



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de solubilización de polisacáridos de las expansinas SocEx1x1-CBM y PcEx11 sobre estilo y estigma de maíz.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Juan José Salazar Cortés

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Claudia Martínez Anaya
Departamento de Ingeniería celular y biocatálisis, IBt UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo Castillo Rosales
Departamento de Ingeniería celular y biocatálisis, IBt UNAM

Dr. Leobardo Serrano Carreón
Departamento de Ingeniería celular y biocatálisis, IBt UNAM

Ciudad de México. Septiembre, 2020



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.

Agradecimientos académicos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que durante más de 9 años ha sido nicho de mi desarrollo personal y académico. En particular al Instituto de Biotecnología porqué es cuna de mi vida en la ciencia.

Al proyecto PAPIIT (IN-211116) y al CONACyT Ciencia-Básica (252551) por el apoyo financiero para el proyecto del que este trabajo forma parte. También al CONACyT agradezco la beca que recibí durante mis estudios y al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP).

Agradezco al Dr. Lorenzo Segovia por permitirme trabajar en el laboratorio, y a mi tutora, la Dra. Claudia Martínez Anaya por su apoyo y consejos. También, agradezco a todo el equipo del laboratorio 12, especialmente al Dr. Omar Tovar, M. en C. Delia Narváez, M. en C. Andrés y M. en C. Blanca Ramos, por el apoyo técnico y consejos durante mi estancia en el laboratorio. Así mismo, agradezco al personal laboratorista y de limpieza.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Edmundo Castillo Rosales y Dr. Leobardo Serrano Carreón, por sus observaciones y consejos durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Jorge Jiménez, Biol. Raúl Alejandro, Biol. Raquel Neri, Quim. Sol Castrejón, Ing. Alberto Morales y Dra. Nina Pastor, por el apoyo técnico y consejos en diferentes momentos durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Alfredo Martínez Jiménez. Dra. Claudia Rodríguez Almazán, Dr. Ernesto Ortiz Suri, Dr. Jorge Luis Folch Mallol y Dra. Claudia Díaz Camino, por sus correcciones del trabajo.

A los y las encargadas de las unidades de apoyo técnico y a la unidad de cómputo del IBt.

A la Red de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (REFER).

Agradecimientos personales.

A mis padres, por el amor que siempre han manifestado. Porque llevan años luchando hasta el sacrificio de ellos mismos por mis hermanos y yo, por nuestro bienestar físico y mental; para que podamos pensar y soñar con libertad. Y porque al principio y al final de todo, son a ellos a quienes debo mi existencia. Gracias por seguir alentando nuestros sueños y apoyándonos en el cumplimiento de nuestras metas. Este logro es suyo.

A mi hermano y mi hermana, mis dos mejores amigos. Quienes son siempre el mejor sostén en los momentos difíciles, quienes son la mejor compañía en los momentos de duda y los mejores cómplices. Agradezco la paz y la alegría que transmiten.

A mis tías, Alejandra y Luz, mi tío Beto y mis dos pequeñas primas, Paz y Luz. Ustedes son quienes completan el núcleo familiar y juntos nos volvemos más fuertes.

A mi abuelo, Benito, una persona excepcional, quien me educó en la responsabilidad, en el trabajo duro y la perseverancia. A quien en su memoria deposito mis logros.

A Fernanda, quien es mi compañera íntima, agradezco toda la paz y alegría que brinda su presencia en mi vida, también, agradezco el apoyo, comprensión, consejo y consuelo. Gracias por permanecer junto a mí.

A mi tutora Claudia, agradezco haber tenido la oportunidad de trabajar bajo su guía durante mi estancia en el laboratorio. Por la confianza que siempre ha manifestado hacia mí, por las enseñanzas y apoyo dentro y fuera del laboratorio. Aprecio el cariño y las atenciones. De todo corazón, gracias.

A todos los miembros del laboratorio 12, pasados y presentes, agradezco el acogimiento, apoyo y consejos. En mi corazón y memoria llevo todas las experiencias y la gratitud por haberme siempre sentido a gusto y en confianza.

A mis más cercanos amigos guayabos Raquel, Raúl y Alfredo, por una larga y muy feliz amistad. También, a Alberto, Alberto y Alberto, a Rubén, Elizabeth, Javier, Ma., Ekaterina, Sinaid y a todos mis amigos del instituto, gracias.

A todos los chicos y chicas de palomas costarricenses, agradezco haber tenido la oportunidad de compartir esta etapa con ustedes en múltiples reuniones pintadas de azul. De quienes aquí recojo grandes experiencias para llevarlas a donde vaya.

A todos mis compañeros y compañeras, amigos y amigas de la comunidad deportiva y salsera del IBt.

Finalmente, agradezco a las amistades que han trascendido etapas importantes de mi vida. Especialmente, a mis amigos de la facultad (A.S.), a mis amigos de la prepa (los del pasillo) y los de la secundaria (el cuadro base). Porque con su ayuda puedo recordar y afianzarme en el pasado, para nunca olvidar de dónde vengo y cómo fue que me convertí en quien soy.

Tabla de contenido

Abreviaturas	7
1. Resumen	8
2. Introducción	9
3. Marco teórico	11
La pared celular de plantas, una estructura compleja	11
Degradación de la pared celular de plantas	14
Módulos de unión a carbohidratos	15
Expansinas	16
Expansinas microbianas	19
4. Antecedentes	22
5. Justificación	25
6. Hipótesis	25
7. Objetivos	26
8. Materiales y Métodos	26
Preparación del tejido vegetal	26
Expresión y purificación de proteínas recombinantes	27
Ensayo de solubilización de polisacáridos de la pared celular del estilo y estigma de maíz (EEM)	28
Análisis de las moléculas solubilizadas	31
Isoterma de unión a estigma de maíz	31
Determinación de la carga eléctrica superficial de las proteínas	31
Alineamiento de residuos clave para la unión/efecto en expansinas	32
9. Resultados	33
Evaluación del efecto de diferentes expansinas bacterianas sobre EEM	33
Efecto de <i>PcExl1</i> sobre EEM	34
Efecto de <i>SocExlx1</i> -CBM sobre EEM	38
Efecto de <i>SocPSL</i> -EXLX1 sobre EEM	42
Efecto de <i>BsEXLX1</i> sobre EEM	47
Efecto de BSA sobre EEM	48
Identidad de las moléculas solubilizadas a partir de EEM	51
Propiedades electrostáticas de las diferentes proteínas usadas	53

10. <i>Discusión</i>	60
Relación estructura-función de las expansinas	61
Particularidades de los ensayos y el método de medición empleado en este estudio	67
Diferencias de señal y polisacáridos	70
Función de las expansinas y la solubilización	71
11. <i>Conclusiones</i>	75
12. <i>Perspectivas</i>	76
13. <i>Referencias</i>	77

Abreviaturas

AX: Arabinoxilano

CBM: Módulo de unión a carbohidratos (*C*arbohydrate Binding Module)

D1: Dominio 1 del módulo expansina canónico

D2: Dominio 2 del módulo expansina canónico

DTT: Ditioneitol

dH₂O: Agua destilada

EEM: Estilo y estigma de maíz

GH: Glicosil hidrolasa

HG: Homogalacturonano

hsGAX: Gluconoarabinoxilano altamente sustituido (*h*ighly substituted Glucuronoarabinoxylan)

PBS: Sitio de unión a polisacáridos (*P*olysaccharide Binding Site)

PSL: Conector de poliserinas (*P*oly Serine Linker)

lsGAX: Gluconoarabinoxilano con pocas sustituciones (*l*ow substituted Glucuronoarabinoxylan)

XG: Xiloglucano

1. Resumen

En la fisiología de las plantas, así como en el ciclo del carbono en diversos ecosistemas, las matrices de polisacáridos que constituye la pared celular de plantas están en constante remodelación y degradación. Existen distintos sistemas que modifican a los polisacáridos que integran la pared de las células vegetales, y que involucran la participación de diversas moléculas que actúan, ya sea provocando la disminución de la tensión (aflojamiento) de sus fibras, hasta su ruptura y liberación de los componentes monoméricos. Las expansinas son una familia de proteínas que no tiene actividad enzimática, presentes en diversos *phyla* de bacterias, hongos y plantas, cuya actividad está involucrada en mecanismos de aflojamiento de la pared celular. Aunque se ha descrito su función en las plantas, su papel biológico en bacterias que contienen genes homólogos aún es materia de discusión, particularmente debido a que se han encontrado genes de expansinas en genomas de bacterias muy diferentes entre sí. En este trabajo profundizamos en el estudio de expansinas bacterianas, la expansina modular Exlx1-CBM de *Sorangium cellulosum* y la expansina ácida Exl1 de *Pectobacterium carotovorum*, para quienes detectamos que son capaces de solubilizar polisacáridos de la pared celular del estigma de maíz. Este proceso depende del pH del medio. Las evidencias sugieren que el efecto no depende de la capacidad de unión de las proteínas. Además, exploramos algunas propiedades electrostáticas de la superficie de estas proteínas como probable explicación del efecto y las diferencias entre proteínas.

2. Introducción

La pared celular de las plantas constituye la interfase entre dos células vegetales vecinas, y funciona como un sistema de comunicación intercelular al tiempo que da forma y rigidez a la célula. La pared celular está compuesta por una compleja red de microfibras de celulosa que se embeben en una matriz hidratada de pectina, hemicelulosa y distintas proteínas, proteoglicanos y moléculas fenólicas presentes en diferentes proporciones^{1,2}.

En conjunto, las paredes celulares representan el más alto porcentaje de la biomasa de plantas (hasta un 80%) y en consecuencia, el mayor aporte de materia orgánica a los suelos de ecosistemas terrestres, así como una barrera y esqueleto fundamental en distintos procesos fisiológicos e inmunológicos de las plantas^{2,3}. Por lo tanto, en una gran variedad de procesos naturales se necesita la remodelación, modificación y/o degradación de los componentes de la pared celular de plantas¹. En particular, durante la colonización del tejido vegetal en el contexto del establecimiento de interacciones tanto patógenas como cooperativas entre plantas y microorganismos, uno de los eventos medulares es la colonización del tejido vegetal y depende de la modificación de la pared celular de la planta por parte de los microorganismos colonizadores⁴. Para lograr dicho objetivo, se utilizan complejas maquinarias moleculares que incluyen la participación de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes), proteínas con actividad auxiliar (LPMOs) y CBMs; y en algunos casos, celulosomas⁵ y “proteínas disruptivas” o “generadoras de amorfogénesis”⁶.

De las proteínas “generadoras de amorfogénesis”, las expansinas son el grupo más ampliamente distribuido⁷. Presentes en todas las divisiones de plantas y en algunos *phyla* de bacterias, hongos y amebozoos⁸. Las expansinas son una superfamilia de proteínas sin actividad enzimática, que poseen un módulo canónico compuesto de alrededor de 210 a 275 aminoácidos, conformando dos dominios⁹. En cuanto al mecanismo de acción, se sabe que las expansinas de plantas provocan la relajación de la pared celular a través del aflojamiento de las fibras de polisacáridos, dando como resultado el deslizamiento y la extensión irreversible¹⁰, y están involucradas en diversos procesos del desarrollo de las plantas¹¹. Por otro lado, ni la función o

especificidad de sustrato de las expansinas presentes en bacterias y en hongos, se ha podido dilucidar contundentemente¹², aunque ha sido demostrado que juegan un papel relevante en la interacción bacteria-planta¹³⁻¹⁵

Recientemente se demostró que las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Apium graveolens* activan su respuesta inmune cuando la expansina ExI1 de *Pectobacterium brasiliense*, interacciona directamente el tejido de estas plantas¹³. Esta misma proteína provoca la solubilización de polisacáridos al incubarse in vitro con el xilema de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla)¹⁶, lo que pudieran explicar el por qué se desencadena la respuesta inmune en la planta. Sin embargo, no se ha identificado la naturaleza de las moléculas liberadas, ni la consecuencia funcional de la presencia de la expansina en el sitio de unión al tejido vegetal, aunque podría estar relacionado con la movilidad al interior del tejido o la penetración al tejido vegetal^{13,17}. Experimentos preliminares indican que la expansina modular ExIx1-CBM de la mixobacteria celulolítica *Sorangium cellulosum* también tiene un efecto de solubilización sobre el estilo y estigma de maíz (EEM)¹⁸.

Este trabajo profundiza en la caracterización de la función de solubilización de polisacáridos de expansinas, sobre tejido vegetal de estilo y estigma de maíz (EEM). Probamos la expansina ácida ExI1 de *Pectobacterium carotovorum* sobre el tejido vegetal de una graminácea, con la intención de saber si el efecto reportado en tejidos de una dicotiledónea (xilema de acelga)¹⁶ puede extrapolarse a otros o es distinto, y así proponer un modelo de la solubilización de polisacáridos de esta expansina sobre paredes celulares. También evaluamos la señal por efecto de EXLX1 de *Bacillus subtilis* una proteína de carga básica, opuesta a PcExI1, para conocer la influencia de las cargas y el ambiente electrostático en la función de las expansinas. Finalmente, incluimos la expansina modular SocExIx1-CBM y una variante trunca de esta última que carece del CBM, para conocer si la presencia de un módulo adicional beneficia o no el efecto de solubilización.

3. Marco teórico

La pared celular de plantas, una estructura compleja

La pared celular vegetal forma la interfase entre dos células contiguas, y comprende un organelo dinámico que funciona como un sistema de soporte, de comunicación intercelular, que modula la forma de la célula y que la protege de insultos provenientes del medio exterior¹⁹. El principal componente la pared celular es la celulosa, presente en forma de microfibras compuestas por 18 a 24 cadenas que se organizan en forma concéntrica, y cuyo arreglo varía entre zonas, desde altamente cristalinas a zonas amorfas²⁰. Las microfibras de celulosa se encuentran embebidas en una matriz hidratada con otros polisacáridos, que se organizan a manera de cadenas individuales, y que se clasifican como hemicelulosas y pectinas¹⁹.

La hemicelulosa se divide en cuatro tipos: xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos²¹. Estos polisacáridos (principalmente los xiloglucanos, XG) crean sitios de estabilización (o “amalgamas”) al interactuar a través de enlaces débiles e inespecíficos entre ellos y con las microfibras de celulosa, modulando así el grado de compactación o de extensión de la pared celular^{2,3,22} (Figura 1). En monocotiledóneas gramíneas (o cereales), los polisacáridos de hemicelulosa más abundantes son los de xilano (hasta 50% en algunos tejidos de cereales y granos) y se encuentran principalmente en forma de arbinxilano (AX) y gluconoarabinxilano con bajo (lsGAX) y alto grado de sustitución (hsGAX)^{20,23,24} (Tabla 1).

Tabla 1. Abundancia de los componentes principales en las paredes celulares de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas gramináceas (cereales). Modificado de Ishii (1997).

Componente		Solubilidad en agua	Composición aproximada en paredes en crecimiento (%)		Composición aproximada en paredes maduras (%)	
			Cereales	Dicotiledóneas	Cereales	Dicotiledóneas
Celulosa (β -1,4-glucano)		Insoluble	30	30	25-35	45-50
Hemicelulosa	Xiloglucano	Soluble	5	25	40-50	25
	Xilano	Soluble	30	5		
	Glicanos con variadas uniones	Soluble	30	---		
	Glucomanos	Soluble	---	---		
Pectina	Homogalacturonano	Soluble	5	15	0.1	0.1
	Ramanogalacturonano I	Soluble		15		
	Ramanogalacturonano II	Soluble		5		
Glicoproteínas	Proteínas arabinogalactanos	Soluble	Variable	Variable		
	Extensinas	Soluble	0.5	<5		
Fenoles	Lignina	Insoluble	---	---	7-10	20
	Ácidos fenólicos	Parcialmente soluble	0.5-1.5	0.3	0.5-1.5	
Otros (sílica)			---	---	5-15	

Por otro lado, los polisacáridos de pectina proveen un alto potencial de hidratación y son los responsables de las propiedades adhesivas y porosas de las paredes celulares. Se encuentran principalmente en forma de homogalacturonano (HG), conocidos como pectina lisa; o bien, ramanogalacturonano I (RGI) y ramanogalacturonano II (RGII) conocidos como pectinas peludas en función de las ramificaciones que presentan²⁵. En general, la abundancia de este último grupo de

polisacáridos es mayor en las paredes celulares en crecimiento (llamadas primarias), y entre grupos, las gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramináceas poseen pectinas en mayor abundancia (Tabla 1)².

Finalmente, en las paredes celulares existen otras moléculas, como glicoproteínas y moléculas fenólicas, que son de importancia estructural y biológica. En particular, las glicoproteínas ricas en residuos de hidroxiprolina (extensinas, proteínas-arabinogalactanos y proteínas ricas en prolina) son fundamentales durante procesos citocinéticos y en el mantenimiento de la forma en general (Figura 1)^{26,27}. Por su parte, las moléculas fenólicas tienden a asociarse en complejos y numerosos polímeros, creando una estructura de soporte y de resistencia llamada lignina; un componente especialmente abundante en paredes celulares que detuvieron su crecimiento (llamadas paredes secundarias) y que comúnmente se encuentran en los tejidos expuestos al medio exterior^{23,28}. Además, los fenoles de tipo ácidos hidroxicinámicos (mayormente ácidos ferúlicos) sustituyentes de azúcares de arabinosa tanto en hemicelulosas como en pectinas (GAX y HG), forman dehidrodímeros de conformaciones variables²⁵, que fungen como puentes entre polisacáridos (conocidos como puentes diferúlicos, Figura 1), proveyendo a la pared de estabilidad térmica, entre otras funciones^{2,29}.

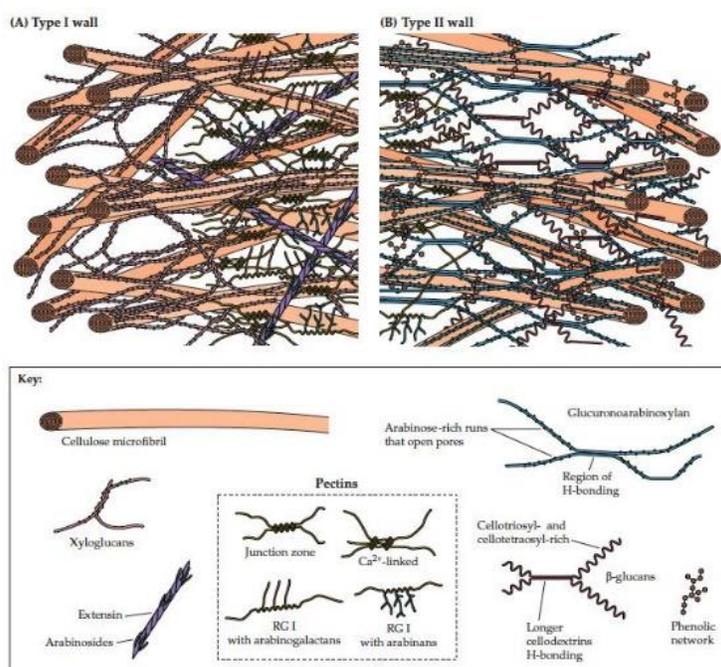


Figura 1. Tipos de pared celular de plantas. Pared celular primaria de dicotiledóneas no gramináceas o de tipo I (A) y gramináceas/cereales o de tipo II (B)^{26,28}.

Evidentemente, la abundancia, composición e interacciones entre todas estas biomoléculas complejas modulan la arquitectura y rigidez de las paredes celulares de plantas, además, hacen posible una diversidad enorme de tipos de paredes celulares, entre grupos de plantas, entre tejidos, e incluso entre zonas alrededor de una misma célula¹⁹. En conjunto, las paredes celulares representan el más alto porcentaje de la biomasa de plantas (hasta un 80%) y, por lo tanto, el mayor aporte de materia orgánica a los suelos de ecosistemas terrestres, así como una barrera y esqueleto fundamental en distintos procesos fisiológicos e inmunológicos de las plantas^{21,23}.

Degradación de la pared celular de plantas

En una gran variedad de procesos naturales se necesita la remodelación, modificación y/o degradación de los componentes de la pared celular de plantas⁴. Por ejemplo, en ecosistemas de suelos terrestres, la productividad primaria depende de la capacidad de degradación del material de origen vegetal que se deposita en el suelo²³. Esta tarea es llevada a cabo en gran medida por microorganismos saprófitos, como los hongos de los géneros *Trichoderma* y *Thermomyces*; y por bacterias como *Pseudomonas*, *Erwinia* y la mixobacteria *Sorangium*^{4,30}. Por otro lado, en el contexto de infecciones bacterianas o fúngicas, o para el establecimiento de interacciones cooperativas planta-bacteria (por ejemplo, con la bacteria promotora del crecimiento radicular *Bacillus subtilis*) u hongo-planta (por ejemplo, con micorrizas), la colonización del tejido vegetal es uno de los eventos medulares, y depende de la modificación de la pared celular de la planta por parte de los microorganismos colonizadores^{11,15}.

La degradación de la pared celular de plantas es un proceso complejo que requiere de una maquinaria que puede incluir enzimas degradadoras de polisacáridos (glicosil hidrolasas, GHs; pectato liasas, PL; esterasas de carbohidratos, CE; y glicosil transferasas, GT), proteínas con actividad auxiliar (AA), como monooxigenasas (LMPOs); módulos de unión a carbohidratos (CBM), proteínas disruptivas o generadoras de amorfogénesis (proteínas tipo expansinas), o celulosomas (Figura 2)^{4,6,31}.

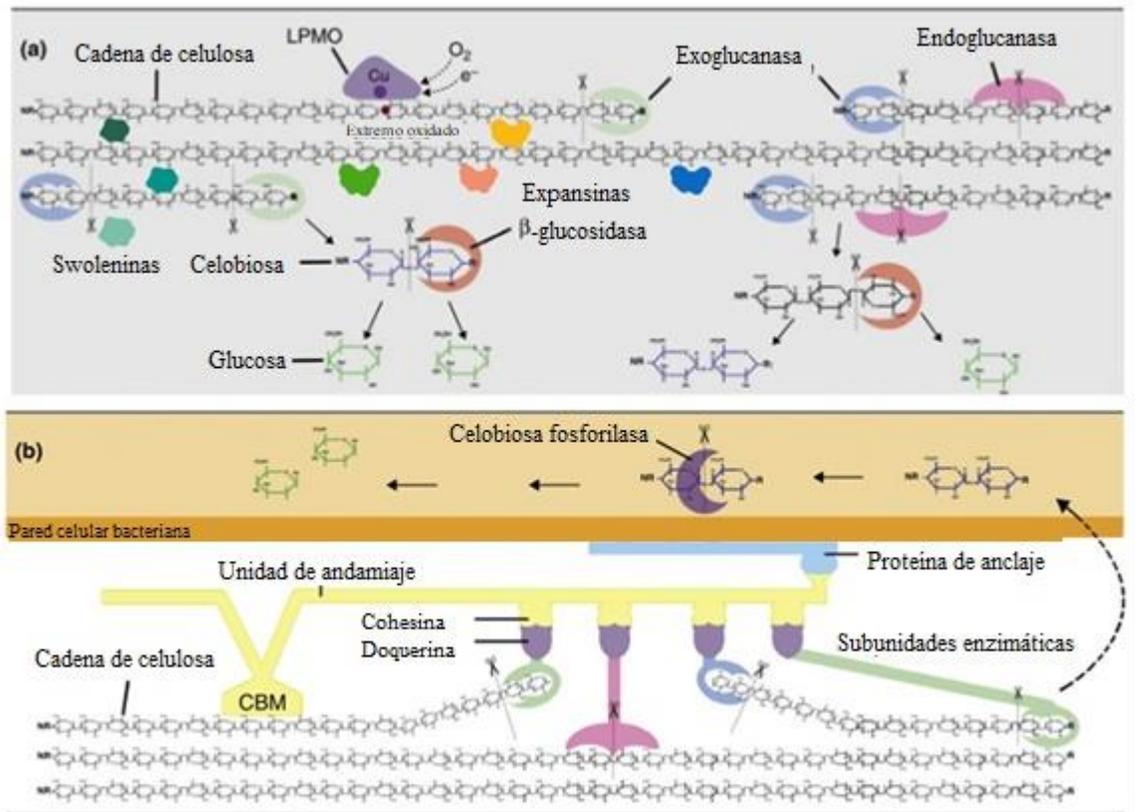


Figura 2. Mecanismos moleculares de microorganismos para la degradación de material lignocelulósico. En la imagen se resaltan los sistemas de degradación extracelulares (a), con una gran cantidad de componentes que actúan de forma independiente; y los sistemas anclados a la membrana (b), donde las enzimas y proteínas de unión y andamiaje forman un complejo molecular conocido como celulosoma. LPMO: *lytic polysaccharide monooxygenases*, CBM: *Carbohydrate Binding Module*. Modificada de Cragg y colaboradores (2015).

