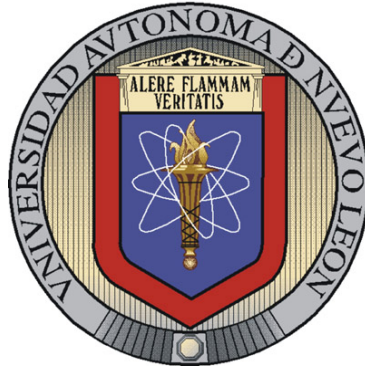


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL TETRAPÉPTIDO “YPWM” DE  
ANTENAPEDIA EN LA REGULACIÓN DE LOS  
GENES BLANCO DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster***

**Por**

**Q.B.P. RICARDO CANALES DEL CASTILLO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

**Julio, 2005**

**ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL TETRAPÉPTIDO “YPWM” DE  
ANTENNAPEPIA EN LA REGULACIÓN DE LOS  
GENES BLANCO DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster***

**Aprobación de la Tesis:**

---

Dra. Diana Reséndez Pérez  
Directora

---

M en C Jorge Armando Martínez  
Secretario

---

Dr. Mario Morales Vallarta  
Vocal

---

Subdirector de Posgrado

## COMISIÓN DE TESIS

---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**

---

**Dr. Mario Morales Vallarta**

---

**M.C. Jorge A. Verduzco Martínez**

## **Área de Trabajo**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología, en el Departamento de Biología Celular y Genética, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la Asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Consejo de Ciencia y Tecnología (Proyecto 39479-Q) por su apoyo y la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
1. NOMENCLATURA.....	1
2. LISTA DE FIGURAS .....	4
3. RESUMEN .....	6
4. INTRODUCCION.....	8
5. ANTECEDENTES .....	10
5.1 El modelo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
5.2 Genes homeóticos.....	11
5.3 Descubrimiento del Homeobox .....	13
5.4 Evolución de los genes <i>Hox</i> .....	14
5.5 Genes <i>Hox</i> en el desarrollo de <i>Drosophila</i> .....	16
5.6 Control de la expresión de los genes <i>Hox</i> .....	17
5.7 Las homeoproteínas son factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco .....	19
5.8 Regulación funcional de las homeoproteínas .....	20
5.9 Antennapedia .....	24
5.10 Genes blanco de Antennapedia .....	29
5.10.1 Genes de regulación directa.....	30
5.10.2 Genes de regulación indirecta.....	33
5.11 Tetrapéptido YPWM .....	34
5.11.1 Terapéptido YPWM en Labial .....	38
5.11.2 Tetrapéptido YPWM en Fushi-tarazu .....	39
5.11.3 Tetrapéptido YPWM en Ultrabithorax .....	40
5.11.4 Tetrapéptido YPWM en Abdominal-A .....	40
5.11.5 Tetrapéptido YPWM en HoxB8.....	41
5.11.6 Tetrapéptido YPWM en HoxA1 .....	42
5.11.7 Tetrapéptido YPWM en Antennapedia .....	42



6.	IMPORTANCIA .....	44
7.	OBJETIVO .....	45
8.	HIPÓTESIS .....	46
9.	ESTRATEGIA GENERAL.....	47
	9.1. Esquema de la estrategia general.....	50
10.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
	10.1. Amplificación y mantenimiento de las moscas transgénicas .....	51
	10.2. Sexado y realización de cruzas .....	53
	10.3. Cruzas genéticas para la activación de <i>tsh</i> y represión de <i>Scr</i> por Antp ....	53
	10.4. Cruzas genéticas para la activación por Antp de los potenciadores <i>fkh[250<sup>con</sup>] lacZ</i> y <i>tsh-lacZ</i> .....	54
	10.5. Colecta de embriones e inducción de la expresión ectópica de Antp.....	55
	10.6. Visualización de la expresión génica mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	56
11.	RESULTADOS .....	59
	11.1 Visualización de la expresión endógena y ectópica de Antennapedia .....	59
	11.2 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM en la activación de <i>tsh</i> .....	60
	11.2.1 La activación ectópica de <i>tsh</i> por Antp dirigida al dominio <i>ptc</i> requiere el tetrapéptido YPWM.....	60
	11.3 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en la represión de <i>Scr</i> .....	64
	11.3.1 Cinética de la expresión de <i>Scr</i> durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> .....	64
	11.3.2 Represión de <i>Scr</i> por Antennapedia ectópica dirigida con el potenciador <i>ptc</i> .....	66
	11.3.3 El tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la represión de <i>Scr</i> .....	67
	11.4 Efecto del tetrapéptido YPWM de Antp en la activación del elemento <i>fkh[250<sup>con</sup>]</i> .....	70
	11.5 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM en la activación del potenciador <i>tsh</i> .....	71
	11.6 Expresión del cofactor Exd durante el estadio embrionario de <i>D</i> <i>melanogaster</i> .....	73
12	DISCUSIÓN.....	75
13	CONCLUSIONES.....	81



14	BIBLIOGRAFIA .....	83
15	APÉNDICE .....	99





## 1. NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
<i>abd A</i>	Gen <i>abdominal A</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>
Antp-C	Complejo Antennapedia
Antp <sup>AAAA</sup>	Sustitución de YPWM por cuatro alaninas en la proteína Antennapedia
ARN	Acido Ribonucleico
AP	Fosfatasa alcalina
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Cloro-Indol/Tetrazolium nitro azul
β-Gal	β-Galactosidasa
BSA	Albumina bovina sérica
BX-C	Complejo Bithorax
CKIII	Casein kinasa
cl	clypeolabrum
<i>cnn</i>	<i>Gen centrosomin</i>
CNS	Sistema nervioso central
CyO	Curly de Oster
°C	Grados Celsius
ΔHD	Delección en el homeodominio
<i>Dfd</i>	Gen <i>Deformed</i>
<i>Dll</i>	Gen <i>Distal-less</i>
<i>dpp</i>	Gen <i>decapentaplegic</i>



<i>exd</i>	Gen extradenticle
Exd	Proteína extradenticle
<i>fh</i>	Gen <i>forkhead</i>
<i>fh[250con]</i>	Potenciador del gen <i>forkhead</i>
<i>ftz</i>	Gen <i>fushi tarazu</i>
g	Gramos
h	Horas
HD	Homedominio
Hs	Promotor de choque térmico
<i>hth</i>	Gen <i>homothorax</i>
Hth	Proteína homothorax
Hys	Esclerito hyposomal
Hx	Hexapéptido
kpb	Mil pares de bases
<i>Lab</i>	Gen <i>labial</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
M	Molaridad
Md	Mandibular
mH	Ganchos de la boca
min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
<i>pb</i>	<i>proboscipedia</i>
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PBT	Buffer fosfato salino + Tritón X-100
PcG	Grupo Polycomb
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
pc	procephalon
PS	Parasegmento



<i>ptc</i>	Potenciador del gen <i>patched</i>
<i>Scr</i>	Gen <i>Sex combs reduced</i>
Trx-G	Grupo tritórax
Tsh	Proteína Teashirt
<i>tsh</i>	Gen <i>teashirt</i>
T1	Segmento torácico 1
T2	Segmento torácico 2
T3	Segmento torácico 3
UAS	Secuencias de union a GAL4
<i>Ubx</i>	Gen <i>Ultrabithorax</i>
wt	wild type
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
yw	yellow/white
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina



## 2. LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	11
2. Mutante homeótica Ultrabithorax en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
3. Los genes <i>Hox</i> regulan la identidad de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior en <i>Drosophila</i> .....	14
4. Evolución de los genes <i>Hox</i> .....	15
5. Representación esquemática de la jerarquía genética en el desarrollo embrionario .....	17
6. Modelos de la interacción con cofactores para la actividad funcional de dos homeoproteínas .....	21
7. La mutante Antennapedia .....	24
8. Organización estructural del gen Antp y su proteína.....	26
9. Análisis comparativo de Antennapedia entre diferentes especies de insectos.	27
10. Interacción del homeodominio Antennapedia con el ADN.....	29
11. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	35
12. Interacción de los homeodominios Ubx y Exd con el ADN.....	37
13. Función dual del tetrapéptido YPWM de labial.....	39
14. Modelo para la regulación de la actividad de Abd-A .....	41
15. Regulación de la expresión génica mediante el sistema binario GAL4/UAS..	48



16.	Expresión endógena y ectópica de Antennapedia en embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	59
17.	Efecto de la expresión ectópica de Antp y Antp <sup>AAAA</sup> en la activación del gen blanco <i>tsh</i> .....	60
18.	La activación ectópica de <i>tsh</i> dirigida por el potenciador <i>ptc</i> requiere del tetrapéptido YPWM .....	62
19.	Análisis de la activación de <i>tsh</i> por la expresión de Antp mediante un promotor de choque térmico .....	63
20.	La expresión de Antp <sup>AAAA</sup> mediante choque térmico no permite la activación de <i>tsh</i> .....	64
21.	Cinética de la expresión de <i>Scr</i> durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> .....	65
22.	Efecto de la expresión de Antp, dirigida mediante un promotor de choque térmico, en el blanco <i>Scr</i> .....	66
23.	La expresión ectópica de Antp reprime a <i>Scr</i> .....	67
24.	La expresión de Antp <sup>AAAA</sup> no reprime a <i>Scr</i> en los segmentos lb y T1 pero sí lo activa en todos los segmentos donde es dirigida .....	68
25.	El tetrapéptido YPWM de Antp es indispensable para la represión de <i>Scr</i> en estadio embrionario avanzado.....	69
26.	El tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la represión de <i>Scr</i> .....	69
27.	La activación ectópica del elemento <i>fkh[250<sup>con</sup>]</i> por Antp requiere el tetrapéptido YPWM .....	71
28.	La activación ectópica del potenciador <i>tsh</i> por Antp es independiente del dominio YPWM.....	72
29.	Distribución de <i>Exd</i> durante el desarrollo embrionario .....	74



### 3. RESUMEN

Los genes *Hox* codifican para una serie de factores transcripcionales, llamados homeoproteínas, que están involucrados en la regulación de los genes que participan en el desarrollo de los organismos. Las homeoproteínas comparten un dominio de unión al ADN, el homeodominio (HD), y en consecuencia reconocen secuencias de unión al ADN muy similares. Sin embargo estas homeoproteínas exhiben *in vivo* funciones biológicas altamente específicas. Se ha establecido que las homeoproteínas ganan especificidad mediante la cooperación con cofactores, con lo cual incrementan su afinidad de unión al ADN. El dominio YPWM es un motivo de interacción con cofactores que se encuentra altamente conservado en el extremo N-terminal del homeodominio de la mayoría de las homeoproteínas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad funcional del motivo YPWM de la homeoproteína Antennapedia (Antp) en la activación/represión de sus genes blanco nativos y secuencias reguladoras en embriones de *Drosophila melanogaster*.

Utilizando el sistema de regulación UAS/GAL4 se dirigió ectópicamente Antp en embriones de *D. melanogaster* para determinar mediante inmunohistoquímica y/inmunofluorescencia la expresión de los genes blanco *teashirt (tsh)*, *sex combs reduced (Scr)* y en las secuencias reguladoras *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ*.



Los resultados mostraron que Antp ectópica activó la expresión de *tsh*, las secuencias reguladoras *fkf[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ*, y reprimió la expresión de *Scr* en regiones anteriores de la cabeza. Interesantemente la proteína mutante en YPWM fue incapaz de activar a *tsh*, *fkf[250<sup>con</sup>]-lacZ* y de reprimir la expresión de *Scr*, sin embargo si fue capaz de activar a la secuencia reguladora de *tsh-lacZ* en regiones anteriores.

Estos resultados nos permitieron concluir que la ausencia de los cuatro aminoácidos YPWM en Antp eliminó totalmente la actividad funcional de esta homeoproteína en los genes blancos analizados, posiblemente debido a la falta de interacción con sus cofactores. Asimismo, esta actividad crucial del YPWM de Antp en la regulación de sus genes blanco abre la posibilidad para estudiar la función en la regulación de otros genes blancos nativos, así como la identificación de los cofactores que podrían interactuar a través de este motivo en el complejo del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.



## 4. INTRODUCCION

En la mayoría de los animales el plan corporal se desarrolla durante la embriogénesis a partir de estructuras seriales repetidas que tienen su origen en células similares. Estas estructuras homólogas alcanzan frecuentemente diferentes morfologías y funciones dentro del animal adulto, mientras que los cambios en número, forma y función marcan diferencias importantes evolutivas entre taxas. El entendimiento básico y modular del diseño animal así como su evolución requieren del conocimiento de la genética y los mecanismos moleculares del desarrollo que regulan la formación y la identidad de las diferentes partes del cuerpo. Los genes selectores tanto en invertebrados como en los vertebrados juegan un papel central en este proceso. Estos codifican factores transcripcionales que dirigen la formación específica de tejidos así como la diferenciación de las partes del cuerpo homólogas como son los segmentos, vértebras y apéndices. Se ha establecido que las proteínas selectoras regulan la expresión de numerosos genes blancos dentro de las redes y cascadas de transducción de señales que controlan el desarrollo de los tejidos. Dentro de esta clase de genes selectores se encuentran los genes *Hox*, los cuales codifican proteínas reguladoras, llamadas homeoproteínas, que contienen un dominio de 60 aminoácidos altamente conservado llamado homeodominio. La regulación a nivel molecular de la expresión de los genes blanco por parte de las homeoproteínas aún no se ha clarificado totalmente ya que pocos





genes blanco directos se han identificado tanto en invertebrados como en vertebrados. Aún mas, estas homeoproteínas muestran una baja especificidad de unión al DNA; se unen a secuencias de 6 pares de bases que contienen el núcleo conservado TAAT que aparece en el genoma de los animales aproximadamente una vez cada mil pares de bases, sugiriendo que existen muchos genes potenciales reconocidos por las homeoproteínas. Debido a lo anterior una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo es ¿cómo homeoproteínas tan similares producen *in vivo* diferentes efectos para la determinación de los distintos programas de regulación génica? Se ha establecido que algunas homeoproteínas adquieren la especificidad de activación/represión génica en un tejido mediante interacción con cofactores activadores ó represores. El análisis de las secuencias aminoacídicas adyacentes al homeodominio han mostrado que existe una región altamente conservada río arriba de éste, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina) que no establece contacto con el DNA y que modula la especificidad de la homeoproteína mediante la interacción con cofactores.

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha demostrado ser un modelo eficiente y versátil en los estudios genéticos del Desarrollo. El gen *Antennapedia* de *Drosophila* determina la identidad de los segmentos torácicos en los cuales se localiza un par de alas y patas. A la fecha se han descrito pocos genes blanco mediante interacción directa con *Antennapedia* y aun no se ha clarificado la regulación específica a nivel molecular. El análisis mediante una sustitución de Alaninas en el tetrapéptido YPWM de *Antennapedia*, y la determinación de la activación y represión de los genes blanco específicos *tsh*, *Scr* y *fkh[250<sup>con</sup>]* durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, nos permitirá establecer la importancia funcional del YPWM.



## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 El modelo de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, reino animalia, filum arthropoda, clase insecta, y orden díptera (Tudge, 2000), se ha utilizado como modelo en la investigación genética y del desarrollo desde los primeros estudios realizados por Morgan en 1919 (Lewis, 2000). *D. melanogaster* contiene cuatro cromosomas: los sexuales X/Y (1) y los autosómicos 2,3 y 4 (siendo este último el más pequeño). Su genoma ha sido secuenciado y contiene cerca de 120 millones de pares de bases y aproximadamente 13,647 genes (Adams *et al.*, 2000).

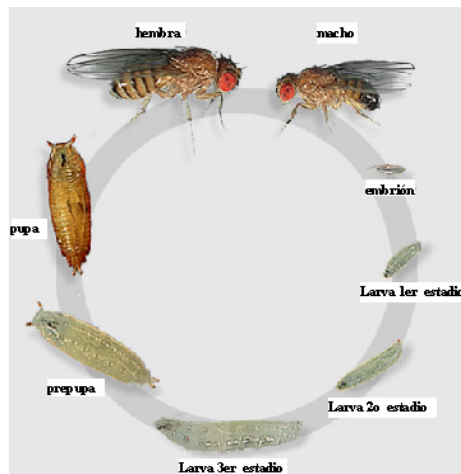
*D. melanogaster* es un insecto holometábolo, es decir que tiene un desarrollo indirecto ya que pasa por distintas fases y mediante metamorfosis alcanza su estado adulto. La Figura 1 muestra el diagrama de las principales etapas del desarrollo:

1. Embriogénesis temprana: Comprende desde el momento de la fertilización hasta las 2.5-3 horas de desarrollo donde inicia la celularización.
2. Embriogénesis tardía: A partir de la celularización hasta que emerge la larva (20-22 horas después de la fertilización).



3. Estadio larvario: Comienza desde que emerge la larva (120 horas) y se subdivide en: estadio 1, estadio 2 y estadio 3. El paso de un estadio a otro esta asociado con un cambio de muda.

4. Pupa: Empieza desde la formación de la cubierta protectora y continúa hasta la eclosión, donde emerge el adulto completamente formado.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** El diagrama muestra las diferentes etapas del desarrollo de *Drosophila* desde huevo hasta adulto. Este proceso dura aproximadamente 10 días dependiendo de la temperatura ambiental.

En general el plan corporal de *Drosophila* es el mismo en el embrión, la larva y el adulto, en cada una de estas fases se distingue en los extremos la cabeza y cola, entre los cuales se encuentran unidades repetidas llamados segmentos. Cada segmento en la mosca adulta tiene su propia identidad. Tres de esos segmentos forman el tórax en donde el primero de ellos contiene un par de patas, en el segundo un par de alas y patas, mientras que el tercero

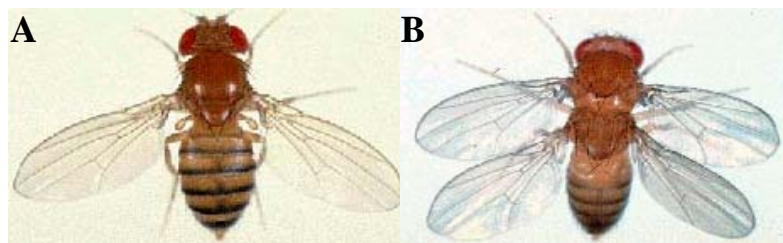
tiene un par de patas y halterios mientras que los restantes ocho conforman el abdomen (Gilbert, 2003).

## 5.2 Genes homeóticos

Durante el desarrollo embrionario de los animales se definen los ejes del cuerpo, esta información desencadena la activación secuencial de distintos programas de



desarrollo en diferentes regiones, permitiendo a las estructuras formarse en el lugar correcto. Los genes homeóticos controlan la diversificación de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior durante el desarrollo embrionario de los animales. El primer paso para el descubrimiento de estos genes reguladores del desarrollo se inició con el estudio de algunas mutaciones en la mosca de la fruta *D. melanogaster*, en las que se observaron la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo. Estas mutaciones fueron denominadas “homeóticas” basadas en el trabajo de William Bateson de 1894 (Bateson, 1894) en el cual postuló el término “Homeosis” para describir la sustitución de una parte del cuerpo por otra estructura homóloga. El primer mutante homeótico referido en *Drosophila* fue Bithorax (Calvin Bridges, 1923) con una transformación en el tercer segmento torácico donde los halterios u órganos de equilibrio son sustituidos por un segundo par de alas, es decir el tercer segmento torácico adquirió la identidad del segundo (fig 2). Posteriormente, se describió *Antennapedia* (*Antp*) otro mutante homeótico en la cual las antenas son substituidas por una par de patas (LeCalvez *et al.*, 1948).



**Figura 2. Mutante homeótica Ultrabithorax en *Drosophila melanogaster*.** (A) Mosca normal con un par de alas en el segundo segmento torácico (T2) y halterios en el tercer segmento torácico (T3). (B) Una triple mutación en el gen *Ultrabithorax* suprime su función en T3 y causa la transformación de la identidad T3→T2 lo que ocasiona la aparición de un par extra de alas.

Edward Lewis en 1978 mostró que la identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca (desde el segundo segmento torácico hasta el

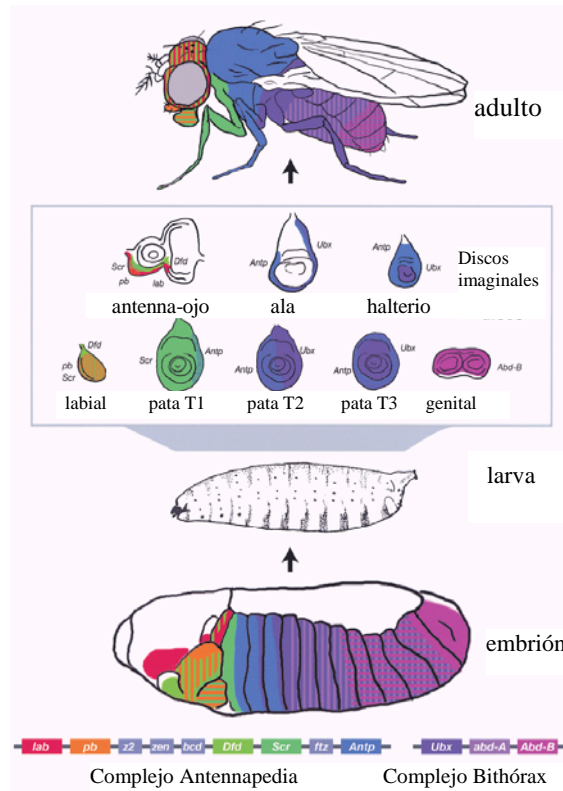


octavo segmento abdominal) son determinados por genes homeóticos agrupados en un complejo llamado Bithórax (BX-C), mientras que la identidad de los dos primeros segmentos torácicos, así como los segmentos de la cabeza (mandibular, maxilar y labial), resultan de la expresión de genes del complejo Antennapedia (ANT-C) (Lewis, 1978).

### 5.3 Descubrimiento del homeobox

Con el advenimiento de las técnicas del ADN recombinante fue posible aislar los complejos Antennapedia (Garber *et al.*, 1983) y Bithórax (Bender *et al.*, 1983) en *Drosophila*. Durante el desarrollo de estos experimentos se detectaron hibridaciones cruzadas en regiones homólogas entre los genes *Antennapedia*, *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* (Kuroiwa *et al.*, 1984), esta región de homología fue mapeada y secuenciada conduciendo al descubrimiento del “Homeobox” ó caja homeótica. Este segmento de ADN de 180 pb, altamente conservado, al utilizarse como sonda permitió la clonación del resto de los genes homeóticos ó *Hox*. En *D. melanogaster* estos genes se encuentran en el tercer cromosoma y está particularmente dividido en dos complejos separados por aproximadamente 8 millones de pares de bases (pb). El complejo Antennapedia (ANT-C) contiene los genes *labial (lb)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *sex combs reduced (Scr)* y *Antennapedia (Antp)*, mientras que en el complejo Bithórax (BX-C) se encuentran *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* y *Abdominal-B (Abd-B)* (fig. 3). Dentro del grupo *Hox* se encuentran otros genes Homeobox, como *Zen*, *ftz* y *bcd*, que no funcionan como genes *Hox*, pero que se saben

Actividad funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en los genes blanco en *D. melanogaster* que evolucionaron dentro del grupo a partir de los genes *Hox* (Ferrier y Minguillon, 2003).



