



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“NaStEP funciona como inhibidor de proteasas  
y como bloqueador de canales dependientes de voltaje”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

YURIDIA CRUZ GONZÁLEZ ZAMORA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Dr. Roberto Coria Ortega

Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., enero, 2021



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.



**SINODALES DESIGNADOS**  
**Presente**

Estimado académico:  
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 24 de agosto del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de Doctora **EN CIENCIAS** del/la estudiante **Cruz González-Zamora Yuridia**, con la tesis "**NaSTEP funciona como inhibidor de proteasas y como bloqueador de canales dependientes de voltaje**", dirigida por el/la Dr(á). **Cruz García Felipe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
<b>PRESIDENTE</b>	Plasencia de la Parra Francisco Javier	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	18/11/20 fecha		firma
<b>VOCAL</b>	Martínez Barajas Eleazar	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	17/11/20 fecha		firma
<b>VOCAL</b>	Guevara García Angel Arturo	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	16/11/20 fecha		firma
<b>VOCAL</b>	González Segura Lilian	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	18/11/20 fecha		firma
<b>SECRETARIO</b>	Cárdenas Torres Luis	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	19/11/20 fecha		firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de agosto de 2020

**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**  
**Coordinadora**

## Reconocimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

Se reconoce al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por el apoyo económico para mi asistencia a varios congresos nacionales y uno internacional.

Se reconoce la colaboración con el Dr. Jesús García Valdés del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM donde se llevaron a cabo los ensayos electrofisiológicos presentados en este trabajo.

El trabajo fue financiado por el CONACyT 236602 y por el PAIP IN220919. Durante mi doctorado, gocé de una beca otorgada por el CONACyT.

El jurado de Examen Doctoral estuvo formado por:

Presidente	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Vocal	Dr. Eleazar Martínez Barajas
Vocal	Dr. Angel Arturo Guevara García
Vocal	Dra. Lilián González Segura
Secretario	Dr. Luis Cárdenas Torres

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Felipe Cruz García por su guía, comprensión y dedicación.

A mis amigos Edgar Nájera Torres, Lilia Angélica Bernal Gracida y Javier Andrés Juárez Díaz por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

## Índice

<b>RECONOCIMIENTOS</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>BARRERAS GENÉTICAS A LA AUTOPOLINIZACIÓN EN LAS ANGIOSPERMAS</b> .....	12
<b>SISTEMA DE AI BASADO EN LA ACTIVIDAD DE LAS S-RNASAS</b> .....	14
<b>GENES MODIFICADORES DEL SISTEMA DE AI EN SOLANACEAE</b> .....	17
<b>ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EL SISTEMA DE AI DE SOLANACEAE</b> .....	19
<b>ANTECEDENTES</b> .....	25
<b>HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	28
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>MATERIAL VEGETAL</b> .....	29
<b>PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NASTeP</b> .....	29
<b>COPURIFICACIÓN DE LA PROTEASA QUE DEGRADA A NASTeP</b> .....	30
<b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE LA SUBTILISINA UTILIZANDO AZO-CASEÍNA COMO SUSTRATO</b> .....	30
<b>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA</b> .....	31
<b>INMUNODETECCIÓN DE NASTeP EN CRUZAS COMPATIBLES</b> .....	31
<b>ENSAYO DE qRT-PCR</b> .....	32
<b>EXPRESIÓN DEL CANAL Kv 1.3 EN <i>XENOPUS</i></b> .....	33
<b>REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO EN OVOCITOS</b> .....	33
<b>ANÁLISIS POR BLAST DE LAS SECUENCIAS TIPO SUBTILISINA</b> .....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>UNA PROTEASA DEGRADA A NASTeP EN EL PISTILO</b> .....	35
<b>NASTeP ES DEGRADADA EN LOS TUBOS POLÍNICOS DE CRUZAS COMPATIBLES</b> .....	39
<b>NASTeP INHIBE ESPECÍFICAMENTE A LA SER-PROTEASA SUBTILISINA DE MANERA DOSIS DEPENDIENTE</b> .....	41
<b>LA SUBTILISINA PROCESA A NASTeP EN AL MENOS DOS FORMAS</b> .....	44
<b>EL GENOMA DE <i>NICOTIANA ALATA</i> ESTÁ CODIFICADA UNA PROTEÍNA TIPO SUBTILISINA</b> .....	47
<b>NASTeP ADEMÁS DE SER INHIBIDOR DE PROTEASA TIENE ACTIVIDAD COMO BLOQUEADOR DE CANALES DEPENDIENTE DE VOLTAJE</b> .....	50
<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	63
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64
<b>ANEXO 1</b> .....	70

## Índice de Figuras

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE UNA FLOR HERMAFRODITA. ....	12
FIGURA 2. LA HETEROSTILIA FOMENTA LA POLINIZACIÓN CRUZADA. ....	13
FIGURA 3. LAS DETERMINANTES DE LA AI NO INTERACCIONAN DE LA MISMA MANERA. ....	16
FIGURA 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PROTEASA SUBTILISINA. ....	21
FIGURA 5. EJEMPLO DE UN INHIBIDOR DE PROTEASAS TIPO KUNITZ. ....	24
FIGURA 6. NASTÉP ES UN INHIBIDOR DE SUBTILISINA ....	25
FIGURA 7. PURIFICACIÓN DE NASTÉP MEDIANTE DOS PASOS CROMATOGRÁFICOS DE INTERCAMBIO IÓNICO Y UNO DE FILTRACIÓN MOLECULAR. ....	35
FIGURA 8. EL PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE NASTÉP RESULTA EN FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE LA PROTEÍNA. ....	36
FIGURA 9. LAS FRACCIONES MÁS ENRIQUECIDAS CON NASTÉP NO PRESENTAN ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE PROTEASAS. ....	37
FIGURA 10. NASTÉP SE DEGRADA EN LAS FRACCIONES QUE NO PRESENTAN ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE PROTEASA ....	38
FIGURA 11. NASTÉP COPURIFICA CON UNA PROTEASA. ....	39
FIGURA 12. NASTÉP SE DEGRADA EN UNA CRUZA COMPATIBLE. ....	41
FIGURA 13. HOMOLOGACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA. ....	42
FIGURA 14. NASTÉP INHIBE ESPECÍFICAMENTE A LA SUBTILISINA, UNA PROTEASA DE SERINA. ....	43
FIGURA 15. LA SUBTILISINA DEGRADA PARCIALMENTE A NASTÉP ....	44
FIGURA 16. LA DEGRADACIÓN PARCIAL DE NASTÉP POR LA SUBTILISINA RESULTA EN DOS ESPECIES DE MENOR MASA MOLECULAR. ....	45
FIGURA 17. NASTÉP INHIBE IRREVERSIBLEMENTE A LA SUBTILISINA. ....	46
FIGURA 18. EL GENOMA DE N. ALATA CODIFICA UNA SUBTILASA DE LA FAMILIA S8. ....	48
FIGURA 19. LA PROTEÍNA TIPO SUBTILISINA DE N. ALATA SE AGRUPA CON UNA SUBTILASA DE N. BENTHAMIANA. ....	49
FIGURA 20. LA PROTEÍNA TIPO SUBTILISINA DE N. ALATA SE EXPRESA EN TEJIDOS REPRODUCTIVOS. ....	50
FIGURA 21. NASTÉP TIENE ACTIVIDAD COMO BLOQUEADOR DE CANALES DEPENDIENTES DE VOLTAJE. ....	52
FIGURA 22. MODELO DE LA FUNCIÓN DUAL DE NASTÉP DURANTE LA RESPUESTA DE AI EN N. ALATA. ....	61

## Resumen

La autoincompatibilidad (AI) se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil de generar cigotos después de la polinización. Estos mecanismos promueven la polinización cruzada incrementando la variabilidad genética de una especie. Se encuentran presentes en 71 familias de las angiospermas.

Este trabajo tomó como modelo de estudio la especie *Nicotiana glauca*, la cual pertenece a la familia de las Solanáceas donde el sistema de AI está basado en la interacción entre la determinante femenina, la S-RNasa y la masculina, las SLFs. Además de este par de proteínas, para que la respuesta del rechazo del propio polen se lleve a cabo exitosamente, se requieren otras más; una de ellas es NaStEP, un inhibidor de proteasas tipo Kunitz que se expresa en las células estigmáticas de especies AI de *Nicotiana*. Su función en la respuesta de AI aún no está del todo clara, sin embargo, ensayos de pérdida de función demuestran que es esencial en la vía. Otros estudios, mostraron que NaStEP es un regulador positivo en la estabilidad de HT-B, una proteína involucrada en la degradación de la vacuola que contiene a las S-RNasas en el citoplasma del tubo polínico. Durante una cruce compatible HT-B es degradada a diferencia de lo que sucede en una cruce incompatible, donde permanece estable aún después de 72 h post polinización. Este hecho condujo al estudio de la estabilidad de NaStEP en una cruce compatible encontrando que al igual que HT-B, NaStEP es degradada posiblemente por una proteasa tipo subtilisina.

Al estudiar el mecanismo de inhibición que presenta NaStEP, se encontró que es específica para la Ser-proteasa subtilisina y que es dosis dependiente. Además, esta inhibición es irreversible y se puede catalogar como suicida, ya que NaStEP está siendo procesada por la propia subtilisina en dos sitios: en el primero pierde parte del extremo carboxilo, conservando el sitio reactivo y en el segundo pierde, además, el sitio reactivo.

Dado que varios miembros de la familia de inhibidores tipo Kunitz presentan una doble función, como inhibidores de proteasas y como bloqueadores de canales



dependientes de voltaje se evaluó la capacidad de NaStEP para bloquear canales. Para este experimento, se sobreexpresó el canal de humano dependiente de voltaje Kv 1.3 en ovocitos de *Xenopus laevis* y se incubaron con NaStEP. Los resultados muestran que, en efecto, NaStEP se comporta como un bloqueador de canales irreversible.

Finalmente, se propone un modelo donde la participación de NaStEP en el mecanismo bioquímico del rechazo S-específico del polen en *Nicotiana glauca* podría ser mediante su función como inhibidor de proteasas o como bloqueador de canales dependientes de voltaje o a través de ambas.

## Abstract

Self-incompatibility (SI) is defined as the inability of a fertile hermaphroditic plant to generate zygotes after pollination. These mechanisms promote cross pollination by increasing the genetic variability of a species. They are present in 71 families of angiosperms.

This work took as a study model the species *Nicotiana glauca*, which belongs to the Solanaceae family where the AI system is based on the interaction between the female determinant, S-RNase, and the male, SLFs. In addition to this pair of genes, for the pollen rejection response to be carried out successfully, others are required; one of them is NaStEP, a Kunitz-type protease inhibitor that is expressed in stigmatic cells of self-incompatible *Nicotiana* species. Its role in the SI response is still not entirely clear, however loss-of-function assay showed that it is essential in the SI pathway. Other studies showed that NaStEP is a positive regulator in the stability of HT-B, a protein involved in the degradation of the vacuole that contains S-RNases in the cytoplasm of the pollen tube. During a compatible cross, HT-B is degraded unlike what happens in an incompatible cross, where it remains stable even after 72 h post pollination. This fact led us to study the stability of NaStEP in a compatible cross and we found that like HT-B, NaStEP is degraded and that a subtilisin-type protease may be responsible for this degradation.

Studying the inhibition mechanism presented by NaStEP, we found that it is specific for the Ser-protease subtilisin in a dose dependent manner. Furthermore, this inhibition is irreversible and can be classified as suicidal, since NaStEP is being processed by subtilisin itself in two ways: the first loses part of the carboxyl end, preserving the reactive site and the second loses, in addition, the reactive site. Since several members of the Kunitz-type inhibitor family have a dual function, as protease inhibitors and as voltage-gated channel blockers, we evaluated the ability of NaStEP to block channels. For this experiment, the human Kv 1.3 voltage-gated channel was overexpressed in *Xenopus laevis* oocytes and then incubated with NaStEP. The results show that NaStEP really behaves as an irreversible channel blocker.

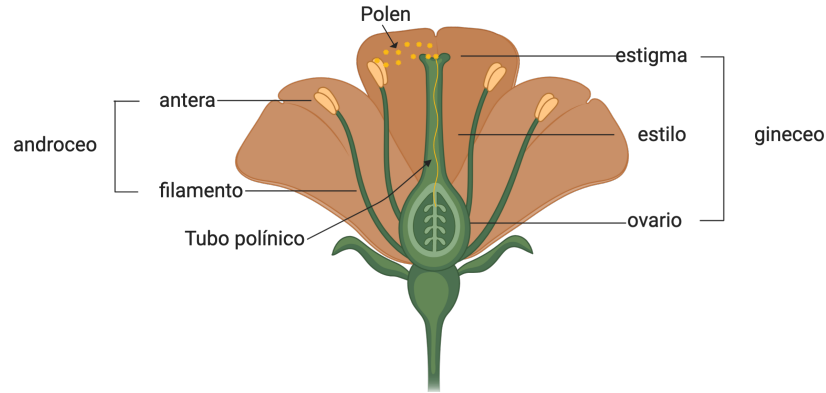
Finally, we propose a model where NaStEP might fits into the biochemical mechanism of S-specific pollen rejection in *Nicotiana alata* by its protease inhibition function or by its ability to block voltage dependent channels or both functions.

## Introducción

Las angiospermas incluyen cerca de 400,000 especies contenidas en 400-500 familias. Presentan una gran variedad en cuanto a características vegetativas y reproductivas, siendo la envoltura de los óvulos en el tejido carpelar y el crecimiento de los tubos polínicos hacia los óvulos a través del estilo, las características principales que las distinguen de otras especies vegetales (Thomas N. Taylor, 2008; Wu, 2008).

La mayoría de las angiospermas (cerca del 90%) son hermafroditas, es decir, poseen los órganos reproductivos de ambos sexos en la misma flor en dos verticilos independientes, el androceo (masculino) y el gineceo (femenino), lo que permite tanto la autopolinización como la polinización cruzada (Figura 1). Este grupo de plantas presenta varios síndromes de polinización, es decir, características morfo-anatómicas que involucran, en cada grupo, diferentes agentes capaces de transferir el polen de una flor a otra. Estos agentes promueven la polinización cruzada a través de vectores bióticos, como los insectos (entomofilia), aves (ornitofilia), murciélagos (quirofilia), o abióticos, como el agua (hidrofilia) y el viento (anemofilia) (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

El hecho de que ambos órganos sexuales se encuentren muy cercanos el uno del otro sugiere que la autofecundación sería el mecanismo de reproducción por excelencia; sin embargo, lo anterior no es del todo correcto, ya que hasta el momento se estima que al menos el 36.7% de las angiospermas son autoincompatibles (rechazan su propio polen) y que esta condición se presenta en al menos 100 familias (Fujii *et al.*, 2016; Iqbal *et al.*, 2008).



**Figura 1. Estructura de una flor hermafrodita.** La parte femenina (gineceo) está formada por el estigma, el estilo y el ovario mientras que la masculina (androceo) por antera (donde se produce el polen) y el filamento. El tubo polínico es la estructura resultante de la germinación del polen en el estigma, la cual lleva los núcleos espermáticos hasta el ovario.

### **Barreras genéticas a la autopolinización en las angiospermas**

En varios grupos de angiospermas se han identificado diferentes barreras que evitan la autopolinización y, por ende, la autofecundación. Estas pueden ser físicas o fisiológicas y todas fomentan la polinización cruzada. La heterostilia es un ejemplo de ellas; esta adaptación es un polimorfismo genético en el cual los órganos sexuales de un individuo se encuentran dispuestos en diferentes niveles. Lo más común es encontrar dos morfos distintos los cuales se detallan en la figura 2 (Barrett, 2019; Baskin and Baskin, 2014). Sin embargo, la barrera que se considera como aquella que impide la autofecundación con una mayor eficiencia (cerca del 100%) es la genética que imponen los sistemas de autoincompatibilidad. Se ha propuesto la existencia de una presión evolutiva por mantener los sistemas de incompatibilidad en las angiospermas, ya que en términos evolutivos la Autofecundación es un callejón sin salida que, a nivel de especie, lleva a la extinción (Fujii *et al.*, 2016). Un estudio en la familia *Solanaceae* demostró que la tasa de especiación para las especies autocompatibles de esta familia, a corto plazo, es mayor en comparación con las especies incompatibles; sin embargo, esta

aparente ventaja se ve acaecida ya que la tasa de extinción de las especies autocompatibles excede a la que presentan las especies AI por lo que los autores proponen que existe una fuerte selección de especies que favorece a los sistemas de autoincompatibilidad y que, justo, el origen y mantenimiento de estos sistemas han jugado un papel crucial en la vasta diversidad de las angiospermas (Goldberg *et al.*, 2010)



**Figura 2.** La heterostilia fomenta la polinización cruzada. En A se muestra la forma **L** donde el pistilo sobresale por arriba de las anteras a diferencia de B donde las anteras se localizan por arriba del pistilo (morfo **S**). Flores de *Prímula vulgaris* (Huu *et al.*, 2016).

En 1876, Charles Darwin describió el fenómeno de la autoincompatibilidad sexual en plantas:

“It is an extraordinary fact that with many species, flowers fertilised with their own pollen are either absolutely or in some degree sterile; if fertilised with pollen from another flower on the same plant, they are sometimes, though rarely, a little more fertile; if fertilised with pollen from another individual or variety of the same species, they are fully fertile...” (DYER, 1877)

de Nettancourt, (2001) definió al fenómeno de la autoincompatibilidad (AI) en las angiospermas como “la incapacidad de una planta hermafrodita fértil de producir cigotos después de la autopolinización”.

La AI es una barrera reproductiva genéticamente controlada que permite al pistilo reconocer y distinguir entre el polen “propio” del “no propio” para rechazar a su propio polen y aceptar al proveniente de otro genotipo de la misma especie (Takayama e Isogai 2005, Franklin-Tong 2008). En la mayoría de los casos, esta selección está controlada por una determinante femenina y una masculina, ambas codificadas por genes multialélicos estrechamente ligados en el locus *S* (Takayama and Isogai, 2005; Franklin-Tong, 2008; Iwano and Takayama, 2012;).

