the Antp Δ HHD mutant that impedes Antp-Ubx

0.08 ± 0.005 (Fig S3 A-B) and 0.09 ± 0.001 respectively (Fig S3 C-D), indicating absence of trimeric complexes due to the lack of energy transfer.

Trimeric complexes reduced transcriptional activity of Antp

To determine the effect of the complexes on Antp transcriptional activity, we used a luciferase (LUC) reporter (pGLH11) with a minimal Hsp70 promoter and eleven oligomerized BS2 Antp-binding sites previously described in HEK293 cells [17]. The Antp-Ubx-TBP trimer showed a statistically significant reduction of transactivation to $30.93\pm10.52\%$ compared to Antp. In a similar fashion, the Antp-Ubx dimer also had a significant reduction of LUC activity to $43.88\pm11.60\%$ (Fig. 5A). There is no significant difference between the transcriptional activity of the Antp-Ubx-TBP and

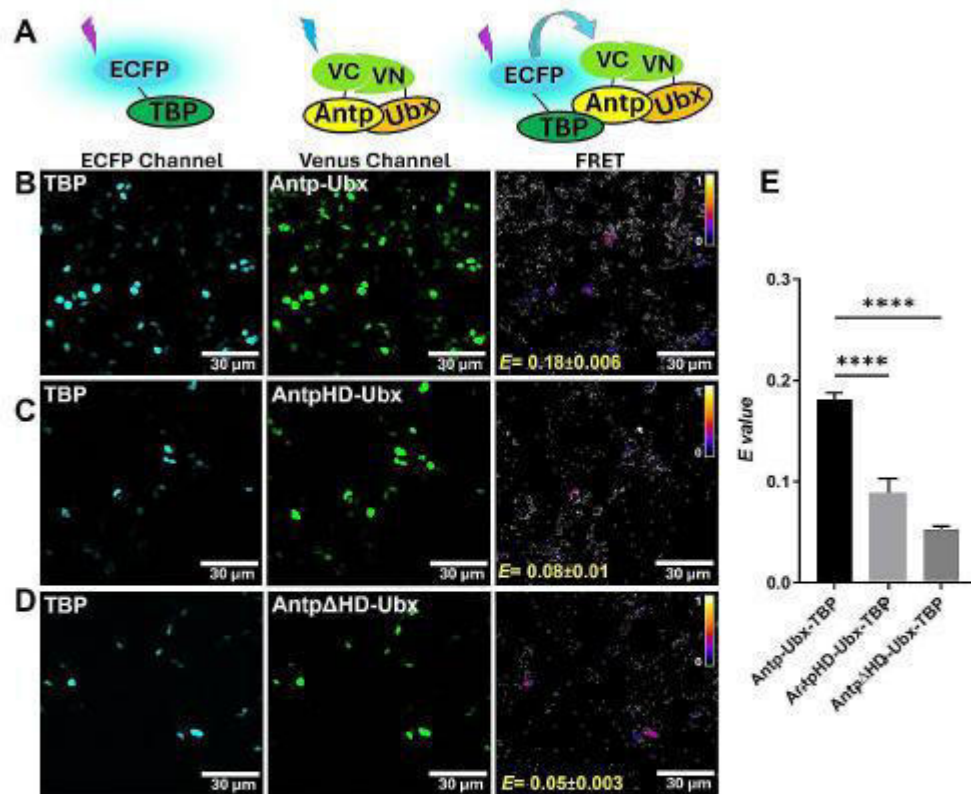


Fig. 3 Trimeric interaction of Antp-Ubx with TBP using BiFC-FRET. **A** Schematic representation of TBP fused to ECFP (ECFP Channel), BiFC by Antp-Ubx interaction (Venus channel) and energy transfer due to TBP-Antp-Ubx trimeric complex (FRET). **B** TBP trimeric interaction with Antp-Ubx heterodimer ($E = 0.18 \pm 0.006$). **C** Absence of PolyQs in AntpHD diminished the trimer formation ($E = 0.08 \pm 0.01$). **D** Antp Δ HD caused a reduction in the trimeric interaction ($E = 0.05 \pm 0.003$). Color bar represents FRET signal intensity (Fire mode); brighter colors indicate high trimeric interaction levels and darker colors indicate low trimeric interaction level. Scale bar, 30 μm . **E** Statistical analysis of three independent FRET experiments using a one-way ANOVA and Tukey for mean comparison, the high significance is indicated with **** ($p < 0.0001$), error bars correspond to standard error.

