



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Caracterización de la interacción entre el factor de transcripción FoxP1 y su ADN blanco.

Memoria de título para optar al título de Bioquímico

Autor: Joaquín A. Hinojosa Soto
Profesor director: Dr. Exequiel Medina
Profesor patrocinante: Dr. Mauricio Baez

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Exequiel Medina por haberme recibido con los brazos abiertos en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Su confianza en mi capacidad y disposición para guiarme en el desafiante mundo de las ciencias han dejado una marca imborrable en mi trayectoria como investigador. Siempre estaré agradecido por su gran compromiso profesional y académico, así como por el constante apoyo y orientación. Su mentoría ha sido fundamental para mi desarrollo como profesional, y espero poder transmitir esa misma dedicación a nuevos científicos en un futuro.

A Isabel Asela, mi sincero agradecimiento por estar a mi lado desde el primer día en el laboratorio, guiándome a través de los procedimientos experimentales esenciales para este proyecto. La paciencia y disposición que ha tenido han sido invaluable, y le agradezco de todo corazón. También, a mis compañeros del laboratorio, gracias por ser científicos brillantes pero, sobre todo, excelentes personas. Su compañerismo y el ambiente amistad que hemos compartido han enriquecido mi aprendizaje y experiencia en el laboratorio enormemente.

A mi familia, mamá, papá, Diego y Pepe, les agradezco por introducirme desde pequeño al cautivante mundo de la naturaleza. Su apoyo incondicional y valores me han guiado hasta aquí. Desde ahora convertiré esa noble energía en descubrimientos fascinantes y soluciones para la vida de las personas.

A Ester, mi compañera de principio a fin, gracias por tu sabio consejo y sincero amor, fundamentales en cada paso de este camino. Estoy agradecido por vernos crecer juntos y compartir la realización de nuestros sueños *rume piwkeyeyu*.

Finalmente agradezco a mi tremenda red de apoyo, partiendo por una familia diversa que se extiende desde Santiago hasta Australia, gracias por brindarme contención y cariño en todo momento. También, a mis amigas y amigos, guardo una admiración y cariño especial por cada uno de ustedes, les agradezco por formar parte de este hermoso espacio donde todos podemos ser y amarnos por quienes somos.

Mi corazón está lleno de gratitud hacia cada uno de ustedes. Juntos hemos construido un camino lleno de aprendizaje, celebraciones y momentos inolvidables.

Con aprecio,

Joaquín Antonio Hinojosa Soto.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	1
1.2 DESORDEN INTRÍNSECO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	1
1.3 FAMILIA FOX DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	2
1.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FOX P	2
1.5 DOMINIO QRICH	4
1.6 FOX P1 COMO MODELO DE ESTUDIO	5
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 CEPAS UTILIZADAS	9
4.2 CONDICIONES DE CULTIVO	9
4.3 COLUMNAS DE AFINIDAD A NÍQUEL HISTRAP™	9
4.4 ADN-LIGANDO	10
4.5 ADN-HORQUILLA	10
4.6 PURIFICACIÓN FOX P1	11
4.7 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	12
4.8 ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	12
4.9 CURVA DE UNIÓN FOX P1-ADN	13
4.10 ENSAYOS DE CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	13
4.11 DESCRIPCIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA-ADN	13
4.12 ANÁLISIS DE LA CURVA DE UNIÓN A ADN	14
5. RESULTADOS	16
5.1 PURIFICACIÓN DE FOX P1	16
5.2 PROPIEDADES DE DIMERIZACIÓN DE FOX P1	16
5.3 DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE FOX P1 CON EL ADN	18
5.4 EVIDENCIAS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA-ADN PARA FOX P1 Y FOX P1ΔQRICH	19
5.5 PURIFICACIÓN DE ADN-HORQUILLA	20
5.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FOX P1 PARA LA FORMACIÓN DE HORQUILLAS DE ADN	22
5.7 FORMACIÓN DE HORQUILLAS	24
6. DISCUSIÓN	29
6.1 ESTADO OLIGOMÉRICO DE FOX P1	29
6.2 AFINIDAD DE FOX P1 POR EL ADN	29
6.3 CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS MOLECULARES FOX P1-ADN	32
6.4 FORMACIÓN DE HORQUILLAS	33
7. CONCLUSIONES	39
8. BIBLIOGRAFÍA	40

Índice de tablas y figuras

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN TOPOLÓGICA DE FoxP1:	4
FIGURA 2. UNIÓN DEL ADN BLANCO A FoxP1:	6
FIGURA 3. PURIFICACIÓN DE FoxP1:	16
FIGURA 4. PROPIEDADES DE DIMERIZACIÓN DE FoxP1:	17
FIGURA 5. ANÁLISIS DE DATOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA:	19
FIGURA 6. ESTUDIOS DE CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% PARA ANÁLISIS DE AFINIDAD DE FoxP1 Y FoxP1 Δ QRICH CON EL ADN-LIGANDO:	20
FIGURA 7. DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PUC-HORQUILLA PARA OBTENCIÓN DE ADN-HORQUILLA Y ADN- Δ HORQUILLA:	21
FIGURA 8. EMSA EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%:	24
FIGURA 9. EMSA EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%:	26
FIGURA 10. EMSA EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%:	28
FIGURA 11. VÍAS DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO FoxP1-ADN:	35

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BME: beta-mercaptoetanol

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EMSA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

FKH: Dominio Forkhead de FoxP1

FKH(A39P): Mutante no dimerizante del dominio Forkhead de unión al ADN de FoxP1

FT: Factores de transcripción

FoxP1 Δ Qrich: Mutante de eliminación de FoxP1, el segmento eliminado corresponde a la región N' terminal de la proteína incluyendo al dominio Qrich

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanol sulfonato

IDRs: Regiones intrínsecamente desordenadas, de sus siglas en inglés *intrinsically diordered regions*

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

K_D: Constante de disociación de FoxP1

K_(0,5): Constante de disociación observada para FoxP1 Δ Qrich, donde se alcanza el 50% del cambio total

K_d: Constante de disociación del complejo FoxP1-ADN

LZ: Dominio cremallera de leucina de FoxP1

OD: Densidad óptica, por su sigla en inglés (*optical density*)

Qrich: Dominio rico en glutaminas de FoxP1

QY: Rendimiento cuántico, del inglés *quantum yield*.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio, por su sigla en inglés (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEC: Cromatografía de exclusión molecular, por su sigla en inglés (*Size exclusion chromatography*)

TAE: Tris-acetato-EDTA

TEV: Proteasa del virus del mosaico del tabaco

Resumen

Los factores de transcripción (FT) son proteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica, participando en el inicio y control de la transcripción. Una característica de los FT es que generalmente presentan en su estructura regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), lo que les permite unir a diversas regiones promotoras de sus genes blanco en diferentes contextos, posibilitando un control regulatorio complejo de los procesos de transcripción.

El FT humano FoxP1 cumple un papel fundamental en una gran diversidad de procesos fisiológicos como lo es la regulación del sistema inmune y el desarrollo embrionario. Si bien este FT ha sido parcialmente caracterizado en cuanto a la estructura y función de sus dominios cremallera de leucinas (LZ) y de unión a ADN (FKH), su dinámica de interacción con el ADN no ha sido totalmente dilucidada. En ese sentido, en este trabajo se planteó como objetivo entender el rol del dominio intrínsecamente desordenado Qrich, el cual participa en la regulación de la actividad transcripcional de otros FT, y ha sido menormente estudiado. Este alcance podría ayudar a encontrar el origen molecular de ciertas patologías asociadas a su mal funcionamiento y también aumentar el conocimiento que se tiene sobre el rol que juegan las IDRs en los factores de transcripción.

Primeramente, se analizó el estado oligomérico predominante de FoxP1 mediante cromatografía de exclusión molecular, calculando su constante de disociación para luego determinar la afinidad de FoxP1 por el ADN, a través de la anisotropía de fluorescencia, obteniendo la constante de disociación del complejo FoxP1-ADN. Tanto la formación de dímeros como la formación de complejos FoxP1-ADN resultaron ser significativamente desfavorecidos respecto a lo observado para FoxP1 Δ Qrich, dando cuenta del impacto funcional que tiene el dominio Qrich en FoxP1.

Adicionalmente, se describió la formación de complejos proteína-ADN a través de ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), analizando las diferencias entre FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich, obteniendo para el segundo complejos de alto peso molecular pero a concentraciones mayores que lo observado para la mutante Δ Qrich.

Finalmente, se determinó la capacidad de FoxP1 de acercar regiones distantes del ADN basándose en el análisis de formación de complejos tipo horquilla, utilizando un ADN de 1,6 kpb que contiene dos sitios de unión para FoxP1 en sus extremos. La formación de las horquillas fueron seguidas por los cambios topológicos provocados con respecto a la migración en su corrida electroforética, lográndose identificar una serie de complejos moleculares de diverso tamaño.

En conjunto, estos resultados dan cuenta de la capacidad de FoxP1 para unir regiones distantes del ADN y a su vez plantean la posibilidad de un mecanismo de regulación transcripcional de alta complejidad basado en la formación de condensados moleculares.

Abstract

Transcription factors (TFs) are proteins that play a crucial role in the regulation of gene expression, participating in the initiation and control of transcription. One feature of transcription factors is that they generally have intrinsically disordered regions (IDRs) in their structure, which allow them to bind to various promoter regions of their target genes in different contexts, enabling a complex regulatory control of transcription.

The human FoxP1 TF plays a key role in a wide range of physiological processes such as the regulation of the immune system and embryonic development. Although this TF has been partially characterized in terms of the structure and function of its leucine zipper (LZ) and DNA-binding (FKH) domains, its interaction dynamics with DNA have not been fully elucidated. In that sense, in this work we aimed to understand the intrinsically disordered domain Qrich, which is involved in the regulation of the transcriptional activity of other TFs, that has been less studied. This scope could help to find the molecular origin of certain pathologies associated with its malfunction and increase the knowledge of the role played by IDRs in transcription factors.

First, the preferred oligomeric state of FoxP1 was determined by size exclusion chromatography, calculating its dissociation constant, and then determining the affinity of FoxP1 for DNA through fluorescence anisotropy, obtaining the dissociation constant of the FoxP1-DNA complex. Both dimer and FoxP1-DNA complexes formation were significantly disfavored with respect to that observed for FoxP1 Δ Qrich, accounting for the functional impact that the Qrich domain has on FoxP1.

Additionally, the formation of protein-DNA complexes was described through electrophoretic mobility shift assays (EMSA), analyzing the differences between FoxP1 and FoxP1 Δ Qrich, obtaining for the latter high molecular weight complexes but at higher concentrations than what was observed for the Δ Qrich mutant. Finally, the ability of FoxP1 to contact distant regions of DNA based-on dimerization-mediated looping formation was determined using a 1.6 kbp DNA containing two binding sites for FoxP1 on its 5' and 3'. The looping formation was followed by the topological changes and its effects in the migration in the electrophoretic run. This analysis made it possible to identify a series of molecular complexes of varying sizes.

Taken together, these results demonstrate the ability of FoxP1 to bind distant regions of DNA and raise the possibility of a highly complex transcriptional regulatory mechanism based on the formation of molecular condensates.

1. Introducción

1.1 Factores de transcripción

Los factores de transcripción (FT) son proteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica, participando en el inicio y control de la transcripción, proceso mediante el cual se expresa la información genética codificada en el ADN mediante la síntesis de ARN. Estas proteínas se unen a secuencias específicas del ADN, influyendo así en el reclutamiento de la ARN polimerasa y otros componentes fundamentales de la maquinaria transcripcional en las regiones promotoras de los genes(Lambert y cols. 2018). Por otro lado, los factores de transcripción tienen características estructurales y funcionales diversas que contribuyen a su capacidad para regular la expresión génica de manera altamente específica y coordinada(Golson y Kaestner 2016a).

Estructuralmente, se caracterizan por la presencia de dominios distintivos, que les permiten llevar a cabo sus funciones regulatorias. Estos incluyen dominios de unión al ADN, dominios de activación y dominios de interacción proteína-proteína(Latchman 1997). Funcionalmente, juegan un papel crítico en orquestar redes complejas de regulación génica que gobiernan varios procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, diferenciación celular y respuesta a estímulos ambientales, pudiendo actuar como activadores o represores de la expresión génica, dependiendo del contexto específico y de la presencia de proteínas co-reguladoras o cofactores, siendo capaces de formar grandes complejos moleculares con distintos cofactores y componentes de la cromatina para una regulación de la expresión génica finamente ajustada(Darnell 2002; Kim y Shendure 2019).

1.2 Desorden intrínseco de los factores de transcripción

Una característica de los factores de transcripción es que generalmente presentan en su estructura regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), que se caracterizan por la ausencia de una estructura secundaria o terciaria estable, lo que les permite adoptar diferentes conformaciones e interactuar con una gran diversidad de componentes moleculares(Berlow, Dyson, y Wright 2015). Este desorden intrínseco permite a los factores de transcripción unirse a diversas regiones promotoras de sus genes blanco en diferentes contextos, posibilitando un control regulatorio complejo de los procesos de transcripción(Minezaki y cols. 2006).

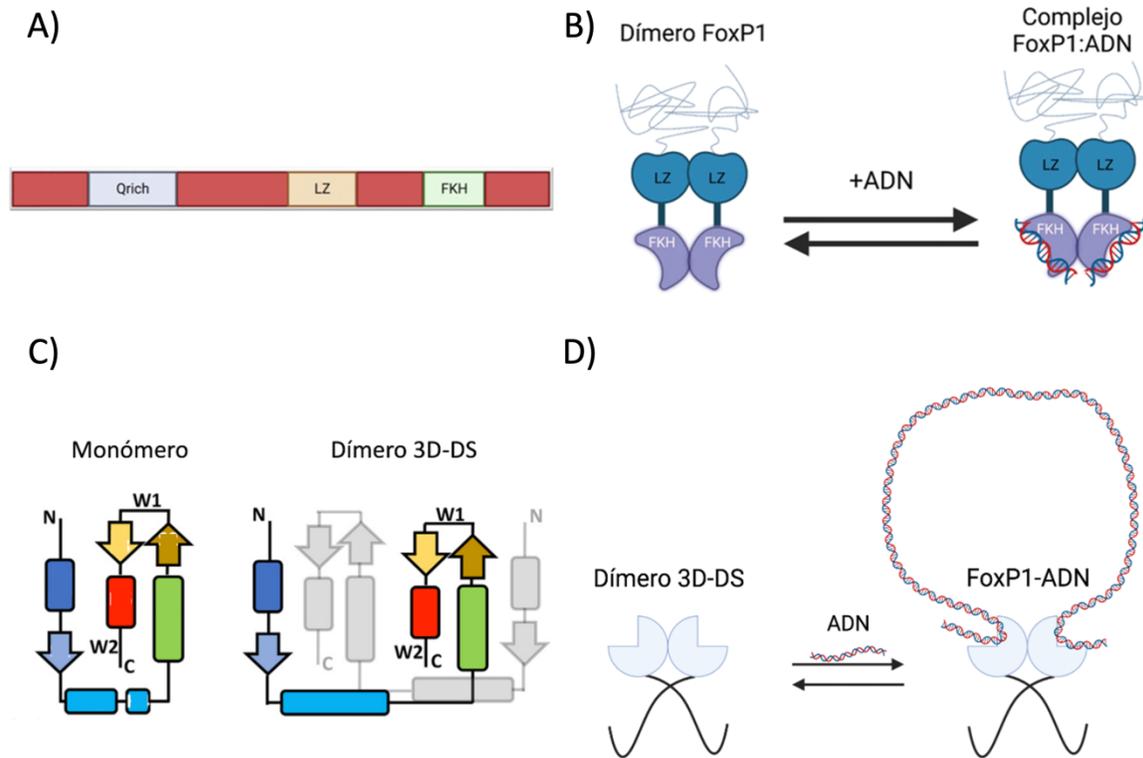
La importancia del desorden intrínseco en la regulación y modo de acción de los factores de transcripción se enfatiza aún más por el número desproporcionadamente alto de dominios intrínsecamente desordenados en proteínas involucradas en vías de señalización celular y regulación transcripcional (Garza, Ahmad, and Kumar 2009). Estas regiones desordenadas a menudo participan en el reconocimiento molecular, modificaciones proteicas e interacciones moleculares, incluida la fosforilación (Iakoucheva y cols. 2004), y la formación de condensados moleculares a través de separación de fases líquido-líquido, formando, por ejemplo, orgánulos sin membrana que compartimentalizan y concentran la maquinaria transcripcional, regulando así la expresión génica (Sabari y cols. 2018), lo que resalta su importancia funcional.