Módulos de unión a carbohidratos

Una característica interesante de varias enzimas que actúan sobre carbohidratos es que están fusionadas a módulos de unión a carbohidratos (CBMs). La superfamilia de CBMs se encuentra mayoritariamente adyacente a GHs o como parte de celulosomas. Está conformada por 81 familias organizadas en dos grupos (A y B) de acuerdo a su estructura, especificidad por el sustrato (según su composición y arquitectura), y a su fuerza de unión a polisacáridos^{6,32}. Los CBMs aumentan la concentración de los dominios catalíticos sobre las fibras de polisacáridos y permiten una correcta orientación hacia el sustrato, lo que en algunos casos beneficia la actividad sobre el éste. Además, el plegamiento y funcionamiento

independiente de los módulos que componen a este tipo de proteínas (llamadas multimodulares) depende de las cadenas que los conectan (llamadas cadenas conectoras), y que se forman por residuos que no adquieren una conformación de estructura secundaria, es decir, son intrínsecamente desordenados³³. Las cadenas conectoras son muy variables en su composición aminoacídica, sin embargo, siempre contienen glicina, treonina y prolina (como las cadenas conectoras de poli-prolina), o glicina, treonina y serina (cadenas conectoras de poli-serina, PSL)³⁴. Este tipo de cadenas conectoras son de longitud variable, tienen diferentes grados de flexibilidad y de rigidez, y generalmente son glicosiladas³⁵.

La función de las enzimas digestivas durante el procesamiento de la matriz de los polisacáridos de la pared celular es intuitiva, sin embargo, existen otras proteínas no hidrolíticas que debilitan su estructura al interrumpir las interacciones de los componentes al interior de la matriz, por ejemplo, las proteínas tipo expansinas, swolleninas y cerato plataninas³⁶. En este trabajo nos enfocamos al estudio de las expansinas microbianas.

Expansinas

Las expansinas son una superfamilia de proteínas, descubiertas en plantas en el contexto del crecimiento de la pared celular, donde es característico un ambiente de pH ácido (crecimiento ácido). Aunque la identidad de secuencia primaria de las expansinas es baja (del 20 al 40%), éstas son altamente similares a nivel estructural, y conservan residuos importantes vinculados a la función e interacción con el sustrato en la superficie de unión al polisacárido (PBS) (Figura 3)^{12,37}. Las expansinas se agrupan en familias, de las cuales cuatro son exclusivas de plantas: 1) α -expansinas (EXPA); 2) β -expansinas (EXPB); 3) expansinas tipo A (EXLA); y 4) expansinas tipo B (EXLB). La familia EXLX agrupa a las expansinas de organismos que no son plantas, y que en su mayoría han sido descritas en bacterias y hongos^{7,15}.

Las expansinas forman un elipsoide de dos dominios que se compone por 210 a 275 aminoácidos. El dominio 1 (D1) se pliega en forma de barril β de doble ψ (tres

α hélices y seis hojas β), y se considera el dominio que posee la actividad, ya que contiene residuos fundamentales para la ruptura de los puentes de hidrógeno que se establecen entre polisacáridos adyacentes, y que resulta en el deslizamiento de las cadenas de celulosa durante la extensión del tejido vegetal en crecimiento. En particular, se ha demostrado la importancia de los residuos Thr14, Ser16, Asp71, Tyr73 y Asp82 en la expansina EXLX1 de *B. subtilis*. Todos estos residuos se localizan en la superficie de unión al polisacárido, y están conservados entre las distintas expansinas que se han estudiado (Figura 3A, B)^{7,38,39}. Es interesante que el sitio catalítico de las GHs de la familia 45 (GH45) tienen el mismo plegamiento que el D1 de las expansinas, con la excepción de que las expansinas carecen de un Asp que sirve como base catalítica en las GH45⁷. El dominio 2 (D2) inicialmente se clasificó como un alérgeno (*grass group-2 pollen allergen, G2As*); presenta un plegamiento tipo β -sándwich (4 pares de hojas β antiparalelas) que orienta de dos a tres residuos aromáticos (Tyr y Trp) hacia la superficie plana expuesta al disolvente. Se sabe que estos residuos son responsables de la unión de la proteína al polisacárido, que se establece mediante interacciones hidrofóbicas similares a las reportadas para CBMs de la familia A (Figura 3A, B)^{12,40}.

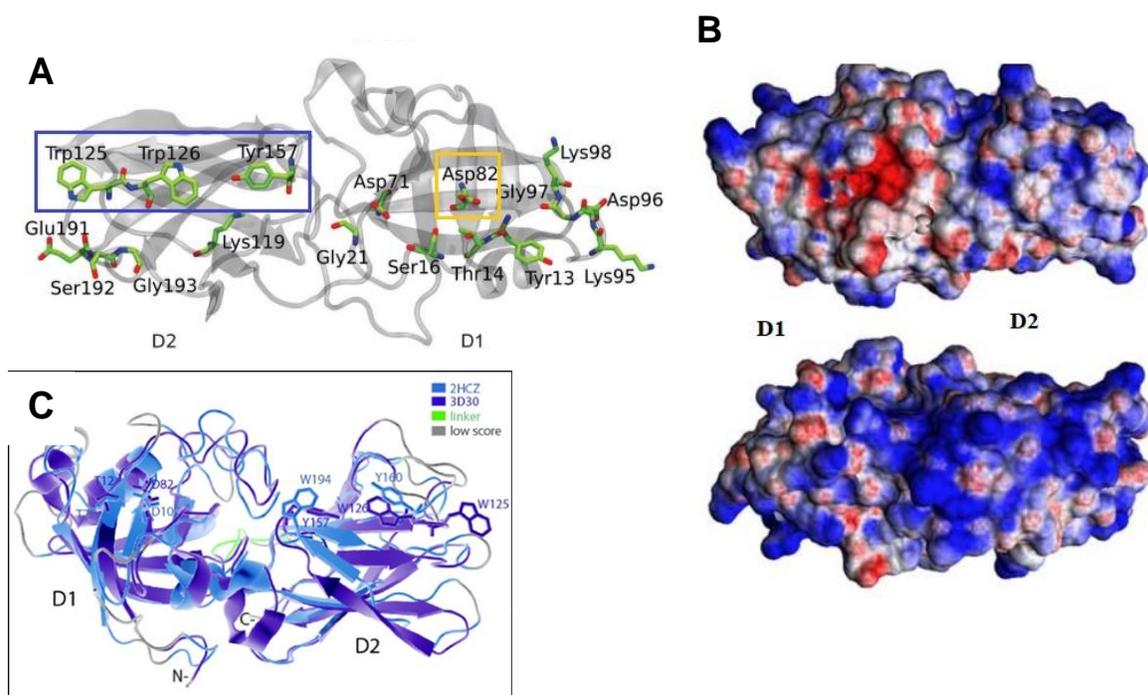


Figura 3. Módulo canónico de las expansinas. A) Residuos clave en la superficie de unión al polisacárido de EXLX1 de *Bacillus subtilis*³⁹. En el D2 se resaltan los tres residuos aromáticos responsables de la unión (cuadro azul) y en el D1 los residuos importantes para su actividad sobre la celulosa. En el recuadro naranja se señala el residuo pseudo-catalítico (Asp82). B) Distribución de cargas en la superficie expuesta al disolvente de EXLX1 de *Bacillus subtilis*⁴¹. En la parte superior se muestra la cara de unión al polisacárido (PBS) y en la inferior la parte opuesta. Asimismo, se enuncia la posición de cada dominio. Carga negativa en rojo y positiva en azul. C) Alineamiento estructural de las expansinas EXPB1 de *Zea mays* (2HCZ) y EXLX1 de *B. subtilis* (3D30)⁴².

Se sabe que las expansinas no modifican enlaces covalentes y por eso se consideran proteínas no catalíticas, pero no se conoce el mecanismo molecular por el cual relajan las fibras de polisacáridos, aunque las evidencias experimentales sugieren que este fenómeno es provocado por la interrupción de las uniones débiles, como hemos mencionado anteriormente. Se ha determinado que las interacciones que regulan el grado de compactación o de extensión de la pared son el blanco de las expansinas, y corresponden a las microfibras de celulosa con glucoxilanos (XG)⁴⁰, o de gluconoarabinosilano de bajo grado de sustitución (lsGAX) con los de alto grado de sustitución GAX (hsGAX)⁴³, pues son éstos los sitios preferidos de unión de las expansinas en la pared celular⁴⁴.

EXPA y EXPB son capaces de promover el crecimiento de tejidos vegetales con gran eficiencia, posibilitando la incorporación de las cadenas de polisacáridos recién formadas hacia la pared celular²². Estos tipos de expansinas están presentes en todas las plantas secuenciadas hasta ahora, y se codifican por un alto número de genes (hasta 38 en *A. thaliana*)^{37,45}. En plantas, las expansinas están involucradas en procesos organogénicos, filotaxia, crecimiento de la raíz, maduración de frutos, penetración del tubo polínico, entre otros¹¹. A nivel funcional se diferencian entre sí porque EXPA son más activas sobre las paredes celulares de las plantas dicotiledóneas (que son ricas en XG), mientras que EXPB actúan preferencialmente sobre las paredes celulares de las plantas monocotiledóneas como Poaceae (Graminaceae, ricas en AX-GAX) y Cyperaceae⁹. EXPB1 de polen de maíz, por ejemplo, relaja y solubiliza polisacáridos pobremente unidos a la pared del estigma y del estilo de maíz (EEM), específicamente hsGAX, facilitando así la penetración

del tubo polínico, a un pH óptimo de 5 a 6^{43,46}. EXLA y EXLB agrupan expansinas que se conocen únicamente por su secuencia en genomas de plantas⁷.

Expansinas microbianas

La información genómica disponible permitió determinar que existen genes que codifican proteínas tipo expansinas en el 3% de los genomas de bacterias y en el 5% de hongos, y también en genomas de algunos amebozoos y en el del nemátodo fitopatógeno *Globodera rostochiensis*. A pesar de la baja cantidad de genes microbianos de expansinas, se observa una correlación con los microorganismos que interactúan en algún momento de su ciclo de vida con componentes de la pared celular de plantas o con matrices de polisacáridos (en el caso de los amebozoos) (Figura 4A)^{8,15,47,48}. Interesantemente, a diferencia de sus homólogas en plantas, varias expansinas de la familia EXLX están fusionadas a dominios adicionales, como CBMs (como Exlx1-CBM de *S. cellulosum*), módulos catalíticos de GHs (como EXLX1 de *Clavibacter michiganensis*), o módulos de “dockerina” que les permiten asociarse en celulosomas (como EXL1 y EXL2 de *Clostridium clariflavum*), lo cual sugiere una especialización de funciones^{8,49,50} (Figura 4B).

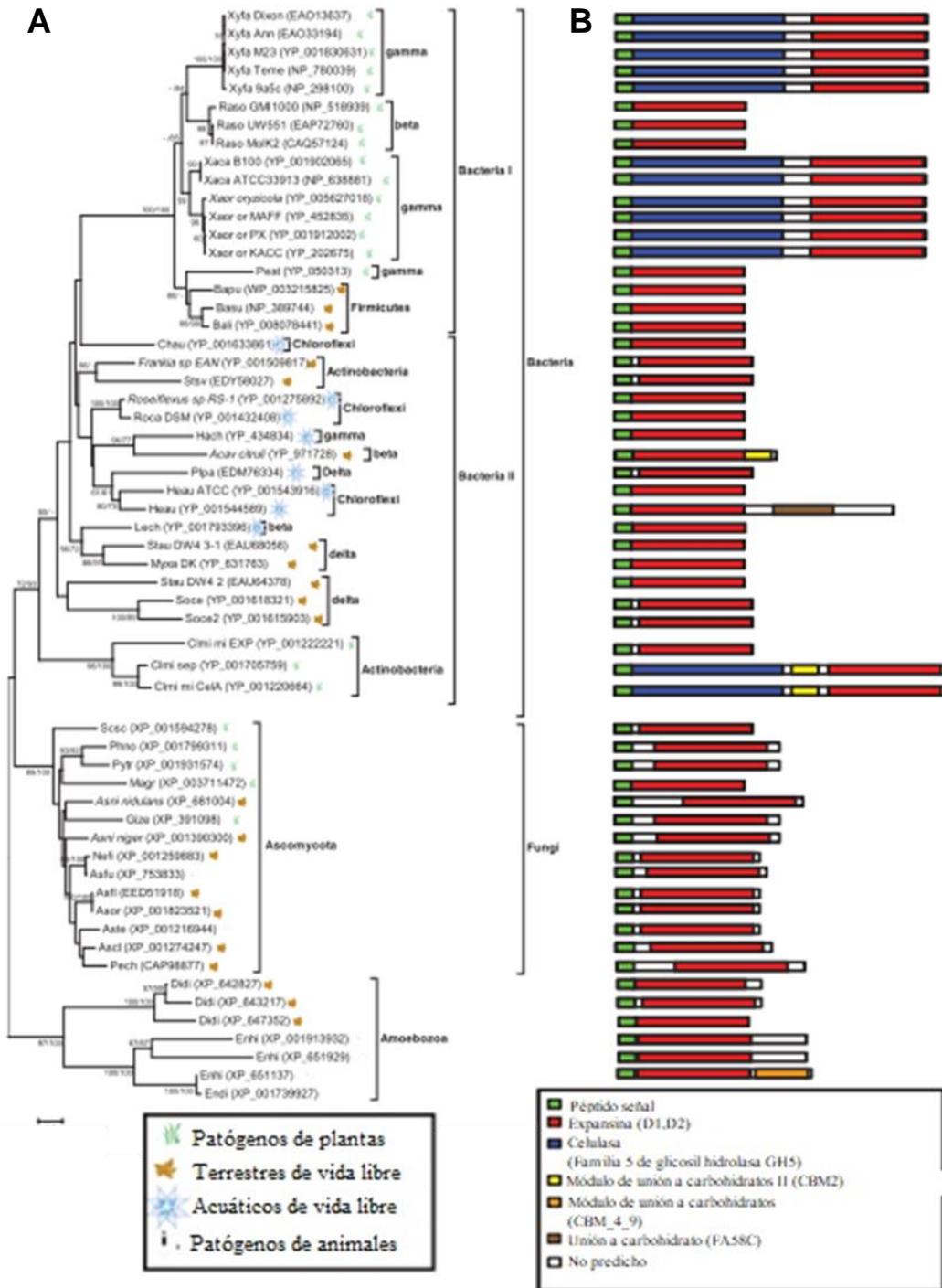


Figura 4. Proteínas homólogas a *BsEXLX1* encontradas en genomas de microorganismos. A) Relaciones filogenéticas de expansinas en microorganismos, en donde se organizaron según *phylas* de bacterias, hongos y amebozoos. En el recuadro se enuncia el significado de los símbolos en el cladograma que corresponden a la biología de los microorganismos. B) Representación de los módulos adicionales presentes en algunas expansinas homólogas a *BsEXLX1*; se muestra la organización en la secuencia y, en el recuadro, el significado de cada color. Modificada de Nokolaidis y colaboradores (2014).

Algunos miembros de la familia EXLX, como las expansinas de *Xanthomonas campestris* (Xantho-EXP), *Clavibacter michiganensis* (Clavi-EXP o CmEXLX), *Ralstonia solanacearum* (Ralstonia-EXP o RsEXLX), *Pectobacterium carotovorum* (PcExl1), *Bacillus subtilis* (BsEXLX1), o *Aspergillus niger* (Asper-EXP), han sido estudiadas bajo los mismos parámetros de medición del “aflojamiento” que provocan las expansinas de plantas. En estos estudios, se determinó que la actividad de las expansinas EXLX es 10 veces menor en comparación con las expansinas de plantas, lo que sugiere que su función en microorganismos podría ser diferente⁵¹⁻⁵³. Se ha demostrado que las expansinas BsEXLX1, CmEXLX, RsEXLX, Asper-EXP y EXL1 de *C. clariflavum* provocan un aumento en la hidrólisis de las fibras de celulosa, por lo que se ha propuesto que su función biológica consiste en auxiliar a las enzimas hidrolíticas, es decir, presentan un sinergismo con éstas^{51,54,55}. Sin embargo, los resultados de estos experimentos no son consistentes y el mecanismo por el cual ocurre el propuesto sinergismo es aún materia de discusión^{12,15}. Algunos autores proponen que la dinámica de interacción de las expansinas con los polisacáridos y su función sobre éstos depende de un diferencial de carga eléctrica, el cual se establece entre la superficie de unión al sustrato (PBS, por sus siglas en inglés) y la cara opuesta de la proteína (Figura 3B). Debido a que la hemicelulosa y la pectina también poseen una carga superficial negativa, el pH impacta de forma importante su interacción con expansinas^{39,43,52}. Con base en esto se ha propuesto un sistema adicional de clasificación de las expansinas bacterianas, en el cual las expansinas que tienen un $pI < 6$ se consideran ácidas, mientras que las que presentan un $pI > 8$ son básicas⁴¹.

Evidencias recientes sugieren que las expansinas microbianas tienen un papel relevante en su interacción con la planta hospedera. Mutantes nulas de genes de expansinas en *B. subtilis*, *P. carotovorum*, *R. solanacearum*, *Xylella fastidiosa* (en un operón con el gen de una GH) y *T. ressei* resultan deficientes en su capacidad de colonización vegetal al compararlas con las cepas silvestres correspondientes^{13,14,53,56,57}. Por su parte, mutantes nulas del gen plasmídico de la expansina, que está fusionada a una secuencia que codifica una GH en *C. michiganensis*, son deficientes en su capacidad de colonización, mientras que, por

el contrario, mutantes de la expansina codificada en el genoma, aumentan la virulencia de la cepa por un motivo aún desconocido¹⁴.

Es claro que se requiere de un análisis aún más detallado para poder determinar con exactitud la función y la especificidad de sustrato de las expansinas microbianas. Este trabajo profundiza en la caracterización de la función de solubilización de polisacáridos de expansinas de diferente tipo: una proteína básica (*BsEXLX1*), una ácida (*PcEXL1*) y una modular (*SocExl1-CBM*), además de una variante trunca de esta última que carece del CBM.

4. Antecedentes

Narváez-Barragán y colaboradores (2020) determinaron que *Arabidopsis thaliana* y *Apium graveolens* activan su respuesta inmune cuando la expansina Exl1 de *Pectobacterium brasiliense*, interacciona directamente el tejido de estas plantas, lo que resulta benéfico ante un evento posterior de infección por parte de un fitopatógeno. En este estudio, también se determinó que la activación de la respuesta inmune se debe a la actividad de la proteína sobre el tejido, ya que expansinas mutadas en residuos clave para la unión a fibras de celulosa (aromáticos en D2, mutante YWY) y del residuo Asp83 en *PcExl1* (mutante D83A), no provocan ninguna respuesta por parte de la planta. Entre las respuestas de defensa de la planta que pudieron medirse se encuentran la producción de especies reactivas de oxígeno y la inducción de las vías de etileno, jasmonato y salicilato¹³. Se ha demostrado que estas respuestas se activan ante la perturbación de la integridad de la pared celular o por la presencia de fragmentos derivados de pectina (los oligogalacturónidos), hemicelulosa o celulosa, que en condiciones naturales son removidos de la pared celular por los organismos patógenos⁵⁸.

Las anteriores observaciones pueden explicarse con un trabajo anterior en el que Tovar-Herrera y colaboradores (2018) demostraron que *PcExl1* provoca la solubilización de polisacáridos al incubarse *in vitro* con el xilema de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla). Interesantemente, este efecto no sucedió cuando se incubó *BsEXLX1* con los mismos sustratos. La solubilización del polisacárido sucedió

después de incubar en microtubos de 1.5 mL a la proteína *PcExl1* por 48 horas con el tejido de acelga en una proporción de 0.3% (w/v), se detectaron en un espectrofotómetro los polisacáridos sustituidos con moléculas de ácido fenólico¹⁶, los cuales se caracterizan por su espectro de absorbancia en el intervalo de 290 a 400 nm con picos de absorbancia que oscilan entre 295 y 325 nm⁵⁹, de forma similar al trabajo realizado por Tabuchi y colaboradores (2011), para la β -expansina EXPB1 de polen de maíz sobre paredes celulares del estigma y estilo de maíz (EEM). Estos autores determinaron que el comportamiento de la señal de absorbancia corresponde a moléculas de ácido ferúlico que se encuentran sustituyendo la arabinosa en GAX de este sustrato⁶⁰. Tovar-Herrera y colaboradores (2018) demostraron también, a través de microscopía de fluorescencia, que *PcExl1* se une de forma limitada a una región alrededor de los haces vasculares de apio, a diferencia de *BsEXLX1* que se unió a la pared de varios tejidos. Estos autores proponen que las diferencias en la composición de polisacáridos en las distintas regiones de la pared podrían provocar que, entre otras cosas, sucedan diferentes ambientes electrostáticos que favorezcan la unión de ciertas expansinas⁵⁹.

Los datos de solubilización *in vitro* de *PcExl1* pudieran explicar el por qué se desencadena la respuesta inmune en la planta. Sin embargo, no se ha identificado la naturaleza de las moléculas liberadas, ni la consecuencia funcional de la presencia de la expansina en el sitio de unión al tejido vegetal. Una posible explicación se relaciona con la colonización del tejido por el microorganismo patógeno, ya que el xilema es el sitio de colonización de *Pectobacterium*, así como el de otras bacterias fitopatógenas que también tienen genes de expansina. Aunado a ello, se comprobó que una cepa de *P. atrosepticum* mutante nula del gen de expansina es deficiente en la infección, posiblemente debido a una menor movilidad al interior del tejido en comparación con la cepa silvestre, además de que su movilidad grupal (“swarming”) *in vitro* también se retrasa con respecto a la cepa silvestre. De forma similar, los granos de polen de maíz (*Zea mays*) reducidos en la expresión de *expb1*, son deficientes en la penetración del tubo polínico al estigma. Además, estas mutantes tienen problemas durante la deshidratación de los granos que sucede en las anteras, lo que lleva a la agregación de los mismo. Ambos eventos se traducen en una menor tasa de reproducción¹⁷.

Finalmente, experimentos preliminares indican que la expansina modular Exlx1-CBM de *Sorangium cellulosum* también tiene un efecto de solubilización sobre el estigma de maíz¹⁸. La bacteria *Sorangium cellulosum* so ce56, una mixobacteria que utiliza celulosa como única fuente de carbono y energía, posee dos genes que codifican expansinas. Uno de ellos está fusionado mediante una secuencia conectora de poli-serinas (PSL) de ~60 residuos con 24 serinas consecutivas, a un módulo de unión a carbohidratos (CBM) de la familia 2A. Esta arquitectura sugiere un efecto sinérgico en la actividad de expansina, como ha sido demostrado en proteínas con CBMs fusionados a módulos catalíticos^{18,32,61}. El módulo canónico de expansina en SocExlx1-CBM es el de mayor similitud a *ZmEXPB1* (Uniprot: P58738) y a SWO1 de *Trichoderma reesei* (Uniprot: Q9P8D0), la cual es una *swollenina* con identidad al dominio D1 de las expansinas (Tabla 2). Ambas proteínas son capaces de solubilizar *in vitro* polisacáridos complejos del tejido vegetal del estigma de maíz^{60,62}.

Tabla 2. Comparación de similitud a nivel de secuencia de proteínas que solubilizan polisacáridos del estigma de maíz (Sbjct) con respecto a las proteínas utilizadas en este trabajo (Query).

Query	Sbjct	SWO1 (<i>T. reesei</i>) ⁺			<i>ZmEXPB1</i>		
		Cobertura	Valor E	Identidad	Cobertura	Valor E	Identidad
SWO1 (<i>T. reesei</i>)					69%	5e-08	24.07%
<i>BsEXLX1</i>			*		52%	4e-04	24%
SocExlx1-CBM ⁺		92%	1e-05	22.73%	62%	0.007	19.41%
<i>PcExl1</i>		32%	4e-06	25.68%	29%	0.003	26.25%
<i>ZmEXPB1</i>		66%	6e-08	24.07%			

⁺En esta comparación, se utilizaron únicamente las regiones correspondientes a los módulos tipo expansina. *El servidor del algoritmo usado (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no arrojó ningún resultado en este caso.

5. Justificación

Decidimos evaluar expansinas bacterianas que tuvieran características diferentes, por un lado, la expansina Exlx1-CBM de *S. cellulosum* como representante de expansinas con módulos adicionales, por la presencia del dominio CBM y la secuencia conectora de poli-serinas (PSL). Además, es relevante el contexto ecológico en el que existe la bacteria y su interacción vital con la pared celular de plantas. Por otro lado, las expansina *BsEXLX1* y *PcExl1* son proteínas de pl opuesto, de las cuales se sabe que tienen diferentes preferencias o sitios de unión. De la última, Exl1 del fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*, resulta relevante estudiar lo que sucede sobre el tejido vegetal de una graminácea, para conocer si el efecto reportado en los tejidos de una dicotiledónea (xilema de acelga)¹⁶ puede extrapolarse a otros modelos de tejido vegetal o es distinto, y así proponer un modelo de la solubilización de polisacáridos de esta expansina sobre paredes celulares. Finalmente, considerando la propuesta de que el ambiente electrostático es importante en la función de las expansina, decidimos probar la función a diferente pH, siendo este un parámetro íntimamente relacionado que puede ser muy informativo.

6. Hipótesis

Debido a que *BsEXLX1* es una expansina básica, esperamos que su unión al estilo y estigma de maíz (EEM) este favorecida y con ella el efecto de solubilización, caso contrario con *PcExl1*, una expansina ácida. Además, esperamos que la versión nativa de la expansina modular *SocExlx1-CBM* genere un mejor efecto de solubilización que la variante trunca carente del CBM y que las otras expansinas evaluadas.

7. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad de solubilización de polisacáridos del estilo y estigma de maíz (EEM) con las expansinas SocExl1-CBM, PcExl1, y BsEXLX1.