Antp-Ubx complexes, indicating that both the trimeric and dimeric complexes affected the Antp transactivation activity. We also found that Ubx has a transactivation activity of $53.47 \pm 10.36\%$, significantly different than Antp; however, when Ubx activity is compared to the Antp dimer and trimer activities there is no significant difference (data not shown). These results indicate that the Antp transactivation function is specifically affected

by these complexes. Similarly, the Antp-Ubx-Exd trimer decreases the transactivation activity of Antp to $57.94 \pm 4.74\%$, which is statistically significant compared to Antp. We also found a significant reduction of the Antp transcriptional activity in the Antp-Exd dimer to $45.87 \pm 2.42\%$ (Fig. 5B). Overall, the transactivation assays indicate that Antp trimeric and dimeric interactions with

Ubx, TBP or Exd have a down-regulating effect in the Antp transcriptional activity.

Discussion

Here, we showed that the dimeric interaction of Antp with Ubx is through Antp HD helices 1 and 2 as well as residue E19 of helix 1. We also report a novel interaction of Ubx with TBP in which the PolyQ domain of TBP is required in this interaction. Furthermore, we established the two new Antp trimeric complexes with Ubx-TBP and Ubx-Exd and both trimers are important for Antp transactivation activity in living cells.

Our results demonstrate that the HDs of both Ubx and Antp are sufficient for maintaining the interaction in embryos. It has been proven that the HD is enough for

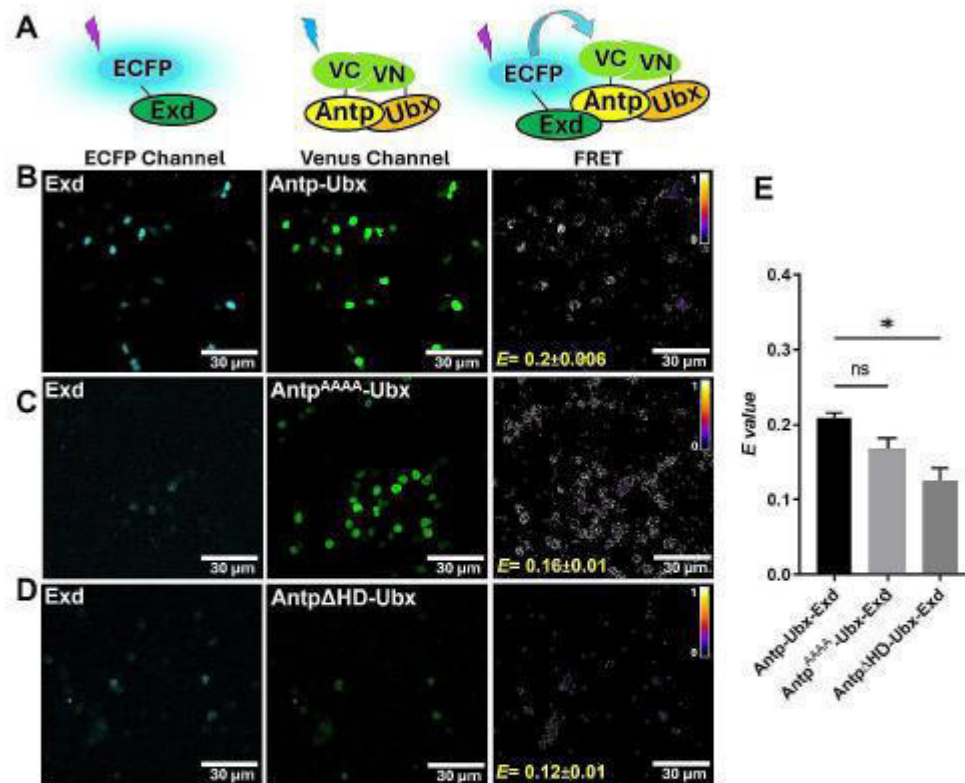


Fig. 4 Exd forms trimeric complexes with Antp-Ubx by Bifc-FRET. **A**) Schematic representation of Exd fused to ECFP (ECFP Channel), Bifc by Antp-Ubx interaction (Venus channel) and energy transfer due to Exd-Antp-Ubx trimeric complex (FRET). **B**) Exd trimeric interaction with Antp-Ubx heterodimer ($E = 0.2 \pm 0.006$). **C**) FRET due to Antp^{AAA}-Ubx ($E = 0.16 \pm 0.01$) is shown (ns). **D**) Antp^{ΔHD}-Ubx affected significantly the trimeric interaction ($E = 0.12 \pm 0.01$). Color bar represents FRET intensity (Fire mode); brighter colors indicate high trimeric interaction levels meanwhile darker colors indicate low trimeric interaction levels, scale bar, 30 μ m. **E**) Statistical analysis of three independent FRET experiments using a one-way ANOVA and Tukey for mean comparison, the significance is indicated with * ($p < 0.05$). Bars correspond to standard error

other protein-protein interactions, for example, the interaction of Antp with the transcription factor Eyeless (Ey) in *Drosophila* also depends on their HDs [14]. Another report indicates that the Scr homodimerization depends on the HD and is required for Scr function in *Drosophila* [7]. The HD is also required for the Antp interaction with the basal transcription machinery factor TFIIE β in cell culture and in vivo [9].