Las familias Solanaceae, Rosaceae, Plantaginaceae y Rutaceae poseen el mismo mecanismo de rechazo del polen, el cual se basa en la acción citotóxica de una ribonucleasa llamada S-RNasa (ribonucleasa del locus *S*) y de un conjunto de proteínas denominadas SLF (proteínas con caja F del locus *S*) (McClure *et al.*, 1989; Kubo *et al.*, 2010; Muñoz-Sanz *et al.*, 2020).

### **Sistema de AI basado en la actividad de las S-RNasas**

Las S-RNasas que representan la parte femenina de la respuesta de AI son glicoproteínas de secreción en las que, en su estructura primaria pueden identificarse cinco regiones conservadas (C1 a C5) y dos regiones hipervariables (HV1 y HV2) entre los diferentes alelos (Ioerger *et al.*, 1991); son altamente polimórficas (comparten desde un 35 a un 96% de similitud en secuencia aminoacídica) y presentan una masa molecular de entre 22 y 34 kDa. Se expresan específicamente en el pistilo, mostrando un gradiente desde el estigma, a lo largo del estilo y, en menor proporción, en la epidermis interna del ovario (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987). Durante el desarrollo floral, la expresión de las S-RNasas aumenta hacia la antesis (momento en que abre la flor), coincidiendo así con la capacidad del pistilo de rechazar su propio polen (Anderson *et al.*, 1986). Las S-RNasas pertenecen a la familia de las T2 ribonucleasas. Los miembros de esta familia son endonucleasas tipo transferasas que producen mono u oligonucleótidos con un fosfato 3´ terminal a través de un intermediario de fosfato cíclico 2´, 3´. Por lo general, no presentan especificidad estricta en el corte, es decir, pueden cortar en cualquiera de las cuatro bases del RNA (MacIntosh, 2011).

La actividad de ribonucleasa de las S-RNasas es esencial para que se lleve a cabo el rechazo del polen propio ( Lee *et al.*, 1994; McClure *et al.*, 1994). Estas glicoproteínas, son capaces de degradar el RNA del tubo polínico, lo que conlleva a la inhibición de su crecimiento dentro del pistilo y finalmente, provoca su muerte (Wang *et al.*, 2009).

La determinante masculina, también codificada en el locus *S*, consiste en realidad de un conjunto de proteínas con caja F en el extremo amino al que deben su nombre (SLF) (Lai *et al.*, 2002; Sijacic *et al.*, 2004 Kubo *et al.*, 2010). Este motivo está presente en muchas proteínas involucradas en la degradación de otras proteínas vía el proteosoma 26S como parte del complejo E3 ubiquitin ligasa (Chang B *et al.*, 1996). Además, se ha determinado que las proteínas con caja F están asociadas a otros procesos tales como la regulación del ciclo celular, señalización, defensa y desarrollo (Lechner *et al.*, 2006).

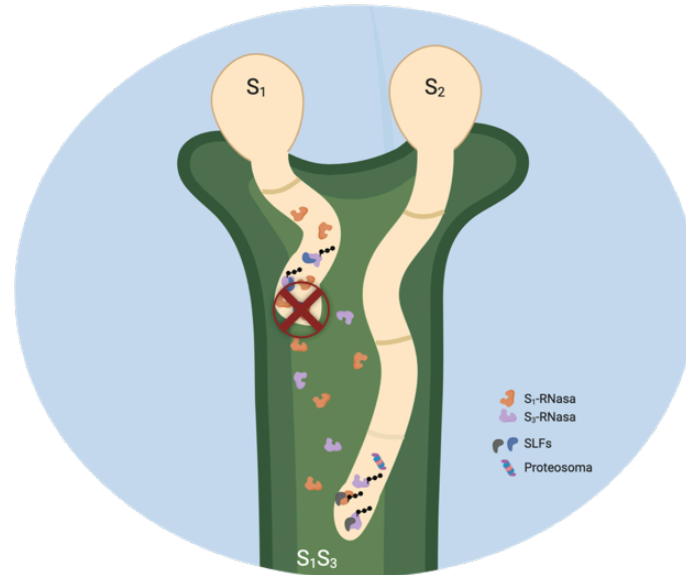
Los genes que codifican las SLF en especies incompatibles de *Petunia*, que son en las que hasta ahora se han descrito a mayor detalle, se determinó que de 16 a 20 genes *SLF* están ligados a uno solo de la S-RNasa, esto le permite al polen reconocer y evitar el efecto citotóxico de múltiples variantes alélicas de las S-RNasas al ingresar al tubo polínico (TP) (Kubo *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014). Se propone que la función de este grupo de proteínas es ubiquitinar a las S-RNasas no propias, enviándolas así a la vía de degradación del proteosoma 26S (Fujii *et al.*, 2016).

Una vez que el polen cae en el estigma, se hidrata y germina el TP. Las S-RNasas que se secretan a la matriz extracelular del pistilo ingresan al citoplasma del TP por un mecanismo aún no descrito, sin importar el haplotipo *S* de las mismas, es decir, hasta este momento no hay discriminación del polen propio (Luu *et al.*, 2000). En *Nicotiana glauca*, la mayor parte de las S-RNasas que ingresan al TP son secuestradas en vacuolas; se propone que una pequeña fracción de S-RNasas que no quedan en las vacuolas son la clave para interactuar con su contraparte masculina, las SLFs que son citoplasmáticas. Es justo esta interacción la que determina el destino de cada TP. En aquellos TP que sean reconocidos como “no



propios”, las S-RNasas no se liberan de las vacuolas, permitiendo su crecimiento hacia el ovario (cruza compatible); mientras que en los TP “propios”, se desencadena la respuesta de rechazo del polen (cruza incompatible), para lo cual es fundamental la liberación de las S-RNasas de las vacuolas (Goldraij *et al.*, 2006).

La S-RNasa y las SLFs interactúan tanto en una cruce compatible como en una incompatible pero no de la misma manera. En una cruce compatible, la interacción es más fuerte, promoviendo la ubiquitinación de la S-RNasa y su degradación vía el proteosoma 26S; las S-RNasas que se encuentran dentro de la vacuola, permanecerán contenidas permitiendo que el TP siga creciendo, llegue al ovario y lleve a cabo la fecundación. Por el contrario, en una cruce incompatible, la interacción de la S-RNasa y SLF es más débil y las S-RNasas escapan a la ubiquitinación. La vacuola que contiene a las S-RNasas se rompe liberándolas al citosol del TP, donde degradan el RNA, inhibiendo así el crecimiento del TP (Figura 3) (Goldraij *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011; Kubo *et al.*, 2015, 2010;).



**Figura 3. Las determinantes de la AI no interactúan de la misma manera.** En una cruce incompatible (polen con haplotipo  $S_1$  en pistilo con genotipo  $S_1S_3$ ) la interacción de SLFs con la  $S_1$ -RNasa es débil quedando libre en el citosol; por el contrario, en una cruce compatible (polen con haplotipo  $S_2$  en pistilo con genotipo

$S_1S_3$ ), la interacción SLFs con la  $S_1$ - y la  $S_3$ -RNasa es fuerte, lo que facilita su degradación vía el proteosoma 26S. Círculos negros=ubiquitinación Cruz roja=inhibición del crecimiento del TP.

## Genes modificadores del sistema de AI en Solanaceae

Además de las determinantes genéticas de la AI en *Nicotiana*, *Solanum* y *Petunia*, la vía también está integrada por otros genes codificados fuera del locus *S*, llamados genes modificadores (GM). Hasta el momento, por medio de ensayos de pérdida de función, se han identificado cuatro GM, tres que se expresan en el pistilo y uno del polen. En todos los casos, al silenciar el gen correspondiente (*HTB*, *120K*, *NaStEP*, *NaSIPP*) o por ganancia de función generando plantas con dominancia negativa, como es el caso de *NaTrxh*, donde se generaron plantas transgénicas de *Nicotiana* que expresan una versión mutante de *NaTrxh*, la cual es incapaz de reducir a la S-RNasa provocando que las plantas acepten su propio polen (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020a, 2020b) se abate la respuesta del rechazo del polen alelo *S* específico.

El primer gen modificador que se identificó fue *HT-B* (McClure *et al.*, 1999) (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Puerta *et al.*, 2009). HT-B es una proteína estilar de 8.2 kDa de masa molecular que tiene una región en el carboxilo rica en asparaginas. Esta proteína entra a los TP, se asocia a la membrana de la vacuola que contiene a las S-RNasas y permanece estable únicamente en cruza incompatibles, mientras que en cruza compatibles es degradada (Goldraj *et al.*, 2006).

Otro GM es *120K*, el cual codifica una glicoproteína, cuya masa varía de 70 a 120 kDa por su grado de glicosilación. Su expresión es muy abundante y específica en el estilo (Hancock *et al.*, 2005). La proteína 120K interacciona y forma complejos con otras proteínas estilares, como la misma S-RNasa (Cruz-García *et al.*, 2005) y al igual que HT-B, también ingresa a los TP. Una vez dentro de los TP, 120K se localiza delimitando la vacuola que contiene a las S-RNasas, tanto en una cruza

compatible como en una incompatible. Después de 36 h de la polinización, en una cruzada incompatible, los niveles de 120K disminuyen hasta no detectarse mientras que en una cruzada compatible la señal persiste (Goldraj *et al.*, 2006). Los ensayos de silenciamiento de *HT-B* y *120K* indican que ambos genes son cruciales para el rompimiento de la vacuola que contiene a las S-RNasas; sin embargo, es un mecanismo que aún no está claro cómo ocurre (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.* 2002; Hancock *et al.*, 2005; Goldraj *et al.*, 2006).

Otro gen esencial para el rechazo del polen por parte del pistilo es *NaStEP* (*Nicotiana alata* Stigma Expressed Protein). NaStEP es una proteína estigmática de 24 kDa que tiene homología con inhibidores tipo Kunitz de proteasas (Busot-González *et al.*, 2007 y Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Se propone que su función en la vía de AI es protegiendo a HT-B de la degradación en una cruzada incompatible (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

El único gen modificador que hasta la fecha ha sido identificado por parte del polen es *NaSIPP* (*Nicotiana alata* Self-Incompatible Pollen Protein). NaSIPP es una proteína mitocondrial de 38 kDa con actividad de transportador de fosfatos. Su transcrito se detecta específicamente en polen maduro de especies de *Nicotiana* tanto AC como AI. Sin embargo, en especies AC es poco probable que la expresión de este gen codifique una proteína funcional ya que presenta mutaciones acumuladas en su secuencia. Cuando se coexpresan NaSIPP y NaStEP en TPs, NaStEP se relocaliza del citosol hacia la mitocondria lo que implica que NaSIPP por medio de un mecanismo aún desconocido, acarrea a NaStEP hacia la mitocondria. Cuando se suprime la expresión de NaSIPP en granos de polen se pierde la capacidad de rechazar el polen propio. Se sugiere que la interacción de NaSIPP con NaStEP promueve la desestabilización de la mitocondria contribuyendo a la inhibición del crecimiento de los TPs en la respuesta de AI (García-Valencia *et al.*, 2017).

NaTrxh es otro gen crucial en la vía del rechazo del polen. Su producto es una tiorredoxina tipo *h* que se expresa preferencialmente en pistilos de especies AI de

*Nicotiana* y al igual que 120K, interacciona con la S-RNasa formando complejos estables (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Avila-Castañeda *et al.*, 2014). Además, Torres *et al.* (2020) demostró que NaTrxh reduce y activa hasta 7 veces más la S-RNasa lo que estaría promoviendo su actividad citotóxica necesaria para el rechazo del polen. Por otro lado, al mutar el sitio activo de la NaTrxh, el rechazo del polen se ve comprometido.

Es importante mencionar que quedan por descubrir otros genes involucrados en la vía, así como describir la función precisa de cada uno de los genes que hasta ahora se conocen. De los hasta ahora identificados, se puede inferir que deben existir otros que complementan la función de los ya descritos como es el caso de NaStEP. Seguramente, debido a que ciertas proteínas, como HT-B, que se degradan en una cruce compatible y se mantienen en una incompatible, existe una regulación de la actividad proteica entre ambos tipos de cruces, además se infiere que en la vía hay una proteasa aún no identificada implicada en la respuesta de AI.

### **Actividad proteolítica en el sistema de AI de Solanaceae**

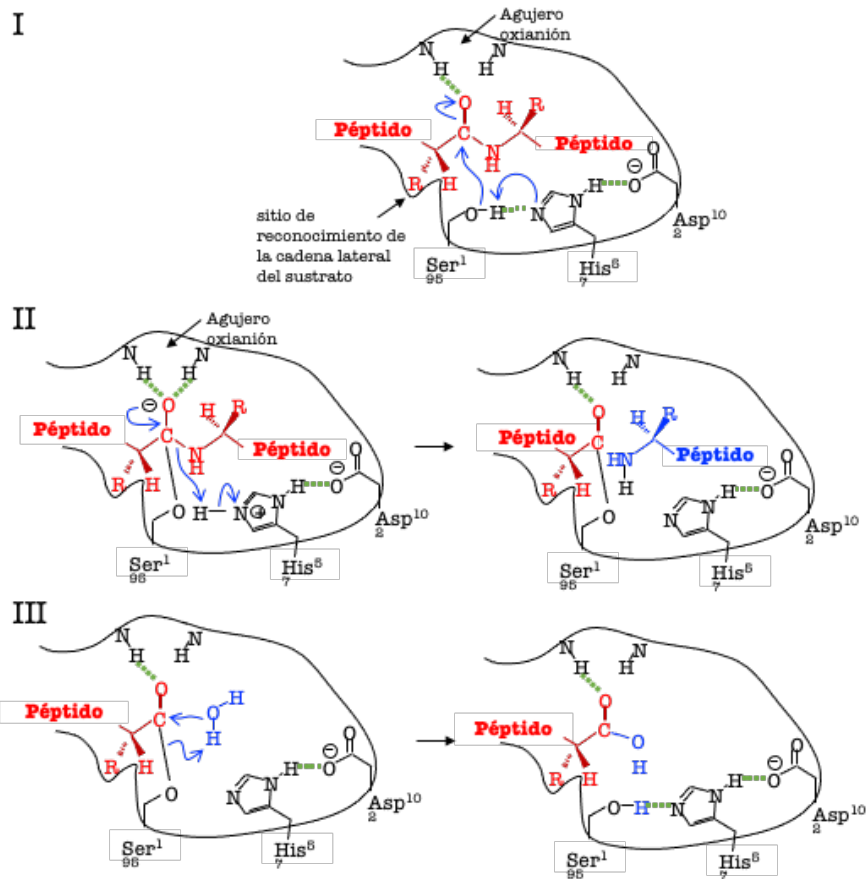
Las proteasas son enzimas que rompen el enlace peptídico de las proteínas. Los genomas de plantas codifican cientos de proteasas con diversidad estructural y funcional. Estas enzimas regulan de forma irreversible la función y destino de otras proteínas. Están involucradas en prácticamente todos los procesos que se llevan a cabo a lo largo de la vida de una planta, desde la germinación hasta su senescencia. Las proteasas también son responsables de muchas de las modificaciones post-traduccionales de otras proteínas a través de una proteólisis limitada en sitios muy específicos (Shaller, 2004).

La regulación de la actividad de las proteasas está fuertemente controlada tanto en tiempo como en espacio y muchas son sustrato específicas. La función biológica de la mayoría de estas enzimas es aún desconocida. Todas las proteasas presentan el mismo mecanismo de catálisis, el cual ocurre por un metal, una molécula de agua o por un aminoácido (serina, cisteína y ácido aspártico), los cuales actúan como nucleófilos. Se da un ataque nucleofílico del aminoácido catalítico de la proteasa

hacia el grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato formando un oxianión, el cual al ser muy reactivo forma nuevamente el carbonilo promoviendo el desplazamiento electrónico que resultará en la ruptura del enlace peptídico de la proteína blanco (Figura 4) (Schaller *et al.*, 2018; van der Hoorn and Rivas, 2018).

Las proteasas se pueden clasificar de acuerdo con el sitio de corte en su sustrato lo que las divide tres tipos: 1) endopeptidasas (corte interno), 2) aminopeptidasas (corte en el N-terminal) y 3) carboxipeptidasas (corte en el C-terminal). Del mismo modo, dependiendo del aminoácido del sitio activo o del metal que lleva a cabo la hidrólisis, las proteasas también se dividen en cuatro clases catalíticas (Schaller *et al.*, 2018): (1) proteasas de cisteína; (2) proteasas de serina; (3) metaloproteasas; y (4) proteasas aspárticas.

Las proteasas de serina se caracterizan por la presencia de solamente un residuo de serina que forma parte de la triada catalítica (His-Asp-Ser) (Figura 4); constituyen la familia más grande de proteasas vegetales y están involucradas en varios procesos biológicos (Rustgi *et al.*, 2018a). Se estima que en el genoma de *Arabidopsis* existen 570 proteasas codificadas, de las cuales el 45% corresponden a las proteasas de serina (Lallemand *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de este tipo de proteasas son la tripsina, la quimiotripsina y la subtilisina. En varias especies de plantas se han identificado un número elevado de proteasas tipo subtilisina pertenecientes a la familia S8A así como proteasas de la familia de la tripsina entre otras (Tripathi and Sowdhamini, 2006).



**Figura 4. Mecanismo de acción de la proteasa subtilisina.** I. El primer paso es un ataque nucleofílico: La Ser195 sustrae un protón de la His57 lo que resulta en la unión covalente entre la cadena lateral del oxígeno de la Ser195 y el sustrato. La carga negativa que se crea en el oxígeno del péptido es estabilizada por los puentes de hidrógeno formados a partir de dos protones de la proteasa, a esta región se denomina agujero oxianión, la cual también incluye a la Ser195. II. En el siguiente paso, la His57 dona un protón al sustrato lo que permite la liberación del extremo carboxilo del sustrato convirtiéndose en un péptido independiente. III. En el último paso, una molécula de agua ataca el enlace éster entre el péptido y el oxígeno de la Ser195, dando como resultado un segundo péptido con un grupo carboxilo completo y la regeneración del hidroxilo de la Ser195. El segundo péptido se disocia de la enzima para permitir que comience otro ciclo catalítico.

