



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIOR IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Purificación e identificación de una peroxidasa catiónica con actividad auxina-oxidasa, obtenida de tallos de *Solanum lycopersicum* L.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**DANIEL CABRERA SANTOS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO, FES-IZTACALA, UNAM  
COMITÉ TUTOR: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ, FES-IZTACALA, UNAM  
Dra. PATRICIA GUEVARA FEFER, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIOR IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Purificación e identificación de una peroxidasa catiónica con actividad auxina-oxidasa, obtenida de tallos de *Solanum lycopersicum* L.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**DANIEL CABRERA SANTOS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO, FES-IZTACALA, UNAM  
COMITÉ TUTOR: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ, FES-IZTACALA, UNAM  
Dra. PATRICIA GUEVARA FEFER, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2016



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de marzo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CABRERA SANTOS DANIEL**, con número de cuenta **302065101**, con la tesis titulada **"PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA PEROXIDASA CATIONICA CON ACTIVIDAD AUXINA-OXIDASA, OBTENIDA DE TALLOS DE *Solanum lycopersicum* L."**, realizada bajo la dirección del **DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO**:

Presidente: DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA  
Vocal: M. EN C. JOSEFINA VÁZQUEZ MEDRANO  
Secretario: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ  
Suplente: DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ  
Suplente: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de mayo de 2016.



*M. del Coro Arizmendi*

DR. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos:**

---

Le agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, así mismo agradezco a sus directivos y personal académico por todo el apoyo durante este proceso.

Agradezco al CONACYT por el apoyo mediante la beca otorgada, también agradezco al COMECYT por brindarme la beca con folio 15BTIIM0092 para tesis de posgrado.

Le agradezco profundamente a mi tutor Dr. Ignacio Peñalosa Castro por todo su apoyo durante mi formación, sus consejos, charlas y por su forma de transmitir el conocimiento. De igual manera agradezco al resto de mi comité tutorial: Dr. Patricia Guevara Fefer, le agradezco sus consejos y gentileza, Dr. César Mateo Ortiz Flores, le agradezco su amistad y consejo.

## Agradecimientos personales:

---

Llegando a este punto no se que decir, ni como decirlo: comencare por agradecer a mi familia: a mis padres Irene y Juan; a mis hermanos y sus esposas: Joaquín, Ernesto y Zule, Toño e Hilda; a mis sobrinas: Ale y Jimena. Los amo con todo mi corazón.

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado: Dr. Victor Manuel Chávez Ávila, M. en C. Josefina Vázquez Medrano, Dr. César Mateo Ortíz Flores, Dr. Enrique García Hernández y al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, gracias a todos por todo su apoyo durante el proyecto, por sus consejos y sugerencias, les agradezco enormemente su humildad y les reitero mi admiración y respeto.

No creo que baste con una palabra, solo quiero que sepan que fueron mi apoyo y mi familia durante el tiempo que trabaje en el laboratorio:

Maestra Josefina: Muchas gracias, su apoyo incondicional fue de vital importancia, gracias por sus consejos.

Anabel: Gracias por tu amistad y apoyo, deseo que tengas una vida feliz y que logres todo por lo que has trabajado tan duro.

Dr. Peñalosa: Gracias por darme la oportunidad de ser su alumno y sobre todo por ser una persona tan agradable y humilde.

Dr. Cesar: Muchas gracias por su amistad, gracias por su apoyo y por confiar en mi.

Dra. Pati: Muchas gracias por compartir su vibra conmigo, gracias por su amistad y por su guía.

Dr. Jorge Campos: Gracias por todo su apoyo durante el proyecto, aprecio mucho su amistad y sus consejos.

Maestro Rafa y Dr. Elías: Gracias por su amistad, por sus charlas, su vibra.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal: Gracias por soportarme.

A mis amigos: Gracias a todos los viejos y nuevos. Saúl, José Luis, Ismael, Iram, Monserrat, Fabián, Ana, Salma (y todos los que me faltan, muchas gracias).

Karen: Gracias por ser mi apoyo durante este tiempo y sobre todo por aguantar mi forma de ser. Mereces lo que sueñas.

A la música, artes y cultura popular: jimi Hendrix, Frank Zappa, Stevie Wonder, Miles Davies, Charles Mingus, The Velvet Underground, Led Zeppelin, Tool, Bob Marley, RHCP, BRMC, AC/DC, Muddy Waters, John Lee Hooker, Black Sabbath, Burning Spear, Beastie Boys, Daft Punk, Dj Shadow, Flying Lotus, Thundercat, Funkadelic/Parliament, Gustavo Cerati, James Brown, Nas, Jamiroquai, Portishead, Massive Attack, QOTSA, Radiohead, RATM, The Mars Volta, The Stooges, Tom Waits, Underworld, Wilco, Wu-Tang Clan, Beck y Bjork. Alex Grey, Luis Buñuel, Quentin Tarantino, Jodorowsky, van Gogh. A los Simpsons y Matt Groening, South Park, Nintendo, a los tatuajes y tatuadores.

A la literatura universal: Goethe, Hesse, Schopenhauer, Nietzsche, Baudelaire, Sartre, Paz, Swami Vivekananda, Poe, Tolstoi, Chejov, Dostoyevski y a todos los que no dejaron nada escrito.

A buda y a todos los despiertos, a la reflexión, al sufrimiento, a la duda, a la razón, a las drogas psicodélicas, a Sócrates y a todos los superhombres, a los pueblos indigenas y a las culturas de todo el mundo, a los Marxistas-Leninistas, a la conciencia única, a la fuente de vibración infinita, a la ciencia y a la vida.

Muchas Gracias.

<b>Tabla de contenido</b>	
<b>Lista de Figuras</b>	<b>1</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
Fundamentos Teóricos	6
Desarrollo vegetal y fitohormonas	6
Auxinas	7
Características generales de las auxinas y homeostasis auxínica	8
Biosíntesis y metabolismo de auxinas	9
Síntesis de AIA dependiente de triptófano	10
Síntesis de AIA independiente de triptófano	11
Transporte de auxinas	13
Formación de conjugados e inactivación auxínica	15
Catabolismo de auxinas	17
Percepción de la señal auxínica y procesos regulados por auxinas	18
Generalidades sobre peroxidasas	22
Peroxidasas no animales	23
Descripción y clasificación	23
Clase I: Peroxidasas de procedencia procariota	23
Clase II: Peroxidasas fúngicas	24
Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas	24
Peroxidasas de clase III: Peroxidasas de secreción en plantas	24
Generalidades sobre peroxidasas de Clase III	24
Ciclos catalíticos	28
Ciclo peroxidativo	28
Papel de los residuos del bolsillo hemo en la catálisis del peróxido y la formación de Compuesto I	29
Sitios de interacción con el sustrato y reducción de Compuesto I y II y elementos estructurales del sitio activo que determinan la interacción con el sustrato	31
Consumo de oxígeno molecular por Prx CIII	32
Ciclo hidroxílico: Mecanismo de producción de ROS por peroxidasas de clase III	33
Procesos fisiológicos mediados por peroxidasas	35
Proteoma de la pared celular: peroxidasas de secreción como componente ubicuo y abundante	37
<b>Planteamiento, hipótesis y objetivos</b>	<b>38</b>
Planteamiento del problema	38
Hipótesis	39
Objetivos	40
Generales	40
Específicos	40
<b>Materiales y métodos</b>	<b>41</b>
Material vegetal y condiciones de crecimiento	41
Enraizamiento adventicio	41
Extracción de peroxidasas, precipitación de proteínas y cuantificación proteica	41
Ensayos electroforéticos	42
1 <sup>er</sup> método (Aislamiento por escisión de banda catiónica desde PAGE horizontal)	43
2 <sup>do</sup> método (Aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica)	43
3 <sup>er</sup> método (Aislamiento por medio de resinas de intercambio iónico)	44
Separación de peroxidasas catiónicas por medio de resina de intercambio iónico	44
Columna de intercambio ionico	44
Electroforesis en dos dimensiones (2-D)	44

4 <sup>to</sup> método (Aislamiento por medio de resina de intercambio catiónico)	45
Separación de peroxidasas catiónicas por medio de zeolita hidrofóbica	45
Extracción de proteínas de pared	45
Columna de intercambio catiónico	46
Electroforesis en 2-D	46
Secuenciación <i>de novo</i>	46
Análisis in silico	47
<b>Resultados y discusión</b>	<b>50</b>
1 <sup>er</sup> método (Aislamiento por escisión de banda catiónica desde PAGE horizontal)	51
Actividad de peroxidasa y AIA oxidasa	51
Patrones enzimáticos	51
Aislamiento y purificación de peroxidasa catiónica	52
Electroforesis en 2-D	52
2 <sup>do</sup> método (Aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica)	53
Patrones enzimáticos de las fracciones apoplásticas soluble e insoluble al día seis y cero durante el proceso de enraizamiento adventicio	53
Separación de peroxidasas catiónicas con zeolita hidrofóbica	55
3 <sup>er</sup> método (Aislamiento por medio de resinas de intercambio iónico)	56
Separación de peroxidasas catiónicas por medio de resinas de intercambio iónico	57
4 <sup>to</sup> método (Aislamiento por medio de resina de intercambio catiónico)	58
Separación de peroxidasas catiónicas por medio de zeolita hidrofóbica	58
Extracción de proteínas de pared	60
Columna de intercambio catiónico	63
Electroforesis en 2-D	66
Análisis in silico	68
<b>Conclusiones</b>	<b>76</b>
<b>Implicaciones y usos prácticos</b>	<b>76</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>78</b>
<b>Anexos</b>	<b>100</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Modelo de acción de hormonas vegetales como reguladores de la expresión génica.....	7
Figura 2: Auxinas que ocurren naturalmente en plantas y algunos ejemplos de conjugados de bajo peso molecular.....	8
Figura 3: Homeostasis auxínica.....	9
Figura 4: Diagrama de las interacciones metabólicas y de señalización conocidas hasta la fecha implicadas en mantener la homeostasis auxínica.....	10
Figura 5: Potenciales rutas de biosíntesis de AIA en <i>Arabidopsis</i> .....	12
Figura 6: Modelo quimiosmótico de transporte polar de auxinas.....	13
Figura 7: Representación esquemática de patrones de proteínas PINs y de auxinas en diferentes tejidos vegetales.....	14
Figura 8: Representación esquemática de las mayores corrientes auxínicas.....	14
Figura 9: Rutas potenciales del metabolismo de AIA.....	16
Figura 10: Proceso de descarboxilación oxidativa catalizado por peroxidasa.....	18
Figura 11: Ruta de señalización auxínica y representación de los cuatro dominios conservados de los represores Aux/IAA.....	19
Figura 12: Patrones de distribución auxínica durante el desarrollo de <i>Arabidopsis</i> .....	21
Figura 13: Cambios cuantitativos en la actividad total de peroxidasa durante el enraizamiento adventicio.....	22
Figura 14: Superfamilia de peroxidasa con grupo hemo.....	23
Figura 15: Esquema estructural de una peroxidasa de clase III.....	26
Figura 16: Estructura de una Peroxidasa.....	27
Figura 17: Representación esquemática la estructura tridimensional de una peroxidasa de cacahuete (Schuller <i>et al.</i> , 1996) obtenida por cristalografía de rayos X.....	28
Figura 18: Residuos de aminoácido en el bolsillo del grupo hemo de una peroxidasa vegetal (peroxidasa de cacahuete).....	30
Figura 19: Puentes de Hidrógeno y moléculas de agua presentes alrededor del grupo hemo en la Lignina Peroxidasa.....	31
Figura 20: Mecanismo de reducción de los Comp. I y II de la HRP C con respecto al ácido ferúlico como sustrato reductor.....	32
Figura 21: Integración de los ciclos de las Prx CIII .....	35
Figura 22: Distribución de clases funcionales halladas en estudios proteómicos de pared celular.....	37
Figura 23: Dispositivo usado para la recuperación del líquido Infiltrante.....	42
Figura 24: Estrategias experimentales empleadas durante cada método de purificación.....	49
Figura 25: Zimogramas de actividad de peroxidasa (Prx) y Ácido indolacético oxidasa (AIA ox) .....	51
Figura 26: Zimogramas de actividad de peroxidasa que confirman la presencia de la banda catiónica con actividad de interés.....	51
Figura 27: Gel de actividad de peroxidasa y SDS-PAGE de las bandas escindidas .....	52
Figura 28: SDS-PAGE del IEF de la banda catiónica con mayor movilidad que presentó actividad de peroxidasa y AIA oxidasa escindida de los geles.....	53
Figura 29: Zimograma de actividad de peroxidasa.....	54
Figura 30: SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie .....	55
Figura 31: Zimogramas de ensayos con zeolita hidrofóbica.....	56
Figura 32: Zimogramas de los eluatos de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y Zeolita.....	56
Figura 33: Eluatos de la columna de intercambio aniónico .....	57
Figura 34: Eluatos columna de intercambio catiónico .....	57
Figura 35: SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie .....	58
Figura 36: PAGE horizontal de actividad de peroxidasa .....	59
Figura 37: PAGE de actividad AIA-oxidasa y Peroxidasa .....	61
Figura 38: SDS-PAGE.....	61
Figura 39: PAGE de actividad de AIA-oxidasa, muestras de extracciones de proteínas de pared con CaCl <sub>2</sub> y LiCl .....	62
Figura 40: SDS-PAGE, muestras de extracciones de proteínas de pared con CaCl <sub>2</sub> y LiCl .....	62

Figura 41: Eluatos obtenidos por medio de la columna de intercambio catiónico.....64

Figura 42: PAGE de actividad AIA-oxidasas y Peroxidasas de los eluatos obtenidos por medio de la columna de intercambio catiónico .....66

Figura 43: SDS-PAGE .....66

Figura 44: SDS-PAGE del IEF del cuarto eluato 0.2 M de NaCl.....67

Figura 45: Detección de dominios conservados.....69

Figura 46: Gráfica de las calificaciones obtenidas por el servidor SignalP 4.1 .....70

Figura 47: Estructura secundaria de LePrx16 usando a la peroxidasa recombinante de rábano C1A en complejo con ácido benzhidroxámico como estructura templete.....73

Figura 48: Potencial electrostático de LePrx16 usando a una peroxidasa catiónica de cacahuete (PDB ID: 1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) como estructura templete .....74

Figura 49: Residuos de Arginina del parche positivo .....74

Figura 50: Zonas hidrofóbicas presentes en la superficie molecular de LePrx16 usando a una peroxidasa catiónica de cacahuete (PDB ID: 1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) como estructura templete .....75

## Lista de Tablas

---

Tabla 1: Parámetros empleados durante la corrida del IEF. ....	45
Tabla 2: Parámetros de búsqueda de secuencias homólogas. ....	47
Tabla 3: Cantidades de tejido inicial y concentraciones de proteína obtenidas en el extracto inicial .....	50
Tabla 4: Concentraciones de proteína obtenidas en cada paso durante la separación de peroxidasas por medio de zeolita.....	58
Tabla 5: Concentraciones de proteína de los extractos con sales; se muestra la concentración obtenida en el último paso de la separación con zeolita con fines comparativos.....	60
Tabla 6: Datos de secuenciación obtenidos de la proteína obtenida .....	67
Tabla 7: Resultado de BLASTp contra la base de datos de Peroxibase .....	68
Tabla 8: Análisis de la composición de aminoácidos de LePrx16.....	69
Tabla 9: Características de los dominios conservados y número de aminoácidos implicados. ....	69
Tabla 10: Resultados de los valores obtenidos del análisis de la presencia del péptido señal en la secuencia de LePrx16 .....	71
Tabla 11: Calificaciones de los potenciales sitios de glicosilación obtenidos por el servidor GlycoEP. ....	72

## Resumen

---

Las peroxidasas (Prx) no animales son una familia de hemoproteínas que oxidan diversos sustratos a expensas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A ellas pertenecen las peroxidasas de clase III (Prx CIII) (EC 1.11.1.7), que son exclusivas de las plantas, en las que forman grandes familias multigénicas y se encuentran implicadas en un amplio número de eventos en el desarrollo vegetal. La heterogeneidad de isoformas (73 en *Arabidopsis thaliana* y en *Lycopersicon esculentum*) no es del todo entendida. Las isoperoxidasas de una especie dada pueden ser distinguidas por diferencias en sus puntos isoeléctricos y secuencias de aminoácidos.

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L., sinónimo de *Lycopersicon esculentum*) es una de las especies que por su importancia se han seleccionado para determinar su genoma, gracias a lo cual, se dispone de las secuencias completas de 71 genes de peroxidasas de clase III (Prx CIII), inferidas de los 73 identificados en su genoma. Aun cuando se supone que por la secuencia señal de secreción encontrada en estos genes, debieran ser localizadas en el apoplasto, no existe evidencia experimental de su aislamiento a partir de este compartimento. Por tanto, la base de datos que refiere a estas 73 isoenzimas sigue reportando la localización subcelular para todas ellas como no determinada y hasta la fecha no existe evidencia de su expresión, ya que no se ha identificado a ninguna de ellas a partir de la proteína obtenida de algún tejido del jitomate, así la evidencia de su existencia es indirecta, pues procede de la secuenciación de los genes en su genoma.

Distintos experimentos han dado evidencias acerca del papel de las peroxidasas extracelulares de plantas vasculares o Prx CIII, los cuales sugieren su implicación en el catabolismo del ácido-3-indolacético (AIA); hay controversia en cuanto a si las peroxidasas aniónicas o las catiónicas se encargan de promover el catabolismo de auxinas. Se ha reportado que hay un aumento en la actividad de isoperoxidasas catiónicas en las fases tempranas de la iniciación del enraizamiento adventicio, que demuestran una alta actividad de AIA oxidasa *in vitro*, sugiriendo una contribución al mayor potencial de actividad AIA oxidasa del tejido. Por otra parte, estudios filogenéticos muestran una mayor homología entre peroxidasas catiónicas de distintas especies que aquellas peroxidasas aniónicas encontradas dentro de la misma especie, sugiriendo un probable mecanismo más conservado para las isoperoxidasas catiónicas que es consistente con la importancia del control de los niveles de auxina en las plantas. A pesar de que los estudios sobre auxinas se extienden por más de 100 años, sorprendentemente no existen evidencias concluyentes de genes de peroxidasas asociados con el catabolismo de auxinas, a pesar de ello se piensa que las peroxidasas de clase III desarrollan esta función.

Aunque existen numerosos reportes realizados con respecto al papel de las peroxidasas, es poco el trabajo que se ha dirigido a la identificación y caracterización individual de peroxidasas específicas, desconociéndose si alguna de ellas participa en el catabolismo del AIA. Por este razón, el objetivo de este trabajo fue aislar y purificar una enzima catiónica, procedente de fracciones correspondientes a las porciones soluble e insoluble del apoplasto de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* L., con actividad de peroxidasa y probar su actividad AIA oxidasa durante el enraizamiento adventicio de los tallos, para finalmente identificarla comparando su secuencia de aminoácidos con las reportadas en las bases de datos bioinformáticas.

Las fracciones obtenidas a partir de muestras que fueron sometidas a enraizamiento adventicio durante 6 días, demostraron la presencia de una peroxidasa catiónica que presentó actividad de auxina oxidasa. Mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, la muestra que contenía una proteína de PM 45.9 kDa y un punto isoeléctrico de 8, fue identificada como LePrx16. Este es el primer reporte que presenta evidencia experimental de su existencia como proteína y de su localización tanto en las paredes celulares como en la fracción soluble del apoplasto de *S. lycopersicum*. Su capacidad de oxidar AIA *in vitro* fue demostrada, mientras que el análisis de su secuencia exhibió las características particulares de una peroxidasa de clase III.

## Abstract

---

Non-animal Peroxidases (Prx) are a family of haem-containing proteins. Its main function is the oxidation of a variety of substrates at the expense of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plant peroxidases often designated as class III peroxidases (Prx CIII) (EC 1.11.1.7) are exclusive plant enzymes, that form wide multigenic families. Plant peroxidases perform a variety of physiological functions during plant development. However, the diversity of isoenzymes (73 found in *Arabidopsis thaliana* and *Lycopersicon esculentum*), remains unknown. Differences between peroxidases could be distinguish by isoelectric points and amino acid sequences.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L., synonymous of *Lycopersicon esculentum*) is a one of the most important crops at global level. Due to this importance, tomato was chosen to determine its genome. That work provides the complete sequence of 71 of 73 class III peroxidase genes. Despite its assumed that the location of the enzymes is the apoplast, fact inferred by the secretion signal sequence found in Prx CIII genes, there is no experimental evidence about its isolation from that cell compartment. Therefore, the database about the 73 isoenzymes still report the subcellular location of every Prx CIII as no determined. Nowadays still missing evidence about its expression profiles, because it hasn't been isolated, and identified some of them as protein of tomato tissues, as a result, the evidence about its existence has been indirect, taken only from tomato gene sequences.

Different studies have given evidence about the role of Prx CIII in vascular plants, these works suggest their implication in indol-3-acetic acid (IAA) oxidation, a classical function attributed to Prx CIII. Controversy has been emerged about if the anionic or cationic peroxidases are involved in IAA catabolism. Some studies have been reported the increment of cationic peroxidase activity during earlier phases of adventitious rooting initiation, this studies indicate a high *in vitro* IAA-oxidase activity, suggesting a mayor contribution of cationic ones in IAA-oxidase potential of different tissues. On the other hand, phylogenetic surveys indicate a higher degree of homology between cationic isoperoxidases from different species than anionic peroxidases found in just one specie, suggesting a more conserved mechanism for cationic ones. Remarkably, despite the fact that auxin investigation extends for over 100 years, there's no concluding evidence about peroxidase genes associated with auxin catabolism, proposing the Prx CIII as the main actors in this role.

Despite numerous reports concerning the role of class III peroxidases, few work has been addressed to identify and characterize individual peroxidases, including those isoperoxidases involved in IAA oxidation. This work was aimed to purify and identify a cationic and apoplastic peroxidase with IAA oxidase activity from stems of *Solanum lycopersicum* L., during auxin-induce adventitious rooting, to proceed to identify the peroxidase by comparing their amino acid sequence with bioinformatic databases.

The initial fractions were obtained from samples which were subject to adventitious rooting and exhibited the presence of one cationic peroxidase with IAA-oxidase activity. Through liquid chromatography-mass spectrometry, the sample containing a protein with a molecular weight of 45.9 kDa and an isoelectric point of 8 was identified as LePrx16. This is the first report that shows experimental evidence about their existence as protein and their localization both in cell wall and in the apoplastic soluble fraction from *Solanum lycopersicum* L. Its capacity to oxidize IAA *in vitro* were demonstrated, while the analysis of their sequence exhibited particular features of a Prx CIII.

Las plantas muestran una enorme plasticidad genética, una tolerancia fisiológica aumentada, y una alta plasticidad fenotípica que les permite adaptar su estructura y optimizar su metabolismo a las demandas de ambientes específicos, utilizando su capacidad de realizar morfogénesis durante todo su desarrollo a partir de poblaciones de células troncales llamadas meristemos, cuyo centro organizador se divide infrecuentemente, manteniendo la capacidad para dar origen a todos los linajes celulares. La flexibilidad de desarrollo vegetal además de implicar a los meristemos también involucra otros eventos como la organogénesis *de novo*, una remarcable capacidad de regeneración y respuestas de crecimiento direccionales a estímulos externos (Davies, 2004; Tanaka *et al.*, 2006).

Al pensar en la plasticidad del desarrollo vegetal surgen preguntas cruciales sobre cómo los estímulos externos son traducidos en cambios de desarrollo específicos y como éstos son coordinados internamente. El hecho de que las células vegetales se encuentren restringidas espacialmente por la pared celular, obliga para su correcta diferenciación, desarrollo y crecimiento, a un fino control una compleja red de comunicación entre hormonas, factores de transcripción y pequeños péptidos que en conjunto sustentan los mecanismo moleculares que gobiernan dichos procesos. Más aún, también existe una vasta comunicación cruzada entre las diferentes hormonas y otras rutas de señalización que en última instancia, determinan las respuestas fisiológicas.

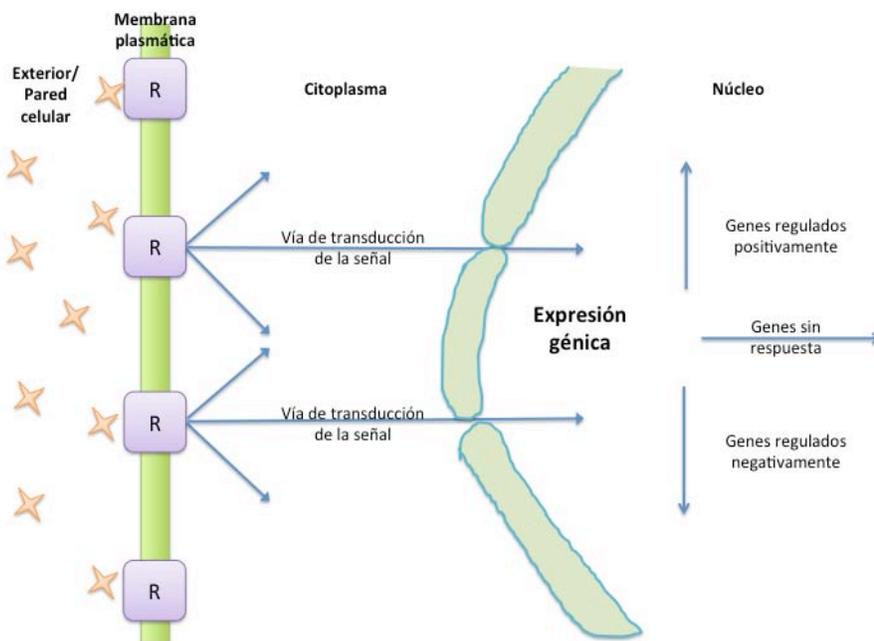
Las hormonas vegetales o fitohormonas son un *grupo de sustancias que ocurren naturalmente, las cuales influyen procesos fisiológicos a bajas concentraciones* (Davies, 2004). Estos procesos consisten primordialmente en el crecimiento, diferenciación y desarrollo vegetal; sin embargo, otros procesos como el movimiento estomático también pueden ser afectados. Went y Thimann (1937) en su libro *Fitohormonas* definen una hormona como una sustancia que es transferida desde una a otra parte del mismo organismo, este concepto también se deriva del concepto de sus contrapartes animales y del estudio de las auxinas, la primer fitohormona en ser descubierta, la cual produce una respuesta de crecimiento a una distancia de su sitio de biosíntesis y de ahí su condición de mensajero bioquímico transportado. En general, la síntesis de hormonas en plantas no está restringida a un tipo particular de tejido especializado. De esta forma, las fitohormonas son componentes ubicuos del desarrollo y diferenciación a través de todo el ciclo de vida de las plantas, literalmente desde la germinación, crecimiento vegetativo, floración y formación de frutos y eventualmente durante la abscisión.

Aunque numerosas sustancias son reconocidas por funcionar como hormonas vegetales, la forma de las plantas es en gran parte controlada por una molécula de estructura simple de naturaleza indólica, el Ácido Indolacético (Tanaka *et al.*, 2006). Dentro de las fitohormonas más importantes se encuentran las auxinas (Aux), citoquininas (CK's), giberelinas (GA's), ácido abscísico (ABA) y etileno, otros tipos de sustancias como las poliaminas y brasinoesteroides también han mostrado regular aspectos del desarrollo y diferenciación de las plantas (revisado por Davies, 2004).

Una clasificación funcional a *grosso modo* puede definir a las auxinas y GA's como reguladores de la elongación celular, a las CK's como reguladores de la división celular, al ABA como un inhibidor general y al etileno como un regulador positivo de una diversidad de procesos; otras aproximaciones sugieren que no todos los tipos celulares responden de forma similar a una hormona dada y que en una célula individual algunos genes pueden ser encendidos y otros apagados por la misma hormona (Dodsworth, 2009); más aún, algunos efectos hormonales pueden ser indirectos, un ejemplo resulta de la producción de etileno estimulado por auxina (Kang *et al.*, 1971; Burg, 1973; Yu & Yang, 1979; Lazarus en Grierson, 1991).

Debido al propósito y tema que comprende esta tesis, se tratará más a fondo el papel regulatorio de las auxinas, además de que estas moléculas merecen un sitio notable en cualquier discusión que trate sobre hormonas vegetales, debido a que se trata de la primer hormona de crecimiento vegetal en ser descubierta y a que mucho de lo que conocemos acerca de los mecanismos de expansión celular vegetal ha sido llevado a cabo en relación con las auxinas. Incluso estas (junto con las citoquininas) difieren de otras hormonas y agentes señalizadores en el hecho de que son requeridas para la viabilidad: hasta el momento no se han encontrado mutantes auxótrofos de auxinas, lo que sugiere que las mutaciones que las eliminan son letales. Mientras que otras hormonas parecen actuar prendiéndose y apagándose regulando procesos de desarrollo

específicos, las auxinas y citoquininas parecen requerirse a un nivel más o menos continuo. En la Fig. 1 se muestra un modelo sucinto, el cual ayuda a explicar la regulación genética por medio de hormonas.



**Figura 1: Modelo de acción de hormonas vegetales como reguladores de la expresión génica. Moléculas de hormona (estrellas) penetran a través de la pared celular libremente hasta llegar a la membrana plasmática donde se ligan a receptores específicos (R); la sensibilidad de un célula a una hormona dada esta influenciada por la cantidad de receptores presentes, la posterior transducción de la señal lleva la información de la hormona ligada en la superficie celular hacia el núcleo, resultando en cambios en la expresión de distintos genes regulados por la hormona. Tomado de Lazarus en Grierson, 1991.**

## Auxinas

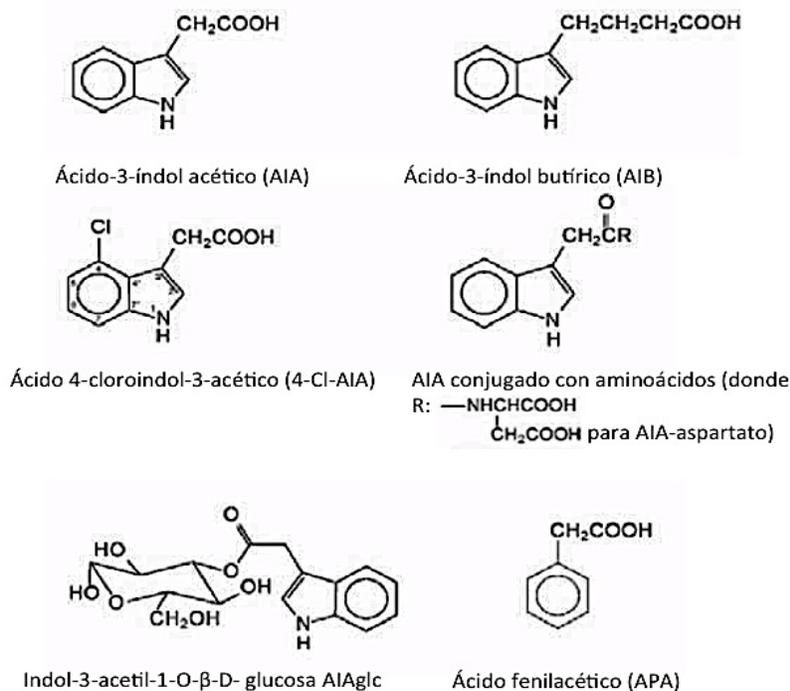
El botánico alemán Julius von Sachs (1832–1897) propuso que un mensajero químico era el responsable de la formación y crecimiento de diferentes órganos vegetales; también proponía que factores externos como la gravedad afectaban las distribución de dicha sustancia. Posteriormente, durante el siglo XIX, los trabajos continuaron con los Darwin con coleoptilos de alpiste (*Phalaris canariensis*), con la finalidad de conocer la influencia que provocaba la curvatura del tallo inducido por luz, posteriormente estos experimentos serian publicados en el libro *El poder del movimiento en las plantas* en 1881 (Darwin & Darwin, 1881). Estos trabajos culminaron con las demostración en 1926 por Frist Went de que al ser removida la punta del coleoptilo de avena el crecimiento cesaba. Posteriormente los trabajos con el material que difundía desde los coleoptilos escindidos hacia bloques de agar dio como resultado una nueva gama de experimentos, lo que condujo finalmente a la formulación de la hipótesis de Cholodny-Went los cuales propusieron que la distribución diferencial de auxina representa el mecanismo del crecimiento trópico (revisado en Went, 1974; Firn *et al.*, 2000). Debido a la capacidad de dicha sustancia para promover el crecimiento eventualmente fue llamada auxina, que desciende del griego 'αυξανω'=auxein y que significa "para crecer" o "para incrementar".

Actualmente el uso de la espectrometría de masas se ha establecido como el método de elección cuando se trata de conocer aspectos en la estructura química o cuando se requiere conocer la cantidad de ácido-3-índol acético (AIA) presente en una muestra. Este método es empleado en conjunto con métodos de separación que involucran cromatografía de gases. Esto ha permitido la identificación y cuantificación auxínica precisa, haciendo posible detectar  $10^{-12}$  g (1 picogramo o pg) de AIA, rango de auxina encontrado en una sola porción de tallo de chícharo o en un grano de maíz. Estas técnicas han hecho posible a los investigadores analizar con precisión precursores de auxinas, el recambio auxínico y la distribución de auxinas a lo largo de la planta.

### Características generales de las auxinas y homeostasis auxínica

Las auxinas pueden definirse como sustancias orgánicas que promueven la elongación celular cuando se aplican en bajas concentraciones a segmentos de tejido durante bioensayos específicos. Las auxinas funcionan en la intersección entre las señales de desarrollo y ambientales y las vías de respuesta que estas desencadenan. Además de la auxina más ampliamente estudiada, el AIA, existen varias otras auxinas nativas que se han reportado en plantas. Todas las auxinas naturales encontradas en plantas pueden encontrarse como ácido libre o en formas conjugadas (Fig. 2).

La búsqueda de un modelo de correlación estructura-actividad válido para el AIA y para una serie de derivados alquilados y halogenados no ha definido una relación simple o directa, aunque el análisis detallado de sus parámetros estructurales y de sus propiedades físico-químicas ha cambiado los conceptos de actividad/determinantes estructurales (Nigović *et al.*, 2000). Contrario a lo que se esperaba, los factores sugeridos para explicar las diferencias en la actividad auxínica como una relación simple basada ya sea en la lipofilicidad de las moléculas, la débil capacidad complejante  $\pi$  o en la acidez del anillo indólico (NH) reducido, no han logrado explicar las diferencias en la actividad biológica. La habilidad de modificar las estructuras para funcionar como auxinas activas pueden ser definidas por la relación entre la cadena lateral ácida y propiedades del sistema del anillo no especificadas (Nigović *et al.*, 2000). Aunque las auxinas son químicamente diversas, una característica que presentan todas estas moléculas es una distancia de 0.5 nm entre una carga positiva fraccional en el anillo aromático y un grupo carboxilo cargado negativamente.



**Figura 2: Auxinas que ocurren naturalmente en plantas y algunos ejemplos de conjugados de bajo peso molecular. Otros conjugados de bajo peso molecular (como el AIA-inositol-arabinosa y conjugados con varios aminoácidos) y de alto peso molecular (como el AIA-proteína IAP1, AIA-péptido, AIA-glicoproteína y AIA-glucano) han sido aislado de material vegetal. Tomado de Normanly *et al.*, en Davis, 2004.**

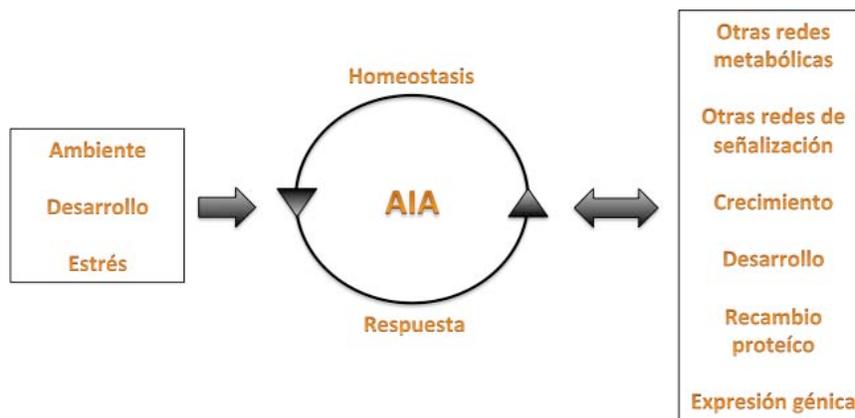
Los niveles de auxina varían a través de todo el ciclo y cuerpo de la planta, formando gradientes los cuales son el componente central de su acción (Benfey, 2002; Doerner, 2000; Hamann, 2001; revisado en Davies, 2004). De esta forma, las plantas han desarrollado intrincadas redes regulatorias con considerable redundancia y plasticidad adaptativa con la finalidad de mantener los niveles de auxina en respuesta a

cambios medioambientales y condiciones de desarrollo. A este fenómeno se refiere el término de homeostasis auxínica y específicamente a la biosíntesis, inactivación, transporte y rutas de interconversión que regulan y mantienen los niveles auxínicos.

El estudio de la **homeostasis auxínica** tiene la finalidad de entender los mecanismos mediante los cuales las plantas logran obtener hormona disponible en la cantidad requerida al momento y lugar de uso, así como en la determinación de cómo las señales de desarrollo y medioambientales impactan esos procesos. La combinación de aproximaciones genéticas y analíticas en los pasados 20 años han resultado en un mayor entendimiento de la homeostasis auxínica; principalmente en lo que respecta a puntos de interacción entre distintas rutas metabólicas redundantes.

Aproximaciones genéticas clásicas como la detección (screening) de mutantes deficientes de auxina, han ofrecido poca información acerca de la homeostasis del AIA. Esto es atribuido probablemente al hecho ya mencionado con anterioridad con respecto a la falta de auxótrofos de auxinas, aunado con el hecho de que las rutas que contribuyen a la homeostasis auxínica resultan redundantes. De esta manera, una mutación en una ruta puede ser compensada por medio de otra ruta funcional. Desde entonces el descubrimiento de más genes involucrados en la biosíntesis y metabolismo de auxinas, la manipulación de la síntesis del AIA en líneas celulares específicas y la medición directa de los niveles de AIA con resolución tisular y celular señalan que la biosíntesis y metabolismo localizado del AIA juegan un papel central en eventos específicos de desarrollo (revisado en Cheng & Zhao 2007; Lau *et al.*, 2008; Zhao 2008; Chandler 2009).

Mutantes y plantas transgénicas con alteraciones en la homeostasis del AIA han resultado integrales en estos estudios, debido a que han revelado los mecanismos compensatorios que las plantas usan para lograr la homeostasis del AIA (Fig. 3). Varios hallazgos de importancia han surgido; entre ellos: 1) las plantas usan múltiples rutas para llevar a cabo la homeostasis del AIA; 2) estos caminos son regulados diferencialmente y 3) numerosos factores medioambientales como luz, temperatura y estrés biótico y abiótico son capaces de regular la actividad de dichas rutas (Ljung *et al.*, 2002).



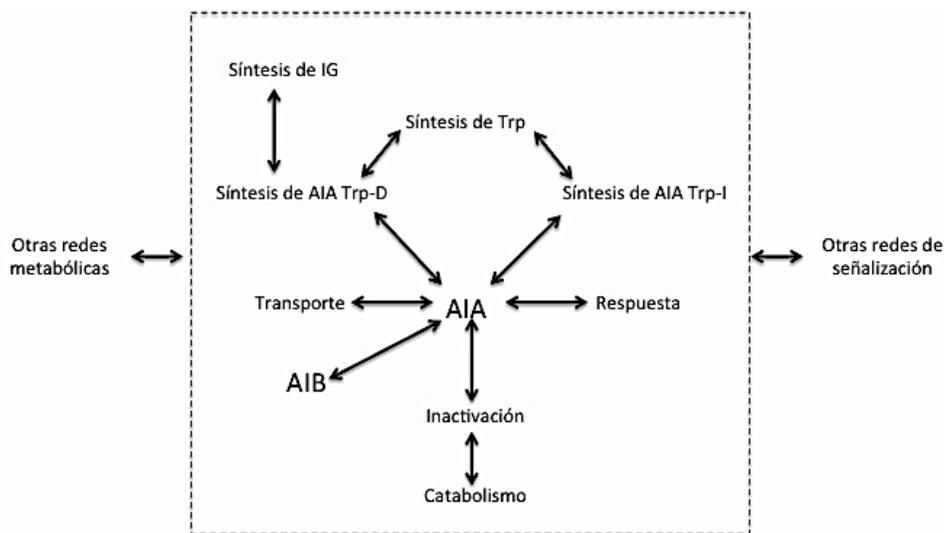
**Figura 3: Homeostasis auxínica; el mantenimiento de los niveles de AIA en las células vegetales óptimos para el desarrollo y crecimiento es dependiente de fuentes bióticas y abióticas que afectan el sistema, éstos resultan en una variedad de respuestas que a menudo se encuentran interconectadas y que son afectadas entre ellas mismas dentro del sistema. Algunas de las complejas redes han evolucionado con una considerable redundancia y plasticidad adaptativa para mantener los niveles de auxina óptimos en respuesta a cambios ambientales y condiciones de desarrollo. Tomado de Normanly *et al.*, en Davis, 2004.**

### Biosíntesis y metabolismo de auxinas

Durante los pasados 15 años, la hipótesis de que el AIA es sintetizado principalmente en la región apical y transportado a través de la planta para formar gradientes morfogénicos ha experimentado revisión y refinamiento, concomitantemente con la habilidad de monitorear la síntesis *de novo* del AIA en tejidos específicos a alta resolución. La biosíntesis del AIA está asociada con tejidos con rápida división y crecimiento, especialmente con brotes; sin embargo, experimentos con óxido de deuterio ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) -también conocido como “agua pesada”-, han mostrado que virtualmente todos los tejidos parecen ser capaces de producir AIA en bajos niveles; más aún, todas las partes de plántulas jóvenes son capaces de sintetizar AIA (Ljung *et al.*, 2001a;

Bhalerao *et al.*, 2002), ya sean embriones recién fertilizados, hojas jóvenes y raíces han exhibido una alta actividad de síntesis de AIA (Ljung *et al.*, 2001a; Ljung *et al.*, 2001b; Ribnicky *et al.*, 2002).

Las rutas bioquímicas que resultan en la producción de AIA dentro de un tejido vegetal se ilustran en la Fig. 4; estas incluyen: A) síntesis *de novo* (síntesis del anillo indólico heterocíclico desde precursores no aromáticos), ya sea desde triptófano; es decir, síntesis de AIA dependiente de triptófano o Trp-D, o desde precursores indólicos de Trp; a saber, la síntesis de AIA independiente de triptófano o Trp-I, debido a que estas rutas no transitan por la síntesis de Trp; en otras palabras, cuando el AIA se deriva de un precursor indólico del Trp, probablemente indól-3-glicerol fosfato (IGP) (Ouyang *et al.*, 2000); B) hidrólisis de conjugados enlazados por enlaces éster o amida; C) transporte desde un sitio a otro de la planta y D) conversión de ácido-3-indolbutírico (AIB) a AIA. El mecanismo de recambio del AIA incluye: E) catabolismo oxidativo; F) síntesis de conjugados; G) transporte desde el sitio de biosíntesis y H) conversión de AIA a AIB. Este modelo de entradas y salidas en la poza (a menudo referida como pool) de AIA ha permanecido sin muchos cambios durante los últimos 30 años (Cohen & Bandurski, 1982).



**Figura 4: Diagrama de las interacciones metabólicas y de señalización conocidas hasta la fecha implicadas en mantener la homeostasis auxínica; sin embargo, aun existen espacios en nuestro conocimiento acerca de las rutas completas e interacciones entre la regulación auxínica y otras redes regulatorias. Tomado de Normanly *et al.*, en Davis, 2004.**

Décadas de investigación han establecido la existencia de múltiples rutas biosintéticas Trp-D de AIA en plantas (Normanly *et al.*, 2004; Woodward & Bartel, 2005) y microbios (Glick *et al.*, 1999). El análisis filogenético de las familias de genes que codifican para la triptófano aminotransferasa (TAA) y flavin monooxigenasa (YUC) que participan en la ruta principal de síntesis de auxina en plantas -a saber, la ruta de la TAA/YUC- provee poca evidencia de la producción de AIA en algas (Cooke *et al.*, 2002; Le Bail *et al.*, 2010); en su lugar, la transferencia horizontal de genes de YUCs desde una bacteria a un ancestro de las plantas sugiere que la ruta TAA/YUC es una innovación de las plantas terrestres, que surge inicialmente como mecanismo para regular o contrarrestar la actividad bacteriana y controlar su propia señalización auxínica (Yue *et al.*, 2014).