The HDs showed stronger interaction signal compared to the FL proteins, suggesting that the regions upstream or downstream of the HD may interfere dimerization in FL proteins as previously observed in Scr, Antp, Ubx, AbdA and AbdB interactions with other TFs in living embryos [18]. A similar effect was observed with the HD

of AbdA which showed a strong interaction with Med19 in *Drosophila* embryos, whereas the FL AbdA is not able to interact with Med19 [19]. In both reports, a similar expression level of HD or FL proteins was confirmed, suggesting that the observed interaction dynamics are not due to overexpression. In addition, in vivo functional analysis of Antp HD peptides showed almost equal levels

of the endogenous Antp protein [17]. Hence, the stronger interaction levels showed by the HDs are most likely due to absence of HD-adjacent regions. This evidence clearly indicates the HD's sufficiency as a platform for protein-protein interactions, as well as the inhibitory activity of different structural motifs along the Hox proteins.

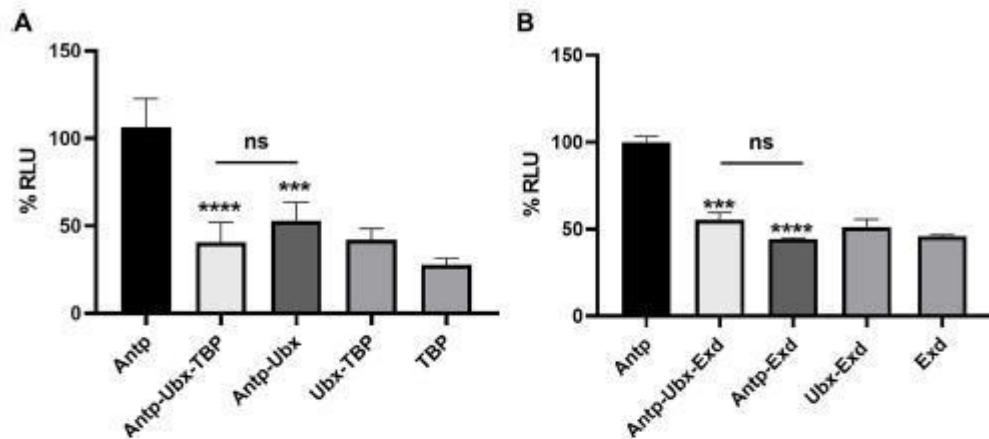


Fig. 5 Trimeric complexes of Antp-Ubx with TBP or Exd affect Antp transcriptional activity. The graphic shows the percentage of Antp transcriptional activity to binding BS2 sites (% RLU). **A)** Antp-Ubx-TBP trimer as well as the dimers diminish transcriptional function of Antp. **B)** Antp-Ubx-Exd and the dimers Antp-Exd and Ubx-Exd decrease Antp transcriptional activity. Statistical analysis was made by one-way ANOVA with the post-hoc Tukey for mean comparison in three independent experiments. Error bars correspond to standard error ($p < 0.0001$)

Both HD helices 1 and 2 are involved in the Antp-Ubx interaction. Other reports indicate the HD helix 1 as responsible for the homeoprotein interactions between Antp-Ey and Scr-Scr, and that the E19 helix residue is key for these interactions [7, 14]. In addition, the HD helix 1 of HOXD8 mediates its interaction with HOX9 as well as its transcription activities [20]. Accordingly, our results also pointed out the specific relevance of the Antp E19 residue for its interaction with Ubx. Other Ubx HD residues cannot be ruled out, since it was previously found that Ubx HD residues 23 and 25 on helix 1, and 57 on helix 3 are important for the *in vitro* interaction with the cofactor Exd, and the residues 22 and 24 are highly conserved and positionally exposed in the Ubx HD [21, 22].

Antp residues 32 and 36 of HD helix 2 were not required in the Antp-Ubx interaction (data not shown), although they are important for interaction with the transcription factor TFIIIE β [9]. However other aminoacidic residues in Antp helix 2 could be involved because it was previously reported that HD residues 30 and 33 of POU factors Oct-1 and Oct-2 are relevant for their interaction with the Herpes simplex virus transactivating factor VP16. Also, residues 29 and 56 of the HOXA9 HD have a redundant function with the HX motif for interaction

with TBP was found to be dependent on the PolyQ regions of TBP and the N- and C-term of Ubx including the Ubx domain, which could play a role in the interaction. The PolyQ region of TBP has been extensively corroborated as an interaction platform for other factors [10, 28, 29]. The Ubx N-term regions do not contain PolyQ stretches, however, it has been previously reported that the Ubx N-term is essential for its transcriptional activity [15], and the intrinsically disordered regions have proven to be necessary for Ubx protein interactions [12, 30]. The link of homeoproteins interacting with the RNA Pol II basal machinery has been established numerous times with other GTFs like TFIIIE β [9, 20, 31] and the transcription pausing factor M1BP [32].