1.3 Familia Fox de factores de transcripción

En humanos, la familia de factores de transcripción Fox es un grupo grande y diverso de proteínas que participan en una amplia gama de procesos celulares, como el desarrollo, diferenciación celular, proliferación, apoptosis, metabolismo y la función inmune (Moparthi y Koch 2020). Su característica fundamental es la presencia del dominio *Forkhead*, que permite la unión al ADN. Sin embargo, existen subfamilias, las que se clasifican según el nivel de homología de sus secuencias, función, y cualidades o funciones únicas (Golson y Kaestner 2016b). Por ejemplo, los factores FoxA están involucrados en la diferenciación del tejido hepático y pancreático (Kaestner 2010; Lee y cols. 2005), mientras que los factores FoxC juegan un papel crucial en el desarrollo del tejido vascular (Seo y cols. 2006), y las FoxO participan en la regulación de la homeostasis de la glucosa, señalización de la insulina y la respuesta al daño del ADN (Bigarella y cols. 2017; Lundell y cols. 2019; Matsumoto y cols. 2007; Nakae y cols. 2001).

1.4 Factores de transcripción FoxP

Por su parte, la subfamilia FoxP incluye cuatro miembros (FoxP1-4) que participan activamente de procesos como el desarrollo celular, diferenciación neuronal y la regulación inmunitaria (Co, Anderson, y Konopka 2020; Lu, Barbi, y Pan 2017). Dentro de este grupo, FoxP1 es particularmente interesante debido a su alta expresión en tejidos, como el cerebral, pulmonar y los órganos linfoides, regulando la expresión génica tanto en el desarrollo embrionario como en tejidos adultos (Ferland y cols. 2003; Koon y cols. 2007; Shu y cols. 2007).



A nivel estructural, FoxP1 consta de 667 aminoácidos que, desde el extremo *N*-terminal, conforman los dominios (i) rico en glutaminas (Qrich), (ii) cremallera de leucina (LZ) y (iii) el de unión a ADN (FKH). Solamente los dominios LZ y FKH han sido caracterizados, y son esenciales para la dimerización de FoxP1 y para la interacción con el ADN, respectivamente (Chu y cols. 2011; B. Wang y cols. 2003) (Figura 1A). En ese sentido, se ha evidenciado que el dominio FKH aislado de estas proteínas adopta dímeros en ausencia de ADN vía intercambio de segmentos (3D-DS por sus siglas en inglés) (Exequiel Medina y cols. 2016), lo que permite a esta proteína unir dos moléculas de ADN (Figura 1B y 1C) y que ha sido relacionado al acercamiento de regiones distantes de ADN (Y. Chen y cols. 2015) (Figura 1D). En este contexto, estudios en FoxP2 han mostrado que la presencia del dominio LZ no sólo favorece significativamente la dimerización sino que además se ve favorecida la unión a ADN (Häußermann y cols. 2019; Thulo y cols. 2021). Interesantemente, el dominio FKH es capaz además de unir ADN de forma monomérica *in vitro* (Li, Weidenfeld, y Morrissey 2023; Morris y Fanucchi 2016; Stroud y cols. 2006), lo que supone un interesante y complejo mecanismo de formación del complejo FoxP1-ADN y que involucra el equilibrio monómero-dímero.

Figura 1. Representación topológica de FoxP1 y representación de la formación de complejos proteína-ADN. A) De N- a C-terminal se encuentran los dominios Qrich, LZ y FKH. B) Esquema del mecanismo de dimerización de interacción de FoxP1 con el ADN. Los dominios LZ (azul) y FKH (morado) interactúan entre sí, dimerizando y aumentando de esta manera su afinidad por el ADN. C) Esquema de dimerización de FoxP1 mediante su mecanismo de intercambio de segmentos (3D-DS) (modificado de (Medina y cols. 2020) D. Mecanismo de interacción del dímero (3D-DS) de FoxP1 con el ADN, ilustrando como mediante este mecanismo de dimerización se estaría facilitando el acercamiento de regiones distantes del ADN.

1.5 Dominio Qrich

El dominio Qrich de FoxP1 posee aproximadamente 140 residuos y ha sido descrito como intrínsecamente desordenado. Este dominio se ubica en el extremo N-terminal de la proteína y que se caracteriza por estar enriquecido en glutaminas (Chu y cols. 2011; 2016, 63). A diferencia de los dominios LZ y FKH, no presenta un alto porcentaje de conservación variando tanto en tamaño como en el patrón de distribución de los residuos de glutaminas entre las distintas proteínas de la subfamilia FoxP (Chu y cols. 2011; 2016, 63). El dominio Qrich se encuentra presente también en otros FT eucariontes donde se ha reportado que su presencia y/o modificación es determinante para el nivel de actividad de la proteína, dado que las interacciones moduladas por estos dominios determinan la especificidad de interacción de estos FT con otras proteínas o secuencias de ADN (Gemayel y cols. 2015a; Kumar y cols. 2001; Legendre, Verstrepen, y Leuven 2010; Liberati y cols. 1999). El mecanismo molecular mediante el que Qrich modula la actividad de los FT no ha sido descrito para FoxP, pero se ha demostrado que regula la formación de multímeros (Imafuku y cols. 1998; Perutz 1994) y que promueve la formación de complejos con moléculas de ADN distantes en el genoma. Es el caso del factor de transcripción Sp1, donde se comprobó que su dominio Qrich modula la actividad transcripcional y la capacidad del factor de transcripción de acercar regiones distantes del ADN, generando complejos tipo horquilla e identificándose interacciones con secuencias de unión separadas por ~1,8kpb. (Guerra y cols. 2007; Hiramatsu y cols. 2012; Su y cols. 1991).

Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas con dominios ricos en Q/N promueven la agregación de proteínas heterólogas con dominios similares, lo que sugiere su participación en la generación de condensados moleculares (Reijns y cols. 2008). Además, se ha encontrado que los dominios ricos en Q son suficientes para mediar la dimerización y tetramerización de proteínas específicas, indicando su papel en facilitar las interacciones proteína-proteína (Ren y cols. 1999; S. Wang y cols. 2011). Estos aspectos funcionales del dominio Qrich sugieren su relevancia en las proteínas FoxP1, aunque no

existen antecedentes *in vitro* que permitan comprender su rol en la dimerización y unión a ADN de FoxP1.

1.6 FoxP1 como modelo de estudio

Tomando en cuenta que las regiones desordenadas son comunes en la arquitectura de los factores de transcripción, y que estas influyen en la interacción con otras proteínas y unión con el ADN (Garza, Ahmad, y Kumar 2009; Minezaki y cols. 2006), analizar la contribución del dominio Qrich en la formación del complejo FoxP1-ADN adquiere importancia y podría entregar información sobre la dinámica de formación del complejo, contribuyendo a un conocimiento más acabado sobre el funcionamiento de este FT, y revelando su rol en la interacción entre regiones distantes del ADN para coordinar la transcripción espacio-temporalmente (Y. Chen y cols. 2015).

Con el objetivo de obtener mayores antecedentes que permitan dilucidar el impacto del dominio Qrich en la afinidad de unión FoxP-ADN y en el acercamiento de regiones distantes del genoma, se propuso caracterizar el factor de transcripción FoxP1, mediante un modelo de estudio basado en el análisis de la interacción de este FT con el ADN-horquilla (Figura 2). Este constructo posee dos sitios de unión a FoxP1 en sus extremos conectados por una región de ADN de 1,6 kbp. Debido a la significativa diferencia en tamaño entre el ADN usado (~750 kDa) y FoxP1 (75 kDa), la formación de horquillas de ADN se observará sólo en condiciones donde el dímero de FoxP1 se promueva.

Considerando los antecedentes previamente expuestos sobre la capacidad moduladora de las regiones intrínsecamente desordenadas de los FT, se propone que el dominio Qrich de FoxP1 aumenta la afinidad de la proteína por ADN y favorece la interacción entre regiones distantes del ADN.

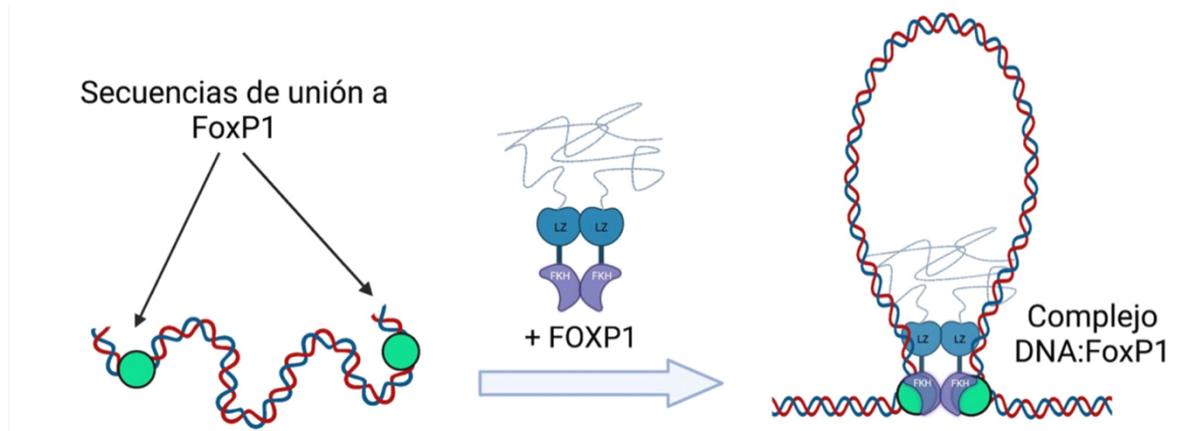


Figura 2. Unión del ADN-horquilla a FoxP1:

La unión del ADN-horquilla con el dímero de FoxP1 a través de secuencias específicas (marcadas en verde) provoca una alteración topológica de su estructura lineal por el acercamiento de sus extremos, dado que cada uno interactúa con uno de los dominios FKH de la proteína en este estado.

2. Hipótesis

Considerando la capacidad de los factores de transcripción FoxP para coordinar la expresión génica espacio-temporalmente, así como la influencia de las regiones intrínsecamente desordenadas y de los dominios ricos en glutaminas en la dinámica de interacción con el ADN, se plantea la siguiente hipótesis:

El dominio Qrich de FoxP1 incrementa la afinidad por el ADN, facilitando la interacción entre regiones distantes del material genético.

3. Objetivo general y específicos

- **Objetivo general:** Caracterizar la asociación y la formación de complejos de FoxP1 y la mutante FoxP1 Δ Qrich con el ADN blanco y la formación de horquillas.
 - **Objetivo específico 1:** Purificar las proteínas FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich
 - **Objetivo específico 2:** Determinar la afinidad de FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich con el ADN blanco mediante anisotropía de fluorescencia.
 - **Objetivo específico 3:** Caracterizar la formación de horquillas de FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich con el ADN blanco mediante EMSA.

4. Materiales y métodos

4.1 Cepas utilizadas

Se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* BI21(DE3)-C41 adquirida desde el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Esta cepa es utilizada para producir la proteína humana FoxP1, pues contiene en su genoma una copia del gen codificante para la ARN polimerasa del fago T7 para hacer posible la expresión del gen de interés dependiente de esta enzima, siendo su transcripción controlada por el operon lac que es inducible por IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido). Además, contiene el plásmido pET-TEV-FoxP1 o pET-TEV-FoxP1ΔQrich, el cual codifica para la proteína FoxP1 completa, además de poseer resistencia al antibiótico kanamicina. La proteína producida posee en su extremo amino una etiqueta de polihistidinas para su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni^{2+}), y un sitio de reconocimiento de la proteasa proveniente del virus del tabaco (TEV) para la remoción de la etiqueta de polihistidinas. La purificación y extracción de los plásmidos puros se realizó de acuerdo con lo señalado por el fabricante del kit ZymoPure II MidiPrep Kit (Zymo Research, EE.UU).

4.2 Condiciones de cultivo

El medio utilizado para el crecimiento de las bacterias previo a la purificación de plásmidos y como preinóculos para la purificación de proteínas corresponde a Luria-Bertani (LB; triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 0,17 M) suplementado con kanamicina 35 µg/mL. El crecimiento en ambos casos se realizó mediante agitación constante a 37°C durante toda la noche. Para la producción de las proteínas de interés, se utilizó el medio Terrific (triptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, glicerol 0,4 % v/v y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 90 mM pH 7,8), suplementado con kanamicina 35 µg/mL.

4.3 Columnas de afinidad a níquel HisTrap™

Las proteínas que se trabajan en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Chile poseen una etiqueta de polihistidinas, las que forman un enlace coordinado con iones metálicos previamente unidos a la resina de la columna. En este caso, se utiliza un ión de Ni^{2+} unido a la columna para seleccionar a la proteína de interés.

4.4 ADN-ligando

La secuencia de doble hebra reconocida por la proteína FoxP1 (5'-CAAGGTAAACAAGACAACGTAAACAA-3') fue adquirida previa síntesis en IDT (Integrated DNA Technologies, EE.UU). Adicionalmente, la secuencia de doble hebra reconocida por la proteína FoxP1 (5'-CAAGGTAAACAAGACAACGTAAACAA-3') conjugada con la sonda Alexa Fluor 488 (QY: 0,92). (ThermoFischer Scientific, EE.UU.) en el extremo 3' fue adquirida previa síntesis en IDT (Integrated DNA Technologies, EE.UU). Para los respectivos experimentos, la sonda fue excitada a 480 nm, y el espectro de emisión fue registrado entre los 500-600 nm. En todas las mediciones derivadas de esta sonda, la emisión a 519 nm se utilizó como punto de monitoreo.

