



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE METACASPASA EN *Nicotiana*
tabacum L.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEXIS ACOSTA MASPONS

TUTOR: Dr. MARIO ROCHA SOSA[†], IBT, UNAM

Dra. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES, IBT, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS, FQ, UNAM

Dra. GLADYS ILIANA CASSAB LOPEZ, IBT, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE METACASPASA EN *Nicotiana tabacum* L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEXIS ACOSTA MASPONS

TUTOR: Dr. MARIO ROCHA SOSA[†], IBT, UNAM

Dra. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES, IBT, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS, FQ, UNAM

Dra. GLADYS ILIANA CASSAB LOPEZ, IBT, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme dado la posibilidad de superarme tanto en lo profesional como lo personal, así como todo el apoyo brindado durante este tiempo.

En segundo lugar, quisiera agradecer a todas las Instituciones que estuvieron involucradas de una forma u otra en el financiamiento de mi proyecto de investigación: 1- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por haberme otorgado una beca doctoral, así como haber financiado parte del proyecto (Proyecto no. 58761). 2- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todos los recursos puestos a mi disposición. 3- Al IFS (International Foundation of Science), quien financió parte del proyecto de investigación (C-4702-1).

En tercer lugar, agradecer a todos los Doctores que formaron parte de mi Comité Tutor. Muy en especial al Dr. Mario Rocha Sosa, quien fue tutor, guía y compañero durante la mayor parte del tiempo. Muchas gracias también al resto del Comité, la Dra. Alejandra Covarrubias, Dra. Gladys Cassab y Dr. Jorge Vázquez.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Primeramente y de manera muy especial, al Dr. Mario Rocha Sosa, por haberme aceptado como su estudiante de doctorado, por haber sido más que un tutor un amigo, por todo el apoyo que me brindó en los momentos difíciles, pero también por todas las alegrías y buenos momentos que compartimos juntos. Lamentablemente el Doc. no llegó hasta el final de este viaje, los caminos de la vida no solo son difíciles sino llenos de injusticia. Gracias por todo Doc.

En segundo lugar, quisiera agradecer a toda mi familia, en especial a mi mamá, hermana y sobrina, pero también a todas mis tías y primas locas, porque la mayor parte de mi vida la he tenido que pasar lejos de ellos para cumplir con metas profesionales y, desafortunadamente ese tiempo no se recupera. El sacrificio ha sido gigante pero las recompensas también.

En tercer lugar, a mi “coco” que más que jefa ha sido mi amiga por tantos años, porque juntos compartimos muchas alegrías, pero también muchas tristezas, por el apoyo y la confianza que siempre me tuvo y porque fue con ella que empezó este largo viaje que hoy termina. Un agradecimiento especial al Yase, por tantos años de amistad y por cuidar tan bien de mi coco.

En cuarto lugar, a mi gran amigo “el negro” hoy el “Dr. Black”, a quien le agradezco infinitamente toda la presión que siempre puso en mí y en el proyecto de investigación para que concluyera en tiempo. Por todas las mañanas y tips que me enseñó en el laboratorio, por

tantas buenas charlas de 5 y 6 horas, por las cáscaras interminables de voly. Junto a él, agradecerle a la que algún día será la Dra. Terexita y al próximo Maestro en Ciencias “La Pepona”, por la amistad de tantos años.

A mi hermana “la negra” por tantos y tantos años de amistad y cariño, por esos sobrinos tan hermosos e inteligentes que me dio y porque si hoy estoy aquí es gracias a ella.

También agradecer a todo el personal del laboratorio que compartió conmigo durante estos años: el Dr. Fernando Lledías, Paty Rueda, Dra. Elizabeth Córdoba, a Maricela, al Dr. Arturo, la Dra. Cynthia, Doña Lurdes, Paty Jarillo, al Chicu, Marel, Luis, Ernesto, y a todos los estudiantes que desfilaron por nuestro lab: Viri, Vivi, Elsa, Karime, Herón, Aned, Carlos, Lola, el Parse y muchos más.

A todos mis amigos del Instituto, pero muy en especial a Gigi, porque siempre se preocupó por mí, porque siempre estuvo ahí cuando la necesité. Agradecimientos especiales también para la toda la banda del voly por tantos fines de semana q me hicieron sudar, muy en especial al Cucu, el Cui, Itzcoatl, Negrardo, Daniela, Michin, Carlita, Ojito, Aime, Inti, Centauro y tantas y tantos más.

Un agradecimiento especial a la Secretaria Técnica Lilia Espinosa y las auxiliares del posgrado Gabriela Diego y María Rodríguez, por haber estado siempre muy al pendiente de mis trámites. Así como a la secre del departamento Adriana Monserrat, por tantos años de buena amistad.

A todos mis ex compañeros de trabajo de la Universidad de la Habana, muy en especial a mis dos grandes profesoras, Ana Rosa Casanova y Rina Pedrol, por todas las enseñanzas que me dieron. También a Marlyn, Laurita, Alenna, Clarita, Xonita, Tonny, Berovides, Leneidys y todo el resto del departamento de Biología Vegetal.

A mis amigos, Alejandro Rojas y Ricardo Giniebra, porque siempre han estado ahí cuando necesitaba apoyo para continuar, porque a pesar de la distancia los sigo queriendo igual.

A todos los que de una forma u otra han sido parte de mi vida y que por diferentes razones ya no están o no forman parte de ella, pero que sin dudas contribuyeron a mi formación personal y profesional, a todos muchísimas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	3
IV. ANTECEDENTES	4
IV. 1. Generalidades de las proteasas.....	4
IV. 1. 1. Mecanismo catalítico general de las proteasas tipo cisteíno.....	6
IV. 1. 2. Proteasas tipo cisteíno en plantas.....	8
IV. 1. 3. Regulación de la expresión génica.....	9
IV. 2. Muerte Celular Programada.....	10
IV. 2. 1. Apoptosis.....	11
IV. 2. 2. Apoptosis en plantas.....	15
IV. 2. 3. Metacaspasas.....	17
IV. 2. 3. 1. Propiedades catalíticas de las metacaspasas.....	20
IV. 2. 3. 2. Similitudes y diferencias entre caspasas y metacaspasas.....	22
IV. 2. 3. 3. Papel de las metacaspasas en la muerte celular programada.....	23
IV. 2. 3. 4. Modelos propuestos para las metacaspasas.....	26
IV. 2. 3. 5. Filogenia de las metacaspasas.....	28

IV. 3. <i>Nicotiana tabacum</i> L. como modelo de estudio.....	29
IV. 4. Aspectos generales de bioinformática.....	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
V.1. Material Vegetal.....	35
V. 2. Extracción de ácidos nucleicos.....	36
V.2.1. Extracción de ADN genómico.....	36
V.2.2. Extracción de ARN total.....	36
V.3. Generación de la secuencia completa de <i>NtMCI</i>	37
V.3.1. Secuencia complementaria de <i>NtMCI</i>	37
V.3.2. Estructura génica de <i>NtMCI</i>	38
V.4. Análisis computacional de la secuencia de <i>NtMC1</i>	38
V.5. Construcción de plásmidos.....	39
V.6. Mutagénesis dirigida.....	41
V.7. Inducción en <i>Escherichia coli</i>	42
V.8. Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	43
V.9. Determinación de la actividad enzimática.....	43
V.10. Extracción y análisis de proteínas a partir de material vegetal.....	44
V.11. Generación de anticuerpos anti-NtMC1.....	45
V.12. Purificación de la proteína.....	46
V.13. Ensayos de inmunoprecipitación.....	47
V.14. Secuenciación de la proteína.....	47

VI. RESULTADOS	49
VI.1. Identificación de una secuencia de metacaspasa en <i>Nicotiana tabacum</i> L.....	49
VI.2. Caracterización bioinformática de la secuencia obtenida.....	50
VI.2.1. Cálculo de parámetros físicos-químicos.....	50
VI.2.2. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con proteínas anotadas en bases de datos.....	51
VI.2.3. Determinación de las relaciones filogenéticas.....	56
VI.2.4. Cálculo de la estructura tridimensional de la proteína deducida.....	58
VI.2.5. Predicción de sitios de fosforilación.....	60
VI.2.6. Predicción de sitios de O-glicosilaciones.....	60
VI.3. Análisis de la estructura génica.....	61
VI.4. Caracterización bioquímica de la proteína.....	62
VI.4.1. Confirmación experimental de las predicciones bioinformáticas.....	62
VI.4.1.2. Aminoácidos del sitio activo y sitios de corte.....	62
VI.4.1.3. Identificación de fragmentos generados por el procesamiento.....	68
VI.4.1.4. Actividad del fragmento SLP-p10.....	70
VI.4.1.5. Localización sub-celular.....	72
VI.4.1.6. Predicción de dominios transmembrana.....	74
VI.4.2. Procesamiento y estequiometría de los complejos activos.....	76
VI.4.2.1. Regulación del procesamiento.....	76
VI.4.2.2. Ensayos de complementación.....	78
VI.4.2.3. Interacción de diferentes complejos <i>in vivo</i>	80

VI.4.2.3.1. Extracción de proteínas mediante el uso de amortiguadores no desnaturalizantes.....	80
VI.4.2.3.2. Ensayos de Inmunoprecipitación.....	81
VI.5. Cinética de los complejos.....	83
VI.5.1. Actividad de <i>NtMC1</i> sobre-expresada en <i>E. coli</i>	83
VI.5.1.1. Purificación de la proteína recombinante.....	83
VI.5.1.2. El calcio como requisitos para la activación <i>in vitro</i> de <i>NtMC1</i>	88
VI.5.1.3. Actividad <i>in vitro</i> de los fragmentos p20 y p10.....	89
VI.5.1.4. Cambios en la actividad de <i>NtMC1</i> al interactuar con p20.....	91
VI.5.1.5. Cambios en la actividad de <i>NtMC1</i> al interactuar con p10.....	94
VI.5.2. Actividad <i>in vitro</i> de los mutantes de aspártico.....	95
VI.5.2.1. Procesamiento diferencial del mutante D348R.....	99
VI.5.3. Inhibición por autoprocesamiento.....	101
VI.5.4. Actividad de <i>NtMC1</i> sobre-expresada en <i>Nicotiana benthamiana</i>	103
VI.5.4.1. Tiempo de vida media de la proteína en extractos totales.....	103
VI.5.4.2. Actividad de la proteína en extractos vegetales.....	104
VI.5.4.3. Interacción <i>in vivo</i> de <i>NtMC1</i> con los fragmentos p20.....	105
VI.5.4.4. Interacción <i>in vivo</i> de <i>NtMC1</i> con los fragmentos p10.....	106
VI.6. Patrón de expresión de <i>NtMC1</i> endógena.....	107
VII. DISCUSIÓN	110
VII.1. Identificación de un gen de metacaspasa tipo II en <i>Nicotiana tabacum</i> L. y sus relaciones filogenéticas.....	109
VII.2. Caracterización bioquímica de <i>NtMC1</i>	114
VII.3. Asignación de posibles funciones y mecanismo de acción de <i>NtMC1</i>	120

VIII. CONCLUSIONES	128
IX. BIBLIOGRAFÍA	130
X. ANEXOS	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática del sitio activo de una proteasa.....	5
Figura 2.- Mecanismo catalítico de las proteasas tipo cisteíno.....	7
Figura 3.- Representación esquemática de la arquitectura de las caspasas y metacaspasas	13
Figura 4.- Representación esquemática de las dos vías de inducción de muerte celular programada en un célula.....	14
Figura 5.- Representación esquemática de los dominios de caspasas y metacaspasas.....	19
Figura 6.- Representación esquemática de la arquitectura de las metacaspasas tipo III.....	19
Figura 7.- Comparación de la estructura secundaria de la caspasa 8 humana y la metacaspasa 9 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Figura 8.- Modelo de activación post-traducciona l de las metacaspasas tipo I y II.....	27
Figura 9.- Resultados obtenidos con el programa BLAST.....	51
Figura 10.- Alineamiento de secuencias de metacaspasas de plantas.....	55
Figura 11.- Dendrograma de las peptidasas de la familia C14 y de las secuencias similares a NtMC1.....	57
Figura 12.- Resultados del alineamiento de proteínas obtenido mediante el programa METASERVER.....	58
Figura 13.- Modelo 3D de las subunidades p20 y p10 obtenidas con el METASERVER y el JPRED.....	59
Figura 14.- Modelo 3D de las subunidades p20 y p10 mediante el software Phyre 2.....	60
Figura 15.- Esquema de las combinaciones de cebadores empleados para determinar la presencia de intrones en el gen de <i>NtMC1</i>	61
Figura 16.- Resultados de las electroforesis de los productos del PCR.....	62
Figura 17.- Representación esquemática del gen <i>NtMC1</i>	63
Figura 18.- Resultados de la sobre-expresión en <i>E .coli</i> de <i>NtMC1</i>	64
Figura 19.- Resultados de la expresión transitoria de <i>NtMC1</i> en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
Figura 20.- Resultado del alineamiento múltiple de la región de <i>NtMC1</i> que contiene los posibles sitios de corte R187 y K224.....	66
Figura 21.- Resultado del Western blot donde se analiza el mutante K224A.....	66

Figura 22.- Resultado del Western blot donde se observa a <i>NtMC1</i> y sus variantes mutantes en los sitios de corte y sitio activo.....	67
Figura 23.- Representación esquemática de los diferentes fragmentos de <i>NtMC1</i>	68
Figura 24.- Resultado del Western blot de la sobre-expresión de los fragmentos en <i>E. coli</i>	69
Figura 25.- Resultado del Western blot de la sobre-expresión de los fragmentos en <i>Nicotiana benthamiana</i>	70
Figura 26.- Sobre-expresión el fragmento SLP-p10 en <i>E. coli</i>	70
Figura 27.- Coomassie y Western blot de precipitados y sobrenadante de un cultivo de <i>E. coli</i> que sobre-expresa el fragmento SLP-p10.....	71
Figura 28.- Resultado del programa SIGNALP 3.0 con el método SIGNALP-NN.....	73
Figura 29-A.- Expresión y localización de <i>NtMC1</i> fusionada a GFP.....	75
Figura 29-B.- Western blot anti-GFP a partir de extractos totales de proteína.....	76
Figura 30.- Western blot de extractos de proteínas obtenidos con diferentes amortiguadores.....	76
Figura 31.- Ensayo para determinar la naturaleza del corte en <i>NtMC1</i>	77
Figura 32.- Ensayo para determinar la naturaleza del corte en <i>NtMC1</i> mediante fusiones con GFP.....	78
Figura 33.- Ensayo de complementación de <i>NtMC1</i>	79
Figura 34.- Extracción de proteínas totales de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante el empleo de diferentes amortiguadores.....	80
Figura 35.- Expresión de las diferentes construcciones con doble epítipo para el ensayo de inmunoprecipitación.....	82
Figura 36.- Resultados del ensayo de inmunoprecipitación de <i>NtMC1</i>	82
Figura 37.-Coomassie de <i>NtMC1</i> luego del primer paso de purificación mediante cromatografía de afinidad.....	84
Figura 38.- Resultados obtenidos a partir de la secuenciación del zimógenos.....	85
Figura 39.- Western blot de muestras de <i>NtMC1</i> purificada mediante exclusión de peso molecular.....	86
Figura 40.- Westerns blots a partir de geles desnaturalizantes y nativos de <i>NtMC1</i> expresada en <i>E. coli</i>	87
Figura 41.- Autoprocésamiento de <i>NtMC1</i> dependiente de calcio.....	88
Figura 42.- Actividad relativa de <i>NtMC1</i> y K224A en extractos totales.....	89

Figura 43.- Actividad relativa de las diferentes subunidades de la metacaspasa en un ensayo <i>in vitro</i>	90
Figura 44.- Ensayo de actividad de <i>NtMC1</i> mezclado con diferentes versiones de p20.....	91
Figura 45.- Ensayo de actividad de <i>NtMC1</i> mezclado con versiones mutadas de p20.....	92
Figura 46.- Efecto del sustrato en la interacción de <i>NtMC1</i> con la subunidad p20.....	93
Figura 47.- Ensayo de actividad de <i>NtMC1</i> mezclado con diferentes versiones de p10.....	94
Figura 48.- Actividad enzimática de <i>NtMC1</i> y las versiones mutantes C139V, D348R, D353R y D348RD353R sobre-expresadas en <i>E.coli</i>	96
Figura 49.- Ensayo de actividad en extractos bacterianos de <i>NtMC1</i> -HA y las formas mutadas D353R-HA y C139V-HA.....	97
Figura 50.- Ensayo de actividad en extractos bacterianos de <i>NtMC1</i> -HA y las formas mutadas D25A-HA y D137A-HA.....	98
Figura 51.- Ensayo de actividad en extractos bacterianos de <i>NtMC1</i> -HA y las formas mutadas D353R-HA y D348R-HA.....	99
Figura 52.- Sobre-expresión de <i>NtMC1</i> y las variantes mutadas en los aspárticos 348 y 353 tanto por argininas como por alaninas.....	100
Figura 53.- Ensayo de actividad en extractos bacterianos de <i>NtMC1</i> -HA, D353A-HA, D348A-HA, el doble mutante y C139V-HA.....	100
Figura 54.- Efecto de la pre-incubación con cloruro de calcio sobre la actividad y procesamiento de <i>NtMC1</i>	102
Figura 55.- Análisis de la estabilidad de <i>NtMC1</i>	103
Figura 56.- Actividad enzimática de <i>NtMC1</i> en extractos vegetales.....	104
Figura 57.- Interacción de <i>NtMC1</i> con las variantes de p20 en un sistema <i>in vivo</i>	105
Figura 58.- Interacción de <i>NtMC1</i> con las variantes de p10 en un sistema <i>in vivo</i>	106
Figura 59.- Patrón de expresión de metacaspasas endógenos en <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i> parecidas a <i>NtMC1</i>	108
Figura 60.- Patrón de expresión de metacaspasas endógenas en diferentes órganos de <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i>	109
Figura 61.- Esquema de la estructura génica de los seis genes de metacaspasas tipo II de <i>Arabidopsis thaliana</i>	114
Figura 62.- Fragmento de la secuencia de la región unidora de <i>NtMC1</i>	117
Figura 63.- Representación esquemática de dos zimógenos de <i>NtMC1</i>	119

Figura 64.- Modelo propuesto para <i>NtMC1</i>	127
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resumen de las diferentes funciones en las que se han identificado a las metacaspasas.....	25
Tabla 2.- Lista de cebadores empleados para identificar la presencia de intrones en <i>NtMC1</i>	38
Tabla 3.- Lista de cebadores empleados para generar las diferentes variantes de los fragmentos p20 y p10.....	40
Tabla 4.- Lista de cebadores empleados para generar las diferentes variantes de mutantes puntuales de <i>NtMC1</i>	41
Tabla 5.- Resultados obtenidos a partir de la comparación de la secuencia <i>NtMC1</i> con las proteínas anotadas en la base de datos no redundantes de NCBI mediante el programa BLAST.....	51
Tabla 6.- Datos de las secuencias aminoacídicas utilizadas para determinar las relaciones filogenéticas de <i>NtMC1</i> con peptidasas de la familia C14.....	57
Tabla 7.- Resultados de NetPhosK 1.0 realizado a la secuencia de <i>NtMC1</i>	61

RESUMEN

En plantas, la muerte celular programada (PCD, del inglés Programed Cell Death) ocurre durante diferentes procesos de desarrollo como la xilogénesis, formación del parénquima, senescencia de las hojas, desarrollo de las semillas, embriogénesis y numerosos procesos reproductivos (Pennel *et al.*, 1997; Gray, 2004). En el año 2000 y tras la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*, Uren y colaboradores describen un grupo de genes que denominó metacaspasas y que codifican para proteínas cuya estructura secundaria es muy similar al de las caspasas animales. *NtMC1* es una metacaspasa de tipo II de *Nicotiana tabacum* L. que se expresa constitutivamente en varios órganos de la planta como raíz, tallo, hojas, meristemo y flores. Por ello es muy posible que su nivel de regulación sea a nivel post-traducciona, autoprocésándose intramolecularmente en la lisina 224 localizada en la región unidora, la cual también es importante para garantizar la interacción entre las subunidades p20 y p10 y así formar un sitio activo funcional. Además, *in vitro* el procesamiento es favorecido por calcio y la activación del complejo es totalmente dependiente de la presencia del catión en el medio. Sin embargo, en un sistema *in vivo* no se conoce cuál es el factor que potencia el autoprocésamiento o activa el complejo. Los datos obtenidos sugieren que en condiciones normales la forma activa es un monómero p20p10 pero una vez activado el complejo parece poder interactuar con otras subunidades p20 formando sitios activos alternativos, lo que se traduce en un aumento de actividad. Por otro lado, el fragmento SLP-p10 generado posee una potente actividad lítica sobre *E.coli*, por lo que podría constituir una molécula efectora contra diferentes patógenos.

ABSTRACT

In plants, programmed cell death (PCD) occurs during different development processes as xylogenesis, parenchyma formation, leaf senescence, seed development, embryogenesis and many reproductive processes (Pennel *et al.*, 1997; Gray., 2004). In 2000 and after a complete sequencing of *Arabidopsis thaliana* genome, Uren and colleagues describe a group of genes called Metacaspases, those genes encoding proteins with secondary structure very similar to animal's caspases. *NtMC1* is a *Nicotiana tabacum* L. type II metacaspase constitutively expressed in various organs of the plant such as: root, stem, leaves, meristem and flowers. It is therefore quite possible that the level of regulation is a post-translational level, exhibiting intramolecular self-processing at 224 lysine located in the linker region, which is also important to ensure the interaction between p20 and p10 subunits to form a functional active site. In addition, *in vitro* the self-processing is favored by calcium and activation of the complex is entirely dependent of the presence in the medium of this cation. However, in an *in vivo* system it is not known which is the factor that enhances or activates the self-processing of the complex. The data obtained in this work suggest that under normal conditions the active form is a monomer (p20p10) but once the complex is activated appears to interact with other p20 subunits forming an alternative active sites, resulting in an increased activity. Furthermore, the SLP-p10 fragment generated by the cleave in K224 has potent lytic activity against *E. coli*, so that could be an effector molecule against different pathogens.

I. INTRODUCCIÓN

Los cambios climáticos a nivel global han agudizado las diferentes formas de estrés. Esto repercute negativa y primariamente en los cultivos y, por tanto, en la economía de muchos países. En tal sentido, la identificación y caracterización de genes relacionados con los mecanismos de respuesta a estrés constituyen una de las líneas de investigación priorizadas para contribuir al conocimiento y mejoramiento genético de los cultivos.

Con este objetivo, se han llevado a cabo diferentes ensayos para determinar la inducción de genes involucrados en las vías de respuesta a estrés biótico y abiótico, como es el caso de las metacaspasas. Estas proteínas constituyen proteasas del tipo cisteínico (Uren *et al.*, 2000), cuya función celular y mecanismo molecular no está del todo dilucidado. Se ha documentado su participación en la muerte celular programada, asociándose directamente a la embriogénesis y diferentes respuestas de estrés bióticos y abióticos (Suarez *et al.*, 2004., Hao *et al.*, 2006; Bozhkov *et al.*, 2005, Watanabe y Lam, 2011b). Actualmente existe todo un debate sobre si las metacaspasas constituyen o no los ortólogos de las caspasas animales. De las mismas existen dos grandes grupos: tipo I y II. Estos se diferencian, fundamentalmente, por la presencia de un propeptido hacia el N-terminal solo en las de tipo I. Además, se ha propuesto que el sitio activo está formado por aminoácidos de las subunidades p20 y p10 en ambos tipos y la activación del zógeno se da por cortes específicos. Sin embargo, las señales que desencadena la activación no se conocen.

Se han descrito nueve genes de metacaspasas en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, tres que pertenecen al tipo I (Atmc1- Atmc 3) y los otros seis son del tipo II (Atmc 4 - Atmc 9). Sin embargo, para el género *Nicotiana*, dentro del cual se encuentran especies ampliamente utilizadas como modelos en estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares, solamente existe un informe parcial de un gen de una metacaspasa tipo II para *Nicotiana benthamiana* (Hao *et al.*,2006).

Además, el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) constituye uno de los renglones de exportación más importante de varios países. Las mejoras de las características organolépticas de sus variedades, ha conllevado a una pérdida significativa en la variabilidad genética y, por consiguiente, al aumento en la susceptibilidad ante diferentes condiciones de estrés. Es por ello que, deducir posibles funciones de las metacaspas en el tabaco, a partir de caracterizaciones *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, permitirá no solo mejorar la comprensión de las complejas interacciones que se establecen entre las plantas y el entorno, sino desarrollar nuevos sistemas que potencien la resistencia de las mismas ante las diferentes condiciones de estrés.

II. HIPÓTESIS

La metacaspasa de tipo II de *Nicotiana tabacum* L. es una cisteín-proteasa cuya actividad para el corte de su(s) sustrato(s) en los residuos K/R, está regulada por interacción directa entre las subunidades p20 y p10 así como por un autoprocesamiento.

III. OBJETIVOS

III. 1. Objetivo General

Caracterización bioquímica de un nuevo gen de metacaspasa tipo II en *Nicotiana tabacum* L.

III. 2. Objetivos específicos:

1. Identificar genes funcionales de metacaspasas en *N. tabacum* L., mediante RT-PCR en plantas sometidas a estrés abiótico.
2. Caracterizar la secuencia obtenida mediante bioinformática, aplicando búsquedas de dominios conservados, alineamiento múltiple de secuencias, análisis filogenético y modelación 3D.
3. Analizar la estructura génica y patrón de expresión del nuevo gen identificado para comprender la evolución y posible función de estos genes.
4. Caracterizar la proteína mediante técnicas bioquímicas para confirmar las predicciones bioinformáticas y conocer su mecanismo de acción.

IV. ANTECEDENTES

IV. 1. Generalidades de las proteasas.

Los procesos fisiológicos esenciales para la supervivencia de los organismos vivos, generalmente involucran eventos de biosíntesis, activación y degradación de proteínas. Todos estos fenómenos implican la escisión de los enlaces peptídicos de numerosas proteínas y péptidos, reacción catalizada por las enzimas proteolíticas, conocidas también como proteasas o proteinasas. Dada su importancia en la escisión de los enlaces peptídicos, estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Neurath, 1989; Barrett *et al.*, 1998; Tyndall *et al.*, 2005).

Las proteasas pueden clasificarse atendiendo a diversos parámetros, tales como: especificidad por el sustrato, modo de acción, mecanismo catalítico, localización intracelular y función en el organismo, entre otros. De acuerdo al modo de acción y de forma análoga a otras hidrolasas (McNaught, 1997), las proteasas pueden clasificarse en endopeptidasas y exopeptidasas. Las primeras son aquellas que llevan a cabo la hidrólisis en el interior de la cadena polipeptídica y las segundas hidrolizan los enlaces peptídicos de los extremos amino (aminopeptidasas) o carboxilo (carboxipeptidasas) de las proteínas. Según la naturaleza del residuo aminoácido esencial para la catálisis, estas enzimas se clasifican en proteasas de tipo: serino, cisteíno, metalo, aspártico, treonino y glutámico (Rawlings *et al.*, 2006; Tyndall *et al.*, 2005).

El método de clasificación de acuerdo a la especificidad por el sustrato, sigue las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y se expresa por el número EC (del inglés *Enzyme Commission number*). Las proteasas tienen el código EC 3.4.c.d, donde los dígitos 3 y 4 significan que estas enzimas catalizan una reacción del tipo hidrólisis y que se escinde un enlace peptídico, respectivamente. En los restantes dígitos: c representa la subclase de acuerdo al modo de acción (endopeptidasa o exopeptidasa) y la naturaleza del

aminoácido reactivo (serino, cisteína, metalo o aspártico); y **d** es un número consecutivo de cada enzima dentro de la subclase (Barrett, 1997; Bairoch, 2000).

De manera general, los sitios de la enzima que acomodan los grupos del sustrato se designan como $S_n \dots S_2, S_1, S_1', S_2' \dots S_n'$. Estos se enumeran desde el extremo N hasta el C-terminal, donde S_1 y S_1' son las regiones más cercanas al enlace hidrolizado (Berger y Schechter, 1967). De modo análogo los residuos del sustrato se designan como $P_n \dots P_2, P_1, P_1', P_2' \dots P_n'$ (entre los residuos P_1 y P_1' se encuentra el enlace hidrolizable) (Barret, 1986) (Figura 1).

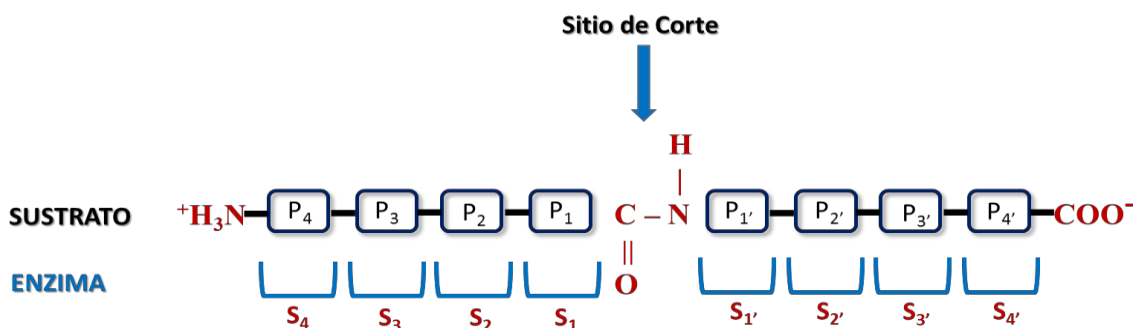


Figura 1: Representación esquemática del sitio activo de una proteasa según Schechter y Berger, 1967. El enlace peptídico comprendido entre las posiciones P_1 y P_1' es escindido por la enzima. En la identificación de la posición P_1 son importantes los aminoácidos de las posiciones P_2, P_3 y P_4

Sobre la base de la relación secuencia-estructura-función de las proteasas, se propuso una clasificación en diferentes familias de acuerdo al valor de identidad de secuencia aminoacídica en la región relacionada con la actividad catalítica. Las familias con estructura 3D similar se agrupan además en clanes (Barrett, 1986; Barrett *et al.*, 2001). Esta clasificación se encuentra implementada en la base de datos MEROPS, actualmente en su versión 9.13 (Rawlings *et al.*, 2014), que se

encuentra accesible en el sitio de Internet <http://merops.sanger.ac.uk>, lo que permite una actualización periódica de las familias y los clanes.

Las plantas contienen cientos de genes que codifican proteasas, sus actividades responden a diferentes estímulos internos y externos, dentro de los que se encuentran la deshidratación y el shock térmico. Además, desempeñan funciones en la regulación de procesos biológicos, entre ellos el reconocimiento de patógenos y la inducción de respuestas de defensa contra estos, siendo evidente una relación entre la inducción de proteasas y los mecanismos de defensa (Sanmartín *et al.*, 2005).

Así por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis* están codificadas alrededor de 50 familias diferentes de proteasas, divididas en 27 Clanes. Entre las familias descritas se han asociado numerosas proteasas con posibles funciones en respuestas de defensa, estando mayormente representadas en la Clase C (proteasas tipo cisteíno).

La mayoría de las proteasas tipo cisteíno de plantas conocidas pertenecen a la familia de las papaínas (C1) y las legumaínas (C13). Recientemente han sido encontradas en plantas abundantes miembros de la familia C14 (proteasas tipo cisteíno similares a caspasas) y de la familia C19 (ubiquitin proteasa), involucrada en la vía de desubiquitinación de las proteínas en el proteosoma (Vierstra, 2003).

IV. 1. 1. Mecanismo catalítico general de las proteasas tipo cisteíno

Las proteasas tipo cisteíno tienen un mecanismo catalítico común que involucra al grupo SH de la cisteína en una tríada catalítica (Cys, His, Asp/Asn). El ataque del nucleófilo al carbono carboxílico del enlace peptídico del sustrato lo realiza el grupo SH de la Cys, el cual es previamente desprotonado por el anillo imidazol del residuo de His, para generar el potente nucleófilo S^- . La orientación correcta del residuo de His se logra por la presencia de los residuos de Asp/Asn. Las

proteasas tipo cisteíno tiene un mecanismo de catálisis ácido-base general. El intermediario tetraédrico formado en esta reacción se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con una Gly en una cavidad oxianiónica (Menard, 1992).

La escisión del intermediario ocurre con el correspondiente reordenamiento electrónico y la liberación de la amina, mientras que la Cys del centro activo permanece acilada. La desacilación comienza con la entrada de una molécula de agua, polarizada por el anillo imidazol de la His, que complementa un segundo ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace tioéter. De la ruptura de este nuevo intermediario tetraédrico ocurre la liberación del segundo producto de la reacción, para completar así el ciclo catalítico (Figura 2) (Otto y Schirmeister, 1997). Evidencias recientes apuntan al hecho de que la transferencia protónica durante la acilación y la desacilación son eventos concertados y no secuenciales (Lecaille *et al.*, 2002).

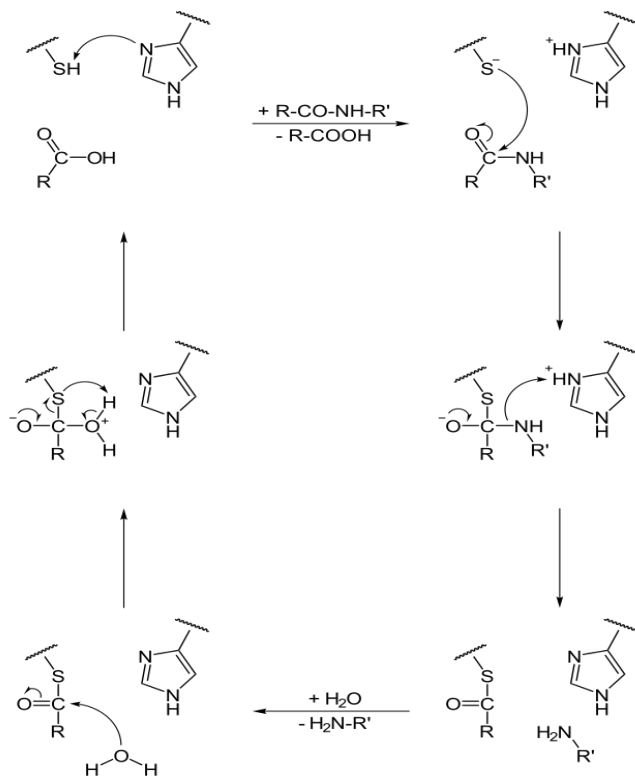


Figura 2: Mecanismo catalítico de las proteasas tipo cisteíno. El nucleófilo S⁻ ataca al carbono carboxílico del enlace peptídico en la posición P1. (Dunn, 1989).

IV. 1. 2. Proteasas tipo cisteíno en plantas.

Entre todas las proteasas tipo cisteíno de plantas la familia de las papaínas (Clase C1) ha sido la más estudiada, quizás por ser las más abundantes. Estas enzimas se caracterizan por tener el sitio activo entre dos dominios estructurales y ser sintetizadas como zimógenos. Éstos se distinguen por la presencia de una prosequencia que oscila entre los 38 – 250 aminoácidos, una secuencia señal N – terminal y una región de 220 – 260 aminoácidos que constituye la enzima madura donde se localiza el sitio catalítico. La activación de estas enzimas ocurre por una proteólisis limitada inter o intramolecular (Wiederanders, 2003). Se ha demostrado la especificidad de algunos miembros del grupo de las papaínas que escinden preferentemente los enlaces peptídicos con la fenilalanina en la posición P2 (Menard y Shutov, 1998) o la arginina en la posición P1 (Fischer *et al.*, 2000).

Por otro lado, las legumaínas (Clase C13) también son sintetizadas como zimógenos y actúan hidrolizando los enlaces peptídicos en asparaginas o aspartatos (menos eficientemente), en las posiciones P1 (Becker *et al.*, 1995). Sus funciones están asociadas al procesamiento de proteínas de las paredes celulares o vacuolares y son activas solo a pH ácido (Müntz *et al.*, 2002). Estas proteasas se conocen como Enzimas de Procesamiento Vacuolar (VPE, del inglés *Vacuolar Processing Enzymes*). En *Arabidopsis thaliana* se agrupan en vacuolas específicas de semillas (β VPE) y de órganos vegetativos (γ VPE y α VPE) (Kinoshita *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1999).

El proceso de activación de estas enzimas se produce mediante dos rupturas proteolíticas del precursor. La primera ruptura permite desplazar el sitio catalítico propio del propéptido C-terminal, el cual es capaz de autoinhibir la actividad de la enzima y, la segunda remover el péptido N-terminal que contribuye al plegamiento de la enzima (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

Finalmente, dentro de la clase C14 se ubican las proteasas tipo cisteíno parecidas a las caspasas. Estas muestran una alta especificidad por el sustrato, requiriendo un residuo de aspártico

adyacente al sitio de corte P1. La actividad tipo caspasa en plantas se ha reportado tanto en el citosol, como en vacuolas (Korthout *et al.*, 2000).

IV. 1. 3. Regulación de la expresión génica.

La expresión de los genes que codifican para las proteasas tipo cisteíno se relacionan con el estadio fisiológico de las plantas, aunque se conoce poco sobre los mecanismos y a los niveles que ocurre la regulación. De las familias de las proteasas tipo cisteíno de las que se tiene mayor información es de las legumainas y de ellas se ha descrito en la literatura que se expresan durante la maduración de las semillas y la embriogénesis temprana (Grudkowska y Zagdanska, 2004), ante el ataque de patógenos que inducen muerte celular programada o durante la senescencia, lo cual podría estar regulado a nivel transcripcional. La regulación post-traducciona es otro de los mecanismos implicados en el control de las legumainas, promoviendo la maduración de los zimógenos que son procesados en los ambientes ácidos de las vacuolas donde se localizan (Sanmartín *et al.*, 2005). De manera general se conoce que la célula puede controlar la actividad proteolítica y por tanto la PCD mediante un grupo de inhibidores (Solomon *et al.*, 1999). Entre estos existen dos grandes grupos: Los inhibidores de apoptosis (IAPs, del inglés Inhibitors of Apoptosis) y las serpinas (Thornberry y Lazebnik, 1998; Vercammen *et al.*, 2006).

IV. 2. Muerte Celular Programada.

En las plantas, así como en los metazoarios, la muerte celular programada constituye un mecanismo esencial de su ciclo de vida, involucrada desde la germinación de las semillas hasta la producción de éstas, durante la senescencia de las hojas y flores, eliminación de órganos reproductores en flores unisexuales, destrucción de la vaina, xilogénesis, formación del parénquima y otros procesos (Pennell y Lamb, 1997; van Doorn y Woltering, 2005). Además, la PCD contribuye a bloquear la invasión de patógenos biotróficos a través de la respuesta hipersensible, produciéndose muerte celular localizada en los sitios de la infección (Jones y Dangl, 2006). El origen de este proceso parece ser tan antiguo como el de la primera célula, ya que no se han logrado escindir los procesos de homeostasia celular de la maquinaria de muerte celular y además, se han observado componentes del mismo tanto en células procarióticas como eucarióticas (Lockshin y Zakeri, 2001).

Existen tres mecanismos básicos de PCD: la apoptosis, necrosis y autofagia. Originalmente, la apoptosis fue descrita como un tipo de muerte celular caracterizada por la redondez y reducción del tamaño de las células, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrhexis), la pérdida de asimetría en la composición lipídica de la membrana mostrando un exceso de fosfatidilserinas en la membrana externa e invaginaciones de la membrana plasmática hacia el citoplasma llevando a la formación de cuerpos apoptóticos que posteriormente son fagocitados por células vecinas (Kerr *et al.*, 1972). La necrosis, como muerte celular se caracteriza por el hinchamiento de las células (oncosis), dilatación de organelos y una subsecuente ruptura de la membrana citoplasmática. Mientras que la autofagia, es definida como la vacuolización del citoplasma, donde las vacuolas autofágicas contienen organelos degenerados y componentes del citosol (Festjens *et al.*, 2006).

IV. 2. 1 Apoptosis.

El término Apoptosis fue acuñado por Kerr y colaboradores en 1972 y muchas veces ha sido usado en la literatura errónea e indistintamente para referirse a muerte celular programada. Estos son dos conceptos diferentes ya que la apoptosis es un término descriptivo que hace referencia a procesos bioquímicos y cambios morfológicos específicos que se dan durante un evento de muerte celular programada, constituyendo la apoptosis una de las tantas formas de PCD, no su equivalente (Kerr *et al.*, 1972; Raff, 1992; Vaux, 1993).

Otro de los problemas afrontado en este campo fue que durante décadas se le dio un carácter dicotómico a su estudio, apoptosis vs necrosis (programado vs desordenado), llegando a constituir incluso un paradigma para muchos (de Toro, 2006). Sin embargo, nuevas investigaciones han revelado una creciente complejidad en éstos y otros nuevos procesos identificados, mostrando incluso cierta direccionalidad dentro de eventos de necrosis, los cuales se pensaba eran caóticos. Todos estos nuevos estudios han conducido al desarrollo de nuevos conceptos como: Oncosis, Parapoptosis, Catástrofe mitótica, Piroptosis, Necroptosis y Mitoptosis (Kroemer *et al.*, 2005) lo que demuestra la diversidad y complejidad de los eventos de muerte celular.

La mecánica del proceso de apoptosis en animales ha sido extensamente estudiada, existen dos formas generales de inducción: una extrínseca, donde un receptor de muerte es activado por un ligando y otra intrínseca, que involucra la liberación del citocromo c de las mitocondrias (Green y Reed, 1998). A grande rasgos, lo primero que ocurre es la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de la formación controlada del poro Bax/Bcl2, liberando al citoplasma el citocromo c, el Factor de Inducción de Apoptosis (FIA), Endo-G, Smac/Diablo y Omi/HtrA2, los cuales dirigen la formación del apoptosoma con la consiguiente activación de las caspasas iniciadoras y posteriormente las ejecutoras

(Adrain y Martin, 2001; Reape y McCabe, 2010), las cuales al procesar diferentes sustratos específicos como la PARP (Poli-ADP-ribosa polimerasa), conducen a la morfología apoptótica antes descrita (del Toro, 2006; Crawford y Wells, 2011).

Las **caspasas** (cisteín-**aspartato** proteasas) son sintetizadas como zimógenos y se distinguen por su poliespecificidad: una sola caspasa es capaz de reconocer cientos de sustratos diferentes y cortarlos con un alto grado de especificidad siempre después de un ácido aspártico. Basados en la estructura total y modo de activación, se dividen en dos tipos. El primero lo constituyen las caspasas efectoras (o ejecutoras) que son activadas por la separación proteolítica de la subunidad mayor (p20) y menor (p10), quedando como enzima activa un heterotetrámero $(p20)_2(p10)_2$ con dos sitios activos (Crawford y Wells, 2011).

En el segundo grupo se localizan las caspasas iniciadoras que poseen una prolongación hacia el N-terminal, conocida como prodominio (más de 90 aminoácidos). En esta región se localiza el/los Dominios de Reclutamiento de Caspasas (CARDs, del inglés **Caspase-Recruitment Domains**) que permiten la interacción con el apoptosoma o el Dominio Efector de Muerte (DED, del inglés **Death Effector Domain**) (Figura 3), el cual permite la interacción con receptores localizados en la membrana plasmática (Crawford y Wells, 2011). La estructura hacia la que se recluten las caspasas dependerá de la vía de muerte que se haya activado: intrínseca o extrínseca.

Para las caspasas iniciadoras se han propuesto dos mecanismos de activación, el primero se conoce como Activación inducida por proximidad: En este caso están involucradas caspasas asociadas a la vía de los receptores de muerte. El mecanismo consiste en la formación de un complejo de señalización de membrana el cual recluta, a través de sus proteínas adaptadoras, varias moléculas de procaspasas con lo que se aumenta la concentración local de zimógeno. En estas condiciones, la baja e intrínseca actividad proteasa de las procaspasas es suficiente para permitir que varias moléculas de

proenzima se corten mutuamente mediante cortes intermoleculares y se activen unas a otras (Crawford y Wells, 2011).

El segundo mecanismo se conoce como **Activación por asociación con una subunidad reguladora**: La activación de las caspasas se da por cambios conformacionales favorecidos por oligomerizaciones y no por la ruptura proteolítica como sucede en el otro caso (Fuentes-Prior y Salvesen, 2007) (Figura 4).

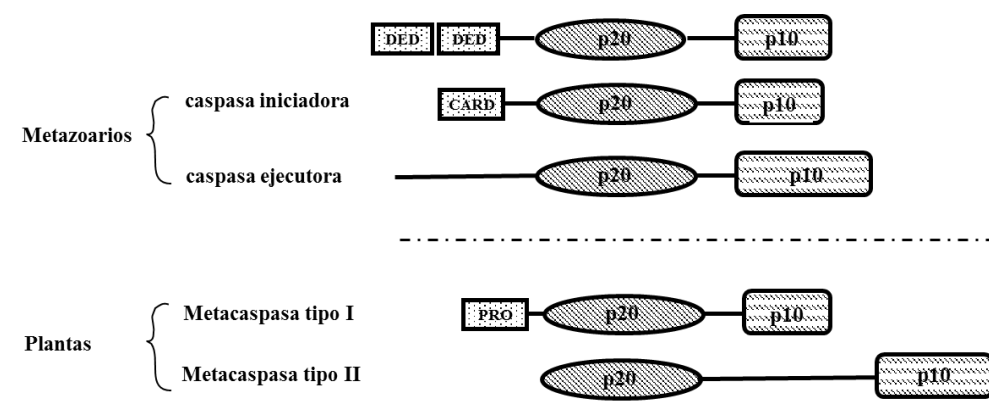


Figura 3: Representación esquemática de la arquitectura de las caspasas y metacaspasas. Básicamente están constituidos por dos subunidades conservadas, una de mayor peso molecular conocida como p20 y la menor como p10. Las caspasas iniciadoras presentan un predominio (CARD) o varios predominios (DED) hacia el amino terminal, mientras que las metacaspasas tipo I poseen dominios ricos en prolina o glutamina (PRO), lo que constituye una semejanza estructural. En el caso de las ejecutoras y las metacaspasas de tipo II este predominio no existe y la región unidora de las subunidades es mayor.

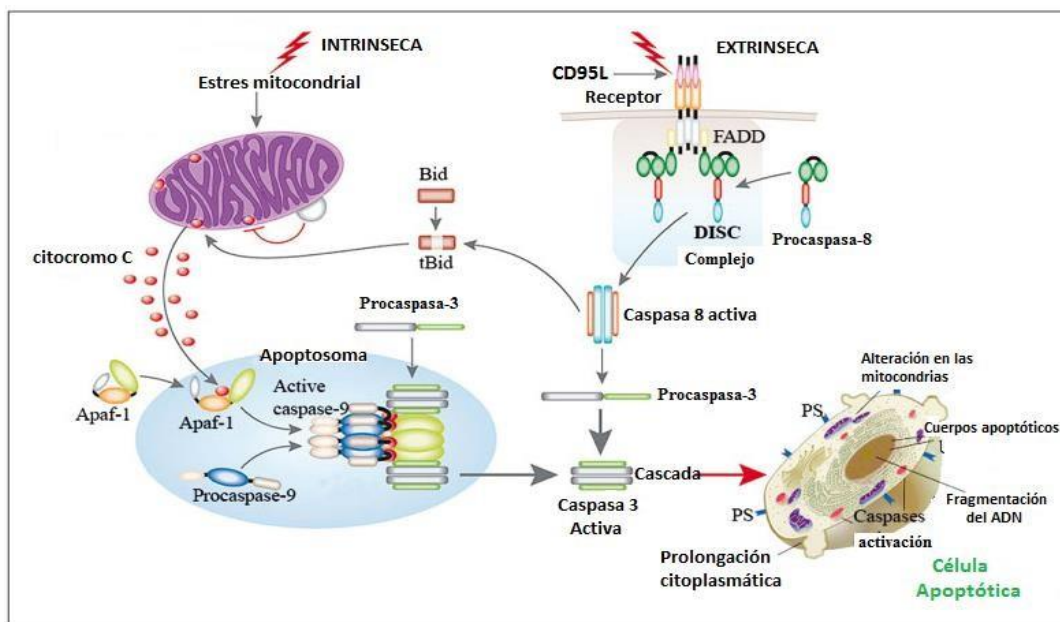


Figura 4: Representación esquemática de las dos vías de inducción de muerte celular programada en una célula. La vía intrínseca se induce por daños en el ADN y conduce a la modificación de las mitocondrias liberándose el citocromo C, lo que permite el ensamblaje del apoptosoma y activación por cambios conformacionales de un grupo de procaspasas iniciadoras. La vía extrínseca depende de señales que son censadas por receptores de muerte, esto permite la formación de un complejo donde se reclutan procaspasas que se activan por procesamiento intermolecular. Tomado de: *Apoptosis and disease: a life or death decision* (McFarlane y Williams, 2004).

Una vez activadas, las caspasas iniciadoras pueden desencadenar una cascada que conduce a la activación por proteólisis de los zimógenos de caspasas efectoras. Estas a su vez, actúan sobre diferentes sustratos, de tal modo que el resultado final es la típica morfología apoptótica (Kumar, 2007; Timmar y Salvesen, 2007). Además, se ha comprobado la participación directa de caspasas en procesos inflamatorios, de proliferación y diferenciación celulares, por lo que la idea de que la actividad caspasa está estrictamente correlacionada con la apoptosis, es incorrecta (Lamkanfi *et al.*, 2007).

IV. 2. 2. Apoptosis en plantas.

Durante la PCD en plantas se han observado similitudes con las características apoptóticas típicas de animales, como picnosis, cariorexis, ruptura del ácido desoxirribonucleico intranucleosomal, reducción de la célula y formación de cuerpos apoptóticos (van Doorn y Woltering, 2005). Sin embargo, la fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos es un evento que no ocurre en plantas, a diferencia de lo que sucede en animales. La existencia de una pared celular constituye una barrera física que impide que los cuerpos formados sean absorbidos por las células vecinas. Además, este proceso tiene una gran importancia en los animales, ya que al poseer sistema inmune si los componentes celulares son vertidos al medio extracelular podrían desencadenar una reacción autoinmune con consecuencias no deseadas (Kam, 2000). Las plantas, por el contrario carecen de tal sistema, por lo que la pared y la inexistencia de una presión selectiva marcaron a lo largo de la evolución una diferencia en el proceso de apoptosis. Se ha planteado que la célula “decide” antes de morir lo que sucederá con los cuerpos del tipo apoptóticos, posiblemente mediado por señales como etileno, citocininas, auxinas y otros elicitores (Jones, 2001).

Finalmente, los cuerpos serán procesados dependiendo del patrón de hidrolasas y toxinas que se hayan acumulado en las vacuolas antes de la muerte justamente dependiendo de las señales que haya recibido la célula. Una vez colapsadas las vacuolas el proceso es irreversible y se sabe que una de las primeras señales que detona el proceso es un flujo de iones calcio (Ca^{2+}) (Jones, 2001). Muchos de los genes que codifican para estas hidrolasas son comunes a todos los eventos de PCD, mientras que otros muestran especificidad de inducción dependiendo del tipo de muerte (Jones, 2001). Esta diferencia ha llevado a que muchos autores se refieran al proceso en plantas como **muerte celular programada del tipo apoptótica** para diferenciarla de la apoptosis de animales.

Respecto a la mecanística, en plantas se sabe que se produce una permeabilización de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación del citocromo c, pero al parecer este no interviene en el desensamblaje del núcleo y condensación de la cromatina, sino más bien en alterar la cadena transportadora de electrones y contribuir a un aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) lo que conlleva a que se activen las vías de muerte celular (Balk *et al.*, 2003).

Al no haberse encontrado ortólogos de Bcl2 en plantas posiblemente el mecanismo de permeabilización sea diferente (Reape y McCabe, 2010). La proteína endo-G se sabe va al núcleo durante la apoptosis en animales, pero no se han encontrado homólogos en plantas hasta el momento, en tanto la FIA (flavoproteína con actividad NADH oxidasa) también va a núcleo durante la muerte y produce fragmentación del ADN de una manera caspasa-independiente (Susin *et al.*, 1999). En plantas se han identificado 5 homólogos cercanos, sin embargo, la ausencia del dominio C-terminal de unión al ADN sugiere que no tiene una función pro-apoptótica sino más bien en el metabolismo activo de ROS (Yamada *et al.*, 2009).

El cloroplasto constituye otro punto de diferenciación del proceso respecto a los animales, al parecer este orgánulo contribuye a elevar las ROS bajo determinadas señales de estrés, la cual conduce a formas de muerte como necrosis (si los niveles son muy altos de ROS) o a las del tipo apoptótico si son menores (Reape y McCabe, 2010), sin embargo, se requiere de más datos para entender completamente la relación de éste con los eventos de muerte.

Uno de los elementos claves para poder establecer similitudes entre la apoptosis en animales y plantas lo constituye la identificación de los ortólogos de las caspasas en plantas. No obstante, durante mucho tiempo permanecieron elusivas estas enzimas. Se conocía de la existencia de estos ortólogos de manera indirecta, pues ya se habían descrito ocho actividades del tipo caspasa en plantas: YVADase (Belenghi *et al.*, 2004), DEVDase (Gao *et al.*, 2008), VEIDase (Bosch y Franklin, 2007), IETDase (Bosch y Franklin, 2007), VKMDase (Coffeen y Wolpert, 2004), LEHDase (Kim *et al.*,

2003), TATDase (Uren *et al.*, 2000) y LEVDase (Bosch y Franklin, 2007). Estas actividades han sido identificadas varias veces, en varias especies y en varios tipos de tejidos, asociadas en varias ocasiones a eventos de PCD (Bonneau *et al.*, 2008).

Por ejemplo, la enzima de procesamiento vacuolar (VPE), la cual posee actividad YVADase y es necesaria para el desarrollo de la respuesta hipersensible en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el TMV (Pennell y Lamb, 1997). También se conoce que VPE se acumula en forma de zimógeno en la vacuola central lítica, y se activa una vez que esta colapsa desencadenando PCD (Bonneau *et al.*, 2008).

Después de varios años de investigación no fue sino hasta finales del año 2000 y tras haberse concluido la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*, que se identificó un grupo de 9 genes que codificaban para un grupo de proteínas con cierto grado de identidad con las caspasas, las cuales se denominaron Metacaspasas (Familia C14). Estas no solo están presentes en plantas, sino también en hongos y protozoos (Uren *et al.*, 2000).