We found that Ubx diminished the Antp transactivation activity; similarly, other HD factors such as AbdB, Ey and Scr also reduced Antp transcriptional activity [14, 33]. It is well known that Ubx represses the expression of Antp in the 3rd thoracic segment of the embryo [34, 35]. Our transactivation findings with Antp and Ubx likely suggest that, in addition to promoter binding, protein-protein interactions may be a part of the transcriptional regulation mechanisms of homeoproteins for posterior prevalence in the embryo. The transcriptional activ-

ity of Antp was not rescued by absence of HD helices 1 and 2 (data not shown), similar to the report of Cárdenas-Chávez in 2012 where the Antp helix 1 mutant E19G decreased the interaction with AbdB but did not rescue the transcriptional activity.

Previous reports have indicated the interaction of homeoproteins like CDX1, Sp1 and Antp with the basal transcription factor TBP [10, 26, 27]. Accordingly, we confirmed for the first time that the interaction of Ubx

with PBX1 and MEIS1 [23–25]. Overall, these results support the importance of Antp position E19 on helix 1 for the interaction with Ubx.

Although the transactivation system with 11 oligomerized BS2 sites is specific for Antp, some level of Ubx

transactivation was observed with this system (data not shown), however this activity differs from Antp, indicating the BS2 sites are Antp-specific. Other homeoproteins such as Exd, HoxB7, HoxB8 and HoxC8 also recognize the BS2 binding sites, but it was not determined whether there is transcriptional activity [36].

We also present the first report of trimeric protein complexes of Antp-Ubx with TBP or Exd using the previously standardized BiFC-FRET assay [10]. The trimer reduction using the Antp PolyQ or HD mutants corroborates the formation of the Antp-Ubx-TBP trimer and supports the key role of Antp PolyQ regions in the interaction with TBP previously described [10], as well as the importance of the Antp HD for its interaction with Ubx. We also validated the trimer complex of Antp-Ubx with Exd using mutants that specifically disrupted the Antp-Ubx or Antp-Exd dimers. Mutation of the Antp YPWM motif did not significantly reduce the *E* value, since the Ubx YPWM motif was not mutated; these results are in accordance with the fact that Antp and Ubx both interact with Exd through this motif [3, 7, 37, 38]. In this scenario, Ubx probably keeps Exd close enough for the energy transfer to occur; this is also feasible due to evidence indicating that Ubx has multiple interactions with Exd besides the YPWM motif, such as the UbdA motif [39, 40]. This also indicates that Antp-Ubx-Exd trimer is formed by multiple interacting domains involving the HDs and the YPWM motif. This has been reported in the trimeric interactions of Antp-Exd or Ubx-Exd with Hth [41] and, in the Antp-Ubx-Exd trimer, raising the possibility of wider complexes involving other transcriptional factors for gene regulation.

The absence of trimeric interactions of Antp-Ubx either with BIP2 or TFIIE β corroborated with Antp mutants (data not shown) is similar to the absence of Antp-TBP trimeric interaction with BIP2 previously described using BiFC-FRET [10]. This adds to the dynamism of Hox proteins interactions, since BIP2 seems to be involved mainly in dimeric interactions whereas other GTFs like TFIIE β are required for some complexes like Antp-TBP and dispensable for others such as Antp-Ubx.

The trimeric complexes of Antp-Ubx with TBP or Exd both showed a significant decrease of the Antp transcription activity in cell culture; the reduction is lower and maintained regardless of a partial Ubx and Exd LUC activity. A similar repression function has been determined for the trimers MES1-PBX-HOXA9 in myeloid

leukemia and the Ubx-Exd-Hth in vivo [41, 42]. When we evaluated the function of Ubx using BS2 sites, we found that it is not affected by the formation of dimeric or trimeric complexes (data not shown). Overall, our results demonstrate two novel Antp trimeric complexes with Ubx-TBP and Ubx-Exd, which also regulate Antp gene

transcription activity, indicating repression function in the trimer assembling.

Our results clearly showed that homeoproteins interact with each other as well as with multiple cofactors and GTFs in dimeric and trimeric ways, raising the question of how these complexes function at the transcriptional level during development. The Antp novel trimers here depicted diminished Antp transcription, indicating repression functions for these ensembles. In the Antp and Ubx interaction with TBP, the Hox proteins could prevent TBP and TFIIB interaction, since TBP acts as the TFIIB recruiter to the RNA Pol II PIC [43], therefore the trimer could be preventing the PIC assembly and therefore transcription initiation.