4.5 ADN-horquilla

El ADN-horquilla corresponde a un constructo lineal de 1,6 kpb que presenta dos secuencias de unión a FoxP1 (5'-CAAGGTAAACAAGACAACGTAAACAA-3') ubicadas en sus extremos 3' y 5'. La obtención de este constructo se llevó a cabo mediante transformación de bacterias competentes *E. coli* (DH5 α) con un plásmido PUC conteniendo el segmento de interés flanqueado por sitios de digestión para *NdeI*. Posteriormente, se inocularon 50 mL de medio LB suplementado con kanamicina (35 μ g/mL), permitiendo que las bacterias crecieran durante toda la noche. Para la purificación del ADN plasmidial resultante, se utilizó el kit de purificación ZymoPure II Plasmid Midi Prep Kit (Zymo Research, EE.UU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN plasmidial, se procedió a la digestión del producto con la enzima de restricción FastDigest *NdeI* (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), permitiendo la digestión durante toda la noche, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del producto de digestión, realizando primero una electroforesis en gel de agarosa al 1%, corriendo el gel a 100 V durante 30 minutos. Luego de la corrida, la banda correspondiente al fragmento de interés fue cuidadosamente removida con un bisturí y transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Para purificar el ADN a partir del gel, se empleó el kit de purificación de ADN mediante adsorción a sílice Ultraclean 15 (MoBio, EE.UU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el producto, se determinó su concentración mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro SynergyHT (BioTEK – Agilent Technologies, EE.UU). Para la obtención del ADN- Δ horquilla se siguió un procedimiento similar pero la digestión se realizó simultáneamente con las enzimas *NdeI* y *BamHI*

4.6 Purificación FoxP1

La proteína recombinante FoxP1 fue purificada en condiciones desnaturalantes mediante cromatografía de afinidad con Ni²⁺ y posterior cromatografía de exclusión molecular. En una primera etapa se preparó un preinóculo con 50mL de medio LB suplementado con el antibiótico kanamicina (35 µg/mL), el cual se inoculó con bacterias *E. coli* BL21(DE3)-C41 transformadas con el plásmido pET-TEV-FoxP1. El cultivo se incubó bajo agitación constante (220 rpm) a 37°C durante toda la noche. Este preinóculo se utilizó para inocular dos litros de medio Terrific suplementado con kanamicina (35 µg/mL). Posteriormente el cultivo fue incubado a 37°C hasta que la densidad óptica (OD) medida a 600 nm alcanzó un valor de 0,9. En este punto se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM, incubando a 25°C por toda la noche bajo agitación constante. El cultivo resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

La pella celular fue resuspendida en 100mL de tampón A (Tris-HCl 50mM pH 7,8; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol (βME) 2 mM; Imidazol 30 mM, Urea 4M). Tras una incubación de 30 min a 37°C, se llevó a cabo la lisis celular mediante ultrasonido, utilizando pulsos de 30 segundos a un 30% de amplitud con pausas de 60 segundos, sumando un total de 4 minutos de pulsos. El lisado resultante fue nuevamente incubado por 30 min a 37°C y posteriormente clarificado mediante centrifugación a 18000 rpm a 4°C durante 30 min. El sobrenadante de esta solución se cargó en una columna HisTrap™, equilibrada previamente con tampón A, empleando un filtro de 0,45µm y colectando el frente de carga. Luego, la columna fue lavada con tampón A y finalmente se realizó un gradiente de elución con tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7,8; NaCl 500 mM; β-ME 2 mM; imidazol 500 mM), colectando las fracciones con mayor absorbancia a 280 nm. La proteína obtenida fue diluida a 1 mg/mL y suplementada con cloruro de guanidinio (GndCl) 2M. Como paso final se cargó la muestra en una columna Superdex S200 increase previamente equilibrada con tampón C (HEPES 20 mM pH 7,8; NaCl 100 mM; βME 2 mM) para separar por tamaño la proteína de impurezas y purificar el producto mediante cromatografía de exclusión molecular.

Posteriormente se procedió a la eliminación de la etiqueta de histidinas mediante la adición de EDTA 0,5M y βME 5mM, seguido de una digestión con la proteasa TEV en una proporción de 1:20 (TEV:proteína total). Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las proteínas resultantes se centrifugaron a 15000rpm por 10 minutos a 4°C, la

muestra se dializó contra tampón A y se cargó en la columna HisTrap previamente equilibrada con el mismo tampón, colectando el frente de carga. Se realizó un lavado con tampón A y se eluyó directamente con tampón B. La fracción pura de la proteína se determinó por SDS-PAGE y se suplementó con GndCl 2M para su almacenamiento.

4.7 Cromatografía de exclusión molecular

Los experimentos se realizaron en un equipo de HPLC Waters modelo 1525 equipado con una columna Superdex 200 increase 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, EE.UU). La columna se equilibró con 40 mL de tampón C (HEPES 20mM pH 7,8; NaCl 100mM; β ME 2mM). El monitoreo de la elución de las muestras se realizó siguiendo la emisión de fluorescencia a 320 nm previa excitación a 295 nm. Se visualizaron de esta forma las poblaciones monomérica y dimérica de la proteína, determinando los radios hidrodinámicos (R_h) y pesos moleculares (PM) aparentes de las especies a partir de la calibración de los volúmenes de elución respecto a una muestra con diferentes analitos de peso molecular y radio conocido: ovoalbúmina de pollo (44 kDa; 30,5 Å), mioglobina de caballo (17 kDa; 19 Å) y vitamina B12 (1,35 kDa; 8,5 Å). Para el análisis del equilibrio de dimerización de FoxP1, se cargaron a la columna muestras de 5, 10 y 30 μ M de proteína previamente incubadas a 37°C durante 1 h, determinando el área relativa de cada población obtenida mediante el análisis del perfil cromatográfico asumiendo poblaciones Gaussianas.

4.8 Anisotropía de fluorescencia

Para llevar a cabo la medición de anisotropía de fluorescencia, se utilizó el fluorímetro FP8300 (JASCO corporation, Japón), que se encuentra equipado con una fuente de luz de Xenón y un set de polarizadores de excitación y de emisión. Las mediciones se realizaron mediante espectros de emisión en el rango de los 500-600 nm previa excitación de la muestra a 480 nm utilizando dos diferentes posiciones del polarizador de emisión: paralelo y perpendicular respecto al polarizador de excitación, haciendo posible la recopilación de datos y el cálculo de la anisotropía, la que se llevó a cabo con la siguiente ecuación (1):

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad (1)$$

Fórmula 1. Anisotropía a partir de las intensidades de fluorescencia al equilibrio

Donde $I_{||}$ e I_{\perp} corresponden a las intensidades de fluorescencia de emisión paralelo y perpendicular respectivamente (respecto a la orientación del polarizador de excitación), y G al factor de corrección para las diferencias de eficiencia de detección del fluorímetro del plano paralelo y perpendicular en la longitud de onda de emisión utilizada para el monitoreo (LiCata y Wowor 2008).

Para efectos de la construcción de la curva de unión se determinó r_0 como el valor de anisotropía del ADN en ausencia de proteína. Este valor se utilizó para normalizar la curva de unión, graficando r/r_0 en función de la concentración de proteína.

4.9 Curva de unión FoxP1-ADN

Para determinar la afinidad de FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich al ADN-ligando, se construyeron curvas de unión midiendo la anisotropía del ADN marcado. Para lo anterior, 200 nM del ADN-ligando conjugado con Alexa Fluor 488 se incubaron con diferentes concentraciones de las proteínas en un rango de 0-600 nM para FoxP1 Δ Qrich y 0-50 μ M para FoxP1 durante 1 h a 37°C. De esta manera se determinó la anisotropía de cada muestra, donde los cambios en esta señal en función de la concentración de la proteína se utilizaron para la determinación de la constante de disociación.

4.10 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) fueron llevados a cabo utilizando geles de poliacrilamida al 6% o al 10% p/v, preparados con tampón TAE (1X) (40 mM de Tris-acetato pH 8; 1 mM de EDTA). Todos los ensayos se realizaron a un voltaje constante de 60V, variando el tiempo de corrida según el tamaño del ADN empleado en cada experimento. Se estableció un tiempo de 1 hora y 20 minutos para los experimentos con ADN-ligando y 3 horas para los experimentos con ADN-horquilla y ADN- Δ horquilla. Tras cada corrida electroforética, los geles fueron incubados durante 15 minutos en solución TAE conteniendo la sonda SybrSafe a una dilución de 1:1000, permitiendo así el marcado del ADN para su posterior visualización mediante luz ultravioleta.

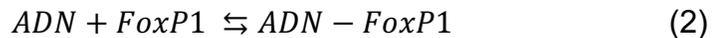
4.11 Descripción de la formación de complejos proteína-ADN

Para evaluar la formación de complejos entre FoxP1-ADN, se incubó ADN-ligando a concentración de 1 μ M con diferentes concentraciones de las proteínas (FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich) en tampón de unión a ADN (HEPES 20 mM pH 7,8; NaCl 20 mM; β ME 2 mM)

un rango de 0-20 μM durante 1 hora a 37°C . Tras esta incubación, las muestras fueron suplementadas con tampón de carga MassRuler (Thermo Scientific, EE.UU) y cargadas en un gel para EMSA junto con un estándar de peso molecular AccuRuler 1kb (MaestroGen, Taiwán) para posterior análisis de migración en la corrida electroforética. En el caso de determinar la formación de horquillas de ADN por la interacción con las diferentes proteínas, se incubaron 15 nM del ADN-horquilla con diferentes concentraciones de estas en un rango de 0-40 μM en tampón de unión a ADN durante 1 hora a 37°C . Después de la incubación, las muestras se suplementaron con tampón de carga MassRuler y se cargaron en un gel para EMSA, junto con el estándar de peso molecular AccuRuler 1kb (MaestroGen, Taiwán), para el análisis de la migración en la corrida electroforética.

4.12 Análisis de la curva de unión a ADN

Para el análisis de los experimentos de unión a ADN, se consideró en el caso de FoxP1 un sitio de unión, lo cual supone un modelo simple de dos estados que permitiera explicar el cambio de la señal de anisotropía observado (Bernetti, Cavalli, y Mollica 2017). En este contexto, las especies se asumieron como ADN libre y ADN-proteína, tal como se observa en la ecuación 2:



Fórmula 2. Equilibrio de la formación del complejo ADN-FoxP1

la constante de disociación respectiva (K_D) viene expresada como:

$$K_D = \frac{[ADN] \cdot [Proteína]}{[ADN-Proteína]} \quad (3)$$

Fórmula 3. Constante de disociación del complejo ADN-FoxP1

Debido a la naturaleza del experimento (señal de anisotropía), es que no es posible determinar directamente las concentraciones de ambas especies, por lo que se utiliza la ecuación 4:

$$r/r_0 = \frac{r_{max} \cdot [Pt]}{K_D + [Pt]} \quad (4)$$

Fórmula 4. Señal de anisotropía normalizada en función de la constante de disociación y concentración de proteína total

Donde r/r_0 corresponde a la anisotropía normalizada a las diferentes concentraciones de proteína, y r_{max} es la señal máxima alcanzada en el experimento en la saturación del ADN; $[Pt]$ corresponde a la concentración de proteína total utilizado, K_D corresponde a la constante de disociación.

Dado que la curva de unión de FoxP1 Δ Qrich muestra un comportamiento sigmoideal y no es posible caracterizar todos los microestados que dan cuenta del cambio de afinidad de la proteína por el ADN, se utilizó un modelo que considera cooperatividad (Stefan y Le Novère 2013) (ecuación 5):

$$r/r_0 = \frac{r_{max} \cdot [Pt]^n}{(K_{0,5})^n + [Pt]^n} \quad (5)$$

Fórmula 5. Señal de anisotropía normalizada en función de la constante 0,5 y concentración de proteína total

Donde $K_{(0,5)}$ corresponde a la constante de disociación observada que representa el 50% del cambio de r/r_0 total, y n corresponde al coeficiente de Hill. El coeficiente de Hill refleja la cooperatividad que puede presentar la unión proteína-ADN cooperatividad (Stefan y Le Novère 2013).

5. Resultados

5.1 Purificación de FoxP1

La proteína FoxP1 fue purificada en condiciones desnaturalantes a través de cromatografía de afinidad a Ni²⁺ y posterior exclusión molecular (Materiales y Métodos), obteniéndose 25mg de proteína total. La pureza de la proteína fue determinada a través de su perfil de movilidad electroforética en SDS-PAGE (Figura 3).

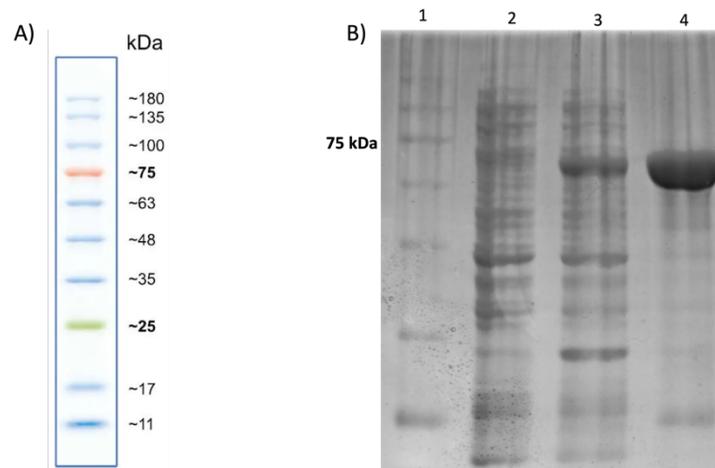


Figura 3. Purificación de FoxP1. A) Estándar de peso molecular AccuRuler, utilizado para identificar la proteína FoxP1 por tamaño (~75kDa). B) Electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) de las etapas de purificación de la proteína. Se muestran, de izquierda a derecha: 1) estándar de peso molecular, 2) frente de carga, 3) lavado con tampón A, 4) eluido en gradiente con tampón B.

5.2 Propiedades de dimerización de FoxP1

Continuando con la caracterización de la proteína, se decidió analizar qué tan favorecido está el dímero de FoxP1 respecto a lo descrito para el dominio de unión a ADN aislado (Exequiel Medina y cols. 2019) y FoxP1 Δ Qrich (Cruz y cols. 2023). Considerando las propiedades de formación de agregados del dominio rico en Q (S. Chen y cols. 2002; Gemayel y cols. 2015b; Nagai y cols. 2000) es que se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión molecular (SEC) a diferentes concentraciones de FoxP1, con el fin de determinar la dependencia de la formación de posibles estados cuaternarios en función de la concentración de proteína. Para esto, se utilizó la proteína a concentraciones entre 5-30 μ M. El cromatograma resultante (Figura 4A) muestra la presencia de sólo dos poblaciones predominantes: la primera con un tiempo de retención de 17 minutos y la segunda con un tiempo de retención de 20 minutos. Considerando la curva de calibración (Materiales y Métodos), estos tiempos de retención suponen valores de R_h de 54 y 36 Å, y

los pesos moleculares estimados de las especies detectadas son de 175 y 76 kDa, respectivamente. Los valores obtenidos son consistentes con el dímero y el monómero, respectivamente, aunque el peso molecular del dímero es superior a lo estimado por lo observado con los monómeros ($2 \cdot 76$ kDa).

Posteriormente se realizó un análisis de los cromatogramas obtenidos para determinar las poblaciones relativas de las especies, considerándolas como poblaciones gaussianas (Materiales y Métodos)(Figura 4B). A partir de este análisis, se determinó que la población de proteína dimérica aumenta a medida que aumenta la concentración de proteína total; sin embargo, la fracción monomérica sigue siendo mayoritaria independiente de la concentración de proteína total, lo que sugiere que el equilibrio está favorecido hacia el monómero. Con los datos obtenidos, se pudo determinar la constante de disociación (K_d) de la proteína, obteniéndose un valor de $14 \pm 2 \mu\text{M}$. En ese sentido, los datos entregados por este experimento sugieren que la presencia dominio rico en Q genera un aumento significativo de la constante de disociación (K_d) de FoxP1 en comparación a FoxP1 Δ Qrich (~ 20 nM).