Debido a que la acción de las proteasas es irreversible, la regulación de su actividad es muy rigurosa e implica diversos mecanismos. Muchas proteasas se sintetizan como zimógenos y se activan a sí mismas o se transactivan. La auto-catálisis generalmente se lleva a cabo a consecuencia de un cambio en el pH e involucra la

escisión del prodominio por el sitio catalítico de la propia proteasa. Por otro lado, la transactivación se refiere a la escisión del prodominio por efecto de otra molécula de la misma enzima previamente activada (Verma *et al.*, 2016).

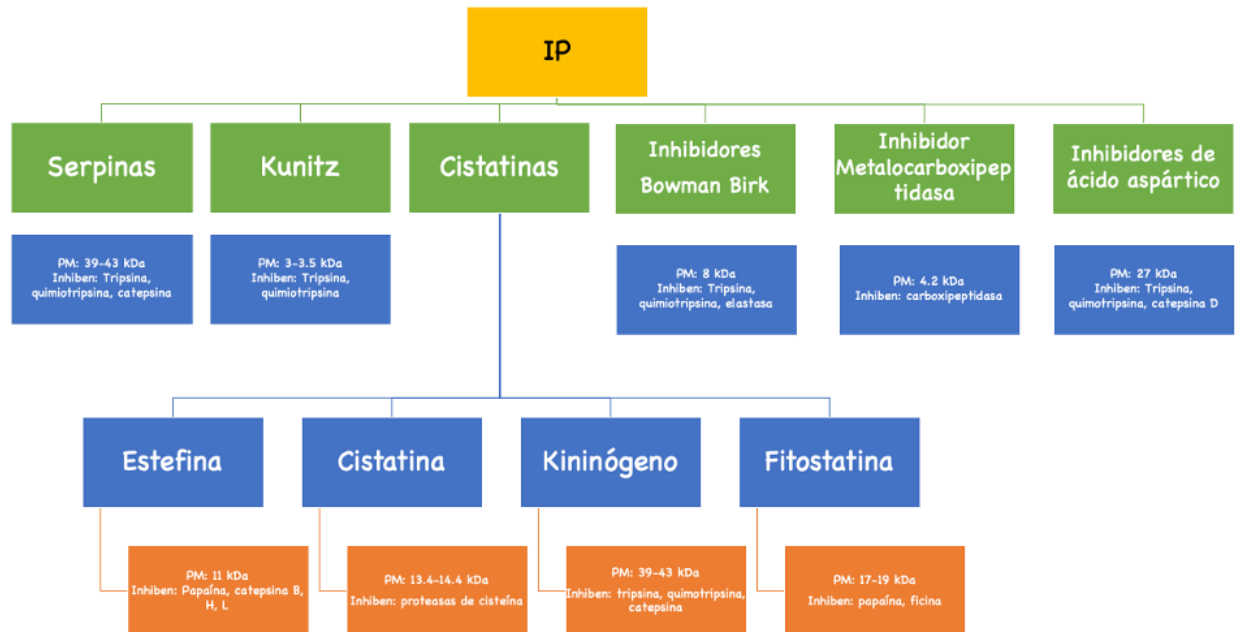
Otro nivel de control es aportado por los inhibidores de proteasas (IP), los cuales se encargan de hacer la regulación más astringente y altamente específica. Los IP son componentes indispensables para la homeostasis y sobrevivencia celular, están involucrados en muchos procesos biológicos relacionados con el metabolismo y la fisiología celular. En plantas, se encuentran involucrados en la movilización de proteínas de reserva, en la regulación de actividades enzimáticas endógenas, en la modulación de la muerte celular y en la estabilización de proteínas de defensa o compuestos contra depredadores (Clemente *et al.*, 2019). Los mejor descritos se encuentran en los órganos reproductores y en los tejidos de almacenamiento de las familias *Fabaceae*, *Poaceae* y *Solanaceae*. Se expresan de manera constitutiva durante el desarrollo de la planta, así como en defensa al ataque por herbívoros (Carlini and Grossi-De-Sá, 2002; Macedo *et al.*, 2009).

Los IP son por lo general, de masa molecular pequeña y son reversibles o irreversibles dependiendo de su capacidad de unión con su enzima blanco. Los reversibles por lo general, se unen a la proteasa a través de múltiples interacciones no covalentes lo que permite su fácil disociación ejerciendo un efecto inhibitorio temporal. Por el contrario, los IP irreversibles alteran el sitio activo de la proteasa blanco generalmente por la formación de enlaces covalentes. Estos complejos son muy estables lo que impide que la proteasa ejerza su función permanentemente (Rodney F, 2000).

A menudo, diferentes proteasas presentan homología en su sitio reactivo por lo que un solo inhibidor puede inhibir a más de una proteasa, de hecho, en el humano, existen anotados 115 IP que regulan la función de 612 proteasas (Farady and Craik, 2010).

Los IP se agrupan según el aminoácido blanco de la proteasa específica sobre la que actúan como inhibidores de proteasas de ácido aspártico (pepstatinas), inhibidores de proteasas de serina (serpinas), inhibidores de proteasas de cisteína (cistatinas) e inhibidores de metalo carboxi proteasas (Rustgi *et al.*, 2018a).

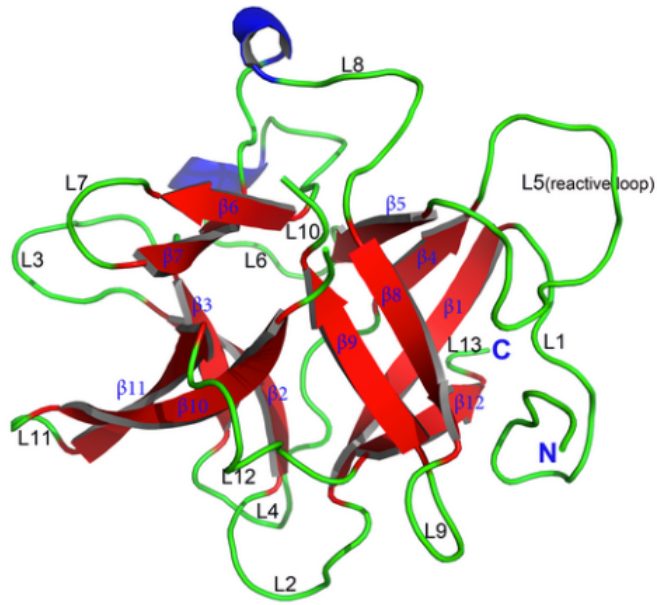
(Rawlings *et al.*, 2004) clasifica a los IP según su similitud en secuencia y estructura en 48 familias. En el cuadro 1 se muestran algunas de estas familias junto con algunas de sus características (Shamsi *et al.*, 2016).



**Cuadro 1.** Los IPs se agrupan en familias. Ejemplo de algunas familias de IP con algunas de sus características. PM = peso molecular IP= inhibidores de proteasas. Modificado de Shamsi, *et al.*, 2016.

Los IP tipo Kunitz (IPK) son una de las familias más estudiadas debido a su creciente uso en productos farmacéuticos. Estos inhibidores pueden inhibir proteasas de serina, cisteína y de ácido aspártico. La mayoría de los miembros de esta familia tienen cuatro residuos de cisteína conservados que forman dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys39-Cys86 y Cys136-Cys145). Interaccionan de manera reversible con sus proteínas blanco, formando complejos estables que inhiben su actividad catalítica de manera competitiva o no competitiva. Se caracterizan por tener desde 18 hasta 24 kDa de masa molecular, bajo contenido en cisteínas, presentar un solo sitio reactivo, tener alfa-hélices y compartir una conformación estructural que consiste en una lámina beta formada por 12 cadenas antiparalelas beta con asas largas que las interconectan (Oliva *et al.*, 2010) (Figura 5).

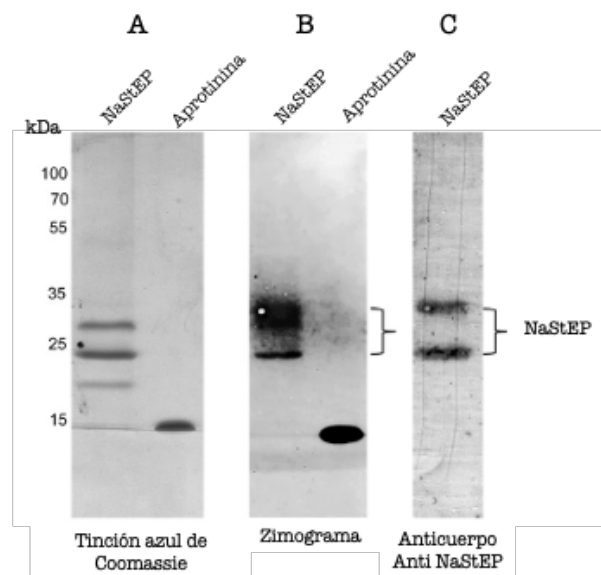




**Figura 5. Ejemplo de un inhibidor de proteasas tipo Kunitz.** Estructura tridimensional del inhibidor EcTI. En rojo se muestran las hojas beta y en verde las asas. C= extremo carboxilo, N= extremo terminal, reactive loop= sitio reactivo. Tomado de (Zhou *et al.*, 2013).

## Antecedentes

*NaStEP* es un gen que se expresa únicamente en especies AI del género *Nicotiana*. Codifica una proteína con un punto isoelectrico teórico de 4.6 y una masa molecular de 25 kDa aproximadamente. Por su similitud de secuencia que va desde el 24.8% hasta el 79.1%, NaStEP es un miembro de la familia de los IPK. Según el análisis filogenético de Busot *et al.* (2008), NaStEP se agrupa junto con los miembros de la familia I3 [los inhibidores tipo Kunitz de plantas (basado en la clasificación de Rawlings (2004)]. Específicamente, se encuentra en el clado V junto con NgPI, un inhibidor potencial de proteasas de *Nicotiana glutinosa*, y con un inhibidor de proteasas de cisteína y ácido aspártico de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* (antes *Lycopersicon esculentum*). La función de NaStEP como IPK fue probada contra las proteasas de serina tripsina y subtilisina, teniendo actividad inhibitoria para la subtilisina (Figura 6) (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013).



**Figura 6. NaStEP es un inhibidor de subtilisina.** A) Fracción de NaStEP purificada a partir de estilos de *N. alata* teñida con azul de Coomassie. B) Zimograma reverso (el gel con la fracción de NaStEP fue incubado con la proteasa subtilisina) que revela la actividad de inhibición de NaStEP sobre la subtilisina. C) Inmunodetección de NaStEP después del zimograma. Modificada de Jiménez-Durán *et al.*, 2013.

En su secuencia de aminoácidos se predice un péptido señal con un sitio de corte entre los residuos Ser24 y Ser25 (VFS-SS). Además, en la proteína madura se predice, en el extremo amino, la señal de destino vacuolar, NPIVL (en las posiciones X a Y), de acuerdo con el motivo conservado y degenerado [N/L]-[P/I/L]-[I/P]-[R/N/S]-[L/P]. En la secuencia también se localiza la triada catalítica característica de los IPK, la cual está formada por los aminoácidos Asp145, His201 y Ser530 (Busot *et al.*, 2008; Cruz-Zamora *et al.*, 2020).

NaStEP es una proteína abundante de estigmas maduros; en pistilos no polinizados, se localiza en las vacuolas de las células estigmáticas asociada a cuerpos proteicos. Después, cuando se lleva a cabo la polinización, la proteína se libera y relocaliza en el exudado estigmático, donde ingresa al citoplasma de los TP sin importar su haplotipo *S* (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). En el interior de los TP, NaStEP interacciona con el transportador mitocondrial de fosfatos NaSIPP, una proteína esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana* que tiene expresión específica en el polen maduro de especies incompatibles de *Nicotiana* (García Valencia *et al.*, 2017).

Por medio de ensayos de pérdida de función utilizando RNAi, se determinó que NaStEP es esencial en la respuesta de AI en *N. alata*. De acuerdo a los resultados, se propone que por medio de su función como inhibidor de proteasas, estabiliza a HT-B, la proteína hipotéticamente encargada de romper la vacuola que contiene a las S-RNasas, desencadenando así, de manera irreversible, el rechazo del polen propio (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

Se sugiere que los IPKs son indispensables en la defensa contra insectos, así como en procesos reproductivos como en la respuesta de AI en *Nicotiana* (Oliva *et al.*, 2010; García-Valencia *et al.*, 2017). En animales, se ha visto que algunos miembros de la familia Kunitz interaccionan con canales dependientes de voltaje (CDVs), bloqueando el intercambio de iones, lo cual concuerda con la doble función que varios miembros de la familia de inhibidores tipo Kunitz presenta, como

bloqueador de canales y como inhibidor de proteasas ( Yuan *et al.*, 2008; Peigneur *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). En lo que respecta a NaStEP, no se sabe si también presenta esta doble función, como inhibidor de proteasas y como bloqueador de canales dependientes de voltaje, ni si la inhibición es específica para Ser-proteasas. De hecho, esta hipotética doble función no ha sido reportada para ningún inhibidor tipo Kunitz de plantas en la literatura consultada.

## Hipótesis

NaStEP tiene una actividad dual, como inhibidor de proteasas de serina y como bloqueador de canales dependientes de voltaje, hecho que no ha sido reportado para sistemas vegetales, como sí ocurre con otros inhibidores de proteasa tipo Kunitz en animales.

## Objetivo general

Determinar la función de NaStEP como inhibidor de proteasas y bloqueador de canales dependientes de voltaje.

## Objetivos particulares

1. Determinar la especificidad de NaStEP como inhibidor de proteasas.
2. Determinar el mecanismo de acción de NaStEP como inhibidor de proteasas.
3. Determinar si existe un ortólogo de la proteasa subtilisina en *Nicotiana glauca*.
4. Evaluar la capacidad de NaStEP para bloquear canales dependientes de voltaje.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron líneas de *Nicotiana alata* homocigas para los genes *SAR-RNasa* y *Sc10-RNasa*, cultivadas en condiciones de invernadero.

### Purificación de la proteína NaStEP

Para la purificación se tomó como referencia el protocolo reportado por Tetsuya *et al.* (1995), brevemente: Se pulverizó en nitrógeno líquido 1 g de pistilos sin ovarios de *N. alata*. Se agregaron 10 mL de amortiguador de extracción (acetato de potasio 50 mM pH 5.5 con 100 mM del inhibidor de proteasas PMSF), directamente en el mortero y se continuó con la molienda hasta obtener una masa con consistencia de nieve. La muestra se transfirió a un tubo de teflón de 30 mL y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 12,000 g a 4°C durante 20 min. Se recuperó la fase acuosa y se inyectó a una columna de intercambio aniónico débil (DEAE de GE) previamente equilibrada con amortiguador A (acetato de potasio 50 mM pH 5.5). Se colectó la fracción no unida, la cual fue precipitada con sulfato de amonio a un 60% de saturación, durante al menos 12h a 4°C. La mezcla fue centrifugada (10,000 g 10 min) y el precipitado resultante fue resuspendido en amortiguador B (acetato de potasio 50 mM pH 4.0); la muestra fue desalada usando la columna *Hi-trap Desalting* (GE) y el equipo cromatográfico ÄKTA pure. Se obtuvieron tres fracciones de proteína desalada, las cuales se juntaron y se inyectaron a la columna de intercambio catiónico Capto S, previamente equilibrada con amortiguador B. Para la elución, se realizó un gradiente de NaCl de 0 a 100% a un flujo de 1 mL/min. Las muestras resultantes se fraccionaron por SDS-PAGE al 12.5%. Después de la electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de PVDF a 80 mA durante 35 min. Para el ensayo tipo western-blot, el anticuerpo primario (anti NaStEP) se utilizó a una dilución de 1:10,000 por 16 h a 4°C y el secundario (anti fosfatasa alcalina anti conejo) a una dilución 1:10,000 durante 2 h a temperatura ambiente. Para el revelado, la membrana fue incubada en buffer

pH 9.5 (12.1 g/L Tris base, 5.8 g/L NaCl, 1.0 g/L MgCl<sub>2</sub>) junto con los sustratos de la fosfatasa alcalina bromocloroindolil fosfato y azul de nitrotetrazolio (BCIP/NBT). Se reveló por aproximadamente 1 min y la reacción fue inhibida con 100 µL de EDTA 5 mM. Una replica del gel fue teñido con azul de Coomassie coloidal.

Las fracciones positivas para NaStEP fueron inyectadas por separado a una columna de filtración molecular (Hi-load superdex 200) a un flujo de 3 mL/min. Las fracciones resultantes fueron analizadas por SDS-PAGE y por western-blot anti NaStEP como ya se indicó.

Las fracciones donde se inmunodetectó a NaStEP fueron concentradas utilizando un dispositivo de ultrafiltración con corte de 10kDa (Amicon).

### **Copurificación de la proteasa que degrada a NaStEP**

El tejido se trituró en nitrógeno líquido y se agregaron 10 mL del amortiguador A (acetato de sodio 50 mM pH 5.5 con PMSF 2 mM); se continuó macerando el tejido hasta su descongelación. El extracto se centrifugó a 14,000 g durante 20 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con sulfato de amonio a 60% de saturación durante toda la noche a 4 °C. El precipitado fue centrifugado a 12,000 g por 20 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla resultante fue resuspendida en 3 mL de acetato de sodio 50 mM pH 5.5

### **Ensayo de inhibición de actividad proteolítica sobre la subtilisina utilizando azo-caseína como sustrato**

Este ensayo se basó en el protocolo reportado por Jones (1995): En un tubo de 1.5 mL se agregó 1 mg de NaStEP y 10 mU/mL de subtilisina, se llevó a un volumen de 50 µL con el amortiguador Tris 50 mM pH 7. La reacción se incubó a 37 °C durante 15 min. Se adicionaron 50 µL de azo-caseína al 1% disuelta en Tris 50 mM a pH 7

y se incubó por 10 min a 37 °C. Para parar la reacción, se agregaron 20 µL de una solución de ácido tricloroacético al 20% disuelto en agua (v/v) y se centrifugó a 10,000 g por 10 min. Se transfirieron 100 µL del sobrenadante a un pozo de microplaca tipo Elisa con 20 µL de NaOH 2M. Se agitó con vórtex la placa y se realizó la lectura a 440 nm utilizando el equipo EPOCH.