IV. 2. 3. Metacaspasas

Inicialmente las metacaspasas en *Arabidopsis* se clasificaron en dos grupos; tipo I, constituido por tres miembros (Atmc1 a Atmc3) y tipo II, con seis integrantes (Atmc4 a Atmc9) (Vercammen *et al.*, 2004). Las metacaspasas tipo I poseen una región N-terminal cuya extensión oscila entre los 80 y 120 aminoácidos similar al prodominio presente en las caspasas iniciadoras de mamíferos. Los prodominios de las metacaspasas de *Arabidopsis* son ricos en prolina (Atmc1 y Atmc2) o glutamina (Atmc3) y todas contienen posibles estructuras en dedos de zinc, las cuales también han sido encontradas en las proteínas LSD1 (del inglés, *Lesions Simulating Disease Resistance-1*), un regulador negativo de la respuesta hipersensible en plantas (van der Hoorn y Jones, 2004).

Proteínas similares ricas en dominios dedos de zinc y prolina se han relacionado con interacciones citoplasmáticas proteína-proteína y/o uniones al ADN nuclear (Mackay y Crossley *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2000). La presencia de estos prodominios sugiere una posible interacción homomérica. Sin embargo, en las dos estructuras cristalográficas de metacaspasas tipo I obtenidas hasta la fecha, Yca1 de *Saccharomyces cerevisi* (Wong *et al.*, 2012) y MC2 de *Trypanosoma brucei* (McLuskey *et al.*, 2012), aparece una inusual octava lámina beta que impide la formación de dímeros, por lo que al menos estas dos metacaspasas son monómeros funcionales. Si bien se requiere de la estructura cristalina de otras metacaspasas de tipo I y II para sugerir el estado monomérico como una característica general y diferencial respecto a las caspasas, no existen hasta la fecha informes que indiquen lo contrario.

Por otro lado, las metacaspasas tipo II carecen del prodominio N-terminal. Estas proteínas se relacionan más con las caspasas ejecutoras de animales, las cuales son proteolíticamente activadas por caspasas iniciadoras (Vercammen *et al.*, 2007). En un principio se pensó que las metacaspasas tipo II podrían ser activadas por las de tipo I, similar a como ocurre con las caspasas. Sin embargo, no se ha logrado asociar al prodominio de las de tipo I como estructura necesaria para la agregación molecular y además, el procesamiento de las de tipo II, parece ser exclusivamente por cortes intramoleculares (Vercammen *et al.*, 2004; Watanabe y Lam, 2011a; Acosta *et al.*, 2014) lo que descarta una activación mediada por las de tipo I.

En ambos tipos de metacaspasas, una región conservada de ~150 aminoácidos pueden relacionarse estructural y funcionalmente con la subunidad p20 de las caspasas de mamíferos (Earnshaw *et al.*, 1999). Hacia el C-terminal, existe un dominio conservado similar al dominio p10 de las caspasas. Entre los dominios p20 y p10, existe una región variable y desordenada que difiere

considerablemente en su secuencia aminoacídica. En las metacaspasas de tipo I la región variable o lazo tiene una longitud aproximada de 20 aminoácidos, mientras que en las de tipo II, existe una variedad de tallas que abarcan desde los 90 residuos (*Atmc9*) hasta los 150 residuos aminoacídicos (*Atmc4* - *Atmc8*) (Vercammen *et al.*, 2007). En los dos tipos de metacaspasas se presentan hacia el dominio p20 un par de histidina/cisteína conservadas con respecto a las caspasas de mamíferos (Figura 5) (Vercammen *et al.*, 2004).

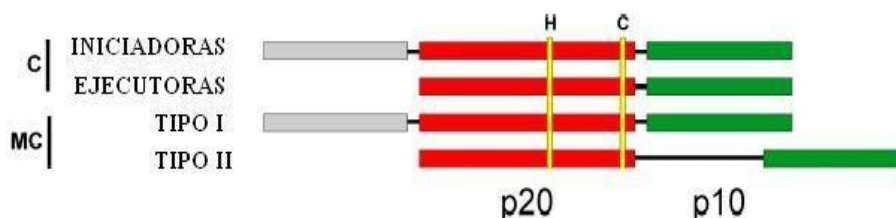


Figura 5: Representación esquemática de los dominios de caspasas (C) y metacaspasas (MC). Los dominios catalíticos están constituidos por dos subunidades, la mayor p20 (rojo) y la menor p10 (verde). La posición de los residuos catalíticos conservados de histidina (H) y cisteína (C) están indicados con barras amarillas. El predominio presente en las caspasas iniciadoras y las metacaspasas tipo I está representado por la barra gris.

Recientemente se identificó un nuevo grupo de metacaspasas (tipo III) en organismos del fitoplancton (Choi y Berges, 2013). Estas se caracterizan por un re-arreglo o intercambio de las subunidades p20 y p10 (Figura 6).

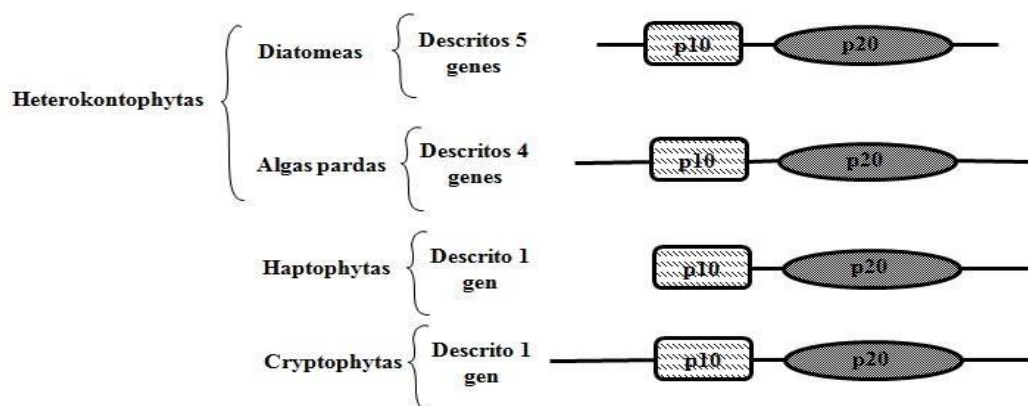


Figura 6: Representación esquemática de la arquitectura de las metacaspasas tipo III. En este caso las dos subunidades p20 y p10 están invertidas respecto a las de tipo I y II. No existe predominio hacia el amino terminal como en las de tipo I y la región unidora no es tan variable en longitud como en las de tipo II.

IV. 2. 3. 1 Propiedades catalíticas de las metacaspasas.

Las propiedades catalíticas de las metacaspasas se determinaron a partir de la expresión de proteínas recombinantes de *Arabidopsis thaliana* en *E. coli*. Se comprobó que las de tipo II se auto procesan, adquiriendo actividad biológica al hidrolizar sustratos sintéticos P1(R); excepto que la *Atmc9* hidroliza además sustratos P1(L), aunque con baja eficiencia (Vercammen *et al.*, 2004; Vercammen *et al.*, 2006; Watanabe y Lam, 2005).

En general, el autoprocesamiento que resulta en la activación de las metacaspasas tipo II recae en una cisteína catalítica que separa los fragmentos p10 y p20, durante este procesamiento puede ser removido una región C-terminal con una longitud comprendida entre 15 y 20 kDa (Aravind y Koonin, 2002). Las metacaspasas tipo I de *Arabidopsis* obtenidas por vía recombinante no se auto procesaron, similar a lo que ocurre en las caspasas iniciadoras de mamíferos (Vercammen *et al.*, 2007). Pero a diferencia de las caspasas, no necesitan de oligomerizaciones para ser activadas.

La especificidad de las proteasas pertenecientes al Clan CD por la posición P1 de los sustratos está determinada por la localización de una serie de aminoácidos conservados en la estructura en forma de bolsillo S1 localizados en la proteasa madura. En caspasas los residuos, R-179, Q-283 y R-341 crean un bolsillo básico para la unión óptima de la región ácida del sustrato P1 (D). Cuando varias secuencias de metacaspasas son alineadas con las secuencias de caspasas de animales, se aprecia que la Q-283 es remplazada por un D, y la R-341 por D o E, mientras que la R-179 de caspasas se alinea con L (Figura 7). Estos residuos son posicionados idealmente para crear un bolsillo altamente ácido, capaz de aceptar un residuo básico P1(R/L) (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004), lo cual constituye una clara diferencia con las caspasas.

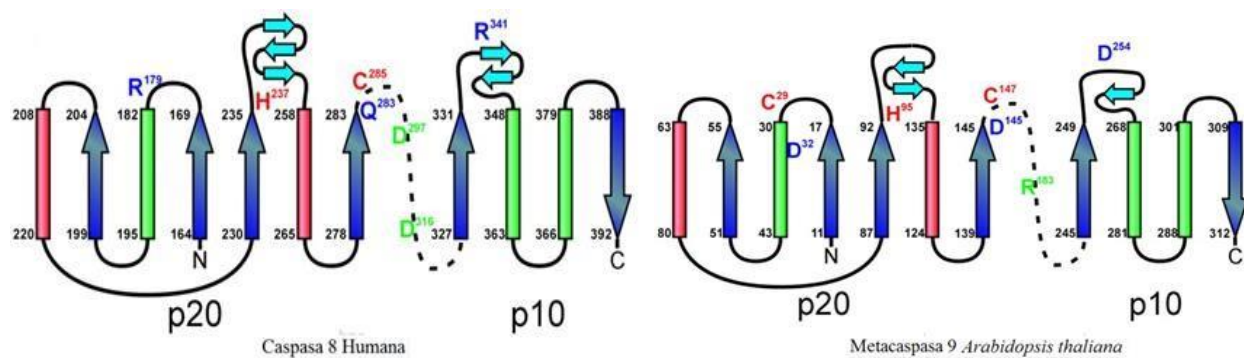


Figura 7: Comparación de la estructura secundaria de la caspasa 8 humana y la metacaspasa 9 de *Arabidopsis thaliana*. A nivel de la estructura secundaria ambas moléculas son prácticamente idénticas. Se observa también cambios de aminoácidos básicos en las caspasas por ácidos en las metacaspasas, lo que implica un cambio en el sustrato para ambas moléculas.

Además, existen diferencias en las propiedades enzimáticas dentro de las mismas metacaspasas, incluyendo la especificidad por el sustrato y los requerimientos de las condiciones de reacción. Por ejemplo, la Atmc9 posee diferentes características cinéticas, incluyendo la especificidad por el sustrato, sensibilidad al inhibidor de proteasa y la dependencia del pH, comparada con la Atmc4. Se conoce que Atmc9 posee un pH óptimo ácido y es inactiva a pH 7-8, rango en el que fluctúa el pH celular. En tanto la Atmc4 está estrechamente relacionada por secuencia aminoacídica con Atmc5, la cual posee un pH óptimo neutral, es inactivada a pH ácidos y requiere de calcio, al menos *in vitro*, para ser activa (Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe y Lam, 2011b; Zhang y Lam, 2011; Piszczek *et al.*, 2012). La sobreproducción y el autoprocésamiento de los zimógenos para convertirse en proteasas maduras no necesariamente implican la activación de la proteasa, ya que otras características como la acidificación del medio donde se encuentre se hacen importantes.

La identificación de AtSerpín-1 como inhibidor de AtMC9 así como la modificación por S-nitrosilación que sufre esta metacaspasa sugiere la existencia de otros mecanismos de regulación. Esta modificación se da por la nitrosilación de una cisteína en presencia de óxido nítrico (NO). El óxido nítrico es una molécula señalizadora que se localiza en los compartimentos tanto intra como intercelulares y es transportado por el xilema (Oashi-Ito *et al.*, 2010). La unión covalente de ON a las cisteínas se considera una modificación post-traducciona (Belanghi *et al.*, 2007) y se ha visto que la S-nitrosilación de la cisteína 147 de AtMC9 bloquea su autoprosesamiento, en tanto la cisteína 29 es “inmune” a este tipo de modificación (Belanghi *et al.*, 2007).

IV. 2. 3. 2 Similitudes y diferencias entre caspasas y metacaspasas.

Una característica común entre las caspasas y los dos tipos de metacaspasas (las de tipo III no han sido estudiadas todavía) es la presencia de una diada catalítica de histidina/cisteína en el sitio activo (Cambra *et al.*, 2010). Los modelos 3D así como los análisis de predicción sugieren que todos las metacaspasas poseen un plegamiento del tipo caspasa/hemoglobinas (Aravind y Koonin, 2002; Barrett y Rawlings, 2001; Vercammen *et al.*, 2004). Las metacaspasas también comparte con las caspasas el mecanismo de formación del sitio activo, el cual involucra procesamiento o autoprosesamiento (Vercammen *et al.*, 2004; Belanghi *et al.*, 2007; Watanabe y Lam, 2011a; Acosta *et al.*, 2014). La forma activa es similar en los dos: p20p10, pero en caspasas son heterotetrámeros (p20)₂(p10)₂, mientras en las metacaspasas, al menos en las de tipo I que se ha resuelto la estructura cristalográfica son heterodímeros (Wong *et al.*, 2012; McLuskey *et al.*, 2012) y en las de tipo II no está clara la estequiometría aunque es muy probable que también sea heterodimérica (Woltering *et al.*, 2002; Vercammen *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2014).

Aun cuando estas dos proteasas comparten una estructura secundaria similar, así como una diada catalítica y un mismo mecanismo de catálisis, poseen marcadas diferencias que las definen. Una de las diferencias más importantes es el aminoácido que es seleccionado y cortado (Bonneau *et al.*, 2008). En el caso de las caspasas siempre es un ácido aspártico mientras que en las metacaspasas es uno básico, sea lisina o arginina (Vercammen *et al.*, 2004; Watanabe y Lam, 2005; Watanabe y Lam, 2011a). Otra gran diferencia es la baja homología de secuencia entre las dos familias (Cambra *et al.*, 2010). El requerimiento estricto de calcio para la activación *in vitro* de varias metacaspasas de tipo II además del carácter intramolecular del autoprocesamiento en estas y no así en las caspasas constituye otra gran diferencia en el mecanismo de ambas (Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe y Lam, 2011b; Zhang y Lam, 2011; Piszczek *et al.*, 2012; McLuskey *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). Debido a estas diferencias muchos investigadores no consideran a las metacaspasas como los ortólogos de las caspasas en plantas (Vercammen *et al.*, 2004; Bonneau *et al.*, 2008).

IV. 2. 3. 3 Papel de las metacaspasas en la muerte celular programada.

La primera identificación de genes de metacaspasas relacionados con eventos de PCD proviene del estudio de la sobre-expresión del gen *yca1* de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), que codifica para una metacaspasa tipo I. Se comprobó que la misma sensibiliza a las células al estrés exógeno o el envejecimiento relacionado con al estrés oxidativo (Madeo *et al.*, 2002). Por lo tanto, alteraciones que bloqueen las funciones del gen *yca1* ($\Delta yca1$) disminuyen la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Khan *et al.*, 2005), luego en células $\Delta yca1$ sometidas a tratamiento con H_2O_2 la apoptosis decrece, lo cual se puede medir por la externalización de fosfatidilserinas (PS) y la fragmentación del ADN, genuinos marcadores apoptóticos.

En células animales durante la ejecución de algún tipo de PCD, se produce un aumento de los niveles de PS en la membrana plasmática, la cual actúa como señal para las células fagocíticas. Sin embargo, la función fisiológica de la exposición de PS para levaduras y plantas permanece como una interrogante, ya que poseen una rígida pared celular, imposibilitándose el fenómeno de fagocitosis (Vercammen *et al.*, 2007).

En un estudio efectuado para determinar si los genes de metacaspasas en plantas están relacionados con las funciones de *yca1*, se emplearon dos metacaspasas de *Arabidopsis* (*atmc1* y *atmc5*), y como controles levadura salvaje y un mutante generado por delección ($\Delta yca1$). La expresión inducida de *atmc1* y *atmc5* en levadura promovió muerte celular por apoptosis de manera significativa, tanto del salvaje como del mutante. Estos resultados sugieren una relación funcional entre las dos metacaspasas de *Arabidopsis* con *yca1*. Se encontró que *atmc5* puede reemplazar parcialmente la función de *yca1* en la mediación de respuestas ante el estrés oxidativo y el envejecimiento que inducen la apoptosis en levaduras, aunque la eficacia de la PCD inducida por la actividad de *atmc5* resulta ser menor que la que se evidenciaron con *atmc1* y *yca1* (Watanabe y Lam, 2005).

En el reino de los hongos tanto PaMca1 como PaMca2 son requeridas para el proceso de muerte celular asociado a senescencia en *Podospora anserina* (Hamann *et al.*, 2007). En tanto, la única metacaspasa (CAMCA1) de *Candida albicans* se ha relacionado con la muerte celular inducida por estrés oxidativo (Cao *et al.*, 2009). En plantas, uno de los modelos más empleados ha sido *Picea abies*, en la cual mediante ensayos de silenciamiento empleando ARN interferente para el gen de la metacaspasa mcII-Pa se logró disminuir la PCD en células del suspensor durante la embriogénesis (Suarez *et al.*, 2004). Estudios posteriores mostraron que mcII-Pa es capaz de desplazarse del citoplasma al núcleo en células embrionarias indiferenciadas donde promueve la degradación del ADN y desensamblaje de la estructura nuclear (Bozhkov *et al.*, 2005). En el caso de

Arabidopsis se conoce que la metacaspasa 8 se requiere para la muerte inducida por luz ultravioleta (He *et al.*, 2008), en tanto AtMC4 participa en la muerte inducida por tratamiento con una toxina fúngica FB1 (Fumonisina B1) (Watanabe y Lam, 2011b); mientras AtMC1 y AtMC2 actúan antagonicamente durante la respuesta hipersensible mediada por receptores intracelulares para bacterias patogénicas (Coll *et al.*, 2010). En *Nicotiana benthamiana*, el silenciamiento del gen NbMC1, que codifica para una metacaspasa de tipo II, le confiere resistencia a la infección por el hongo necrotrófico *Colletotrichum destructivum* (Hao *et al.*, 2007).

Además de las evidencias experimentales que relacionan inobjetablemente a las metacaspasas con eventos de MCP, también se han relacionado con otros procesos celulares, algunos de los cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de las diferentes funciones en las que se han identificado a las metacaspasas. S E: sobreexpresión, KO: silenciadas, IM: inactivación por mutación. Información recopilada en “Metacaspases” (Tsiatsiani *et al.*, 2011).

Reino	Especie	Número total de genes de metacaspasas	Genes con función fisiológica conocida	Método	Función	Referencia
PROTISTA	<i>Leishmania donovani</i>	2	LdMc1 LdMc2	SE	Regulador positivo en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.	Lee <i>et al.</i> ⁽³⁷⁾
	<i>Leishmania major</i>	1	LmjMCA	KO, SE SE	Regulación del ciclo celular. Regulador positivo en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.	Ambit <i>et al.</i> ⁽³⁸⁾ Zalila <i>et al.</i> ⁽³⁹⁾
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2	LeMCA5	SE	Regulador positivo en muerte celular inducida en suero humano.	Kosec <i>et al.</i> ⁽⁴⁰⁾
PLANTAE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9	AtMC8 AtMC1 AtMC2 AtMC4	KO KO, SE, IM	Requerido para la muerte celular inducida por UV. Control antagonico de la muerte celular inducida durante la RH. Activación de la MCP inducida por la micotoxina FB1	He <i>et al.</i> ⁽⁴¹⁾ Coll <i>et al.</i> ⁽⁴²⁾ Watanabe y Lam ⁽⁴³⁾
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	?	NbMCA1	KO, SE, IM SGIV	Confiere resistencia a hongos necrotróficos	Hao <i>et al.</i> ⁽⁴⁴⁾
	<i>Picea abies</i>	?	MeII-Pa	RNAi	Requerido para la embriogénesis y la MCP	Suarez <i>et al.</i> ⁽³⁶⁾
FUNGI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Yca1	KO, SE KO, SE KO KO, IM KO, IM	Requerido para la muerte celular inducida por estrés oxidativo, sal y osmótico. Requerido para la muerte celular inducida por problemas en la ubiquitinación, replicación del ADN, estabilidad del ARNm y el metabolismo de la mitocondria. Requerido para la muerte celular inducida por virus. Requerida para el aclaración de proteínas agregadas. Regulación del ciclo celular.	Madeo <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾ Madeo <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾ Ivanovska y Hardwick ⁽⁴⁵⁾ Herker <i>et al.</i> ⁽⁴⁶⁾ Palermo <i>et al.</i> ⁽⁴⁷⁾

IV. 2. 3. 4. Modelos propuestos para las metacaspasas.

Para tratar de explicar la versatilidad funcional observada en estas proteasas se han formulado diferentes hipótesis sobre cómo actúan. Las primeras hipótesis planteaban un mecanismo similar al de las caspasas, en el cual las de tipo I deberían funcionar como “moléculas iniciadoras” activándose por agregación en respuesta a una señal de muerte (intra o extracelular), mientras que las de tipo II serían las “ejecutoras”. Estas serían activadas mediante un corte proteolítico efectuado por las iniciadoras (Vercammen *et al.*, 2004; Watanabe y Lam, 2005).

Sin embargo, los niveles de regulación podrían variar dependiendo del tipo de metacaspasa, lo que implica que no todas estarían controladas a nivel post-traducciona l como en el caso de las caspasas. En un ensayo para determinar la acumulación de los diferentes ARN mensajeros de los genes de metacaspasas en *Arabidopsis*, *atmc4* mostró los mayores niveles en los diferentes órganos vegetales analizados (raíz, hoja, tallo y flores) excepto en sílicuas (Watanabe y Lam, 2011a). Sin embargo, bajo estrés oxidativo o estrés generado por la toxina FB1 los niveles pueden aumentar, así como el auto procesamiento del zimógeno (Watanabe y Lam, 2011b). Estos resultados sugieren que algunos genes de metacaspasas poseen más de un nivel de regulación.

Otro dato interesante es la estricta dependencia del Ca^{2+} en la activación enzimática para la mayoría de las de tipo II, al menos *in vitro* (Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe y Lam, 2011b; Zhang y Lam, 2011; Piszczek *et al.*, 2012; McLuskey *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014), en tanto las caspasas son independientes de este catión. Todos estos elementos plantean un escenario diferente a lo que se pensaba inicialmente respecto al mecanismo de acción. A partir de la información disponible, Lam y Zhang en el 2012 proponen un modelo para las metacaspasas, el cual se muestra en la Figura 8. Este modelo se basa exclusivamente en una regulación post- traducciona l asumiendo que las metacaspasas se expresan constitutivamente, lo cual no es estrictamente cierto. Sin embargo,

existen varios elementos interesantes que valen la pena analizar. Primero: plantea un paso de activación del zimógeno el cual es mediado *in vitro* por el calcio mientras que *in vivo* podrían ser especies reactivas de oxígeno, esto debido a que *atmc8* es regulado por H_2O_2 y luz ultravioleta (He *et al.*, 2008). Este paso estaría caracterizado por un reordenamiento estructural donde son posicionados correctamente los aminoácidos del sitio activo y además se llevaría a cabo el primer corte en las de tipo II.

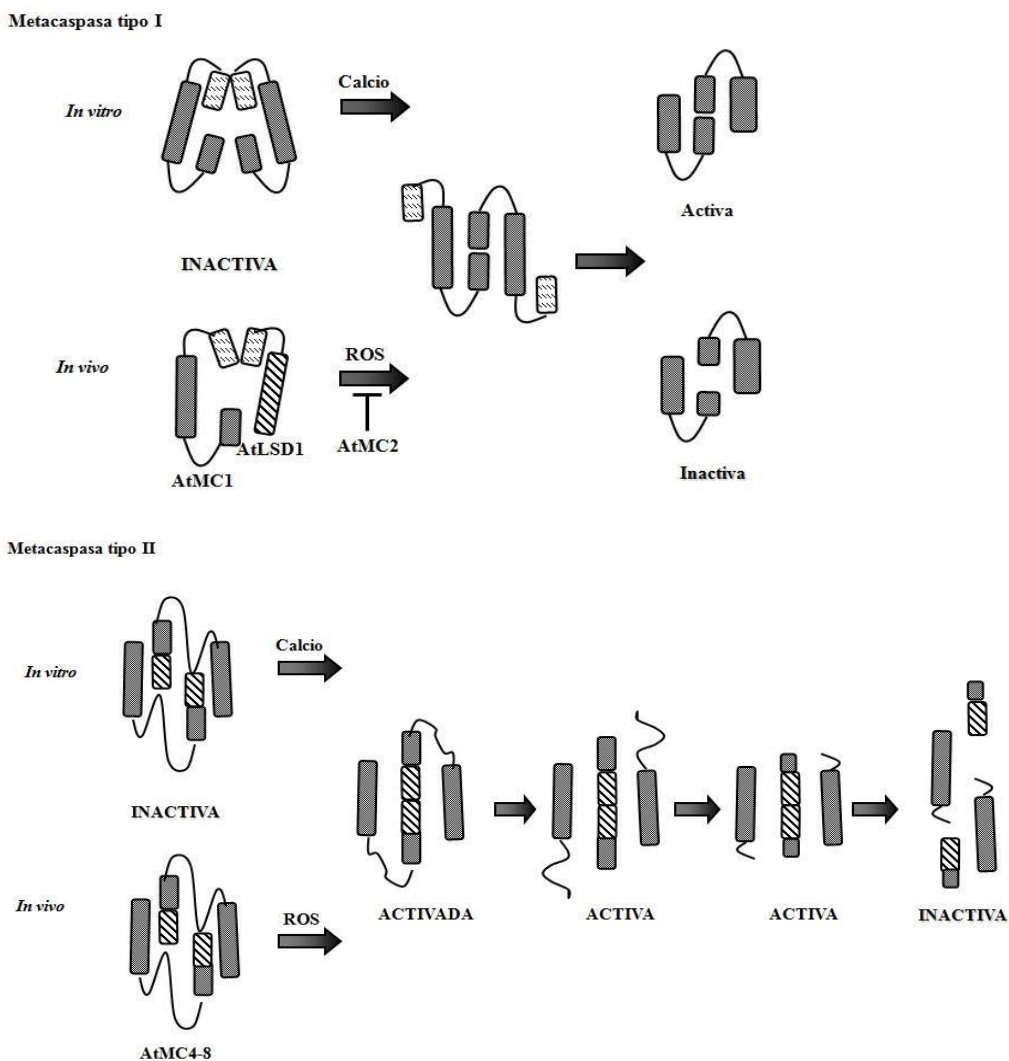


Figura 8: Modelo de activación post-traduccional de las metacaspasas tipo I y II según Lam y Zhang (2012). Las subunidades p10 están representadas con rectángulos pequeños, las p20 con rectángulos más grandes. Las de tipo I son activadas enzimáticamente por calcio *in vitro* pero no se auto procesan, o al menos no es necesario. Mientras que *in vivo* se ha informado de su activación por estrés oxidativo, existiendo un antagonismo en la Atmc1 y 2. La mayoría de las de tipo II *in vitro* son dependientes de calcio para activarse enzimáticamente, aunque también tiene un efecto positivo sobre el autoprocesamiento.

No se conoce si *in vivo* el calcio podría ser importante para la activación de las mismas, aunque no se descarta esta idea dado que los niveles de calcio intracelular se disparan durante numerosos eventos de estrés celular (Rentel y Knight, 2004). También podría estar mimetizado el efecto de otro “activador” que actualmente no se conoce.

El segundo paso sería el de la maduración, durante este se siguen produciendo cortes en las de tipo II, hasta que quedan inactivadas. Para las de tipo I no se conoce como se produce la maduración, si es que esta ocurre. Este paso implica que las metacaspasas exhibirían un comportamiento suicida, pues su activación conduciría irreversiblemente a su inactivación. Esto podría constituir un mecanismo de autorregulación al disminuir el efecto de las mismas en el tiempo. El modelo en si es novedoso y constituye un primer intento de explicar cómo funcionan las metacaspasas.

IV. 2. 3. 5 Filogenia de las metacaspasas.

En eucariontes las caspasas están restringidas al genoma de los metazoarios, mientras que las metacaspasas están distribuidas en los reinos Protozoos, Hongos, Plantas y Cromistas. En los procariontes han sido halladas metacaspasas tanto en Eubacterias como Archaeobacterias. Existe la hipótesis de que las metacaspasas eucarióticas se originaron a partir de una transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*) entre los endosimbiontes mitocondriales (α -protobacterias) y los eucariontes tempranos (Koonin y Aravind, 2002).

En Protozoos, Hongos y Cromistas solo se han reportado metacaspasas tipo I y III, mientras que en plantas, se encuentran los tipos I y II. Es por ello que se han planteado hipótesis alternativas de que las caspasas y metacaspasas tipo I provienen de un ancestro común originado por HGT entre los endosimbiontes mitocondriales y las células eucariotas hospedadas. En tanto las metacaspasas tipo

II pueden derivar de un segundo evento de HGT durante el establecimiento de plastidios por relaciones de endosimbiosis entre cianobacterias y células eucariotas primitivas (Vercammen *et al.*, 2007).

IV. 3. *Nicotiana tabacum* L. como modelo de estudio.

Nicotiana tabacum L., conocida comúnmente con el nombre de tabaco es una especie de suma importancia en la economía de muchos países. En el caso de países como Cuba, representa el principal renglón exportable de la economía y donde numerosos estudios se han dirigido al mejoramiento genético de la especie para lograr crear nuevas variedades más resistentes al ataque de patógenos que ocasionan daños severos a las hojas que afectan la fotosíntesis y hace que se reduzca considerablemente el valor comercial del cultivo.

La continua selección de caracteres comerciales ha conllevado a una pérdida significativa en la variabilidad genética y, por consiguiente, al aumento en la susceptibilidad ante diferentes condiciones de estrés (Pérez y Montes de Oca, 2000). En tal sentido, la identificación y caracterización de genes relacionados con los mecanismos de respuesta a estrés constituyen una de las líneas de investigación priorizadas para contribuir al conocimiento y al mejoramiento genético de los cultivos.

Por otra parte, este cultivo ha sido históricamente utilizado como modelo para el estudio de las estructuras y funciones del genoma, de Bioquímica y Fisiología Vegetal (Greiner *et al.*, 2000), Genética Molecular Básica (Zhan *et al.*, 1998), de la caracterización de herbicidas (Yei Shung *et al.*, 2003), la obtención de metabolitos secundarios y estudios de organogénesis inducida (Arai *et al.*, 1997). Sin embargo, poco se conoce sobre las proteasas del tipo cisteínico dentro de este género donde solamente se encuentra un reporte parcial de un gen de una metacaspasa tipo II para *Nicotiana benthamiana* (Hao *et al.*, 2006).

IV. 4. Aspectos generales de bioinformática.

La bioinformática es un área de investigación multidisciplinaria, la cual puede ser definida, de manera general, como la interfase entre dos ciencias: Biología y Computación. La misma utiliza la tecnología de la información para organizar, analizar y distribuir información biológica, almacenada en bases de datos con la finalidad de responder a preguntas complejas (Durbin *et al.*, 1997).

En la actualidad son muchas las bases de datos disponibles, como son por ejemplo la NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (del inglés *The European Molecular Biology Laboratory*-<http://www.embl.org>) y EBI (del inglés *European Bioinformatics Institute*-<http://www.ebi.ac.uk/>). Las mismas coleccionan las informaciones de secuencia de nucleótidos, de aminoácidos, de proteínas o genomas completos, respectivamente (Gusfield, 1997).

Para buscar la información deseada en las bases de datos existen motores de búsqueda, los que funcionan mediante alineamientos de secuencias homólogas y que revelan características comunes de estructura y función. Existen dos tipos de alineamientos: el global que incluye toda la longitud de la secuencia y el local que incluye el análisis de un fragmento de ella (Eloffsson *et al.*, 1996). El primer programa buscador desarrollado fue el FASTA (“Todo rápido”, del inglés **FAST-ALL**), el cual se basa en localizar relevancia biológica en los alineamientos globales mediante las comparaciones exactas entre pequeñas regiones de las secuencias, donde casi cualquier par de secuencias homólogas es aceptado mientras tenga regiones pequeñas exactas a la secuencia problema (Pearson y Lipman, 1988).

El BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) es otro método que se emplea ampliamente para localizar secuencias con similitud. El mismo busca secuencias definidas que compara con la secuencia problema mediante alineamientos locales. Emplea para su análisis la información disponible en bases de datos como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), entre otras. Permite identificar genes recién secuenciados, motivos compartidos por una o más familias de genes o encontrar genes ortólogos en diferentes organismos (Altschul *et al.*, 1990).

Para el análisis individual de familias de proteínas el alineamiento múltiple es un método criticable debido a que el alineamiento de más de tres secuencias no es confiable. El error se puede minimizar utilizando algoritmos que minimicen el alineamiento incorrecto, lo que incrementa el valor del alineamiento correcto. El método más usado para el alineamiento múltiple que utiliza este algoritmo es el CLUSTAL, el cual es comúnmente usado en sus variantes CLUSTAW o CLUSTALX disponibles en Internet (<http://www.ebi.ac.uk/clustal><http://clustalw.genome.ad.jp/> y <http://www.bork.emblheidelberg.de/Alignment/alignment.html>). El CLUSTAL produce rápidos y confiables alineamientos para proteínas con secuencias conservadas. Además, mediante comparaciones permite modificar la función específica de las proteínas, apoyado en la predicción de su función (Thompson *et al.*, 1994).

Numerosas son las bases de datos y los buscadores, así como la variedad de programas bioinformáticos que permiten realizar predicciones a las proteínas a nivel primario, secundario y terciario (Mount *et al.*, 2000). Por ejemplo, para estudios de la secuencia primaria de aminoácidos, se debe primero traducir la secuencia de nucleótidos a proteína y con este objetivo se utilizan programas como TRANSLATE del servidor EXPASY (de sus siglas en inglés: *Expert Protein Analysis Systems*; <http://www.expasy.org/tools/dna.html>), o TRANSLATE de EBI (<http://www2.ebi.ac.uk/translate/>). Todos brindan seis marcos de lectura diferentes (tres para cadena

molde y tres más para la cadena complementaria) para traducir un fragmento de ADN, según se empiece por la primera, segunda o tercera base del fragmento de ADN. Solo un marco abierto de lectura será el correcto, el que no contenga a lo largo de la secuencia codones de parada, siendo el marco abierto de lectura más amplio (Gasteiger *et al.*, 1999). Después de traducida la secuencia de nucleótidos se predicen características físico-químico como peso molecular, coeficiente de extinción, punto isoeléctrico con programas como el PROTPARAM del ExPasy (Gasteiger *et al.*, 2005).

El análisis de las estructuras secundarias ofrece una pobre predicción de las funciones o relaciones de homología entre proteínas por sí sola, ya que la predicción de características estructurales no está relacionada directamente con la predicción funcional, pero puede contribuir al análisis con métodos de homología de detección basados en la relación estructura-secuencia. No obstante, las predicciones de las estructuras secundarias conjugándose con otros métodos adquieren un mayor valor (Baxevanis *et al.*, 2001). Los aminoácidos de las estructuras secundarias como α -hélices y láminas- β tienden a mantenerse conservados, no siendo así en las regiones de lazadas donde durante la evolución, las proteínas sufren deleciones o inserciones. De manera general, la predicción de las estructuras secundarias permite estimar la distancia correcta en los alineamientos de proteínas relacionadas (Mount *et al.*, 2000).

Por otra parte, el programa JPRED (<http://jpred.ebi.ac.uk/>), desarrollado por Geoff Barton y sus colegas en la Universidad de Dundee, constituye un programa consenso que utiliza simultáneamente varios métodos para realizar la predicción de la estructura secundaria como: PHD, PREDATOR, DSC, NNSSP, ZPRED, MULPRED, JNET, COILS, y MULTICOIL. De forma similar, se puede emplear el programa PREDICTPROTEIN desarrollado con el mismo objetivo y creado por Burkhard Rost de la Universidad de Columbia (Baxevanis *et al.*, 2001).

Los análisis de características moleculares de proteínas ayudan a predecir el tipo de estructura y localización subcelular, que son un complemento en los análisis basados en homología. Existen diversos programas que permiten predicciones de características moleculares, como son los posibles segmentos transmembrana o, más precisamente, α -hélices transmembranas. Estos programas estiman el grado la hidrofobicidad de las cadenas polipeptídicas y muchos de ellos usan determinaciones experimentales de segmentos transmembranas, como por ejemplo TMHMM, HMMTOP, y SOSUI (Hoffman y Stofeel, 1993).

Entre los programas para predecir péptidos señales, el SIGNALP es el más empleado (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) y se creó mediante la caracterización experimental de un grupo de péptidos señales en eucariontes, bacterias Gram-positivas y Gram- negativas (Nielsen *et al.*, 1997). Existen otros que predicen secuencias señales que guíen a la proteína hacia compartimentos celulares, como mitocondria o cloroplastos, y permiten diferenciar a proteínas citosólicas de las que se encuentran en organelos celulares. Ejemplo de ellos son el TARGETP (Emanuelsson *et al.*, 2000), que predice si la proteína va a cloroplasto o mitocondria, y el PSORT que además predice localización en núcleo, retículo endoplasmático, lisosomas, complejo de Golgi, peroxisomas (Fariselli *et al.*, 2002).

La reconstrucción evolutiva de los genes y las especies es una importante tarea en la evolución molecular y para la cual se han desarrollado programas que predicen las líneas de origen o filogenias de los organismos, a fin de construir las relaciones antepasado-descendientes (relaciones evolutivas) entre los grupos de organismos vivos y extinguidos. En el contexto molecular estas relaciones se infieren a partir de las similitudes y diferencias en las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas. Las relaciones filogenéticas de genes u organismos son usualmente presentadas en forma de dendograma (árbol), que permite entender la ocurrencia de eventos o mecanismos que originaron diversidad en los genes y las especies (Tamura *et al.*, 2007). Con este propósito, programas como el BLAST, CLUSTALW y MEGA, los cuales tienen insertadas herramientas para otorgar confiabilidad a los

análisis. Los dendrogramas que se obtienen por estos programas emplean el muestreo *Bootstrap* y técnicas de re-emplazamiento. Pueden ser construidos por diferentes algoritmos que se pueden clasificar en métodos de distancia, parsimonia o el “vecino más próximo” (Swofford *et al.*, 1996; Li, 1997; Page y Holmes, 1998; Nei y Kumar, 2000).

Si bien el análisis de la estructura primaria de las proteínas representa el primer paso para la caracterización de un producto celular, la predicción de la estructura tridimensional (3D) constituye una herramienta de inestimable valor para profundizar en el conocimiento de su función molecular. La predicción de la estructura 3D o modelación de las proteínas se realiza fundamentalmente mediante dos enfoques. El primero utiliza principios fisico-químicos que rigen el plegamiento de las proteínas, tales como enlaces por puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, y se conocen como métodos *ab initio*. El segundo enfoque utiliza el conocimiento de la historia evolutiva de las proteínas que se obtiene de la comparación de secuencias aminoacídicas homólogas, o alineamiento múltiple (Koehl y Levitt, 1999).

El método de modelación por comparación u homología continúa siendo el más preciso (Koehl y Levitt, 1999). Existen varios servicios automáticos de modelación por comparación, accesibles en Internet: 3D-JIGSAW (Bates y Sternberg, 1999); SDSC (Shindyalov y Bourne, 2000); METASERVER (Ginalski *et al.*, 2003) y programas para la visualización de las estructuras tridimensionales como el SWISS-PDBVIEWER (Guex y Peitsch, 1997); MODVIEW (Ilyin *et al.*, 2001). Actualmente, el número de secuencias modeladas es más de dos veces el número de estructuras 3D determinadas experimentalmente, lo que refuerza la utilidad de los métodos teóricos de predicción para contribuir al conocimiento de la función molecular de las proteínas cuya estructura 3D se desconoce (Sánchez *et al.*, 2000).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Material Vegetal.

Se emplearon semillas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* L. de la variedad H2.1.1, estas últimas donadas gentilmente por investigadores del Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana, Cuba. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente mediante el siguiente protocolo: primeramente, se sumergieron en agua destilada por 15 min y luego en alcohol 70 % (v/v) por 1 min, después se les agregó hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 50 % por 15 min y finalmente se lavaron 3 veces con agua destilada. Para garantizar la germinación se plantaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) por 15 días en una cámara de crecimiento (25°C/20°C, 14/10 h ciclo día/noche, intensidad de la luz 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Pasado este tiempo, las plántulas se pasaron a macetas rellenas con sustrato Metromix® 702 (50-60 % corteza de pino fino, 15-25 % musgo de turbera, 10-15 % vermiculita, and 5-15 % perlita) colocando una plántula por maceta. Posteriormente fueron trasladadas a un invernadero con suficiente agua para garantizar su adecuado desarrollo. Al cabo de 30 días se procedió a generar estrés por herida en las hojas durante 24 horas, para luego colectarlas, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -70°C hasta su posterior procesamiento.

V. 2. Extracción de ácidos nucleicos.

V.2.1. Extracción de ADN genómico.

Para la extracción del ADN genómico se siguió el protocolo del Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Se partieron de 0,2 g de hojas molidas de *Nicotiana tabacum* L. en nitrógeno líquido, al cual se le agregó 600 µl de buffer CTAB precalentado a 60°C. A esta mezcla se le agregaron 200 µl de PVP (Polivinilpirrolidona) y β-mercaptoetanol y se homogenizó por inversión. La fase acuosa se separó por centrifugación a 18,000 g por 5 min. Posteriormente se le adicionó 400 µl de cloroformo – isoamilalcohol (24:1), se homogenizó nuevamente y se separaron las dos fases centrifugando a 18,000 g por 5 min. La fracción acuosa se transfirió a un nuevo eppendorff y se precipitó el ADN agregándole 400 µl de isopropanol e incubándolo por no menos de 1 hora a –20°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 18,000 g por 15 min y se resuspendió el precipitado en 90 µl de buffer TE (Tris-EDTA). En este paso se trató el ADN con RNasa, incubándolo por 1 hora a 37°C, para luego repetir el paso de precipitación. La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) y la integridad del mismo se determinó en un gel de agarosa al 0.8 %.

V.2.2. Extracción de ARN total.

El ARN total fue aislado a partir de 100 mg de hojas de tabaco, empleando como reactivo principal el Trisol (Invitrogen) y siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) y la integridad del mismo se determinó en un gel de agarosa – formaldehído al 1 %.

V.3. Generación de la secuencia completa de *NtMCI*.

V.3.1. Secuencia complementaria de *NtMCI*.

El ARN obtenido se empleó para generar ADNc mediante transcripción reversa, usando para ello a la MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, Invitrogen) y el oligo (dT) 12-18, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

Para la amplificación del ADNc de metacaspasas se emplearon oligos degenerados (upper: CAY TWC WSY GGH CAY GG y lower: CCR CTR TKR CAR GMR TC) previamente descritos por Castillo-Olamendi *et al.* (2007). Las condiciones del PCR fueron: 5 min a 95°C, 30 seg a 95°C, 30 seg a 50°C, 1 min a 68°C (repetir 40 veces al paso 2), 7 min a 72°C. Los oligos fueron empleados a una concentración final de 0.2 µM y se usó una Taq de alta fidelidad (Accuprime Taq DNA polymerase High Fidelity, Invitrogen).

A partir de este PCR se obtuvo un fragmento de aproximadamente 182 pares de base (pb), el cual fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega) y posteriormente secuenciado. La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos del Centro Nacional de Reportes en Biotecnología (NCBI: del inglés National Center for Biotechnology Information) a través de la página en línea para efectuar BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para completar los extremos del ADNc se llevó a cabo la técnica de Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc (RACE, del inglés: Rapid Amplification of cDNA Ends). Para el 5'-RACE se emplearon dos cebadores anidados: RACE5-143 (CCG CTG TGG CAT GAG TCA GAT AC) y RACE5-N4 (CCA GTT TCA GCT GGA AGT CTA GT) en tanto para el 3'-RACE se usó un simple cebador, NT2B-F282 (GGT GAA GAT GAT GAT ACT GGT TAT GAT G) combinado con un oligo (dT).

V.3.2. Estructura génica de *NtMC1*.

Se realizó un PCR empleando diferentes combinaciones de cebadores: ATTB1 – MS + ATTB2 – MS, D – MET + ATTB2 – MS, ATTB1 – MS + R – MET, D – MET + R – MET, ATTB1 + ATTB2 – MS, ATTB1 + R – MET, ATTB1 – MS + ATTB2 y D – MET + ATTB2 (ver Figura 15). Para ello se partieron de 50 µg de ADN genómico de *Nicotiana tabacum* L. y se siguió el programa: 5 min a 95°C, 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 3 min a 68°C (repetir 35 veces al paso 2), 7 min a 72°C. El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 2: Lista de cebadores empleados para determinar la presencia de intrones en *NtMC1*.

Cebadores	5' → 3'
ATTB1 – MS	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGT CCC TTG TG
ATTB2 – MS	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA ACC ATA CCC AA G
D – MET	CTA GTA GGA TCT GCT GAA GAA GGT GAT TTC
R – MET	TGC ATA GCT CTC ATC ATT TTC GTC AAG TTT CTG

V.4. Análisis computacional de la secuencia de *NtMC1*.

Todas las bases de datos y programas empleados en el presente estudio se encuentran disponibles en Internet. Para la comparación de la secuencia obtenida con la base de datos no redundantes del NCBI (NCBI-nr: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) se efectuó un BLAST de posición específica iterado. Mientras que para el alineamiento múltiple de secuencias se empleó el programa ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) con la configuración por defecto y las secuencias de metacaspasas informadas para otras plantas, la cuales fueron tomadas directamente del GenBank. Las secuencias alineadas fueron analizadas y ajustadas manualmente empleando el programa Se-AL v2.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).

Para realizar el cálculo de la estructura tridimensional así como un alineamiento estructural-secuencia, se realizó una búsqueda de moldes compatibles a partir de estructuras conocidas en la base de datos de proteínas (PDB, del inglés Protein Data Bank). Se empleó el programa I-TASSER (Zhang, 2008) y PHYRE2 (Kelley y Sternberg, 2009). La estructura 3D predicha para NtMC1 fue sometida a diferentes pruebas para evaluar la consistencia y fiabilidad del resultado.

El cumplimiento de las restricciones conformacionales en la estructura primaria se evaluó mediante la inspección del mapa de valores Psi/Phi de Ramachandran obtenido mediante el programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). La calidad del empaquetamiento o “foldeo” del modelo se determinó por el cálculo de los valores de WHATCHECK Z (Hoofst *et al.*, 1996). Finalmente, la compatibilidad entre secuencia y estructura fue analizada con el VERIFY-3D (Bowie *et al.*, 1991). Todos los programas fueron ejecutados en el servidor de verificación y análisis de estructuras al que se puede acceder a través del sitio web UCLA (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>).

V.5. Construcción de plásmidos.

Se generaron inicialmente dos vectores de entradas con la secuencia codificadora de NtMC1 fusionada a los epítomos HA (Hemaglutinina) y VSV-G (Glicoproteína del Virus de Estomatitis Vesicular) en la región carboxilo terminal. La fusión del gen y el epítomo se realizó mediante PCRs anidados. Para NtMC1-HA se efectuaron dos PCRs, empleándose en el primero los oligos ATTB-1-Met (GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGC GAA GAA AGC AGT ATT AAT C) y HA-MOR-R (CTG GAA CAT CGT ATG GAT AGC ACA CAA AAG GAG CGT C) y en el segundo ATTB-1-Met y ATTB2-HA (GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA AGC ATA ATC TGG AAC ATC G). Mientras que para NtMC1-

VSV-G se realizaron tres PCRs, utilizando ATTB-1-Met y NtMC1-VSV-G (C TTA CTT ACC AAG TCG GTT CAT TTC GAT ATC CA CAA AAG GAG CGT C), luego ATTB-1-Met y ATTB2p-VSVG (GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTT ACC AAG TCG GTT CAT TTC GAT ATC) y por último se completaron los extremos con ATTB1 (GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT) y ATTB2 (GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT).

El producto de los PCRs fue clonado en el vector pDONRTM/Zeo (Invitrogen) empleando la tecnología Gateway (Invitrogen), generando los vectores pENTR-NtMC1-HA y pENTR-NtMC1-VSVG. Los cuales fueron empleados para transferir a NtMC1-HA y NtMC1-VSVG hacia los vectores pEarlyGate103 (fusión a GFP hacia el carboxilo terminal, Curtis y Grossniklaus, 2003), pGWB12 (fusión de Flag hacia el amino terminal, Nakawaga *et al.*, 2002), pGWB18 (fusión de cMyc hacia el amino terminal, Nakawaga *et al.*, 2002) y pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) para la expresión en plantas y pDEST17 (Invitrogen) para la expresión en bacteria.

Para generar los diferentes fragmentos de p20 y p10 se emplearon las siguientes combinaciones de cebadoras: **p20 – Lk** = Flag-MET + ATTB2 - p20-Lk; **p20** = Flag-MET + ATTB2 - Ter-p20; **p10 – L** = ATTB1- p10-L + ATTB2 – HA; **SLP – p10** = ATTB1- p10-SLP + ATTB2 – HA; **p10** = ATTB1- p10 + ATTB2 – HA. La secuencia de los mismos se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Lista de cebadores empleados para generar las diferentes variantes de los fragmentos p20 y p10.

Cebadores	5' → 3'
Flag-MET	GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG ATG GCG AAG AAA GCA G
ATTB2-p20-Lk	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA ATG TCA TCT TTG
ATTB2-Ter-p20	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAT CCA TGG CCT TC
ATTB1-p10-L	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CTG GTT TTG GAT TC
ATTB1-p10-SLP	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CCT TGC CTC TTT CC
ATTB1-p10	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA AAC TT G ACG AAA ATG

V. 6. Mutagénesis dirigida.

Las versiones mutantes de *NtMC1*: C139V, H86S, D348A, D353A, D25A, D137A, D348R, D353R, D348R-D353R, D348A-D353A, R187V, K224A y K270D fueron construida empleando el kit QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). El plásmido pENTR-NtMC1-HA fue usado como molde, excepto para el doble mutante de aspárticos donde se empleó pENTR-NtMC1-D353R-HA o pENTR-NtMC1-D353A-HA. Los oligos empleados se muestran en la Tabla 4 y se empleó el siguiente programa de PCR: 1: 30seg a 95°C, 2: 30seg a 95°C, 3: 1min a 55°C, 4: 1min a 68°C (repetir 16 veces al paso 2), 5: 4min a 68°C.

Tabla 4: Lista de cebadores empleados para generar las diferentes variantes de mutantes puntuales de NtMC1.

Mutagenesis	5' → 3'
C139V-f	CAC AAT TGT ATC CGA CTC AGT GCA CAG CGG CGG CCT CAT TG
C139V-r	CAA TGA GGC CGC CGC TGT GCA CTG AGT CGG ATA CAA TTG TG
H86S-f	ATT CTT TGT TTG TTC ATT ACA GTG GAT CCG GGA CTA GAC TTC CAG CTG AAA C
H86S-r	GTT TCA GCT GGA AGT CTA GTC CCG GAT CCA CTG TAA TGA ACA AAC AAA GAA T
D348R-f	GTG GGT GCC AAA CGC GCC AAA CAT CTG CAG
D348R-r	CTG CAG ATG TTT GGC GCG TTT GGC ACC CAC
D353R-f	ACG GAC CAA ACA TCT GCA CGA GCT ACC CCT GCA GGC
D353R-r	GCC TGC AGG GGT AGC TCG TGC AGA TGT TTG GTC CGT
D348A-f	GTG GGT GCC AAA CGG CCC AAA CAT CTG CAG A
D348A-r	TCT GCA GAT GTT TGG GCC GTT TGG CAC CCA C
D353A-f	ACC AAA CAT CTG CAG CTG CTA CCC CTG CAG G
D353A-r	CCT GCA GGG GTA GCA GCT GCA GAT GTT TGG T
K224A-f	CCA TGT GAA GAA CGC ATC CTT GCC TCT TTC CAC CC
K224A-r	GGG TGG AAA GAG GCA AGG ATG CGT TCT TCA CAT GG
R187V-f	TGT TGA AGA CGC ATT TGA ATC GAT GGG TAT CCA CAT TCC ACG CC
R187V-r	GGC GTG GAA TGT GGA TAC CCA TCG ATT CAA ATG CGT CTT CAA CA
K270D-f	GTC CTA AGG TGA AGA AAT TCA TGG ACG TCA TTT TCA ACA AAC TAC AGC A
K270D-r	TGC TGT AGT TTG TTG AAA ATG ACG TCC ATG AAT TTC TTC ACC TTA GGA C

A partir de los plásmidos generados se transfirió mediante clonaje Gateway, el marco abierto de lectura mutado a los vectores destino pEarlyGate103 (fusión a GFP hacia el carboxilo terminal (Curtis y Grossniklaus, 2003), pGWB12 (fusión de Flag hacia el amino terminal, Nakawaga *et al.*, 2002), pGWB18 (fusión de cMyc hacia el amino terminal, Nakawaga *et al.*, 2002) y pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) para la expresión en plantas y pDEST17 (Invitrogen) para la expresión en bacteria.

V.7. Inducción en *Escherichia coli*.

Los vectores de expresión generados a partir del clonaje en pDEST17 fueron empleados para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen). Una simple colonia fue inoculada en 1mL de medio Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml de cloranfenicol y se creció toda la noche a 37°C. Treinta microlitros de este cultivo fueron agregados a 1.5mL de medio LB fresco y se dejó crecer por 90min a 37°C. Al cabo de este tiempo se agregaron 0.4mM de isopropil-1-thio-β-D-galactopiranososa (IPTG) y se incubó por 3horas continuas.

Las células fueron colectadas mediante centrifugación (18,500 g, 4°C, 5 min), resuspendidas en amortiguador STE (Tris 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM) o amortiguador fosfato (KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, β-mercapto 10 mM, glicerol 10 %) y lisadas por sonicación. La fracción soluble fue separada por centrifugación (18,500 g, 24°C, 10 min) y almacenada a -80°C hasta su posterior empleo.

V.8. Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

Los derivados recombinantes de pEarlyGate103, pMDC32, pMDC83, pGWB12 y pGWB18 fueron introducidos mediante electroporación en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas de *Agrobacterium* fueron crecidas hasta la fase estacionaria a 28°C en medio LB suplementado con 100 µg/ml rifampicina, 100 µg/ml ampicilina, 50 µg/ml kanamicina, y 50 µg/ml acetosiringona (Sigma). Las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación (8200 g, 4°C, 15 min) y lavadas con MgCl₂ 10 mM. Nuevamente se procedió a centrifugar, resuspender las bacterias en MgCl₂ 10 mM suplementado con 150 µg/ml de acetosiringona y ajustar a 0.5 la densidad óptica (DO₆₀₀).