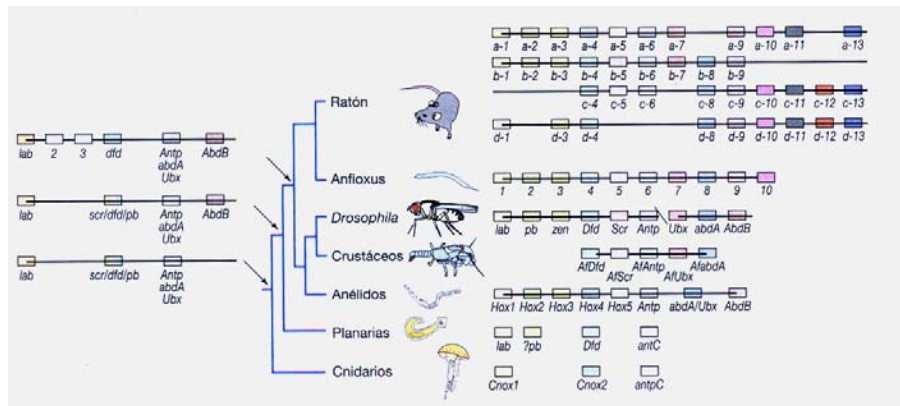
**Figura 3. Los genes Hox regulan la identidad de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior en *Drosophila*.** El color representa el segmento en donde se expresan cada uno de los genes Hox durante el desarrollo embrionario y en los discos imaginales en el estadio larvario (a partir de donde se desarrollan los apéndices). Nótese que la disposición en el cromosoma de los genes *Hox* es el mismo orden que las partes del cuerpo que definen.

#### 5.4 Evolución de los genes *Hox*

Utilizando al homeobox como sonda se encontró que los genes *Hox* están presentes en organismos tan distantes como levaduras y vertebrados superiores incluyendo al hombre (McGinnis *et al.*, 1984). Una de las características más importantes de los genes *Hox* es que estos siempre se encuentran agrupados en el genoma de diferentes especies de animales. Las especies de invertebrados analizadas contienen un solo grupo de genes



*Hox*, mientras que en vertebrados en el número varía; se han identificado cuatro en mamíferos y siete grupos en diferentes peces (fig. 4) (Meyer y Schartl, 1999). Basado en el análisis filogenético se ha propuesto que el último ancestro común de los insectos donde se incluyen a los protostomados, y vertebrados (deuterostomados) tuvo probablemente un solo grupo de seis o siete genes *Hox* (Yanze *et al.*, 2001). La familia de los genes *Hox* ha mantenido esta organización grupal en el genoma durante cientos de millones de años de evolución a través de diversas rondas de duplicación genética, lo que refleja su importancia en el desarrollo de todos los organismos (Patel y Prince., 2000). Se considera que la duplicación de los genes *Hox* y de los grupos *Hox* ha sido uno de los diversos motores de evolución de los planes corporales (Carroll *et al.*, 2000).



**Figura 4. Evolución de los genes *Hox*.** Árbol filogenético que muestra la evolución de los genes *Hox* en diferentes fílum. A la derecha se muestra los genes *Hox* que se han encontrado en cada uno de los taxones del árbol, los genes homólogos están alineados verticalmente y los que se muestran a la izquierda señalan aquellos que se encontraban presentes en los puntos de ramificación antes de la duplicación y divergencia.

Experimentos realizados con los genes *Hox* muestran que existe una relación entre la organización en el cromosoma y su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo, de tal manera que se expresan en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran en el cromosoma, fenómeno que se ha denominado Colinearidad en la expresión (Lewis, 1963; Duboule y Dolle, 1989). Los genes *Hox* en vertebrados se



activan sucesivamente de acuerdo a su posición en el cromosoma, lo que se ha llamado Colinearidad temporal, lo que refleja la formación gradual del eje anterior-posterior durante la embriogénesis (Doubule, 1994). Sin embargo, los genes *Hox* de la mosca se activan simultáneamente durante el etapa del blastodermo probablemente debido en gran parte a la velocidad de su embriogénesis (Ferrier y Minguillon, 2003).

### 5.5 Genes *Hox* en el desarrollo de *Drosophila*

Es durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* donde se establecen los ejes anterior-posterior, dorsoventral, se forman los segmentos y se confiere la identidad particular a cada uno de ellos. La jerarquía genética que controla estos eventos comienza con la acción de los genes de coordinación de origen materno (ver fig. 5).

Los genes de *efecto materno* se transcriben en el ovario de la mosca, y los RNA's mensajeros se transmiten a diferentes regiones del huevo. Estos codifican proteínas reguladoras que se difunden a través del blastodermo del sincitio. Los promotores de los primeros genes *cigóticos*, los genes *Gap*, responden a diferentes concentraciones y combinaciones de los factores de transcripción maternos, expresándose en amplios dominios. Los genes de *la regla del par* son regulados por diferentes combinaciones y niveles de los factores, y se expresan con cierta periodicidad. De esta manera en el embrión se localizan bandas regulares de RNA mensajeros (RNAm's) que se repiten en cada uno de los futuros segmentos. Finalmente, los factores de transcripción de regla de par actúan sobre los promotores de los genes de *polaridad segmental*. Estos definen la identidad regional de cada uno de los futuros segmentos y actúan durante el resto del desarrollo para mantener ese destino celular. A diferencia de los genes *Gap* y de la *regla*



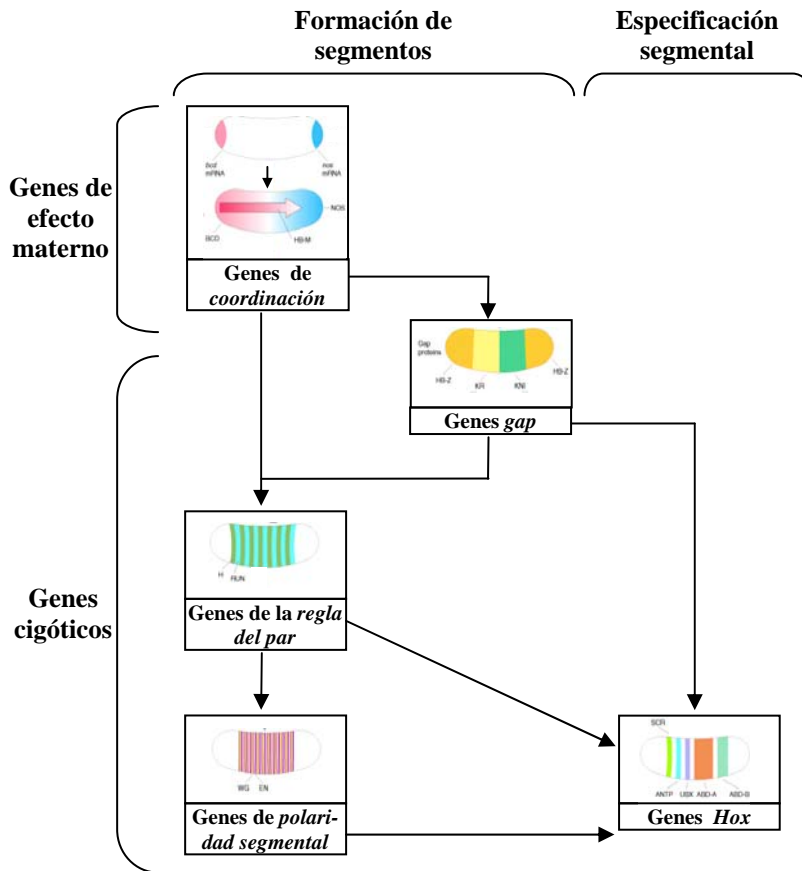


*del par*, sólo algunos genes de *polaridad segmental* codifican factores de transcripción.

Esto es porque sus funciones comienzan después de que las células se han formado, y por lo tanto las células deben de tener la capacidad de enviar y recibir señales entre ellas.

Las proteínas gap y de la regla de par establecen el patrón de segmentos y regulan la expresión de los genes *Hox*. Estos genes se expresan en diferentes dominios dentro de los segmentos y mediante sus factores de transcripción, las homeoproteínas, establecen en cada uno de los dominios características y funciones únicas (Gilbert, 2003 y Nasiadka *et al.*, 2002).

### 5.6 Control de la expresión de los genes *Hox*



**Figura 5. Representación esquemática de la jerarquía genética en el desarrollo embrionario.** La formación del patrón anterior-posterior en el embrión de *Drosophila* está controlado por diversas clases de genes. En el primer lugar de la jerarquía se encuentran los genes de *coordinación* de origen materno. Estos controlan la expresión de los genes *cigóticos*, que en combinación con los genes de *coordinación*, regulan a los genes de la *regla del par*. Estos genes a su vez regulan a los genes de *polaridad segmental*. Esta cascada genética es la que instruye la formación de los segmentos, mientras que la asignación de identidad segmental es instruida por genes *Hox*. La modulación de la expresión de los genes *Hox* es determinada, en parte, por la expresión y regulación entre los genes *Gap*, *regla de par* y *polaridad segmental*.



La expresión de los genes *Hox* en las células de un determinado segmento se regula mediante mecanismos de controles negativos o positivos. El silenciamiento de los genes *Hox* en *Drosophila* se lleva a cabo en dos etapas: Primero, productos de los genes *Gap* y *regla del par* localmente expresado se unen directamente a las secuencias *cis*-reguladoras de los genes *Hox* durante la embriogénesis temprana reprimiéndolos y delimitando así su expresión. A medida que avanza el desarrollo los genes *Hox*, que inicialmente se encontraban reprimidos en un segmento, se mantienen silenciados aun y cuando los represores *Gap* ya no se encuentran presentes. Este silenciamiento que se hereda a la descendencia celular lo llevan a cabo los productos de los genes del *Grupo Polycomb (PcG)* (Lewis, 1978; Struhl, 1981; Duncan, 1982 y Jürgens 1985), muchos de los cuales se encuentran conservados en secuencia y función en vertebrados (Müller *et al.*, 1995 y Shumacher *et al.*, 1996). En embriones de *Drosophila* que carecen de las proteínas PcG, los genes *Hox* inicialmente se expresan correctamente en sus dominios pero rápidamente comienzan a expresarse sin control (Struhl y Akam, 1985; Soto *et al.*, 1995). Las proteínas del grupo Trithorax (*trxG*) tienen una función antagónica a las PcG, al mantener la expresión de los genes *Hox* en la descendencia celular. Otro controles más precisos se llevan a cabo por autorregulación (Bienz y Tremml, 1988; Kuziora y McGinnis, 1988; Chouinard y Kaufman, 1991; Lamka *et al.*, 1992; Tremml y Bienz, 1992) y regulación cruzada entre diferentes homeoproteínas (Hafen *et al.*, 1984b, Struhl y White, 1985). Recientemente se ha comprobado en vertebrados que la expresión de algunos genes *Hox* es regulada mediante microRNA's, aunque se han predicho candidatos para esa clase de regulación en *Drosophila* aún no se corroborado (Mansfield *et al.*, 2004; Yekta *et al.*, 2004 y Enright *et al.*, 2003).



## 5.7 Las homeoproteínas son factores de transcripción que regulan las expresión de genes blanco

Los genes *Hox* establecen la morfología del cuerpo actuando como selectores entre las diferentes vías de desarrollo. Estos regulan a otros genes que se encuentran bajo su control, por lo que en un segmento un gen *Hox* modula la expresión de los genes río abajo que al final llevaran a cabo la diferenciación celular (genes realizadores) ó de otros genes selectores (García–Bellido, 1975 y Graba *et al.*, 1997).

El primer indicio de la forma en que los productos de los genes *Hox*, podrían regular la expresión de genes blanco, provino cuando se analizó la secuencia aminoacídica del homeodominio, que es codificada por el Homeobox. La comparación aminoacídica reveló cierto grado de similitud con las proteínas reguladoras Mat a1 y  $\alpha 2$ , las cuales tienen un papel clave en la determinación de tipo de identidad en levaduras (Sheperd *et al.*, 1984). La semejanza estructural en secuencia de los homeodominios y proteínas reguladoras en procariotes sugirió que estos podrían contener un motivo de unión hélice-vuelta-hélice (Laughon y Scott 1984; Sheperd *et al.*, 1984). La capacidad de unión al ADN de los homeodominios fue confirmada cuando se determinó la estructura tridimensional del homeodominio de Antennapedia (Qian *et al.*, 1989). Posteriormente mediante ensayos de transcripción *in vitro* y experimentos de transfección se demostró que los homeodominios funcionan como activadores y/o represores de la transcripción (Jayness y O'Farrell 1988; Thali *et al.*, 1988; Biggin y Tijan 1989; Han *et al.*, 1989; Krasnow 1989; Winsolw *et al.*, 1989).



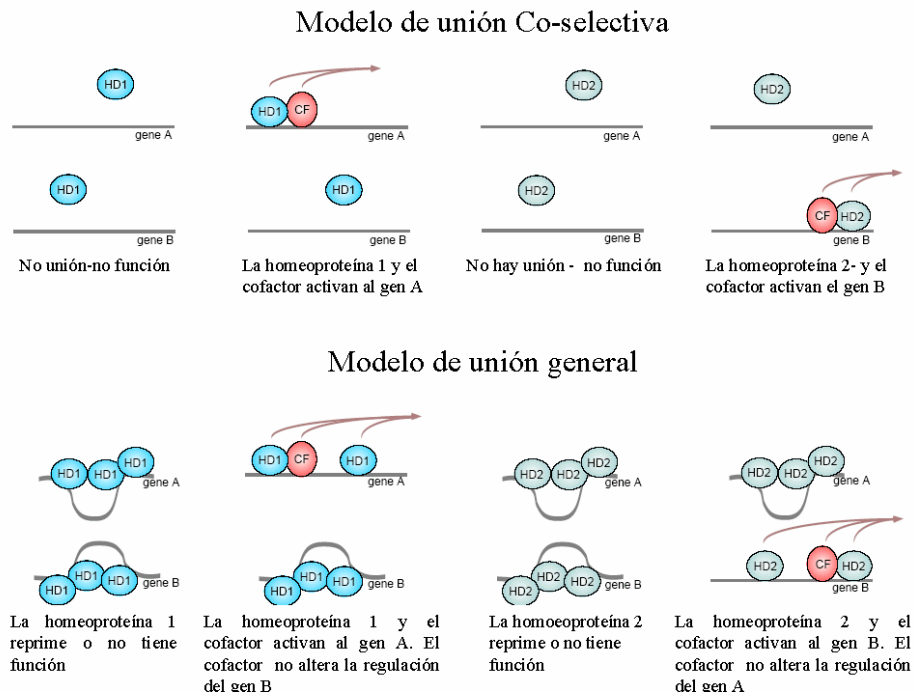
Los genes blancos de las homeoproteínas están implicados en la regulación de las actividades celulares como son: migración celular, comunicación, adhesión, división, diferenciación e inervación neuronal (Garcia-Bellido, 1975; Postlethwait, 1978; Lawrence, 1993; Castelli Gair *et al.*, 1994; Bienz y Hart, 1996). Dada la naturaleza compleja de la morfogénesis, no es sorprendente que los genes blanco codifiquen una gran variedad de proteínas, como son: factores de crecimiento, receptores de membrana, adhesión celular, estructurales como tubulina, enzimas, diversos factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y orientación de la división celular (Botas, 1993; Follette y O'Farrell, 1997). Además, recientemente se ha propuesto que los genes *Hox* tienen una segunda función diferente de la regulación de la identidad segmental: el control de la organogénesis (Hombria y Lovegrove., 2003). Se estima que el número de genes blanco regulados por homeoproteínas en un tejido/embrión en particular debe ser de al menos un centenar en *Drosophila* (Mastick *et al.*, 1995) y en mayor número en vertebrados (Zhao y Potter, 2001).

### 5.8 Regulación funcional de las homeoproteínas

Todas las proteínas *Hox* contienen un homeodominio altamente conservado, y consecuentemente muestran una afinidad muy similar de unión al ADN *in vitro*. (Desplan *et al.*, 1988; Hoey y Levine, 1988; Kalionis y O'Farrell, 1993; Beachy *et al.*, 1993). Las homeoproteínas generalmente se unen a una secuencia de seis pares de bases NNTAAT (Egger *et al.*, 1991) *in vitro*, sin embargo esta secuencia se presenta con alta frecuencia en los genomas de los animales (una vez cada kilobase), sugiriendo demasiados genes blancos potenciales para las proteínas *Hox in vivo*. Es por ello que la



manera en como las homeoproteínas reconocen y regulan diferentes genes blanco ha sido una de las preguntas fundamentales en la biología del desarrollo. Uno de los modelos que se ha propuesto postula la unión de las homeoproteínas en múltiples sitios sobre las secuencias *cis*-reguladoras. De tal manera que las homeoproteínas interactuarían entre si incrementando su afinidad de unión al ADN como se muestra en la Figura 6 (Biggin y McGinnis, 1997).



**Figura 6. Modelos de la interacción con cofactores para la actividad funcional de dos homeoproteínas.** Los esquemas de izquierda a derecha muestran el efecto de homeoproteínas en los genes A y B en células que expresan: homeoproteína 1 (HD1), HD1 y un cofactor (CF), HD2 y HD2 y un CF. Los cofactores, que se muestran interactuando con HD1 y HD2, pueden ser los mismos o diferentes. En cualquiera de los casos, para lograr la regulación que se representa, el heterodímero podría tener diferente especificidad de unión al ADN. En el ejemplo dado, los cofactores podrían ser requeridos para la activación de la transcripción, pero bajo otras circunstancias podrían actuar como represores. En el modelo de unión general, HD1 y HD2 se unen cooperativamente a múltiples sitios de unión al ADN en la ausencia del cofactores. Aquí, se ha asumido que la interacción con el cofactor enmascara la superficie de interacción entre las homeoproteínas. Esto reduciría la unión de las homeoproteínas a sitios de menor afinidad ó cambiaría su función de represora a activadora.

En este escenario, se requieren de numerosos sitios de unión para las homeoproteínas dentro de los elementos *cis*-reguladores para que los genes blanco sean



regulados. Sin ser excluyente de este modelo es posible que la interacción de las homeoproteínas con algún cofactor module la actividad transregulatoria de represor a activador y viceversa. Alternativamente, un modelo de unión co-selectivo propone que las proteínas Hox pueden regular a los elementos *cis* a través de las interacciones cooperativas con cofactores, incrementando así su afinidad de unión al ADN (Biggin y McGinnis, 1997).

Algunas proteínas que han demostrado ser requeridas como cofactores para la regulación de genes blanco son Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth). El gen *exd*, que contiene homeobox, fue inicialmente caracterizado debido a que su mutación causaba múltiples transformaciones homeóticas en *Drosophila* sin afectar los patrones de expresión de los genes *Hox*. Estas observaciones sugirieron que probablemente podría ser un cofactor de los productos de los genes *Hox* (Peifer y Wieschaus, 1990). Estudios moleculares han confirmado que Exd interacciona con algunas homeoproteínas y modifica la especificidad de unión al ADN (Mann y Chann, 1996). Esta función parece estar conservada en PBX, que son las proteínas similares u ortólogas a de Exd en mamíferos (Petelnburg y Murre, 1997; Phelan *et al.*, 1995). Por otro lado la importancia de Hth se reconoció primeramente en mamíferos en donde Meis-1, su ortólogo, fue sobreexpresado junto con HoxA7 y HoxA8 lo que dio como resultado una transformación leucémica de las células madres hematopoyéticas (Nakamura *et al.*, 1996). En *Drosophila*, Hth regula la localización nuclear de Exd (Rieckhof *et al.*, 1997) y forma complejos con las proteínas Hox, incluyendo a Exd (Ryoo *et al.*, 1999). De igual forma que Exd, la función e interacción de Hth están fuertemente conservadas entre *Drosophila* y los mamíferos (Jacobs *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001).



Se ha propuesto otro mecanismo de regulación de la actividad de las homeoproteínas, basado en que al igual que la mayoría de los factores de transcripción, las homeoproteínas pueden ser fosforiladas (Lopez y Hogness 1991), por lo que su función podría ser modulada a través Kinasas ó Fosfatasas. Se ha demostrado que la Caseina Kinasa (CKIII) actúa sobre Antp; el análisis mediante mutagénesis dirigida a los sitios blancos de CKII en Antp, que se encuentran fuera del homeodominio, probó que la actividad de Antp aparentemente se elimina mediante una fosforilación (Jaffe *et al.*, 1997). Similarmente, la fosforilación de la homeoproteína Scr en el brazo N-terminal de su homeodominio, aparentemente suprimió la actividad de Scr, por lo que la defosforilación en este sitio por la proteínas fosfatasa PP2 se requiere para la actividad de Scr (Berry y Gehring, 2000). En ambos casos la fosforilación interfiere con la unión al ADN ya sea como monómeros o mediante un cofactor. En ninguno de los casos, sin embargo, pareciera que la fosforilación modula la especificidad de las homeoproteínas. Al menos en estos dos sistemas, la fosforilación podría ser una forma de suprimir post-traduccionalmente la actividad de las homeoproteínas. Aunque pareciera que la fosforilación tiene un papel importante en la función de las homeoproteínas, no se sabe en qué células o durante cuál periodo del desarrollo normal este mecanismo es usado (Mann y Morata, 2000). Interesantemente, Ftz también se fosforila en el brazo N-terminal de su homeodominio, pero en este caso la fosforilación es necesaria para las funciones de segmentación de Ftz (Dong y Krause 1999).



## 5.9 Antennapedia

En 1948 LeCalvez describió la mutación homeótica *Antennapedia* en *Drosophila melanogaster*. Esta mutante dominante transformaba las antenas en un par de patas del segundo segmento torácico (mesotórax) (fig. 7), así como la transformación de la parte dorsal de la cabeza en tipo torácico, reducción de los ojos y ocasionalmente los palpos maxilares no se alcanzan a desarrollar (Duncan, 1982). El estudio de varias mutantes de este tipo mostró que una inversión cromosómica deja en la mayoría de los casos al gen completo *Antp* bajo la regulación de otra región de control (promotor-potenciador). Schneuwly y colaboradores (1987) realizaron la inserción del ADN complementario de *Antp* en un vector de expresión regulado por un promotor sensible a choque térmico que al ser aplicado promueve la expresión ectópica de este gen; es decir se dirigió *Antp* en regiones que normalmente no lo hace. Estos estudios mostraron que la transformación de antena por pata resultante se debió a la sobre expresión-ectópica de *Antp* en las antenas (Schneuwly *et al.*, 1987).



**Figura 7. La mutante *Antennapedia*.** La mosca *Drosophila melanogaster* tipo silvestre presenta un par de antenas normales (izquierda) y en la mutante *Antennapedia* (derecha) las antenas han sido transformadas en un par de patas debido a la expresión ectópica de la proteína Antennapedia

En clones mutantes de *Drosophila* (sin *Antp*) las células de la pata se diferencian como estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981). A raíz de tal observación se



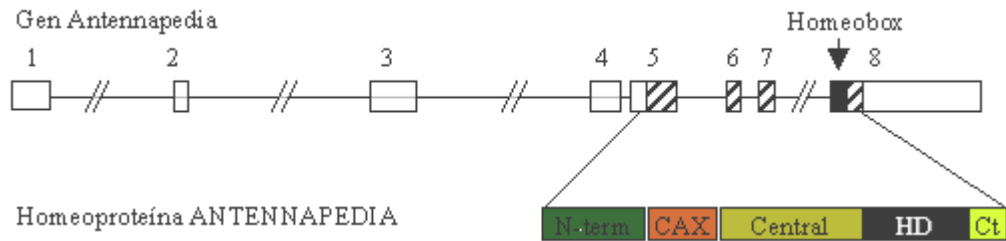


planteó la hipótesis de que la función de Antp se requiere en todos los segmentos torácicos para suprimir en cada uno de ellos el desarrollo de la cabeza y promover el de los apéndices torácicos (Struhl, 1981). De esta manera en *D. melanogaster*, las antenas y las patas son estructuras homólogas, que difieren unas de otras a consecuencia de la acción de *Antp*. Esta promueve la identidad de la pata mediante la represión de los genes determinantes de la antena. Esto debido a que Antp, en discos de pata reprime al gen *hth*, regresando la ruta del desarrollo al estado basal, el cual es pata. Sin embargo, Antp no forma parte en la generación de este estado basal, solo contribuye al desarrollo normal de la pata mediante la modificación del estado basal (Casares y Mann, 1998 y 2001).