#### Síntesis de AIA dependiente de triptófano

El AIA se encuentra relacionado estructuralmente con el triptófano; más aún, los primeros estudios en relación con la biosíntesis de auxinas estuvieron basados en el triptófano como probable precursor. Las rutas biosintéticas fueron elucidadas por estudios con marcaje radiactivo así como por ensayos bioquímicos. Estos experimentos han revelado el hecho de que no todo el AIA producido por tejidos vegetales incorpora triptófano exógeno marcado ( $[^3\text{H}]$ triptófano). Por medio de este tipo de experimentos se han detectado intermediarios con marcaje, el AIA y metabolitos de AIA producidos fueron cuantificados, las enzimas que catalizan estas reacciones fueron aisladas y caracterizadas e incluso en algunos casos los genes que codifican para esas enzimas han logrado clonarse (De Luca *et al.*, 1989; Bartel & Fink, 1994; Bartling *et al.*, 1994). El

marcaje con isótopos estables llevados a cabo en plantas intactas han confirmado la existencia y uso de rutas de síntesis de AIA Trp-D en una variedad de especies (Ljung *et al.*, 2002; Slovin *et al.*, 1999).

Muchos de los primeros estudios han sobreestimado la contribución de la síntesis de AIA Trp-D, debido al hecho de que fueron conducidos en segmentos de tejido (Normanly, 1997) y ahora se conoce que las heridas inducen la síntesis de AIA Trp-D (Sztein *et al.*, 2002). La síntesis de AIA Trp-D también es inducida por factores medioambientales como luz y temperatura (Rapparini *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha podido establecer una correlación directa. También existen varios ejemplos de aumentos repentinos en los niveles de auxina que se relacionan con estímulos de desarrollo o medioambientales. Dichas alzas surgen de la fertilización que da paso al cigoto (Ribnicky *et al.*, 2002) y cambios en la temperatura (Ljung *et al.*, 2002), también se conoce que el metabolismo del AIA también es perturbado por infecciones de patógenos (Normanly & Bartel, 1999). A pesar de esta y otras dificultades (Normanly *et al.*, 1995; Normanly, 2010a; 2010b), existe un enorme acervo de evidencia que demuestra que las plantas convierten triptófano en AIA por varias rutas (Nonhebel *et al.*, 1993).

**Ruta del ácido-3-índol pirúvico (IPA):** Esta es probablemente la ruta de síntesis Trp-D más común. Esta involucra una reacción de desaminación del Trp para formar el IPA, seguido de una descarboxilación para formar índol-3-acetaldehído (AIAId). El AIAId es entonces oxidado por la IAId deshidrogenasa para formar AIA.

**Ruta de la triptamina (TAM):** Esta ruta es similar a la del IPA, con excepción de que se invierte el orden de la desaminación y la descarboxilación y que distintas enzimas se encuentran involucradas. Aquellas especies que no usan la ruta del IPA poseen la ruta del TAM. En algunos casos como en el tomate, existe evidencia del uso de ambas rutas biosintéticas (Nonhebel *et al.*, 1993).

**Ruta del índol-3-acetonitrilo (IAN):** Durante esta ruta el Trp primero es convertido a índol-3-acetaldoxima y posteriormente en IAN. Las nitrilasas son las enzimas que convierten el IAN en AIA. Esta ruta es importante en tres familias: Brassicaceae (familia de la mostaza y de la que forma parte *A. thaliana*), Poaceae (familia de los pastos) y Musaceae (familia del plátano). Sin embargo, los genes o actividades de las nitrilasas también han sido identificadas en Cucurbitaceae (familia de las calabazas), Solanaceae (familia del tabaco y tomate), Fabaceae (familia de las leguminosas) y Rosaceae (familia de las rosas). Cuatro genes de nitrilasas (NIT1 a NIT4) han sido clonados en *A. thaliana*. Cuando NIT2 se expresó en tabaco transgénico, las plantas resultantes adquirieron la habilidad para hidrolizar al IAN a AIA (Schmidt *et al.*, 1996).

Otra ruta dependiente de triptófano –una que usa al **índol-3-acetaldoxima (IAM)** como intermediario– es empleada por varias bacterias patógenas, como *Pseudomonas savastanoi* y *Agrobacterium tumefaciens*. Esta ruta involucra a la triptófano monooxigenasa y a la IAM hidrolasa. Las auxinas producidas por estas bacterias a menudo propician cambios morfológicos en las plantas hospederas.

#### Síntesis de AIA independiente de triptófano

La ruta de síntesis de AIA Trp-I ha sido establecida en varias especies vegetales por medio de marcaje radiactivo con isótopos estables (revisado por Woodward & Bartel, 2005); el concepto de esta ruta surge debido a los bajos niveles de conversión de triptófano marcado radiactivamente a AIA; sin embargo, aún no existen disponibles aproximaciones genéticas que definan y confirmen dicha ruta.

Quizás el más sorprendente de los estudios con marcaje isotópico, es el del mutante de maíz pericarpo naranja (*orp* del inglés *orange pericarp*) (Bandurski *et al.*, 1995; Normanly *et al.*, 1995; Slovin *et al.*, 1999) (Figura 5). El mutante *orp* presenta un rasgo recesivo doble causado por la mutación en dos genes que codifican para la enzima Trp sintasa  $\beta$ , donde ambas subunidades de la triptófano sintasa se encuentran inactivas; en otras palabras, se trata de un auxótrofo estricto de Trp. A pesar del bloqueo a partir de la síntesis de Trp, el mutante *orp* presenta una cantidad 50 veces más alta de AIA que la encontrada en el tipo silvestre (Wright *et al.*, 1991). Estudios con marcaje, mostraron que los mutantes *orp* son capaces de convertir [ $^{15}\text{N}$ ]antranilato a [ $^{15}\text{N}$ ]AIA pero no pueden convertir [ $^2\text{H}_5$ ]Trp a [ $^2\text{H}_5$ ]AIA. Ni las plántulas *orp* ni las plántulas silvestres fueron capaces de convertir [ $^2\text{H}_5$ ]Trp a [ $^2\text{H}_5$ ]AIA en cantidades significativas, incluso cuando el mutante *orp* fue alimentado con niveles suficientes de [ $^2\text{H}_5$ ]Trp para revertir los efectos letales de la mutación (Bandurski *et al.*, 1995; Normanly *et al.*, 1995; Slovin *et al.*, 1999). Estos resultados fueron los primeros en establecer claramente que ocurre la síntesis de AIA Trp-I y que esa ruta predomina sobre la ruta Trp-D. Esta ruta también ha sido demostrada directamente en un sistema *in vitro* usando enzimas de plántulas mutantes de maíz *orp* y silvestres que crecieron en luz. Este sistema se usó para catalizar la conversión directa de [ $^{14}\text{C}$ ]índol pero no de [ $^{14}\text{C}$ ]Trp a [ $^{14}\text{C}$ ]AIA (Bartel *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2002; Normanly & Bartel, 1999).

No obstante de la demostración de que una ruta de biosíntesis de AIA ocurre sin el aminoácido Trp como precursor, la ruta exacta de síntesis de AIA Trp-I permanece elusiva. Estudios posteriores establecieron que el punto de bifurcación en la biosíntesis de AIA deriva ya sea desde el indol o de su precursor, el indol-3-glicerol fosfato (Bandurski *et al.*, 1995; Normanly *et al.*, 1995); también se han postulado como posibles intermediarios al IAN y IPA. El AIA no es el único compuesto producido por las plantas a partir de precursores que conducen directamente al Trp. La camalexina, compuesto de defensa en *A. thaliana*, parece ser producido directamente desde el indol sin transitar por el Trp (Zook, 1998). Sin embargo, hasta el momento el precursor inmediato del AIA en la ruta Trp-I aún no ha sido identificado.

Se ha descubierto que el tipo de ruta de biosíntesis de AIA varía dependiendo del tejido y diferentes estadios de desarrollo. Por ejemplo, durante la embriogénesis en zanahoria, la ruta Trp-D es importante durante el desarrollo temprano, mientras que la ruta Trp-I se torna cardinal después del establecimiento del eje radical-apical (Ljung *et al.*, 2002). De manera similar, la producción de AIA en frutos inmaduros de jitomate ocurre vía Trp-D; sin embargo, la producción de AIA en el fruto maduro continúa predominantemente vía Trp-I (Epstein *et al.*, 2002).

El intercambio de rutas no solo es controlado por programas de desarrollo, sino que también es afectado por estímulos externos, como en el caso de la remoción de los cotiledones de frijol, donde se observó que este es capaz de usar ambas rutas y que la ruta Trp-D es activada como consecuencia de la lesión resultado de la remoción de los cotiledones (Sztein *et al.*, 2002). La temperatura de crecimiento también afecta la regulación de las rutas de síntesis de AIA, se ha demostrado que en *Lemna gibba* el uso de las rutas de síntesis Trp-D y Trp-I difieren durante dos temperaturas de crecimiento (Rapparini *et al.*, 2002).

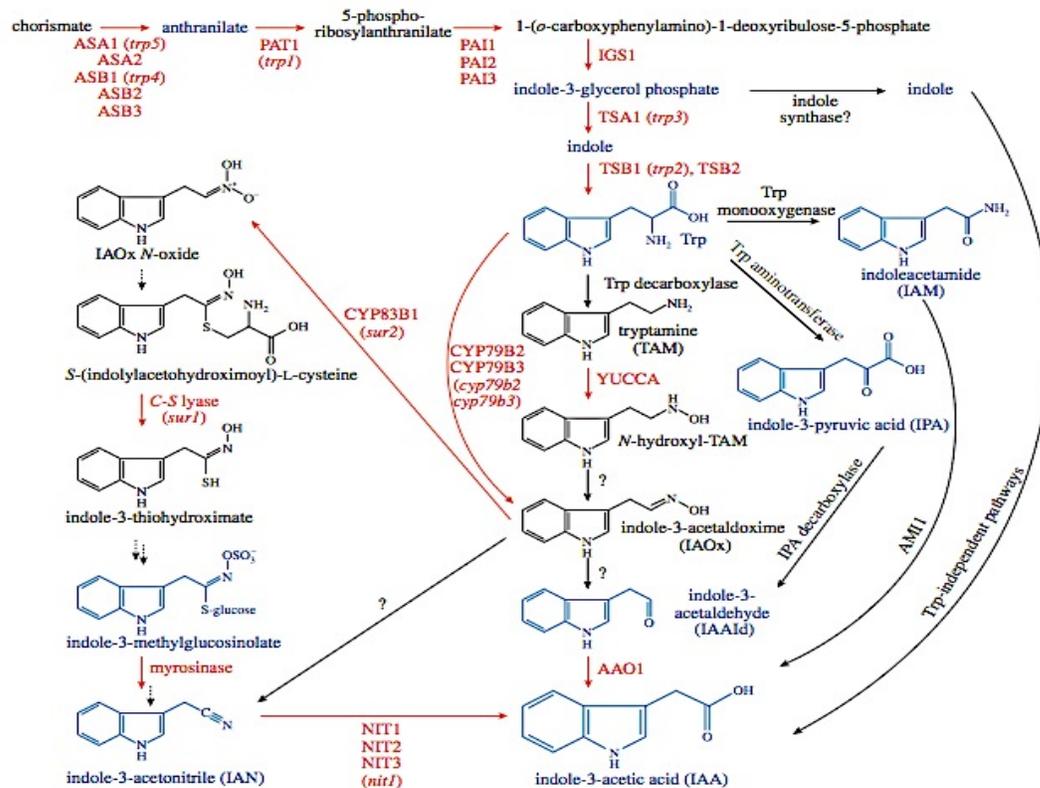
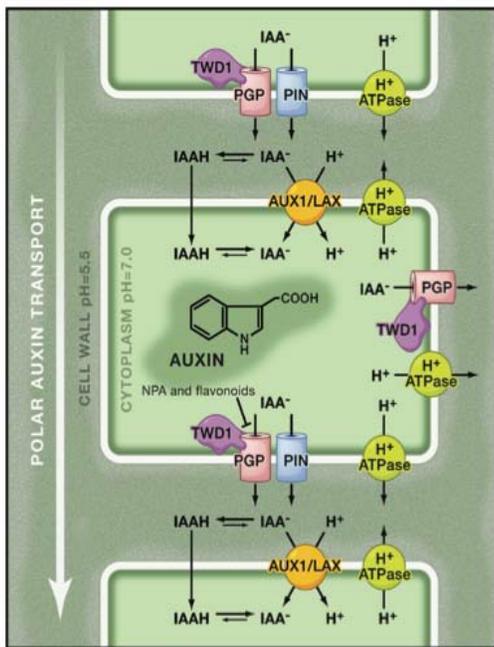


Figura 5: Potenciales rutas de biosíntesis de AIA en *Arabidopsis*. Las rutas biosintéticas *de novo* comienzan desde Trp o precursores de Trp. Los compuestos que se han logrado cuantificar aparecen en azul, las enzimas de las que se han identificado sus genes se presentan en rojo; los mutantes detectados se presentan con cursivas minúsculas también en rojo. Las conversiones propuestas para genes que aún no se han identificado se indican con símbolos de interrogación. La biosíntesis de Trp y las conversiones de Trp a IAox (indol-3-acetaldoxima) catalizadas por citocromos P450 acontecen en el cloroplasto, mientras que varias enzimas de las rutas biosintéticas de AIA Trp-dependientes son aparentemente citoplasmáticas. Tomado Woodward & Bartel, 2005.

Mucha de la distribución espacial de las auxinas es causada por el transporte direccional o transporte polar auxínico (PAT por sus siglas en inglés). Experimentos en el transporte de auxinas usando inhibidores químicos revelaron la importancia fisiológica del transporte auxínico y condujeron, a principios de los años 70s, a la formulación del modelo quimiosmótico de transporte polar de auxinas propuesto por Rubery, Sheldrake y Raven (Rubery & Sheldrake, 1974; Raven, 1975) (Fig. 6). De acuerdo con este modelo, el pH bajo de las paredes celulares provoca que las auxinas apoplásticas se encuentren predominantemente en forma protonada (AIAH), permitiéndoles entrar a las células con relativa facilidad. Además, transportadores de entrada bombean auxina hacia dentro de la célula. Debido a un pH más básico en el citosol, las auxinas son desprotonadas a su forma aniónica (AIA<sup>-</sup>), perdiendo la capacidad de cruzar la membrana. De esta forma, las auxinas necesitan ser bombeadas activamente fuera de las células por medio de proteínas transportadoras de salida.

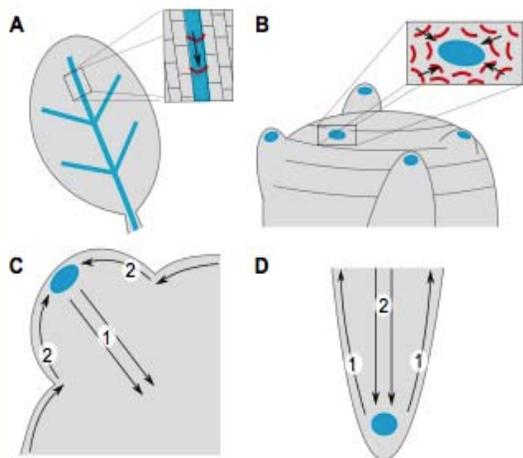
Esfuerzos conjuntos de aproximaciones moleculares y genéticas (Palme & Gälweiler, 2000; Friml *et al.*, 2002a; Swarup *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 1999; Palme & Gälweiler, 2000; Friml *et al.*, 2002a) dieron paso a la identificación de los genes que codifican para este tipo de transportadores de entrada y salida representados por las familias de genes *AUX* y *PIN*, respectivamente (Palme & Gälweiler, 2000). Aunque aún falta evidencia bioquímica directa que establezca su función como transportadores, resulta indudable que las proteínas *AUX* y *PIN* participan en el proceso de transporte auxínico.



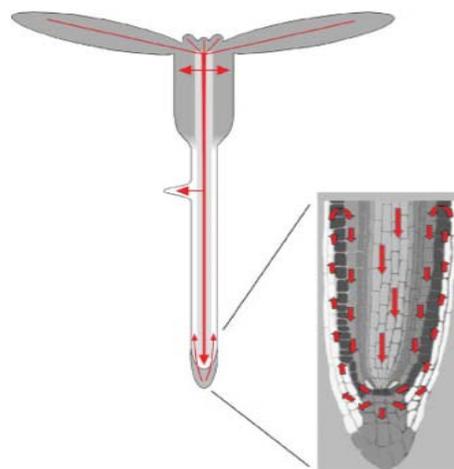
**Figura 6: Modelo quimiosmótico de transporte polar de auxinas:** El pH bajo del apoplasto (pared celular) es mantenido mediante la actividad de la H<sup>+</sup> ATPasa de membrana. En un ambiente relativamente ácido, una fracción del ácido débil, ácido-3-indol acético (AIA), la forma auxínica predominante, se protona. La forma protonada (AIAH) es más lipofílica y se difunde libremente a través de la membrana celular hacia dentro de la célula. Además de la difusión pasiva, las auxinas son transportadas activamente desde el apoplasto por el simporte de H<sup>+</sup>/IAA<sup>-</sup> mediado por los acarreadores de entrada AUX1/LAX. Una vez dentro del citosol neutral, las auxinas son desprotonadas quedando atrapadas dentro de la célula. Las auxinas pueden dejar el interior por medio de acarreadores de salida como las proteínas PIN-FORMED (PIN) y las glicoproteínas P (PGP) que forman parte de la ATP-Binding cassette la cual pertenece a la familia B de proteínas transportadoras ABC (ABCB). La actividad de las proteínas ABCB puede ser modulada por el ácido-1-naftil-p-talámico (NPA) y flavonoides que interfieren con la interacción de las ABCB y de la TWISTED DWARF 1 (TWD1), proteína que la regula. La localización polar subcelular de los PINs determina la dirección de la salida de las auxinas y por lo tanto el flujo unidireccional de auxina dentro de un tejido. Tomado de Vanneste & Friml, 2009.

Proteínas de la familia PIN-FORMED (PIN) son un grupo de proteínas transportadoras de salida (Gälweiler *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998, Paponov *et al.*, 2005; Friml, 2003). Estas proteínas típicamente presentan una distribución celular polar, dirigiendo el transporte solo a través del espacio de membrana donde los PINs se encuentran localizados (en lo sucesivo, se describirá a los PINs como “apuntando” hacia la dirección donde el flujo de auxina es conducido por la distribución de los PINs). Esta localización polar depende de las condiciones de desarrollo y del tipo celular (Petrášek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006). En hojas, células con una distribución específica de PINs generan venas transportadoras de auxina (Fig. 7), mientras que en la epidermis del meristemo apical del brote, los PINs apuntan hacia diferentes puntos para crear máximos de auxina a la distancia necesaria para demarcar nuevos primordios, produciendo los patrones filotáxicos (Fig. 7B) (Casimiro *et al.*, 2001; Reinhardt *et al.*, 2000; Reinhardt *et al.*, 2003). Dentro de esos primordios individuales, los PINs de la capa del tejido externo están localizados hacia el máximo de auxina en la punta del primordio, mientras que las capas internas forman venas con PINs apuntando lejos del máximo, conectando el primordio con la vasculatura (Fig. 7C), un patrón conocido como “fuente-reversa”.

Finalmente, en la punta de la raíz y en primordios de raíces laterales, se observa un patrón opuesto de PINs (mientras que los PINs de las capas externas transportan auxina lejos del máximo, los de la capa interna dirigen el flujo hacia el máximo) (Fig. 7D), patrón referido como “fuente”. Modelos matemáticos del meristemo de la raíz (Grieneisen *et al.*, 2007) y del brote (de Reuille *et al.*, 2006) han demostrado que los patrones de polaridad observados experimentalmente son necesarios y suficientes para el correcto establecimiento de los máximos de auxina.



**Figura 7:** Representación esquemática de patrones de proteínas PINs y de auxinas en diferentes tejidos vegetales. Las auxinas se presentan en color azul y los PINs en rojo; las flechas indican la dirección del flujo auxínico. (A) Venas acumuladoras de auxina de hojas en desarrollo. (Recuadro interior) Proteínas PIN apuntan con el flujo de auxina hacia la base de la hoja. (B) Patrón de filotaxia en el meristemo apical del brote, donde máximos de auxina preceden la formación de primordios y forman un patrón regular. (Recuadro interior) Proteínas PIN apuntando hacia cada máximo de auxina. (C) Patrón de “fuente reversa” en un primordio de brote en desarrollo. En las capas internas, los PINs transportan auxinas lejos del máximo (dirección 1), mientras que en la capa externa, los PINs transportan auxina hacia el máximo (dirección 2). (D) Patrón de “fuente” en la punta de la raíz. Los PINs de la capa externa transportan auxina lejos del máximo (dirección 1), mientras que los PINs de las capas internas transportan auxina hacia el máximo (dirección 2). Tomando de van Berkel *et al.*, 2013.



**Figura 8:** Representación esquemática de las mayores corrientes auxínicas (flechas rojas) en etapa de plántula y en el meristemo de la raíz. Las auxinas son sintetizadas en partes jóvenes de plántulas en desarrollo y transportadas en sentido basípeto hacia la punta de la raíz. El transporte acrópeto auxínico desde la punta de la raíz coincide con la distribución lateral del regulador de crecimiento, el cual es crucial para el control de la elongación y para la formación de raíces laterales. El transporte basípeto de auxinas en la punta de la raíz, se presume, regula el tamaño de meristemo y el gravitropismo de la raíz mediante la distribución diferencial de auxina en la zona de elongación de la raíz. Tomado de Benjamins *et al.*, 2015.

Información reciente sugiere que los transportadores de salida del flujo auxínico no actúan exclusivamente en la membrana plasmática. Basado en esa nueva información se ha planteado un nuevo modo de acción de inhibidores de transporte auxínico (Geldner *et al.*, 2001). Las proteínas PIN experimentan un constante ciclo desde y hacia la membrana plasmática (Geldner *et al.*, 2001; Dhonukshe *et al.*, 2007), permitiéndoles el mantenimiento dinámico de su polaridad y rápidamente redistribuirse en respuesta a señales endógenas (formación de primordios, respuesta gravitropica) o estímulos externos (laceraciones, estiramiento). Debido a que los PINs ciclan desde y hacia la membrana plasmática, es probable que un bucle de retroalimentación o “feedback” represente un efecto regulatorio de las auxinas sobre la ciclación de los PINs.

En general, parece que el transporte de auxinas es conducido a través de mecanismos de transporte polarizado y no polarizado (Morris, 2004). El transporte no polar de auxinas procede a través del floema a lo largo de un gradiente de concentración (Raven & Rubery, 1982). La auxina sintetizada es cargada dentro del floema y translocada pasivamente dentro de la savia del floema hacia los tejidos (Morris, 1996). El transporte polar de auxina involucra mecanismos de regulación complejo ya sea hacia “abajo” (basipeto) desde la punta del brote hacia la punta de la raíz o hacia “arriba” (acropeto en la punta de la raíz) por medio de tejidos distales de la raíz que apuntan hacia el brote (Figura 8). Aparentemente, la corriente de transporte activo desde el brote hacia la punta de la raíz procede a través de las células del parénquima del xilema; mientras que el transporte de la corriente basipeto en la punta de raíz procede a través del capuchón y la capa de células externa hacia la zona de elongación, propiciando una separación espacial de ambas corrientes de transporte (Lomax *et al.*, 1995)

#### Formación de conjugados e inactivación auxínica

Las plantas superiores pueden almacenar AIA en forma de conjugados y ácido-3-indol butírico (AIB), los cuales pueden proveer AIA libre mediante su hidrólisis o  $\beta$ -oxidación, respectivamente (Fig. 9). Hasta ahora, el conocimiento que tenemos acerca del metabolismo del AIA en plantas está basado en los trabajos realizados en *A. thaliana* y maíz (Normanly, 1997; Slovin *et al.*, 1999; Cohen & Gray, 2006).

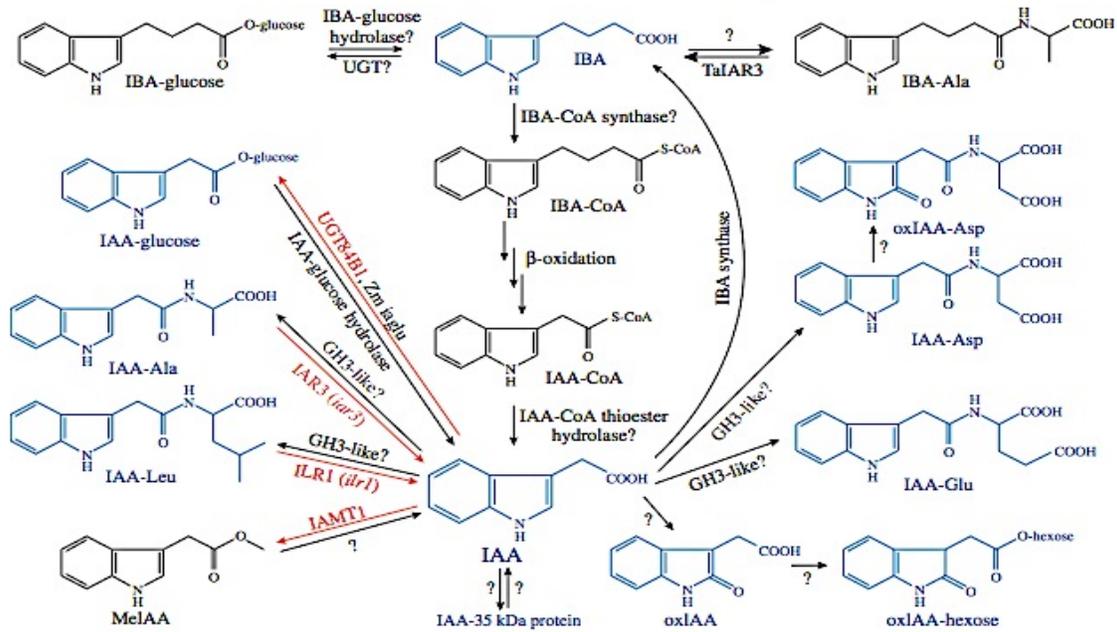
Los metabolitos más abundantes del AIA son formas conjugadas con una variedad de moléculas pequeñas, péptidos o proteínas (revisado por Seidel *et al.*, 2006); las formas conjugadas son clasificadas generalmente por el tipo de conjugado vinculado, ya sea éster-ligados como AIA-glucosa, AIA-mioinositol y compuestos de alto peso molecular como AIA-glicanos; así como amida-ligados como el AIA-aminoácido, AIA-péptido y AIA-proteína. Los conjugados de AIA predominantes en *A. thaliana* son aquellos amida-ligados (Ljung *et al.*, 2002), esto debido a la cantidad de AIA libre que es liberado cuando conjugados amida-ligados se descomponen durante el tratamiento de extractos vegetales con NaOH.

Ciertos conjugados son activos durante bioensayos específicos y varias plantas almacenan conjugados de AIA en semillas que son hidrolizados durante la germinación con la finalidad de proveer AIA libre a las plántulas en desarrollo. En contraste, los conjugados biológicamente inactivos presentes en plantas son probablemente intermediarios en la degradación del AIA. El análisis de mutantes de *A. thaliana* deficientes en varios aspectos de la homeostasis del AIA han revelado el papel de diversas fuentes de AIA durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Woodward & Bartel, 2005).

Las funciones propuestas para estos conjugados incluyen almacenamiento, transporte, compartimentalización, detoxificación del exceso de AIA y protección en contra de oxidación peroxidativa (Cohen & Bandurski, 1982). Los conjugados de AIA que sirven como formas de almacenamiento son biológicamente inactivas y en algunos casos (como el AIA-Asp encontrado en *A. thaliana*), son usados como un primer intermediario en una ruta de degradación (Östin *et al.*, 1998).

Al medirse directamente los conjugados de AIA-aminoácidos en *A. thaliana* se han encontrado cantidades del mismo orden de magnitud que los de AIA libre (Tam *et al.*, 2000; Kowalczyk & Sandberg, 2001; Rampey *et al.*, 2004) y se infiere que la mayoría de los conjugados amida-ligados son péptidos o pequeñas proteínas (Ljung *et al.*, 2002). El papel de los AIA-péptidos y AIA-proteínas sigue bajo investigación; como es el caso de la AIA-proteína IAP1 de frijol (Seidel *et al.*, 2006). Más que una forma de almacenamiento del AIA, se especula que el AIA en estas formas funcionan como una etiqueta que marca a la proteína, dirigiendo su localización celular específica o su interacción con otras proteínas, de forma similar a otras pequeñas moléculas que modifican proteínas; sin embargo, es necesaria una mayor caracterización de estos últimos conjugados para proveer nuevas hipótesis sobre este mecanismo de acción.

Otros metabolitos del AIA como el IBA, se encuentra presente típicamente en niveles más bajos que el AIA libre (Ludwig-Muller & Epstein, 1994; Jones *et al.*, 2005) y posiblemente el metil-AIA, el cual se encuentra debajo de los límites de detección en *A. thaliana* (Qin *et al.*, 2005) y que probablemente es transformado rápidamente. Debido a esto, la inclusión de información cuantitativa acerca de los niveles de metabolitos de AIA en estudios de la homeostasis de AIA son muy poco frecuentes.



**Figura 9: Rutas potenciales del metabolismo de AIA.** Compuestos cuantificados en *Arabidopsis* aparecen en azul, genes de las enzimas que se han clonado se presentan en rojo; los mutantes detectados se presentan en cursivas minúsculas también en rojo. Las conversiones propuestas para genes que aun no se han identificado se indican con símbolos de interrogación. Una familia de amidohidrolasas que aparentemente residen en el lumen del retículo endoplasmático pueden liberar AIA de formas conjugadas del AIA. ILR1 presenta especificidad por AIA-Leu (Bartel & Fink, 1995), mientras que IAR3 tiene preferencia por AIA-Ala (Davies *et al.*, 1999). Indol-3-acetato  $\beta$ -glucosiltransferasa del maíz (Zm iaglu) y la UDP-glicosiltransferasa 84B1 (UGT84B1) de *Arabidopsis* esterifican AIA a glucosa (Szerszen *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2001); la enzima que forma e hidroliza AIA-péptido no ha sido identificada. AIB probablemente es convertido a AIA-CoA en un proceso que ocurre en el peroxisoma paralelo a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos a acetil CoA (Bartel *et al.*, 2001). El AIA puede ser inactivado por oxidación (oxAIA) o la formación de conjugados no hidrolizables (IAA-Asp and IAA-Glu). Conjugados AIA-aminoácidos pueden ser formados por miembros de la familia GH3/JAR1 (Staswick *et al.*, 2002, 2005). oxAIA puede ser conjugado a hexosas y AIA-Asp puede ser adicionalmente oxidado (Östin *et al.*, 1998). IAMT1 puede metilar AIA (Zubieta *et al.*, 2003), sin embargo no se conoce si activa o inactiva AIA. AIB y conjugados de AIA hidrolizables se pueden derivar presuntivamente de AIA; la biosíntesis de estos compuestos pueden contribuir a la inactivación del AIA. La formación y la hidrólisis de conjugados de AIB también pueden contribuir a la homeostasis auxínica; la enzima amidohidrolasa del trigo (TaIAR3) puede hidrolizar AIB-Ala (Campanella *et al.*, 2004). Tomado Woodward & Bartel, 2005.

Las rutas que inactivan el AIA contrarrestan las entradas a la poza del AIA. *A. thaliana* es capaz de inactivar permanentemente AIA por medio de la oxidación a oxAIA (Fig. 9), que posteriormente puede ser conjugado con hexosas (Östin *et al.*, 1998). La conjugación con distintos aminoácidos parece depender de las concentración auxínica (Östin *et al.*, 1998; Barratt *et al.*, 1999). Se ha observado que plántulas de *A. thaliana* son capaces de hidrolizar AIA-Asp y AIA-Glu de forma apreciable; el AIA-Asp puede ser oxidado posteriormente a oxAIA-Asp (Östin *et al.*, 1998), reforzando la naturaleza catabólica de la conjugación con Asp. El sistema de conjugación catabólica probablemente se presenta durante el desarrollo normal, debido a que el AIA-Asp y el AIA-Glu se encuentran presentes en bajos niveles en plántulas de *A. thaliana* (Tam *et al.*, 2000; Kowalczyk & Sandberg, 2001; Rampey *et al.*, 2004). En respuesta a niveles elevados de AIA, las rutas de conjugación catabólicas pueden ser reguladas positivamente y las rutas de conjugación para el almacenaje reguladas negativamente (Glass & Kosuge, 1986; Normanly *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2001).

Además de los conjugados AIA-aminoácidos, también se han encontrado conjugados esterificados como el AIA-glucosa (Chisnell & Bandurski, 1988; Tam *et al.*, 2000; Jakubowska & Kowalczyk, 2004), así como proteínas con actividad de AIA glucosil transferasa (Leznicki & Bandurski, 1988; Szerszen *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2001; Jakubowska & Kowalczyk, 2004). Se han encontrado dos genes que codifican para glucosil

transferasas, uno en maíz (Szerszen *et al.*, 1994) y otro en *A. thaliana* (Jackson *et al.*, 2001); la sobreexpresión del gene de *A. thaliana* propicia la resistencia de las plantas al AIA exógeno y afecta el gravitropismo (Jackson *et al.*, 2002), acorde con el papel en la inactivación que presentan este tipo de enzimas; también se ha encontrado que la enzima de *A. thaliana* es activa sobre el AIB (Jackson *et al.*, 2001).

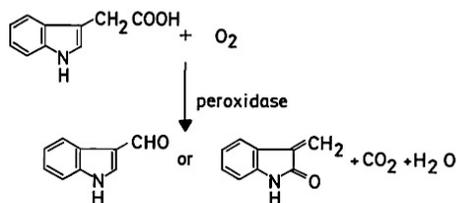
Finalmente, *A. thaliana* es capaz de convertir AIA a AIB (Ludwig-Müller & Epstein, 1994), se especula que la actividad de AIB sintasa puede contribuir a la inactivación del AIA. Una AIB sintasa regulada por una variedad de estreses bióticos y abióticos fue parcialmente purificada del maíz (Ludwig-Müller & Hilgenberg, 1995); sin embargo, los componentes específicos o sus efectos en la poza de AIA libre no han sido determinados.

### Catabolismo de auxinas

El catabolismo oxidativo del AIA se ha propuesto que ocurre ya sea mediante la modificación química del núcleo indólico en las posiciones 2, 3 y 7 (para formar oxAIA o conjugados de oxAIA) o de la cadena lateral, lo cual resulta en ambos casos en la pérdida de la actividad auxínica. Hasta donde se sabe, se trata del único paso realmente irreversible que regula los niveles de auxina. La mayoría de estos trabajos ha sido realizados *in vitro* (Nonhebel *et al.*, 1985; Beffa *et al.*, 1990) y ninguno de los genes implicados en el catabolismo del AIA han sido identificados definitivamente.

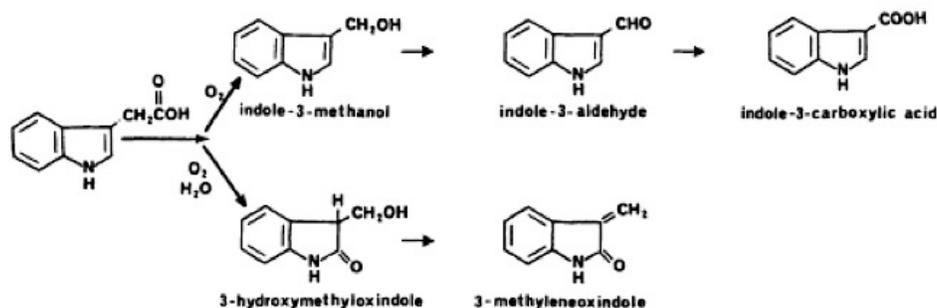
Estudios sobre el catabolismo del AIA anteceden incluso a la identificación del AIA como auxina ubicua en plantas, siendo los reportes sobre enzimas peroxidadas que catalizan la descarboxilación oxidativa del AIA los más numerosos (Bandurski *et al.*, 1995). La observación de que extractos acuosos de hojas de avena eran capaces de inactivar sustancias “promotoras de crecimiento”, condujo a trabajos posteriores que mostraron que las peroxidadas catalizaban la descarboxilación oxidativa del AIA (Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro). Se ha reportado que en raíces de *A. thaliana*, el oxAIA es el principal producto catabólico del AIA (Pencik *et al.*, 2013). Debido a que oxAIA posee baja actividad auxínica, la oxidación reversible del AIA en oxAIA, propicia la remoción efectiva del AIA de la poza de auxina.

**Ruta descarboxilativa:** Esta ruta es catalizada por peroxidasa de varias especies vegetales y a menudo por varias isoenzimas por especie. A través de distintos esfuerzos (revisado por Gaspar *et al.*, 1982 y referencias dentro) se confirmó la siguiente estequiometría:



La reacción *in vitro* puede ser monitoreada por la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de 1-[<sup>14</sup>C]-AIA, colorimétricamente por la pérdida de color en el reactivo de Salkowski o por cambios en la absorbancia de luz UV. En la literatura, se han manejado los términos AIA-oxidasa y oxidación peroxidativa del AIA como sinónimos; sin embargo, esta definición de la oxidación del AIA resulta estrecha, debido al descubrimiento de rutas oxidativas no descarboxilativas presentes en varias especies vegetales.

La descarboxilación peroxidativa del AIA ocurre en presencia de la HRP (Fig. 10), -la AIA oxidasa mejor estudiada- sin la adición de cofactores, sin embargo se conoce que el Mn<sup>+2</sup> y los monofenoles incrementan la tasa de la reacción y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce la fase de retardo o latencia durante la oxidación del AIA (Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro); en este mismo rubro se ha observado que las peroxidadas de jitomate dependen del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la oxidación del AIA. Los productos principales de la oxidación del AIA por peroxidadas son el 3-oxindol metileno, el 3-hidroxiometil oxindol (oxindol-3-carbinol), el indol-3-aldehído y el indol-3-metanol.



**Figura 10: Proceso de descarboxilación oxidativa catalizado por peroxidasas. Este proceso es iniciado por peroxidasas contenidas en extractos de varias especies vegetales; se ha demostrado la ocurrencia natural de algunos de estos catabólitos. Tomado de Bandurski *et al.*, en Davies, 1995.**

La proporción de varios productos depende de la proporción enzima/sustrato, cofactores y pH de la reacción (Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro). Altas proporciones enzima/sustrato favorecen la formación de indol-3-aldehído e indol-3-metanol así como pequeñas cantidades de oxindoles. La adición de Mn<sup>2+</sup> y 2,4-diclorofenol también estimula la formación de indol-3-metanol a expensas de otros productos de oxidación. Se conoce que las peroxidasas inicialmente reaccionan con el AIA para formar AIA radical, el cual es subsecuentemente atacado por oxígeno (Hinman & Lang, 1965; Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro). Después de la descarboxilación del AIA, la reacción procede por la ruta del indol-3-aldehído o la del oxindol-3-metileno.

Hace poco más de una década, se identificó una nueva ruta catabólica del AIA que tiene lugar en una variedad de especies vegetales como *Pinus sylvestris*, *Vicia faba* y *Zea mays*, la cual implica una oxidación no descarboxilativa, la retención del grupo carboxilo de la cadena lateral y la oxidación del núcleo indólico (Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro).

**Ruta del ácido-3-oxindol acético/ácido-3-dioxindol acético:** Esta ruta de oxidación ha sido observada en varias especies vegetales, incluyendo arroz, maíz y haba. Basándose en ensayos colorimétricos simples, se ha observado que el primer producto en esta ruta, el oxAIA, ocurre en semillas en germinación de *Brassica rapa* y en semillas en desarrollo de *Ribes rubrum* (Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro). En *Oryza sativa* (arroz) se ha observado la presencia tanto de oxAIA y dioxAIA (Kinashi *et al.*, 1976; Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro) así como la presencia de 5-hidroxi análogos de oxAIA y dioxAIA.

Métodos estándar para el monitoreo de la descarboxilación oxidativa del AIA no son capaces de distinguir entre las dos rutas en sistemas *in vitro*. Por ejemplo, la oxidación del AIA a oxAIA exhibe la toma concomitantemente de O<sub>2</sub>, pérdida de color de Salkowski y una reducción en el espectro del indol a 280nm con un incremento del espectro del indol a 247 nm, cambios que son característicos dentro de un sistema donde se usan peroxidasas. La medición de la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de 1-[<sup>14</sup>C]-AIA también es un claro indicativo de la descarboxilación oxidativa conducida por peroxidasas. Sin embargo, se ha mostrado que el oxAIA no es un intermediario o un sustrato durante las rutas catalizadas por peroxidasas (Hinman & Lang, 1965; Bandurski *et al.*, 1995 y referencias dentro), lo que indica que se trata de rutas independientes. El aislamiento cromatográfico cuidadoso y la identificación bioquímica de los catabólitos provee el mejor método para la identificación de las rutas catabólicas del AIA que acontecen en una especie en particular.

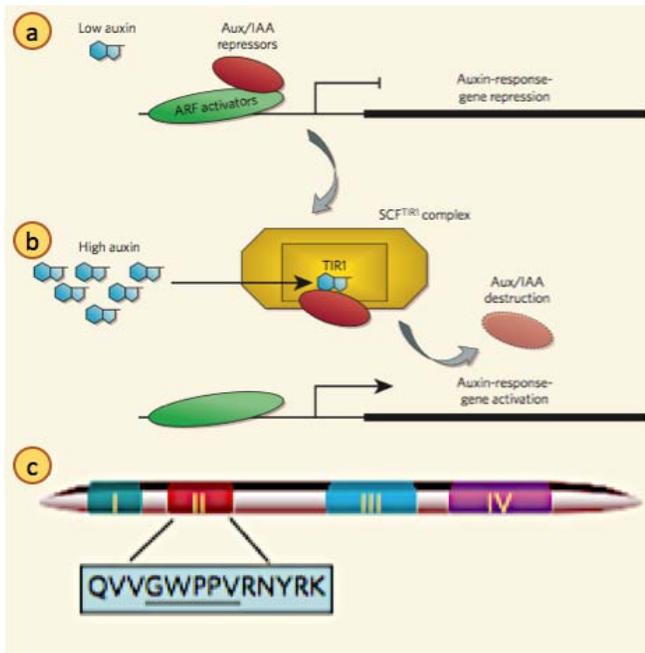
Cabe decir que a pesar de todos los estudios acerca de la descarboxilación catalizada por peroxidasas realizados *in vitro*, pocos reportes se han realizado sobre el aislamiento e identificación fisicoquímica de los catabólitos endógenos que producen las peroxidasas.

#### *Percepción de la señal auxínica y procesos regulados por auxinas*

En detecciones genéticas iniciales, muchos componentes de la maquinaria de ubiquitinación de proteínas fueron identificados, en particular los componentes y reguladores de la proteína Skp1-culina-caja F (complejo SCF) E3 ubiquitina ligasa, tal como el componente de la caja F llamado TIR1 (Leyser *et al.*, 1993; Ruegger *et al.*, 1998), implicando que la regulación de la estabilidad proteica es parte crucial de la señalización auxínica.

Dado el rápido recambio de los represores Aux/AIA auxina-dependiente, se pensó que la estabilidad de los represores Aux/AIAs son regulados por degradación dependiente de ubiquitinación. En este contexto, los Aux/AIAs son reclutados por SCF<sup>TIR1</sup> e interactúan directamente a través de su dominio II con TIR1 de manera auxina-dependiente; entonces los represores son ubiquitinados y por lo tanto marcados para su degradación (Gray *et al.*, 2001). Aunque todos los componentes de la ruta han sido identificados, el mecanismo por el cual las auxinas activan a SCF<sup>TIR1</sup> y promueven su interacción con los represores Aux/AIAs no es clara. A través del análisis paso a paso de cada uno de los componentes que afectan la interacción TIR1-Aux/IAA, se ha mostrado que las auxinas son el único elemento regulatorio en esta ecuación. TIR1 es capaz de ligar auxinas a concentraciones fisiológicamente relevantes (Kd ~20–80 nM), la unión de auxinas con TIR1 es requerido para estimular la interacción entre TIR1 y los represores Aux/AIAs (Dharmasiri *et al.*, 2005a; Kepinski & Leyser, 2005). El análisis cristalográfico de esta interacción muestra que TIR1 contiene un bolsillo hidrofóbico en el cual las auxinas y otros compuestos análogos se pueden unir. De forma interesante, las auxinas no cambian la conformación de TIR1, sino que en su lugar actúan como un “pegamento molecular”, llenando la cavidad hidrofóbica en la superficie de interacción, hecho que potencia la interacción TIR1-Aux/AIA (Tan *et al.*, 2007). Estas observaciones demuestran que TIR1 es el prolongadamente buscado receptor de auxinas. Más aún, al menos tres proteínas caja F relacionadas con TIR1 (caja F de unión a auxina o AFB) también interactúa de una manera auxina-dependiente con los represores Aux/AIAs, siendo en gran medida redundantes con TIR1 mediando las respuesta auxínica (Dharmasiri *et al.*, 2005b). La importancia de la ruta es ilustrada por el hecho de que para todos los componentes se pueden encontrar homólogos en genomas ancestrales de plantas terrestres, como los encontrados en el musgo *Physcomitrella patens* (Rensing *et al.*, 2008).

