



CIENCIA **XV**UANL
ANIVERSARIO

Disección molecular de la función dual de Antenapedia en el control genético del desarrollo en *Drosophila melanogaster*

DIANA RESÉNDEZ PÉREZ*, DIANA L. CÁRDENAS CHÁVEZ*, RICARDO CANALES DEL CASTILLO*,
KARINA VILLANUEVA SEGURA*



Los genes homeóticos están involucrados en el control genético del desarrollo de los diferentes organismos que permiten la especificación del plan corporal, a lo largo de los ejes antero-posteriores y dorso-ventrales en los organismos bilaterales.¹⁻³ Estos genes presentan una secuencia altamente conservada denominada *homeobox*, que codifica para un polipéptido de 60 aminoácidos, conocido como homeodominio (HD), el cual representa el dominio de unión al DNA,⁴⁻⁷ y contiene un motivo de cuatro aminoácidos altamente conservado, denominado “YPWM”, involucrado en interacciones proteína-proteína.⁸⁻¹¹

En este trabajo se investigó la paradoja de los genes Hox, que consistió en determinar el mecanismo molecular mediante el cual las homeoproteínas altamente similares adquieren distintas funciones durante el desarrollo. Debido a lo anterior, se realizó la disección molecular de la homeoproteína Antenapedia (Antp), para determinar su actividad funcional durante diferentes etapas del desarrollo de *D. melanogaster*. Para ello, se analizó la actividad fun-

cional de Antp, mediante un análisis mutacional de YPWM, el enlazador corto y largo entre el HD y YPWM, así como la sustitución y fusión al dominio de represión WRPW. La mutación de YPWM en Antp mostró que este motivo es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp en la involución de la cabeza, en las transformaciones torácicas T1 a T2 y antena-tarso, mediante represión de los genes de la antena y activación de los genes tarsales. Esta función dual del motivo YPWM también se demostró a nivel molecular en la activación y represión de los genes blancos específicos de Antp, en la que se requirió para la activación ectópica de los genes *teashirt (tsh)* y *grain (grn)*, así como para represión endógena de *Scr* y ectópica de *Salm* y *dan*. Por otro lado, la sustitución y fusión del motivo WRPW rescató e incrementó, respectivamente, el fenotipo en la actividad represora de YPWM en Antp, y no afectó su activación funcional en las transformaciones tarsales, ni en la activación de los genes blanco de Antp analizados. Adicionalmente, las variaciones en la longitud del espaciador (4-8 aminoácidos) que se presentan en las diferentes isoformas de Antp incrementaron preferencialmente la eficiencia en la activación/represión, al sugerir la participación del espaciador en la especificidad funcional de Antp.

El presente artículo está basado en la investigación “Disección molecular de la función dual de Antenapedia en el control genético del desarrollo en *Drosophila melanogaster*”, galardonada con el Premio de Investigación UANL 2012, en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2012.

* Universidad Autónoma de Nuevo León. FCB.
diarendez@gmail.com

METODOLOGÍA

Construcción de plásmidos recombinantes

La construcción de las secuencias codificantes para Antp y las mutantes se realizaron en el vector pUAST, con los procedimientos estándares de biología molecular.¹²⁻¹⁴

Generación de moscas transgénicas y cruza genéticas

Para la generación de las líneas de moscas transgénicas, los plásmidos recombinantes se introdujeron en la línea germinal de *D. melanogaster*, mediante microinyección,¹⁵ para su posterior identificación y balanceo de los cromosomas en las líneas transgénicas. Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron como homocigotas viables, o líneas balanceadas, a 18°C en tubos de comida estándar (*Fisher Scientific*). Para la expresión ectópica de Antp y las mutantes, se utilizó el sistema binario de regulación GAL4.^{16,20} Las cruza genéticas se realizaron con moscas vírgenes de las líneas productoras *ptc-Gal4*, *nullo-GAL4*, *Dll-GAL4* y *Salm-lacZ*, y machos de las líneas reporteras *yw*; UAS-Antp y UAS-mutantes, como se describió previamente.¹⁶ La colecta sincronizada de los embriones y la preparación de las cutículas embrionarias se llevó a cabo con el método antes descrito.¹⁶⁻¹⁷

Visualización de la expresión génica mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para la tinción de los embriones, se emplearon los anticuerpos Anti-Antp4C3 1:250 (U. Iowa), Anti-Scr 1:100,²² Anti-b-gal 1:500 (Molecular Probes) y Anti-tsh 1:2000, de acuerdo a procedimientos estándares previamente descritos por Sullivan *et al.*¹⁸

La detección de las señales de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se realizó mediante observación en microscopía visible y confocal-láser.¹⁹

RESULTADOS

El tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la función homeótica en *D. melanogaster*

Para analizar la función *in vivo* del tetrapéptido YPWM, se llevó a cabo la expresión ectópica de la homeoproteína silvestre (^{YPWMLL}Antp) y mutantes en YPWM, por un bloque de alaninas (^{AAAA}Antp) o por el dominio de represión WRPW (^{WRPW}Antp), así como la fusión de este dominio en el extremo C-terminal de Antp (^{YPWM}Antp^{WRPW}) y mutante de alaninas (^{AAAA}Antp^{WRPW}), durante la etapa de preblastodermo y blastodermo del embrión con la línea productora *nullo-GAL4*.⁴