### **Cuantificación de proteína**

Para los ensayos de actividad de inhibición proteolítica de NaStEP, la cuantificación de proteína fue determinada utilizando el equipo Bio-Drop (Biochrom).

### **Inmunodetección de NaStEP en cruzas compatibles**

Se emascularon flores de *N. alata* en pre-antésis y dos días después (ya en antesis) se realizaron polinizaciones compatibles ( $S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$ ) e incompatibles ( $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$ ). Los estilos se colectaron a las 16 y 24 h post polinización. El ensayo se hizo por triplicado.

Cada réplica biológica se preparó con tres pistilos, los cuales fueron procesados de la siguiente manera: los estigmas fueron decapitados y triturados directamente en 50 µL de amortiguador de carga 6X para SDS PAGE; los estilos se dividieron en tres partes iguales que fueron trituradas por separado en amortiguador de carga. Todas las muestras fueron desnaturalizadas a 100°C durante 10 min. Los extractos se diluyeron con 30 µL de PBS.

Para el análisis por SDS-PAGE, se cargaron cantidades similares de proteína total de cada extracto y se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12.5%. Después de la electroforesis, cada gel fue transferido a una membrana de PVDF a 80 mA durante 35 min. La membrana fue teñida con azul de Coomassie R-250 de la siguiente manera: se incubó la membrana en metanol al 100% durante 30 s y después se incubó en solución de Coomassie R-250 (Coomassie R250 0.1%,



metanol 30%, ácido acético 30%) por un minuto con agitación constante. La membrana se destiñó en metanol al 50% 3 veces durante 3 min cada lavado. Se documentó la membrana teñida y, para continuar con el ensayo tipo western-blot, se destiñó completamente con metanol al 100%. Para el ensayo tipo western-blot, el anticuerpo primario (anti NaStEP) se utilizó a una dilución de 1:10,000 por 16 h a 4°C y el secundario (anti conejo acoplado a la fosfatasa alcalina) a una dilución 1:10,000 durante 2h a temperatura ambiente. El revelado se hizo con el protocolo antes mencionado.

### **Ensayo de qRT-PCR**

Se extrajo RNA total de tallo, hoja, pétalo, polen, pistilo y antera por el método de Trizol: se pulverizaron 100 mg de cada tejido en nitrógeno líquido y se adicionó 1 mL de Trizol (Ambion) a cada muestra; se agitó con vórtex durante 30 s y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 0.2 mL de cloroformo y se agitó por 15 s. Se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se agregó 0.5 ml isopropanol frío. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 12000 g a 4 °C. El pellet resultante se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 50 µL de agua libre de RNasas.

Las muestras fueron tratadas con DNasa I libre de RNasas (New England BioLabs) y el RNA fue concentrado y limpiado con el sistema RNA *Clean and Concentrator* (Zymo Research). Las muestras de RNA se resolvieron por electroforésis en un gel de agarosa. La concentración de RNA de cada muestra fue medida usando el equipo Nanodrop (Thermofisher). El ensayo de qPCR se llevó a cabo usando el sistema SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR con ROX (Invitrogen) en el equipo 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos específicos para subtilisina son FW 5´ AGCTCAAGCGAAAACGAAGA 3´ and RV 5´ GCTCTGCAGAAACAAAGCCT 3´. Como control se utilizó el RNAr del ribosoma 18S el cual fue amplificado con los oligonucleótidos FW 5´ GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG 3´ and RV 5´

GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC 3'. La abundancia relativa de los productos de amplificación se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Los niveles de subtilisina fueron normalizados usando el RNAr del 18S como referencia y fueron comparados con la muestra que arrojó los niveles más bajos de subtilisina (antera madura). Todas las reacciones se hicieron por triplicado. Los datos de cambio relativo de expresión, obtenidos a partir de qRT-PCR se muestran como promedios con error estándar.

### **Expresión del canal Kv 1.3 en *Xenopus***

Hembras adultas de la rana *Xenopus laevis* fueron anestesiadas por inmersión en una solución de tricaina al 1% a pH 7.4. Se extrajeron los ovocitos de cada individuo y se incubaron con 1  $\mu$ g/mL de colagenasa tipo IV por 10-20 min en medio libre de  $Ca^{2+}$  OR-2 (buffer: 83 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , y 5 mM HEPES, pH 7.0). Finalmente, los ovocitos fueron lavados en medio ND-96.

La clona del canal mitocondrial humano Kv 1.3 fue donado por el laboratorio de Niels Decher (Phillips University of Marburg). Para la transcripción del cRNA *in vitro* se utilizó el sistema mMessageMachine (Ambion). El cRNA se inyectó a los ovocitos y se incubaron de uno a tres días a 18 °C en el medio fisiológico ND-96 adicionado con gentamicina 50  $\mu$ g/L.

### **Registro electrofisiológico en ovocitos**

Los registros electrofisiológicos se hicieron siguiendo la técnica de Two-Electrode Voltage clamp. Se emplearon ovocitos que presentaron corrientes estables o mayores a 3  $\mu$ A. Se aplicaron pulsos desde -60 mV a +60 mV con incrementos de 20 mV. Para las corrientes (IK) sólo se consideró el pulso de +60 mV. Las corrientes fueron filtradas a 1/5 de la frecuencia de la muestra (1 kHz). La actividad de NaStEP en las corrientes de potasio fue medida 10 min después de la adición de NaStEP (100  $\mu$ M) al final del pulso. La cámara fue lavada manualmente 10 veces para eliminar cualquier rastro de NaStEP que hubiera quedado libre en el medio. El porcentaje de inhibición se determinó como  $(I_{control}-ITx)/I_{control}$

\*100. Los valores de inhibición se muestran como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba *t* de Student y se consideró estadísticamente significativo a una probabilidad  $\leq 0.05$ .

### **Análisis por BLAST de las secuencias tipo subtilisina**

Para el análisis por BLAST (Altschul *et al.*, 1990) se utilizó la secuencia obtenida a partir de DNA genómico (DNAG) del gen tipo subtilisina. Se obtuvieron varias secuencias, pero únicamente se tomaron en cuenta secuencias codificantes completas (CDS) (extraídas del banco de datos del NCBI (dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). Con estas secuencias y con la secuencia de la subtilisina de *N. benthamiana*, se generó el fenograma que se presenta en la Figura 19.

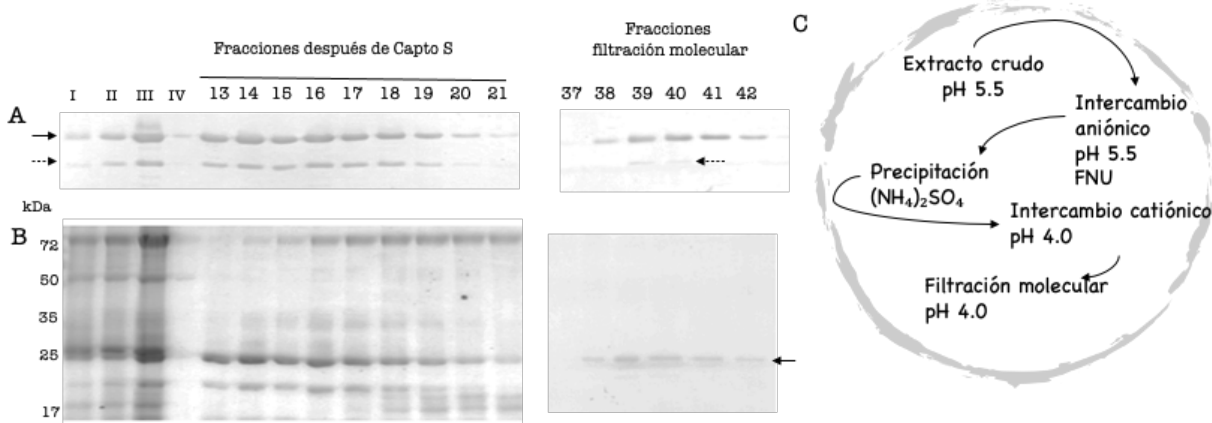
## Resultados

Los resultados más relevantes derivados de este trabajo fueron incluidos en la siguiente publicación internacional:

Cruz-Zamora, Y., Nájera-Torres, E., Noriega-Navarro, R., Torres-Rodríguez, M.D., Bernal-Gracida, L.A., García-Valdés, J., Juárez-Díaz, J.A., Cruz-García, F., 2020. **NaStEP, an essential protein for self-incompatibility in *Nicotiana*, performs a dual activity as a proteinase inhibitor and as a voltage-dependent channel blocker.** *Plant Physiol. Biochem.* 151, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.052>

### Una proteasa degrada a NaStEP en el pistilo

La purificación de NaStEP se llevó a cabo modificando el protocolo de (Uchikoba *et al.*, 1995). Cada purificación partió de pistilos sin ovario de *N. alata*. Después de realizar dos cromatografías de intercambio iónico y una filtración molecular, se obtuvieron fracciones homogéneas de NaStEP. Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunodetectadas con el anticuerpo anti NaStEP (Figura 7).

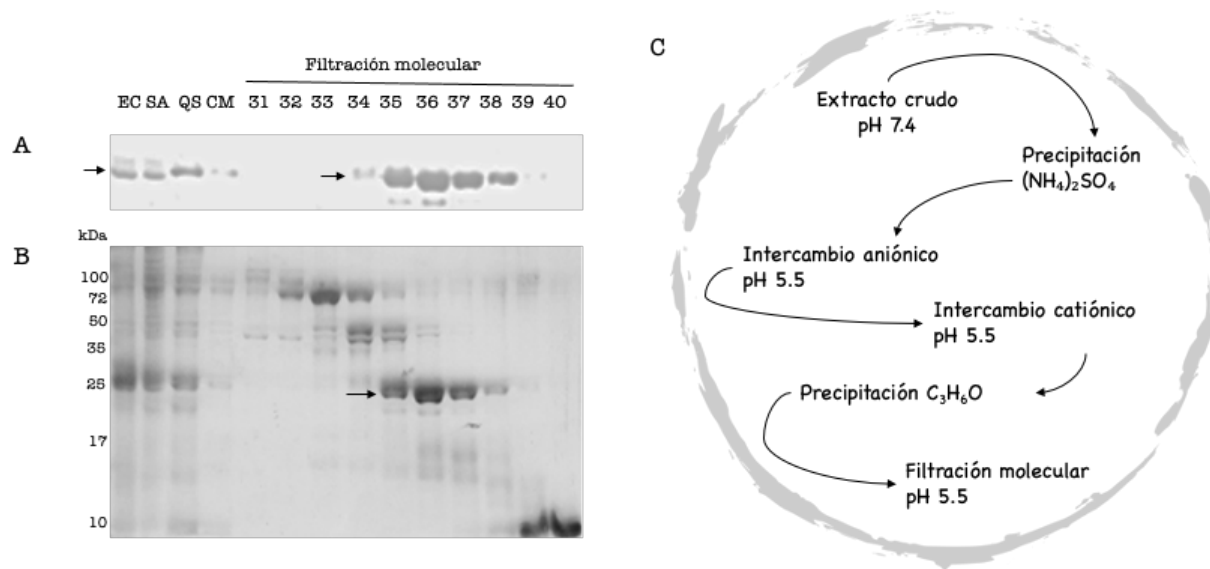


**Figura 7. Purificación de NaStEP mediante dos pasos cromatográficos de intercambio iónico y uno de filtración molecular.** A) Ensayos tipo western-blot con el anticuerpo anti NaStEP de las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico (Columna Capto S de GE) B) Electroforesis SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de filtración molecular teñidas con azul de Coomassie coloidal. I= Extracto crudo, II= Fracción no unida a la resina DEAE, III= Fracción desalada, IV= Fracción no unida a la resina Capto S. Las flechas sólidas señalan a NaStEP y la flecha punteada a una proteína desconocida inmunoreactiva con el

anticuerpo anti NaStEP. El protocolo de purificación se muestra en (C).

Durante la purificación de NaStEP, se encontró una reacción cruzada para el anticuerpo anti NaStEP. Además de reconocer a NaStEP, también reconoce una proteína de menor peso molecular (Figura 7A, flecha punteada). Para determinar si esta banda corresponde a una inespecificidad del anticuerpo o es resultado del procesamiento proteolítico de NaStEP, la proteína se analizó por espectrometría de masas. El resultado fue congruente con una versión de NaStEP más pequeña que carece de una parte del extremo carboxilo (anexo 1). Este hecho señaló que NaStEP está siendo degradada parcialmente.

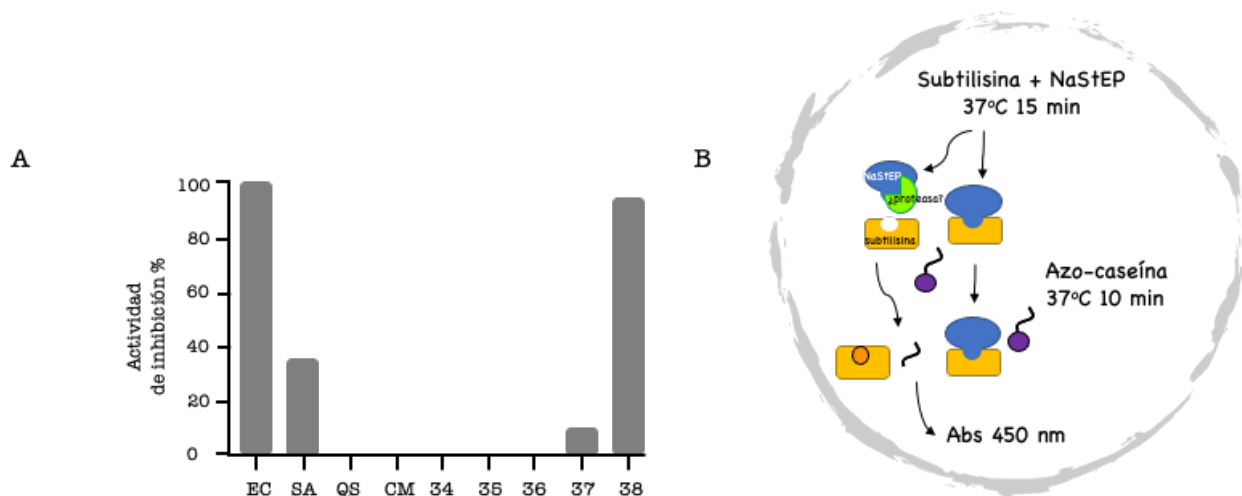
Es conocido que las proteasas forman interacciones muy fuertes con sus blancos, por lo que para identificar proteasas cuyo blanco sea NaStEP, se diseñó un nuevo método de purificación. En este caso, el extracto inicial se mantuvo a un pH neutro (7.4), después se sometió a cromatografías de intercambio aniónico y catiónico, finalmente, a un pH ácido (5.5), se realizó una cromatografía de filtración molecular. Siguiendo esta estrategia de purificación, se obtuvieron fracciones enriquecidas de NaStEP (Figuras 8A y B).



**Figura 8. El protocolo de purificación de NaStEP resulta en fracciones enriquecidas de la proteína.** Las fracciones de cada paso de purificación fueron analizadas por ensayo tipo western-blot anti NaStEP (A) y las proteínas en los geles fueron visualizadas en geles teñidos con azul de Coomassie coloidal (B). EC= extracto crudo, SA= fracción precipitada con sulfato de amonio, QS= fracción no

unida a la resina Q-sefarosa, CM= fracción no unida a la resina CM-sefarosa, 31-40= fracciones obtenidas después de una cromatografía de filtración molecular. Las flechas señalan a NaStEP. El protocolo de purificación se muestra en (C).

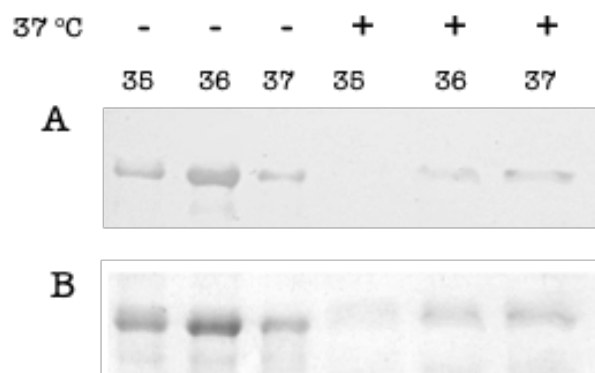
En la figura 8A se muestra la inmunodetección de NaStEP en las fracciones obtenidas a lo largo de la purificación siendo las fracciones 35, 36 y 37 de la filtración molecular las que presentan mayor señal. En el panel 5B se visualizaron por tinción con azul de Coomassie las mismas fracciones que en el panel 8A; se hace evidente que las fracciones 35, 36 y 37 son las más enriquecidas con NaStEP. Para estudiar la actividad de NaStEP se emplearon varias fracciones obtenidas en la purificación que se muestra en la figura 8 y, se utilizó a la subtilisina como proteasa blanco y a la azo-caseína como sustrato de la enzima (Figura 9). Los resultados muestran que en el extracto crudo (EC) la actividad de inhibición alcanza el 100% la cual disminuye a un 35% en la fracción precipitada son sulfato de amonio (SA). No se detecta actividad en la fracción no unida a la resina Q sefarosa ni en la no unida a la resina CM sefarosa. Asimismo, las fracciones 34, 35 y 36 tampoco presentaron actividad inhibitoria a pesar de que contienen a NaStEP. La fracción 37 presentó una ligera inhibición (10%), en tanto que la fracción 38 fue capaz de inhibir el 100% de la actividad (Figura 9).