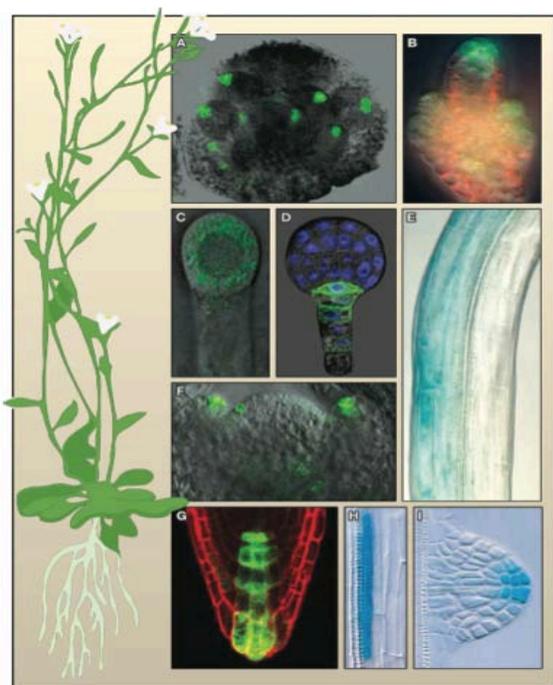
Cuando las concentración de auxina es baja, los represores Aux/AIAs son más estables y pueden interactuar con los ARFs para inactivarlos mediante el reclutamiento del correpresor TPL (TOPLESS, proteínas represoras de la transcripción); a altas concentraciones de auxina, éstas estabilizan la interacción TIR1/AFBs y las proteínas represoras Aux/IAA. En asociación con SCF<sup>TIR1/AFBs</sup>, los Aux/AIAs son ubiquitinados y son marcados para su proteólisis, resultando en la desrepresión de los ARF y la modulación de la transcripción (Fig. 11). Aunque esta ruta de señalización auxínica es muy corta y simple, el número de genes que se encuentran involucrados en cada nivel es amplio, proporcionando a las plantas con una impresionante gama de combinaciones posibles para la transcripción mediada por auxinas. De esta manera, las células presentan varias entradas y salidas durante la señalización auxínica, dependiendo del contexto de desarrollo.



**Figura 11: Ruta de señalización auxínica.** Activadores ARF se unen a los elementos de respuesta a auxinas presentes en genes de respuesta a auxina. a) Cuando las concentraciones de auxina son bajas, los represores Aux/IAA asociados con los activadores ARF (por medio de los dominios III y IV) restringiendo la expresión de dichos genes. b) Cuando las concentraciones de auxina incrementan, las auxinas se unen al receptor TIR1 que forma parte del complejo SCF<sup>TIR1</sup>, conduciendo al reclutamiento de los represores Aux/IAA por TIR1. Una vez captado por el complejo SCF<sup>TIR1</sup>, el represor comienza una ruta que conduce a su degradación y la subsecuente activación de los genes de respuesta a auxina. c) Representación de los cuatro dominios conservados de los represores Aux/IAA. El péptido sintético del dominio II es suficiente para marcar a Aux/IAA para su unión al receptor de auxina TIR1, el núcleo de residuos que conduce a esta unión es GWPPV (G, glicina; W, triptófano; P, prolina; V, valina). Tomado de Guilfoyle, 2007.

Uno de los descubrimientos más importantes durante los últimos 15 años en el estudio de las auxinas, es el hallazgo de que las auxinas se encuentran distribuidas diferencialmente dentro de los tejidos vegetales (Fig. 12), característica que parece estar asociada con la acción de dicha hormona (revisado en Tanaka *et al.*, 2006). En algunos casos, las auxinas se acumulan localmente dentro de una célula individual o un grupo de ellas (máximo de auxina); en otros casos su distribución entre células es mejor descrito como un gradiente (en este contexto el término gradiente debe usarse de acuerdo con su significado inicial, a saber, como un distribución gradual). El concepto de distribución diferencial de auxina emerge hace más de un siglo, durante estudios sobre la evaluación del mecanismo que subyace en el crecimiento diferencial en respuesta a estímulos medioambientales como luz o gravedad (tropismo). Dependiendo de la concentración y tejido, las auxinas estimulan o inhiben la elongación celular (Thimann, 1938). De esta forma, la distribución diferencial de auxina a través de un órgano, como la raíz o el tallo, inducida por un estímulo, conduce al crecimiento diferencial que a su vez resulta en la flexión del tejido. Basado en este principio, raíces y tallos redirigen su crecimiento durante respuestas trópicas en direcciones opuestas. Por ejemplo, la graviestimulación conduce a un incremento en la acumulación de auxina en el parte inferior de la raíz o tallo (revisado en Tanaka *et al.*, 2006). En raíces, esta acumulación de auxina inhibe la elongación provocando la flexión hacia abajo de las raíces; mientras que en tallos, se estimula el crecimiento provocando a los brotes su flexión hacia arriba (revisado en Whippon & Hangarter, 2006; Friml *et al.*, 2002b). Las auxinas también desempeñan un papel importante durante el llamado síndrome de evitar la sombra. Cuando las plantas han sido cubiertas por sus vecinas y compiten por luz solar, los cambios en la calidad de luz inducidos por la sombra, desencadenan la biosíntesis local de auxinas que aceleran la elongación del tallo (Tao *et al.*, 2008).

Además de cumplir un papel importante en la regulación del crecimiento en respuesta a estímulos medioambientales, las auxinas tienen múltiples funciones en procesos organogénicos y de formación de patrones. Durante la embriogénesis temprana, un patrón altamente dinámico de acumulación de auxina marca el sitio de decisiones importantes de desarrollo, tales como la especificación de la célula apical y el posterior establecimiento del polo de la raíz y cotiledones (Friml *et al.*, 2003). Durante el crecimiento post-embriionario de plantas, la actividad diferencial de las auxinas establecen marcas distintivas de desarrollo de la organogénesis *de novo* de hojas, flores, órganos florales y raíces laterales (Benková *et al.*, 2003). Primero, las auxinas se acumulan en la ubicación de la iniciación del órgano nuevo (Dubrovsky *et al.*, 2008; Heisler *et al.*, 2005) y posteriormente, un gradiente de auxina se establece a lo largo del eje de crecimiento del primordio en desarrollo con un máximo de auxina en la punta (Benková *et al.*, 2003). Una vez que el meristemo de una raíz lateral o primaria se convierte en funcional, se forma un gradiente estable de auxina con su máximo en el centro quiescente y en la células jóvenes de la columela (Sabatini *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2002a), el cual es requerido para mantener el patrón del meristemo radicular (Blilou *et al.*, 2005). Más aún, la distribución diferencial de auxinas parece ser importante durante el desarrollo de hojas, donde el incremento en la actividad auxínica corresponde con la formación de tejido vascular durante la venación de la hoja (formación de venas) (Mattsson *et al.*, 2003; Scarpella *et al.*, 2006). La versatilidad de las auxinas resulta inquietante debido a que es difícil imaginar un mecanismo común por el cual una sustancia química simple puede actuar como una señal específica en un variedad de procesos.



**Figura 12: Patrones de distribución auxínica durante el desarrollo de *Arabidopsis*.** La distribución de actividad auxínica es visualizada por la actividad de reporteros de respuesta a auxina que expresan proteína verde fluorescente (*DR5rev::GFP*) (A, B, C, D, F y G) así como *DR5::GUS* (E, H y I). Las siguientes son ubicaciones de actividad auxínica: A) Puntas de primordios de órganos florales dentro del meristemo de inflorescencia. B) Punta de un primordio del óvulo. C) Célula vegetal de un cigoto en división. D) Polo de la raíz de un embrión en etapa globular. E) Lado sombreado de un hipocótilo foto-estimulado. F) Posición de la iniciación de órganos y primordios florales en el meristemo del brote. G) Meristemos apical de la raíz. H) Sitio de iniciación de raíces laterales. I) Punta del primordio de una raíz lateral emergente. Tomado de Vanneste & Friml, 2009.

Las auxinas son importantes para muchos aspectos en el **desarrollo de las raíces**, incluyendo la iniciación y salida del meristemo radicular, modelado del meristemos apical, gravitropismo y elongación de la raíz. Las auxinas juegan un papel clave en el desarrollo de raíces adventicio (RA) y raíces laterales (RL) (De Klerk *et al.*, 1999; Overvoorde *et al.*, 2010; Pop *et al.*, 2011; Lavenus *et al.*, 2013; Bellini *et al.*, 2014; revisado por Verstraeten *et al.*, 2014). Los mutantes o tratamientos que resultan en el disturbio del transporte polar de auxinas han mostrado defectos en la formación de RA y RL (Reed *et al.*, 1998; Bhalerao *et al.*, 2002; Himanen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2012; Sukumar *et al.*, 2013).

La observación temprana de que la aplicación de auxinas exógenas o sintéticas favorecían el enraizamiento de esquejes, ha sido repetidamente confirmada y las auxinas han sido usadas en la horticultura convencional por mucho tiempo. Las propiedades de enraizamiento de las auxinas aplicadas exógenamente han guiado a dos conceptos: primero, que esquejes o brotes deben acumular necesariamente una cierta cantidad de auxina natural o sintética con la finalidad de ser capaces de enraizar; y segundo, que las auxinas aplicadas simplemente incrementan el volumen de auxina endógena (revisado en Gaspar *et al.*, 1992). Durante los años 80s, experimentos con el objetivo de establecer una relación entre los niveles de auxina y el proceso de enraizamiento han guiado a resultados muy distintos (Gurumurti *et al.*, 1984; Haissig, 1986; Jackson, 1986; Davis *et al.*, 1988; Gaspar & Hofinger, 1988).

Varios trabajos han reportado el papel de un contenido de auxina que regula el llamado sistema auxina-oxidasa, relacionando de manera inversa el contenido de AIA endógeno de un tejido vegetal u órgano con su actividad auxina-oxidasa (Pilet & Gaspar, 1968; revisado en Gaspar *et al.*, 1992); esto condujo a muchos investigadores a ocuparse de los cambios en la actividad auxina-oxidasa en relación con la formación de raíces (Mato & Vieitez, 1986; Bhattacharya, 1988 y referencias dentro; Moncousin, 1991; revisado en Gaspar *et al.*, 1992). La actividad del llamado sistema AIA-oxidasa fue posteriormente atribuida a una o varias peroxidadas (revisado por Gaspar *et al.*, 1982). Debido a que la medición de la actividad de peroxidasa es más sencilla que la de la actividad AIA-oxidasa, las relaciones entre diferentes aspectos de enraizamiento y los cambios en la actividad de las peroxidadas e isoperoxidasas han sido investigadas por muchos autores.

La formación de raíces tiene 3 fases distintas: inducción de la raíz en el que cambios moleculares y bioquímicos ocurren antes de cualquier evento citológico; iniciación de la raíz donde las primeras modificaciones anatómicas tienen lugar; y la protrusión, correspondiente a la emergencia del primordio de la raíz (Berthon *et al.*, 1990; Gaspar *et al.*, 1992; Heloir *et al.*, 1996). El proceso de enraizamiento también involucra una serie de cambios fisiológicos que están asociados con variaciones en la concentración de ácido-

3-indol acético y con la actividad de peroxidasa (Hausman, 1993; Moncousin, 1988), se ha observado una relación inversa entre la concentración de auxina y la actividad de peroxidasa durante este proceso [Gaspar *et al.*, 1994; Gendreau *et al.*, 1997; Ripetti *et al.*, 1994].

Un pico específico de actividad de peroxidasa (incremento en la actividad enzimática seguido por un decremento) ha sido generalmente encontrado en extractos crudos de esquejes de tallos y brotes antes de la formación de raíces (revisado en Gaspar *et al.*, 1992; Vatulescu *et al.*, 2004) (Fig. 13). Algunos efectores de naturaleza fenólica también juegan un papel importante en los cambios observados en la actividad de peroxidasa. El pico de actividad de peroxidasa no finaliza en la fase inductiva del enraizamiento, como se ha propuesto en el pasado, sino más bien en la fase de iniciación antes de la formación e identificación del primordio radicular.

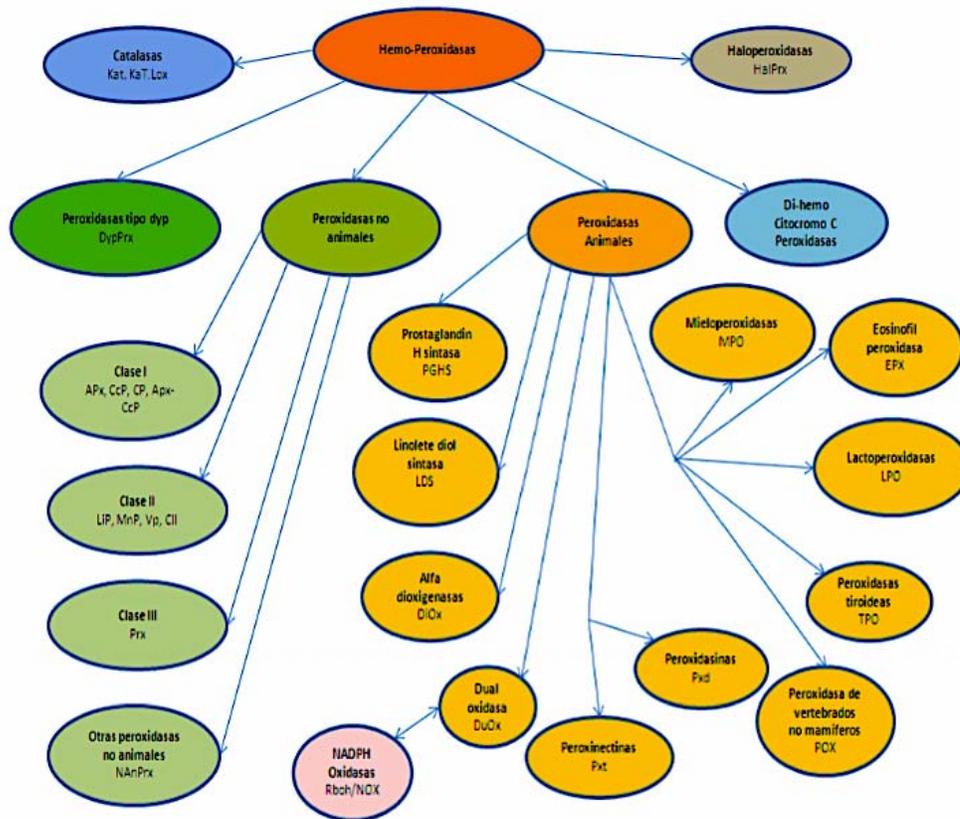


**Figura 13: Cambios cuantitativos en la actividad total de peroxidasa, la flecha roja denota el pico máximo de actividad que marca el fin de la fase de iniciación y el inicio de la fase de la protrusión del meristemo radicular. Tomado de Vatulescu *et al.*, 2004.**

#### Generalidades sobre peroxidasas

Durante la colonización de ambientes más oxigenados los organismos tuvieron la necesidad de desarrollar estrategias para lidiar con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para contrarrestar dichas moléculas los organismos aerobios poseen grandes conjuntos de proteínas, entre ellas las peroxidasas. Las peroxidasas (EC 1.11.1.x) pueden ser definidas como enzimas que catalizan la oxidación de varios sustratos mediante la reducción del peróxido de hidrógeno a agua. Esta clase de enzimas se encuentran presentes en todos los reinos donde forman grandes familias multigénicas. La diversidad de isoformas y su función bioquímica les confieren papeles importantes en distintos eventos durante el desarrollo de los organismos; existen sin embargo organismos que carecen de peroxidasas, como el caso de algunas bacterias y algunos eucariotes parásitos amitochondriados (Apicomplexa, Diplomonadida, Microsporidia) que presentan otros tipos de moléculas. Se hipotetiza que la adquisición de las peroxidasas pudo ocurrir durante los eventos de simbiosis que dieron paso a las mitocondrias y cloroplastos que contenían una o varias secuencias ancestro parecidas a peroxidasas de clase I, las cuales se duplicaron y diversificaron (Passardi *et al.*, 2007).

Las peroxidasas pueden contener o no grupo hemo. La mayoría de las peroxidasas hemo pertenecen a dos amplias familias: peroxidasa animales y no animales (Fig. 14). Algunos estudios han intentado comprobar si estos dos tipos de peroxidasas se encuentran relacionadas filogenéticamente, sin embargo debido a la falta de información disponible, la búsqueda de dichas relaciones no ha resultado exitosa (Passardi *et al.*, 2007).



**Figura 14: Superfamilia de peroxidasas con grupo hemo. Tomado de Peroxibase (peroxibase.toulouse.inra.fr) (Fawal *et al.*, 2013).**

## Peroxidasas no animales

### Descripción y clasificación

Esta superfamilia comprende a las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas las cuales a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y se encuentran evolutivamente relacionadas (Welinder & Gajhede, 1993). Dicha superfamilia comprende tres diferentes clases de peroxidasas: Intracelulares o de clase I (EC 1.11.1.5/.6/.11), las liberadas por hongos o de clase II (EC 1.11.1.13/.14) y las secretadas por plantas o de clase III (EC 1.11.1.7). Todas estas exhiben en común un grupo hemo formado por una Protoporfirina IX y un Fe(III) (forma férrica en estado basal) así como una estructura tridimensional conservada; sin embargo, presentan un bajo nivel de identidad en sus secuencias de aminoácidos además de estar asociadas a distintas funciones y localizaciones subcelulares (Gaspar *et al.*, 1982 y referencias dentro). El mecanismo evolutivo de un ancestro de clase I a clase III es poco claro, pero puede relacionarse con la emergencia de las plantas terrestres y como efecto de los cambios dramáticos en las condiciones de crecimiento (nuevos órganos, estructuras y condiciones atmosféricas)(Passardi *et al.*, 2007).

#### Clase I: Peroxidasas de procedencia procarionota

Este tipo de peroxidasas se encuentra en procariontes, plantas y en hongos; no presentan glicosilación y carecen de péptidos señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidasas de las clases II y III), tampoco presentan iones de calcio estructurales o puentes disulfuro

(Welinder, 1992; Passardi, 2007); elementos característicos de las peroxidadas de clase III (Prx CIII). Existen tres tipos de acuerdo a la clasificación de enzimas (EC) en esta clase: EC 1.11.1.5 (ferrocitocromo-c: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), EC 1.11.1.6 (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa o más comúnmente conocida como catalasa peroxidasa) y EC 1.11.1.11 (L-ascorbato: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa).

#### Clase II: Peroxidadas fúngicas

---

Las peroxidadas de clase II son secretadas por los Homobasidiomicetes para degradar la lignina de origen vegetal. Esta clase consiste en: Lignina-peroxidadas (LiP; EC 1.11.1.14) y las Manganeso-peroxidadas (MnP; EC 1.11.1.13). Dentro de esta clase se encuentra otro grupo de peroxidadas, las *peroxidadas versátiles* (VP, sin EC definido) las cuales engloban las propiedades catalíticas de las LiP y MnP. A diferencia de las de clase I, son glucosidadas y contienen iones calcio ( $\text{Ca}^+$ ); puentes disulfuro; así como péptidos señal que permite su secreción directamente al retículo endoplásmico. Estas peroxidadas poseen la habilidad de oxidar moléculas con un alto potencial redox como la lignina, además de ser esenciales en la descomposición material vegetal muerto y el reciclaje del suelo (Conesa *et al.*, 2002). Se plantea un proceso coevolutivo entre los hongos lignolíticos de esta clase y la diversificación de los componentes de la pared celular, lo cual llevó a la acumulación de varias copias de la misma o diferentes familias de peroxidadas de clase II (Passardi *et al.*, 2007).

#### Clase III: Peroxidadas de secreción en plantas

---

Esta clase de peroxidadas son exclusivas de las plantas donde forman grandes familias multigénicas (73 genes completos de peroxidadas de clase III, 2 pseudogenes y 6 fragmentos esparcidos en los 5 cromosomas de *Arabidopsis thaliana*, 181 en *Eucalyptus grandis*, 138 en *Oryza sativa*, 143 en *Brachypodium distachyon* y 73 en *Solanum lycopersicum* L.) (Tognolli *et al.*, 2002; Fawal *et al.*, 2013). Más aún, otras isoformas pueden ser generadas por modificaciones postranscripcionales y postraduccionales (Van Engelen *et al.*, 1991). La expansión de genes de esta familia de peroxidadas (amplio número de genes) y los eventos de duplicación (grupos de genes específicos de cada especie) parece no seguir un orden general (Dunand *et al.*, 2011); no obstante su secuencia primaria se distingue de las otras clases por sólo algunos residuos (Passardi *et al.*, 2004a), así mismo su estructura espacial es muy similar a las de la clase II. Su estructura está caracterizada por aminoácidos conservados necesarios para el ligado del grupo prostético, la transferencia de electrones y su estructura tridimensional; la variabilidad en sus secuencias está ligada a su afinidad de sustratos (canal de acceso al grupo hemo). Además, también presentan iones de calcio, puentes disulfuro y un residuo *N*-terminal como señal para su secreción (Welinder, 1992); algunas de ellas pueden presentar un residuo *C*-terminal adicional, que se sugiere, puede dirigir su secreción en la vacuola (Carter *et al.*, 2004). Las Prx CIII presentan dos tipos de ciclo, durante el ciclo hidroxílico las peroxidadas pasan a través de un estado Fe (II) y usan el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) para generar radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Durante su ciclo peroxidativo regular estas enzimas usan  $\text{H}_2\text{O}_2$  como aceptor y varios sustratos como donadores, los cuales son convertidos en radicales, en este ciclo el hierro del grupo hemo pasa de un estado Fe(II) a Fe(IV).

#### Peroxidadas de clase III: Peroxidadas de secreción en plantas

---

##### Generalidades sobre peroxidadas de Clase III

---

Las Prx CIII (donante:  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa EC 1.11.1.7) son enzimas cuya función elemental es la oxidación de diversos sustratos a expensas del peróxido de hidrógeno. En *A. thaliana*, las secuencias codificantes de la mayoría de los genes de peroxidadas se encuentran fragmentados por tres intrones (patrón clásico: cuatro exones, tres intrones) en posiciones altamente conservadas (Fig. 15C y B). Los intrones 1 y 3 se encuentran localizados en la mitad de los dominios conservados I y III, respectivamente; el intron 2 se localiza después del dominio 2 (Fig. 15C). Esto sugiere la existencia de un gen ancestral con este patrón clásico. Sin embargo, se han observado variaciones en este patrón, los cuales implican la ganancia o la pérdida de intrones. La abundancia de genes con un bajo número de intrones en monocotiledóneas y en organismos viridiplantae basales, algunos con un solo intron e incluso carentes totalmente de ellos, es consistente con la hipótesis de la pérdida de intrones durante la evolución (Lin *et al.*, 2006; Roy & Penny, 2007), lo cual se encuentra en concordancia con la idea del patrón clásico de tres intrones. Lo contrario parece ocurrir en

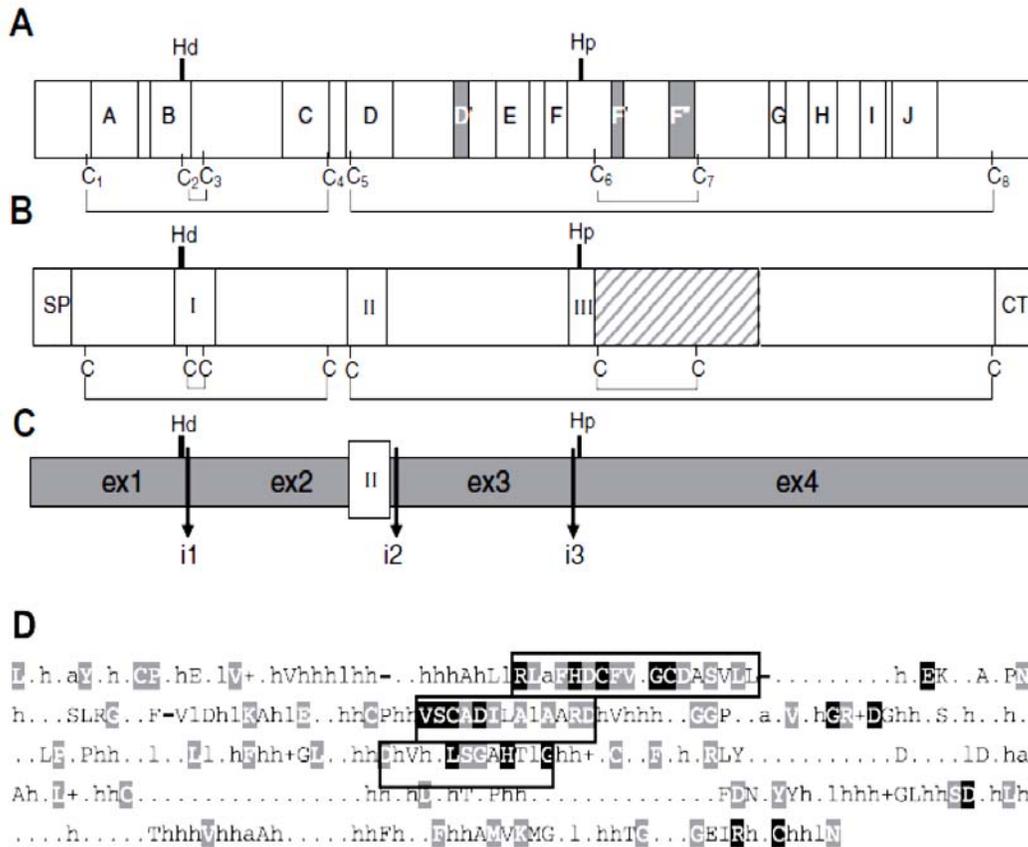
dicotiledóneas, donde se plantea la existencia de un ancestro con pocos o ningún intrón y la posterior ganancia de ellos (Mathé *et al.*, 2010).

El análisis de la secuencia de una peroxidasa catiónica inducida por lesiones mecánicas, durante experimentos tempranos para dilucidar el control transcripcional de genes de Prx CIII en *A. thaliana*, se observaron motivos regulados por luz, así como motivos de unión a factores de transcripción en *-trans* (Fujiyama *et al.*, 1995). En el mismo rubro, la caracterización de los promotores de dos peroxidases de arroz, una aniónica de pI 5.3 y otra catiónica de pI 8.5, mostró que ambos promotores presentan una variedad de motivos regulatorios en *-cis*: secuencias de respuesta a auxinas como AuxRE (TGTCTC) y ARF (CATATG), motivos involucrados en la activación transcripcional de genes por auxinas y/o ácido salicílico, otros por ácido abscísico, etileno, así como elementos regulados por luz (Chou *et al.*, 2010). Østergaard y colaboradores (Østergaard *et al.*, 1998), mostraron que los promotores de 23 de un total de 30 secuencias disponibles, contenían en sus regiones 5'-UTRs un 40-71% de adenina, una característica observada en genes que predominantemente codifican para proteínas inducidas por algún tipo de estrés, resultados parecidos fueron mostrados posteriormente por otro grupo de investigación (Welinder *et al.*, 2002).

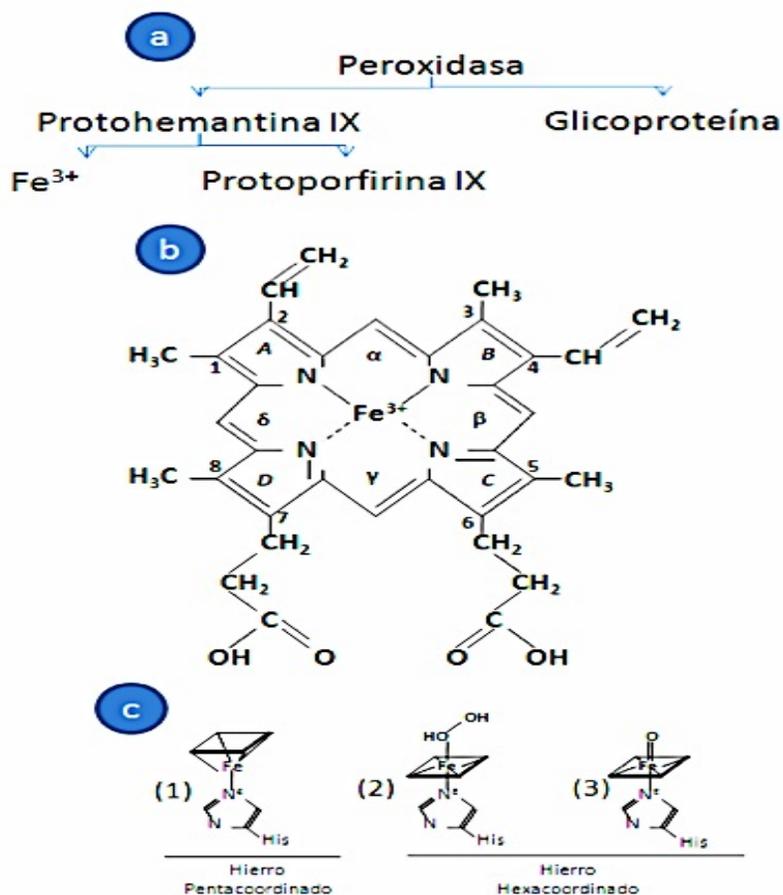
El análisis de información transcriptómica y proteómica de la pared celular de *A. thaliana*, muestran la expresión diferencial de las distintas isoformas de Prx CIII distribuyéndose en toda la planta, detectándose actividad en todos los órganos y en casi todos los tejidos, siendo de particular interés el caso de las raíces, lugar preferente de acumulación de mensajeros de Prx CIII, mostrándose también dicha acumulación preferente en arroz (Hiraga *et al.*, 2000). La razón de esta acumulación no ha sido elucidada, sin embargo, debido a la información con que se cuenta acerca de los procesos que catalizan las Prx CIII, es posible que la actividad de distintas isoformas sea necesaria durante el desarrollo y mantenimiento del tejido de la raíz; evolutivamente se puede especular que dicha acumulación se encuentra relacionada con la ganancia de funciones durante la emergencia de las plantas terrestres (Delaux *et al.*, 2012).

La estructura secundaria de una peroxidasa de clase III se compone de una sola cadena peptídica, un grupo prostético: ferriprotoporfirina IX (usualmente referida como grupo hemo tipo b) que se encuentra en su centro activo y que contiene un ion de hierro en estado de oxidación de +3 y en cuya coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos y el nitrógeno  $\epsilon$  del anillo imidazólico de una histidina axial denominada histidina proximal (Fig. 16A y B). El sexto ligando se encuentra libre y puede variar a lo largo del ciclo catalítico (Fig. 16C). No obstante que presentan un bajo nivel de identidad (menor al 20%), todas presentan una estructura secundaria y plegamiento similar (Banci, 1997; Finzel *et al.*, 1984; Welinder & Gajhede, 1993; Gajhede *et al.*, 1997). Los pesos de estas enzimas oscilan entre los 35,000 y los 100,000 Daltons (alrededor de 251 a 726 residuos).

Una peroxidasa de clase III está dividida en dos dominios estructurales bien definidos formados en su mayoría por  $\alpha$ -hélices (10 a 13) conectadas entre sí por medio de bucles y vueltas, también se encuentran formadas en menor cantidad por láminas beta y aparentemente sólo presentan conservados algunos residuos de Glicina y Prolina esenciales para su forma funcional (Banci, 1997). La estructura secundaria de una peroxidasa (Fig. 15A) se compone de 10-13  $\alpha$ -hélices, con 10 hélices (A-J) que representan aproximadamente el 50% de la molécula y que además ocupan posiciones topológicamente similares a otros miembros de la superfamilia de las peroxidases vegetales. Esta correspondencia estructural es en ocasiones referida como el núcleo de plegamiento de una peroxidasa. La estructura también presenta cinco láminas  $\beta$ , cuatro de ellas formando pares antiparalelos; el dominio I (distal), formado por el extremo N-terminal y de las hélices A-D, se encuentra distribuido sobre la hélice B que se localiza sobre el grupo hemo; un lazo de gran longitud entre las hélices D y E conecta este dominio con el dominio II (proximal); éste contiene de las hélices E-I y la mayor parte de la estructura B (beta). Otro elemento estructural de importancia son los cuatro puentes disulfuro que se forman en pares invariables de residuos de Cys 11-91, 44-49, 97-301 y 177-209 (numeración de Peroxidases de rábano C o HRP C) tres en el dominio distal y uno en el proximal, así como un puente de sal que se forman entre dos invariables residuos de Asp y Arg (Asp99 y Arg123 en numeración de HRP C); ambos tipos de uniones ayudan a mantener la estructura, plegamiento y función de la proteína (Schuller *et al.*, 1996).



**Figura 15:** Esquema estructural de una peroxidasa de clase III. (A) Estructura secundaria. La composición y posición de hélices se representan usando los residuos conservados de Cys (C) y las Hys distal y proximal (Hd and Hp) como referencia. Las hélices en gris oscuro son específicas de las peroxidases de clase III. Hélices en gris tenue se encuentran conservadas entre peroxidases de clase I, II y III. (B) Estructura primaria. Los dominios altamente conservados I, II y III corresponden al dominio distal de ligado al hemo, dominio desconocido y dominio proximal de ligado al hemo, respectivamente. La región sombreada corresponde a la región variable responsable de la especificidad catalítica. El péptido señal (SP) y la extensión C-terminal (CT) son altamente variables en longitud y secuencia de aminoácidos. (C) Composición clásica intron-exón con 4 exones (ex1, ex2, ex3, ex4) y 3 intrones (i1, i2, i3). (D) Secuencia de aminoácidos consenso de peroxidasa de arroz adaptada de Passardi y colaboradores (2004 cita). El 60% de la secuencia se obtuvo del alineamiento de 138 secuencias proteicas de OsPrx (Mathé *et al.*, 2010 cita). Las cajas representan los tres dominios conservados (I, II and III en (B)). Los residuos conservados se representan sombreados: los sombreados negro corresponden a un consenso del 98% y sombreado gris al 60%. Los puntos representan aminoácidos variables, h para hidrofóbicos (A,C,F,G,H,I,K,L,M,R,T,V,W,Y), l para alifáticos (I,L,V), a para aromáticos (F,H,W,Y), + para positivos (H,K,R) y - para negativos (D y E). Tomado de Mathé *et al.*, 2010.



**Figura 16:** Estructura de una Peroxidasa; b) Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles; c) Diferentes estados de coordinación del hierro (1) el N<sup>ε</sup>His (Nitrógeno  $\epsilon$  de la His proximal), (2) el N<sup>ε</sup>His y una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y (3) el N<sup>ε</sup>His y un O.

Una característica que distingue a un peroxidasa de clase I y II de una de clase III es que estas últimas presentan varias  $\alpha$ -hélices extra adicionales al núcleo de plegamiento (hélices D, F' y F'' en el caso de HRP C) (Gajhede *et al*, 1997) (Fig. 17). La localización de F' y F'' es particularmente interesante ya que ocurren en una inserción relativamente larga que exhibe una considerable variabilidad entre las peroxidases vegetales. Esta inserción, la cual es delineada por las hélices F y G del núcleo de plegamiento, también comprende un puente disulfuro (177–209 en HRP C) que puede actuar como una restricción estructural de la dicha región. Otro punto de interés, es la presencia de residuos como Phe179 que contribuyen con el ligado de sustratos aromáticos.

Estas enzimas presentan sitios de glicosilación que se encuentran delimitados por el motivo Asn-X-Ser/Thr (donde X denota cualquier aminoácido) los cuales se encuentra sobre la superficie de vueltas o bucles que conectan hélices en el exterior de la molécula. La mayoría de las peroxidases vegetales contienen varios glicanos N-ligados los cuales representan alrededor de un  $\pm 25\%$  del peso total, estos azúcares protegen a la enzima de degradación proteolítica, estabilizan la conformación de la proteína y además se encuentran relacionados con su actividad (Chunfang & van Huystee, 1989; revisado en van Huystee *et al.*, 2004).

La estructura además, presenta dos iones de calcio que mantienen la estructura, los sitios de unión de los iones se encuentran altamente conservados en peroxidasa fúngicas y de plantas; cada ion calcio se encuentra en un dominio diferente: el ion del dominio proximal se encuentra fuertemente unido en comparación el ion de calcio distal que parece estar débilmente asociado debido a su cercanía a la superficie molecular y a su exposición al solvente. Los iones calcio se encuentran ligados a los residuos de las hélices B y F, que forman la superficie distal y proximal de la cavidad hemo, contiguos a cada una de las histidinas catalíticas (Banci, 1997). Estudios en los que se extrajeron los iones calcio muestran que estas enzimas pierden su actividad catalítica (Shiro *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1995) o se inactivan totalmente debido a cambios estructurales provocados por esta modificación (Sutherland & Aust, 1996; Sutherland *et al.*, 1997). La interacción de las Prx CIII con los polisacáridos de la pared celular parece ser dependiente de un grupo de aminoácidos básicos (Arg-262, Arg-268 y Arg-271 de Prx CIII de zucchini) (Carpin *et al.*, 2001) envueltos en el ligado de Ca<sup>+</sup>-poligalacturonato *in vitro* (Carpin *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2004; revisado en Francoz *et al.*, 2015).



**Figura 17:** Representación esquemática la estructura tridimensional de una peroxidasa de cacahuete (Schuller *et al.*, 1996) obtenida por cristalografía de rayos X. Se representa el grupo prostético en esqueleto de Ca así como estructuras secundarias en esquema de listón. El grupo hemo se encuentra entre los dominios distal y proximal. Los dos átomos de Ca<sup>+</sup> se presentan por sus radios de van der Waals, situados uno en cada dominio. Las dos α-hélices F' y F'' características de las peroxidasa de clase III son indicadas. Tomado de Veitch, 2004.

## Ciclos catalíticos

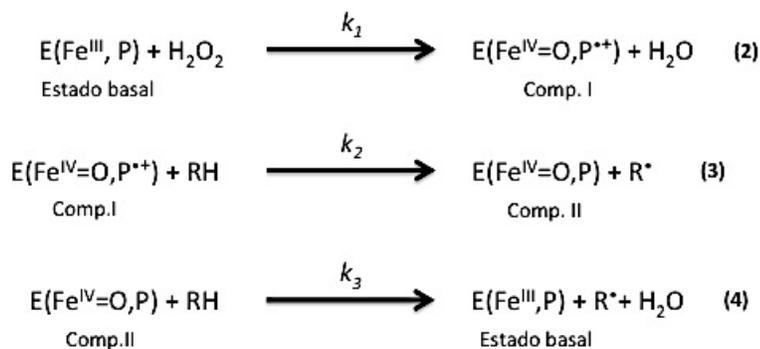
### Ciclo peroxidativo

En términos generales la mayoría de las reacciones catalizadas por una peroxidasa puede representarse de la siguiente forma, donde RH y R' representan un sustrato reductor y su forma radical oxidada, respectivamente. De esta manera, una peroxidasa se puede definir por la siguiente reacción general:



El proceso catalítico llevado a cabo por las peroxidasa puede ser visto en dos partes: la reacción de las enzimas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la interacción de la enzima con los distintos sustratos donadores. La evidencia es apoyada por las distintas estructuras tridimensionales de intermediarios catalíticos o complejos enzima-sustrato disponibles (Gajhede *et al.*, 1997; Schuller *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1990), así como de la evidencia obtenida por mutagénesis dirigida para determinar y explorar el papel de aminoácidos particulares. La reacción del grupo hemo frente al peróxido de hidrógeno genera agua y la formación de un intermediario con

un alto estado de oxidación conocido como Compuesto I (Comp. I), oxidado con dos electrones y el cual se considera que se encuentra dos equivalentes oxidantes por arriba del estado Fe(III) basal de la enzima. Este estado comprende un centro oxiferril ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) y un catión radical el cual se puede localizar, dependiendo de la isoenzima, en el grupo hemo o en un residuo (Hiner *et al.*, 2002; Jones & Dunford, 2005; revisado por Veitch, 2004). Durante el primero y segundo pasos de reducción con un electrón cada vez, el Comp. I es reducido al Comp. II donde el catión radical es reducido a su estado completo y el sustrato reductor RH es oxidado en un producto radical  $\text{R}^{\bullet}$ . El Compuesto II (Comp. II), una segunda especie oxiferril Fe(IV) que se encuentra un equivalente oxidante por arriba del estado basal de la enzima. Finalmente, el Comp. II es reducido una segunda ocasión con un electrón proveniente de una molécula de sustrato para llevar a la enzima a su estado basal Fe(III), dicho sustrato es oxidado a su estado radical correspondiente, este paso es representando por la ecuación (4). Cada paso del ciclo ha sido estudiado a profundidad y puede ser considerado en dos partes: la formación del Comp. I, y la reducción de los Comp. I y II. En el siguiente esquema, E representa una peroxidasa de clase III, para la cual el estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo y el estatus de la porfirina (P) es indicado dentro de paréntesis, RH y  $\text{R}^{\bullet}$  representan un sustrato reductor y su forma radical oxidada. Las constantes cinéticas  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  corresponden a la tasa de formación del Comp. I, la tasa de reducción del Comp. I y la tasa de reducción del Comp. II, respectivamente; el ciclo puede quedar resumido de la siguiente forma:

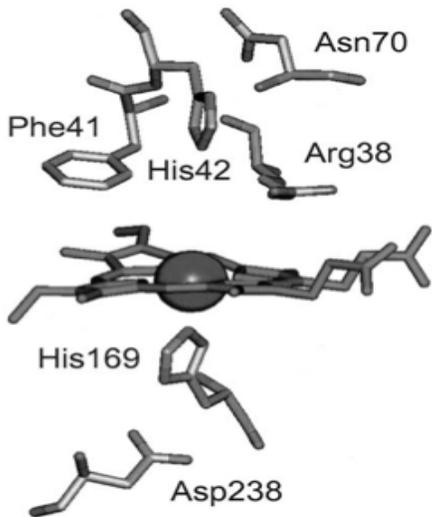


#### *Papel de los residuos del bolsillo hemo en la catálisis del peróxido y la formación de Compuesto I*

Las relaciones estructurales entre los residuos de aminoácidos en el bolsillo hemo involucrados en la catálisis del peróxido se ilustran en la Fig. 18. Estos residuos se encuentran ya sea invariables o altamente conservados en todas las peroxidases vegetales de clase III. Usando el ejemplo de la peroxidasa de cacahuate, es posible observar que en el lado proximal del plano del hemo, la His169 (Histidina proximal) se encuentra directamente coordinada al átomo de Fe del grupo hemo a través de su átomo Nε2 de su cadena lateral. Adicionalmente el grupo carboxilato de la cadena lateral del Asp238 se une mediante un puente de hidrógeno al protón Nδ1 de la propia His169 proximal, interacción que podría influenciar el grado del carácter imidazolato (forma aniónica del imidazol) del anillo de la Histidina proximal. En el lado distal del plano del hemo los residuos de mayor importancia son Arg38, His42 y Asn70. El átomo Nε2 de la cadena lateral de la His42 (Histidina distal), se encuentra significativamente más alejada del átomo de Fe del hemo que su His169 contraparte, de esta forma el sexto sitio de coordinación se encuentra vacante y disponible para la unión del ligando, es decir por el sustrato reductor. Otra interacción de interés es un puente de hidrógeno entre del átomo de oxígeno del carbonilo de la cadena lateral de la Asn70 y el átomo Nδ1H de la His42. La presencia de las interacciones His-Asn y His-Asp tanto del dominio distal como proximal, resulta en una evidencia que sugiere que las peroxidases vegetales de esta clase surgen por una duplicación de genes (Welinder & Gajhede, 1993).