Las larvas que sobreexpresaron Antp mostraron pérdida total de la involución de la cabeza, transformación homeótica del primer segmento protorácico (T1) a mesotóraco (T2) y reducción de dentículas protorácicas (figura 1B). Por el contrario, que la sustitución de alaninas en YPWM mostró un fenotipo normal (figura 1A), ya que no se detectó transformación homeótica o alteración de la involución de la cabeza (figura 1C). En contraste, la activación ectópica de las mutantes que contienen el dominio WRPW (figuras 1D-F) mostró transformación homeótica de T1 a T2 y represión de dentículas protorácicas. La fusión de WRPW en el extremo C-terminal de Antp generó el fenotipo más dramático, representado por pérdida drástica de la involución de la cabeza y transformación completa T1→T2, así como la deformación del embrión (figura 1E). Además, la sobreexpresión de mutantes con el enlazador corto (figuras 2G y H) causó un bloqueo pronunciado de la involución de la cabeza, y ocasionó la

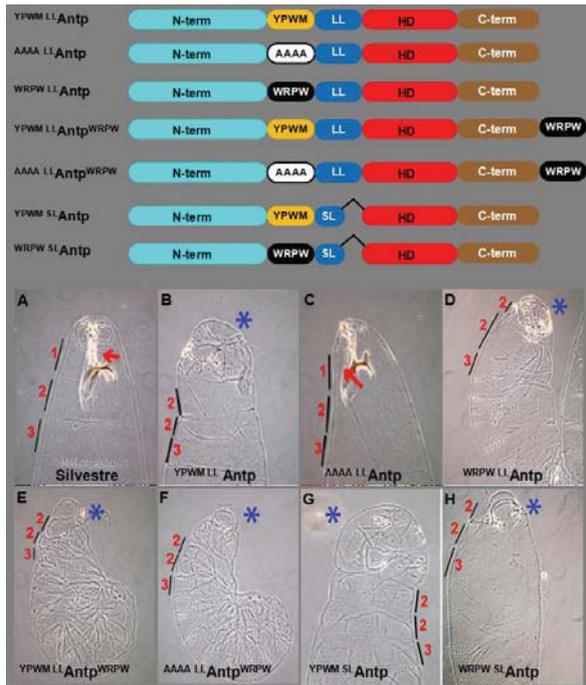


Fig. 1. Efecto de la expresión ectópica de Antp y mutantes en la transformación homeótica e involución de la cabeza. El diagrama en la parte superior representa la estructura de la homeoproteína Antenapedia y sus mutantes en YPWM, enlazador y fusión de WRPW. El enlazador largo de ocho aminoácidos se describe como LL (del inglés *long linker*) y el espaciador corto de cuatro aminoácidos se representa como SL (del inglés *short linker*). Las proteínas con LL serán referidas en el texto únicamente como Antp, ^{AAAA}Antp, WRPW Antp, ^{YPWM}Antp^{WRPW} y ^{AAAA}Antp^{WRPW}. La imagen inferior muestra un embrión silvestre con un desarrollo normal (A), mientras que la expresión ectópica de Antp (B) y mutantes que contienen WRPW (D-F) bloquearon la involución de la cabeza y presentaron transformación torácica T1-T2, a diferencia de la línea ^{AAAA}Antp (C). Las líneas SL (G, H) mostraron un fenotipo idéntico a sus contrapartes LL (B, D). Los números representan los segmentos protorácico (1), mesotorácico (2) y metatorácico (3). Las flechas y asteriscos muestran las dentículas protorácicas y defectos en la involución de la cabeza, respectivamente.

pérdida completa de estructuras bucales, en comparación con sus contrapartes con el enlazador largo (figuras 1B y D). Estos resultados indican que el tetrapéptido YPWM se requiere para la función homeótica de Antp, la cual es favorecida por la presencia del enlazador corto; mientras que la sustitución de este motivo por el dominio WRPW permite conservar la especificidad funcional de esta homeoproteína en la expresión ectópica en la cabeza.

Antp requiere la presencia del dominio funcional YPWM para inducir la transformación antena-tarso

Para analizar si el motivo YPWM se requiere en las transformaciones tarsales de la antena en *Drosophila*, utilizamos el sistema UAS-GAL4, con el potenciador *Distal-less* (*Dll*), para dirigir Antp y mutantes a la antena. La inducción ectópica de patas torácicas T2 con cerdas apicales y preapicales en la tibia distal se generaron en las líneas que contenían el dominio YPWM (figuras 2B y 2G). En contraste, no se detectó transformación en la mutante de alaninas (figura 2C), únicamente muestra un leve engrosamiento de la arista y unas pocas cerdas ectópicas en el segmento número 3 de la antena (A3), debido probablemente a la presencia del HD en la proteína. Resultados similares se obtuvieron con la mutante de alaninas fusionada al dominio de represión WRPW (^{AAAA}Antp^{WRPW}), en la que numerosas cerdas tarsales y ausencia de la arista fueron identificadas en la antena (figura 2E). Asimismo, la sustitución de YPWM por WRPW en Antp causó un sobrecrecimiento del segmento A3 (figura 2D). Las transformaciones tarsales dependieron del tamaño del enlazador entre YPWM y el HD de Antp, ya que