Recientemente, se ha destacado la importancia de diversos genes *Hox* en la organogénesis, entre ellos *Antp*, *Ubx* y *abd-A*, los cuales son necesarios para la formación del tubo cardiaco en *Drosophila*, sin embargo la manera como se regulan y la descripción de los genes blanco aún no se ha establecido (Perrin *et al.*, 2004).

El análisis de la distribución de la proteína Antp mediante anticuerpos policlonales mostró que ésta se expresa en la epidermis embrionaria, especialmente en la región posterior T2 y anterior de T3 así como en los neurómeros (Carroll *et al.*, 1986). En la larva se ha detectado Antp en cada disco imaginal de la pata así como en los discos torácicos dorsales (ala y halterio) pero no así en los discos de ojo-antena (Wirtz *et al.*, 1986).

El análisis de la estructura organizacional y la secuencia del gen *Antp* en *Drosophila* revelaron que contiene dos promotores, ocho exones, siete intrones de hasta 60 kpb y dos regiones de procesamiento-terminación (fig 8) (Schneuwly *et al.*, 1986).



**Figura 8. Organización estructural del gen Antp y su proteína.** Los exones 1-8 están separados por siete intrones y el homeobox se localiza en el exón 8. La homeoproteína Antp se muestra con sus regiones características, Extremo N- terminal (N-term), la repetición de Glutaminas (CAX), la región Central, el homedominio (HD) y el extremo C-terminal (Ct).

El RNAm de Antp contiene dos diferentes sitios de procesamiento en la región codificante (Stroeher *et al.*, 1988) y las proteínas resultantes tienen cuatro sitios de fosforilación (Jaffe *et al.*, 1997). Las cuatro posibles clases de proteínas difieren por 17 aa's de un total de 378, sin embargo éstas son reguladas de tal manera que una domina en la epidermis y en el sistema nervioso central, otra en el intestino del embrión, y la tercera en los discos imaginales en la larva (Gibson *et al.*, 1988). La proteína completa consiste de una región (N-terminal) de 295 aa's, seguida de la porción llamada repetición CAX de 130 aa's rica en glutamina, el homeodominio de 60 y 23 aa's que conforman el extremo C-terminal.

Al hacerse las primeras comparaciones aminoacídicas entre la homeoproteína Antp de *D. melanogaster* y *Schistocerca americana*, se encontraron al menos siete dominios altamente conservados (Hayward *et al.*, 1995). Al analizarse un mayor número de secuencias disponibles de insectos se observó que estos dominios se mantienen conservados (Devenport *et al.*, 2000 y Walldorf *et al.*, 2002) (fig 9).



	1				50
AntpBee	<b>MSSYFANSYI</b>	<b>PDLRNGGVEH</b>	<b>PHQHQQHYGA</b>	<b>AVQVPQQTQS</b>	<b>VQQSQQAGD</b>
AntpSch	<b>MSSYFAVQQG</b>	<b>PGG</b> .....	.....	.....	<b>..GAD</b>
AntpDro	<b>MTSYFINSYM</b>	<b>GAD</b> .....	<b>..MHHGHY</b> ..	.....	.....
AntpBom	.....	.....	.....	.....	.....
	<b>7</b>				
	51				100
AntpBee	<b>PCDPSLLRQG</b>	<b>VPGHYGAAG</b>	<b>SQQ.DMPYPR</b>	<b>FPPYNRMDMR</b>	<b>NATYYQHQQD</b>
AntpSch	<b>PSSGAGAAASW</b>	<b>GGGGGAGAQ</b>	<b>QPPQGMFYPR</b>	<b>FPPYDRMDIR</b>	<b>SAAYYGAQQS</b>
AntpDro	<b>PGNGVTDLDA</b>	<b>QQMHYSQNA</b>	<b>NHQCNMPYPR</b>	<b>FPPYDRMPY</b>	<b>NCQGMQQQQ</b>
AntpBom	<b>.MDGCDQQLR</b>	<b>PAQHYPAP</b>	<b>APG..MPYPR</b>	<b>FPPYDRLGY</b>	<b>.....QQM</b>
			<b>2</b>		
	101				150
AntpBee	<b>HGSGMDGMGG</b>	<b>YRSASPS</b> ..	<b>GMGHMGHTPT</b>	<b>PNGHP</b> .....	.....
AntpSch	<b>GGG</b> .....	<b>GGLDGS</b> PGGG	<b>GNCGCGGCGY</b>	<b>RSRSP</b> .....	.....
AntpDro	<b>HQV</b> .....	<b>Y SRPDS</b> PS..	<b>QVGVMPQAQ</b>	<b>TNGQLGVPOQ</b>	<b>QQQQQQPS</b>
AntpBom	<b>EQN</b> .....	<b>G YRPDS</b> PS..	<b>QMGHMGPKTD</b>	<b>GYGN</b> .....	.....
	151				200
AntpBee	.....	.....	.....	<b>S</b> ..	<b>TPIVYAS</b>
AntpSch	.....	.....	.....	<b>.MGG</b>	<b>GGQTPVVYAS</b>
AntpDro	<b>NQQQQQAQA</b>	<b>PQQLQQQLFQ</b>	<b>VTQQVTHPQQ</b>	<b>QQQPVVYAS</b>	<b>CKLQAAVGG</b>
AntpBom	.....	.....	<b>.GH</b>	<b>QPATPAVYIS</b>	<b>CKLQAAATG</b>
				<b>3</b>	
	201				250
AntpBee	<b>QGSVLD</b> ....	<b>.GPDSP</b> PLV	<b>ESQMHHQMHT</b>	<b>QHPMQPQQG</b>	<b>QHQSQAQQH</b>
AntpSch	<b>AAAAAGNGG</b>	<b>AGGGSP</b> PLD	<b>VPPHQHQA</b>	<b>HHAEPHLQQ</b>	<b>QQQQQLYAD</b>
AntpDro	<b>GMVPE</b> ....	<b>.GSP</b> PLV	<b>DQMSGHMHNA</b>	<b>QMTLPHHMGH</b>	<b>FQAQLGYTDV</b>
AntpBom	<b>GAVP</b> ....	<b>.GSP</b> PLE	<b>QAQMPHHMH</b>	<b>FQHMVQHGV</b>	<b>PPHQH</b> ....
		<b>4</b>			
	251				300
AntpBee	<b>LQAHEQHMMY</b>	<b>....Q</b> ....	<b>..QQQSQA</b>	<b>ASQSQPGMH</b>	<b>PRQQQAQQH</b>
AntpSch	<b>PAPQQQQQQ</b>	<b>PPPTQQ</b> PPV	<b>PPPHQH</b> PL	<b>GAGVPPGHQ</b>	<b>HQHHPQQQ</b>
AntpDro	<b>GVPDVTEVHQ</b>	<b>....NHHM</b>	<b>GMVQQSGVP</b>	<b>FVGAPPQMM</b>	<b>HQQGPPQH</b>
AntpBom	.....	.....	.....	<b>.LMYPVDDMQ</b>	<b>HQTQMPMHQ</b>
	301				350
AntpBee	<b>QGVVTSPLSQ</b>	<b>QQQAPQ</b> GAA	<b>SANLPS</b> LYP	<b>WMRSQF</b> ...	<b>ERKRGRQTYT</b>
AntpSch	<b>Q</b> .....	<b>PPP QQ</b> ...	<b>HNGSP</b>	<b>ANTLPS</b> LYP	<b>WMRSQF</b> ...
AntpDro	<b>QGHFGQHTFP</b>	<b>SQ</b> ...	<b>NPNSQ</b>	<b>SSGMP</b> LYP	<b>WMRSQF</b> GKC
AntpBom	<b>QSMHAQQPPP</b>	<b>QQ</b> ...	<b>PPPNT</b>	<b>KPSLPS</b> LYP	<b>WMRSQF</b> ...
			<b>5</b>		<b>ERKRGRQTYT</b>
	351				400
AntpBee	<b>RYQTELEKE</b>	<b>FHNRYL</b> TRR	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpSch	<b>RYQTELEKE</b>	<b>FHNRYL</b> TRR	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpDro	<b>RYQTELEKE</b>	<b>FHNRYL</b> TRR	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
AntpBom	<b>RYQTELEKE</b>	<b>FHNRYL</b> TRR	<b>RRIEIAHALC</b>	<b>LTERQIKIWF</b>	<b>QNRMRKWKKE</b>
			<b>6</b>		
	401				428
AntpBee	<b>NKSK</b> ...	<b>GTP</b>	<b>GSGD</b> DEIS	<b>PQTS</b> PQG	
AntpSch	<b>NKSK</b> PDAGQN	<b>G</b> DGNAGSDIT	<b>PQTS</b> PQ.		
AntpDro	<b>NKTK</b> ...	<b>GEP</b>	<b>GSG</b> EGDEIT	<b>PPNS</b> PQ.	
AntpBom	<b>NKTK</b> ...	<b>GEP</b>	<b>GSG</b> DEPNMS	<b>PPTS</b> PQ.	
			<b>7</b>		

**Figura 9. Análisis comparativo de Antennapedia entre diferentes especies de insectos.** Comparación de la secuencia aminoacídica entre secuencias homólogas de la proteína Antp de la abeja (*Apis mellifera*), Saltamontes (*Schistocerca americana*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y gusano de seda (*Bombix mori*). Las regiones conservadas (1-7) se indican mediante barras negras debajo de la secuencia. Las secuencias de aminoácidos que al menos están conservadas en dos especies se muestran en negrilla. La región rica en Glutamina en Antp de *Drosophila* se señala en un rectángulo (Tomado y modificado de Walldort *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que algunas de estos dominios conservados participan en la modulación de la especificidad funcional de Antp en diferentes tejidos. Sin embargo sólo en algunos se ha determinado su importancia funcional más no a nivel molecular



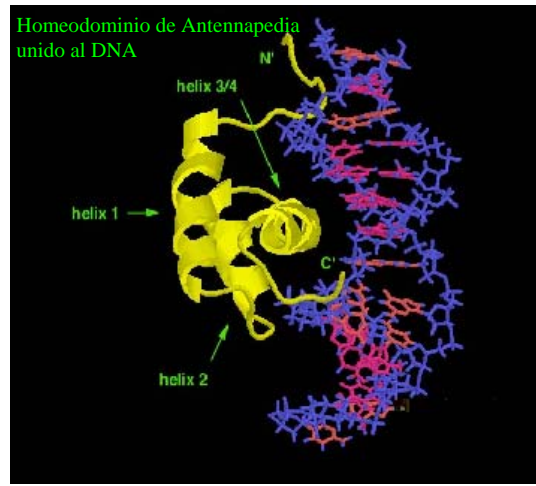
como el caso del extremo C-terminal (Gibson *et al.*, 1988 y Jaffe *et al.*, 1997), la región N-terminal de homeodominio (Gibson *et al.*, 1990 y Zeng *et al.*, 1993) y el tetrapéptido YPWM (Canales-del Castillo, 2002). Otra secuencia que esta conservada sólo entre Antp del mosquito *Anopheles* y *Drosophila* es la caja CAX. Esta secuencia se encuentra en el factor de transcripción Sp1 y en Abd-A, en las cuales es necesaria para la activación transcripcional, pero aún no se ha determinado su función en Antp (Courey y Tijan, 1988 y Merabet *et al.*, 2003).

La estructura tridimensional de Antp analizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), mostró tres  $\alpha$ -hélices con una “vuelta” de 5 aminoácidos entre la hélice 1 y la hélice 2, y una “vuelta” de 4 aminoácidos entre la hélice 2 y hélice 3 (Gehring *et al.*, 1994). El análisis de los complejos *Antp*-ADN mostró que los contactos principales se localizan en la hélice de reconocimiento (3/4), que se une al surco mayor del ADN, y el extremo N-terminal que se une a bases específicas del surco menor del ADN (fig 10) (Otting *et al.*, 1990). En la mayoría de estos ensayos de unión al ADN usaron las secuencias “TAAT” y “ATTA” como sitios de unión para el homeodominio (Kalionis y O’Farrell, 1993).

Interesantemente, el análisis de la estructura tridimensional, mediante RMN, del homeodominio de Antp mutado, con una delección en el brazo N-terminal, mostró que la estructura del homeodominio permanecía intacta estructuralmente. Sin embargo, la afinidad de unión al ADN de este homeodominio truncado mostró una disminución, que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal del homeodominio (Qian *et al.*, 1994). Experimentos genéticos *in vivo* en *Drosophila* realizados mediante substitución recíproca de cuatro residuos entre los extremos N-



terminal de Antp y Scr modificaron la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993). Estos experimentos genéticos *in vivo* demostraron la importancia funcional de estos residuos y sugirieron que el extremo N-terminal de los homeodominios está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de los mismos.



**Figura 10. Interacción del homeodominio Antennapedia con el DNA.** Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3/4 con el surco mayor del DNA y el extremo amino terminal del homeodominio con el surco menor.

## 5.10 Genes blanco de Antennapedia

A la fecha se conocen varios genes bajo la regulación de Antp, estos se pueden agrupar arbitrariamente en dos categorías; los de regulación directa donde ya se ha confirmado que es efectivamente Antp quien regula la expresión del gen blanco y aquello de regulación indirecta en donde la modulación de la expresión del gen blanco puede ser producto de una cascada donde participe Antp.



### 5.10.1 Genes de regulación directa

El gen *apterous* (*ap*) codifica para una proteína que contiene un homeodominio LIM, que está involucrado en el desarrollo dorsoventral del ala (Diaz-Benjumea y Cohen, 1993; Hobert y Westphal, 2000). *ap* se expresa en el embrión de *Drosophila* en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y en el mesodermo somático esta limitado a los músculos progenitores que contribuyen a la formación de los músculos LT1-4, Va2 y VA3 (Bourgouin *et al.*, 1992). Se ha identificado un pequeño potenciador de 680 pb (*apME680*) que es capaz de dirigir la expresión de *lacZ* a partir de la etapa del desarrollo 10 en un grupo de células muy similares a aquellas que expresan *ap*. La expresión de *ap* inicia desde la extensión temprana de la banda germinal en el tórax a diferencia del abdomen que es más tardío, sugiriendo que su regulación está controlada por las proteínas Hox. Mediante una alteración complementaria en la proteína Antp y en los sitios de unión en *apME680* se demostró que la proteína Antp regula directamente y positivamente a este gen. La homeoproteína Ubx parece regular a este potenciador, ya que se une a los mismo sitios de unión y las mutaciones en las secuencias de unión en *apME680* elimina la expresión en el tórax y en el abdomen anterior (Capovilla *et al.*, 2001).

El gen *forkhead* (*fh*) se expresa en el primordio de las glándulas salivales durante el desarrollo embrionario, éste se forma en el lado ventral del PS2 (Parasegmento 2) durante la etapa 11 del desarrollo embrionario. Las células que expresan *fh* eventualmente se invaginan para formar la glándula salival embrionaria. *Scr* es uno de los genes requeridos para la activación de *fh* y la formación de las glándulas salivales



(Panzer *et al.*, 1992; Andrew 1998). Ryoo y Mann en 1999 describieron una región de 5 kpb del gen *fkh* la cual dirige la expresión de un gen reportero en un patrón idéntico al de la proteína Fkh. Dentro de este potenciador esta un elemento de 37 pb denominado *fkh[250]*, que contiene la secuencia 5'-AGATTAATCG-3' con sitios de unión para el complejo de Scr y Exd (Scr/Exd). Para probar la actividad de este elemento se clonaron cuatro copias de *fkh[250]* río arriba de un promotor que regula al gen reportero *lacZ*. La mutación de dos pares de bases de este elemento 5'-AGATTTATGG-3' convirtió este sitio de unión natural del heterodímero Scr/Exd a un sitio de unión consenso, denominado *fkh [250<sup>con</sup>]*. Este elemento se fusionó con cuatro copias del elemento *fkh [250<sup>con</sup>]* al gen reportero *lacZ*, el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se probó su actividad *in vivo*. Mientras que la expresión de *fkh[250]-lacZ* se encuentra limitada al PS2, la expresión de *fkh [250<sup>con</sup>]-lacZ* se observa del PS2 hasta PS6 (fig 7 A). En mutantes dobles que carecen de los genes *Scr* y *Antp*, no se detectó  $\beta$ -Gal en los PS2 y PS5, pero si en PS6 y hacia la parte posterior del embrión. Por otro lado, la dirección de la expresión ectópica de *Antp* utilizando el potenciador del gen *patched (ptc)* y activó *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* ectópicamente en la cabeza del embrión (Ryoo y Mann, 1999).

El gen homeótico *tsh* codifica para una proteína de dedos de zinc, que junto con Ubx y Antp se requieren para la formación adecuada de los segmentos del torax en el embrión (Röder *et al.*, 1992). Dentro del desarrollo embrionario *tsh* es activado distintamente por las homeoproteínas en epidermis y mesodermo. Antp activa al gen *tsh* en la epidermis mientras que Ubx lo activa en el mesodermo somático en consecuencia los más altos niveles de la proteína Tsh se localizan en las células donde se expresa Antp (Fasano *et al.*, 1991). Asimismo Antp, Ubx y Abd-A son requeridos para activar a *tsh* en el



intestino medio para la formación de dos constricciones (Mathies *et al.*, 1994). Esta regulación se comprobó mediante la activación ectópica de *tsh* en las regiones anteriores mediante la expresión de Antp y Ubx utilizando potenciadores específico de tejido o el promotor de choque térmico (Roder *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 1993; Bhojwani *et al.*, 1995 y Shiga *et al.*, 2002). El gen *tsh* juega un papel importante en la formación de las estructuras de la cabeza, presumiblemente mediante la represión de Antp en los discos imaginales de los ojos (Bhojwani *et al.*, 1997). Se han identificado 3 regiones reguladoras que modulan la expresión de *tsh*; el potenciador regulado por Ftz que actúa en los parasegmentos pares y que es dependiente de la actividad de Ftz (Core *et al.*, 1997), el potenciador que responde a las homeoproteínas Antp y Ubx, (McCormick *et al.*, 1995) y un elemento activador en *cis* que se requiere para que *tsh* se exprese en las regiones proximales del ala y halterio (Soanes y Bell, 2001).

Una región de 1.3 Kb del locus de *tsh* en *Drosophila*, a la cual se fusionó el gen reportero *lacZ* es capaz de dirigir  $\beta$ -gal en epidermis y mesodermo, de manera similar a la expresión de *tsh* en embriones. Este potenciador de *D. melanogaster* comparte 5 bloques o cajas homólogas con el del *Drosophila virilis*; es en estas cajas donde mediante ensayos de protección a ADNsas se comprobó la unión directa de las homeoproteínas Antp, Ubx y Abd-A. La regulación del potenciador por estas homeoproteínas se corroboró a través de la activación ectópica de este en regiones más anteriores al tórax debida a la sobreexpresión de Antp y Ubx. Esta expresión ectópica resulta principalmente en las regiones anteriores del embrión en la epidermis, el tejido donde normalmente Antp activa al potenciador del gen *tsh*, así como en bajos niveles en el mesodermo (McCormick *et al.*, 1995).





### 5.10.2 Genes de regulación indirecta

El gen *odd paired* es regulado positivamente por Antp y Abd-A en la constricción del intestino y negativamente por Ultrabithorax (Ubx) y Decapentaplegic (Dpp) (Cimborra, 1995)

El gen *serrate* es requerido en la morfogénesis del cinturón de dentículas y los ganchos bucales, es activado durante la etapa del desarrollo embrional 11 por Ubx y Abd-A pero no así en los parasegmentos donde Antp se expresa (Williette, 1999).

El gen *centrosomina* (*cnn*) se expresa en el mesodermo visceral del intestino medio (VM) y en el sistema nervioso central (CNS). En VM Antp y Abd-A regulan negativamente *cnn*, mientras que Ubx lo regula positivamente. En CNS, *cnn* es regulado positivamente por Antp y negativamente por Ubx y Abd-A (Heuer *et al.*, 1995).

El gen *dpp* codifica para una proteína de señalización de la clase TGF $\beta$ , este es regulado positivamente en el intestino medio por Ubx y negativamente por Abd-A. Un fragmento de 813 pb del potenciador de *dpp* es capaz de dirigir la expresión del gen reportero *lacZ* con el mismo patrón en el intestino medio en mesodermo. La expresión ectópica de Antp es capaz de activar este potenciador en regiones anteriores, aún y cuando normalmente no lo active (Manak *et al.*, 1995).

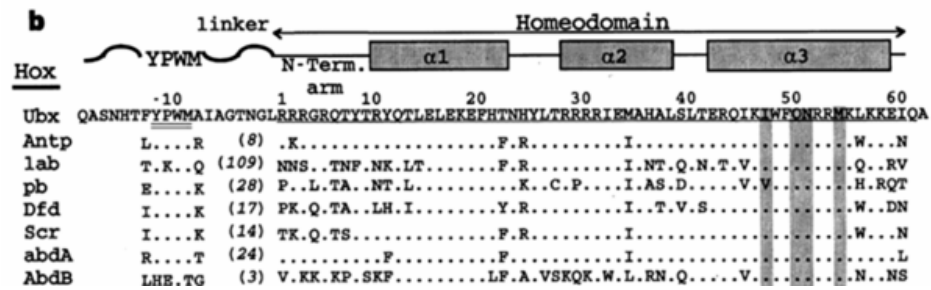
En la regulación indirecta se puede incluir a los genes que son reprimidos por el fenómeno de la dominancia posterior, término que describe la regulación cruzada entre los genes *Hox*, y las consecuencias fenotípicas de su expresión. Las observaciones iniciales se apoyaron en que genes del BX-C son capaces de reprimir Antp (Hafen *et al.*,



1994) mientras que los genes más posteriores del BX-C podrían reprimir a Ubx (Struhl y White, 1985). Este modelo se vio fortalecido con la evidencia bioquímica que Ubx podría reprimir a Antp uniéndose directamente a uno de sus promotores (Beachy *et al.*, 1988). Se ha demostrado que Antp expresada ectópicamente en regiones más anteriores es capaz de reprimir a *lab*, *pb* y a *Scr*, sin embargo el mecanismo de represión molecular aún no ha sido determinado (Gibson *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 2001 y Sprecher *et al.*, 2004).

### 5.11 Tetrapéptido YPWM

Comparaciones de la secuencia de aminoácidos en diferentes homeoproteínas mostró que además del HD existe otra región altamente conservada, el tetrapéptido YPWM (Tirosina, Prolina, Triptofano y Metionina) (fig 11). Este motivo está localizado río arriba de la mayoría de los genes homeóticos y se conecta al HD mediante el brazo amino terminal flexible de este (Burglin, 1995). El número de aminoácidos que separan este motivo de la región N-terminal flexible es variable en las diferentes homeoproteínas. El análisis estructural de esta región en *Antp* mostró que el tetrapéptido YPWM no presenta un arreglo tridimensional definido, es decir es una región flexible de la proteína. Estos resultados permitieron postular que el tetrapéptido YPWM en combinación con el brazo flexible amino-terminal constituyen un puente de conexión flexible entre el HD y el resto de la homeoproteína. La importancia de este puente flexible esta relacionada con interacciones específicas proteína-proteína ya que se encuentra en una región expuesta en la superficie de esta homeoproteína (Qian *et al.*, 1992).



**Figura 11. Alineamiento y comparación aminoácídica de homeoproteínas en *Drosophila*.** El homeodominio se muestra de 1 a 60 y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aa's entre YPWM y el homeodominio se muestra en los paréntesis.

La importancia funcional de este motivo se destacó cuando se determinó que las interacciones entre las proteínas Hox y PBX estaban mediadas por el tetrapéptido. El análisis mediante mutaciones puntuales reveló que los residuos triptofano y metionina son críticos para estas interacciones cooperativas (Chang *et al.*, 1995; Knoepfler *et al.*, 1995 y Phelan *et al.*, 1995).