La suspensión bacteriana se incubó por 3 horas a temperatura ambiente y cada una de las construcciones se mezcló con igual volumen de una cepa de *A. tumefaciens* que portaba el supresor viral p19 (Voinnet *et al.*, 2003), tratada de igual forma pero con una DO₆₀₀ de 1. La mezcla se utilizó para infiltrar la parte abaxial de hojas de plantas de *N. benthamiana* con 3-4 semanas de edad. Tres días después se colectó el material para la extracción de proteínas.

V. 9. Determinación de la actividad enzimática.

Debido a los problemas para purificar la metacaspasa y que la concentración de proteínas en extractos totales no es equivalente a los niveles de *NtMC1* y sus derivados, la cantidad de proteína empleada para medir la actividad fue ajustada cualitativamente de acuerdo a la señal detectada en el Western blot. Los diferentes extractos bacterianos fueron diluidos según correspondiera y 50 µl de estas diluciones fueron empleados para determinar la actividad en un volumen final de 500 µl

de amortiguador de reacción (50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM CaCl₂) suplementado con 50 μM del sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC (Bachem Bioscience).

Durante ensayos preliminares no se observó diferencia en la actividad de *NtMC1* cuando se usaban 5 ó 50 mM de CaCl₂, por ello se decidió emplear 5mM en todos los ensayos de actividad. Las mezclas se incubaron en hielo y alícuotas de 100 μl fueron tomadas cada cierto período de tiempo, según correspondiera. La reacción fue detenida por calor 5min a 94°C y la liberación de 7-amino-4-metilcoumarin (AMC) se determinó fluorométricamente (Bio-Rad Versafluor) empleando longitudes de excitación y emisión de 360 y 460 nm, respectivamente. Estas muestras fueron empleadas posteriormente para análisis en Western blot.

V.10. Extracción y análisis de proteínas a partir de material vegetal.

Aproximadamente 100 μl de tejido molido congelado de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, fue homogenizado con 200 μl de alguno de los siguientes amortiguadores de extracción:

1. **Amortiguador Laemmli 1X:** Tris 60 mM pH 6.8, SDS 2 %, glycerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0.01 %.
2. **Amortiguador Tris-Igepal:** Trisi-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Igepal 0.5 %, glicerol 10 %, pH=7.5.
3. **Amortiguador Tris-Triton:** Trisi-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton-100 0.5 %, glicerol 10 %, pH=7.5.
4. **Sacarosa:** Trisi-HCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa 0.5 M, EDTA 10 mM, DTT 5 mM.

En la extracción con el amortiguador Laemmli, las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 minutos. Los extractos de cada amortiguador fueron centrifugados a 18500 g por 5 minutos. En el caso de los amortiguadores nativos (Igepal, Triton y sacarosa), se mezclaron en una relación 1:1 con amortiguador Laemmli y se calentaron por 10 min a 95°C. Posteriormente 10 µl del sobrenadante se cargó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con porcentajes entre 8 % - 12 %.

Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-P+ (Amersham Pharmacia Biotech) mediante electrotransferencia. Para la detección se empleó anticuerpos monoclonales anti-HA (Sigma), anti-VSVG (Sigma) y un policlonal anti-NtMC1 generado en conejo. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz). Se usaron diluciones 1:5000 para cada anticuerpo y las membranas fueron reveladas empleando el kit de fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, Invitrogen)

V.11. Generación de anticuerpos anti-NtMC1.

La proteína *NtMC1* recombinante se sobre-expresó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS de acuerdo a las indicaciones de Frangioni y Neel (1993). Posteriormente, *NtMC1* fue purificada a partir de un gel de SDS-PAGE 8.5 % según el protocolo descrito por Scheer y Ryan en el 2001. Dos conejos de Nueva Zelandia fueron inmunizados por inyección subcutánea con 100 µg de proteína recombinante suspendida en adyuvante de Freud completo (Sigma) cada diez días, tres veces. La titulación fue ensayada en la semana 7 y el suero fue recuperado cuando hubo una adecuada detección (detección de 1 ng de antígeno con una dilución 1:10,000 del suero completo en ensayos de Western blot).

V.12. Purificación de la proteína.

La presencia de una cola de histidinas (His x6) en el amino terminal de la proteína expresada en *E. coli* permitió realizar un primer paso de purificación mediante cromatografía de afinidad, empleando el sistema de purificación Ni-NTA (Invitrogen). Para ello se incubaron 5 mL de extractos totales de proteínas con 500 μ l de agarosa Ni-NTA toda la noche a - 4°C. Posteriormente se empaquetó y lavó la columna con 5 volúmenes de buffer fosfato suplementado con 25 μ l de imidazol. Luego se procedió a la elución empleando un 1 ml de buffer fosfato con concentraciones crecientes de imidazol (100, 150 y 250 μ l).

Para la detección de la proteína se tomaron 10 μ l de las fracciones colectadas y se les agregó 30 μ l de buffer Laemmli 2X, se calentó a 95°C por 5 min y luego fueron corridas en geles SDS-PAGE 10%. En los Westerns blot se emplearon como anticuerpos primarios anti-His y anti-NtMC1 y como secundario, uno acoplado a fosfatasa alcalina.

En el segundo paso de purificación se llevó a cabo una cromatografía de exclusión de peso molecular. Para ello se empleó una columna Superdex-200 (GE Healthcare) y un FPLC BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Se inyectaron 100 μ l de proteína y se colectaron fracciones de 500 μ l. De estas se tomaron 100 μ l y se concentraron las proteínas mediante el método metanol – cloroformo (Sauve *et al.*, 1995). El precipitado fue resuspendido en 20 μ l de amortiguador Laemmli, calentado a 95°C por 5 min y separándolas en geles SDS – PAGE 10%.

V.13. Ensayos de inmunoprecipitación.

Los vectores pGWB12-NtMC1-HA (I), pGWB12-K224A-HA (II), pGWB18-NtMC1-VSVG (III) y pGWB18-K224A-VSVG (IV) fueron transformados en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* en las combinaciones siguientes: I + III, I + IV, II + IV. Al cabo de tres días se colectaron las hojas agroinfiltradas y se procedió a la extracción de proteínas totales empleando buffer de sacarosa. Se empleó 1 µl de agarosa acoplada a inmunoglobulina anti – HA (Sigma) y se incubó toda la noche a - 20°C con 1 ml de extracto total de proteínas. Al cabo de este tiempo se centrifugó la muestra a 12,000 g por 1 min y se lavó el precipitado cuatro veces con amortiguador PBS (Amortiguador fosfato salino). Posteriormente se le agregaron 60 µl de amortiguador Laemmli, se calentó a 95°C por 3 min y se corrieron 10 µl en un gel SDS-PAGE al 12%. Para la detección se empleó el anticuerpo monoclonal anti- VSVG (Sigma) y como secundario un anti-inmunoglobulina acoplado a fosfatasa alcalina. También se emplearon 5 µl de extracto total de proteínas a los que se les adicionó 55 µl de amortiguador Laemmli, los cuales se calentaron y corrieron de igual forma que las muestras anteriores, pero se reveló con anti-HA (Sigma) y un anticuerpo secundario también acoplado a fosfatasa alcalina

V.14. Secuenciación de la proteína.

La secuenciación de los péptidos se llevó a cabo en la unidad del secuenciación de proteínas del Instituto de Biotecnología de la UNAM y la metodología empleada fue la siguiente: Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida y digerida “in gel” con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS

constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 μm ID \times 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2+ y 3+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1+, superiores a 4+ y de cargas indefinidas.

Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones segundo las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NBCInr a través del programa ProteinProspector.

VI. RESULTADOS

VI. 1. Identificación de una secuencia de metacaspasa en *Nicotiana tabacum* L.

Para identificar nuevas secuencias de metacaspasas se empleó ADNc obtenido de una cinética de respuesta a estrés inducida por herida en *Nicotiana tabacum* L. Se realizó un PCR empleando oligos degenerados (upper y lower) diseñados a partir de secuencias de metacaspasas de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*). Como resultado se obtuvo una banda de aproximadamente 182 pb a las 8 horas de inducción. La misma correspondía en talla con una metacaspasa tipo II de *Arabidopsis*.

El fragmento fue clonado y secuenciado, para luego realizar un alineamiento con la base de datos no redundantes del NCBI, el cual mostró una elevada homología de secuencia (97%) con un fragmento de metacaspasa tipo II reportada para *Nicotiana benthamiana* (Hao *et al.*, 2006). A partir de este análisis se diseñaron oligos específicos (NT2B-F282 y NT2B-R) para amplificar toda la región codificante. Se obtuvo una banda única de aproximadamente 1 Kb, similar en talla a la secuencia reportada para *N. benthamiana.*, la que posteriormente fue clonada y secuenciada. El BLAST realizado con la nueva secuencia, mostró una homología del 98% con la de *N. benthamiana*, en total se observaron 10 cambios de bases, de los cuales ocho constituyeron transiciones.

Para completar el extremo 5' del gen se procedió al diseño de oligos degenerados sobre la región 5' UTR así como específicos sobre la región codificadora. Con la combinación RACE5Ntd + RACE5-143 se amplificó una banda de aproximadamente 500 pb, lo que permitió la identificación de unos 200 pb de la secuencia no traducida del 5'.

Respecto al extremo 3' se empleó el oligo específico RACE3-200 y el RACE3-outer (poliT) amplificándose dos bandas, de 300 y 500 pb respectivamente. La secuenciación de la banda mayor mostró que se correspondía con una anhidrasa carbónica cloroplástica (AF454759), mientras la menor coincidía perfectamente con el extremo 3' de una metacaspasa.

El diseño de oligos específicos sobre las regiones 5' y 3' permitió obtener la secuencia completa del nuevo gen, la cual fue nuevamente comparada con la base de datos del NCBI corroborando que se corresponde con la secuencia complementaria de una metacaspasa tipo II, el cual nombramos *NtMCI* (*Nicotiana tabacum Metacaspase-1*) y constituye la primera secuencia completa de metacaspasa reportada en la literatura para *Nicotiana tabacum* L. El gen está formado por 196 pb de 5'UTR, 1251 pb de ORF y 296 pb del 3'UTR. La secuencia de aminoácidos se dedujo a partir del fragmento codificador mediante el empleo del programa TRANSLATE, el cuál mostró que el marco abierto de lectura analizado no contenía interrupciones en su traducción hacia aminoácidos.

VI. 2. Caracterización bioinformática de la secuencia obtenida.

VI.2.1. Cálculo de parámetros físicos-químicos.

Los resultados obtenidos al calcular los parámetros físico-químicos de la proteína deducida con el programa PROTPARAM, mostraron que el polipéptido consta de 416 aminoácidos, tiene un peso molecular aproximado de 46 kDa y un punto isoelectrico teórico de 4,83.

El resto de las variables calculadas se describen a continuación:

- Número total de residuos cargados negativamente (D + Q): 77
- Número total de residuos cargados positivamente (R + K): 43
- Coeficientes de Extinción (CE): Esta proteína no contiene ningún residuo de triptófano y la experiencia ha demostrado que esto pueda resultar en más de un 10% de error cuando se calcula el CE. Los valores de los mismos se muestran a continuación en unidades de $M^{-1}cm^{-1}$, determinado a 280 nm en agua:
 - CE: 15400, Absorbancia 0,1% (=1 g/l) de 0,337, asumiendo que todos los residuos de cisteína forman puentes.
 - CE: 14900, Absorbancia 0,1% (=1 g/l) de 0,326, asumiendo que no todos los residuos de cisteína forman puentes.

VI. 2. 2. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con proteínas anotadas en bases de datos.

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de *Nicotiana tabacum* L., con las proteínas anotadas en la base de datos no-redundantes de NCBI mediante el programa BLAST mostró que posee el mayor porcentaje de identidad (98%) con una metacaspasa tipo II de *Nicotiana benthamiana* (Tabla 5). Además, se evidenció la presencia de dos dominios conservados hacia los extremos amino y carboxilo terminal de peptidasas C14 (Figura 9).

Tabla 5: Resultados obtenidos a partir de la comparación de la secuencia *NtMC1* con las proteínas anotadas en la base de datos no redundantes de NCBI mediante el programa BLAST. **Columna 1:** Identificador en las bases de datos de las proteínas; **Columna 2:** Breve descripción de la proteína; **Columna 3:** Número de aminoácidos (longitud); **Columna 4:** Porcentaje de identidad en secuencia (%) con respecto a *NtMC1*; **Columna 5:** Probabilidad de que la similitud obtenida sea al azar y **Columna 6:** Organismo del que proviene la proteína.

Identificador	Descripción	Longitud	Identidad (%)	Valor-E	Organismo
AAZ39606.1	Metacaspasa tipo II	323aa	98	0.0	<i>Nicotiana benthamiana</i>
AAM51555.1	Metacaspasa tipo I	409aa	91	0.0	<i>Solanum lycopersicum</i>
AAD13216.1	Proteína abundante del látex	417aa	75	1,00E-176	<i>Hevea brasiliensis</i>
ABK95507.1	Función desconocida	416aa	72	2,00E-166	<i>Populus trichocarpa</i>
NP_178052.1	Proteína abundante del látex, supuesta (AtmC7) / familia de las proteínas caspasas	418aa	69	1,00E-164	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAP84710.2	Metacaspasa 7	418aa	69	7,00E-164	<i>Arabidopsis thaliana</i>
NP_17805.1	Metacaspasas tipo II (AtmC 6); endopeptidasa tipo cisteínicas	410aa	66	1,00E-158	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABK24525.1	Función desconocida	418aa	65	1,00E-150	<i>Picea sitchensis</i>
CAD59226.1	Metacaspasa tipo II	418aa	65	1,00E-149	<i>Picea abies</i>
EAY76152.1	Proteína hipotética Osl_003999	417aa	62	1,00E-143	<i>Oryza sativa Indica Group</i>

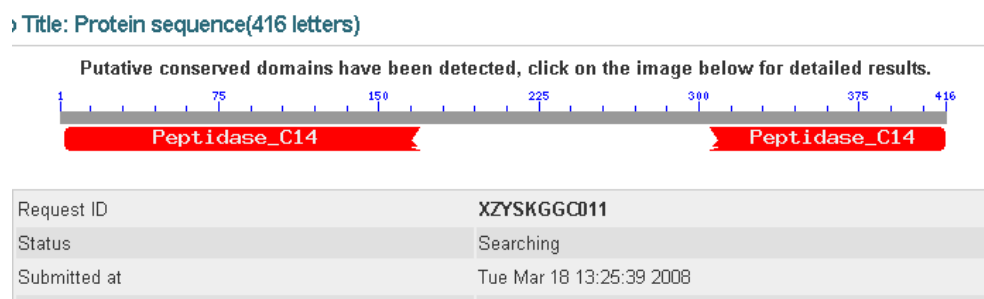


Figura 9: Resultados obtenidos con el programa BLAST, donde se representan esquemáticamente en barras rojas los dominios C14 conservados p20 y p10 presentes en *NtMC1*.

```
FvMC4      1 -----
PrpMC     1 -----
HbMC      1 -----
RcMC      1 -----
PtMC      1 -----
VvMC5     1 -----
NbMC1     1 -----
NtMC1     1 -----
SlMC4     1 -----
CsMC4     1 -----
CsMC5     1 -----
GmMC4     1 -----
MfMC      1 -----
AlMC7     1 -----
AtMC4     1 -----
CarMC     1 -----
AtMC5     1 -----
AtMC6     1 -----
mcII-Pa   1 -----
PsMC      1 -----
AsMC3     1 -----
TmMC3     1 -----
HvMC      1 -----
BdMC5     1 -----
SbMC      1 -----
ZmMC      1 -----
OsMC      1 -----
AtMC7     1 -----
AtMC8     1 -----
SmMC      1 -----
PpMC      1 -----
AtMC9     1 -----
CrMC      1 -----
VcMC      1 -----
PtMC1     1 ---MYS---YMLVNCSCKQOTPLQLPFGAESIRCVICQAVTHVAVHS-----RHAPPPS-----N
RcMC1     1 ---M-----SMLVNCSCHWIPLQLPFGARSIRCSICRAVTRIADAR-----TAPPPPSYAPSSHTALP
VvMC1     1 -MPPPPPT---MMLVNCACRITPLQLPFGARSIRCAICQGVQIADPR-----AVPPPPF
AtMC1     1 MYPPPPSSIYAPPMLVNCSCGRTPLQLPFGARSIRCALCGAVTHIADPR-----TAPPPQP
SbMC1     1 ---MMMLIDCSGCRITPLQLPFGAPCIRCAICQAVTHIWA-----PAPP
ZmMC1     1 ---MMMLIDCSGCRITPLQLPFGAPCIRCAICQAVTHIA-----PAPP
HvMC1     1 ---MMMLVNCSCGRTALQLPFGAPCIRCSICQAVTHIWA-----APPAPC
PsMC1     1 ---MAMPPLLVTCGQQITPLQLPFGAKSIRCALCRAVTHIAEPS-----GAAPPQC
SmMC1     1 ---MLVNCSCNCRITPLQLPFGAKAIRCALCHAVTHIAEPR-----NVPPSPY
PpMC1     1 ---MLVNCGRCRITPLVLPFGAMSIQCALCRHVTPIAYDR-----AAPSHST
AtMC2     1 ---MLLVDCSSCRTPLHLFPGATRIRCAICHAFTLIAPEPRLQSHASASFPFFPNSSPAPTIFVYPPPTPGPYTHAPHAPS
AtMC3     1 ---MASRREVRCR-CGRRMVQDPDARTVQCSTCHVTQLYSLVD-----IARGANRIHG--FQQL
```

D25

```
FvMC4      1 ---MAKK-AVLGGNYGGTKAELKGCINDVWRMYCLIDRGFGE--DITVILDT--
PrpMC     1 ---MAKK-AVLGGNYGGTKAELKGCINDVWRMHSCLVDIIGFRE--DITQVLID--
HbMC      1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
RcMC      1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
PtMC      1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
VvMC5     1 ---MCKK-AVLGGNYGGTKAELKGCINDVWRMYNSLNRFGFSQ--DITVILDT--
NbMC1     1 -----
NtMC1     1 -----
SlMC4     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYNCLNRFGE--DITVILDT--
CsMC4     1 ---MCKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLIERGFSE--DITVILDT--
CsMC5     1 ---MCKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLIERGFSE--DITVILDT--
GmMC4     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLIERGFSE--DITVILDT--
MfMC      1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLIERGFSE--DITVILDT--
AlMC7     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
AtMC4     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
CarMC     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLIERGFSE--DITVILDT--
AtMC5     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHSCLVDRFGFE--RNITVILDT--
AtMC6     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHSCLVERGFSE--SNIKILDT--
mcII-Pa   1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERGFSE--DITVILDT--
PsMC      1 ---NTEK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMYCLVERFGFKE--DITVILDT--
AsMC3     1 ---MGRK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFD--DAAITVILDTA--
TmMC3     1 ---MGRK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFD--DAAITVILDTA--
HvMC      1 ---MGRK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFD--DAAITVILDTA--
BdMC5     1 ---MGRK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHSCLVDRFGFAE--ADITVILDTA--
SbMC      1 ---MGAKE-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--SGITVILDT--
ZmMC      1 ---MGAKE-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--SGITVILDT--
OsMC      1 ---MGRK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--DITVILDR--
AtMC7     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFAE--DITVILDT--
AtMC8     1 ---MAKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGAN--KDIITVILDT--
SmMC      1 ---MCKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHSCLVERFGFAE--DITVILDT--
PpMC      1 ---MCKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--RDITVILDT--
AtMC9     1 ---MDQQQVVKRRLAVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFKE--DITVILDT--
CrMC      1 ---MPCKK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--ADITVILDT--
VcMC      1 ---MPSK-AVLGGNYGPKAELKGCINDVWRMHCCLVDRFGFDE--SDITVILDT--
PtMC1     49 PTTTRPPSTL---AP--PSPYNHAPPPPPPNQHGKKE---AVLVGISYRYSRBELKGCINDARCMRELLNRFQPPQ---SITLILDT--
RcMC1     56 PPSSAPSSTY---APPLPSYNYAPPQPPNNAHGKKE---AVLGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRYLLNRFQPPQ---SITLILDT--
VvMC1     51 ADHAPPFPQ---LP-ALSPYNHAPPGPSAHSKKE---ALVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRYLLNRFQPPQ---SITLILDT--
AtMC1     57 ---SSAPS-----PPPQIHAPPGLPHPHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRELLNRFQPPQ---SITLILDT--
SbMC1     40 ---ADPNRGA---VQ--QAPGWGPPP---PPVHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRELLNRFQPPQ---SITLILDT--
ZmMC1     40 ---AEPNRGA---VQ--PAPGWAPP---PPVHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRELLNRFQPPQ---SITLILDT--
HvMC1     42 -PVVDPARGA---QA--PAPAWGPPP---PAAHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRELLNRFQPPQ---SITLILDT--
PsMC1     50 YHQHQLAPP---AP-AASPQHYSPPAP---PPSHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDANCMRYLLNRFQPPQ---ASTILDT--
SmMC1     44 ---SSAGS---SNGA---PP--ANPLQYSPS---VPSAHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRYLLNRFQPPQ---SITLILDT--
PpMC1     44 ---POISDPY---RNSSHAPQYTPTP---PMSHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDANCMRELLNRFQPPQ---ASTILDT--
AtMC2     80 PFNHAPPDSYFFTHAPPASSPFNHAPPGLPHPHGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDARCMRYLLNRFQPPQ---SITLILDT--
AtMC3     56 LRQHQPQHHEQQQQQHHMQAPPRLLEP---LPSFPGKKE---AVLVGGHSYRYSRYELKGCINDANCMRYLLNRFQPPQ---SITLILDT--
```


	K224	K270
FvMC4	193 RRHGG----DEEESDREIDMGDGERGVKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--SHE	
FrpMC	194 RPDRIH----HEEESDREIETGYGHRGVKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--NNE	
HbMC	193 HHHHG---HRDEEDFDNRVVEEDYGDSDGVKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--HGD	
RcMC	193 QHRHHRH--HYDEEDTDDRVEEDGDCSEYGVKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--HGD	
PcMC	200 HPSRH----VKEEDFDRAVEGDYGEREYKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--LGD	
VvMC5	194 QHRHHRHRRHHEEDVDEGGVDAEYGDGQVYKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
NbMC1	102 DRREE----EKESFAESSVIETEDGDQVHKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--HGK	
NtMC1	196 DRREE----EESFAESSVIETEDGDQVHKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--HGN	
SlMC4	195 HRREE----EENFAESSVIETEDGDQVHKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--KIN	
CeMC4	195 QHRHHD--RPSDGDSESERELELSYGERVWIKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--GDE	
CeMC5	195 QHRHHD--RPSDGDSESERELELSYGERVWIKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--GDE	
GmMC4	193 RHNRG---RDDDDDEAQRNDIELPDGG--YKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--HGS	
MtMC	184 CQYK---SGIGEKDVELLHVNHRYIKRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--GG	
AlMC7	199 KDE----DEAEE-IETKEIELEDGERIHPKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--AGN	
AtMC4	199 KDE----DEAEE-IETKEIELEDGERIHPKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--AGN	
CarMC	199 KDE----AEAEI IQTKEIELEDGERVHARDKSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--AGN	
AtMC5	196 DEKDENKI-----KELKLEDGAKVHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--EGK	
AtMC6	170 -----KETEAEIIEIKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--EIT	
mcII-Pa	197 EHKDR---RESDEGETREIEYRGRGHAKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--SS	
PeMC	197 EHKDR---HEFDEGETREIEYRGRGHAKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--SA	
AsMC3	206 --GQGS--SYDD--AETEEPLSDS--VDGHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
TmMC3	206 --GQGS--SYDDDDAEAEPLSDSGTDGHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
HvMC	202 --GQGS--SYDD--DEAEENLDS--AEGHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
BdMC5	201 --HQGS--GHID--SEAEPEIDSGTDGHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
SbMC	200 HSHRQG--HGDDDDAE--ESRYINT--ADAHKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
ZmMC	203 RSHQGS--SGHGDDGQESRYINT--ADAHKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGG	
OsMC	201 --HSQS--HYGG--EQDetyaqP--TDGHWKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--QGS	
AtMC7	197 T-----REIVEVGGEGDEV--KSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--KRT	
AtMC8	204 RGGGEE----SFRGEIELEKDETLDRKRYLDFEYVSLRRETCQTNLDFVRLRDTLLKDFGHSFSP-----NLRGLSD	
SmMC	201 GSRHRR---QEQDEEEQVLEETENGDVWIKSRSLPLSLTLILKQKGTGDDIVVCKIRPFLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--SSGG	
FpMC	192 PDTQN-----FDFESQYMEETHQIKRNLNEMALRHSQITG--RSLVQVNRITLFDVFGDASPKVKKFKVIMKRLC--SGAG	
AtMC9	177 -----NKTIKSLALEFKAKMELSSIGITTSIG----TLLDFGSDAGLWELFAMDLDLIE---	
CrMC	179 -----LGQPDGRDRKVALLESGLGSLGQLLGVVDFARTVRSNGTDFGASPKVKKFKVIMKRLC--YQALTAGTK-	
VcMC	179 -----LGQPDGRDRKVALLESGLGSELLCGARVDARNVRSITGTFDFGASPKVKKFKVIMKRLC--YQALTAGTK-	
PtMC1	263 -----	
RcMC1	262 -----	
VvMC1	256 -----	
AtMC1	254 -----	
SbMC1	238 -----	
ZmMC1	238 -----	
HvMC1	242 -----	
PsMC1	253 -----	
SmMC1	255 -----	
FpMC1	244 -----	
AtMC2	290 -----	
AtMC3	263 -----	
FvMC4	277 GE---G--SGGFMGMVGLLACFLKQKIDEN--D-----QY-VKPA-DTEVGGKEEYAGANHR---S-PPDGGILLI	
FrpMC	278 G---S--SGGFMGMVGLLACFLKQKIDEN--D-----EY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---A-PPDGGILLI	
HbMC	279 GE--SG--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SY-VKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---S-PPDGGILLI	
RcMC	281 GE--SG--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----GY-AKPA-DTEVGGSKQEYAGANHR---S-PPDGGILLI	
PcMC	285 GE--SG--GGFVGMVGLLACFLKQKIDEN--E-----GY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---A-PPDGGILLI	
VvMC5	284 GG--GE--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENNE-----DY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---A-PPDGGILLI	
NbMC1	187 GE--GE--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
NtMC1	281 EE--GE--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
SlMC4	280 EQ--GG--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
CsMC4	283 NG--QS--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----DY-VKPA-KTEVGGSKTEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
CsMC5	283 NG--QS--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EY-VKPA-KTEVGGSKTEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
GmMC4	278 D--ES--GGFVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----GY-AKPA-ETVGGSKQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
PcMC	265 ES--GG--HSGMGLVGLLACFLKQKIDENDE-----EY-ENP-----VKSAPDYAGANHR---D-PPDGGILLI	
AlMC7	282 GE-----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----Y-VKPA-QTEVGGSKQEYAGANHR---V-PPDGGILLI	
AtMC4	282 GE-----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----Y-VKPA-QTEVGGSKQEYAGANHR---V-PPDGGILLI	
CarMC	283 GE-----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----Y-VKPA-QTEVGGSKQEYAGANHR---V-PPDGGILLI	
AtMC5	276 T-----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----Y-VKPA-KTEVGGSKQEYAGANHR---S-PPDGGILLI	
AtMC6	239 TTIQTV---EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----Y-VKPA-----QY-YAGANHR---A-PPDGGILLI	
mcII-Pa	279 GN-----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SEY-VKPA-KEVSSSTQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
PeMC	279 DN-----KGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SEY-VKPA-KEVSSSTQEYAGANHR---G-PPDGGILLI	
AsMC3	288 -----HGRVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----ED-LKPA-EQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
TmMC3	291 -----HGGVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EE-LKPA-EQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
HvMC	284 -----HGGVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----ED-LKPA-EQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
BdMC5	284 -----YGGVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EDALKPA-EQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
SbMC	285 -----HGGVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EE-LKPA-KQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
ZmMC	288 -----HGGVGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EEEEFPA-KQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
OsMC	284 GE-----CGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EEAFKPA-EQVNSVCEYAGANHR---E-PPDGGILLI	
AtMC7	271 QS-----TNGKVEESARGTEETINDEH-----Y-VKPA-QAVKSDREYAGANHR---LEPPDGGILLI	
AtMC8	276 -----MGNCEVIAG-----DSGASRLN---A-PPDGGILLI	
SmMC	287 ND--GG--CGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----EY-ASPA-KRTHAN-PHYAGANHR---RRSDMAYLIV	
FpMC	271 -----EGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----SSLMARAGSAHPNFRSNYAGANHR---V-PPDGGILLI	
AtMC9	234 -----TMTREKH-----V-PPDGGILLI	
CrMC	247 GAAAGG--KGGFMGMVGLLACFLKQKIDENDE-----KVVNY-TPGAKPPNEQLG-----A-PPDGGILLI	
VcMC	248 GGGAGGVPAKQQLIACCLAPADQNG--GPGTGANAGSFGAHYAAPAAAGNLAEEDKVVNY-TPGAKPPNEQLG-----A-PPDGGILLI	
PtMC1	253 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
RcMC1	262 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
VvMC1	256 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
AtMC1	254 -----GAGG-----E-PPDGGILLI	
SbMC1	238 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
ZmMC1	238 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
HvMC1	242 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
PsMC1	253 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
SmMC1	255 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
FpMC1	244 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
AtMC2	290 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	
AtMC3	263 -----GNGG-----E-PPDGGILLI	

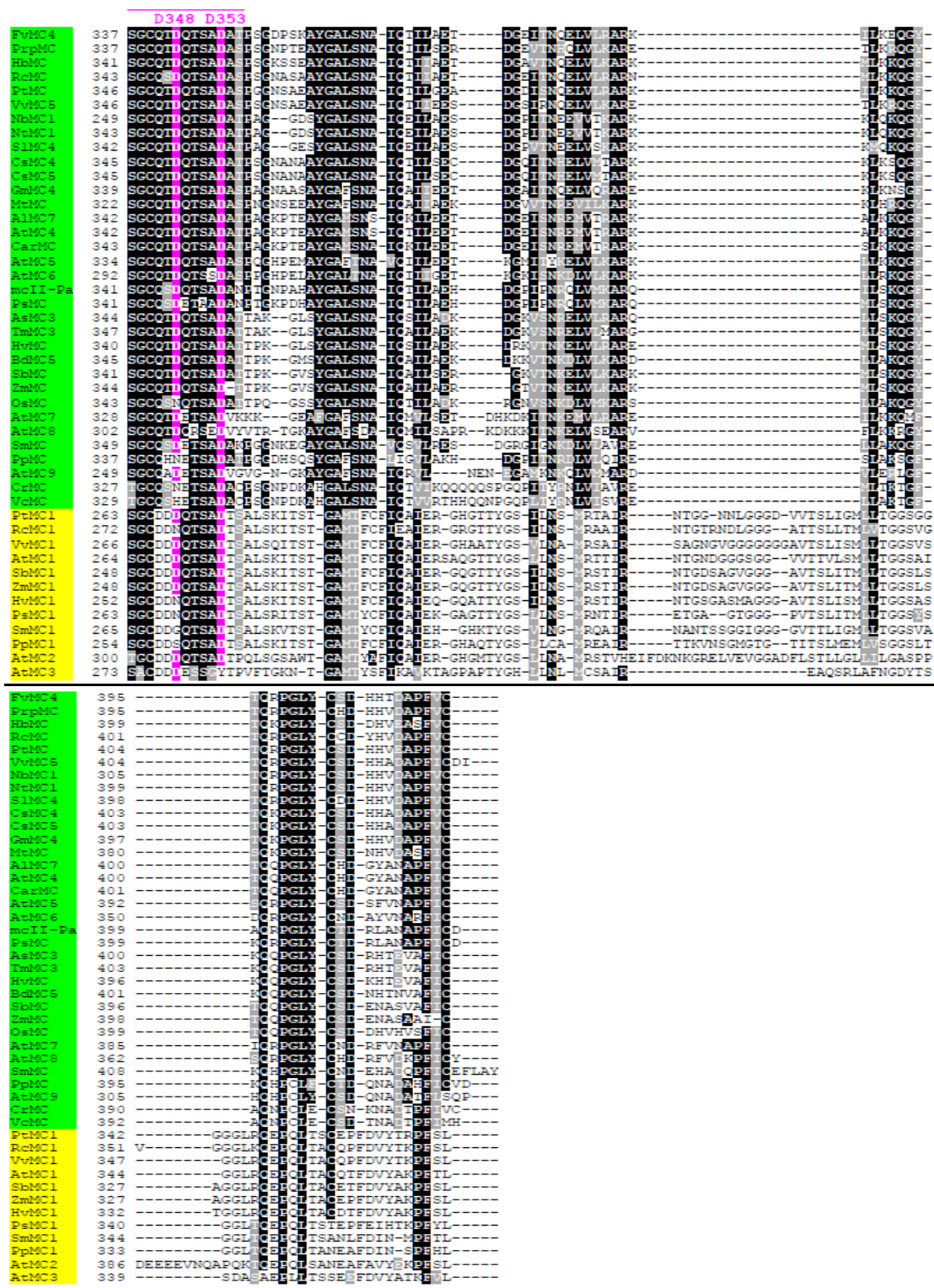


Figura 10: Alineamiento de secuencias de metacaspasas de plantas. Las proteínas con similitud con *NtMCA1* fueron identificadas en la base de datos GeneBank. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y ajustado manualmente con el programa Se-AL v2.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>). La figura fue construida con el programa BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Los aminoácidos del sitio activo están marcados con color rojo, los del sitio S1 de magenta y los posibles sitios de procesamiento de azul. Los aminoácidos que fueron mutagenizados en este trabajo se muestran sobre el alineamiento. Las líneas magentas muestran las secuencias conservadas que incluyen los Asp348 y Asp353 en *NtMCA1* y contienen el loop-280 de MCA2 de *T. brucei* y el loop-L3 de Yca1 de levadura.

El alineamiento múltiple realizado con el programa CLUSTALW 2.0, para comparar las secuencias con mayor porcentaje de identidad respecto a *NtMC1*, permitió identificar los segmentos de aminoácidos conservados en las peptidasas de la familia C14 (Figura 10). Entre estas regiones se pudieron identificar la histidina y cisteína conservadas del sitio activo del dominio p20, localizadas en las posiciones 86 y 139 respectivamente.

VI. 2. 3. Determinación de las relaciones filogenéticas.

Para determinar las relaciones filogenéticas de *NtMC1* con peptidasas de la familia C14, se tuvieron en cuenta las de mayor porcentaje de identidad, las nueve metacaspasas informadas para *Arabidopsis thaliana* y dos caspasas de animales, cuyos datos se muestran en la tabla 6.

El dendrograma construido con el programa MEGA 4.0 se muestra en la figura 11. El mismo permite formar tres grupos: en el grupo I aparecen *NtMC1*, M2, M1, M3, M10, M9; en el grupo II se asocian A4, A5, A6, A7, A8, A9, A3, A1, pertenecientes a *Arabidopsis thaliana* y por último aparece el grupo III, que incluye a las dos caspasas de animales C8 y C9. El 96% de las simulaciones coinciden en que *NtMC1* se agrupa en una misma rama con M2, ambas metacaspasas tipo II del género *Nicotiana*, a su vez, M1 se relaciona en el 75% de las simulaciones con estas metacaspasas aun perteneciendo al tipo I.

Tabla 6: Datos de las secuencias de aminoácidos utilizadas para determinar las relaciones filogenéticas de *NtMC1* con peptidasas de la familia C14. **Columna 1:** Código utilizado para su identificación en el dendrograma; **Columna 2:** Identificador en base de datos; **Columna 3:** Breve descripción de la proteína; **Columna 4:** Organismo al cual pertenece.

Proteína	Identificador	Descripción	Organismo
A1	At1g02170	metacaspasa 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A2	Atg425110	metacaspasa 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A3	At5g64240	metacaspasa 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A4	At1g79340	metacaspasa 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A5	At1g79330	metacaspasa 5	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A6	At1g79320	metacaspasa 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A7	At1g79310	metacaspasa 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A8	At1g16420	metacaspasa 8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A9	At5g04200	metacaspasa 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>
C8	AAD24962	Caspasa 8	<i>Homo sapiens</i>
C9	BAA82697	Caspasa 9	<i>Homo sapiens</i>
M1	AAM51555.1	Metacaspasa tipo I	<i>Solanum lycopersicum</i>
M2	AAZ39606	Metacaspasa tipo II	<i>Nicotiana benthamiana</i>
M3		Proteína abundante del látex	<i>Hevea brasiliensis</i>
M9	CAD59226	Meatcaspasa tipo II	<i>Picea abies</i>
M10	EAY76152.1	Proteína hipotética OsI	<i>Oryza sativa Indica</i>

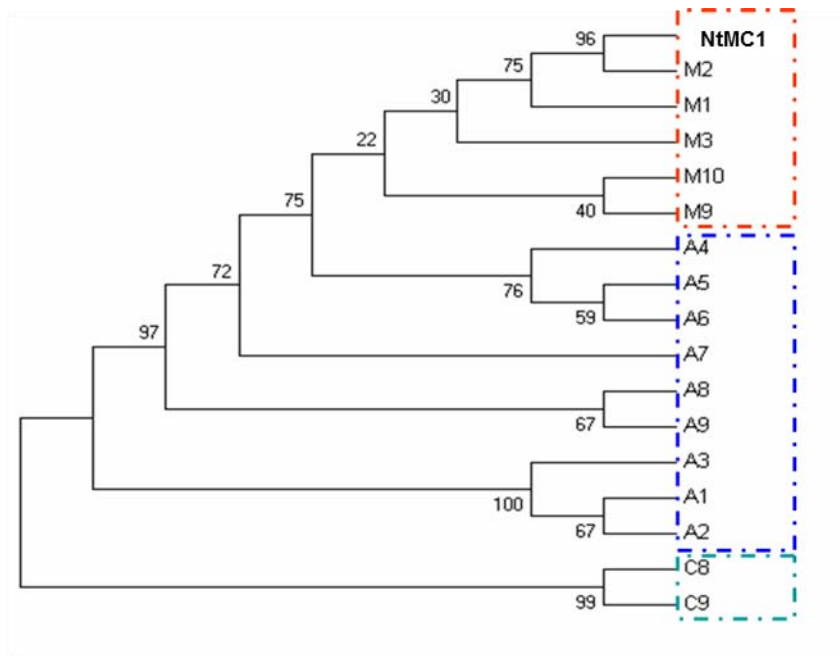


Figura 11: Dendrograma de las peptidasas de la familia C14 y de las secuencias similares a *NtMC1*. Los números representan los valores de *Bootstrap* calculados con el programa Mega versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Recuadro Rojo: Grupo I, Azul: Grupo II, Verde: Grupo III.

VI. 2. 4. Cálculo de la estructura tridimensional de la proteína deducida.

La predicción de la estructura secundaria de *NtMC1* se muestra en la Figura 12. El programa JPRED empleado para el análisis, genera un modelo consenso en base a la predicción realizada por varios algoritmos que permitieron incrementar la calidad del alineamiento múltiple de secuencias obtenido anteriormente.

Por otra parte, para predecir la estructura 3D de *NtMC1* primero se identificaron las proteínas que podrían ser empleadas como moldes, mediante el programa consenso METASERVER. Como resultado se obtuvo que la proteína Gsu0716, aislada de la bacteria *Geobacter sulfurreducens* (Código PDB: 3bij_A), mostraba la mayor puntuación consenso del programa (Jscore=126.67). Esta estructura molde permite calcular el modelo 3D de 150 aminoácidos del extremo amino (subunidad p20) y 90 aminoácidos del extremo carboxílico (subunidad p10) del dominio catalítico de *NtMC1*. Gsu0716 es una proteína cristalizada y obtenida mediante genómica estructural, pero de la cual se desconoce su función.

Este programa brindó, además del modelo de estructura 3D, el alineamiento correspondiente entre la secuencia de aminoácidos de *NtMC1* con las 20 secuencias de mayor puntuación consenso predichas (Figura 12), e incluye también la información de las estructuras secundarias predichas.

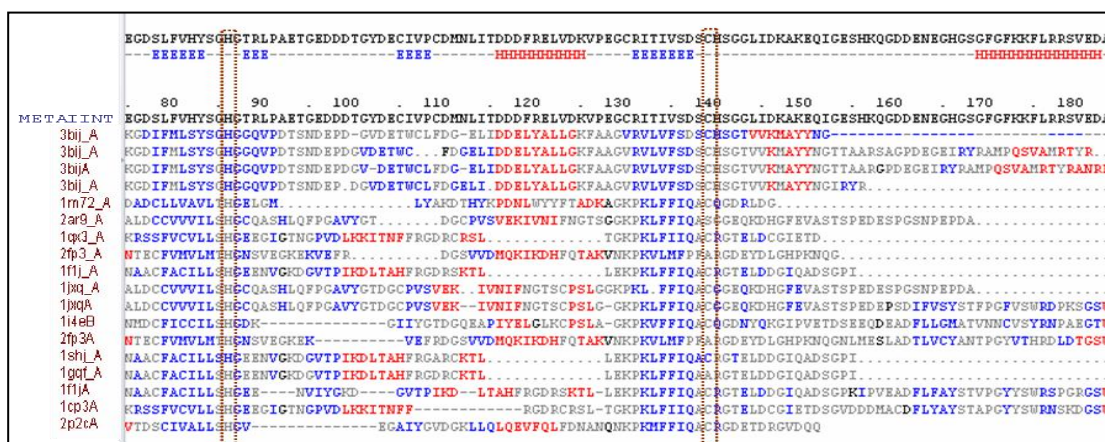


Figura 12: Resultados alineamiento de proteínas obtenido mediante el programa METASERVER. Se muestra un fragmento de METAIINT (*NtMC1*) y los 20 modelos de mayor puntuación (indicadas por su código en PDB), correspondiente con el dominio catalítico de las caspasas. En líneas discontinuas se destacan los residuos catalíticos histidina y cisteína.

En la figura 13 se muestra el modelo 3D del dominio catalítico de los primeros 150 aminoácidos de la subunidad p20 y de los 90 aminoácidos del p10.

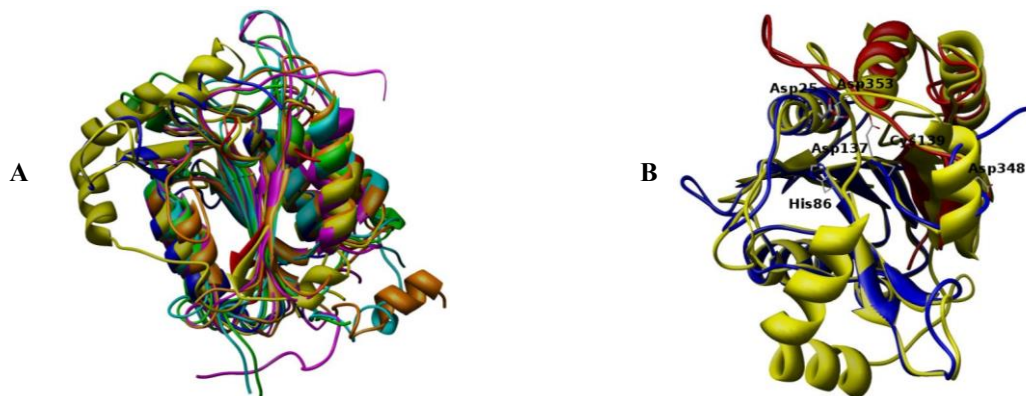


Figure 13: Modelo 3D de las subunidades p20 y p10 obtenidas con el METASERVER y el JPRED. **A:** subunidad p10; **B:** subunidad p20 en la cual se observan diferentes aminoácidos del sitio activo entre ellos Asp25, Asp137, Asp348, Asp353, C139 y H86. En las figuras aparecen superpuesto el molde empleado y la nueva estructura generada.

El modelo muestra a la histidina 86 y la cisteína 139 muy próximas en lo que sería el sitio activo, coincidiendo con lo informado en la literatura. Sin embargo, el aspártico 348 que debería participar en la coordinación del sustrato aparece demasiado alejado del sitio, en su lugar aparece el 353, lo que podría constituir una diferencia con las otras metacaspasas.

Para reforzar los datos *in silico* se recalculó la estructura 3D con el programa Phyre 2, el cual cuenta con una base de datos más actualizada donde se incluyen las dos únicas estructuras cristalográficas de metacaspasas que han sido resueltas hasta la fecha, la MCA2 de *Trypanosoma brucei* (McLucksley *et al.*, 2012) y la YCA1 de levadura (Wong *et al.*, 2012). Curiosamente el molde que sigue siendo más adecuado es el de *Geobacter sulfurreducens*, aunque también aparecen los de las metacaspasas con un alto puntaje. El modelo obtenido se muestra en la figura 14 y es consistente con el anterior, confirmando la cercanía del D353 a la diada catalítica y ubicando más alejado al D348.

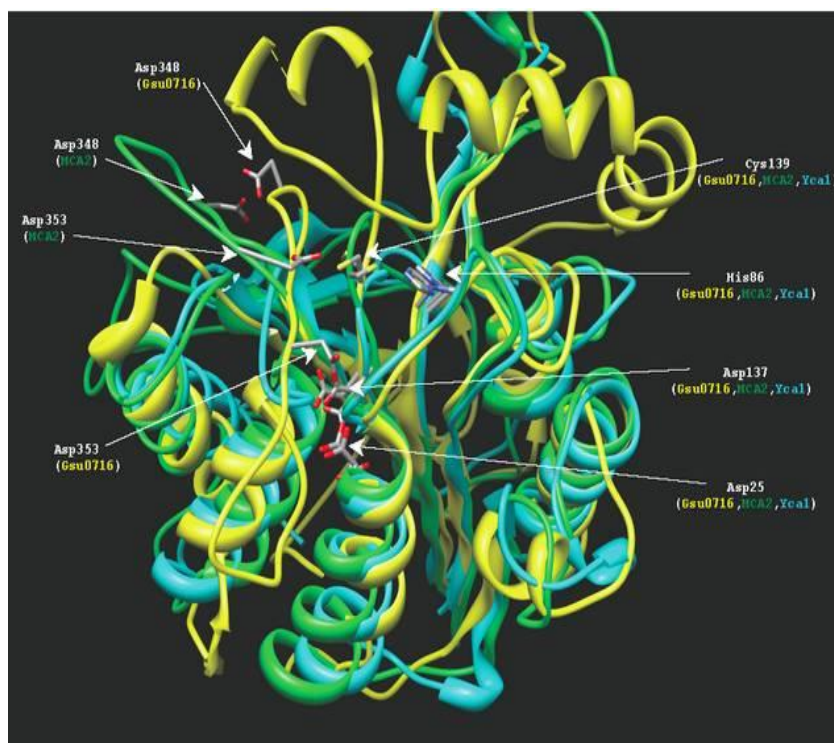


Figura 14: Modelo 3D obtenido de las subunidades p20 y p10 mediante el software Phyre 2 y empleando como molde a las dos estructuras de metacaspasas cristalizadas (MCA2 y YCA1) así como a Gsu0716 de *Geobacter sulfurreducens*. Este modelo es congruente con el obtenido anteriormente.

VI. 2. 5. Predicción de sitios de fosforilación.

Los resultados de la predicción de sitios potenciales de fosforilación en *NtMC1* mediante el programa NETPHOSK 1.0, evidenciaron un total 44 residuos potenciales de fosforilación con un rango de probabilidades que osciló entre 0,51 y 0,81. De estos, los que mostraron valores por encima de 0,6 se muestran en la Tabla 7. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios de modificaciones post-traduccionales de fosforilaciones y/o glicosilaciones en las metacaspasas.

VI. 2. 6. Predicción de sitios de O-glicosilaciones.

Al analizar los posibles sitios de O-glicosilaciones en la secuencia *NtMC1* mediante el programa OGPET versión 1.0 (OGPET 1.0), no se encontraron evidencias de la presencia de estos sitios en la proteína.

Tabla 7: Resultados de NetPhosK 1.0 realizado a la secuencia de aminoácidos de *NtMC1*.

Residuo que se analiza/ representa la posición del residuo	Predicción de la quinasa (por encima del umbral, por defecto 0,500)	Resultado de salida (valor en el rango [0.000- 1.000])
T-387	Proteína Kinasa C (PKC)	0.81
S-225	Proteína Kinasa A (PKA)	0.71
T-100	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.66
S-204	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.65
S-208	Proteína Kinasa A (PKA)	0.65
T-252	Proteína Kinasa A (PKA)	0.64
Y-398	Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)	0.64
S-31	Proteína Kinasa A (PKA)	0.63
S-209	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.63
T-213	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.63
T-94	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.62
T-115	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.62
T-381	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.61
S-72	Caseína kinasa 2 (CK2)	0.6
S-136	Proteína Kinasa C (PKC)	0.6

VI. 3. Análisis de la estructura génica.

Para conocer la estructura del gen (número de intrones y exones) se realizaron diferentes PCRs sobre ADN genómico de *N. tabacum* L. Para ello se emplearon diferentes combinaciones de oligos, tal como se muestra en la Figura 15. Como control positivo se usó un plásmido en el que se clonó el gen obtenido a partir de ADNc.

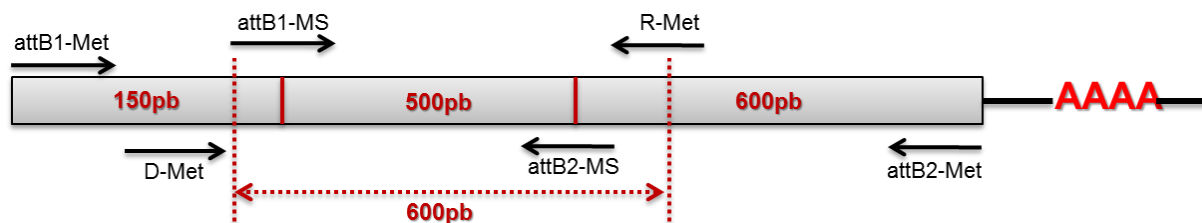


Figura 15: Esquema de las combinaciones de cebadores empleados para determinar la presencia de intrones en el gen de *NtMC1* y las tallas esperadas.

Una eficiente amplificación fue observada en el control positivo no así en la muestra genómica (Figura 16). No obstante, la presencia de una banda definida de aproximadamente 1.10

Kb en ambas muestras, sugiere una ausencia de intrones en el genómico ya que se corresponde en talla con el gen completo obtenido a partir de ADNc.

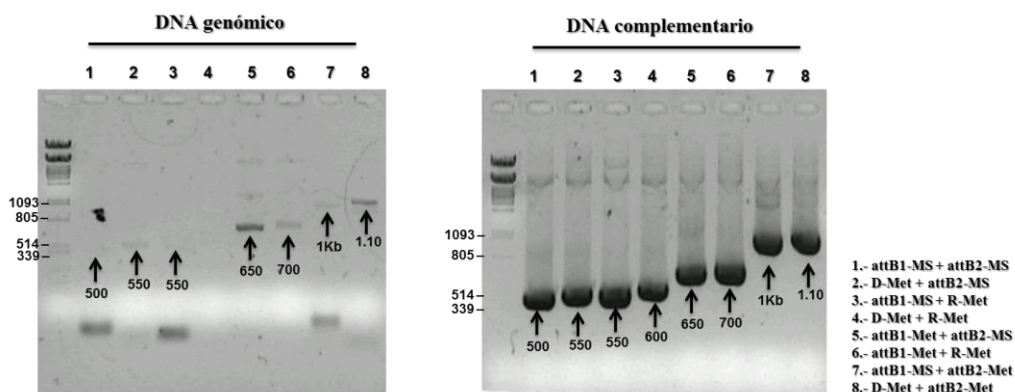


Figura 16: Resultados de las electroforesis de los productos del PCR en geles de agarosa al 1%. A la izquierda los resultados obtenidos sobre ADN genómico de *Nicotiana tabacum* L. A la derecha los efectuados sobre ADNc de *NtMCI* clonado en el vector pMDC32. Al comparar ambos resultados se observa el gen completo de ADNc coincide con el genómico lo que sugiere ausencia de intrones.

VI. 4. Caracterización bioquímica de la proteína.

VI. 4. 1. Confirmación experimental de las predicciones bioinformáticas.

VI. 4. 1. 2. Aminoácidos del sitio activo y sitios de corte.

Para confirmar las predicciones hechas *in silico* sobre el procesamiento nos apoyamos en dos modelos que habían sido reportados en la literatura. El primero está asociado a la metacaspasa mCII-Pa de *Picea abies*, la cual se autoprocresa en la arginina 188 y la lisina 269, liberando las subunidades p20 y p10, similar a como ocurre en las caspasas, permitiendo la interacción entre estas subunidades y la formación de un complejo activo (Bozhkov *et al.*, 2005). En el segundo caso se aborda a la AtMC4 de *Arabidopsis*, en la cual se da solo un corte en la lisina 225 localizada en la región unidora o “linker” (Watanabe y Lam, 2011a), tal como se muestra en la Figura 17.