**Figura 9. Las fracciones más enriquecidas con NaStEP no presentan actividad de inhibición de proteasas.** Para el ensayo, la subtilisina se pre-incubó con las fracciones indicadas en el histograma durante 15 min a 37 °C antes de agregar azo-

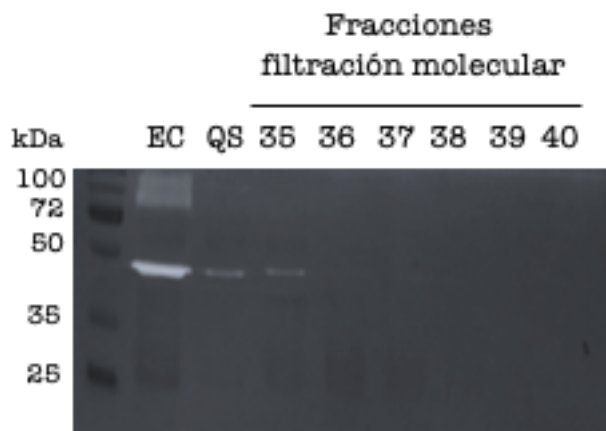
caseína y dejarla actuar por 10 min a la misma temperatura. (A) Para el histograma se tomó como el 100% de actividad proteolítica el valor obtenido del ensayo sin NaStEP. Se graficó el porcentaje de actividad inhibitoria de cada muestra. EC= extracto crudo, SA= fracción precipitada con sulfato de amonio, QS= fracción no unida a la resina Q-sefarosa, CM= fracción no unida a la resina CM sefarosa, 34-38= fracciones obtenidas por filtración molecular. El protocolo para determinación de actividad se muestra en (B).

La nula inhibición de actividad proteolítica en las fracciones de filtración molecular más enriquecidas con NaStEP, sugirió que la actividad de NaStEP como inhibidor de proteasas estaba siendo inhibida por la presencia de una proteasa, la cual podría estarse activando por las condiciones propias del ensayo (incubación a 37 °C por 25 min). Para comprobar esta hipótesis, las fracciones 35, 36 y 37 se incubaron a 37 °C durante 25 min y la presencia de NaStEP se analizó por un ensayo tipo western-blot (Figura 10). Después de la incubación, en la fracción 35 no se inmunodetectó a NaStEP, mientras que en las fracciones 36 y 37 la detección fue mucho menor con respecto a su control no incubado. Estos datos apoyan la presencia de una actividad proteolítica que copurifica y degrada a NaStEP, razón por la cual estas fracciones fueron incapaces de inhibir a la subtilisina en el ensayo mostrado en la Figura 9.



**Figura 10. NaStEP se degrada en las fracciones que no presentan actividad de inhibición de proteasa.** Las fracciones (35-37) que no presentaron actividad inhibitoria de proteasas, se incubaron a 37 °C durante 25 min. En el ensayo de la inumodetección de NaStEP (A) se observa la degradación total (fracción 35) o parcial (fracción 36 y 37) de NaStEP después de la incubación. En el panel B se muestran las fracciones separadas por SDS-PAGE en geles teñidos con azul de Coomassie coloidal.

Intentando identificar a la proteasa que degrada a NaStEP, las fracciones 35 a 40 se analizaron en un zimograma, en el que utilizó gelatina como sustrato (Figura 11). Con este ensayo, se detectó actividad proteolítica en las fracciones 35, 36 y 37, siendo más evidente en la fracción 35. La fracción 38, como era de esperarse, no presentó actividad proteolítica, lo cual correlaciona con los resultados del ensayo de actividad de inhibición (Figura 9).



**Figura 11. NaStEP copurifica con una proteasa.** Se evaluó la actividad proteolítica en las fracciones de filtración molecular donde se presentó degradación de NaStEP, a través de un zimograma utilizando gelatina como sustrato. En la imagen se observa la actividad proteolítica en las fracciones EC (Extracto crudo), QS (retenido a la resina Q-sefarosa), 35 y 36 que correspondería a una proteasa con peso molecular por abajo de 50 kDa. La banda de la fracción 35 fue escindida del gel, digerida y analizada por espectrometría de masas.

La proteína con actividad proteolítica identificada en el zimograma en la fracción 35 fue purificada del gel, digerida con tripsina y analizada por espectrometría de masas. Sin embargo, los resultados de este análisis no revelaron ningún candidato confiable, si bien se obtuvieron coincidencias para endo-glucosidasas, celulasas y proteínas de unión a GLP (germin-like protein).

### **NaStEP es degradada en los tubos polínicos de cruza compatibles**

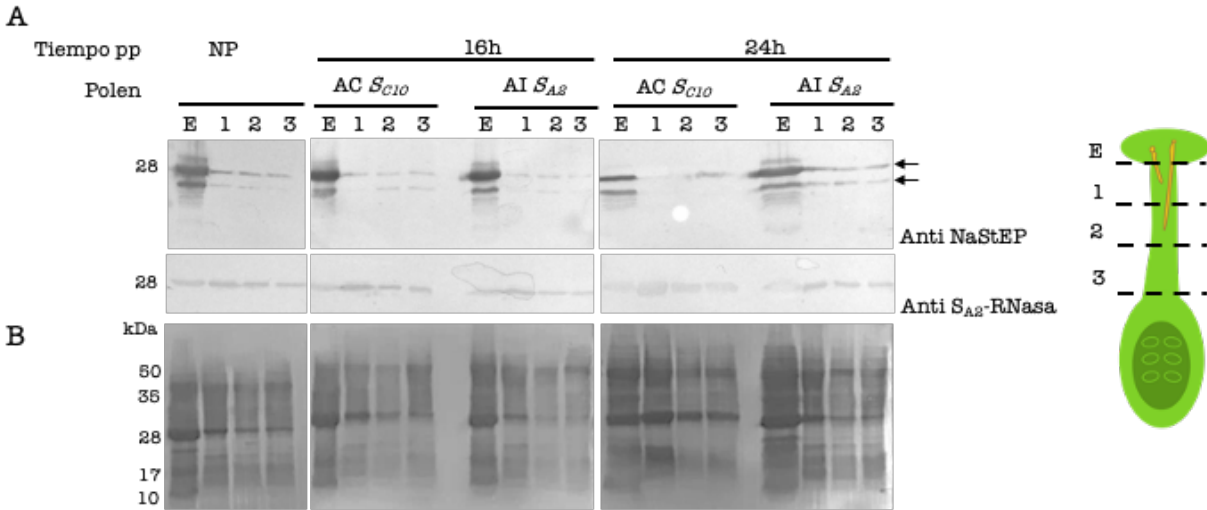
En la respuesta de AI, la ruptura de la vacuola que contiene a las S-RNAsas en el TP, es el paso final para que se inhiba su crecimiento, es decir, sea rechazado. El



rompimiento de la vacuola esta mediado por la proteína estilar, HT-B. La proteína HT-B se incorpora al TP de cruza compatibles e incompatibles. En una cruza incompatible permanece estable y media la ruptura de la vacuola que contiene las S-RNasas. Sin embargo, en una cruza compatible es degradada en el interior del TP (McClure *et al.*, 1999; Goldraj *et al.*, 2006).

Las proteínas HT-B y NaStEP participan en la vía que conduce al rechazo del polen, ya que cuando se evaluó la integridad de HT-B en plantas transgénicas de *Nicotiana* con NaStEP suprimida por un RNAi, se vio que se degrada en los TPs tanto de cruza compatibles, como incompatibles, sugiriendo que la función de NaStEP es proteger de alguna manera a HT-B de la degradación. Esta observación llevó a proponer que NaStEP debe ser inactivada o degradada en los tubos polínicos de cruza compatibles. De esta manera, en este trabajo se estudió la estabilidad de NaStEP en tubos polínicos de cruza compatibles e incompatibles.

El estudio se llevó a cabo en dos tiempos post-polinización. El análisis de estabilidad de NaStEP se hizo por ensayos tipo western-blot. Para el análisis, el estigma fue decapitado y el estilo fue dividido en 3 partes iguales. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 12. A las 16 horas postpolinización no se observó ninguna diferencia en la señal de NaStEP entre la cruza compatible y la incompatible. No obstante, a las 24 h, la señal de NaStEP disminuyó considerablemente a lo largo de todo el pistilo en una cruza compatible, lo cual no ocurre en una cruza incompatible. Es importante señalar, que la degradación de NaStEP en cruza compatibles es específica, ya que cuando se inmunodetectó a la SA<sub>2</sub>-RNasa en los mismos extractos, esta mostró niveles invariables a 16h y a las 24 h postpolinización, comparado con la cantidad inmunodetectada en estilos sin polinizar. Estos resultados dan evidencia de que NaStEP está siendo degradada en los TPs de cruza compatibles.



**Figura 12. NaStEP se degrada en una cruce compatible.** Se hicieron polinizaciones compatibles  $S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$  e incompatibles  $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$  y se colectaron los pistilos a las 16 y 24 horas postpolinización. Los estigmas (E) fueron decapitados y el estilo fue seccionado en tres partes iguales (1, 2 y 3). Los tejidos fueron molidos con amortiguador de carga y desnaturalizados por ebullición. A las 24 h postpolinización, en una cruce compatible (AC) la señal de NaStEP es apenas detectable, mientras que en una cruce incompatible (AI) la señal es estable en las tres partes del estilo. A) Ensayo tipo western blot con los anticuerpos anti NaStEP y anti  $S_{A2}$ -RNasa. B) Membranas teñidas con azul de Coomassie. NP = no polinizado pp = tiempo post polinización. Las flechas señalan a NaStEP.

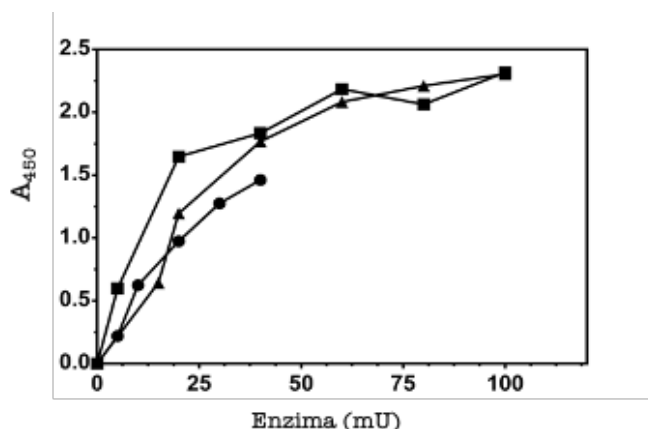
Hasta este punto, se ha descrito que la función de NaStEP como inhibidor de proteasas en el tubo polínico podría estar regulada por una proteasa que copurifica con NaStEP. Además, se demostró que, en una cruce compatible, NaStEP se degrada. Para un estudio más profundo sobre la función de NaStEP en la respuesta de AI, se realizaron análisis más amplios y minuciosos de esta proteína. Los resultados de este estudio se describen a continuación.

### **NaStEP inhibe específicamente a la Ser-proteasa subtilisina de manera dosis dependiente**

Las evidencias experimentales sobre la función de NaStEP como inhibidor de Ser-proteasas indican que esta proteína no inhibe a la tripsina (Busot-González *et al.*, 2008), a pesar de que está reportada como sustrato de los inhibidores tipo Kunitz

(Bendre et al., 2018). Por otro lado, NaStEP sí inhibe a la Ser-proteasa subtilisina (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), la cual es otro sustrato para inhibidores tipo Kunitz (Walsh and Twitched, 1991). Por lo tanto, para este trabajo se evaluó si NaStEP inhibe de manera específica a la subtilisina o si también inhibe a otro tipo de proteasas.

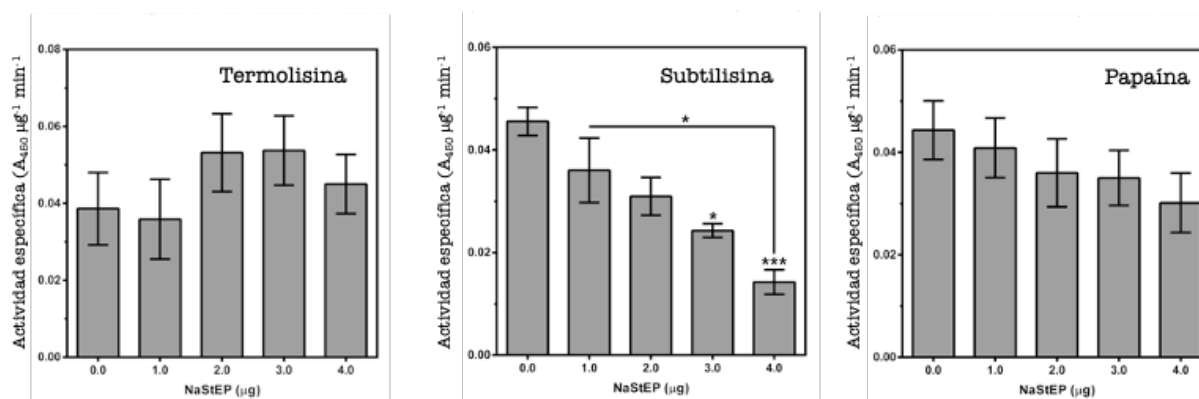
Para determinar la especificidad de inhibición de NaStEP sobre otras proteasas, se evaluó su función inhibitoria sobre la Cis-proteasa papaína y sobre la termolisina, que es una metaloproteasa. El ensayo se hizo de manera cuantitativa utilizando a la azo-caseína como sustrato. Primero, dado que cada proteasa presentó diferente afinidad por la azo-caseína y para poder realizar un análisis comparativo entre las proteasas, la actividad específica de cada una fue determinada haciendo una curva dosis-respuesta usando diferentes concentraciones de enzima (Figura 13).



**Figura 13. Actividad proteolítica de la termolisina (triángulos), subtilisina (círculos) y papaína (cuadrados).** Dado que cada proteasa presenta diferente afinidad por el sustrato azo-caseína, para homologar la actividad de las tres proteasas, se realizó una curva con cada una de ellas. Para los ensayos de actividad proteolítica de las figuras 14 y 15 se utilizaron 25 mU de termolisina, 20 mU de subtilisina y 10 mU de papaína.

A partir de los resultados de la Figura 13, se determinó utilizar para los ensayos subsecuentes 5 mU de termolisina, 20 mU de subtilisina y 15 mU de papaína.

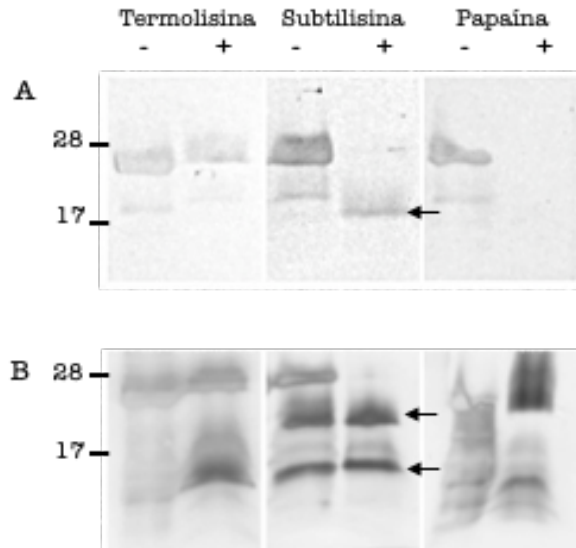
Para el ensayo de inhibición, se preincubó cada proteasa con diferentes concentraciones de NaStEP y después se agregó el sustrato azo-caseína. Los resultados mostrados en la Figura 14, indican que NaStEP no inhibe a la termolisina ni a la papaína, aunque para esta última proteasa se observa una tendencia a disminuir su actividad a medida que aumenta la cantidad de NaStEP, sin embargo, el análisis estadístico indica que el cambio no es significativo. En el caso de la subtilisina, NaStEP mostró actividad inhibitoria a partir de 1  $\mu\text{g}$  y fue en aumento hasta los 4  $\mu\text{g}$ . Por este método no se pudo determinar si NaStEP inhibe totalmente a la subtilisina, ya que el pH óptimo de actividad de la subtilisina es entre 7 y 10 (de acuerdo con los datos del proveedor). Además, dado que NaStEP eluye a un pH 4, al aumentar la cantidad de NaStEP, también se disminuye el pH de la reacción lo que ocasiona que la subtilisina ya no presente actividad.



**Figura 14. NaStEP inhibe específicamente a la subtilisina, una proteasa de serina.** Se determinó la actividad específica de cada proteasa usando diferentes cantidades de NaStEP como inhibidor. La actividad de la subtilisina fue inhibida significativamente a partir de 1  $\mu\text{g}$  de NaStEP a diferencia de la termolisina y la papaína, las cuales no mostraron diferencia significativa en ninguno de los tratamientos. Se muestra el error estándar (n=3). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P = 0.001$

Dado que está reportado que los inhibidores de proteasas tipo Kunitz pueden ser sustratos de proteasas, se investigó si la poca o nula inhibición que se registró con la papaína y la termolisina (Figura 14), era el resultado de la degradación de NaStEP por estas proteasas. Para el ensayo, NaStEP fue incubada junto con cada una de las proteasas durante 15 min a 37 °C. Las muestras fueron analizadas por un ensayo tipo western-blot. Los resultados (Figura 15) indican que la papaína

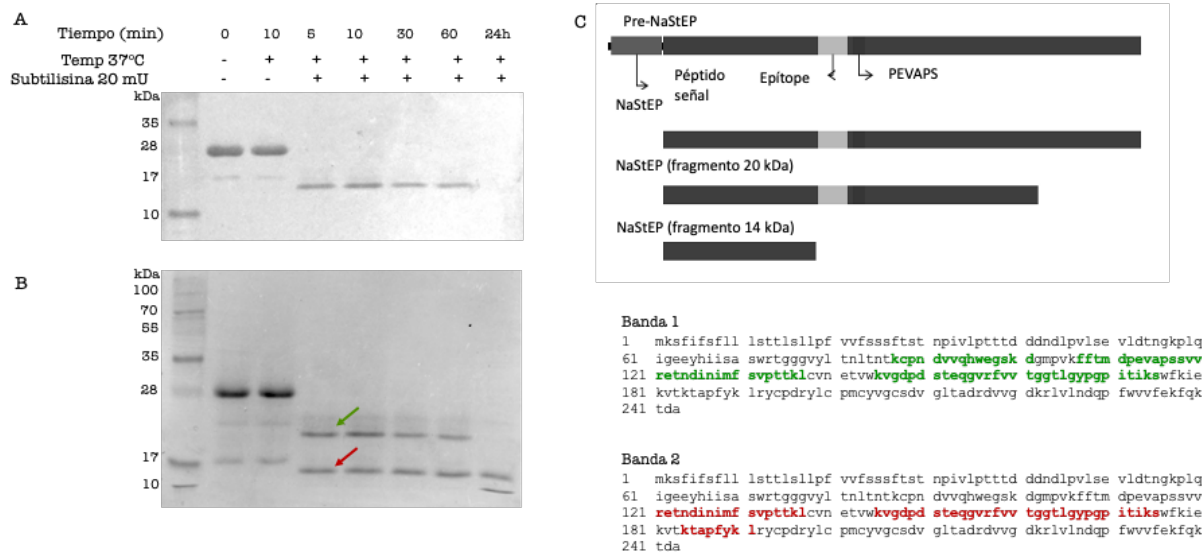
degradó completamente a NaStEP, la termolisina no tuvo ningún efecto sobre ella y, el tratamiento con subtilisina generó dos especies de NaStEP de menor masa molecular, sugiriendo un procesamiento parcial.