The Antp-Ubx interaction with the cofactor Exd adds a new interacting dynamic to the extensive evidence of complexes between Hox and the TALE (three amino acid loop extension) family of cofactors. Antp promotes leg identities in the thorax by repressing the activity of antennal- and head-determining genes such as Spalt, Hth and Dll and activating leg-specifying genes [44, 45]. Ubx specifies haltere identities by repressing the wing genes Dpp and Wg in the third thoracic segment [46, 47] and represses Antp promoter, preventing Antp expression towards the third thoracic segment.

Antp-Ubx interaction may function as an alternative in which both homeoproteins sequester themselves, preventing their respective binding to DNA in the limits of the 2nd and 3rd thoracic segments when both are present. Plainly, Antp and Ubx both have activation and repression activities, they can bind identical DNA motifs and even regulate common targets [48–50]. It is reasonable to think that the Antp-Ubx trimeric complex with Exd could be involved in the regulation of Antp and Ubx common targets, conferring specificity for repression.

Clearly, homeoproteins have versatility not only of functions but also of interactions, since Ubx also interacts with nuclear export factors like Embargoed (Emb) for autophagy repression in *Drosophila* [51]. The protein complex dynamics presented could also be extrapolated to the rest of Hox cellular activities, apart from gene regulation.

Hox proteins association with the RNA Pol II PIC are well known since the first report by Plaza et al., [14] and they continue to be described to date, either within dimer or trimer complexes [10, 52]. Apart from transcriptional activity, Hox ensembles with TBP, TFIIE β or other GTFs

[10] may also be participating in other RNA Pol II functions like transcription pausing during early development. Ubx and AbdA collaborate with the pausing factor M1BP, changing chromatin status to enable transcription [32]. Hunt et al., established that pausing release is triggered in a tissue-specific manner by enhancer regulation of Pol II primed promoters [53]. Thus, Antp-Ubx trimeric

complexes may participate in linking the enhancer to the primed promoter via GTFs or pausing factors, orchestrating rapid transcriptional bursts.

Recently, Bandau et al., described a new RNA Pol II role for the reorganization of chromatin right after DNA replication, stabilizing several proteins including chromatin remodelers, histone modifiers and transcription factors [54]. Exd and Hth collaborate with Hox proteins for chromatin accessibility [55]; Ubx is involved in both opening and closing chromatin functions in vivo [56]. Therefore Antp-Ubx trimers either with TBP or Exd could collaborate with the RNA Pol II at chromatin level participating in remodeling tasks.

Conclusions

In conclusion, we presented two novel trimeric complexes of Antp-Ubx with TBP and Exd that regulate Antp transcriptional function, opening the possibility of the regulation of Antp and Ubx targets and conferring specificity for repression. Our results increase the transcriptional factors in the Antp and Ubx interactomes and this variety of functions and interaction dynamics could be further analyzed during embryo development and extrapolated to other Hox proteins in *Drosophila* and even in mammals.

Methods

BiFC assays in *Drosophila* embryos

Fly crosses for BiFC assays were incubated at 25 °C overnight and the embryos were incubated at 4 °C for 48 h prior to BiFC visualization, according to Hudry et al., 2011 [6]. Embryos were dechorionized with 1.5% sodium hypochlorite, washed with PBX buffer and mounted on slides with 60% Glycerol/PBS. Imaginal discs were dissected on PBS and mounted on slides using Vectashield mounting medium with DAPI (Vector laboratories, Southfield, MI, USA). Fly stocks were maintained at 18–25 °C on standard yeast-agar-cornmeal medium. Transgenic lines were kindly donated by Samir Merabet (UAS-VCAntp, VNUbx, -VNUbxHD and antp-Gal4). The drivers *ptc*- and *nullo*-Gal4 were purchased from Bloomington Stock Center.

Plasmid constructs

For BiFC assays, Ubx and UbxHD coding sequences were amplified by PCR from genomic DNA of UAS-Ubx transgenic flies (Bloomington Stock Center). The ORFs were

cloned in the pCS2VNm9 vector in frame with the coding sequence of the N-terminus of Venus (VN) using *AgeI* and *XbaI* restriction sites. AntpHD^{EG19} and Ubx^{ET9G} mutants were obtained by site-directed mutagenesis (Quickchange II XL kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Antp, AntpHD, AntpAHD, AntpΔH1 and AntpΔH1-2 in pCS2VC155; TBP and TBPAQ in pCS2VNm9 were

previously obtained [9, 10]. For BiFC/FRET assays, TBP coding sequence was amplified by PCR and cloned in frame with ECFP into pECFP-N1 using *AgeI* and *AgeI* sites enzymes. pECFP-N1-Exd, -BIP2 and -TFIIIEβ vectors were previously obtained [10]. Oligonucleotide sequences are available upon request. All plasmid constructions were verified by DNA sequencing before cell co-transfections.