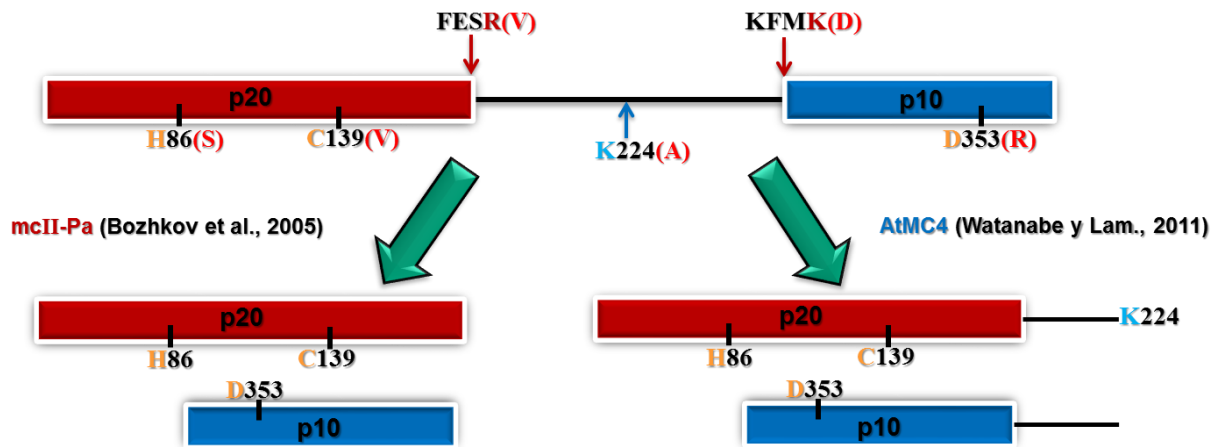


Figura 17: Representación esquemática de la proteína *NtMC1*, donde están señalados los principales aminoácidos del sitio activo, así como los posibles sitios de procesamiento, entre paréntesis se han señalado los aminoácidos por los que se cambiaron para analizar la función de estos sitios (mutantes puntuales). También están representados los dos modelos de procesamiento que se han reportado en la literatura para las metacaspasas tipo II. A la izquierda para mcII-Pa (Bozhkov, 2005) y a la derecha AtMC4 (Watanabe y Lam, 2011)

El primer modelo que intentamos corroborar fue el *Picea abies* y para ello generamos diferentes construcciones con mutaciones puntuales en la H86(S), C139(V) y los posibles sitios de corte en la arginina 187(V) y lisina 270(D), equivalentes a la R188 y K269 de mcII-Pa. Estas fueron sobre-expresadas tanto en bacterias como en plantas, el esquema de la construcción y los resultados obtenido en bacterias se muestra en la Figura 18. En ambos Westerns se identificó una banda a la altura de 60 kDa que se corresponde con el zimógeno. Empleando anti-HA se observó una banda a la altura de 29 kDa y 17 kDa en la forma silvestre, así como en los mutantes R187V y K270D, pero no en las mutantes C139V y H86S. En el caso de anti-His las bandas se observaron a la altura de 50 y 37 kDa aproximadamente, relacionándose con los fragmentos que se generan con la subunidad p20.

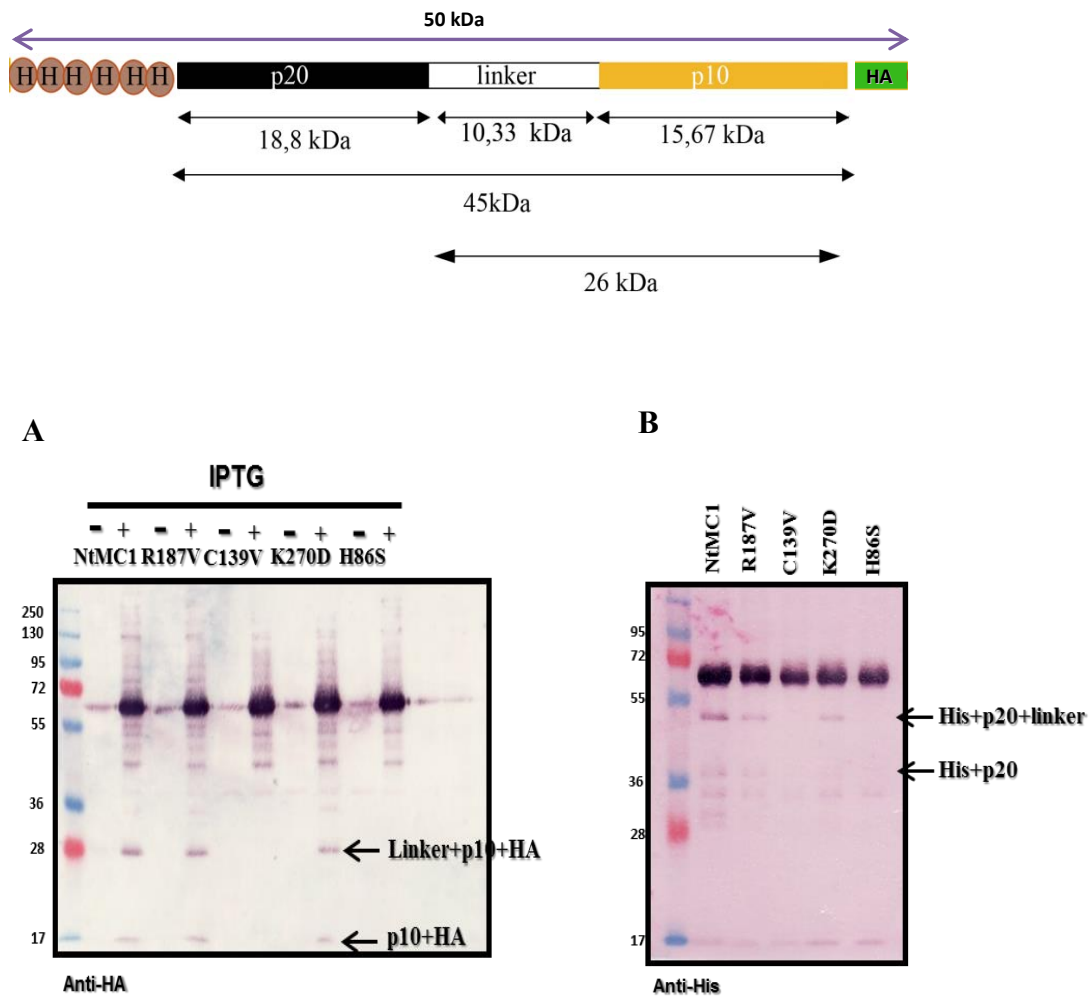


Figura 18: Resultados de una cinética de sobreexpresión en *E. coli* de *NtMC1* fusionada a los epítipos HA e His. Los Western blots se realizaron con extractos totales de proteína. (A) Revelado empleando anti-HA para determinar los fragmentos del p10 de *NtMC1*. (B) Revelado empleando anti-His para observar los fragmentos del p20. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 5 réplicas.

Para la expresión en plantas se analizaron construcciones con fusiones de *NtMC1* a los epítipos HA y GFP. Se probaron también dos sueros de anticuerpos policlonales anti-metacaspasa obtenidos en conejos (Suero 7 y 8). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19, donde se puede apreciar procesamiento de la forma silvestre y los mutantes K270D y R187V, pero no de C138V y H86S. Estos resultados coinciden con los de inducción en *E. coli* analizados anteriormente. Tanto el suero 7 como el 8 resultaron eficientes en la detección de la metacaspasa y

sus formas procesadas, por ello decidimos solo usar el 8 durante el presente trabajo y lo nombramos como α -met o anti-NtMC1.

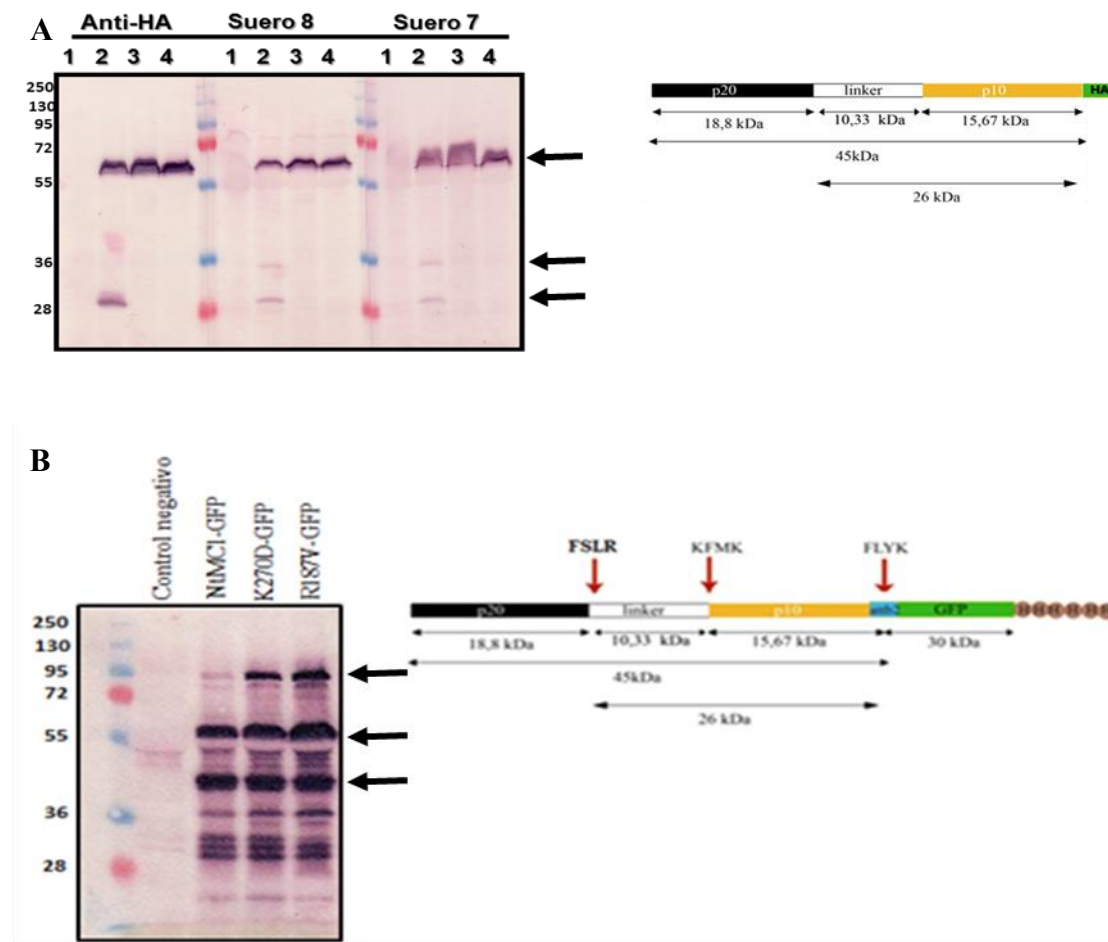


Figura 19: Resultados de la expresión transitoria de *NtMC1* en hojas de *Nicotiana benthamiana*. (A) Resultado del western de la expresión de *NtMC1*-HA y revelado con anti-HA y dos sueros de anti-*NtMC1* donde 1: Control negativo, 2: Proteína silvestre, 3: Mutante C139V y 4: Mutante H86S. (B) Western blot de la expresión transitoria de *NtMC1* fusionada a GFP, se reveló mediante anti-GFP y se analizaron además los diferentes mutantes de sitio de corte. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 5 réplicas.

El procesamiento similar encontrado en la forma silvestre *NtMC1* respecto a los mutantes K270D y R187V sugiere que estos no constituyen sitios primarios de corte, tal como ocurre para mII-Pa (Bozhkov *et al.*, 2004). Por ello se decidió analizar el segundo modelo propuesto en *Arabidopsis*, donde solo existe un sitio de corte en la lisina 225 localizada en la región unidora. Esta lisina corresponde a una lisina en posición 224 en *NtMC1*, tal como se muestra en el alineamiento de la Figura 20.

```

                                     R187                                     K224
                                     *                                     *
AtMC4  ES-SSRFGFRKFLRSKVEGAI*ESRGFHIgG--NkKDEdEaEeIETKEIELEDGeTiHAKdksLPLQTLIdILKQQTGNdNteVGKIRP:252
NtMC1  Gh-GSGFGFkKFLRRSVEDAFESRGIHIPRRHdrrEeEESFaEsSVIETEDGdQvHVKNkSLPLSTLIEILKQKTGkDDIDVGKIRP:251
mcII-Pa HkKQGGFGFRDLLSESVHGAFESRGIHlPSRHehKDRRESdEgETQEIEYHGKG--rAKNrSLPLSTLIEILNekTGrHDIDVGKIRP:250
AtMC9  -----SSNispAI*EtTNKTITS-----raLpFKAvldH*SSLTG---ITTSDIGT:207

```

Figura 20: Resultado del alineamiento múltiple de la región de *NtMC1* que contiene los posibles sitios de corte R187 y K224 con las secuencias de AtMC4, AtMC9 y mcII-Pa.

Se generó un nuevo mutante puntual de la K224 por alanina (K224A) al cual se le agregó el epítipo HA y se sobre-expresó transitoriamente en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Se realizaron tres réplicas y los extractos totales de proteínas fueron analizados en Western blots (α -met y α -HA). El α -met no permitió identificar si el zimógeno se procesaba debido a la presencia de numerosas bandas inespecíficas tal como se muestra en la Figura 21. Sin embargo, en el α -HA se observó una banda a la altura de los 60 kDa, la cual coincide con la observada anteriormente (Figuras 18 y 19) y que se corresponde con la forma de zimógeno. Este resultado sugiere que la lisina 224 constituye el sitio primario de procesamiento para *NtMC1*, similar a lo que ocurre con K225 para AtMC4 (Watanabe y Lam, 2011a).

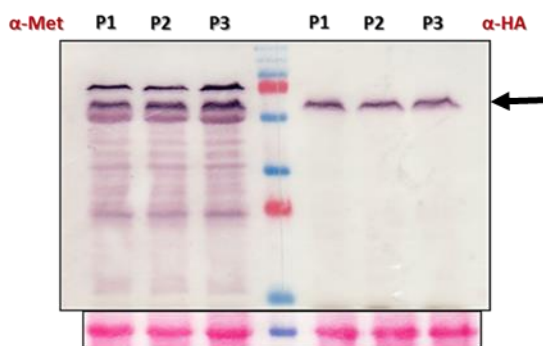


Figura 21: Resultado del Western blot realizado de 3 extractos totales de proteínas obtenidos de hojas de *Nicotiana benthamiana* en las que se expresó de manera transitoria al mutante en la lisina 224. En el mismo P1, P2 y P3 representan tres réplicas y fue revelado empleando anticuerpos anti-*NtMC1* y anti-HA. La electroforesis se realizó en geles SDS-PAGE al 12 %. y se realizaron 3 réplicas.

Los resultados obtenidos indican que el sitio activo en *NtMC1* estaría formado por la C139 y la H86, mientras la K224 constituye un sitio primario de procesamiento. Sin embargo, además de estos aminoácidos, el bolsillo catalítico ha de poseer varios aspárticos para coordinar los sustratos básicos. Como se mencionó anteriormente, el D348 queda demasiado alejado del sitio S1 en nuestro modelo, no así el D353. Para contrastar los datos *in silico* se diseñaron tres mutantes puntuales cambiando los aspárticos por argininas: D348R, D353R y DDDR (doble mutante). Los resultados obtenidos de la sobreexpresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* se muestran en la Figura 22.

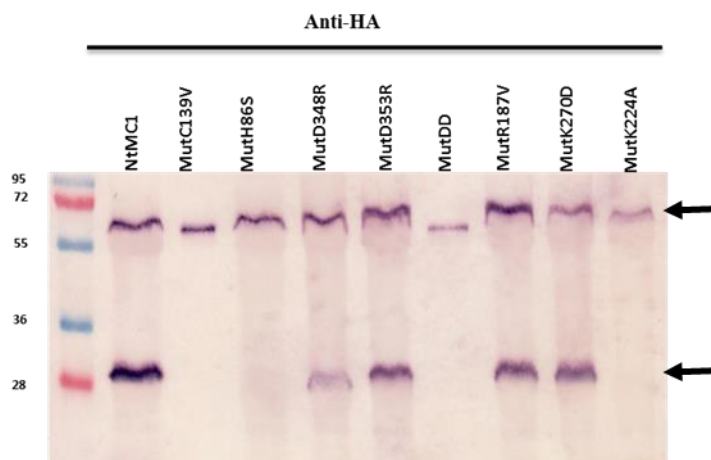


Figura 22: Resultado del Western blot efectuado a partir de extractos totales de proteínas obtenidos de hojas de *Nicotiana benthamiana* en las que se expresó de manera transitoria las diferentes versiones mutantes de *NtMC1*. La identificación se realizó empleando anti-HA. La electroforesis se realizó en geles SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 5 réplicas.

Tanto el D348R como D353R se procesan de manera similar a la forma silvestre, mientras que en el doble mutante se abate el procesamiento. Este resultado sugiere que ambos aspárticos pueden participar en la coordinación del sustrato básico, pero es necesario que al menos uno de ellos esté presente para que sea funcional el sitio activo. Este resultado constituye la primera evidencia experimental para las metacaspasas de que el sitio S1 está formado por aminoácidos de las subunidades p20 y p10. Los aspárticos D25 y D137 también se han reportado como parte del sitio activo, pero su importancia será abordada posteriormente cuando se analice la actividad de la

enzima. El resto de los mutantes analizados mostraron el mismo comportamiento de los ensayos anteriores, confirmando que R187 y K270 no constituyen sitios de procesamiento para *NtMC1* pero si la K224.

VI. 4. 1. 3. Identificación de fragmentos generados por el procesamiento.

Si K224 constituyese el único sitio de corte, se deberían generar solo dos fragmentos a partir del zimógeno: p20-K224 y SLP-p10. Para investigar la posibilidad de que R187 y K270 funcionen como sitios secundarios de procesamiento se generaron diferentes construcciones con las posibles combinaciones de fragmentos generados a partir de los tres sitios de corte (Figura 23). Estas fueron expresadas tanto en plantas como en bacterias y los resultados se muestran en las Figuras 24 y 25.

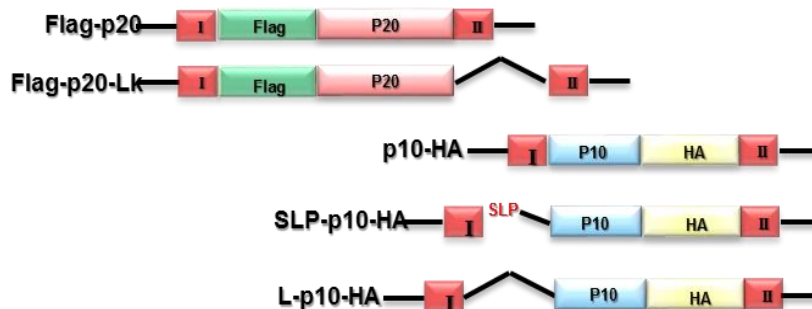


Figura 23: Representación esquemática de las diferentes construcciones obtenidas con el objetivo de determinar los sitios de procesamiento de *NtMC1* tanto en bacterias como en plantas.

La expresión en bacterias mostró a nivel de Western blot una banda de aproximadamente 20 kDa para el fragmento p10, 40 kDa para L-p10 y una de 30 kDa para SLP-p10 tanto en α -HA como α -Met. La banda correspondiente a p20 aparece a la altura de 28 kDa mientras p20-K lo hace a 35 kDa. La forma silvestre mostró el mismo patrón de ensayos anteriores. El fragmento generado del procesamiento en *NtMC1* se corresponde en tamaño con p20 en ambos Westerns, sin embargo, el epítipo HA se localiza en el carboxilo terminal del p10 y *NtMC1* fue revelado con este anticuerpo, por lo que no es posible observar el p20 generado del corte en el zimógeno.

El ligero desplazamiento hacia arriba del fragmento SLP-p10 respecto a la banda de 29 kDa de la silvestre se puede explicar por la ganancia de diferentes aminoácidos durante la generación de la construcción, entre ellos la cola de histidinas (His) que posee el vector de expresión en bacterias y los aminoácidos que se generan del sitio de recombinación attB1 producto del proceso de clonación. Esta explicación está en congruencia con lo observado en la expresión en plantas (Figura 25) donde la construcción no lleva las histidinas y el fragmento SLP-p10 coincide en tamaño con el generado a partir del zimógeno.

Para los fragmentos p20, si bien en el Western α -met de extractos bacterias no se aprecia una banda intensa y diferencial, si se observa una a los 36 kDa que parece corresponder con p20-K. Esta misma banda se observa en el Western anti-His de la Figura 18, pero no se aprecia una banda que se corresponda con la subunidad p20. En el caso de plantas no fue posible identificar los fragmentos p20 mediante el epítipo Flag localizado en el amino terminal, posiblemente porque se está eliminando. Remoción de fragmentos del amino terminal fueron observados en ensayos *in vitro* (Figura 41).

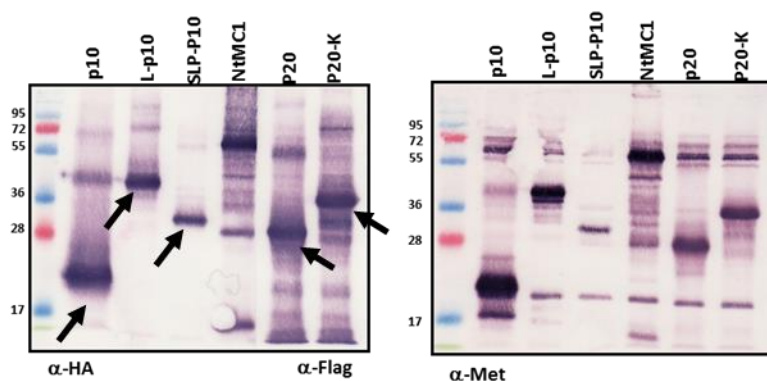


Figura 24: Resultado del Western blot a partir de extractos de proteínas totales de *E. coli* donde se sobre-expresaron los diferentes fragmentos de *NtMC1*. En el mismo se aprecian las diferentes bandas que corresponden con las diferentes construcciones, el ligero incremento de SLP-p10 respecto al que se genera en la forma silvestre se debe a la adición en el N-terminal de una cola de histidina y otro grupo de aminoácidos. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 3 réplicas

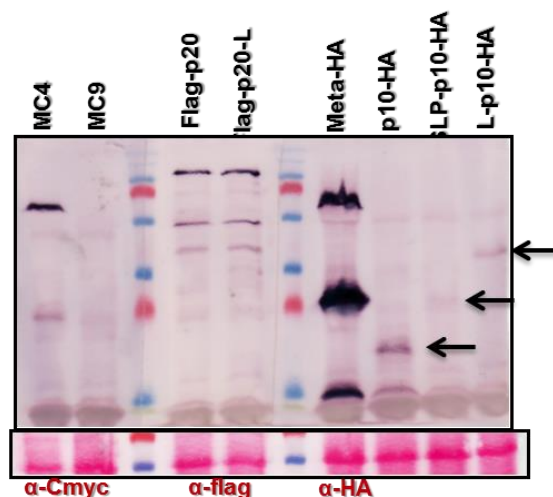


Figura 25: Resultado del Western a partir de extracto de proteínas totales obtenido de hojas de *Nicotiana benthamiana*. en las que se expresó de manera transitoria los diferentes fragmentos de *NtMC1*. En el mismo se aprecian las diferentes bandas que se corresponden con las diferentes construcciones, en este caso coincide el fragmento SLP-p10 recombinante con el que se genera a partir del zimógeno. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12% y se realizaron 3 réplicas

VI. 4. 1. 4. Actividad del fragmento SLP-p10.

Durante los ensayos de expresión inesperadamente encontramos que el fragmento SLP-p10 posee un marcado efecto lítico sobre *E. coli*, tal como se muestra en la Figura 26.

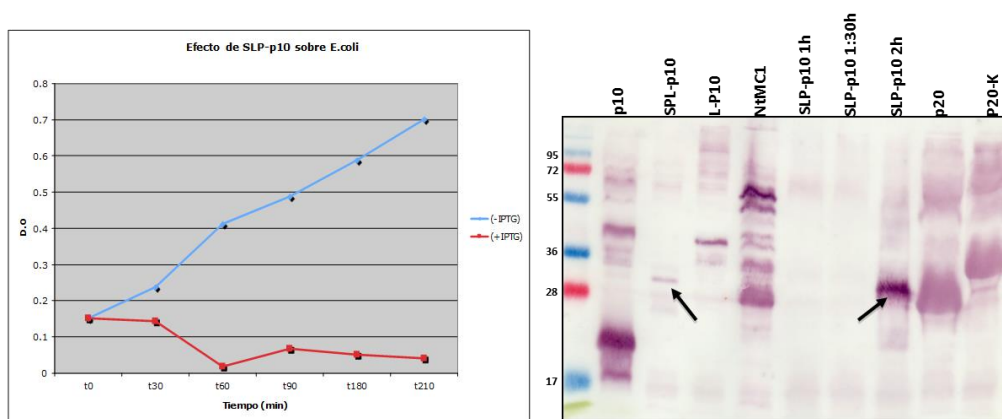


Figura 26: Resultados obtenidos al sobre-exresar el fragmento SLP-p10 en *E. coli*. A la izquierda se encuentra graficado el crecimiento bacteriano (medido a partir de la densidad óptica a 600 nm) a partir del punto en que se induce la expresión de la RNA polimerasa T7 aplicando IPTG. A la derecha resultado del Western blot donde se aprecia la acumulación del SLP-p10 a las 2 horas post-inducción revelando con anti-NtMC1. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 %. y se realizaron 5 réplicas. Las flechas indican el fragmento SLP-p10.

A la hora post-inducción el cultivo mostró una drástica reducción de la DO (Densidad Óptica), sin que se observara una posterior recuperación. Resulta también interesante que a nivel de Western solo fue posible identificar al fragmento SLP-p10 a las 2h post inducción (Figura 26).

Para conocer si al lisarse las células se liberaba al medio los fragmentos SLP-p10, contribuyendo así a la lisis de más células y actuado como una cascada de amplificación se tomaron muestras a diferentes tiempos tanto de la fracción celular como del medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27.

A nivel de western se detectó el péptido en las fracciones celulares, cuyos niveles aumentan respecto al tiempo. Sin embargo, en la fracción extracelular solo a las 2 horas se alcanza a detectar una pequeña cantidad de proteína. ¿Cómo entender entonces que en el tiempo de mayor lisis (1 hora) no se detecte casi proteína?

Para dar una respuesta satisfactoria se necesitaría más datos experimentales. Sin embargo, se podría pensar solo a bajas concentraciones del fragmento SLP-p10 tendría un efecto lítico y cuando aumenta su concentración se formarían complejos inactivos. También sería interesante conocer como un grupo de bacterias logra seguir creciendo y sobre-expresando el péptido.

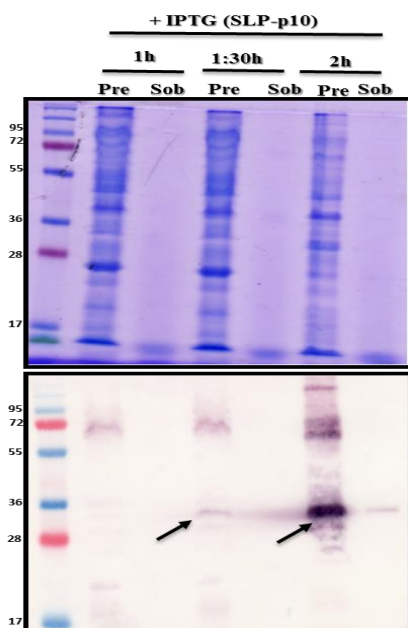


Figura 27: Resultados del Coomassie y Western blot (revelado con anti-NtMC1) a partir del precipitado y sobrenadante obtenidos a diferentes tiempos post-inducción. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12.5%

Debido a que no existen antecedentes en la literatura consultada sobre un efecto lítico de las metacaspasas o sus formas procesadas, resulta un tanto difícil poder dar una explicación satisfactoria o formular una hipótesis respecto al mecanismo implicado. Muchas proteínas capaces de lisar células poseen dominios transmembranales, los que les permiten formar poros y desequilibrar osmóticamente las células. Sin embargo, a nivel de secuencia la metacaspasa no posee tales regiones tal como se verá posteriormente.

VI. 4. 1. 5. Localización sub-celular.

Los resultados obtenidos de la predicción de posibles péptidos señales y/o regiones de anclaje a membrana para *NtMC1* con el programa SIGNALP 3.0, se muestran en la Figura 28. Cuando se obtienen valores elevados de puntuación S (*S-score*), indica que el aminoácido forma parte de un péptido señal, mientras que valores bajos en esta puntuación sugieren que el aminoácido pertenece a la proteína madura. Por otra parte, la puntuación C (*C-score*), indica el sitio de ruptura en la secuencia de interés por la acción de la peptidasa péptido señal I (*SPase I*). La puntuación Y (*Y-score*) es un valor de puntuación que combina a los valores S y C.

La secuencia de *NtMC1* mostró un valor de puntuación C igual a 0.652 en la posición 18, el cual sobrepasa el valor de puntuación límite 0.32 establecido por el programa. Sin embargo, los valores de puntuación S y Y resultaron inferiores a los valores de puntuación límites. Estos valores de conjunto permiten predecir que la proteína no posee péptido señal.

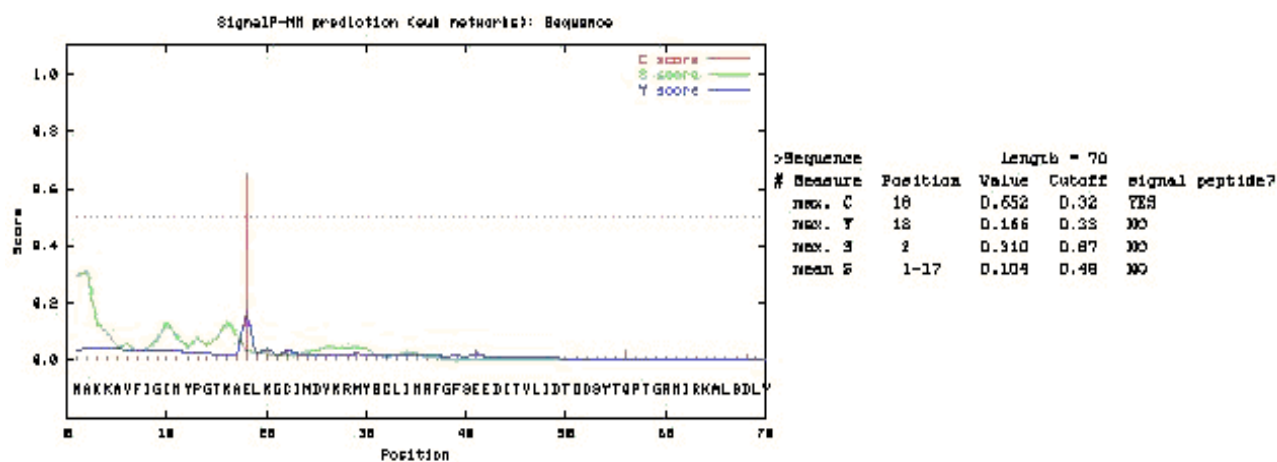


Figura 28: Resultado del programa SIGNALP 3.0 con el método SIGNALP-NN. **Measure:** magnitud evaluada; **max.C**, **max.Y**, **max.S:** valores de puntuación máxima para C-score, Y-score y S-score, respectivamente; **mean.S:** promedio de las puntuaciones de S-score en el segmento que abarca desde la posición del extremo amino hasta la posición de mayor puntuación o sitio de ruptura; **cutoff:** valor de puntuación límite que define si la predicción es válida o no.

Los resultados obtenidos para la predicción de regiones de anclaje a membrana de la proteína *NtMC1* mediante el método SIGNALP-HMM fueron los siguientes: No resultó ser una proteína de secreción, tuvo una probabilidad de 0,023 para la presencia de péptido señal, fue nula la probabilidad de poseer regiones de anclaje y el sitio más probable de corte se localizó entre las posiciones 17 y 18 con un valor de probabilidad de 0.022.

Los resultados que proporcionó el programa SIGNALP 3.0, fueron complementados con las predicciones del programa TARGETP 1.1, para predecir señales de tránsito a cloroplasto, mitocondria u otra localización. Los mismos evidenciaron que *NtMC1* no contiene señales de tránsito hacia ningún organelo ya que no posee péptido señal, lo que indica que es muy probable que se localice en el citosol.

Para confirmar la localización citosólica predicha *in silico*, se emplearon varias construcciones de la metacaspasa fusionada a GFP, entre estas la proteína silvestre, la mutante C139V y una nueva mutante a la que se le eliminó el sitio attB2 (Met- Δ attB2-GFP) generado para el clonaje y en el cuál había sido informado existía un sitio de autoprocésamiento (Vercammen *et al.*, 2004).

Los patrones de fluorescencia de *NtMC1* y sus variantes fusionadas a GFP fueron similares, observándose una acumulación de la proteína hacia la membrana citoplasmática, mientras el control de GFP mostró un patrón más difuso por todo el citosol. En todos los casos se evidenció que la proteína no se acumula en cloroplasto, núcleo, mitocondria u otro orgánulo, según se puede apreciar en la Figura 29-A. La fluorescencia observada de manera difusa en todo el citoplasma de las quimeras, aunque en menor intensidad, es posible que se deba a GFP libre, pues tal y como se muestra en el western de la Figura 29-B la eliminación del sitio attB2 no impidió que se cortara parte de la GFP. Este resultado sugiere que existe al menos otro sitio de corte muy próximo al extremo amino de la GFP.

VI. 4. 1. 6. Predicción de dominios transmembrana.

Los resultados obtenidos de la predicción de la posible presencia de dominios transmembrana en *NtMC1* con el programa SOUSI, indican que esta es una proteína soluble, con un promedio de hidrofobicidad de -0,633413, y que no contiene dominios transmembrana. Resultados similares se obtuvieron con el programa TMPRED. Según estas predicciones, la extracción de la proteína sería factible usando detergentes “suaves” como Igepal o Triton-X100. Esto contrasta con los resultados obtenidos durante extracciones empleando estos detergentes, tal como se muestra en la Figura 30 (carriles 4, 6 y 8). No fue posible detectar la proteína en la fracción soluble con buffer a base de Igepal ni tampoco con Triton-X100 (datos de este último mostrado más adelante).

(Figura 29-A)

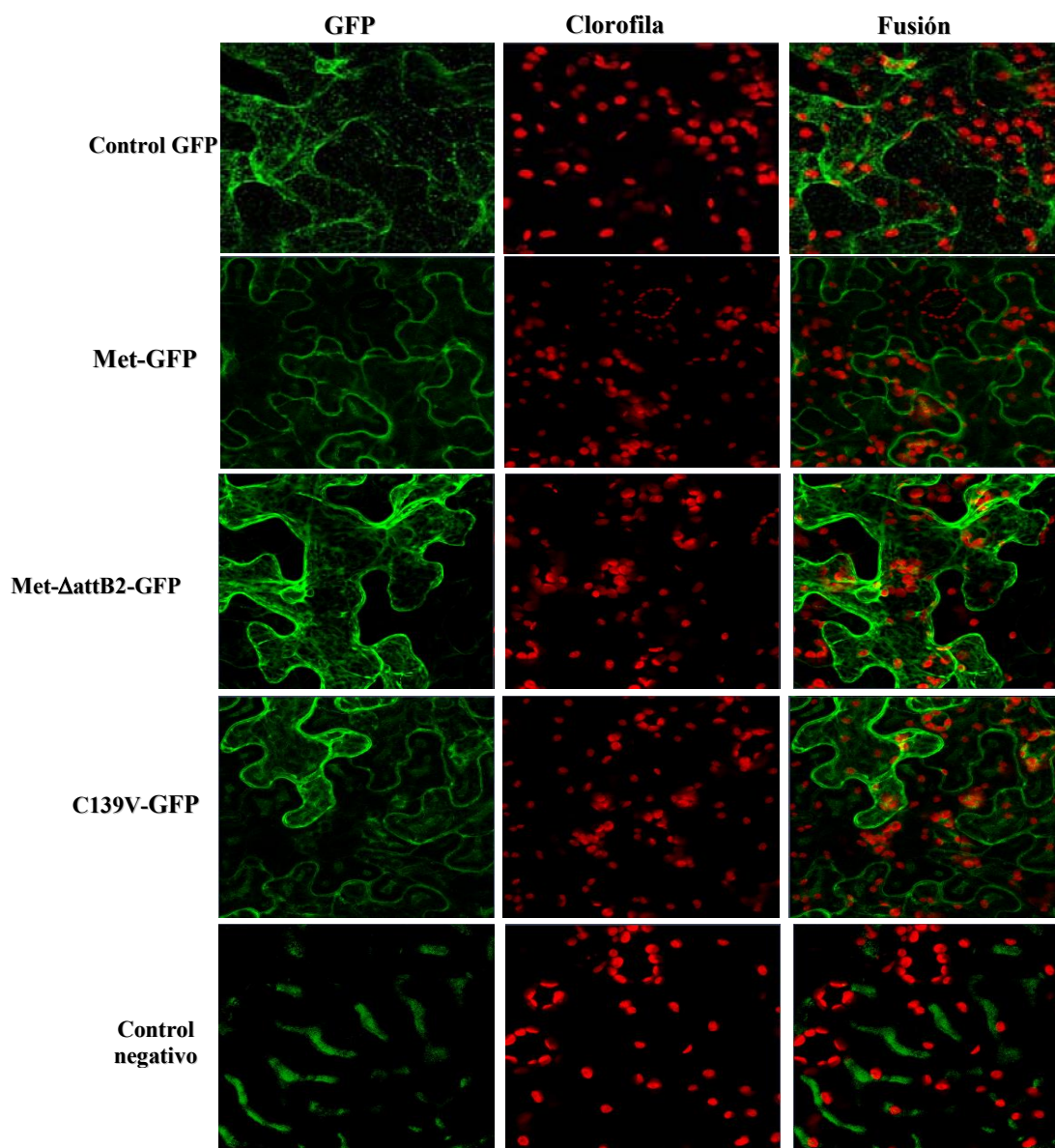


Figura 29-A: Expresión y localización de *NtMC1* fusionada a GFP en expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Aumento 40X. en este experimento se emplearon 3 construcciones diferentes: La forma silvestre fusionada a GFP (Met-GFP), una mutante donde se eliminó el sitio de corte generado por el sitio de recombinación (Met- Δ attB2-GFP), y la mutante en la cisteína del sitio activo (C139V-GFP), además se empleó un control positivo de expresión de GFP y uno negativo (hojas sin agroinfiltrar). Como se observa en el primer carril de imágenes, el patrón de expresión es similar en todas las construcciones empleadas, observándose en el citosol de las células, con cierta tendencia a concentrarse muy cercana a la membrana plasmática. Las imágenes del centro se corresponden con los cloroplastos y la superposición de los mismo con el patrón de expresión muestra que *NtMC1* no se localiza en los mismos. Las imágenes de fluorescencia de las diferentes construcciones de la metacaspasa fusionada a la GFP fueron observadas con una onda de excitación de 433nm y una de emisión de 535nm.

(Figura 29-B)

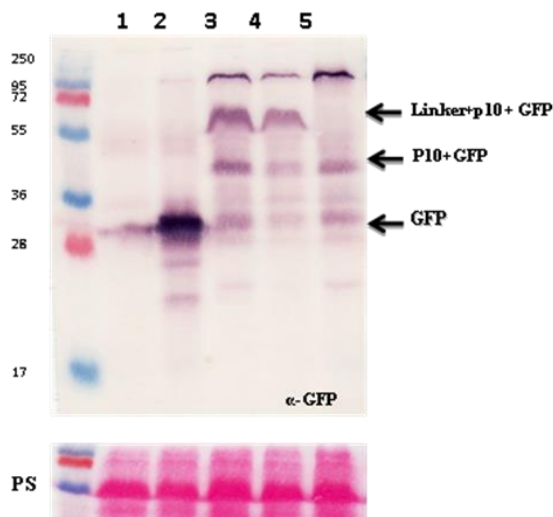


Figura 29-B: Western blot anti-GFP a partir de extractos totales de proteína extraída de las mismas plantas empleadas para los análisis de microscopía. 1-control negativo, 2- GFP, 3- Met-GFP, 4- Met Δ attB2GFP y 5- Met-C139V-GFP. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 %.

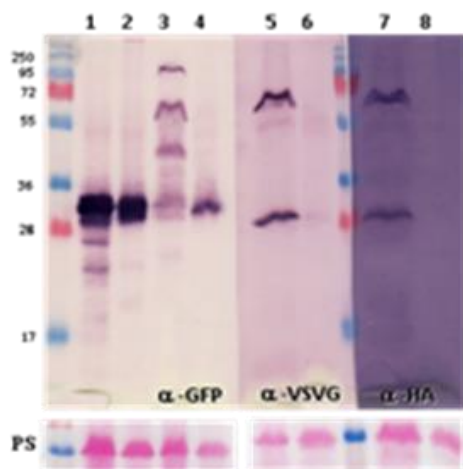


Figura 30: Western blot de extractos de proteínas obtenidos en buffer Laemli (carriles 1, 3, 5 y 7) y buffer nativo a base de Igepal (carriles 2, 4, 6 y 8). 1 y 2: GFP; 3 y 4: NtMC1-GFP; 5 y 6: NtMC1-VSVG; 7 y 8: NtMC1-HA. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 %.

VI. 4. 2. Procesamiento y estequiometría de los complejos activos.

VI. 4. 2. 1. Regulación del procesamiento.

Según el modelo de activación por proximidad de las caspasas, las iniciadoras se activan por cortes intermoleculares de un complejo a otro, lo que desencadena un proceso en forma de cascada (Crawford y Wells., 2011). Estos complejos activos son capaces de reconocer y procesar las caspasas ejecutoras también mediante cortes intermoleculares (Crawford y Wells., 2011). Para

conocer si el procesamiento observado en *NtMC1* es producto de cortes inter o intramolecular se diseñó un experimento de co-expresión de la forma silvestre (*NtMC1*-VSVG) con un mutante en el sitio activo (C139V-HA o H86S-HA) y por tanto incapaz de auto procesarse.

Si los complejos de *NtMC1* tuviesen la capacidad de interactuar y cortarse unos a otros como en las caspasas, entonces las formas mutadas deberían observarse procesadas en los Westerns blots cuando se co-expresan con la forma silvestre. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31 donde se observa ausencia total de procesamiento en ambos mutantes, cisteína 139 (MutC-HA) e histidina 86 (MutH-HA) cuando son co-expresados con *NtMC1* (WT-VSVG). Este resultado sugiere que el corte en *NtMC1* es básicamente intramolecular a diferencia de lo que ocurre en las caspasas y similar a los que ocurren en otras metacaspasas.

Para confirmar estos resultados se volvieron a co-infiltrar los mutantes fusionados a los epítipo HA y GFP. Además, durante este ensayo se empleó a *NtMC1* sin epítipos para descartar que estuvieran interfiriendo con el reconocimiento, interacción o procesamiento de otros complejos.

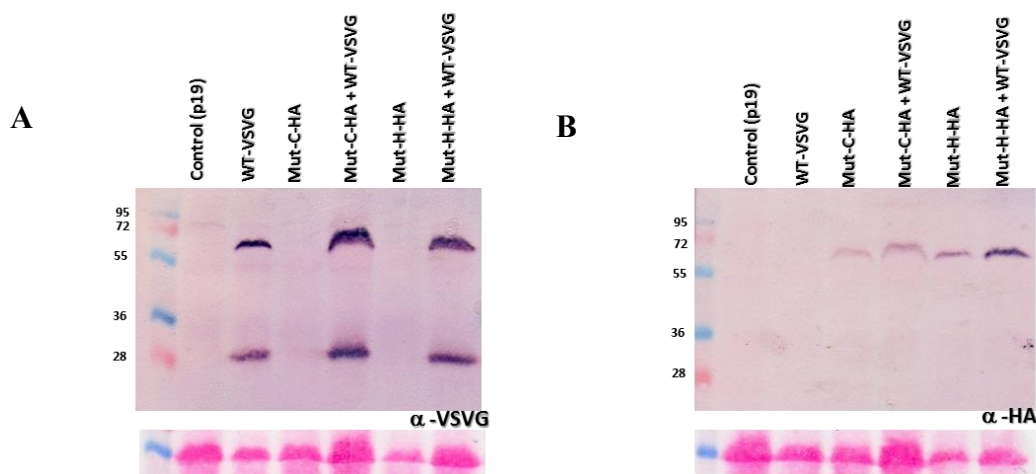


Figura 31: Western blot a partir de extractos totales de proteína obtenidas de plantas de *N. benthamiana* en las que se sobre expresó transitoriamente las diferentes variantes de *NtMC1* y sus combinaciones. (A) Se reveló con anti-VSVG para mostrar solamente la proteína silvestre. (B) Se reveló con anti-HA para observar cada una de las mutantes. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 3 réplicas

Los resultados obtenidos fueron similares a los observados anteriormente, donde las formas mutantes no son procesadas, no obstante, se observó una banda tenue a la altura de 36 kDa en el Western revelado con anti-HA (Figura 32-C). Esta banda no corresponde en tamaño con alguna generada de manera natural en *NtMC1*, por lo que podría corresponderse a un procesamiento atípico como resultado de las elevadas concentraciones al sobre expresarlas.

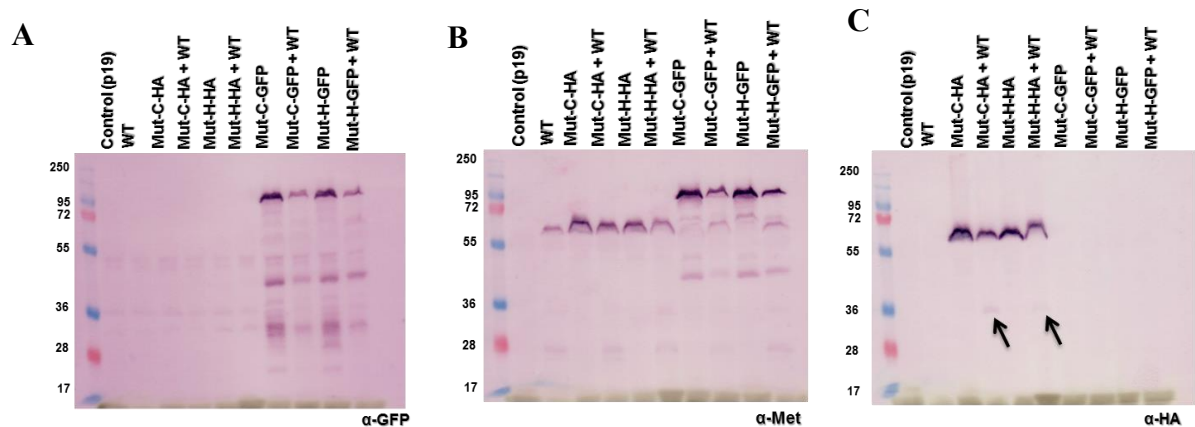


Figura 32: Western blot a partir de extractos totales de proteína obtenidas de plantas de *N. benthamiana* donde se sobre expresaron transitoriamente las diferentes variantes de *NtMC1* y sus combinaciones. (A) Se empleó anti-GFP para observar cada una de las mutantes fusionados a GFP. (B) se reveló con anti-Metacaspasa para observar a la silvestre que no poseía ningún epítipo. y (C) anti-HA para mostrar los mutantes fusionados a HA. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 12 % y se realizaron 3 réplicas.

En la fusión con GFP la aparición de numerosas bandas inespecíficas en el Western no permiten llegar a una conclusión clara (Figura 32-A). Sin embargo, tampoco aparecieron bandas que pudieran contradecir los resultados obtenidos anteriormente. Con α -met se pudo identificar la forma silvestre (Figura 32-B) con la banda de procesamiento a la altura de 29 kDa en los carriles 2, 4, 6, 8 y 10, lo que indica que se expresó correctamente en todas las combinaciones analizadas y que es funcional, al menos a nivel de autoprocesamiento.

VI. 4. 2. 2. Ensayos de complementación.

Las formas activas de las caspasas son heterotetrámeros $(p20)_2(p10)_2$, los cuales se generan por dos cortes que liberan las subunidades p20 y p10 (Crawford y Wells, 2011). Estos cortes son

intermoleculares y las formas activas generadas tienen la capacidad de reconocer y cortar a otras moléculas. Para *NtMC1* y *AtMC4* el primer corte se produce en la región de unión en las lisinas 224 y 225 respectivamente, estrictamente intramolecular (Watanabe y Lam, 2011b). Sin embargo, poco se conoce sobre la estequiometría de la forma activa de estas proteasas.

Para determinar si dos heterodímeros pueden interactuar intercambiando las subunidades p20 y p10 se diseñó un experimento en el cual se co-infiltró un mutante de cisteína 139 (localizada en la subunidad p20) con un doble mutante en los aspárticos 348 y 353 (localizados en la subunidad p10). Si los complejos fuesen dinámicos o con una estequiometría similar a las capas se esperaría una población conformada por todas las combinaciones entre las subunidades, por lo que algunas formas deberían ser completamente funcionales. Los resultados se muestran en la Figura 33 y como se aprecia hay ausencia de procesamiento cuando se co-expresaron las formas mutantes, lo que sugiere que las subunidades no se intercambian al menos cuando no son procesadas en la lisina 224.

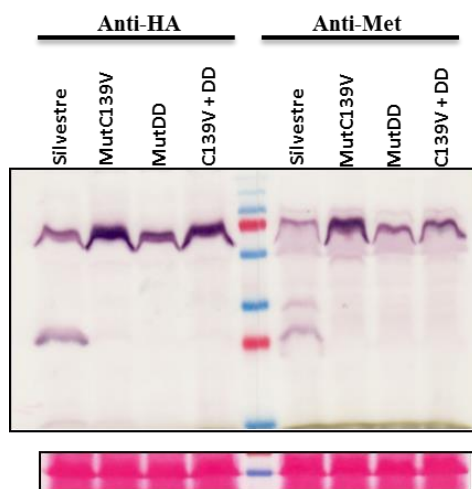


Figura 33: Ensayo de complementación de *NtMC1*. Resultado del Western a partir de extractos totales de proteínas de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Co-expresión transitoria de dos mutantes en diferentes subunidades (C139V en p20 y D348RD353R en p10) para determinar una posible complementación de las subunidades. La corrida se efectuó en un gel de SDS-PAGE 12 % y se realizaron 5 réplicas

VI. 4. 2. 3. Interacción de diferentes complejos *in vivo*.

VI. 4. 2. 3. 1. Extracción de proteínas mediante el uso de buffers no desnaturizantes.

Los resultados anteriores sugieren que el sitio activo de NtMC1 está constituido por aminoácidos tanto de las subunidades p20 como p10 de un mismo zimógeno y que estas no se intercambian, pero no permite conocer la estequiometría de los complejos activos. Para ello se diseñó un experimento de inmunoprecipitación. Sin embargo, la extracción nativa de los complejos es un punto crítico en estos ensayos, pues cualquier factor que desestabilice la interacción puede conducir a falsos resultados. De ahí que inicialmente probamos diferentes buffers para extraer de manera nativa las proteínas, los resultados se muestran en la Figura 34.

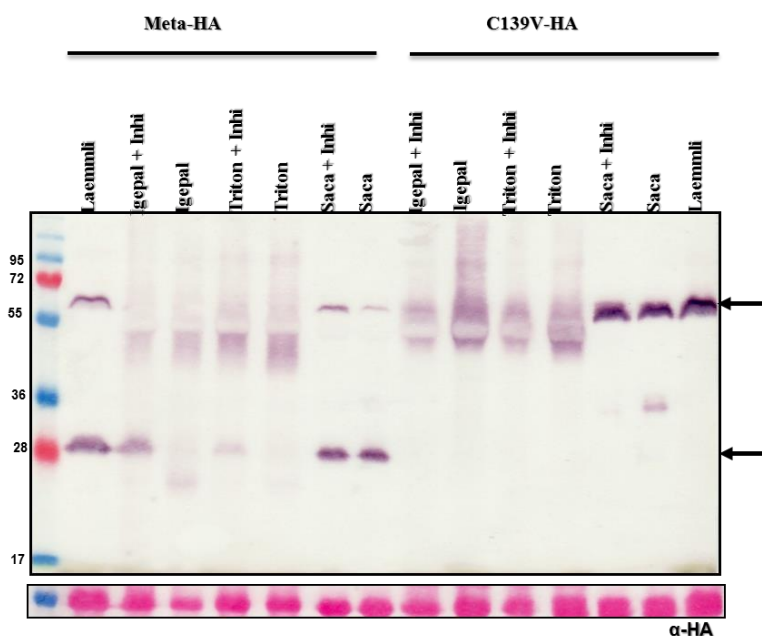


Figura 34: Resultado del Western a partir de la extracción de proteínas totales de hojas de *Nicotiana benthamiana* en las que se expresó transitoriamente a NtMC1 y la mutante NtMC1-C139V, empleando para la extracción diferentes amortiguadores con detergentes suaves y sacarosa. Se reveló con anti-HA y la corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 % y se realizaron 3 réplicas

Tal como se observa en el Western blot, no fue posible la extracción en los amortiguadores que contenían detergentes “suaves” como Igepal y Tritón-X100, este resultado es congruente con el obtenido anteriormente (Figura 30). Contrario a lo que sucedió con la extracción en amortiguador de sacarosa, donde la eficiencia fue similar a la del amortiguador desnaturalizante Laemmli. A partir de estos resultados se determinó que el amortiguador óptimo para los ensayos de actividad e inmunoprecipitación era el de sacarosa.

VI. 4. 2. 3. 2. Ensayos de Inmunoprecipitación.

Para los ensayos de inmunoprecipitación se co-expresaron en *N. benthamiana* a NtMC1 y una versión mutante en K224. Ambas construcciones con fusiones a epítomos diferentes en los extremos (Flag-NtMC1-HA, cMyc-NtMC1-VSVG, Flag-K224A-HA, cMyc-K224A-VSVG). Primeramente, se sobre expresaron las cuatro construcciones de manera independiente con el objetivo de identificar problemas de expresión y/o detección. En la Figura 35 se muestran los resultados a nivel de Western blots a partir de los extractos totales de proteína. Como se puede observar la identificación no fue posible empleando anti-Flag, sin embargo, la detección de las construcciones Flag-NtMC1-HA y Flag-K224A-HA en las mismas muestras usando anti-HA indican que las proteínas si se expresaron correctamente y el problema está a nivel del epítomo Flag.