Objetivos particulares

1. Determinar si las reacciones de las expansinas con el sustrato (EEM) generan la solubilización de moléculas sustituidas con ácidos fenólicos.
2. Conocer el efecto del pH y de DTT en las reacciones de interacción entre el sustrato (EEM) y las expansinas.
3. Determinar la naturaleza química de las moléculas que se producen tras la interacción entre el sustrato (EEM) y las expansinas.
4. Obtener mapas de la distribución de cargas de superficie de las proteínas evaluadas con relación a cambios en el pH.
5. Comparar los resultados obtenidos entre las diferentes proteínas.

8. Materiales y Métodos

Preparación del tejido vegetal

El estilo y estigma de maíz (EEM) se obtuvo de mazorcas adquiridas en un mercado local en Cuernavaca, Morelos. Se eligieron las sedas de maíz menos oscuras (lo que indica una menor concentración de lignina), y se secaron en un horno a 45°C durante 72 h. Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron, primero de manera vigorosa utilizando un mortero, y después en el equipo TissueLyserLT (Quiagen) durante 10 min, a una oscilación de 50 rps en presencia de perlas de acero. El tejido homogenizado se almacenó a temperatura ambiente hasta ser sometido a des-proteinización^{60,63}. En breve, el sustrato se lavó 4 veces con dH₂O, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, y después se cubrió con ~50 mL de una solución fenol: ácido acético: agua (PAW, 1:1:1 m/v/v) y se agitó por 17

h a 70 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó una vez más con dH₂O y se deshidrataron en un horno a 45 °C por 8 h.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

En *Pichia pastoris* X-33:

La producción de las proteínas SocExl1-CBM y las variantes trucas en *Pichia pastoris* X-33 se realizó con las cepas transformadas, una con la construcción *pPICZ α A-Exl1-CBM* y otra con *pPICZ α A-PSL-Exl1*, las cuales se encuentran integradas al cromosoma de las levaduras; dichas cepas fueron construidas anteriormente por Salazar-Cortés (2019). Considerando el protocolo en el manual de usuario (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit), utilizamos medio BMMY (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, 100 mM fosfato de potasio pH 6, base de nitrógeno de levaduras al 1.34%, biotina al 4x10⁻⁵% y metanol al 0.5%) con una concentración constante de 0.5% de metanol, durante 96 h 30°C/200 rpm. El sobrenadante se filtró con membranas de 0.45 μ m de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Sigma-Aldrich). Debido a que las proteínas recombinantes contienen una etiqueta de histidinas, se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel, utilizando columnas de 5 mL *Histrap FF crude* (GE Healthcare Bio-Sciences), eluyendo con imidazol 300 mM. La muestra eluida se concentró con filtros Vivaspín® de 10 kDa (GE Healthcare) hasta un volumen de 2 mL, posteriormente la muestra se diluyó 3 veces con amortiguador HEPES 20 mM pH 7.4, y se volvió a concentrar hasta 2 mL, este proceso se repitió tres veces. Finalmente, se concentró la muestra a un volumen final de ~2 mL. La concentración final de proteína en esta fracción se cuantificó por el método de Bradford.

En *Escherichia coli* BL21:

Para obtener a la proteína recombinante PcEx11 se utilizó una colonia de *E. coli* BL21 DE3 recién transformada con el vector pET22b-PcEx11 (construido anteriormente por el Dr. Miguel Olarte) para inocular medio Luria-Bertani (triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl al 0.5% a pH 7.0) con 50 μ g/mL de ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} 0.7-0.9 se indujo la expresión de

la proteína recombinante con la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM, y el cultivo se incubó durante ~12 horas a 16°C agitando a 200 rpm. La proteína se obtuvo del periplasma. Después de centrifugar 15 min a 5,000 rpm, la pastilla celular se resuspendió en el amortiguador SET (50 mM Tris-HCl; 4 mM EDTA; 1 mM sacarosa) y se incubó en hielo por 20 min. La mezcla se centrifugó de nuevo y se recuperó el sobrenadante (Fracción 1). La pastilla fue resuspendida en 5 mM MgSO₄ y se incubó 20 min en hielo. Se centrifugó nuevamente y se recuperó el sobrenadante (Fracción 2). Las fracciones 1 y 2 se analizaron por medio de electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE), y la fracción que contenía a la proteína de interés fue concentrada y lavada con amortiguador HEPES 20 mM pH 7.4, y se cuantificó la concentración final de la proteína por el método de Bradford.

Para obtener *BsEXLX1* a partir de *E. coli* BL21 DE3 (habiendo transformado con el vector pET22b-*yoaJ*) la inducción se realizó a 30°C/200 rpm. La purificación siguió el protocolo para la obtención de proteínas del periplasma indicado en el párrafo previo, pero debido a que esta proteína está fusionada a una etiqueta 6xHis, las fracciones 1 y 2 fueron purificadas por cromatografía de afinidad a níquel. Después de lavar y de concentrar a un volumen mínimo de 2 mL, la concentración de la proteína purificada se calculó por método Bradford.

Ensayo de solubilización de polisacáridos de la pared celular del estilo y estigma de maíz (EEM)

Todos los ensayos se realizaron en un volumen final de 500 μ L en microtubos de 1.5 mL con 1.5 mg (0.3% w/v) de estilo y estigma de maíz (EEM) des-proteinizado (PAW), lavado 3 veces con dH₂O, previo a la reacción. Se utilizaron 4.4 nm de cada proteína, con excepción de *BsEXLX1* para la cual solo se pudo hacer un ensayo con el doble de concentración, por la dificultad que significó la producción de esta proteína en la cepa de *E. coli* BL21 (Tabla 3). Las proteínas fueron disueltas en amortiguador a diferentes pH: HEPES 20 mM pH 7.4, acetato de sodio 20 mM pH 5, o boratos 20 mM pH 9, conteniendo 2 mM de NaN₃ y en algunos casos 1 mM DTT. Las reacciones se incubaron a 30°C con agitación a 1,000 rpm (en un Thermomixer) durante 72 horas continuas.

Tabla 3. Concentración de las proteínas utilizadas en los ensayos de solubilización. Se determinaron las masas teóricas con las secuencias anotadas en UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y en el PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Proteína	Masa (kDa)	Concentración (µg/µL)	nmoles
SocExI1-CBM (CAN95423.1)	44.9	0.4	4.4
SocCBM-PSL	24.76	0.218	4.4
SocPSL-ExI1	33.4	0.294	4.4
**BsEXLX1 (3D30)	23.3	0.4	8.8
PcExI1 (W5VT34)	24.2	0.212	4.4
*BSA (3V03)	66.3	0.584	4.4

*Se utilizó la información depositada en el RCSB PDB. *Se utilizó una cantidad diferente de proteína.

Las muestras tomadas a distintos tiempos se centrifugaron por 10 min a 13,000 rpm en una minicentrífuga y se determinó con 300 µL del sobrenadante el perfil de absorbancia en el intervalo de 200 a 400 nm. Los resultados se analizaron con una prueba de varianza (ANOVA de una vía y Tukey).

Para calcular el valor de absorbancia de las moléculas solubilizadas por efecto de las expansinas se usaron controles y correcciones apropiadas. A las absorbancias crudas de las reacciones en cada tiempo, se les sustrajo el valor de absorbancia de la condición control en la que se incubó el sustrato sin proteínas, más el valor de absorbancia de la proteína pura en solución en el amortiguador de reacción. Este último dato se ajustó por un factor de corrección que considera la señal de proteínas presente en la disolución en cada tiempo de muestreo, con respecto a la absorbancia total determinada al inicio de la reacción, usando las ecuaciones 1 y 2:

[1]

$$Pnu = (E_{Abs_{280}} - S_{Abs_{280}}) / P_{Abs_{280}}$$

Donde: Pnu= proteína no unida; E= Condición experimental, sustrato incubado con proteína; S= control de sustrato sin proteína; P= control de proteína sin sustrato.

El factor de corrección se aplica a los diferentes datos para la proteína pura según la ecuación 2, asumiendo que el resto de los elementos que podrían estar presentes

en la disolución de proteínas y que también absorban en este intervalo de longitudes de onda, se comporta igual:

[2]

$$Pre = Pnu \times Abs_{200-400 \text{ nm}}$$

Donde: Pre= proteína residual

Finalmente, el valor Pre se utiliza en la ecuación 3, para determinar el delta (o diferencia) de absorbancia (ΔAbs) para cada valor dentro del intervalo UV-vis de 290 nm a 400 nm.

[3]

$$\Delta Abs = E - (S + Pre)$$

Donde: E= Condición experimental, sustrato incubado con proteína; S= Condición control de sustrato sin proteínas; Pre= proteína residual

Al conjunto de valores de ΔAbs en el intervalo señalado se le llama *perfil de absorbancia*, que indica la presencia de moléculas solubilizadas del sustrato. Con el dato del pico de absorbancia máxima se determinó la cantidad de equivalentes ferúlicos liberados ($\mu\text{mol/ mg}$ de sustrato) con una curva de calibración de ácido ferúlico (Sigma Aldrich) $R^2= 0.99$, considerando el valor máximo de solubilización del reactivo (320 nm). Los datos se procesaron en RStudios (versión 1.1.456) y se analizaron en Prism (versión 5.01) con una prueba de varianza (ANOVA de una vía más Tukey).

Adicionalmente, se calculó la cantidad (nmol) de proteína unida en cada punto de medición utilizando el valor de absorbancia a 280 nm según la ecuación [4]

[4]

$$Un = (I_{nmoles}) \times \left\{ 1 - \left[(E_{Abs_{280}} - S_{Abs_{280}}) / P_{Abs_{280}} \right] \right\}$$

Donde: E= Condición experimental, sustrato incubado con proteína; S= Condición control de sustrato sin proteínas; P= Condición control de proteína sin sustrato; I= Cantidad de proteína agregada (nmol).

Análisis de las moléculas solubilizadas

Se colectaron los sobrenadantes al término de las reacciones (72 h), algunas se concentraron con tubos Vivaspín® de 10 kDa. De esta preparación se analizaron ~20 µL por cromatografía de capa fina (TLC) con una fase móvil de n-butanol: etanol: agua (50:30:20)¹⁶ en placas de sílica-gel. El patrón de separación por TLC de las muestras se reveló, por un lado, con α-naftol y también, por su absorbancia a 366 nm en cámaras de luz UV. Por otro lado, las muestras concentradas (obtenidas a partir de los tubos Vivaspín) se sometieron a un tratamiento de extracción de ácidos ferúlicos, utilizando el protocolo de Tilay y colaboradores (2008). En breve, se utilizaron ~30 mL de NaOH 2 M, 132 µM de sulfito de sodio, y se incubaron por 24 h, agitando a 200 rpm. Posteriormente, se acidificó hasta pH<2 cada una de las muestras mediante la adición de ácido clorhídrico (grado reactivo, Sigma-Aldrich), y se extrajo la fase orgánica con 10 mL de acetato de etilo. Esta acción se repitió tres veces. Finalmente, por evaporación las muestras se concentraron hasta <1 mL. Estas preparaciones fueron analizadas por TLC, con una fase móvil cloroformo:metanol 70:30 en placas de sílica-gel, reveladas a través de la absorbancia a 366 nm.

Isoterma de unión a estigma de maíz

Se realizó siguiendo el protocolo presentado en Olarte-Lozano (2014), en breve, se utilizó 1.5 mg de sustrato EEM suspendido en amortiguador de acetatos 20 mM, DTT 1 mM y NaN₃ 2 mM. En estos ensayos, se utilizaron de 1 a 7 µM de proteína SocExl1-CBM. La muestra se incubó a 30°C, agitando a 1,000 rpm durante 24 h. La cantidad de proteína unida al sustrato se determinó utilizando el reactivo de Bradford y mediante su absorbancia a 280 nm.

Determinación de la carga eléctrica superficial de las proteínas

A partir de las secuencias de las expansinas EXLX1 de *Bacillus subtilis* y EXPB1 de *Zea mays* depositadas en el *Protein Data Bank* se obtuvieron las estructuras 3D30 y 2HCZ. Para las proteínas Exl1-CBM de *Sorangium cellulosum* (tanto de los módulos independientes como de la proteína completa) y Exl1 de *Pectobacterium*

brasiliensis, se utilizaron los modelos estructurales generados en el servidor I-TASSER⁶⁴. Adicionalmente, se utilizó la estructura de la albúmina de suero bovino (3V03). Una vez teniendo todas las estructuras, se siguió el protocolo presentado en Pastor y colaboradores (2015) para el mapeo de la carga eléctrica superficial. En breve, se prepararon las estructuras 3D (archivos .pdb) usando el servidor en línea PDB2PQR⁶⁵, con CHARMM como campo de fuerza y especificando los estados de protonación con PROPKA a pH 5, 7 y 9. Posteriormente, se realizó el cálculo de los potenciales electrostáticos con el software APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solve). Los archivos obtenidos (.pqr y .dx) se cargaron en el visualizador VMD⁶⁶, en donde se representó la superficie con un gradiente de color de trayectoria de -5 (rojo) a 5 (azul) kT/e.

Alineamiento de residuos clave para la unión/efecto en expansinas

Se realizó un alineamiento con ClustalW en MEGAX (versión 10.0.5) de los módulos expansina de las proteínas utilizadas en este trabajo (SocExlx1-CBM, del residuo 200 al 438), con las secuencias de la α -expansina EXPA2 de *Vasconcellea cundinamaricensis* (VpEXPA2)⁶⁷ y de la β -expansina EXPB1 de *Zea mays* (ZmEXPB1)⁶⁸. Además, se incluyó la swollenina1 de *Trichoderma reesei* (TrSWO1, del residuo 193 al 493)⁶². Se eligieron residuos que han sido reportados como importantes para la función de las expansinas *ZmEXPB1*^{9,43,68}, *BsEXLX1*^{39,46,55,69} y *VpEXPA2*⁶⁷. Se ubicaron los residuos de la cara PBS o de la cara opuesta, y los que pertenecen al D1 o D2; con las estructuras *ZmEXPB1* (2HCZ), *BsEXLX1* (3D30) y los modelos de más alto puntaje predichos con I-TASSER para el resto de las proteínas. Para *VpEXPA2* se determinó la ubicación de los aminoácidos utilizando como referencia la estructura de *ZmEXPB1*.

9. Resultados

Teniendo en cuenta la evidencia de la probable modificación de un polisacárido de la pared celular de plantas por efecto la expansina Ex11 de *Pectobacterium brasiliense*^{16,70}, y los datos de solubilización de EXPB1 de *Zea mays*⁶⁰ y SWO1 de *Trichoderma reesei*⁶², en este trabajo nos interesó saber si el efecto de solubilización era extrapolable a otras expansinas bacterianas sobre un mismo sustrato (estilo y estigma de maíz- EEM). También nos interesó investigar la importancia del ambiente electrostático para la actividad de las expansinas, por lo que consideramos el pH y la influencia de DTT en la reacción.

Evaluación del efecto de diferentes expansinas bacterianas sobre EEM

Para obtener los perfiles de solubilización de alguna molécula⁶⁰ a partir de EEM, medimos el diferencial de absorbancia UV-vis (ΔAbs) en el intervalo de 290 a 400 nm (calculado según la ecuación 3), por efecto de las proteínas de interés. Pero con la intención de identificar el efecto de la agitación y el pH en la liberación de moléculas en las diferentes condiciones evaluadas y en los diferentes tiempos de muestreo, primero obtuvimos los datos de incubaciones control que contienen el sustrato sin proteína, y medimos la absorbancia en el intervalo UV-vis de 200 a 400 nm. Presentamos el valor a 300 nm (Tabla 4) porque, como se verá más adelante, fue la longitud de onda en que se ubicó el pico de señal de los perfiles de solubilización.

Tabla 4. Valores de absorbancia a 300 nm de incubaciones control del sustrato EEM a diferentes valores de pH, a través del tiempo.

Tiempo (h)	Absorbancia 300 nm					
	pH 5		pH 7.4		pH 9	
	Con DTT	Sin DTT	Con DTT	Sin DTT	Con DTT	Sin DTT
1	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.34 ± 0.05	0.21 ± 0.01
12	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0	0.3 ± 0.03**	0.2 ± 0 **	0.49 ± 0.08	0.36 ± 0.03*
24	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.33 ± 0.03 ⁺	0.22 ± 0.01 ⁺	0.55 ± 0.09	0.4 ± 0.03
48	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.31 ± 0.04 ⁺	0.23 ± 0.01 ⁺	0.62 ± 0.1	0.48 ± 0.03
72	0.15 ± 0.01 ⁺	0.11 ± 0.01 ⁺	0.4 ± 0.02**	0.2 ± 0.01**	0.60 ± 0.12	0.52 ± 0.04

Promedios de absorbancia más/menos la desviación estándar. (*) Diferencia significativa entre tiempos continuos de muestreo; (+) diferencia significativa entre muestras al mismo tiempo, pero en presencia o ausencia de DTT. $p < 0.05$ por ANOVA de una vía y Tukey.

Observamos que en todos los casos que el valor de la absorbancia aumentó con el tiempo de incubación (siendo esto evidente entre la primera y última lectura de medición). Sin embargo, en presencia de DTT resultó en una mayor absorbancia con respecto a las reacciones que no contenían DTT a todos los pH evaluados, siendo más acentuada la diferencia en las reacciones a pH 7.4. A pH 9, los valores de absorbancia fueron los más altos y con mayor variabilidad entre ensayos, y aunque en promedio las mediciones de las incubaciones en presencia de DTT arrojaron valores mayores, las diferencias resultaron no ser significativas entre los tiempos de medición.

Estos datos crudos de absorbancia para el control de incubación del sustrato sin proteína revelaron que la propia condición de incubación altera la integridad del sustrato, liberando moléculas que absorben a 300 nm, y conforme aumentó el pH hubo aún más liberación.

Efecto de *PcExl1* sobre EEM

En principio, comparamos el efecto de Exl1 de *Pectobacterium brasiliense* el último punto de muestreo (72 h) utilizando las señales de absorbancia cruda a 300 nm, es decir, sin aplicar las ecuaciones que corrigen por la señal intrínseca de la proteína y del sustrato, contra las señales control de incubación de sustrato sin proteína (Figura 5A, B). De esta manera, confirmamos que existen diferencias significativas entre el control y la presencia de *PcExl1* sólo a pH ácido. A pH básico el comportamiento también fue significativo entre una condición y otra, sin embargo, fue en sentido opuesto. Adicionalmente, observamos que los datos sin DTT fueron en promedio menores a cuando el DTT estaba presente en la reacción (Figura 5B).

Al aplicar las ecuaciones (1, 2 y 3) para determinar la diferencia en los valores de absorbancia en el rango de 290 a 400 nm (Figura 5), tal y como ya habíamos visto en el análisis de la absorbancia cruda, la única señal positiva en estos experimentos se vio en condiciones ácidas, y se definió aún más en presencia de DTT (Figura 5C). Como puede apreciarse en la Fig. 5C-D, el perfil de absorbancia es muy parecido al reportado por Tabuchi y colaboradores (2011), lo que sugiere que la

molécula solubilizada es también un polisacárido con sustituyentes de ácidos fenólicos, posiblemente, ácido ferúlico.

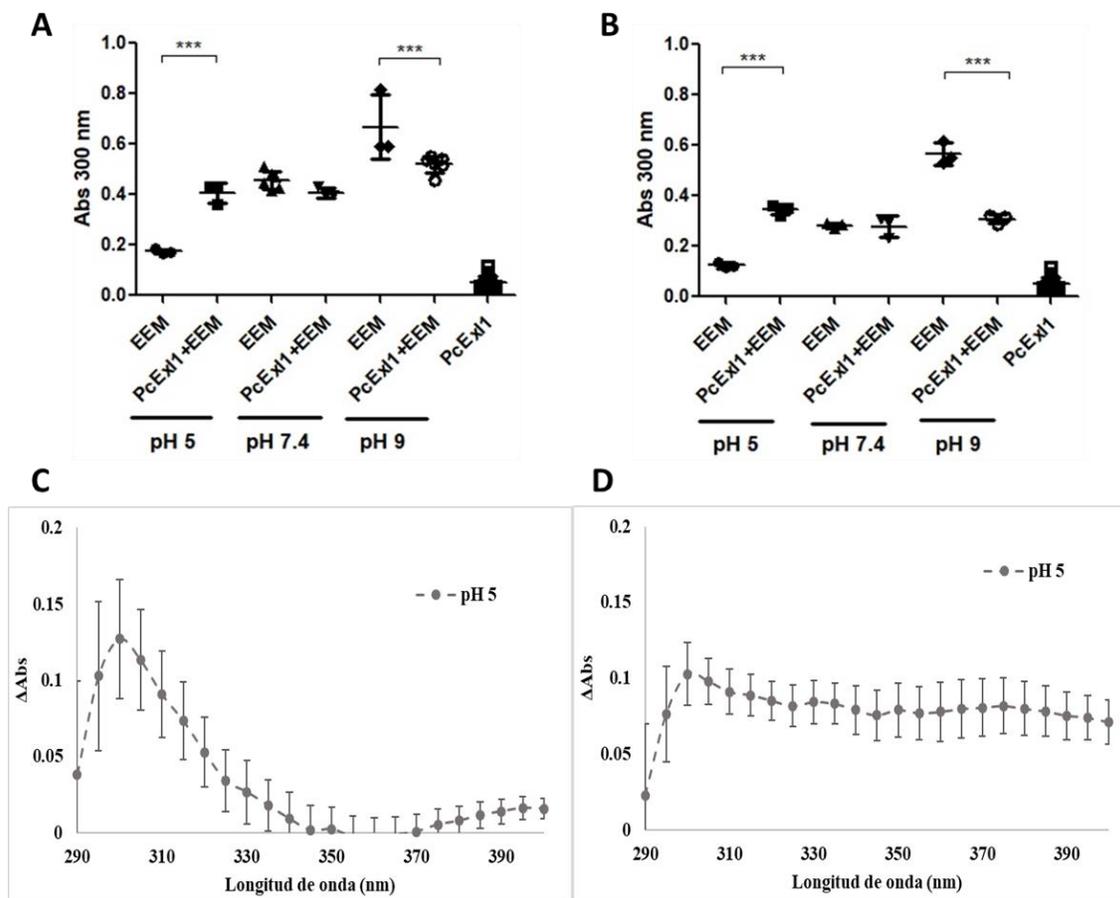


Figura 5. Actividad de *PcEx11* evaluada tras 72 horas de incubación. En estos experimentos, se incubaron 4.4 nmoles de *PcEx11* con 1.5 mg de estilo y estigma de maíz (EEM) a diferentes pHs. Las gráficas A y C son lecturas de muestras que contienen 1 mM DTT, y las gráficas B y D son de incubaciones sin DTT. (A-B) Comparación del valor de absorbancia a 300 nm entre muestras incubadas sin proteína y con *PcEx11*. Cada punto graficado corresponde a una reacción independiente. En la gráfica se indica el pH de la solución. Se muestra el promedio y la desviación estándar; *** $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01). (C-D) Perfiles de Δ Abs en el intervalo 290 nm-400 nm resultante de la ecuación 3. Se grafica el promedio y la desviación estándar.

Determinamos entonces la concentración de equivalentes ferúlicos liberados por *PcEx11* a través del tiempo y diferente pH (Figura 6), y observamos que, a pH ácido, se liberaron ~5 a 6 μ mol/mg equivalentes ferúlicos del sustrato (EEM) (Tabla 5). En presencia de DTT esta cantidad se alcanzó desde la primera hora de incubación, aunque a las 12 horas se obtuvo un máximo con menor valor de desviación (Tabla

5). En ausencia de DTT la liberación fue significativamente menor, por lo menos hasta las 72 horas, en donde las señales con o sin DTT fueron similares (Figura 6).

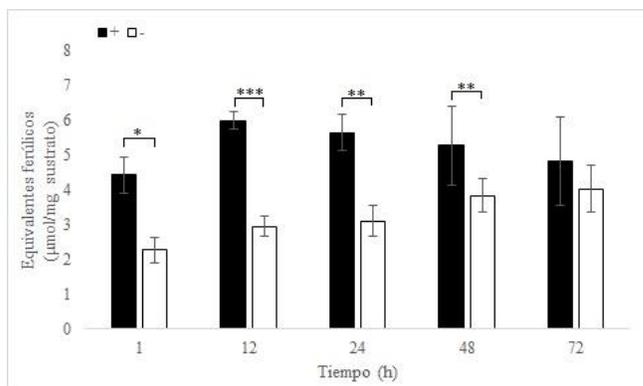


Figura 6. Solubilización de equivalentes ferúlicos por efecto de *PcEx1* a pH ácido. La gráfica muestra los promedios de liberación ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de sustrato) a los diferentes tiempos de muestreo, de reacciones con 2.9 nmoles de *PcEx1* por mg de EEM y 1 mM de DTT (barras negras), o sin DTT (barras blancas). Se muestra el promedio y la desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01).

Tabla 5. Equivalentes ferúlicos solubilizados por *PcEx1* a lo largo del tiempo, y unión de *PcEx1* al sustrato EEM.