BiFC and transactivation assays in cell culture

HEK293 cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA). 1×10^5 cells were seeded on 6-well plates with glass coverslips, cultured for 24 h co-transfected with 6 μg of plasmidic DNA using polyethylenimine (PEI) 15 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. All BiFC co-transfections included the VN- and VC- plasmids along with pCAG-mCherry (donated by Ataulfo Martínez-Torres) for BiFC and calculation of transfection efficiency percentage. The fluorescence signals were visualized 48 h after transfection using the Zeiss Axio Imager 2 microscope (Carl Zeiss, Germany). BiFC Interaction percentages were calculated by counting the number of Venus fluorescent cells in one hundred red fluorescent cells, with three independent triplicates.

For transactivation assays, HEK293 cells were seeded in 24-well plates and co-transfected as described above using different combinations pPAC plasmids, pGLH11 reporter and pCopia-βGal (to normalize the luciferase activity) as previously described [9, 10]. Luciferase values were obtained 48 h after transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The transfections assay was performed in three independent experiments by triplicate.

BiFC-FRET assays

The HEK293 cells for BiFC-FRET assays were maintained under standard culture conditions. For transfection, cells were seeded on 6-well plates and transfected 48 h after using PEI 15 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. To correct for bleed-through, Venus (BiFC) and ECFP plasmids fusion constructs were individually transfected. The

cyan (donor) and venus (acceptor) fluorescent signals were visualized 48 h after transfection using an immersion objective on an Olympus BX61W1 confocal microscope and the Fluoview 4.0 software (Olympus, Tokyo, Japan). Ten-nanometer size photographs were collected in spectral mode (420–660 nm) using 10 nm of step size under the confocal parameters 600v, 1X gain and 10%

laser potency with 20X objective. All images captured were analyzed in ImageJ software using FRETty plug in; BiFC-FRET quantification (*E*-value) were carried out according to Jimenez-Mejia et al., 2022 [10].

Abbreviations

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

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s41065-024-00327-x>.

Supplementary Material 1

Acknowledgements

We thank J. Emiliano Martínez-Robledo for technical support, and Alejandra E. Areola-Triana, ELS for her critical editing of the manuscript.

Author contributions

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

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (project number 2280) granted to DRP. AVP, CHB, and RMM were supported by graduate fellowships No. 717425, No. 790953 and No. 814714 from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, and CAT, by research grant 7-BQ-2023 from ProACTI.

Data availability

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 3 May 2024 / Accepted: 22 July 2024

Published online: 30 July 2024

References

- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Funakubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D et al. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* [Internet]. 1994;78(2):211–23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90292-5).
- Carnesecci J, Pinto RS, Lohmann I. Hox transcription factors: an overview of multi-step regulators of gene expression. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2018;52(11–12):733–32. <https://doi.org/10.1387/jdb.1802948>.
- Mann RS, Lelli KM, Joshi R. Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2009;88:63–101. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88003-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88003-4).
- Merabet S, Mann RS. To be specific or not: The critical relationship between Hox and TALE proteins. *Trends Genet* [Internet]. 2016;32(6):334–47. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.004>.
- Bobola N, Merabet S. Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2017;43:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cde.2016.09.008>.
- Hudry B, Vala S, Graba Y, Merabet S. Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol* [Internet]. 2011;9(1):5. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-5>.
- Papadopoulos DK, Skouloudaki K, Adachi Y, Samakovlis C, Gehring WJ. Dimer formation via the homeodomain is required for function and specificity of Sex combs reduced in *Drosophila*. *Dev Biol* [Internet]. 2012;367(1):78–89. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.021>.
- Prince F, Katsuyama T, Oshima Y, Plaza S, Resendez-Perez D, Berry M et al. The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* [Internet]. 2008;135(9):1669–79. <https://doi.org/10.1242/dev.018008>.
- Altamirano-Torres C, Salinas-Hernández JE, Cárdenas-Chávez DI, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D. Transcription factor THIEP interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in *Drosophila*. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(10):e0205905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205905>.
- Jiménez-Mejía G, Montalvo-Méndez R, Hernández-Bautista C, Altamirano-Torres C, Vázquez M, Zurita M et al. Trimeric complexes of Antp-TBP with THIEP or Exd modulate transcriptional activity. *Hereditas* [Internet]. 2022;159(1):23. <https://doi.org/10.1186/s41065-022-00239-8>.
- Carnesecci J, Boumpas P, van Nieuw P, Sanchez P, Domsch K, Pinto HD, Borges Pinto P et al. The Hox transcription factor Ultrabithorax binds RNA and regulates co-transcriptional splicing through an interplay with RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2022;50(2):763–83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1290>.
- Carnesecci J, Sigismundo G, Domsch K, Baader CEP, Raffae M-R, Krijgsvelde J et al. Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1388. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15223-x>.
- Shanmugam K, Green NC, Rambaldi L, Saragovi HJ, Featherstone MS. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1999;19(11):7577–88. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7577>.
- Plaza S, Prince F, Adachi Y, Purizo C, Cribbs DL, Gehring WJ. Cross-regulatory protein-protein interactions between Hox and Pax transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(36):13439–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806106105>.
- Tan X-X, Bondos S, Li L, Matthews KS. Transcription activation by ultrabithorax I₁ protein requires a predicted α-helical region. *Biochemistry* [Internet]. 2002;41(8):2774–85. <https://doi.org/10.1021/bi011967y>.
- Crocker J, Abe N, Rinaldi L, McGregor AP, Frankel N, Wang S et al. Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell* [Internet]. 2015;160(1–2):191–203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.041>.
- Papadopoulos DK, Reséndez-Pérez D, Cárdenas-Chávez DI, Villanueva-Segura K, Canales-del-Castillo R, Félix DA et al. Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(20):11999–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108686108>.
- Baeza M, Vala S, Heim M, Dard A, Hudry B, Duffraisse M et al. Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *Elife* [Internet]. 2015;4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06034>.
- Boube M, Hudry B, Immanigeon C, Carrier Y, Bernat-Fabre S, Merabet S et al. *Drosophila melanogaster* Hox transcription factors access the RNA polymerase II machinery through direct homeodomain binding to a conserved motif of mediator subunit Med19. *PLoS Genet* [Internet]. 2014;10(5):e1004303. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004303>.
- Zappavigna V, Sartori D, Mavilio F. Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes Dev* [Internet]. 1994;8(6):732–44. <https://doi.org/10.1101/gad.8.6.732>.
- Chan SK, Jaffe L, Capovilla M, Botas J, Mann RS. The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* [Internet]. 1994;78(4):603–15. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90525-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90525-8).