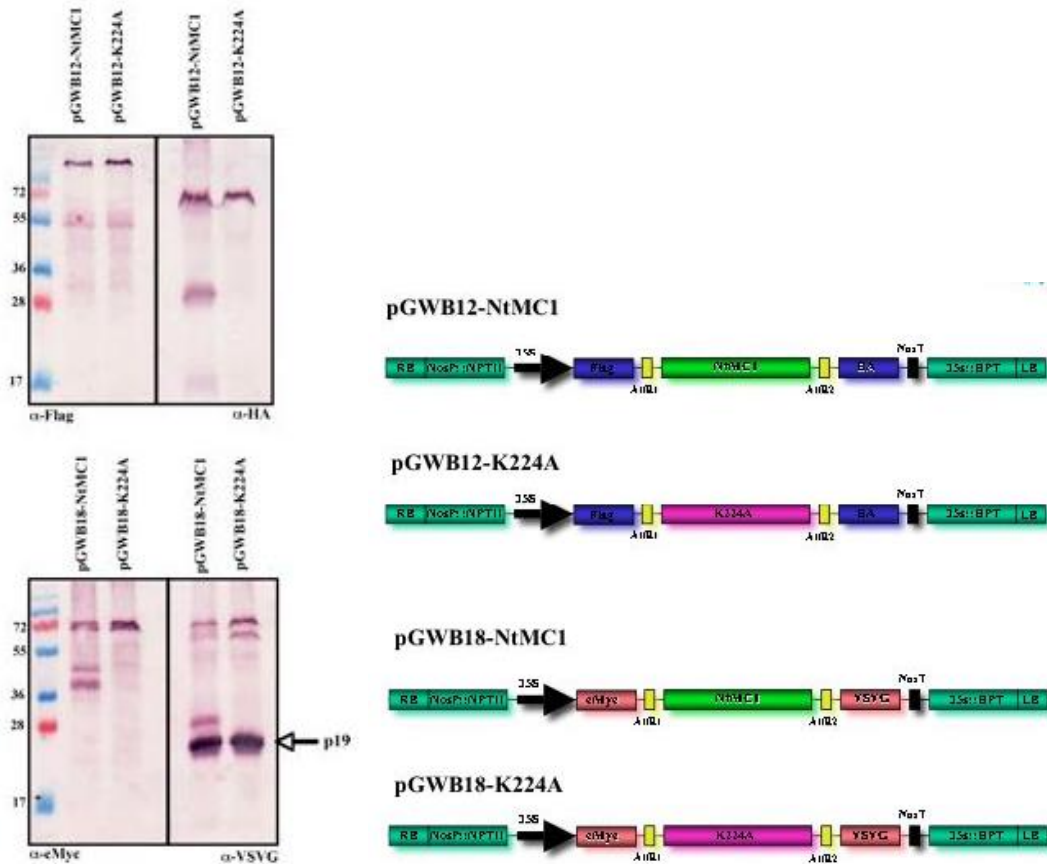


Figura 35: Esquema de las construcciones generadas para el ensayo de inmunoprecipitación y resultados de los Western blots a partir de la expresión transitoria de *NtMC1* y *K224A* con dobles epítomos en *N. benthamiana*. Como se puede apreciar no fue posible detectar a la proteína empleando anti-Flag pero si anti-HA. La corrida se efectuó en SDS-PAGE 12.5% y se realizaron 2 réplicas

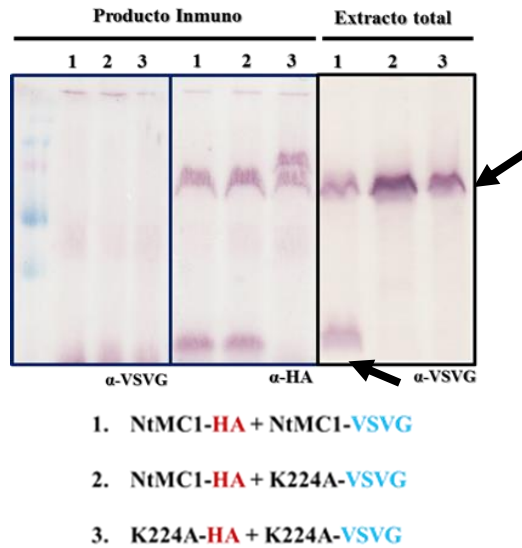


Figura 36: Resultado del Western blot del ensayo de inmunoprecipitación. Al revelar con anti-VSVG en el producto de la inmunoprecipitación no se observó proteína sin embargo al hacerlo en extractos totales si, lo que evidencia que estaba presente pero no interaccionando con otros complejos. El anti-HA mostró presencia de la proteína en la inmuno lo que permite asegurar que *NtMC1*-HA y *K224V*-Ha se están uniendo a la agarosa-HA. Se corrió en SDS-PAGE 12 %.

Tal como muestran los Westerns al inmunoprecipitar a *NtMC1* fusionada con HA y revelar con anti-VSVG, no se detectó proteína. Este resultado sugiere que los complejos p20p10 interaccionan, al menos bajo nuestras condiciones experimentales. Esto constituye una clara diferencia con las caspasas y podría plantear un escenario de regulación y mecanismos de acción diferentes.

VI. 5. Cinética de los complejos.

VI. 5. 1. Determinación de la actividad de *NtMC1* sobre expresada en *E. coli*.

VI. 5. 1. 1. Purificación de la proteína recombinante.

El estudio de la cinética y dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico. Sin embargo, para el cálculo de varios parámetros cinéticos se requiere conocer la concentración de la enzima en la reacción. Por tal motivo se procedió a la purificación del zimógeno para estimar su concentración. Primeramente, se empleó una columna de afinidad (Ni-Agarosa, Invitrogen, México) aprovechando la existencia de una cola de histidinas en el amino terminal de la proteína, para luego usar una columna de exclusión.

El objetivo de la purificación por afinidad era obtener una muestra enriquecida con el zimógeno y el fragmento p20-K. Sin embargo, en la tinción con azul de Coomassie se apreciaron al menos 3 bandas mayoritarias por debajo del zimógeno (Figura 37). Para identificarlas se procedió a la secuenciación de las mismas.

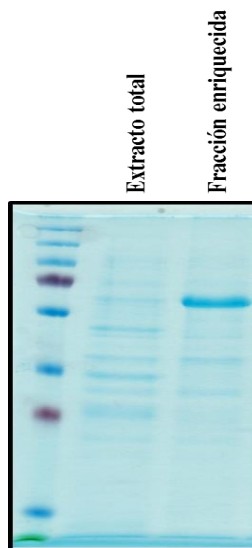


Figura 37: Coomassie de *NtMC1* luego del primer paso de purificación mediante cromatografía de afinidad empleando Ni-Agarosa. En la fracción enriquecida se observan varias bandas debajo del zimógeno. La corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

Los resultados de la secuenciación de los cuatro fragmentos obtenidos después del primer paso de purificación se muestran en la Figura 38. Sorprendentemente los cuatro fragmentos coincidieron a nivel de secuencia, conteniendo regiones del p20, el fragmento unidor y el p10. Inicialmente pensamos que se podría tratar de un problema de contaminación a la hora de la secuenciación, sin embargo, la réplica del experimento así como nuevos ensayos de purificación y Western blots (Figura 38) confirmaron estos datos inesperados. No conocemos la razón del arrastre de los mismos fragmentos en diferentes tallas de peso molecular al expresar la proteína recombinante en *E. coli*. Otros grupos también han informado de problemas a la hora de la purificación de ciertas metacaspasas tipo II (Cox., 2011).

MUESTRA-11 Acc. #: 195963550 Species: NICOTIANA TABACUM Name: metacaspase type II

Protein MW: 45668.0 Protein pI: 4.8 Protein Length: 416

1 MAKKA~~V~~FIGI NYPGTKAELK GCINDV~~K~~RM~~Y~~ SCLINRFGFS EEDITVLIIDT DDSYTQPTGR NIRKALSDLV GSAEEGDSLLF
 81 VHYSGHGTRL PAETGEDDDT GYDECIVPCD MNLITDDDFR ELVDKVPEGC RITIVSDSCH SGGLIDKAKE QIGESHKQGD
 161 DENEGHGS~~G~~F GFKKFLRRSV EDAFESRGIH IPRRHDRREE EESFAESSV IETEDGDQVH VKNKSLPLST LIEILKQKTG
 241 KDDIDVGKLR PTLFDVFGED ASPKVKKFMK VIFNKLQHGN EEGESGGFLG MVGNLAQEFK KQKLDENDES YAKPAMETHV
 321 EGKQEVYAGS GSRGLPDSGI LVSGCQTDQT SADATPAGGD SYGALSNAIQ EILAESDGPI TNEEVVTKAR KKLQKQGYTQ
 401 RPGLYCSDDH VDAFFV

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

14 31.2 6.14 2.0e-9

MUESTRA-21 Acc. #: 195963550 Species: NICOTIANA TABACUM Name: metacaspase type II

Protein MW: 45668.0 Protein pI: 4.8 Protein Length: 416

1 MAKKA~~V~~FIGI NYPGTKAELK GCINDV~~K~~RM~~Y~~ SCLINRFGFS EEDITVLIIDT DDSYTQPTGR NIRKALSDLV GSAEEGDSLLF
 81 VHYSGHGTRL PAETGEDDDT GYDECIVPCD MNLITDDDFR ELVDKVPEGC RITIVSDSCH SGGLIDKAKE QIGESHKQGD
 161 DENEGHGS~~G~~F GFKKFLRRSV EDAFESRGIH IPRRHDRREE EESFAESSV IETEDGDQVH VKNKSLPLST LIEILKQKTG
 241 KDDIDVGKLR PTLFDVFGED ASPKVKKFMK VIFNKLQHGN EEGESGGFLG MVGNLAQEFK KQKLDENDES YAKPAMETHV
 321 EGKQEVYAGS GSRGLPDSGI LVSGCQTDQT SADATPAGGD SYGALSNAIQ EILAESDGPI TNEEVVTKAR KKLQKQGYTQ
 401 RPGLYCSDDH VDAFFV

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

10 26.7 6.05 5.8e-6

1 Acc. #: 4235430 Species: HEVEA BRASILIENSIS Name: latex-abundant protein

Protein MW: 45958.9 Protein pI: 5.0 Protein Length: 417

1 MAKKA~~V~~LIGI NYPGTKAELK GCINDV~~K~~RM~~Y~~ RCLVDRYGFS EEDITVLIDI DESYIQPTGK NIRRVLTDLV RSAEPGDLLF
 81 VHYSGHGTRL PAETGEDDDT GFDECIVPCD MNLITDDDFR EFVDQVPHGC RITVVS~~S~~CH SGGLIDEAKE QIGESTKRKE
 161 EES~~E~~SGFGFK SFLKQTIQDA FESRGVHLPS DLHHHHGHRD EEDFDNRVVE EDYGD~~S~~GYVK SKSLPLSTLI EILKQKTKGD
 241 DIDVGKLRPT LFD~~M~~F~~G~~DDAS PKVKKFMKVI LNKLRHG~~D~~GE SGGGGFLGMV G~~S~~LAQEF~~L~~KH KLDENDES~~Y~~V KPALET~~E~~VDS
 321 KQEVYAGTK RSLPDGGILI SGCQTDQ~~T~~SA DASPSGK~~S~~E AYGALSNAIQ TIIAETD~~G~~AV TNQELV~~L~~KAR KMLK~~Q~~QGYTQ
 401 KPGLYCSDDH VEAS~~F~~V

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

6 9.8 3.29 1.0e-4

MUESTRA-31 Acc. #: 195963550 Species: NICOTIANA TABACUM Name: metacaspase type II

Protein MW: 45668.0 Protein pI: 4.8 Protein Length: 416

1 MAKKA~~V~~FIGI NYPGTKAELK GCINDV~~K~~RM~~Y~~ SCLINRFGFS EEDITVLIIDT DDSYTQPTGR NIRKALSDLV GSAEEGDSLLF
 81 VHYSGHGTRL PAETGEDDDT GYDECIVPCD MNLITDDDFR ELVDKVPEGC RITIVSDSCH SGGLIDKAKE QIGESHKQGD
 161 DENEGHGS~~G~~F GFKKFLRRSV EDAFESRGIH IPRRHDRREE EESFAESSV IETEDGDQVH VKNKSLPLST LIEILKQKTG
 241 KDDIDVGKLR PTLFDVFGED ASPKVKKFMK VIFNKLQHGN EEGESGGFLG MVGNLAQEFK KQKLDENDES YAKPAMETHV
 321 EGKQEVYAGS GSRGLPDSGI LVSGCQTDQT SADATPAGGD SYGALSNAIQ EILAESDGPI TNEEVVTKAR KKLQKQGYTQ
 401 RPGLYCSDDH VDAFFV

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

Forma silvestre de la proteína

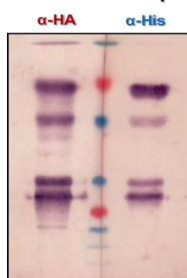


Figura 38: Resultados obtenidos a partir de la secuenciación del zimógeno y las tres bandas obtenidas en el primer paso de purificación. En el Western blot se pueden apreciar las mismas bandas cuando se revela con anti-HA (para detectar el C-terminal) como con anti-His (para detectar el N-terminal). La corrida se efectuó en geles de SDS-PAGE 12 %.

También se observó la formación de “complejos” al pasar la proteína por una columna de exclusión de peso molecular, apareciendo bandas que se corresponden a la metacaspasa desde la fracción 13 hasta la 22 (Figura 39). Este patrón solo se explica si los fragmentos estaban formando estructuras de diferentes pesos moleculares a la hora de pasar por la columna.

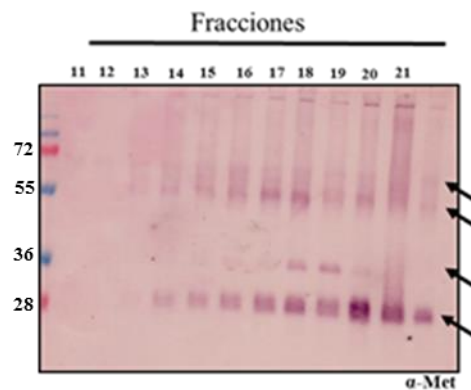


Figura 39: Western blot de muestras de *NtMC1* purificada mediante exclusión de peso molecular. La proteína se detectó con anti-*NtMC1* a partir de la fracción 13 y hasta la 22, apareciendo bandas diferenciales en la 18, 19 y 20, lo cual solo puede ser explicado por la presencia de diferentes complejos de *NtMC1*, las muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 12%.

Para verificar estos resultados se separaron en dos gels nativos a la *NtMC1* y los diferentes mutantes en los aspárticos, lisina y cisteína y se compararon con un gel desnaturizante. Como se puede observar en el Western blot de la Figura 40, la forma silvestre, D348R y D353R mostraron un patrón de barrido en el gel nativo, lo que confirma la existencia de numerosas formas de diferente peso molecular de al menos tres formas de *NtMC1*

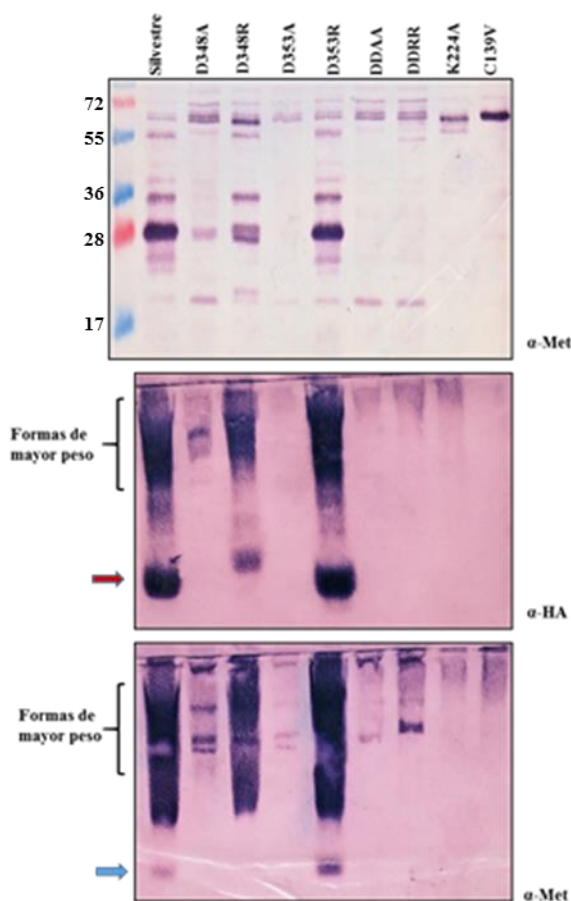


Figura 40: Westerns blots a partir de geles desnaturizantes y nativos de *NtMC1* expresada en *E. coli*. El primero se corresponde a una corrida SDS-PAGE al 12 %, el segundo a una corrida nativa en 12 % y para el revelado se empleó un anticuerpo anti-HA, mientras que el tercero también es nativo y se reveló con anti-*NtMC1*. En ambos se aprecian formas de diferentes tamaños moleculares, aunque parecen ser menores en las proteínas que no se autoprocenan.

La complejidad para purificar el zimógeno nos impidió determinar la concentración de la enzima y por tanto el cálculo de diferentes parámetros cinéticos. Para la “estimación” de la actividad enzimática se partieron de cantidades equivalentes de enzimas en extractos totales de proteína, determinadas cualitativamente mediante Western blots y tinción por azul de Coomassie.

VI. 5. 1. 2. El calcio como requisito para la activación *in vitro* de NtMC1.

El Ca^{2+} ha sido reportado como un regulador positivo del autoprocésamiento y la activación *in vitro*, al menos para las metacaspasas AtMC4, 5, 8 y mCII-Pa de *Picea abis* (Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe y Lam., 2011b; Zhang y Lam., 2011), así como un pH relativamente básico (Vercammen *et al.*, 2004). Para investigar el efecto del calcio sobre el autoprocésamiento, se sobre-expresó la forma recombinante de NtMC1 en *E. coli* y se incubaron los extractos totales de proteínas en amortiguador HEPES a pH básico a diferentes concentraciones de cloruro de calcio y diferentes tiempos, los resultados se muestran a continuación (Figura 41).

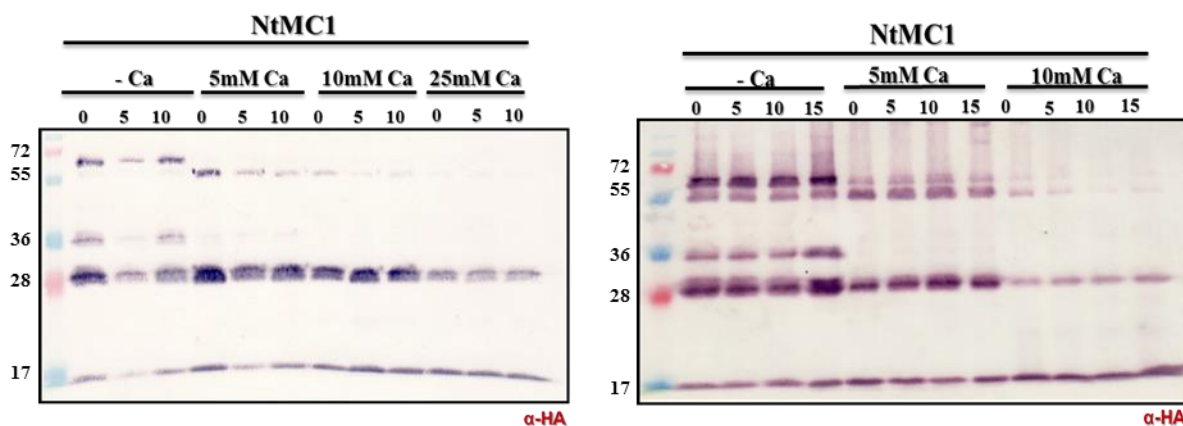


Figura 41: Autoprocésamiento de NtMC1 dependiente de calcio. Western blot de extractos totales de proteína con NtMC1 sobre-expresada en *E. coli* para analizar la dependencia de Ca^{2+} en el autoprocésamiento. Los extractos de proteínas fueron incubados en amortiguador HEPES a pH básico (7.2) a diferentes concentraciones de cloruro de calcio y durante diferentes tiempos. La corrida se llevó a cabo en SDS-PAGE 12 % y se realizaron 5 réplicas.

A la concentración de 5 mM de cloruro de calcio el zimógeno se procesa completamente, mientras que a mayores concentraciones y tiempos de incubación no solo se procesa, sino que se desaparece, resultado que se puede interpretar como degradación. Este efecto es claramente atribuible a la presencia del calcio, pues en ausencia del mismo el zimógeno no solo no desaparece, sino que está en equilibrio con una población de formas procesadas. Es importante destacar que el

zimógeno se auto procesa incluso en ausencia del calcio, sin embargo, nos interesaba conocer si estas formas eran capaces de procesar otros tipos de sustratos.

Para determinar la actividad de la proteína se empleó una molécula sintética (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) la cual es reconocida y procesada por *NtMC1* en la última Arg, liberando el 7-amino-4-metil-coumarin (AMC). La liberación del AMC se puede seguir empleando un fluorímetro excitando a una longitud de 351 nm y capturando la emisión en 430 nm.

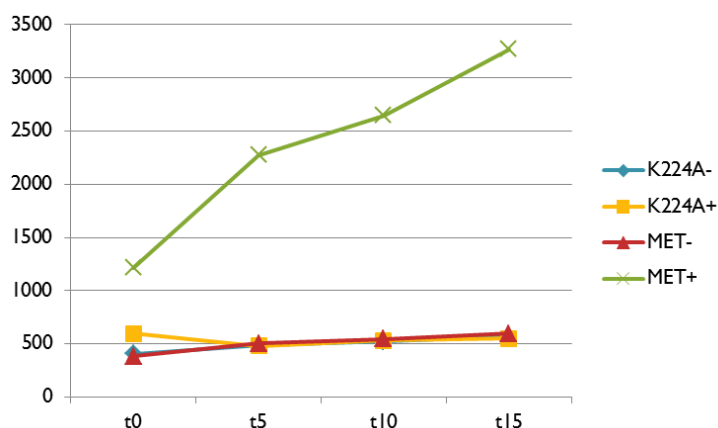


Figura 42: Actividad relativa de la metacaspasa silvestre MET (*NtMC1*) y de la mutante K224A en presencia (+) o ausencia (-) de 5 mM de cloruro de calcio en extractos totales de proteína de *E. coli*. La actividad se midió en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF)(eje Y), mientras que el tiempo fue medido en minutos (eje X).

En este experimento solo se detectó actividad de *NtMC1* cuando se le agregaba cloruro de calcio al medio de incubación (Figura 42), de este resultado podemos concluir que: 1.- **El procesamiento en K224 es necesario para que se forme un complejo activo**, pues la mutante K224A no mostró actividad incluso en presencia de calcio; 2.- **El procesamiento es necesario, pero no suficiente, para que el complejo sea activo** pues también se requiere de calcio en el medio, al menos *in vitro*.

VI. 5. 1. 3. Actividad *in vitro* de los fragmentos p20 y p10.

Como se vio anteriormente el sitio S1 está constituido por aminoácidos de las subunidades p20 y p10, resultado evidenciado en los ensayos con los mutantes C139V, H86S y el doble

mutante de los aspárticos 348 y 353. Para determinar si en este sitio también se procesa el sustrato se analizó la actividad de los dominios p20 y p10 por separado y mezclados, en un intento por reconstituir el complejo *in vitro*.

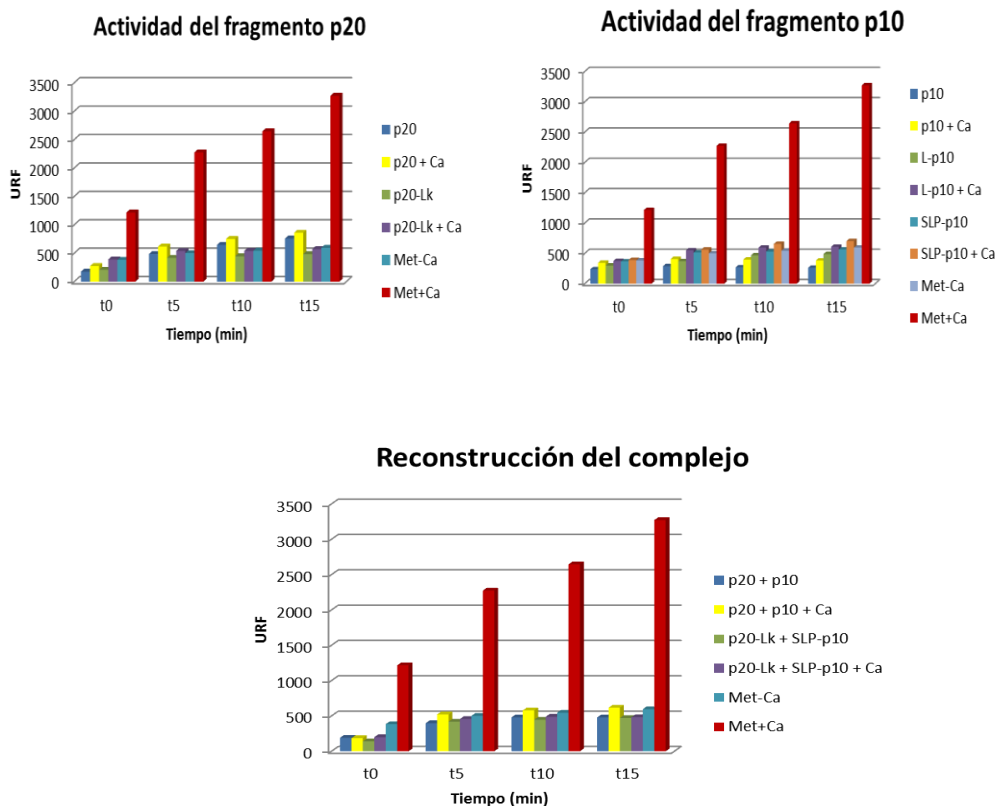


Figura 43: Actividad relativa de las diferentes subunidades de la metacaspasa (p20 y p10), incubados en amortiguador HEPES a pH = 7.5, cloruro de calcio a una concentración final de 5 mM y el sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC 50 μ M.

La actividad de los fragmentos se comparó con la de *NtMC1* tanto en presencia como ausencia de calcio. Tal como se aprecia en la Figura 43, ni p20 ni p10 mostraron actividad significativa respecto a la forma silvestre y tampoco fue posible reconstituir un complejo activo al mezclar estos fragmentos. Este resultado coincide con lo informado por Watanabe y Lam (2012) para *AtMC4* y constituye otro pre-requisito para la formación de un complejo activo *in vitro* para *NtMC1*: **La síntesis obligada del zimógeno.**

VI. 5. 1. 4. Cambios en la actividad de *NtMC1* al interactuar con p20.

Como se demostró anteriormente, el calcio promueve el total autoprosesamiento del zimógeno así como la activación del complejo, lo cual a elevadas concentraciones conduce a la autodegradación de la enzima (Figura 41). Por ello se investigó el efecto de combinar *NtMC1* con las diferentes subunidades en presencia del calcio. En las combinaciones con los fragmentos de p20 se empleó a *NtMC1* fusionada al epítipo HA y los p20 a Flag.

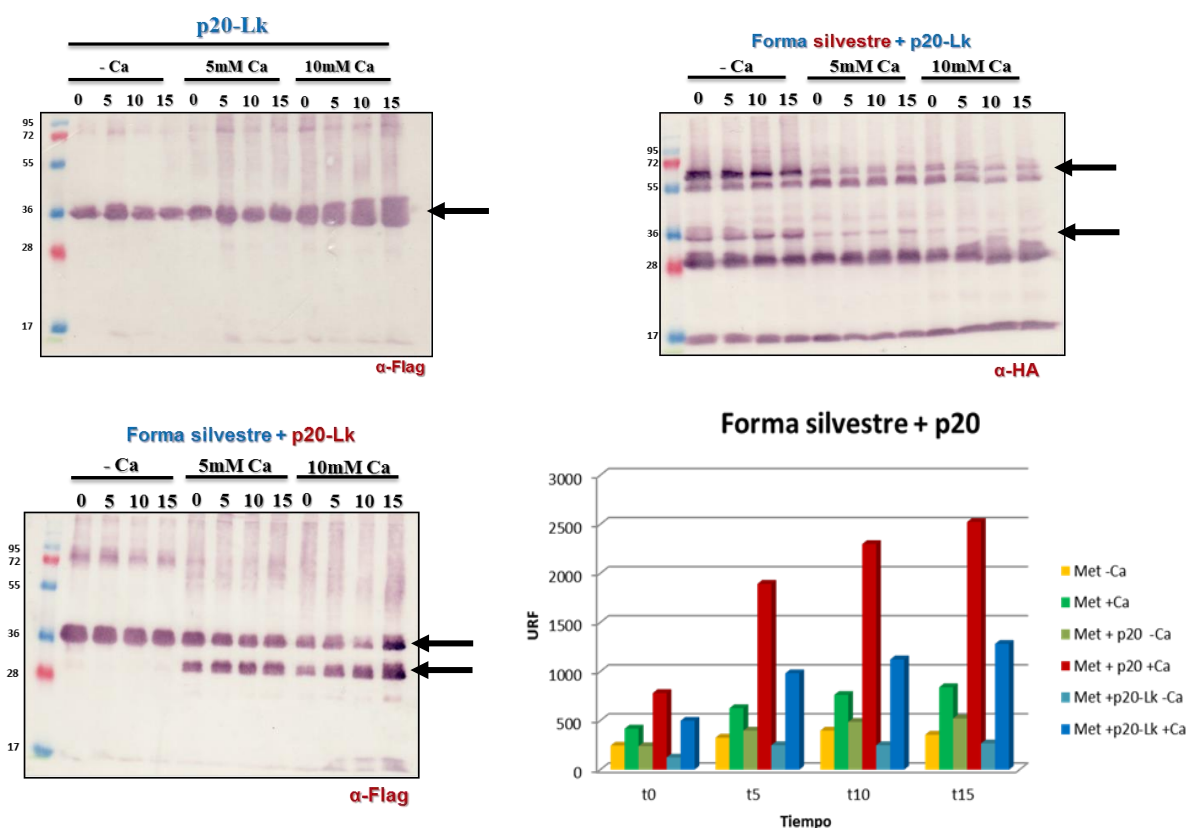


Figura 44: Ensayo de actividad de *NtMC1* combinado con diferentes versiones de p20. Se observa un efecto “potenciador” de la subunidad p20 y p20-Lk sobre la actividad de la forma silvestre. Los Western blots muestran que la forma p20-Lk es procesada por *NtMC1* en presencia de Ca^{2+} . Se corrieron las muestras en geles de SDS-PAGE 12 % y se reveló con anti-HA o anti-Flag.

Curiosamente se detectó un aumento significativo en la actividad de *NtMC1* cuando se combinó con p20 o p20-Lk (Figura 44), siendo considerablemente mayor en *NtMC1* y p20 que con p20-Lk. A nivel de Western se observó que *NtMC1* cuando es activada por calcio también es capaz de reconocer y procesar a p20-Lk como un sustrato, liberando un fragmento de talla similar al p20 (Figura 44).

Para determinar si en el efecto observado de los fragmentos p20 sobre *NtMC1* estaba involucrada su díada catalítica, se generaron nuevas construcciones en las cuales los fragmentos p20 tenían mutada la cisteína 139 por una valina. Los resultados obtenidos de las actividades, así como los Westerns blots de cada uno se muestran en la Figura 45.

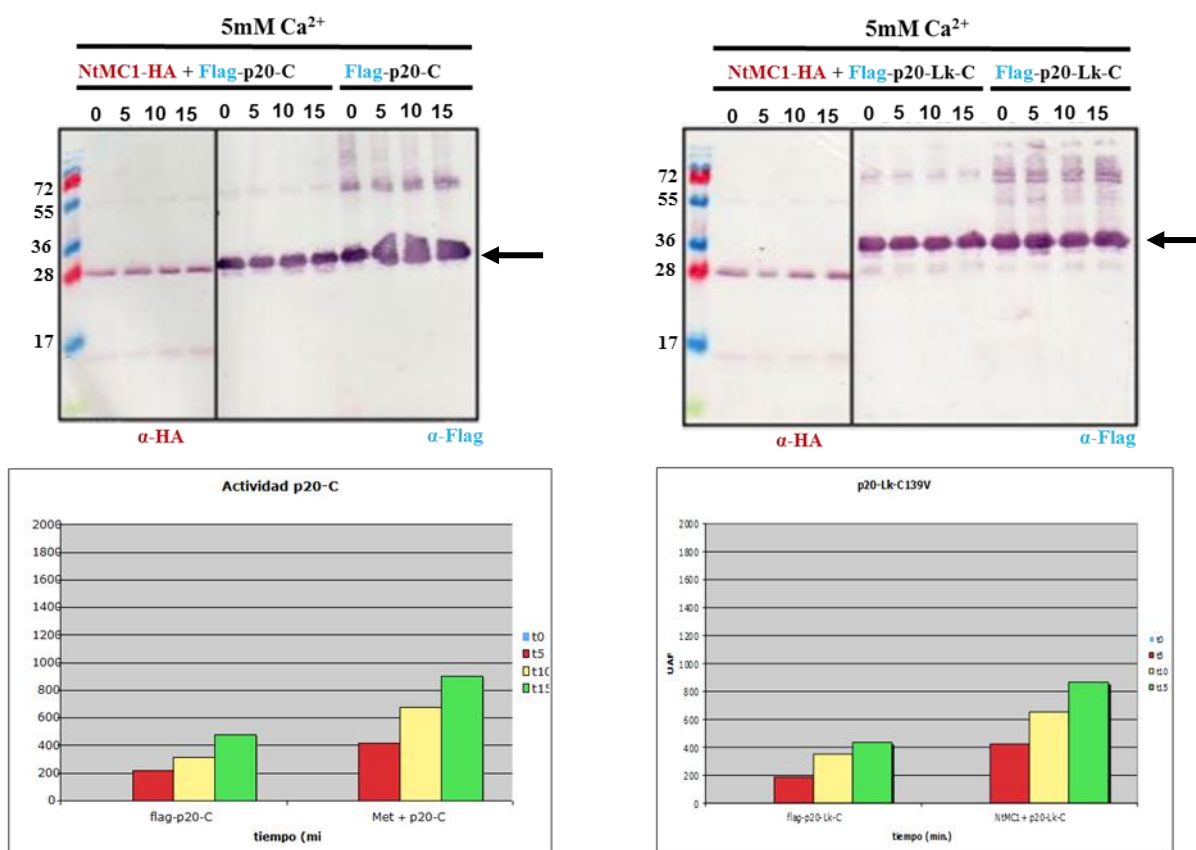


Figura 45: Ensayos de actividad y Western blot de *NtMC1* mezclada con los fragmentos de p20 que portaba una mutación en la C139. En ambos casos la actividad fue no significativa y se abatió el procesamiento de p20-Lk lo que sugiere que el mismo depende de un sitio alterno entre p20-Lk y el p10 de la forma silvestre. Se corrieron las muestras en geles de SDS-PAGE 12 %.

La actividad de *NtMC1* en ambos casos fue de aproximadamente 900 unidades relativas de fluorescencia (URF) a los 15 min., valor similar al obtenido en el ensayo anterior y muy por debajo de las 2500 URF detectadas cuando estaba presente el fragmento p20 o las 1300 URF con p20-Lk. Este resultado sugiere que la cisteína 139 está implicada directamente en el efecto potenciador de la actividad de *NtMC1*. Además, p20-Lk tampoco sufrió procesamiento lo cual sugiere la formación de un sitio activo adicional, constituido por la diada del fragmento p20 y los aspárticos de la p10 del complejo nativo.

Luego de estos resultados inesperados nos preguntamos si el sustrato sintético empleado podría ser importante en la interacción entre p20 y *NtMC1*. Para elucidar este aspecto llevamos a cabo un experimento de incubación similar a los anteriores, pero ahora con y sin el sustrato sintético. Como se puede observar en la Figura 46, el fragmento p20-Lk se procesa de manera independiente al sustrato, lo que descarta una posible función del mismo como adaptador en el mecanismo de interacción entre *NtMC1* y p20-Lk.

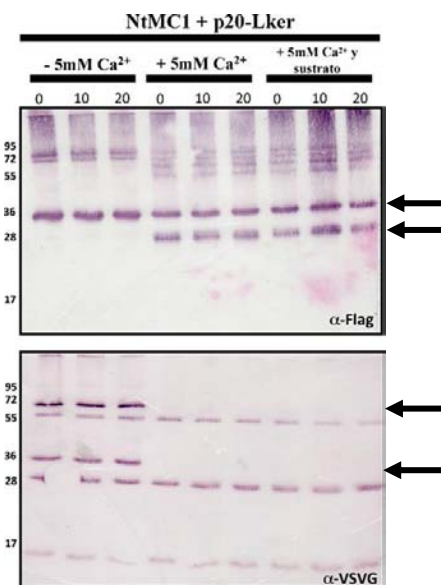


Figura 46: Efecto del sustrato Boc-Gly-Arg-Arg-AMC en la interacción de *NtMC1* con la subunidad p20. Western blot de *NtMC1* mezclada con p20-Lk e incubada en amortiguador HEPES, pH básico, suplementado con 5 mM de cloruro de calcio y en presencia y ausencia del sustrato sintético. Se reveló con anti-Flag para ver a p20-Lk y con anti-VSVG para *NtMC1*. Se corrió en geles de SDS-PAGE 12 %.

VI. 5. 1. 5. Cambios en la actividad de *Nt*MC1 al interactuar con p10.

La interacción y modificación de la actividad de *Nt*MC1 promovida por p20 fue un resultado no esperado y al mismo tiempo generaba una nueva interrogante sobre la posible interacción de *Nt*MC1, pero ahora con los fragmentos de la subunidad p10.

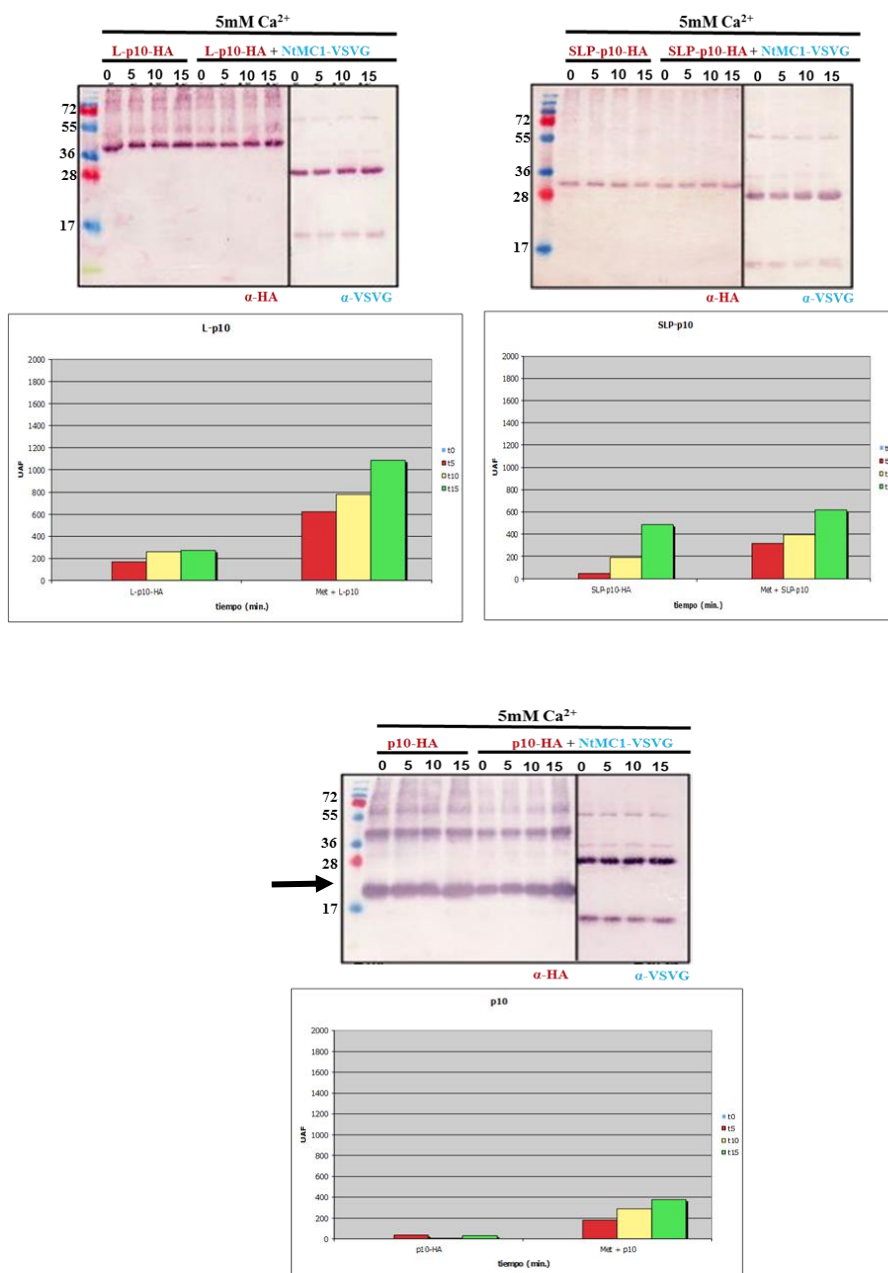


Figura 47: Ensayos de actividad y Western blot de *Nt*MC1 mezclada con las diferentes versiones de los fragmentos de p10. En ningún caso la actividad fue significativa y no se detectó procesamiento de los fragmentos en los Western blots por *Nt*MC1 cuando la enzima es activada con 5 mM de cloruro de calcio. Se corrieron las muestras en geles de SDS-PAGE 12 %.

Para investigar este aspecto se llevó a cabo un experimento similar al anterior en el cual se empleó la forma silvestre fusionada al epítipo VSVG y los diferentes fragmentos de p10 al HA. Contrario a los resultados obtenidos con los fragmentos del p20, las diferentes combinaciones de p10 no mostraron un efecto sobre la actividad de *NtMC1*. En el caso de los fragmentos SLP-p10 y p10 la actividad incluso fue inferior, y no se observó procesamiento en ninguno caso (Figura 47).

VI. 5. 2. Actividad *in vitro* de los mutantes de aspártico.

El mutante en la lisina 224 ya había mostrado nulo procesamiento y actividad, por tal razón sabíamos que el procesamiento era un prerequisite para la formación de un complejo activo. Por ello esperábamos que los mutantes en la cisteína 139, la histidina 86 y el doble mutante en aspárticos que son incapaces de auto procesarse, tampoco mostraran actividad ante el sustrato.

Por otro lado, los simples mutantes en los aspárticos 348 y 353 por argininas si se procesan y no se tenía conocimiento sobre el efecto de estos cambios sobre la actividad de *NtMC1*. Además, también se investigó la función de los aspártico 25 y 137, los cuales se corresponden con los residuos D95 y D211 de la MCA2 de *T. brucei*. Se sabe que estos se localizan en la superficie del sitio activo S1 (McLuskey *et al.*, 2012). Además, la substitución de estos por Ala abate la actividad enzimática y el autoprocésamiento de MCA2, lo que sugiere que ambos están involucrados en el reconocimiento del sustrato (McLuskey *et al.*, 2012).

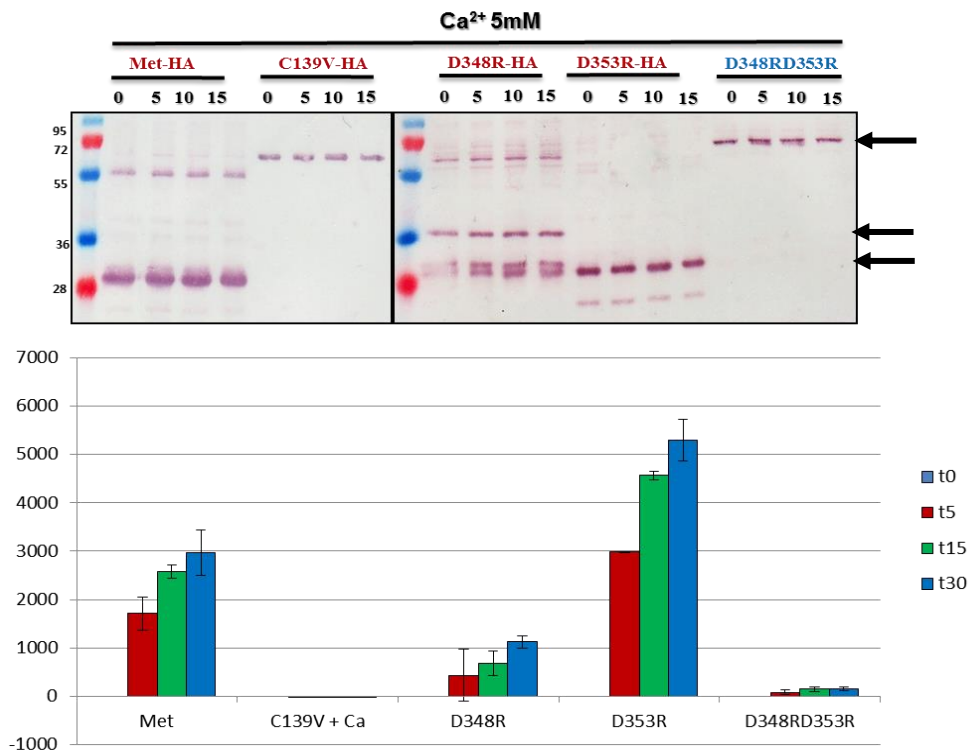


Figura 48: Actividad enzimática de *NtMC1* (Met) y las versiones mutantes C139V, D348R, D353R y D348RD353R sobrepresadas en *E.coli*. A nivel de Western blot se observó la falta de procesamiento en C139V y del doble mutante de los aspárticos, lo que sugiere que uno de los dos ha de estar presente para que la enzima sea funcional. Se corrieron en gels de SDS-PAGE 12 %.

La actividad del mutante D353R resultó significativamente mayor que la de *NtMC1*, no así la de D348R que resultó estadísticamente inferior, mientras C139V y D348RD353R se comportaron tal como se esperaba, sin actividad apreciable (Figura 48). Dado lo inesperado del resultado pensamos que podía deberse a un error experimental en el ajuste de las concentraciones de enzima empleada, aunque el Western no mostraba diferencias cuantitativas que explicaran el resultado y si un procesamiento diferente del mutante D348R. Por ello decidimos repetir el experimento con *NtMC1*, D353R y C139V intentando partir de cantidades equivalentes de las de proteína, a partir de los resultados de la tinción con azul de Coomassie y Western blot.

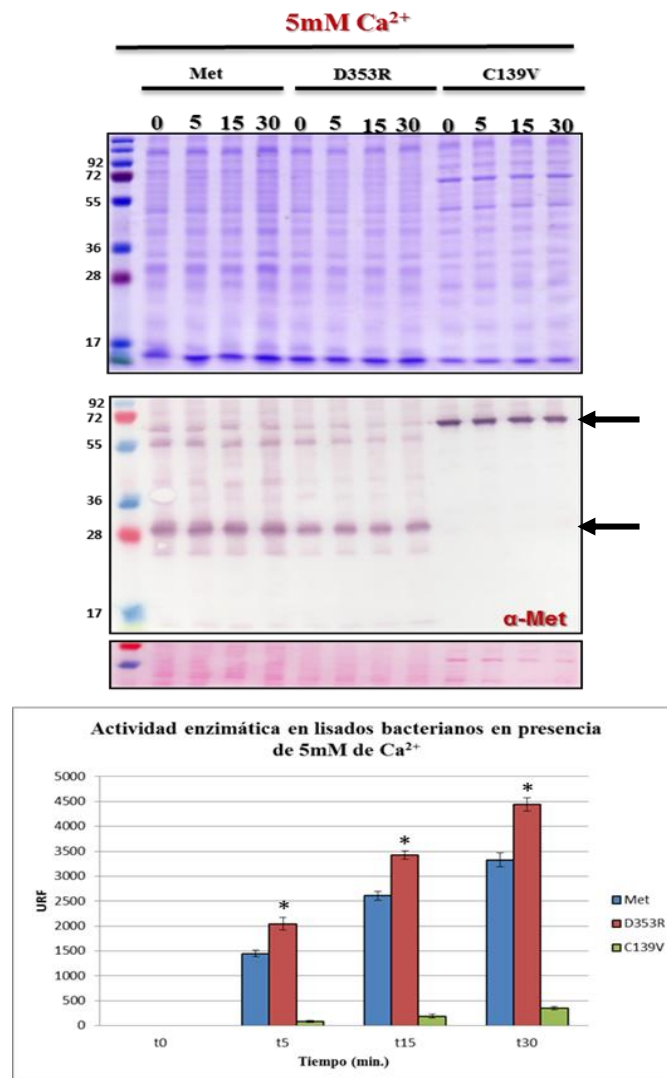


Figura 49: Ensayo de actividad en extractos bacterianos de la forma silvestre de la metacaspasa (NtMC1-HA) y las formas mutadas en el aspártico 353 (D353R-HA) y la cisteína 139 (C139V-HA). Para inducir la actividad se empleó CaCl₂ a una concentración final de 5mM y se siguió la liberación del 4-metil-coumarín (AMC) del sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC en un rango de tiempo de 0 a 15 minutos. En la figura superior se muestra el resultado del Coomassie y Western blot de la cinética donde se observa el no procesamiento de la mutante C139V aún en presencia de calcio, en tanto en la parte inferior se muestra el resultado de la actividad observándose un incremento significativo de la misma en la mutante D353R respecto a la silvestre ($p=0.5$), mientras que la de la mutante C139V resultó prácticamente nula.

Tal como se muestra en la Figura 49, el Coomassie y el Western blot muestran cantidades de proteína total y de NtMC1 o su versión mutante, equivalentes. En tanto el resultado de actividad fue congruente con el obtenido anteriormente, donde el mutante D353R mostró valores significativamente mayores que NtMC1, mientras que en C139V no se apreció actividad significativa.

Para determinar la relación de los aspárticos 25 y 137 con el sitio activo se generaron mutantes puntuales de estos por alaninas y se sobre expresaron en *E. coli*. Posteriormente se determinó la actividad en presencia y ausencia de calcio, los resultados se muestran a continuación (Figura 50).

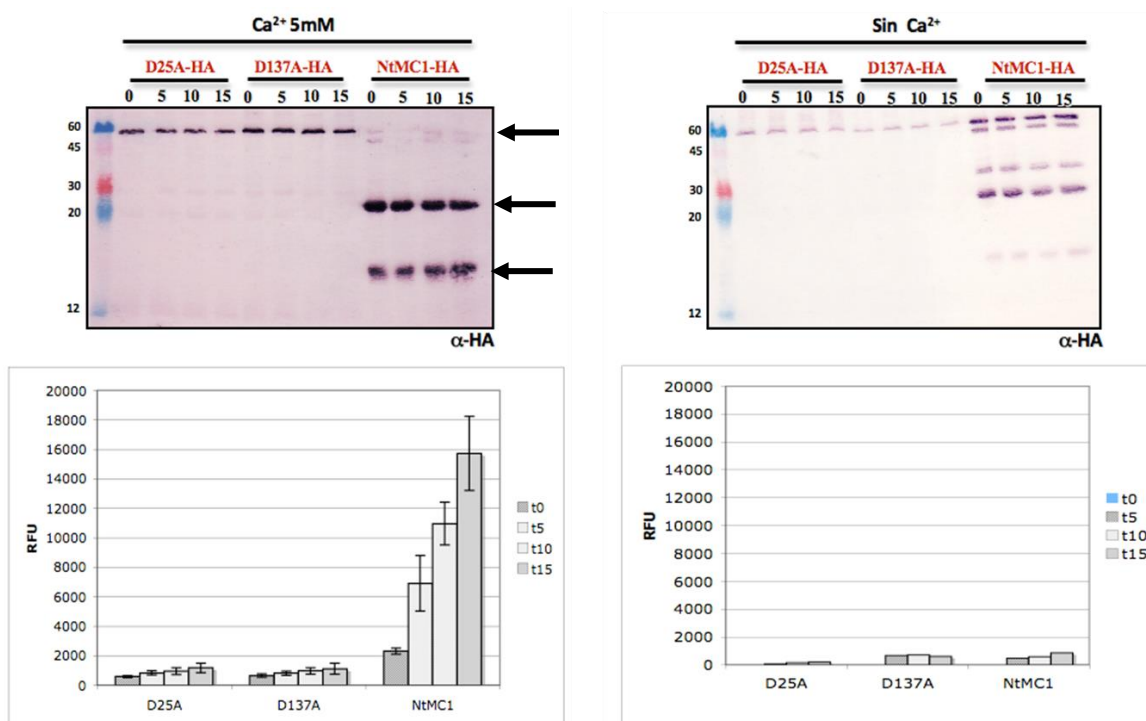


Figura 50: Ensayo de actividad en extractos bacterianos de la forma silvestre de la metacaspasa (NtMC1-HA) y las formas mutadas en los aspárticos 25 y 137 (D25A-HA y D137A-HA). Para inducir la actividad se empleó CaCl_2 a una concentración final de 5mM y se siguió la liberación del 4-metil-coumarín (AMC) del sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC en un rango de tiempo de 0 a 15 minutos. En los resultados obtenidos a nivel del Western blot de la cinética se observa ausencia total de procesamiento en las formas mutantes mientras que en las gráficas de actividades se observa ausencia de actividad en los mutantes también congruente con la falta de procesamiento ($p=0.5$).

Tal como se observa, en ambos mutantes se abatió el autoprocésamiento y consecuentemente, la actividad. Este resultado es congruente con el informado por McLuskey y colaboradores (2012) para la MCA2 de *T. brucei* lo que demuestra que los aspárticos 25 y 137 forman parte del sitio activo de *NtMC1* y son esenciales para el correcto funcionamiento de la misma.

VI. 5. 2. 1. Procesamiento diferencial del mutante D348R.

Como se mencionó anteriormente, el mutante D348R mostró un procesamiento diferencial respecto a NtMC1 y D353R. El efecto se observó cuando se sobre expresó la proteína tanto en bacterias como en plantas, y se separó en geles SDS-PAGE de menor porcentaje (10 %) lo que permitió observar las bandas de menor peso molecular, tal como se muestra en la Figura 51.