Tiempo (h)	pH 5		pH 7.4		pH 9	
	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Unión (nmoles/mg)	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Unión (nmoles/mg)	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Unión (nmoles/mg)
Con DTT						
1	4.41 ± 0.52	0	0	2.05 ± 0.37	0	1.96 ± 0.63
12	5.98 ± 0.24	0	0	2.41 ± 0.35	0	1.95 ± 0.47
24	5.63 ± 0.51	0	0	2.41 ± 0.35	0	1.95 ± 0.47
48	5.26 ± 1.13	0	0	2.42 ± 0.28	0	2.32 ± 0.41
72	4.81 ± 1.26	0	0	2.14 ± 0.23	0	1.59 ± 0.58
Sin DTT						
1	2.26 ± 0.37	0	0	1.71 ± 0.37	0	1.40 ± 0.40
12	2.93 ± 0.29	0	0	1.43 ± 0.67	0	1.83 ± 0.54
24	3.08 ± 0.43	0	0	1.45 ± 0.75	0	2.31 ± 0.47
48	3.81 ± 0.48	0	0	1.34 ± 0.89	0	2.9 ± 0.4*
72	4.02 ± 0.66	0	0	1.42 ± 1.06	0	2.9 ± 0.36*

Se presentan los promedios obtenidos más/menos la desviación estándar. Se utilizaron 2.9 nmoles de proteína por mg de sustrato en cada muestra. En gris resalto las mediciones donde se obtuvieron los más altos valores. *Los valores calculados rebasan la cantidad de proteínas utilizada.

Se ha reportado que la unión al sustrato es un requisito para la actividad de expansinas, por lo que analizamos la unión de *PcEx1* a EEM por absorbancia a 280 nm, calculada con la ecuación 4. Encontramos que *PcEx1* se unió al sustrato a pH neutro y básico (Figura 7), y particularmente a pH 9 sin DTT, se registró su unión máxima desde las 48 h (Figura 7B). Además, en esta condición, la concentración

Notamos que para los experimentos en condiciones ácidas se forma un precipitado blanco, creemos que sucede cuando el pH del amortiguador es menor o igual a 5, por lo que debe verificarse que el pH sea mayor a 5. No parece que el precipitado sea de proteína, ya que en la reacción control sin sustrato *PcExl1* permaneció soluble. Pensamos que esto ocurrió debido a que, como Olarte-Lozano y colaboradores (2014) reportaron, entre pH 6 y 5 la carga neta de la proteína cambia súbitamente de negativa a positiva, pasando de ser -0.7 e a pH 6 a +4.74 e a pH 5 (ver la sección “Propiedades electrostáticas de las diferentes proteínas usadas”), lo que en algunas reacciones pudo haber alterado la interacción de *PcExl1* con el sustrato y/o la estabilidad de la proteína. Creemos que las reacciones en las que el pH fue mayor a 5, y que ocurrieron sin formar un precipitado evidente, dieron los mejores resultados (Fig. 7), en comparación con pHs más bajos. Interesantemente, en condiciones de pH ácido, sin precipitado, la proteína parece no unirse al sustrato, e incluso la señal Abs_{280} fue mayor que al inicio de la reacción, lo que sugiere que además de polisacáridos, también pudieran estar liberándose proteínas de la pared celular. Finalmente, parece que no incluir DTT en la reacción hace más lenta la liberación.

Efecto de SocExl1-CBM sobre EEM

Realizamos experimentos equivalentes a los de la sección anterior con la expansina Exl1-CBM de *Sorangium cellulosum*. En este caso, en comparación con *PcExl1*, hubo una diferencia al analizar la absorbancia directa de las reacciones a pH neutro y básico al final de la reacción (Figura 8A, B). La diferencia se mantuvo en el análisis después de sustraer la absorbancia de fondo de los controles de la proteína y el sustrato, donde observamos el pico de absorción a 300 nm en ambas condiciones, siendo más claro en ausencia de DTT (Figura 8B, C), aunque nuevamente, la presencia de una baja cantidad de DTT arrojó mayores valores de absorbancia.

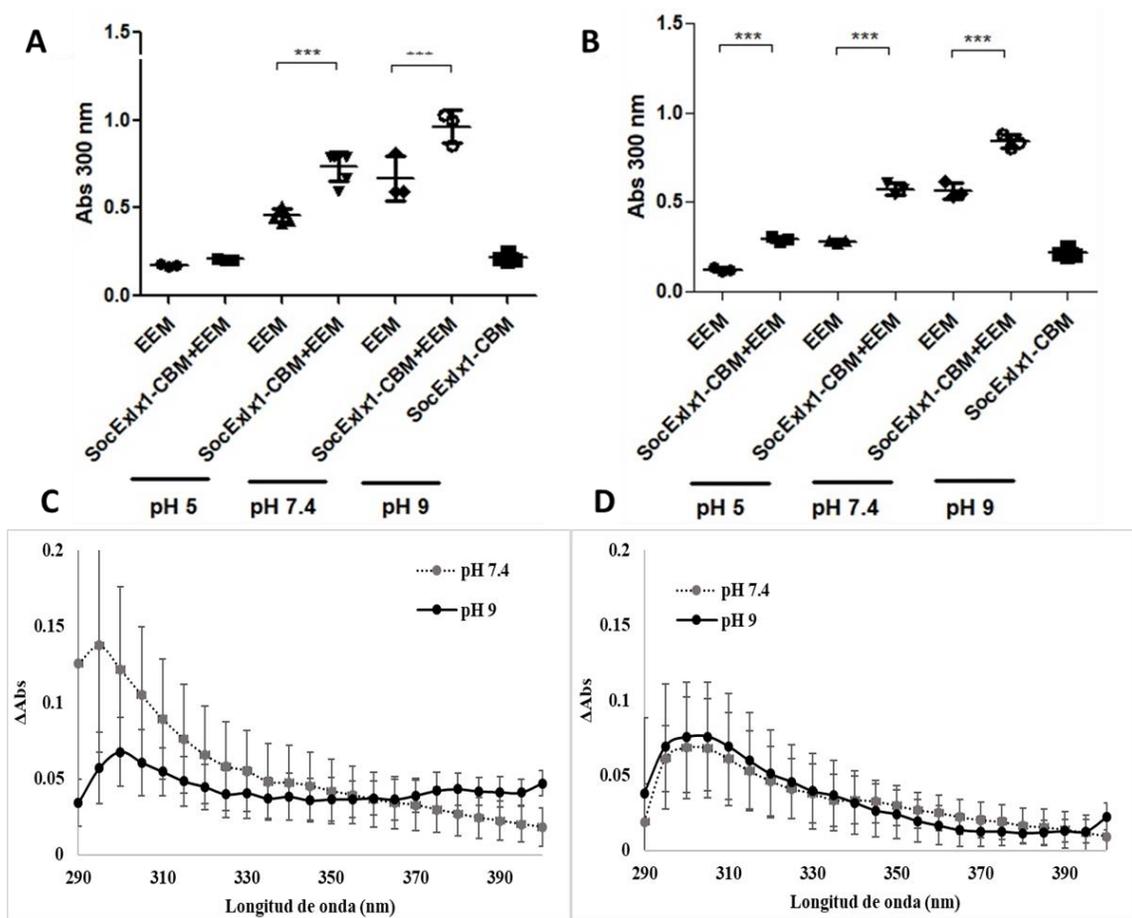


Figura 8. Actividad de SocExlx1-CBM a distintos pHs tras 72 h de incubación. Se incubaron 4.4 nmoles de SocExlx1 con 1.5 mg de estilo y estigma de maíz (EEM) a diferentes pHs. El valor de absorbancia en A y C corresponden a muestras incubadas con 1 mM DTT, y las gráficas B y D sin DTT. (A-B) Comparación de los valores de absorbancia a 300 nm entre muestras incubadas sin y con SocExlx1. Cada una de las mediciones tomadas en cuenta provienen de una reacción independiente. Se muestra el promedio y la desviación estándar; *** $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01). (C-D) Perfiles de Δ Abs en el intervalo 290 nm-400 nm resultante de la ecuación 3. Se grafica el promedio más la desviación estándar.

Determinamos la concentración de equivalentes ferúlicos en el pico de absorción a 300 nm a través del tiempo de reacción (Figura 9). Los resultados en presencia de DTT en este caso son variables, pero tienden a aumentar con respecto a las reacciones sin DTT. En el caso del valor a 12 horas sin DTT, este se disparó (Figura 9B). No tenemos claro si este comportamiento está relacionado a errores técnicos en la de medición, pero no descartamos la posibilidad de que haya sucedido una reacción de precipitación al acumularse azúcares sustituidos con ácidos ferúlicos, pues está reportado que estas moléculas en altas concentraciones forman

estructuras tipo gel²⁹. En todos los casos, al final del ensayo la cantidad de equivalentes ferúlicos fue de ~3 $\mu\text{mol/mg}$ de sustrato (Tabla 6).

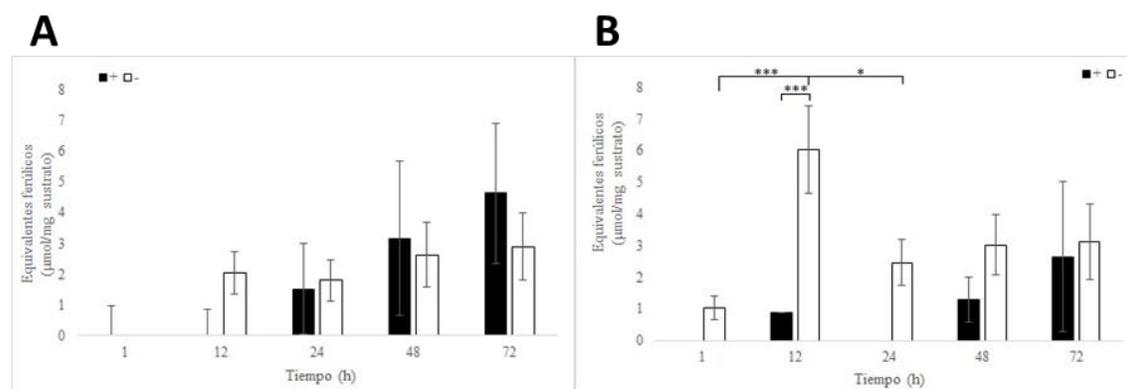


Figura 9. Grado de solubilización de equivalentes ferúlicos por efecto de la acción de SocExlx1-CBM en función del pH. Promedios de liberación ($\mu\text{mol/mg}$ de sustrato) determinado a los diferentes tiempos de muestreo. En estos casos, las reacciones se prepararon con 2.9 nmoles de SocExlx1-CBM por mg de EEM, y 1 mM de DTT (barras negras), o sin DTT (barras blancas) a pH 7.4 (A) o pH 9 (B). La gráfica ilustra el promedio y la desviación estándar. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01).

Tabla 6. Equivalentes ferúlicos solubilizados por la acción de SocExlx1-CBM a lo largo del tiempo, y su unión al sustrato.

Tiempo (h)	pH 5		pH 7.4		pH 9	
	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol/mg}$)	Unión (nmoles/mg)	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol/mg}$)	Unión (nmoles/mg)	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol/mg}$)	Unión (nmoles/mg)
Con DTT						
1	0	0.52 ± 0.12	0 ± 0.97	0.46 ± 0.43	0	0 ± 0.02
12	0	1.24 ± 0.05	0 ± 0.85	0.65 ± 0.35	0.86	0.15 ± 0.10
24	0.72 ± 0.03	1.76 ± 0.04	1.53 ± 1.47	0.66 ± 0.4	0	0.15 ± 0.10
48	0.78 ± 0.03	2.18 ± 0.03	3.17 ± 2.50	0.46 ± 0.60	1.29 ± 0.7	0.19 ± 0.14
72	0	2.41 ± 0.04	4.64 ± 2.28	0.63 ± 0.6	2.65 ± 2.37	0.07 ± 0.34
Sin DTT						
1	0	0.3 ± 0.1	0	0.37 ± 0.07	1.02 ± 0.36	0.20 ± 0.13
12	0	0.42 ± 0.3	2.06 ± 0.69	0.06 ± 0.08	6.03 ± 1.38	0
24	0	0.48 ± 0.27	1.80 ± 0.68	0.1 ± 0.13	2.46 ± 0.73	0.21 ± 0.07
48	0	0.47 ± 0.18	2.64 ± 1.04	0 ± 0.02	3.02 ± 0.95	0.24 ± 0.12
72	0	0.48 ± 0.10	2.90 ± 1.10	0 ± 0.02	3.13 ± 1.19	0.26 ± 0.18

Se presentan los promedios obtenidos más/menos la desviación estándar. Se utilizaron 2.9 nmoles de proteína por mg de sustrato en cada muestra. En gris resalto las mediciones donde se obtuvieron los más altos valores.

La unión de SocExlx1-CBM al sustrato EEM en presencia de DTT fue de ~ 0.5 nmoles/mg a pH neutro de 1h -72 h de muestreo, mientras que a pH ácido la unión aumentó de forma logarítmica ($R^2= 0.95$) hasta alcanzar 2.41 ± 0.03 nmoles/mg, casi 85% del total de proteína agregada inicialmente (2.93 nmol totales) (Figura 10A). Por su parte, en los ensayos sin DTT no hubo unión a pH 7.4, y a pH ácido fue considerablemente menor, manteniéndose constante a lo largo del tiempo ($\sim 0.48 \pm 0.10$ nmoles/mg, Tabla 6); mientras que a pH básico la proteína se unió de forma constante ($\sim 0.25 \pm 0.17$ nmoles/mg) durante el tiempo del ensayo (Figura 10B).

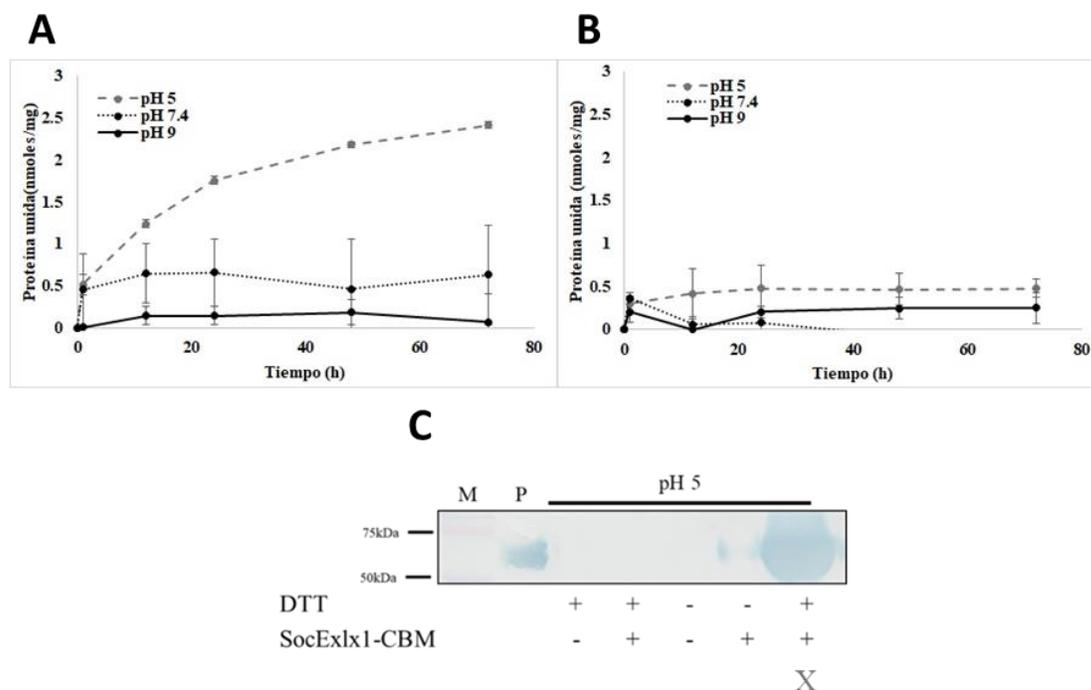
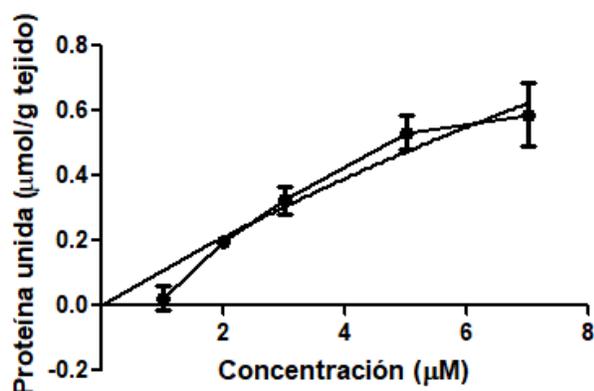


Figura 10. Unión de SocExlx1-CBM a EEM. Cantidad de SocExlx1-CBM unida al sustrato (nmol/mg sustrato) calculada como la diferencia de la cantidad original menos la determinada en el sobrenadante (ecuación 4), de reacciones con DTT 1 mM (A), o sin DTT (B). C) Inmunodetección tipo *Western-blot* usando el anticuerpo anti:SocPSL-Exlx1 de muestras de las incubaciones con y sin SocExlx1-CBM sobre EEM. Se analizaron los sobrenadantes de las incubaciones a pH ácido y una muestra del precipitado (X). Los signos + y - indican la presencia o ausencia de las moléculas indicadas. M= marcador de peso molecular; P= SocExlx1-CBM purificada.

Finalmente, mediante ensayos tipo *Western-blot* determinamos que la proteína no se unió al sustrato a pH ácido y sin DTT, pero en presencia de DTT se detectó abundante proteína en el precipitado, es decir, unida al sustrato (Figura 10C). Nos interesó determinar los parámetros de unión a este sustrato en esta última condición (pH 5 + DTT), a través de una isoterma Langmuir (Figura 11). Para ello, utilizamos concentraciones de 1 a 7 μM e incubación durante 24 h (tiempo en el que observamos aproximadamente la mitad de la concentración de la proteína unida al sustrato, Figura 10A), calculamos la unión máxima, $B_{max}= 2.8 \mu\text{mol/g}$ y la constante de disociación $k_d= 25.4 \mu\text{M}$, parámetros que indican una baja afinidad al sustrato.

Figura 11. Isoterma de unión de SocEx1x1-CBM al estigma de maíz PAW. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres reacciones independientes.



Recapitulando los datos obtenidos en esta sección, consideramos que hay una señal positiva por efecto de la expansina Ex1x1-CBM de *S. cellulosum* a pH 7.4 y pH 9 (con mayor variación entre valores que en el caso de *PcEx1*). Además, nuevamente observamos que la señal de solubilización sucedió en condiciones de unión mínima de la proteína. Interesantemente, a pH ácido la cantidad de proteína unida aumentó en el tiempo sólo en presencia de DTT. Aun así, no se registró la liberación de equivalentes ferúlicos.

Efecto de SocPSL-EXLX1 sobre EEM

Para conocer la contribución del dominio CBM a la actividad de SocEx1x1-CBM, evaluamos las propiedades de una variante trunca carente del CBM a la que llamamos SocPSL-Ex1x1 debido a que mantiene la secuencia conectora de polisacáridos (PSL). La comparación de absorbancia total de la reacción a 300 nm con y

sin proteína mostró diferencias significativas a todos los pHs evaluados, independientemente de la presencia de DTT (Figura 12A y12B). En cuanto a la señal de solubilización, hubo comportamientos particulares a cada pH; a pH 5 parecería que los valores apenas rebasan la señal de fondo con DTT, y son cercanos a cero sin DTT, pero en realidad el efecto fue mucho mayor al comparar las lecturas de las reacciones que incluyeron a la proteína completa ExI1-CBM o con *PcExI1*, incluso sin DTT. A pH 7.4 hubo señal, pero sin el máximo a 300 nm. Interesantemente registramos el más alto nivel de señal a pH 9, en comparación de los otros ensayos (Figura 12C y12D).

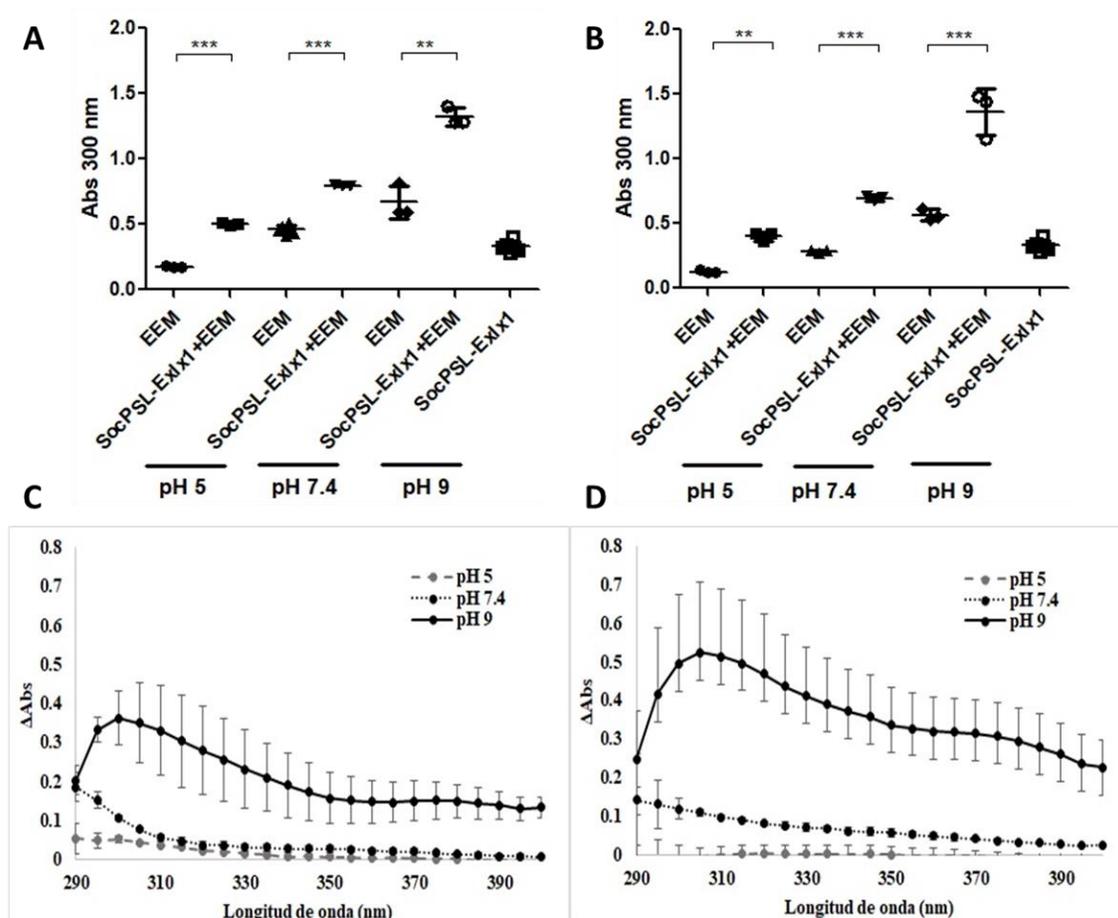


Figura 12. Actividad de SocPSL-Exlx1 tras 72 h de incubación. Se incubaron 4.4 nmoles de SocPSL-Exlx1 con 1.5 mg de estilo y estigma de maíz (EEM) a diferentes pHs. Las gráficas A y C corresponden a las lecturas de las muestras con 1 mM DTT, y las gráficas B y D de incubaciones sin DTT. (A-B) Comparación del valor de absorbancia a 300 nm entre muestras incubadas sin proteína y con SocPSL-Exlx1. Cada punto proviene de una reacción independiente. Se muestra el promedio y la desviación estándar; **p<0.005, ***p<0.0001 por ANOVA de una vía más Tukey (Prism, versión 5.01). (C-D) Perfiles de Δ Abs en el intervalo 290 nm-400 nm resultante de la ecuación 3. Se grafica el promedio más la desviación estándar

En cuanto a la cantidad de equivalentes ferúlicos, basados en el comportamiento del perfil, creemos que esta proteína sólo genera este tipo de moléculas a pH básico e independientemente de DTT. Se observó el aumento comparable entre presencia y ausencia de DTT hasta las 48 h. Posterior a ese momento, la concentración de equivalentes ferúlicos con DTT fue de 12.45 ± 2.23 , y 16.7 ± 5.8 sin DTT (Figura 14E, Tabla 7).

Tabla 7. Equivalentes ferúlicos solubilizados por SocPSL-Exlx1 a lo largo del tiempo, y su unión al sustrato.

Tiempo (h)	pH 5		pH 7.4		pH 9	
	Unión (nmoles/mg)	Unión (nmoles/mg)	Unión (nmoles/mg)	Equivalentes ferúlicos (μ mol/mg)	Unión (nmoles/mg)	Unión (nmoles/mg)
Con DTT						
1	0.14 \pm 0.02	0.59 \pm 0.02	0.79 \pm 0.59	0.46 \pm 0.03		
12	0.17 \pm 0.01	0.76 \pm 0.05	1.94 \pm 0.95	0.48 \pm 0.07		
24	0.23 \pm 0.06	0.81 \pm 0.09	2.34 \pm 2	0.51 \pm 0.11		
48	0.23 \pm 0.08	0.74 \pm 0.05	2.94 \pm 1.76	0.55 \pm 0.11		
72	0.28 \pm 0.07	0.63 \pm 0.05	12.45 \pm 2.23	0.34 \pm 0.06		
Sin DTT						
1	0.33 \pm 0.04	0.42 \pm 0.02	0	0.33 \pm 0.01		
12	0.36 \pm 0.14	0.40 \pm 0.13	1.27 \pm 1.25	0.28 \pm 0.14		
24	0.37 \pm 0.11	0.40 \pm 0.01	2.2 \pm 1.82	0.27 \pm 0.12		
48	0.37 \pm 0.21	0.30 \pm 0.01	6.32 \pm 2.35	0.3 \pm 0.15		
72	0.37 \pm 0.21	0.33 \pm 0.15	16.79 \pm 5.80	0.27 \pm 0.17		

Se presentan los promedios obtenidos más/menos la desviación estándar. Se utilizaron 2.9 nmoles de proteína por mg de sustrato en cada muestra. En gris resalto las mediciones donde se obtuvieron los más altos valores.