**Figura 15. La subtilisina degrada parcialmente a NaStEP.** Se evaluó la estabilidad de NaStEP después de su incubación con diferentes proteasas. La incubación se hizo a 37 °C durante 15 min. (-) significa que no se agregó proteasa al ensayo. A) Inmunodetección de NaStEP después del tratamiento con las distintas proteasas. B) Tinción con nitrato de plata de geles SDS-PAGE después del tratamiento con las distintas proteasas. Las flechas señalan los productos de degradación de NaStEP.

### La subtilisina procesa a NaStEP en al menos dos formas

Para profundizar en el procesamiento de NaStEP por la subtilisina, se llevó a cabo un ensayo de inhibición a diferentes tiempos y manteniendo la cantidad de NaStEP constante. Tras 5 min del ensayo, se observaron dos fragmentos, uno de 20 kDa y otro de 14 kDa (Figura 16). A las 24 h del ensayo, únicamente se detectó la banda de menor masa molecular, la cual fue evidente cuando el gel se tiñó con azul de Coomassie (Figura 16A), pero no por inmunodetección (Figura 16B).

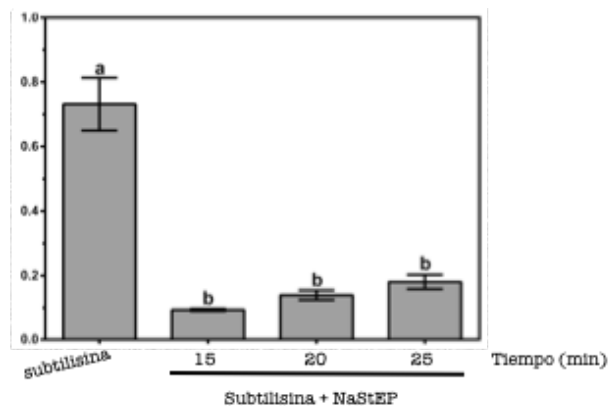


**Figura 16. La degradación parcial de NaStEP por la subtilisina resulta en dos especies de menor masa molecular.** NaStEP fue incubada con 20 mU de subtilisina a 37 °C por 10, 30, 60 min y 24 h. En el panel (A) se muestra la inmunodetección de NaStEP en el curso temporal de degradación. En el panel (B) se visualizan las fracciones del panel A teñidas con azul de Coomassie coloidal. En el panel (C) se muestra la secuencia propuesta de los péptidos resultantes del análisis. Las letras en verde y rojo son los péptidos obtenidos de cada banda, lo cuales están señalados sobre la secuencia de NaStEP. La flecha verde corresponde a la banda 1 y la roja a la banda 2.

Ambos productos del procesamiento sobre NaStEP se analizaron por espectrometría de masas. Los resultados muestran que el primer procesamiento de NaStEP (banda 1) ocurre hacia el extremo carboxilo terminal, conservando así el sitio activo (PEVAPS) y el epítipo (WEGSKDGMpvKFFT) que reconoce el anticuerpo anti-NaStEP (Figura 16C). En el caso de la especie de menor masa molecular (banda 2), es el producto de la degradación continua de la subtilisina hacia el extremo amino terminal de NaStEP, lo que da como resultado la pérdida del sitio activo y del epítipo reconocido por el anticuerpo. Esto explica que este fragmento de NaStEP no fuera inmunodetectado por el anticuerpo (Figura 16B). Debido a que NaStEP es también un sustrato para la subtilisina que rinde al menos en dos especies de menor masa molecular, desconocemos a la fecha si NaStEP completa es la que tiene la actividad de inhibición sobre la subtilisina o, son las dos especies de menor masa molecular o, todas ellas.

Por otra parte, durante la purificación de NaStEP se detectó que el anticuerpo anti-NaStEP detectaba, además de una banda de la masa molecular esperada (24 kDa), una banda adicional de menor masa molecular (20 kDa), la cual fue visible desde el extracto crudo (Figura 7). El análisis de espectrometría de masas reveló que se trataba de una versión más corta de NaStEP. Este resultado sugiere la existencia de una proteasa en el pistilo capaz de degradar a NaStEP de la misma manera que lo hace la subtilisina, como se observa en las Figuras 15 y 16.

Para determinar si el mecanismo de inhibición de NaStEP sobre la subtilisina es reversible o irreversible, se pre-incubó a la subtilisina junto con NaStEP por 15, 20 o 25 min y después, se agregó el sustrato azo-caseína y se midió la actividad enzimática de la subtilisina. Los resultados (Figura 17) mostraron que la actividad de la subtilisina disminuyó significativamente desde los 15 min, manteniéndose sin cambios significativos hasta los 25 min. Estos resultados permiten hipotetizar que NaStEP es un inhibidor irreversible que evita la unión de la azo-caseína al sitio activo de la subtilisina, aunque no se descarta que pudiera ser un inhibidor de muy alta afinidad.



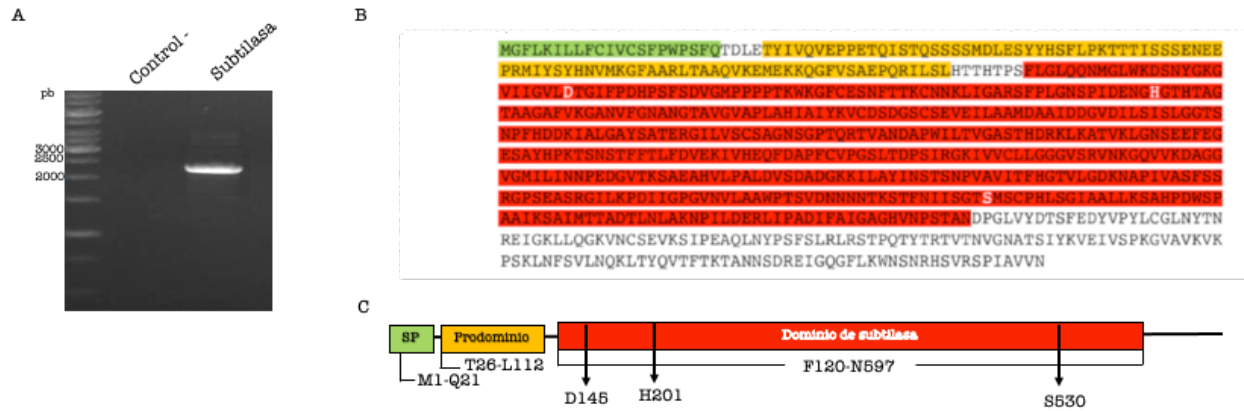
**Figura 17. NaStEP inhibe irreversiblemente a la subtilisina.** La actividad de la subtilisina se determinó después de su preincubación con NastEP por 15, 20 y 25 min. Todos los tratamientos resultaron en una inhibición significativa comparado con el control (subtilisina pre-incubada sin NaStEP por 25 min). Todas las medias se muestran como +/- el error estándar (n=5) grupo b P<0.0001 comparado con a.

## **El genoma de *Nicotiana alata* está codificada una proteína tipo subtilisina**

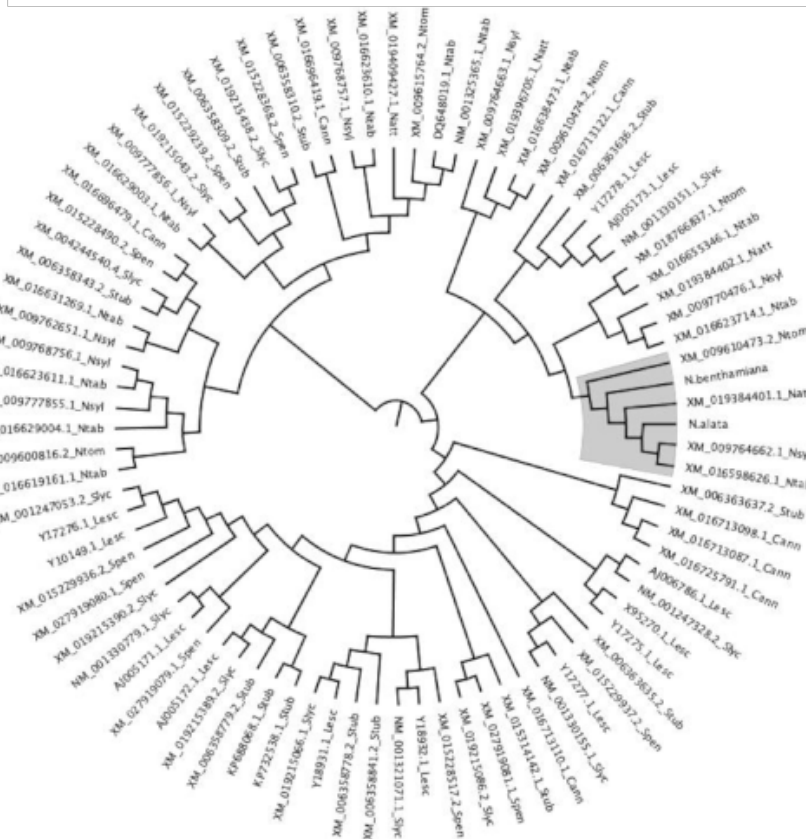
Para determinar si en el genoma de *N. alata* está codificada al menos una proteína tipo subtilisina, se buscaron secuencias homólogas en el genoma de *Solanum lycopersicum* y se encontró un total de 273 secuencias homólogas. De estas secuencias, se eliminaron las repetidas, así como aquellas que están en la categoría de “predicción”, obteniendo una secuencia única de 2466 pb (Genebank CAA76724). Con esta secuencia se realizó un análisis tipo BLAST en la base de datos Solgenomics (<https://solgenomics.net/>) usando la secuencia del genoma de *N. benthamiana*, el cual dio como resultado una secuencia con el 85.84% de identidad (Niben101Scf00490Ctg00) con la supuesta subtilisina de *S. lycopersicum*. Con base en la secuencia nucleotídica de *N. benthamiana* se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar por PCR su ortólogo en *N. alata* a partir de DNA genómico como molde, logrando amplificar un fragmento de 2220 pb (Figura 18).

A partir de la secuencia nucleotídica del ortólogo de la subtilisina de *N. alata* se dedujo su secuencia de aminoácidos, la cual al compararse con la secuencia de la subtilisina de *N. benthamiana* se obtuvo que éstas comparten un 94.72% de identidad (Figura 18B). El ORF (marco de lectura abierto) de este cDNA predice una subtilasa de la familia S8 de 79.3 kDa, en la cual se predice la secuencia de un péptido señal de 21 aminoácidos que asocia su síntesis en ribosomas unidos al retículo endoplasmático rugoso. Además, en esta región del amino terminal también se encuentra un prodominio el cual está reportado como chaperón en el plegamiento de la proteína madura de las subtilasas (Li *et al.*, 1995). Esta secuencia también incluye la triada catalítica del sitio activo (Asp145, His201 y S530) característica de varias subtilasas (Vartapetian *et al.*, 2011) (Figura 18C).





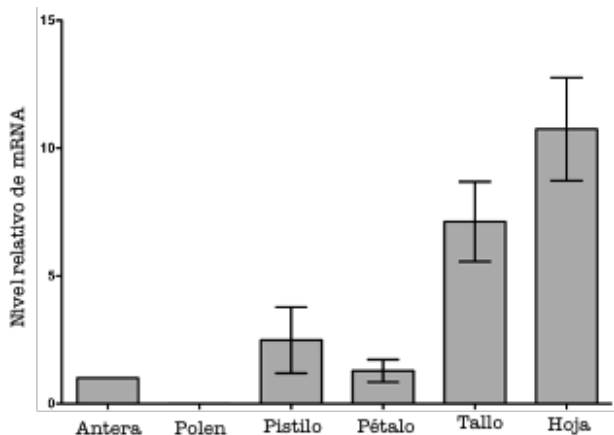
**Figura 18. El genoma de *N. alata* codifica una subtilasina de la familia S8.** A) Amplificación de una subtilasina a partir de DNAg de *N. alata*. B) Secuencia inferida de aminoácidos de la subtilisina de *N. alata* indicando el péptido señal (verde), el prodominio (amarillo), el dominio de subtilasina (rojo) y la triada catalítica (blanco). C) Representación esquemática de la proteína tipo subtilisina de *N. alata* mostrando la posición del péptido señal (SP), el prodominio, el dominio de subtilasina y la triada catalítica (D145, H201 y S530) (mismos colores que en B).



**Figura 19. La proteína tipo subtilisina de *N. alata* se agrupa con una subtilisina de *N. benthamiana*.** Por el criterio de máxima similitud, se construyó un fenograma con las secuencias de las proteínas tipo subtilisina obtenidas del análisis BLAST del genoma de *N. benthamiana*. El grupo sombreado corresponde al *cluster* de la proteína tipo subtilisina de *N. alata* y *N. benthamiana*. Se muestra el número de acceso de cada secuencia. Cann: *Capsicum annuum*; Lesc: *Solanum lycopersicum* (antes *Lycopersicon esculentum*); Natt: *N. attenuata*; Nsyl: *N. sylvestris*; Ntab: *N. tabacum*; Ntom: *N. tomentosiformis*; Slyc: *Solanum lycopersicum*; Spen: *S. pennellii*; Stub: *S. tuberosum*.

Tomando la secuencia aminoacídica de la proteína predicha a partir del producto de la amplificación del genoma de *N. alata*, se realizó un análisis tipo BLAST usando la base de datos del NCBI. El resultado arrojó varias secuencias de otras proteínas tipo subtilisina. A partir de estas secuencias, incluyendo 16 de la familia *Solanaceae*, se hizo un alineamiento múltiple para generar un fenograma, en el cual la subtilisina predicha de *N. alata* y la de *N. benthamiana* se encuentran en el mismo grupo (Figura 19).

Para conocer el patrón de expresión del gen de la subtilasa de *N. alata*, se realizó un qRT-PCR con mRNA proveniente de diferentes tejidos. Los resultados del ensayo muestran una mayor acumulación del mRNA en tallo y hoja, pero también en antera y pistilo, aunque en menor cantidad (Figura 20). Este resultado, junto con el análisis de similitud, indica que el gen que se clonó de *N. alata* codifica una enzima tipo subtilasa que se expresa en el pistilo, la cual podría ser la responsable de degradar a NaStEP de la misma manera en que lo hace la subtilisina usada en los ensayos de inhibición de origen bacteriano (Figura 16), ya que, además, esta subtilasa también pertenece a la familia S8 de las subtilasas.



**Figura 20. La proteína tipo subtilisina de *N. alata* se expresa en tejidos reproductivos.** Se cuantificaron los niveles del transcrito de la proteína tipo subtilisina por q(RT)-PCR en antera, granos de polen, pistilo, pétalo, tallo y hoja usando el rRNA 18S como control de referencia. El resultado muestra altos niveles de mRNA en hoja y tallo y en menor cantidad en el pistilo, tejido donde se lleva a cabo la respuesta de AI. En polen no se detectó su mRNA. Los promedios se muestran con +/- error estándar (n=3).

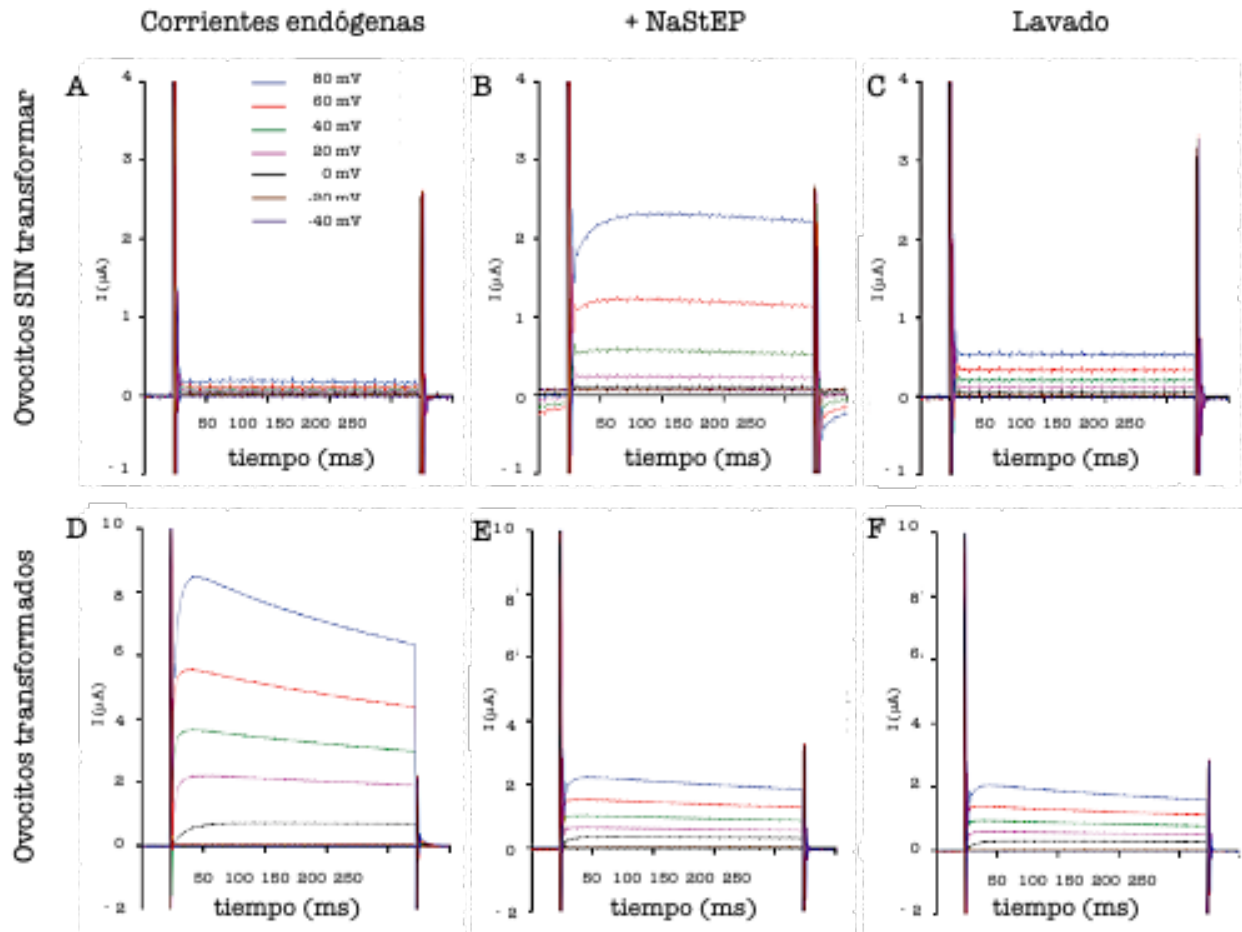
### **NaStEP además de ser inhibidor de proteasa tiene actividad como bloqueador de canales dependiente de voltaje**

Varios inhibidores tipo Kunitz de animales presentan dos actividades, una como inhibidores de proteasas y otra como bloqueadores de canales dependientes de voltaje (Chen *et al.*, 2012b; Rustgi *et al.*, 2018b). En plantas, hasta donde se sabe, no se ha reportado ningún inhibidor de este tipo con esta característica dual por lo

que se decidió evaluar si NaStEP funciona también como bloqueador de canales.