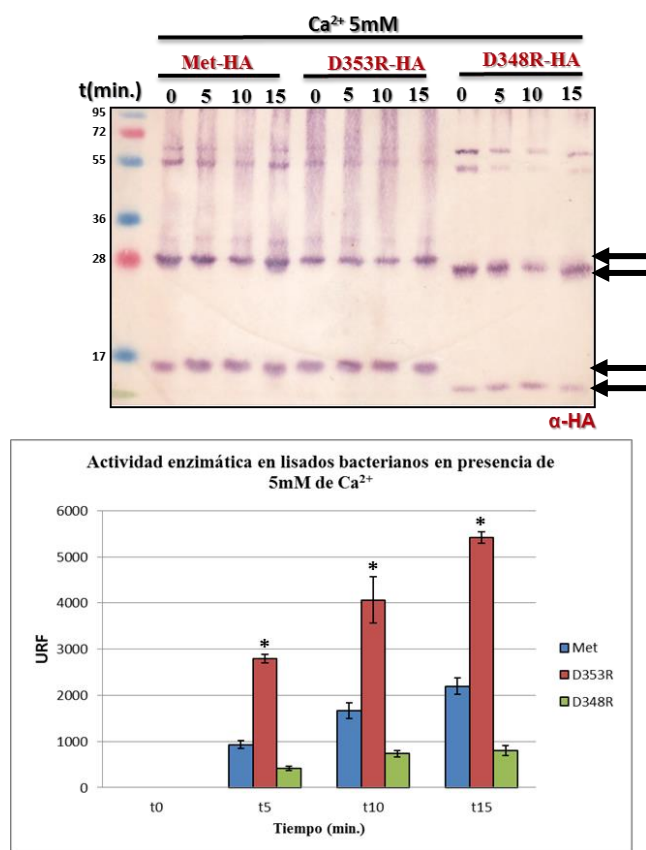


Figura 51: Ensayo de actividad en extractos bacterianos de la forma silvestre de la metacaspasa (NtMC1-HA) y las formas mutadas en los aspárticos 353 y 348 (D353R-HA y D348R-HA). Para inducir la actividad se empleó CaCl₂ a una concentración final de 5mM y se siguió la liberación del 4-metil-coumarín (AMC) del sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC en un rango de tiempo de 0 a 15 minutos. En la figura superior se muestra el resultado del Western blot de la cinética donde se observa un procesamiento diferencial de la mutante D348R mientras que en la parte inferior se muestra el resultado de la actividad observándose un incremento significativo de la misma en la mutante D353R respecto a la silvestre (p=0.5), en tanto la D348R mostró una actividad inferior. Se corrió en un gel SDS-PAGE 10%

La sustitución de los aspárticos 348 y 353 (aminoácidos ácidos) por argininas (básicos) parece tener consecuencias drásticas en la configuración del sitio activo, alterando la actividad del complejo y la forma en que se autoprocresa. Por ello decidimos generar nuevos mutantes puntuales cambiando los aspárticos por alaninas (D348A y D353A).

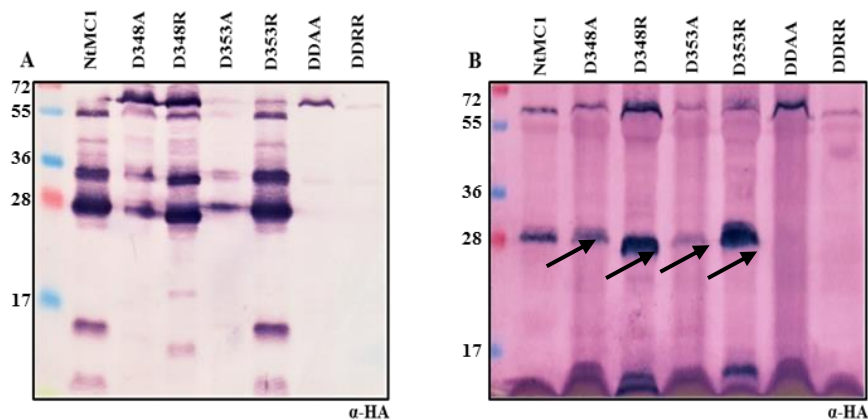


Figura 52: Resultados del western blot de *NtMC1* y sus variantes mutadas en los aspárticos 348 y 353 tanto por argininas como por alaninas. Sobre expresadas en *E.coli* (A). En expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* (B). Se corrieron en geles de SDS-PAGE 12%.

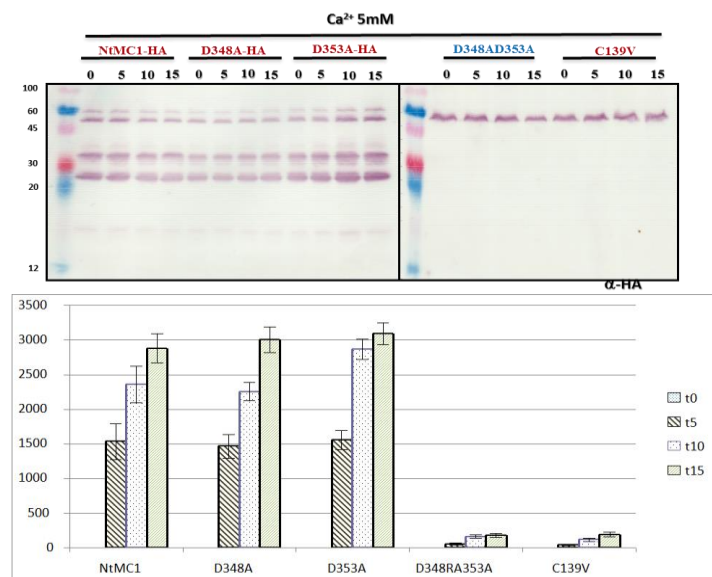


Figura 53: Ensayo de actividad en extractos bacterianos de la forma silvestre de la metacaspasa (*NtMC1*-HA) y las formas mutadas en los aspárticos 353 y 348 (*D353A*-HA y *D348A*-HA) así como en la cisteína 139 (*C139V*). Para inducir la actividad se empleó CaCl_2 a una concentración final de 5mM y se siguió la liberación del 4-metil-coumarín (AMC) del sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC en un rango de tiempo de 0 a 15 minutos. En la figura superior se muestra el resultado del western blot de la cinética donde se observa el mismo patrón de procesamiento para los imple mutantes en aspárticos por alaninas, mientras que en la parte inferior se muestra el resultado de la actividad observándose valores similares para *NtMC1*, *D348A* y *D353A* ($p=0.5$).

La alanina es empleada frecuentemente en la generación de mutantes puntuales para determinar la contribución de los aminoácidos en la estabilidad y función de una determinada proteína, esta técnica es conocida como “Alanine Scanning” (Morrison y Weis, 2001). La preferencia de cambios por alanina se debe a que no es un aminoácido voluminoso, químicamente es inerte y posee un grupo funcional metilo que puede mimetizar muchas de las estructuras secundarias de otros aminoácidos (Morrison y Weis, 2001).

Los mutantes D348A y D353A sobre-expresados en bacterias y plantas (Figura 52 A y B; Figura 53) mostraron un patrón de auto-procesamiento similar al de *NtMC1*, lo que sugiere una reversión del efecto provocado por el cambio de D por R. A nivel de actividad y tal como se muestra en la Figura 53, también se recuperaron los valores en los dos nuevos mutantes. Estos resultados permiten concluir que el efecto observado en D348R y D353R se debe a alteraciones conformacionales y electrostáticas en el sitio activo.

VI. 5. 3. Inhibición por autoprocésamiento.

El calcio no solo promueve el autoprocésamiento del zimógeno y la actividad del complejo *NtMC1*, sino que a mayores concentraciones también su posible autodegradación (Figura 41). Watanabe y Lam (2011) observaron un efecto inhibitorio en *AtMC4* cuando esta era expuesta a mayores tiempos de incubación con calcio debido probablemente a un proceso de autodegradación. Para determinar si el mismo efecto se daba en *NtMC1* se pre-incubó a la enzima y a D353R en 5 mM de cloruro de calcio durante 15 minutos y luego se midió la actividad en intervalos de tiempo de 10, 20 y 30 min.

Como se observa en la Figura 54 ni en D353R, ni en *NtMC1*, la pre-incubación en cloruro de calcio modificó la actividad al compararla con extractos no incubados. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de auto-procesamiento lo que sugiere el establecimiento de un equilibrio

entre el zimógeno y las formas procesadas el cual es desplazando hacia las formas procesadas al aumentar las concentraciones de calcio para luego dar paso a la autodegradación.

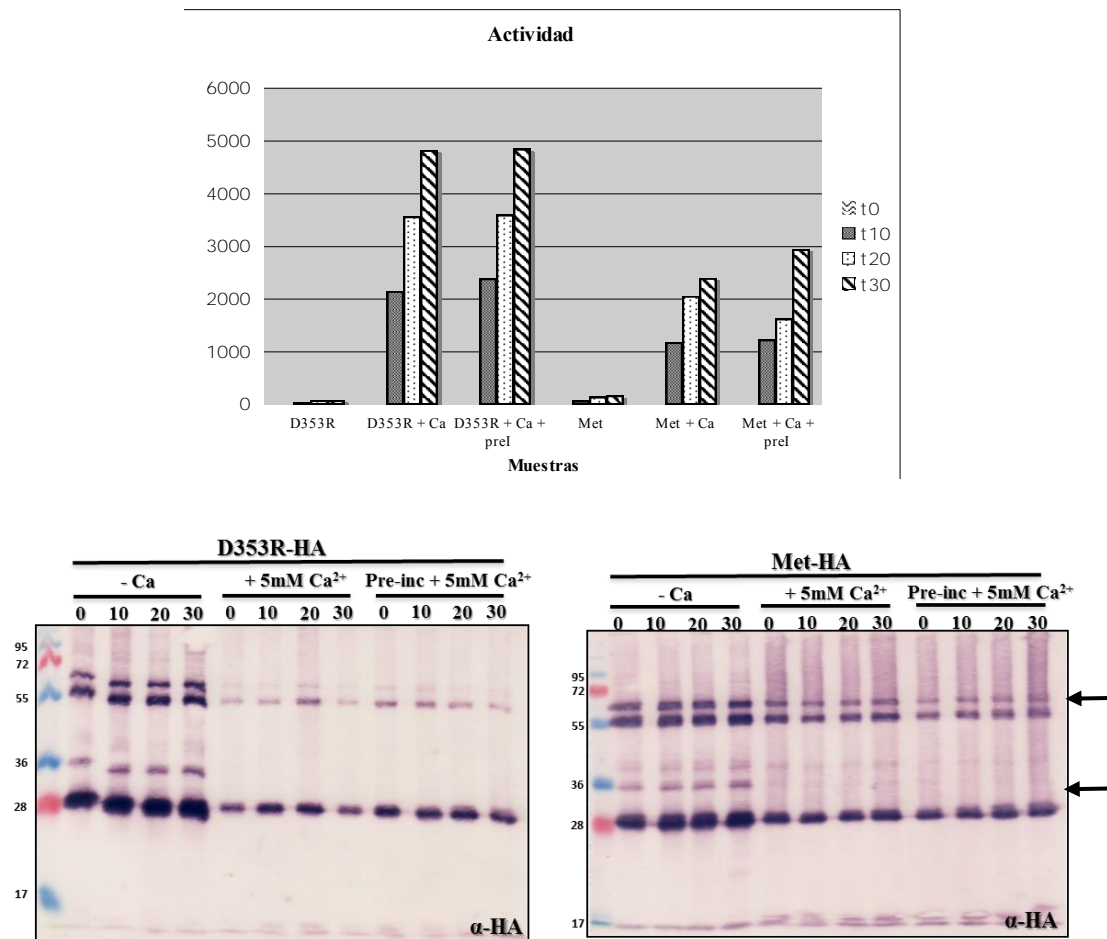


Figura 54: Efecto de la pre-incubación con cloruro de calcio sobre la actividad y procesamiento de *NtMC1*. Resultados de actividad y Western blots al pre-incubar con o sin cloruro de calcio durante 15 min la forma silvestre de la metacaspasa y el mutante D353R. En la figura superior se muestran las actividades obtenidas; en la misma se aprecia que no hubo diferencias significativas al pre-incubar (I) o no en calcio a *NtMC1* y donde el mutante D353R mostró la mayor actividad respecto a la forma silvestre, tal como ya se había observado. A nivel de Western en ambas muestras pre-incubadas no se aprecian cambios en el procesamiento. Se corrieron en geles de SDS-PAGE al 12 %.

VI. 5. 4. Actividad de *NtMC1* sobre-expresada en *Nicotiana benthamiana*.

VI. 5. 4. 1. Tiempo de vida media de la proteína en extractos totales.

Para determinar la estabilidad de la proteína, extractos totales fueron incubados en amortiguador (Tris-HCl pH=7.5 25mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 5mM, TWEEN 0.1% y Glicerol 10%) en períodos de tiempo que oscilaron de 0 – 60 min. Posteriormente las muestras fueron sometidas a desnaturalización por calor, separadas en SDS-PAGE y analizadas mediante Western blots. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 55.

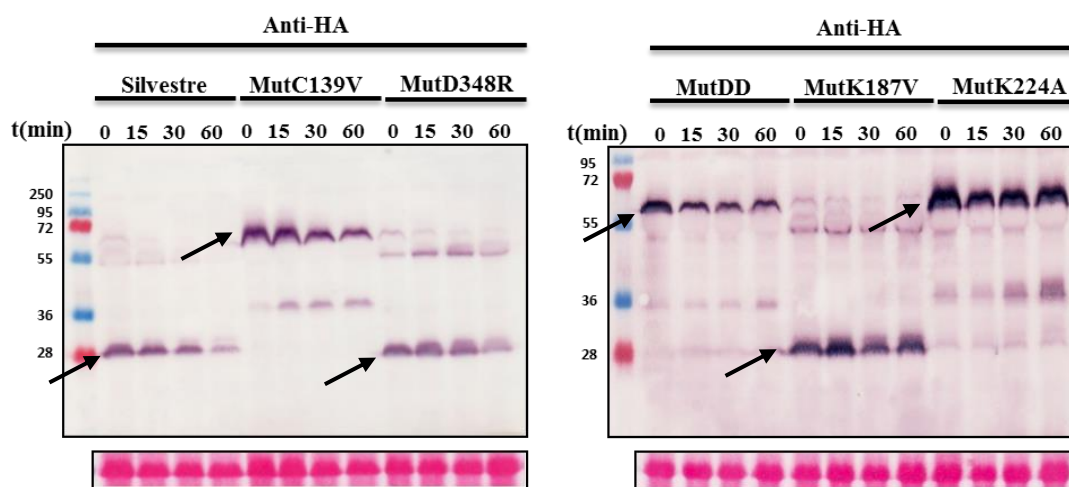


Figura 55: Análisis de la estabilidad de *NtMC1*. Resultado de la incubación de extractos totales de proteínas de hojas de *N. benthamiana* que expresaban transitoriamente a *NtMC1* y sus formas mutantes C139V, D348R, D348RD353R, K187V y K224A. Los Westerns fueron revelados empleando anti-HA y la corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

Como se observa en los Westerns, *NtMC1*, D348R y K187V se autoprocenan a medida que transcurre el tiempo, hasta quedar prácticamente todo procesado tras una hora de incubación. Además, la banda de 29 kDa generada también se va degradando en el tiempo, similar a lo que ocurre cuando se agrega calcio en un extracto de proteína recombinante expresada en *E. coli* (Figura 41). Mientras las variantes mutantes C139V, D348RD353R y K224A sufren un procesamiento diferencial, generándose una banda a la altura de los 36 kDa la cual va aumentando conforme aumenta el tiempo de incubación mientras la cantidad de zimógeno va disminuyendo, pero a

diferencia de las anteriores, a la hora de incubación todavía se observa proteasa no procesada. Debido a que el ensayo se realizó en extractos totales de proteínas vegetales, es muy probable que los cortes atípicos en los mutantes se deban a la acción de otra proteasa.

VI. 5. 4. 2. Actividad de la proteína en extractos vegetales.

Para determinar la actividad de *NtMC1* se empleó el mismo sustrato sintético que en los ensayos con extractos bacterianos (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC 50 μ M) y además el inhibidor de metacaspasas Z-Phe-Lys-2,4,6 trimetilbenzoyloxymetilketona 10 μ M. El ensayo se llevó a cabo con extractos totales de proteína incubados en amortiguador (HEPES 25 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 0.1 mM) a 37°C durante un intervalo de tiempo de 0 a 60 min. La concentración de proteínas totales se determinó mediante Bradford.

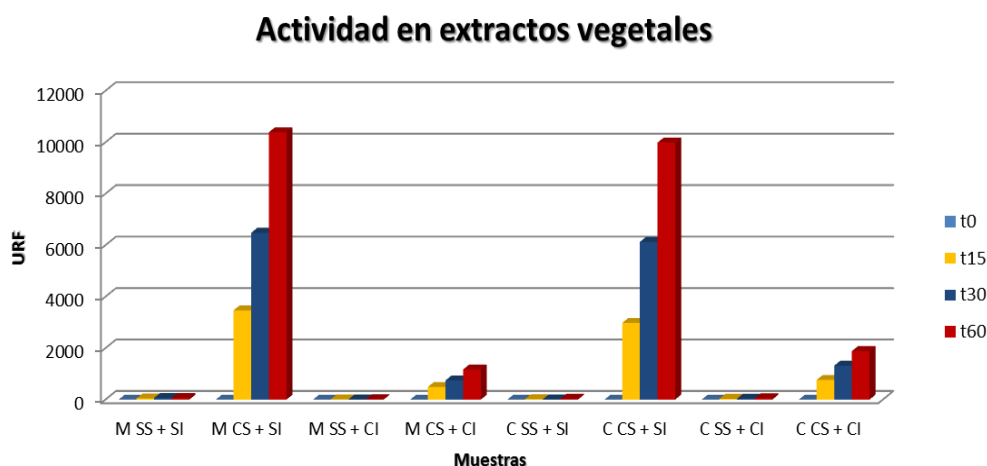


Figura 56: Actividad enzimática de extractos totales de proteína obtenidos de hojas de *N. benthamiana* que sobrexpresaban transitoriamente a *NtMC1* y su variante mutada en la C139, incubados en buffer (HEPES 25 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 0.1 mM) a 37°C durante un intervalo de tiempo de 0 a 60min. Se empleó el sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC 50 μ M y el inhibidor Z-Phe-Lys-2,4,6 trimetilbenzoyloxymetilketona 10 μ M. **M:** *NtMC1*, **C:** C139V, **CS:** Con Sustrato, **SS:** Sin Sustrato, **CI:** Con Inhibidor, **SI:** Sin Inhibidor.

En presencia del sustrato sintético y ausencia del inhibidor se registró actividad similar tanto en *NtMC1* como en C139V, mientras que en el resto de las combinaciones la actividad fue no significativa (Figura 56). La actividad registrada en el extracto del mutante indica que el sustrato sintético está siendo procesado eficientemente por las metacaspasas endógenas de *N. benthamiana* u otras proteasas capaces de reconocerlo. Por tal razón no podemos discernir bajo estas condiciones experimentales entre las actividades endógenas y de la recombinante.

VI. 5. 4. 3. Interacción *in vivo* de *NtMC1* con los fragmentos p20.

A pesar de que resultaba imposible medir la actividad directamente en extractos totales de proteínas vegetales y por tanto compararla con los resultados obtenidos en extractos de *E. coli*, nos interesaba conocer si *NtMC1* era capaz de interactuar *in vivo* con los fragmentos p20, similar a lo que sucedía en bacterias. Para ello se empleó a *NtMC1* fusionada al epítipo VSVG hacia el carboxilo terminal y los diferentes fragmentos p20, p20-Lk (con el linker cortado en la lisina 224) y p20-L (linker completo) con el cMyc hacia el amino terminal. Las construcciones fueron expresadas transitoriamente en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 57).

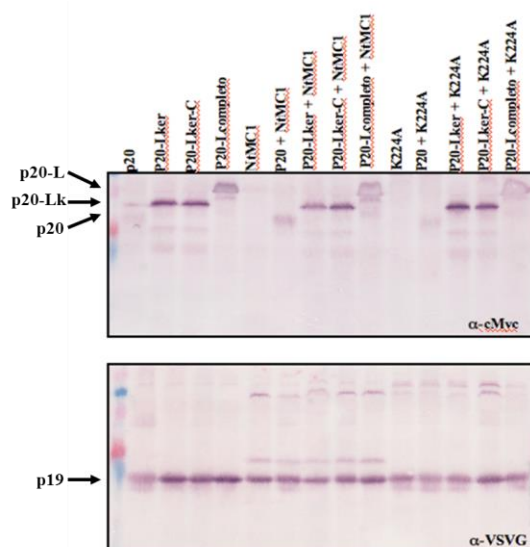


Figura 57: Interacción de *NtMC1* con las variantes de p20 en un sistema *in vivo*. Westerns blots de extractos totales de proteínas obtenidos de hojas de *N. benthamiana* en las que se coexpresó transitoriamente a *NtMC1* y las diferentes versiones de la subunidad p20. A diferencia de lo que ocurre en los ensayos *in vitro*, en estos no se logró observar procesamiento de p20 por la forma silvestre. La corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

Se esperaba un procesamiento del fragmento p20-Lk, liberándose el p20 similar a lo que ocurre en extractos bacterianos, así como un procesamiento de p20-L el cual podría ser cortado tanto en la lisina 224 como en p20 o ambos. Los resultados obtenidos, por el contrario, no mostraron procesamiento en ninguna de las formas de p20, lo cual establece una diferencia en el comportamiento de *NtMC1* cuando se emplean sistemas *in vitro* o *in vivo*.

VI. 5. 4. 4. Interacción *in vivo* de *NtMC1* con los fragmentos p10.

La falta de interacción *in vivo* de *NtMC1* y los fragmentos p20 constituye un resultado contrario al obtenido *in vitro* y por ello nos interesaba conocer que sucedía con la subunidad p10. Para ello se empleó a *NtMC1* fusionada a VSVG hacia el carboxilo terminal y los fragmentos p10, SLP-p10 (“linker” cortado en la lisina 224) y L-p10 (con el “linker” completo) fusionados al epítipo HA hacia el carboxilo terminal.

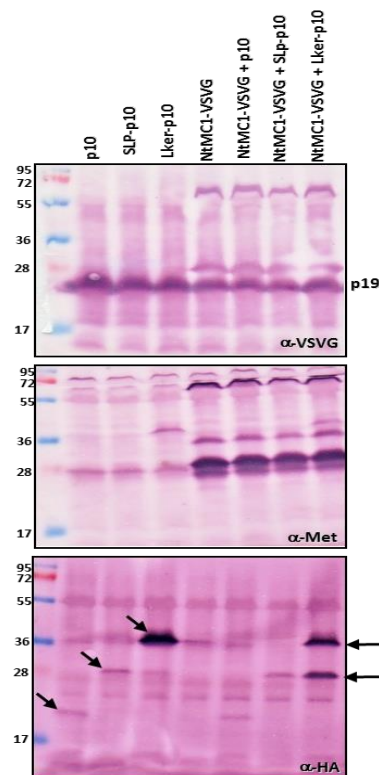


Figura 58: Interacción de *NtMC1* con las variantes de la subunidad p10 en un sistema *in vivo*. Westerns blots de extractos totales de proteínas obtenidos de hojas de *N. benthamiana* en las que se co-expresó transitoriamente a *NtMC1* y las diferentes versiones de la subunidad p10. A diferencia de lo que ocurre en los ensayos *in vitro*, se observó procesamiento de p10-Lk por la forma silvestre. La corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

A nivel de western se aprecia procesamiento en el fragmento L-p10 al coexpresarlo con *NtMC1*, producto del corte se genera un fragmento de talla similar a SLP-p10 (29 kDa) lo que sugiere que el corte se está dando en la lisina 224 (Figura 58). Resulta curioso que los resultados obtenidos *in vitro* no coincidan con los observados *in vivo*. Esto implica comportamientos diferentes para *NtMC1* dependiendo del sistema de expresión y por tanto las conclusiones podrían no ser extrapolables de un sistema a otro.

VI. 6. Patrón de expresión de *NtMC1* endógena.

Los genes que codifican para proteasas se encuentran bajo un estricto control de su expresión, que va desde el nivel transcripcional hasta el post-traducciona. Por tal razón, sería lógico esperar que también *NtMC1* estuviera altamente regulada, sin embargo, al sobre-expresarla tanto en bacteria como en plantas el zimógeno se autoprocasa. Este resultado sugiere que el control no es a nivel transcripcional o podría ser un arteficio debido a los elevados niveles de expresión a los que es forzada la proteína. Para intentar determinar el nivel o niveles de regulación se analizó la expresión de las metacaspasas endógenas en diferentes especies vegetales y en diferentes órganos de la planta, empleando para ello el anticuerpo generado a partir de *NtMC1*.

El éxito de este experimento dependía de la capacidad del anticuerpo para detectar a la *NtMC1* endógena o metacaspasas con secuencias similares a esta. Para ello se empleó material de *Nicotiana tabacum* L. (plántulas, meristemo y hojas adultas), *Nicotiana benthamiana* (meristemas, hojas adultas y control de *NtMC1*) así como *Arabidopsis thaliana*. En la Figura 59 se puede observar el patrón de expresión en todas las muestras analizadas. La *NtMC1* endógena se observa autoprocasada lo que conduce a dos posibles conclusiones: 1.- La metacaspasa *NtMC1* se expresa constitutivamente y se autoprocasa generando complejos inactivos, los cuales requieren de un factor adicional para su activación ó 2.- Se expresa constitutivamente y se autoprocasa generando

complejos activos. En el primer caso la regulación estaría a nivel post-traducciona l mientras que en el segundo se estaría comportando como una proteína necesaria para el mantenimiento celular.

También se observaron bandas correspondientes a metacaspasas en *N. benthamiana* e incluso en una especie más distante como lo es *Arabidopsis thaliana*. Por ello se decidió investigar sobre el patrón de expresión en diferentes órganos de *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana*.

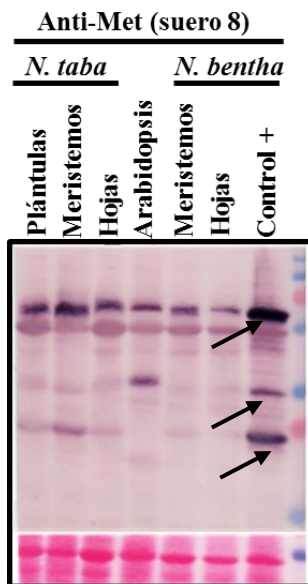


Figura 59: Patrón de expresión de metacaspasas endógenos en *N. benthamiana* y *N. tabacum* parecidas a *NtMC1*. Western blot a partir de extractos totales de proteína obtenidas de *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, así como diferentes órganos. Se reveló con anti-*NtMC1* y la separación se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

En el caso de *Nicotiana benthamiana* se investigó el patrón de expresión en raíz, tallo, hojas, flor e inflorescencia. A partir del Western (Figura 60) no es posible precisar en qué órgano se expresa más pues no se partieron de las mismas cantidades de proteínas totales tal como lo muestra la tinción con rojo de ponceau. Sin embargo, el patrón de expresión y autoproc esamiento es claro en todos los órganos analizados.

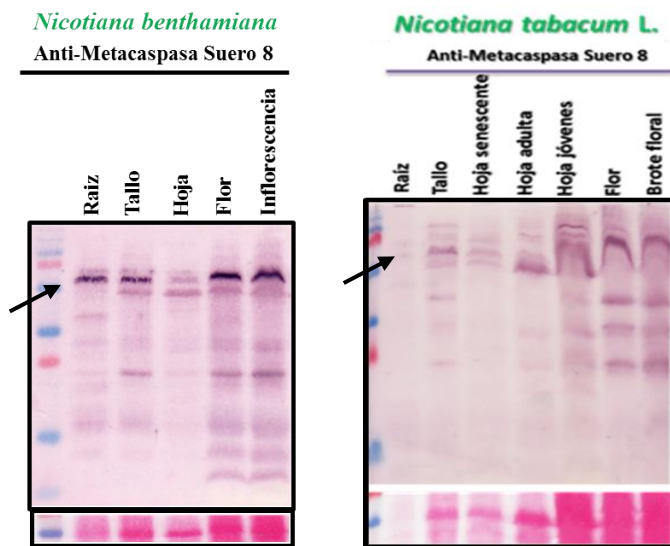


Figura 60: Patrón de expresión de metacaspasas endógenas en diferentes órganos de *N. benthamiana* y *N. tabacum*. Western blot a partir de extractos totales de proteína obtenidas de diferentes órganos de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*. En ambos casos se reveló con anti-NtMC1 y la corrida se efectuó en SDS-PAGE 12 %.

En *Nicotiana tabacum* L. el resultado es completamente reproducible (Figura 20) y reafirma las conclusiones enumeradas anteriormente. En este caso, la proteína se acumula en flores, brotes florales y hojas jóvenes y menos en raíz y hojas senescentes, aunque podría deberse a las cantidades de proteína totales de las que se partió en cada caso.

VII. DISCUSIÓN

VII. 1. Identificación de un gen de metacaspasa tipo II en *Nicotiana tabacum* L. y sus relaciones filogenéticas.

Desde el descubrimiento de las metacaspasas en plantas, protozoos y hongos (Uren *et al.*, 2000), numerosos han sido los esfuerzos por entender su papel en la muerte celular y el mecanismo que regula el autoprosesamiento y la actividad del zimógeno. Sin embargo, en plantas han sido pocos los trabajos en los que se han relacionado directamente a las metacaspasas con la muerte celular programada (Suarez *et al.*, 2004; He *et al.*, 2008; Coll *et al.*, 2010; Watanabe y Lam, 2011a). Contrario al elevado volumen de información del que se dispone respecto a las propiedades bioquímicas de estas enzimas (Vercammen *et al.*, 2004 y 2006; Watanabe y Lam, 2005 y 2011b; Bozhkov *et al.*, 2005; Belenghi *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Helmersson *et al.*, 2008). Además, dentro de la familia Solanacea y en particular para el género *Nicotiana*, solo existe un reporte parcial para una metacaspasa tipo II de *Nicotiana benthamiana* (Hao *et al.*, 2006). En el presente trabajo se reporta por primera vez la secuencia completa y la caracterización parcial de un gen de metacaspasa tipo II en *Nicotiana tabacum* L.

El polipéptido de 416 aminoácidos deducido del fragmento de 1250pb de ADNc de *Nicotiana tabacum* L. pose un tamaño y peso molecular similar al de otras metacaspasas tipo II reportadas en la literatura, 410 aminoácidos para AtMC4 de *Arabidopsis thaliana* (Watanabe y Lam, 2011a) y 418 para mc-PaII de *Picea abies* (Bozhkov *et al.*, 2005), así como una identidad de secuencia del 97% con una metacaspasa tipo II de *N. benthamiana* (Hao *et al.*, 2006). Los dominios de mayor similitud identificados a partir de los alineamientos efectuados, coinciden con regiones conservadas descritas para peptidasas de la familia C14 (Vierstra, 2003).

En adición a la homología estructural de los dominios, la designación de metacaspasas también se basa en la presencia de una díada conservada Histidina/Cisteína en el dominio p20 y del residuo de ácido aspártico conservado en el dominio p10, estos tres residuos de aminoácidos conforman la tríada catalítica característica de las proteasas tipo cisteíno. En la secuencia analizada se identificaron los segmentos HYSGH₈₆G y DSC₁₃₉HSG, los cuales contienen a los residuos catalíticos Histidina-86 y Cisteína-139 y a los aminoácidos de sus entornos en el dominio p20, y el segmento CQTD₃₄₈QTSA con el residuo catalítico ácido aspártico-348 del dominio p10 (Vercammen *et al.*, 2004).

Sin embargo, basado en un alineamiento con caspasas se han postulado tres residuos de aspárticos involucrados en la coordinación del sustrato básico de la posición P1 en lugar de un solo residuo (Vercammen *et al.*, 2004), estos corresponden con Asp25, Asp137 y Asp348 en NtMC1 (Figura 10). Sin embargo, en nuestro modelo 3D el Asp348 queda localizado demasiado lejos del sitio catalítico, así como de los otros dos aspárticos (Figura 13 y 14). Por esta razón se propuso que el residuo Asp353 junto con el Asp25 y Asp137 forman parte del bolsillo catalítico S1.

Una vez conocida la estructura primaria más probable de la proteína, se pueden predecir relaciones funcionales y evolutivas a través de comparaciones entre las regiones similares de las secuencias de aminoácidos presentes en bases de datos como NCBI, con la secuencia problema y el cálculo de la significación estadística de estas coincidencias. Para una correcta interpretación del dendrograma obtenido, es preciso tener en cuenta que el valor ubicado en el interior de la rama, es el valor del porcentaje con el que es aceptada la topología, donde valores del 95% o superiores se consideran como correctos (Tamura *et al.*, 2007).

De manera general se pudieron diferenciar las caspasas de las metacaspasas, agrupándose en los grupos I y II las de plantas y en el III las de animales. Entre las metacaspasas comparadas, el grupo II incluyó a las nueve secuencias reportadas para *Arabidopsis thaliana*; mientras que en el grupo I, se asociaron el resto de las metacaspasas analizadas. Vale destacar los altos porcentajes (mayores de 96%) obtenidos para agrupar las caspasas humanas, las metacaspasas de *Arabidopsis* y la *NtMC1* con la de *N. benthamiana*. Esto último reafirma la inclusión de *NtMC1* dentro de las metacaspasas tipo II en el género *Nicotiana*.

Los resultados obtenidos del agrupamiento en el grupo II, concuerdan con lo informado por Vercammen y colaboradores (2004), separándose las metacaspasas de tipo I (A1, 2, 3) de las de tipo II (A4 – 9). Similares resultados podrían esperarse en el grupo I, sin embargo, la metacaspasa más cercana a las del género *Nicotiana* fue una de tipo I, perteneciente a *Solanum lycopersicum*. Se ha propuesto un origen para las metacaspasas tipo I a partir de una transferencia horizontal de genes (THG) entre los endosimbiontes mitocondriales (α -protobacterias) y los eucariontes primitivos (Avarind y Koonin, 2002). Esta hipótesis está basada en el hecho de que estas aparecen en Protozoos, Hongos, Cromistas y Plantas; mientras que las de tipo II solo aparecen en plantas. Por lo tanto, las metacaspasas de tipo II pudieron haberse derivado de un segundo evento de THG, durante el establecimiento de los plástidos a partir de las cianobacterias endosimbióticas (Vercammen *et al.*, 2007). Por lo tanto, la distribución filogenética observada que agrupa con un 75% tanto al género *Nicotiana* como *Solanum*, ambos de la familia Solanacea, permite plantear la hipótesis de que las metacaspasas han sufrido un proceso de convergencia dentro de las familias, independientemente de su tipo, al menos para la familia Solanacea. Como presión selectiva podría estar actuando, además, un proceso de especificación dentro de la familia, que conlleve a la determinación de funciones diferentes de estas metacaspasas.

Otro elemento interesante que encontramos al analizar la estructura génica de *NtMC1* fue la falta de intrones en su secuencia (Figura 16). En eucariontes la mayoría de los genes poseen la información fragmentada en secuencias denominadas exones, los cuales están separados por secuencias no codificantes, los intrones (Krebs *et al.*, 2011). La presencia de intrones confiere diferentes ventajas: 1.- constituyen una fuente alternativa de información (“splicing” alternativo), 2.- pueden portar elementos regulatorios adicionales, 3.- son fuente de ARN no codificante, 4.- constituyen el sustrato para la mezcla de exones y por tanto de generación de nueva información, entre otras (Fedorova y Fedorov, 2003). En tanto los genes continuos responden a otro tipo de presión selectiva y están relacionados con proteínas que se requieren en elevadas cantidades en un corto período de tiempo, como las histonas (Krebs *et al.*, 2011). La ausencia de intrones permite que el ARN se traduzca inmediatamente y no tenga que sufrir procesamiento post-transcripcional.

Para el caso de *NtMC1* no esperábamos que fuese un gen continuo, dada su posible relación en eventos de muerte celular programada. Sin embargo, al analizar la estructura de los genes de metacaspasa en *Arabidopsis* observamos que los de tipo II poseen un corto intrón (*AtMC4* – *AtMC8*) excepto la *AtMC9* que no lo posee (Figura 61), mientras los genes que codifican para las de tipo I poseen cuatro intrones relativamente pequeños.

En la literatura no existe información relativa a la estructura génica de otras metacaspasas ni de cómo podría esto influir en la regulación de las mismas, pero la reducción del número de intrones e incluso la ausencia de los mismos en algunos casos, sugiere un escenario para las metacaspasas más activo en funciones de metabolismo o mantenimiento celular de lo que se esperaba.

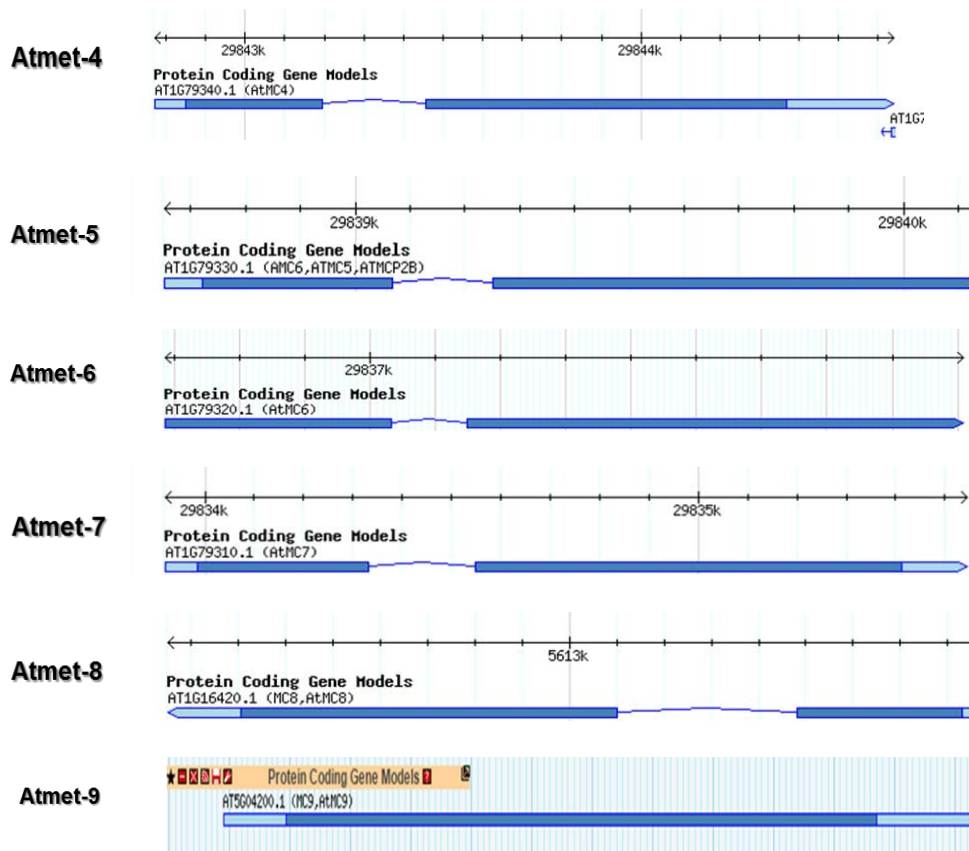


Figura 61: Esquema donde se representa la estructura génica de los seis genes de metacaspasas tipo II de *Arabidopsis thaliana*. Las mismas fueron obtenidas en la base de datos <https://www.arabidopsis.org/>

VII. 2. Caracterización bioquímica de *NtMC1*.

Los modelos 3D y los alineamientos múltiples de secuencias (AMS), así como el análisis de mutantes, nos permiten identificar los aminoácidos implicados en el sitio activo y el procesamiento del zimógeno. Además, el AMS muestra los residuos que se han conservado entre diferentes metacaspasas pertenecientes a una misma familia, así como las diferencias entre las de tipo I y II. Sin duda alguna estas posiciones o regiones están bajo una fuerte presión selectiva, lo que significa que se corresponden con regiones involucradas en el correcto funcionamiento de la enzima.

Cuando se sobre-expresa a *NtMC1* en *E. coli* o transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* el zimógeno aparece autoprosesado (Figuras 18, 19 y 22), lo cual indica que no se requiere de un factor adicional y que tiene que ser un proceso autocatalítico. El sitio activo de las metacaspasas y proteasas relacionadas está constituido por una cisteína y una histidina, ambos están conservados en *NtMC1* (Figuras 10, 13 y 14). Cuando cualquiera de estos dos residuos es sustituido, la enzima se vuelve inactiva lo cual es evidente por la pérdida de actividad y capacidad de autoprosesamiento en *E. coli* y pérdida de autoprosesamiento en *N. benthamiana* (Figuras 18, 19 y 22). De acuerdo a nuestros análisis de fragmentos en expresiones transitorias el corte se da en la lisina 224. Como se mostró en ensayos *in vitro* e *in vivo* para *AtMC4* (Watanabe y Lam, 2011b) y experimentos *in vitro* para *AtMC9* (Vercammen *et al.*, 2004) el primer corte también se da en una lisina o arginina equivalente en esta posición. El alineamiento múltiple de la región de *NtMC1* que contiene los posibles sitios de corte R187 y K224 con las secuencias de *AtMC4*, *AtMC9* y mcII-Pa (Figuras 10 y 20) muestra que en todas las metacaspasas de plantas analizadas en esta posición se localiza una arginina o una lisina. Cuando la K224 es sustituida por una alanina, se pierde la capacidad de autoprosesamiento (Figura 21), lo cual confirma que esta lisina constituye el sitio primario de procesamiento en *NtMC1*, similar a lo que ocurre con *AtMC4* y *AtMC9* de *Arabidopsis thaliana*.

Por el contrario, mutaciones en R187 y K270 no abatieron el procesamiento. Estos resultados son similares a los encontrados con la R188 y K269 de mcII-Pa de *P. abies*, en la cual se observó en ensayos *in vitro* que estos residuos constituyen sitios de procesamiento (Bozhkov *et al.*, 2005). Contrario a K224, estos aminoácidos están menos conservados en las metacaspasas, lo que sugiere que podrían funcionar como sitios secundarios o alternos en determinadas metacaspasas, tal como se ha propuesto para *AtMC4* en la que después del corte en K225 se producen cortes subsecuentes (Watanabe y Lam, 2011b). No obstante, no contamos con evidencia de que estos cortes ocurran *in vivo*. Es más, los cortes observados en *AtMC4* podría deberse a un artificio asociado a las

condiciones *in vitro* en las que se llevó a cabo el ensayo o podría ser que *in vivo* se requiere de una señal específica que conlleve al subsecuente procesamiento de la metacaspasas en fragmentos más pequeños. Debido a que nuestros ensayos se llevaron a cabo también en hojas de *N. benthamiana* consideramos que son condiciones que simulan mejor la realidad del entorno en que se procesan la metacaspasas.

Como se mencionó anteriormente, a partir del análisis del modelo 3D se propone a los aspárticos Asp25, Asp137 y Asp353 de *NtMC1* forman parte del sitio S1 y coordinan el sustrato básico. A partir del alineamiento mostrado en la Figura 10 se puede observar que el Asp348 y Asp353 se corresponden con los Asp260 y Asp266, los cuales forman parte del lazo-280 de la metacaspasa MCA2 de *T. brucei* (McLuskey *et al.*, 2012). Este lazo constituye una región desordenada dentro de la subunidad p10 de MAC2 y podría estar implicado en la unión al sustrato. También se sabe que el Ca^{2+} induce un cambio conformacional en este lazo lo que permite estabilizar el sustrato en el sitio activo (McLuskey *et al.*, 2012). Por otro lado, la metacaspasa Yca1 de levadura posee un lazo equivalente, el L3 y que funciona como la base del surco donde se une el sustrato en el sitio S1 (Wong *et al.*, 2012).

Curiosamente, la secuencia consenso SGCXDXQTSADV (los residuos subrayados corresponden con los Asp348 y Asp353 de *NtMC1*) se localiza en el extremo N-terminal de las metacaspasa tipo III (Choi y Berges, 2013). Esta secuencia no solo está bien conservada en las metacaspasas tipo I y II (consenso para las de tipo I: SGCDDDQTSADT y para tipo II: SGCQTDQTSADA), sino también en hongos, bacterias y *T. brucei*. Esta secuencia consenso forma parte del lazo-280 de MCA2 y del L3 de Yca1, lo que sugiere que esta región es importante para la actividad de las metacaspasas.

Se debe notar que el Asp353 está más conservado que el Asp348 en las metacaspasas de plantas. El Asp353 está representado en todas las posiciones equivalentes de todas las

metacaspasas de tipo II analizadas (Figura 10) y en casi todas las de tipo I, con *AtMC3* como la única excepción. Por el contrario, numerosas metacaspasas de tipo I y II han perdido durante la evolución el aspártico en la posición 348.

Al evaluar la posible relación del Asp348 en la formación del bolsillo S1 a través del análisis de la actividad y capacidad de autoprosesamiento de los mutantes NtMC1-D353A y NtMC1-D353R, tanto en *E. coli* como en expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, encontramos que ambos mutantes se comportaron similar al silvestre en cuanto al autoprosesamiento (Figuras 48, 49, 51 y 53). En tanto NtMC1-D353R mostró un aumento significativo en la actividad (Figuras 48, 49, 51). Por otro lado, la substitución del Asp348 por Ala no tuvo efecto sobre el procesamiento ni actividad (Figura 53), pero el cambio por una arginina implicó una alteración del sitio de procesamiento y un decremento significativo en la actividad (Figuras 48 y 51). Con estos datos y la ausencia de la estructura cristalográfica de *NtMC1* no es posible llegar a una conclusión clara, pero podemos especular en base a la secuencia y las estructuras informadas para MCA1 de *T. brucei* y Yca1 de levadura. Así, la substitución de un aspártico por una arginina en una región equivalente de lazada en *NtMC1* conduciría a cambios conformacionales alostéricos lo que implicaría cambios directos en la actividad de la metacaspasa. Sin embargo, más difícil de explicar es el por qué este tipo de cambio también altera el sitio de autoprosesamiento. No obstante, un análisis detallado de la secuencia que flanquea la K224 muestra la presencia de numerosos aminoácidos básicos cuyo corte generarían fragmentos de menor tamaño como los observados a nivel de proteína (Figura 62).

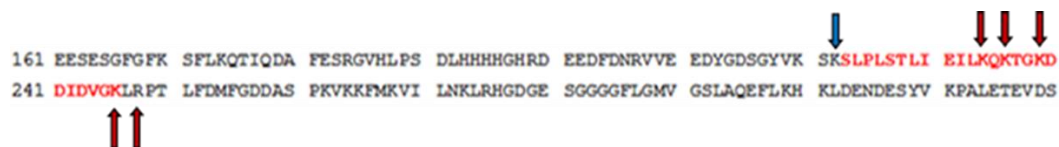


Figura 62: Fragmento de la secuencia de la región unidora de *NtMC1*. Con la flecha azul se señala la lisina 224 que constituye el sitio primario de procesamiento, con flechas rojas están marcados los posibles sitios alternativos que se cortan cuando se cambia el aspártico 348 por una arginina generándose fragmentos más pequeños.

En tal sentido, la alteración conformacional podría provocar un desplazamiento de la secuencia y por tanto que se reconociera una lisina alternativa. Finalmente, el hecho de que los dobles mutantes de aspárticos NtMC1-D348AD353A y NtMC1-D348RD353R sean inactivos (Figuras. 3 y 4) indica que cualquiera de estos aminoácidos puede ser usado en el S1 para coordinar el sustrato.

Como se mencionó anteriormente, el Ca^{2+} induce cambios conformacionales en el lazo-280 que contiene los aspárticos equivalentes al Asp348 y Asp353. Esta podría ser la razón del por qué aún cuando el Asp348 aparece alejado en el modelo 3D, en presencia de Ca^{2+} el lazo podría desplazarse acercándolo al sitio activo. Sin embargo, la respuesta definitiva vendrá con la resolución de la estructura cristalográfica de NtMC1. Vale la pena mencionar que los residuos involucrados en la coordinación del Ca^{2+} en la MCA2 de *T. brucei* están conservados en NtMC1 (Asp103, Asp116, Asp117 y Asp146) (Figura 10).

Watanabe y Lam (2011(b)) demostraron en un ensayo *in vitro* que AtMC4 sufre un autoprosesamiento predominantemente intramolecular. En el ensayo que llevamos a cabo para determinar la forma de procesamiento de NtMC1 en un sistema de expresión transitoria encontramos resultados similares. En este sentido la forma silvestre NtMC1 no fue capaz de procesar una versión mutante con la que se co-expresó (Figuras 31 y 32). Este resultado indica que la lisina 224 solo está accesible al sitio activo del complejo del cual forma parte, lo cual sugiere que la región unidora o parte de ella están localizada dentro del sitio S1 (Figura 63). Esto podría constituir un mecanismo de control de la actividad, pues el lazo estaría bloqueando el sitio activo y solo cuando se produce el corte en K224 se desplazaría permitiendo la entrada del sustrato.

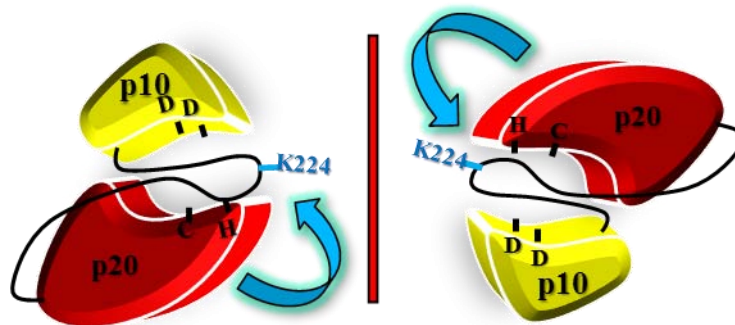


Figura 63: Representación esquemática de dos zimógenos de *NtMC1*. Se muestra a la región unidora plegada dentro del sitio activo formado por p20 y p10, lo que impide que la K224 sea accesible a otra molécula y por tanto los cortes en este sitio son siempre intramoleculares.

También se analizó la posible interacción entre dos complejos activos al co-exresar una mutante en la subunidad p20 (*NtMC1*-C139V) con un mutante en el p10 (*NtMC1*-D348RD353R), ambas inactivas. En los resultados obtenidos no se logró detectar el fragmento de 29 kDa que se genera durante el autoprosesamiento, lo que sugiere que no se producen eventos de complementación entre los diferentes complejos (Figura 33). Este resultado es congruente con la falta de interacción entre dos complejos observada en el ensayo de inmunoprecipitación (Figura 36), lo que sugiere que *NtMC1* funciona como un heterodímero p20p10.

En experimentos con *AtMC4* en los que se mezclaron los fragmentos p20 y p10 obtenidos de manera recombinante no se logró reconstituir un complejo activo (Watanabe y Lam, 2011b). En nuestros ensayos *in vitro* con estos fragmentos encontramos que carecían de actividad y tampoco fuimos capaces de reconstituir un complejo activo a partir de una mezcla de p20 y p10 obtenidos de manera recombinante (Figura 43). También se intentó sin resultado positivo, demostrar la interacción de p20 y p10 mediante un sistema de dos híbridos en levaduras. A partir de estos datos podemos proponer que: los fragmentos p20 y p10 se pliegan incorrectamente cuando se expresan en *E. coli* lo cual impide que interactúen, o es necesaria la región unidora actuando como una bisagra entre p20 y p10 para la formación de un complejo funcional o simplemente es

necesaria la síntesis del zimógeno completo para que se plieguen correctamente p20 y p10. Ya vimos anteriormente que esta región también podría ser importante para regular la entrada de los sustratos al sitio activo.

VII. 3. Asignación de posibles funciones y mecanismo de acción de *NtMC1*.

El papel más importante que se le ha asignado a las metacaspasas en plantas está asociado a la MCP por cuatro razones fundamentales: 1) Poseen un origen común con las caspasas, 2) la ausencia de homólogos cercanos a caspasas en plantas, 3) la proliferación de genes codificadores para metacaspasas en el genoma de las plantas es una imagen semejante a la proliferación de las caspasas en los genomas de animales y 4) la fusión de las metacaspasas de plantas tipo I con un dominio de dedos de Zn^{2+} también presente en LSD1, el cual constituye un regulador de la Respuesta Hipersensible en plantas. Por todo ello, es de esperar que las metacaspasas de plantas posean una función similar a las caspasas (Aravind y Koonin, 2002).

En *Arabidopsis thaliana* de las 6 metacaspasas tipo II que posee, la AtMC8 está involucrada en respuesta ante estrés oxidativo y radiación ultravioleta (He *et al.*, 2008) mientras que AtMC4 participa en respuestas al estrés inducido por la toxina fúngica fumonisina B1 así como al estrés oxidativo (Watanabe y Lam, 2011b). En el caso de las de tipo I, se conoce del efecto antagónico entre AtMC1 y AtMC2, esta última posee una función anti-muerte celular independiente de su sitio activo (Coll *et al.*, 2010). También la mcII-Pa de *Picea abies* se ha reportado asociada a los eventos de muerte celular programada que ocurre en el suspensor durante la embriogénesis (Suárez *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha informado de la participación de metacaspasas en otros eventos celulares como regulación del ciclo celular y reciclaje de proteínas mal plegadas o dañadas durante situaciones de estrés en *Saccharomyces cerevisiae* (Madeo *et al.*, 2009; Chahomchuen *et*

al., 2009; de Castro *et al.*, 2011), *Trypanosoma brucei* (Helms *et al.*, 2006) y *Leishmania major* (Ambit *et al.*, 2008). Estas “nuevas” funciones en las que están involucradas las metacaspasas en organismos unicelulares podrían dar una idea de cómo han evolucionado los genes de MCP. Probablemente éstos se originaron asociados al control de la síntesis de proteína y del ciclo celular en organismos procarióticos, actividad que fue heredada a las células eucarióticas ancestrales para posteriormente adquirir una función directa en la muerte celular programada asociada a la diferenciación con el surgimiento de los organismos pluricelulares (Liu, 2014).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular por el cual actúan las metacaspasas. Lo que sí sabemos es que parece ser totalmente diferente al de las caspasas pues reconocen sustratos básicos en lugar de ácidos (Bonneau *et al.*, 2008), se autoprocenan de manera intramolecular y no intermolecular (Watanabe y Lam, 2011b; Acosta *et al.*, 2014) y forman complejos activos monoméricos al menos las de tipo I (p20p10), mientras las caspasas son activas en forma dimérica (p20)₂(p10)₂ (Crawford y Wells, 2011).

La activación Ca²⁺- dependiente observada en algunas metacaspasas tipo II en ensayos *in vitro* constituye otra característica distintiva. *NtMC1* es capaz de autoprocenarse en ausencia de elevadas concentraciones de calcio al sobre-expresarla en *E. coli* o en hojas de *N. benthamiana*. Sin embargo, *in vitro* la actividad enzimática es estrictamente dependiente del catión en concentraciones mayores a 1 mM (Figura 42; Watanabe y Lam, 2011a), el cual también promueve el total procesamiento del zimógeno (Figura 41). Un comportamiento similar se ha descrito para la *AtMC4*, *AtMC5* y *AtMC8* de *A. thaliana* (Zhang y Lam, 2015) y *mcII-Pa* de *P. abies* (Bozhkov *et al.*, 2005). No obstante, poco se conoce de la importancia del Ca²⁺ para la regulación de las metacaspasas *in vivo* donde las concentraciones están en el orden de μM (Bush, 1995). En tal sentido se han planteado dos hipótesis para tratar de explicar esta aparente contradicción: 1- Factores celulares adicionales podrían sensibilizar las metacaspasas al Ca²⁺, requiriendo

concentraciones mucho menores del cofactor y 2- las elevadas concentraciones de Ca^{2+} *in vitro* podrían estar mimetizando o inhibiendo ciertas interacciones proteína – proteína que normalmente ocurren *in vivo* durante la activación de las metacaspasas (Zhang y Lam, 2015).