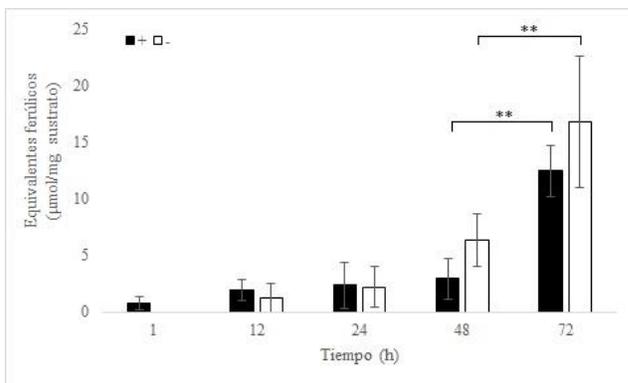


Figura 13. Solubilización de equivalentes ferúlicos por efecto de SocPSL-Exlx1 a pH 9. Promedios de liberación ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de sustrato) en los diferentes tiempos de muestreo, de reacciones conteniendo 2.9 nmoles de SocPSL-Exlx1 por mg de EEM, y 1 mM de DTT (barras negras), o sin DTT (barras blancas). Se muestra el promedio y la desviación estándar. ** $p < 0.005$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01).

Observamos que la unión de SocPSL-Exlx1 al sustrato (medido por la Abs a 280 nm) fue igual en todas las condiciones de reacción (Figura 14A, B), y sólo en las incubaciones con DTT hubo un poco de variación (Figura 14B). El análisis por *Western-blot* indicó diferencias en función al pH (Figura 14C). Primero, a pH ácido detectamos a la proteína tanto en el sobrenadante como en el precipitado de incubación (que representa su unión al sustrato). A pH 7.4 vimos que la proteína en el sobrenadante mostró una reducción de peso de ~ 60 kDa a ~ 40 kDa, y en el pellet se determinaron bandas de bajo peso molecular, indicando una posible degradación de la proteína.

Finalmente, a pH 9 el perfil de proteínas que se encuentran tanto en el sobrenadante como en el precipitado tienen un peso molecular de ~ 40 kDa, aunque el sobrenadante de la condición con DTT mostró también el tamaño original de SocPLS-Exlx1 (Figura 14C). El peso teórico de SocPSL-Exlx1, tomando en cuenta solamente la cadena peptídica, es ~ 33 kDa (Tabla 3), pero sabemos que la proteína está altamente glicosilada, según lo reportó Salazar-Cortés (2019), especialmente en la secuencia conectora de poli-serinas.

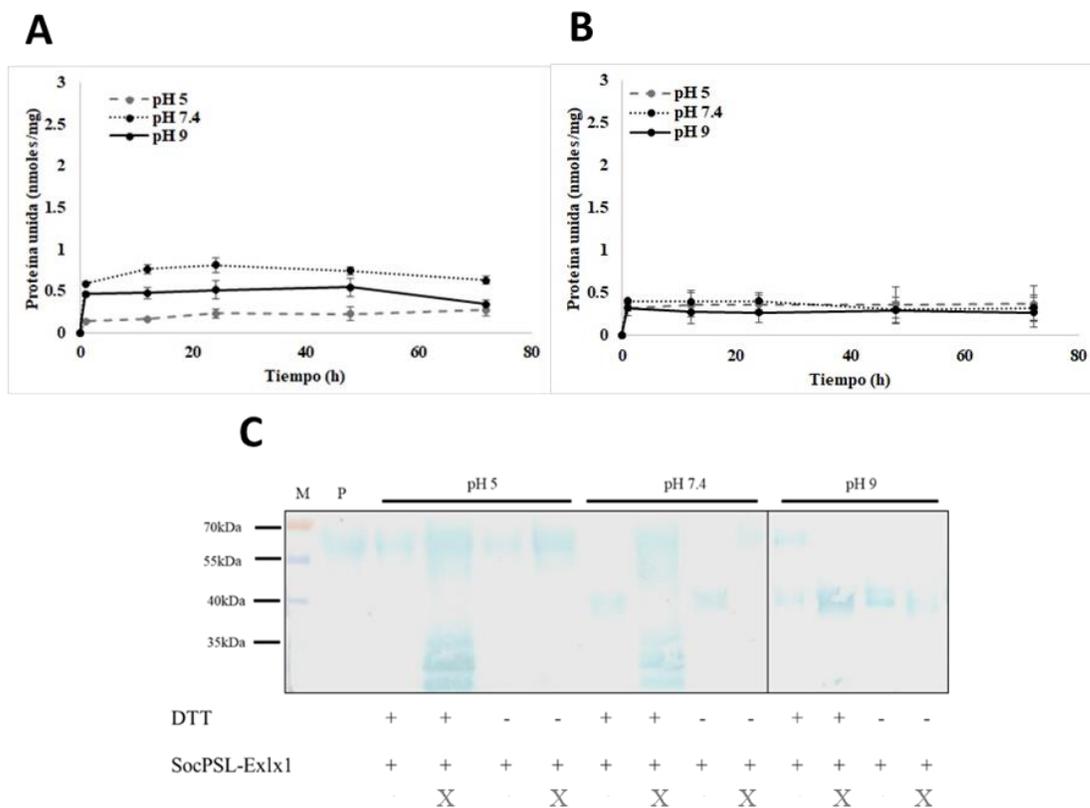
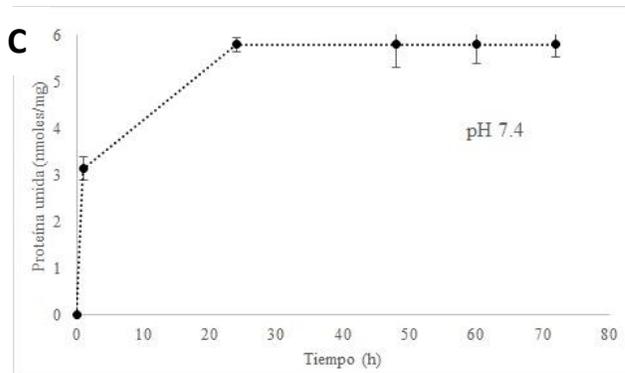
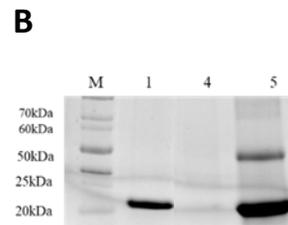
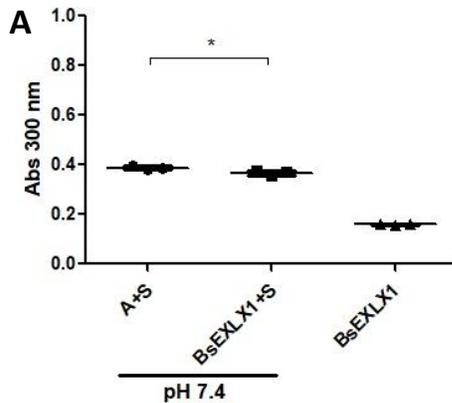


Figura 14. Unión de SocPSL-Exlx1 a EEM. Cantidad de proteína unida al sustrato (nmol/mg sustrato) calculada como la diferencia entre la cantidad original menos la encontrada en el sobrenadante (ecuación 4), de reacciones con DTT 1 mM (A), o sin DTT (B). C) *Western-blot* usando el anticuerpo anti:SocPSL-Exlx1 de muestras de las incubaciones con y sin SocPSL-Exlx1 sobre EEM. Se analizaron los sobrenadantes y precipitados (X) de las incubaciones a diferente pH. Los signos + y – indican la presencia o ausencia de las moléculas indicadas. M= marcador de peso molecular; P= SocPSL-Exlx1 purificada.

A diferencia del comportamiento de la proteína completa, la variante trunca evaluada en esta sección, que carece de módulo de unión a carbohidratos (CBM), sólo mostró un perfil de absorbancia que sugiere la liberación de equivalentes ferúlicos a pH 9, y esta señal fue la más alta registrada en estos experimentos. Interesantemente, el comportamiento de unión de esta expansina trunca fue muy similar en todas las condiciones evaluadas, aunque por inmunodetección se reveló una migración anormal en las muestras a pH neutro y básico.

Efecto de *BsEXLX1* sobre EEM

Evaluamos el efecto de la expansina EXLX1 de *Bacillus subtilis*. Pero debido a que obtuvimos una baja cantidad de la proteína recombinante, sólo analizamos la condición de pH 7.4 con DTT. Así, confirmamos un resultado preliminar obtenido por nuestro grupo, en el que no se observó una diferencia significativa en las lecturas crudas de absorbancias entre las reacciones que contenían a la proteína con su control (Figura 15A). Por esta razón, los valores resultantes de las ecuaciones de actividad fueron ligeramente menores a 0, lo que indica que no hubo liberación de moléculas del sustrato por parte de *BsEXLX1*.



Tiempo (h)	Unión (nmoles/mg)
1	3.14 ± 0.26
24	5.8 ± 0.15*
48	5.8 ± 0.45*
60	5.8 ± 0.41*
72	5.8 ± 0.26*

Figura 15. Actividad de *BsEXLX1* sobre el estigma de maíz PAW. Se utilizaron 5.8 nmoles/mg de tejido. A. Comparación del valor de absorbancia a 300 nm entre las muestras incubadas sin proteínas (A+S) y con *BsEXLX1* a pH 7.4 y con 1 mM de DTT y 2 mM de NaN_3 . Cada lectura proviene de una reacción independiente. Se muestra el promedio y la desviación estándar; * $p < 0.05$ por ANOVA de una vía y Tukey (Prism, versión 5.01). B. Análisis SDS-PAGE. M= marcador de peso molecular; 1. 1.5 μg de *BsEXLX1*; 4. sobrenadante de incubación con *BsEXLX1*; 5. Precipitado de incubación con *BsEXLX1*. C. Cantidad de proteínas unidas (nmoles) por mg de estigma de maíz con respecto al tiempo. Los valores calculados rebasan la cantidad de proteína utilizada.

El análisis de unión reveló que *BsEXLX1* se unió al tejido en su totalidad, a partir de las 24 h (Figura 15C), y determinamos que al final del ensayo, la proteína desaparece del sobrenadante de incubación (Figura 15B). En este caso, se encontró una relación inversa entre la capacidad de unión al tejido vegetal y el efecto producido por la proteína.

Efecto de BSA sobre EEM

Finalmente, como control de que el efecto observado de la liberación de moléculas del sustrato es específico de las expansinas, incluimos en este estudio una proteína irrelevante, la albúmina de suero bovino (BSA). Se hicieron experimentos bajo las mismas condiciones de concentración de BSA y en presencia o ausencia de DTT. En estos experimentos, los valores crudos de absorbancia a 300 nm indican que existen diferencias significativas entre las reacciones sin y con BSA (Figura 16A, B). Sin embargo, el perfil de absorbancia (una vez eliminando el ruido de fondo) no define con claridad ningún máximo en el espectro de solubilización (Figura 16C, D). Esto sugiere que el efecto de solubilización de polisacáridos por parte de las expansinas analizadas es específico.

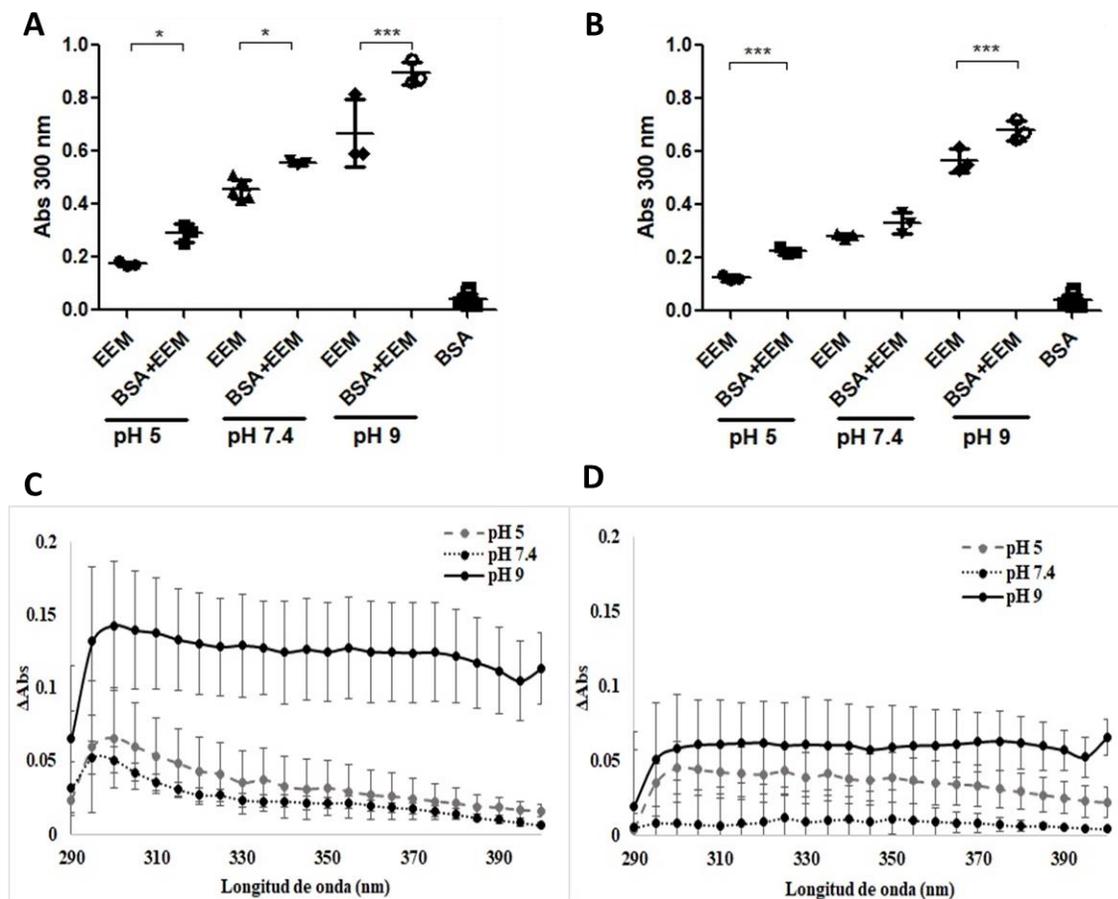


Figura 16. Actividad de BSA tras 72 h de incubación. Se incubaron 4.4 nmoles de BSA con 1.5 mg de estilo y estigma de maíz (EEM) a diferente pH, las gráficas A y C son de muestras con 1 mM DTT, y las gráficas B y D son de incubaciones sin DTT. (A-B) Comparación de la absorbancia a 300 nm entre muestras incubadas sin proteína y con BSA. Cada valor corresponde a una reacción independiente. Se muestra el promedio y la desviación estándar; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía más Tukey (Prism, versión 5.01). (C-D) Perfiles de Δ Abs en el intervalo 290 nm-400 nm resultante de la ecuación 3. Se grafica el promedio más la desviación estándar.

Decidimos no calcular los equivalentes ferúlicos debido a que en ninguna condición logramos observar de forma definida una curva que sugiriera la liberación de moléculas con equivalentes ferúlicos. Por otra parte, la evaluación de unión al sustrato reveló que la proteína no se unió al sustrato (Figura 17), e incluso aumentó la señal de absorbancia a 280 nm en el sobrenadante, sugiriendo la liberación de proteínas desde el tejido.

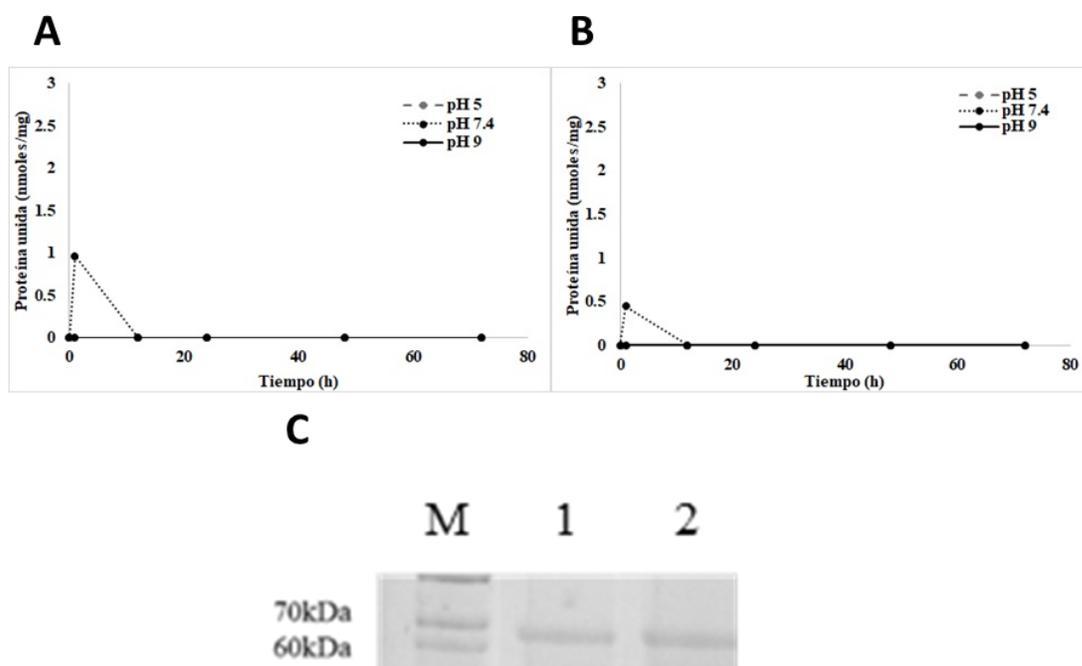


Figura 17. Unión de BSA a EEM. Cantidad de proteína unida al sustrato (nmol/mg sustrato) calculada como la diferencia entre la cantidad original menos la del sobrenadante (ecuación 4), de reacciones con DTT 1 mM (A), o sin DTT (B). C. Análisis SDS-PAGE. M, marcador de peso molecular; 1, 1.5 µg de BSA; 2, sobrenadante de incubación con BSA.

Los experimentos presentados en esta sección no revelaron un patrón claro que sugiriera la liberación de moléculas fenólicas, sin embargo, hubo valores positivos en el intervalo de absorbancia 290 a 400 nm. Anteriormente Gourlay y colaboradores en 2013, observaron un comportamiento similar de BSA al interactuar con EEM a pH ácido. Sin embargo, lo que queda claro es que, en la mayoría de las condiciones evaluadas, la señal por interacción de expansinas generan señales más claras y altas. Además, para estos ensayos, la señal observada no está relacionada con la unión de BSA al tejido vegetal.

Comprobamos que la incubación de diferentes proteínas sobre EEM, resultó en la liberación y solubilización de material que podemos detectar por su espectro de absorbancia, y que manejamos hasta este momento como equivalentes ferúlicos. Sin embargo, es importante conocer la identidad de las moléculas liberadas.

Identidad de las moléculas solubilizadas a partir de EEM

Según lo reportado en la literatura para *ZmEXPB1*, la señal alrededor de los 300 nm está dada por polisacáridos sustituidos con moléculas fenólicas⁶⁰. Considerando la similitud entre nuestros resultados y lo reportado, nuestra hipótesis es que en nuestras muestras también hay ácidos fenólicos. Debido a que el análisis de la actividad de SocEx1x1-CBM fue nuestro principal interés durante este proyecto, usamos a esta expansina para intentar identificar a la molécula responsable de la señal a 300 nm. Al cuantificar la cantidad de azúcares totales con el método de fenol-ácido sulfúrico (DuBois et al., 1965) y con una variante desarrollada por López-Legarda y colaboradores (2017) se calculó la misma concentración de azúcares en las muestras experimentales que en las de proteína únicamente. Esto se debe a la alta glicosilación de la proteína, como lo reportamos antes¹⁸. Se intentó solucionar este problema retirando la proteína de los sobrenadantes de la reacción después de la incubación, sirviéndonos de una etiqueta de histidinas y utilizando minicolumnas HisPur Ni-NTA. Sin embargo, esta estrategia no funcionó, posiblemente por la presencia de DTT, que puede afectar la interacción de la proteína con la columna de níquel⁷¹. También se usaron otros métodos para la detección de azúcares y determinación de su identidad, por ejemplo, con ensayos catalíticos con una xilanasas, una pectinasa y una celulasa sobre los sobrenadantes después de la incubación, pero no fueron suficientemente informativos. Asimismo, se hicieron pruebas de inmunodetección tipo *dot-blot*, usando anticuerpos específicos para distintos polisacáridos de las paredes celulares, pero no se logró refinar la técnica al grado de que nos diera resultados confiables.

Mediante cromatografía en capa fina (TLC) se analizó la presencia de azúcares y de ácido ferúlico extraído con el método indicado en la sección de Materiales y Métodos. Como control positivo, logramos extraer y determinar la presencia de ácido ferúlico de muestras no tratadas, lo que indicó que el protocolo sería útil para nuestro objetivo. Sin embargo, creemos que debido a la poca cantidad de sustrato que se utiliza en las reacciones no logramos detectarlos por su baja concentración. Se intentó concentrar las muestras, pero éstas se volvieron altamente viscosas y

fue imposible cargarlas en las placas de TLC. Al mismo tiempo, la placa se reveló con alfa-naftol para el análisis de los azúcares liberados en las reacciones con SocExlx1-CBM, incluyendo un control de muestras sin expansinas y otro conteniendo BSA. Debido al tamaño pequeño de muestra concentramos los sobrenadantes de tres reacciones independientes para este análisis (Figura 18).

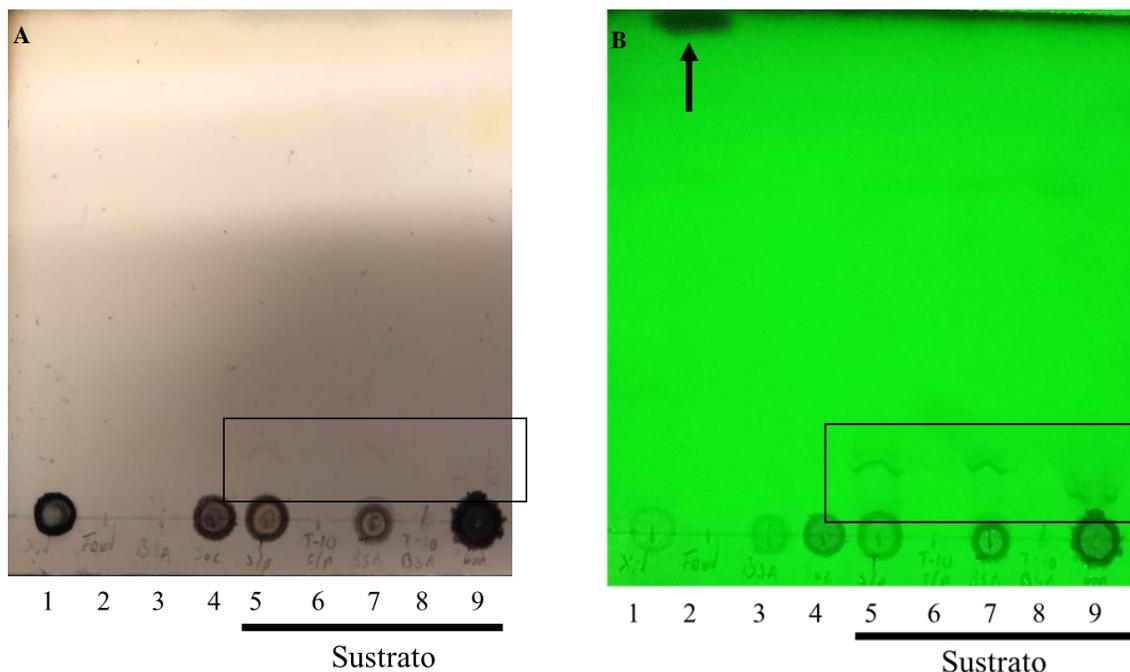


Figura 18. Análisis de los compuestos liberados a partir del sustrato por la acción de SocExlx1-CBM mediante cromatografía de capa fina (TLC) de sobrenadantes concentrados y revelados con A) α -naftol y B) Fotografía de placa irradiada con luz UV a 366 nm. 1. Xilano; 2. Ácido ferúlico; 3. BSA; 4. SocExlx1-CBM sola; 5. SN de reacción con EEM sin proteína; 7. SN de reacción con EEM y BSA; 9. SN de reacción de EEM con SocExlx1-CBM. En el recuadro resalto las señales que se observaron bajo ambos métodos. La flecha en B indica el estándar de ácido ferúlico.

Lo primero que se observó es que la señal del azúcar no migra y se queda en el sitio de aplicación de la muestra, por lo tanto, lo que se obtuvo es un polisacárido, como lo indica el control de xilano que tampoco migró (Figura 18, carril 1 y 9). La proteína sola da señal por la alta glicosilación, y del sustrato sin proteínas también se liberan moléculas por la pura agitación, como lo habíamos determinado antes por su lectura de absorbancia (Figura 18, carril 4 y 5). Sabemos que las moléculas liberadas tienen un tamaño mayor de 10 kDa, porque fueron retenidas en filtros con un tamaño de poro de 10 kDa. La presencia de BSA muestra intensidad un poco menor que la de el sustrato solo, por lo que pudiera protegerlo un poco de la

agitación (Figura 18, carril 7). Finalmente, la señal de interés, que corresponde a la de reacción con expansina SocEXLX1-CBM (Figura 18, carril 9), fue la más intensa de todas (como también detectamos por su valor de absorbancia). Cuando revelamos con luz UV, detectamos una señal asociada a los polisacáridos o a las proteínas (con menor intensidad) (Figura 18B), aunque nuevamente, la reacción que incluyó a la expansina fue la más intensa. Fue interesante observar en las reacciones con el sustrato que si hay migración de moléculas cuando no hay expansina o cuando se usó BSA, pero que tiene una movilidad menor cuando la incubación fue con la expansina SocEXLX1-CBM (Figura 18, recuadro), lo que podría indicar que el polisacárido blanco de SocEXLX1-CBM es una molécula particular de la pared celular.