Poulos y Kraut (1980) -basándose en la estructura cristalizada de la citocromo *c* peroxidasa- propusieron un mecanismo de la catálisis del peróxido, asignando papeles específicos a las cadenas laterales de los residuos de His y Arg distales. Dos principios fueron establecidos de la interpretación de este mecanismo: (i) el átomo Nε2 de la cadena lateral de la His distal actúa como aceptor de protones cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es ligado en el sexto sitio de coordinación del átomo de hierro del grupo hemo y (ii) la cadena lateral de la Arg distal asiste en la estabilización de la carga durante la formación del compuesto I. El hecho de que estos residuos sean invariables en todos los miembros de la superfamilia de las peroxidases de origen vegetal, sugiere que este

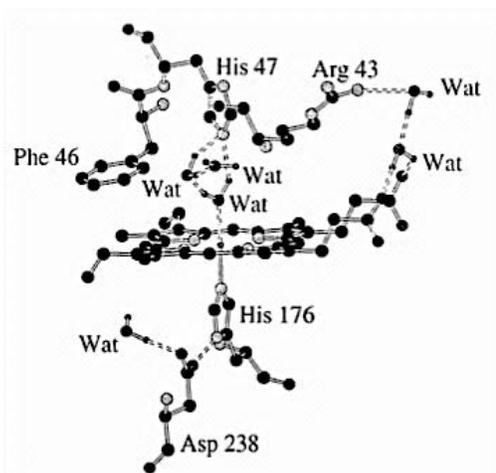
mecanismo también sea aplicable a las Prx CIII. A partir de la estructura cristalizada del Comp. I de la HRP C es posible observar que el átomo oxiferril está enlazado por un puente de hidrógeno al átomo NεH de la Arg38 y a una molécula de agua -molécula que surge de la ruptura heterolítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- la cual está ligada a la Arg38 y a la His42 a través de un puente de hidrógeno (Berglund *et al.*, 2002). La importancia de los residuos de His, Arg e incluso de la Asn distal ha sido mostrada en estudios de mutagénesis de sitio dirigida, en donde la tasa de formación del Comp I (*k<sub>I</sub>*) decrece dependiendo del aminoácido mutado (Veitch & Smith, 2001).



**Figura 18: Residuos de aminoácido en el bolsillo del grupo hemo de una peroxidasa vegetal (peroxidasa de cacahuete). El átomo de hierro (Fe<sup>III</sup> en estado basal) es mostrado como esfera en radio de van der Waals, este es coordinado por la His proximal (His170 en numeración de HRP C). El sexto sitio de coordinación en el plano distal del hemo se encuentra vacante y varía a lo largo del ciclo. Tomado de Veitch, 2004.**

Estudios sobre la formación del Comp. I a bajas temperaturas (Baek & van Wart, 1992), han permitido la caracterización de complejos temporales que ocurren durante la interacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que son producidos antes de la formación del Comp. I, compuesto referido como "Comp. 0" (Rodríguez-López *et al.*, 2001; Filizola & Loew, 2000).

A partir de la distinta evidencia obtenida de información cristalográfica (Gajhede *et al.*, 1997), así como de estudios espectroscópicos en mutantes puntuales de HRP C (Smulevich *et al.*, 1994; Howes *et al.*, 1997), surge otra característica de importancia, es decir la existencia de una red de puentes de hidrógeno que conecta los residuos distales y proximales dentro del bolsillo del grupo hemo, esta red se extiende hasta incluir los sitios de unión de los iones Ca<sup>+</sup>. Dunford (2001) planteó la hipótesis de que esta red funcionalmente actúa en la conducción electrónica. Todas las estructuras cristalizadas de peroxidases muestran en su sitio activo al menos cuatro moléculas de agua bien organizadas que son invariables en esas estructuras. Tres están presentes en el plano distal conectadas a través de puentes de hidrógeno con los residuos hidrofílicos de la cavidad del grupo hemo, que en conjunto forman una red que conecta a la His distal con una Arg, un propionato y a un residuo hidrofílico que siempre se encuentra presente en un lado del grupo hemo expuesto al solvente. La otra molécula de agua conservada se encuentra en el plano proximal, donde se encuentra invariablemente unida a un residuo de Asp por medio de un puente de hidrógeno (Fig. 19) (Poulos *et al.*, 1993).



**Figura 19: Puentes de Hidrógeno (líneas punteadas) y moléculas de agua (Wat) presentes alrededor del grupo hemo en la Lignina Peroxidasa (LiP) (Poulos *et al.*, 1993). Tomado de Banci, 1997.**

*Sitios de interacción con el sustrato y reducción de Compuesto I y II y elementos estructurales del sitio activo que determinan la interacción con el sustrato*

Como ya se mencionó, las Prx CIII catalizan la oxidación de una variedad de sustratos, de los cuales, los electrones tomados son necesarios para llevar a la enzima de su estado en el Comp. I al estado en el Comp. II y de este último al estado basal (ecuaciones 3 y 4). Ejemplos típicos de estos sustratos son pequeñas moléculas aromáticas como: aminas aromáticas, indoles, ácidos fenólicos y fenoles, así como polímeros grandes como la lignina. A menudo el perfil de productos formados por las reacciones catalizadas por las Prx CIII es complejo, esto debido a la formación de dímeros u oligómeros, los cuales también actúan como sustratos. Las estrategias empleadas para el estudio de los complejos formados antes de las reacciones de transferencia electrónica, han sido conducidas -a falta del análisis directo de las estructuras temporales formadas antes de las reacciones redox- por medio de ensayos basados en la inactivación enzimática de las Prx de CIII, los cuales han sido empleados como un método para determinar los sitios potenciales de la oxidación de los sustratos (Ortiz de Montellano, 1992). Estas estrategias involucran la incubación de la enzima con  $H_2O_2$  y un agente reactivo como la fenilhidrazina o azida de sodio. Las especies radicales que son generadas reaccionan para dar aductos hemo (derivados hemo sin cambios estructurales) que reflejan el ambiente local del sitio de interacción con el sustrato. En el caso específico de la HRP C con fenilhidrazina, se generaron derivados C18-hidroximetilo y C20-meso-fenil, indicando que el sustrato interactúa en una arista del grupo hemo expuesta al solvente en la proximidad de los grupos protonados metilo-C18 y meso-C20. Estos resultados se encuentran en concordancia con la información estructural de complejos enzima-sustrato aromático de peroxidases vegetales obtenidas por cristalografía de rayos X o por espectroscopia NMR (Veitch & Smith, 2001). En la Figura 22, se muestra un modelo de reducción de los Comp. I y II de una Prx CIII, los papeles específicos de algunos residuos del bolsillo del grupo hemo están basados en el análisis de estructuras tridimensionales de los complejos ternarios de la HRP C-ácido ferúlico y -cianuro (un derivado hexacoordinado de la enzima) (Henriksen *et al.*, 1999).

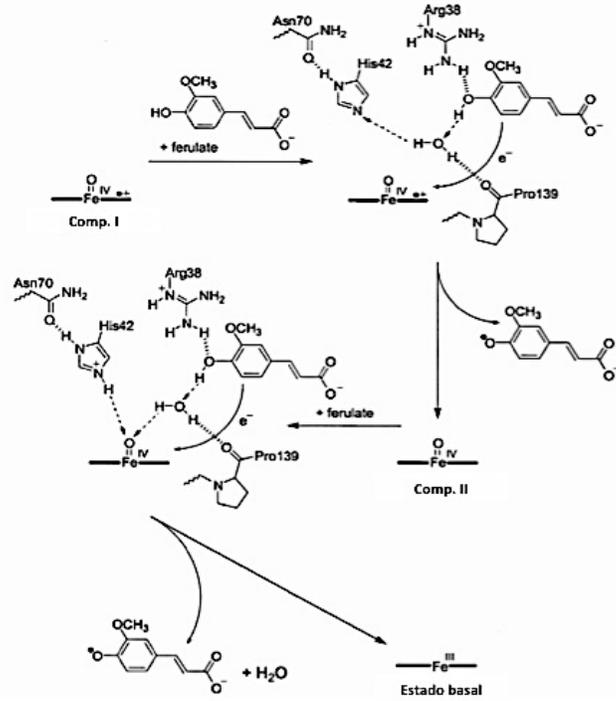
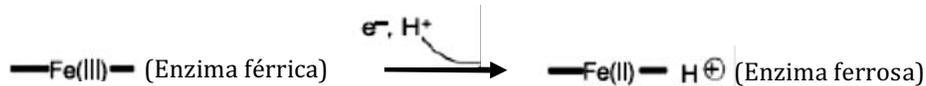


Figura 20: Mecanismo de reducción de los Comp. I y II de la HRP C con respecto al ácido ferúlico (ferulato a pH neutro) como sustrato reductor. Se señala el papel de los residuos del plano distal de la cavidad del grupo hemo así como una molécula de agua y la Pro139. Las líneas punteadas indican la dirección de la transferencia electrónica; la transferencia electrónica se muestra con flechas completas marcadas con e<sup>-</sup>. El modelo está basado en el original propuesto por Henriksen y colaboradores (1993). El mecanismo también comprende dos moléculas de agua que fueron propuestas posteriormente (Gajhede, 2001). Tomado de Veitch, 2004.

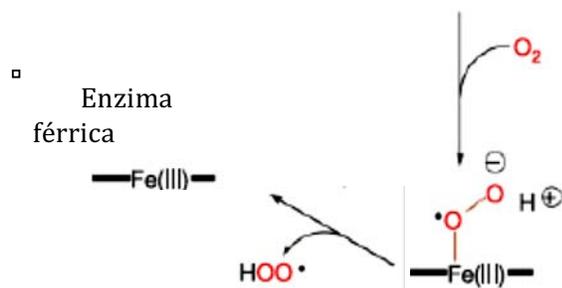
### Consumo de oxígeno molecular por Prx CIII

Las hemo-peroxidasas pueden catalizar reacciones consumiendo O<sub>2</sub>, éstas se reconocen como ciclo oxidasa, que es favorecido por bajos niveles de oxígeno, dada la mayor afinidad hacia el O<sub>2</sub> que presenta la ferropoxidasa (Acosta *et al.*, 1988).

Este ciclo consta de las siguientes etapas: el hemo en estado de reposo (Fe<sup>3+</sup>) puede recibir un electrón y un H<sup>+</sup>, a partir de algún agente reductor, formando el estado ferroso de la enzima, que tiene Fe<sup>2+</sup> y un H<sup>+</sup>, este paso acontece de la siguiente manera:



A continuación se capta O<sub>2</sub> y se forma el compuesto III, en el que el Fe<sup>2+</sup> al enlazar al átomo de la molécula de oxígeno provoca que exista en este último un electrón libre, se convierte en Fe<sup>2+</sup> y el segundo átomo de la molécula de O<sub>2</sub> adquiere entonces carga negativa, lo que promoverá que el H<sup>+</sup> se enlace a él, desprendiéndose posteriormente un radical ·O-O-H, al tiempo que se regenera el estado de reposo (la enzima férrica).

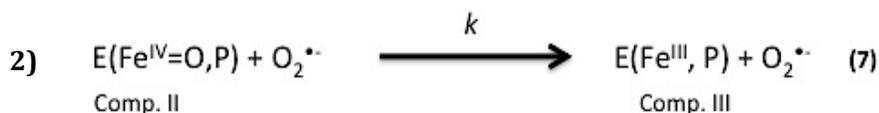
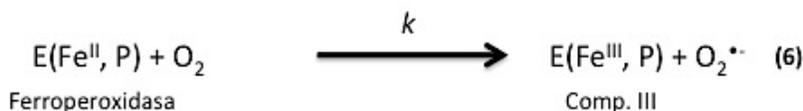
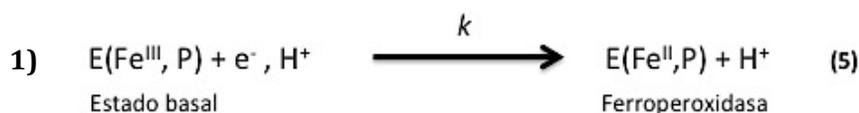


Las peroxidasas de este grupo desarrollan un mecanismo eficiente para capturar y activar rápida y específicamente al  $H_2O_2$ . La constante de velocidad bimolecular para la formación del compuesto I ( $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) es muy parecida al valor de la constante para reacciones limitadas por difusión (aproximadamente  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

La presencia de  $H_2O_2$  en el compartimento en el que se localizan las Prx CIII, el apoplasto, ha sido demostrado de diferentes maneras. Entre las evidencias más importantes, Fecht-Christoffers y colaboradores (2006), demostraron la capacidad de Prx CIII aisladas de fluido apoplástico de hojas de *Vigna unguiculata* L., de producir  $H_2O_2$  con el concomitante uso de NADH como sustrato; este hecho fue apoyado posteriormente por Fühns y colaboradores (2009), quienes en experimentos similares, mostraron esta misma capacidad por parte de cuatro Prx CIII apoplásticas.

#### Ciclo hidroxílico: Mecanismo de producción de ROS por peroxidasas de clase III

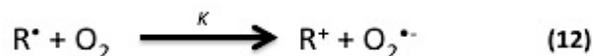
La generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) -intermediarios tóxicos resultado de la reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) con un electrón cada vez, consideradas como componentes centrales en la adaptación de las plantas a estrés biótico y abiótico, ya sea exacerbando el daño o mediando la señalización de la activación de la respuesta defensiva (Mehdy, 1994; Dat *et al.*, 2000)- involucra la formación de un intermediario o compuesto III (Comp. III), el conjugado ferro-oxígeno (oxiperoxidasa), el cual es generado por la interacción directa de la forma nativa de la enzima (forma férrica) con el anión superóxido o por la formación intermedia de la ferropoxidasa por medio de donadores de  $e^-$  y  $H^+$  (lo que ha sido identificado también como producto de la interacción entre el Compuesto II y  $H_2O_2$ ). El ciclo y la formación del Comp. III puede llevarse a cabo por las siguientes vías:



La asociación del Comp. III con peróxido de hidrógeno da como resultado la formación de ROS; adicionalmente se ha observado que el Comp. III desaparece en presencia de donadores y aceptores de electrones lo que lleva a la formación de la ferriperoxidasa (Yokota & Yamazaki, 1965), lo que hace del compuesto un híbrido entre los complejos ferroperoxidasa-oxígeno y el complejo ferroperoxidasa-anión superóxido; a su vez, el Comp. III puede reaccionar con la ferroperoxidasa y el Comp. II liberando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  (Gaspar *et al.*, 1982). Un posible mecanismo para la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por las peroxidasas involucra la reducción del Comp. III, se puede expresar mediante la siguiente ecuación (Dunford, 1993):

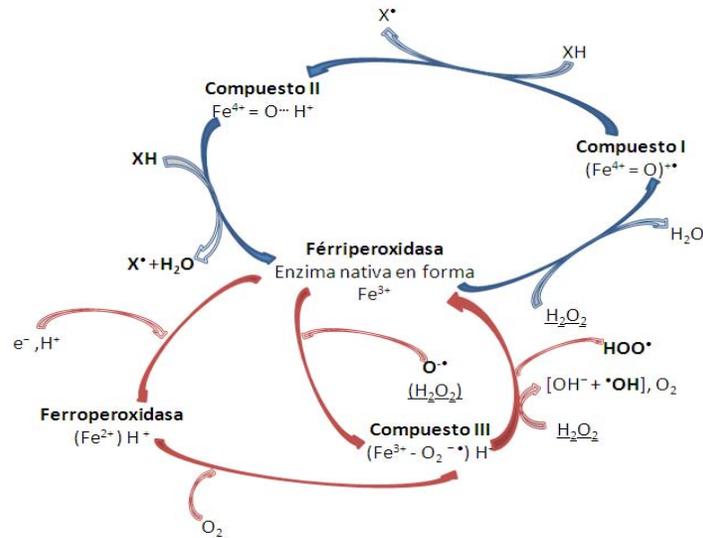


Las Prx CIII pueden generar  $\text{O}_2^{\bullet -}$  cuando un reductor apropiado y pequeñas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encuentran disponibles de acuerdo con la siguiente ecuación (Halliwell, 1978):



Aún no existe respuesta a la pregunta con respecto a la naturaleza de los agentes reductores en el proceso de formación de AOS, aunque varios compuestos como tioles, NAD(P)H, ascorbato (ASC), o fenoles (PhOHs) han desarrollado este papel *in vitro* (Bolwell & Wojtaszek, 1997; Vianello & Macri, 1991 y referencias dentro).

Los productos intermediarios son  $\text{O}_2^{\bullet -}$  así como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el balance total de las reacciones catalizadas por las Prx CIII es una reacción de oxidación. En las células vegetales el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son formados temporalmente, mientras que el NAD<sup>•</sup> ya se encuentra presente y no se consume totalmente (Ros Barceló, 2000); sin embargo, la presencia de NAD(P)H es cuestionable.



**Figura 21: Integración de los ciclos de las Prx CIII. El ciclo hidroxílico (flechas rojas) puede regular el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la liberación de ROS (•OH, HOO•). El ciclo Peroxidativo (flechas azules) puede oxidar varios sustratos (XH) y liberar sus forma oxidada (X•), ambos ciclos regulan los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tomado de Passardi *et al.*, 2005.**

#### Procesos fisiológicos mediados por peroxidasas

La evolución de los organismos y su adaptación a condiciones medioambientales más oxigenadas han dependido de la funcionalidad de las peroxidasas como adaptación evolutiva; las peroxidasas forman parte de muchos mecanismos fisiológicos de las plantas, como ya se ha mencionado son poseedoras de dos ciclos catalíticos y participan a través de todo el ciclo de vida de las plantas.

**Germinación:** Durante la germinación de *Raphanus sativus* (rábano) se ha observado la liberación de peroxidasas al medio circundante (Scialabba *et al.*, 2002); por medio de su ciclo hidroxílico son capaces de formar peróxido y subsecuentemente radicales •OH, el cual debido a su alta capacidad reactiva puede jugar un rol de defensa en contra de patógenos durante la germinación; no obstante, se conoce que pueden ser liberadas en ausencia de ataques (Scialabba, op cit). Las peroxidasas también se han relacionado con la necesidad que existe desde los primeros días de germinación, de permitir la ruptura del endospermo y la capacidad que tienen estas enzimas para romper uniones entre compuestos de la pared en los alrededores del área de protrusión (revisado por Passardi *et al.*, 2005).

**Modulación de enlaces entrecruzados entre polímeros de la pared:** Durante el desarrollo vegetal, los eventos crecimiento celular, expansión celular y el aflojamiento de la pared, están íntimamente asociados al relajamiento-rigidez de la pared celular. El balance entre estos dos procesos tiene que ser regulado de forma precisa por medio de las actividades antagonistas de las Prx CIII:

- a) Ya sea mediante la formación de enlaces entrecruzados (cross-link) por medio de la oxidación de compuestos aromáticos de la pared celular (monolignoles, ácidos cinámicos, aminoácidos aromáticos, entre otros) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contribuyendo a la rigidez de la pared. Este evento puede surgir en respuesta a diferentes estímulos, como lesiones, interacción con patógenos y agresiones climáticas; dicho proceso también puede ocurrir simplemente como evolución normal de la pared celular durante el proceso de crecimiento y senescencia. Durante el proceso de formación de **lignina y suberina**, las peroxidasas participan en el cross-link de monómeros de fenólicos para la formación de suberina y el acoplamiento oxidativo de subunidades de lignina por medio de polimerización oxidativa; las peroxidasas forman radicales fenoxi-monolignol a costa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante; los cuales forman polímeros de lignina de forma espontánea (Lewis & Yamamoto, 1990). La implicación de las peroxidasas en el cross-link de los compuestos de la pared está relacionado con la capacidad oxidativa de su ciclo peroxidativo (Passardi *et al.*, 2004b). En otras palabras, las peroxidasas regulan, por medio del producto de sus dos ciclos directa e indirectamente, la arquitectura de la pared (Cosgrove, 2001).

- b) Regulando las concentraciones locales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o generando ROS como radicales hidroxilo (•OH), controlando la distensión de la pared por medio de la ruptura de enlaces covalentes dentro de los polímeros de la pared celular (Fry, 1998; Schopfer, 2001).

**Estrés biótico y abiótico:** Es conocido que las plantas expuestas a un estrés agudo regulan por completo su actividad de peroxidasa; esta reacción sucede tanto en el estrés de tipo biótico como abiótico, es decir, bajo influencias de tipo químico (contaminación por metales pesados, desechos industriales y agrícolas), biológicos (patógenos) y físicos (lesiones). La participación de las peroxidases puede en estos casos ser de tipo pasivo por medio del levantamiento de barreras o activo con la producción de especies reactivas de oxígeno en contra de agentes perjudiciales (Schützendübel & Polle, 2002; Seregin, 2001); en caso que los factores de estrés superen este tipo de barreras y penetren en el interior de la planta, las peroxidases pueden jugar un papel mayor ya sea aislando o eliminando el cuerpo extraño.

**Señalización:** Durante la primer descarga oxidativa suministrada en parte por la capacidad de las peroxidases para generar especies activas de oxígeno (AOS), se ha encontrado actividad anti-patógena; sin embargo, esta actividad podría ser un efecto secundario resultado del reconocimiento y señalización, papeles principales durante de esta primer descarga (Lüthje *et al.*, 2000); en este rubro existe evidencia del papel del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula señalizadora en plantas (Mehdy, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Neill *et al.*, 1999; Bolwell, 1999; Dat *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2002). Muchos tipos de estrés activan la cascada señalizadora que involucra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, óxido nítrico (NO), ácido salicílico (SA), Ca<sup>2+</sup>, y otros factores que conducen a la resistencia sistémica adquirida (SAR). (López-Delgado *at al.*, 1998, Schwacke & Hager, 1992, Shirasu *et al.*, 1997, Durner *et al.*, 1998). Se ha observado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> controla la transcripción de genes inducidos por patógenos (Levine *et al.*, 1994; Green & Fluhr, 1995; Wu *et al.*, 1997; Bolwell, 1999; Desikan *et al.*, 2001).

La fosforilación reversible de proteínas es un evento clave que regula la descarga oxidativa en respuesta a la interacción con patógenos (Schwacke & Hager, 1992; Baker *et al.*, 1993; Chandra & Low, 1995); en plantas superiores, la activación de MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos) es propiciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2000; Cessna & Low, 2001; Kroj *et al.*, 2003).

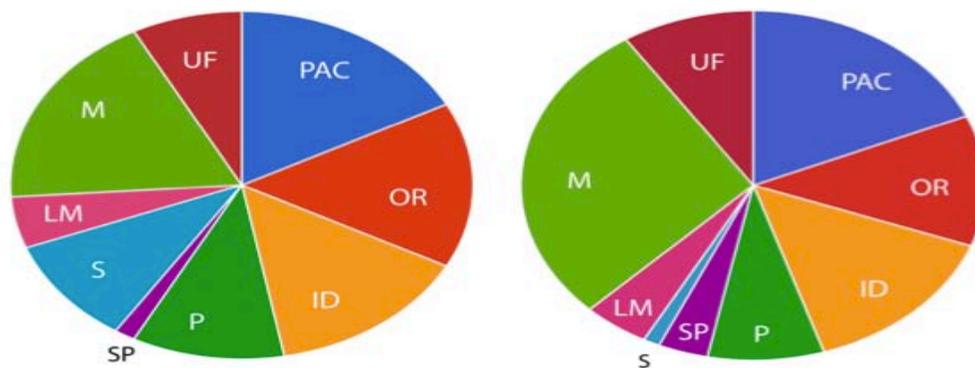
**Simbiosis:** Durante este tipo de procesos, los mecanismos de defensa descritos anteriormente son controlados para que se lleven a cabo las respectivas interacciones; en el fenómeno de formación de nódulos ciertas leguminosas, después de la inoculación inicial, forman este tipo de agrupación celular para proveer el ambiente necesario para que se lleve a cabo la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, donde una degradación localizada junto con modificaciones de la actividad de peroxidasa de la pared celular preceden a la inoculación inicial (Salzwedel & Dazzo, 1993). El otro caso importante es durante la micorrización: fenómeno que está relacionado íntimamente con la nutrición y tolerancia a estrés en las plantas (Koide & Schreiner, 1992) en donde este proceso -como es conocido- modifica enzimáticamente (tanto actividad como isoformas de enzimas) las raíces y por lo tanto, la actividad peroxidasa (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988). Es importante recalcar que durante los dos tipos de interacción mencionados es posible que se lleven a cabo modificaciones dentro de la pared celular que permite la asociación pacífica con bacterias u hongos, según sea el caso.

**Senescencia:** Durante este proceso; se han reportado cambios celulares que implican la síntesis de etileno y cambios en la actividad de peroxidasa (Jiménez *et al.*, 1998); una disminución de la expresión de los genes implicados en la fotosíntesis y un incremento con aquellos genes implicados en senescencia también ha sido observada durante el periodo de envejecimiento celular (Abarca *et al.*, 2001). El incremento de radicales de oxígeno como O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> se ha observado durante la inducción y desarrollo en la etapa de senescencia; lo que sugiere que, este tipo de radicales pueden inducir el envejecimiento celular (Kawano *et al.*, 1998).

**Crecimiento y maduración de frutos:** El crecimiento de los frutos es un fenómeno más estrechamente relacionado con la expansión celular que con la división celular, dicho proceso está mediado por la actividad de las peroxidases sobre el balance entre el aflojamiento y rigidez de la pared. Las peroxidases podrían no estar relacionadas directamente con la maduración de frutos, pero pueden controlar el paro de crecimiento mediante cambios mecánicos en las propiedades de la pared y consecuentemente producir una barrera protectora en la epidermis (Passardi *et al.*, 2005).

La pared celular vegetal constituye un determinante en las propiedades físicas (tamaño y forma) y fisiológicas (señalización, transporte, interacción planta-patógeno) de las plantas y generalmente, cuando la planta crece y madura, una gran porción de la biomasa del tallo corresponde a pared celular. Carbohidratos estructurales complejos como la celulosa, hemicelulosa y pectina forman la matriz de la que están formadas la mayoría de las paredes celulares; en la agricultura, la pared puede observarse a la luz de la importancia nutricional de estos materiales como fuente de energía del ganado rumiante constituyendo una fuente importante de fibra y forraje; sin embargo, el conocimiento que se tiene acerca de su composición en carbohidratos resulta insuficiente para el entendimiento de este componente celular dinámico y siempre cambiante; las aproximaciones obtenidas acerca de la composición de la pared celular en cuanto a su contenido en proteínas constituye un avance en el entendimiento de su dinámica.

Las proteínas de la pared celular (CWPs por cell wall proteins) constituyen alrededor del 10-20% del peso seco de la pared desempeñando papeles regulatorios, enzimáticos y estructurales (Burke *et al.*, 1974; Cassab & Verner, 1988); así las CWPs con estas propiedades pueden ser blanco de modificaciones que resulten en el mejoramiento de las propiedades de la pared celular. Para aumentar el conocimiento de la población de CWPs, diversos análisis proteómicos han sido realizados en cultivos celulares, plántulas, hojas, hipocotilos etiolados, protoplastos y raíces de *A. thaliana* (Robertson *et al.*, 1997; Chivasa *et al.*, 2002; Borderies *et al.*, 2003; Borner *et al.*, 2003; Feiz, 2004). A pesar de que muchos de los estudios de la pared celular han sido enfocados en *A. thaliana* como modelo, investigaciones de esta índole han sido realizadas en otras especies como tabaco (Dani *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2009), garbanzo (Bhushan *et al.*, 2006), maíz (Zhu *et al.*, 2007) y alfalfa (Watson *et al.*, 2004); de esta última especie, el trabajo realizado por Verdonk y colaboradores (2012), ofrece un panorama nuevo –debido a la parte técnica usada- sobre la composición en cuanto a proteínas de la pared celular, brevemente, ellos reportan un catálogo de 272 proteínas del cual se concluye, de acuerdo a su análisis bioinformático, que aproximadamente 188 (69%) corresponden a proteínas de secreción al exterior celular con dirección hacia la pared, este análisis proteómico permite incluir a las proteínas encontradas en nueve clases en base a su funcionalidad: Proteínas de acción en carbohidratos (PAC), oxidoreductasas (OR), proteínas con dominios de interacción (ID), proteasas (P), señalización (S), proteínas relacionadas al metabolismo de lípidos (LM), funciones misceláneas (M), proteínas estructurales (SP) y de proteínas de función desconocida 8 (UF). El análisis de abundancia de las 272 proteínas indica que 28 de ellas representan aproximadamente el 10% de las más abundantes y constituyen el 71% del total de proteína extraída de las paredes celulares y de aquí algo importante: dentro de estas proteínas se encuentran siete diferentes peroxidadas. Este mismo análisis indica que de 42 proteínas pertenecientes a la clase OR, 22 proteínas corresponde a peroxidadas, las cuales se encuentran probablemente envueltas en el cross-link de componentes de la pared como la lignina, así como en la detoxificación inducida por radicales libres (Passardi *et al.*, 2004b).



**Figura 22: Distribución de clases funcionales halladas en estudios proteómicos de pared celular: Proteínas de acción en carbohidratos (PAC), oxidoreductasas (OR), proteínas con dominios de interacción (ID), proteasas (P), señalización (S), proteínas relacionadas al metabolismo de lípidos (LM), funciones misceláneas (M), proteínas estructurales (SP) y de proteínas de función desconocida 8 (UF). Tomado de Verdonk *et al.*, 2012.**

### Planteamiento del problema

---

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel global; actualmente la producción mundial del fruto alcanza los >211 millones de toneladas de acuerdo con datos del 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), producidas en 3.7 millones de hectáreas alrededor del planeta, su consumo tan solo en los Estados Unidos en el año 2000 fue de aproximadamente 80 kg per cápita (ERS-USDA, 2000). Debido a la importancia económica que el jitomate representa y, por ende, lo relevante que resulta aproximarse al entendimiento de los mecanismos que ocurren en su desarrollo y propagación, el Consorcio del Genoma del Tomate en conjunto con el Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA), decidió completar la secuencia de su genoma (Tomato Genome Consortium, 2012).

La secuencia completa del genoma del jitomate proporciona un conocimiento preciso de las regiones funcionales, ya que revela el orden, la orientación, los tipos y las posiciones de sus 35 000 genes; este conocimiento servirá como referencia para la identificación de genes de interés, como el caso de los que codifican para las 73 isoenzimas de Prx CIII reportadas en Peroxibase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr>). Debido a que las secuencias reportadas en las bases de datos surgen de aproximaciones genómicas, como es el uso de marcadores de secuencia expresada (ESTs), en el jitomate hasta la fecha se carece de evidencia experimental de la localización subcelular de alguna de las 73 isoenzimas reportadas, adicional al hecho de que no se ha verificado la existencia de algunas de ellas. La importancia de su localización precisa en la pared celular para el cumplimiento de su función *in muro*, ha sido demostrada en aproximaciones recientes de genética reversa (revisado por Francoz *et al.*, 2015). La identificación de su sitio de localización (microdominios), de sus sustratos y la forma en que interactúan con ellos, se han establecido como puntos críticos para la comprensión de la función de todas las Prx CIII; sin embargo, el número de isoformas y sus diversos sustratos potenciales *in vitro*, han dificultado identificar el papel fisiológico de las Prx CIII; el aislamiento y caracterización de isoenzimas pretende ser la base para el posterior análisis de estas moléculas, así como de estudios que proporcionen información acerca de estos componentes de la pared celular y de sus relaciones intermoleculares.

A pesar de numerosos reportes realizados con respecto al papel de las peroxidasas (ver Gaspar *et al.*, 1982 y referencias dentro), poco trabajo se ha dirigido a la identificación y caracterización individual de peroxidasas específicas (Cosio & Dunand, 2009), incluyendo aquellas peroxidasas involucradas en la oxidación del ácido-3-indolacético (AIA), función clásica atribuida a las Prx CIII (Lagrimini *et al.*, 1997; Carpin *et al.*, 1999; 2001). Estudios con isoperoxidasas con distintos pI han demostrado que de entre ellas, las peroxidasas ácidas o aniónicas se encuentran probablemente involucradas en la formación de lignina (Chen *et al.*, 2002), formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schopfer & Liskay 2006; Chou *et al.*, 2010) y en la regulación del crecimiento (Lagrimini *et al.*, 1987; 1990; 1997); en tanto que otros estudios señalan a las peroxidasas básicas o catiónicas como uno de los principales actores en el control auxínico (Vatulescu *et al.*, 2004). A pesar de esto, una relación clara entre las propiedades fisicoquímicas y la función putativa de las isoenzimas estudiadas no es clara ni conclusiva; hasta el momento se desconoce que isoperoxidasas del jitomate se encuentran involucradas en el metabolismo del AIA durante la formación de raíces, evento al cual se encuentran íntimamente vinculadas.

La formación de raíces adventicias representa una fase obligatoria en la multiplicación vegetativa de plantas producidas *in vitro*. Quoirin y colaboradores (1974) demostraron que las plantas que forman raíces más fácilmente tienen una más alta actividad de peroxidasa, también se ha establecido una relación positiva entre la actividad de peroxidasas básicas y el número de raíces formadas (De Klerk *et al.*, 1990). Gaspar y colaboradores (1992) observaron una relación directa entre el tiempo máximo de actividad de peroxidasa y el tiempo de formación de estructuras meristemáticas. Un típico mínimo de actividad aparece durante la fase inductiva, mientras que durante el subsecuente incremento de actividad aparece el pico que marca el final de la iniciación y el inicio de la protrusión. Existe evidencia que el mRNA de APRx, que codifica para una peroxidasa aniónica del calabacín o zucchini (*Cucurbita pepo*), es fuertemente expresado durante la formación de raíces adventicias, sugiriendo una relación con el nivel de auxina (Carpin *et al.*, 1999); el proceso de enraizamiento involucra una serie de cambios fisiológicos que asocian a las concentraciones de AIA y a las peroxidasas de forma inversa. El conocimiento acerca de las funciones y regulación de isoperoxidasas individuales, podría reflejarse en la multiplicación de plantas adultas que son difíciles de propagar por

métodos tradicionales, en los cuales un enraizamiento exitoso representa una limitación principal para la aplicación de este método en algunas especies.

La presencia de peroxidasas en la pared celular es enteramente aceptada; ensayos citoquímicos, filtraciones al vacío con tejido activo y cultivos celulares han demostrado que las células liberan peroxidasas hacia el medio extracelular (Mader, 1986; Cesarino *et al.*, 2013); la presencia de dos secuencias señal putativas, una en el extremo amino terminal que dirige su secreción al medio extracelular y una secuencia adicional en el carboxilo terminal que dirige su destino vacuolar, han consolidado la idea de su deposición extracelular *in muro*. Distintas isoperoxidasas se encuentran presentes simultáneamente en el apoplasto. Éstas exhiben diferentes formas de interacción con la pared y se clasifican dependiendo del método usado para liberarlas, ya sea de forma soluble, unidas iónicamente y unidas covalentemente (McDougall & Morrison, 1995). Debido a la heterogeneidad bioquímica observada en las proteínas de pared, la selección de un protocolo de extracción adecuado es un paso crucial durante aproximaciones proteómicas; dicho método procurará la obtención de las proteínas apoplásticas residentes de interés y la exclusión de otros componentes proteicos y no proteicos de otros compartimentos celulares, que interfieran en subsecuentes técnicas analíticas.

A partir del razonamiento anterior, se han planteado las siguientes preguntas asociadas a esta problemática:

- ¿Cuáles isoperoxidasas catiónicas con actividad AIA-oxidasa se pueden revelar al 6<sup>to</sup> día de enraizamiento adventicio?
- ¿Es comparable su actividad de AIA-oxidasa con su actividad de peroxidasa?
- ¿Es diferente la actividad entre las isoperoxidasas reveladas?
- ¿Existe alguna isoperoxidasa catiónica con mayor actividad que el resto de las encontradas?
- Si existe dicha proteína, ¿a cuál de las 73 isoperoxidasas reportadas en peroxidase corresponde?
- ¿Qué técnica será idónea para el aislamiento de una peroxidasa catiónica a partir de extractos de pared, basándose en sus propiedades fisicoquímicas?

## Hipótesis

---

- Existe una relación entre el enraizamiento adventicio estimulado por auxinas y las isoperoxidasas encontradas durante el proceso de formación de raíces. Basándose en distintas aproximaciones, ya sea *in vitro* o *in vivo*, se ha atribuido la actividad del sistema AIA-oxidasa a una o más isoperoxidasas catiónicas extracelulares de clase III. Trabajos realizados en distintas especies incluyendo al jitomate, han reportado que durante los primeros 6 días (144 h) de enraizamiento adventicio es posible observar el incremento máximo en la actividad de las peroxidasas; de acuerdo con esto, se encontrara una peroxidasa catiónica durante el 6<sup>to</sup> día de enraizamiento adventicio de tallos de *Solanum lycopersicum* L., con actividad de AIA-oxidasa.
- La interacción de las proteínas asociadas a la pared celular guarda relación con sus propiedades fisicoquímicas, implicando a menudo interacciones electrostáticas. El método de extracción de las proteínas apoplásticas se basa en la disociación de éstas de la pared celular. Debido a la localización extracelular de las Prx CIII catiónicas responsables de la actividad del sistema AIA-oxidasa, su obtención a partir de extractos de apoplasto demostrará mediante la recuperación de una fracción con actividades peroxidasa/AIA-oxidasa su localización subcelular. El carácter catiónico de la peroxidasa blanco es un factor que influirá en su separación de entre el trasfondo de peroxidasas acompañantes por medio de una resina de intercambio catiónico durante el proceso de purificación.

## Objetivos

---

### Generales

---

- Identificar si alguna de las Prx CIII catiónicas es responsable de la mayor actividad AIA-oxidasa en tallos de *Solanum lycopersicum* L., después de 6 días de enraizamiento adventicio y evidenciar a cuál corresponde de las 73 isoperoxidasas reportadas en peroxibase.
- Definir una ruta analítica de fraccionamiento que esté fundamentada en la localización extracelular de las Prx CIII de carácter catiónico.

### Específicos

---

- Delimitar un proceso de extracción para isoperoxidasas extracelulares asociadas a la pared que permita la recuperación de una cantidad suficiente de proteína para la aplicación de técnicas analíticas subsecuentes.
- Identificar a las distintas isoperoxidasas catiónicas con actividad AIA-oxidasa presentes en los extractos obtenidos.
- Identificar de entre la escisión de bandas con actividad de geles de acrilamida y el uso de resinas de intercambio aniónico y catiónico, el método que brinde una mayor recuperación de proteína.
- Obtener una fracción con una peroxidasa catiónica con actividad AIA-oxidasa.
- Determinar el punto isoeléctrico, peso molecular y la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada.
- Cotejar la secuencia obtenida con las bases de datos disponibles para identificar a la enzima, así como realizar el análisis *in silico* de dicha secuencia.

## Materiales y métodos

---

### Material vegetal y condiciones de crecimiento

---

Semillas de *Solanum lycopersicum* L., fueron desinfectadas con NaClO 1% durante 30 min, posteriormente las fueron lavadas en tres ocasiones con agua bidestilada para eliminar los residuos de NaClO. A continuación, las semillas fueron embebidas en agua bidestilada durante 24 h, tiempo durante el cual ocurrió la emergencia de la radícula. Las semillas fueron sembradas en almácigos con agrolita y crecidas dentro de una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad a 25 °C e irrigadas con solución nutritiva de Hoagland (Anexo 1) cada tercer día y agua del grifo durante el resto de los días. Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 30 cm de alto, fueron trasplantadas a bolsas de polietileno con sustrato de agrolita con humus de lombriz y dejadas en condiciones de invernadero. Para evitar plagas, las plantas fueron rociadas ocasionalmente con bifentrina comercial (Plant care plus, Ortho) a una concentración de 0.12 g/L, este plaguicida no es absorbido por el follaje de las plantas, ni sufre translocación en el interior de las mismas, evitando efectos fisiológicos en las plantas. Las plantas se dejaron crecer durante 1 año y de estos ejemplares adultos se tomaron brotes axilares para el tratamiento de enraizamiento adventicio.

### Enraizamiento adventicio

---

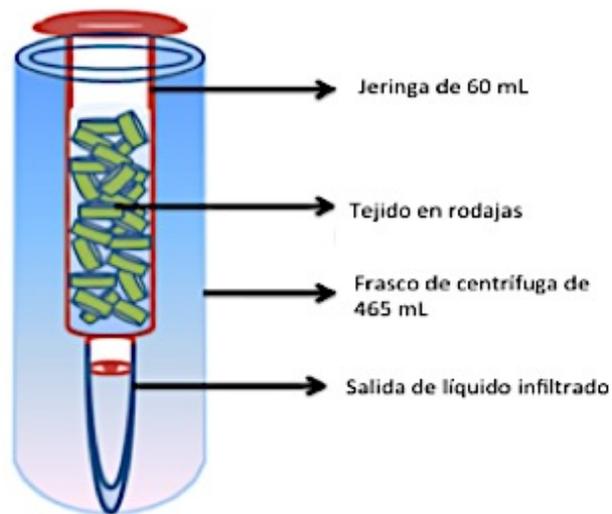
Se consideró como brote axilar aquel que presentó una yema con por lo menos una hoja bien diferenciada y que se encontrara entre el tallo principal y una rama lateral; se procedió a seleccionar aquellos brotes axilares con una talla de entre 20 y 30 cm de altura, durante las colectas se obtuvo una cantidad de entre 40 y 50 brotes axilares. Los brotes fueron sometidos durante 6 días a tratamiento de enraizamiento adventicio: 24 horas sumergidos en solución de ácido indol-3-butírico (AIB) 50 µM y posteriormente en agua bidestilada durante los 5 días restantes. Durante el tratamiento, los brotes se encontraron dentro de un cuarto de crecimiento bajo las condiciones previamente descritas.

### Extracción de peroxidasas, precipitación de proteínas y cuantificación proteica

---

Durante cada extracción se pesó una determinada cantidad de brotes, la cual se indica en el subtema correspondiente a cada método; los brotes fueron cortados en rebanadas de ~0.5 cm de longitud; este material vegetal se infiltró basándose en la metodología propuesta por Li & colaboradores (1989) y Witzel & colaboradores (2011). Dentro de un matraz kitasato se dispuso del material vegetal junto con buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 6.5 (de aquí en adelante se referirá a esta solución como "buffer de extracción"), en una proporción de 2 mL de buffer de extracción por cada gramo de tejido; se usaron matraces kitasato de distintos volúmenes, dependiendo de la cantidad de tejido. Inmediatamente se procedió a aplicar vacío durante 1 h, a una presión de 46.53 kPa. Una vez transcurrido el tiempo deseado, el tejido fue centrifugado a 800 x g durante 15 min a 4 °C en una centrifuga de piso modelo Avanti™ J-25 I (Beckman) dentro de jeringas de 50 mL adaptadas a frascos de plástico de 465 mL (Beckman); la Fig. 23 muestra cómo se montó dicho dispositivo. El tejido se infiltró en una o dos ocasiones dependiendo de la cantidad de tejido infiltrado durante 1 h cada vez, obteniéndose el extracto correspondiente.

Se procedió a precipitar los extractos con acetona al 90% previamente enfriada a -20 °C en una proporción 4:1 acetona/muestra, se agitó en vórtex durante 1 min e inmediatamente se incubó durante 1 h a -20 °C. Transcurrido el tiempo, el precipitado se centrifugó a 14 000 x g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue decantado y se dejó evaporar la acetona remanente de la pastilla en una campana de extracción; a continuación se resuspendió con buffer de extracción o con el buffer que requiriera la técnica subsecuente. A todas las muestras se les midió la concentración de proteína por el método de Bradford (1976), determinando la concentración interpolando en curva patrón de BSA en un rango de 0 a 15 µg de proteína.



**Figura 23: Dispositivo usado para la recuperación del líquido Infiltrante.**

#### Ensayos electroforéticos

Para observar las isoenzimas con actividad de peroxidasa, AIA-oxidasa y proteínas totales de las muestras obtenidas, se prepararon tres tipos de geles de poliacrilamida (PAGE horizontal, PAGE vertical nativo, PAGE-SDS) basándose en el método de Laemmli (1970):

- Las isoenzimas catiónicas con actividad de peroxidasa fueron observadas mediante PAGE horizontales de 1 cm de espesor preparados a una concentración de acrilamida al 10%, pH 6.8, en condiciones nativas, con el origen de corrida en el centro del gel (Anexo 1). Los geles fueron ensayados a 150 volts, 50 mA y 250 watts durante 3 h o hasta que el frente de corrida -marcado por azul de bromofenol- se encontró al borde del gel.
- Para distinguir las isoenzimas con actividad de AIA-oxidasa y proteínas totales presentes en las muestras se montaron PAGE verticales nativos y PAGE-SDS (Anexo 1); para ambos casos se montaron sistemas electroforéticos discontinuos verticales, con el gel concentrador al 5%, pH 6.8 y el gel separador al 12.5%, pH 8.8 y dependiendo del caso se agregó o no SDS al 10%. Las muestras para el PAGE-SDS fueron desnaturalizadas con buffer que contenía Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS al 4%, glicerol al 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.004 %, a una temperatura de 80 °C durante 3 min, en una proporción 1:1 muestra/buffer.

Los medios de reacción para revelar actividad enzimática en los geles se detallan a continuación:

- Actividad enzimática de AIA: En base a Hoyle (1977) se preparó un medio de reacción en un volumen total de 20.5 ml, el cual contenía en concentración final: Acetato de Sodio 0.2 M, pH 4.2;  $H_2O_2$  0.342 mM; Fast Blue BB base 3.3 mM, disuelto en 5 mL de etanol; Acido *p*-Coumárico 1 mM y AIA 1 mM (estos dos últimos reactivos disueltos en 1 mL de etanol).
- Peroxidasa (Prx): La actividad de peroxidasa fue detectada en base al método de Barceló & colaboradores (1987), en un medio de reacción que contenía en un volumen total de 18.5 mL, en concentración final: Fosfato de Potasio 100 mM, pH 6.5; Bencidina dihidrocloruro 2.7 mM disuelta en 1 mL de etanol y  $H_2O_2$  172 mM.