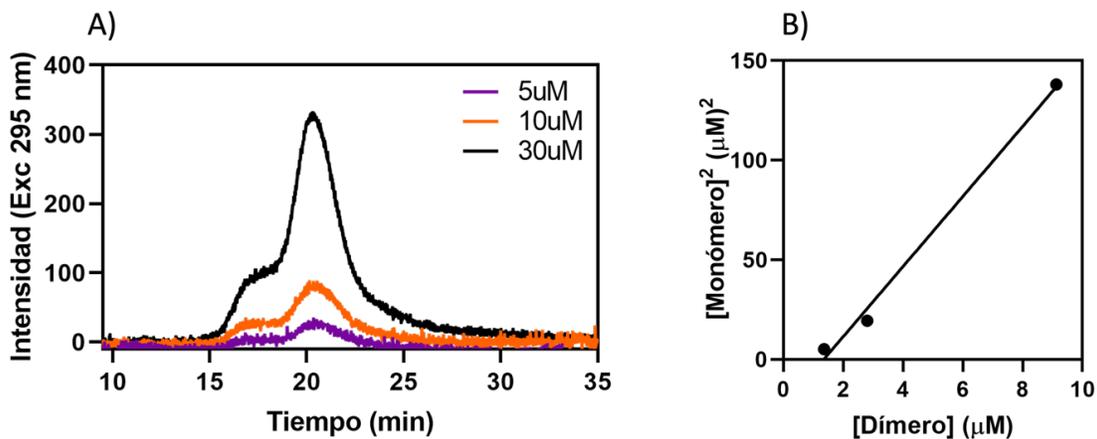


Figura 4. Propiedades de dimerización de FoxP1. A) Perfil cromatográfico de exclusión molecular de FoxP1, indicando el perfil a 5, 10 y 30 μM . B) Análisis de las poblaciones usando un modelo de gaussianas, donde se determinó la concentración de dímero y monómero en función de la concentración de proteína total cargada, construyendo una curva de concentración de [Dímero] vs [Monómero]². Considerando un sistema en equilibrio, se utilizó una recta que se ajusta a la ecuación $[\text{dímero}] \cdot K_d = [\text{monómero}]^2$. A partir de este análisis se obtuvo la constante de dimerización de la proteína (K_d) de $14 \pm 2 \mu\text{M}$.

5.3 Determinación de la afinidad de FoxP1 con el ADN

Una vez obtenida la proteína purificada, se procedió a realizar su caracterización funcional, centrándose especialmente en comprender la afinidad de FoxP1 por el ADN. Para abordar esta interrogante, se construyeron curvas de unión de la proteína con ADN-ligando, el cual posee 26 pb y el sitio de reconocimiento para FoxP1, conjugado con Alexa Fluor 488 en el extremo 3' (Materiales y Métodos). Se incubó 200 nM del ADN con diversas concentraciones de la proteína FoxP1 en un rango de concentraciones entre 0-600 nM durante 1 hora a 37°C. Este rango fue determinado en primera instancia considerando la información respecto a la alta afinidad de la proteína FoxP1 Δ Qrich al ADN usado (Cruz y cols. 2023).

Se observó que el ADN en presencia de FoxP1 Δ Qrich exhibe un aumento en la anisotropía en el rango de concentraciones usado, evidenciando la formación del complejo. En comparación, en presencia de FoxP1, el ADN muestra una anisotropía sin cambios significativos, indicando cualitativamente una menor afinidad respecto a FoxP1 Δ Qrich. Además, la curva en presencia de FoxP1 Δ Qrich muestra un comportamiento sigmoideal que sugiere cooperatividad para la formación del complejo (Figura 5A).

Debido a lo observado con FoxP1, se procedió a realizar una segunda curva de unión con un espectro más amplio de concentraciones. En este caso, se utilizó un rango de concentraciones hasta 20 μ M. El gráfico resultante (Figura 5B) muestra un aumento de la señal de anisotropía en el rango de 1-5 μ M, sugiriendo cualitativamente que la presencia del dominio rico en Q disminuye la afinidad de la proteína por el ADN blanco.

Ambas proteínas fueron analizadas mediante un modelo simple de dos estados que considera la formación de un complejo proteína-ADN a partir de proteína y ADN libres (Materiales y Métodos). Estos datos permitieron determinar la constante de disociación (K_D) para la formación del complejo proteína-ADN de FoxP1, que alcanza un valor de $2,5 \pm 0,25$ μ M, notablemente superior al de FoxP1 Δ Qrich ($K_{D(0,5)} = 0,36 \pm 0,12$ μ M). Además, el valor de Hill para ambas proteínas fue de $1,2 \pm 0,2$ y $2,2 \pm 0,6$ para FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich, respectivamente, evidenciando que sólo la formación del complejo FoxP1 Δ Qrich presenta cooperatividad (ver sección Discusión). Otra diferencia observada es la amplitud de la curva de unión de FoxP1 Δ Qrich ($r/r_0 \sim 1,4$) con la de FoxP1 ($r/r_0 \sim 1,25$), indicando, en principio, que FoxP1 Δ Qrich forma un complejo de radio hidrodinámico mayor que FoxP1 con el ADN.

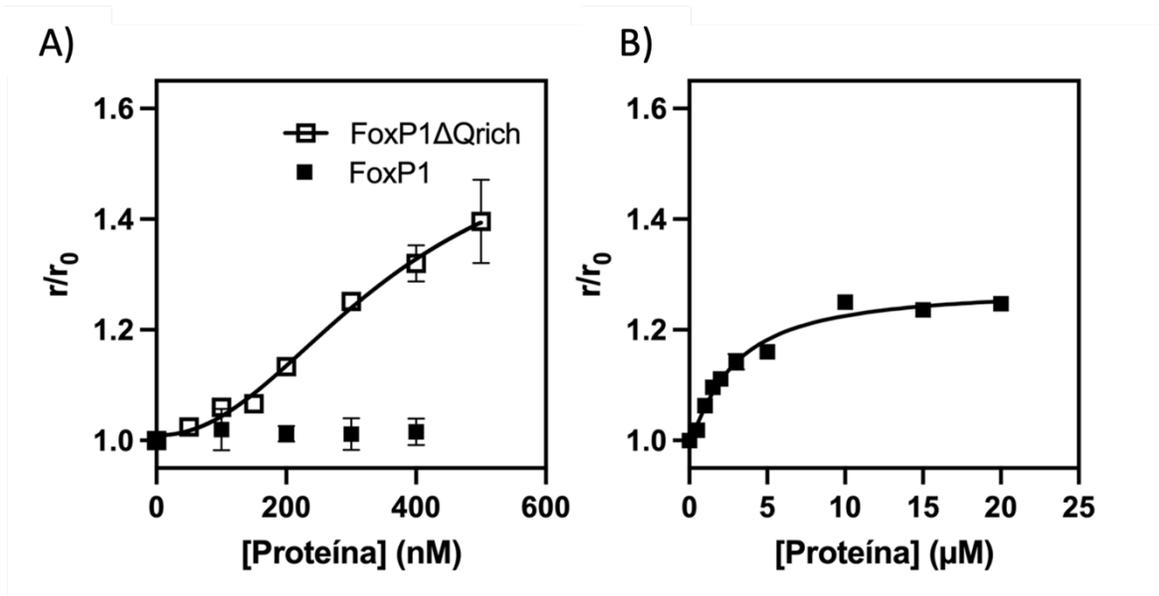


Figura 5. Análisis de datos de anisotropía de fluorescencia en función de la concentración de proteína. A) Curva de anisotropía del ADN conjugado normalizada (r/r_0), en función de la concentración de proteína en un rango de 0 a 600 nM. La curva representa el ajuste de los datos de la proteína FoxP1 Δ Qrich a un modelo de unión cooperativo, la cual muestra un factor de Hill de $2,2 \pm 0,6$. B) Curva de anisotropía normalizada (r/r_0) en función de la concentración de FoxP1 en un rango de 0 a 20 μ M. Los datos fueron ajustados al mismo modelo general de unión, mostrando un comportamiento no cooperativo con un factor de Hill de $1,2 \pm 0,2$.

5.4 Evidencias de la formación de complejos proteína-ADN para FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich

Una vez determinada la afinidad de la proteína por el ADN a través de los ensayos de anisotropía, se optó por realizar ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA), con el fin de obtener una perspectiva visual de las diferencias en la afinidad de la proteína por el ADN y la formación de los diferentes complejos proteína-ADN. Para esto, se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (Materiales y Métodos), preparando mezclas de ADN-ligando no conjugado a 1 μ M con FoxP1 Δ Qrich y FoxP1 a diferentes concentraciones, en un rango entre 1-50 μ M.

Los resultados muestran cómo la banda correspondiente a ADN-ligando varía en su patrón de migración, disminuyendo a medida que aumenta la concentración de FoxP1 Δ Qrich, llegando a ser casi imperceptible a una concentración de 20 μ M (Figura 6A). Por otro lado, FoxP1 no parece influir significativamente en la migración del ADN, corroborando la menor afinidad que fue evidenciada anteriormente (Figura 5), aunque es posible visualizar la aparición de una banda de mayor peso molecular, por lo que con el aumento en la concentración de FoxP1 se estaría favoreciendo la formación del complejo

proteína-ADN, y por ende, la formación de un complejo molecular de mayor tamaño, lo cual se traduce en un cambio en el patrón de migración electroforética del ADN-ligando.

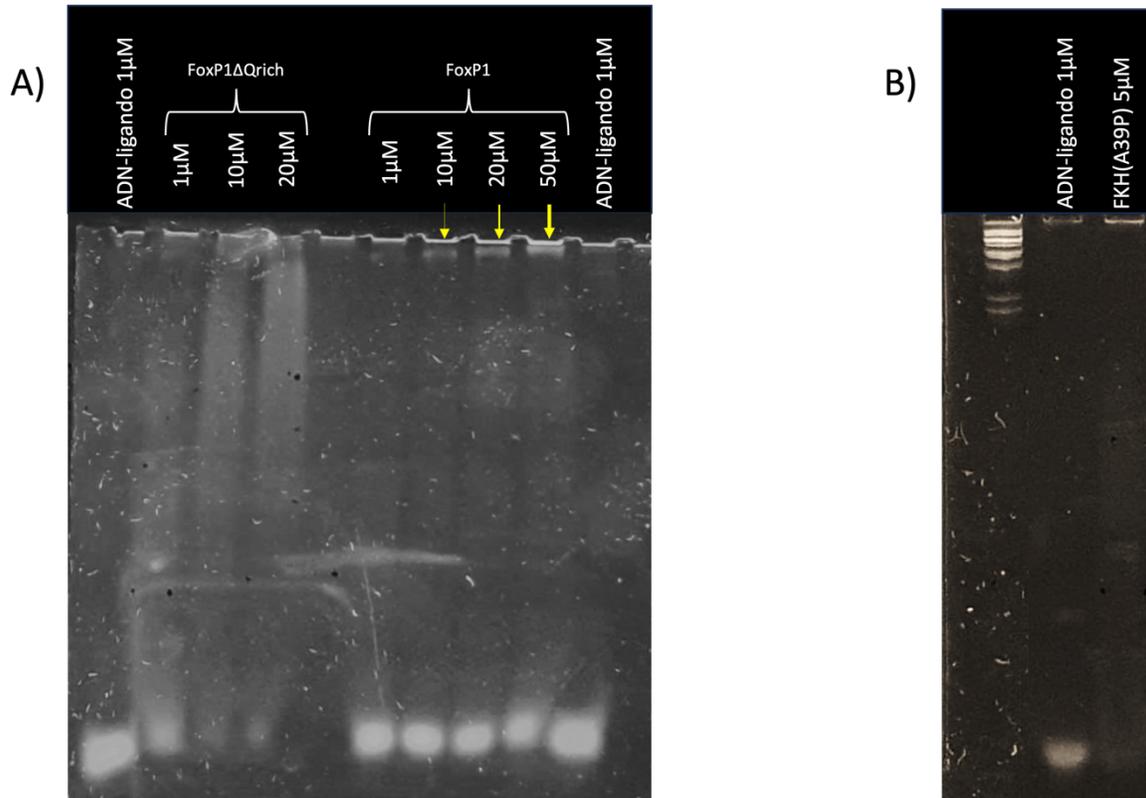


Figura 6. Estudios de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) en gel de poliacrilamida al 10% para análisis de afinidad de FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich con el ADN-ligando. A) De izquierda a derecha se visualizan las bandas correspondientes a: ADN-ligando 1 μ M, FoxP1 Δ Qrich (1 μ M – 20 μ M), carril vacío, FoxP1 (1 μ M – 50 μ M) y ADN-ligando. Las flechas en amarillo indican la intensificación de las bandas de alto peso molecular a medida que aumenta la concentración de FoxP1. B) De izquierda a derecha se visualizan las bandas correspondientes a: Estándar de peso molecular, ADN-ligando individual 1 μ M y ADN-ligando en presencia de FKH(A39P) 5 μ M.

5.5 Purificación de ADN-horquilla

Una vez que se logró caracterizar el comportamiento de la proteína con respecto a la formación de complejos y afinidad por el ADN, se procedió a analizar su capacidad para conectar regiones distantes de ADN, empleando el modelo experimental basado en la unión de FoxP1 a ADN-horquilla, un constructo lineal de 1,6 kpb que en sus extremos 3' y 5' contiene la secuencia de unión a FoxP1 (5'- CAAGGTAAACAAGACAACGTAACAA-3') unidas por una región enlazante que tiene una secuencia azarosa (Figura 2). El modelo se basa en que la unión simultánea de cada extremo del ADN-horquilla con cada uno de los sitios de unión del dímero de FoxP1 genera un cambio topológico tal que el patrón de migración de este ADN en una corrida electroforética se verá alterado en caso de estar unido a la proteína de esta forma. Para cumplir con este objetivo fue necesario diseñar y

purificar el ADN-horquilla, así como estandarizar los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), lo que permitió detectar y analizar cambios topológicos del ADN en presencia de la proteína.

La obtención del ADN se llevó a cabo a partir de la purificación de ADN plasmidial de bacterias competentes *E. Coli* DH5 α transformadas con un plásmido que contiene la secuencia del ADN-horquilla flanqueada por sitios de restricción para la enzima *NdeI*, lo que permite su purificación a partir de la digestión del plásmido con esta enzima y posterior separación por tamaño en un gel de agarosa. Además, este constructo contiene un sitio de restricción para *Bam*HI, que permite la eliminación de un sitio de unión a FoxP1. Como se puede observar (Figura 7), la digestión del ADN plasmidial resultó ser exitosa ya sea para obtener el ADN-horquilla obtenido a través de la digestión con *NdeI* (Figura 7A), o ADN- Δ horquilla (solo un sitio de unión a FoxP1) (Figura 7B) obtenido con la co-digestión de *NdeI* y *Bam*HI, pudiendo resolver la separación por tamaño del ADN plasmidial residual y el ADN- Δ horquilla, que migra en concordancia con su tamaño de 1,6 kpb. Ambas bandas fueron purificadas desde el gel (Materiales y Métodos).