Estudios realizados en homeoproteínas de *Drosophila*, utilizando el sistema de dos híbridos, señalaron que el tetrapéptido está involucrado en las interacciones de Ubx y Abd-A con Exd, en donde el mayor contacto se realiza mediante el tetrapéptido. Sin embargo, no se encontró una interacción directa entre la Antp y Exd utilizando este sistema (Jhonson *et al.*, 1995)

El análisis *in vitro* mediante el uso de anticuerpo dirigidos contra el motivo YPWM confirmaron que éste es necesario para la cooperación de los homeoproteínas con el cofactor de PBX (Shanmugam *et al.*, 1997).

Cuando se analizó la interacción entre las proteínas Hox/PBX se encontró que además del motivo YPWM existía otra región que participaba en la interacción; el



dominio GKFQ localizado en el extremo carboxilo-terminal del homeodominio de PBX.

Usando derivados de la oncoproteína E2-PBX se determinó que el dominio GKFQ no es esencial para la interacción cooperativa con HoxA1 pero contribuye a la estabilidad del complejo, mientras que el motivo YPWM es estrictamente requerido para estas interacciones cooperativas *in vitro* e *in vivo* (Green *et al.*, 1998).

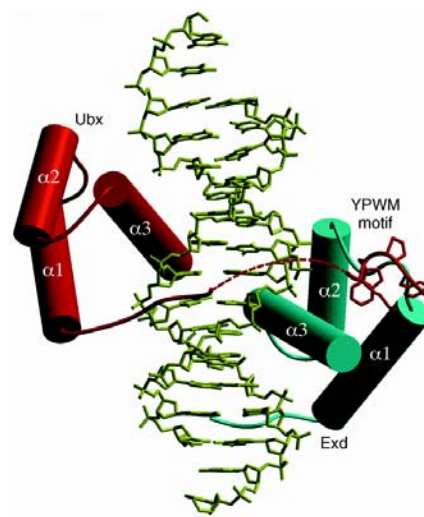
La estructura terciaria del complejo Pbx1-HoxB1-ADN fue determinada mediante Cristalografía de rayos X. La interacción entre las proteínas se da a través del tetrapéptido de HoxB1, el cual se une en un paquete hidrofóbico en la proteína de Pbx1. Este paquete está formado por una inserción de tres aminoácidos en el homeodominio de Pbx1. El dominio de unión al ADN de Pbx1 es mayor que el de los homeodominios de las proteínas Hox. Contiene una hélice adicional que parece contribuye a la unión del tetrapéptido de HoxB1 y a la unión más estable de Pbx1 al ADN (Piper *et al.*, 1999)

El análisis mediante Cristalografía de Rayos X determinó la estructura tridimensional del complejo Ubx-Exd-ADN. Los homeodominios de Exd y Ubx se unen a caras opuestas del ADN con sus hélices de reconocimiento casi tocándose uno al otro. Sin embargo, la mayoría de las cooperaciones se dan a través del tetrapéptido YPWM, el cual forma una vuelta reversa que se inserta en un paquete hidrofóbico en la superficie del homeodominio (fig 12; Passner *et al.*, 1999).

Por otro lado, las interacciones entre PBX/HOX no se dan únicamente a través del tetrapéptido YPWM como lo señala la estructura cristalina del heterodímero PBX-HoxB1. En ésta se observa que la  $\alpha$ -hélice que se encuentra en el extremo C-terminal incrementa la afinidad entre la proteína HoxB1 y el ADN (Sprueles *et al.*, 2000).



LaRonde-LeBlanc y Wolberger en el 2003 analizaron el complejo terciario entre la homeoproteína HoxA9, el cofactor Pbx1 y una secuencia consenso de ADN, este estudio reveló que el tetrapéptido adquiriría una conformación alterada comparada con los complejos anteriormente analizados. Estos autores describen interacciones inespecíficas y una alteración en la conformación del ADN, lo cual parece indicar una mayor afinidad de unión al ADN por parte de estos complejos. Estos datos sugieren que las proteínas PBX tienen una mayor relevancia en la especificidad y selectividad de unión al ADN en aquellas proteínas que son codificadas por los genes Hox del extremo 3' del complejo, como *HoxA1* y *Hox B1*, que los otros que se encuentran al extremo 5' (La Ronde-LeBlanc *et al.*, 2003).



**Figura 12. Interacción de los homeodominios Ubx y Exd con el ADN.** El esquema representa la unión de las proteínas Ubx y Exd en caras opuestas al ADN. La interacción proteína-proteína esta mediada por el tetrapéptido YPWM de Ubx.

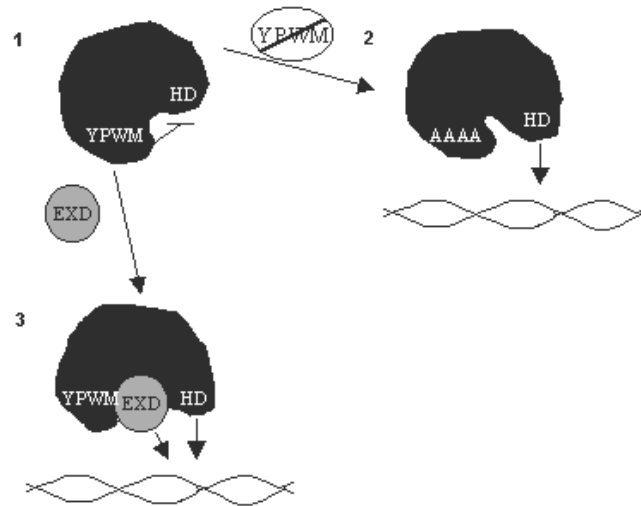
Hasta la fecha se han realizado varios análisis funcionales del tetrapéptido en diversas homeoproteínas; en cultivo celular e *in vivo*, tanto en *Drosophila* como en ratones. En los modelos *in vivo* se sustituye el tetrapéptido total o parcialmente por un bloque de Alaninas. Siendo la principal diferencia entre estos dos modelos que mientras



que en ratones la proteína mutada se expresa en su dominio endógeno (debido al “knock-out” del gene silvestre), en *Drosophila* se utilizan sistemas de expresión para dirigir la proteína mutada en otras regiones donde no se encuentra la proteína silvestre. El análisis funcional del tetrapéptido YPWM en diferentes homeoproteínas ha mostrado diversos resultados.

### 5.11.1 Tetrapéptido YPWM en Labial

Cuando se analizó la importancia funcional del tetrapéptido de Lab en la transformación homeótica, no se encontró diferencia significativa entre los efectos casuados por la sobreexpresión de Lab silvestre y mutante. Sin embargo si se observó una letalidad cercana al 50% en aquellas larvas donde sobre-expresó la homeoproteína labial mutante. Para analizar el papel del tetrapéptido YPWM de labial en la activación del gene blanco se utilizó una región del extremo 5' del gen *HoxB-1*, un homólogo del gen *labial*, que en *Drosophila* dirige la expresión de manera muy similar a *labial* endógeno. El análisis *in vivo* demostró que su expresión es dependiente de *labial* y *exd*, confirmándose *in vitro* que Lab requiere de Exd para unirse a este oligonucleótido. A pesar de esto, la proteína Lab con la mutación en el tetrapéptido se une al ADN *in vitro* aún sin la presencia de Exd, más aún la mutante Lab muestra mayores niveles de transactivación *in vivo*. En la figura 13 se muestra el modelo propuesto en donde el tetrapéptido inhibe la unión de Lab al ADN, sin embargo debe considerarse que Labial, a diferencia de la mayoría de las homeoproteínas no se une al ADN por si mismo. Por lo que esta función inhibitoria de unión al ADN por parte de YPWM debe ser una función particular en esta proteína (Siu-Kwong Chan *et al.*, 1996).



**Figura 13. Función dual del tetrapéptido YPWM de Labial.** (1) La conformación de Lab no permite la unión al ADN, posiblemente debido a la función inhibitoria de YPWM, (2) Cuando YPWM es mutado, Lab se une al ADN. (3) Exd, promueve una mayor afinidad de unión de Lab al ADN mediante la interacción con el tetrapéptido YPWM (Tomada y modificada de Chen *et al.*, 1996).

### 5.11.2 Tetrapéptido YPWM en Fushi-tarazu

El estudio sobre la evolución del dominio YPWM en las homeoproteínas fushi-tarazu (Ftz) de *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Schistocherca americana* reveló su importancia funcional. La proteína Ftz de *Drosophila melanogaster* que carece de un motivo YPWM es incapaz de activar a *tsh*, sin embargo Ftz de *Trilobium castaneum* que contiene YPWM si activa a *tsh* (Löhr *et al.*, 2001). Además, la expresión ectópica de la proteína Ftz de *Drosophila* no induce una transformación homeótica al contrario de Ftz de *T. castaneum* y *S. americana* que si transforman la antena en pata. En base a estas observaciones se postuló que la función de *ftz* evolucionó de un gen *Hox* a uno de segmentación, esto probablemente sea debido a la pérdida del motivo YPWM y la ganancia del dominio LXXLL (Alonso *et al.*, 2001 y Löhr *et al.*, 2001).



### 5.11.3 Tetrapéptido YPWM en Ultrabithorax

Ubx establece la identidad del segmento T3 y del resto de los abdominales. La expresión ectópica de Ubx silvestre transforma el segmento torácico T3 al segmento abdominal A1, sin embargo la expresión ectópica de Ubx sin el tetrapéptido YPWM transformó el segmento T3 a A2. Este resultado es similar a lo observado en embriones nulos para de Exd ( $exd^{-/-}$ ), lo que señala que la carencia de interacción debido a la mutación en YPWM con Exd modificó la actividad funcional de Ubx. El análisis molecular de la expresión ectópica de Ubx en la represión del gen *Distal-less* mostró que esta homeoproteína mutante fue capaz reprimir de igual manera al *Dll*. Lo que indica que la represión de *Dll* no es dependiente del tetrapéptido YPWM (Galant *et al.*, 2002).

Resultados similares se observaron cuando se sobre expresó Ubx con el tetrapéptido mutado y este reprimió de igual forma al gen *labial* que Ubx silvestre. Sin embargo esta represión fue revertida cuando se expresó Ubx ectopicamente junto con Exd y Hth, y no así cuando se expresó Ubx con el tetrapéptido mutado. Lo que indica que la sobreexpresión de los cofactores Exd y Hth canceló la actividad represora de Ubx, y que el tetrapéptido YPWM está implicado en esta interacción (Sprecher *et al.*, 2004).

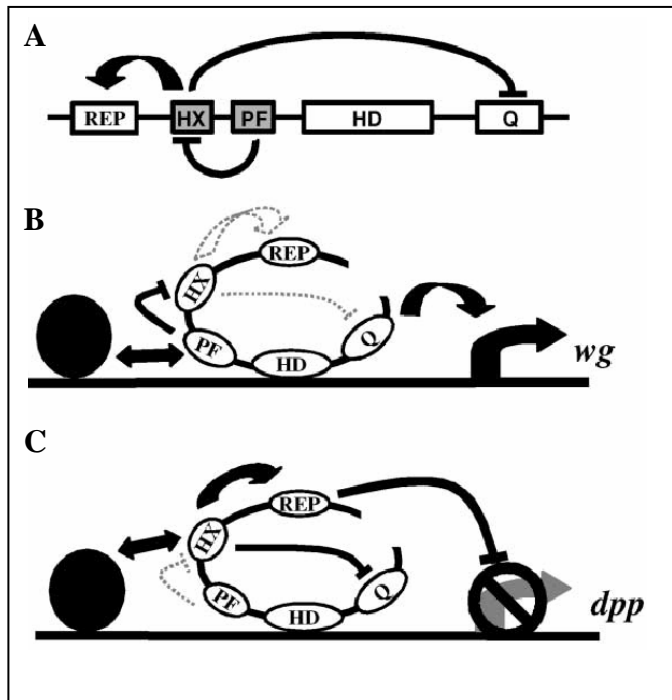
### 5.11.4 Tetrapéptido YPWM en Abdominal-A

El análisis de YPWM de Abd-A en la transformación homeótica de los segmentos en el desarrollo larvario reveló que este motivo no es necesario. Además, Abd-A, con la mutación en YPWM, fue capaz de formar complejos diméricos en el ADN con Exd, lo





que indica que existen otras regiones en Abd-A capaces de reclutar a esta proteína. Asimismo, la mutación en el tetrapéptido no afectó la selección de la homeoproteína al ADN, como se observó en la unión a secuencias blanco *in vitro*, y el control de la expresión de genes blanco *in vivo*. Sin embargo, la mutación en el tetrapéptido si modifico la actividad reguladora de Abd-A en el gen *dpp*, que es independiente de Exd y de acuerdo a estos resultados se propuso un modelo en donde el tetrapéptido tiene un papel dual; reprimir la función de la región de activación, rica en glutaminas, y la de promover un dominio de represión aun no identificado (fig 14) (Merabet *et al.*, 2003).



**Figura 14. Modelo para la regulación de la actividad de Abd-A.** (A) Circuito regulador intramolecular conectando el tetrapéptido YPWM (HX), PFER (PF), la región rica en glutamina (Q) y un potencial dominio represor colocado arbitrariamente (REP). En el modelo propuesto, el Hx y PF actúan como una plataforma molecular que detecta la especificidad reguladora y controla el potencial de activación/represión de Abd-A. (B y C) Selección del modo de transregulación de Abd-A mediante detección de la especificidad cis-regulatoria de *wingless* (*wg*) y *decapentaplegic* (*dpp*). La interacción de PFER con un cofactor positivo de la transcripción de *wg* bloquea la función del HX, seleccionando el modo de activación de Abd-A en favor de la actividad del dominio de activación Q. La interacción del HX con un co-represor estimula la función de HX, por lo tanto seleccionando el modo de represión de Abd-A favoreciendo la actividad de un dominio de represión (tomado de Merabet *et al.*, 2003)

### 5.11.5 Tetrapéptido YPWM en HoxB8

La mutagénesis del tetrapéptido de HoxB8 en ratones reveló que la expresión de esta proteína mutante acarrea mutaciones homeóticas similares a aquellas observadas



cuando había una pérdida de función de los genes *HoxA7*, *HoxB7* y *HoxB9*. Esto revela que la mutación en el tetrapéptido esta afectando la función de otros genes que se encuentran en el locus *HoxB*. Por lo que se postuló que este motivo es necesario para la interacción con cofactores que seleccionan los genes blanco naturales por lo que esta mutación interfirió con la función de otras homeoproteínas al unirse a su genes blanco (Medina-Martinez *et al.*, 2004).

#### **5.11.6 Tetrapéptido YPWM en HoxA1**

La mutagénesis del tetrapéptido de HoxA1 previene la interacción entre este y PBX, y su unión al ADN. Sin embargo esta sustitución no afecta la habilidad de unión de monómeros al ADN (Phelan *et al.*, 1997). Asimismo la mutante HoxA1 pierde su actividad en distintos potenciadores blancos en cultivo celular (Remacle *et al.*, 2002). Cuando se analizaron los efectos de esta mutante en el desarrollo del ratón se observaron todos aquellos reportados en un “knock-out”, demostrando que la función de HoxA1 *in vivo* depende en gran parte en la integridad de su tetrapéptido (Remacle *et al.*, 2004).

#### **5.11.7 Tetrapéptido YPWM en Antennapedia**

El análisis de la función *in vivo* del motivo YPWM en Antp, se llevó a cabo mediante mutaciones del motivo YPWM y sus regiones flanqueantes. La expresión ectópica de Antp silvestre y las mutantes en los cuatro aminoácidos flanqueantes a YPWM produjo la transformación homeótica esperada con una pérdida total de la involución de la cabeza y una transformación del segmento protorácico (T1) a



mesotorácico (T2). La mutación en el motivo YPWM en Antp mostró un fenotipo larvario normal, y fenotipos con leves transformaciones homeóticas. Estos resultados sugieren que el motivo YPWM es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp (Resendéz-Pérez, en preparación).

Cuando se analizó la importancia del tetrapéptido YPWM de Antp en transformaciones homeóticas en el estadio larvario se demostró que este dominio es necesario en la transformación ojo-ala y en menor grado en la transformación antena-pata. Utilizando el sistema de doble híbrido de levadura, se identificó una nueva proteína que interactúa con Antp a través de YPWM: la proteína de unión a la caja TATA asociada al factor TAF<sub>II</sub>155 (originalmente descrita como BIP 2). Ensayos de ganancia y pérdida de función demostraron que BIP interactúa con Antp en la transformación de los ojos en alas. (Prince *et al.*, 2004)

Experimentos realizados en células Schneider de *D. melanogaster*, donde se expresó GAL4 con un péptido de 12 aa's, que incluyen a YPWM de la homeoproteína Antp fusionado en el extremo C-terminal; mostraron una disminución de la transactivación de un gen reportero regulado por las secuencias UAS hasta en un 55% debido a esta fusión. Por lo que se estableció que YPWM funcionó como un dominio de represión transcripcional (Cardenas Chavez, 2003). Además cuando este motivo fue substituido por un bloque de Alaninas en Antp y se co-transfectó junto con un plásmido conteniendo como promotor 11 sitios oligomerizados de la secuencia de unión a Antp, se observó un aumento en la transactivación en un 50% comparado con el nivel de activación de Antp silvestre) lo que refuerza la idea de que YPWM funcione como un domino de represión (Villanueva, 2004).



## 6. IMPORTANCIA

Uno de los objetivos de la Biología del Desarrollo consiste en determinar como las homeoproteínas llevan a cabo sus funciones reguladoras sobre los genes blanco, durante el desarrollo de los organismos. El análisis de regiones conservadas fuera del homeodominio podría proveer datos para dilucidar el complejo mecanismo que determina la especificidad funcional de las homeoproteínas. Este trabajo pretende analizar la importancia funcional del tetrapéptido YPWM de Antennapedia en la regulación de sus genes blanco en un estudio *in vivo* en embriones de *D. melanogaster* a través de dos contextos funcionales: la activación y represión.



## 7. OBJETIVO

Determinar el efecto del tetrapéptido YPWM de Antp en la actividad funcional sobre los genes blanco, *tsh* y *Scr*, y los potenciadores *fkh[250<sup>con</sup>]* y *teashirt* en embriones de *D. melanogaster*.



## 8. HIPÓTESIS

El tetrapéptido YPWM de Antennapedia es un dominio necesario para la regulación de sus genes blanco.



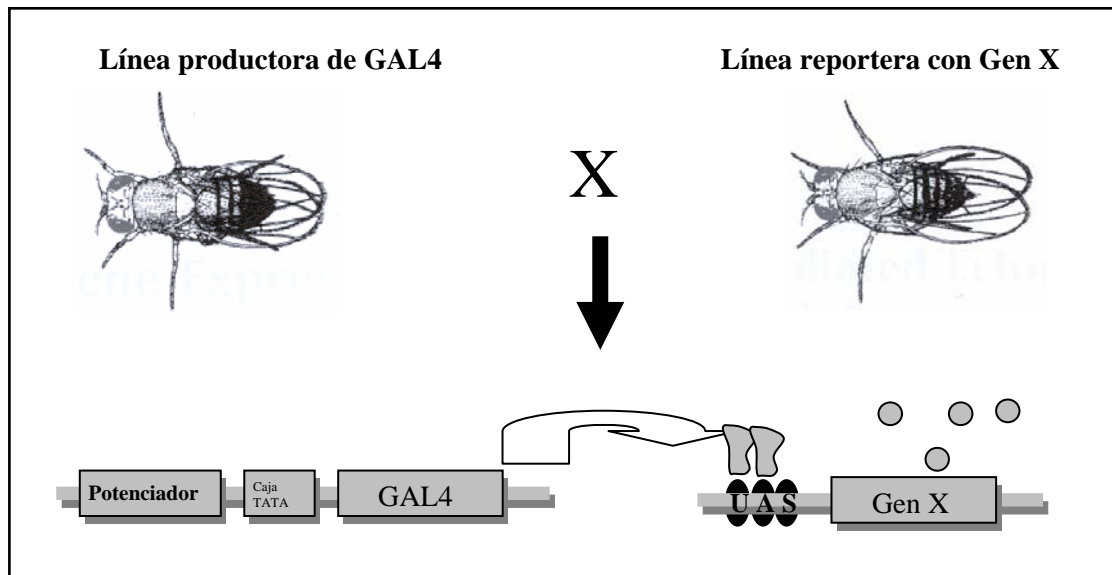
## 9. ESTRATEGIA GENERAL

La generación de fenotipos con ganancia ó pérdida de función mediante la expresión ectópica de genes conocidos provee un complemento en el campo de la genética, en el que los genes son identificados a través de las mutaciones que reducen o eliminan la función genética (Brand y Perrimon, 1993). El sistema de expresión GAL4 es una herramienta poderosa para la expresión génica ectópica en *Drosophila* que permite la activación selectiva de cualquier gen clonado mostrando una amplia variedad de patrones de tejido y celulares específicos. Sistemas similares basado en la expresión de GAL4 han sido aplicados en ratón (Ornitz *et al.*, 1991), pez zebra (Scheer y Campos-Ortega 1999) y en plantas (Ma *et al.*, 1988). Modificaciones recientes al sistema han permitido en embriones el mapeo específico del destino celular (Sullivan *et al.*, 2000).

GAL4 es un factor de transactivador de levaduras que permite la activación de genes selectivamente. Debido a que GAL4 no tiene genes blanco conocidos en *Drosophila* se puede expresar en células y tejidos del organismo sin ningún efecto secundario observable. Para la producción de la línea productora (GAL4) que expresa el activador transcripcional GAL4 en diferentes células y tejidos, una región potenciadora es fusionada al ADN complementario de GAL4 y se integra al azar dentro del genoma de *Drosophila* mediante la transposición usando un elemento P (Brand y Perrimon, 1993). Dependiendo del sitio de integración del potenciador se produce la expresión de



GAL4 y que puede ser dirigida en tiempo y en espacio. Para la generación de la línea reportera se usa un segundo gen el cual puede ser un gen reportero o algún otro de interés conteniendo los sitios de unión al regulador GAL4 (UAS). Mediante una cruce genética de la línea productora y reportera, el gen se expresará en las células donde se dirigió la expresión de GAL4 (fig 15).



**Figura 15. Regulación de la expresión génica mediante el sistema binario GAL4/UAS.** El gen de levadura GAL4 que codifica para una proteína transactivadora, es introducido al genoma de *Drosophila*, su expresión es regulada por un potenciador específico de tejido. Las líneas de *Drosophila* que expresan GAL4 en tejidos y células específicas (Línea productora) son cruzadas con líneas que contienen el gen blanco de interés (Gen X) que esta subclonado río abajo de cinco sitios de unión para GAL4 (UAS) (Línea reportera). El gen blanco se expresa en la progenie, solo en las células y tejidos en donde GAL4 esta presente.

Para determinar la importancia funcional del tetrapéptido YPWM en embriones *D. melanogaster* expresamos ectópicamente la homeoproteína Antennapedia con YPWM mutado ( $Antp^{AAAA}$ ) y analizamos sus efecto en la activación ó represión de los genes blanco *Scr*, *tsh* y los potenciadores *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ*. La expresión ectópica de *Antp* y  $Antp^{AAAA}$  permitió analizar sus efectos directamente sobre los genes blancos en





regiones donde normalmente no se expresa Antp endógena, descartándose así efectos cruzados entre las proteínas endógenas y ectópicas.

La expresión ectópica de Antp y la mutante se llevó a cabo utilizando el sistema binario de expresión GAL4/UAS, el cual consiste en cruzar moscas transgénicas de la línea productora, que contienen la secuencia que codifica para el factor de levadura GAL4, regulado por el promotor inducible por choque térmico (*Hs-GAL4*) ó el potenciador *patched* (*ptc-GAL4*), con moscas de la línea reportera *UAS-Antp*. Los embriones, progenie de las cruces, *Hs-GAL4;UAS-Antp* y *ptc-GAL4;UAS-Antp* fueron colectados y sincronizados en su desarrollo; en los primeros fue necesario aplicar un tratamiento de choque térmico a 37 °C para inducir la expresión de Antp. Posteriormente, los embriones, fueron fijados e incubados con los anticuerpos primarios anti-Scr, anti-Antp, anti-Tsh y los anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo o enzima, para detectar y visualizar la expresión de Antp y sus genes blanco.