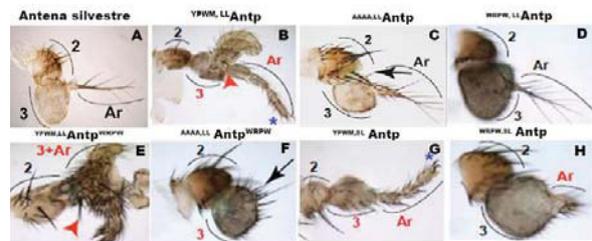


Fig. 2. Transformaciones tarsales generadas por Antp con el motivo YPWM. La presencia de YPWM en Antp incrementa fuertemente la transformación tarsal de la antena (B, E, G); y su ausencia genera una muy débil transformación (C, F). La doble mutante ^{YPWM}Antp^{WRPW} induce transformaciones tarsales (E), a diferencia de la sustitución con WRPW, que confiere únicamente engrosamiento débil de la arista (D, H). Los segmentos antenales están indicados con líneas curvas seguidas de números que corresponden a los diferentes segmentos (2=segundo segmento antenal, 3=tercer segmento antenal, Ar=arista). La cerdas de la pata se señalan con flechas negras, e indican una transformación débil del segmento A3, y la presencia de cerdas apicales/preapicales (cabeza de flecha roja) indica la identidad de patas mesotorácicas (T2). Los ganchos tarsales y segmentos antenales transformados se señalan con un asterisco azul o color rojo, respectivamente.

las líneas con el enlazador largo mostraron un efecto más dramático que con el corto de cuatro aminoácidos (figuras 2G y H). Estos resultados muestran, sin lugar a dudas, que la transformación de antena a tarso requiere la presencia del dominio funcional YPWM de Antp, y que el dominio de represión WRPW no sustituye la función de este motivo, mientras que el enlazador largo favorece transformaciones más dramáticas.

La activación del gen blanco *tsh* por Antp es dependiente de YPWM

Se utilizó el gen blanco *tsh* como modelo para determinar la función activadora de Antp *in vivo* (figura 3A). En todas las construcciones evaluadas se mostró que la activación de *tsh* en la región anterior del embrión (cabeza) requiere del motivo funcional de YPWM de Antp (figuras 3C, D, F y H). Sin embargo, se observaron diferencias en las líneas con distinta longitud del espaciador; la activación inducida por ^{YPWMSL}Antp fue menor que ^{YPWMLL}Antp (figuras 3B y G). Asimismo, se logró modificar la función activadora de Antp a parcialmente represora, me-

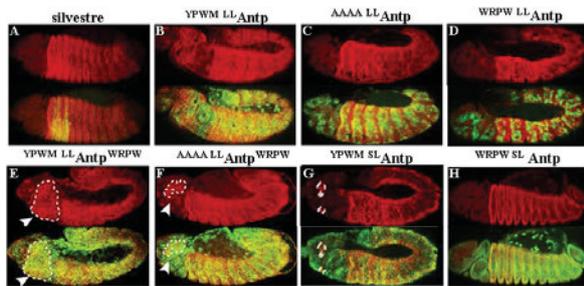


Fig. 3. La activación ectópica de *tsh* en segmentos anteriores depende de YPWM de Antp. Los embriones, en la parte superior, muestran la expresión de *tsh* (rojo) y en la inferior la colocalización (amarillo) de *tsh* con Antp (verde). Todas las líneas UAS se indujeron con el potenciador *ptc*-GAL4. El dominio de activación ectópica de *tsh* se señala con líneas punteadas. (A) La tinción de los embriones muestra la expresión de los genes endógenos. (B) Activación anterior de *tsh* por Antp. (C, D) La sustitución de YPWM por alaninas o WRPW inhibe la función activadora de Antp. (E, F) En contraste, la adición de WRPW no alteró su actividad, pero la doble mutación causó un decremento. (G, H) Las líneas con el enlazador corto exhiben una reducida función activadora, donde la sustitución con WRPW inhibe totalmente la activación de *tsh* por Antp.

dante la sustitución de YPWM con el motivo WRPW (figuras 3E, F y H).

La activación del *grn* por Antp requiere la presencia de YPWM

Las transformaciones tarsales requieren la activación ectópica de genes específicos de pata, como *grain* (*grn*). Para evaluar la actividad funcional de YPWM en Antp, se analizó la activación de *grn* en discos imaginales, con el potenciador *Dll*-Gal4. La tinción de b-gal mostró los patrones de expresión endógena y activación ectópica, debido a la expresión de las diferentes mutantes de Antp (figura 4). Estos resultados confirmaron un requerimiento absoluto de YPWM de Antp para la activación ectópica de *grn* en el disco de la antena (figuras 4C, D, F y H). Las líneas con la sustitución de YPWM por alaninas (figuras 4C y F) mostraron el mismo patrón de expresión endógena que el control (figura 4A), mientras que las mutantes en las que WRPW reemplazó al motivo YPWM fallaron en la activación de *grn* (figuras D y H), confirmaron así el requerimiento de YPWM para la activación transcripcional. En contraste, la adición de WRPW no alteró la regulación de Antp sobre *grn* (figura 4E). Asimismo, no se ob-