NtMC1 no solo mostró dependencia del calcio para procesar eficientemente el sustrato sintético Boc-Gly-Arg-Arg-AMC sino también para procesar *in vitro* el fragmento p20-Lk y liberar la subunidad p20 (Figuras 44 y 46). Este corte parece estar mediado por un sitio activo alternativo generado por la interacción de p20-Lk con la subunidad p10 del complejo silvestre, debido a que un mutante en la C139 de p20-Lk es incapaz de procesarse (Figura 45). La formación de este sitio podría explicar el aumento observado en la actividad de *NtMC1* cuando se mezcla con p20 (Figura 44). Esta interacción resulta interesante, pero podría no ser más que un artificio por las condiciones *in vitro* en las que se llevó a cabo el experimento, pues en los ensayos de co-expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* no se observó procesamiento de p20-Lk por *NtMC1* (Figura 57) y tampoco fuimos capaces de detectar interacciones entre diferentes complejos en el ensayo de inmunoprecipitación (Figura 36). Otra posible explicación a estas contradicciones sería que la interacción se dé solo bajo determinadas condiciones de estrés que son mimetizadas por las altas concentraciones de calcio *in vitro* y que no fueron probadas en nuestros ensayos *in vivo*.

En el caso de los fragmentos p10 se observó un comportamiento diferente, pues en los ensayos *in vitro* ninguno de los tres fragmentos (p10, SLP-p10 y L-p10) constituyó sustrato para *NtMC1* ni tampoco tuvieron un efecto significativo en la actividad de la misma (Figura 47). Sin embargo, si resultó interesante la potente actividad lítica de SLP-p10 sobre *E. coli* (Figura 26). No existe en la literatura informes relacionados con una actividad similar de alguna metacaspasa o sus productos. La idea de que p20 pueda funcionar como una subunidad potenciadora de la actividad mientras SLP-p10 podría constituir un efector directo actuando en la eliminación de patógenos

resulta más que atractiva, sin embargo habría que demostrarlo *in vivo*. Justamente en un ensayo de expresión transitoria encontramos otro dato contradictorio, el L-p10 es claramente procesado por *NtMC1* (Figura 57).

El L-p10 es un fragmento que contiene la K224 y por tanto no se genera de manera natural por el procesamiento del zimógeno a diferencia del p20-Lk. Si bien, no contamos con los elementos para dar una explicación satisfactoria a estas diferencias, podemos especular que en condiciones de crecimiento normal y en un ambiente celular adecuado (posiblemente un factor estabilizador) el complejo autoprosesado de *NtMC1* sería capaz de reconocer y procesar sustratos que poseen una secuencia similar a YVKSKSLPL (la letra subrayada se corresponde la lisina 224). No sólo sería necesaria la presencia de la secuencia o una similar sino también que esté accesible y espacialmente quepa en el bolsillo S1 de la enzima, por estas razones podríamos pensar que el número de moléculas que cumplirían estas condiciones serían reducidas, sino es que también constituye un artificio el procesamiento del fragmento que naturalmente no existe. Por otro lado, esto podría constituir un mecanismo de control para evitar el procesamiento de moléculas durante el desarrollo normal de la célula. Sin embargo, bajo determinadas condiciones de estrés podrían inducirse cambios conformacionales o darse nuevas interacciones proteína – proteína, lo que permitiría el reconocimiento y procesamiento de una amplia gama de sustratos.

Tomando en cuenta esta hipótesis podríamos asumir que la falta de procesamiento en el ensayo *in vitro* de L-p10 en ausencia de calcio se debe a que no está el factor estabilizador del sustrato, presente en una célula vegetal pero no en una de *E. coli*. En tanto cuando se adiciona el calcio se estaría mimetizando una condición de estrés en la que el complejo estaría en su forma activada y por tanto reconociendo nuevas secuencias de corte. Es importante destacar el hecho de que no existen otros reportes donde se analice la relación de las metacaspasas con sus formas procesadas, por lo que la interpretación de estos resultados podría cambiar en un futuro.

El patrón de expresión de la *NtMC1* endógena coincide con el de *AtMC4* (Watanabe y Lam, 2011a) y sugiere un mecanismo de regulación básicamente a nivel pos-traducciona. Por ello además de la regulación del procesamiento y actividad mediada por calcio se predijeron los posibles sitios de fosforilación y glicosilación ya que modificaciones a este nivel influyen directamente en la actividad biológica de las proteínas. En tal sentido, la T (treonina)-387 constituye el sitio con mayor probabilidad de ser fosforilado por la Proteína Kinasa C (PKC). Esta forma parte de una familia de kinasas serin-treonina dependientes de fosfolípidos, con alrededor de 10 isoformas. Sus funciones precisas no se conocen hasta el momento, pero se acepta que las PKC constituyen elementos centrales en las vías de transducción de señales involucradas en las respuestas inmunes adaptativas de mamíferos (Mellor y Parker, 1998). Sin embargo, las funciones de PKC en respuestas de defensa no están restringidas solamente a animales, ya que se ha demostrado su implicación en la resistencia de plantas ante determinados patógenos. Por ejemplo, estudios realizados en plantas de tomate infectadas con hongos inician una serie de mecanismos de defensa, incluidos cambios estructurales en la pared celular, síntesis de enzimas hidrolíticas y compuestos antifúngicos. La activación de estos mecanismos está mediada por una activación secuencial de dos cinasas de serina-treonina, la primera, una cinasa similar a PKC y la segunda, una cinasa similar a las dependientes de calmodulina (Xing *et al.*, 1996).

Adicionalmente, se encontraron otros sitios con menor puntuación que pueden ser fosforilados por las quinasas Proteína cinasa A (PKA) y Caseína cinasa 2 (CK2) y el receptor del factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). La PKA es una proteína dependiente de AMP cíclico, cuyas funciones en plantas se han asociado a respuestas de defensa frente al ataque de patógenos (Yoshitaka *et al.*, 2001). Por otro lado, la CK2 es una proteína ubicua que pertenece a una subfamilia de cinasas de serina-treonina independientes de calcio, conservada en todos los eucariontes (Litchfield, 2003, Meggio y Pinna, 2003). Son esenciales para la viabilidad celular,

estando involucradas en procesos tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Murtas y Millar, 2000; Ahmed *et al.*, 2002, Guo *et al.*, 2001, Litchfield, 2003; Riera *et al.*, 2003). Por otro lado, no se encontraron sitios propensos a ser glicosilados por lo que descartamos este tipo de modificación en la molécula.

Otro elemento importante para entender el mecanismo de las metacaspasas es su localización celular. Se ha planteado una localización mitocondrial y cloroplástica para las de tipo I (Sanmartín *et al.*, 2005), mientras que las de tipo II son predominantemente citosólicas (van der Hoorn y Jones, 2004; Sanmartín *et al.*, 2005). De acuerdo a los resultados del programa SignalP 3.0 que se muestran en la Figura 28, la proteína *NtMC1* no posee péptido señal (valor pequeño de puntuación Y). Por otro lado, tampoco se predijeron señales de anclaje a membrana. Estos resultados fueron confirmados con los obtenidos por los programas TargetP versión 1.1, SOUSI y TMPred; donde además TargetP predice que *NtMC1* no posee señales de tránsito a cloroplasto o mitocondria, mientras SOUSI y TMPred indican que no posee regiones transmembrana. Los ensayos de expresión transitoria de *NtMC1* fusionada a GFP en hojas de *N. benthamiana* y observadas al confocal son congruentes con las predicciones *in silico*. *NtMC1* se localizó en el citoplasma celular (Figura 29) pero muy próxima a la membrana plasmática, estos datos también coinciden con los informados para *AtMC4* (Watanabe y Lam, 2011a).

A partir de los datos obtenidos no podemos precisar cuan próximo a la membrana se localiza la proteína o incluso si existe algún tipo de interacción. Las predicciones muestran ausencia de regiones transmembranas o regiones hidrofóbicas que pudieran interactuar directamente con la membrana plasmática, sin embargo, podría existir interacción con alguna proteína membranal o simplemente podría estar interactuando no covalentemente con la misma, lo cual podría explicar las dificultades para extraer la proteína empleando amortiguadores con detergentes suaves (Figuras 30 y 34).

Los resultados obtenidos no nos permiten asignarle categóricamente una función a *NtMC1*. Sin embargo, atendiendo al análisis filogenético y su estrecha cercanía a la metacaspasa *AtMC4* de *Arabidopsis thaliana*, a los diferentes parámetros físico-químicos, la localización celular, al patrón de expresión de la endógena y a las posibles modificaciones post-traduccionales por fosforilación, podría estar asociar a vías de respuesta a estrés. No obstante, se deben llevar a cabo más ensayos *in vivo* que permitan elucidar las funciones biológicas de la misma.

A partir de todos los datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, diseñamos un modelo (Figura 64) de cómo podría estar regulándose y funcionando *NtMC1*. Primeramente, se tiene que dar la síntesis completa del zimógeno, al parecer la región unidora es importante para el correcto plegamiento de p20 y p10 y/o para acercar las subunidades y que estas interactúen. En el zimógeno recién sintetizado el sitio activo está bloqueado pues es incapaz de procesar sustratos, lo más probable es que la región unidora está ocupando este sitio lo que permite que se dé un corte intramolecular en la lisina K224, generando una población de moléculas procesadas “inactivas”. Estos complejos generados durante condiciones normales de desarrollo celular podrían ser capaces de reconocer un reducido número de sustratos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés se elevarían las concentraciones de calcio intracelular o aparecerían ciertos factores sensibilizadores que promoverían la activación del complejo. Esto podría implicar cambios conformacionales en *NtMC1* estabilizándose los sustratos en el sitio S1, dentro de estos podría encontrarse la propia subunidad p20-Lk generada por el corte en la K224. Para *AtMC4* se ha informado un posible mecanismo de autodegradación por cortes secuenciales posteriores al de K225 (Watanabe y Lam, 2011b). Sin embargo, en nuestros ensayos *in vitro* con *NtMC1* no fuimos capaces de observar la inhibición de la actividad al pre-incubar con 5 mM de cloruro de calcio la enzima (Figura 54), aunque a mayores concentraciones en los westerns si desaparece la proteína (Figura 41) lo que podría sugerir un proceso de autodegradación. Los nuevos fragmentos p20 generados por el

procesamiento de p20-Lk podrían asociarse a las subunidades p10 lo que generaría complejos con dos sitios activos en lugar de uno y por tanto serían más eficientes en el procesamiento de los sustratos. En tanto el fragmento SLP-p10 generado también durante el autoprocesamiento en K224 y que no está formando un complejo podría estar involucrado en la defensa contra patógenos por sus propiedades líticas.

MODELO PROPUESTO PARA NtMC1

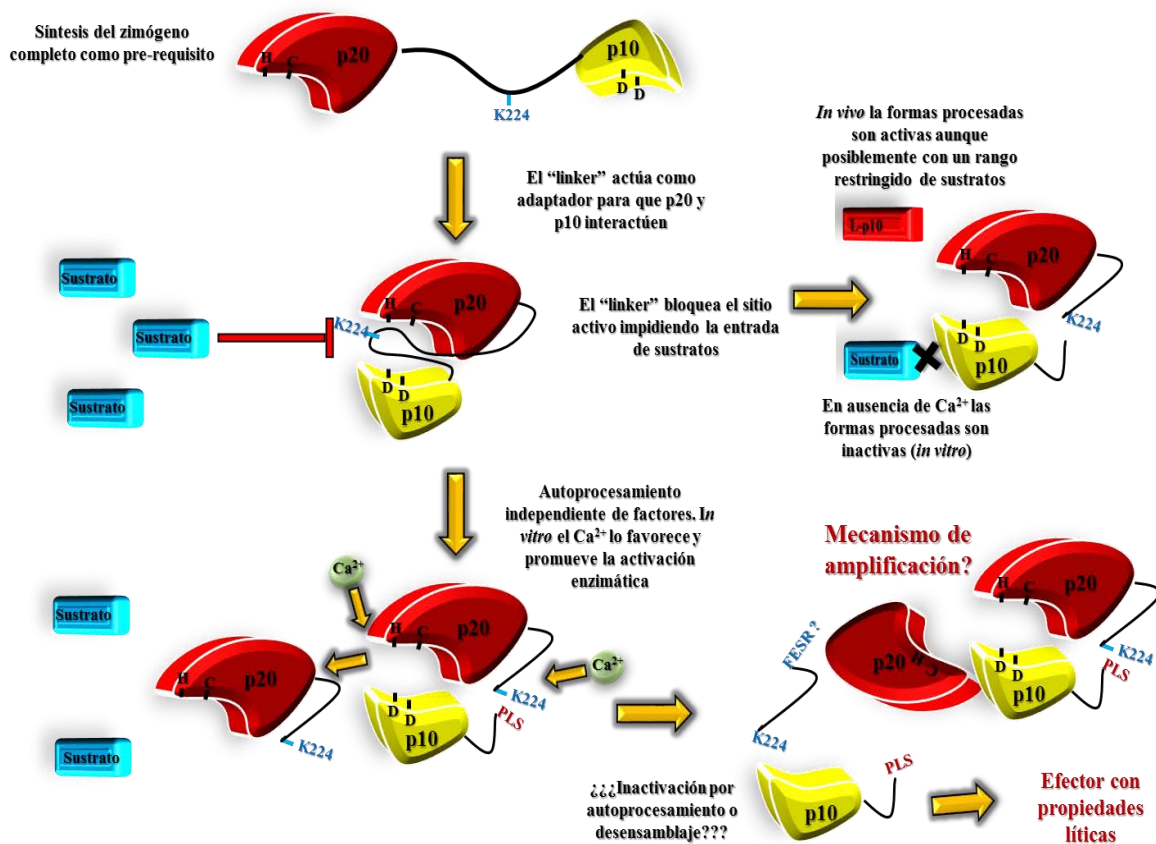


Figura 64: Modelo propuesto para NtMC1. Para obtener una molécula funcional se tiene que sintetizar completo el zimógeno, el cual se pliega de tal forma que la región unidora queda dentro del sitio activo formado por las subunidades p20 y p10. Esto bloquea la entrada de otros sustratos hasta que se da un corte en la K224. Este corte es estimulado por calcio *in vitro* pero no se conoce que lo promueve *in vivo*. El corte promueve un desplazamiento de la secuencia unidora permitiendo la entrada de otros sustratos, los cuales solo son procesados *in vitro* en presencia de calcio, posiblemente porque promueve cambios conformacionales que estabilizan el sustrato en el sitio activo. Uno de los posibles sustratos de NtMC1 parece ser p20-Lk, lo que genera la liberación de la subunidad p20 la cual parece interactuar con el p10 del complejo p20p10 y formándose un sitio activo alternativo que conduce al aumento en la actividad enzimática. Por otro lado el fragmento SLP-p10 generado por el corte en K224 posee un potente efecto lítico sobre *E. coli*, por lo que podría constituir una molécula efectora importante durante el ataque de diferentes patógenos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificó un nuevo gen de metacaspasa tipo II en *Nicotiana tabacum* L. sometida a estrés por herida, aunque el análisis del patrón de expresión sugiere que se expresa y autoprocasa constitutivamente en diferentes órganos de la planta. Además, constituye el primer reporte de su tipo para la especie y la primera secuencia completa disponible para el género.
- El mecanismo de activación es diferente al de las caspasa animales, pues el corte para activar el zimógeno es estrictamente intramolecular, aunque desconocemos los factores que inducen al mismo.
- El sitio activo de la metacaspasa está constituido por aminoácidos de la subunidad p20 y p10, existiendo redundancia de función en los ácidos aspárticos localizados en las posiciones 348 y 353. No obstante, al menos uno de éstos siempre debe estar presente para que el sitio sea funcional. Además, la sustitución de estos aspárticos por argininas, altera drásticamente la actividad de la proteasa.
- La región unidora o “linker” parece tener dos funciones: garantizar la interacción de las subunidades p20 y p10, y regular la actividad del complejo al bloquear el sitio activo y no permitir la entrada de sustratos.
- El complejo activo, bajo condiciones normales de crecimiento es un monómero, lo cual constituye otra diferencia con las caspasas. *In vitro*, elevadas concentraciones de calcio en el medio inducen interacciones entre el monómero activo y subunidades p20, generándose sitios activos alternativos, lo que conduce a un aumento de la actividad.

- Los sustratos de *NtMC1* son aminoácidos básicos (argininas y lisinas) en la posición P1, mientras que las caspasas cortan en aminoácidos ácidos. El primer sitio de corte y regulación lo constituye la lisina de la posición 224, ya que cualquier alteración de este aminoácido abate la actividad de la enzima.
- El fragmento SLP-p10, generado por el autoprocésamiento de *NtMC1* posee un marcado efecto lítico sobre *Escherichia coli*, aunque no se cuenta con todos los elementos para proponerlo como una subunidad efectora contra el ataque de patógenos.
- *NtMC1* parece estar implicada en procesos de homeostasis durante el crecimiento de las células vegetales en condiciones normales, debido a su expresión y autoprocésamiento constitutivo y ubicuo, así como a la ausencia de intrones en su estructura.
- Por todos los elementos antes señalados podemos concluir que la metacaspasa *NtMC1* no constituye un ortólogo de caspasa en *Nicotiana tabacum* L. Se requiere de nuevos experimentos para elucidar completamente el mecanismo bioquímico, así como la identificación de los sustratos naturales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A. M., Sepúlveda G. E., Sanchez B. L., Marrero G. J., Pons, T., Rocha S. M. y González, L. Two aspartate residues at the putative p10 subunit of a type II metacaspase from *Nicotiana tabacum* L. may contribute to the substrate-binding pocket. *Planta*. **239(1)**, 147 – 160. (2014).
- Adrain C. and Martin, S., J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 390–397. (2001).
- Ahmed, K., Gerber, D.A. y Cochet, C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends in Cell Biology*, 12, 226-230. (2002).
- Altschul, S.A., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. (1997).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410. (1990).
- Ambit A., Fasel N., Coombs G. H. y Mottram J. C. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ.* **15**, 113-122. (2008).
- Arai, M; T Saito, Y. Kanako y H. Matsumina. Cellular origin and ultrastructural changes of regeneration shoots from tobacco internodes cultured *in vitro*. *Physiol. Plantarum.* 99: 523-528. (1997).
- Aravind, L., y L.V. Koonin. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins.* **46**, 355–367. (2002).
- Balk J., Chew S.K, Leaver C.J., McCabe P.F. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *The Plant Journal* **34**, 573–583. (2003).
- Bairoch, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**: 304-305. (2000).

- Barrett A.J. The classes of proteolytic enzymes. In Plant Proteolytic Enzymes. Dalling MJ, ed, vol. 1: pp 1–16. CRC Press, Boca Raton, Fl. (1986).
- Barrett, A.J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions. Eur. J. Biochem. 250: 1-6. (1997).
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., O'Brien, E.A. The MEROPS database as a protease information system. J. Struct. Biol. 134: 95–102. (2001).
- Barrett, A.J. y Rawlings, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol Chem. 382(5):727-33. (1997).
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, New York (CD_ROM). (1998).
- Bates, P.A. y Sternberg, M.J.E. Model Building by Comparison at CASP3: Using Expert Knowledge and Computer Automation. Proteins 37:47-54. (1999).
- Baxevanis AD y Ouellette BFF (eds). Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins. John Wiley & Sons, New York. (2001).
- Becker C, Shutov A.D, Nong V.H, Denyuk V.I, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen, NC y Müntz K. Purification, cDNA cloning and characterisation of proteinase B, arginine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. Eur J Biochem.; 228: 456–62. (1995).
- Beers E.P, Jones A.M, Dickerman A.W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. Phytochemistry.; 65: 43–58. (2004).
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. J Biol Chem 282: 1352–1358. (2007).

- Belenghi B., Salomon M. y Levine A. Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *J Exp Bot.* **55**, 889-897. (2004).
- Berger A y Schechter I. Mapping active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Philos. Trans r. Soc. Lons. (Biol) Vlo.257*: 249-264. (1967).
- Bonneau L., Ge Y., Drury G., Gallois P. What happened to plant caspases? *J Exp Bot* 59: 491–499. (2008).
- Bosch M. y Franklin-Tong V. E. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen. *Proc Nat Acad Sci USA.* **104**, 18327-18332. (2007).
- Bowie J.U, Lüthy R, Eisenberg D.A. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253: 164-70. (1991).
- Bozhkov P.V, Filanova LH, Suarez MF, Helmersson A, Smertenko AP, Zhivotovsky B, Von Arnold S. VEIDase is a principal caspase like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ* 11: 175-182. (2004).
- Bozhkov P. V., M.F. Suárez, L.H. Filonova, G. Daniel, A. A. Zamyatin, S. Rodriguez, B. Zhivotovisky y A. Smertenh. Cysteine proteases mcII-Pa executes programmed cell death plant embryogenesis. *PNAS*.**102 (40)**, 14463. (2005).
- Bush, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 95–122. (1995).
- Cambra I., Garcia F.J., Martinez M. Clan CD of cysteine peptidases as an example of evolutionary divergences in related protein families across plant clades. *Gene* 449: 59–69. (2010).
- Cao Y., Huang S., Dai B., Zhu Z., Lu H. y Dong L. *Candida albicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced cell death and change in energy metabolism. *Fungal Genet Biol.* **46**, 183–189. (2009).

- Castillo-Olamendi L, Bravo-García A, Morán J, Rocha-Sosa M, Porta H. AtMCP1b, a chloroplast-localised metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection. *Funct Plant Biol* 34: 1061-1071. (2007).
- Chahomchuen T, Akiyama K, Sekito T, Sugimoto N, Okabe M, Nishimoto S, Sugahara T, Kakinuma Y. Tributyltin induces Yca1p-dependent cell death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Toxicol Sci.* 34(5):541-5. (2009).
- Choi C. J. y Berges J. A. New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death Dis.* 4, e490; doi:10.1038/cddis.2013.21. (2013).
- Coffeen W. C. y Wolpert T. J. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell.* 16, 857–873. (2004).
- Coll N. S., Vercammen D., Smidler A., Clover C., Van Breusegem F., Dangl J. L. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science.* 330, 1393–1397. (2010).
- Collazo C, Chacón OY, Borrás O. Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals. *Biotecnología aplicada* 23:1-10. (2006).
- Cox, P. Characterization of the metacaspase gene family in *Arabidopsis thaliana*. Master's thesis. Sweden University of Agricultural Sciences. (2011).
- Crawford E.D., Wells J.A. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem.* 80:1055-87. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-121639. (2011).
- Curtis M, Grossniklaus U. A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462-469. (2003)
- Cutler SR, Sommerville CR. Imaging cell death: GFP-Nit1 aggregation marks an early step of wound and herbicide induced cell death. *BMC Plant Biol* 5: 1-15. (2005).

- de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Barros MH, Goldman MH, Berretta AA, Goldman GH. Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 10(3):398-411. (2011).
- del Toro, G. VIII Congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica. (2006).
- Dudkiewicz MZ, Piszczek E Bacterial putative metacaspase structure from *Geobacter sulfureducens* as a template for homology modeling of type II *Triticum aestivum* metacaspase (TaeMCAII). *Acta Biochim Pol* 59: 401-406. (2012).
- Dunn B. Proteases mechanisms. Oxford University Press, Oxford,pp. 57-79. (1989).
- Durbin R, Eddy SR, Krogh A y Mitchison G. Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge University Press, Cambridge, UK. (1997).
- Earnshaw W.C. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7: 337-343. (1995).
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., y Kaufmann, S. H. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383–424. (1999).
- Ellis R.E, Yuan J.Y, Horvitz H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-698. (1991).
- Elofsson, A., Fischer, D., Rice, D.W., LeGrand, S.M. y Eisenberg, D. A study of combined structure/sequence profiles. *Fold Des.* 1:451-461. (1996).
- Emanuelsson O., H. Nielsen, S. Brunak y G. von Heijne. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300: 1005-1016. (2000).
- Emily D. Crawford y James A. Wells. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 80:1055–87. (2011).
- Enari M., Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50. (2008).

- Fariselli, P., Pazos, F., Valencia, A. y Casadio, R. Prediction of protein-protein interaction sites in heterocomplexes with neural networks. *Eur. J. Biochem.* 269:1356-1361. (2002).
- Fedorova L. y Fedorov A. Introns in gene evolution. *Genetica* .Vol 118 (123-131). (2003).
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, y P. Vandenabeele. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757:1371–1387. (2006).
- Fischer J, Becker C, Hillmer S, Horstmann C,Neubohn B, Schlereth A, Senyuk V, hutovA, Müntz K. The families of papainand legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intercellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Mol Biol.*; 48: 83–101. (2000).
- Fischer, D. y Eisenberg, D. Protein fold recognition using sequence-derived predictions. *Protein Sci.* 5:947-955. (1996).
- Frangioni J.V, Neel B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210: 179-187. (1993).
- Frigerio L, Pastres A, Prada A, Vitale A. Influence of KDEL on the fate of trimeric orassembly-defective phaseolin: selective use ofan alternative route to vacuoles. *Plant Cell.*;31: 1109–26. (2001).
- Fuentes-Prior, P., y G.S. Salvesen. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* **384**, 201–232. (2004).
- Gao C. J., Xing D, Li L. L., Zhang L. R. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C over-exposure. *Planta.* **227**, 755-767. (2008).
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. ExPASy: transalate tool on the ExPASy Server. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788 (1999).
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;

- (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. pp. 571-607. (2005).
- Ginalski K, Elofsson A, Fischer D, Rychlewski L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics*. 19(8):1015-8. (2003).
- Goldman, N., Thorne, J. y Jones, D. Using evolutionary trees in proteins secondary structure prediction and other comparative sequence analyses. *J. Mol. Biol.* 263:196-208. (1996).
- Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6: 201-211. (2004).
- Gray J. Paradigms of the evolution of programmed cell death. In: Gray J, ed. *Programmed cell death in plants*. Oxford: Blackwell Publishers Ltd, 1–25. (2004).
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Greiner, R., Jany, K.-D. & Larsson Alming, M. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Journal of Cereal Science*. 31, 127–139. (2000)
- Grudkowska M. y B. Zagdanska. Multifunctional role de of plant cysteine proteinases. *abp*. 51(3): 609-624. (2004).
- Guex, N., y Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723. (1997).
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., Wang, H., Green, J.E. and Ahmed, K. A Potential Role of Nuclear Matrix-associated Protein Kinase CK2 in Protection against Drug- decisions of life and death. *Biochem J*, 369, 1-15. (2001).
- Gusfield D. *Algorithms on Strings, Trees, and Sequences: Computer Science and Computational Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. (1997).

- Hamann A., Brust D. y Osiewacz H. D. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*. *Mol Microbiol.* **65**, 948–958. (2007).
- Hao L., Goodwin P. H. y Hsiang T. Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. tomato and the effect of silencing the gene on the host response. *Plant Cell Rep.* **26**, 1879-1888. (2007).
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M. y Hara-Nishimura I. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science.* **305**, 855-858. (2004).
- He R., Drury G. E., Rotari V. I., Gordon A., Willer M. y Farzaneh T. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis. *J Biol Chem.* **283**, 774–783. (2008).
- Heath M. Hypersensitive response related cell death. *Plant Mol Biol* 44: 321-334. (2000).
- Helmerson A, von Arnold S, Bozhkov P.V. The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiol* 147: 1158–1167. (2008).
- Helms M.J., Ambit A., Appleton P., Tetley L., Coombs G.H., Mottram J.C. Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *J Cell Sci* 119: 1105-1117. (2006).
- Herker E., Jungwirth H., Lehmann K. A., Maldener C., Fröhlich K. U. y Wissing S. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* **164**, 501–507. (2004).
- Hoeberichts F.A., ten Have A., Woltering E.J. A tomato metacaspase gene is unregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea* infected leaves. *Planta* 217: 517–522. (2003).
- Hoffmann, K. W. y Stoffel, S. TMbase—a database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374, 166. (1993).

- Hooft R.W., Vriend G., Sander C., Abola E.E. Errors in protein structures. *Nature* 381: 272. (1996).
- Ilyin, V.A., Pieper, U., Stuart, A.C., Martí-Renom, M.A. y Sali, A. Modview, a web application for visualization of multiple proteins sequences and structures (Submitted; <http://guitar.rockefeller.edu/ModView/>).in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Polon.*; 50: 691–713.in germinating seeds. *J Cell Biol.*; 148: 453–63. (2001).
- Ivanovska I. y Hardwick J. M. Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *J Cell Biol.* **170**, 391–399. (2005).
- Jin H.L., Liu Y.D., Yang K.Y., Kim C.Y., Baker B., Zhang S.Q. Function of mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J* 33: 719-731. (2003).
- Jones A.M. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-97. (2001).
- Jones, J.D.G., y J.L. Dangl. The plant immune system. *Nature.* 444:323–329. (2006).
- Kam P.C.A. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*; 55:1081-93. (2000).
- Kelley L.A., Sternberg M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363-371. (2009).
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, y A.R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239–257. (1972).
- Khan, M. A. S., P.B. Chock, y E.R. Stadtman. Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2005).
- Kim M., Ahn J-W, Jin U-H, Choi D., Paek K-H y Pai H-S. Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *Journal of Biological Chemistry.* **278**, 19406–19415. (2003).

- Kinoshita T, Nishimura M y Hara-Nishimura I. Homologues of vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*;29: 81–9. (1995).
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stress conditions. *Plant J.*; 19: 43–53. (1999).
- Koehl, P. y Levitt, M. A brighter future for protein structure prediction. *Nature Struct. Biol.* 6:108-111. (1999).
- Koonin, E.V., y L. Aravind. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.* 9:394–404. (2002).
- Korthout H.A.A.J., Berecki G., Bruin W., van Duijn B., Wang M. The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Lett.*; 475:139–44. (2000).
- Kosec G., Alvarez V. E., Agüero F., Sánchez D., Dolinar M. y Turk B. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol.* **145**, 18–28. (2006).
- Krebs J., Kilpatrick S., Goldstein E. Lewis's genes 11. Jones & Bartlett Learning. (2011).
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ Suppl 2*: 1463-1467. (2005).
- Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14:32–43. (2007).
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685. (1970).
- Lam E. y Zhang Y. Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends in Plant.* **17(8)**, 487 -294. (2012).

- Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe, y P. Vandenabeele. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 14:44–55.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948. (2007)
- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D., Thornton J.M. Procheck-a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26: 283-291. (1993).
- Lecaille F., J. Kaleta, D. Bromme. Cysteine Proteases: Their role in Physiology and Recent developments in Inhibitor. *Chem. Rev.*102: 4459-4488. (2002).
- Lee R. E., Brunette S., Puente L. G. y Megeney L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**, 13348-13353. (2010).
- Li W-H. *Molecular Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. old Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,170(8): 1001-1009. (1997).
- Liang H., Yao N., Song J.T., Luo S., Lu H., Greenberg J.T. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17: 2636-2641. (2003).
- Litchfield, D.W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, 369, 1-15. (2003).
- Litchfield, D.W., Bosc, D.G., Canton, D.A., Saulnier, R.B., Vilk, G. and Zhang, C. Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners induced Apoptosis in Cancer Cells. *Mol Cell Biochem*, 227, 21-29. (2001).
- Liu B. The Yin and Yang of a metacaspasa. *Cell Cycle* 13:22, 3471--3472; 15. (2014).
- Lockshin R.A. y Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature reviews Molecular cell biology.* Jul;2(7):545-50. PubMed PMID: 11433369. Epub 2001/07/04. (2001).
- Mackay, J. P., y Crossley, M. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 1–4. (1998).

- Madeo F., Carmona-Gutierrez D., Ring J., Buttner S., Eisenberg T., Kroemer G. Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* **382**, 227–231. (2009).
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg, y K.-U. Fröhlich. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell.* **9**, 911–917. (2002).
- McCabe P. F., Levine A., Meijer P. J., Tapon N. A. y Pennell R. I. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* **12**, 267-280. (1997).
- McCabe P.F., Pennell R.I. In *Techniques in Apoptosis* (eds Kotter TG, Martin SJ), Portland Press, London, 301-326. (1996).
- McFarlane M. y Williams A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* **5**, 674-678. (2004).
- McLuskey K., Rudolf J., Proto W. R., Isaacs N. W., Coombs G. H., Moss C. X. y Mottram J. C. Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**, 7469–7474. (2012).
- McNaught, A.D. International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of carbohydrates. *Carbohydrate Res.* **297**: 1-92. (1997).
- Meggio, F. y Pinna, L.A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*, **17**, 349-368. (2003).
- Mellor, H. y Parker, P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**, 281–292. (1998).
- Menard R. y Shutov A. D., Storer AC. Papain. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, eds, pp 555–7. Academic Press, New York. (1998).
- Menard R., A.C. Storer. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*: 373-393. (1992).

- Mitler R., Lam E. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol* 34: 209-221. (1997).
- Morrison K.L., Weiss G.A. "Combinatorial alanine-scanning". *Curr Opin Chem Biol* 5 (3): 302–7. (2001)
- Mount D.W. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* . Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Chapter 1. (2000).
- Müntz K., Blattner F.R., Shutov A.D. Legumains-a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants. *J Plant Physiol.*; 160:1281–93. (2002).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497. (1962).
- Murtas G. y Millar A.J. How plants tell the time. *Current Opinion in Plant Biology* Volume 3, Issue 1, Pages 43-46. (2000).
- Nakagawa T., Takayuki K., Takeshi H., Katsunori T., Makoto K., Yasuno N., Kiminori T., Ken M., Tetsuro J y Tetsuya K. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 104, Issue 1 , Pages 34–41. (2007).
- Nielsen H., J. Engelbrecht, S. Brunak y G.von Heijne. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10:1-6. (1997).
- Ohashi-Ito K., Oda Y, Fukuda H. Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell*. 22(10):3461-73. (2010).
- Otto H.H. y T. Schirmeister. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97:133-137. (1997).

- Page R.D.M. y Holmes E.C. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford, U.K. (1998).
- Palermo V., Falcone C., Calvani M. y Mazzoni C. Acetyl-L-carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission. *Aging Cel.* **9**, 570–579. (2010).
- Paula Salinas; Daniela Fuentes, Elena Vidal, Xavier Jordana, Manuel Echeverria y Loreto Holuigue. An extensive survey of CK2 α and β subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant and Cell Physiology Advance Access* published August 21, 46 páginas. (2006).
- Pearson, W.R. y Lipman, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448. (1988).
- Pennell, R. I. y Lamb, C. Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell.* **9(7)**, 1157 -1168. (1997).
- Pérez, Omar Everleny y Miriela Montes de Oca. La comercialización del Habano en Cuba, Documento CEEC, Ciudad de la Habana. (2000).
- Piszczek E., Dudkiewicz M. y Mielecki M. Biochemical and bioinformatics characterization of type II metacaspase protein (TaeMCAII) from wheat. *Plant Mol Biol Rep.* **30**, 1338–1347. (2012).
- Raff M. C. Social control on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400. (1992).
- Rawlings, N.D., Morton, F.R. y Barrett, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 34: D270-D272. (2014).
- Reape J.T., McCabe P.F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 15: 249-256. (2010).
- Reape T.J., McCabe P.F. Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol* 180: 13–26. (2008).
- Ren D., Yang H., Zhang S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J Chem Biol* 4: 559-565. (2002).

- Rentel, M. C., y Knight, M. R. Oxidative Stress-Induced Calcium Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **135**, 1471-1479. (2004).
- Riedl, S.J., y G.S. Salvesen. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:405–413. (2007).
- Riera, M., Pages, M., Issinger, O.G. y Guerra, B. Purification and characterization of recombinant protein kinase CK2 from *Zea mays* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 29, 24-32. (2003).
- Salvesen, G. S., y Abrams, J. M. *Oncogene* 23, 2774–2784. (2004).
- Sambrook J.E., Fritsch F., Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1989).
- Sánchez, R., Pieper, U., Mirkovic, N., de Bakker, P.I.W., Wittenstein, E. y Sali, A. ModBase a database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic Acids Res.* 28:250-253. (2000).
- Sanmartín, M., L. Jaroszewski, N.V. Raikhel y E. Rojo. Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology*. 137(7):841-847. (2005).
- Sauve, D. M., D. T. Ho, et al. "Concentration of dilute protein for gel electrophoresis." *Anal Biochem* 226(2): 382-3. (1995).
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res.* (1967).
- Scheer J.M., Ryan C.A. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 298: 130-132. (2001).
- Schlereth A, Standhardt D, Mock HP, Müntz K. Stored cysteine proteinases Stara globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta*. 212: 718–27. (2001).
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459–470.

- (2002).
- Shindyalov I.N. y Bourne P.E. Improving alignments in HM protocol with intermediate sequences. In: "Forth meeting on the critical assessment of techniques for protein structure prediction, pp. A-92. (2000).
- Solomon, S. C., Mark A. Bullock, David H. Grinspoon. Climate Change as a Regulator of Tectonics on Venus. *Science* 286, 87. (1999).
- Suarez M. F., Filonova L. H., Smertenko A., Savenkov E. I., Clapham D. H. y von Arnold S. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr Biol.* **14**, 339–340. (2004).
- Sundström J.F., Vaculova A., Smertenko A.P., Savenkov E.I., Golovko A., Minina E., Tiwari BS, Rodriguez-Nieto S., Zamyatnin A.A. Jr, Välineva T., Saarikettu J., Frilander M.J., Suarez M.F., Zavialov A., Ståhl U., Hussey P.J., Silvennoinen O., Sundberg E., Zhivotovsky B., Bozhkov P.V. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat Cell Biol* 11:1347-1354. (2009).
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Samzami N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441–446. (1999).
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.J. y Hillis D.M. Phylogenetic Inference. In Hillis DM, Moritz D, and Mable BK, editors, *Molecular Systematics*, pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. (1996).
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (2007).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80. (1994).
- Thornberry N.A. y Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 28; 281(5381):1312-6. (1998).

- Timmar, J.C., y G.S. Salvesen. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14:66–72. (2007).
- Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zaviyalov A., Lam E., Bozhkov P.V. Metacaspases. *Cell Death Differ* 18: 1279–1288. (2011).
- Tyndall, J.D.A., Nall, T., Fairlie, D.P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem. Rev.* 105: 973-999. (2005).
- Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V., Dixit V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6: 961-967. (2000).
- Valdés, M. Caracterización citogenética e isoenzimática de haploides y de un dihaploide del género de *Nicotiana*. Tesis de Maestro en Ciencias. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. 46pp. (1997).
- van de Hoorn, R. A. L. y J. D. G. Jones. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Plant Biology.* 7 (3), 400-407. (2004).
- Van der Biezen E.A., Jones J.D. The NBARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* 8: 226-267. (1998).
- van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhiotovskiy B., Bozhkov P.V. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* 18: 1241–1246. (2011).
- van Doorn, W.G., y E.J. Woltering. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.* 10:117–122. (2005).
- Vaux D.L. Toward understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 786-789. (1993).
- Vaux D.L., Korsmeyer S.J. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254. (1999)

- Vercammen D., Belenghi B., van de Cotte B., Beunens T., Gavigan J.A., De Rycke R., Brackenier A., Inzé D., Harris J.L., Van Breusegem F. Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J. Mol. Biol.* 364: 625-636. (2006).
- Vercammen D., van de Cotte B., De Jaeger G., Eeckhout D., Casteels P., Vandepoele K., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Inzé D., Van Breusegem F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem* **279**: 45329–45336. (2004).
- Vercammen D., W. Declercq, P. Vandenabeele y F. Van Breusengen. Are metacaspases caspases. *jbc.* **179**(3): 375-380. (2007).
- Vercammen, D., B. van de Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J., Van Beeumen, D., Inzé, F. Y Van Breusegem. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem.* **279**, 45329 – 4533. (2004).
- Vierstra R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.*; 8: 135–42. (2003).
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956. (2003).
- Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers GEM, Oppedijk BJ, van der Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol.* 39: 489-501.
- Watanabe, N., y E. Lam. Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *The Plant Journal.* **66**, 969-982. (2011a).
- Watanabe, N., y E. Lam. Calcium-dependent activation and autolysis of *Arabidopsis* metacaspase 2d. *J. Biol. Chem.* **286**, 10027-10040. (2011b).
- Watanabe, N., y E. Lam. Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in

- yeast. *J. Biol. Chem.* **280**, 14691–14699. (2005).
- Wiederanders B. Structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* **30**:691–699. (2003).
- Woltering E.J., van der Bent A., Hoeberichts F.A. Do plant caspases exist? *Plant Physiol* **130**: 1764–1769. (2002).
- Wong A.H.H., Yan C., Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem.* **287**, 29251–29259. (2012).
- Wyllie A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* **284**, 555-556. (1980).
- Xiao, S., McCarthy, J. G., Aster, J. C., y Fletcher, J. A. *Blood.* **96**, 699–704. (2000).
- Xing, T., Higgins, V.J. & Blumwald, E. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant. Cell* **8**, 555–564. (1996).
- Yamada T, Ichimura K., Kanekatsu M., van Doorn W.G. Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* petals. *Plant Cell Physiol* **50**: 610-625. (2009).
- Yoshitaka, T.; Kenichi, K. ; Kaihei, K. y Tetsuro, O. Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium.*, vol. 14, no10, pp. 1149-1157. (2001).
- Yei-Shung W. Jui-Hung Y., Wey-Shin S. Dissipation of the herbicide oxyfluorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **54** (2), Pages 151–156. (2003).
- Zalila H., González I. J., El-Fadili A. K., Delgado M. B., Desponds C., Schaff C. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major.* *Mol Microbiol.* **79**, 222–239. (2011).

- Zhan, S; C. Williams, D. Jackson, P. Lemaux. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during *in vitro* axillary shoot meristem. *Planta*.204: 542-54. (1998).
- Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40. (2008).
- Zhang, Y. y Lam, E. Sheathing the swords of death. Post-translational modulation of plant metacaspases. *Plant Signal Behav.* **6**, 2051–2056. (2011).

X. ANEXOS

Artículo publicado en la revista “Planta” para la obtención del grado del Doctor en Ciencias Biológicas: **“Two aspartate residues at the putative p10 subunit of type II metacaspase from *Nicotiana tabacum* L. may contribute to the substrate-binding pocket”**

Two aspartate residues at the putative p10 subunit of a type II metacaspase from *Nicotiana tabacum* L. may contribute to the substrate-binding pocket

Alexis Acosta-Maspons · Edgar Sepúlveda-García ·
Laura Sánchez-Baldoquín · Junier Marrero-Gutiérrez ·
Tirso Pons · Mario Rocha-Sosa · Lien González

Received: 22 May 2013 / Accepted: 27 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Metacaspases are cysteine proteases present in plants, fungi, prokaryotes, and early branching eukaryotes, although a detailed description of their cellular function remains unclear. Currently, three-dimensional (3D) structures are only available for two metacaspases: *Trypanosoma brucei* (MCA2) and *Saccharomyces cerevisiae* (Yca1). Furthermore, metacaspases diverged from animal caspases of known structure, which limits straightforward homology-based interpretation of functional data. We report for the first time the identification and initial characterization of a metacaspase of *Nicotiana tabacum* L., NtMC1. By combining domain search, multiple sequence

alignment (MSA), and protein fold-recognition studies, we provide compelling evidences that NtMC1 is a plant metacaspase type II, and predict its 3D structure using the crystal structure of two type I metacaspases (MCA2 and Yca1) and Gsu0716 protein from *Geobacter sulfurreducens* as template. Analysis of the predicted 3D structure allows us to propose Asp353, at the putative p10 subunit, as a new member of the aspartic acid triad that coordinates the P1 arginine/lysine residue of the substrate. Nevertheless, site-directed mutagenesis and expression analysis in bacteria and *Nicotiana benthamiana* indicate the functionality of both Asp348 and Asp353. Through the co-expression of mutant and wild-type proteins by transient expression in *N. benthamiana* leaves we found that polypeptide processing seems to be intramolecular. Our results provide the first evidence in plant metacaspases concerning the functionality of the putative p10 subunit.

M. Rocha-Sosa: Deceased, 8 September 2013.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-013-1975-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Acosta-Maspons (✉) · E. Sepúlveda-García ·
L. Sánchez-Baldoquín · M. Rocha-Sosa
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico
e-mail: aacosta@ibt.unam.mx

L. Sánchez-Baldoquín · J. Marrero-Gutiérrez
Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de La Habana, 10400 Havana, Cuba

T. Pons
Programa de Biología Estructural y Biocomputación, Centro
Nacional de Investigaciones Oncológicas-Carlos III (CNIO),
28029 Madrid, Spain

L. González (✉)
Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias, Universidad de
Las Américas (UDLA), Quito, Ecuador
e-mail: liengonza@yahoo.es; lgonzalez@udla.edu.ec

Keywords Autoprocessing · Cell death · Protein modeling · Transient expression

Abbreviations

AMC 7-Amino-4-methylcoumarin
IPTG Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MSA Multiple sequence alignment
PCD Programmed cell death
RACE Rapid amplification of cDNA ends

Introduction

Programmed cell death (PCD) is an integral part of the cell development and occurs also in response to cellular insults. In animals, apoptosis is one of the three major types of cell death described so far. The other two are autophagy and

necrosis. In contrast to animal cells, plant cells do not present apoptosis, since the existence of the cell wall makes the requirement of apoptotic bodies unnecessary. In addition, phagocytic cells are absent in plants. Based on morphological criteria, two main classes of PCD are recognized in plants: vacuolar cell death and necrosis (van Doorn et al. 2011). Central components of the apoptotic machinery are caspases, a family of cysteine proteases that cleave proteins after aspartic acid residues (the P1 residue) (Shi 2002). Caspases are synthesized as inactive precursors consisting of a large (p20) and small (p10) subunit, which subsequently assemble in an active p20₂p10₂ heterotetramer (Shi 2002).

In plants, molecular mechanisms of PCD are poorly understood. Several events commonly observed during animal apoptosis, such as cell shrinkage, blebbing of the plasma membrane, condensation of the nucleus, and fragmentation of DNA, have been also described in plants when PCD occurs (Reape and McCabe 2008). However, our knowledge on molecules involved in the execution of PCD in plants is limited. Plants do not have close homologues of caspases, but possess phylogenetically distant families of cysteine proteases termed metacaspases and vacuolar processing enzymes. These caspase-like enzymes are unified in the clan CD, and use a catalytic cysteine that is activated by a catalytic histidine for nucleophilic attack (Cambra et al. 2010).

Based on their sequence and structural features, metacaspases have been classified as type I, type II (Uren et al. 2000), and more recently type III (Choi and Berges 2013). Type I metacaspases have an N-terminal extension, while type II lack such an extension but hold a linker region between the putative p20 and p10 subunits (Uren et al. 2000; Vercammen et al. 2004). Type III metacaspases are found in phytoplankton and show a rearrangement of N- and C-terminus. Although not demonstrated yet, in analogy to animal caspases, the combination of p20 and p10 subunits would form the catalytic domain of metacaspases. In contrast to caspases, metacaspases cleave proteins after arginine or lysine residues (Vercammen et al. 2004; Watanabe and Lam 2005). The P1 preference of these proteases is determined by the amino acids forming the S1 pocket (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Based on sequence comparison, Vercammen et al. (2004) suggested that the AtMC9 residues Asp32 and Asp145 in the p20 subunit and Asp254 located in the p10 subunit form the S1 pocket that coordinate the P1 arginine/lysine residue of the substrate.

Active roles in stress responses, like plant defense (Coll et al. 2010; Watanabe and Lam 2011a) or UV-induced cell death (He et al. 2008) and in PCD occurring during embryogenesis in *Picea abies* (Suarez et al. 2004), have demonstrated the presence of metacaspases. Nevertheless, a

detailed description of their cellular function and substrates remains enigmatic, with the only exception of a Tudor staphylococcal nuclease protein (Sundström et al. 2009).

Currently, nine metacaspase genes of the *Arabidopsis thaliana* genome are annotated in databases: three of type I (AtMC1 to AtMC3) and six of type II (AtMC4 to AtMC9) (Vercammen et al. 2004). In addition, other plant metacaspases have been reported in species like *Solanum lycopersicum* Mill (Hoeberichts et al. 2003) or *Picea abies* (Suarez et al. 2004). However, considering the *Nicotiana* genera, only one partial sequence of a type II metacaspase has been described in *N. benthamiana* so far (Hao et al. 2007).

The *A. thaliana* type II metacaspases, AtMC4 and AtMC9, are two of the most studied in plants and their N-terminal tagged versions have been overproduced in *Escherichia coli* for biochemical characterization (Vercammen et al. 2004; Watanabe and Lam 2011b). Upon overproduction in bacteria both metacaspases undergo self-processing. For these two proteins, site-directed mutagenesis studies have shown that: (1) replacement of catalytic Cys139 in AtMC4 or the corresponding Cys147 in AtMC9 by alanine residues, suppressed autocatalytic activity and (2) mutant AtMC9-R183A or AtMC4-K225G at the autoprocessing site, remained as uncleaved zymogens and no protease activity was observed (Vercammen et al. 2004; Watanabe and Lam 2011b).

The crystal structures of MCA2 from *T. brucei* (McLuskey et al. 2012) and Yca1 from *S. cerevisiae* (Wong et al. 2012), both type I metacaspases, have been determined. Interestingly, the two structures contain an extra pair of β -strands, in addition to those present in caspases. This particular structural property prevents the formation of a dimer; therefore, in contrast to what was observed for caspases, the active type I metacaspase is a monomer (McLuskey et al. 2012; Wong et al. 2012). Most metacaspases studied at present require Ca²⁺ for in vitro activity (Bozhkov et al. 2005; Watanabe and Lam 2011b; Zhang and Lam 2011; Piszczek et al. 2012; McLuskey et al. 2012; Wong et al. 2012). In MCA2, the Ca²⁺ binding site was mapped to four aspartic acid residues (Asp173, Asp189, Asp190 and Asp220). Ca²⁺ induces an allosteric conformational change that stabilizes substrate binding (McLuskey et al. 2012).

Comparative protein structure modeling is a useful technique in the field of bioinformatics. Indeed, combining multiple sequence alignment (MSA), with site-directed mutagenesis results and 3D structure information, would be an invaluable aid to understand metacaspases function. The present study reports the cDNA cloning, sequencing, in silico and *in planta* characterization of *Nicotiana tabacum* L. metacaspase, termed NtMC1. We also propose a structural model of NtMC1 and hypothesize about its functional residues Asp25, His86, Asp137, Cys139, Asp348,

and Asp353. These results might contribute to understand the structure–function relationship of plant metacaspases. Finally, the expression of NtMC1 and mutant variants of this protein in *E. coli* and *N. benthamiana* allows us to analyze the requirements for autoprocessing and activity of this enzyme.

Materials and methods

Plant material

Commercial tobacco H2.1.1 seeds (*Nicotiana tabacum* L.) were kindly provided by the Institute of Tobacco Research, Havana, Cuba. The seeds were surface sterilized with 1 % (w/v) calcium hypochlorite. To ensure germination, the seeds were grown in MS medium (Murashige and Skoog 1962) for 15 days in a growth chamber (25 °C/20 °C, 14/10 h day/night cycle, light intensity 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After this time, seedlings were transplanted to pots filled with Metromix[®] 702 substrate (50–60 % composted pine bark fines, 15–25 % peat moss, 10–15 % vermiculite, and 5–15 % perlite), putting one seedling per pot, and the pots were moved into a greenhouse with enough water supplies. Leaves of 30-day old tobacco plants were collected, frozen in liquid nitrogen, and kept at –70 °C until processed.

Total RNA extraction

Total RNA was isolated from 100 mg of tobacco leaves using Trizol reagent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. RNA was quantified by NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) and the integrity of the RNA was assessed on a 1 % (w/v) agarose-formaldehyde gel.

Generation of full-length metacaspase gene

Total RNA obtained was reverse transcribed using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo (dT) 12–18 primer following the manufacturer's instructions. To amplify a metacaspase cDNA, we used degenerate upper and lower primers (Supplemental Table S1) previously described by Castillo-Olamendi et al. (2007). The PCR reaction was as follows: 95 °C/5 min, 40 cycles of 95 °C/30 s, 50 °C/30 s, 68 °C/1 min, and one cycle of 72 °C/10 min. A DNA fragment with the expected size, 182 base pairs (bp), was inserted into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced. The obtained sequence was compared against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, using the BLAST web server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). To get the missing

5' and 3' ends of the cDNA, the rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique was employed. For the 5'-RACE, two nested oligonucleotides were used: RACE5-143 and RACE5-N4, and for the 3'-RACE a single primer, NT2B-F282, combined with oligo (dT) (Supplemental Table S1). The nucleotide sequence of the putative metacaspase cDNA was determined by sequencing the PCR products.

Computational analysis of NtMC1 sequence

All databases and software used in the present study are available on the World Wide Web. Sequences of metacaspases from other plants were retrieved from the GenBank. Position-Specific Iterated BLAST against the non-redundant database (NCBI-nr; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used for sequence comparisons. ClustalW2 program (Larkin et al. 2007) with default settings was used to obtain a multiple sequence alignment (MSA) of metacaspases. Aligned sequences were inspected and adjusted manually using the program Se-AL v2.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).

In search for structural templates from known structures in the Protein Data Bank (PDB) and alternative sequence-to-structure alignments of NtMC1, we used the structure prediction methods PHYRE2 (Kelley and Sternberg 2009) and I-TASSER (Zhang 2008). The predicted 3D structure of NtMC1 was subjected to a series of tests to evaluate its internal consistency and reliability. Backbone conformation was evaluated by the inspection of the Psi/Phi Ramachandran plot obtained from PROCHECK analysis (Laskowski et al. 1993). Packing quality of the 3D model was investigated by the calculation of WHATCHECK Z-score value (Hooft et al. 1996). Finally, sequence–structure compatibility was evaluated by VERIFY-3D (Bowie et al. 1991). All these programs were executed from the structure analysis and verification servers' web site at UCLA (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>).