Propiedades electrostáticas de las diferentes proteínas usadas

Con base en las propiedades electrostáticas de las expansinas analizadas por Pastor y colaboradores (2015) y por otros autores^{15,46,51,69}, sabemos que la carga superficial de estas proteínas es importante en su interacción con polisacáridos. De hecho, los resultados anteriores permitieron determinar que al modificar el pH se obtienen resultados distintos. Por ello, decidimos investigar las propiedades electrostáticas de las proteínas usadas en este trabajo. Para intentar conocer la base de las diferencias obtenidas para cada proteína que se usó, investigamos sus propiedades de carga eléctrica neta y la de la superficie expuesta al disolvente mediante análisis *in silico*, utilizando las estructuras de *BsEXLX1* (pI= 9), BSA (3V03) e incluimos *ZmEXPB1* (pI=9.5), pues está demostrado que esta última solubiliza polisacáridos de EEM^{43,60}, y los mejores modelos de *PcExl1* (pI= 4.7) y *SocExlx1-CBM* (pI de la proteína completa= 5.9; pI del módulo expansina= 8.09; pI del CBM= 6.07) (Figura 19).

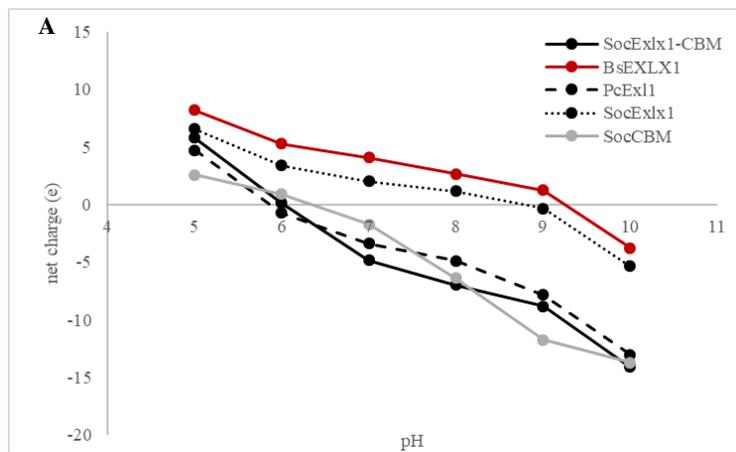


Figura 19. Determinaciones teóricas de las propiedades electrostáticas de las proteínas evaluadas. Diagrama de las modificaciones en la carga de las proteínas en un intervalo de pH de 5 a 10. Para todas las proteínas, excepto *BsEXLX1*, se utilizaron los modelos de más alto puntaje predichos con I-TASSER⁶⁴.

Mediante este estudio, confirmamos que *PcExl1* es una expansina ácida, y *BsEXLX1* es básica al igual que *ZmEXPB1*, según se había reportado anteriormente^{43,60}. Interesantemente, *SocExlx1*-CBM tiene importantes diferencias cuando se analizan ambos módulos juntos o cuando se analizan independientemente. El módulo expansina es básico, mientras que el de la proteína completa es ácido. Como los módulos se pliegan y funcionan de forma independiente hasta cierto punto, y están separados por un largo puente que podría evitar las interacciones entre ellos⁷²⁻⁷⁴, se puede considerar a la expansina *SocExlx1*-CBM como básica, y como la secuencia conectora no puede modelarse por ser intrínsecamente desordenada, los análisis siguientes sólo toman en cuenta el módulo de expansina al que llamamos *SocExlx1*. *BsEXLX1* y *SocExlx1*, son mayoritariamente positivas de 5 a 9 de pH, mientras que *PcExl1* es positiva a pH < 6, y negativa después de pH 6 (Figura 19).

Para las expansinas básicas *BsEXLX1* y *SocExlx1*, los cambios de carga a diferente pH dibujan una recta con pendiente menor entre pH 6 y 9, en donde la carga es positiva, y fuera de ese intervalo, la pendiente es más pronunciada. Lo contrario sucede al analizar el CBM y *PcExl1*, que tienen pendientes más pronunciadas en

todo el rango analizado, por lo que pequeños cambios de pH provocan cambios grandes en la cantidad de carga de estas proteínas ácidas (Figura 19). El análisis de BSA resultó en cambios muy grandes, que son difíciles de analizar en el contexto de las expansinas (Figura 19).

Para analizar la distribución de las cargas en la superficie, se determinaron los potenciales electrostáticos de las proteínas (como se enuncia en la sección de Materiales y métodos) ajustando la trayectoria de -5 (rojo) a 5 (azul) 15 kT/e (Figura 20).

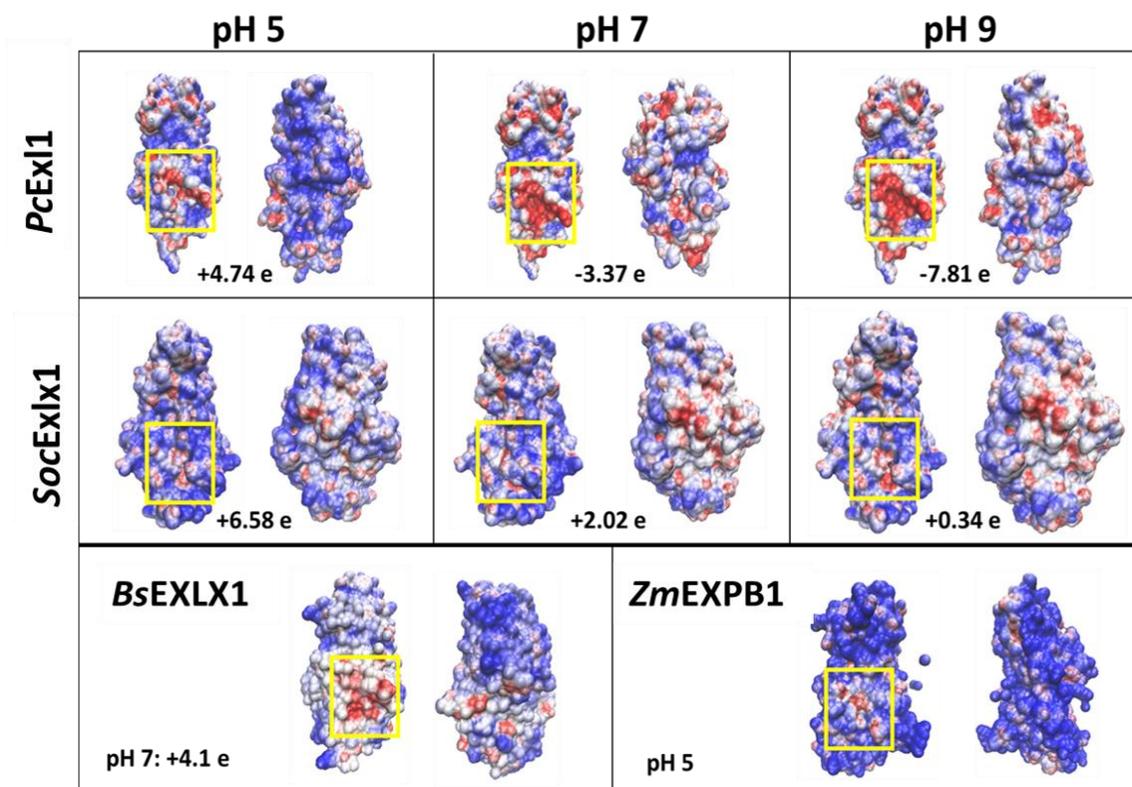


Figura 20. Modelos tridimensionales del potencial electrostático de las expansinas. En todos los modelos: de lado izquierdo la cara de unión al polisacárido (PBS) y a la derecha la cara opuesta. En el recuadro amarillo resalto la región donde se ubica el residuo Asp pseudo-catalítico (D82 en *BsEXLX1*). Las estructuras de *PcExl1* y *SocExlx1* fueron evaluadas a pH 5, 7 y 9; mientras que de *BsEXLX1* al único pH al que se pudo hacer la evaluación (7) y *ZmEXPB1* al pH en que fue reportada su función (5). Los modelos están coloreados según el potencial en la superficie de rojo a azul de -5 (rojo) a +5 (azul) kT/e.

En todos los casos, y como ha sido previamente reportado, observamos un “parche hidrofílico” de carga negativa en el dominio 1 (D1) (Figura 21), que disminuye de tamaño a pH ácido y aumenta a pH 9 (aunque este efecto no es tan evidente en *BsEXLX1*). En este parche hidrofílico se ubica un residuo Asp que es indispensable para la actividad de las expansinas, por lo que se le ha llamado residuo psuedo-catalítico, y está acompañado de residuos polares mayormente, así como de residuos neutros (en diferente abundancia según la proteína) (Figura 21A-E, Figura 22)

Con estos modelos queda clara la influencia de los distintos valores de pH que modifica la predominancia de cargas (Figura 20). A pH bajo, las cargas parciales negativas de los residuos polares desaparecen o son sustituidas por cargas parciales positivas, en comparación con pH neutro; caso contrario sucede ante un aumento en el pH. Considerando los residuos en la región que compone la cara de unión al polisacárido (PBS), exceptuando el parche hidrofílico que contiene residuos clave para la actividad de las proteínas y que siempre es negativo, predominan las cargas positivas o regiones sin carga, con excepción de la cara de unión al polisacárido del D2 en *PcExl1*, que tiene una región rica en cargas negativas. Por otro lado, encontramos mayor heterogeneidad en la distribución de cargas entre proteínas al analizar el lado opuesto a la cara de unión al polisacárido: en *ZmEXPB1* predominan las cargas positivas; en *BsEXLX1*, el D1 tiene cargas negativas y neutras, mientras que el D2 es rico en carga positiva; en *SocExlx1* la cara opuesta mantiene una superficie mayormente sin carga a lo largo del espacio que comprende los dos dominios. Finalmente, en *PcExl1* la distribución de cargas en la cara opuesta al PBS no muestra dominio de ningún tipo de carga, pero a pH 5 predominan las cargas positivas (Figura 20).

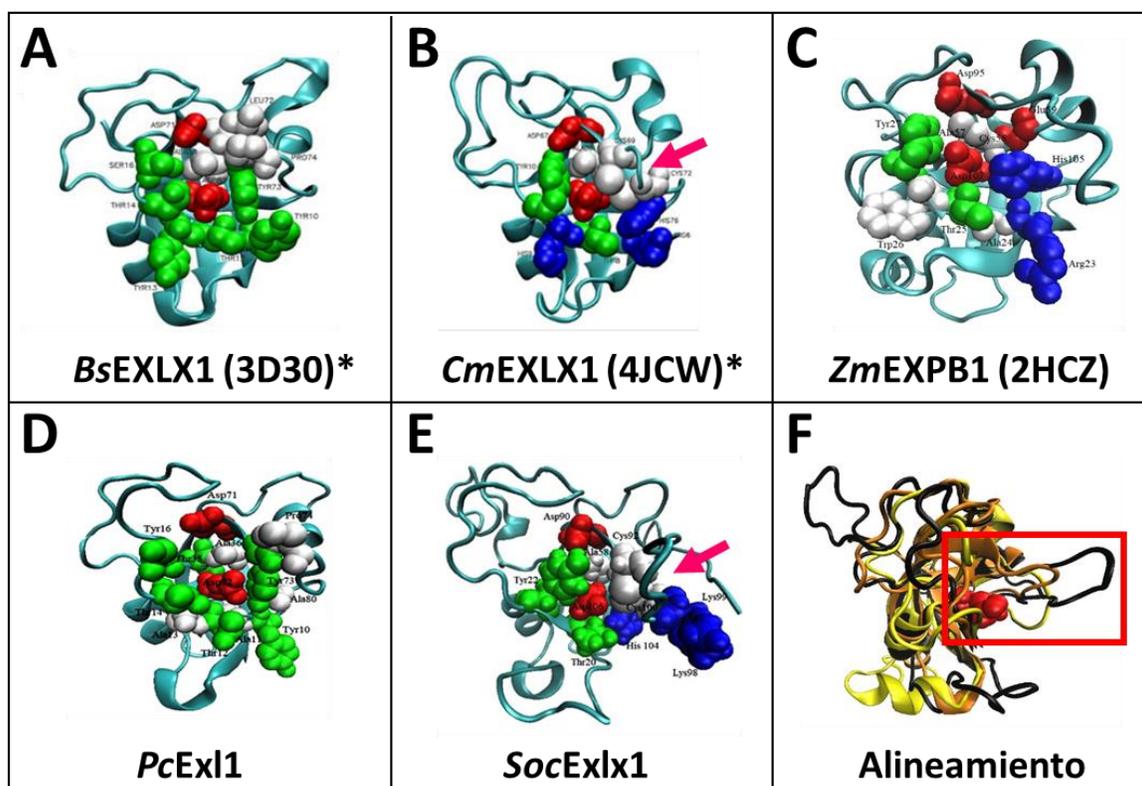


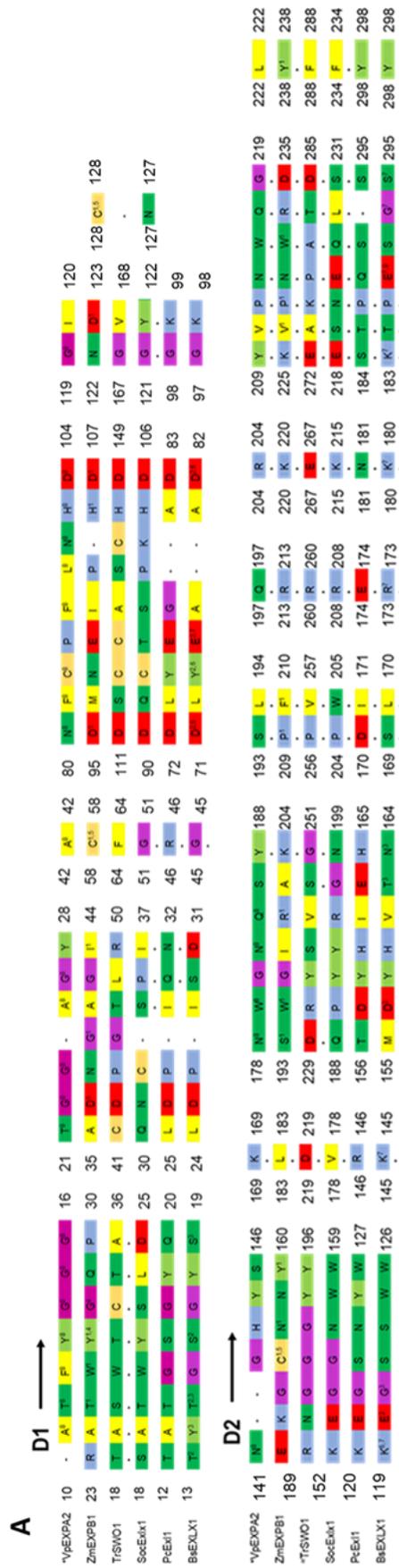
Figura 21. Topología del “parche hidrofílico” presente en las expansinas. (A-E) Vista frontal de la cara de unión a polisacáridos en el D1, donde se muestran los residuos que rodean al Asp (pseudocatalítico) en el parche electrostático; coloreados de rojo (polares cargados negativamente), azul (polares cargados positivamente), verde (polares sin carga) y blanco (no polares). La flecha rosa muestra la región donde se establece un puente disulfuro. F) Alineamiento estructural de *ZmEXPB1* (amarillo), *BsEXLX1* (anaranjado) y *SocExlx1* (negro), en vista lateral del D1; resaltando la región donde se forma un *loop* en el caso de *SocExlx1*. *Modificadas de Pastor y colaboradores (2015).

Además del Asp pseudo-catalítico y otro Asp cercano (Asp 71 en 3D30), en el caso de *ZmEXPB1* (Figura 21C) hay un residuo con carga negativa extra. En otros casos hay residuos cargados positivamente y polares sin carga (en *BsEXLX1* y *PcExl1*). Un caso interesante fue *SocExlx1*, donde hay un conjunto de residuos formando un *loop* muy cerca del “parche hidrofílico”. Esta configuración se encuentra en un grupo de expansinas, según el análisis realizado por Pastor y colaboradores, donde se incluye a EXLX1 de *C. michiganensis* (Figura 21B), que en la vecindad del parche electrostático presenta un puente disulfuro que forma un *loop* de diferentes longitudes, y que probablemente module la accesibilidad del Asp pseudo-catalítico

(Figura 21F). Es probable que en el modelo de distribución de cargas de *SocExlx1* el *loop* evita que el parche hidrofóbico este expuesta en la superficie y que el modelo revele su ubicación (Figura 20).

Considerando los residuos que han sido determinados como importantes para la unión/efecto de expansinas al tejido vegetal, observamos que la mayoría se ubican en la cara PBS (Figura 22), y que incluyen a Tyr25, Asp37, Asp95 y Asp107 (pseudo-catalítico), que en *ZmEXPB1* forman puentes de hidrógeno con polisacáridos⁶⁸ y que se encuentran en las expansinas evaluadas y en *TrSWO1*, pero no están en la α -expansina EXPA2 de *Vasconcellea cundinamarcensis*. Por otro lado, *BsEXLX1* se sabe que Tyr73 es importante en la unión³⁹, sin embargo, este residuo sólo se encuentra en *PcExl1*.

Para la proteína *ZmEXPB1* se determinó la importancia de tres cisteínas expuestas (C58, C128 y C156)⁴³ que se ha visto interactúan con iones divalentes, mismos que en condiciones de concentración de NaCl ≥ 10 mM afectan la tasa de relajación del tejido vegetal⁶⁹. En nuestro alineamiento, observamos que estos residuos no se encuentran en otras proteínas o por lo menos no en la misma posición. También para *ZmEXPB1* se determinó la existencia de un “parche hidrofóbico” compuesto por los residuos P209, V227, P229 y Y238 en la cara opuesta al PBS en el D2, que se cree son importantes para su unión al sustrato⁶⁸. Este parche sólo se repite en la estructura del CBM de *TrSWO1* (aunque cambia el último residuo Tyr por Phe). También, sabemos que al mutarse los residuos R173, K180 y K183 en *BsEXLX1* (mutante RKKQ), se crea una versión hiperactiva de esta proteína sobre el tejido vegetal^{46,69,75}. Como hemos ya mencionado, este patrón sólo se encontró en *ZmEXPB1*, sin embargo, aunque no idéntico, también se encuentra en *SocExlx1*. Además, en *BsEXLX1*, K145 completa el conjunto de residuos básicos en la cara opuesta al PBS en el D2 que son importantes en su unión al tejido⁴⁶. Por su parte, el residuo E191 en *BsEXLX1* que es importante para su actividad sólo se encuentra en *SocExlx1*⁶⁹.



B

Proteínas	Motivos consenso															
	ATFGY	GGAGGY	GXXCGXC(FY)	C	C	C	T(N/D)	C	HFDL	(Y/F)R	RVPC	(Y/W)Y	W	W/Y	W	W
VpEXPA2	ATFGY	GGAGGY	GXXCGXC(FY)	C	C	C	TN	C	HFDL	FRR	RVSC	F	W	W	W	W
ZmEXPB1	ATFGY	GGAGGY	GLSGGSCY	C	C	C	TD	C	HFDL	FRR	RVRC	NYL	W	W	W	W
TrSWO1	ATWYG	GGACGI	GKGGSCY	C	C	C	VD	C	HLDL	YRR	RVQC	YF	W	Y	W	W
SocExk1	ATWYS	AAACGACV	YLSCGECI	VD	C	C	VD	C	HIDL	WWN	YVPC	WWN	W	Y	W	W
PcEx1	ATGSS		AAACGACV	TD	C	C	TD	C	ALDL	YWA	YWA	YWA	W	Y	Y	Y
BsEXLX1	YTGS			TD	C	C	TD	C	ALDL	WWA	WWA	WWA	W	Y	Y	Y

Figura 22. Alineamiento de módulos expansina de las proteínas utilizadas con secuencias de las expansinas EXPA2 de *Vasconcellea cundinamarcensis* (VpEXPA2), EXPB1 de *Zea mays* (ZmEXPB1) y la swollenina1 de *Trichoderma reesei* (TrSWO1). A) Se muestran conjuntos de residuos en el D1 y D2 con no más de tres aminoácidos de distancia, elegidos por haber sido reportados como importantes para la función/efecto de las expansinas. VpEXPA2: (8) Gaete-Eastman et al., 2015. ZmEXPB1: (1) Yennawar et al., 2006; (4) Sampedro et al., 2015; (5) Wang et al., 2016. BsEXLX1: (2) Silveira y Skaf, 2016; (3) Orłowski et al., 2018, (7) Georgelis et al., 2011 y (9) Hepler y Cosgrove, 2019. Se utilizó ClustalW, coloreando según el código incluido en MEGAX. Las flechas negras muestran la ubicación de los residuos aromáticos responsables de la unión al sustrato. Se determinó la ubicación de los residuos en la cara PBS o la cara opuesta (†) con las estructuras ZmEXPB1 (2HCZ), BsEXLX1 (3D30) y los modelos de más alto puntaje predichos con I-TASSER para el resto de las proteínas. * No se obtuvo un modelo 3D de esta expansina, se determinó la ubicación de los aminoácidos utilizando como referencia la estructura de ZmEXPB1. ∞ Esta proteína no tiene D2, los residuos presentados corresponden al CBM. B) Tabla de los módulos consenso propuestos por Li y colaboradores (2011).

Por otro lado, los residuos aromáticos W125, W126 y Y157 en *BsEXLX1* importantes para su unión al sustrato se alinean en todas las expansinas bacterianas y en *TrSWO1*, mientras que en las expansinas de plantas sólo se ubican dos de estos residuos (Figura 22). Además, se cree que los residuos W26 y Y27 en el D1 contribuyen a la unión en *ZmEXPB1* y se encuentran también en *SocExl1* y *TrSWO1*. Por otro lado, en la cara PBS del D2 los residuos E120 y G121 en *BsEXLX1*, que son importantes en la estabilización de la unión con polisacáridos^{8,55}, junto con los residuos Lys11 e His159, se encuentran en las expansinas bacterianas y en *ZmEXPB1*.

Finalmente, en la estructura de las expansinas se han definido algunos motivos consenso ³⁷(Figura 22B) como el motivo ATFGY y el T(D/N) , que están ubicados en la vecindad del motivo en se encuentra el Asp pseudo-catalítico, (H/A)(F/L)DL, y que constituyen el parche hidrofílico. Estos motivos están presentes en todas las expansinas analizadas (con ligeras variaciones), incluyendo a las expansinas de plantas. El motivo GGACGY se encuentra en expansinas de plantas y se ubica en la cara PBS del D1 junto al parche hidrofílico. Por su parte, el motivo RVPC que se encuentra entre los dos dominios justo donde termina el D1, está presente en las expansinas de plantas y, con algunas variaciones, en *TrSWO1* y *SocExl1*.

10. Discusión

En este trabajo hemos dado evidencia de la actividad de solubilización de polisacáridos de la pared celular del estilo y estigma del maíz por parte de expansinas bacterianas con diferentes características de carga eléctrica superficial y estructura modular. En la tabla 8 presentamos los resultados más sobresalientes, en donde la expansina trunca de *S. cellulosum* (que carece de CBM) fue la que mayor solubilización del sustrato provocó, y lo hizo a pH 9 hasta el final del ensayo, seguida por Ex11 de *Pectobacterium brasiliense*, mientras que EXLX1 de *B. subtilis* fue inactiva bajo las condiciones analizadas (a pesar de haberse usado en los ensayos el doble de concentración con respecto a las demás).

Tabla 8. Resumen de resultados con mayor variación en la función de solubilización y su correspondencia con la unión de las expansinas estudiadas en este trabajo, además, se muestran los parámetros en que sucedieron.

Proteína	pH	Tiempo (h)	Equivalentes ferúlicos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Unión (nmol/mg)	
<i>PcExl1</i>	>5	12	5.98 ± 0.24	0	Con DTT
		72	4.02 ± 0.66	0	Sin DTT
<i>SocExlx1</i> -CBM	7.4	72	2.9 ± 1.10	0	Sin DTT
		9	6.03 ± 1.38	0	
<i>SocPSL</i> - <i>Exlx1</i>	9	72	12.45 ± 2.23	0.34 ± 0.06	Con DTT
			16.79 ± 5.80	0.27 ± 0.17	Sin DTT

Se presentan los promedios obtenidos más/menos la desviación estándar. Se utilizaron 2.9 nmoles de proteína por mg de sustrato en cada muestra.

A pesar de que no se logró una caracterización completa de todas las condiciones, pudimos determinar algunos parámetros que parecen influir en mejores actividades, y que a continuación se discutirán por secciones.

Relación estructura-función de las expansinas

Se sabe que la actividad de las expansinas sucede en intervalos de pH de 4 a 6. Una de las razones por la que esto ocurre es que el estado de protonación de residuos susceptibles a cambiar a diferente pH debe ser favorable para la unión o la dinámica de las proteínas en las matrices de polisacáridos en las regiones blanco de la actividad, para así interrumpir las interacciones y provocar la relajación del sustrato. Es decir, el contenido de carga eléctrica superficial de las expansinas afecta su blanco dentro de las paredes celulares^{15,16,41,46}.