Los geles nativos fueron sumergidos en el respectivo medio de reacción durante 20 minutos en agitación a 100 rpm, a temperatura ambiente. Una vez visible el patrón enzimático, los geles se lavaron con agua destilada.

- **Proteínas totales:** Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie R-250 (Anexo 1) en base al método de Simpson (2010), de la siguiente manera: los geles fueron sumergidos en solución de tinción de azul de Coomassie y calentados en microondas por 1 min, una vez teñido el gel se procedió a enfriar y agitar a temperatura ambiente; posteriormente el gel se paso a la solución de destinción, de igual manera se calentó en microondas durante 1 min y posteriormente en agitación, repitiendo este proceso hasta alcanzar la decoloración deseada.

Los geles se digitalizaron utilizando el software Image Lab v5.2.1 acoplado a un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

#### 1<sup>er</sup> método (Aislamiento por escisión de banda catiónica desde PAGE horizontal)

---

El extracto obtenido por el método antes descrito, se ensayó para visualizar la banda catiónica con actividad de peroxidasa y AIA oxidasa que sería elegida para su purificación. Con esta finalidad se realizó un PAGE horizontal con un solo pozo a lo ancho del gel, este gel se cargó con 400 µl de muestra conteniendo 8093 µg de proteína; de éste se cortaron dos tiras para ser reveladas para actividad de peroxidasa y AIA oxidasa de la forma descrita, el gel restante se mantuvo a 4 °C. Una vez visibles los zimogramas se ajustaron con el gel almacenado y con respecto al bandeo obtenido se escindieron ambas bandas catiónicas: la que reveló actividad peroxidasa y la que lo hizo como AIA oxidasa. Se realizaron de esta forma 5 geles más. Las tiras de gel fueron maceradas con 4 ml buffer de extracción y agitadas en vórtex. A continuación se centrifugaron a 3000 x g durante 15 min a 4 °C, se procedió a recuperar el sobrenadante. A todos los sobrenadantes por separado, se les midió la concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente, todas las muestras se reunieron en un mismo volumen y se liofilizaron hasta que el volumen se redujo a 0.5 ml, con esta fracción se procedió a correr una electroforesis (PAGE) horizontal, revelando actividad de peroxidasa para corroborar la obtención de la banda y un SDS-PAGE para observar las proteínas detectables presentes en la muestra.

#### 2<sup>do</sup> método (Aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica)

---

Para esta extracción el tejido fue infiltrado y posteriormente el mismo tejido se volvió a infiltrar. Los dos volúmenes obtenidos fueron precipitados de la forma antes descrita; concomitantemente se tomó una muestra del líquido infiltrante (buffer que estuvo en contacto con el tejido durante la infiltración) para su análisis. Posteriormente con la finalidad de analizar otras isoperoxidasas asociadas a la pared celular, el tejido remanente se digirió durante 12 h con 100 ml de el buffer restante, añadiendo 100U de celulasa y 7.5U de pectinasa de *Aspergillus niger* por gramo de tejido. Una vez transcurrido este tiempo el digerido se centrifugó a 15000 x g durante 10 min a 4 °C, se procedió a recuperar el sobrenadante. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota para su análisis, el volumen restante fue usado para estandarizar ambas cromatografías de intercambio iónico. Con fines comparativos se realizó una extracción con brotes al día cero de la misma forma antes descrita, de igual forma se precipitaron las proteínas de la muestra; se procedió a medir la concentración de proteína de las muestras obtenidas.

**Modificación de zeolita y separación de peroxidosas catiónicas:** Para la modificación de la zeolita hidrofóbica se integraron 5 g de zeolita (heulandita) + 1 g de caolín + 0.05 g de cloruro de estearil dimetil bencil amonio, junto con 20 ml de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5. Esta pasta se dejó en una estufa a 80 °C durante 1 h. Finalizado este tiempo, la zeolita se pulverizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente la zeolita fue equilibrada con 15 mL de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5 durante 1 h y puesta en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 mL de extracto digerido al sexto día de enraizamiento adventicio; la mezcla se dejó en incubación durante 12 h; después la mezcla se centrifugó a 1000 x g durante 10 min, el sobrenadante se almacenó para su análisis. Posteriormente la pastilla fue lavada con 10 mL de Tris-HCl, 50 mM, pH 8.8 durante 15 min y centrifugada bajo los mismos parámetros, el sobrenadante se almacenó. A continuación la pastilla fue lavada y centrifugada en una ocasión con 2 mL de NaCl 0.5 M y otra ocasión con 2 mL de NaCl 1M, en este último lavado se dejó incubando durante 30 min; los sobrenadantes fueron almacenados para su análisis y la pastilla de zeolita se descartó. Todas los lavados con NaCl se dializaron exhaustivamente contra agua bidestilada durante 12 h dentro de membranas de celulosa de 33 mm x 21 mm.

Se realizó un ensayo posterior en el que la zeolita modificada se incubó de la misma manera que en el experimento descrito anteriormente. Posteriormente se lavó tres veces con 10 mL de NaCl, 0.5 M en cada ocasión. Se realizó un quinto lavado con 5 mL de NaCl 1M durante 30 min. A los sobrenadantes de ambos experimentos se les midió su concentración de proteína y fueron ensayados en PAGE horizontal.

### 3<sup>er</sup> método (Aislamiento por medio de resinas de intercambio iónico)

---

En este punto de la fase experimental se tenía la evidencia que mostraba que la enzima de interés se encontraba activa durante el día cero del enraizamiento adventicio, es decir, sin tratamiento hormonal. Con lo anterior en mente, se procedió a realizar un extracto de tejido al día cero infiltrando en dos ocasiones siguiendo la misma metodología que en el 2<sup>do</sup> método.

### Separación de peroxidasas catiónicas por medio de resina de intercambio iónico

---

#### *Columna de intercambio iónico*

**Intercambio aniónico:** Durante el montaje de esta técnicas se empleó buffer Tris-HCl, 0.05 M, pH 8.0 para preparar todas las soluciones aplicadas; se procedió a montar la columna de intercambio aniónico con grupos  $-N^+(CH_3)_3$  UNOsphere Q (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 3 mL de resina en suspensión (1.5 mL empacados) se mantuvieron en agitación a 100 rpm con 20 mL de NaOH 1M durante 2 h, posteriormente se dejó sedimentar y se decantó la solución de NaOH. Consecutivamente la resina se dejó en agitación con 20 mL de NaCl 2M durante 1 h, esta solución fue retirada transcurrido el tiempo y bajo las mismas condiciones se incubó con 30 mL de NaCl 1M durante 1 h, esta mezcla se empacó en dos columnas de plástico (1 x 6 cm), con filtros en la entrada y salida de la columna. Las columnas se dejaron sedimentar y una vez compactas se hicieron pasar 4 volúmenes (1 vol=1.5 mL; esta unidad de medida se ocupó durante las subsecuentes cromatografías de intercambio) de NaCl 1M a través de la columna para equilibrarla, posteriormente se agregaron los 4 mL de muestra (2 mL por cada pastilla resuspendida de los extractos precipitados con acetona). Por cada columna se colectaron 2 eluatos por percolación de 1.5 mL con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, posteriormente las columnas fueron lavadas con 4 volúmenes de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5; se colectaron eluatos de 1.5 mL. Después cada columna fue lavada con 4 volúmenes de diferentes concentraciones de NaCl (0.1, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M), colectándose eluatos de 1.5 mL. Los eluatos obtenidos con NaCl fueron dializados y posteriormente ensayados por PAGE con la finalidad de observar las isoenzimas presentes en cada fracción.

**Intercambio catiónico:** Los eluatos obtenidos por percolación de la columna de intercambio aniónico que contenían a las proteínas que no se ligaron iónicamente, se liofilizaron hasta la eliminación del solvente y posteriormente se resuspendieron en 2 mL de buffer HEPES 0.05 M, pH 7.5, este buffer fue empleado como solvente en la preparación de todas las soluciones manejadas durante la estrategia metodológica. Posteriormente se midieron 3 mL de resina en suspensión UNOsphere S (Bio-Rad) con grupos  $-SO_3^-$  empacándose de la forma antes mencionada. Una vez montada la columna se procedió a agregar los 2 mL de muestra. Se colectaron 2 eluatos por percolación de ~1 mL. Posteriormente la columna fue lavada con 4 volúmenes de HEPES 0.05 M, pH 7.5 colectándose eluatos de 1.5 mL. Después la columna fue lavada con diferentes concentraciones de NaCl (0.1M, 1M y 2M) disueltas en buffer HEPES 0.05 M, pH 7.5, con 4 volúmenes de cada concentración, excepto 0.1 M (1 mL), colectando eluatos de 1.5 mL por cada concentración. Los eluatos con NaCl se procedieron a dializar de la manera antes descrita. Las fracciones se analizaron por PAGE y SDS-PAGE con la finalidad de observar las isoperoxidasas y proteínas totales presentes.

### Electroforesis en dos dimensiones (2-D)

---

La muestra con las peroxidasa catiónicas de interés fueron separadas con base en su pI y peso molecular, para esto se realizó un isoelectroenfoque (IEF) en tiras de gel para IEF de 7 cm con gradiente de pH de 3-10 Immobiline DryStrip (GE Healthcare), para dicha tarea la muestra fue precipitada con acetona y posteriormente la pastilla conteniendo 15-20 µg de proteína fue tratada con 125 µl de buffer de rehidratación (Anexo 1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante; el IEF fue conducido bajo los parámetros que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1: Parámetros empleados durante la corrida del IEF.**

Intervalo de pH	Paso	Voltaje (V)	Tiempo (h:min)	KVh
3-10	1	300	0:40	0.2
	2	1000	0:27	0.3
	3	5000	1:30	4.5
	4	5000	0:39	1.0-3.0
	Total		3:16	6.0-8.0

Una vez enfocadas las proteínas, las tiras se equilibraron inicialmente con buffer de equilibrio con DTT y posteriormente con buffer de equilibrio con iodoacetamida. Finalmente, con las tiras se procedió a correr una segunda dimensión por peso molecular en un SDS-PAGE sin gel concentrador, las tiras fueron selladas para favorecer la entrada de las proteínas al gel separador de acrilamida; la concentración de todas las soluciones se presentan en el Anexo 1. Los geles fueron revelados para proteínas totales con azul de Coomassie.

#### 4<sup>to</sup> método (Aislamiento por medio de resina de intercambio catiónico)

Se realizó una extracción a partir de tallos de brotes axilares al día cero de enraizamiento adventicio, es decir sin tratamiento hormonal. El tejido fue infiltrado en dos ocasiones durante 1 h cada vez, seguido de su respectivo proceso de centrifugado, los volúmenes obtenidos de ambos procesos de infiltrado-centrifugado fueron precipitados con acetona; las pastillas fueron de buffer de extracción, muestras que sería utilizadas para la posterior separación por zeolita hidrofóbica.

#### Separación de peroxidases catiónicas por medio de zeolita hidrofóbica

La zeolita hidrofóbica fue preparada de forma similar que en el protocolo conducido durante el 2<sup>do</sup> método con mínimas modificaciones; en esta ocasión se integraron 60 g de zeolita (heulandita) + 12 g de caolín + 0.6 g de cloruro de estearil dimetil bencil amonio, junto con 100 mL de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5. Se obtuvieron 68 g totales de zeolita hidrofóbica, los cuales se dividieron en dos porciones de 34 g, cada una fue equilibrada con 50 mL de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5 durante 1 h. En seguida se agregaron los 25 mL de muestra a cada porción de zeolita hidrofóbica, incubándose en agitación a 200 rpm durante 12 h a temperatura ambiente. Una vez terminado este tiempo, se procedió a centrifugar a 1000 x g durante 15 min a 4 °C (todas las incubaciones y centrifugados durante esta estrategia fueron realizados bajo los mismos parámetros). Durante cada etapa se retiró y almacenó el sobrenadante para su posterior análisis en tanto que las pastillas fueron tratadas con las soluciones descritas a continuación. Las pastillas se incubaron con 60 mL de solución de Tris-HCl, 50 mM, pH 6.5 y en seguida con Tris-HCl, 50 mM, pH 8.8, en ambos casos durante 30 min; posteriormente las pastillas fueron incubadas con 60 mL de solución de NaCl 0.2 M y finalmente con 200 mL de solución de NaCl 2 M, en ambos casos se incubó durante 1.5 h. Los sobrenadantes de cada etapa de ambas porciones fueron mezclados y posteriormente liofilizados hasta obtener 20 mL de muestra, a todas las muestras se les midió su concentración de proteína y se les ensayó por PAGE horizontal en el cual se reveló la actividad de peroxidasa con bencidina.

#### Extracción de proteínas de pared

Debido a la baja cantidad de proteína obtenida del proceso anterior, como se mostrará más adelante en los resultados, se procedió a procesar el tejido por el método de Feiz & colaboradores (2006). Se procedió de la siguiente manera: 300 g de tejido provenientes del protocolo de extracción anterior fueron triturados en licuadora junto con buffer de baja fuerza iónica de acetato de sodio 5 mM + sacarosa 0.4 M, pH 4.6. La mezcla fue incubada a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, con la finalidad de separar las paredes del fluido citoplasmático, el homogenizado fue centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos a 4 °C, obteniéndose la fracción “**Sobrenadante 1** o **SN 1**” este líquido y los subsecuentes sobrenadantes obtenidos de cada etapa de la metodología fueron almacenados para su posterior análisis. La pastilla del paso anterior fue resuspendida

en buffer de acetato de sodio 5 mM + sacarosa 1 M, pH 4.6 y a continuación centrifugada de la misma forma antes descrita por medio de los dispositivos mostrados en la Fig. 23, el sobrenadante de este paso constituyó la fracción "**Pared celular 1 o PC 1**". La pastilla residual fue lavada exhaustivamente con buffer de acetato de sodio 5 mM, pH 4.6 y luego centrifugada bajo las mismas condiciones. El sobrenadante constituyó la fracción "**Pared celular 2 o PC 2**". La pastilla remanente fue congelada con nitrógeno líquido y triturada en licuadora, el homogenizado fue filtrado por medio de gasa estéril y posteriormente congelado a -70 °C para favorecer el proceso de liofilización, el cual se llevó a cabo posteriormente con el tejido pulverizado resultante.

El polvo liofilizado fue tratado con soluciones de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M y LiCl 2M, buscando así remover las proteínas nativas de la pared, aprovechando que la elevada fuerza iónica promueve su remoción, de acuerdo con reportes de Feiz *et al.* (2006) y referencias ahí contenidas; se extrajeron 200 g realizando dos extracciones consecutivas con CaCl<sub>2</sub> (buffer acetato de sodio 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.2 M, pH 4.6; 6 mL por cada 0.65 g de tejido). El sobrenadante constituyó la fracción "**CaCl<sub>2</sub>**". La fracción insoluble remanente fue extraída dos veces con buffer acetato de sodio 5 mM + LiCl 2M, pH 4.6 (6 mL por cada 0.65 g de tejido). El sobrenadante derivado de la centrifugación de esta mezcla constituyó la fracción "**LiCl**". En cada etapa los homogenizados fueron agitados durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente centrifugados por medio del dispositivo antes mencionado a 4000 x g durante 15 min a 4°C. los extractos de soluciones iguales fueron integrados en un solo volumen y congelados a -70°C para ser posteriormente liofilizados hasta un cuarto del volumen obtenido. Los extractos fueron dializados exhaustivamente durante 3 h contra agua bidestilada, realizando cambios cada ½ h. De estos extractos se tomó una alícuota para ensayarlos en PAGE y SDS-PAGE, con la finalidad de observar las bandas con actividad y proteínas detectables en cada uno de ellos, el volumen restante fue separado en alícuotas de 1.5 mL y liofilizados por completo.

#### Columna de intercambio catiónico

---

Las muestras liofilizadas del paso anterior se resuspendieron en 4 mL de buffer HEPES 0.05 M, pH 7.5 antes de ser dispuestas en la columna cromatográfica. Para montar la columna se midieron 40 mL de resina en suspensión (20 mL empacados) los cuales se dispusieron en una columna de vidrio LC Sigma econo de 30 cm x 10 mm con filtro en el fondo. En primera instancia se colectaron eluatos por percolación, posteriormente la columna fue lavada de la forma antes descrita con buffer HEPES 0.05 M, pH 7.5 y posteriormente con dos concentraciones de NaCl, 1M y 2M, respectivamente; en todos los casos se colectaron eluatos de 1.5 mL. Los eluatos se analizaron por PAGE vertical nativo para ensayar su actividad de AIA-oxidasa y SDS-PAGE.

#### Electroforesis en 2-D

---

Debido a los patrones enzimáticos observados en los geles, como se reporta más adelante en los resultados, la muestra del extracto de CaCl<sub>2</sub> contenía a las peroxidasas catiónicas de interés. Para separar las proteínas de la muestra por pI, se realizó un IEF de la misma manera antes descrita, la tira fue cargada con 125 µl de muestra conteniendo 100 µg de proteína; el IEF fue conducido bajo los mismo parámetros mencionados

Una vez enfocadas las proteínas se procedió a correr un SDS-PAGE con las tiras enfocadas en una segunda dimensión, separándolas por peso molecular. Los geles fueron revelados para proteínas totales con azul de Coomassie, los proteínas que cumplieran con las características de peso y pI fueron escindidas del gel bajo condiciones de esterilidad y depositadas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL junto con 50 µl de agua Milli-Q y posteriormente enviadas al Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación.

#### Secuenciación de novo

---

La muestra previamente fue reducida con ditioneitol (DTT) y alquilada con iodoacetamida (Sigma-Aldrich); posteriormente fue digerida "*in gel*" con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS compuesto por una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución (Calmix)<sup>®</sup> conteniendo N-butilamina, cafeína, H<sub>2</sub>N-MRFA-CO<sub>2</sub> y Ultramark 1621. En el sistema de cromatografía de líquidos (LC) se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 no comercial (ID 0.75 µm y 10cm largo) a un flujo de 300 nL/min. Para la fragmentación de los

péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde los iones con carga 1+, 2+, 3+, 4+, 5+ y de cargas indefinidas son seleccionados para los eventos de fragmentación. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 ( $m/z$ ), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos Uniprot de *Solanum lycopersicum* a través del motor de búsqueda Sequest, utilizando el programa Proteome Discoverer 1.4., también se realizó la secuenciación manual (*de novo*).

### Análisis *in silico*

En primera instancia para revelar la identidad de la proteína y conocer si ésta se encontraba anotada, se realizó la búsqueda de secuencias homólogas contra el banco de Peroxibase tomando en cuenta todas las secuencias proteicas reportadas (Perox PEP), se ajustó el BLASTp para mostrar las primeras 25 secuencias con mejor puntuación, dicho análisis se realizó bajo los siguientes parámetros:

**Tabla 2: Parámetros de búsqueda de secuencias homólogas.**

<b>Programa</b>	Blastp
<b>Valor esperado (E-Value)</b>	0.01
<b>Ordenamiento por</b>	E-Value
<b>Matriz</b>	Blosum62
<b>Banco</b>	Peroxibase

Para realizar el análisis de la secuencia (longitud, peso molecular, pI, frecuencia y porcentaje de aminoácidos), así como el alineamiento con respecto a las 25 secuencias con mejor puntuación obtenidas del BLASTp del servidor de Peroxibase se empleó el software Geneious v7.0.4.

La predicción de la estructura secundaria de la secuencia fue llevada a cabo mediante PSIPRED del UCL Department Of Computer Science (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>). Por otra parte, con el propósito de detectar dominios conservados dentro de la secuencia consultada se realizó un análisis de la secuencia mediante BLASTp directamente del servidor de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Se conoce la existencia de una extensión *N*-terminal con la función de secuencia señal para dirigir a las proteínas de secreción hacia el medio extracelular, en este rubro Gadea y colaboradores (1996) reportaron en la secuencia de LePrx06 (peroxibase ID: 58) la existencia de dicha extensión *N*-terminal; se realizó un alineamiento en Geneious con respecto a LePrx06 con la finalidad de conocer la presencia de dicha extensión. Otro análisis de la presencia del péptido señal en la secuencia se realizó por medio del servidor SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011), dicho servidor predice la presencia y localización del sitio de escisión del péptido señal en secuencias de aminoácidos de organismos eucariotes, el método incorpora la predicción del sitio de escisión y la predicción de péptidos señal y no señal basándose en la combinación de varias redes neuronales artificiales; el servidor otorgó resultados de tres distintos parámetros, estos parámetros se explicarán a detalle en la parte de los resultados.

Es ampliamente aceptado que las Prx CIII presentan en su superficie cadenas de carbohidratos, las cuales se encuentran implicadas en su actividad, resistencia a la proteólisis y estabilización de la proteína, entre otros eventos (Chunfang & van Huystee, 1989; revisado en van Huystee *et al.*, 2004, Siegel 1993) y representan un ±25% del peso total de la proteína. Tomando esto en cuenta, se procedió a realizar el análisis de los sitios potenciales de glicosilación, para esta tarea se empleó el servidor GlycoEP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>) (Chauhan *et al.*, 2013). La predicción está basada en el uso de patrones de glicosilación extraídos de glicoproteínas que presentan menos del 40% de similitud (reducción de redundancia basada en la secuencia). La base de datos no redundante empleada por el servidor comprende 2604 glicositos *N*-ligados, 456 glicositos *O*-ligados y 48 glicositos *C*-ligados obtenidos de Swiss-Prot (publicados en Junio del 2011). La predicción se llevó a cabo sobre la secuencia en busca de glicositos *N*-ligados, la cual se fundamenta en el reconocimiento del motivo Asn-X-Ser/Thr, donde X denota cualquier aminoácido, excepto prolina.

La búsqueda de estructuras cristalizadas templete y el posterior modelado tridimensional se realizó por medio del servidor del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB por sus siglas en inglés) (<http://swissmodel.expasy.org>), con respecto a la peroxidasa recombinante de rábano C1A en complejo con ácido benzidroxámico (PDB ID: 1GX2) (Henriksen *et al.*, 1998; Henriksen *et al.*, sin publicar), se eligió esta estructura debido a que presentó la mejor puntuación bajo los parámetros dados por el servidor; en un esfuerzo por acercarse a su relevancia fisiológica real, la estructura fue modelada en conjunto con el ácido benzidroxámico como ligando del sitio activo, el posterior arreglo de los modelo fue realizado por medio de PyMOL v1.7.4.5 y DeepView-Swiss-PdbViewer v4.1.0.

Con la finalidad de conocer si la secuencia obtenida presentaba las características reportadas para la interacción de las Prx CIII con complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -pectato de la pared celular, se realizó un alineamiento por medio de Geneious con respecto a una peroxidasa catiónica de cacahuate (PDB ID: 1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) y a una peroxidasa aniónica de zucchini (Carpin *et al.*, 2001), AhPrx04 y CpPrx01, en clasificación de Peroxibase, respectivamente; las cuales se ha reportado, incluyen dentro de su secuencia 4 residuos de Arg que se encuentran mediando su unión con la pared por medio de interacciones electrostáticas. En esta misma tarea se realizó otro modelado usando como templete a la peroxidasa catiónica de cacahuate (Schuller *et al.*, 1996). La presencia de estos residuos de Arg fue explorada en la estructura tridimensional. En un esfuerzo de determinar otros posibles sitios de unión se procedió a examinar otras zonas con potencial electrostático positivo en la superficie de la molécula. Otra forma de apreciar la posible interacción entre las peroxidases y su medio circundante, es decir ya sean componentes de la pared celular, otras proteínas, cofactores, sustratos etc., es la posibilidad de su interacción por medio del efecto hidrofóbico, tal como acontece en la formación de oligómeros en algunas proteínas grandes; entonces se procedió a examinar la presencia de zonas hidrófobas en la superficie de la proteína. El análisis de las zonas con potencial eléctrico positivo y las zonas hidrófobas se llevó a cabo mediante el software PyMOL.

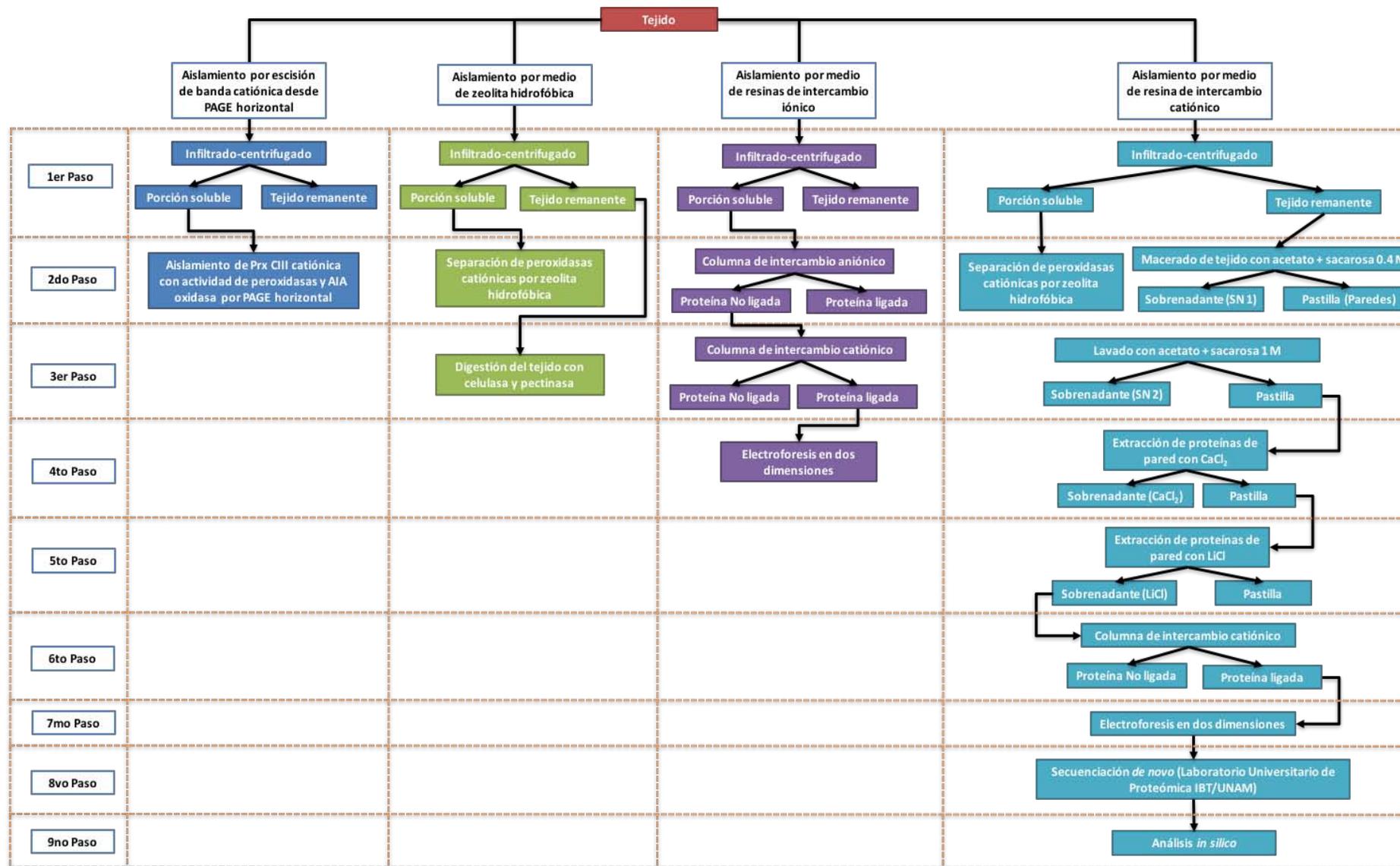


Figura 24: Estrategias experimentales empleadas durante cada método de purificación.

## Resultados y discusión

En este estudio no se evaluó la disrupción celular, sin embargo, tomando en cuenta la literatura es evidente que durante el corte de los tallos en rodajas, la extracción por infiltración-centrifugado del tejido y durante todo el proceso de extracción de proteínas de la pared con sales existió daño celular. Existen varios métodos para evaluar el contenido citoplasmático liberado por las células durante la disrupción celular, algunos de ellos se basan en el ensayo de la actividad de distintos marcadores celulares, como por ejemplo la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o G6PD. La G6PD es una enzima citosólica abundante, la cual es liberada cuando la integridad de la membrana plasmática resulta comprometida. Este tipo de ensayos proporciona una forma para evaluar la calidad de los extractos de pared celular con respecto a la contaminación por disrupción celular con componentes intracelulares. De acuerdo con trabajos en donde se han empleado metodologías similares basadas en la infiltración-centrifugado de tejido (Li *et al.*, 1989; Lohaus *et al.*, 2001), se puede observar que la actividad de esta enzima se encuentra presente aun cuando exhaustivamente la integridad celular, tornando este método inadecuado al discernir si se trata de una enzima intracelular o una extracelular; en cambio otros métodos basados en la identificación de proteínas por medio del cotejo de su secuencia de aminoácidos en bases de datos, ha resultado en una herramienta ampliamente usada durante estudios proteómicos (Feiz *et al.*, 2006; Negri *et al.*, 2008; Witzel *et al.*, 2011; Verdonk *et al.*, 2012).

En la Tabla 3 se muestra el resumen de las cantidades de tejido inicial así como los cambios en la concentración de proteína obtenidos en cada método realizado. Las cantidades de proteína obtenidas en los tres primeros métodos de purificación (escisión de banda catiónica, aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica, resinas de intercambio ionico) fueron valores muy bajos, no obstante que se partía de una cantidad considerable de proteína con diferencia de por lo menos tres órdenes de magnitud; la concentración de proteína obtenida del 4<sup>to</sup> método (aislamiento por medio de resina de intercambio catiónico) fue la más alta de todas. Esta muestra se eligió para su ensayo en electroforesis en 2-D.

**Tabla 3: Cantidades de tejido inicial y concentraciones de proteína obtenidas en el extracto inicial. En la última columna se muestra la concentración de proteína que se obtuvo al final de cada método de purificación, estas cantidades fueron dispuestas para ensayar el IEF.**

	Tejido inicial (g)	Vol. extracto inicial (mL)	Proteína (mg)	Vol. final después de precipitar con acetona (mL)	Proteína (mg)	Concentración de proteína obtenida al final del método de purificación (mg)
1 <sup>er</sup> método (Escisión desde PAGE horizontal)	124.6	26	11.46	3	6.07	0.03785 ± 0.0609
2 <sup>do</sup> método (Aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica)	102.42	48	19.43	6	7.23	0.07 (Col. zeolita 1), 0.24 (Col. zeolita 2)
3 <sup>er</sup> método (Col. Intercambio aniónico/catiónico)	241.23	80	19.26	4	10.06	Todo se ensayó en IEF
4 <sup>to</sup> método (Col. Intercambio catiónico)	700	232	63.31	50	48.8720	0.6075

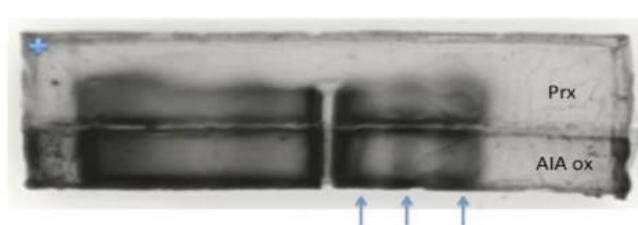
Se puede observar que durante la etapa de precipitación con acetona se perdía una cantidad considerable de proteína, evento atribuido a la disrupción de interacciones no covalentes que acontecen en el interior de las cadenas peptídicas, conducidos en parte por la electronegatividad del oxígeno del grupo carbonilo (C=O) presente en la acetona, evitando la formación de puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura terciaria de las proteínas, lo que conduce a la desnaturalización proteica. El hecho de que no fuera medida durante los ensayos de cuantificación de proteína, sugiere que las

proteínas no se pudieron solubilizar, manteniéndose agregadas y por ende precipitándose. Este método, sin embargo, es útil al aumentar la actividad de las peroxidasa y descartar un poco del trasfondo inicial de proteínas acompañantes.

#### 1<sup>er</sup> método (Aislamiento por escisión de banda catiónica desde PAGE horizontal)

##### Actividad de peroxidasa y AIA oxidasa

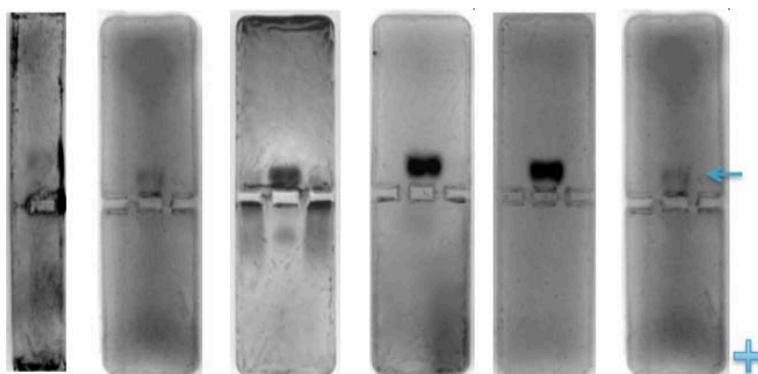
La actividad de las peroxidasa catiónicas que demostraron la capacidad para oxidar AIA (Fig. 25) y su recuperación por medio de la infiltración del tejido, manteniendo la integridad celular, sugieren en conjunto, que la actividad de AIA oxidasa en este tejido reside probablemente en el apoplasto, evento que concuerda con trabajo experimental previo, el cual demuestra que el catabolismo descarboxilativo del AIA reside en la matriz extracelular (García-Florenciano *et al.*, 1990; Vatulescu *et al.*, 2004). La capacidad de AIA oxidasa de las peroxidasa catiónicas durante el día seis del enraizamiento adventicio, sugiere la posible intervención de estas enzimas durante la última fase de la formación de raíces adventicias, es decir la protrusión del meristemo radicular; esta actividad también sugiere que puedan contribuir con la regulación del gradiente del AIA a través de su catabolismo. De las bandas catiónicas con actividad de peroxidasa y AIA oxidasa, la banda catiónica con mayor movilidad fue elegida para su purificación (Fig. 25, flecha azul), para este propósito se ensayaron 5 geles de la misma manera antes descrita y se ensayaron para actividad de peroxidasa, intentando recortar en cada ocasión la banda con actividad de igual movilidad.



**Figura 25: Zimogramas de actividad de peroxidasa (Prx) y Ácido indolacético oxidasa (AIA ox); 5  $\mu$ g por carril; flechas azules: bandas catiónicas con actividad.**

##### Patrones enzimáticos

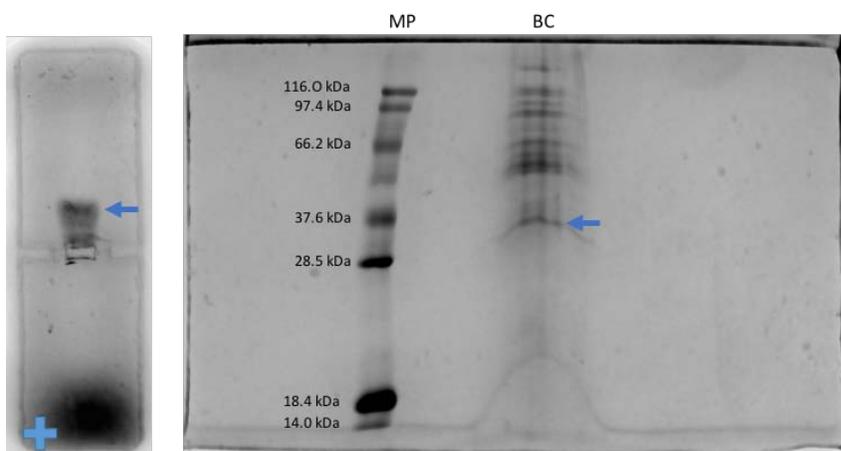
Los zimogramas de actividad de peroxidasa ensayados para confirmar la recuperación de la banda catiónica con actividad, revelados a partir de la muestra obtenida de la extracción de las rebanadas de geles ensayados previamente, muestran el aislamiento parcial de la banda blanco; en la Fig. 26 se muestra la presencia de una sola banda en los geles ensayados. La cantidad de proteína recuperada de cada banda escindida fue del orden de  $0.03785 \pm 0.06$  mg de proteína (n=5).



**Figura 26: Zimogramas de actividad de peroxidasa que confirman la presencia de la banda catiónica con actividad de interés previamente escindida de los PAGE horizontales, no se tomó en cuenta lo recuperado en el último gel debido a que se obtuvo una cantidad baja de proteína. Se ensayaron 3  $\mu$ g por gel.**

## Aislamiento y purificación de peroxidasa catiónica

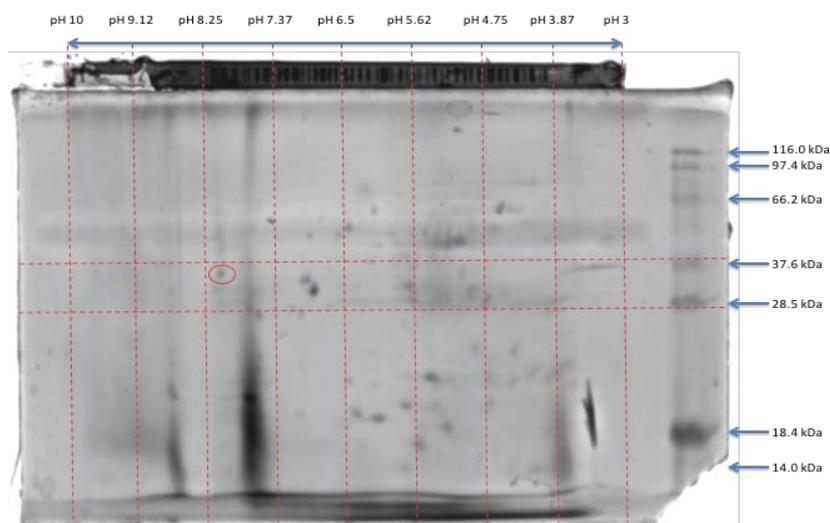
Después de integrar juntas todas las muestras que contenían la enzima catiónica con actividad de peroxidasa observada en los geles horizontales, se ensayaron nuevamente en un PAGE horizontal para confirmar la presencia de la banda de interés y en un SDS-PAGE para conocer el trasfondo de proteínas acompañantes. En el PAGE horizontal revelado para actividad de peroxidasa con bencidina, se encontró una única banda con actividad (Fig. 27, izquierda); debido a la naturaleza glicosilada de este tipo de proteínas, la banda a menudo no se compacta completamente, bandeos parecidos han sido observados en otros trabajos con peroxidases (van den Berg *et al.*, 1983); en este mismo rubro, no se descarta la posibilidad de que se trate de un cúmulo de proteínas similares. Por otra parte, en el SDS-PAGE se observan pocas bandas dentro del rango de peso molecular de las peroxidases, de las cuales una de ellas pudiera corresponder a la peroxidasa catiónica de interés (Fig. 27, derecha); a pesar de observarse una sola banda con actividad de peroxidasa en el rango de peso mencionado, se observa una plétora de proteínas acompañantes de distinta índole que dificultarían el proceso de purificación río abajo.



**Figura 27: Derecha: Gel de actividad de peroxidasa de las bandas escindidas de los PAGE horizontales, se ensayaron 5  $\mu$ g; Izquierda: SDS-PAGE conteniendo las bandas escindidas de los geles horizontales de poliacrilamida, la flechas azules señalan las probables isoperoxidasas, MP: Marcador de peso, BC: Banda catiónica.**

## Electroforesis en 2-D

Al realizar la electroforesis en 2-D con la finalidad de separar a la proteína de interés de la muestra que la contenía, se encontró un punto que cumplía con el peso requerido de entre 32.5 y 42 kDa y un pI de entre 7 y 8 (Fig. 28). También se observó un hecho que resulta evidente desde el SDS-PAGE, es decir, un gran número de proteínas acompañantes; este tipo de eventos puede ocurrir debido a la fragmentación proteolítica de moléculas más grandes, la obtención de este trasfondo durante la manipulación de las muestras o a que se trata simplemente del proteoma celular normal o que forma parte de la respuesta fisiológica del organismo hacia algún tipo de estrés, en base a esta evidencia se decidió no emplear esta muestra para su secuenciación .



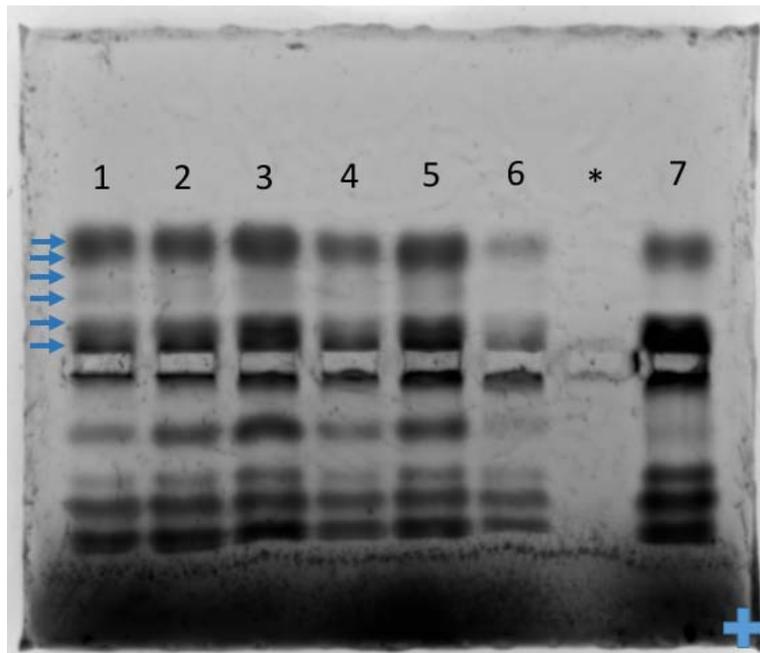
**Figura 28: SDS-PAGE del IEF de la banda catiónica con mayor movilidad que presentó actividad de peroxidasa y AIA oxidasa escindida de los gels horizontales de acrilamida; Círculo rojo: isoperoxidasas catiónica.**

## 2<sup>do</sup> método (Aislamiento por medio de zeolita hidrofóbica)

Para esta extracción se partió de 102.42 g de tejido, el cual se infiltró en dos ocasiones y de los cuales se obtuvieron 23 mL y 25 mL, los cuales contenían 8.47 mg y 10.96 mg de proteína para el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> infiltrado, respectivamente. La posterior precipitación de proteína con acetona nos proporcionó una cantidad de 3.86 mg en el 1<sup>er</sup> infiltrado y de 3.36 mg en el 2<sup>do</sup> infiltrado. Al digerirse el tejido remanente se obtuvo un volumen de 80 mL, los cuales contenían un total de 131.52 mg de proteína.

## Patrones enzimáticos de las fracciones apoplásticas soluble e insoluble al día seis y cero durante el proceso de enraizamiento adventicio

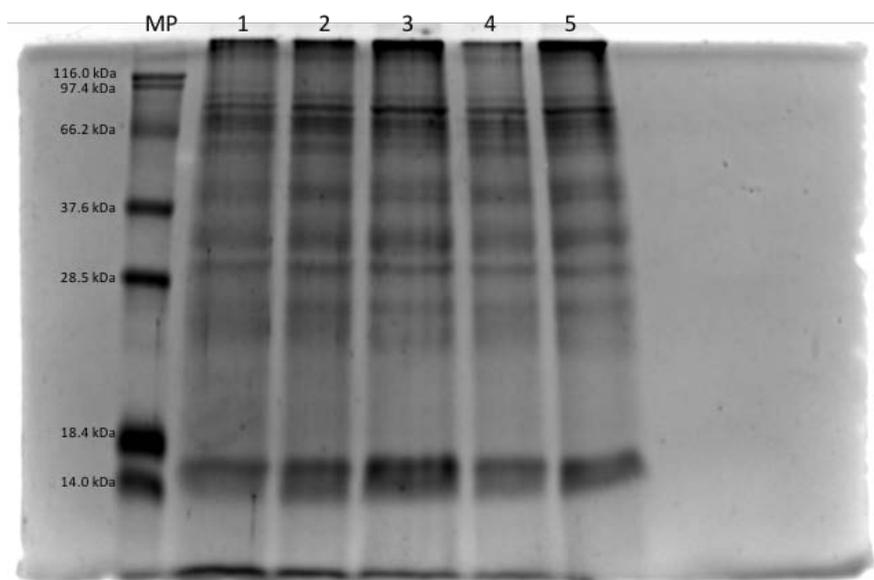
Los zimogramas de actividad de peroxidasa (Fig. 29) muestran al menos cinco bandas catiónicas con actividad de peroxidasa en todas las muestras obtenidas, también es posible observar que existen las mismas isoenzimas en todas las muestras, incluyendo la del día cero. En los bandeos que corresponden al sexto día de enraizamiento (carriles 1-6) se observa el aumento en la intensidad de 2 bandas que en el patrón del día cero se detectan tenuemente. Nótese que lo opuesto ocurre con las bandas más cercanas al origen del lado catódico, obsérvese solo los carriles 2, 4 y 7, debido a que se trata del mismo punto en la metodología usada; es decir, previo a la precipitación de proteínas con acetona proceso por el cual aumenta la actividad. Es importante señalar que estas enzimas cambian su actividad dependiendo del método de extracción e incluso del material usado: cuarzo < pyrex < vidrio suave (Siegel, 1993). El cambio en la actividad de los carriles mencionados responde al estatus fisiológico, de desarrollo y genético del tejido debido al tratamiento aplicado y al método de extracción usado, esto apoya la idea de la especialización funcional de los miembros de esta familia de proteínas. Otros autores reportan la aparición y desaparición de isoperoxidasas específicas durante un proceso o localización en particular (Loukili *et al.*, 1999; Allison & Schultz, 2004); sin embargo, es importante recordar que es difícil asociar una banda a un gen particular debido a que no existen relaciones cualitativas entre la expresión de transcritos y la actividad de una proteína (Cosio & Dunand *et al.*, 2009).