22. Merabet S, Hudry B, Saadaoui M, Graba Y. Classification of sequence signatures: a guide to Hox protein function. *Bioessays* [Internet]. 2009;31(5):500–11. <https://doi.org/10.1002/bies.200800229>.
23. Lai JS, Cleary MA, Herr W. A single amino acid exchange transfers VP16-induced positive control from the Oct-1 to the Oct-2 homeo domain. *Genes Dev* [Internet]. 1992;6(11):2058–65. <https://doi.org/10.1101/gad.6.11.2058>.
24. Pomerantz JL, Kristie TM, Sharp PA. Recognition of the surface of a homeo domain protein. *Genes Dev* [Internet]. 1992;6(11):2047–57. <https://doi.org/10.1101/gad.6.11.2047>.
25. Dard A, Ju Y, Reboullet J, Bleicher F, Lavau C, Merabet S. The human HOKA9 protein uses paralog-specific residues of the homeodomain to interact with TALE-class cofactors. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):5664. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42096-y>.
26. Calon A, Gross L, Davidson I, Kedinger M, Duluc I, Domon-Dell C et al. Functional interaction between the homeoprotein CDK1 and the transcriptional machinery containing the TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2007;35(1):175–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1034>.
27. Emil A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box binding protein. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1994;14(3):1582–93. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1582>.
28. Atanasyan L, Günther V, Dichtl B, Georgiev O, Schaffner W. Polyglutamine tracts as modulators of transcriptional activation from yeast to mammals. *Biol Chem* [Internet]. 2012;393(1–2):63–70. <https://doi.org/10.1515/BC-2011-252>.
29. Alba MM, Gülgör R. Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. *Genome Res* [Internet]. 2004;14(4):549–54. <https://doi.org/10.1101/gr.1025704>.
30. Hsiao H-C, Gonzalez KL, Catanese DJ Jr, Jordy KE, Matthews KS, Bondos SE. The intrinsically disordered regions of the *Drosophila* melanogaster Hox protein Ultrabithorax select interacting proteins based on partner topology. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(10):e108217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108217>.
31. Bondos SE, Tan X-X, Matthews KS. Physical and genetic interactions link hox function with diverse transcription factors and cell signaling proteins. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2006;5(3):324–34. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500256-MCP200>.
32. Zouar A, Auradkar A, Delini MC, Macchi M, Barthez M, Ela Akou S et al. The Hox proteins Ubx and AbdA collaborate with the transcription pausing factor M1BP to regulate gene transcription. *EMBO J* [Internet]. 2017;36(9):2887–906. <https://doi.org/10.1525/embj.201697571>.
33. Cardenas Chávez DL. Interacciones moleculares de la antenapedia con factores generales de la maquinaria de transcripción basal y homeoproteínas en la regulación transcripcional. [Dissertation on the Internet]. Monterrey (MX): Universidad Autónoma de Nuevo León; 2012 [cited 2022 May 10]. 137 p. <https://reprints.uanl.mx/2701>.
34. Krasnow MA, Saffman EE, Kornfeld K, Hogness DS. Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* [Internet]. 1989;57(3):1031–43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90341-3).
35. Slattery M, Ma L, Negre N, White KP, Mann RS. Genome-wide tissue-specific occupancy of the hox protein Ultrabithorax and hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(4):e34686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014686>.
36. Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DO, Kamps MP. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAAT cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1996;16(7):2186–95. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.2186>.
37. Passner JM, Ryoo HD, Shen L, Mann RS, Aggarwal AK. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature* [Internet]. 1999;397(6721):714–9. <https://doi.org/10.1038/17833>.
38. Vanderperre S, Merabet S. Visualization of the association of dimeric protein complexes on specific enhancers in the salivary gland nuclei of *Drosophila* larva. *Cells* [Internet]. 2024;13(7):613. <https://doi.org/10.3390/cells13070613>.