En la pared celular de las células vegetales, la actividad endógena sucede ante un bombeo de protones que disminuye el pH entre 4-6, lo que activa la elongación de las paredes mediada por expansinas^{7,76,77}. Durante la penetración del tubo polínico también se han observado oscilaciones en el pH¹⁹, y el efecto de aflojamiento y solubilización de polisacáridos *in vitro* para *ZmEXPB1* sucede en el intervalo de pH de 4.5 a 5.5^{60,76}, aunque para *BsEXLX1* se ha visto que la actividad sucede entre 5.5 y 9.5⁴⁶. *PcExl1*, que es la expansina ácida del patógeno *P. brasiliense*, es mayormente activa a pH 5, con niveles de señal equiparable a lo reportado para *ZmEXPB1*, y se inactiva a pH 7 o 9 sobre tejido EEM. Esto se puede explicar porque ante pequeñas variaciones de pH entre 5 y 6 hay un cambio abrupto en la carga

(Figura 20), que llega hasta +4.74 e a pH 5. Estos cambios ocurren principalmente en la PBS, lo que se asemeja a *ZmEXPB1* a pH ácido (Figura 21). Esto puede explicarse si se considera la abundancia de los residuos cargados en esta zona, pues *PcExl1* posee la menor cantidad de residuos polares con carga (36) en comparación de *ZmEXPB1* (53), *BsEXLX1* (47) o *SocExl1* (42), lo que resulta en mayor susceptibilidad a cambios electrostáticos en su superficie por variaciones en el pH. También explica su aumento de unión al sustrato. De hecho, Olarte-Lozano y colaboradores (2016) demostraron que *PcExl1* a pH ácido se une al tejido vegetal de coleoptilo de trigo (graminaceae) mejor que a cualquier otro pH. Estos datos parecerían contradecir nuestras observaciones sobre que la solubilización ocurre sin unión. Creemos que puede deberse a la técnica de medición de la unión usada, o a las características del ensayo. Interesantemente, *PcExl1* tiene pl opuesto al de *ZmEXPB1*, esto es, es una expansina ácida.

Anteriormente, Tovar-Herrera y colaboradores (2018) reportaron actividad de solubilización de polisacáridos del tejido vascular de acelga con *PcExl1* a pH 7.4, mientras que a este pH en nuestros ensayos no observamos actividad. La razón de esta diferencia podría ser que el tejido usado en los experimentos fue diferente; ya que la acelga es una planta dicotiledónea, mientras que el maíz es una monocotiledónea. Aunque en ambos tipos predominan paredes secundarias con abundante hemicelulosa y pectina reducida, su proporción en la vasculatura de acelga es la mitad de lo que hay en EEM (Tabla 1)⁷⁸. Esto puede también explicar la concentración de azúcares totales liberados por *PcExl1*, que fue de la mitad a partir de acelga (20 µg/mg de tejido) comparada con la solubilización que provoca *ZmEXPB1* sobre EEM^{16,60}. Esperaríamos además que la composición de hemicelulosa en la vasculatura de acelga sea distinta, en la que predominen XylG que no posean moléculas con carga negativa, facilitando así la interacción de *PcExl1* (que a pH 7.4 será negativa y neutra) (Figura 20), y liberando HG sustituidos de ese sustrato. En nuestro experimento de incubación de *PcExl1* con EEM, se formaron precipitados blancos que opacaron la disolución en menos de una hora de incubación. Esos experimentos fueron hechos en el intervalo de 5 a 6, que es en el que la proteína es más sensible a los cambios. Pensamos que cuando la proteína

fue más activa, el pH en realidad fue de alrededor de 6 debido a un fallo en el cálculo del pH de los amortiguadores. Existe la posibilidad de que el precipitado fuera en parte expansina precipitada, pues en esta condición la señal de proteína en el sobrenadante disminuyó. Sin embargo, en muestras de proteína sin sustrato al mismo pH no hubo precipitado, lo que sugiere que el precipitado está formado tanto de proteína como de moléculas liberadas del tejido vegetal. Estos experimentos deben repetirse.

Se ha reportado que *PcExl1* se une preferentemente a la zona intercelular de los vasos del xilema y las células circundantes en cortes de apio¹⁶, en la que abundan GAX y HG. Sin embargo, por ensayos *in vitro* sabemos que la unión de *PcExl1* a paredes celulares se beneficia al eliminar los polisacáridos ácidos (posiblemente GAX o HG sustituidos con moléculas de ácido ferúlico) mostrando un máximo de unión en paredes celulares enriquecidas en celulosa⁵². A diferencia de *ZmEXPB1* que une específicamente *IsGAX*⁴³, y cuya unión se ve reducida al eliminar este tipo de polisacáridos, parecería que la unión de las *PcExl1* y *ZmEXPB1* es a dos polisacáridos distintos, pero se genera un mismo efecto. La respuesta a esta aparente discrepancia podría estar relacionada con las regiones de unión y los polisacáridos de EEM que se liberan, pues *ZmEXPB1* se une a las regiones de estabilización entre *IsGAX* y *hsGAX*⁴³ (que son los componentes que se liberan). Pero otras regiones de estabilización entre las microfibras con los HG sustituidos también existen, y es posible que estas sean el blanco de la expansina *PcExl1* en el tejido vascular de acelga. Podría ser que *PcExl1* también actúe en las regiones de estabilización *IsGAX*-*hsGAX* en EEM. Es probable que *BsEXLX1*, que une específicamente celulosa en regiones donde interactúa con *XylG*^{44,75}, provoque la liberación de *XylG*. Sería interesante determinar si así sucede.

Por otro lado, la expansina trunca de *S. cellulosum* carente del CBM, *SocPSL-Exl1*, fue activa a pH 7.4 y aún más a pH 9, que resulta diferente a lo reportado para otras expansinas que actúan a pH ácido. Esta variante trunca carece del CBM, pero contiene la secuencia conectora de poli-serinas (aproximadamente 57 residuos intrínsecamente desordenados) que contiene abundantes O-glicosilaciones. La mayor actividad de esta variante podría deberse a un efecto de presentar dicha

secuencia conectora, pues esta pudiera plegarse para favorecer el efecto de solubilización, o interactuar con el sustrato directamente. Debido a que dicha secuencia es intrínsecamente desordenada, podría estar más expuesta al medio en SocPSL-Exlx1 en comparación con la proteína completa, por lo que los azúcares de las O-glicosilaciones (que son principalmente manosas) podrían interactuar con los polisacáridos de la pared (como la celulosa). Lo anterior ha sido demostrado para una variante de la enzima celobiohriolasa Cel7A de *Trichoderma reesei* que carece del módulo catalítico pero que mantiene la secuencia conectora y que une mejor la celulosa cristalina a través, justo, de esta secuencia que se encuentra glicosilada^{74,79,80}. Por otro lado, los geles de proteínas y los ensayos de inmunodetección (Figura 14C) a pH 7, pero sobre todo a pH 9, sugieren que se están retirando las glicosilaciones de la proteína, probablemente por una mayor exposición de éstas a las condiciones del medio. Se requieren mayores estudios para determinar lo que está pasando.

El pH es determinante en la actividad de las expansinas y parece influir de manera similar en la unión y solubilización de proteínas con pI semejante. Sin embargo, a pesar que casi todas las expansinas de plantas tienen pI básico¹⁵, las expansinas α y β difieren en la tasa de actividad sobre las paredes celulares, siendo las α más activas en dicotiledóneas, y las β en algunas familias de monocotiledóneas, como las gramíneas⁹. Esto sugiere que existen otros factores relevantes en la actividad. Por ejemplo, los aminoácidos aromáticos del PBS en D2 (Figura 22) que son importantes para la interacción productiva con el sustrato^{39,42,46}, y otros residuos del PBS (Tyr y tres Asp, incluyendo el pseudo-catalítico) que además de aportar cargas a la superficie, forman puentes de hidrógeno con el sustrato^{39,68,81}, y están presentes en todas las expansinas evaluadas (Figura 22). Existen otros residuos que han sido caracterizados como importantes para la unión/efecto ubicados en diferentes zonas de la estructura y que no están conservados entre las expansinas, particularmente en la cara opuesta al PBS (Figura 22). Algunas de ellas parecen establecer interacciones que se consideran no productivas, por ejemplo, los residuos R173, K180 y K183 en el D2 de *BsEXLX1*, también presentes en *ZmEXPB1* o el llamado “parche hidrofóbico”, que está presente únicamente en la expansina β de maíz, de

los cuales no se sabe con exactitud su función pero existe evidencia experimental de que su ausencia repercute en la actividad de las proteínas^{46,68}.

También hay elementos estructurales que podrían afectar la unión/actividad, por ejemplo, en glicosil hidrolasas se ha descrito un *loop* en la región donde se ubican los residuos catalíticos que evita que se admitan cadenas largas de polisacáridos⁶⁸. Un *loop* similar también se encuentra en el parche hidrofílico de algunas expansinas como *CmEXLX1* y *SocExlx1*, pero está ausente en *PcExl1*, *ZmEXPB1* y *BsEXLX1* (Figura 21), y aunque no conocemos las implicaciones de este *loop* en estas expansinas, podría limitar su interacción a sólo cadenas de polisacáridos sencillas (sin decoraciones) y/o individuales. *BsEXLX1* comparte la mayor identidad con *SocEXLX1*, aunque sólo esta última contiene el *loop*, por lo que su interacción con celulosa podría reducirse en comparación con *BsEXLX1*. Existe la posibilidad de que el CBM de *SocEXLX1* compensara esta reducción ya que es muy similar a CBMs de la familia 2A que unen celulosa cristalina¹⁸. Por lo que, mientras el CBM de *SocExlx1*-CBM une celulosa, el módulo expansina interactúa con cadenas sencillas como GAX, HG o XG. Sin embargo, observamos una baja unión de esta proteína en casi todas las condiciones, tal vez debido a las N-glicosilaciones del CBM¹⁸. Al respecto, Boraston y colaboradores (2001) reportaron que el CBM2a de la xilanasa 10A de *Cellulomonas fimi* producido en *Pichia pastoris* presentó N-glicosilaciones que abolieron la unión, mientras Olarte-Lozano (2016) demostró que *SocExlx1*-CBM producida en *E. coli* (carente de glicosilaciones) tuvo una gran capacidad de unión. Aunque no descartamos que sea a pH 5 en presencia de DTT la condición más favorable para la unión y que requiera el ensamblado de ambos módulos, pues como vimos, en esta misma condición, la variante carente de CBM no registró unión.

Ahora bien, el paradigma de acción de estas proteínas argumenta que la unión a los polisacáridos es fundamental, sin embargo, nuestros datos sugieren que la solubilización de polisacáridos resulta en (o es resultado de) ausencia de unión de las expansinas al sustrato. Aunque hemos mencionado que esto puede ser un artificio de nuestro método de medición, existen algunos estudios que apoyan nuestras observaciones. Georgelis y colaboradores (2011) confirmaron que una variante de

BsEXLX1 mutada en tres residuos polares ubicados en la cara opuesta al PBS en el D2 (R173Q/K180Q/K183Q o RKKQ) es hiperactiva en términos del aflojamiento de las paredes celulares de coleótilos de trigo, pero su unión a AX insoluble fue muy baja o nula en comparación a la proteína silvestre. Así mismo, la unión a Avicel de esta misma mutante se vio apenas reducida. Esto indica que la diferencia entre la extensión o el aflojamiento de los sustratos depende del tipo de sustrato sobre el que tengan que actuar las proteínas. Esta misma mutante RKKQ se une específicamente a ciertas regiones de las paredes celulares en comparación con la proteína silvestre, debido a que aumentó la unión mediada por el PBS en el D2 en contraparte con la interacción electrostática⁷⁵. En otro ejemplo, Hepler y Cosgrove (2019) reportaron que una mutante E191K, que cambia un residuo negativo por otro positivo ubicado en el PBS del D2 en *BsEXLX1*, abolía la actividad de aflojamiento y aumentaba la capacidad de unión a AX. Además, al utilizar 10 mM CaCl₂ en dicho estudio, se reduce la unión a AX y la actividad de expansina mejora. Por su parte, la unión a Avicel se vio ligeramente mejorada. Inclusive, mutantes de *BsEXLX1* carentes de los residuos aromáticos del D2 mantienen cierta capacidad de unión a AX insoluble sin generar efecto de aflojamiento⁴⁶. Finalmente, *PcExl1* D83A mejora la unión a paredes celulares de trigo, pero la actividad se pierde³⁸.

Tabuchi y colaboradores (2011) argumentan que la solubilización provocada por la expansina *ZmEXPB1* está gobernada por la capacidad de difusión de la proteína a través de la matriz de polisacáridos de la pared celular, es decir, que la movilidad de las proteínas en la matriz es clave para solubilizar a las moléculas del sustrato. Por esta razón, no descartamos que la agitación a la que se sometieron las reacciones sea relevante al aumentar la probabilidad de interacción de las proteínas con los azúcares en las regiones estabilizadoras (*hotspots*, amalgamas). Esto ayudaría a explicar cierta señal observada con BSA (que también es una proteína anfifílica⁶²), que podría ser una señal inespecífica, aunque en algunas condiciones fue mayor a la de las expansinas analizadas.

Como ha sido sugerido, parece que la clave para provocar la relajación y consecuente solubilización del sustrato es la manera en la que las proteínas interactúan con éste a través de residuos importantes en diferentes regiones de la

expansina que discriminan entre el tipo de polisacáridos de unión, y los sitios dentro de las matrices complejas de polisacáridos donde las expansinas logran “acomodarse” mejor. En nuestro caso, observamos además que el tejido es afectado por las condiciones del ensayo (Tabla 4) y que hay señal inespecífica con BSA (Figura 16).

Particularidades de los ensayos y el método de medición empleado en este estudio

Con respecto a la decisión de utilizar DTT en las reacciones, trabajamos sobre el antecedente de la actividad de aflojamiento de *ZmEXPB1* que aumenta por la presencia de entre 1 y 10 mM de DTT, que según los autores que reduciría tres cisteínas expuestas en la superficie de esta expansina (C58, C128 y C156)⁶⁸, evitando así interacciones indeseables de la proteína con el sustrato. Sin embargo, en ninguna expansina bacteriana usada en este trabajo parecen alinearse dichas cisteínas, por lo que esa explicación no podría aplicarse a *PcExl1* o *SocExlx1-CBM* en las condiciones de actividad mejorada con DTT. Otro efecto podría ser a nivel de los puentes disulfuro. *BsEXLX1* parece no poseer puentes disulfuro en su estructura ya que carece de residuos Cys, *PcExl1* contiene un puente disulfuro, y *Exlx1-CBM* parece poseer tres puentes, pero sólo uno de ellos está expuesto, y es clave en la formación del *loop* antes mencionado (Figura 20 y 21). Aunque se esperaría que a la concentración de DTT utilizada en las reacciones los puentes disulfuro al interior de la estructura no se hubieran afectado⁸², es probable que haya sido suficiente para reducir las cisteínas del *loop* del parche hidrofílico promoviendo la actividad sobre el sustrato.

Debido a que no conocemos las cantidades de proteína producida a niveles fisiológicos, no contamos con una referencia que nos permita comparar las concentraciones usadas en nuestras reacciones. Sin embargo, se ha determinado que en las paredes celulares de las plantas hay alrededor de 1 expansina por cada 5,000 proteínas en paredes celulares de células en crecimiento⁴²; mientras que el polen de maíz puede contener de 1 a 4 expansinas por cada 100 proteínas durante la penetración del tubo polínico al carpelo, correspondiendo mayormente a *ZmEXPB1*⁹. También sabemos que la actividad de solubilización *in vitro* de

ZmEXPB1 se realizó con 3.6 μmol de expansina/g de paredes celulares de EEM⁶⁰. En este trabajo utilizamos 2.93 μmol de proteínas/g de tejido vegetal, y 5.8 $\mu\text{mol/g}$ en el caso de *BsEXLX1*, que son cantidades similares a las reportadas para la expansina de maíz. Interesantemente, en ensayos equivalentes usando swollenina SWO1, con apenas 0.2 $\mu\text{mol/g}$ se observó un efecto, lo que habla de la alta actividad de esta proteína con respecto a las expansinas. La actividad fisiológica de las expansinas en plantas es la de relajar el tejido para permitir el crecimiento del tubo polínico, que a diferencia con las de los microorganismos (hongos en el caso de la producción de swolleninas), el objetivo que se persigue es la destrucción de la pared celular de plantas⁶².

Como se menciona en la sección de Materiales y métodos, las señales crudas de absorbancia se procesaron con las primeras tres ecuaciones para obtener la diferencia de absorbancia (ΔAbs). Esto, para describir de forma confiable lo que sucede en el sistema. Sobre todo, porque la dinámica de unión (medida como la disminución de la señal de proteínas en el sobrenadante de las incubaciones) de cada proteína es distinta, además, de que el sistema es complejo ya que se usaron paredes celulares completas. Esto puede influir en los datos de actividad controversiales que encontramos en este trabajo.

El cálculo de ΔAbs permite eliminar la señal de fondo del sustrato y de la proteína, y da un valor del efecto de solubilización por el tratamiento con expansina, y el cociente $(E_{\text{Abs}280} - S_{\text{Abs}280})/P_{\text{Abs}280}$ (ecuación 1) indica la proporción (0 a 1) de proteína en el sobrenadante al momento de la medición. Siendo 0 equivalente a la ausencia de la proteína en el sobrenadante, es decir, toda está unida al sustrato, y 1, la misma señal de proteína en el sobrenadante que al inicio, es decir, nada de unión al sustrato. En el caso de algunas reacciones, como las de *PcExl1* a pH ácido y desde la primera hora de tratamiento, se obtuvo un valor mayor a 1, lo que indica un aumento de la concentración de proteínas disueltas en comparación con el control ($E_{\text{Abs}280} - S_{\text{Abs}280} > P_{\text{Abs}280}$), es decir, parecería como si no sólo no se estuviera uniendo *PcExl1* al sustrato, sino que además se estuvieran liberando proteínas desde el tejido. Este efecto se repitió cuando se usó BSA. Sin embargo, la señal de la proteína obtenida por inmunodetección (Figura 7C) y lo reportado por Olarte-

Lozano (2014), indican que *PcExl1* sí se une al tejido en estas condiciones. Es probable entonces que este sucediendo unión de *PcExl1* al tejido y al mismo tiempo se están liberando proteínas desde el tejido. Nuestro método de medición no nos permite diferenciar entre estas posibilidades. Así mismo, la relación unión/efecto que determinamos podría ser sólo un artificio del método de medición, como mencionamos antes. Evidentemente, se necesitan más experimentos para revelar lo que está pasando, entre los que destacamos el mejoramiento del tratamiento de deproteinización del sustrato.

También obtuvimos casos opuestos, donde los valores calculados por la ecuación 1 resultaron en cocientes menores a 0 (valores con signo negativo), ya que el valor E_{Abs280} fue menor que S_{Abs280} (p. ej., en las evaluaciones de *PcExl1* a pH 9 sin DTT, después de las 48 horas, y de *BsEXLX1* a pH 7.4, desde la primera hora de incubación), sugiriendo que en las condiciones mencionadas se unió toda la proteína y/o se estabilizó la matriz de polisacáridos haciéndola más resistente al tratamiento. Es decir, que no se generó el nivel de liberación basal a 280 nm, efecto que también se determinó a 300 nm (Figuras 5 y 15), en donde los valores de la absorbancia cruda en las incubaciones con proteínas son menores, en comparación con las incubaciones control (amortiguador más sustrato). En estos casos decidimos ajustar los valores a 0, simulando unión total al sustrato para el tratamiento de las ecuaciones.

Finalmente, vale la pena considerar que a pesar de que la proteína completa y la variante trunca de *SocEXLX1*-CBM se purificaron por afinidad a níquel a partir de medio BMMY (de producción de *Pichia pastoris*), al momento de concentrarlas se observó un componente de color café (aparentemente a baja concentración, ya que apenas era visible). Pensamos que esto podría haber introducido variabilidad y producido error en las mediciones, ya que las señales de proteína de 290 a 300 nm variaron ligeramente entre lotes de purificación. Al aplicar el factor de corrección en la ecuación 2 (producto de la ecuación 1) a todos los valores de absorbancia en las longitudes de onda de 200 a 400 nm de dichas muestras, asumimos que este error se corrige.

Diferencias de señal y polisacáridos

Como hemos mencionado, nuestros datos sugieren la capacidad para solubilizar polisacáridos a partir de EEM por parte de SocPLS-EXLX1 y PcExl1, que son detectados indirectamente por la señal de absorbancia que sugiere la presencia de moléculas fenólicas. Se sabe que las paredes vegetales contienen ácidos hidroxicinámicos y ácidos glucorónicos como sustituyentes de arabinosa en GAX, y que son responsables de su carga negativa. De los ácidos fenólicos, el más abundante es el ácido ferúlico, constituyendo hasta ~20,660 µg/g de tejido^{25,83}, y que puede aumentar como resultado de la infección por patógenos⁸³. En nuestros ensayos obtuvimos ~16,800 µg/g en las incubaciones de SocPSL-Exlx1 a pH9. Aun así, tenemos duda sobre la identidad del ácido ferúlico, ya que su pico de absorbancia es a 320 nm (el estándar utilizado sirvió para identificar que nuestro espectrofotómetro está bien calibrado), y el pico de los perfiles obtenidos fue a 300 nm. Tovar-Herrera y colaboradores (2018) identificaron un pico en perfiles similares de PcExl1 sobre xilema aislado de acelga, y argumentan que las señales con picos en 310 nm o menos podrían estar asociados a ácido cumárico, que también puede encontrarse como un componente estructural no fusionado a otros fenoles como aquellos que forman la lignina^{21,78}. La diferencia entre el ácido cumárico y el ferúlico consiste en la presencia de un grupo metoxilo extra en la posición 3. Aunque es posible que se trate de algún otro ácido hidroxicinámico, como el ácido vanilínico, que tiene una longitud menor del grupo alifático en comparación con ferúlico, y pico de absorbancia entre 294 y 320 nm, o el ácido protocatéquico, que tiene un grupo alifático más corto y presenta un grupo hidroxilo en lugar del metoxilo y absorbancia máxima a 295 nm. Tanto el ácido vanílico como el protocatéquico han sido extraídos de plantas, pero su posición en la pared celular o su papel no son claros^{84,85}. Otra explicación a esta diferencia del pico de absorbancia podría ser que las uniones diferúlicas estén en diferentes conformaciones por efecto de la irradiación con luz UV o por el pH de la reacción, como ha sido demostrado antes^{25,59,84}.

Para tratar de asignar alguna identidad a las moléculas liberadas del sustrato en nuestras reacciones, determinamos los perfiles de absorbancia de pectina y xilano disueltos en el amortiguador, que revelaron máximos a 230 nm y 250 nm,

respectivamente, aunque el perfil de xilano muestra un intervalo mucho más amplio en comparación a la pectina (datos no mostrados). La absorbancia cruda de nuestras reacciones con el sustrato en longitudes de onda por debajo de 290 nm mostró máximos entre 230 y 250 (más frecuentemente en 230), sugiriendo que pectina o xilano son los responsables de la señal. Este patrón parece ser además específico del tratamiento con las proteínas ya que, en este mismo intervalo, los controles sin proteína o de muestras que no resultaron positivas en la diferencia de absorbancia (como PcExl1 a pH 7.4), muestran un desfase en la longitud de onda de máxima absorbancia al compararlos con muestras positivas. Sin embargo, sabemos que se requieren análisis más refinados para la discriminación de los polisacáridos.

Finalmente, otra evidencia de liberación de polisacáridos por la actividad de SocExl1-CBM (que, además, fue la expansina más activa), es que algunas de las muestras positivas se volvieron viscosas después de concentrarlas al vacío, como fue reportado por McQueen-Mason y Cosgrove (1995), quienes observaron que la incubación de la expansina de pepino con tejido vegetal de la misma planta a pH 4.5 aumentaba la viscosidad de las disoluciones.

Función de las expansinas y la solubilización

La actividad mediada por expansinas da como resultado la reducción de la tensión entre polisacáridos al interior de matrices de la pared celular de plantas; y se ha evaluado a través de cinco métodos: 1) el aflojamiento de paredes celulares, 2) el debilitamiento de papel filtro, 3) la mejora sinérgica de la actividad de celulasas, 4) la unión a celulosa y paredes celulares y 5) midiendo la participación en la colonización bacteriana a tejidos de plantas o mediante la severidad de síntomas de infección¹⁵.

La función de solubilización de polisacáridos por parte de expansinas que exploramos en este trabajo ha sido demostrada en eventos fisiológicos como la penetración del tubo polínico y en la maduración de frutos, o en la colonización de microorganismos a tejidos de plantas^{16,28,60}. Durante la penetración del tubo polínico en *A. thaliana*, se expresan 4 genes de expansina en todo el carpelo y 2 en el polen.