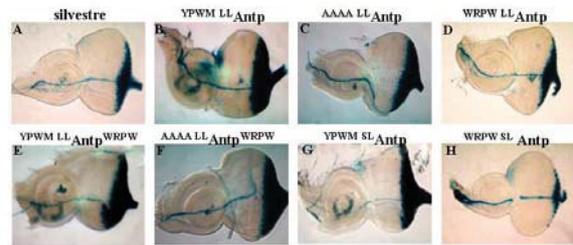


Fig. 4. Activación ectópica del gen específico de pata *grn* en el disco de la antena. (A) Patrón de expresión endógena de *grn* en el disco del ojo y nervio de Bolwin, mediante tinción de b-galactosidasa. (B) Activación ectópica de *grn* en el disco de la antena por Antp. (C) La mutación de YPWM por alaninas inhibe completamente la activación ectópica, y (D) la sustitución por WRPW inhibe ligeramente esta activación. (E) La adición de WRPW en Antp no modifica la activación de *grn*. (F) La adición de WRPW no modifica la pérdida de actividad en la sustitución de YPWM por alaninas. (G, H) Las variantes de enlazador corto activan o inhiben *grn*, de igual manera que las variantes del largo.

servaron diferencias entre la construcción con el enlazador largo y con el corto (figuras 4B y G).

El motivo YPWM de Antp es esencial en la represión de *Scr* endógeno

La represión endógena de *Sex combs reduced* (*Scr*) por Antp se usó para determinar la habilidad de Antp para actuar, directa o indirectamente como represor transcripcional. Para ello se utilizó el potenciador *patched* (*ptc*), que dirige la expresión ectópica de las construcciones de Antp en el compartimiento anterior de cada parasegmento; posteriormente, se analizó su efecto en la expresión endógena de *Scr*. Los resultados mostraron la represión de *Scr* en el segmento labial y T1 por Antp (figura 5B). En contraste, la mutación de YPWM por un bloque de alaninas no ocasionó la represión de *Scr* en el embrión (figura 5C), mientras que la sustitución por el dominio WRPW (^{WRPW}Antp) muestra una represión parcial (figura 5D). Las mutantes con la fusión de WRPW en el extremo C-terminal de Antp presentaron la actividad ectópica de Antp normal (figuras 5E y F), y las proteí-

nas con el enlazador corto exhiben una mayor actividad represora en comparación con las del largo (figuras 5G y 6H). Estos resultados demuestran la importancia del motivo YPWM en la actividad funcional de Antp para la represión de *Scr*; asimismo, sugieren que la capacidad represora de la homeoproteína Antp depende parcialmente del tamaño del enlazador.

YPWM de Antp es crucial para la represión del gen antenal *Salm*

Las transformaciones tarsales en el disco antenal también requieren la represión de genes *Salm* y *dan* necesarios para la morfogénesis de la antena. Esta represión permite que las células del disco antenal se rediseñen para el desarrollo de la pata.²⁴ Como se esperaba, la expresión ectópica de Antp mostró la represión de *Salm* en el disco de la antena (figura 6B). Este gen blanco se reprime completamente en el segmento antenal A3 en todas las mutantes probadas (figuras 6D-H), con excepción de la línea que presenta la sustitución de alaninas en YPWM (figura 6C). Las proteínas mutantes de enlazador corto no mostraron diferencia con Antp (figuras 6G y H).

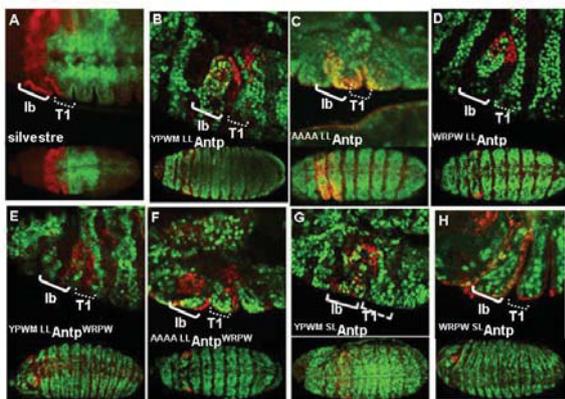


Fig. 5. La represión de *Scr* en embriones requiere la presencia de YPWM en Antenapedia. Las imágenes superiores corresponden a un acercamiento de la región de represión, y las inferiores muestran el embrión completo. (A) *Scr* se expresa normalmente en los segmentos labial (lb) y T1 del embrión (rojo). (B, D-H) La expresión ectópica de Antp y mutantes (verde) con sustitución de YPWM por WRPW o adición de WRPW en el extremo C-terminal reprimen total o parcialmente la expresión endógena de *Scr*. (C) La sobreexpresión de la mutante ^{AAAA}Antp no ocasionó la represión de *Scr* en el embrión, observándose una colocalización de ambas proteínas (amarillo).