**Figura 29: Zimograma de actividad de peroxidasa, se ensayaron 5  $\mu$ g por carril; 1-6: Enraizamiento al sexto día: 1: Líquido infiltrante, 2: 1<sup>er</sup> infiltrado, 3: Precipitado 1<sup>er</sup> infiltrado, 4: 2<sup>do</sup> infiltrado, 5: Precipitado 2<sup>do</sup> infiltrado, 6: Digerido; 7: Infiltrado día cero; el símbolo \* denota un carril vacío.**

Es posible asegurar que el cambio en la actividad no sea debido a la concentración de proteína sembrada en cada pozo, ya que se cuidó de colocar la misma en cada uno de ellos. Existen experimentos con inhibidores de la síntesis de proteína y con marcaje radioactivo que indican que el aumento en la actividad de las peroxidases catiónicas no es debido a su síntesis *de novo*, sino a la activación de las enzimas ya presentes en el tejido (Ver referencias en Gaspar *et al.*, 1982; Castillo, 1984) Los bandeos de las isoenzimas aniónicas también presentan cambios en la intensidad, sin embargo el análisis de la presencia de estas bandas no son la finalidad de este trabajo.

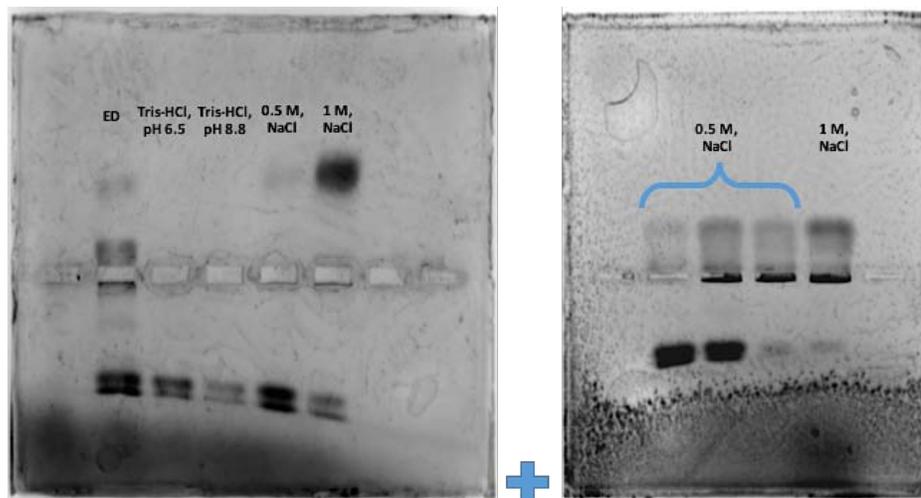
Los bandeos observados por SDS-PAGE muestran que existen los mismo patrones de proteínas detectables en las muestras analizadas (Fig. 30); las muestras digeridas al sexto día y al día cero fueron descartadas para realizar el SDS-PAGE debido a que en la primera se obtuvo la menor actividad detectada y la última debido a que no sería incorporada junto con el resto de las muestras por pertenecer a un día sin tratamiento hormonal; de acuerdo con esto las muestras restantes fueron liofilizadas hasta reducir a 1/3 su volumen y reunidas en un solo volumen Debido a la resolución del patrón de bandeos, solo tres o cuatro bandas de mayor intensidad se observan dentro del rango del peso molecular de las peroxidases (32.5-42 kDa, peso que pueden aumentar hasta en 10 kDa debido a los patrones de glicosilación), las otras isoenzimas se encuentran en el límite o por debajo de la sensibilidad de la técnica de tinción de azul de Coomassie (50-100 ng); es decir de las 12-14 bandas observadas en el zimograma de actividad (incluyendo aniónicas) solo 3 ó 4 contribuyen mayoritariamente al contenido de proteína. La recuperación de las mismas proteínas durante el proceso de extracción (infiltración-centrifugado con fosfato de potasio 100 mM, pH 6.5) indica que las isoenzimas encontradas están tanto en forma soluble, como asociadas posiblemente por interacciones iónicas a la pared celular. Esto coincide con resultados previos que han sugerido la posible interacción iónica entre las peroxidases y la matriz extracelular de la vid (Vatulescu *et al.*, 2004).



**Figura 30: SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie, se ensayaron 5 µg por carril; MP: Marcador de peso, 1: Líquido infiltrante, 2: 1er infiltrado, 3: Precipitado 1er infiltrado, 4: 2do infiltrado, 5: Precipitado 2do infiltrado.**

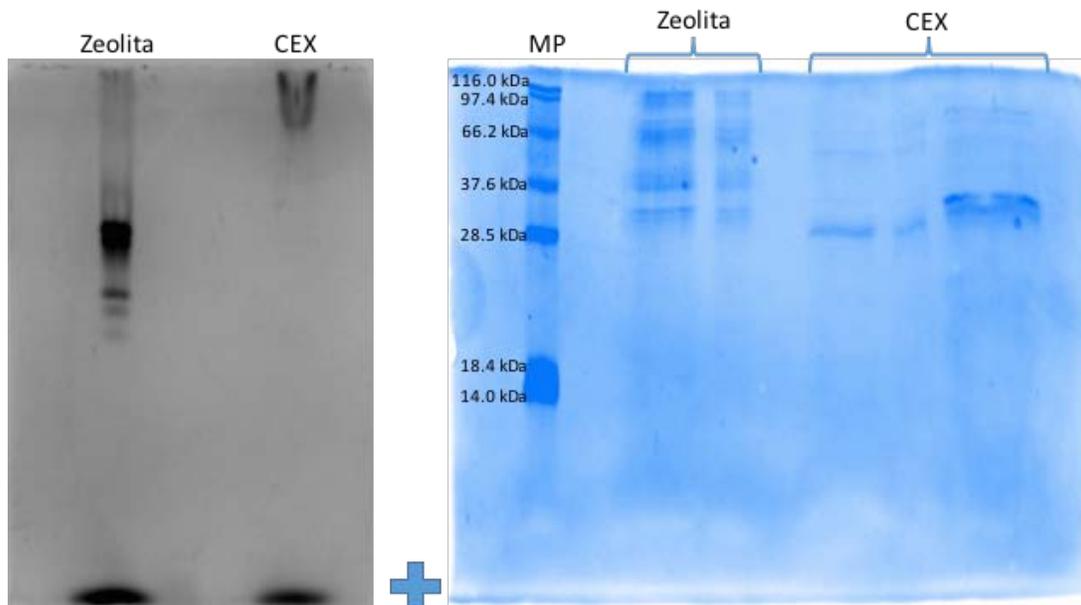
#### Separación de peroxidasas catiónicas con zeolita hidrofóbica

La separación por medio de zeolita (Fig. 31) muestra que este tipo de material es capaz de retener peroxidasas de distintos pI, tanto aniónicas como catiónicas; sin embargo la asociación de la peroxidasa catiónica es más fuerte que en los otros casos, debido a que dicha enzima fue eluida hasta el tercer lavado con fuerza iónica de 0.5 M de NaCl, haciéndose más evidente su elución con la concentración 1 M de la misma solución. El uso de la zeolita de la forma en que fue empleada presenta dificultades inherentes: como es el caso de los lixiviados que se presentan en las muestras o que este tectosilicato es capaz de ligar enzimas de distintos pI. En este punto sería interesante modificar la resina de tal manera que las peroxidasas ácidas no fueran retenidas, así como encontrar la causa del ligado de tal forma que se pueda aprovechar esta facultad para depurar las muestras conforme a los propósitos asociados a la purificación.



**Figura 31: Zimogramas de ensayos con zeolita hidrofóbica; se ensayaron 5 µg por carril. ED: Extracto digerido; en cada carril se indica la muestra correspondiente. Es posible observar la retención de la banda catiónica, sin embargo se encontró acompañada de peroxidasas aniónicas.**

Los zimogramas de la Fig. 32 muestran que la columna de intercambio catiónico fue más efectiva en la remoción de las peroxidasas aniónicas, en este punto la muestra del segundo extracto se agotó durante la estandarización de dicha técnica.

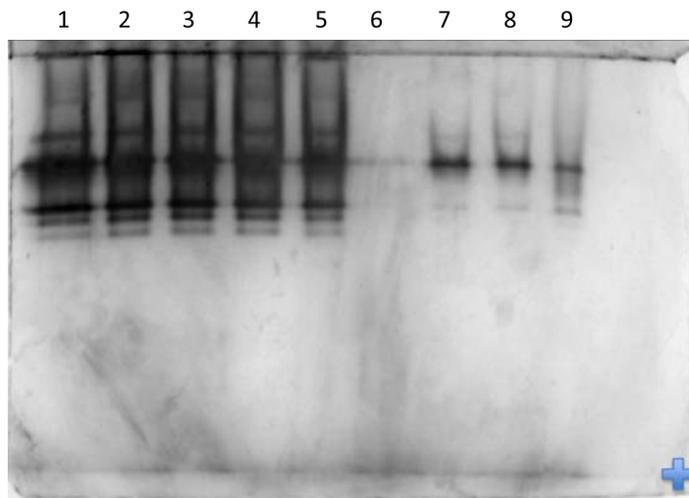


**Figura 32: Zimogramas de los eluatos de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y Zeolita.**

### 3<sup>er</sup> método (Aislamiento por medio de resinas de intercambio iónico)

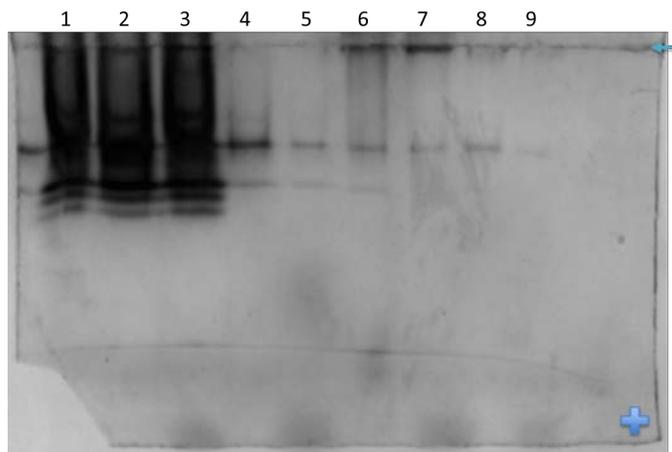
Se partió de 241.23 g de tejido del cual se obtuvieron dos volúmenes de 40 mL de ambos precipitados conteniendo en ambos casos 9.63 mg (19.26 mg en total). Estos se resuspendieron en 2 mL de buffer de fosfato de potasio conteniendo una concentración de 4.74 y 5.32 mg de proteína para el 1er y 2do infiltrado respectivamente.

**Intercambio aniónico:** La purificación de la peroxidasa catiónica en primera instancia, se llevó a cabo por cromatografía de intercambio aniónico en modalidad de flow-through para descartar a las peroxididasas aniónicas que quedaran ligadas a los grupos cargados de la resina. En los primeros eluatos se observa que se obtienen las mismas isoenzimas que en la muestra antes de ser aplicada a la columna (Fig. 33). Sin embargo, en los posteriores eluatos se observa que ocurrió el ligado y elución de algunas isoenzimas aniónicas, dejando libre los primeros eluatos del trasfondo de peroxididasas acompañantes que quedaron unidas a la resina. Estas muestras se agruparon y liofilizaron hasta eliminar el solvente en su totalidad. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas en buffer HEPES, 0.05 M, pH 8.0 para incorporarlas a la columna de intercambio catiónico.



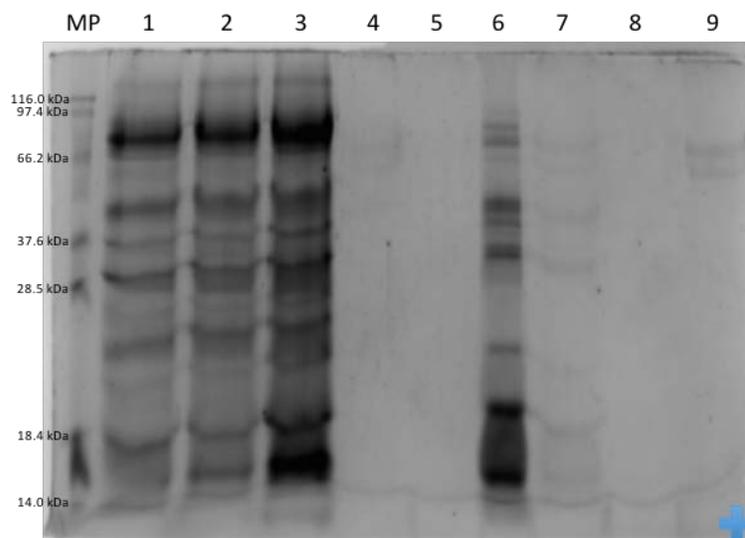
**Figura 33:** Eluatos de la columna de intercambio aniónico; se ensayaron 5 µg por carril. 1: Carga 1; 2: Carga 2; 3: Lavado Tris-HCl 1; 4: Lavado Tris-HCl 2; 5: Lavado Tris-HCl 3; 6: 0.4M NaCl; 7: 0.6M NaCl; 8: 0.8M NaCl 9: 1M NaCl. Las bandas fueron reveladas para actividad de AIA-oxidasa con AIA como sustrato de la forma descrita en el texto principal.

**Intercambio catiónico:** En el PAGE de actividad de AIA oxidasa, se puede observar que efectivamente, la peroxidasa blanco se mantuvo ligada hasta su posterior elución con fuerza iónica de la resina (Fig. 34, carriles 6-9). También es claro que el trasfondo de isoperoxididasas es menor que en los eluatos previos, hecho que muestra la purificación parcial de la peroxidasa catiónica.



**Figura 34:** Eluatos columna de intercambio catiónico; se ensayaron 5 µg por carril. 1: Carga 1; 2: Carga 2; 3: Lavado HEPES 1; 4: Lavado HEPES 2; 5: 0.1M NaCl; 6: 1M-1er fracción NaCl; 7: 0.6M NaCl; 8: 0.8M NaCl 9: 1M NaCl. Las bandas fueron reveladas para actividad de AIA-oxidasa con AIA como sustrato de la forma descrita.

Con la finalidad de observar el trasfondo de proteínas acompañantes se realizó un SDS-PAGE con las mismas muestras del gel de actividad (Fig. 35). En dicho gel se puede observar que existe una cantidad de proteínas detectables menor que en los eluatos previos y varias bandas dentro del rango de peso molecular de las peroxidasa de clase III. Con esto en mente, se procedió a realizar una electroforesis en 2-D con los eluatos 1M en donde se encontró a la proteína catiónica.



**Figura 35: SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie; se ensayaron 5 µg por carril. Eluatos de la columna de intercambio catiónico; MP: Marcador de peso molecular; 1: Carga 1; 2: Carga 2; 3: Lavado HEPES 1; 4: Lavado HEPES 2; 5: 0.1M NaCl; 6: 1M-1er fracción NaCl; 7: 0.6M NaCl; 8: 0.8M NaCl 9: 1M NaCl.**

#### 4<sup>to</sup> método (Aislamiento por medio de resina de intercambio catiónico)

##### Separación de peroxidosas catiónicas por medio de zeolita hidrofóbica

La cantidad de proteína contenida en los 232 mL totales de extracto infiltrado fue 63.31 mg que al precipitarse y resuspenderse en 50 mL de buffer de extracción se convirtieron en 48.87 mg, perdiéndose durante esta etapa alrededor de un 23% de proteína. Las cantidades obtenidas en cada lavado se muestran en el Tabla 4. No obstante a que en este experimento se parte de 48.87 mg, cantidad suficiente de proteína para su separación, se puede observar que la cantidad de proteína en cada lavado fue escasa, además de encontrarse en volúmenes grandes.

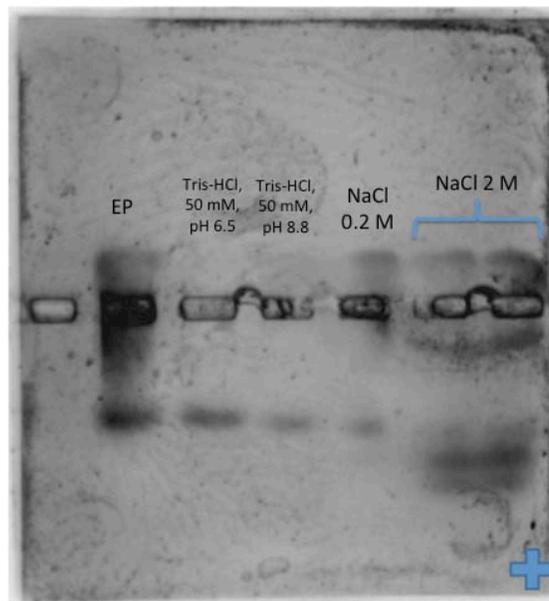
**Tabla 4: Concentraciones de proteína obtenidas en cada paso durante la separación de peroxidosas por medio de zeolita, se muestra el volumen necesario para ensayar 5 µg de proteína en cada carril.**

Muestra	Vol. Total (mL)	Proteína total (mg)	µl para actividad en 5 µg
Infiltrado	232	63.31	18.32
Infiltrado precip.	50	48.87	5.11
Tris-HCl 50 mM, pH 6.5	200	0.02	3578.31
Tris-HCl 50 mM, pH 8.8	90	0.17	562.50
0.2 M NaCl	120	0.20	492.53
2M NaCl	120	0.15	648.47

Considerando la cantidad de tejido del que se partió, la cantidad de proteína obtenida pudo corresponder a que los 700 g de tejido infiltrado pudieron no encontrarse en contacto el suficiente tiempo y con la fuerza necesaria para que penetrara el buffer de extracción. Durante ensayos anteriores en los que se partía de una cantidad menor de tejido, la concentración de sales en el buffer de extracción había sido lo suficientemente alta (fosfato de potasio 100 mM) como para extraer a las peroxidasa presentes en la porción soluble obtenida a partir del apoplasto. Este hecho nos hace suponer un punto importante, el estado de desarrollo al tiempo que se tomaron los brotes, las condiciones de crecimiento y la exposición a patógenos -fenómenos que provocan cambios fisiológicos que incluyen cambios en la actividad de las Prx CIII-, pudieron ser elementos que propiciaron una unión más estrecha entre las peroxidasa y la pared. Se conoce que la modificación en la composición y arquitectura de la pared como respuesta a cambios medioambientales y de desarrollo, promueven la unión de algunas isoperoxidasa a la pared por medio de la estabilización entre cargas negativas y oxígenos expuestos de pectinas en conformación de hélices  $2_1$  y  $3_1$  o “caja de huevo o eggbox” y las cargas positivas de los extremos guanidina de residuos específicos de arginina localizados en la superficie de la proteína, favoreciendo la formación de uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Grant *et al.*, 1973; Golberg *et al.*, 1996; Carpin *et al.*, 2001).

El anclaje de las peroxidasa a microdominios específicos de la pared es parte esencial de su función *in vivo*, esto nos lleva a cuestionarnos el papel de la unión de este tipo de isoformas, es decir ¿se trata de alguna forma de control iónico que la célula ejerce sobre sus peroxidasa?, ¿estas isoformas se encuentran invariablemente solubles?. Un hecho a tomar en cuenta es que su solubilidad no determina una orientación específica, dificultando el encuentro con sus sustratos preferentes y por ende a su relevancia fisiológica; el análisis *in silico* de la secuencia de la isoperoxidasa obtenida, confirmó la presencia o ausencia de características estructurales putativas, reportadas para su unión a los polisacáridos de la pared.

Para realizar los geles fue necesario trabajar con el volumen necesario para ensayar 5  $\mu$ g de proteína por carril; debido a que el volumen excedía el límite del pozo (80-100  $\mu$ l), se decidió liofilizar cada muestra. En el gel que revela bandas de actividad peroxidasa (Fig. 36), aunque es posible observar bandas catiónicas, la cantidad de proteína y el volumen en el que se encontraban no permitiría trabajar con técnicas analíticas subsiguientes.



**Figura 36: PAGE horizontal de actividad de peroxidasa, muestras obtenidas mediante separación por zeolita; se ensayaron 5  $\mu$ g por carril.**

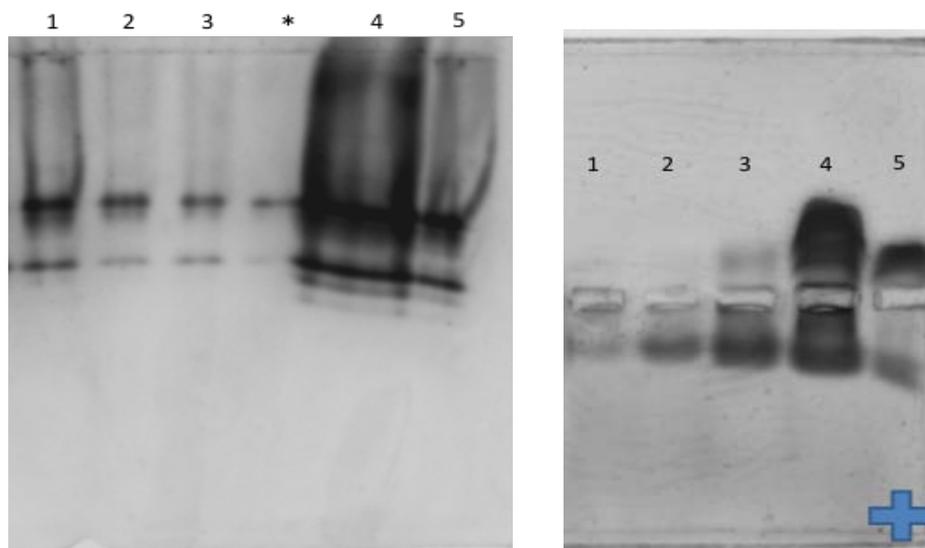
## Extracción de proteínas de pared

El método de purificación de paredes celulares propuesto por Feiz & colaboradores (2006) está basado en varias características, la primera de ellas es la composición de la pared celular, la cual comprende polisacáridos altamente densos; esta propiedad puede ser usada para purificar paredes a través de gradientes de densidad. En segundo lugar, la estructura bioquímica de las paredes es compleja y las proteínas de pared pueden estar unidas a la matriz por medio de fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas; estas interacciones pueden ser moduladas por la composición del medio de aislamiento; a menudo se emplean buffers de baja fuerza iónica para preservar las interacciones iónicas, así como para diluir la fuerza iónica que presenta la pared en sí misma. Un pH ácido es elegido comúnmente para preservar las interacciones entre las proteínas y los polisacáridos tal como sucede *in planta*. Una vez aisladas, las paredes son tratadas habitualmente con buffers de  $\text{CaCl}_2$  para liberar las proteínas y con buffers de  $\text{LiCl}$  con la finalidad de extraer a las glicoproteínas (Melan & Cosgrove, 1988).

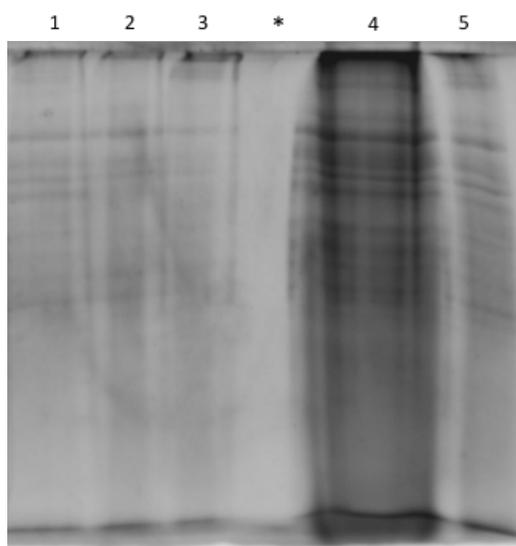
Las cantidades de proteína en el Tabla 5 y los zimogramas de actividad de AIA-oxidasa y peroxidasa (Fig. 37), confirman que sales como el  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{LiCl}$  son eficientes para la extracción de proteínas unidas iónicamente a la pared, como se ha reportado en otros trabajos (Melan & Cosgrove, 1988; Voigt & Frank, 2003), siendo evidente una mayor intensidad en las bandas que corresponden a las fracciones  $\text{CaCl}_2$  200 mM y  $\text{LiCl}$  2M (Fig. 37, carriles 4 y 5). La extracción con sales sugiere que la unión de las peroxidases a la pared estaría basada en interacciones electrostáticas y que las peroxidases catiónicas de interés forman parte de este grupo de isoperoxidasas.

**Tabla 5: Concentraciones de proteína de los extractos con sales; se muestra la concentración obtenida en el último paso de la separación con zeolita con fines comparativos.**

Muestra	Vol. Total (mL)	Vol. Final después de liofilizar (mL)	Proteína total ( $\mu\text{g}$ )
<b>2M NaCl</b>	120	20	154.20
<b><math>\text{CaCl}_2</math></b>	10	0.5	8335.01
<b>LiCl</b>	10	0.5	1441.07



**Figura 37:** PAGE de actividad AIA-oxidasa (izquierda) y Peroxidasa (derecha); se ensayaron 5  $\mu$ g por carril: 1) SN 1 (acetato de sodio 5 mM + sacarosa 0.4 M, pH 4.6), 2) PC 1 (acetato de sodio 5 mM + sacarosa 1 M, pH 4.6), 3) PC 2 (acetato de sodio 5 mM, pH 4.6), 4)  $\text{CaCl}_2$  0.2 M, 5) LiCl 2M. El símbolo \* indica una repetición de la muestra contenida en el carril 3 (PC 2). Las bandas fueron reveladas para actividad de AIA-oxidasa con AIA como sustrato (izquierda) y actividad de peroxidasa con bencidina como sustrato (derecha), de la forma descrita en el texto principal.

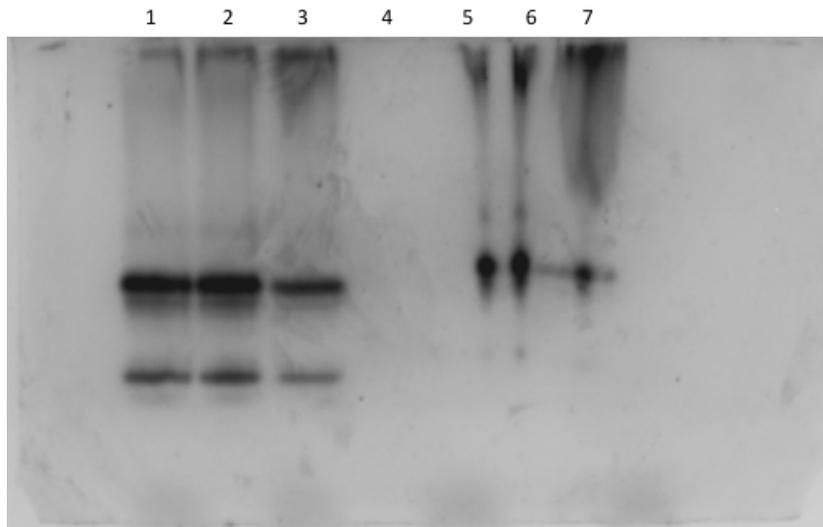


**Figura 38:** SDS-PAGE; se ensayaron 5  $\mu$ g por carril: 1) SN 1 (acetato de sodio 5 mM + sacarosa 0.4 M, pH 4.6, 2) PC 1 (acetato de sodio 5 mM + sacarosa 1 M, pH 4.6), 3) PC 2 (acetato de sodio 5 mM, pH 4.6), 4)  $\text{CaCl}_2$  0.2 M, 5) LiCl 2M. El símbolo \* indica un carril vacío. La tinción de proteínas totales fue realizada con azul de Coomassie, de la forma descrita en el texto principal.

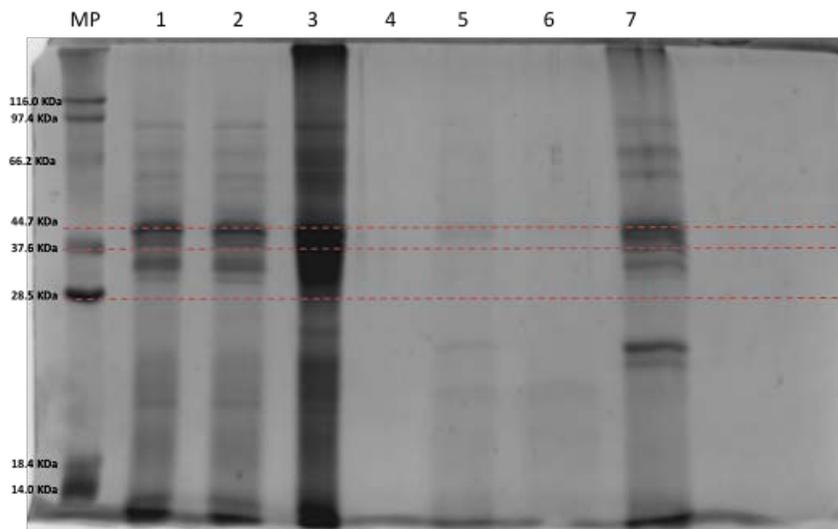
El hecho de que se obtenga una mayor cantidad de proteína en las extracciones con sales y se observe una mayor intensidad en los bandeos en los PAGE de actividad de peroxidasa en comparación con el infiltrado-centrifugado (Fig. 36 y 37 izquierda), sugiere que las peroxidasas se encontraban en mayor proporción unidas a las paredes celulares y disueltas en menor proporción; sin embargo, no se descarta

la utilidad del infiltrado-centrifugado como método preliminar para el lavado de moléculas solubles o unidas débilmente a la pared, es decir aquellas que se encuentran unidas iónicamente a la matriz polimérica pero no de forma estable.

Al término de la extracción de las proteínas de pared con sales y del posterior procesamiento de las muestras, se observó la formación de precipitados; se procedió a realizar el análisis por PAGE de actividad y SDS-PAGE de cada una de las fases formadas, tanto de la fase soluble, del precipitado y una última que contenía ambas partes (completa) (Fig. 39).



**Figura 39:** PAGE de actividad de AIA-oxidasa, muestras de extracciones de proteínas de pared con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{LiCl}$ ; 1:  $\text{CaCl}_2$  completo; 2:  $\text{CaCl}_2$  sobrenadante; 3:  $\text{CaCl}_2$  pastilla; 4: carril vacío; 5:  $\text{LiCl}$  completo; 6:  $\text{LiCl}$  sobrenadante; 7:  $\text{LiCl}$  pastilla. Se ensayaron  $3 \mu\text{g}$  por carril.



**Figura 40:** SDS-PAGE, muestras de extracciones de proteínas de pared con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{LiCl}$ ; MP: Marcador de peso; 1:  $\text{CaCl}_2$  completo; 2:  $\text{CaCl}_2$  sobrenadante; 3:  $\text{CaCl}_2$  pastilla; 4: carril vacío; 5:  $\text{LiCl}$  completo; 6:  $\text{LiCl}$  sobrenadante; 7:  $\text{LiCl}$  pastilla; las líneas rojas punteadas representa el rango de peso reportado para las Prx CIII; sin embargo considerando el peso que otorga a la proteína las cadenas de carbohidratos, se estima un peso con al menos  $10 \text{ kDa}$  extra. Se ensayaron  $5 \mu\text{g}$  por carril.

En los bandeos del zimograma de actividad, se observa una intensidad ligeramente más alta en las bandas catiónicas del precipitado con respecto a la del sobrenadante y una diferencia más acentuada con respecto a la muestra completa; lo opuesto sucede con las bandas más aniónicas; es decir, se observa una mayor intensidad en la muestra completa y en el sobrenadante que en el precipitado.

El bandedo observado de proteínas detectables en el SDS-PAGE (Fig. 40), revela que la muestra del precipitado contenía más bandas detectables con respecto a la muestra completa y la del sobrenadante, así como una mayor intensidad en las bandas en común de todas las muestras.

Se conoce que los agregados son formados por distintos factores que propician esta unión, ya sea de forma covalente o no covalente, tal es el caso de factores medioambientales, diversos tipos de estrés, temperatura, congelamiento y descongelamiento, estrés de agitación, efectos del solvente, modificaciones químicas de la proteína derivadas de los factores anteriores e incluso la cantidad de proteína (Mahler *et al.*, 2008). Estos agregados pueden estar constituidos por diferentes tipos de especies proteicas en distintos estados, ya sea en formas nativas, formas degradadas, estructuras modificadas, parcialmente desdobladas o completamente desdobladas de su forma nativa. El zimograma revela que existe actividad en el agregado precipitado por lo que podemos decir que al menos una parte de este se encuentra en su forma nativa, modificada o parcialmente desdoblada, de tal manera que no se vio afectado su sitio activo; sin embargo, no es posible comprobar si existen modificaciones que afecten a las propiedades inherentes a su estructura (afinidad por sustratos específicos, sitios de unión a cofactores, dominios de unión a otras proteínas y/o componentes de la pared). Por otra parte, el efecto de salting out que sufren las proteínas bajo el efecto cosmotrópico de las sales favorece la agregación y precipitación proteica. Se desconoce si estos agregados se encontraban unidos de forma reversible o irreversible; es probable que los agregados sean del primer tipo, tomando en cuenta que la formación de agregados reversible es a menudo considerado como un evento causado por el auto-ensamble de moléculas de proteína, inducido por cambios en el pH o la fuerza iónica del medio en el que se encuentran (Calamai *et al.*, 2005).

Algunos protocolos (Wu *et al.*, 2014) han probado que la solubilización de esta pastilla puede ser eficientemente conducida por medio de SDS, urea u otro tipo de agente caotrópico; sin embargo, al realizar dicha solubilización las proteínas son propensas a perder su actividad debido a cambios en la estructura globular de la proteína, factor que no permitiría monitorear su presencia.

Todo en conjunto, es decir las zimogramas de actividad durante extracción de proteínas de pared y el análisis de las fases, nos llevó a descartar las muestras obtenidas con LiCl y el uso de las obtenidas con CaCl<sub>2</sub> y de entre éstas, la fracción soluble para la aplicación de las técnicas subsecuentes por encontrarse con un menor trasfondo de proteínas acompañantes.

#### Columna de intercambio catiónico

Después del proceso de separación por medio de la resina de intercambio catiónico, al medir la cantidad de proteína de los eluatos de la columna de intercambio (Fig. 41), se observó que el 2<sup>do</sup> y 4<sup>to</sup> eluatos obtenidos de la concentración 0.2 M de NaCl, así como el 1<sup>er</sup> eluato con 2 M de NaCl, contenían una mayor cantidad de proteína con respecto a otros eluatos. Éstos fueron elegidos para su posterior análisis; se eligieron también el 2<sup>do</sup>, 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> eluatos de la concentración 2 M de NaCl con la finalidad de observar si en estos eluatos estaban presentes las bandas con actividad AIA-oxidasa de interés; se procedió entonces a ensayar los eluatos en PAGE de actividad AIA-oxidasa, peroxidasa y SDS-PAGE.



**Figura 41: Eluatos obtenidos por medio de la columna de intercambio catiónico: el número de eluato y su concentración de proteína se presentan en la tabla inferior (Proteína/Eluato). Se muestran en rojo los eluatos con mayor concentración de proteína. Se señalan con una flecha roja los eluatos elegidos para su ensayo por PAGE de actividad y SDS-PAGE. Las dos tonalidades de azul representan cada una de las concentraciones de NaCl (claro: 0.2 M; fuerte: 2 M). Los corchetes debajo de la gráfica representan las fracciones agrupadas que se ensayaron en el IEF.**

Se obtuvieron zimogramas de actividad de AIA-oxidasa y peroxidasa que confirman el ligado y elución satisfactorio de las peroxidasa catiónicas de interés (Fig. 42). En el zimograma de actividad de AIA-oxidasa se observa en el 2<sup>do</sup> y 4<sup>to</sup> eluato con 0.2 M de NaCl una banda intensa en la parte superior del gel (Fig. 42, izquierda: carriles 3 y 4). Se observa la misma banda en el 2<sup>do</sup> eluato de la concentración 2 M (Fig. 41, izquierda: carril 5) y no así en el 1<sup>er</sup> eluato de la misma concentración (Fig. 42, izquierda: carriles 5), en el 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> eluato se observa la actividad de una banda diferente que se encuentra por debajo de la anterior (Fig. 42, izquierda: carriles 7 y 8), banda que también forma parte del lavado de la columna con buffer HEPES 0.05 M, pH 7.5 (Fig. 42, izquierda: carril 2).

La concentración 0.2 M de NaCl se encuentra al límite de susceptibilidad de la concentración reportada (>200 mM de NaCl) que afecta la unión iónica de una peroxidasa a componentes de la pared (Penel & Greppin, 1996; Carpin *et al.*, 2001), lo cual concuerda con la obtención de una banda en el zimograma de actividad de AIA-oxidasa y al menos cuatro bandas catiónicas con actividad de peroxidasa en el eluato correspondiente a esa concentración (Fig. 42: carril 3 en ambos zimogramas), de igual manera se observan bandas catiónicas en los otros eluatos ensayados (Fig. 42, derecha: carriles 4-6). El hecho de que se observen varias bandas en el PAGE de actividad de peroxidasa y una sola banda en el PAGE de actividad de AIA-oxidasa, demuestran que se trata de un agregado de proteínas con peso y carga parecida, este mismo fenómeno ha sido reportado en otros trabajos (Mahler *et al.*, 2008), el cual sería comprobado más tarde por medio de una electroforesis en dos dimensiones.

La actividad AIA-oxidasa disminuye hacia el 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> eluato obtenido con concentración 2 M de NaCl (Fig. 42, izquierda: carriles 7 y 8); mientras que en los bandeos del zimograma de actividad de peroxidasa se observa un decremento en la actividad desde el 2<sup>do</sup> eluato obtenido con solución 2 M de NaCl (Fig. 42, derecha: carril 6). Un hecho resulta evidente al comparar el patrón de bandas del 1<sup>er</sup> eluato de la concentración 2 M y el patrón del mismo eluato en el zimograma de actividad de peroxidasa (Fig. 42, carril 5 en ambos zimogramas); no se observa una banda clara con actividad de AIA-oxidasa, mientras

que en el de actividad de peroxidasa se observan al menos dos bandas muy intensas. Este mismo fenómeno ocurre de forma inversa con el patrón del 2<sup>do</sup> eluato 2 M (Fig. 42, carril 6 en ambos zimogramas); es decir se observa una banda intensa en el zimograma de actividad de AIA-oxidasa, mientras que no se observan bandas claras en el zimograma de actividad de peroxidasa.

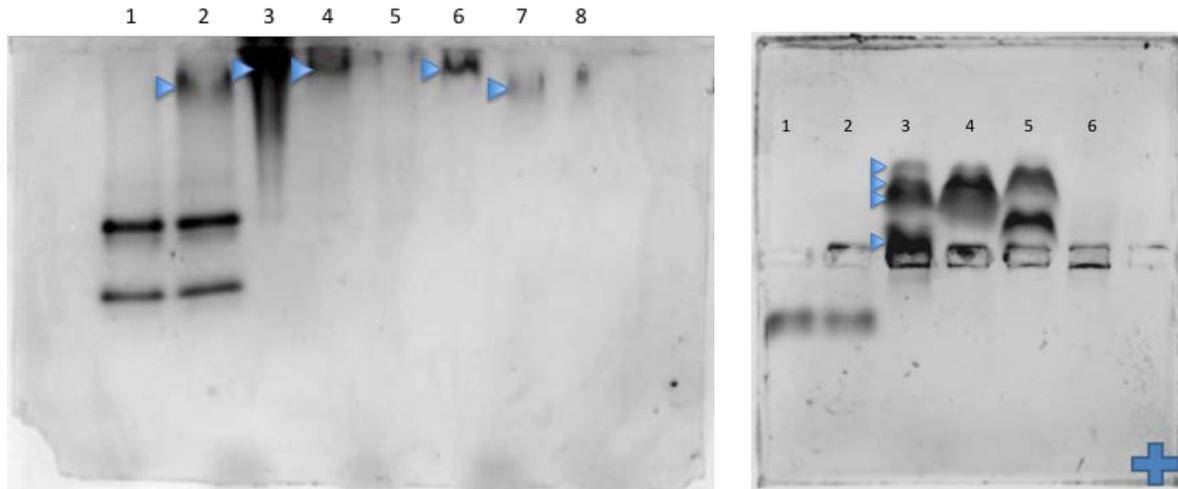
En experimentos previos durante el enraizamiento de esquejes de varias especies de álamo (*Poplar alba*, *P. nigra* y *P. tremula*) se ha observado una mayor actividad de peroxidasa durante los primeros cuatro días de enraizamiento adventicio con una concomitante falta de actividad de AIA-oxidasa durante este mismo periodo (Güneş, 2000). Se ha demostrado con anterioridad que el incremento en la actividad de peroxidasa esta relacionada con la división celular y formación de primordios (Dalet & Cornu, 1988; Ingemarsson, 1995; Pythoud & Buchala, 1989), es decir, durante la fase de iniciación del enraizamiento adventicio. También se ha especulado que esta actividad está relacionada con la formación de cofactores necesarios durante esta fase (Haissig, 1972).

El hecho observado por Østergaard y colaboradores (1998) de que las regiones reguladoras de varios genes de peroxidases contienen una alta cantidad de adenina, característica particular de genes inducidos por varios tipos de estrés, sugiere otra función de las isoformas reveladas en nuestros geles, que además de participar en programas normales de desarrollo, pudieran estar implicadas en la respuesta fisiológica de los organismos hacia varios tipos de estrés, ya sean bióticos o abióticos.

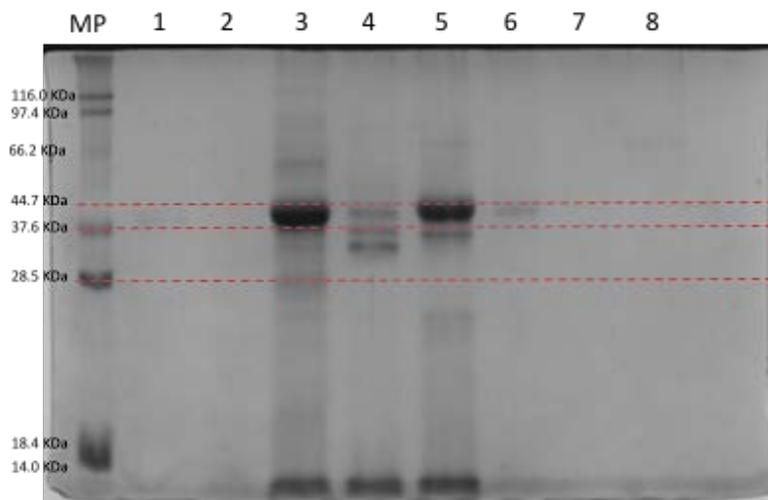
También se puede especular que la actividad AIA-oxidasa observada obedece al catabolismo del AIA tanto exógeno como endógeno; en este rubro Dalet & Cornu (1988) concluyeron que la actividad de AIA-oxidasa regula las concentraciones endógenas de AIA y promueve la formación de raíces, aunado al hecho de que esta actividad se ha encontrado presente en el tejido donde se forman los primordios radiculares. En conjunto, la diferencia entre las actividades de peroxidases y AIA-oxidasa puede inclinarse a la afinidad por sustratos específicos de las isoformas detectadas, las cuales pueden ser más afines por bencidina u otro tipo de sustratos de origen fenólico, al tiempo que disminuyen su afinidad por las auxinas y de la forma contraria.