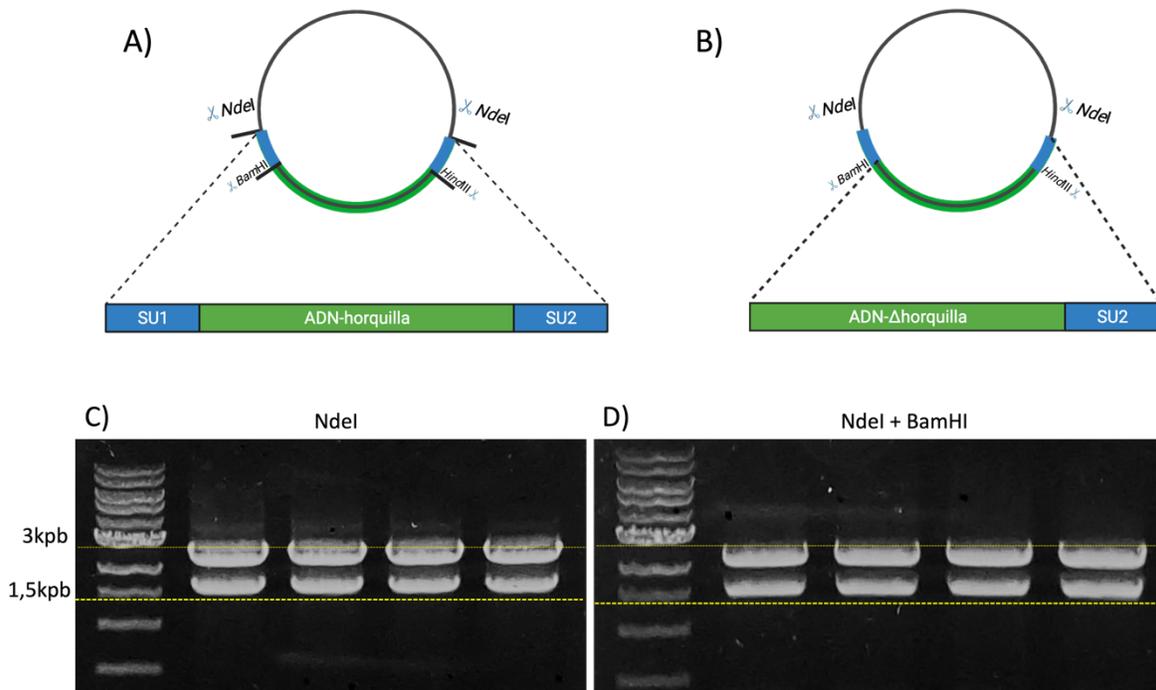


Figura 7. Digestión del plásmido PUC-horquilla para obtención de ADN-horquilla y ADN- Δ horquilla. A) y B) Ilustración plásmido PUC-horquilla. Los sitios de restricción para *NdeI*, *Bam*HI y *Hind*III se indican según su ubicación en el constructo, además de los sitios de unión a FoxP1 (SU1 y SU2), que comparten exactamente la misma secuencia. La línea punteada indica el producto de la digestión con *NdeI* (A), o de la co-digestión usando *NdeI* + *Bam*HI, donde el SU1 es eliminado del constructo, lo cual se indica por su decoloración. C) y D)

Perfil electroforético de la digestión con enzimas de restricción del plásmido PUC para obtención de ADN-horquilla y ADN- Δ horquilla. Ensayo realizado en gel de agarosa 1%. C) Digestión con NdeI para obtención de ADN-looping (~1,6kpb) lo cual se visualiza en las bandas que migran levemente por sobre los 1,5kpb con respecto al estándar. D) Co-digestión con las enzimas BamHI y HindIII para la obtención de ADN- Δ horquilla. Este constructo solo tiene un sitio de unión para FoxP1, sin embargo, la diferencia de tamaño con el ADN-horquilla es muy baja para ver diferencias en la migración electroforética (26bp), por lo que el perfil de la corrida de la banda es similar al de la digestión con NdeI. Para cada digestión, se muestran cuatro réplicas. Sin embargo, el vector PUC posee sitios adicionales para BamHI -no mostrados- que permite diferenciar la migración del vector digerido ya sea con NdeI (2393, 1594 y 186 pb) o con la co-digestión (2140 pb, 1560, 253, 186 y 34 pb). Las líneas amarillas remarcan la migración a 3kpb y 1,5kpb según el estándar de peso molecular para mostrar la diferencia de migración entre el ADN-horquilla (A) y ADN- Δ horquilla (B) además de las diferencias de migración de sus respectivos vectores digeridos.

5.6 Determinación de la capacidad de FoxP1 para la formación de horquillas de ADN

Una vez obtenido el ADN-horquilla y ADN- Δ horquilla, se dio paso a la determinación de la capacidad de FoxP1 para la formación de horquillas de ADN. En primer lugar se realizó un EMSA empleando ADN- Δ horquilla; este constructo solo tiene un sitio de unión para FoxP1, por lo que no tiene la posibilidad de formar horquillas de ADN, y por lo tanto sirve para caracterizar el patrón de migración electroforética de todos los complejos proteína-ADN excepto la formación de horquillas, facilitando la identificación de estos complejos en los siguientes ensayos.

En primer lugar se realizó un EMSA preparando ADN- Δ horquilla a una concentración constante de 15nM con FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich a concentraciones de 200 nM y 2 μ M, con el fin de establecer los complejos a concentraciones menores y mayores $\sim K_D$, de acuerdo con los valores informados anteriormente. Adicionalmente, se utilizó una mutante del dominio de unión a ADN (FKH) -A39P- previamente descrita (E Medina y cols. 2016) que favorece significativamente la especie monomérica en el equilibrio monómero \rightleftharpoons dímero. Esta proteína que sólo posee el dominio FKH (A39P) posee una afinidad por el ADN similar a lo observado por la proteína FoxP1 Δ Qrich, lo cual fue confirmado mediante EMSA usando ADN-ligando con 5 μ M FKH(A39P) mostrando una disminución significativa de la banda del ADN libre (Figura 6B).

La corrida electroforética del ADN- Δ horquilla con las proteínas no mostró cambios a concentraciones del orden nM (Figura 8A), aunque se puede observar como las muestras incubadas con proteína a 2 μ M si cambian el patrón de corrida. En primer lugar, la mutante FKH(A39P) a 2 μ M que se encuentra principalmente como un monómero en solución, muestra un cambio de migración que da cuenta de la formación del complejo FKH(A39P)-ADN migrando levemente por sobre la banda correspondiente al ADN- Δ horquilla,

correspondiente a la adición de un monómero. Adicionalmente, se muestra una segunda banda a 3 kpb que está en menor concentración, lo que podría corresponder a formación de un complejo dimérico con dos moléculas de ADN- Δ horquilla, que se explica por lo favorecida que está la especie monomérica, de manera que la acumulación del dímero es mucho menor. Por otro lado, FoxP1 Δ Qrich, que está presente principalmente como un dímero en solución, muestra dos bandas de migración con una leve diferencia respecto a FKH(A39P), lo que se explica por la diferencia en tamaño de estas proteínas (~120 residuos). Una de las bandas coincide con la migración del estándar de peso molecular a 3 kpb y la otra con la banda del complejo monómero-ADN (Figura 8A). Estos resultados dan cuenta de la formación de dos complejos FoxP1 Δ Qrich-ADN diferentes: uno formado por el monómero de la proteína, que tiene una diferencia de tamaño con FKH(A39P) debido a la presencia del dominio cremallera de leucina y la región conectora, mientras que la forma dimérica de FoxP1 Δ Qrich estaría uniendo dos moléculas de ADN-horquilla, ya que la migración de la segunda banda indica un tamaño de 3 kpb, lo que corresponde aproximadamente al doble del tamaño de una molécula de ADN- Δ horquilla individual. Finalmente FoxP1 muestra una banda de gran tamaño molecular, excediendo el límite de resolución del estándar de peso molecular, por lo que, si bien se forma un complejo FoxP1-ADN Δ horquilla, no es posible estimar su tamaño. Sin embargo, por la naturaleza del dominio Qrich y sus capacidades de favorecimiento de la formación de multímeros y condensados no se descarta la posibilidad de que se esté formando este tipo de complejos (Figura 8B). Estos resultados dan cuenta del impacto de las proteínas (monómeros, dímeros) sobre la migración relativa del ADN- Δ horquilla, así como de los distintos complejos que se pueden observar de acuerdo con los cambios en el patrón de corrida electroforética.

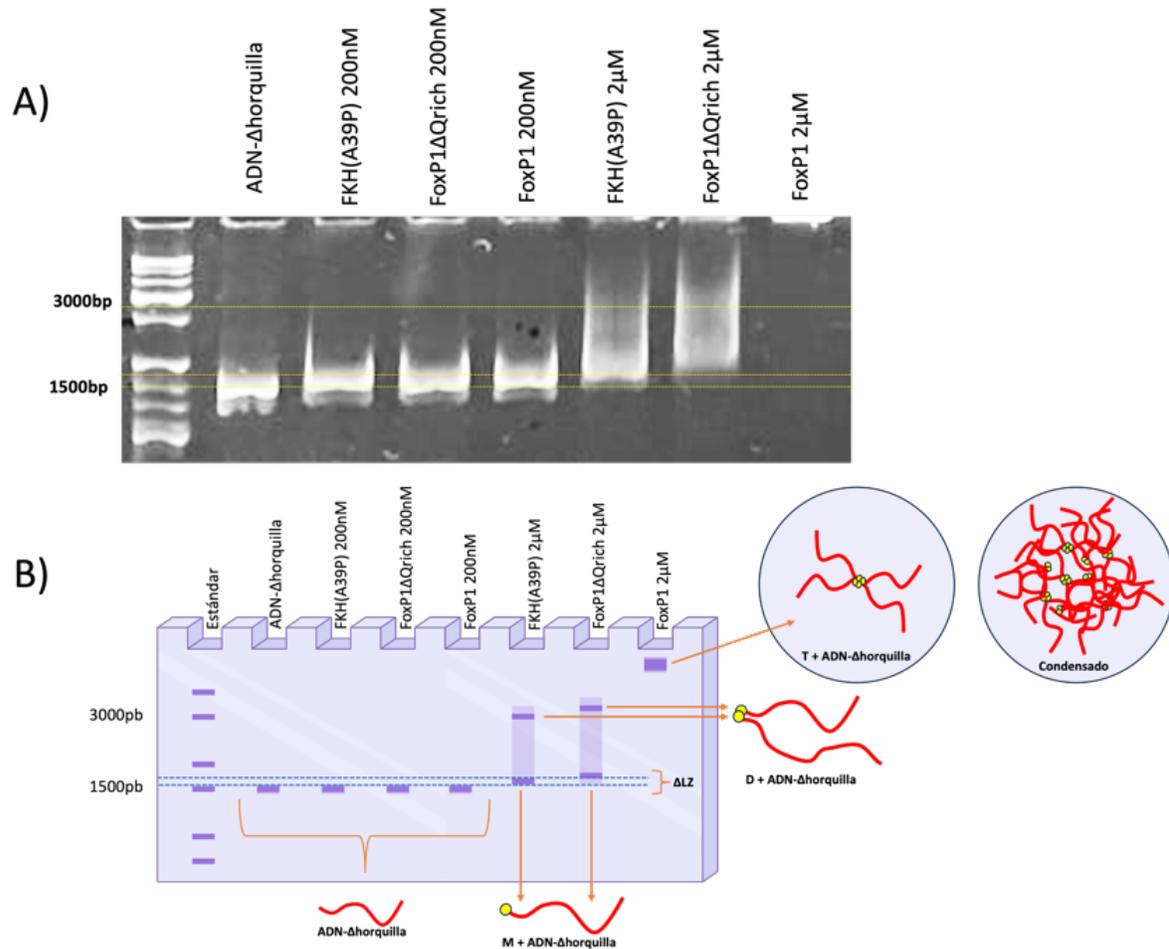


Figura 8. EMSA en gel de poliacrilamida al 6%. A) Se muestra la migración del ADN-Δhorquilla en función de la concentración de las proteínas usadas en esta investigación. De izquierda a derecha se visualiza: ADN-Δhorquilla, FKH(A39P) 200nM, FoxP1ΔQrich 200nM, FoxP1 200nM, FKH(A39P) 2μM, FoxP1ΔQrich 2μM, FoxP1 2μM. FoxP1 a 2μM muestra una banda de alto peso molecular que supera el límite de resolución del estándar de peso molecular. B) Esquema de los posibles complejos proteína-ADNΔhorquilla formados y sus respectivos pesos moleculares de acuerdo a su patrón de migración, ya sea a través de la unión de un monómero (M) o un dímero (D) (amarillo) al ADN-Δhorquilla (rojo). La distancia entre las líneas azules señala la diferencia de tamaño que hay entre los complejos formados por FKH(A39P) y FoxP1ΔQrich por la presencia del dominio LZ, también se muestra la banda que excede la resolución del estándar del complejo FoxP1(2μM)-ADNΔhorquilla, la cual no se puede caracterizar por su gran tamaño.

5.7 Formación de horquillas

Una vez caracterizados los distintos complejos proteína-ADNΔhorquilla se procedió a analizar la formación de horquillas de ADN preparando muestras con ADN-horquilla y FoxP1ΔQrich. El ADN se mantuvo a una concentración constante de 15nM mientras que la proteína se utilizó en un rango de concentraciones entre 15 y 750nM. Adicionalmente, se preparó una muestra de ADN-horquilla (15nM) y FKH(A39P) a 750nM.

Los resultados (Figura 9) muestran cambios en la corrida electroforética, tal como se observó en el experimento anterior al aumentar la concentración de proteína: a 150nM se puede ver la formación de un complejo de tamaño levemente mayor al ADN-horquilla individual, lo que da cuenta de la unión del monómero de FoxP1 Δ Qrich al ADN, mientras que al aumentar la concentración al doble se observa un nuevo cambio en la migración, dando cuenta de la formación de un complejo formado por el dímero de FoxP1 Δ Qrich y el ADN. Finalmente, al aumentar la concentración de proteína a 750nM, lo que equivale a una proporción estequiométrica de 50:1 (proteína-ADN), se observa una banda de gran tamaño molecular, excediendo el límite de resolución del estándar de peso molecular. FKH(A39P) 750nM muestra un patrón de migración similar, con una migración levemente mayor que FoxP1 Δ Qrich, lo cual se podría relacionar con la diferencia de tamaño del complejo formado entre estas proteínas y el ADN por la presencia del dominio LZ en FoxP1 Δ Qrich. El patrón de migración anómalo observado para las proteínas a concentración 750nM da cuenta de la formación de horquillas en los complejos formados con FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P), esto porque el cambio en el tamaño molecular de las bandas observadas no se condice con el tamaño de los complejos observados en el control realizado con ADN- Δ horquilla, entendiendo entonces que esta banda corresponde a un cambio en la topología del ADN, ya que esta variación si podría generar un cambio significativo en la migración observada.