Aunque se desconoce la función de estas expansinas, las expansinas de polen parecen participar en el aflojamiento activo de la pared celular de la zona de elongación del tubo polínico y en la penetración de éste al carpelo. En particular, la reducción de la expresión de *expb1* no parece generar alteraciones en la elongación, sino en la penetración del tubo polínico al carpelo^{17,86}, además, algunos de ellos se quedan adheridos unos con otros en las anteras. Los autores de este trabajo argumentan que este fenómeno es causado por la ausencia de la expansinas, que provoca cambios en la remodelación de la pared celular¹⁷ que conduce a alteraciones en las propiedades hidrodinámicas del tejido. Esto querría decir que más de una expansina es expresada en un mismo proceso y/o que las mismas expansinas pueden producir diferentes efectos debido a las características ambientales propias (pH, fuerza iónica, etc.) de cada región de la planta. Las propiedades electrostáticas podrían estar relacionadas con el o los tejidos sobre los que las expansinas actúan y repercuten en sus funciones.

Por otro lado, en microorganismos, existen ejemplos de mutantes de expansinas con capacidad disminuida para colonizar o penetrar las paredes celulares vegetales, que, en algunos casos, conducen a alteraciones en los síntomas de la infección. Sin embargo, el comportamiento no siempre es el mismo. El efecto de solubilización o liberación de polisacáridos de la matriz podría contribuir en la explicación de los fenotipos mencionados, ya que en el caso de *Pectobacterium atrosepticum* y *Erwinia tracheiphyla*, existe una clara correlación entre menor invasividad a partir del sitio de inoculación de las bacterias en los hospederos con una menor virulencia. Interesantemente, las expansinas de estos dos organismos, que tienen al xilema como nicho de alojamiento dentro de sus hospederos, son 76% idénticas en secuencia, por lo que se esperaría que su función biológica fuera la misma o muy parecida. De forma similar a los defectos provocados por la falta de EXPB1 en maíz, en *P. atrosepticum* la ausencia del gen *Exl1* tiene defectos en la movilidad de la célula bacteriana al interior del tejido de la planta hospedera y en especial de la lámina media de los vasos del xilema y las células circundantes¹³. En apoyo a esto, Dotto y colaboradores (2008) sugieren que hay solubilización de pectinas de la lámina media durante el ablandamiento de la fresa que está mediado por α -

expansinas (*FaEXP2* y *FaEXP5*). La disminución de la expresión de ciertas expansinas en plantas provoca que sus frutos sean más firmes, mientras que su sobre-expresión acelera la maduración²⁸.

En bacterias de vida libre como las mixobacterias, así como en amebas (Figura 4), es probable que, además de su función como degradadoras de la biomasa vegetal, sus expansinas también participen en el mantenimiento y/o remodelación de los exopolisacáridos que sostienen la forma de vida social, como lo sugiere la afectación en el *swarming* (una forma de movimiento social) para la bacteria fitopatógena *P. atrosepticum* ante la falta de *Exl1*¹³. En la ameba *Dictyostelium discoideum*, dos de los seis genes que codifican para expansinas, se expresan durante la formación de la estructura multicelular: a) Inicialmente *ExpL3* se requiere para la migración de las células sobre matrices de mucopolisacáridos; su sobreexpresión provoca un fenotipo hipermótil; b) Posteriormente, *ExpL6* participa en la formación del tallo que está recubierto por una matriz rica en celulosa^{48,87}. Además, en este organismo ocurre un proceso de desecación de esporas que requieren la modificación de la matriz de polisacáridos extracelulares (como sucede en el polen de maíz), por lo que es probable que alguna de las expansinas de *Dictyostelium discoideum* intervengan en ese proceso^{17,48}.

Por su parte, la presencia de expansinas en bacterias como *Mixococcus xanthus*, una bacteria depredadora y no consumidora de material lignocelulósico, sugiere que podrían estar relacionadas con la movilidad⁸⁸. Pensamos que en *Sorangium cellulosum*, que posee dos genes de expansina, la proteína *SocExl1-CBM* (que está fusionada a un *CBM* a través del *PSL*, y que fue objeto de este estudio) podría ser activa durante la degradación de material lignocelulósico, que es fuente de carbono y energía para esta bacteria, particularmente la celulosa. Proteínas con estructuras modulares similares en eucariontes, incluyendo hongos saprófitos, son extracelulares y se especializan en la degradación de matrices complejas de polisacáridos³⁴. La segunda expansina (*SocExl2*) de *S. cellulosum*, está compuesta únicamente por el módulo canónico de expansinas. La actividad de esta expansina podría estar relacionada con eventos de movilidad bacteriana o en la formación del cuerpo fructífero. Adicionalmente, tanto *M. xanthus* como *S.*

cellulosum poseen sistemas de regulación por *quorum sensing*⁸⁹, y como fue demostrado en *P. atrosepticum* o *P. brasiliense*, su expansina está regulada por este sistema⁷⁰. Este también pudiera ser el caso de los genes de expansina en estas bacterias. Sería interesante investigar si las expansinas de estos organismos son expresadas bajo condiciones particulares de su desarrollo.

En su conjunto, la evidencia proporcionada amplia nuestro entendimiento sobre la función de las expansinas, no sólo como proteínas que permiten el crecimiento de las paredes celulares en plantas, sino también como proteínas que intervienen en la interacción entre células delimitadas o separadas por matrices de polisacáridos, ya sea para la adherencia entre las células de un tejido, para la penetración de los patógenos a sus hospederos vegetales, o bien, para su movimiento al interior del hospedero para arribar al sitio blanco. A nivel molecular, el mecanismo de estas proteínas pudiera ser la de reducir las interacciones entre polisacáridos al unirse a regiones *hotspot* que en ciertas circunstancias resulta en la solubilización de elementos que están pobremente unidos, lo que lleva a un aflojamiento de las estructuras. Aunque, otros trabajos sugieren que el mecanismo tiene que ver con la interacción de las expansinas y los polisacáridos de las propias células de bacterias al colocarse entre fases a manera de un surfactante^{40,55,90}, recubriendo las paredes de células evitando que éstas se adhieran a otras superficies y promoviendo la movilidad (DeSandozequi-Mijares, comunicación directa); o separando entre fases al interior de la matriz de polisacáridos. Esta propuesta surge de la actividad sinérgica de celulasa con *BsEXLX1*, ya que la expansina tiene propiedades anfifílicas similares a algunos surfactantes no iónicos, y es capaz de unirse a la lignina evitando que las enzimas hidrolíticas interactúen con esta región no productiva, y beneficiando las uniones productivas. Esta propuesta concuerda con el hecho de que la actividad sinérgica sucede cuando están en la misma incubación celulasa y expansina^{62,91}.

Para entender mejor el rol de expansinas en microorganismos, es importante conocer: i) qué tipo de polisacáridos son relevantes para cada uno de ellos en el contexto en el que habitan; ii) considerar la probable interacción de las proteínas tanto con los exopolisacáridos de las células que las expresan y secretan, y/o las

matrices externas sobre las que las células interactúan; iii) el mecanismo por el que invaden o penetran en el hospedero (heridas, aberturas naturales, etc.); iv) el contexto fisiológico en que los organismos producen expansinas; y finalmente, v) el sitio en el que las células se establecen. Por lo tanto, es necesario el análisis de estas proteínas desde diferentes enfoques.

11. Conclusiones

- Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la solubilización de polisacáridos con sustituyentes fenólicos por parte de la expansina ExI1 de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium brasiliense*, una proteína ácida, en condiciones de pH no menores a 5, mejora en presencia de DTT. El mismo efecto ocurrió al tratar los sustratos con la expansina modular ExI1-CBM de la mixobacteria *Sorangium cellulosum* a pH ácido y neutro.
- La actividad de SocExI1-CBM aumentó cuando le fue eliminado el CBM, y ésta fue mayor a pH básico.
- EXLX1 de la bacteria promotora del crecimiento radicular *Bacillus subtilis*, una proteína básica, no generó señal de solubilización a pH neutro, aunque no sabemos lo que sucede a otro pH.
- Aunque se obtuvieron perfiles absorbancia por la interacción de la proteína BSA con tejido EEM, la señal obtenida no muestra un pico de absorbancia a 300 nm, a diferencia de las señales provocadas por las expansinas arriba mencionadas.
- Nuestros datos indican que la actividad de solubilización del sustrato provocado por la acción de las expansinas es inversamente proporcional a su unión. Aunque reconocemos que se necesitan más experimentos para comprobar esta relación.

12. Perspectivas

- Utilizar feruloil esterasa como control de la liberación de ácidos ferúlicos del tejido.
- Realizar análisis de sinergismo, utilizando enzimas hidrolíticas de polisacáridos de xilano y otras hemicelulasas, tanto sobre el tejido EEM después de incubaciones con expansina, como con el sobrenadante de las incubaciones.
- Evaluar el grado de liberación de moléculas al medio en presencia de iones divalentes o altas concentraciones de sales, diferentes cantidades de proteínas, diferentes temperaturas y velocidad de agitación.
- Evaluar el grado de liberación de moléculas al medio a pH ácido provocado por la acción de *PcEx1*.
- Continuar con la determinación del efecto para *BsEXLX1* a diferentes valores de pH.
- Utilizar CaCl_2 en el análisis de unión de *SocExlx1*-CBM a tejido EEM, para determinar si la unión está mediada por cargas.
- Realizar análisis de cuantificación de azúcares totales sobre los sobrenadantes resultado de las incubaciones con *PcEx1*, *BsEXLX1* y BSA.
- Escalar las reacciones de solubilización para realizar extracciones de ácido ferúlico.
- Probar métodos de determinación de la identidad de las moléculas liberadas más sensibles, proponemos HPLC.
- Extraer ácidos ferúlicos de tejido vegetal de *A. thaliana* antes y después de una infiltración de *PcEx1*.
- Caracterizar estructuralmente a la proteína *SocExlx1*-CBM y a la variante *SocPSL-Exlx1*.
- Infiltrar a los polisacáridos solubilizados en tejido de maíz (probablemente hojas) y observar la respuesta inmune de la planta.
- Realizar estudios de dinámica molecular de la variante *SocPSL-Exlx1* para determinar el comportamiento de la secuencia conectora de poli-serinas.

- Realizar comparaciones de la estructura y propiedades de carga en la superficie de expansinas de microorganismos con diferentes tejidos blanco de infección/colonización, o distintos modos de infección o, en expansinas de plantas que sean utilizadas en eventos y lugares distintos. Como las expansinas utilizadas en el contexto del arribo y penetración del tubo polínico en *A. thaliana* y *Zea mays*, incluyendo un análisis de las características de las paredes celulares del carpelo y del grano de polen en ambas especies.

13. Referencias

1. Wei H, Xu Q, Taylor LE, Baker JO, Tucker MP, Ding SY. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(3):330-338. doi:10.1016/j.copbio.2009.05.008
2. Waldron KW, Parker ML, Smith AC. Plant Cell Walls and Food Quality. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2003;2(4):128-146. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00019.x
3. Zablackis E, Huang J, Müllerz B, Darvill AC, Albersheim P. Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of Leaves, Arabidopsis. 1990;20115(Xxxix).
4. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol.* 2015;29:108-119. doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.018
5. Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014;33. doi:10.1016/j.rser.2014.01.077
6. Cantarel BI, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 1):233-238. doi:10.1093/nar/gkn663
7. Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 2005;6(12):242. doi:10.1186/gb-2005-6-12-242
8. Nikolaidis N, Doran N, Cosgrove DJ. Plant expansins in bacteria and fungi: Evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Mol Biol Evol.* 2014;31(2):376-386. doi:10.1093/molbev/mst206
9. Sampedro J, Guttman M, Li LC, Cosgrove DJ. Evolutionary divergence of ??-expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits. *Plant J.* 2015;81(1):108-120. doi:10.1111/tpj.12715
10. Li L, Bedinger PA, Volk C, Jones AD, Cosgrove DJ. Purification and Characterization of Four α -Expansins (*Zea m 1* Isoforms) from Maize Pollen 1 [w]. 2003;132(August):2073-2085. doi:10.1104/pp.103.020024.activity

11. Mohanty SK, Arthikala MK, Nanjareddy K, Lara M. Plant-symbiont interactions: the functional role of expansins. *Symbiosis*. 2018. doi:10.1007/s13199-017-0501-8
12. Martinez-Anaya C. Understanding the structure and function of bacterial expansins: a prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. *Microb Biotechnol*. 2016;9(6):727-736. doi:10.1111/1751-7915.12377
13. Narváez-barragán DA, Tovar-herrera OE, Torres M, et al. Expansin-like Exl1 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection , and induces a defence plant response involving ROS , and jasmonate , ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. 2020:1-14. doi:10.1038/s41598-020-64529-9
14. Tancos MA, Lowe-Power TM, Peritore-Galve FC, Tran TM, Allen C, Smart CD. Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(5). doi:10.1111/mpp.12611
15. Cosgrove DJ. Microbial Expansins. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71(1):479-497. doi:10.1146/annurev-micro-090816-093315
16. Tovar-Herrera OE, Rodríguez M, Olarte-Lozano M, et al. Analysis of the Binding of Expansin Exl1, from *Pectobacterium carotovorum*, to Plant Xylem and Comparison to EXLX1 from *Bacillus subtilis*. *ACS Omega*. 2018;3(6):7008-7018. doi:10.1021/acsomega.8b00406
17. Valdivia ER, Stephenson AG, Durachko DM, Cosgrove D. Class B β -expansins are needed for pollen separation and stigma penetration. *Sex Plant Reprod*. 2009;22(3):141-152. doi:10.1007/s00497-009-0099-y
18. Salazar-Cortés JJ. Clonación , expresión y caracterización de la interacción de materiales celulósicos de la expansina modular Exlx1-CBM de *Sorangium cellulosum* y cuatro variantes. *Tesis del Sist Bibl la UNAM*. 2019.
19. Hocq L, Pelloux J, Lefebvre V, Höfte H, Voxeur A. Plant cell walls. *Curr Biol*. 2017;27(17):R865-R870. doi:10.1016/j.cub.2017.05.025
20. Busse-Wicher M, Grantham NJ, Lyczakowski JJ, Nikolovski N, Dupree P. Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(1):74-78. doi:10.1042/BST20150183
21. Ebringerová A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol Symp*. 2006;232(333):1-12. doi:10.1002/masy.200551401
22. Cosgrove DJ. Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp Bot*. 2016;67(2):463-476. doi:10.1093/jxb/erv511
23. Paul EA. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. London Elsevir ; Academic press, 2015; 2015.
<http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=catt02025a&AN=lib.MX001001707728&lang=es&site=eds-live>.
24. Álvarez Arriaga ME. Evaluación de residuos de tamarindo como fuente de carbono para la producción de enzimas por cepas de *Aspergillus*. 2005.

25. Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2004;24(2-3):59-83. doi:10.1080/07388550490491467
26. Chen Y. Biochemical Characterization of Hydroxyproline-rich Glycoproteins in the Arabidopsis Root Cell Wall Biochemical Characterization of Hydroxyproline-rich Glycoproteins in the the faculty of the College of Arts and Sciences of Ohio University In partial fulf. 2018;(June).
27. Fry SC. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *New York.* 1988;203:333. doi:10.1111/j.1469-8137.2003.00980.x
28. Dotto M. Participación de expansinas en el ablandamiento de frutilla: regulación hormonal, expresión en distintas variedades y efecto de la aplicación de tratamientos físicos. 2008.
29. Niño-Medina G, Carvajal-Millan E, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA, Guerrero V, Salas-Muñoz E. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochem Rev.* 2010;9(1):111-120. doi:10.1007/s11101-009-9147-3
30. Gerth K, Müller R. *Sorangium cellulosum* 19. 2008.
31. Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels.* 2013;6(1):1. doi:10.1186/1754-6834-6-41
32. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* 2004;382(3):769-781. doi:10.1042/BJ20040892
33. Sammond DW, Payne CM, Brunecky R, Himmel ME, Crowley MF, Beckham GT. Cellulase Linkers Are Optimized Based on Domain Type and Function: Insights from Sequence Analysis, Biophysical Measurements, and Molecular Simulation. *PLoS One.* 2012;7(11):e48615. doi:10.1371/journal.pone.0048615
34. Howard MB, Ekborg N a, Taylor LE, Hutcheson SW, Weiner RM. Identification and analysis of polyserine linker domains in prokaryotic proteins with emphasis on the marine bacterium *Microbulbifer degradans*. *Protein Sci.* 2004;13(5):1422-1425. doi:10.1110/ps.03511604
35. Van Rosmalen M, Krom M, Merckx M. Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers to Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry.* 2017;56(50):6565-6574. doi:10.1021/acs.biochem.7b00902
36. Gourlay K, Arantes V, Saddler JN. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Biofuels.* 2012;5:1-14. doi:10.1186/1754-6834-5-51
37. Li Y, Darley CP, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, Mcqueen-mason SJ. Plant Expansins Are a Complex Multigene Family with an Ancient Evolutionary Origin 1. 2020:854-864. doi:10.1104/pp.010658.854
38. Mendoza-Núñez MA. Caracterización de una expansina de *Pectobacterium*

- carotovorum PcEXL1. 2014.
39. Silveira RL, Skaf MS. Molecular dynamics of the Bacillus subtilis expansin EXLX1: Interaction with substrates and structural basis of the lack of activity of mutants. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(5):3510-3521. doi:10.1039/c5cp06674c
 40. Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Research*. 2016;5(0):1-13. doi:10.12688/f1000research.7180.1
 41. Pastor N, Dávila S, Pérez-Rueda E, Segovia L, Martínez-Anaya C. Electrostatic analysis of bacterial expansins. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2015;83(2):215-223. doi:10.1002/prot.24718
 42. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(9):3807-3823. doi:10.1007/s00253-015-6534-0
 43. Wang T, Chen Y, Tabuchi A, Cosgrove DJ, Hong M. The Target of β -Expansin EXPB1 in Maize Cell Walls from Binding and Solid-State NMR Studies. *Plant Physiol*. 2016;172(4):2107-2119. doi:10.1104/pp.16.01311
 44. McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol*. 1995;107(1):87-100. doi:10.1104/pp.107.1.87
 45. Cosgrove DJ. Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;25:162-172. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.014
 46. Georgelis N, Tabuchi A, Nikolaiis N, Cosgrove DJ. Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *J Biol Chem*. 2011;286(19):16814-16823. doi:10.1074/jbc.M111.225037
 47. Schots A, Smant G, Bakker J, Helder J. Plant degradation A nematode expansin. 2004;427(January):2004.
 48. Kawata T, Nakamura Y, Saga Y, et al. Implications of expansin-like 3 gene in Dictyostelium morphogenesis. ??? 2015. doi:10.1186/s40064-015-0964-0
 49. Artzi L, Morag E, Shamshoum M, Bayer EA. Cellulosomal expansin: Functionality and incorporation into the complex. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(1). doi:10.1186/s13068-016-0474-5
 50. Olarte Lozano M. Efecto de la diferencia de potencial electrostático y de dominios estructurales en la actividad y unión de expansinas bacterianas. 2016.
 51. Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydr Polym*. 2014;100:17-23. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.094
 52. Olarte-Lozano M, Mendoza-Nuñez MA, Pastor N, Segovia L, Folch-Mallol J, Martínez-Anaya C. PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen Pectobacterium carotovorum, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS One*. 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0095638
 53. Kerff F, Amoroso A, Herman R, et al. Crystal structure and activity of Bacillus

- subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(44):16876-16881. doi:10.1073/pnas.0809382105
54. Bunternngsook B, Eurwilaichitr L, Thamchaipenet A, Champreda V. Binding characteristics and synergistic effects of bacterial expansins on cellulosic and hemicellulosic substrates. *Bioresour Technol*. 2015;176. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.042
 55. Orłowski A, Artzi L, Cazade PA, Gunnoo M, Bayer EA, Thompson D. On the distinct binding modes of expansin and carbohydrate-binding module proteins on crystalline and nanofibrous cellulose: Implications for cellulose degradation by designer cellulosomes. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(12):8278-8293. doi:10.1039/c7cp07764e
 56. Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R. The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2000;13(7):703-714. doi:10.1094/MPMI.2000.13.7.703
 57. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol*. 2008;147(2):779-789. doi:10.1104/pp.108.116293
 58. Vorhölter FJ, Wiggerich HG, Scheidle H, et al. Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. *BMC Microbiol*. 2012;12. doi:10.1186/1471-2180-12-239
 59. Fry SC. Phenolic components of the primary cell wall. *Biochem J*. 1982;203:493-504. doi:10.1042/bj2030493
 60. Tabuchi A, Li LC, Cosgrove DJ. Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant J*. 2011;68(3):546-559. doi:10.1111/j.1365-3113X.2011.04705.x
 61. Walker JA, Takasuka TE, Deng K, et al. Multifunctional cellulase catalysis targeted by fusion to different carbohydrate-binding modules. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8(1):220. doi:10.1186/s13068-015-0402-0
 62. Gourlay K, Hu J, Arantes V, et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresour Technol*. 2013;142:498-503. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.053
 63. P. Darley C, M. Forrester A, J. Mcqueen-Mason S. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol*. 2001;47(1-2):179-195. doi:10.1023/A:1010687600670
 64. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):40. doi:10.1186/1471-2105-9-40
 65. Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, et al. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(SUPPL.2):522-525. doi:10.1093/nar/gkm276
 66. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*.

1996;14:33-38.

67. Gaete-Eastman C, Morales-Quintana L, Herrera R, Moya-León MA. In-silico analysis of the structure and binding site features of an α -expansin protein from mountain papaya fruit (VpEXPA2), through molecular modeling, docking, and dynamics simulation studies. *J Mol Model*. 2015;21(5). doi:10.1007/s00894-015-2656-7
68. Yennawar NH, Li AC, Dudzinski DM, Tabuchi A, Cosgrove DJ. Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(40):14664-14671. doi:10.1073/pnas.0605979103
69. Hepler NK, Cosgrove DJ. Directed in vitro evolution of bacterial expansin BsEXLX1 for higher cellulose binding and its consequences for plant cell wall-loosening activities. *FEBS Lett*. 2019;593(18):2545-2555. doi:10.1002/1873-3468.13528
70. Narváez-barragán DA, Sandozequi A De, Rodríguez M, Estrada K, Tovar-herrera OE, Martínez-anaya C. Analysis of two Mexican *Pectobacterium brasiliense* strains reveals an inverted relationship between c-di-GMP levels with exopolysaccharide production and swarming motility. *Microbiol Res*. 2020;235(October 2019):126427. doi:10.1016/j.micres.2020.126427
71. Healthcare G. Affinity Chromatography Vol.2 Tagged Proteins. *GE Heal Handbooks*. 2016;2(2):10.
72. Ruiz DM, Turowski VR, Murakami MT. Effects of the linker region on the structure and function of modular GH5 cellulases. *Sci Rep*. 2016. doi:10.1038/srep28504
73. SKlein J, Jiang S, PGalimidi R, RKeeffe J, JBjorkman P. Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities. doi:10.1093/protein/gzu043
74. Payne CM, Resch MG, Chen L, et al. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(36):14646-14651. doi:10.1073/pnas.1309106110
75. Wang T, Park YB, Caporini MA, et al. Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16444-16449. doi:10.1073/pnas.1316290110
76. Li LC, Bedinger PA, Volk C, Jones AD, Cosgrove DJ. Purification and characterization of four β -expansins (Zea m 1 isoforms) from maize pollen. *Plant Physiol*. 2003;132(4):2073-2085. doi:10.1104/pp.103.020024
77. Hocq L, Pelloux J, Lefebvre V. Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends Plant Sci*. 2017;22(1):20-29. doi:10.1016/j.tplants.2016.10.009
78. Ishii T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. 1997;127:111-127.
79. Badino SF, Bathke JK, Sørensen TH, et al. The influence of different linker modifications on the catalytic activity and cellulose affinity of cellobiohydrolase Cel7A from *Hypocrea jecorina*. *Protein Eng Des Sel*. 2017;30(7). doi:10.1093/protein/gzx036

80. Beckham GT, Bomble YJ, Matthews JF, et al. The O-Glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. *Biophys J*. 2010;99(11):3773-3781. doi:10.1016/j.bpj.2010.10.032
81. Georgelis N, Yennawar NH, Cosgrove DJ. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(37):14830-14835. doi:10.1073/pnas.1213200109
82. Konigsberg W. Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol. 1964;11(2):185-188.
83. Harris PJ, Trethewey JAK. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochem Rev*. 2010;9(1):19-33. doi:10.1007/s11101-009-9146-4
84. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268-3295. doi:10.1002/jssc.200700261
85. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*. 2003;51(10):2866-2887. doi:10.1021/jf026182t
86. Mollet J-C, Leroux C, Dardelle F, Lehner A. *Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth*. Vol 2.; 2013. doi:10.3390/plants2010107
87. Amoeba AS. Dictyostelium discoideum , una ameba peculiar. *Treballs la Soc Catalana Biol*. 2011;0(0):61-78. doi:10.2436/20.1501.02.104
88. Muñoz-Dorado J, Marcos-Torres FJ, García-Bravo E, Moraleta-Muñoz A, Pérez J. Myxobacteria: Moving, killing, feeding, and surviving together. *Front Microbiol*. 2016;7(MAY):1-18. doi:10.3389/fmicb.2016.00781
89. Findlay BL. The Chemical Ecology of Predatory Soil Bacteria. *ACS Chem Biol*. 2016;11(6):1502-1510. doi:10.1021/acscchembio.6b00176
90. Quiroz-Castañeda RE, Folch-Mallol JL. Plant Cell wall degrading and remodeling proteins: Current perspectives. *Proteínas que Remodel y Degrad la pared Cel Veg Perspect actuales*. 2011;28(4):194-215. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857675707&partnerID=40&md5=73d6562cf1dc2d9692617f429d9150c5>.
91. Su R, Ma Y, Qi W, et al. Real-time adsorption and action of expansin on cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11(1):1-13. doi:10.1186/s13068-018-1318-2