39. Merabet S, Saadaoui M, Sambrani N, Hudry B, Pradel J, Affolter M et al. A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007;104(43):16946–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705832104>.
40. Ortiz-Lombardo M, Foss N, Maurer Zaffran C, Saurin AJ, Graba Y. Hox functional diversity: Novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *Bioessays* [Internet]. 2017;39(4):1600246. <https://doi.org/10.1002/bies.201600246>.
41. Gebelein B, Cui J, Ryoo HD, Zhang W, Mann RS. Specificity of Distal-less repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev Cell* [Internet]. 2002;3(4):487–98. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00257-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00257-5).
42. Shen W-F, Rozenfeld S, Kwong A, Komives LG, Lawrence HJ, Langman C. HOKA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1999;19(4):3051–61. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.3051>.
43. Friedman MJ, Shah AG, Fang Z-H, Ward EG, Warren ST, Li S et al. Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci* [Internet]. 2007;10(12):1519–28. <https://doi.org/10.1038/nn2011>.
44. Casares F, Calleja M, Sánchez-Herrero E. Functional similarity in appendage specification by the Ultrabithorax and abdominal-A *Drosophila* Hox genes. *EMBO J* [Internet]. 1996;15(15):3934–42. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00767.x>.
45. Emerald BS, Curtis I, Mlodnik M, Cohen SM. Distal antenna and distal antenna related encode nuclear proteins containing pipsqueak motifs involved in antenna development in *Drosophila*. *Development* [Internet]. 2003;130(6):1171–80. <https://doi.org/10.1242/dev.00323>.
46. Prasad M, Bajpai R, Shashidhara LS. Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. *Development* [Internet]. 2003;130(8):1537–47. <https://doi.org/10.1242/dev.00393>.
47. Makhijani K, Kalyani C, Srividya T, Shashidhara LS. Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in *Drosophila*. *Dev Biol* [Internet]. 2007;302(1):243–55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.009>.
48. Rosales-Vega M, Reséndez-Pérez D, Vázquez M. Antennapedia. The complexity of a master developmental transcription factor. *Genesis* [Internet]. 2023;e23561. <https://doi.org/10.1002/dvg.23561>.
49. McCormick A, Core N, Kenridge S, Scott MP. Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the *teashirt* gene. *Development* [Internet]. 1996;121(9):2799–812. <https://doi.org/10.1242/dev.121.9.2799>.
50. Ekker SC, Jackson DG, von Kessler DP, Sun BL, Young KE, Beachy PA. The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J* [Internet]. 1994;13(13):3551–60. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06662.x>.
51. Duffraisse M, Paul R, Carnesecchi J, Hudry B, Banetti A, Reboullet J et al. Role of a versatile peptide motif controlling Hox nuclear export and autophagy in the *Drosophila* fat body. *J Cell Sci* [Internet]. 2020;133(18):jc241943. <https://doi.org/10.1242/jcs.241943>.
52. Bischof J, Duffraisse M, Furger E, Ajana I, Gnaud G, Vanderperre S et al. Generation of a versatile BFC OFFome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*. *Elife* [Internet]. 2018;7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38853>.
53. Hunt G, Vald R, Progov S, Pfab A, Ziegenhain C, Sandberg R et al. Tissue-specific RNA Polymerase II promoter-proximal pause release and burst kinetics in a *Drosophila* embryonic patterning network. *Genome Biol* [Internet]. 2024;25(1):2. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03135-0>.
54. Bandau S, Alvarez V, Jiang H, Graff S, Sundaramoorthy R, Gierlinski M et al. RNA polymerase II promotes the organization of chromatin following DNA replication. *EMBO Rep* [Internet]. 2024;25(3):1387–414. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00065-x>.
55. Porcelli D, Fischer B, Russell S, White R. Chromatin accessibility plays a key role in selective targeting of Hox proteins. *Genome Biol* [Internet]. 2019;20(1):115. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1721-4>.
56. Loker R, Sanner JE, Mann RS. Cell-type-specific Hox regulatory strategies orchestrate tissue identity. *Curr Biol* [Internet]. 2021;31(19):4246–4255.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.030>.

Publisher's Note

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