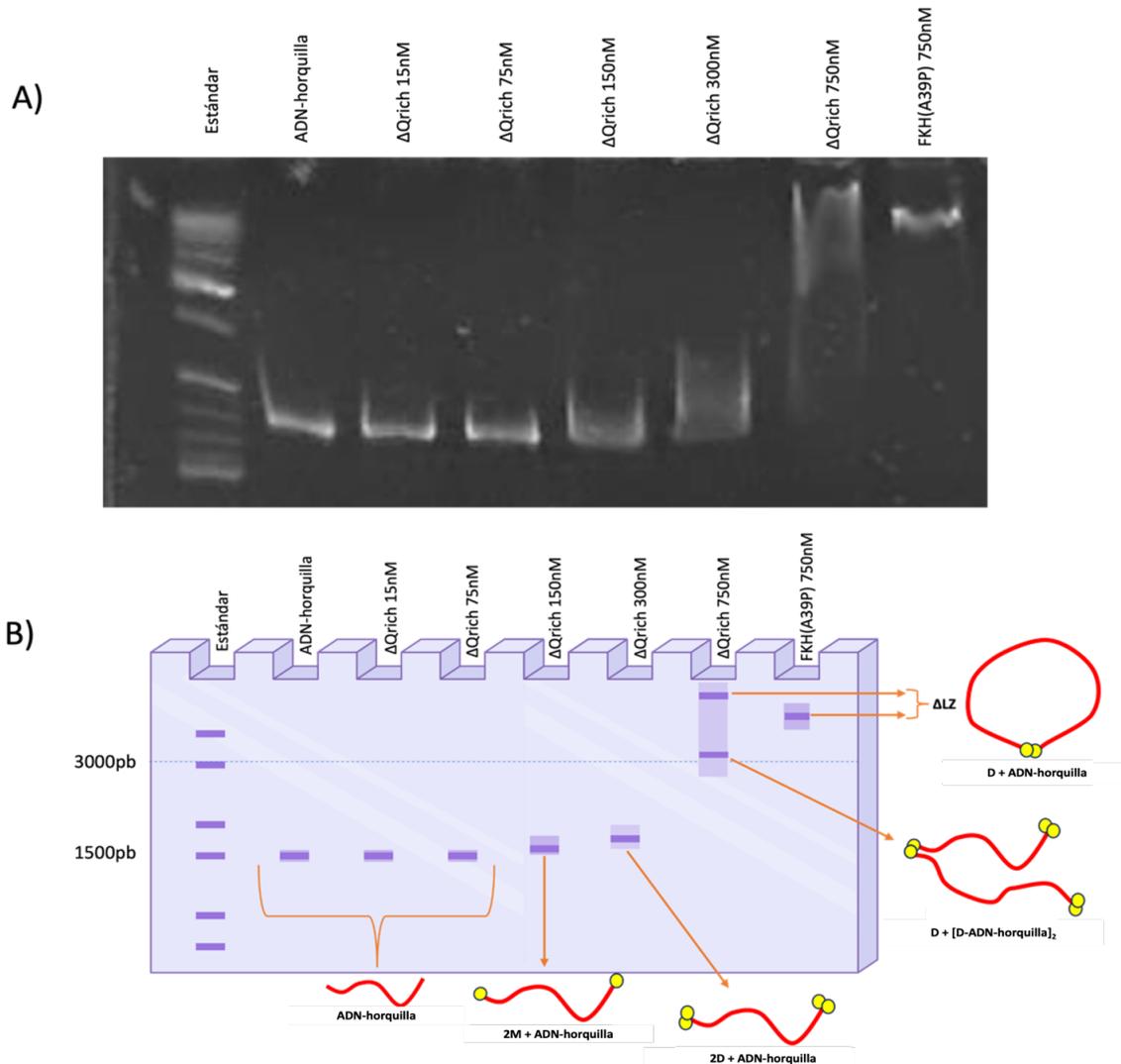


Figura 9. EMSA en gel de poliacrilamida al 6%. A) Se muestra la migración del ADN-horquilla en función de la concentración de las proteínas usadas en esta investigación. De izquierda a derecha se observa: Estándar de tamaño molecular, ADN-horquilla, FoxP1 Δ Qrich (15nM – 750nM) y FKH(A39P) 750nM. En las últimas dos bandas se observa un patrón de migración anómalo, por la formación de un complejo molecular de baja migración, pero distinto a los observados en el control con ADN- Δ horquilla. Esta diferencia en gran magnitud de la migración da cuenta de un cambio en la topología del ADN y por ende de la formación de un complejo tipo horquilla. B) Ilustración esquemática de los distintos complejos formados por FoxP1 Δ Qrich (amarillo) en su estado monomérico (M) o dimérico (D) con el ADN-horquilla (rojo), de acuerdo con sus respectivos tamaños y patrones de migración. Δ LZ se refiere a la diferencia de tamaño entre los complejos formados por el ADN-horquilla con FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P) dado que esta última proteína no posee el dominio LZ.

Por último, se realizó un EMSA con la proteína FoxP1 en un rango de concentraciones entre 15nM y 40 μ M (Figura 10), para determinar su capacidad de formación de horquillas al formar con un complejo FoxP1-ADN-horquilla. En este gel se puede observar un fenómeno similar a los gels anteriores, con la aparición de bandas que dan cuenta de la formación de al menos cuatro complejos FoxP1-ADN-horquilla diferentes.

A una concentración de proteína de 750nM se evidencia el primer cambio en la migración de las bandas, mostrando un complejo con un migración menor con respecto al ADN-horquilla, dando cuenta de la formación de un complejo con la forma monomérica de FoxP1 y el ADN; a esa misma concentración es posible observar una segunda banda con tamaño molecular mayor, lo que estaría evidenciando la presencia de un complejo formado por un dímero de FoxP1 unido a dos moléculas de ADN-horquilla. Por otro lado, al aumentar la concentración de proteína a 2 μ M ocurre un nuevo cambio en el patrón de corrida, mostrando una intensificación de la banda correspondiente a un tamaño molecular de 3 kpb, lo que correspondería a la formación de un complejo con la forma dimérica de la proteína unida a dos moléculas de ADN-horquilla, que se ve aún más favorecido por el aumento de la concentración de proteína. Finalmente al aumentar la concentración a 10 μ M se observa la formación de un complejo de gran tamaño molecular, superando el límite de resolución del gel, lo cual se mantiene a medida que aumenta la concentración de proteína. Estos resultados dan cuenta de la capacidad de FoxP1 para formar complejos moleculares con el ADN, los cuales se pueden observar principalmente a concentraciones de proteína desde 2 μ M, sin embargo, por el tamaño molecular de las especies formadas, no es posible determinar si está ocurriendo o no la formación de horquillas, ni tampoco se puede descartar la posibilidad de que se estén formando complejos de mayor tamaño o condensados moleculares (Figura 9B).

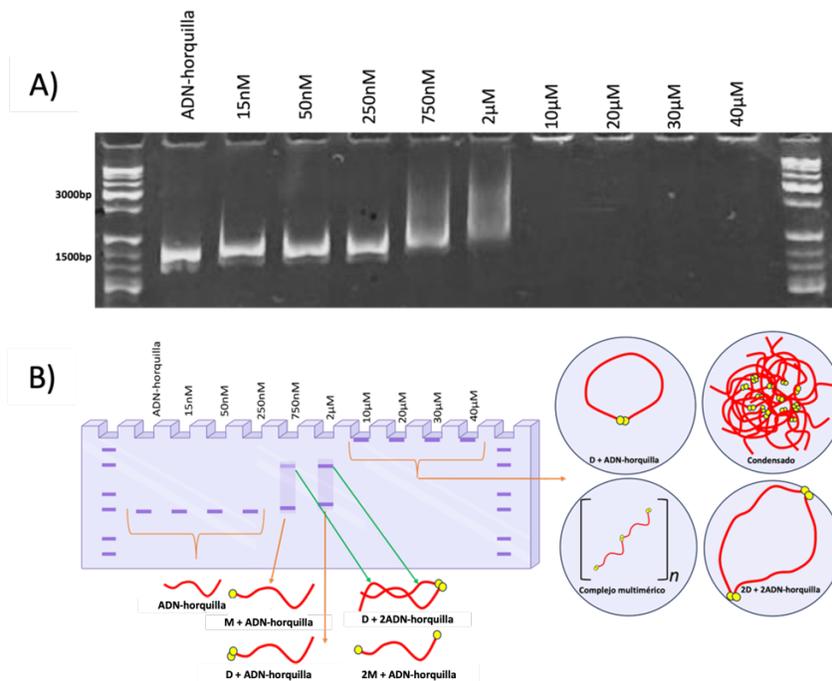


Figura 10. EMSA en gel de poliacrilamida al 6%. A) Se muestra la migración del ADN-horquilla en función de la concentración de las proteínas usadas en esta investigación. De izquierda a derecha se observa: Estándar de tamaño molecular, ADN-horquilla, FoxP1 Δ (15nM – 40 μ M), estándar de peso molecular. B) Ilustración esquemática de los distintos complejos formados por FoxP1 (amarillo) en su estado monomérico (M) o dimérico (D) con el ADN-horquilla (rojo), de acuerdo con sus respectivos tamaños y patrones de migración. Para las bandas de que representan un tamaño molecular que excede el límite se han representado los posibles complejos moleculares que podrían dar cuenta de este comportamiento (ver discusión).

6. Discusión

En esta investigación se examinaron las características funcionales del factor de transcripción humano FoxP1, poniendo énfasis en su interacción con el ADN y capacidad de unir regiones distantes del ADN a través de un modelo de estudio *in vitro* basado en la formación de horquillas de ADN. Además, se puso especial atención en comprender el rol que juega el dominio enriquecido en glutaminas (Qrich), comparando el comportamiento de FoxP1 con la mutante de delección FoxP1 Δ Qrich, y con el dominio *Forkhead* (FKH(A39P)) de unión a ADN aislado.

6.1 Estado oligomérico de FoxP1

El análisis por cromatografía de exclusión molecular reveló dos especies con radios hidrodinámicos de 54Å y 36Å, cuyo pesos moleculares correspondientes extraídos son de 175kDa y 76kDa. Estos hallazgos apuntan a la existencia de formas monomérica y dimerica de FoxP1, predominando la forma monomérica en todas las concentraciones examinadas. A partir de estos datos, se elaboró una curva que relaciona la concentración de dímero y monómero² a partir del análisis de los cromatogramas obtenidos, permitiendo la cuantificación de las poblaciones de dímeros y monómeros mediante análisis de ajuste gaussiano, a través del cual se estimó una constante de disociación (K_d) de la proteína en aproximadamente 14 μ M. Este valor representa un incremento considerable en la K_d en comparación con FoxP1 Δ Qrich, cuya K_d es aproximadamente 0,02 μ M (Cruz y cols. 2023). Se ha sugerido que los dominios intrínsecamente desordenados influyen en las interacciones intermoleculares de los factores de transcripción (Brodsky, Jana, y Barkai 2021; Exequiel Medina y cols. 2020; Sabari y cols. 2018). En concordancia con esta perspectiva y los resultados obtenidos, es plausible que el dominio Qrich module la dimerización de FoxP1, disminuyendo intrínsecamente la dimerización de la proteína, subrayando su papel regulador en las interacciones moleculares.

6.2 Afinidad de FoxP1 por el ADN

La afinidad de FoxP1 por el ADN fue investigada a través de la interacción con ADN-ligando conjugado con Alexa flúor 488, evaluando cambios en la anisotropía en función de la concentración de proteína. Se empleó un modelo de dos estados para analizar los datos, el cual considera la formación de complejos proteína-ADN a partir de sus componentes libres. Utilizando este enfoque, se determinaron las constantes de disociación (K_D y $K_{D(0,5)}$)

para FoxP1 y FoxP1 Δ Qrich respectivamente, obteniendo un valor de $2,5 \pm 0,25 \mu\text{M}$. Este valor es considerablemente más alto que el de FoxP1 Δ Qrich, que es de $0,36 \pm 0,12 \mu\text{M}$, lo que implica que el dominio Qrich influye en la unión de FoxP1 al ADN y en su dimerización. Estos hallazgos concuerdan con la literatura, la cual sugiere que los dominios intrínsecamente modulan la afinidad y la actividad de las proteínas hacia el ADN.

Además, la anisotropía de FoxP1 siguió un perfil hiperbólico de 0 a 20 μM con un factor de Hill de $1,2 \pm 0,2$, lo que no permite tener certezas sobre si el comportamiento de unión a ADN es no cooperativa. En contraste, FoxP1 Δ Qrich exhibió una curva de anisotropía sigmoide con un factor de Hill de $2,2 \pm 0,6$, indicativo de una unión cooperativa. Dado que la K_d de la proteína es de aproximadamente 20nM y considerando el rango de concentraciones estudiadas (0 a 600nM), es plausible que la acumulación del dímero de FoxP1 Δ Qrich sea un factor importante en su afinidad por el ADN. En ese sentido, es interesante el efecto que tiene el dominio Qrich en la proteína, cambiando su comportamiento de un cooperativo a uno no cooperativo. Esto probablemente tenga relación con la modulación de la dimerización de FoxP1, que al verse desfavorecido, el comportamiento observado corresponde principalmente a la formación del complejo monómero-ADN de FoxP1, que mantendría una afinidad constante por el ligando. En ese sentido se ha demostrado previamente que la unión del ADN a FoxP1 Δ Qrich estabiliza los dominios FKH en el dímero *in vitro* (Cruz y cols 2023). Esto, en conjunto con los resultados expuestos da cuenta de que la formación del complejo FoxP1-ADN es un proceso dinámico, que podría estar interconectado con el equilibrio monómero \rightleftharpoons dímero de la proteína a través de un complejo sistema de regulación, el cual podría estar siendo modulado por el dominio Qrich.

Por otro lado, la diferencia en el tamaño de los complejos formados se sugiere a partir de la amplitud de las curvas de anisotropía, siendo de $\sim 1,4$ para FoxP1 Δ Qrich-ADN ligando y de $\sim 1,25$ para FoxP1-ADN ligando. Se debe considerar que un aumento en la anisotropía del ADN estaría indicando la formación de un complejo de mayor radio hidrodinámico, por lo que FoxP1 Δ Qrich-ADN ligando forma un complejo de mayor tamaño que FoxP1, a pesar de la falta del dominio Qrich. Este fenómeno podría explicarse por la predominancia de la forma monomérica de FoxP1, según lo indican los datos de SEC (Figura 4), implicando que los cambios en anisotropía se deben a la formación de complejos FoxP1 (monómero)-ADN ligando. Por otro lado, FoxP1 Δ Qrich tiende a permanecer como

dímero en el rango de concentraciones examinado, formando complejos tipo FoxP1 Δ Qrich₂-ADN₂.

Los ensayos de movilidad electroforética (EMSA) confirmaron la mayor afinidad de FoxP1 Δ Qrich por el ADN. Como se muestra en la Figura 6A, FoxP1 Δ Qrich modifica el patrón de corrida electroforética del ADN ligando a concentraciones de proteína de 1 μ M en el límite inferior del rango de concentraciones analizado. Por otro lado, aunque no se observan cambios notables en FoxP1 a bajas concentraciones, al incrementarla entre 10 μ M y 50 μ M, surge una banda de alto peso molecular que se intensifica con la concentración, lo cual sugiere la formación de complejos FoxP1-ADN. A partir de la intensificación de las bandas en el gel con el aumento de la concentración de proteína, se deduce que la formación de estos complejos es dependiente de la acumulación del dímero de FoxP1 y/o de la formación de complejos moleculares de mayor tamaño. Una forma de resolver esta hipótesis sería realizar ensayos de EMSA con ADN ligando utilizando geles de menor porcentaje, con el fin de aumentar la resolución a pesos moleculares mayores. Sin embargo, en esta investigación se optó por utilizar la migración del ADN libre (bajo peso molecular) para evaluar la fracción de ADN unido.

Los resultados entonces sugieren que la interacción de FoxP1 con el ADN está altamente influenciada por la acumulación de complejos multiméricos, dentro de lo cual podría incluir la formación de condensados moleculares *in vitro*, teniendo en cuenta la capacidad de los dominios Qrich para regular interacciones intermoleculares y promover la formación de estos condensados. Este comportamiento podría estar siendo favorecido a medida que aumenta la concentración de FoxP1, fomentando la condensación del ADN con la proteína mediante interacciones inespecíficas entre los dominios Qrich, considerando además que la distribución y densidad de carga en las moléculas de ADN puede afectar sus interacciones con otras biomoléculas, como proteínas o ARN, lo que a su vez puede influir en la separación de fases (Fraccia y Zanchetta 2021). A través de estos resultados se plantea una visión más compleja de los mecanismos que regulan las interacciones FoxP1-ADN y con un rol crucial de los dominios Qrich en estos procesos.

6.3 Caracterización de complejos moleculares FoxP1-ADN

Después de completar la caracterización funcional de FoxP1, se llevó a cabo un análisis detallado de su capacidad para formar complejos tipo horquilla, realizando ensayos EMSA para analizar los complejos que FoxP1, FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P) podrían formar con el ADN- Δ horquilla (Figura 8A). En este sentido, el ADN- Δ horquilla fue diseñado debido a que elimina la posibilidad de generar horquillas en presencia de la proteína, ya que posee un único sitio de unión para FoxP1.