Para analizar el efecto de Antp y la mutante sobre los potenciadores *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ*, se cruzó la línea productora *ptc-GAL4* con las reporteras *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* ó *tsh-lacZ*. La progenie se seleccionó en base a su fenotipo (balanceador) que nos indicó la presencia de los transgenes en las moscas obtenidas, y éstas se cruzaron con las líneas reporteras *UAS-Antp*. El análisis de los embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp;fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *ptc-GAL4;UAS-Antp;tsh-lacZ*, se realizó como anteriormente se describió, utilizando anticuerpos primarios anti-Antp y anti-β-Gal.



## 9.1 Esquema de la estrategia general



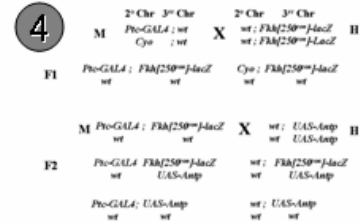
Amplificación de las líneas transgénicas



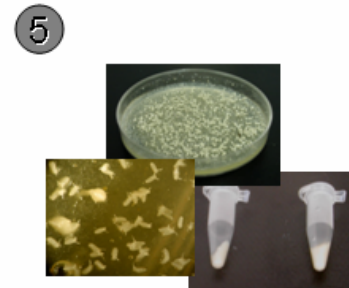
Colecta



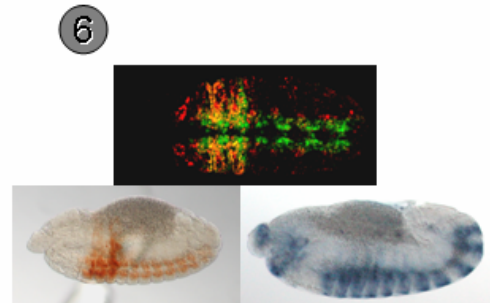
Sexado



Cruza de las líneas transgénicas



Colecta de embriones y fijación



Detección de la expresión genética mediante anticuerpos



## 10. MATERIALES Y MÉTODOS

### 10.1|Amplificación y mantenimiento de las moscas transgénicas

Todas las líneas de *Drosophila* fueron mantenidas como homocigotas viables o líneas balanceadas a 18° C en tubos de comida estándar (agar, harina de maíz, azúcar, levadura y propionato de sodio) suplementadas con levadura activa seca (ver Apéndice). Las líneas de moscas necesarias para las cruzas fueron amplificadas mediante colectas de huevos durante 12 horas y mantenidas en botellas con comida a 25°C. En general, todas las líneas de moscas transgénicas fueron mantenidas a 18° C y transferidas a viales con comida fresca una vez al mes.

Las líneas de moscas transgénicas productoras y reporteras usadas durante el desarrollo del presente trabajo fueron las siguientes:

**Hs-GAL4:** Esta línea productora posee un promotor de choque térmico fusionado río arriba de la secuencia codificante del factor transactivador de levadura GAL4 insertado en el tercer cromosoma.

***patched-GAL4/Cyo;FICI/MKRS (patched-GAL4):*** Esta línea productora contiene el potenciador del gen *patched* balanceado con el marcador genético “Curly” (*CyO* fenotipo de alas rizadas), *patched* dirige la expresión en las regiones anteriores de todos los parasegmentos durante el desarrollo embrionario.



**yw;UAS-Antp:** Esta línea contiene la construcción recombinante de Antp silvestre en el tercer cromosoma, río abajo de las secuencias UAS y presentan un fenotipo con ojos blanco y cuerpo amarillo (yw; “yellow/white”).

**yw;UAS-Antp $\Delta$ HD6.1:** Esta línea contiene la construcción recombinante de Antp, sin el homeodominio río abajo de las secuencias UAS. Esta delección incluye los aminoácidos 246 al 463 de la proteína Antp eliminando toda la región del homeodominio, el extremo N-amino terminal de éste, la región del tetrapéptido YPWM y parte de la región central de la homeoproteína. La inserción se encuentra en el tercer cromosoma.

**yw;UAS-Antp A010-3.1(64):** Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de un bloque de Alanina en el motivo YPWM río abajo de las secuencias UAS. La inserción está localizada en algún sitio del tercer cromosoma.

**yw;UAS-Antp A010-7(66):** Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de un bloque de alanina en el motivo YPWM río abajo de las secuencias UAS. La inserción está localizada en algún sitio del tercer cromosoma.

**yw;UAS-Antp A010-11(67):** Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de un bloque de alanina en el motivo YPWM río abajo de las secuencias UAS. La inserción está localizada en algún sitio del tercer cromosoma.

***fkh* [250<sup>con</sup>]-lacZ:** Esta línea contiene cuatro fragmentos oligomerizados del potenciador *fkh* con 39 pb consenso fusionado con el gen reportero de *lacZ* en el tercer cromosoma.



## 10.2 Sexado y realización de cruzas

Las líneas de moscas transgénicas usadas se sexaron en base al dimorfismo sexual y el criterio de sexado se basa en las siguientes características: a) el tamaño de las hembras por lo general es mayor que el de los machos, b) el abdomen del macho tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados visiblemente melanizados; por su parte, el abdomen de la hembra no tiene fusionados estos segmentos y con coloración uniforme. En las hembras, la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho y c) la presencia de peines sexuales en los machos presentan una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine que se localizan en la región basal del tarso del primer par de patas. (Ramos *et al.*, 1993).

La colecta de las hembras vírgenes se realizó poniendo especial atención que hubiesen eclosionado durante un período no mayor de 8 horas incubadas a 25°C para evitar la cruce con los machos. De las líneas reporteras se seleccionaron los machos y las hembras vírgenes de las líneas productoras.

Las cruces de moscas se realizaron en la proporción 3:1 (hembra:macho), las cuales se dejaron aparear por lo menos 12 horas a 25°C. Se mantuvieron viables en frascos con comida estándar suplementada con levadura activa seca.



### 10.3 Cruzas genéticas para la activación de *tsh* y represión de *Scr* por Antp

La expresión ectópica de Antp se dirigió usando el potenciador *patched* y un promotor de choque térmico, para analizar la activación de *tsh* y la represión de *Scr*. Se colectaron 100 hembras vírgenes de la línea productora *ptc-GAL4* y se cruzaron con 30 machos de las líneas reporteras *UAS-Antp* silvestre y las mutantes *UAS-Antp<sup>AAAA</sup>*. De igual manera se colectaron hembras vírgenes de la línea productora *Hs-GAL4* y se cruzaron con machos de las líneas reporteras *UAS-Antp* y *UAS-Antp<sup>AAAA</sup>*.

### 10.4 Cruzas genéticas para la activación por Antp de los potenciadores *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ*

La expresión ectópica de Antp dirigida con el potenciador *patched* se utilizó para analizar la activación del potenciador *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*. Se colectaron 100 hembras vírgenes de la línea productora de la línea *ptctiempo-GAL4* y se cruzaron con machos 50 de la línea reportera *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*, de la progenie, se seleccionaron hembras vírgenes que no tuvieran las alas rizadas (No CyO) y se cruzaron con machos de la línea reportera *UAS-Antp* (Antp silvestre y sus mutantes). Para el análisis del potenciador *tsh-lacZ* se utilizó el mismo procedimiento; se colectaron hembras vírgenes de la línea productora *ptc-GAL4* y se cruzaron con machos de la línea reportera *tsh-lacZ*, de la progenie se seleccionaron hembras no CyO que se cruzaron con machos de las líneas reporteras *UAS-Antp*.



### 10. 5 Colecta de embriones e inducción de la expresión ectópica de Antp

Las colectas de los embriones se realizaron primeramente con una precolecta, en placas de puesta, durante una hora a 25° C con el propósito de eliminar los huevos que estuvieran en el oviducto para permitir sincronizar la ovoposición. Posteriormente se les permitió a las moscas ovopositar durante cierto tiempo, y los embriones colectados fueron transferidos a una malla mediante un embudo y a continuación se les eliminó el corion con una solución de cloro al 4% durante tres minutos. Estos se enjuagaron con agua, se lavaron con NaCl al 0.4% y TritónX-100 al 0.1% y se enjuagaron otra vez con agua destilada.

Para el análisis de la expresión del gen *tsh* (italicas y minusculas) por Antp los embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp* fueron colectados durante dos horas y se dejaron desarrollar durante 6 h 50 min a 25°C antes de ser fijados. En cambio los embriones *Hs-GAL4;UAS-Antp* fueron colectados durante 12 horas a 25°C, transferidos a una caja petri con papel filtro humedecido y sellados con parafilm, se les aplicó un choque térmico de 30 min a 37° C, en un baño de agua en continua agitación, se les dejó en recuperación a 18°C durante 30 min, se les aplicó un segundo choque térmico y se les permitió recuperarse 30 min, y posteriormente se aplicó un tercer choque térmico y al término se les dejó 3 horas de recuperación a 25°C antes de ser fijados (Zeng *et al.*, 1993)

Para analizar los efectos de la expresión de Antp en la expresión de Scr durante el desarrollo temprano se colectaron embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp* durante 2 horas y se les dejó desarrollar durante 6 h 50 min a 25 °C antes de ser fijados, en cambio para el análisis en embriones de estadios avanzados se dejaron desarrollar durante 11 horas 30



min antes de ser fijados. La inducción de Antp ubicua, en los embriones *Hs-GAL4;UAS-Antp*, para analizar la expresión de Scr se realizó de acuerdo al método descrito por Zeng *et al.*, 1994 como anteriormente se describió.

El análisis de la activación de los potenciadores *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *tsh-lacZ* por Antp se llevó a cabo en embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp;fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* y *ptc-GAL4;UAS-Antp;tsh-lacZ* que fueron colectados durante 2 horas a 37°C y se dejaron desarrollar durante 6 h 30 min antes de ser fijados.

### **10.6 Visualización de la expresión génica mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Los embriones fueron decorionizados, como anteriormente se describió, y fueron pasados a un tubo de microcentrifuga eppendorf conteniendo 500 µl de heptano (CTR), 100µl de formaldehído 37% (Sigma-Aldrich) y 400µl de solución PIPES 0.1M pH 6.9 (ver Apéndice) para su fijación durante 30 minutos en el brazo de agitación a velocidad media. Posteriormente, se devitelinizaron como se describe, se eliminó cuidadosamente la fase del fondo, se añadieron 500µl de metanol (CTR), se agitaron a media velocidad en el brazo de agitación durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron tres veces con metanol. Estos embriones se almacenaron a -20°C en metanol hasta su uso o se procesaron inmediatamente después de obtenidos.

Los embriones fueron rehidratados reemplazando sucesivamente en 30%, 50%, 70% y 100% de PBS/metanol (v/v) y se permeabilizaron incubándose en una solución de PBT 0.1% (Sigma) (PBS + Tritón X 100-0.1%) durante 1 hora. Se eliminó el sobrenadante y se agregó una solución de PBT 0.1% + albúmina sérica bovina (BSA)





(Research organics, grado molecular) al 10% que se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se incubó toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo específico. A continuación se muestra los diferentes anticuerpos primarios que fueron utilizados así como las diluciones en PBT 0.1% + BSA 1% (PBT/BSA1%) que se realizaron:

<b>Antígeno primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>	<b>Fuente</b>
Anti-Antp 4C3	1:250	Ratón	U of Iowa
Anti-Exd BIIM	1:5	Ratón	White <i>et al.</i> ,1997
Anti-β-gal	1:500	Ratón	Promega
Anti-β-gal	1:100	Conejo	Molecular probes
Anti-Tsh	1:250	Conejo	S. Cohen <i>et al.</i> ,2001
Anti-Scr	1:100	Conejo	Kaufman <i>et al.</i> , 1991

Cuando los anticuerpos dos anticuerpos fueron utilizados simultáneamente en los embriones, se diluyeron en 50 µl por reacción. Al término de la incubación se hizo un lavado rápido y tres de 30 minutos con PBT 1.0 %. Posteriormente, se agregó el segundo anticuerpo y se incubó de 3 a 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en PBT/BSA1% en un volumen final por reacción de 50 µl, como a continuación se muestra:

<b>Antígeno que reconocen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Fuente</b>
Anti-IgG de Ratón acoplado a FITC	1:200	J. Immunoresearch
Anti-IgG de Conejo acoplado a Alexa	1:50	Molecular Probes
Anti-IgG de Conejo acoplado a Peroxidasa de rábano (HRP)	1:150	Biomeda
Anti-IgG de Ratón acoplado a Fosfatasa alcalina (AP)	1:100	Promega
Anti-IgG de Ratón acoplado a Peroxidasa de rabano (HRP)	1:250	Promega



Los anticuerpos secundarios que se incubaron de forma simultánea fueron Anti-IgG de Ratón-FITC y anti-IgG de Conejo-Alexa. Al término de la incubación se realizó un lavado rápido y tres de 30 minutos en PBT 1.0% a temperatura ambiente y por último uno rápido con PBS + Tween 20 0.05%.

A los anticuerpos secundarios acoplados a una enzima se agregó: 1ml de 3-3 Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) 0.3mg/ml + 2µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para HRP y para AP se agregaron 50 µl de Fosfato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol/Tetrazolium Nitro Azul (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich), en ambos casos se esperó hasta que terminara la reacción colorimétrica (marrón en el caso de HRP y azul en AP) y se paró con extensivos lavados con PBS 1X + Tween 20.

A continuación se deshidrataron los embriones, de igual manera de aquellos que fueron tratados mediante inmunohistoquímica como los de inmunofluorescencia, agregando sucesivamente metanol/PBS v/v etanol al 30%, 50%, 70% y 100% durante 1 a 2 minutos por cada solución cada uno y finalmente se agregaron 500µl de medio para montaje (glicerol 40%/PBS 60%) y se montaron en un portaobjetos cubriéndose con un cubreobjetos.

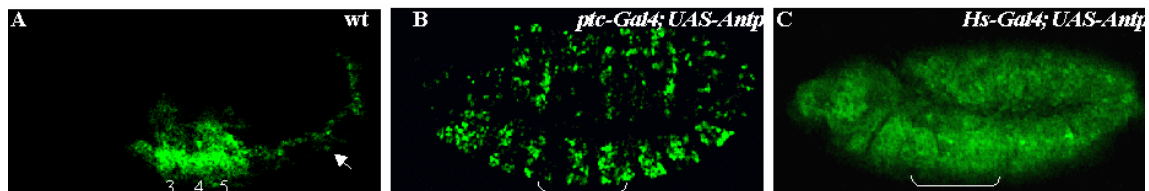
La detección de las señales específicas en los embriones, con las reacciones enzimáticas, se realizó mediante observación en microscopía de luz. Las señales fluorescentes se detectaron mediante microscopía confocal-láser con un microscopio Olympus IX70, usando el canal de detección BA510IF y BA550RIF, con un 578 nm (Rojo) y 494 nm (verde) de longitud de onda de excitación respectivamente.



## 11. RESULTADOS

### 11. 1 Visualización de la expresión endógena y ectópica de Antennapedia

En embriones de *D. melanogaster* la expresión de Antp se localiza desde los parasegmentos 3 al 5 (PS 3-5) así como en el cordón nervioso del Sistema Nervioso Central (SNC) (fig 16A). Utilizando el sistema binario de regulación UAS/GAL4, descrita previamente en Materiales y Métodos, fue posible dirigir la expresión ectópica de Antennapedia durante el desarrollo embrionario. La cruce entre hembras de la línea *ptc-GAL4* y machos *UAS-Antp* nos permitió integrar estos transgenes en su descendencia (embriones *ptc-GAL4; UAS-Antp*). El análisis de la localización de Antp en estos embriones reveló que el potenciador *ptc* permitió la expresión de Antp constitutivamente y uniformemente en la región anterior de todos los parasegmentos como se observa en la Figura 16 B. Por otro lado, los embriones *Hs-GAL4;UAS-Antp*, producto de la cruce entre hembras *Hs-GAL4* y machos *UAS-Antp*, mostraron la expresión de Antp, inducida mediante choques térmicos, a lo largo de todo el embrión (fig 16C).



**Figura 16. Expresión endógena y ectópica de Antennapedia en embriones de *D. melanogaster*.** Embriones del estadio 12 fueron incubados con anti-Antp y la expresión visualizada utilizando un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FITC. **A.** La expresión endógena de Antp se localiza

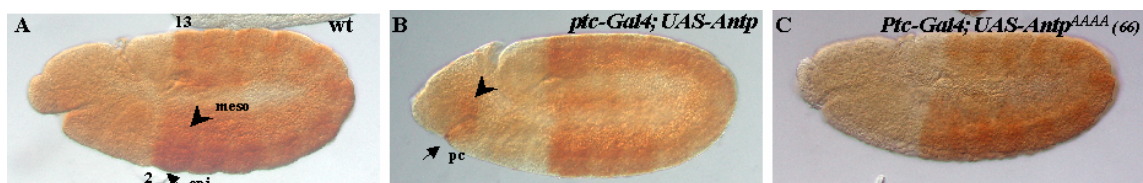


en PS3-5 y en el SNC (flecha). **B.** El potenciador *patched* dirige la expresión ectópica de Antp hacia la región anterior de cada parasegmento, el corchete señala los PS 3-5 donde se localiza Antp endógena. **C.** Localización ubicua de Antp en un embrión que expresa Antp bajo la regulación de un promotor de choque térmico. Todos los embriones están orientados con la región anterior a la izquierda y la ventral hacia abajo.

## 11.2 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM en la activación de *tsh*

### 11.2.1 La activación ectópica de *tsh* por Antp dirigida al dominio de *ptc* requiere el tetrapéptido YPWM

Uno de los genes blanco de Antp mejor caracterizados es *tsh*, lo que lo convierte en un candidato idóneo para determinar la actividad funcional del dominio YPWM de Antp. La expresión endógena de *tsh* en embriones silvestres se localizó en los PS 2-13 tanto en epidermis como en mesodermo (fig 16A). Para determinar si Antp dirigida por el potenciador del gen *ptc* es capaz de activar ectópicamente a *tsh* realizamos una inmunohistoquímica en embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp* del estadio 12. La expresión de Antp ectópica activó al gen blanco *tsh* en las regiones anteriores del embrión, específicamente en la epidermis y mesodermo del procephalon y no modificó la expresión endógena de *tsh* del PS 2-13 (fig 17B). Por otro lado, cuando analizamos la expresión de *tsh* en los embriones de *ptc-GAL4;UAS-Antp<sup>AAAA</sup>* no detectamos activación ectópica de *tsh* en las regiones anteriores del embrión ni observamos modificación en la expresión endógena previamente detectada (fig 16C).

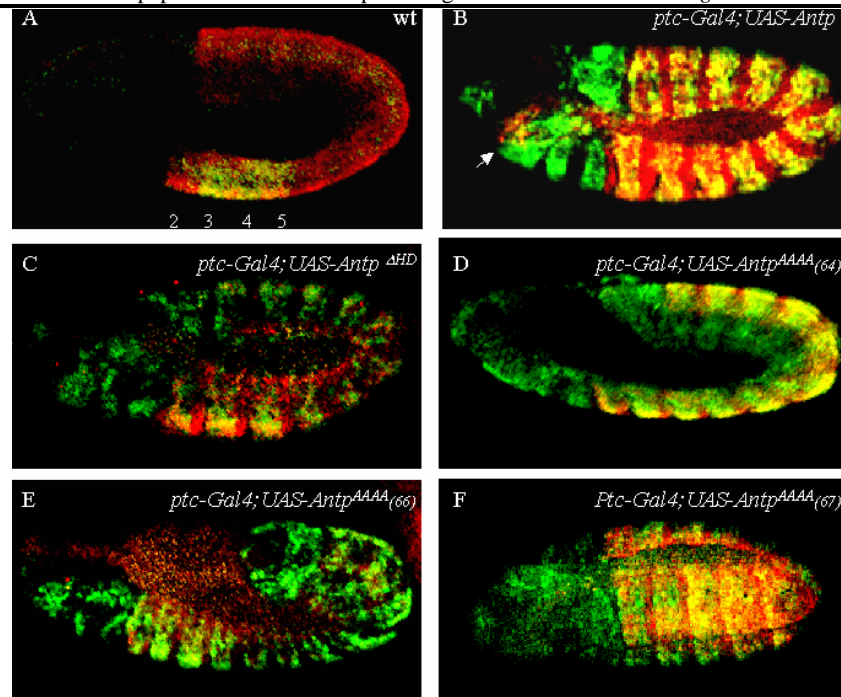


**Figura 17. Efecto de la expresión ectópica de Antp y Antp<sup>AAAA</sup> en la activación del gen blanco *tsh*.** Embriones del estadio 12 que fueron incubados con anti-Tsh y un anticuerpo secundario conjugado con



peroxidasa para detectar el patrón de la expresión de *tsh*. **A.** Embrión wt donde la expresión de *tsh* se localiza desde la parte posterior del PS 2 hasta el PS 13 en epidermis (epi) y en el mesodermo (meso). **B.** La activación de la expresión de *tsh* por Antp (dirigida ectópicamente por *ptc*) se observa en la región del procephalon (pc), en la epidermis (flecha) y en el mesodermo (punta de flecha). **C.** Antp<sup>AAAA</sup> ectópica no activa *tsh* y no altera su expresión endógena.

Para corroborar la presencia ectópica de Antp y su mutante en la activación de *tsh* utilizamos anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluorocromos. El análisis mediante microscopía confocal-láser nos permitió observar la expresión simultánea de *Antp* y *tsh* en embriones wt del estadio 12; estas proteínas se detectaron en sus dominios endógenos de expresión y se co-localizaron en los PS 3-5 (fig 18A). En embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp* la proteína Antp se dirigió a la región anterior de todos los parasegmentos, mientras que Tsh se detectó en su dominio endógeno de expresión y ectópicamente en el procephalon (ambas proteínas se co-localizaron en cada parasegmento donde se activó ectópicamente *tsh*) (fig 18B). La expresión ectópica de Antp $\Delta$ H $\Delta$ D, no causó ninguna modificación en la expresión endógena de *tsh* ni lo activó en la región anterior como se muestra en la figura 18°C. De la misma manera las tres líneas de embriones que expresaron Antp<sup>AAAA</sup> ectópicamente no mostraron modificación en el patrón de Tsh, ni activaron la expresión de *tsh* en la cabeza de los embriones, es decir se observaron como el testigo negativo (fig 18 D, E y F). Estos resultados demuestran claramente que la activación del gen blanco *tsh* por Antp, dirigida con el potenciador *ptc*, requiere de la presencia del tetrapéptido YPWM.