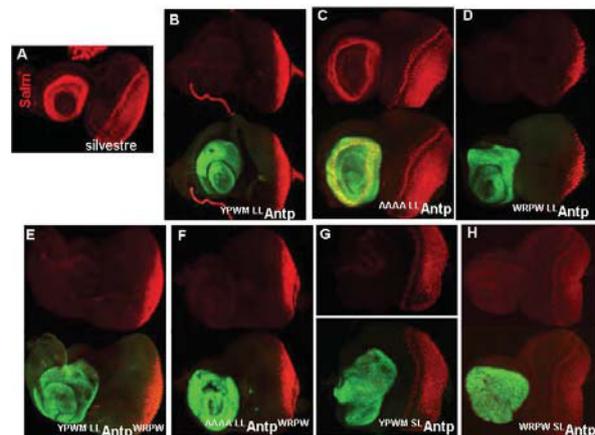


Fig. 6. La expresión ectópica de Antp reprime *Salm* de manera dependiente de YPWM. (A) Expresión endógena y ectópica de *Salm* (rojo) y Antp (verde), respectivamente, en el disco imaginal ojo-antena. (B, D-H) Las mutantes con dominio YPWM y WRPW reprimen la expresión de *Salm* en el segmento antenal. (C) La línea ^{AAAA}Antp no afecta la expresión del gen blanco *Salm* ocasionando la colocalización de ambas proteínas (amarillo).

Estos resultados corroboran la importancia de la presencia del motivo YPWM en Antp, para llevar a cabo la represión del *Salm* en el disco imaginal de antena.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las estrategias empleadas en *D. melanogaster* para analizar la función *in vivo*, ya sea activadora o represora de las homeoproteínas, es expresarlas ectópicamente en un lugar donde normalmente no se expresan.^{5,26} Por ello, utilizamos el sistema de regulación UAS/GAL4 para dirigir la expresión de la homeoproteína Antp y las mutantes en YPWM, región enlazadora o fusionadas con WRPW en diferentes etapas del desarrollo. Este dominio se encuentra altamente conservado en proteínas represoras con estructura bHLH (Hairy, Hucklebein, etc.), y su importancia se demostró en la secuenciación de los alelos del gen Hairy, que presentaba dos mutaciones que afectaban específicamente al dominio WRPW de esta proteína.^{27,28}

Nuestros resultados muestran que la expresión ectópica de Antp generó la transformación homeótica T1-T2, con pérdida de involución de la cabeza, lo cual corrobora que esta sobreexpresión causa la represión de genes requeridos en el desarrollo normal de la cabeza.^{24,21} En este caso, el dominio YPWM es responsable de la actividad represora de Antp, ya que la mutación de este motivo por alaninas mostró un fenotipo larvario normal. Además, la fusión de un segundo dominio represor (WRPW) incrementó la capacidad represora y el efecto fenotípico de la homeoproteína, debido probablemente a la interacción con el correpresor Groucho, que reconoce el dominio WRPW.²⁹⁻³¹ La sobreexpresión de las mutantes con sustitución del motivo YPWM por WRPW mostraron un fenotipo similar al obtenido con Antp, sugiriendo que el dominio WRPW rescata la actividad homeótica de Antp, en ausencia de

YPWM. En la etapa adulta de la mosca, la expresión ectópica de Antp generó además la transformación homeótica del segmento antenal A3 a tarso y la presencia de cerdas en la tibia distal. Como se esperaba, las mutantes con sustitución de YPWM por alaninas presentaron una transformación nula o débil de la antena, y corroboraron así la importancia funcional de YPWM en la actividad homeótica de Antp. Resultados similares se obtuvieron en la combinación de AAAA-Antp y una forma activa constitutiva del receptor Notch,⁹ o en la sustitución de YPWM por AAAA en *fushi tarazu*.³² En contraste con los defectos en el desarrollo embrionario, las mutantes que contienen WRPW mostraron únicamente un engrosamiento del segmento A3, indicando que este dominio represor no sustituye la función de YPWM en la transformación antena-tarso.

Dado que la transformación homeótica depende de la activación/represión de genes endógenos, se evaluó el papel del motivo YPWM en la expresión de los genes blanco *tsh*, *grn*, *Scr* y *Salm* como modelo de estudio. El gen homeótico *tsh* se expresa normalmente en los parasegmentos 3-13 del embrión.³³ La sobreexpresión de Antp induce la activación ectópica de este gen blanco en la región anterior del embrión.³⁴⁻³⁶ La ausencia de activación de *tsh* en la mutante Antp con alaninas confirma que YPWM es indispensable para la activación de este gen blanco en *Drosophila*. Sin embargo, estudios realizados con las homeoproteínas ftz de *Drosophila* y *Tribolium* establecieron que el motivo YPWM es necesario para la activación de *tsh in vivo*.³⁶

Asimismo, estos resultados proponen la formación de un heterodímero con el cofactor Exd para la regulación del gen blanco *tsh*, debido a que la expresión de este gen blanco en embriones nulos de *Exd* se reduce considerablemente.³⁷ Ensayos adicionales de transactivación y retardación en gel corroboraron la interacción Antp/Exd mediada exclusivamente

por el tetrapéptido YPWM de Antp.³⁸ Otros estudios revelan que el motivo YPWM también une la homeoproteína Antp con la maquinaria transcripcional basal, a través del factor TAF155.¹¹ En el caso de las transformaciones homeóticas antena-tarso, se requiere principalmente la activación de genes específicos de pata y represión de genes necesarios para la antena.²⁴ Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de Antp resultó en una activación ectópica del gen *grn* en el disco imaginal de la antena,³⁹ y esta activación presenta el mismo patrón de comportamiento que el gen blanco *tsb*: un requerimiento absoluto del motivo YPWM de Antp.