Durante el análisis se identificaron complejos conformados por las proteínas en sus estados monoméricos o diméricos, así como aquellos que contenían una o dos moléculas de ADN- Δ horquilla. Los resultados revelaron que, cuando las diferencias en los complejos estaban vinculadas al tamaño de las proteínas que se unen al ADN- Δ horquilla, los cambios observados eran sutiles, observándose pequeñas variaciones en la distancia de migración entre los complejos formados por FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P) a una concentración de 2 μ M. Estas diferencias se relacionarían con la ausencia del dominio cremallera de leucina (LZ) en FKH(A39P). En ese sentido, al analizar en detalle el carril correspondiente a FKH(A39P) a una concentración de 2 μ M se muestra una banda que se ubica ligeramente por encima de la migración del ADN- Δ horquilla aislado, y otra, aunque menos evidente, a 3kpb, dando cuenta de la formación de un complejo formado por FKH(A39P) en su forma dimérica, unida a dos moléculas de ADN, interesantemente, esto ocurre pese a que la mutación A39P aumente considerablemente la K_d de la proteína, por lo que la unión del ADN podría estar favoreciendo la dimerización de FKH(A39P). Por otro lado, FoxP1 Δ Qrich exhibió bandas similares pero con una migración levemente menor debido a su mayor tamaño derivado de la presencia del dominio LZ, por lo que también estaría formando complejos FoxP1 Δ Qrich(monómero)-ADN Δ horquilla y FoxP1 Δ Qrich(dímero)-ADN Δ horquilla₂. Estos resultados corroboran al menos la hipótesis sobre la habilidad de las proteínas FoxP de unir dos moléculas de ADN en su estado dimérico, algo excepcional dentro de la familia.

En el caso de FoxP1, solo se observa una banda de alto peso molecular que supera el límite de resolución del estándar de tamaño molecular. Dado que el ADN empleado para este ensayo no puede formar horquillas y las bandas correspondientes a la unión de dos moléculas de ADN-horquilla son claramente visibles en los carriles de FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P) a 3 kpb, es plausible que se esté formando un complejo multimérico de mayor tamaño y complejidad, como un tetrámero unido a cuatro moléculas de ADN o un

condensado molecular (Figura 8B). Esta última opción no se descarta, ya que se ha informado que los dominios intrínsecamente desordenados de los factores de transcripción suelen modular este tipo de procesos biológicos mediante interacciones inespecíficas, en este caso, entre los dominios Qrich de las proteínas en solución y el ADN- Δ horquilla, así también, se ha reportado que los dominios ricos en glutaminas favorecen la tetramerización del factor de transcripción TLE1 (Brotsky, Jana, y Barkai 2021; S. Wang y cols. 2011).

Al analizar estos resultados se concluye que los cambios en la migración del ADN están primordialmente determinados por la cantidad de moléculas de ADN- Δ horquilla involucradas en la formación del complejo (una o dos). Mientras que la unión de proteínas o complejos proteicos de distinto tamaño generan cambios en menor grado, aunque visibles de todas maneras.

Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el análisis de la formación en los ensayos de EMSA, permitiendo discernir entre cambios ocasionados por el tamaño neto del complejo y alteraciones relacionadas con cambios topológicos del ADN, como la formación de horquillas.

6.4 Formación de horquillas

La caracterización de los complejos FoxP1-ADN Δ horquilla continuó con un análisis de la formación de complejos tipo horquilla mediante ensayos de EMSA, donde se monitorearon las alteraciones en la migración del ADN-horquilla a distintas concentraciones de FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P). La electroforesis sugiere la existencia de cuatro complejos moleculares diferenciados. A 150nM de FoxP1 Δ Qrich, se detectó una banda que migraba ligeramente por encima del ADN-horquilla solo, sugiriendo un complejo de ADN-horquilla ligado a dos monómeros de FoxP1 Δ Qrich. Al elevar la concentración a 300nM, la migración disminuyó aún más, indicando un posible desplazamiento hacia la formación de un complejo dimérico, consistente con la unión de ADN a dos dímeros de FoxP1 Δ Qrich.

A 750nM, se distinguen dos bandas adicionales. La primera, correspondiente a un complejo molecular de 3kpb, esto denota la formación de un ensamblaje que incorpora dos moléculas de ADN-horquilla, presumiblemente unidas en sus extremos a un dímero de FoxP1 Δ Qrich, lo cual explica su migración levemente reducida. La segunda banda, de un tamaño molecular mayor y fuera del rango de resolución estándar, plantea la hipótesis de

un cambio topológico en el ADN-horquilla, manifestando un patrón de migración anómalo. La magnitud de este desplazamiento, junto con la banda similar pero con migración levemente mayor en FKH(A39P), sugiere la formación de un complejo tipo horquilla en lugar de un condensado molecular, una interpretación respaldada por las diferencias de tamaño entre las proteínas (Figura 9B), lo cual sería difícil de distinguir en caso de que la especie formada sea un condensado.

Estos hallazgos corroboran la formación de complejos proteína-ADN horquilla y demuestran la capacidad de FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P) para inducir horquillas en el ADN. En ese sentido, se debe considerar que la formación del dímero de FKH(A39P) podría estar siendo favorecida por su concentración, pese a su K_d aumentada, mientras que el equilibrio $\text{FKH(A39P)} + \text{ADN} \rightleftharpoons \text{FKH(A39P)-ADN}$ estaría siendo favorecido hacia la formación del complejo dado que a una concentración de 300nM hay una proporción estequiométrica de 20:1 (proteína:ADN), por lo que la unión de una molécula de ADN al dímero es mayormente plausible que la unión de dos moléculas.

Finalmente, se estudió a través de EMSA la formación de complejos tipo horquilla entre FoxP1 y el ADN-horquilla (Figura 10A), lográndose analizar la formación de distintos ensamblajes moleculares (Figura 10B). A 750nM, se observó un complejo de migración ligeramente menor que el ADN-horquilla, indicativo de un monómero de FoxP1 unido al ADN. Al aumentar la concentración a 2 μ M, se visualizó una migración reducida que podría corresponder a un complejo formado por un dímero de FoxP1 unido al ADN-horquilla o dos monómeros unidos cada uno a un sitio de unión. También, a 750nM y más pronunciada a 2 μ M, se notó una banda a 3 kpb, concordante con un complejo de dos moléculas de ADN-horquilla unidas a un dímero de FoxP1. Es interesante analizar la diferencia en los patrones de migración entre ADN-horquilla y ADN- Δ horquilla, lo que puede atribuirse a una mayor estabilización de FoxP1 con el ADN-horquilla, sugiriendo que la interacción específica con sus sitios de unión, promueve la formación de complejos estables, lo cual ha sido demostrado para FoxP1 Δ Qrich (Cruz y cols. 2023). En contraste, la interacción con ADN- Δ horquilla, podría favorecer interacciones inespecíficas con el dominio Qrich de FoxP1 y otros dominios Qrich libres en solución, conduciendo a la formación de condensados o a la separación de fases líquido-líquido, y a ensamblajes de gran tamaño molecular, ya que la disponibilidad de un único sitio de unión para el ADN disminuye la posibilidad de dimerización y formación de complejos estables. En ese sentido, el ADN-horquilla estaría

favoreciendo la formación de estos complejos *in vitro* al aumentar la concentración local de proteína cuando estas se unen simultáneamente a sus dos secuencias de unión.

Por otro lado, a concentraciones de proteína de $10\mu\text{M}$ a $40\mu\text{M}$, se detectó exclusivamente una banda de gran tamaño, superando la resolución del estándar, lo que refuerza la idea de que se esté formando un complejo multimérico de gran tamaño o un condensado molecular, especialmente considerando que la concentración de ADN permanece constante y la de proteína es sustancialmente superior, por lo que la concentración de proteína estaría facilitando la interacción inespecífica entre sus regiones intrínsecamente desordenadas y el ADN, promoviendo la formación de un condensado.

A partir de estos resultados se pudo determinar que la formación de horquillas de ADN a través de la interacción con FoxP1 es un fenómeno multifactorial, que involucra una serie de equilibrios que implican tanto la transición de la proteína desde su estado monomérico al estado dimérico, como su unión con el ADN, con el dominio Qrich como modulador central de estos procesos moleculares. Basándose en los resultados, el modelo de estudio plantea que hay dos vías principales mediante las cuales es posible la formación de un complejo tipo horquilla (Figura 11).

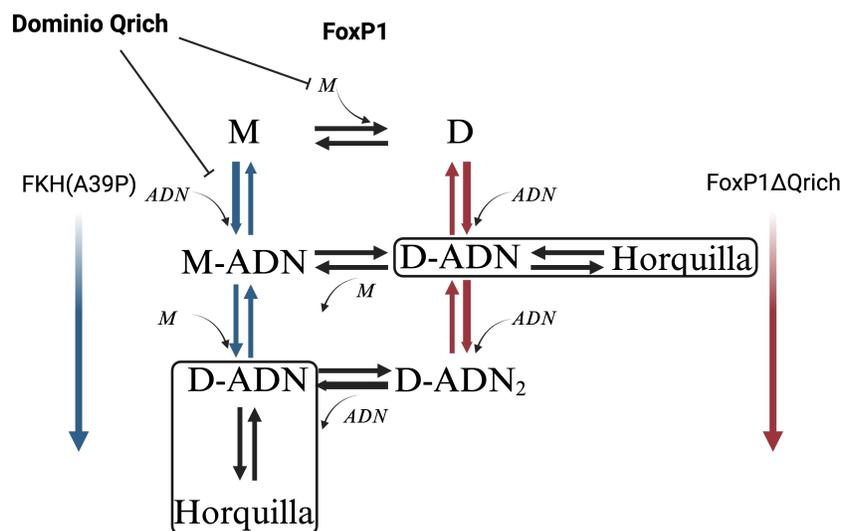


Figura 11. Vías de formación del complejo FoxP1-ADN. Con la letra M se representan las especies monoméricas de FoxP1, y con la letra D se representan las especies dimericas. En azul se indica la vía de formación comandada por la unión de un monómero de FoxP1 al ADN, favorecida en FKH(A39P). En rojo se representa la vía comandada por la formación del dímero de FoxP1 y eventual unión de dos moléculas de ADN, favorecida en FoxP1ΔQrich. El dominio Qrich (esquina superior izquierda) estaría inhibiendo la dimerización de FoxP1 y también disminuyendo su afinidad de este FT por el ADN, y por lo tanto, actuando como regulador de la vía formación del complejo tipo horquilla destacado en el cuadro negro.

La primera vía se caracteriza por la formación inicial del complejo FoxP1 (Monómero)-ADN, donde en ese caso, la unión del ADN-horquilla podría estar favoreciendo la transición de la proteína desde el estado monomérico al estado dimérico debido al aumento de la concentración local de proteína, favoreciendo su dimerización y provocando también la formación de una horquilla de ADN. Esta vía se ve representada en el modelo de estudio al analizar el comportamiento de FKH(A39P), que tiene una constante de disociación aumentada con respecto al dominio FKH en su estado nativo, pero que mantiene su alta afinidad por el ADN. A pesar de esto su dimerización estaría siendo facilitada indirectamente por la interacción con el ADN y de esta manera, la formación de complejos tipo horquilla de acuerdo con el análisis de los ensayos de EMSA.

La segunda vía de formación del complejo tipo horquilla está comandada por la formación del dímero de FoxP1, en ese caso se ve favorecido el reclutamiento de dos moléculas de ADN simultáneamente. Sin embargo, a medida que la concentración de proteína aumenta, la disponibilidad de sitios de unión del ADN-horquilla, se ve limitada, por lo que se favorece la formación del complejo FoxP1 Δ Qrich-ADN (con una sola molécula de ADN), mientras que el estado dimérico de la proteína se mantiene, favoreciendo entonces un cambio topológico del ADN por la unión de cada uno de los sitios de unión al dímero y la formación de un complejo tipo horquilla. Por otro lado, también se abre la posibilidad de formación de un complejo de dímeros concatenados con el ADN-horquilla (Figura 10B), sin embargo, esto es poco probable, precisamente por la baja disponibilidad de ADN en solución.

De acuerdo con los resultados de esta investigación, ambas vías estarían siendo reguladas por el dominio Qrich, que al estar presente aumenta considerablemente el valor de la constante de disociación del dímero de FoxP1 y también del complejo FoxP1-ADN. Sin embargo, es evidente la formación de un complejo FoxP1-ADN, constatado a través de bandas en los ensayos de EMSA que superan el límite de resolución del estándar. En ese sentido, emerge la posibilidad de una tercera vía de asociación, gobernada principalmente por interacciones inespecíficas que se dan principalmente entre las regiones intrínsecamente desordenadas de FoxP1, como el dominio rico en glutaminas. Precisamente, al aumentar la concentración FoxP1 en los ensayos de EMSA solo es posible observar un complejo de alto peso molecular que excede el límite de resolución del estándar

de ADN, estas bandas no siguen un cambio sutil en la migración proporcional al tamaño de la proteína en sí, a diferencia de las bandas visibles a altas concentraciones de FoxP1 Δ Qrich y FKH(A39P). En ese sentido, se ha reportado que las regiones desordenadas de los factores de transcripción funcionan como moduladores de la función transcripcional, regulando aspectos como la afinidad de las proteínas con el ADN y su capacidad de multimerización, además, se ha descrito que a través de interacciones inespecíficas, ya sea, con el ADN o con otros componentes proteicos de la cromatina, los factores de transcripción son capaces de generar condensados moleculares a través de un mecanismo molecular denominado separaciones de fase líquido-líquido (Hyman, Weber, y Jülicher 2014; Wagh, Garcia, y Upadhyaya 2021).

Finalmente, se deben considerar aspectos técnicos de esta investigación, que son importantes para conocer el alcance real de la información recabada en los experimentos. Si bien los ensayos de anisotropía y EMSA permiten dilucidar aspectos importantes de la interacción entre FoxP1 y el ADN, como la influencia que tiene el dominio Qrich en estos procesos, y la formación de complejos moleculares de distinta conformación, se debe considerar que estos experimentos no son capaces de resolver fenómenos moleculares en condiciones de equilibrio, ya que a medida que avanza la corrida electroforética ocurren cambios en las concentraciones de ADN y proteína que deben ser tomados en cuenta. De todas maneras, debido a la alta concentración de proteína en comparación a la del ADN, la interacción entre FoxP1 y el ADN se ve altamente favorecida en la mayoría de las condiciones experimentales propuestas, por lo que la disminución de la concentración de proteína a medida que avanza la corrida electroforética probablemente no sea suficiente para revertir el equilibrio y desencadenar la disociación de los complejos formados en las condiciones iniciales del experimento.

Por otro lado, no fue posible optimizar la corrida electroforética empleando geles de poliacrilamida al 10% para permitir la resolución del estándar de peso molecular propiamente. A pesar de esto se usó como parámetro la banda del ADN-ligando individual a 1 μ M como referencia para determinar la fracción de ADN libre y por tanto la formación del complejo proteína-ADN, entendiendo que los cambios en el patrón de corrida del ADN individual dan cuenta de la formación del complejo, y que estos además se correlacionan con la información que se tenía previamente de las proteínas, como su afinidad por el ADN, determinada con los experimentos de anisotropía.