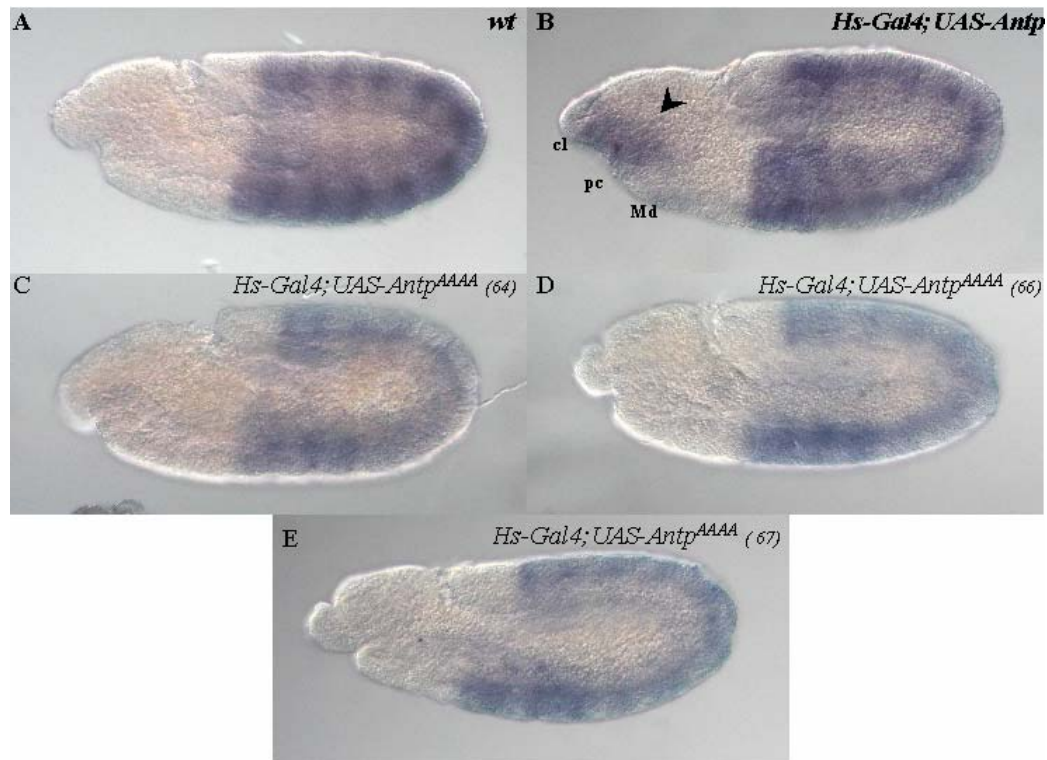


**Figura 18. La activación ectópica de Tsh por Antp dirigida al dominio *ptc* requiere el tetrapéptido YPWM.** Embriones del estadio 12 fueron analizados mediante inmunofluorescencia para la detección de Tsh en rojo y Antp en verde; la co-localización de ambas proteínas se muestra en amarillo. **A.** La expresión endógena de *tsh* se distribuye del PS 2 al PS 13, y Antp lo activa (repetido) del PS 3 al PS 5 en donde ambas proteínas se co-localizan. **B.** La expresión ectópica de Antp mediante el potenciador *ptc* activa *tsh* en el procephalon (flecha) mientras que Antp $\Delta$ HHD (**C**) y tres líneas diferentes de embriones que expresan Antp<sup>AAA</sup> (**D**, **E** y **F**) mostraron únicamente la expresión endógena de Tsh. Con el objeto de

analizar si la falta de activación ectópica de *tsh* fue se debio a la baja concentración de la homeoproteína Antp mutante dirigida con el potenciador *ptc* y no a la mutación en si, se dirigió la expresión ubicua de Antp usando un promotor fuerte como lo es el de choque térmico (Hs). Los embriones silvestres que fueron sometidos a choques térmicos (como se describe en materiales y métodos) no presentaron modificación en la expresión endógena de *tsh* (fig 19A). Embriones con los transgenes *Hs-GAL4;UAS-Antp* que fueron sometidos a choque térmico mostraron la expresión endógena y además activación ectópica de *tsh* en la regiones anteriores del embrión, en los segmentos clypeolabrum (cl), procephalon (pc) y mandibular (Md) (fig 19B). Mientras que las tres líneas de embriones que expresaron Antp<sup>AAA</sup> no mostraron ninguna modificación en la



expresión endógena de *tsh* y tampoco activación en la región anterior de la cabeza (fig 19 C, D y E).



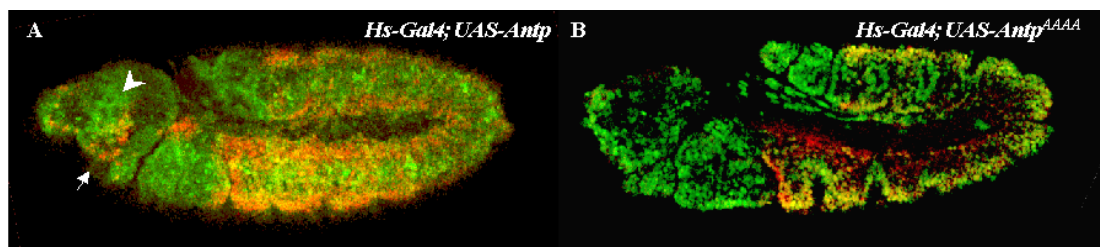
**Figura 19. Análisis de la activación de *tsh* por la expresión de Antp mediante un promotor de choque térmico.** Embriones del estadio 12 fueron incubados con anti-Tsh y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina para detectar el patrón de expresión de Tsh **A**. El tratamiento de choque térmico en embriones *wt* no afecta la localización endógena de Tsh. **B**. La expresión ectópica de Antp activa a *tsh* en la epidermis de clypeolabrum (cl), procephalon (pc) y en menor intensidad en el segmento mandibular (Md), así como en el mesodermo (punta de flecha). **C, D y E** Las tres líneas transgénicas que expresan Antp<sup>AAAA</sup> ectópica no activan *tsh* en las regiones anterior mostrando solo el patrón endógeno de *tsh*.

Para corroborar la presencia de Antp mutante, en la región anterior de los embriones, se realizó una co-localización de ambas proteínas, Antp y Tsh, en los embriones donde la expresión ubicua de Antp fue inducida mediante choque térmico. La co-localización mediante microscopia confocal-láser muestra que Antp activó a *tsh* en las regiones anteriores del embrión como previamente se había descrito en la sección anterior mediante inmunohistoquímica (ver fig 19B y 20A). De igual manera



corroboramos que la presencia de Antp<sup>AAAA</sup> en la cabeza del embrión, no fue capaz de activar a *tsh* (fig 20 B).

La demostración de la presencia de Antp mutante en YPWM (Antp<sup>AAAA</sup>) en la región anterior de los embriones usando dos diferentes potenciadores demuestra sin lugar a dudas que esta homeoproteína mutante no activó al gen blanco *tsh*, por lo que el tetrapéptido YPWM es indispensable para la actividad funcional de Antp sobre este gen blanco.



**Figura 20. La expresión de Antp<sup>AAAA</sup> mediante choque térmico no permite la activación de *tsh*.** Co-localización de Antp (verde) y Tsh (rojo) mediante inmunofluorescencia en embriones del estadio 12. **A.** Antp expresada ubicuotamente mediante el promotor de choque térmico activa Tsh en la epidermis (flecha) y mesodermo (punta de flecha) en las regiones anteriores del embrión. **B.** En cambio Antp<sup>AAAA</sup> no activa a Tsh a pesar de haberse expresado también ubicuotamente.

### 11. 3 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en la represión de *Scr*

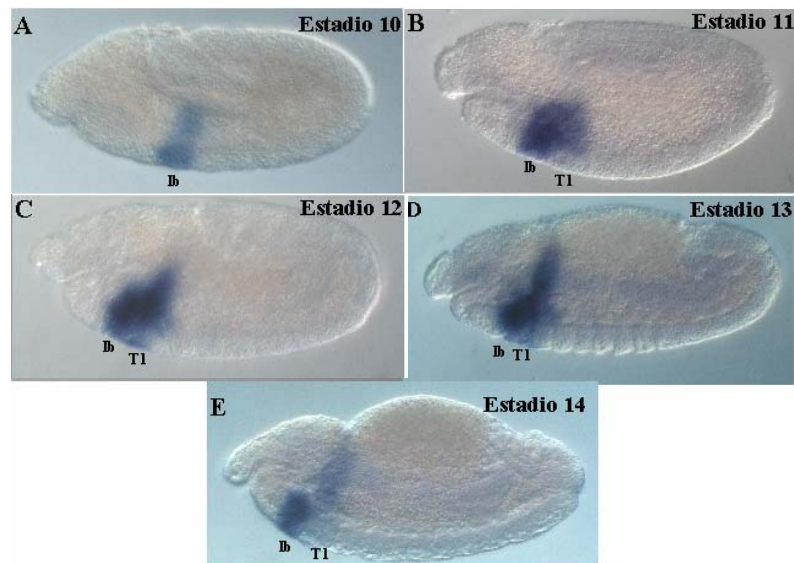
#### 11.3.1 Cinética de la expresión de *Scr* durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*

Con el objetivo de analizar la relevancia funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en el fenómeno de la supresión fenotípica, que consiste cuando una homeoproteína se localiza anteriormente a su dominio endógeno reprime la expresión del gen homeótico que le antecedió, en este caso sobre del gen *Scr*.





Primeramente detectamos mediante inmunohistoquímica el patrón endógeno de *Scr* durante el desarrollo embrionario. Es a partir de la etapa 10 del desarrollo embrionario donde se detectó por primera vez la expresión de *Scr*; en el segmento labial tanto en epidermis como en mesodermo (fig 21 A). La expresión en el segmento torácico 1, en mesodermo, aparece en el estadio 11, y es a partir del estadio 12 donde se detecta *Scr* en la epidermis del segmento torácico 1 (fig 21 B y C respectivamente). La expresión de *Scr*, en mesodermo y epidermis, continúa en el estadio 13, sin embargo en estadios posteriores disminuye notablemente la intensidad en la expresión en el segmento T1 (fig 21 D).

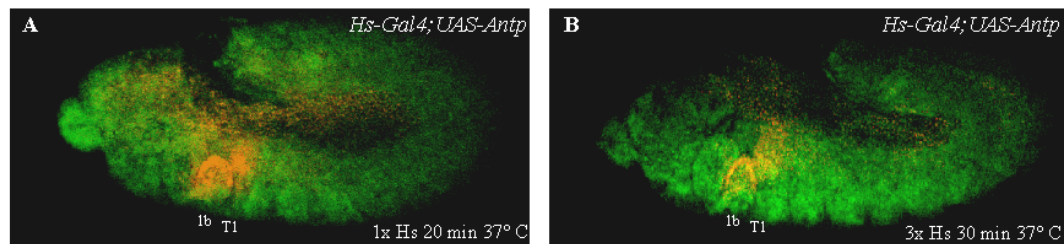


**Figura 21. Cinética de la expresión de *Scr* durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.** Embriones silvestres fueron incubados con anti-*Scr* y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina para detectar el patrón de expresión de *Scr*. **A.** *Scr* se detecta en la epidermis y mesodermo del segmento labial (lb) en embriones del estadio 10. **B.** Más tarde en el desarrollo (estadio 11) *Scr* intensifica su expresión en lb e inicia su expresión en el mesodermo del primer segmento torácico (T1). **C, D y E** A partir del estadio 12 *Scr* se localiza en la epidermis de T1. Nótese que *Scr* se expresa con mayor intensidad en lb que en T1.



### 11.3.2 Represión de *Scr* por *Antennapedia* ectópica dirigida con el potenciador *ptc*.

Con el objeto de determinar si la expresión de Antp ubicua podría reprimir a *Scr* analizamos su expresión en embriones *Hs-GAL4;UAS-Antp*. Estos embriones fueron tratados con un choque térmico de 37° C durante 20 min en la etapa 11 del desarrollo (ver materiales y métodos), etapa en la cual *Scr* se localiza en lb y se empieza a expresar en T1 (ver fig 21 A). La expresión de Antp se localizó en todo el embrión, sin embargo la expresión de *Scr* se mantuvo en los mismos niveles, en lb y T1 (comparar fig 21 C y 22 A). De igual manera la aplicación de 3 choques térmicos de 30 min a partir de la etapa 10 (ver materiales y métodos) no modificó la expresión natural de *Scr* (fig 22 B).

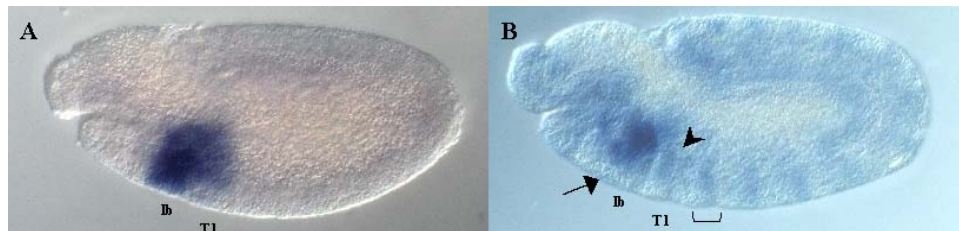


**Figura 22. Efecto de la expresión de Antp, dirigida mediante un promotor de choque térmico, en el gen blanco *Scr*.** Co-localización de las proteínas Antp (verde) y Scr (rojo) mediante inmunofluorescencia en embriones, (*Hs-GAL4;UAS-Antp*) expresaron Antp mediante choques térmicos **A.** Embrión en el que se indujo la expresión ubicua de Antp, mediante un choque térmico de 20 min en estadio 11, se observa el patrón endógeno de *Scr*. **B.** La inducción de Antp a partir del estadio 10 mediante 3 choques térmicos de 30 min no fue suficiente para modificar la expresión de *Scr*.

Considerando que probablemente la represión de *Scr* requiera de una expresión continua de Antp en estadios mas tempranos, utilizamos el potenciador *ptc* para dirigir Antp ectópicamente. El análisis de embriones del estadio 12, *ptc-GAL4;UAS-Antp*, mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-*Scr* mostró que Antp reprimió completamente la expresión endógena de *Scr* en el segmento T1 y ligeramente en la epidermis del segmento labial. Asimismo, se detectó una leve ganancia de expresión de



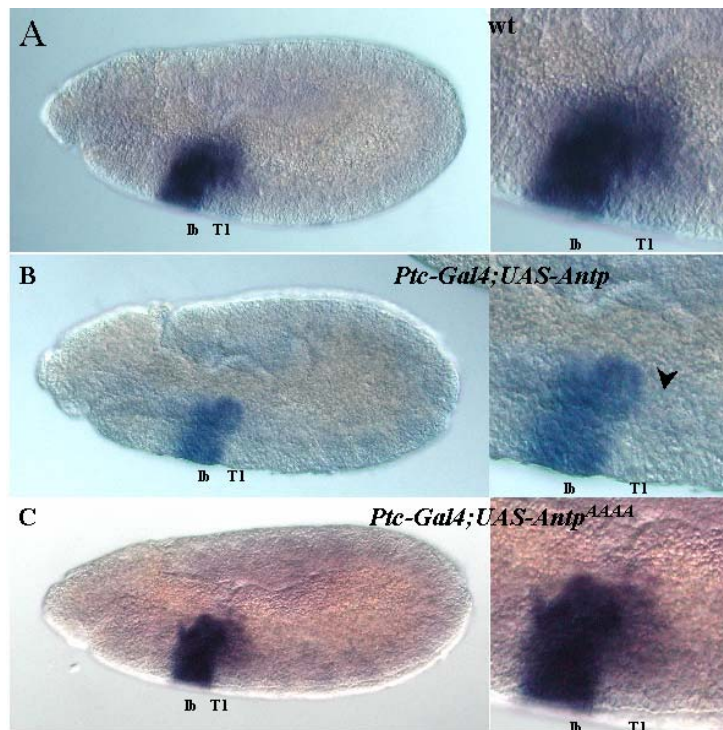
*Scr* en la región anterior de cada segmento en donde se dirigió Antp con el potenciador *ptc* (fig 23 B y 24 B). La represión de la expresión de *Scr* fue mas dramática en el estadio 14 donde *Scr* se localiza en los segmentos que se encuentran mejor definidos, labial y T1 como se muestra en la Figura 23 A. La sobre-expresión ectópica de Antp provocó la reducción de la expresión de *Scr* en lb y abolió completamente la expresión en T1 (fig 25 B).



**Figura 23. La expresión ectópica de Antp reprime a Scr.** Tinción mediante inmunohistoquímica (como se describe en la fig 6) de embriones del estadio 12. **A.** Localización de la expresión de *Scr* endógena en los segmentos lb y T1. **B.** Antp dirigida por el potenciador *ptc* reprime la expresión de *Scr* en T1 (punta de flecha) y en la epidermis de lb (flecha). A su vez la expresión ectópica de Antp activa a *Scr* ligeramente en la región anterior de cada uno de los segmentos (corchete).

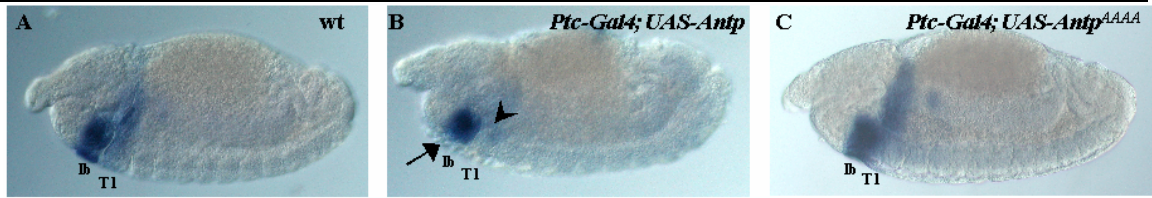
### 11.3.3 El tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la represión de *Scr*

Con el propósito de conocer cual es el papel funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en la represión de *Scr*, se detectó mediante inmunohistoquímica la expresión de *Scr* en embriones *ptc-GAL4;UAS-Antp<sup>AAAA</sup>*. La expresión de Antp<sup>AAAA</sup> dirigida con el potenciador *ptc* no causó la represión de *Scr* en los segmentos lb y T1 (fig 24 C); sin embargo presentó la misma ganancia de activación en las regiones anteriores de cada parasegmento como se había descrito con la expresión ectópica de Antp.



**Figura 24.** La expresión de  $Antp^{AAAA}$  no reprime a *Scr* en los segmentos lb y T1 pero si lo activa en todos los segmentos donde es dirigida. En la izquierda se muestran embriones del estadio 12 con el patrón de expresión de *Scr* y a la derecha la región amplificada del tórax. **A.** Expresión endógena de *Scr* en un embrión *wt*. **B.** Antp ectópica dirigida por el potenciador *ptc* reprime a *Scr* en T1 (punta de flecha) mientras que en **C**  $Antp^{AAAA}$  no afecta la expresión de *Scr* en lb y T. La sobre-expresión de Antp y  $Antp^{AAAA}$  causan una ligera activación ectópica de *Scr* en la región anterior de cada segmento.

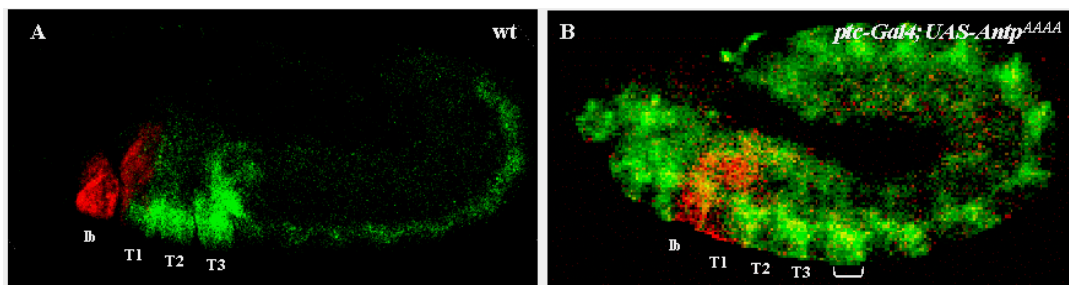
Además, en embriones de un estadio más avanzado, en los que se expresó  $Antp^{AAAA}$  ectópicamente mediante el potenciador *ptc*, no mostraron represión de *Scr*, pero si se mantuvo la activación en las regiones anteriores de los segmentos; lo que confirma que durante todo el desarrollo embrionario la expresión constante y uniforme de  $Antp^{AAAA}$  no es capaz de reprimir a *Scr* en los segmentos lb y T1 (fig 25 C).



**Figura 25. El tetrapéptido YPWM de Antp es indispensable para la represión de *Scr* en estadio embrionario avanzado.** Tinción mediante inmunohistoquímica en embriones del estadio 14 mostrando el patrón de *Scr*. **A.** Expresión endógena de *Scr* en un embrión *wt* del estadio 14. **B.** La expresión de Antp ectópica por el potenciador *ptc* reduce dramáticamente la expresión de *Scr* en el segmento T1 (punta de flecha) y en la epidermis de lb (flecha) mientras que en **C** Antp<sup>AAAA</sup> no reprime la expresión de *Scr*. La expresión ectópica de Antennapedia activa a *Scr* ligeramente en la parte anterior de cada segmento (**B** y **C**).

El análisis mediante microscopía confocal en embriones, *ptc-GAL4; UAS-Antp*<sup>AAAA</sup> del estadio 11 mostró la co-localización de las homeoproteínas Antp y *Scr* (fig 26 A). La presencia de Antp<sup>AAAA</sup> ectópica en las regiones anteriores de todos los segmentos del embrión no afecta la expresión de *Scr* en lb y T1, pero que si es capaz de activar levemente a *Scr* en la región anterior de cada segmento (fig 26 B).

Este análisis reveló que el dominio YPWM es indispensable para que la homeoproteína Antp, cuando ésta se dirige mediante *ptc* en las regiones anteriores, reprima la expresión endógena de *Scr*; sin embargo la mutación de este motivo no afectó la activación ectópica de *Scr* por Antp en las regiones anteriores del embrión.



**Figura 26. El tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la represión de *Scr*.** Co-localización de Antp (verde) y *Scr* (rojo) mediante inmunofluorescencia en embriones del estadio 12. **A.** Embrión *wt* que muestra la expresión endógena de *Scr* en los segmentos lb y en la región anterior de T1 mientras que Antp se expresa a partir de la parte posterior de T1, en T2 y T3, así como en el SNC. **B.** La expresión ectópica de Antp<sup>AAAA</sup> no reprime a *Scr*, pero si lo activa en la parte anterior de cada segmento a donde fue dirigida Antp (amarillo); el corchete señala un segmento en donde *Scr* fue activado.



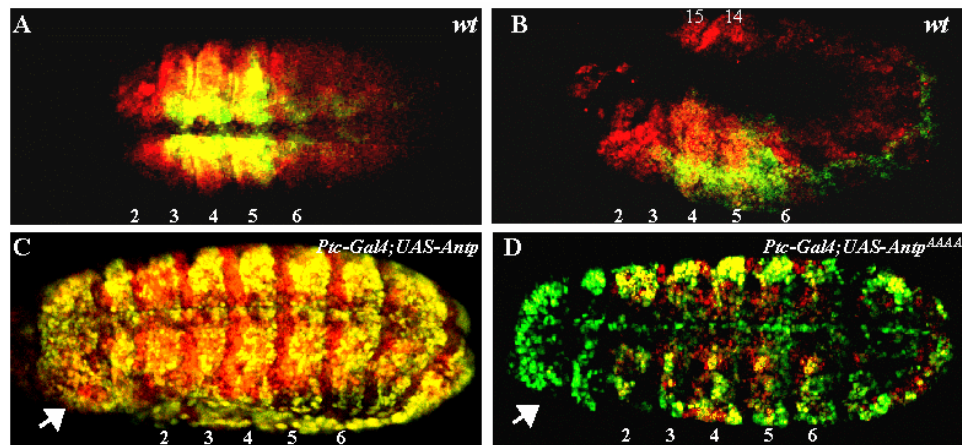
### 11.4 Efecto del tetrapéptido YPWM de Antp en la activación del elemento *fkh[250<sup>con</sup>]*

Para analizar la función del tetrapéptido YPWM de Antp en otro gen blanco, seleccionamos el elemento *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*, ya que contiene 5 cajas de repuesta homéoticas oligomerizadas, y es dependiente para su activación de heterodímeros Hox/Exd. El análisis de este elemento nos permitirá determinar la importancia de YPWM en la formación de los heterodímeros (Hox/Exd) en la activación de *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*.