Por otra parte, el gen homeótico *Scr* se expresa normalmente en el segmento protorácico (T1) del embrión, pero no en el mesotóraco (T2), debido a la expresión endógena de la homeoproteína Antp.^{40,41} Sorprendentemente, la expresión ectópica de Antp es capaz de reprimir *Scr* en el segmento T1, a diferencia de la mutante que presenta la sustitución de YPWM por alaninas, lo cual permite concluir que YPWM es crucial en Antp para la represión de este gen blanco. De igual manera, la represión del gen de antena *Salm* en el disco imaginal ojo-antena por la sobreexpresión de Antp o mutantes que contienen un dominio funcional YPWM, con excepción de ^{AAA}Antp, indican que este motivo presenta un papel esencial en el reclutamiento de correpresores para la regulación de estos genes blanco.

El potencial represor de YPWM fue adicionalmente corroborado mediante su fusión al extremo C-terminal de la proteína transactivadora GAL4 (GAL4^{YPWM}). El análisis de la actividad transcripcional de esta proteína mostró una reducción significativa de 55%, debido a la presencia de YPWM, confirmando que este motivo actúa como un dominio de represión transcripcional de manera similar que la fusión GAL4-WRPW previamente descrita.^{30,38} Es importante mencionar que en todos los experimen-

tos los mutantes con sustitución de YPWM por WRPW conservaron la actividad represora, debida probablemente a la presencia de este dominio, mientras que la fusión de WRPW al extremo C-terminal de Antp mostró una mayor represión, ya que contiene dos dominios represores (YPWM y WRPW). En relación a esto, la adición del dominio de represión *engrailed* (En), que es capaz de unirse a Gro *in vivo*,⁴² no confirió cambios significantes en la actividad de Antp (resultados no mostrados).

Este requerimiento diferencial del motivo YPWM en Antp sustenta la noción de que diferentes reglas pueden aplicarse en la regulación transcripcional activadora y represora mediada por las homeoproteínas. La comparación de secuencias de sitios de unión Hox⁸ muestran que los sitios bipartitas Hox-Pbx se encuentran en potenciadores de genes activados por el complejo Hox-Pbx, mientras que los elementos regulatorios con sitios individuales Hox (sin la unión de Pbx) se distribuyen igualmente entre los genes activados o reprimidos por estos factores.

En conclusión, nuestros resultados son contundentes, al demostrar que la homeoproteína Antp tiene una función dual para la activación de los genes requeridos en la morfogénesis del tórax, así como la represión de los genes de la cabeza en *D. melanogaster* como se detalla a continuación:

- La actividad funcional dual *in vivo* de Antp en las transformaciones homeóticas, en embriones y antena → tarso en adultos, requiere la presencia de YPWM.
- El dominio YPWM de Antp es necesario para la activación de los genes blanco *tsh* y *grn* en la región anterior del embrión y el disco antenal de *D. melanogaster*, respectivamente.
- La represión de los genes blanco: *Scr* en embriones, *Salm* y *dan* en el disco de antena depende del tetrapéptido YPWM de Antp.

- La sustitución y fusión del motivo WRPW rescata e incrementa, respectivamente, el fenotipo de la actividad represora de YPWM en Antp, y no afecta su activación funcional.
- El enlazador largo incrementa la capacidad de activación, mientras que el corto aumenta la represión de Antp en *D. melanogaster*.

RESUMEN

Los genes homeóticos están involucrados en el control genético del desarrollo de los diferentes organismos que permiten la especificación del plan corporal. Estos genes presentan una secuencia altamente conservada denominada *homeobox*, que codifica para un polipéptido de 60 aminoácidos, conocido como homeodominio (HD), el cual representa el dominio de unión al DNA y contiene un motivo de cuatro aminoácidos altamente conservado denominado “YPWM”, involucrado en interacciones proteína-proteína. En este trabajo se investigó la paradoja de los genes Hox, que consiste en determinar el mecanismo mediante el cual homeoproteínas altamente similares adquieren distintas funciones durante el desarrollo. Se realizó la disección molecular de *Antenapedia* (Antp) para determinar su actividad funcional durante el desarrollo de *D. melanogaster*. Para ello se realizó el análisis mutacional de YPWM, el enlazador entre el HD y YPWM, así como la sustitución y fusión al dominio de represión WRPW en la actividad funcional que permite la activación y represión de los genes blanco de Antp. La mutación de YPWM en Antp mostró que este motivo es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp en la involución de la cabeza, en las transformaciones torácicas T1 a T2 y tarsales mediante represión de los genes de la antena y activación de los genes tarsales. Esta función dual del motivo YPWM también se mostró en la activación y represión de los