De esta forma, el modelo experimental empleado permitió determinar la afinidad de FoxP1 por el ADN y explorar su capacidad de unión de regiones distantes del ADN y la formación de complejos tipo horquilla. En ese sentido, la hipótesis se rechaza, puesto que el dominio Qrich disminuye la afinidad de FoxP1 con el ADN y no es posible concluir que este favoreciendo la interacción entre regiones distantes del ADN. Sin embargo, los resultados obtenidos plantean un mecanismo de interacción complejo, que requiere de un análisis experimental más acabado para determinar si FoxP1 puede generar esta clase de cambios topológicos en el ADN, además del papel que estaría jugando el dominio Qrich en este proceso. Una proyección interesante para esta línea de investigación sería el análisis del acercamiento de los sitios de unión del ADN-horquilla ubicados en los extremos del constructo a través de su marcaje y análisis mediante técnicas de molécula única como single molecule FRET (smFRET), para determinar a través de la detección directa de transferencia de energía, el efecto que podría tener FoxP1 en la topología del ADN y determinar si los complejos propuestos según los resultados de los ensayos de EMSA corresponden precisamente a conformaciones de tipo horquilla.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que el dominio Qrich tiene una influencia significativa en la capacidad de dimerización de FoxP1, concomitantemente afectando la afinidad de este factor de transcripción por el ADN. Aunque estos fenómenos parecen estar estrechamente correlacionados, se hace imperativo llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la dinámica de interacción de esta proteína para validar dicha relación.

En otro contexto, el modelo de estudio basado en la interacción entre FoxP1 y el ADN-horquilla ha proporcionado una visión esclarecedora sobre la formación de complejos de tipo horquilla. En este sentido, si bien los resultados no indican la posibilidad de que el dominio Qrich favorezca el acercamiento de regiones distantes del ADN, se requiere una exploración más profunda en la caracterización de los posibles complejos formados entre FoxP1 y el ADN-horquilla. Esto podría lograrse mediante la optimización de la resolución de los ensayos de (EMSA) o la aplicación de técnicas experimentales que permitan determinar el tamaño de complejos macromoleculares de gran envergadura. Además, no se puede descartar la posibilidad de que el dominio Qrich esté modulando un mecanismo altamente dinámico y complejo de interacción con el ADN, que incluye interacciones inespecíficas con otros cofactores y componentes característicos de la cromatina, formando complejos supramoleculares de gran tamaño y/o condensados a través de un mecanismo de separaciones de fase líquido-líquido. Sin embargo, es importante destacar que estos experimentos corresponden a ensayos *in vitro*, los cuales suponen condiciones minimalistas respecto a la complejidad y heterogeneidad macromolecular que puede observarse en el interior de una célula.

En última instancia, este proyecto de investigación ha contribuido significativamente a la comprensión de la dinámica de interacción entre FoxP1 y el ADN, revelando el carácter modulador del dominio Qrich. Estos hallazgos proporcionan una guía valiosa para futuras investigaciones, orientadas a dilucidar la compleja red de regulación de este factor de transcripción. En este sentido, se recomienda la optimización del modelo de estudio utilizado y la aplicación de técnicas experimentales avanzadas para caracterizar de manera exhaustiva complejos y condensados macromoleculares.

8. Bibliografía

- Berlow, Rebecca B., H. Jane Dyson, y Peter E. Wright. 2015. "Functional advantages of dynamic protein disorder". *FEBS Letters* 589(19): 2433–40.
- Bernetti, M., A. Cavalli, y L. Mollica. 2017. "Protein–ligand (un)binding kinetics as a new paradigm for drug discovery at the crossroad between experiments and modelling". *MedChemComm* 8(3): 534–50. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/md/c6md00581k> (25 de diciembre de 2023).
- Bigarella, Carolina L. & cols. 2017. "FOXO3 transcription factor is essential for protecting hematopoietic stem and progenitor cells from oxidative DNA damage". *Journal of Biological Chemistry* 292(7): 3005–15. <http://www.jbc.org/article/S0021925820407379/fulltext> (16 de abril de 2023).
- Brodsky, Sagie, Tamar Jana, y Naama Barkai. 2021. "Order through disorder: The role of intrinsically disordered regions in transcription factor binding specificity". *Current Opinion in Structural Biology* 71: 110–15.
- Chen, Songming y cols. 2002. "Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics". *Biochemistry* 41(23): 7391–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12044172/> (9 de diciembre de 2023).
- Chen, Yongheng y cols. 2015. "DNA binding by FOXP3 domain-swapped dimer suggests mechanisms of long-range chromosomal interactions". *Nucleic Acids Research* 43(2): 1268–82. <https://academic.oup.com/nar/article/43/2/1268/2414772> (16 de abril de 2023).
- Chu, Yuan Ping y cols. 2011. "Solution structure and backbone dynamics of the DNA-binding domain of FOXP1: Insight into its domain swapping and DNA binding". *Protein Science* 20(5): 908–24.
- Co, Marissa, Ashley G. Anderson, y Genevieve Konopka. 2020. "FOXP transcription factors in vertebrate brain development, function, and disorders". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 9(5): e375. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wdev.375> (16 de abril de 2023).
- Cruz, Perla y cols. 2023. "Domain tethering impacts dimerization and DNA-mediated allostery in the human transcription factor FoxP1". *Journal of Chemical Physics* 158(19).
- Darnell, James E. 2002. "Transcription factors as targets for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer* 2:10 2(10): 740–49. <https://www.nature.com/articles/nrc906> (8 de diciembre de 2023).
- Ferland, Russell J. y cols. 2003. "Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain". *Journal of Comparative Neurology* 460(2): 266–79. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cne.10654> (16 de abril de 2023).
- Fraccia, Tommaso P., y Giuliano Zanchetta. 2021. "Liquid–liquid crystalline phase separation in biomolecular solutions". *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 56: 101500.
- Garza, Anna S., Nihal Ahmad, y Raj Kumar. 2009. "Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation". *Life Sciences* 84(7–8): 189–93.
- Gemayel, Rita y cols. 2015a. "Variable Glutamine-Rich Repeats Modulate Transcription Factor Activity". *Molecular Cell* 59(4): 615–27. <http://www.cell.com/article/S1097276515005341/fulltext> (16 de abril de 2023).
- . 2015b. "Variable Glutamine-Rich Repeats Modulate Transcription Factor Activity". *Molecular Cell* 59(4): 615–27.
- Golson, Maria L., y Klaus H. Kaestner. 2016a. "Fox transcription factors: from development to disease". *Development* 143(24): 4558–70. <https://journals.biologists.com/dev/article/143/24/4558/47609/Fox-transcription-factors-from-development-to> (17 de abril de 2023).
- . 2016b. "Fox transcription factors: from development to disease". *Development* 143(24): 4558–70. <https://journals.biologists.com/dev/article/143/24/4558/47609/Fox-transcription-factors-from-development-to> (16 de abril de 2023).
- Guerra, Rosalinda F. y cols. 2007. "DNA compaction by the nuclear factor-Y". *Biophysical Journal* 93(1): 176–82.

- Häußermann, Katharina, Gavin Young, Philipp Kukura, y Hendrik Dietz. 2019. "Dissecting FOXP2 Oligomerization and DNA Binding". *Angewandte Chemie* 131(23): 7744–49. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ange.201901734> (17 de abril de 2023).
- Hiramatsu, Naoko y cols. 2012. "Interaction between isolated transcriptional activation domains of Sp1 revealed by heteronuclear magnetic resonance". *Protein Science* 21(10): 1481–88.
- Hyman, Anthony A., Christoph A. Weber, y Frank Jülicher. 2014. "Liquid-liquid phase separation in biology". *Annual review of cell and developmental biology* 30: 39–58.
- Iakoucheva, Lilia M. y cols. 2004. "The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation". *Nucleic Acids Research* 32(3): 1037–49. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh253> (9 de diciembre de 2023).
- Imafuku, Ichiro y cols. 1998. "Polar Amino Acid-Rich Sequences Bind to Polyglutamine Tracts". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253(1): 16–20.
- Kaestner, Klaus H. 2010. "The FoxA factors in organogenesis and differentiation". *Current Opinion in Genetics & Development* 20(5): 527–32.
- Kim, Seungsoo, y Jay Shendure. 2019. "Mechanisms of Interplay between Transcription Factors and the 3D Genome". *Molecular Cell* 76(2): 306–19.
- Koon, Henry B, Gregory C Ippolito, Alison H Banham, y Philip W Tucker. 2007. "FOXP1: a potential therapeutic target in cancer".
- Kumar, Mohan B. y cols. 2001. "The Q-rich Subdomain of the Human Ah Receptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity". *Journal of Biological Chemistry* 276(45): 42302–10. <http://www.jbc.org/article/S0021925819830922/fulltext> (24 de diciembre de 2022).
- Lambert, Samuel A. y cols. 2018. "The Human Transcription Factors". *Cell* 172(4): 650–65.
- Latchman, D. S. 1997. "Transcription factors: An overview". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29(12): 1305–12.
- Lee, Catherine S., Joshua R. Friedman, James T. Fulmer, y Klaus H. Kaestner. 2005. "The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors". *Nature* 2005 435:7044 435(7044): 944–47. <https://www.nature.com/articles/nature03649> (16 de abril de 2023).
- Legendre, Matthieu, Kevin J Verstrepen, y K U Leuven. 2010. "Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory Sequences". <https://www.researchgate.net/publication/46109533> (23 de diciembre de 2022).
- Li, Shanru, Joel Weidenfeld, y Edward E. Morrisey. 2023. "Transcriptional and DNA Binding Activity of the Foxp1/2/4 Family Is Modulated by Heterotypic and Homotypic Protein Interactions". <https://doi.org/10.1128/NCB.24.2.809-822.2004> 24(2): 809–22. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/NCB.24.2.809-822.2004> (16 de abril de 2023).
- Liberati, Chiara, Alberto di Silvio, Sergio Ottolenghi, y Roberto Mantovani. 1999. "NF-Y binding to twin CCAAT boxes: role of Q-rich domains and histone fold helices". *Journal of Molecular Biology* 285(4): 1441–55.
- LiCata, Vince J., y Andy J. Wowor. 2008. "Applications of Fluorescence Anisotropy to the Study of Protein–DNA Interactions". *Methods in Cell Biology* 84: 243–62.
- Lu, Ling, Joseph Barbi, y Fan Pan. 2017. "The regulation of immune tolerance by FOXP3". *Nature Reviews Immunology* 2017 17:11 17(11): 703–17. <https://www.nature.com/articles/nri.2017.75> (16 de abril de 2023).
- Lundell, Leonidas S. y cols. 2019. "Regulation of glucose uptake and inflammation markers by FOXO1 and FOXO3 in skeletal muscle". *Molecular Metabolism* 20: 79–88.
- Matsumoto, Michihiro y cols. 2007. "Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver". *Cell Metabolism* 6(3): 208–16.
- Medina, E y cols. 2016. "Elucidating the domain swapping mechanism of the forkhead domain of human FoxP1". *FEBS JOURNAL* 283: 223–223.
- Medina, E y cols. 2016. "Three-Dimensional Domain Swapping Changes the Folding Mechanism of the Forkhead Domain of FoxP1". *Biophysical Journal* 110(11): 2349–60.
- Medina, E y cols. 2019. "The protonation state of an evolutionarily conserved histidine modulates domain swapping stability of FoxP1". *Scientific Reports* 2019 9:1 9(1): 1–11. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41819-5> (2 de diciembre de 2023).
- Medina, E y cols. 2020. "Intrinsically Disordered Regions of the DNA-Binding Domain of Human FoxP1 Facilitate Domain Swapping". *Journal of Molecular Biology* 432(19): 5411–29.

- Minezaki, Yoshiaki, Keiichi Homma, Akira R. Kinjo, y Ken Nishikawa. 2006. "Human Transcription Factors Contain a High Fraction of Intrinsically Disordered Regions Essential for Transcriptional Regulation". *Journal of Molecular Biology* 359(4): 1137–49.
- Moparthi, Lavanya, y Stefan Koch. 2020. "A uniform expression library for the exploration of FOX transcription factor biology". *Differentiation* 115: 30–36.
- Morris, Gavin, y Sylvia Fanucchi. 2016. "A Key Evolutionary Mutation Enhances DNA Binding of the FOXP2 Forkhead Domain". *Biochemistry* 55(13): 1959–67.
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biochem.5b01271> (16 de abril de 2023).
- Nagai, Yoshitaka y cols. 2000. "Inhibition of Polyglutamine Protein Aggregation and Cell Death by Novel Peptides Identified by Phage Display Screening". *Journal of Biological Chemistry* 275(14): 10437–42.
- Nakae, Jun, Tadahiro Kitamura, David L. Silver, y Domenico Accili. 2001. "The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression". *The Journal of Clinical Investigation* 108(9): 1359–67.
- Perutz, Max. 1994. "Polar zippers: Their role in human disease". *Protein Science* 3(10): 1629–37.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.5560031002> (24 de diciembre de 2022).
- Reijns, Martin A.M., Ross D. Alexander, Michael P. Spiller, y Jean D. Beggs. 2008. "A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization". *Journal of Cell Science* 121(15): 2463–72. <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.024976> (9 de diciembre de 2023).
- Ren, Bing, Kerlen J. Chee, Tae Hoon Kim, y Tom Maniatis. 1999. "PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins". *Genes & Development* 13(1): 125–37. <http://genesdev.cshlp.org/content/13/1/125.full> (9 de diciembre de 2023).
- Sabari, Benjamin R. y cols. 2018. "Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control". *Science* 361(6400).
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aar3958> (9 de diciembre de 2023).
- Senior, Karita Ojala y cols. 2016. "Molecular Characterization of FOXP2 in Neurodevelopment and Disorder". *Proceedings of the Master's Programme Cognitive Neuroscience of the Radboud University* 11(1): 65–91.
- Seo, Seungwoon y cols. 2006. "The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development". *Developmental Biology* 294(2): 458–70.
- Shu, Weiguo y cols. 2007. "Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development". *Development* 134(10): 1991–2000.
<https://journals.biologists.com/dev/article/134/10/1991/52767/Foxp2-and-Foxp1-cooperatively-regulate-lung-and> (16 de abril de 2023).
- Stefan, Melanie I., y Nicolas Le Novère. 2013. "Cooperative Binding". *PLOS Computational Biology* 9(6): e1003106.
<https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003106> (25 de diciembre de 2023).
- Stroud, James C. y cols. 2006. "Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA". *Structure* 14(1): 159–66. <http://www.cell.com/article/S0969212605004338/fulltext> (16 de abril de 2023).
- Su, Wen, Stephen Jackson, Robert Tjian, y Harrison Echols. 1991. "DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1." *Genes & Development* 5(5): 820–26. <http://genesdev.cshlp.org/content/5/5/820> (10 de diciembre de 2023).
- Thulo, Monare y cols. 2021. "The influence of various regions of the FOXP2 sequence on its structure and DNA-binding function". *Bioscience Reports* 41(1).
</bioscirep/article/41/1/BSR20202128/227301/The-influence-of-various-regions-of-the-FOXP2> (17 de abril de 2023).
- Wagh, Kaustubh, David A. Garcia, y Arpita Upadhyaya. 2021. "Phase separation in transcription factor dynamics and chromatin organization". *Current Opinion in Structural Biology* 71: 148–55.
- Wang, Bin, Danjuan Lin, Chuan Li, y Philip Tucker. 2003. "Multiple Domains Define the Expression and Regulatory Properties of Foxp1 Forkhead Transcriptional Repressors". *Journal of Biological Chemistry* 278(27): 24259–68.
<http://www.jbc.org/article/S0021925820868768/fulltext> (5 de diciembre de 2022).

Wang, Su y cols. 2011. "Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of the human TLE1 Q domain". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43(2): 149–53. <https://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmq116> (9 de diciembre de 2023).