Las figuras 27 A y B muestran embriones con la construcción *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* del estadio 12. Mediante inmunofluorescencia se localizó la presencia endógena de  $\beta$ -Gal en los PS 2-6 y en los PS 14 y 15 así como en menor intensidad en los PS 7-14; mientras que Antp endógena se co-localizó en los PS 3-5. Para determinar la regulación de este elemento por Antp se cruzaron hembras de la línea *ptc-GAL4* y machos *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*, posteriormente las hembras de la progenie se cruzaron con machos de las líneas *UAS-Antp* (ver Materiales y Métodos). Los embriones con los transgenes *ptc-GAL4;UAS-Antp; fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*, en donde Antp fue dirigida ectópicamente por el potenciador *ptc*, mostraron mediante inmunofluorescencia la activación de *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* en la parte anterior de todos los segmentos donde se co-localiza con Antp (fig 27 C ). Sin embargo, la expresión ectópica de Antp<sup>AAAA</sup> no modificó la expresión de endógena en ningún segmento, es decir mostró solamente la activación endógena en los PS 2-6 a pesar de haberse detectado la presencia la homeoproteína Antp<sup>AAAA</sup> en todos los segmentos (fig



27 D). Estos resultados confirman una vez más que en Antp son necesarios e indispensables los aminoácidos YPWM en la activación del elemento *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*.



**Figura 27. La activación ectópica del elemento *fkh[250con]* por Antp requiere el tetrapéptido YPWM.** Embriones del estadio 12 muestran Antp en verde y *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* ( $\beta$ -Gal) en rojo, la co-localización de ambos mediante microscopía confocal en amarillo (A, C, E y D vista ventral y B vista lateral). A y B El elemento *fkh[250<sup>con</sup>]* dirige la expresión de  $\beta$ -Gal del PS 2-6 y PS 14-15; en los PS 3-5 se co-localiza con Antp. C La flecha señala la activación ectópica de  $\beta$ -Gal inducida en la cabeza por Antp dirigida con el potenciador *ptc*. D. La expresión ectópica de Antp<sup>AAAA</sup> en el dominio de *ptc* no activo al elemento *fkh[250<sup>con</sup>]*.

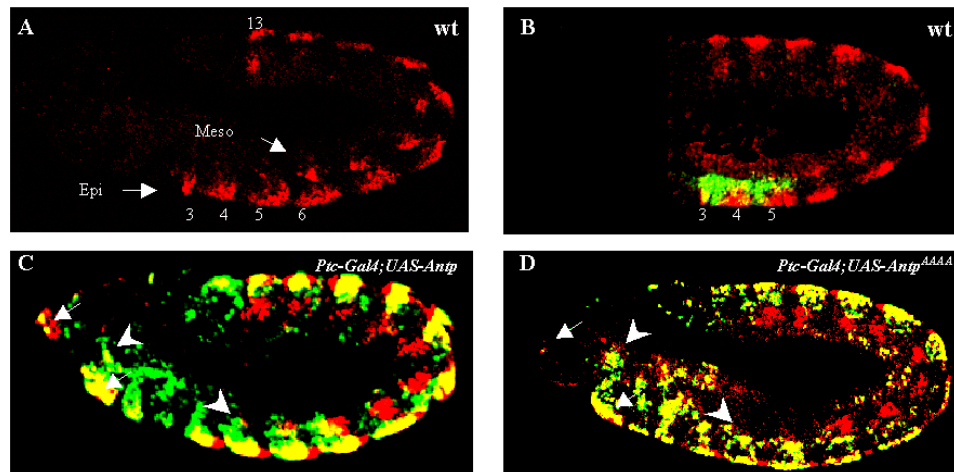
### 11.5 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en la activación del potenciador del gen *tsh*

Para determinar si el tetrapéptido YPWM de Antp es necesario para la activación del potenciador del gen *tsh* se realizó el análisis de su patrón endógeno de expresión. Embriones del estadio 12 con la construcción *tsh-lacZ* con anticuerpos anti- $\beta$ -Gal, dado que este potenciador *tsh* dirige la expresión de  $\beta$ -Gal. Este reportero se localizó desde PS 3 al 13 en epidermis y del PS 6 al 13 en mesodermo. La localización de  $\beta$ -Gal no fue uniforme en todo el segmento, esta se expresa más intensamente en la región posterior que en la anterior (fig 28 A). El análisis mediante microscopía confocal de las dos



proteínas reveló que Antp y  $\beta$ -Gal se co-localizan en la región torácica, en los PS 3-5 (fig 28 B).

En los embriones, que contienen los transgenes *ptc-GAL4;UAS-Antp*, se expresó ectópicamente Antp mediante el potenciador *ptc*, encontrándose una activación del potenciador del gen *tsh* en las regiones anteriores del embrión. Esta activación se localizó tanto en epidermis como en mesodermo del clypeolabrum y procephalon, así mismo en la región torácica hubo una ganancia de activación en el mesodermo de los PS 3 y 4 (fig 28 C). De la misma forma la expresión ectópica de Antp<sup>AAAA</sup> causó la misma ganancia de activación en el potenciador del gen *tsh*, tanto en las regiones anteriores (en la cabeza) como en el tórax, difiriendo sólo que Antp<sup>AAAA</sup> activó en el segmento labial mientras que Antp silvestre no lo hizo (fig 28 D).



**Figura 28. La activación ectópica del potenciador del gen *tsh* por Antp es independiente del dominio YPWM.** A. El potenciador del gen *tsh* dirige la expresión de  $\beta$ -Gal en epidermis (Epi) del PS 3 al PS 13, y en el mesodermo (Meso) del PS 6 al PS 13. B. Antp endógena (verde) y  $\beta$ -Gal (rojo) se co-localizan (amarillo) en los PS 3 al PS 5 en epidermis. C. La expresión ectópica de Antp dirigida con el potenciador *ptc* indujo la activación del potenciador de *tsh* en regiones anteriores del embrión en epidermis (flecha) y en el mesodermo (punta de flecha). D. Antp<sup>AAAA</sup> ectópica activó al potenciador de *tsh* de manera similar que Antp en epidermis y mesodermo. Todos los embriones están orientados con la región anterior hacia la izquierda y la ventral hacia abajo.

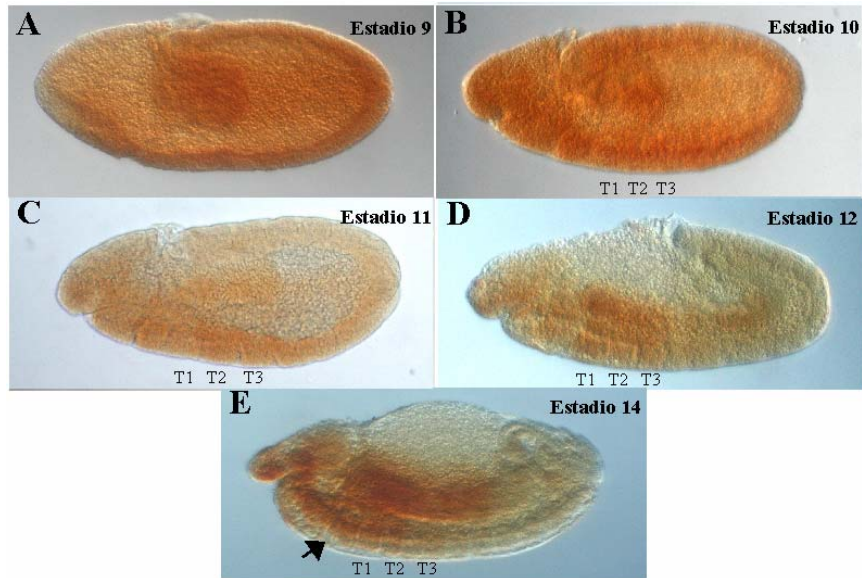




## **11.6 Expresión del cofactor *exd* durante el estadio embrionario de *D. melanogaster*.**

Habiéndose destacado la importancia funcional del tetrapéptido YPWM de Antp en la regulación de sus genes blanco, y considerando que este es un sitio de interacción proteína-proteína, pretendimos conocer la distribución de uno de los probables cofactores de Antp durante el desarrollo embrionario: El cofactor Extradenticle (Exd).

La expresión de *exd* se determinó mediante anticuerpos anti-Exd en embriones silvestres a diferentes etapas del desarrollo. En el estadio 9 la presencia de Exd es uniforme en todo el embrión, sin embargo en etapas posteriores hay una marcada modulación en su expresión y se localiza más hacia las regiones anteriores que en las posteriores. Es en el estadio 10 donde se observan los primeros signos de la disparidad en la expresión entre la región anterior (cabeza y tórax) y el abdomen, y para el estadio 11 Exd se encuentra localizado en el núcleo de las células en la región anterior mientras que en el abdomen se observa difuso por su localización en el citoplasma. Sin embargo para el estadio 12 *exd* se expresa en mayor cantidad en el mesodermo que en la epidermis, fenómeno que se mantiene constante hasta el estadio 14. Interesantemente, los efectos de la expresión ectópica de Antp, en sus genes blanco, se determinaron en las regiones anteriores, justo donde la homeoproteína Exd se localiza constantemente durante el desarrollo embrionario, y no en las regiones posteriores donde se encuentra disminuida y en el citoplasma (fig 29).



**Figura 29. Distribución de Exd durante el desarrollo embrionario.** **A** y **B** La expresión de *exd* es alta e uniforme en los estadios 9 y 10 respectivamente. **C** y **D** Durante el estadio 11 comienza la modulación de la expresión de Exd se mantiene alta en la región anterior y disminuye hacia la parte posterior. **E**. A medida que avanza el desarrollo embrionario Exd reduce sus niveles de expresión en la epidermis (flecha).



## 12. DISCUSIÓN

En este estudio determinamos *in vivo*, en embriones de *Drosophila*, la actividad funcional del tetrapéptido YPWM en la activación/represión de genes blanco de Antennapedia. La primera parte de este análisis se llevó a cabo mediante el uso de moscas transgénicas que contienen las construcciones para expresar: Antp silvestre, Antp con la delección en el homeodominio y Antp<sup>AAAA</sup>, en esta última el tetrapéptido YPWM está substituído por un bloque de alaninas. Mediante el uso del sistema de regulación UAS/GAL4 dirigimos Antp y las mutantes ectópicamente, en regiones anteriores del embrión, donde normalmente no se expresa *Antp* y así descartamos efectos cruzados. La segunda parte del trabajo consistió en analizar la activación/represión de los genes blanco de Antennapedia; *tsh*, *Scr* y los potenciadores *fkh[250con]-lacZ* y *tsh-lacZ*.

Para analizar la expresión ectópica del gen blanco *tsh* por Antp, utilizamos dos sistemas para dirigir Antp: el potenciador del gen *ptc* y el promotor de choque térmico (fig 13). El potenciador *ptc* dirige la expresión constitutivamente en las regiones anteriores de cada segmento a partir de estadios embrionarios tempranos y en niveles similares en la parte dorsal y ventral. A pesar de que este potenciador había sido utilizado anterioremente para analizar los efectos de Antp ectópica en otros genes blanco (Ryoo *et al.*, y Shiga *et al.*, 2002) no se había determinado si Antp dirigida por éste



podría activar a *tsh*. Los resultados obtenidos muestran claramente que cuando se dirige Antp mediante el potenciador *ptc* es capaz de activar a *tsh* en las regiones anteriores de la cabeza del embrión de *Drosophila* (fig 14 B). Sin embargo, la activación ectópica de *tsh* es ligeramente menor a la que obtuvimos cuando dirigimos la expresión de Antp mediante choque térmico múltiple (comparar fig 15 B y 17 A). La activación ectópica de *tsh* mediante la expresión de Antp dirigida por choques térmicos múltiples se localizó como se esperaba en la región anterior del embrión (Röder *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 1993 y Löhr *et al.*, 2001).

Sorprendentemente, cuando dirigimos Antp<sup>AAAA</sup> mediante el potenciador del gen *ptc* ó el promotor de choque térmico no detectamos ninguna activación de *tsh* en las regiones anteriores de la cabeza del embrión, ni modificación en su expresión endógena. La presencia ectópica de Antp<sup>AAAA</sup> en la región anterior de los embriones se verificó mediante microscopía confocal-láser al detectar mediante anticuerpos contra Antp y Tsh acoplados a un fluorocromo simultáneamente (fig 18 y 20). La localización de las dos proteínas en embriones con Antp silvestre expresada ectópicamente y la falta de co-localización/activación de *tsh* por Antp<sup>AAAA</sup>, sin lugar a dudas confirmaron la falta de activación de *tsh* debido a la ausencia de YPWM en Antp. Estos resultados indican claramente que el tetrapéptido YPWM de Antp es indispensable para la activación ectópica de *tsh* durante el desarrollo embrionario. Estudios anteriores realizados con las homeoproteínas Ftz de *Drosophila* y *Tribolium*, establecieron que Ftz de *Drosophila* es incapaz de activar ectópicamente a *tsh*, en cambio Ftz de *Tribolium* sí lo activa porque ésta contiene un verdadero tetrapéptido YPWM (Löhr *et al.*, 2001). Estos estudios en conjunto establecen que en estas dos homeoproteínas es indispensable el tetrapéptido YPWM para la activación del gen blanco *tsh*.



Asimismo, nuestros resultados abren la posibilidad de que sea necesaria la formación de un heterodímero con el cofactor Exd para la regulación de *tsh*. Esto debido a que la expresión de *tsh* en embriones nulos de *Exd* (Rauskolb et al., 1994) se reduce considerablemente, y puesto que se ha comprobado que el motivo YPWM de otros homeoproteínas es un motivo de interacción con Exd (Chang et al., 1995; Johnson et al., 1995; Knoepfler y Kamps, 1995; Neuteboom et al., 1995; Phelan et al., 1995), es posible que esta falta de activación se deba a que la mutación no permitió la interacción entre estas homeoproteínas. La figura 26 muestra la expresión de Exd nuclearmente en las regiones anteriores del embrión, donde Antp expresada ectópicamente activa a *tsh* como previamente ha sido descrita por Aspland y colaboradores (1997). Considerando que la localización nuclear de Exd es dependiente de Hth (Rieckof et al., 1997) y éste es reprimido por Antp (Casares y Mann, 1997), es posible argumentar que la sobreexpresión de Antp mediante el potenciador *ptc* excluya esta interacción. Sin embargo, se ha demostrado que la sobreexpresión de Antp no altera la localización de Exd en los estadios embrionarios de *Drosophila* (Azplazu y Morata, 1997). A pesar de esto y ante la falta de ensayos moleculares en donde se establezca en definitiva la interacción entre Antp/Exd en las secuencias reguladoras de *tsh* no podríamos asegurar la interacción directa entre estas dos proteínas.

Para determinar la importancia de YPWM de Antp en la represión de los genes blanco, escogimos al gen blanco *Scr* como modelo de estudio: *Scr* normalmente se expresa durante el desarrollo embrionario temprano en los segmentos T1 mientras que *Antp* en el T2 segmento; Antp reprime su activación en el segmento T2 como se ha comprobado en embriones nulos de *Antp* en donde *Scr* se expresa en T2 (Riley et al., 1987 y Pelaz et al., 1993). Asimismo, la sobreexpresión ectópica de Antp mediante



choques térmicos reduce ligeramente la expresión de *Scr* (Gibson *et al.*, 1988). Los resultados obtenidos muestran que Antp dirigida por choque térmico no es suficiente para reprimir totalmente a *Scr* como se observa en la Figura 19. Sin embargo, cuando dirigimos Antp con el potenciador *ptc*, fue posible reprimir a *Scr* en T1 en estadios embrionarios temprano y esta represión fue más evidente en estadios avanzados (fig 20 y 22). El hecho de que Antp dirigida por *ptc* y no por choques térmicos fue capaz de reprimir a *Scr* probablemente sea debido a la expresión temprana y continua de Antp ectópica como menciona Gibson y colaboradores (1990).

Los resultados muestran además de la represión de *Scr* por Antp, una ganancia de expresión en cada uno de los segmentos donde se dirigió Antp (fig 20). Una activación similar se observó en embriones nulos de BX-C, en donde *Scr* se expresó en regiones posteriores del embrión. En tal caso la activación se debió probablemente a que Antp es capaz de prevenir la expresión de *Scr* en T2, y junto con la proteína reguladora Engrailed, es capaz de activar a *Scr* en la región posterior del embrión. Esto se debe a que Antp tiene una ganancia de expresión en los segmentos posteriores cuando el BXC está nulo (Pelaz *et al.*, 1993). Por lo que Antp pudiera tener una función dual cuando se expresa ectópicamente: la de reprimir a *Scr* en los segmentos T1 y T2, y la de activación de *Scr* en las regiones posteriores.

Cuando analizamos la expresión de *Scr* en embriones donde se dirigió Antp<sup>AAAA</sup> encontramos que no fue capaz de reprimir a *Scr* en las regiones anteriores, sin embargo permitió la activación de este gen en las regiones posteriores del embrión. En tal caso el tetrapéptido es indispensable para la represión anterior de *Scr* pero no así para la activación posterior. La regulación de la expresión de *Scr* está mediada por diversas secuencias reguladoras (Pattatucci y Kaufman, 1991; Gorman y Kaufman, 1995); por lo



que una posibilidad sería que una de estas secuencias reguladoras sea la encargada de modular la expresión de *Scr* en la región anterior, en donde Antp endógena y ectópica reprimen a *Scr*, mientras que la ganancia de activación de *Scr* en la región posterior del embrión debe estar mediada por una secuencia regulatoria diferente de la primera. En tal situación el tetrapéptido YPWM de Antp es indispensable para la represión de *Scr* en regiones anteriores, y no para la activación de las regiones posteriores. La otra posibilidad sería que Antp no reprima directamente a *Scr* y esta sea consecuencia de uno o varios intermediarios.

Por otro lado, determinamos la importancia del tetrapéptido YPWM de Antp en la activación del potenciador *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* (Canales-del Castillo 2002) mediante microscopía confocal-láser. Nuestros resultados comprueban que en efecto la mutante Antp<sup>AAAA</sup> no es capaz de activar este elemento aún y cuando se detectó la presencia de Antp en las regiones anteriores de cada segmento. Si bien este gen blanco no es nativo de Antp, ya que es una modificación de un potenciador regulado por *Scr*, este potenciador *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* es capaz de ser activado por *Scr*, Antp, Ubx y Abd-A en cooperación con Exd. Ensayos mediante mutación en los sitios de unión de Exd y experimentos *in vitro* e *in vivo* corroboraron la interacción entre Exd, Antp para la activación de *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* (Ryoo *et al.*, 1999). Los resultados en la Figura 27 muestran que la eliminación del tetrapéptido YPWM en Antp ocasiona la pérdida de activación del potenciador *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ*. Estos resultados junto con los obtenidos por Ryoo y colaboradores (1999), nos permiten postular que es a través del dominio YPWM donde se lleva a cabo la interacción entre Antp y Exd para la activación de este potenciador.



Contrario a lo descrito por McCormick y colaboradores en 1995, en donde el potenciador de *tsh* contiene los elementos de respuesta homeótica para las homeoproteínas Antp, Ubx y Abd-A, nuestros resultados indican que se requieren de otras secuencias para la regulación del gen *tsh*. La expresión ectópica de Antp y Antp<sup>AAAA</sup> dirigidas por el potenciador *ptc* fueron capaces de activar a este potenciador *tsh* en regiones anteriores de la cabeza de *Drosophila* (fig 28). Estos resultados difieren de los descritos previamente cuando se analizó la regulación del gen *tsh* directamente mediante la inmunolocalización de la proteína Tsh en embriones de *Drosophila*. Este potenciador del gen *tsh* no mostró la misma función detectada en la expresión de *tsh* probablemente por requerir otras regiones de regulación como potenciador y/o promotor que en conjunto podrían modular integralmente la expresión del gen *tsh*.





### 13. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

- El dominio YPWM de Antp es necesario para la activación del gen blanco *tsh* en regiones anteriores de *D. melanogaster*.
- El dominio YPWM es indispensable para la represión de *Scr* en las regiones anteriores del embrión.
- La activación ectópica del elemento de la region reguladora *fkh[250<sup>con</sup>]-lacZ* es dependiente del tetrapéptido YPWM de Antp.
- La activación ectópica de la regiones reguladoras de *tsh-lacZ* y la posterior de *Scr* no mostraron ser dependientes de este motivo YPWM.

Nuestros resultado, a diferencia de los ya reportados para la homeoproteína Ubx (Carroll, *et al* 2002 y Sprecher *et al.*, 2004), demuestran que este dominio es indispensable para la actividad funcional de Antennapedia en la regulación de sus genes blanco.

El mecanismo mediante el cual el tetrapéptido es necesario para que Antp regule sus genes blancos podría explicarse de dos formas: En un modelo en donde la interacción a través del tetrapéptido con un cofactor modifique la afinidad de unión al ADN y de tal manera se seleccionen los genes blancos. El cofactor podría ser Exd u otra proteína, que requiera sitios de unión al ADN. En el segundo modelo la interacción con



un cofactor podría modificar la actividad transregulatoria de Antp de activador → represor ó viceversa.

Recientemente, se demostró que el tetrapeptido YPWM de Antp es un motivo de interacción con proteínas de la maquinaria transcripcional como es el caso de TAF<sub>II</sub> 155 (Prince *et al.*, 2005). De esta manera el tetrapéptido se asemeja a un dominio que puede interactuar con una gran batería de proteínas dependiendo de: la concentración de proteínas presentes, el gen blanco a regular y el contexto del desarrollo. Por lo que es necesario, como perspectiva del trabajo, caracterizar la función del tetrapéptido de YPWM de Antp en otros genes blanco, como *apterous* y *cnn* en distintas fases del desarrollo, así como la identificación y descripción funcional de otros dominios de Antp conservados en diferentes especies (Walldorf *et al.*, 2000) que pudieran actuar sinérgicamente o antagónicamente con YPWM.



## 14. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y.-H. C., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor Miklos, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H.-J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., Pablos, B. d., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M.-H., Ibegwam, C., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Alonso, C., Maxton-Kuechenmei, J. and Akam, M. (2001). Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol* 11(18): 1473-8.
- Andrew, D. J. (1998). Regulation and Formation of the *Drosophila* Salivary Glands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 842(1): 55-69.
- Aspland, S. and R. White (1997). Nucleocytoplasmic localisation of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in *Drosophila*." *Development* 124(3): 741-747.
- Azpiazu, N. and G. Morata (1998). Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes." *Genes & Dev.* 12(2): 261-273.



Bateson W. Materials for the study of variation. 1894. London. Macmillan

Beachy PA, J Varkey, KE Young, DP von Kessler, BI Sun, and SC Ekker (1993). Cooperative binding of an Ultrabithorax homeodomain protein to nearby and distant ADN sites Mol. Cell. Biol. 13: 6941 - 6956.

Beachy, P., Krasnow, M., Gavis, E. and Hogness, D. (1988). An Ultrabithorax protein binds sequences near its own and the Antennapedia P1 promoters. Cell 55(6): 1069-81.

Bender, W., Spierer, P. and Hogness, D.. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate ADN from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol 168(1): 17-33.

Berry, M. and W. Gehring (2000). Phosphorylation status of the SCR homeodomain determines its functional activity: essential role for protein phosphatase 2A,B'. EMBO J. 19(12): 2946-2957.

Bhojwani, J., Shashidhara, L. S. and Sinha, P. (1997). Requirement of *teashirt (tsh)* during cell fate specification in developing head structures in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 207, 137-146.

Bienz, M. and G. Tremml (1988). "Domain of Ultrabithorax expression in *Drosophila* visceral mesoderm from autoregulation and exclusion." Nature 333(6173): 576-8.

Hart, K. and M. Bienz (1996). A test for cell autonomy, based on di-cistronic messenger translation. Development 122: 747 - 751.

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

Biggin, M. and R. Tjian (1989). Transcription factors and the control of *Drosophila* development. Trends Genet 5(11): 377-83.



Botas, J. (1993). Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr Opin Cell Biol* 5(6): 1015-22.

Bourgouin, C., Lundgren, S. and Thomas, J. (1992). Apterous is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9(3): 549-61.

Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). Targeted expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.

Bridges, C. B. and T. H. Morgan (1923). The third chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst. Wash. Pub*: 327-93.

Burglin, T. R. (1995). The evolution of homeobox genes. *Biodiversity and evolution*. The national science museum foundation, Tokyo: 291-336.