genes blanco de Antp, ya que se requirió para la activación ectópica de los genes blanco *teashirt (tsh)* y *grain (grn)*, así como para represión endógena de *Scr* y ectópica de *Salm* y *dan*. La sustitución y fusión del motivo WRPW rescataron e incrementaron, respectivamente, la actividad represora de YPWM en Antp, sin afectar su activación funcional en las transformaciones tarsales ni en la activación de los genes blanco de Antp analizados. Por otro lado, las variaciones en el número de aminoácidos que separan YPWM del HD en las isoformas de Antp incrementaron preferencialmente la eficiencia de Antp para la actividad de represión o activación, lo que sugiere su participación en la especificidad funcional de Antp. Los resultados obtenidos permiten concluir que el tetrapéptido YPWM de Antp tiene una función dual para la activación de los genes requeridos en la inducción del tarso, así como la represión de los genes antena, ya que mostró ser indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco de Antp en diferentes etapas del desarrollo de *D. melanogaster*. Lo anterior es altamente relevante, ya que la actividad funcional de los diferentes genes blanco se regula por interacciones proteína-proteína, a través del tetrapéptido YPWM, modulando la selección de los genes blanco de Antp, que permiten el desarrollo del tórax y reprimen los genes de la cabeza en *D. melanogaster*. Este mecanismo molecular de activación-represión génica sugiere la interacción con diferentes cofactores (activadores o represores), en una forma dinámica que permite la especificidad funcional de Antp durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

Palabras clave: *D. melanogaster*, Antenapedia, YPWM, WRPW.

ABSTRACT

The homeotic genes are involved in the genetic con-

trol of development of the different organisms the specification of body plan. These genes have a highly conserved sequence known as homeobox, which encodes a polypeptide of 60 aminoacids known as homeodomain (HD), which represents the DNA binding domain and contains four highly conserved amino acids called «YPWM», involved in protein-protein interactions. In this study the paradox of Hox genes is studied, to determine the mechanism by which highly related homeoproteins acquire different functions during development.

We performed molecular dissection of Antennapedia (Antp) to determine their functional activity during development of *D. melanogaster*. To do this, we performed mutational analysis of YPWM, the link between HD and YPWM, as well as the substitution and fusion into the WRPW domain of repression to determine the functional activity that allow activation and repression of target genes Antp. The mutation of YPWM showed that this motif is necessary and indispensable for the *in vivo* function of Antp in the involution of the head, in the thoracic transformations of T1 to T2, and in the tarsal transformation through repression of genes of the antenna and tarsal gene activation. This dual function of YPWM was also shown in the activation and repression of target genes Antp because it was required for ectopic activation of target genes *teshirt* (*tsh*) and *grain* (*grn*), as well as for endogenous repression of *Scr* and ectopic repression of *Salm* and *dan*. The replacement and fusion of the WRPW motif rescued and increased respectively the repressive activity of YPWM in Antp, with no effect on the functional activation of tarsal changes, or in the activation of the analyzed Antp target genes. On the other hand, variations in the number of amino acids which naturally separate YPWM from HD in the Antp isoforms preferentially increased efficiency of Antp for repression or activation activity, suggesting

its involvement in the functional specificity of Antp. The results obtained indicate that the tetrapeptide YPWM of Antp has a dual role in the activation of genes required for the induction of tarsus, as well as the repression of antenna genes, which proved to be essential and crucial for the activation and repression of genes target of Antp in different developmental stages of *D. melanogaster*. The latter is highly relevant, as the functional activity of the different target genes can be regulated by protein-protein interactions, through the tetrapeptide YPWM modulating the selection of target genes that allow the development of thorax by Antp and repress the head genes in *D. melanogaster*. The molecular mechanism of activation and repression gene suggests interaction with different cofactors (activator or repressors) in a dynamic way that allows the functional specificity of Antp during development of *D. melanogaster*.

Keywords: *D. melanogaster*, Antennapedia, YPWM, WRPW.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al grupo del Prof. Walter Gehring, de la Universidad de Basilea, en Suiza, por la colaboración, apoyo y discusión al presente trabajo. Asimismo, al Conacyt, por el apoyo en el proyecto 39479-Q, y al Paicyt, con el proyecto CN1341-06. D.L. Cárdenas y K. Villanueva agradecen el apoyo de las becas de Conacyt 46659 y 167042, respectivamente.

REFERENCIAS

1. Gehring, W. Homeoboxes in the study of development. *Science* 1987; 236: 1245-1252.
2. Lewis, E. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978; 276(5688): 565-70.
3. McGinnis W. and Krumlauf R. Homeobox genes and axial