Para probar la actividad de bloqueador de canales de voltaje de NaStEP, se sobreexpresó el canal de potasio dependiente de voltaje de humano Kv 1.3 en ovocitos de *Xenopus leavis*. Los ovocitos transformados y no transformados fueron incubados con NaStEP (100 mM) y se les aplicó diferentes voltajes.

El comportamiento de los ovocitos sin transformar bajo las siguientes condiciones se muestra en las Figuras 21A, 21B y 21C, respectivamente: sin NaStEP; al agregar NaStEP; y después de agregar NaStEP y realizar un lavado. Cuando se prueban los ovocitos transformados (*i.e.* sobreexpresan el canal Kv 1.3), muestran un comportamiento en la intensidad de la corriente (Figura 21D) que se interrumpe cuando son tratados con NaStEP (Figura 21E). Esta interrupción es irreversible, ya que, si después de agregar NaStEP se realiza un lavado, la interrupción perdura (Figura 21F).



**Figura 21. Actividad de NaStEP como bloqueador de canales dependientes de voltaje.** Se probó la capacidad de NaStEP como bloqueador de canales en ovocitos de *X. leavis* donde se sobreexpresó el canal de potasio Kv 1.3. Los paneles A, B y C corresponden a los electrogramas de ovocitos silvestres y los paneles D, E y F a los electrogramas de los ovocitos que sobreexpresan el canal. A y D. Lecturas de los controles de corrientes endógenas de ovocitos no inyectados o inyectados con agua; B y E electrogramas obtenidos después de agregar 100 mmol/L de NaStEP; C y F electrogramas después de realizar lavados con la solución fisiológica ND96.

## Discusión

Durante la polinización se forma una red de interacciones entre proteínas tanto del polen como del pistilo que resulta en la degradación de algunas proteínas y en la síntesis o permanencia de otras. Estas interacciones son las responsables de que se lleve a cabo o no la fecundación. *Nicotiana glauca* es una especie autoincompatible, es decir, rechaza su propio polen y el polen genéticamente relacionado a través de un mecanismo basado en S-RNasas y genes modificadores. El rechazo del polen ocurre cuando las S-RNasas provenientes del estilo ingresan a los TPs e interaccionan con la determinante masculina SLF. Esta interacción junto con la acción de los productos de otros genes como *NaStEP*, *HT-B*, *120K*, *NaTrxh* y *NaSIPP*, impiden que el TP se lleve a cabo la fecundación.

*NaStEP* se agrupa con los inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Se sugiere que su función en la respuesta de AI es proteger de la degradación a la proteína HT-B quien rompe la vacuola que contiene a las S-RNasas, las cuales ingresaron al TP desde el estilo. Libres en el citoplasma, las S-RNasas degradan el RNA del TP inhibiendo su crecimiento. Por el contrario, en una cruce compatible, HT-B se degrada antes de que libere a las S-RNasas al citoplasma del TP. No es claro si *NaStEP* también se degrada en una cruce compatible por lo que en este trabajo se estudio la estabilidad de *NaStEP* durante la polinización.

Por otro lado, está reportado que algunos miembros de la familia de inhibidores Kunitz presentan dos funciones, como inhibidor de proteasas y como bloqueador

de canales iónicos (Peigneur *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012;) por lo que en este trabajo se evaluó el mecanismo de acción de NaStEP sobre la Ser-proteasa subtilisina así como su función como bloqueador de canales iónicos en ovocitos de *Xenopus*.

Por lo general, los inhibidores tipo Kunitz inhiben proteasas de serina como la tripsina y la subtilisina. En trabajos previos se evaluó la capacidad de inhibición de NaStEP sobre la tripsina dando un resultado negativo (Busot *et al.*, 2008). Por el contrario, cuando se probó contra la subtilisina el resultado fue positivo (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), hecho que era de esperarse ya que la subtilisina es un blanco común para los inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Hegedus *et al.*, 2003). En este trabajo se analizó la actividad de NaStEP como inhibidor de proteasas realizando ensayos cuantitativos sobre la papaína (proteasa de cisteína), sobre la termolisina (metaloproteasa) y sobre la subtilisina la cual fue utilizada como control. No se registró inhibición significativa para ninguna de las dos proteasas nuevas analizadas, demostrando así la especificidad de NaStEP para inhibir a la subtilisina (Figura 14).

En algunos casos, los inhibidores de proteasas funcionan como sustratos de las proteasas, por lo que se decidió investigar si NaStEP es sustrato de alguna de las proteasas analizadas. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, NaStEP permaneció intacta cuando en el ensayo se utilizó termolisina; sin embargo, cuando se utilizó papaína y subtilisina, NaStEP fue degradada, pero de manera diferente. La papaína la degradó completamente, mientras que la subtilisina sola la digirió parcialmente. Este resultado sugiere que NaStEP, al igual que la azo-

caseína es un sustrato tanto de la papaína como de la subtilisina, pero en el primer caso, es un sustrato que se comporta de manera genérica y es digerido rápidamente, mientras que con la subtilisina la degradación es lenta. De hecho, la digestión de la subtilisina da como resultado dos polipéptidos de menor masa molecular (21 y 14 kDa). Este mecanismo de inhibición también ha sido demostrado en otros inhibidores tipo Kunitz, los cuales llevan a cabo su acción inhibitoria siendo a si mismo sustratos de la proteasa a la que inhiben, pero a diferencia de un sustrato “normal”, la velocidad de la reacción es menor. Este tipo de inhibición se conoce como inhibición tipo competitiva o suicida (Christeller and Laing, 2005; Farady and Craik, 2010; Gubb *et al.*, 2010).

Los resultados muestran que la digestión parcial de NaStEP por la subtilisina se lleva a cabo después de 5 min de incubación con 20 mU de la proteasa; en este tiempo, la proteína madura de NaStEP desaparece por completo, dando lugar a dos polipéptidos de 21 y 14 kDa. El polipéptido de 21 kDa permanece activo ya que conserva el sitio activo del inhibidor (PEVAPS), pero va siendo degradado a lo largo de la incubación, desapareciendo completamente después de 24 h. Por el contrario, el de 14 kDa, el cual permanece hasta las 24 h de incubación, no presenta el sitio activo, sin embargo, no se pudo determinar si aún conserva la capacidad de inhibir a la subtilisina, ya que la proteasa pierde su actividad después de 24 h de incubación.

Durante el establecimiento del protocolo de purificación de NaStEP, se encontró una proteasa que inhibe la actividad de NaStEP; que no se pudo identificar, pero que sugiere la existencia *in vivo* de una proteasa capaz de regular la actividad de



NaStEP, como lo podría hacer la subtilisina. Para determinar si en el genoma de *N. alata* se expresa una proteína tipo subtilisina, se realizó un análisis bioinformático sobre el genoma de *N. benthamiana*, que permitió amplificar la secuencia de una proteína tipo subtilisina, la cual se expresa en pistilo, hoja y antera. Su expresión en pistilo y antera, lo convierte en un fuerte candidato a ser la proteína blanco de NaStEP en la vía de AI. Para confirmar esta suposición se propone realizar un análisis de pérdida de función.

Además de las determinantes alelo *S* específicas SLFs y la S-RNasa, se requieren otras proteínas como HT-B, 120K, NaSIPP y NaStEP para el rechazo del polen propio en *Nicotiana* (McClure *et al.*, 1999; Nathan Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2013; García-Valencia *et al.*, 2017). A pesar de que no se conoce aún el mecanismo bioquímico y molecular que lleva a cabo cada una de estas proteínas durante la AI, se sabe que, en una cruce incompatible, HT-B y 120K permanecen estables dentro de los TPs. Por el contrario, en una cruce compatible ambas proteínas son degradadas (Goldraj *et al.*, 2006). En este trabajo se comprobó que NaStEP también se degrada en una cruce compatible y se mantiene estable en una cruce incompatible (Figura 12). La degradación de NaStEP en TPs de una cruce compatible es congruente con los resultados de supresión de esta proteína en plantas transgénicas de *Nicotiana*, donde la proteína HT-B es degradada tanto en una cruce compatible como en una incompatible, situación que no ocurre en *N. alata* AI silvestre, donde HT-B solo se degrada en los TPs de cruces compatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), sugiriendo que la actividad de NaStEP como inhibidor de proteasas es esencial para la estabilidad de HT-B en una cruce

incompatible. Por lo tanto, se propone que, a través de su actividad de inhibidor de proteasas, NaStEP protege a HT-B del ataque de una proteasa en una crucea incompatible. Esta proteasa bien podría ser la subtilisina que se identificó en este trabajo, ya que además de que se expresa en los pistilos de *N. alata*, comparte el 94.72% de identidad con su ortólogo de *N. benthamiana*.

Muchas de las proteínas estilares involucradas en la AI, como la S-RNasa, poseen un péptido señal que las envía a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo desde donde, durante la polinización, ingresan a los TPs que van creciendo hacia el ovario (McClure *et al.*, 2011). Es muy probable que la proteína tipo subtilisina madura de *N. alata* aquí descrita, se acumule también en la matriz extracelular del tejido de transmisión, ya que en su secuencia se predice un péptido señal. Con estos datos, se propone al gen de la proteína tipo subtilisina de *N. alata*, como un fuerte candidato para ser el que codifica la proteasa que degrada a HT-B, la cual sería inhibida por NaStEP. Para probar lo anterior, se propone llevar a cabo la sobreexpresión de esta proteína para hacer ensayos tanto de actividad proteolítica, como de inhibición, utilizando a NaStEP como inhibidor de proteasas.

La otra función de NaStEP que se exploró en esta investigación, fue su capacidad para bloquear canales dependientes de voltaje (CDV). Esto se realizó en ovocitos de *X. leavis* que sobreexpresan el canal de potasio Kv 1.3. Los resultados dieron evidencia de que NaStEP, puede bloquear canales dependientes de voltaje. En la literatura no se encontró ningún reporte en plantas de algún inhibidor tipo Kunitz que lleve a cabo esta función. En plantas, los canales dependientes de voltaje se localizan en la mayoría de las membranas celulares, incluyendo vesículas de

secreción, glioxisomas y membranas mitocondriales (Lurin *et al.*, 1996; Kusano *et al.*, 2009).

Durante el ataque de un patógeno, se bloquean algunos canales dependientes de voltaje induciéndose la muerte celular programada (MCP) (Li *et al.*, 2008; Kusano *et al.*, 2009). Aún no se sabe con certeza si NaStEP, además de interactuar con NaSIPP (García-Valencia *et al.*, 2017), también interaccione *in vivo* con un canal dependiente de voltaje en el tubo polínico. De ser así, NaStEP podría formar un complejo tripartita con un canal dependiente de voltaje mitocondrial en el TP. Para que este complejo pueda formarse, la interacción de NaStEP con un canal dependiente de voltaje, debería dejar expuesto un dominio de NaStEP en el espacio intermembranal de la mitocondria, donde a su vez interaccionaría con el dominio C-terminal de NaSIPP. Este complejo causaría la despolarización de la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de factores de muerte, como el citocromo *c*, desencadenando la MCP. Este evento reforzaría la respuesta de rechazo del polen alelo-S específico.

Tomando en cuenta los resultados de este trabajo y los elementos involucrados en la respuesta del rechazo del polen reportados previamente, proponemos el modelo mostrado en la Figura 22 que implica que sin importar el tipo de cruza que ocurra, las S-RNAs ingresan al citoplasma del TP (Luu *et al.*, 2000; Goldraj *et al.*, 2006). Para explicar cómo se desarrolla la respuesta de AI se han propuesto dos modelos: el modelo colaborativo y el de compartimentalización. En el primero, las SLFs interactúan con las S-RNAs de manera diferencial, entre las alelo S específicas y las no alelo S específicas. Se propone que la interacción con las S-RNAs no alelo

S específicas es muy fuerte, lo que permite que estas S-RNasas sean ubiquitinadas y enviadas a su degradación, vía el proteosoma 26S. Por el contrario, la interacción con las S-RNasas alelo S específicas. debe ser débil, permitiendo que las S-RNasas logren escapar a la degradación y puedan llevar a cabo su función citotóxica, digiriendo el RNA del TP deteniendo su crecimiento (Kubo *et al.*, 2010, 2015).

En el modelo de compartimentalización, las S-RNasas son confinadas en vacuolas del TP, las cuales se rompen solamente en cruza incompatibles. La ruptura de estas vacuolas libera a todas las S-RNasas al citoplasma del TP donde degradan el RNA del TP deteniendo su crecimiento.

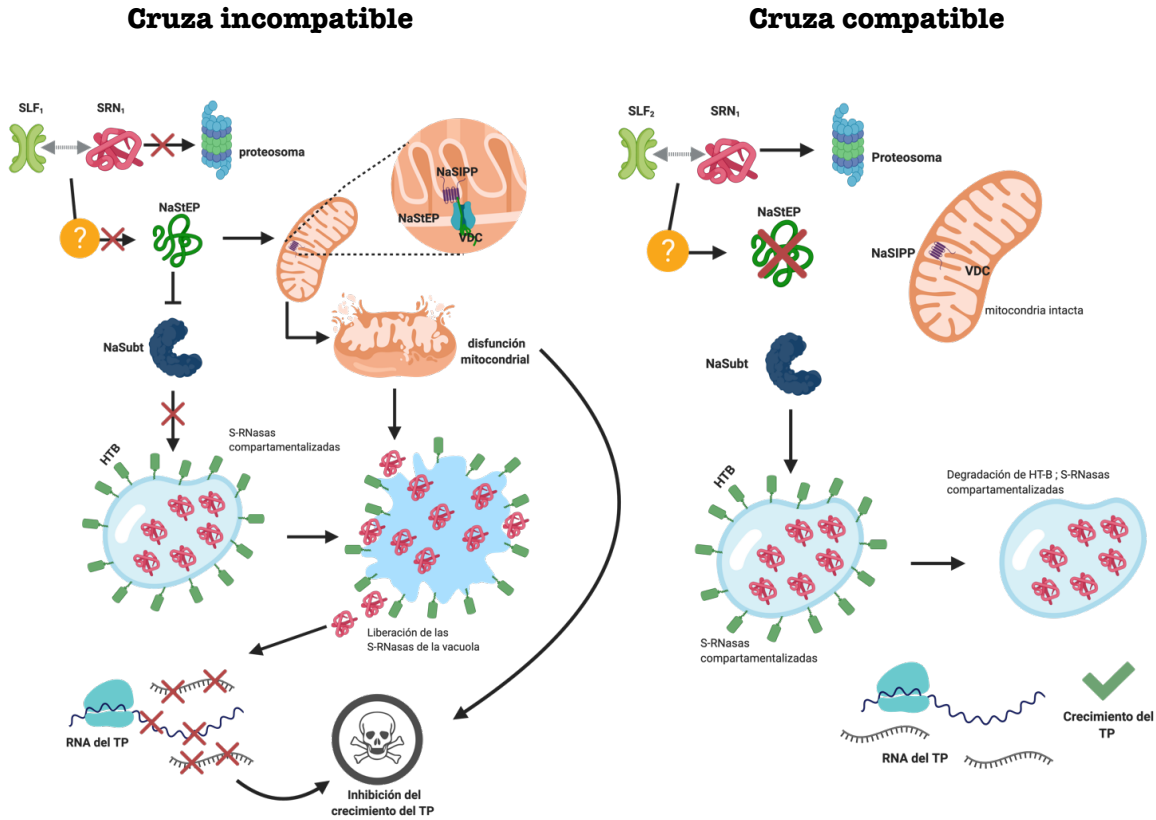
Las S-RNasas que no son degradadas (modelo colaborativo) o las S-RNasas citosólicas que no ingresaron a las vacuolas del TP (modelo de compartimentalización), puede que sean insuficientes para que se lleve a cabo el rechazo del polen. Por lo tanto, es posible que estas S-RNasas citosólicas (o las no degradadas, dependiendo del modelo), desencadenen los eventos que lleven a la respuesta de AI a un punto irreversible, el cual, según la evidencia observada, es la liberación de las S-RNasas de la vacuola del TP.