Canales del-Castillo, R. (2002) Análisis molecular y funcional del tetrapéptido YPWM en antenapedia en el estadio larvario de *D. melanogaster*

Courey, A.J. and Tjian, R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55: 887-98.

Capovilla, M., Kambris, Z. & Botas, J. (2001). Direct regulation of the muscle-identity gene apterous by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development* 128(8): 1221-1230.

Cárdenas-Chávez, D. (2003). Análisis de la Represión Transcripcional in vitro del Tetrapéptido YPWM de Antenapedia. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L

Carroll, S., Laymon, R., McCutcheon, M., Riley, P. & Scott, M. (1986). The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* embryos. *Cell* 47(1): 113-22.

Carroll S., J. K. G. and S. D. W. (2001). From ADN to diverstiy: Molecular genetics and the evolution of animal design. Malden, Blackwell



- Casares, F. and R. Mann (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392(6677): 723-6.
- Casares, F. and R. S. Mann (2001). The Ground State of the Ventral Appendage in *Drosophila*. *Science* 293(5534): 1477-1480.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. & Akam, M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* 120(7): 1983-1995.
- Chan, S.-K. and R. S. Mann (1996). A structural model for a homeotic protein-extradenticle-ADN complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer. *PNAS* 93(11): 5223-5228.
- Chang, C., Shen, W., Rozenfeld, S., Lawrence, H., Largman, C. and Cleary, M. (1995). PBX proteins display hexapeptide-dependent cooperative ADN binding with a subset of Hox proteins. *Genes & Dev.* 9(6): 663-674.
- Chouinard, S. and T. Kaufman (1991). Control of expression of the homeotic labial (lab) locus of *Drosophila melanogaster*: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development* 113(4): 1267-1280.
- Cimborra, D. and S. Sakonju (1995). *Drosophila* midgut morphogenesis requires the function of the segmentation gene odd-paired. *Dev Biol* 169(2): 580-95.
- Core, N., Charroux, B., McCormick, A., Vola, C., Fasano, L., Scott, M. & Kerridge, S. (1997). Transcriptional regulation of the *Drosophila* homeotic gene teashirt by the homeodomain protein Fushi tarazu. *Mech Dev* 68(1-2): 157-72.
- Desplan, C., Theis, J. & O'Farrell, P. The sequence specificity of homeodomain-ADN interaction. *Cell* 54(7): 1081-90.
- Devenport, M., C. Blass, *et al.* (2000). "Characterization of the Hox gene cluster in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*." *Evol Dev* 2(6): 326-39.
- Diaz-Benjumea, F. and S. Cohen (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75(4): 741-52.



- Dong, J. and H. Krause (1999). Tissue-specific requirements for a phosphorylation site in the Fushi tarazu homeodomain. *Dev Genes Evol* 209(7): 427-31.
- Duboule, D. (1994). Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev Suppl*: 135-42.
- Duboule, D. and P. Dolle (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8(5): 1497-1505.
- Duncan, I. M. (1982). Polycomb like: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 102(1): 49-70.
- Ekker, S., Young, K., von Kessler, D. and Beachy, P. (1991). Optimal ADN sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *EMBO J.* 10(5): 1179-1186.
- Enright, A., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5(1): R1.
- Fasano, L., Roder, L., Core, N., Alexandre, E., Vola, C., Jacq, B. and Kerridge, S. (1991). The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* 64(1): 63-79.
- Ferrier, D. and C. Minguillon (2003). Evolution of the Hox/ParaHox gene clusters. *Int J Dev Biol* 47(7-8): 605-11.
- Follette, P. J., and O'Farrell, P. H. (1997). Connecting cell behavior to patterning: lessons from the cell cycle. *Cell* 88, 309-14.
- Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S. and Gehring, W. (1993). Functional Specificity of the Antennapedia Homeodomain. *PNAS* 90(13): 6360-6364.



- Galant, R., Walsh, C. M. and Carroll, S. B. (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development* 129(13): 3115-3126.
- Garber, R. L., Kuroiwa, A. and Gehring, W.J. (1983). Genomic and cADN clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. *EMBO J.*(2): 2027-36.
- Garcia-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* 0(29): 161-82.
- Gehring, W., Qian, Y., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wuthrich, K. (1994). Homeodomain-ADN recognition. *Cell* 78(2): 211-23.
- Gibson, G. and W. Gehring (1988). Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during *Drosophila* development. *Development* 102(4): 657-675.
- Gibson, G., Schier, A., LeMotte, P. and Gehring, W. (1990). The specificities of Sex combs reduced and Antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain. *Cell* 62(6): 1087-103.
- Gilbert, F. S. (2003). *Developmental Biology*. Séptima edición. USA. Sinauer. Capitulo 9.
- Gorman, M. J. and T. C. Kaufman (1995). Genetic Analysis of Embryonic cis-Acting Regulatory Elements of the *Drosophila* Homeotic Gene Sex combs reduced. *Genetics* 140(2): 557-572.
- Graba, Y., Aragnol, D. and Pradel, J. (1997). *Drosophila* Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19(5): 379-88.
- Green, N. C., Rambaldi, I., Teakles, J. and Featherstone, M. S. (1998). A Conserved C-terminal Domain in PBX Increases ADN Binding by the PBX Homeodomain and Is Not a Primary Site of Contact for the YPWM Motif of HoxA1. *J. Biol. Chem.* 273(21): 13273-13279.





- Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. (1984). Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 307(5948): 287-9.
- Han, K., Levine, M.S., Manley, J.L. (1989). Synergistic activation and repression of transcription by *Drosophila* homeobox proteins. *Cell* 56, 573–583.
- Hart, K. and M. Bienz (1996). A test for cell autonomy, based on di-cistronic messenger translation. *Development* 122(3): 747-751.
- Hayward, D., Patel, N., Rehm, E., Goodman, C. and Ball, E. (1995). Sequence and expression of grasshopper antennapedia: comparison to *Drosophila*. *Dev Biol* 172(2): 452-65.
- Heuer, J., Li, K. and Kaufman, T. (1995). The *Drosophila* homeotic target gene centrosomin (cnn) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* 121(11): 3861-3876.
- Hobert, O. and H. Westphal (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet* 16(2): 75-83.
- Hoey, T. and M. Levine (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar ADN sequences in *Drosophila*. *Nature* 332(6167): 858-61.
- Hombria, J. and B. Lovegrove (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 71(8): 461-76.
- Jacobs, Y., Schnabel, C. A. and Cleary, M. L. (1999). Trimeric Association of Hox and TALE Homeodomain Proteins Mediates Hoxb2 Hindbrain Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.* 19(7): 5134-5142.
- Jaffe, L., Ryoo, H. and Mann, R. (1997). A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 11(10): 1327-1340.
- Jaynes, J. and P. O'Farrell (1988). Activation and repression of transcription by homoeodomain-containing proteins that bind a common site. *Nature* 336(6201): 744-9.



- Johnson, F., Parker, E. and Krasnow, M. (1995). Extradenticle Protein is a Selective Cofactor for the *Drosophila* Homeotics: Role of the Homeodomain and YPWM Amino Acid Motif in the Interaction. *PNAS* 92(3): 739-743.
- Jurgens, G. (1985). A group of genes controlling spatial expression of the bithorax complex of *Drosophila*. *Nature* 316: 1533-1535.
- Kalionis, B., O'Farrell, P.H. 1993. A universal target sequence is bound in vitro by diverse homeodomains. *Mech. Dev.* 43, 57-70.
- Knoepfler, P., Lu, Q. and Kamps, M. (1996). PBX-1 Hox heterodimers bind ADN on inseparable half-sites that permit intrinsic ADN binding specificity of the Hox partner at nucleotides 3' to a TAAT motif. *Nucleic Acids Res.* 24(12): 2288-2294.
- Krasnow, M., Saffman, E., Kornfeld, K. and Hogness, D. (1989). Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* 57(6): 1031-43.
- Kuroiwa, A., Hafen, E. and Gehring, W. (1984). Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene fushi tarazu of *Drosophila*. *Cell* 37(3): 825-31.
- Kuziora, M. and W. McGinnis (1988). Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell* 55(3): 477-85.
- Lamka, M., Boulet, A. and Sakonju, S. (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* 116(4): 841-854.
- LaRonde-LeBlanc, N. A. and C. Wolberger (2003). Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to ADN: Hox hexapeptide and ADN recognition anterior to posterior. *Genes & Dev.* 17(16): 2060-2072.
- Laughon, A. and M. Scott (1984). Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with ADN-binding proteins. *Nature* 310(5972): 25-31.



- Lawrence, H., Stage, K., Mathews, C., Detmer, K., Scibienski, R., MacKenzie, M., Migliaccio, E., Boncinelli, E. and Largman, C. (1993). Expression of HOX C homeobox genes in lymphoid cells. *Cell Growth Differ.* 4(8): 665-669.
- LeCalvez, J. (1948). Mutation Aristapedia, hétérozygote dominante, homozygote lethal chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. France Belg.*(82): 97-113.
- Levine, M., Rubin, G. and Tjian, R. (1984). Human ADN sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38(3): 667-73.
- Lewis, E. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276(5688): 565-70.
- Lewis, E. B. (1963). Genes and developmental pathways. *Am. Zool.*(3): 33-56.
- Lewis, R. (2000). A Brief History of *Drosophila's* Contributions to Genome Research.
- Liu Y, Raymond J. MacDonald, and Galvin H. Swift. (2001). ADN Binding and Transcriptional Activation by a PDX1·PBX1b·MEIS2b Trimer and Cooperation with a Pancreas-specific Basic Helix-Loop-Helix Complex. *J. Biol. Chem.* 276: 17985 – 17993
- Lohr, U., Yussa, M. and Pick, L. (2001). *Drosophila fushi tarazu*. a gene on the border of homeotic function. *Curr Biol* 11(18): 1403-12.
- Lopez, A. and D. Hogness (1991). Immunochemical Dissection of the Ultrabithorax Homeoprotein Family in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 88(22): 9924-9928.
- Manak, J., Mathies, L. and Scott, M. (1994). Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development* 120(12): 3605-3619.
- Mann, R. and S. Chan (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* 12(7): 258-62.



- Mann, R. and G. Morata (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 243-71.
- Mansfield, J., Harfe, B., Nissen, R., Obenauer, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A., Ruvkun, G., Sharp, P., Tabin, C. and McManus, M (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36(10): 1079-83.
- Mastick, G. S., *et al.* (1995). Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of Ultrabithorax protein-binding sites in yeast. *Genetics* 139: 349-363
- Mathies, L., Kerridge, S. and Scott, M.. (1994). Role of the teashirt gene in *Drosophila* midgut morphogenesis: secreted proteins mediate the action of homeotic genes. *Development* 120(10): 2799-2809.
- McCormick, A., Core, N., Kerridge, S. and Scott, M. (1995). Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene. *Development* 121(9): 2799-2812.
- McGinnis, W., Garber, R., Wirz, J., Kuroiwa, A. and Gehring, W. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37(2): 403-8.
- McGinnis, W., Hart, C., Gehring, W. and Ruddle, F. (1984). Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse ADN sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38(3): 675-80.
- Medina-Martinez, O. and R. Ramirez-Solis (2003). In vivo mutagenesis of the Hoxb8 hexapeptide domain leads to dominant homeotic transformations that mimic the loss-of-function mutations in genes of the Hoxb cluster. *Dev Biol* 264(1): 77-90.
- Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Berenger, H., Pradel, J. and Graba, Y. (2003). The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell* 4(5): 761-8.



- Meyer, A. and M. Scharf (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 11(6): 699-704.
- Miller, D., Rogers, B., Kalkbrenner, A., Hamilton, B., Holtzman, S. and Kaufman, T. (2001). Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mech Dev* 102(1-2): 3-16.
- Muller, J., Gaunt, S. and Lawrence, P. (1995). Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 121(9): 2847-2852.
- Nakamura, T., Jenkins, N. and Copeland, N. (1996). Identification of a new family of PBX-related homeobox genes. *Oncogene* 13(10): 2235-42.
- Nasiadka, A., Dietrich, B. H. and Krause, H. M. (2002). Anterior-posterior patterning in the *Drosophila* embryo. *Advances in Developmental Biology and Biochemistry* 12: 155-204.
- Neuteboom, S., Peltenburg, L., van Dijk, M. and Murre, C. (1995). The Hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is Required for Cooperative ADN Binding with Pbx1 and Pbx2 Proteins. *PNAS* 92(20): 9166-9170.
- Ornitz, D. M., Moreadith, R. W. and Leder, P. (1991). Binary system for regulating transgene expression in mice targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 698-702.
- Otting, G., Qian, Y., Billeter, M., Muller, M., Affolter, M., Gehring, W. and Wuthrich, K. (1990). Protein-ADN contacts in the structure of a homeodomain-ADN complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* 9(10): 3085-3092.
- Panzer, S., Weigel, D. and Beckendorf, S. (1992). Organogenesis in *Drosophila melanogaster*: embryonic salivary gland determination is controlled by homeotic and dorsoventral patterning genes. *Development* 114(1): 49-57.
- Passner, J., Ryoo, H., Shen, L., Mann, R. and Aggarwal, A. (1999). Structure of a ADN-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature* 397(6721): 714-9.



- Patel, N. and V. Prince (2000). Beyond the Hox complex. *Genome Biol* 1(5):1027.
- Pattatucci, A. M. and T. C. Kaufman (1991). The Homeotic Gene *Sex combs reduced* of *Drosophila melanogaster* Is Differentially Regulated in the Embryonic and Imaginal Stages of Development. *Genetics* 129(2): 443-461.
- Peifer, M. and E. Wieschaus (1990). Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes & Dev.* 4(7): 1209-1223.
- Pelaz, S., Urquia, N. and Morata, G. (1993). Normal and ectopic domains of the homeotic gene *Sex combs reduced* of *Drosophila*. *Development* 117(3): 917-923.
- Peltenburg, L. and C. Murre (1997). Specific residues in the PBX homeodomain differentially modulate the ADN-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* 124(5): 1089-1098.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M. and Semeriva, M. (2004). *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Dev Biol* 272(2): 419-31.
- Phelan, M., Rambaldi, I. and Featherstone, M. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* 15(8): 3989-3997.
- Phelan, M. L. and M. S. Featherstone (1997). Distinct HOX N-terminal Arm Residues Are Responsible for Specificity of ADN Recognition by HOX Monomers and HOX-PBX Heterodimers. *J. Biol. Chem.* 272(13): 8635-8643.
- Piper, D., Batchelor, A., Chang, C., Cleary, M. and Wolberger, C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to ADN: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96(4): 587-97.
- Postlethwait, J.H. (1978). Development of cuticular patterns in legs of a cell lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archiv.* 185:37-57



- Prince, F., Katsuyama, T., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S. and Gehring, W. (2004). The YPWM-motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Enviado a Development*.
- Qian, Y., Billeter, M., Otting, G., Muller, M., Gehring, W. and Wuthrich, K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59(3): 573-80.
- Qian, Y., Furukubo-Tokunaga, K., Resendez-Perez, D., Muller, M., Gehring, W. & Wuthrich, K. (1994). Nuclear magnetic resonance solution structure of the fushi tarazu homeodomain from *Drosophila* and comparison with the Antennapedia homeodomain. *J Mol Biol* 238(3): 333-45.
- Qian, Y., Resendez-Perez, D., Gehring, W. and Wuthrich, K. (1994). The Des(1-6)Antennapedia Homeodomain: Comparison of the NMR Solution Structure and the ADN-Binding Affinity with the Intact Antennapedia Homeodomain. *PNAS* 91(9): 4091-4095.
- Qian, Y. Q., Otting G., Furukubo-Tokunaga K., Affolter M., Gehring W.J. and Wuthrich K. (1992). 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.* 89: 10738-42.
- Rauskolb, C. and E. Wieschaus (1994). Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *EMBO J.* 13(15): 3561-3569.
- Remacle, S., Abbas, L., De Backer, O., Pacico, N., Gavalas, A., Gofflot, F., Picard, J. J. and Rezsohazy, R. (2004). Loss of Function but No Gain of Function Caused by Amino Acid Substitutions in the Hexapeptide of HoxA1 In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24(19): 8567-8575.
- Rieckhof, G., Casares, F., Ryoo, H., Abu-Shaar, M. and Mann, R. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91(2): 171-83.
- Riley, P., Carroll, S. and Scott, M. (1987). The expression and regulation of Sex combs reduced protein in *Drosophila* embryos. *Genes & Dev.* 1(7): 716-730.



- Roder, L., Vola, C. and Kerridge, S. (1992). The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development* 115(4): 1017-1033.
- Ryoo, H., Marty, T., Casares, F., Affolter, M. and Mann, R. (1999). Regulation of Hox target genes by a ADN bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* 126(22): 5137-5148.
- Scheer, N. and J. A. Campos-Ortega (1999). Use of the GAL4/UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev* 80: 153-158.
- Schneuwly, S., Klemenz, R. and Gehring, W. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia. *Nature* 325(6107): 816-8.
- Schumacher, A., Faust, C. and Magnuson, T. (1996). Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice. *Nature* 384(6610): 648.
- Shanmugam, K., Featherstone, M. S. and Saragovi, H. U. (1997). Residues Flanking the HOX YPWM Motif Contribute to Cooperative Interactions with PBX. *J. Biol. Chem.* 272(30): 19081-19087.
- Shiga, Y., Yasumoto, R., Yamagata, H. and Hayashi, S. (2002). Evolving role of Antennapedia protein in arthropod limb patterning. *Development* 129(15): 3555-3561.
- Soanes, K. and J. Bell (2001). The *Drosophila aeroplane* mutant is caused by an I-element insertion into a tissue-specific teashirt enhancer motif. *Genome* 44(5): 919-28.
- Soto, M. C., Chou, T. B. and Bender, W. (1995). Comparison of Germline Mosaics of Genes in the Polycomb Group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140(1): 231-243.
- Sprecher, S., Muller, M., Kammermeier, L., Miller, D., Kaufman, T., Reichert, H. and Hirth, F. (2004). Hox gene cross-regulatory interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mech Dev* 121(6): 527-36.





- Sprules, T., Green, N., Featherstone, M. and Gehring, K. (2000). Conformational changes in the PBX homeodomain and C-terminal extension upon binding ADN and HOX-derived YPWM peptides. *Biochemistry* 39(32): 9943-50.
- Struhl, G. (1981). A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature* 293(5827): 36-41.
- Struhl, G. and M. Akam (1985). Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of *Drosophila*. *EMBO J.* 4(12): 3259-3264.
- Struhl, G. and R. White (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* 43(2 Pt 1): 507-19.
- Sullivan, W., Ashburner, M. and R, S (2000). *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
- Thali, M., Muller, M., DeLorenzi, M., Matthias, P. and Bienz, M. (1988). *Drosophila* homoeotic genes encode transcriptional activators similar to mammalian OTF-2. *Nature* 336(6199): 598-601.
- Tremml, G. and M. Bienz (1992). Induction of labial expression in the *Drosophila* endoderm: response elements for dpp signalling and for autoregulation. *Development* 116(2): 447-456.
- Tudge, C. (2000). *The variety of life*. Primera edición. Oxford Press. New York. Capitulo 10.
- Villanueva-Segura, O.K. (2004). Modulación de la Represión Transcripcional de Antennapedia con el motivo WRPW en cultivo celular. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.
- Stroehel VL, J. G., and Garber RL (1988). Alternative RNA splicing that is spatially regulated: generation of transcripts from the Antennapedia gene of *Drosophila melanogaster* with different protein-coding regions. *Mol. Cell. Biol* 8(10): 4143-54.



- Wakimoto, B. and T. Kaufman (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 81(1): 51-64.
- Walldorf, U., Binner, P. and Fleig, R. (2000). Hox genes in the honey bee *Apis mellifera*. *Dev Genes Evol* 210(10): 483-92.
- Wiellette, E. and W. McGinnis. (1999). Hox genes differentially regulate Serrate to generate segment-specific structures. *Development* 126(9): 1985-1995.
- Wirtz, J., Fessler, L. I., Gehring, W.J. (1986). Localization of the Antennapedia protein in *Drosophila* embryos and imaginal discs. *EMBO J.* 12, 3327-3334.
- Winslow, G.M., Hayashi, S. , Krasnow, M. , Hogness, D.S. and Scott, M.P. (1989) Transcriptional activation by the *Antennapedia* and *fushi tarazu* proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell*, **57**, 1017-1030
- Yanze, N., Spring, J., Schmidli, C. and Schmid, V. (2001). Conservation of Hox/ParaHox-related genes in the early development of a cnidarian. *Dev Biol* 236(1): 89-98.
- Yekta, S., Shih, I.-h. and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304(5670): 594-596.
- Zeng, W., Andrew, D., Mathies, L., Horner, M. and Scott, M. (1993). Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development* 118(2): 339-352.
- Zhao, Y. and S. S. Potter (2001). Functional specificity of the HoxA13 homeobox. *Development* 128(16): 3197-3207.



## 15. APÉNDICE

**Preparación de comida estándar para *Drosophila melanogaster*.** En un litro de agua destilada disolver 100g de levadura (comercial) por 10 min mediante agitación. Añadir 13.75g de agar (Labscientific) y esperar a que se disuelva por aproximadamente 10 min mediante agitación. Agregar 100g de azúcar morena (comercial) y esperar a que se disuelva por aproximadamente 10 min en agitación. Añadir 50g de harina de maíz (comercial) y disolver por 10 min. Calentar a ebullición durante 15 min, esperar a que la temperatura baje entre 55 y 60°C y disolver 10g de propionato de sodio (comercial) en agitación por 10 min. Servir el alimento en viales ó frascos y esperar a que solidifique por 45 min. Espolvorear sobre la superficie levadura seca activa granulada y almacenar a 18°C por un lapso no mayor de una semana.

**Preparación de placas de puesta para *Drosophila melanogaster*.** Disolver mediante agitación 8.5g de agar (Labscientific Livingstone) en 300mL de agua destilada. Agregar 5g de azúcar morena (comercial) y disolver. Calentamiento a ebullición. Se deja de 55°C a 60°C y se agregan 100mL de jugo de uva (comercial) y 4g de propionato de sodio (comercial). Mezclar bien todos los componentes y servir en cajas petri de plástico pequeñas. Esperar a que solidifique, tapan y almacenar a 4°C por no más de una semana.



**NaCl al 0.4% y Tritón X-100 al 0.1%.** Pesar 0.4g de NaCl en 800mL de agua destilada, agregar 100µL de Tritón X-100 y aforar a 1000mL con agua destilada.

**Buffer PIPES pH 6.9 0.1 M.** Pesar EGTA 0.4683g (2mM), MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0.2464g (1mM) y PIPES en 90mL de agua destilada ajustar el pH 6.9 con HCl concentrado y aforar a 1 litro.

**Buffer de Fosfatos Salino (PBS).** Pesar, disolver, aforar en un litro de agua destilada y esterilizar mediante autoclave 200.0g de NaCl, 5.0g de KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de 5.0g y 27.8g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**PBS + Tritón X-100 0.1% (PBT 0.1%).** Disolver por agitación 50µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en 40ml de PBS y aforar a 50ml con PBS.

**PBT 0.1% + Albúmina Sérica Bovina 1%.** Disolver por agitación 1000µL de Triton X-100 en 0.01g de Albúmina Sérica Bovina (BSA Molecular Probes) y disolver. Esta solución se debe preparar al momento y no se debe almacenar más de un día a 4°C.

**PBT 0.1% + Albúmina Sérica Bovina 10%.** Disolver por agitación 1000µL de Triton PBT X-100 en 0.1g de albúmina sérica bovina (BSA) y disolver. Esta solución se debe preparar al momento y no se debe almacenar más de un día a 4°C.



**PBS + Tween 20 0.05%.** Disolver por agitación 25 $\mu$ L de Tween20 en 45mL de PBS 1X y aforar a 50mL con PBS.