Plasmid construction

To construct an entry vector bearing the NtMC1 coding region with the HA epitope in the C-terminus, this region was amplified by a first PCR using primers ATTB-1-Met and HA-MOR-R and in a second PCR with ATTB-1-Met and ATTB2-HA (Supplemental Table S1). HA-MOR-R is complementary to NtMC1 and contains part of the HA epitope; meanwhile, ATTB2-HA is partly complementary to HA-MOR-R and provides the rest of the HA sequence. The product was cloned into the vector pDONRTM/Zeo (Invitrogen) using the Gateway system (Invitrogen), giving rise to the plasmid pENTR-NtMC1-HA, which was then transferred to the destination vectors pMDC32 (Curtis

and Grossniklaus 2003) for plant expression and pDEST17 (Invitrogen) for bacterial expression.

Site-directed mutagenesis

Mutant versions of NtMC1: C139V, H86S, D348A, D353A, D25A, D137A, D348R, D353R, D348R-D353R, D348A-D353A, R187V, K224A, and K270D were constructed using the QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The plasmid pENTR-NtMC1-HA was used as template except for double aspartate mutants, where pENTR-NtMC1-D353R-HA or pENTR-NtMC1-D353A-HA were the templates. Oligonucleotides used for the mutagenesis are listed in the Supplemental Table S1. Plasmids generated were then used to transfer the mutant ORFs to the destination vectors pMDC32 (Curtis and Grossniklaus 2003) for plant expression and pDEST17 (Invitrogen) for bacterial expression using Gateway technology.

Bacterial induction

pDEST17 derivatives were introduced into the bacterial strain BL21(DE3)p*LysS* (Novagen). A single colony was inoculated in 1 ml of Luria–Bertani media (LB, Sambrook et al. 1989) containing 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml chloramphenicol and grown overnight at 37 °C. Thirty microliter of this culture was added to a fresh 1.5 ml of LB and grown for 90 min at 37 °C. After that time, 0.4 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) was added and the incubation continued for 3 h. Cells were collected by centrifugation (18,500g, 4 °C, 5 min), resuspended in STE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT), and lysed by sonication. The soluble fraction was separated by centrifugation (18,500g, 24 °C, 10 min) and stored at –80 °C until used.

Transient expression analysis

Recombinant pMDC32 derivatives were transformed by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. *A. tumefaciens* was grown to stationary phase in LB medium containing 100 µg/ml rifampicin, 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin, and 50 µg/ml acetosyringone. Bacteria culture were centrifuged (8,200g, 4 °C, 15 min) and pellet washed with 10 mM MgCl₂. After a new centrifugation, bacteria were resuspended in 10 mM MgCl₂ and 150 µg/ml acetosyringone and adjusted to 0.5 OD₆₀₀. Following 3 h of incubation, *A. tumefaciens* containing each construct was mixed with the same volume of an *A. tumefaciens* strain including the viral suppressor p19 (Voinnet et al. 2003) treated in the same way, but adjusted to 1 OD₆₀₀. The abaxial side of 3- to 4-week-old leaves of *N. benthamiana* was then infiltrated with the bacterial suspension using a 1-ml

syringe. After 3 days the material was collected to extract proteins.

Enzymatic activity determination

Because the protein concentration in bacterial extracts does not reflect the levels of NtMC1 or its derivatives, the amount of protein utilized to measure metacaspase activity was adjusted qualitatively according to the metacaspase signal detected in a Western blot. Bacterial extracts were diluted accordingly and 50 µl of these protein extracts in 500 µl reaction buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 5 mM CaCl₂) supplemented with 50 µM of Boc-Gly-Arg-Arg-AMC (Bachem Bioscience) were used for activity determinations. We did not observe major differences in activity when 5–50 mM CaCl₂ was used, therefore, we decided to use 5 mM for all measurements. Mixes were incubated on ice and 100-µl aliquots were taken every 5 min. Reactions were stopped by heating at 94 °C for 5 min. Release of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) was determined fluorometrically (Bio-Rad Versafluor). Excitation and emission wavelengths were 360 and 460 nm, respectively. These samples were, thereafter, used for analysis by Western blotting.

Extraction and analysis of proteins

Approximately 100 µg of frozen tissue from agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves was homogenized in 200 µl of 1X Laemmli loading buffer (60 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, 0.01 % bromophenol blue), boiled 5 min and centrifuged at 18,500g for 5 min. Ten microliter of the supernatant was loaded onto a polyacrylamide gel and subjected to SDS-PAGE (Laemmli 1970). Separated proteins were blotted onto a Hybond-P⁺ membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Blots were probed with an anti-HA (Sigma), anti-VSVG (Sigma) or anti-NtMC1 antibodies and revealed using an alkaline phosphatase kit (BCIP/NBT kit; Invitrogen).

NtMC1 antibody generation

Recombinant NtMC1 was produced in the *E. coli* BL21(DE3)p*LysS* strain according to Frangioni and Neel (1993). NtMC1 was purified from 8.5 % SDS-PAGE gels (Scheer and Ryan 2001). Two New Zealand rabbits were immunized by subcutaneous injection with 100 µg of recombinant protein resuspended in complete Freund's adjuvant. Three additional injections with the protein resuspended in incomplete Freund's adjuvant were applied every 10 days. The raw serum was used at a dilution of 1:5,000.

Results

Cloning and sequencing of a *N. tabacum* metacaspase cDNA

To isolate a metacaspase cDNA from tobacco, a RT-PCR was performed using total RNA obtained from tobacco leaves and two degenerate primers, designed previously to amplify metacaspases in *Arabidopsis* (Castillo-Olamendi et al. 2007). A single band with 182 base pairs was amplified. From the sequence obtained, new primers were designed to clone the full-length cDNA by using 5'-RACE and 3'-RACE. This cDNA sequence was compared with those reported in the NCBI-nr database, obtaining the highest degree of similarity, 97.17 %, with a type II metacaspase reported for *N. benthamiana*. Likewise, a BLAST search made with the predicted amino acid sequence showed a sequence identity of 99 % to the *N. benthamiana* metacaspase (Table 1). By MSA, we provided compelling evidences that *N. tabacum* L. sequence is a plant metacaspase type II (see Fig. 1, Supplemental Fig. S1). We named it NtMC1, in accordance with the nomenclature suggested for *A. thaliana* (Tsiatsiani et al. 2011). The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank with accession number

EU869285. MSA revealed amino acid residues that are conserved among all or most of the individual metacaspases. Remarkable is the fact that amino acids important for metacaspase function are conserved in NtMC1 (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1).

Comparative protein 3D structure modeling

Since 3D structure of NtMC1 is not available, and despite the low sequence similarity between metacaspases and animal caspases, we fed the amino acid sequence of NtMC1 in the fold-recognition (PHYRE2) and ab initio (I-TASSER) methods. The results are shown in Table 2. The two methods, PHYRE2 and I-TASSER, suggested *T. brucei* metacaspase MCA2, *S. cerevisiae* metacaspase Yca1, and *G. sulfurreducens* uncharacterized protein Gsu0716 as the best templates for NtMC1 (Table 2). Other templates including human caspase-1, caspase-3, caspase-7, and caspase-9, match ranked high but with confidence scores and sequence identities in their alignments lower than those obtained for metacaspases MCA2, Yca1, and the uncharacterized protein Gsu0716. On the other hand, an independent prediction by other researches suggested Gsu0716 as the best template for the homologous *Triticum aestivum* metacaspase type II (Dudkiewicz and

Table 1 Plant metacaspases showing higher sequence identity with NtMC1

	Description	Source	%id	BLAST <i>E</i> -value	Name in Suppl. Fig. 1
DQ08404	Metacaspase type II	<i>Nicotiana benthamiana</i>	99	0.0	NbMC1
XP_004248002	Metacaspase 4	<i>Solanum lycopersicum</i>	92	0.0	SIMC4
XP_003546660	Metacaspase-4-like	<i>Glycine max</i>	75	0.0	GmMC4
ADM52185	Type II metacaspase	<i>Hevea brasiliensis</i>	74	0.0	HbMC
XP_002518827	Caspase, putative	<i>Ricinus communis</i>	73	0.0	RcMC
XP_004139955	Metacaspase-5 like	<i>Cucumis sativus</i>	73	0.0	CsMC5
XP_00415454	Metacaspase-4 like	<i>Cucumis sativus</i>	73	0.0	CsMC4
EMJ13150	Hypothetical protein	<i>Prunus persica</i>	72	0.0	PrpMC
XP_002267780	Metacaspase-5-like isoform 2	<i>Vitis vinifera</i>	72	0.0	VvMC5
XP_002316158	Predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	72	0.0	PtMC
XP_004293812	Metacaspase-4 like	<i>Fragaria vesca</i>	71	0.0	FvMC4
XP_002887781	Metacaspase 7	<i>Arabidopsis lyrata</i>	71	0.0	AlMC7
NP_178052	Metacaspase 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	70	0.0	AtMC4
EOA35212	Hypothetical protein	<i>Capsella rubella</i>	70	0.0	CarMC
NP_178051	Metacaspase 5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67	0.0	AtMC5
CAD59226	Metacaspase type II	<i>Picea abies</i>	66	0.0	McII-Pa
ACB11499	Metacaspase type II	<i>Pinus sylvestris</i>	66	0.0	PsMC
XP_003595929	Metacaspase type II	<i>Medicago truncatula</i>	64	0.0	MtMC
EAY76152.1	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	63	4e−180	OsMC
XP_002441316	Hypothetical protein	<i>Sorghum bicolor</i>	63	8e−179	SbMC
XP_003568187	Metacaspase-5-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	62	6e−179	BdMC5

Protein BLAST analysis was performed using the NCBI server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) against non-redundant protein sequences (nr) *Acc. number* the accession number of sequences in the NCBI-nr database, *%id* percentage of sequence identity

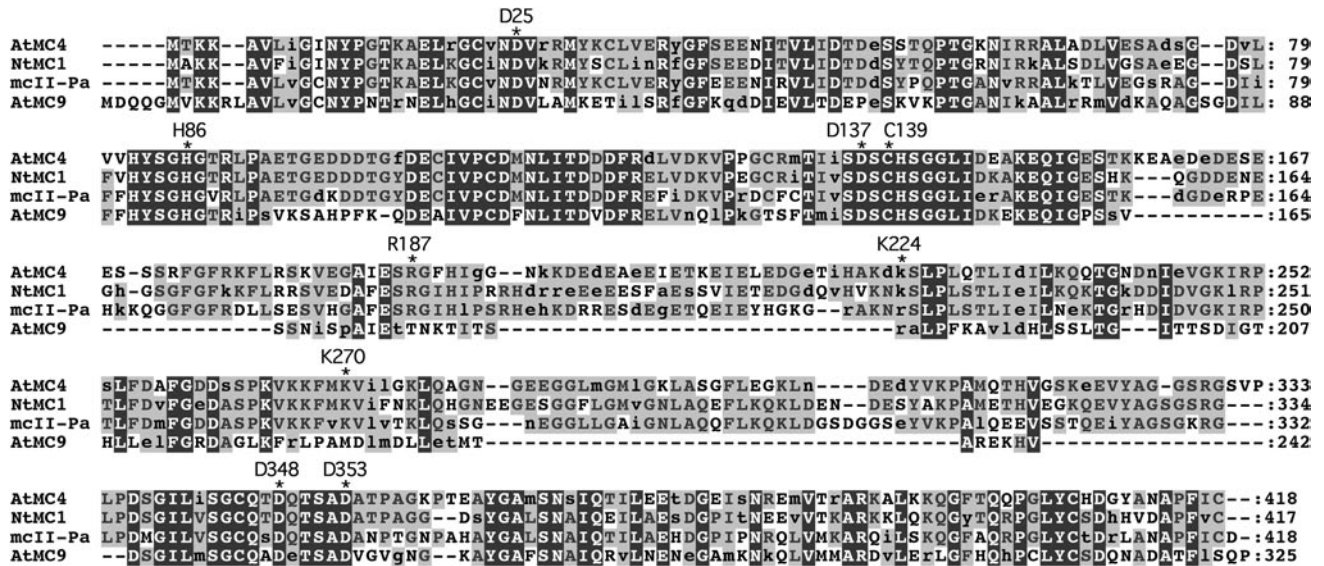


Fig. 1 Alignment of NtMC1 with characterized plant type II metacaspases. Metacaspases were aligned using the ClustalW2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The figure was made with the program *Box Shade*. Amino acids of the catalytic site (H86 and C139), the S1 pocket (D25, D137, and D348/D353) and

proposed processing sites (R187, K224 and K270) are marked above the alignment (numbers correspond to NtMC1). *Black boxes* identical amino acids; *gray boxes* lower case: conserved amino acids; *gray boxes* similar amino acids

Piszczek 2012), which reinforces the 3D model predicted here for NtMC1.

The structural models were analyzed by different structure validation programs including PROCHECK for the evaluation of the Ramachandran plot quality, WHACHECK for the calculation of packing quality Z-score, and VERIFY-3D for the analysis of sequence–structure compatibility (Supplemental Table S3). In general, quality values obtained for the 3D models are similar to those observed in the template structures. These results indicated a high quality of the NtMC1 low-resolution models presented in this work.

Structural superimposition of 3D models of NtMC1 based on crystal structures of *T. brucei* metacaspase MCA2 (PDB ID: 4AFP), *S. cerevisiae* metacaspase Yca1 (PDB ID: 4F6O), and *G. sulfurreducens* Gsu0716 (PDB ID: 3BIJ) is shown in Fig. 2. Mapping the functional residues proposed by Vercaemmen et al. (2004) for AtMC9 (Asp32 and Asp145 in the p20 subunit and Asp254 in the p10 subunit) into 3D models of NtMC1, lead us to propose a different aspartate (Asp353) as functional residue in the p10 subunit. According to the MSA in Fig. 1, the NtMC1-Asp348 is the residue equivalent to AtMC9-Asp254. This position is far in space from the catalytic and aspartate residues in the p20 subunit, according to the 3D models (Fig. 2) and could not coordinate the P1 Arg/Lys residue of the substrate. Instead, based on this criterion, we propose NtMC1-Asp353 as functional. This residue is more conserved than Asp348 in type I and type II metacaspases (see Supplemental Fig. S1).

Analysis of mutant NtMC1

To evaluate the role of Asp348 and Asp353 as a part of the S1 pocket of NtMC1, we measured the enzymatic activity and the autoprocessing capacity of mutants in these amino acids. With this aim, site-directed mutagenesis was used to generate proteins containing substitutions in Asp348 and Asp353. We also generated two inactive mutants to be used as controls. For that, we substituted the amino acids in the catalytic site, His86, and Cys139 (Fig. 1) by Ser and Val, respectively. These proteins and the wild-type NtMC1-HA were expressed in *E. coli* and bacterial extracts were used to measure metacaspase activity. As expected in extracts containing NtMC1-C139V-HA or NtMC1-H86S-HA, no activity was detected (Fig. 3a, only the activity for C139V is shown), demonstrating also that in our conditions, bacterial proteases did not contribute to the activity. As reported for other metacaspases, the enzymatic activity of NtMC1 was dependent on the presence of Ca²⁺. No activity could be measured in the absence of Ca²⁺; however, after the addition of 5 mM Ca²⁺, the metacaspase activity was detected. Two types of mutants were constructed for Asp348 and Ap353 with the aim of evaluating the effect of the change in charge, in one case both residues were substituted by Ala and in the second case, the substitution was by Arg. Surprisingly, and opposite to what we had expected according to our 3D model, both NtMC1-D348A-HA and NtMC1-D353A-HA, showed metacaspase activity comparable to that of the wild-type enzyme. We then constructed

Table 2 Summary of the structure prediction methods PHYRE2 and I-TASSER

NtMC1					
Rank	PDB ID (chain)	PHYRE2 confidence (%)	PHYRE2 %id	Fold description	Source
1	4afp (A)	100	37	Metacaspase-2	<i>Trypanosoma brucei</i>
2	4f6o (A)	100	38	Metacaspase-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	3bij (C)	100	27	Gsu0716	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
4	3v4o (A)	100	23	Caspase	<i>Homo sapiens</i>
5	3uoa (B)	100	20	Paracaspase	<i>Homo sapiens</i>
6	3e4c (B)	99.9	23	Procaspase-1	<i>Homo sapiens</i>
7	1nw9 (B)	99.8	22	Caspase-9	<i>Homo sapiens</i>
8	1nmq (B)	99.8	20	Caspase-3	<i>Homo sapiens</i>
9	1flj (A)	99.7	25	Caspase-7	<i>Homo sapiens</i>
10	1kmc (B)	99.7	25	Caspase-7	<i>Homo sapiens</i>
NtMC1					
Rank	PDB ID (chain)	I-TASSER TM-score ^a	I-TASSER %id	Fold description	Source
1	4af8 (A)	0.580	32.7	Metacaspase-2	<i>Trypanosoma brucei</i>
2	3bij (A)	0.490	21.2	Gsu0716	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
3	4f6o (A)	0.485	33.2	Metacaspase-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	1t3t (A)	0.421	3.5	FGAR-AT	<i>Salmonella enterica</i>
5	1gqf (A)	0.414	10.9	Procaspase-7	<i>Homo sapiens</i>
6	2nn3 (D)	0.414	12.4	Procaspase-1	<i>Spodoptera frugiperda</i>
7	2fp3 (A)	0.406	9.2	Caspase	<i>Drosophila melanogaster</i>
8	3v4o (A)	0.404	15.4	Caspase	<i>Homo sapiens</i>
9	3v4i (A)	0.404	14.7	RT-p51	HIV-1
10	1jxq (A)	0.401	12.1	Caspase-9	<i>Homo sapiens</i>

%id percentage of sequence identity, *RT-p51* reverse transcriptase P51 subunit, *HIV-1* human immunodeficiency virus type 1, *FGAR-AT* formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase

^a Estimated accuracy of the best models (ntMC1-model1, C-score = -2.45, TM-score = 0.43 ± 0.14)

a double mutant NtMC1-D348AD353A-HA. This protein did not exhibit metacaspase activity, suggesting that any aspartate, 348 or 353, was able to coordinate the P1 residue in the substrate. We also analyzed by SDS-PAGE and Western blot the NtMC1 processing from the same protein extracts. As shown in Fig. 3b, NtMC1 was already processed before Ca²⁺ addition and no further processing occurred in the presence of Ca²⁺, in spite of activity changes. As expected, the mutant in Cys139 or the double mutant NtMC1-D348AD353A-HA did not suffer any processing (Fig. 3b), confirming that it was an autocatalytic process as was already shown for other metacaspases.

Interestingly, an important reduction in activity was noticed in the mutant NtMC1-D348R-HA. On the contrary, an increase in activity was observed in the mutant metacaspase NtMC1-D353R-HA when compared with the wild-type metacaspase (Fig. 4a). The double mutant NtMC1-D348RD353R-HA, however, showed a negligible activity (Fig. 4a). Interestingly, NtMC1-D348R showed a

differential processing (Fig. 4b) when compared with wild-type NtMC1 and the rest of active derivatives. This suggests that a conformational change is caused by the substitution of an Asp by an Arg, which could expose different residues for processing. Again, the substitution of both aspartates, mutant NtMC1-D348RD353R-HA, prevented any processing (Fig. 4b).

In *T. brucei*, MCA2 residues D95 and D211 point toward the surface of the S1 pocket (McLuskey et al. 2012). Substitutions of these residues by Ala suppressed MCA2 enzymatic and autoprocessing activity, suggesting that both residues have a role in substrate recognition (McLuskey et al. 2012). In NtMC1, D25 and D137 correspond to D95 and D211, respectively; moreover, they are conserved in type I and type II plant metacaspases (Supplemental Fig. S1). To test if these two Asps have a similar role in NtMC1, we exchanged them by Ala and measured the enzymatic activity of these mutants. As expected, neither NtMC1-D25A nor NtMC1-D137A showed activity nor processing

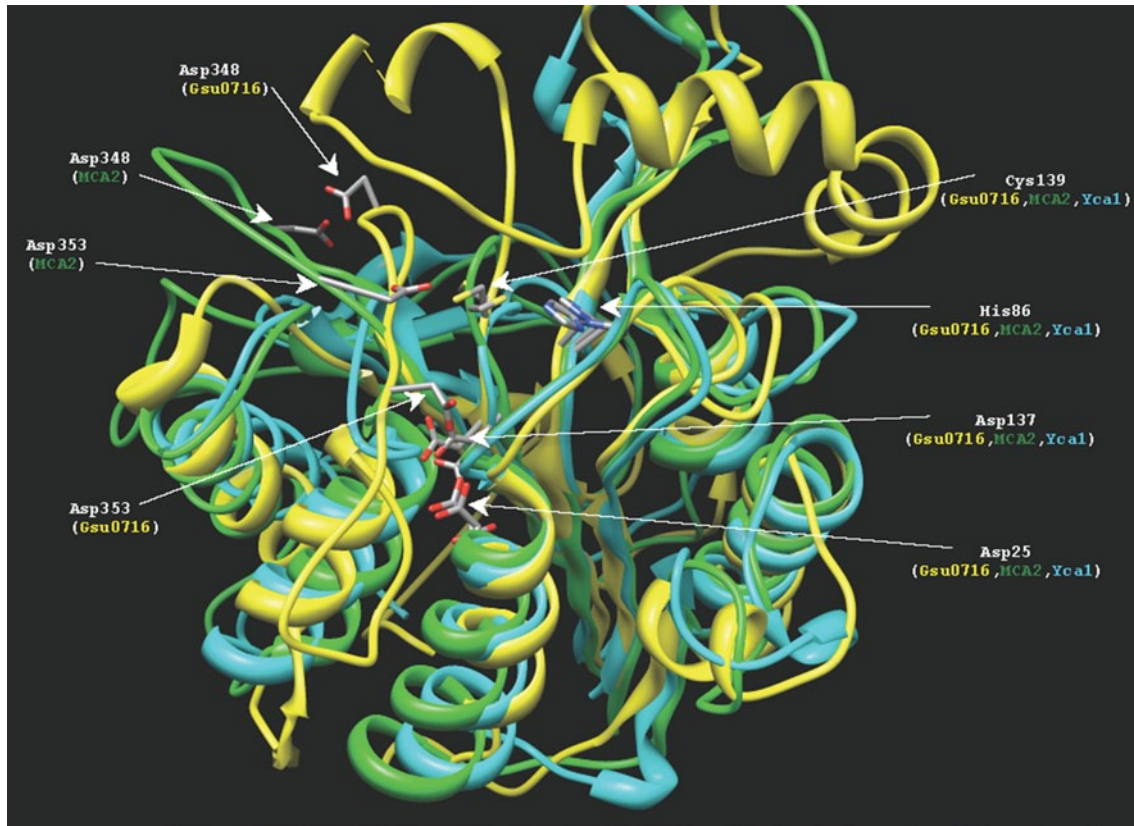


Fig. 2 Structural models of NtMC1. Structural superimposition of 3D models of NtMC1 based on crystal structures of *T. brucei* metacaspase-2 (MCA2, PDB ID: 4AFP), *S. cerevisiae* metacaspase-1 (Yca1, PDB ID: 4F6O), and *G. sulfurreducens* Gsu0716 (PDB ID: 3BIJ)

(Supplemental Fig. S3), indicating that these two Asps could be part of the S1 pocket.

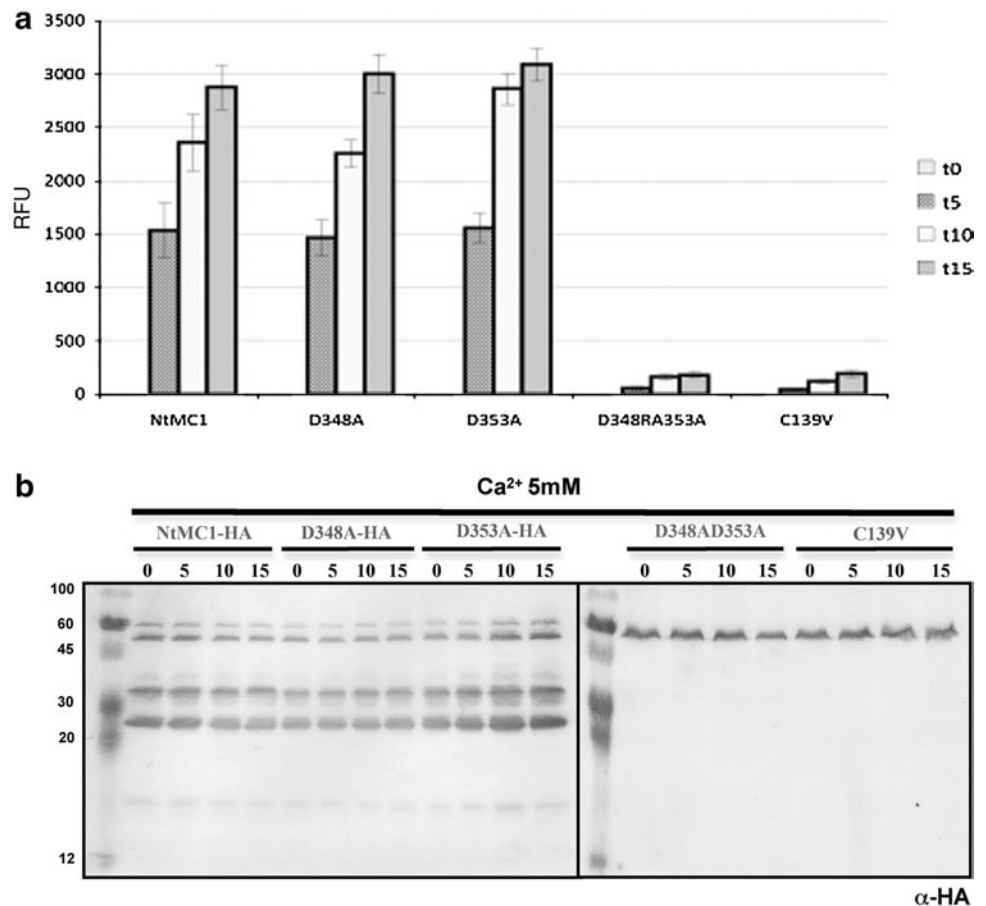
Analysis of mutants in *N. benthamiana*

To our knowledge, only a marginal *in planta* analysis of the autoprocessing activity of metacaspases has been performed so far (Watanabe and Lam 2011b). Most of the data correspond to the analysis of purified recombinant proteins, which in principle must be desirable. However, artifactual results could be obtained due to high protein concentrations. Besides, it is possible that additional factors in the plant cell could be required for an appropriate processing. According to this, we analyzed the autoprocessing activity of NtMC1 in a transient expression system in *N. benthamiana* leaves. First, we examined the ability of processing of the wild-type metacaspase in this system. The wild-type NtMC1-HA was processed when the protein was transiently expressed in *N. benthamiana* leaves, as evidenced by the presence of two bands clearly detected in a Western blot probed with anti-HA antibodies (Fig. 5). Although the predicted size for the unprocessed NtMC1 is of around 46 kDa, we and others have observed an anomalous migration of this kind of proteins (Vercammen et al. 2004; Watanabe and Lam 2005). We found a band of

around 64 kDa that corresponds to the unprocessed metacaspase and another band of around 28 kDa, which was identified as the C-terminal region of the product of the processing in Lys224 (Supplemental Fig. S2). It is remarkable that, in contrast to what we and others observed for purified recombinant proteins or in bacterial extracts (Vercammen et al. 2004; Watanabe and Lam 2005, 2011b), mainly two bands were observed in the transient expression system used, suggesting that fewer cuts could be occurring in the plant (compare Figs. 3 and 4 with Fig. 6). As observed for proteins expressed in bacteria, mutants D348A, D353A, D348R, and D353R were also processed in *N. benthamiana* leaves. A difference in processing was observed again for mutant D348R, reinforcing our previous hypothesis that a conformational change is caused by the amino acid substitution that places a different site for processing. As expected, none of the double mutants (NtMC1-D348AD353A-HA or NtMC1-D348RD353R-HA) were processed in the transient expression system (Fig. 5).

The processing site for some metacaspases has been determined, however, some discrepancy exists between the site found in AtMC4 (Watanabe and Lam 2011b) and AtMC9 (Vercammen et al. 2004), and sites found in *P. abies* mcII-Pa (Bozhkov et al. 2005). Since those analyses were performed with purified recombinant proteins, we decided to examine

Fig. 3 Enzymatic activities of NtMC1 and mutants derivatives expressed in *E. coli*. **a** Bacterial cultures containing expression vectors for C-terminally HA-tagged wild-type (WT) and mutant NtMC1 were induced with IPTG and lysed by sonication. Protein extracts were used to measure metacaspase activity as described in “Materials and methods”. RFU relative fluorescence units. **b** Proteins from the extracts used for activity determination were separated by PAGE and blotted onto a nylon membrane. Blots were probed with anti-HA



processing in *N. benthamiana* leaves. We exchanged Arg187 by valine, and Lys270 by aspartate in NtMC1-HA, equivalent sites to Arg188 and Lys269 in mcII-Pa (Fig. 1). However, in both cases processing took place (Fig. 6), suggesting that these sites are not primary targets for processing. On the contrary, when the substituted residue was Lys224, equivalent to Lys225 or Arg183 in AtMC4 or AtMC9, respectively (Fig. 1), no processing was observed in transient expression experiments in *N. benthamiana* (Fig. 6). This indicated that, as was already suggested for AtMC4 (Watanabe and Lam 2011b), an initial cut has to occur at Lys224 allowing, if that happens, subsequent processing in other basic residues.

We also tested in transient expression experiments of mutant proteins where the amino acids in the catalytic site, His86, and Cys139 (Fig. 1), were substituted by Ser and Val, respectively. As expected, none of these mutant proteins were processed in *N. benthamiana* leaves (Fig. 6), confirming that this process is autocatalytic as was shown above for proteins produced in bacteria.

Polypeptide processing is predominantly intramolecular

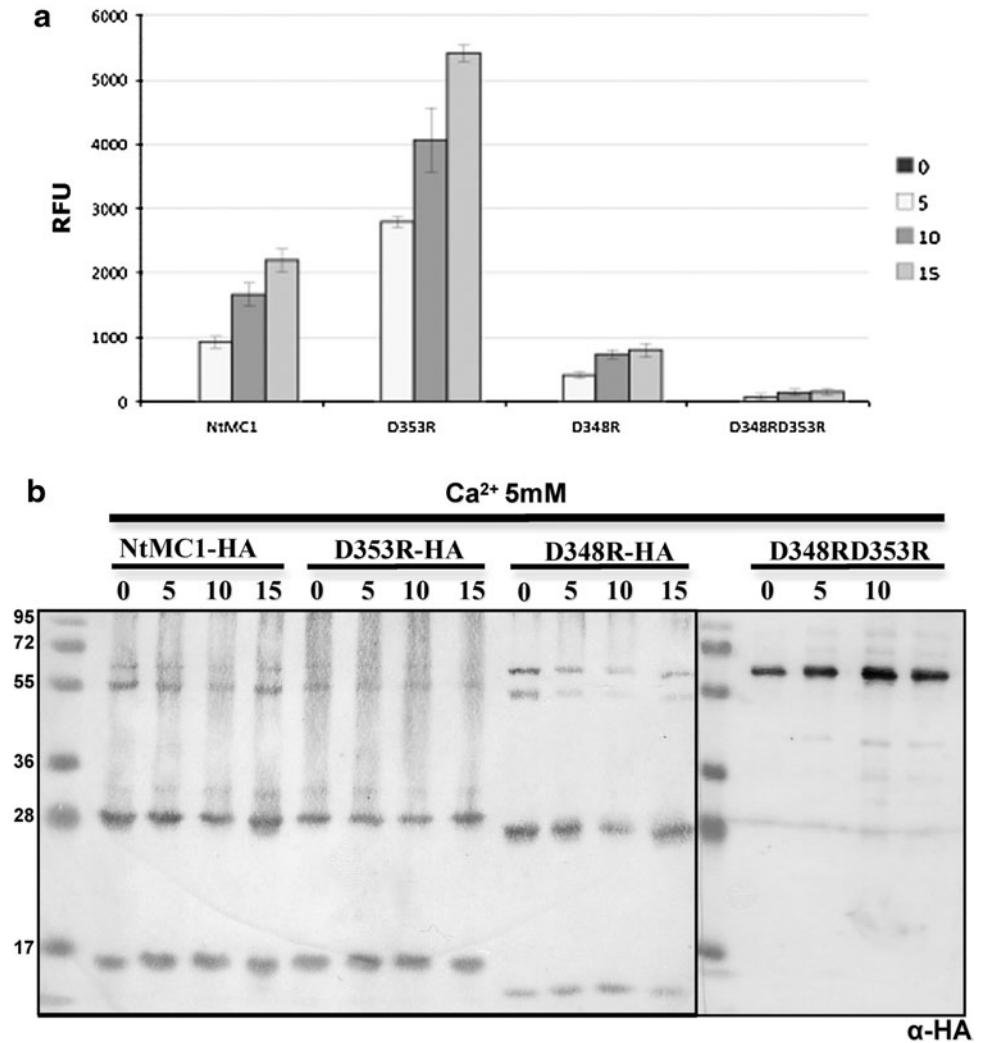
It was previously demonstrated using a purified metacaspase that the processing reaction was essentially an

intramolecular event (Watanabe and Lam 2011b). We tested this possibility using the transient expression system. For that, we co-infiltrated *A. tumefaciens* containing a VSVG-tagged wild-type NtMC1 with bacteria bearing a HA-tagged C139V or HA-tagged H86S NtMC1. While the wild-type NtMC1 was correctly processed, only the unprocessed form was visible in both mutants in the presence of the wild-type protein (Fig. 7a), suggesting that processing occurs exclusively, or at least predominantly, intramolecularly. In another experiment designed to test possible interactions between the putative p20 from one molecule with the putative p10 from another molecule, we co-infiltrated *A. tumefaciens* carrying NtMC1-C139V-HA with *Agrobacterium* containing NtMC1-D348RD353R-HA. Cys139 is located in p20, while Asp348 and Asp353 are found in p10. No processing could be observed, indicating that there was no intermolecular complementation (Fig. 7b).

Discussion

Since the discovery of metacaspases in plants, protozoa, and fungi (Uren et al. 2000), there have been some efforts

Fig. 4 Enzymatic activities of NtMC1 and mutants derivatives expressed in *E. coli*. **a** Bacterial cultures containing expression vectors for C-terminally HA-tagged wild-type (WT) and mutant NtMC1 were treated as in Fig. 3. RFU relative fluorescence units. **b** Proteins from the extracts used for activity determination were separated by PAGE and blotted onto a nylon membrane. Blots were probed with anti-HA



to understand their role in cell death and the mechanism regulating the processing and activation of the zymogen. In plants, evidence has been published assigning a function for metacaspases in cell death for only few cases (Suarez et al. 2004; He et al. 2008; Coll et al. 2010; Watanabe and Lam 2011a). More knowledge has been accumulated concerning biochemical properties of these enzymes (Vercammen et al. 2004, 2006; Watanabe and Lam 2005, 2011b; Bozhkov et al. 2005; Belenghi et al. 2007; He et al. 2008; Helmersson et al. 2008).

We report here the sequence, cloning, and initial characterization of a type II metacaspase of *N. tabacum*. MSA and 3D structure modeling, supported by a mutant analysis, allow us to identify sites for activity and processing. Analysis of the MSA revealed amino acid residues that are conserved among all or most of the individual metacaspase family members, as well as some differences between type I and II metacaspases (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1). Those conserved regions or positions indicate residues supposedly under stronger evolutionary constraints, and thus

might be more important for the protein to fulfill its function. Moreover, residues that are specifically conserved in subfamilies point to sequence changes that occurred during the divergence of a common ancestor, and they imply functional changes or the acquisition of a modified specificity.

Based on sequence alignment with caspases, it was postulated that three aspartates form the S1 pocket that coordinate the P1 residue of the substrate (Vercammen et al. 2004), these correspond to Asp25, Asp137, and Asp348 in NtMC1 (Fig. 1). However, in our prediction of the NtMC1 3D structure (Fig. 2), Asp348 was located far from the catalytic and the other aspartate residues. For that reason we proposed that Asp353 together with Asp25 and Asp137 forms the S1 pocket. An alignment (Supplemental Table S4) shows that both Asp 348 and Asp353 correspond to Asp260 and Asp266 that are part of the 280-loop in *T. brucei* MCA2 (McLuskey et al. 2012). The MCA2 280-loop is a disordered loop region at the putative subunit p10 of this metacaspase and could play a role in substrate binding. Ca²⁺ induces a conformational change in the position

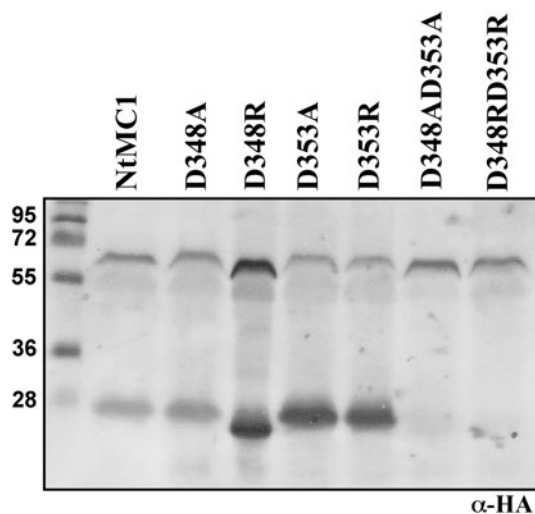


Fig. 5 Expression in *N. benthamiana* of NtMC1 and mutants in D348 and D353. Leaves of *N. benthamiana* plants were infiltrated with cultures of *Agrobacterium* containing plasmids for the expression of C-terminally HA-tagged wild-type NtMC1 and mutant versions. Proteins extracts were separated by PAGE and used for immunoblot analysis. Blots were probed with anti-HA

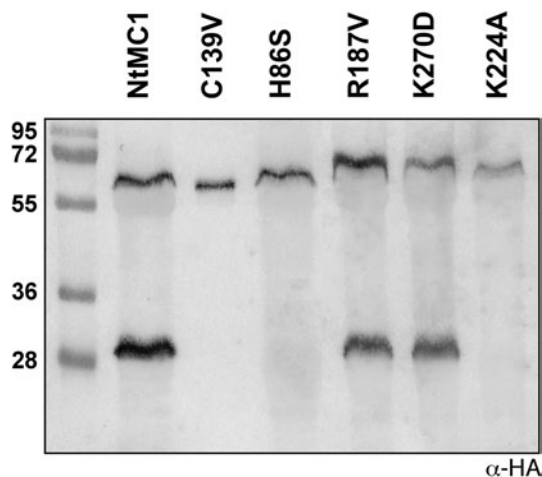


Fig. 6 Expression of NtMC1 and mutant derivatives in *N. benthamiana*. Leaves of *N. benthamiana* plants were infiltrated with cultures of *Agrobacterium* containing plasmids for the expression of C-terminally HA-tagged wild-type NtMC1 and mutant versions. Proteins extracts were separated by PAGE and used for immunoblot analysis. Blots were probed with anti-HA

of this loop that would stabilize substrate binding (McLuskey et al. 2012). Yeast metacaspase Yca1 has an equivalent loop, L3 loop, which functions as the basis of the substrate-binding groove (Wong et al. 2012). Interestingly, the consensus sequence SGCXDXQTSADV (underlined residues correspond to Asp348 and Asp353 in NtMC1), is found in the N-terminus of type III metacaspases (Choi and Berges 2013). This sequence is not only well conserved in type I

and type II metacaspases (consensus for type I metacaspases: SGCDDDQTSADT and for type II metacaspases: SGCQTDQTSADA, Supplemental Fig. S1) but also in fungal, bacterial and *T. brucei* metacaspases (Supplemental Table S4). This consensus sequence contains the *T. brucei* MCA2 280-loop and the Yca1 L3 loop, stressing its importance for metacaspase functionality.

It is worth noting that Asp353 is better conserved than Asp348 in plant metacaspases. Asp353 is present in an equivalent position in all type II metacaspases analyzed in Supplemental Fig. S1 and in almost all type I metacaspases, with the only exception of AtMC3. On the contrary, several type I and II metacaspases lack an aspartate in a position equivalent to Asp348. According to this, we evaluated the possible role of Asp353 in S1 pocket formation by analyzing the activity and the autoprocessing capacity of NtMC1-D353A and NtMC1-D353R in *E. coli* or *N. benthamiana* leaves. However, both mutant proteins behave just as the wild-type metacaspase (Figs. 3, 4, 5), with the exception that NtMC1-D353R has a higher activity (Fig. 4a). On the other hand, the substitution of Asp348 by Ala has no effect on activity or autoprocessing; nevertheless, its substitution by Arg alters the site of processing and decreases the activity (Figs. 4, 5). Although it is not possible to draw a clear conclusion before resolution of the crystal structure of NtMC1, we can speculate on the basis of sequence and structural similarities between NtMC1 and *T. brucei* MCA2 or yeast metacaspases that the substitutions by arginines of the aspartates in the equivalent loop of NtMC1 alter its allosteric conformational change and, therefore, its activity. Which is harder to understand is how the substitution of Asp348 by Arg changes the autoprocessing point. Finally, the fact is that double mutants NtMC1-D348AD353A or NtMC1-D348RD353R are inactive (Figs. 3, 4) indicates that any of these aspartates could be used to conform the S1 pocket. As mentioned above Ca^{2+} induces a conformational change in the 280-loop containing the equivalent aspartates to Asp348 and Asp353 in *T. brucei* MCA2. This could explain why the movement of the loop provoked by Ca^{2+} could bring Asp348 closer to the S1 pocket, even when in our model, Asp348, is far in space from the other aspartate residues. Again, the final answer could come with the resolution of the crystal structure of NtMC1. It is worth mentioning that residues involved in Ca^{2+} binding in *T. brucei* MCA2 are conserved in NtMC1 (Asp103, Asp116, Asp117 and Asp146, see Supplemental Fig. S4), thus supporting our hypothesis.

When expressed in *E. coli* or transiently in *N. benthamiana* leaves, NtMC1 undergoes processing (Figs. 3, 4, 5), indicating that no additional factor is required and, therefore, the reaction must be autocatalytic. The catalytic site of metacaspases and related proteases is constituted by a cysteine and a histidine. Both residues are conserved in

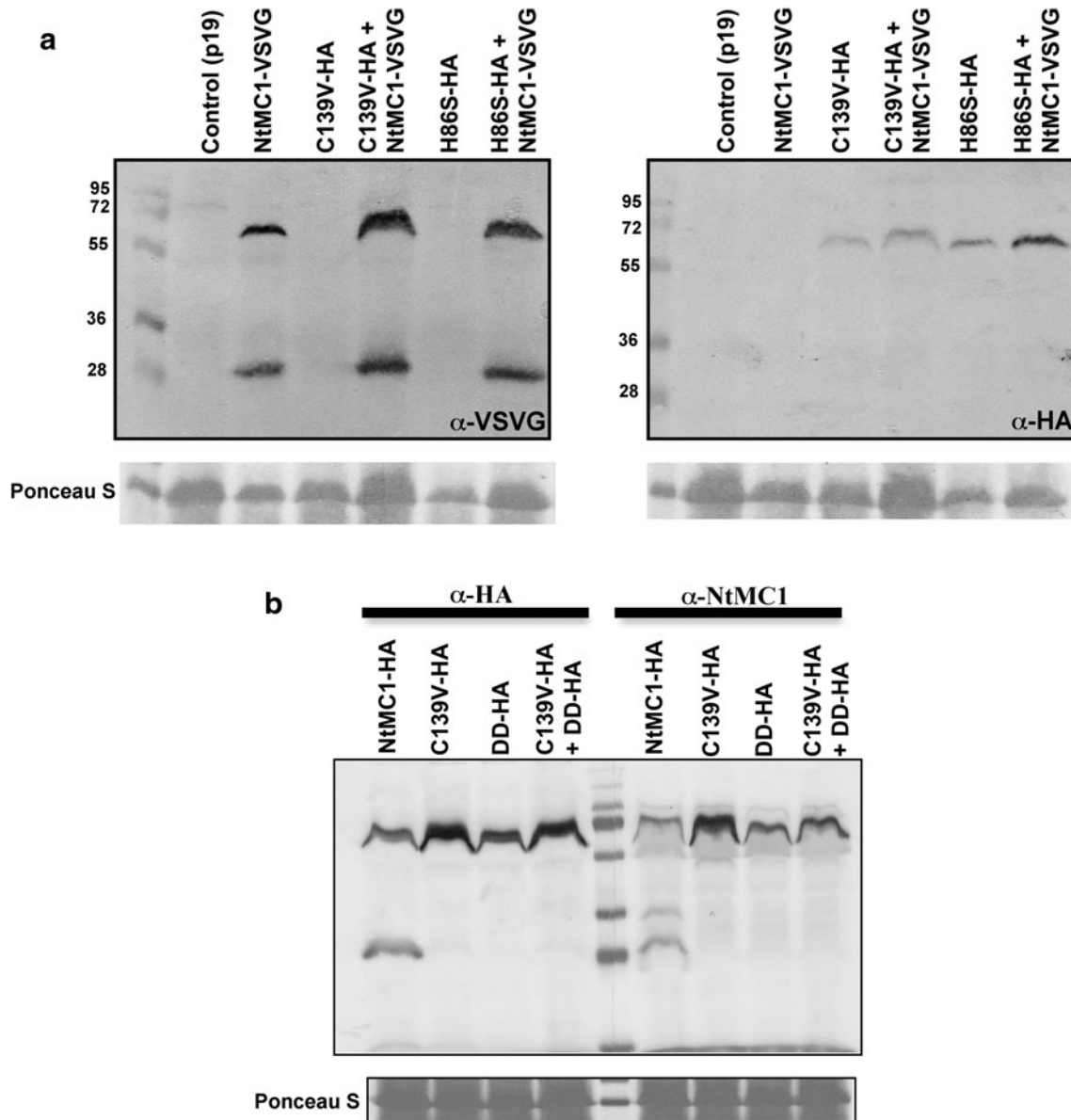


Fig. 7 NtMC1 processing is largely intramolecular. **a** *Agrobacterium*-mediated transient expression in *N. benthamiana* leaves of VSVG-tagged wild-type NtMC1 and/or HA-tagged NtMC1-C139V or NtMC1-H86S. Proteins were separated by PAGE and blotted onto a nylon membrane. Blots were probed with anti-VSVG (*left*) or anti-HA (*right*). **b** NtMC1 mutants C139V or D348RD353R (DD) were

transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves. Both mutants alone and the wild-type NtMC1 were also transiently expressed as controls. Protein extracts were separated by PAGE and used for immunoblot analysis. Blots were probed with anti-HA or anti-NtMC1. The Ponceau staining of the membrane is shown as a control of protein loading

NtMC1 (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1). When any of them is replaced, the enzyme becomes inactive as was evidenced by the lack of activity and processing in *E. coli* and lack of processing in *N. benthamiana* (Figs. 3, 4, 6), strengthening the conclusion that processing is autocatalytic. According to our analysis of transiently expressed NtMC1 fragments (Supplemental Fig. S2), the cut takes place in K224. As shown in *in vitro* and *in vivo* experiments for AtMC4 (Watanabe and Lam 2011b) and in *in*

vitro experiments for AtMC9 (Vercammen et al. 2004), the first cut is located in an equivalent lysine or arginine residues, respectively. The alignment in Supplemental Fig. S1 shows that in all plant metacaspases analyzed an arginine or a lysine present in this position. When K224 was replaced by alanine, no processing could be observed (Fig. 6), indicating that this residue is the autoprocessing site as shown for AtMC4 and AtMC9. On the contrary, mutations in R187 or K270 did not avoid the cleavage of NtMC1. These

residues correspond to R188 and K269 in *P. abies* mcII-Pa, which were found to be the sites for in vitro processing of this metacaspase (Bozhkov et al. 2005). Unlike K224, these amino acids are less conserved in metacaspases aligned in Supplemental Fig. S1, suggesting that they could be secondary sites for cleavage in mcII-Pa. As proposed for AtMC4, after the first cut in K225, equivalent to K224 in NtMC1, subsequent cuts take place afterward (Watanabe and Lam 2011b). Nevertheless, we do not have any evidence suggesting that such processing could occur in vivo. Therefore, the processing of AtMC4 could be an artifact associated to the in vitro analysis or an unknown signal that is required in vivo to trigger the cleavage of metacaspases to smaller pieces. Since our analysis was performed in *N. benthamiana* leaves, we suggest that the results reflect more closely how metacaspases are processed.

As reported for AtMC4 in an in vitro experiment (Watanabe and Lam 2011b), processing is predominantly intramolecular. We performed similar experiments in a transient expression system and found comparable results, namely, that the wild-type NtMC1 was not able to cut inactive mutants when they were co-expressed in *N. benthamiana* leaves (Fig. 7a). We also tested possible interactions between two different metacaspase molecules co-expressing in a mutant, the active site NtMC1-C139 V, located in the putative p20, and in the mutant NtMC1-D348RD353R with both Asp348 and 353 located in the putative p10. We were not able to detect the 29 kDa protein, one of the products of the processing event, suggesting that no complementation between wild-type p20 and p10 has occurred (Fig. 7b). We tried to demonstrate unsuccessfully the interaction between p20 and p10 in a yeast two-hybrid assay, using both wild-type and inactive p20 (not shown). Experiments with AtMC4, mixing recombinant p10 and p20 did not yield an active enzyme (Watanabe and Lam 2011b). Hence, it is not clear to date how an active metacaspase is built and what is the role of autoprocessing in the activation of these enzymes might be. Nevertheless, for the first time we demonstrate the functionality of the putative p10 subunit in a plant metacaspase. In addition, our transient expression experiments provide a closer view of what must take place in the plant concerning the autoprocessing of metacaspases and supply a tool to analyze the factors that promote the activation of these enzymes.

Acknowledgments We thank Patricia Rueda for technical assistance, Eugenio López-Bustos and Paul Gaytán for oligonucleotide synthesis and Jorge Yáñez for sequencing. This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Grant No. 58761) and the International Foundation for Science (Grant C/4702-1). A A-M, E S-G and L S-B were supported by CONACYT fellowships. A A-M wants to acknowledge to Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. The present work is as a part of the requirements for obtaining his PhD degree.

References

- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackener A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by *S*-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 282:1352–1358
- Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg DA (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253:164–170
- Bozhkov PV, Suarez MF, Filonova LH, Daniel G, Zamyatnin AA Jr, Rodriguez-Nieto S, Zhitovskiy B, Smertenko A (2005) Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14463–14468
- Cambra I, Garcia FJ, Martinez M (2010) Clan CD of cysteine peptidases as an example of evolutionary divergences in related protein families across plant clades. *Gene* 449:59–69
- Castillo-Olamendi L, Bravo-García A, Morán J, Rocha-Sosa M, Porta H (2007) AtMCP1b, a chloroplast-localised metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection. *Funct Plant Biol* 34:1061–1071
- Choi CJ, Berges JA (2013) New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death Differ* 4:e490. doi:10.1038/cddis.2013.21
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, Van Breusegem F, Dangl JL, Epple P (2010) *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science* 330:1393–1397
- Curtis M, Grossniklaus U (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462–469
- Dudkiewicz MZ, Piszczek E (2012) Bacterial putative metacaspase structure from *Geobacter sulfurreducens* as a template for homology modeling of type II *Triticum aestivum* metacaspase (TaeM-CAII). *Acta Biochim Pol* 59:401–406
- Frangioni JV, Neel BG (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione *S*-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210:179–187
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384:201–232
- Hao L, Goodwin PH, Hsiang T (2007) Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and the effect of silencing the gene on the host response. *Plant Cell Rep* 26:1879–1888
- He R, Drury GE, Rotari VI, Gordon A, Willer M, Farzaneh T, Woltering EJ, Gallois P (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283:774–783
- Helmersson A, von Arnold S, Bozhkov PV (2008) The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiol* 147:1158–1167
- Hoerberichts FA, ten Have A, Woltering EJ (2003) A tomato metacaspase gene is unregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea* infected leaves. *Planta* 217:517–522
- Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1996) Errors in protein structures. *Nature* 381:272
- Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4:363–371
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948

- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss D, Thornton JM (1993) Procheck-a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291
- McLuskey K, Rudolf J, Proto WR, Isaacs NW, Coombs GH, Moss CX, Mottram JC (2012) Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7469–7474
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Piszczek E, Dudkiewicz M, Mielecki M (2012) Biochemical and bioinformatic characterization of type II metacaspase protein (TaeM-CAII) from wheat. *Plant Mol Biol Rep* 30:1338–1347
- Reape TJ, McCabe PF (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol* 180:13–26
- Sambrook JE, Fritsch F, Maniatis T (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Scheer JM, Ryan CA (2001) A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 298:130–132
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459–470
- Suarez MF, Filonova LH, Smertenko A, Savenkov EI, Clapham DH, von Arnold S, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2004) Metacaspase dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr Biol* 14:R339–R340
- Sundström JF, Vaculova A, Smertenko AP, Savenkov EI, Golovko A, Minina E, Tiwari BS, Rodriguez-Nieto S, Zamyatnin AA Jr, Välineva T, Saarikettu J, Frilander MJ, Suarez MF, Zavialov A, Ståhl U, Hussey PJ, Silvennoinen O, Sundberg E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2009) Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat Cell Biol* 11:1347–1354
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV (2011) Metacaspases. *Cell Death Differ* 18:1279–1288
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6:961–967
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliany M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* 18:1241–1246
- Vercammen D, van de Cotte B, De Jaeger G, Eeckhout D, Castells P, Vandepoele K, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Inze D, Van Breusegem F (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem* 279:45329–45336
- Vercammen D, Belenghi B, van de Cotte B, Beunens T, Gavigan J-A, De Rycke R, Brackenier A, Inzé D, Harris JL, Breusegem F (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J Mol Biol* 364:625–636
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33:949–956
- Watanabe N, Lam E (2005) Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J Biol Chem* 280:14691–14699
- Watanabe N, Lam E (2011a) Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *Plant J* 66:969–982
- Watanabe N, Lam E (2011b) Calcium-dependent activation and autolysis of *Arabidopsis* metacaspase 2d. *J Biol Chem* 286:10027–10040
- Wong AHH, Yan C, Shi Y (2012) Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem* 287:29251–29259
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinforma* 9:40
- Zhang Y, Lam E (2011) Sheathing the swords of death. Post-translational modulation of plant metacaspases. *Plant Signal Behav* 6:2051–2056