- patterning. *Cell* 1992; 68(2) : 283-302.
4. Gehring W.J., Kloter U., Suga H. Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state. *Curr Top Dev Biol.* 2009; 88: 35-61.
 5. Kmita-Cunisse M., Loosli F. *et al.* Homeobox genes in the ribbonworm *Lineus sanguineus*: evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (6): 3030-3035.
 6. McGinnis, W., Garber, R. *et al.* A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 1984; 37(2): 403-8.
 7. Scott M.P. and Weiner A.J. Structural relationships among genes that control development : sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(13): 4115-4119.
 8. Gehring, W., Y. Qian, *et al.* Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994; 78(2): 211-23.
 9. Qian, Y.Q., Otting G., Furukubo-Tokunaga K., Affolter M., Gehring W.J. and Wuthrich K. NMR structure determination reveals that the homeodomain is connected through a flexible linker to the main body in the *Drosophila* Antennapedia protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 10738-42.
 10. Qian, Y.Q., Reséndez-Pérez, D. *et al.* The *des(1-6) Antennapedia* homeodomain: Comparison of the NMR solution structure and the DNA-binding affinity with the intact *Antennapedia* homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 91:4091-4095.
 11. Prince, F., Katsuyama T. *et al.* The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* 2008; 135 : 1669-1679.
 12. Green, M.R. and Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York Fourth Edition.
 13. Cárdenas-Chávez, D.L. Purificación de las proteínas Antennapedia, GAL4 y mutantes en el tetrapéptido YPWM: Dominio de represión transcripcional en Antennapedia. Tesis de Maestría en Ciencias FCB/UANL 2007.
 14. Bello, B., Reséndez-Pérez, D. *et al.* Spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila* by means of tetracycline responsive promoters *Development* 1998 125:2193-2202.
 15. Reséndez-Pérez, D., Canales-del Castillo, *et al.* Arquitectos moleculares en el diseño del cuerpo: análisis funcional de Antennapedia en *Drosophila*. *CiENCiAUANL* 2002. V3: 305-315.
 16. Moreno-Rocha, J.C., Rodríguez-Padilla, C. *et al.* Visualización de la expresión específica de tejido mediante microscopía confocal láser. *CiENCiAUANL* 2004 VII:3348-354.
 17. Villanueva-Segura, O.K. Efecto del motivo WRPW en la actividad funcional de Antennapedia en *Drosophila melanogaster* Tesis de maestría, FCB/UANL 2007.
 18. Sullivan, M., Hawley, R.S. Asburner, M. *Drosophila* Protocols CSH Laboratory Press 2000.
 19. Canales-del-Castillo, R. Actividad funcional del tetrapéptido YPWM de Antennapedia en la regulación de los genes blanco durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría en ciencias, FCB/UANL, 2005.
 20. Brand A.H., Manoukian A.S. and Perrimon N. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* 1994; 44: 635-654.
 21. Gibson, G. and W. Gehring. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during *Drosophila* development. *Development* 1988; 102(4): 657-675.
 22. Kaufman, T.C., Seeger, M.A. and Olsen, G. Molecular and genetic organization of the Antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 1990; 27: 309-362.
 23. Panganiban G., Sebring A., *et al.* The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* 1995; 270(5240): 1363-1366.
 24. Struhl, G. A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature* 1981; 293(5827): 36-41.

25. Duffy J.B. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 2002;34: 1-15.
26. Li, X., Murre C. *et al.* Activity regulation of a Hox protein and a role for the homeodomain in inhibiting transcriptional activation. *EMBO J.* 1999; 18: 198-211.
27. Wainwright S.M. and Ish-Horowitz D. Point mutations in the *Drosophila* hairy gene demonstrate in vivo requirements for basic, helix-loop-helix and WRPW domains. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12(6): 2475-2483.
28. Goldstein, R.E., Jiménez G. *et al.* Hucklebein repressor activity in *Drosophila* terminal patterning is mediated by Groucho. *Development* 1999; 17: 3747-55.
29. Dawson, S.R., Turner D.L. *et al.* Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggest two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 6923-6931.
30. Fisher, A.L., Ohsako, S., Caudy, M. The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell. Biol* 1996; 16: 2670-2677.
31. Parkhurst, S.M. Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends. Genetic.* 1998; 14: 130-132.
32. Löhr U. and Pick L. Cofactor-interactions motifs and the cooption of a homeotic Hox protein into the segmentation pathway of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 2005; 15(7): 643-649.
33. McCormick A., Coré N., *et al.* Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene. *Development* 1995; 121: 2799-2812.
34. Roder, L., C. Vola, *et al.* The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development* 1992; 115(4): 1017-1033.
35. Zeng, W., D. Andrew, *et al.* Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development* 1993; 118(2): 339-352.
36. Lohr, U., M. Yussa, *et al.* *Drosophila* fushi tarazu, a gene on the border of homeotic function. *Curr. Biol.* 2001; 11(18): 1403-12.
37. Rauskolb C. and Wieschaus E. Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *EMBO J.* 1994; 13(15): 3561-3569.
38. Papadopoulos D.K., Reséndez-Pérez D., Cárdenas-Chávez D.L., *et al.* Functional synthetic Antennapedia genes and the dual roles of YPWM motif and linker size in transcriptional activation and repression. *PNAS* 2011; 108 (29):11959-64.
39. Grieder N.C. *et al.* Spalt major controls the development of the notum and of wing hinge primordia of the *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Dev Biol* 2009; 329:315-326.
40. Riley P.D., Carroll S.B. and Scott M.P. The expression and regulation of Sex combs reduced protein in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 1987; 1(7): 716-730.
41. Pelaz S., Urquía N. and Morata G. Normal and ectopic domains of the homeotic gene Sex combs reduced of *Drosophila*. *Development* 1993; 117(3): 917-923.
42. Tolkunova E.N., Fujioka M., *et al.* Two distinct types of repression domain in engrailed: one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(5): 2804-2814.

Recibido: 1 de septiembre de 2012

Aceptado: 1 de septiembre de 2012