De acuerdo con los resultados presentados, NaStEP es necesaria para proteger a HT-B de la degradación lo que permite que las S-RNasas sean liberadas de la vacuola (Figura 22). No es claro cómo podría llevarse a cabo este paso, sin embargo, el modelo colaborativo puede ayudar a explicarlo: en una cruza incompatible, la interacción de SLF-S-RNasa puede inhibir o degradar a una proteasa hipotética que tenga como blanco a NaStEP, mientras que, en una cruza

compatible, la interacción de SLFs con S-RNasas no propias, de alguna forma permite que esta proteasa hipotética degrade a NaStEP (Figura 22). El modelo de compartimentalización puede explicar los eventos posteriores de la respuesta: Si en una cruce incompatible NaStEP no es degradada, entonces podría inhibir, por un lado a la proteasa tipo subtilisina que tiene como blanco a HT-B, quien liberaría a las S-RNasas al citoplasma del TP, y por el otro, NaStEP podría traslocarse hacia la mitocondria, donde formaría un complejo tripartita con CDV y NaSIPP, el cual desencadenaría MCP (Jiménez-Durán *et al.*, 2013; García-Valencia *et al.*, 2017;). Por el contrario, si NaStEP es degradada en una cruce compatible, entonces HT-B también sería blanco de degradación, lo que evitaría que las S-RNasas fueran liberadas de la vacuola impidiendo su interacción con CDV y NaSIPP, lo que mantendría en buen estado a la mitocondria. Como resultado, el TP podría seguir su crecimiento hacia el ovario (Figura 22).

La respuesta de AI se puede detectar después de las 16 h post polinización en una cruz incompatible (Goldraj *et al.*, 2006); durante este tiempo, la proteasa que degrada a HT-B debe permanecer inhibida, probablemente por NaStEP ya que es un inhibidor que ingresa a los TPs desde el estigma y persiste hasta las 24 h después de la polinización (Figura 12).

Hasta ahora, no se sabe qué polipéptido de NaStEP podría ser el responsable de la relocalización a la mitocondria para interactuar con el CDV y NaSIPP, ni cuál el que inhiba a la proteasa tipo subtilisina.



**Figura 22. Modelo de la función dual de NaStEP durante la respuesta de AI en *N. alata*.** A) En una cruce incompatible, la interacción SLF-S-RNasa [ejemplificada como SLF<sub>1</sub> y S<sub>1</sub>-RNasa (SRN<sub>1</sub>)] es débil, permitiendo que queden S-RNasas libres en el citosol. Esta interacción alelo S-específica de alguna manera (¿?) estabiliza a NaStEP y una fracción de esta proteína inhibirá a la proteasa tipo subtilisina (NaSubt) que degrada a HT-B (proteína importante para la liberación de las S-RNasas al citosol). Otro polipéptido de NaStEP será relocalizado hacia la mitocondria, donde interaccionará con NaSIPP (transportador de fosfatos específico de polen esencial en la AI) y CDV. Esta interacción desestabiliza a la mitocondria liberando factores de muerte que inducen la MCP lo que reforzaría la respuesta de AI. B) En una cruce compatible, la interacción entre SLF y las S-RNasas no propias [ejemplificadas como SLF<sub>2</sub> y S<sub>1</sub>-RNasa (SRN<sub>1</sub>)] es más fuerte, lo que provoca la degradación de las S-RNasas vía el proteosoma 26S. NaStEP se encuentra de alguna manera inhibida o degradada, por lo tanto, la proteasa NaSubt permanecería activa para degradar a HT-B lo que mantendría intacta a la vacuola que contiene a las S-RNasas. De la misma forma, dado que NaStEP no podría interaccionar con NaSIPP ni con CDV, la mitocondria no sufriría daño lo que permitiría que el TP creciera hacia el ovario completando así la fecundación.

## Conclusiones

1. La proteína NaStEP se degrada en cruces compatibles, probablemente en el interior de los tubos polínicos, como ocurre con la proteína HT-B.
2. NaStEP inhibe de manera específica e irreversible a la Ser-proteasa subtilisina.
3. La subtilisina también procesa a NaStEP, produciendo dos especies proteicas de menor masa molecular.
4. La inhibición de NaStEP sobre la subtilisina es dosis dependiente e irreversible.
5. NaStEP presenta actividad de bloqueador de canal dependiente de voltaje Kv1.3 en ovocitos de *Xenopus*.

## Perspectivas

Las preguntas que surgen de este trabajo de investigación para profundizar más en la función de NaStEP en el rechazo del polen de *N. alata* son las siguientes:

1. ¿Las especies de menor masa molecular derivadas de la digestión parcial de la subtilisina poseen actividad como inhibidor de proteasa o como bloqueador de canales?

Para resolver esta pregunta se piensa expresar en *E. coli* cada una de estas especies moleculares y evaluar, en primera instancia, si funcionan como bloqueadores de canales en ovocitos de *Xenopus laevis*. Para determinar si estas especies de bajo peso molecular participan en el rechazo del polen, en el laboratorio se cuenta con una línea de *N. alata* donde NaStEP está silenciada, a esta línea se le agregarán, en el estigma, las versiones purificadas de NaStEP recombinantes y se evaluará si los individuos revierten el fenotipo de polinización, es decir, se vuelven AI de nuevo.

2. ¿El cDNA de la proteína tipo subtilisina que se clonó en este trabajo participa en la AI?

Para contestar esta pregunta, se generarán plantas transgénicas donde se suprima la expresión de esta proteína por medio de RNAi; si la proteína tipo subtilisina está implicada en la vía, las plantas serán incapaces de reconocer y rechazar su propio polen lo cual indicará que es una proteína esencial en el rechazo del polen.

3. ¿NaStEP y la subtilisina interaccionan en el interior del tubo polínico?

La respuesta a esta pregunta se dará a través de experimentos de coinmunolocalización de ambas proteínas, ya que el laboratorio cuenta con anticuerpos mono-específicos para cada una de ellas. Con esta información podremos determinar la capacidad que pudiera tener NaStEP de inhibir *in vivo* a la subtilisina en el tubo polínico si es que colocalizan en algún compartimento celular.



## Bibliografía

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, M.A., Cornish, E.C., Mau, S.L., Williams, E.G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Niall, H.D., Tregear, G.W., Coghlan, J.P., Crawford, R.J., Clarke, A.E., 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321, 38-44. <https://doi.org/10.1038/321038a0>
- Barrett, S.C.H., 2019. 'A most complex marriage arrangement': recent advances on heterostyly and unresolved questions. *New Phytol.* 224, 1051-1067. <https://doi.org/10.1111/nph.16026>
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00597-X>
- Bendre, A.D., Ramasamy, S., Suresh, C.G., 2018. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.148>
- Busot, G.Y., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C.P., Jiménez-Durán, K., Vázquez-Santana, S., Cruz-García, F., 2008. Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J. Exp. Bot.* 59, 3187-3201. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern175>
- Carlini, C.R., Grossi-De-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00240-4)
- Chen, Z.Y., Hu, Y.T., Yang, W.S., He, Y.W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.M., Ding, J.P., Cao, Z.J., Li, W.X., Wu, Y.L., 2012a. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kvl.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *J. Biol. Chem.* 287, 13813-13821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343996>
- Chen, Z.Y., Hu, Y.T., Yang, W.S., He, Y.W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.M., Ding, J.P., Cao, Z.J., Li, W.X., Wu, Y.L., 2012b. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kvl.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *J. Biol. Chem.* 287, 13813-13821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343996>
- Christeller, J., Laing, W., 2005. Plant Serine Proteinase Inhibitors. *Protein Pept. Lett.* 12, 439-447. <https://doi.org/10.2174/0929866054395329>
- Clemente, M., Corigliano, M.G., Pariani, S.A., Sánchez-López, E.F., Sander, V.A., Ramos-Duarte, V.A., 2019. Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20061345>
- Cornish, E.C., Pettitt, J.M., Bonig, I., Clarke, A.E., 1987. Developmentally

- controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/326099a0>
- Cruz-Zamora, Y., Nájera-Torres, E., Noriega-Navarro, R., Torres-Rodríguez, M.D.D., Bernal-Gracida, L.A.A., García-Valdés, J., Juárez-Díaz, J.A.A., Cruz-García, F., 2020. NaStEP, an essential protein for self-incompatibility in *Nicotiana glauca*, performs a dual activity as a proteinase inhibitor and as a voltage-dependent channel blocker. *Plant Physiol. Biochem.* 151, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.052>
- de Nettancourt, D., de Nettancourt, D., 2001. The Basic Features of Self-Incompatibility, in: *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–24. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04502-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04502-2_1)
- DYER, W.T.T., 1877. The Effects of Cross and Self-Fertilisation in the Vegetable Kingdom. *Nature* 15, 329–332. <https://doi.org/10.1038/015329a0>
- Farady, C.J., Craik, C.S., 2010. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBioChem* 11, 2341–2346. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000442>
- Franklin-Tong, V.E., 2008. Self-incompatibility in flowering plants: Evolution, diversity, and mechanisms, *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68486-2>
- Fujii, S., Kubo, K.I., Takayama, S., 2016. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nat. Plants*. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.130>
- García-Valencia, L.E., Bravo-Alberto, C.E., Wu, H.M., Rodríguez-Sotres, R., Cheung, A.Y., Cruz-García, F., 2017. SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol.* 175, 1105–1120. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01884>
- Goldberg, E.E., Kohn, J.R., Lande, R., Robertson, K.A., Smith, S.A., Igić, B., 2010. Species selection maintains self-incompatibility. *Science (80- )*. 330, 493–495. <https://doi.org/10.1126/science.1194513>
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, C.N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T.E., Cruz-García, F., McClure, B., 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Nature* 439, 805–810. <https://doi.org/10.1038/nature04491>
- Gubb, D., Sanz-Parra, A., Barcena, L., Troxler, L., Fullaondo, A., 2010. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.004>
- Hegedus, D., Baldwin, D., O'Grady, M., Braun, L., Gleddie, S., Sharpe, A., Lydiate, D., Erlandson, M., 2003. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53, 30–47. <https://doi.org/10.1002/arch.10084>
- Huu, C.N., Kappel, C., Keller, B., Sicard, A., Takebayashi, Y., Breuninger, H., Nowak, M.D., Bäurle, I., Himmelbach, A., Burkart, M., Ebbing-Lohaus, T., Sakakibara, H., Altschmied, L., Conti, E., Lenhard, M., 2016. Presence versus

- absence of CYP734A50 underlies the style-length dimorphism in primroses. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17956>
- Igic, B., Lande, R., Kohn, J.R., 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *Int. J. Plant Sci.* <https://doi.org/10.1086/523362>
- Ioerger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B., Kao, T.H., 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4, 81–87. <https://doi.org/10.1007/BF00196492>
- Iwano, M., Takayama, S., 2012. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.09.003>
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., Cruz-García, F., 2013. NaStEP: A proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol.* 161, 97–107. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198440>
- Kubo, K.I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A.M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S.I., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.H., Takayama, S., 2010. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* (80-. ). 330, 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1195243>
- Kubo, K.I., Paape, T., Hatakeyama, M., Entani, T., Takara, A., Kajihara, K., Tsukahara, M., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K.K., Takayama, S., 2015. Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Nat. Plants.* <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.5>
- Kusano, T., Tateda, C., Takahashi, Y., Berberich, T., 2009. Voltage-dependent anion channels: Their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Rep.* 28, 1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0741-z>
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y., 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50, 29–42. <https://doi.org/10.1023/A:1016050018779>
- Lallemand, J., Bouché, F., Desiron, C., Stautemas, J., Esteves, F. de L., Périlleux, C., Tocquin, P., 2015. Extracellular peptidase hunting for improvement of protein production in plant cells and roots. *Front. Plant Sci.* 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00037>
- Lee, H.S., Huang, S., Kao, T.H., 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367, 560–563. <https://doi.org/10.1038/367560a0>
- Li, J., Brader, G., Palva, E.T., 2008. Kunitz trypsin inhibitor: An antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1, 482–495. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn013>
- Li, Y., Hu, Z., Jordan, F., Inouye, M., 1995. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J. Biol. Chem.* 270, 25127–25132. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.25127>

- Lurin, C., Geelen, D., Barbier-Brygoo, H., Guern, J., Maurel, C., 1996. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell* 8, 701–711. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.701>
- Luu, D.T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M., 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35036623>
- Macedo, M., Pando, S., Chevreuril, L., Marangoni, S., 2009. Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein Pept. Lett.* 16, 1459–1465. <https://doi.org/10.2174/092986609789839395>
- MacIntosh, G.C., 2011. RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases. pp. 89–114. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-21078-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-21078-5_4)
- Márquez-Guzmán, J., Collazo-Ortega, M., Martínez-Gordillo, M., Orozco-Segovia, A., Vázquez-Santana, S., 2013. *Biología de angiospermas*, 1st ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- McClure, B., Cruz-García, F., Romero, C., 2011. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* 108, 647–658. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr179>
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., Bernatzky, R., 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13548–13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13548>
- McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F., Clarke, A.E., 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342, 955–957. <https://doi.org/10.1038/342955a0>
- Muñoz-Sanz, J.V., Zuriaga, E., Cruz-García, F., McClure, B., Romero, C., 2020. Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00195>
- Nathan Hancock, C., Kent, L., McClure, B.A., 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43, 716–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02490.x>
- Oliva, M.L. V., Silva, M.C.C., Sallai, R.C., Brito, M. V., Sampaio, M.U., 2010. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.021>
- Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., Tytgat, J., 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* 82, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/BJ20031825>
- Rodney F, B., 2000. *Conceptos en Bioquímica*.
- Rustgi, S., Boex-Fontvieille, E., Reinbothe, C., von Wettstein, D., Reinbothe, S.,

- 2018a. The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1368599>
- Rustgi, S., Boex-Fontvieille, E., Reinbothe, C., von Wettstein, D., Reinbothe, S., 2018b. The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1368599>
- Schaller, A., Stintzi, A., Rivas, S., Serrano, I., Chichkova, N. V., Vartapetian, A.B., Martínez, D., Guiamét, J.J., Sueldo, D.J., van der Hoorn, R.A.L., Ramírez, V., Vera, P., 2018. From structure to function – a family portrait of plant subtilases. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.14582>
- Shamsi, T.N., Parveen, R., Fatima, S., 2016. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069>
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G., Huang, S., Kao, T.H., 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429, 302–305. <https://doi.org/10.1038/nature02523>
- Takayama, S., Isogai, A., 2005. SELF-INCOMPATIBILITY IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- Thomas N. Taylor, E.L.T. and M.K., 2008. Paleobotany The Biology and Evolution of Fossil Plants. *Paleobotany (Second Ed. Biol. Evol. Foss. Plants.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373972-8.00029-2>
- Tripathi, L.P., Sowdhamini, R., 2006. Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* 7, 1–31. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-200>
- Uchikoba, T., Yonezawa, H., Kaneda, M., 1995. Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. *J. Biochem.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124817>
- van der Hoorn, R.A.L., Rivas, S., 2018. Unravelling the mode of action of plant proteases. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15156>
- Vartapetian, A.B., Tuzhikov, A.I., Chichkova, N. V., Taliansky, M., Wolpert, T.J., 2011. A plant alternative to animal caspases: Subtilisin-like proteases. *Cell Death Differ.* <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.49>
- Verma, S., Dixit, R., Pandey, K.C., 2016. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front. Pharmacol.* 7, 107. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>
- Walsh, T.A., Twitched, W.P., 1991. Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* 97. <https://doi.org/10.1104/pp.97.1.15>
- Wang, C.-L., Xu, G.-H., Jiang, X.-T., Chen, G., Wu, J., Wu, H.-Q., Zhang, S.-L., 2009. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia in vitro*. *Plant J.* 57, 220–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03681.x>
- Williams, J.S., Natale, C.A., Wang, N., Li, S., Brubaker, T.R., Sun, P., Kao, T.H., 2014. Four previously identified *petunia inflata* s-locus f-box genes are

- involved in pollen specificity in self-incompatibility. *Mol. Plant.*  
<https://doi.org/10.1093/mp/sst155>
- Wu, S., 2008. LAND PLANTS, in: *The Jehol Fossils*.  
<https://doi.org/10.1016/b978-012374173-8.50020-x>
- Yuan, C.-H., He, Q.-Y., Peng, K., Diao, J.-B., Jiang, L.-P., Tang, X., Liang, S.-P.,  
2008. Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from  
Tarantulas. *PLoS One* 3, e3414.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003414>
- Zhou, D., Lobo, Y.A., Batista, I.F.C., Marques-Porto, R., Gustchina, A., Oliva, M.L.  
V., Wlodawer, A., 2013. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from  
*Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine  
Trypsin. *PLoS One* 8, e62252.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062252>

## Anexo 1

Secuencia de los péptidos recuperados del análisis por espectrometría de masas de la proteína de menor peso molecular que detecta el anticuerpo NaStEP:

(K)CPNDVVQHWEGSK(D)  
(R)ETNDINIMFSVPTTK(L)  
(R)FVVTGGTLGYPGPITIK(S)  
(K)FFTMDPEVAPSSVVR(E)  
(R)ETNDINIMFSVPTTK(L)  
(K)FFTMDPEVAPSSVVR(E)  
(R)LVLNDQPFVVFEK(F)  
(R)YLCPMCYVGCSDVGLTADR(D)  
(K)CPNDVVQHWEGSK(D)  
(C)PNDVVQHWEGSK(D)  
(P)NDVVQHWEGSK(D)  
(N)DVVQHWEGSK(D)  
(K)FFTMDPEV(A)  
(K)FFTMDPEVA(P)  
(K)FFTMDPEVAPSSVVR(E)  
(E)VAPSSVVR(E)  
(V)APSSVVR(E)  
(A)PSSVVR(E)  
(P)SSVVR(E)  
(R)ETNDINIM(F)  
(R)ETNDINIMF(S)  
(R)ETNDINIMFSV(P)  
(R)ETNDINIMFSV(P)  
(R)ETNDINIMFSVPTTK(L)  
(D)INIMFSVPTTK(L)  
(N)IMFSVPTTK(L)  
(R)FVVTGGTL(G)  
(R)FVVTGGTLG(Y)  
(R)FVVTGGTLG(Y)  
(R)FVVTGGTLGY(P)  
(R)FVVTGGTLGY(P)  
(R)FVVTGGTLGYPGPI(T)  
(R)FVVTGGTLGYPGPITIK(S)  
(V)VTGGTLGYPGPITIK(S)  
(V)TGGTLGYPGPITIK(S)  
(T)GGTLGYPGPITIK(S)  
(L)GYPGPITIK(S)  
(Y)PGPITIK(S)  
(K)CPNDVVQHWEGSK(D)