Los bandeos observados en el SDS-PAGE (Fig. 43) mostraron que los eluatos obtenidos con 0.2 M de NaCl contenían varias bandas visibles y en el caso del 1<sup>er</sup> eluato de esta concentración (Fig. 43: carril 3) las bandas fueron las más intensas de todas; el mismo patrón con bandas menos intensas se puede observar en el 1<sup>er</sup> eluato obtenido con 2 M de NaCl (Fig. 43: carril 5). Por otra parte, se observa un patrón distinto en el bandeo del 4<sup>to</sup> eluato con 0.2 M (Fig. 43, carril 4), donde se observan tres bandas intensas que aparecen tenuemente en los patrones de los otros eluatos. Se deja de observar bandas claras en los eluatos que se obtuvieron por percolación, el lavado con buffer HEPES 0.05 M (Fig. 43: carriles 1 y 2) y los últimos eluatos con concentración 2 M de NaCl (Fig. 43: carriles 7 y 8).

Tomando en cuenta la cantidad de proteína obtenida y los zimogramas observados, se descartaron los eluatos con proteína escasa; con la finalidad de evitar contaminación durante la siguiente técnica analítica se procedió a agrupar los eluatos restantes obtenidos con la misma concentración de NaCl que presentaban bandeos similares y que además contenían un menor trasfondo de proteínas acompañantes.



**Figura 42:** PAGE de actividad AIA-oxidasa (izquierda) y Peroxidasa (derecha) de los eluatos obtenidos por medio de la columna de intercambio catiónico: 1) Eluato obtenido por percolación; 2) Lavado con HEPES 0.05 M, pH 7.5; 3) 2<sup>do</sup> eluato 0.2 M; 4) 4<sup>to</sup> eluato 0.2 M; 5) 1<sup>er</sup> eluato 2 M; 6) 2<sup>do</sup> eluato 2 M; 7) 5<sup>to</sup> eluato 2 M; 8) 7<sup>mo</sup> eluato 2 M. En ambos gels las muestra fueron dispuestas en el mismo orden. En el gel de actividad de peroxidasa no se ensayaron el 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> eluato 2 M. Se ensayaron 5  $\mu$ g por carril.



**Figura 43:** SDS-PAGE: MP) Marcador de peso; 1) Eluato obtenido por percolación; 2) Lavado con HEPES 0.05 M, pH 7.5; 3) 2<sup>do</sup> eluato 0.2 M; 4) 4<sup>to</sup> eluato 0.2 M; 5) 1<sup>er</sup> eluato 2 M; 6) 2<sup>do</sup> eluato 2 M; 7) 5<sup>to</sup> eluato 2 M; 8) 7<sup>mo</sup> eluato 2 M. Las líneas rojas punteadas representa el rango de peso reportado para las Prx CIII; sin embargo considerando el peso que otorga a la proteína las cadenas de carbohidratos, se estima un peso con al menos 10 KDa extra; se ensayaron 5  $\mu$ g por carril.

### Electroforesis en 2-D

Se cargaron tres tiras de IEF con las muestras indicadas en la Figura 41, posteriormente se llevó a cabo una segunda dimensión por medio de un SDS-PAGE. De entre los tres gels se observó que la tira que contenía la muestra del cuarto eluato 0.2 M (Fig. 41, muestra 2; Fig. 44) era la que presentaba los puntos más nítidos que cumplían con el peso y pI correspondiente a las Prx CIII. La banda fue escindida del gel, fragmentada, y su contenido posteriormente secuenciado.

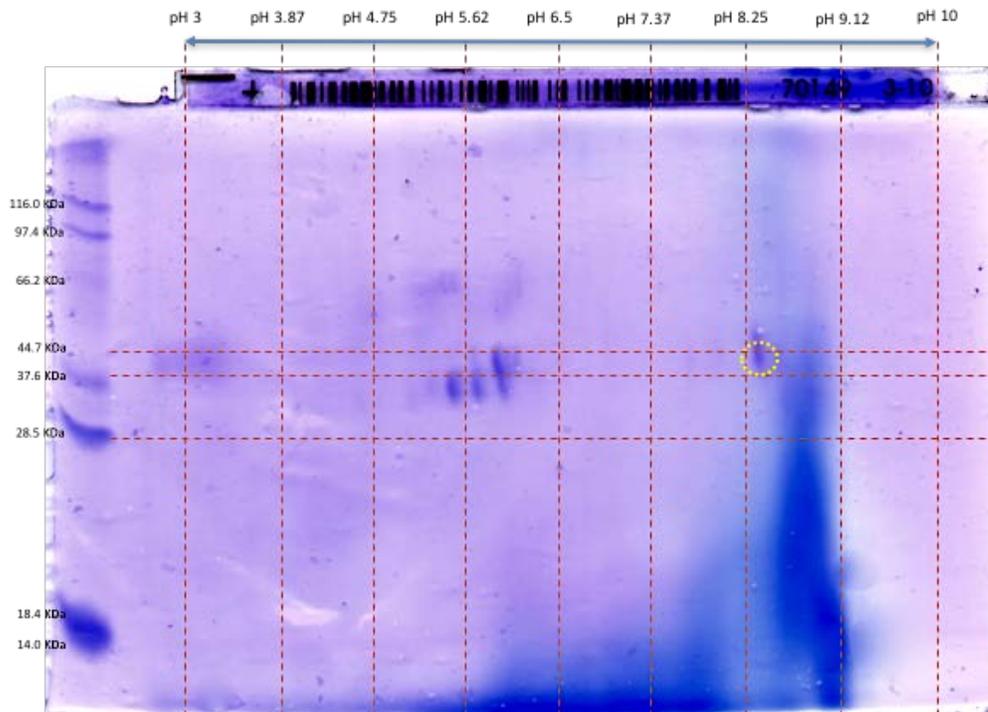


Figura 44: SDS-PAGE del IEF del cuarto eluato 0.2 M de NaCl, se muestra el rango de pH de la tira de IEF por medio de líneas rojas punteadas verticales, las líneas horizontales representan el rango de peso de las Prx CIII; el círculo punteado amarillo encierra la proteína que se seleccionó para su secuenciación, el peso calculado para la proteína es de aproximadamente 45.9 kDa.

En la Tabla 6 se muestran los detalles obtenidos del proceso de secuenciación de 17 fragmentos proteolíticos de la proteína.

**Tabla 6: Datos de secuenciación obtenidos de la proteína obtenida. Acceso:** Identificador único asignado a la proteína por la base de datos FASTA usado para generar el reporte. **Descripción:** Nombre de la proteína exclusivo del identificador que aparece en la columna de acceso. **Puntuación:** Puntuación de la proteína, el cual es la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales. **Cobertura:** Porcentaje de la secuencia de la proteína cubierta por los péptidos identificados. **# Péptidos:** Número de secuencias de los distintos péptidos de la proteína. **Peso molecular [kDa]:** Peso molecular calculado de la proteína.

Acceso	Descripción	Puntuación	Cobertura	# Péptidos	Peso molecular [kDa]
<b>K4BTH7</b>	Peroxidasa OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g071900.2 PE=3 SV=1 - [K4BTH7_SOLLIC]	235.88	60.97	17	38.9

La secuencia de aminoácidos determinada por espectrometría de masas fue:

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80
MASPSLFTFDSSLLVVL ILS IFVS IHFQVTAQGTQP IVKGLSWTFYDS ICPNAES I IRRRLQNVFRQD IGQAAGLLRLHFH
90     100     110     120     130     140     150     160
DCFVQGCDSVLLDGSASGPSEKDAPPNLT LRQQA FR I IEDLRRRVHRDCGRVVS CAD ITA IAARDSVFFSGGPDYDLPLGR
170    180    190    200    210    220    230    240
RDGLTFATTNETLANLPPPSFNTSL ILASLTKNF TPTDVVALSGGHT IG ISHCSSFTDRLYPNQDSSMDKTFANLKTTCF
250    260    270    280    290    300    310    320
TRNSTNTTVLD IRSPNKFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYTDRRTRG IVTSFA INESLFFKEFVNSMIKMGQLNVLTGTQGE
330    340    351
IRANCSVRNSNNYNL IQGTWSE I

```

La búsqueda de secuencias homólogas por BLASTp mostró las 10 secuencias similares con mejor puntuación (Anexo 2); en la Tabla 7 se muestran la secuencia que presentó un E-value de cero, perteneciente a una Prx CIII: **LePrx16** presentó un porcentaje de identidad del 100% y la misma longitud de aminoácidos que nuestra secuencia consulta, por lo tanto se puede asumir que se trata de dicha peroxidasa.

**Tabla 7: Resultado de BLASTp contra la base de datos de Peroxibase, se muestra la secuencias con mejor puntuación.**

Descripción	% Identidad	Aminoácidos (Longitud)	E-value
LePrx16 [ <i>Lycopersicon esculentum</i> (Jitomate)]	100	351	0

El análisis realizado sobre la secuencia obtenida muestra que la proteína presenta:

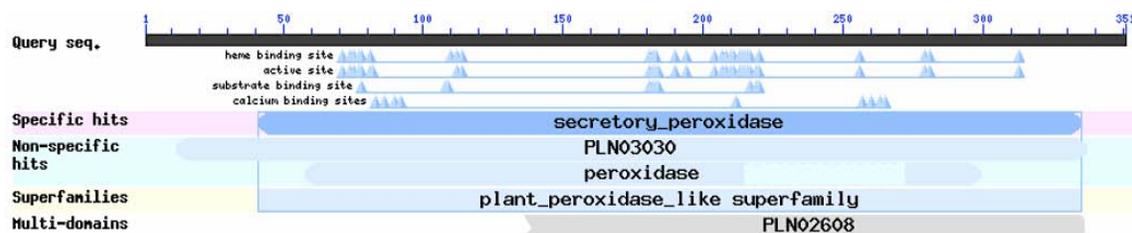
- **Longitud:** 351 aminoácidos (preproteína), 319 aminoácidos (proteína madura, sin péptido señal)
- **Peso molecular:** 38.75 kDa (preproteína), 35.39 kDa (proteína madura, sin péptido señal y sin glicosilación), 45.9 kDa (proteína glicosilada madura)
- **Punto Isoelectric:** 8 (7.99)
- **Coefficiente de extinción:** 21930 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a 280 nm medido en agua.

Este análisis nos reveló que su peso teórico calculado de 38.75 kDa para la proteína madura, es decir sin contar el peso de los aminoácidos que componen la extensión *N*-terminal, este peso se encuentra dentro del rango reportado para las Prx CIII (32.5-42 kDa) (Siegel, 1993). Este valor representa solo el peso de la cadena peptídica; sin embargo, se conoce que este peso aumenta de entre un 18-25% debido a las cadenas de carbohidratos unidas a residuos de Asn expuestos en la superficie de la molécula (Welinder, 1976; revisado por Gaspar *et al.*, 1982), por lo que el peso de la glicoproteína puede llegar a los 45.9 kDa (peso calculado desde el gel de segunda dimensión); este peso supone que la porción de carbohidratos representa un aproximado del 15.5% (7.15 kDa) del peso total. El pI teórico calculado señala que se trata de una isoforma moderadamente catiónica/básica de pI 7.99. La proteína está compuesta principalmente por aminoácidos polares sin carga (S, T, N, G, Q, C y Y) y no polares hidrófobos (L, I, F, A, V, P, M y W), los cuales representan un 40% del total de la proteína en ambos casos (un total del 80%). Aquellos residuos que otorgan carga positiva a la molécula aparecen con un porcentaje del 6.8, 2.6 y 1.7% para R, K y H, respectivamente; las Arg parecen ser los residuos que mayor carga positiva aportan a la molécula. Las 8 cisteínas conservadas típicas de las Prx CIII constituyen un 2.3% del total, siendo además las únicas Cys presentes. Otro hecho importante es la presencia de 6 His adicionales a los 2 residuos implicados en el ciclo catalítico y en la coordinación del átomo de hierro del grupo prostético, que aportan cargas positivas extra a la carga total de la peroxidasa. Estos resultados se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8: Análisis de la composición de aminoácidos de LePrx16.**

Aminoácido:Frecuencia	%	Aminoácido:Frecuencia	%
S: 34	9.7	Q: 16	4.6
L: 34	9.7	P: 15	4.3
T: 30	8.5	K: 9	2.6
D: 24	6.8	C: 8	2.3
R: 24	6.8	E: 8	2.3
N: 23	6.6	Y: 7	2.0
F: 22	6.3	H: 6	1.7
G: 22	6.3	M: 5	1.4
I: 22	6.3	W: 2	0.6
A: 20	5.7	U: 0	0.0
V: 20	5.7	O: 0	0.0

El análisis hecho sobre la composición de la estructura secundaria por el servidor PSIPRED (Anexo 2), muestran que la proteína presenta 13  $\alpha$ -hélices, lo cual se encuentra en concordancia con el número reportado para las Prx CIII (10-13 hélices), así como la presencia de solo una lámina  $\beta$ ; este tipo de análisis está basando en la posible estructura deducida de la secuencia obtenida sin ser esto un resultado canónico, hecho que se comprobó más tarde mediante el modelado tridimensional de la secuencia. La detección de dominios conservados por medio del servidor de NCBI mostró que la secuencia contiene los dominios usuales de las Prx CIII, así como el número de residuos implicados en cada característica detectada (Fig. 45).



**Figura 45: Detección de dominios conservados, se observan los dominios esperados para una peroxidasa de clase III.**

En la Tabla 9 se muestra un resumen del número de residuos implicados con una función específica encontrados durante esta misma búsqueda. Los resultados completos de análisis se presentan en el Anexo 2. Este tipo de consulta da una aproximación de la funcionalidad de la secuencia, tal como se esperaba para este tipo de enzimas.

**Tabla 9: Características de los dominios conservados y número de aminoácidos implicados.**

Característica	# residuos implicados
<b>Ligado del hemo</b>	29
<b>Sitio activo</b>	31
<b>Sitio de unión a sustrato</b>	10
<b>Sitios de unión a Ca<sup>2+</sup></b>	9

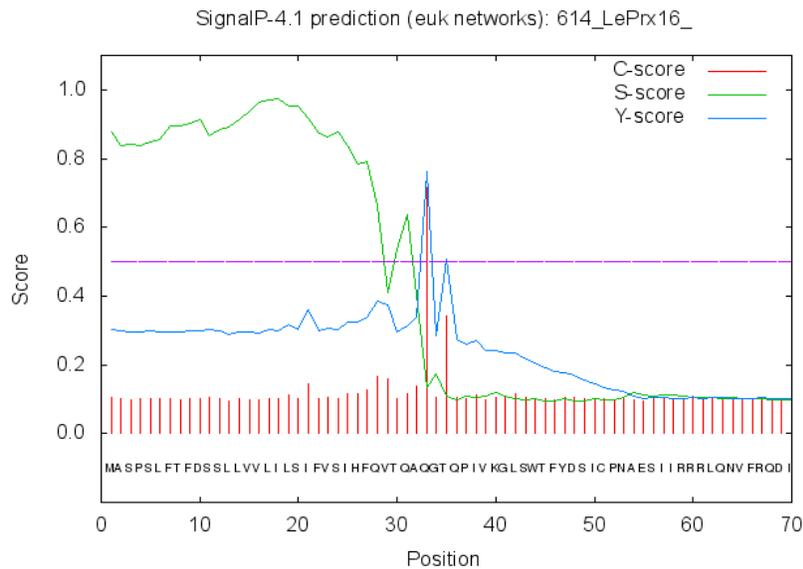
Una característica importante, tal como sucede en el caso de la HRP recombinante (HRP-C), es la presencia en la preproteína de una extensión *N*-terminal de 30 residuos de longitud (Fujiyama *et al.*, 1988; 1995). El análisis de dicha secuencia hecho por medio de la comparación de LePrx16 con LePrx06 durante su alineamiento, muestra que el péptido maduro consta de ~312 residuos con una extensión *N*-terminal de ~39 residuos, la aproximación es debida a la variabilidad en el número de residuos que se ha encontrado entre las distintas isoperoxidasas estudiadas.

La extensión *N*-terminal encontrada con respecto al alineamiento con LePrx06, se muestra sombreada en gris (39 residuos); las histidinas distal y proximal (H44 y 178) se encuentran en rojo y en

azul las 8 cisteínas conservadas que forman los 4 puentes disulfuro (pares 12-93, 45-50, 99-294 y 179-206).

MASPSLFTFDSSLLVVLILSIFVSIHFQVTQAQGTQPIVKGLSWTFYDSICPNAESIIRRRLLQNVFRQDIGQAA  
 GLLRLHFHDCFVQGC DGSVLLDGSASGPSEKDAPPNLT LRQQAFRIIEDLRRRVHRDCGRVVS CADITAIAARDS  
 VFFSGGPDYDLPLGRRDGLTFATTNETLANLPPPSFN TSLILASLATKNFTPTDVVALSGGH TIGISHCSSFTDRL  
 YPNQDSSMDKTFANNLKTTCPTRNSTNTTVLDIRSPNKF DNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYTDRRTRGIVTSF  
 AINESLFFKEFVNSMIKMGQLNVLTGTQGEIRANCSVRNSNNYLIQGTWSEI

Los resultados de la predicción del péptido señal hecho por medio de SignalP 4.1 Server (Fig. 46), mostraron que el puntaje más alto para el sitio de escisión –y por ende la longitud del péptido señal- se encuentra entre las posiciones 32 y 33, seis residuos menos que lo encontrado durante los alineamientos y comparación con LePrx06 (39 aminoácidos).



**Figura 46:** Gráfica de las calificaciones obtenidas por el servidor SignalP 4.1. La descripción detallada de los puntajes se describen en el texto principal. Nótese que los puntajes más altos de todos los parámetros convergen entre la posición 32 y 33, sitio que delimita el punto de escisión del péptido señal. *C-score (raw cleavage site score):* Calificación obtenida de la discriminación del sitio de escisión del péptido señal de cualquier otro sitio. Nótese que el C-score es alto en la posición posterior inmediata al sitio de escisión (primer residuo de la proteína madura). *S-score (signal peptide score):* Calificación que distingue posiciones dentro de los péptidos señal de posiciones en la parte madura de las proteínas y de proteínas sin péptido señal. *Y-score (combined cleavage site score):* Media geométrica del C-score y la pendiente del S-score, esta calificación otorga una mejor predicción del sitio de escisión que solo el C-score. Esto es debido al hecho de que múltiples picos con calificación alta de C-score pueden ser encontrados en la secuencia, de los que solo uno es el verdadero sitio de escisión. El Y-score discrimina entre puntajes altos de C-score escogiendo el único donde la pendiente del S-score es más pronunciada.

En la Tabla 10 se muestra el resumen de los puntajes máximos de los tres parámetros; también se muestran:

- *mean S:* Promedio del S-score del posible péptido señal (desde la posición 1 a la posición inmediata antes del Y-score máximo)
- *D-score (discrimination score):* Promedio ponderado de la media S y el Y-score máximo. Esta calificación es usada para discriminar péptidos señal de péptidos no señal. Para proteínas no secretoras todas las calificaciones representadas en los resultados deben ser idealmente bajas (cerca del valor negativo de 0.1).

**Tabla 10: Resultados de los valores obtenidos del análisis de la presencia del péptido señal en la secuencia de LePrx16, los valores representan los puntajes de la gráfica en la Figura 45.**

Medición	Posición	Valor	Cutoff	Péptido señal?
max. C	33	0.715		
max. Y	33	0.763		
max. S	18	0.974		
mean S	1-32	0.832		
D	1-32	0.800	0.450	Si

Nombre=614\_LePrx16 SP='Si' Sitio de escisión entre las posiciones: 32 and 33: TQA-QG D=0.800  
D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-noTM

De los dos resultados, el primero se trata solo de una aproximación con respecto al alineamiento con LePrx06, por lo tanto no representa un resultado exacto, en tanto que el segundo resultado –análisis por SignalP 4.1- se encuentra en concordancia con lo reportado por Peroxibase, es decir, dicho servidor reporta un péptido señal con las mismas características que lo encontrado por SignalP 4.1. Todo en conjunto, nos indica que la extensión *N*-terminal se encuentra dentro del rango de longitud reportado para este tipo de secuencias (20-50 residuos) (Chrispeels, 1991; Kis *et al.*, 2003 cita); y que además presenta una secuencia interna de al menos 6 aminoácidos hidrófobos (ya sea A, V, L, I, P, M, F y W), la cual se conoce que actúa como péptido señal, marcando a las proteínas hacia el retículo endoplásmico (RE), desde donde son dirigidas hacia el tonoplasto o hacia la pared celular (Chrispeels, 1991). Este proceso involucra la escisión del péptido señal y la translocación de la proteína a través de la membrana del RE hacia dentro del espacio cisternal. La proteína es retenida en el lumen del RE si exhibe una extensión *C*-terminal (Wandelt *et al.*, 1992); se conoce además que esta secuencia dirige hacia la vacuola a las proteínas que la comprenden, en dicha extensión se encuentra la secuencia conservada MLVSSI, presente en las peroxidasas vacuolares (Ren *et al.*, 2015). En el análisis realizado sobre la secuencia de LePrx16, no se observa la presencia de esta extensión ni de la secuencia reportada, lo que sugiere que este evento no ocurre durante el procesamiento de LePrx16. La ruta entonces continúa hacia el aparato de Golgi, donde se lleva a cabo la modificación post-traduccional de proteínas de secreción -tal como el caso de proteínas previamente glicosiladas en el RE-, donde son modificadas a glicanos más complejos por medio de varias glicosidasas y glicosil transferasas (Stahelin & Moore, 1995). Desde el aparato de Golgi, pueden ser transportadas ya sea hacia la vacuola (Chrispeels & Raikhel, 1992; Matsui *et al.*, 2011) -sea este caso si presenta la mencionada extensión *C*-terminal, hecho que no se observó en LePrx16, descartando su probable destino vacuolar- o el espacio extracelular, lugar donde se he demostrado la presencia de las Prx CIII. El proceso descrito delimita una ruta de procesamiento que culmina en la secreción de las peroxidasas hacia la pared celular.

El análisis de los sitios de glicosilación por GlycoEP, muestra el total de sitios analizados (23 sitios), cada glicositio potencial es representado en la secuencia en color rojo, subrayadas y en fuente negra:

MASPSLFTFDSSLLVVLILSIFVSIHFQVTQAQGTQPIVKGLSWTFYDSICPNAESIIRRLQNVFRQDIGQAAGLLR  
LHFHDCFVQCDGSLVLLDGSASGPSEKDAPPNLTLRQQAFFRIEDLRRRVHRDCGRVVCADITAIARDSVFFS  
GGPDYDLPLGRRDGLTFATTNETLANLPPPSFNLSLILASLTKNFTPTDVVALSGGHTIGISHCSSFTDRLYPNQ  
DSSMDKTFANNLKTTCPTRNSTNTTVLDIRSPNKFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYTDRRTRGIVTSFAINES  
LFFKEFVNSMIKMGQLNVLTGTQGEIRANCSVRNSNNYNLIQGTWSEI

En la Tabla 11 se muestra el puntaje de los 23 posibles glicositios analizados; los resultados mostraron 8 motivos con mejor puntuación cotejados contra la base de datos que comprende 2604 glicositios *N*-ligados en proteínas eucariotes; todos ellos cumplen con la secuencia requisito Asn-X-Ser/Thr o N-X-S/T (X= cualquier aminoácido, excepto prolina), reportada para sitios de glicosilación en distintas proteínas eucariotes incluyendo a las Prx CIII. Reportes sobre la presencia de glicositios, señalan un número de entre 2 y 6 sitios (revisado por Siegel, 1993), 3 para la peroxidasa catiónica de cacahuate

(CPrx) (van Huystee *et al.*, 2002), 7 cadenas para la HRP (revisado en van Huystee *et al.*, 2004) y 9 sitios para el caso de HRP C1A de los cuales 8 se encuentran ocupados cuando la enzima es expresada en plantas (Smith *et al.*, 1990); en el caso de LePrx16 se encontraron 8 sitios con un puntaje >0.7, este número de sitios se encuentra en concordancia con lo explorado por otros autores.

**Tabla 11: Calificaciones de los potenciales sitios de glicosilación obtenidos por el servidor GlycoEP.**

Posición	Motivo	Puntuación	Predicción
53	<u>NAE</u>	-1.079779	No glicosilada
64	<u>NVF</u>	-1.0674425	No glicosilada
110	<u>NLT</u>	0.94270315	Sitio potencial de glicosilación
174	<u>NET</u>	1.2883152	Sitio potencial de glicosilación
179	<u>NLP</u>	-1.2173472	No glicosilada
186	<u>NTS</u>	0.77266057	Sitio potencial de glicosilación
198	<u>NFT</u>	0.80641173	Sitio potencial de glicosilación
228	<u>NQD</u>	-0.76863387	No glicosilada
239	<u>NNL</u>	-0.68464035	No glicosilada
240	<u>NLK</u>	-0.78299538	No glicosilada
249	<u>NST</u>	0.86430806	Sitio potencial de glicosilación
252	<u>NTT</u>	1.1661191	Sitio potencial de glicosilación
262	<u>NKF</u>	-1.2379436	No glicosilada
266	<u>NKY</u>	-1.2333912	No glicosilada
274	<u>NRQ</u>	-1.007964	No glicosilada
301	<u>NES</u>	1.0769619	Sitio potencial de glicosilación
311	<u>NSM</u>	-1.0984664	No glicosilada
320	<u>NVL</u>	-0.73333688	No glicosilada
332	<u>NCS</u>	0.93557902	Sitio potencial de glicosilación
337	<u>NSN</u>	-0.96269448	No glicosilada
339	<u>NNY</u>	-0.64636988	No glicosilada
340	<u>NYN</u>	-1.1566015	No glicosilada
342	<u>NLI</u>	-1.1500578	No glicosilada

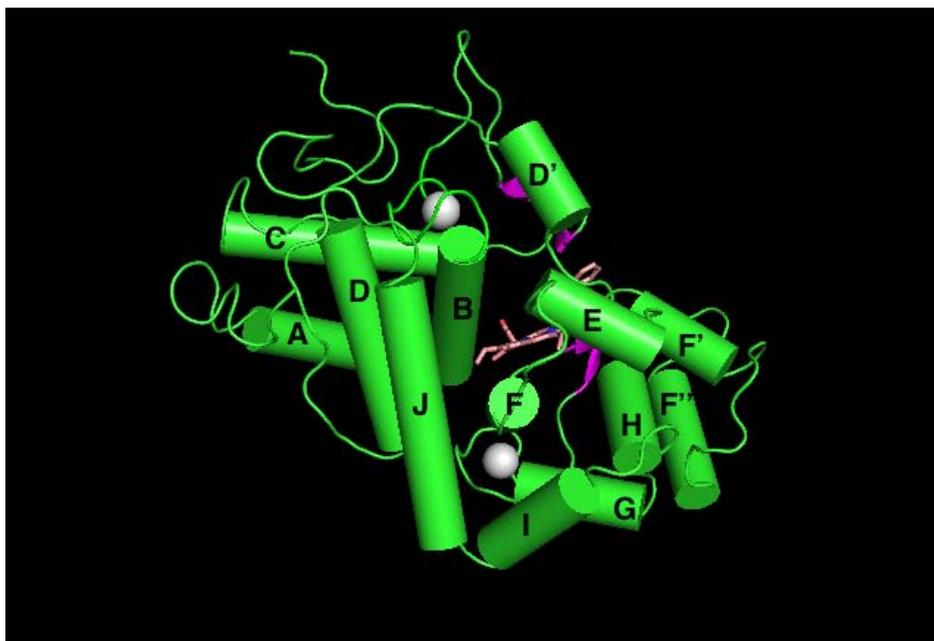
La naturaleza de los azúcares presentes que poseen los glicositos analizados es sin embargo desconocida; cabe mencionar que durante las últimas 4 décadas esta cuestión ha tratado de elucidarse (revisado en van Huystee *et al.*, 2004; Clarke & Shannon, 1976), llegando a la conclusión en primera instancia que los glicanos ligados presentan microheterogeneidad, es decir, que la clase, el número y la posición de las cadenas de azúcares es variable dando lugar a distintas glicoformas, las cuales varían en sus cadenas de carbohidratos pero no en su núcleo peptídico. Otros experimentos se han encargado de dilucidar la función de estos glicanos; brevemente, el marcaje de la CPrx con <sup>35</sup>S-metionina y <sup>3</sup>H-manosa durante cultivos celulares incubados con tunicamicina -inhibidor de glicosilación (Schwarz *et al.*, 1979; Elbein, 1984)- mostraron que las proteínas recuperadas fueron marcadas normalmente con <sup>35</sup>S-metionina. Lo interesante estriba en el hecho de que se encontró poco o ningún marcaje con <sup>3</sup>H-manosa, aunado al hecho de que se recuperó poca peroxidasa del medio, sugiriendo que la proteína no glicosilada fue degradada antes de ser liberada por las células. Otros experimentos sobre CPrx han mostrado que aunque la remoción de todos los azúcares afecta su actividad enzimática, no todas las cadenas están implicadas en esta característica (Bowles & Pappin, 1988).

Las enzimas son conocidas por ser bastante lábiles (Schimke & Katunuma, 1975; Price & Stevens, 1988); el hecho de que CPrx es estable *in vivo* e *in vitro* (van Huystee & Zheng, 1995), además de que no se desconoce la resistencia de las Prx CIII, nos hace cuestionarnos el papel de los glicanos en la proteína. En experimentos previos, cuando CPrx fue tratada con PNGasa F (Péptido *N*-glicosidasa F, amidasa que escinde entre la GlcNAc más interna y residuos de Asn de glicoproteínas *N*-ligadas), no se perdieron todos los glicanos; sin embargo la actividad dejó de ser detectable (Hu & van Huystee, 1989), quizás debido a la pérdida del grupo hemo (van Huystee & Wan, 1994). Actualmente, no obstante a que se sabe que la estabilidad de varias enzimas es debida a las cadenas de carbohidratos *N*-ligadas (Terashima *et al.*, 1994),

se desconoce qué tipo de pérdida, ya sea de un azúcar o la de una cadena entera, puede causar la pérdida de actividad o degradación (van Huystee *et al.*, 2002).

En cuanto al tema de la localización de los azúcares, el aislamiento por HPLC de tres glicopéptidos pertenecientes a la CPrx, mostró que los sitios de glicosilación se encontraban en vueltas  $\alpha$  (Wan & van Huystee, 1993). El análisis preliminar de la longitud de los azúcares por filtración en biogel, reveló que la masa promedio fue de 176 Da y que dichos glicanos podían contener de 7 a 14 azúcares (Wan *et al.*, 1994), esta evidencia confirma la idea de su microheterogeneidad.

El modelado tridimensional con respecto a la peroxidasa recombinante de rábano C1A en complejo con ácido benzhidroxámico reportada por Henriksen y colaboradores (1998) (Fig. 47), muestra un arreglo globular conformador por 13  $\alpha$ -hélices y 2 laminas  $\beta$ , resultado distinto al obtenido por medio de el servidor PSIPRED. Dentro de la estructura helicoidal aparece el núcleo de plegado de las peroxidases (A-J) además de las 3 hélices exclusivas de las Prx CIII (D', F' y F'').

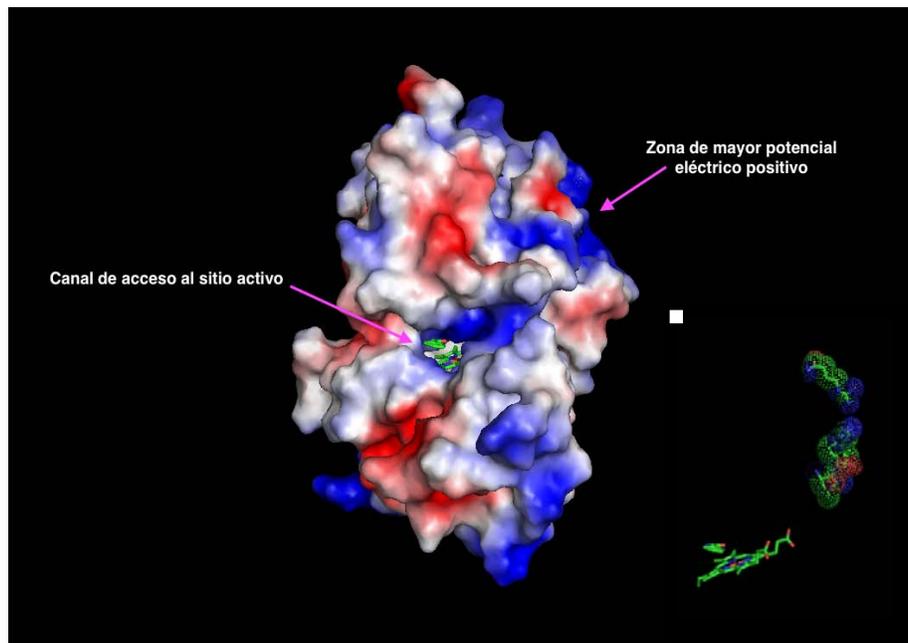


**Figura 47:** Estructura secundaria de LePrx16 usando a la peroxidasa recombinante de rábano C1A en complejo con ácido benzhidroxámico como estructura templete (Henriksen *et al.*, 1998); se muestran en cilindros verdes cada una las  $\alpha$ -hélices que forman el núcleo de plegado de las Prx (A-J), así como las tres helices exclusivas de las Prx CIII (D', F' y F''); las laminas  $\beta$  de la estructura se muestran en color magenta.

Las Prx CIII presentan un grado bajo de homología de  $\sim 20\%$ , encontrándose conservados sólo algunos aminoácidos específicos implicados en su ciclo catalítico y en mantener su estructura terciaria. De acuerdo con Carpin y colabores (2001), las peroxidases también pueden presentar conservados 4 residuos de Arg, los cuales se encuentran mediando en parte su interacción con componentes de la pared (Grant *et al.*, 1973). Los residuos de Arg implicados en esta característica -de acuerdo con la literatura- son las Arg 117, 262, 268 y 271 (en numeración de AhPrx04 y CpPrx01), los cuales se encuentran sobre la hélice J y en el lazo que une a las hélices D y D' (Penel & Greppin, 1996; Schuller *et al.*, 1996; Carpin *et al.*, 2001). Los resultados del alineamiento con respecto a estas dos secuencias no mostraron residuos de Arg conservados en las posiciones reportadas ni en LePrx16 ni en AhPrx04 y CpPrx01 (Anexo 2). Al analizar la estructura secundaria se observaron resultados parecidos, es decir, no se encontraron estos residuos en los fragmentos reportados, descubriéndose incluso que dichos segmentos carecían de Arg.

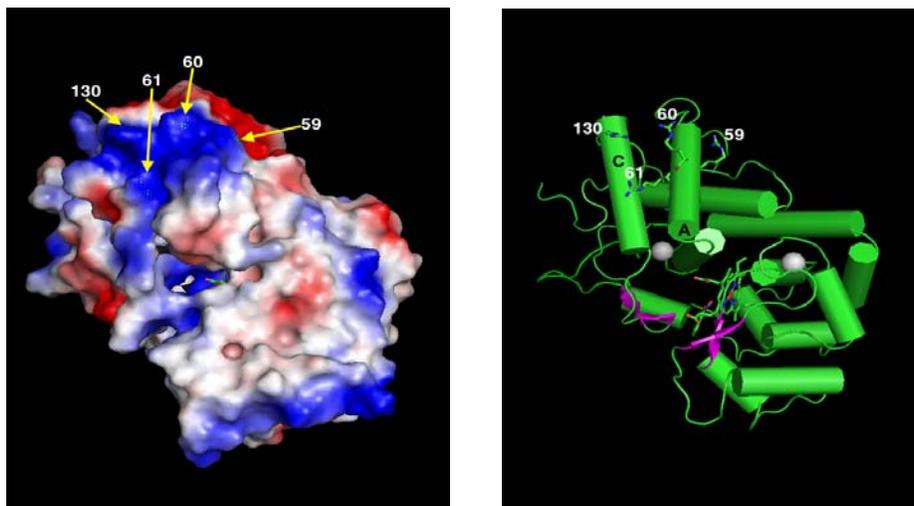
Posteriormente, con la finalidad de encontrar algún indicio de residuos que pudieran llevar a cabo un papel similar, se calculó el potencial electrostático de la superficie de la molécula; de acuerdo con la literatura, el sitio de localización de los 4 residuos de Arg se encuentra en el lado opuesto de entrada al sitio activo. Con base en esto, se procedió a buscar regiones con carga positiva que pudieran tener esta

función putativa. Se descubrió un parche con carga positiva que además fue el de mayor extensión en la superficie, el cual se encontró aproximadamente a  $90^\circ$  del canal de acceso al sitio activo. En este sitio se encontraron 4 residuos de Arg distintos a los reportados que podrían desempeñar esta función (Fig. 48).



**Figura 48: Potencial electrostático de LePrx16 usando a una peroxidasa catiónica de cacahuete (PDB ID: 1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) como estructura templete; en azul se muestran las regiones de potencial positivo, en rojo las de potencial negativo y en blanco las regiones neutras o cercanas a la neutralidad. Recuadro interior: orientación de las Arg que forman parte del parche positivo con respecto al sitio activo.**

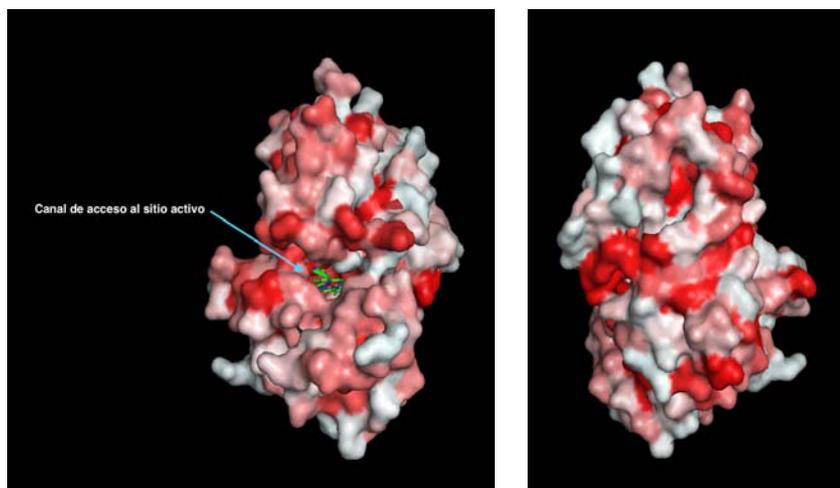
Al analizar el parche con carga positiva se descubrieron varios residuos de Arg, de los cuales solo el 59, 60, 61 y 130 se encontraban con sus extremos guanidina orientados hacia el exterior de la molécula (Fig. 49, izquierda). Se encontró además que dichos residuos forman parte de la hélice A y C (Fig. 49, derecha).



**Figura 49: Residuos de Arginina del parche positivo. Izquierda: Posición de los residuos de Arg sobre la superficie de la molécula. Derecha: Posición de residuos de Arg en la estructura secundaria.**

Se procedió a analizar si dichos residuos se encontraban conservados en las 25 secuencias con mejor puntuación obtenidas por el Blastp contra el banco de peroxidasa, incluyendo en el alineamiento a AhPrx04 y CpPrx01 con fines comparativos. Se descubrió que R59 se encuentra muy conservada entre todas las secuencias analizadas, con excepción de AhPrx04, la cual presenta una Lys en dicha posición. Por otra parte se encontró mayor variabilidad en las posiciones 60 y 61, predominando residuos de R, K, S y Q. En el caso de la posición 130 se encontraron predominantemente residuos de K, R y S. En conjunto, la evidencia señala la presencia de aminoácidos con carga positiva, negativa, y con grupos capaces de formar interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con componentes de la pared de la forma antes mencionada. Hace falta evidencia basada en la mutación de los aminoácidos encontrados y como afecta la falta de éstos a la susceptibilidad en la unión a la pared celular para poder afirmar que se trata de la característica que delimita la unión de esta isoperoxidasa a la pared; sin embargo, esta idea propone cuestiones interesantes para futuras aproximaciones.

El plegamiento y el auto-ensamble de proteínas es un evento que es conducido en gran medida por el efecto hidrófobo; uno de los temas que mejor se conoce el campo de la bioquímica es la interacción de grupos hidrófobos que llevan a distintos polímeros a su forma funcional, tal es el caso de los ácidos nucleicos y las proteínas. Dentro de las proteínas, el efecto hidrofóbico es la causa principal de la formación de estructuras secundarias y del auto-ensamble entre complejos grandes, las cuales tienden hacia estos arreglos debido a su propensión -como todo el universo- hacia las formas que menor energía libre suponen. Esta idea condujo al análisis de los sitios hidrófobos en la superficie de la proteína (Fig. 49) con la finalidad de apreciar posibles sitios de interacción entre las peroxidasas y su medio circundante. Con esto en mente se procedió a marcar en rojo a los aminoácidos con mayor índice de hidropatía, encontrándose que este tipo de aminoácidos además de encontrarse en la parte interna de la proteína, también se encuentran sobre la superficie expuesta al solvente. Este análisis nos lleva a pensar en la posible complementariedad de unión con otros componentes hidrofóbicos de la pared, tal es el caso del homogalacturonano (HG) -polisacárido pectínico más abundante (65% de las pectinas totales de la pared celular)-, el cual es secretado en un estado muy metil-esterificado (Staehelin & Moore; 1995; Sterling *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2009) y por ende altamente hidrófobo, postulándolo como posible actor durante este tipo de unión. Es posible que enlaces iónicos y puentes de hidrógeno ocurran en el caso en el que exista la presencia de aminoácidos polares en la vecindad del ambiente hidrófobo, los cuales pueden estabilizar la unión y como se piensa de los puentes de hidrógeno, puedan discriminar entre la estructura correcta de las formas incorrectas (Matthews, 2001).



**Figura 50:** Zonas hidrofóbicas presentes en la superficie molecular de LePrx16 usando a una peroxidasa catiónica de cacahuete (PDB ID: 1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) como estructura templete, se representan en color rojo los sitios con mayor hidrofobicidad. Izquierda: Vista frontal del canal de acceso hacia el sitio activo. Derecha: Vista a 180° del sitio activo, obsérvense los surcos hidrofóbicos en esta parte de la molécula, los cuales pueden conducir su unión a otros componentes de la pared.

## Conclusiones

---

Se purificó una proteína de tallos de *Solanum lycopersicum* L., de 351(319 aminoácidos como proteína madura, sin péptido señal) de longitud, un peso teórico de 45.9 kDa (proteína glicosilada madura) y un pI de 8 (7.99), la cual fue identificado como LePrx16. La evidencia experimental de este trabajo sostiene que su localización es extracelular, considerando que se utilizaron procedimientos de extracción basados en la obtención de proteínas extracelulares y de pared celular del tejido (segmentos de tallo). Su presencia en la porción soluble del apoplasto y asociada a las paredes celulares (fracción insoluble del apoplasto) sugiere una dinámica de asociación-disociación, que puede tener importancia en el control de su actividad. La capacidad de esta isoenzima para oxidar al ácido Indolacético hace posible su intervención en el catabolismo de las auxinas, aunque su localización extracelular haría suponer que deben acompañarle elementos que ayuden a tener un control refinado de su actividad. El andamiaje de la isoenzima puede contribuir a ello, y la naturaleza catiónica de la LePrx16 sugiere que la interacción de sus grupos cargados positivamente con las cargas negativas de los poligalacturonatos que integran las pectinas en las paredes celulares contribuyan a la asociación, aunque en un ambiente acuoso, un procedimiento más eficiente de asociación lo constituye la existencia de grupos hidrófobos ubicados en la superficie de la molécula enzimática. El modelaje que se ha llevado a cabo para predecir la estructura tridimensional de esta isoenzima, muestra que se exponen los residuos hidrofóbicos de tal forma en la superficie, que promueven una asociación más eficiente con las paredes celulares y los grupos cargados, contribuirían a la especificidad en las uniones. La metilación de los poligalacturonatos promovería la asociación.

## Implicaciones y usos prácticos

---

Las peroxidasas exhiben un grado de versatilidad difícil de alcanzar por alguna otra enzima y debido la gran variedad de subproductos que su actividad provee, este tipo de enzimas a menudo han sido empleada en numerosas y distintas aplicaciones, tanto industriales como medicas, ya sea en el tratamiento de aguas residuales, síntesis química (como el caso de la síntesis de moléculas útiles en el tratamiento del cáncer), inmunoensayos, biosensores durante la determinación de hidroperóxidos o aplicadas en kits de diagnóstico (detección de lactosa en leche, cuantificación de ácido úrico, glucosa y colesterol). Considerando este punto de vista, la producción de peroxidasas con distintos grados de variación dependiendo de la aplicación necesaria, ya sea en su grado de glicosilación para su uso médico o modificándolas en sus propiedad fisicoquímicas a tal punto que sean más termoestables, suena muy lucrativo, evento que ha sido bien aprovechado en el ámbito de los ensayos inmunológicos junto con el uso de distintos sustratos cromogénicos, así como en la industria de producción de polímeros fenólicos con sus respectivas aplicaciones que incluyen la producción de materiales con protección anticorrosiva y diodos emisores de luz mejor conocidos como LEDs.

Su aplicación en la biorremediación de aguas y suelos contaminados con fenoles, cresoles, fenoles clorados y otras clases de contaminantes fenólicos, nos provee otra faceta de las peroxidasas, la cual ha sido demostrada tanto en laboratorio como en plantas piloto con resultados prometedores, considerando el gasto de agua que las actividades antropogénicas han dejado a lo largo de muchos años de abuso y contaminación indiscriminada.

Por otra parte, el uso de las peroxidasas en plantas transgénicas ha resultado un éxito, donde se ha observado que la sobreexpresión de una peroxidasa en semillas de tabaco mejoró su germinación bajo estrés osmótico. Este tipo de resultados nos muestra que estas enzimas pueden ser empleadas en la producción de plantas en ambientes adversos. Este planteamiento nos presenta una paradoja, la cual radica en el hecho de introducir especies en ambientes donde no se encontrarían naturalmente, hecho de gran ayuda a la humanidad a través de cultivos de interés pero inapropiado para la naturaleza; también podríamos verlo desde el punto de vista de ayudar a salir del bache lo que nosotros mismos metimos dentro; es decir, ayudar a recuperar ambientes que el ser humano a erosionado o contaminado. La aplicación de las peroxidasas durante el enraizamiento adventicio es otra parte importante en la recuperación de especies amenazadas en donde el conocimiento acerca de las funciones y regulación de isoperoxidasas individuales, podría reflejarse en la multiplicación de plantas adultas que son difíciles de propagar por métodos tradicionales, en los cuales un enraizamiento exitoso representa una limitación

principal para la aplicación de este método en algunas especies. El uso de estas herramientas plantea la relación interdisciplinaria tanto de fisiólogos vegetales, biólogos moleculares, bioquímicos, agrónomos, edafólogos, ecólogos e investigadores en el área de recursos naturales.

Finalmente, el estudio de las peroxidasas resulta de importancia al emplearlas como modelo para investigar los mecanismos que han resultado en la diversificación y evolución de familias de genes y sus secuencias reguladoras, así como investigar como este tipo de enzimas han sido empleadas por las plantas como una ventaja evolutiva durante la colonización de los distintos ambientes terrestres.

## Bibliografía

---

- Abarca, D., Martin, M., & Sabater, B. (2001). Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiol. Plant*, 113:409–415.
- Allison, S.D., Schultz, J.C., (2004). Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *J. Chem. Ecol.*, 30, 1363–1379.
- Baek, K.H., & Van Wart, H. E. (1992). Elementary steps in the reaction of horseradish peroxidase with several peroxides: kinetics and thermodynamics of formation of compound 0 and compound I. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (2), pp 718–725
- Baker, C.J., Orlandi, E.W., & Mock, N.M. (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.*, 102: 1341–1344.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53, 253–263.
- Bandurski, R., Cohen, J., Slovin, J., & Reinecke, D. (1995). Auxin biosynthesis and metabolism, En Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, P Davies, Editor, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London. ISBN 0- 7923-2984-8. p. 39-65
- Barber, K. R., Rodríguez Marañón, M. J., Shaw, G. S., & van Huystee, R. B. (1995). Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by <sup>1</sup>H- NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 232: 825-833.
- Barratt, N.M., Dong, W., Gage, D.A., Magnus, V., & Town, C.D. (1999). Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: identification of the conjugate N<sub>α</sub>-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiologia Plantarum*, 105: 207–217.
- Bartel, B., & Fink, G. (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 6649-6653
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B.K. (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis and indole-3-butyric acid 78-oxidation. *J. Plant Growth Regulation*, 20:198-216.
- Bartel, B., & Fink, G. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268: 1745–1748.
- Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C., & Weiler, E.W. (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:6021-6025.
- Beffa, R., Martin, H.V., Pilet, P.-E. (1990). *In vitro* oxidation of indoleacetic acid by soluble auxin-oxidases and per-oxidases from maize roots. *Plant Physiol.*, 94: 485–491.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65, 639–666.
- Benfey, P. N. (2002). Auxin action: slogging out of the swamp. *Curr Biol*, 12(11), R389–90.

Benjamins, R., Malenica, N., & Luschnig, C. (2005). Regulating the regulator: The control of auxin transport. *BioEssays*, 27(12), 1246–1255.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591–602.

Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szöke, H., Henriksen, A. & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417: 463–468.

van Berkel, K., de Boer, R. J., Scheres, B., & ten Tusscher, K. (2013). Polar auxin transport: models and mechanisms. *Development (Cambridge, England)*, 140(11), 2253–68.

Berthon, J.Y., Ben Tahar, S., Gaspar T., & Boyer, N. (1990). Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* in vitro and their requirements, *Plant Physiol. Biochem.*, 28: 631–638.

Bhalerao, R. P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, 29, 325–332.

Bhattacharya, N.C. (1988). Enzymes activities during adventitious rooting. In: Adventitious Root Formation in Cuttings (Davis TD, Haissig BE, Sankhla N, eds) Dioscorides Press, Portland, OR, vol 2, 88–101.

Bhushan, D., Pandey, A., Chattopadhyay, A., Choudhary, M. K., Chakraborty, S., Datta, A. & Chakraborty N. (2006). Extracellular matrix proteome of chickpea (*Cicerarietinum L.*) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary perspective. *J. Proteome Res.*, 5, 1711–1720.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433, 39–44.

Bolwell, G.P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 287–294.

Bolwell, G.P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defence: a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 51: 347–366.

Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Boudet, A. & Pont-Lezica, R. (2003). Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis*, 24, 3421–3432.

Borner, G. H., Lilley, K. S., Stevens, T. J., & Dupree, P. (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.*, 132, 568–577.

Bowles, D.J., & Pappin, D.J. (1988). Traffic and assembly of concanavaline A. *TIBS* 13: 60–65.

Brownleader, M.D., Hopkins, J., Mobasher, A., Dey, P.M., Jackson, P., Trevan, M., (2000). Role of esterase peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta* 210, 668–676.

Burg, S. P. (1973). Ethylene in plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(2), 591–597.

- Burke, D., Kaufman, P., McNeil, M., & Albersheim, P. (1974). The structure of plant cell walls: VI. A survey of the walls of suspension-cultured monocots. *Plant Physiol.*, 54, 109–115.
- Calamai, M., Canale, C., Relini, A., Stefani, M., Chiti, F., & Dobson, C.M. (2005). Reversal of protein aggregation provides evidence for multiple aggregated states. *J Mol Biol* 346:603–616.
- Campanella, J.J., Olajide, A.F., Magnus, V., & Ludwig-Müller, J. (2004). A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiology*, 135: 2230–2240.
- Carpin, S., Crevecoeur, M., Greppin, H., & Penel, C. (1999). Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol.*, 120: 799–810.
- Carpin, S., Crèvecoeur, M., de Meyer, M., Simon, P., Greppin, H., & Penel, C. (2001). Identification of a Ca<sup>(2+)</sup>-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *The Plant Cell*, 13(3), 511–520.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., & Raikhel, N. V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, 16(12), 3285–3303.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P. J., & Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, 13, 843-852.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* , 39: 321-353.
- Cessna, S.G., & Low, P.S. (2001). Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase and anion channel-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from internal stores. *Planta*, 214: 126–134.
- Clarke, J., & Shannon, L.M. (1976). The isolation and characterization of the glycans of the glycopeptides from horseradish peroxidase isoenzyme C. *Biochem. Biophys. Acta*, 427: 428–442.
- Cohen, J.D., & Bandurski, R.S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 403–430.
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., Hendrickson, A. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8:197-199
- Cohen, J.D., & Gray, W.M. (2006). Auxin metabolism and signaling. In *Plant Hormone Signaling*. (eds. P. Hedden, S.G. Thomas), 37–66. Blackwell, Oxford.
- Conesa, A., Punt, P.J. & van den Hondel C.A. (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.*, 93: 143–158.
- Conroy, J.M. (1986). Immunological antibodies. En: H. Greppin, C. Penel, T. Gaspar (eds) *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, 85- 95. Geneva: Universidad de Génova.
- Cooke, T.J. Poli, D., Sztejn, A.E., & Cohen, J.D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol. Biol.*, 49, 319–338.
- Cosgrove, D. J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* , 125:131–134.

- Cosio, C., & Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 391–408.
- Chandler, J.W. (2009). Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays*, 31: 60–70.
- Chandra, S., & Low, P.S. (1995). Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92: 4120–4123.
- Chauhan, J. S., Rao, A., & Raghava, G. P. S. (2013). *In silico* Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 8(6), e67008.
- Chen, Y.A., Shin, J.W., & Liu, Z.H. (2002). Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mung bean hypocotyls. *Plant Physiol Biochem.*, 40: 33–39.
- Chen, S.X., & Schopfer, P., (1999). Hydroxyl radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 260, 726–735.
- Cheng, Y., & Zhao, Y. (2007). A role for auxin in flower development. *J Integr Plant Biol.*, 49: 99–104.
- Chisnell, J.R., & Bandurski, R.S. (1988). Translocation of radiolabeled indole-3- acetic acid and indole-3-acetyl-*myo*-inositol from kernel to shoot of *Zea mays* L. *Plant Physiology*, 86: 79–84.
- Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Robertson, D., Yu, X. L., Knox, J. P., Bolwell, P. & Slabas A.R. (2002). Proteomic analysis of the Arabidopsis thaliana cell wall. *Electrophoresis*, 23, 1754–1765.
- Chou, C. H., Huang, Y. C., & Liu, Z. H. (2010). Peroxidase genes differentially respond to auxin during the formation of adventitious roots in soybean hypocotyl. *Plant Growth Regulation*, 60(2), 151–161.
- Chrispeels, M.J. (1991). Sorting of proteins in the secretory system. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 21-53.
- Chrispeels, M.J., & Raikhel, N.V. (1992). Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell*, 68: 613-616.
- Chunfang H. U. & Van Huystee, R. B. (1989). Role of carbohydrate moiety in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidase. *Biochem. J.*, 263, 129–135.
- Dalet, F., & Cornu, D. (1988). Lignification level and Peroxidase activity during in vitro rooting of *Prunus avium*. *Can. J. Bot.*, 67: 2182- 2186.
- Dani, V., Simon, W. J., Duranti, M., & Croy, R. R. (2005). Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, 5, 737–745.
- Darwin, C. & Darwin, F. 1881. The power of movement in plants (Deutsche Übersetzung: Das Bewegungsvermögen der Pflanze). Darwins gesammelte Werke, Bd. 13, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CellMol. Life Sci.*, 57: 779–795.
- Davies R.T., Goetz D.H., Lasswell J., Anderson M.N. & Bartel B. (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11: 365–376.

Davies, P.J. (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (London: Kluwer Academic Publishers). Science: Oxford. p. 115-140.

Davis, T.D., Haissig, B.E., & Sankhla, N. (ed.): *Adventitious Root Formation in Cuttings*. *Advances in Plant Sciences Series*. Volume 2. *Advances in Plant Sciences Series*. Volume 2, Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1988. 315 pp.

De Klerk, G.J., Ter Brugge, J., Smulders, R. & Benschop, M. (1990). Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus domestica*. *Acta Hort.*, 280: 29–36.

De Klerk, G. J., Van Der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). Review – The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 35, 189–199.

De Luca, V., Marineau, C., & Brisson, N. (1989). Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2582-2586.

de Marco, A., Guzzardi, P., Jamet, E., (1999). Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol.*, 120, 371–382.

de Reuille, P. B., Bohn-Courseau, I., Ljung, K., Morin, H., Carraro, N., Godin, C. & Traas, J. (2006). Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1627-1632.

Delaux, P.M., Nanda, A. K., Mathé, C., Sejalon-Delmas, N., & Dunand, C. (2012). Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(1), 49–59.

Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T. & Neill, S.J. (1999). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.*, 50: 1863–1866.

Desikan, R., Mackerness, S.A.-H., Hancock, J.T. & Neill, S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, 127: 159–172.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435, 441–445.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., & Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell*, 9, 109–119.

Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D. G., Mravec, J., Stierhof, Y. D. & Friml, J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 17, 520-527.

Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S. 2008. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, 20: 228–240.

Dodsworth, S. (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Developmental Biology*, 336(1), 1–9.

Doerner, P. (2000). Root patterning: does auxin provide positional cues? *Current Biology*, 10(5), R201–3.

Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., and Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 8790–8794.

Dunand, C., Crevecoeur, M., Penel, C., (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol.*, 174, 332–341.

Dunand, C., Mathé, C., Lazzarotto, F., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2011). Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is not a duplicable gene. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12), 1908–1913.

Dunford, B., (1993), Kinetics of peroxidase reactions: horseradish, barley, Coprinus cinereus, lignin and manganese. En: Welinder KG, Rasmussen S, Penel C & Greppin H (eds.) *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (pp. 113–124) Geneva: University of Geneva Press.

Dunford, H.B. (2001). How do enzymes work? Effect of electron circuits on transition state acid dissociation constants. *J Biol. Inorg. Chem.*, 6: 819–822.

Durner, J., Wendehenne, D. & Klessig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 10328–10333.

Elbein, A.D. (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *Crit. Rev. in Biochem.*, 16: 21–49.

Epstein, E., Cohen, J.D., & Slovin, J.P. (2002). The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regulation*, 38:15-20.

Fawal, N., Li, Q., Savelli, B., Brette, M., Passaia, G., Fabre, M., Mathé, M. & Dunand, C. (2013). PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D441-444.

Fecht-Christoffers, M., & Führs, H. (2006). The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. *Plant Physiology*, 140(Abril), 1451–1463.

Feiz, L. (2004). *Cell Wall Proteomics of Elongating Tissues of Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Université Paul Sabatier, Francia, 28.

Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, R. F., Canut, H., & Jamet, E. (2006). Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from Arabidopsis hypocotyls. *Plant Methods*, 2, 10.

Filizola, M., & Loew, G.H. (2000). Role of protein environment in horseradish peroxidase compound I formation: Molecular dynamics simulations of horseradish peroxidase-HOOH complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 122; 18–25.

Finzel, B. C., Poulos, T. L., & Kraut, J. (1984). Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *A. Biol. Chem.*, 259: 13027-13036.

Firn, R.D., Wagstaff, C., & Digby, J. (2000). The use of mutants to probe models of gravitropism. *J. Exp. Bot.*, 51: 1323–1340.

Foyer, C.H, Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., & Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimation to stress tolerance and signalling. *Physiol Plant*, 100: 241–254

Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V., & Dunand, C. (2014). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*, 112:15-21.

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G. & Palme, K. (2002a). AtPIN4 mediates sink driven auxin gradients and patterning in *Arabidopsis* roots. *Cell*, 8;108(5):661-73.

Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., & Palme, K. (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415, 806–809.

Friml, J. (2003). Auxin transport – shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 7-12.

Fry, S.C., (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate- induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, 332, 507–515.

Führs, H., Götze, S., Specht, A., Erban, A., Gallien, S., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Kopka, J., Braun H.P., & Horst W.J. (2009). Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1663–1678.

Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J-K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., & Okada, H. (1988). Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 173(3), 681–687.

Fujiyama, K., Intapruk, C., & Shinmyo, A. (1995). Gene structures of peroxidase isoenzymes in horseradish and *Arabidopsis thaliana* and their expression. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 245–246.

Gadea, J., Mayda, M., Conejero, V., & Vera, P. (1996). Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(5):409-15.

Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, 4(12): 1032- 1038.

Gajhede, M. (2001). Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochem. Soc. Trans.*, 29: 91–99.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226–2230.

Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., & Greppin, H. (1982). Peroxidases 1970-1980: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique.

Gaspar, T. & Hofinger, M. (1988). Auxin metabolism during adventitious rootin. In: Adventitious Root Formation in Cuttings (Davis TD, Haissig BL, Sankla N, eds) Dioscorides Press, Portland, 117-131.

Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J., Berthon, J., & Ripetti, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, 12(10), 757–765.

Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J. & Ripetti, V. (1994). Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation, P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, W.J. Davies (Eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 289–298.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jürgens, G. & Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425- 428.

Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., & Hofte, H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 114: 295–305.

Glass, N.L., & Kosuge, T. (1986). Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 166: 598–603.

Grant, J.J., Yun, B.W., & Loake, G.J. (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J.*, 24: 569–582.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations. *FEBS Lett.*, 32, 195–198.

Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414, 271–276.

Green, R. & Fluhr, R. (1995). UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell*, 7: 203–212.

Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F. M., Hogeweg, P. and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449, 1008-1013.

Guilfoyle, T. (2007). Plant biology: sticking with auxin. *Nature*, 446: 621-622.

Güneş, T. (2000). Peroxidase and IAA-oxidase activities during rooting in cuttings of three poplar species. *Turkish Journal of Botany*, 24(2), 97–101.

Gurumurti, K., Gupta, B.B., Kumar, A. (1984). Hormonal regulation of root formation. In: Hormonal Regulation of Plant Growth and Development (Purohit SS, ed) Agro Bot Publ, Bikaner, India, 387-400.

Haissig, B. E. (1972). Meristematic activity during adventitious root primordium development influences of endogenous auxin and applied Gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 49, 886-892.

Haissig, B.E. (1986). Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In: New Root Formation in Plants and Cuttings (Jackson MB, ed) Martinus Nijhoff Publ, Dordrecht, 141-189.

Halliwell, B. (1978). Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese(II) and phenols. *Planta*, 140: 81–88.

Hamann, T. (2001). The Role of Auxin in Apical-Basal Pattern Formation During *Arabidopsis* Embryogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(3), 292–299.

Hausman, J.F. (1993). Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. *Plant Growth Regul.*, 13: 263–268.

Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., & Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.*, 15, 1899–1911.

Heloir, M.C., Kevers, C., Hausman, J.F., & Gaspar, T. (1996). Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of *in vitro* propagated walnut shoots. *Tree Physiol.*, 16: 515–519.

Henriksen, A., Schuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T., & Gajhede, M. (1998). Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 37: 8054–8060.

Henriksen, A., Smith, A.T., & Gajhede, M. (1999). The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.*, 274: 35005–35011.

Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci.*, 10: 108–115.

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J. D., Inze, D., & Beeckman, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14, 2339–2351.

Hiner, A. N. P., Raven, E. L., Thorneley, R. N. F., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2002). Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 27–34.

Hinman, R. L., & Lang, J. (1965). Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochem.*, 4: 144-158.

Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamurac, Y., Sasaki, T. & Ohashi, Y. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters*, 471, 245–250.

Howes B.D., Rodriguez-Lopez JN, Smith AT & Smulevich G. (1997). Mutation of distal residues of horseradish peroxidase: Influence on substrate binding and cavity properties. *Biochemistry*, 36: 1532–1543.

Hu, C., & van Huystee, R.B. (1989). Role of carbohydrate moiety in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidase. *Biochem. J.*, 263, 129–135.

Ingemarsson, B. S. M. (1995). Ethylene effects on Peroxidases and cell growth patterns in *Picea abies* hypocotyl cutting. *Physio. Plant.*, 94: 211-218.

Jackson, R.G., Lim E-K., Li Y., Kowalczyk M., Sandberg G., Hoggett J., Ashford D.A., Bowles D.J. (2001). Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 4350–4356.

Jackson, R.G., Kowalczyk M, Li Y, Higgins G, Ross J, Sandberg G., & Bowles, D.J. (2002). Overexpression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterization of transgenic lines. *Plant Journal*, 32: 573–583.

Jakubowska, A., & Kowalczyk, S. (2004). The auxin conjugate 1-*O*-indole-3-acetyl- $\beta$ -D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *Journal of Experimental Botany*, 55: 791–801.

Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.*, 118: 1327–1335.

Jones, S.E., DeMeo J.S., Davies, N.W., Noonan, S.E., & Ross, J.J. (2005). Stems of the *Arabidopsis* pin1-1 mutant are not deficient in free indole-3-acetic acid. *Planta*, 222: 530 – 534.

Jones, P., & Dunford, H. B. (2005). The mechanism of compound I formation revisited. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(12), 2292–2298.

Kang, B. G., Newcomb, W., & Burg, S. P. (1971). Mechanism of Auxin-induced Ethylene Production. *Plant Physiology*, 47(4), 504–509.

Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N., & Muto, S. (1998). Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increased in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.*, 39: 721–730.

Kepinski, S., & Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446–451.

Kim, G., & Tsukaya, H. (2002) Regulation of the biosynthesis of plant hormones by P450s. *Journal of Plant Research*, 115:169-177.

Kinashi, H., Suzuki, Y., Takeuchi, S., Kawarada, A. (1976) Possible metabolic intermediates from IAA to B-Acid in rice bran. *Agr. Biol. Chem.*, 40:2465-2470.

Kis, M., Burbridge, E., Brock, I. W., Heggie, L., Dix, P. J., & Kavanagh, T. A. (2004). An N-terminal peptide extension results in efficient expression, but not secretion, of a synthetic horseradish peroxidase gene in transgenic tobacco. *Annals of Botany*, 93(3), 303–310.

Koide, R. T. & Schreiner, R. P. (1992). Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 557-581.

Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 2940–2945.

Kowalczyk, M., & Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127: 1845–53.

Kroj, T., Rudd, J.J., Nurnberger, T., Gabler, Y., Lee, J., & Scheel D. (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.*, 278: 2256–2264.

Kutz, A., Muller, A., Hennig, P., Kaiser, W., Piotrowski, M., & Weiler, E. (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 30:95-106.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15;227(5259):680-5.

Lagrimini, M. L., Burkhart, W., Moyer, M., & Rothstein S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84(21), 7542-7546.

Lagrimini, M. L., Bradford, S., & Rothstein, S. (1990). Peroxidase-Induced Wilting in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Cell*, 2(1), 7-18.

Lagrimini, M. L., Joly, R. J., Dunlap, J. R., & Ting-Ting, Y. L. (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Molecular Biology*, 33(5), 887- 895.

Lariguet, P., Ranocha, P., De Meyer, M., Barbier, O., Penel, C., Dunand, C., (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light- dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta*, 238, 381–395.

Lau, S., Jurgens, G., & De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell*, 20: 1738–1746.

Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki H., Beeckman, H., Bennett, M. & Laplazeemail, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.*, 18, 450–458.

Lazarus, C.M. (1991). Hormonal regulation of plant gene expressio. En Grierson, Donald (Ed.), *Developmental Regulation of Plant Gene Expression*. Blackie & Son Limited/ Springer Science+Business Media New York.

Le Bail, A., Billoud, B., Kowalczyk, N., Kowalczyk, M., Gicquel, M., Le Panse, S., Stewart, S., Scornet, D., Cock, J.M., Ljung, K., & Charrier, B. (2010). Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Physiolog*, 153(1), 128–144.

Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., Geldner, N., (2013). A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*, 153, 402–412.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583–593.

Lewis, N. G., & Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* , 41: 455–496.

Leyser, H. M. O., Lincoln, C. A., Timpte, C. S., Lammer, D., Turner, J. C. & Estelle, M. (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 304, 161-164.

Leznicki, A.J., & Bandurski, R.S. (1988). Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-*O*- β-D-glucose. I. Partial purification and characterization of the enzyme from *Zea mays*. *Plant Physiology*, 88: 1474–1480.

Li, Y. H., Zou, M. H., Feng, B. H., Huang, X., Zhang, Z., & Sun, G. M. (2012). Molecular cloning and characterization of the genes encoding an auxin efflux carrier and the auxin influx carriers associated with the adventitious root formation in mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon segments. *Plant Physiol. Biochem.*, 55, 33–42.

Li, Z. C., McClure, J. W., & Hagerman, a E. (1989). Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase, beta-d-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary Leaves. *Plant Physiology*, 90(1), 185–190.

Lin, H., Zhu, W., Silva, J. C., Gu, X., & Buell, C. R. (2006). Intron gain and loss in segmentally duplicated genes in rice. *Genome Biology*, 7(5), R41.

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. (2001a). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* 28: 465–74.

Ljung K, Ostin A, Lioussanne L, Sandberg G. (2001b). Developmental regulation of indole-3-acetic acid turn-over in Scots pine seedlings. *Plant Physiol* 125: 464–75.

Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 49: 249–72.

Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., & Hermann Muehling, K. (2001). Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*, 111(4), 457–465.

Lomax TL, Muday GK, Rubery PH. 1995. Auxin transport. En: Davies PJ, (editor). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Press. p 509–530.

Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H. & Scott I.M. (1998). Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.*, 49: 713–720.

Loukili, A., Limam, F., Ayadi, A., Boyer, N., Ouelhazi, L., (1999). Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiol. Plant.*, 105, 24–31.

Ludwig-Müller, J., Epstein E. (1994). Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana* III: *in vivo* biosynthesis. *Plant Growth Regulation*, 14: 7–14.

Ludwig-Müller, J., Hilgenberg W. (1995). Characterization and partial purification of indole-3-butyric acid synthetase from maize (*Zea mays*). *Physiologia Plantarum*, 94: 651–660.

Lüthje S, Böttger M. & Döring O. (2000). Are plants stacked neutrophiles? Comparison of pathogen-induced oxidative burst in plants and mammals. *Prog. Bot.*, 61: 187–222.

Magliano, T.M.A., & Casal, J.J., (1998). *In vitro* cross-linking of extensin precursors by mustard extracellular isoforms of peroxidase that respond either to phytochrome or to wounding. *J. Exp. Bot.*, 49, 1491–1499.

Mahler, H.C., Friess, W., Grauschopf, U., & Kiese S. (2008). Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci.*, 98(9):2909-34.

Marjamaa, K., Hilden, K., Kukkola, E., Lehtonen, M., Holkeri, H., Haapaniemi, P., Koutaniemi, S., Teeri, T.H., Fagerstedt, K., Lundell, T., (2006). Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.*, 61, 719–732.

Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., & Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 58–65.

Mato, M.C., & Vieitez, A.N. (1986). Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots *in vitro*. *Physiol Plant*, 66, 491-494.

Matsui, T., Tabayashi, A., Iwano, M., Shinmyo, A., Kato, K., & Nakayama, H. (2011). Activity of the C-terminal-Dependent Vacuolar Sorting Signal of Horseradish Peroxidase C1a is Enhanced by its Secondary Structure. *Plant and Cell Physiology*, 52(2), 413–420.

Matthews, B. W. (2001). Hydrophobic Interactions in Proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6.

Mattsson, J., Ckurshumova, W., & Berleth, T. (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.*, 131, 1327–1339.

McDougall, G. J., & Morrison, I. M. (1995). Ionically-bound and covalently-bound wall peroxidases differ in their substrate specificity. *Biochem Soc Trans*, 23(2), 150S.

Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 105(2), 467–472.

Melan, M. A., & Cosgrove, D. J. (1988). Evidence against the involvement of ionically bound cell wall proteins in pea epicotyl growth. *Plant Physiology*, 86, 469–74.

Millar, D. J., Whitelegge, J. P., Bindschedler, L. V., Rayon, C., Boudet, A. M., Rossignol, M., Borderies, G. & Bolwell, G.P. (2009). The cell wall and secretory proteome of a tobacco cell line synthesising secondary wall. *Proteomics* 9, 2355–2372.

Moncousin, C. (1988). Adventitious rhizogenesis control: new developments. *Acta Hort.*, 230 97–104.

Moncousin, C. (1991). Rooting of in vitro cuttings. In: *Biotechnology and Forestry (17) - High-Tech and Micropropagation I* (Bajaj YPS, ed) Springer Verlag, Berlin, 231-261.

Morris, D. A. (1996). Hormonal regulation of source-sink relationships: an overview of potential control mechanisms. En: Zamski ES, Schaffer AA, editors. *Photoassimilate distribution in plants and crops*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc. p 441 – 465.

Morris, D.A. (2004). The function of hormones in plant growth and development. En: Davies PJ, (editor). *Plant Hormones; Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p 437 – 470.

Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennet, M., Wisman, E. & Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903–6911.

Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., Matsui, M. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant Journal*, 25: 213–221.

Negri, A.S, Prinsi, B., Scienza, A., Morgutti, S., Cocucci, M. & Espen L. (2008). Analysis of grape berry cell wall proteome: a comparative evaluation of extraction methods. *J Plant Physiol.*, 165(13):1379-89.

Neill S., Desikan R., & Hancock J. (2002). Hydrogenperoxide signalling. *Curr. Opin.Plant Biol.*, 5: 388–395.

Nigović, B., Antolić, S., Kojić-Prodić, B., Kiralj, R., Magnus, V., & Salopek-Sondi, B. (2000). Correlation of structural and physico-chemical parameters with the bioactivity of alkylated derivatives of indole-3-acetic acid, a phytohormone (auxin). *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, 56(1), 94–111.

Nonhebel, H., Kruse, L., & Bandurski, R. (1985). Indole-3-acetic acid catabolism in *Zea mays* seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 12685–12689.

Nonhebel, H.M., Cooney, T.P., & Simpson, R. (1993). The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Aust J Plant Physiol.*, 20:527-539.

Normanly, J., Cohen, J.D., Fink, G.R. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90: 10355–10359.

Normanly, J., Slovin, J.P., & Cohen, J.D. (1995). Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.*, 107, 323–329.

- Normanly, J. (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant*, 100:431-442.
- Normanly, J., & Bartel, B. (1999). Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:207-213.
- Normanly J, Slovin JP, Cohen JD. (2004). Auxin Metabolism. En *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (ed. P.J. Davies), 36–62. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Normanly, J. (2010a). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001594.
- Normanly, J., Slovin, J.P., & Cohen, J.D. (2010b). Auxin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Third Edition, P.J. Davies, ed. (New York: Springer-Verlag), pp. 36–62.
- Ortiz de Montellano, P.R. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 89–107.
- Østergaard, L., Pedersen, A. G., Jespersen, H. M., Brunak, S., & Welinder, K. G. (1998). Computational analyses and annotations of the Arabidopsis peroxidase gene family. *FEBS Letters*, 433(1-2), 98–102.
- Östin, A., Kowalyczuk, M., Bhalerao, R.P., & Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118: 285–296.
- Ouyang J, Shao X, Li J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 24: 327–333.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001537.
- Paciorek, T., Zazimalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y. D., Kleine-Vehn, J., Morris, D. A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., & Friml J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435, 1251-1256.
- Palme, K. and Galweiler, L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 375–381.
- Paponov, I. A., Teale, W. D., Trebar, M., Blilou, I. & Palme, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.*, 10, 170-177.
- Park, J.-E., Park, J.-Y., Kim, Y.-S., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.-Y., Kim, J., Lee, Y.-H., & Park, C.-M. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.*, 282: 10036–10046.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004a). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879–1893.
- Passardi, F., Penel, C., & Dunand, C. (2004b). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9:534–540.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., Dunand, C., (2006). Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* 223, 965–974.

Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C., & Dunand, C. (2007). Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, 89(5), 567–579.

Pencik, A., Simonovik, B., Petersson, S.V., Henykova, E., Simon, S., Greenham, K., Zhang, Y., Kowalczyk, M., Estelle, M., Zazimalova, E., Novak, O., Sandberg, G., Ljung, K. (2013). Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *Plant Cell* 25:3858–3870.

Penel, C., & Greppin, H. (1996). Pectin binding proteins: Characterization of the binding and comparison with heparin. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 479–488.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8:785-786.

Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M. et al. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312, 914-918.

Pilet P.E. & Gaspar T. (1968). Le Catabolisme Auxinique. Monographie de Physiologie Végétale No 1. Masson, Paris, 148p.

Pop, T. I., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca*, 39, 307–316.

Poulos T.L. & Kraut J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255: 8199–8205.

Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4429–4440.

Price, N.C., & Stevens, L. (1988). *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University Press. pp. 365–422.

Pythoud, F. & Buchala, A. J., (1989). Peroxidase activity and adventitious rooting in cuttings of *Populus tremula*. *Plant Physiol. Biochem.* 27(4) 503-510.

Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., & Qu, L.-J. (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 17: 2693–2704.

Quoirin, M., Boxus, P., & Gaspar, T. (1974). Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature Prunus plants. *Phys. Veg.*, 12: 165–174.

Rampey, R.A., LeClere, S., Kowalczyk, S., Ljung, K., Sandberg, G., & Bartel, B. (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiol* 135: 978 – 988.

Rapparini, F., Tam, Y., Cohen, J.D., & Slovin, J.P. (2002). IAA metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiol* 128:1410-6.

Raven, J.A., & Rubery, P.H. (1982). Coordination of development: Hormone receptors, hormone action and hormone transport. En: Smith H, Grierson D, editors. *Molecular Biology of Plant Development*. Oxford: Blackwell Scientific. p 28 – 48.

Raven, J.A. (1975). Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electric potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *The New Phytologist*, Vol. 74: 163-172.

Reed, R. C., Brady, S. R., & Muday, G. K. (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 1369–1378.

Reinhardt, D., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12, 507-518.

Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426, 255-260.

Ren, L.-L., Liu, Y.-J., Liu, H.-J., Qian, T.-T., Qi, L.-W., Wang, X.-R., & Zeng, Q.-Y. (2014). Subcellular Relocalization and Positive Selection Play Key Roles in the Retention of Duplicate Genes of Populus Class III Peroxidase Family. *The Plant Cell*, 26(6), 2404–2419.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64–69.

Ribnicky, D.M., Cohen, J.D., Hu, W.S., & Cooke, T.J. (2002). An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505–509.

Ripetti, V., Kevers, C., & Gaspar, T. (1994). Two successive media for the rooting of walnut shoots in vitro. Changes in peroxidase activity and in ethylene production, *Adv. Hort. Sci.* 8: 29–32.

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S. Y., Jones, A. M., Luschnig, C., Aniento, F., Zažímalová, E. & Friml, J. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143, 111-121.

Robertson, D., Mitchell, G. P., Gilroy, J. S., Gerrish, C., Bolwell, G. P., & Slabas, A. R. (1997). Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J. Biol. Chem.* 272, 15841–15848.

Rodríguez-López, J.N., Lowe, D.J., Hernández-Ruiz, J., Hiner, A.N.P., García-Cánovas, F., & Thorneley, R.N.F. (2001). Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: Identification of intermediates in the catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 11838–11847.

Ros Barceló, A. (2000). Peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by plant cells: truths and clues. *Curr. Top. Phytochem.* 3: 197–202.

Roy, S. W., & Penny, D. (2007). On the Incidence of Intron Loss and Gain in Paralogous Gene Families. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1579–1581.

Rubery, P.H., & Sheldrake, A.R. (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 188:101 – 121.

Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W. M., Hobbie, L., Turner, J. & Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* 12, 198-207.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472.

Salzwedel, J. L., & Dazzo, F. B. (1993). pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from White clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:127-134.

Samuel, M.A., Miles, G.P. & Ellis, B.E. (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J.* 22: 367-376.

Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J., & Berleth, T. (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev.* 20, 1015-1027.

Scialabba, A., Bellani, L. M., & Dell'Aquila, A. (2002). Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur. J. Histochem.* , 46: 351-358.

Schimke, R.T., & Katunuma, N. (1975). Intracellular Protein Turnover. Academic Press. New York.

Schmidt, R. C., Müller, A., Hain, R., Bartling, D., & Weiler, E. W. (1996) Transgenic tobacco plants expressing *Arabidopsis thaliana* nitrilase II enzyme. *Plant J.* 9: 683-691.

Schopfer, P., (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant J.* 28, 679-688.

Schopfer, P., & Liskay, A. (2006). Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *Biofactors*, 28: 73-81.

Schuller, D. J., Ban, N., Huystee, R. B., McPherson, a, & Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure (London, England : 1993)*, 4(3), 311-321.

Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhization. *J. Exp. Bot.* , 53: 1351-1365.

Schwacke, R., & Hager, A. (1992). Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca<sup>2+</sup> and protein kinase activity. *Planta* 187: 136-141.

Schwarz, R.T., Schmidt, M.F.G., & Datema, R. (1979). Inhibition of glycosylation of viral glyco-proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 7: 322-330.

Seidel, C., Walz, A., Park, S., Cohen, J.D., Ludwig-Müller, J. (2006). Indole-3-acetic acid protein conjugates: novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology* 8: 340-345.

Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., & Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98: 4788-4793.

Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* , 48: 523-544.

Shah, K., Penel, C., Gagnon, J., Dunand, C., (2004). Purification and identification of a Ca<sup>2+</sup>-pectate binding peroxidase from *Arabidopsis* leaves. *Phytochemistry* 65, 307–312.

Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., & Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates antagonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9: 261–270.

Shiro, Y., Kurono, M., & Morishima, I. (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* , 261: 9382-9390.

Slovin, J.P., Bandurski, R.S., & Cohen, J.D. (1999). Auxin, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, P Hooykaas, M Hall, and K Libbenga, Editors, Elsevier

Smulevich, G., Paoli, M., Burke, J.F., Sanders, S.A., Thorneley, R.N.F., & Smith, A.T. (1994). Characterization of recombinant horseradish peroxidase C and three site-directed mutants, F41V, F41W, and R38K, by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* 33: 7398–7407.

Spanu, P., & Bonfante-Fasolo, P. (1988). Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* , 109: 119–124.

Staehelin, L.A., & Moore, I. (1995). The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 261-288.

Staehelin, L.A., & Moore, I. (1995). The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 261–288.

Staswick, P.E., Tiryaki, I., Rowe, M.L. (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* 14: 1405–1415.

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., & Suza, W. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell* 17: 616–627.

Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., & Mohnen, D. (2001). The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4- galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360–371.

Sukumar, P., Maloney, G. S., & Muday, G. K. (2013). Localized induction of the ABCB19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162, 1392–1405.

Sutherland, G., R. J., & Aust, S. D. (1996). The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* , 332: 128-134.

Sutherland, G., R. J., Zapanta, L. S., Tien, M., & Aust, S. D. (1997). Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. *Biochemistry*, 36: 3654-3662.

Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. & Bennett, M. (2001). Localisation of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development*, 2648–2653.

Szerszen JB, Szczyglowski K, Bandurski RS. 1994. *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265: 1699–1701.

Sztejn, A., Ilic, N., Cohen, J.D., Cooke, T.J. (2002). Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: The effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regulation*, 36:201-207.

Takase, T., Nakazawa, M., Ishikawa, A., Kawashima, M., Ichikawa, T., Takahashi, N., Shimada, H., Manabe, K., & Matsui, M. (2004). ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant Journal*, 37: 471-483.

Tam, Y.Y., Epstein, E., & Normanly, J. (2000). Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol.* 123: 589 – 596.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640-645.

Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., & Friml, J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2738-2754.

Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., & Chory, J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164-176.

Terashima, M., Kubo, A., Suzawa, M., Itoh, Y., & Katoh, S. (1994). The roles of the N-linked carbohydrate chain in rice  $\alpha$ -amylase in thermostability and enzyme kinetics. *Eur. J. Biochem.* 226: 249-254.

The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641.

Thimann, K.V. (1938). Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* 13, 437-449.

Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H. & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.

van Engelen, F.A., Sterk, P., Booij, H., Cordewener, J.H.G., Rook, W., van Kammen, A. & de Vries, S.C. (1991). Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiol* 96: 705-712.

van Huystee, R.B., & Wan, L. (1994). Carbohydrate moiety of peanut peroxidase necessary for enzyme activity. *C.R. Acad. Sci. Paris/Life Sci.* 317: 789-794.

van Huystee, R.B., & Zheng, X. (1995). Half-life of peroxidase in actively growing and arrested peanut cells. *C. R. Acad. Sci. Paris/Life Sci.* 318: 655-658.

van Huystee, R.B., Lige, B., & Sun, Y. (2002). Structure and role of glycan chains of cationic peanut peroxidase en Plant peroxidases: biochemistry and physiology: VI International Plant Peroxidase Symposium proceedings, Murcia 2002, Spain Manuel Acosta Echeverría, J. N. Rodríguez López, M. A. Pedreño.

van Huystee, R. B., Roig, M. G., Shnyrov, V. L., & Sakharov, I. Y. (2004). Peroxidase stability related to its calcium and glycans. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 19-28.

Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.

Vatulescu, A. D., Fortunato, A. S., Sá, M. C., Amâncio, S., Ricardo, C. P. P., & Jackson, P. a. (2004). Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(7-8), 609–615.

Veitch, N.C. (1995). Aromatic donor molecule binding sites of haem peroxidases. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 232–240.

Veitch, N.C., Gao, Y., Smith, A.T., & White, C.G. (1997). Identification of a critical phenylalanine residue in horseradish peroxidase, Phe179, by site-directed mutagenesis and <sup>1</sup>H-NMR: Implications for complex formation with aromatic donor molecules. *Biochemistry* 36: 14751–14761.

Veitch, N.C. & Smith, A.T. (2001). Horseradish peroxidase. *Adv. Inorg. Chem.* 51: 107–162.

Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 3–18.

Verdonk, J. C., Hatfield, R. D., & Sullivan, M. L. (2012). Proteomic Analysis of Cell Walls of Two Developmental Stages of Alfalfa Stems. *Frontiers in Plant Science*, 3(Diciembre), 1–9.

Verstraeten, I., Schotte, S., & Geelen, D. (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1–13.

Vianello, A. & Macri, F. (1991). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 409–423.

Voigt, J., & Frank, R. (2003). 14-3-3 Proteins Are Constituents of the Insoluble Glycoprotein Framework of the *Chlamydomonas* Cell Wall. *The Plant Cell*, 15(6), 1399–1413.

Wan, L., & van Huystee, R.B. (1993). A study of glycosylation of cationic peanut peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 1398–1405.

Wan, L., Gijzen, M., & van Huystee, R.B. (1994). Heterogeneous glycosylation of the cationic peanut peroxidase. *Biochem. Cell Biol.* 72: 411–417.

Wandelt, C. I., Khan, M. R., Craig, S., Schroeder, H. E., Spencer, D., & Higgins, T. J. (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2(2), 181–192.

Watson, B. S., Lei, Z., Dixon, R. A., & Sumner, L. W. (2004). Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* 65, 1709–1720.

Welinder, K. G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Letters*, 72(1), 19–23.

Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388–393.

Welinder, K. G., & Gajhede, M. (1993). Structure and evolution of peroxidases. En K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, C. Penel, & H. (Greppin, Plant peroxidases: biochemistry and physiology (págs. pp. 35–42). Geneva, Suiza: University of Geneva.

Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjærsgård, I. V. H., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., & Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6063–6081.

- Went, F.W., & Thimann, K.V. (1937). *Phytohormones*. New York, The Macmillan Company.
- Went, F.W. (1974). Reflections and speculations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 1–26.
- Whippo, C.W., & Hangarter, R.P. (2006). Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell* 18, 1110–1119.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouguié, D., Benková, E., Scheres, B. & Friml, J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312, 883.
- Wittstock, U., & Halkier, B. (2002). Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 7:263-270.
- Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H.-P., & Mühling, K. H. (2011). Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*, 7(1), 48.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860.
- Woodward, A.W., & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95: 707–735.
- Wright, A. D., Sampson, M. B., Neuffer, M. G., Michalczuk, L. P., Slovin, J., & Cohen, J. (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254: 998–1000.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. & Shah, D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiol.* 115: 427–435.
- Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., & Cresti M. (2014). Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nat Protoc.* Feb; 9(2):362-74.
- Yokota, K. & Yamazaki, I. (1965). Reaction of peroxidase with reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 105: 301-312.
- Yu, Y. B., & Yang, S. F. (1979). Auxin-induced Ethylene Production and Its Inhibition by Aminoethoxyvinylglycine and Cobalt Ion. *Plant Physiology*, 64(6), 1074–1077.
- Yue, J., Hu, X., & Huang, J. (2014). Origin of plant auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 19(12), 764–770.
- Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y., & He, Z. (2007). Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae interaction. *Plant Physiol* 145: 450–464.
- Zhao, Y., Christensen, S., Fankhauser, C., Cashman, J., Cohen, J.D., Weigel, D., & Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309.
- Zhao, Y. (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 16–22.

Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., Guo, X., Gai, Y., Wu, C., Zhai, H., Wang, H., & Wan, J. (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell*. 27(1):113-22.

Zhu, J., Alvarez, S., Marsh, E. L., LeNoble, M. E., Cho, I.-J., Sivaguru, M., Chen, S., Nguyen, H.T., Wu, Y., Schachtman, D.P. & Sharp, R. E. (2007). Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. II. Region-Specific Changes in Water Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins under Water Deficit. *Plant Physiology*, 145(4), 1533–1548.

Zook, M. (1998). Biosynthesis of camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118:1389-1398.

Zubieta, C., Ross, J.R., Koscheski, P., Yang, Y., Pichersky, E., Noel, J.P. (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *The Plant Cell* 15: 1704–1716.

**Anexo 1: Soluciones y reactivos**

- **Solución de Hoagland:**

La composición nutrimental de la solución fue:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM;  $\text{KNO}_3$ , 5 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 5mM;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.88 mM;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.038 mM;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.016 mM;  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 mM.

- **Electroforesis en geles de acrilamida:**

Solución o reactivo	Sistema electroforético				
	PAGE- Horizontal (29.86 mL)	PAGE		PAGE-SDS	
		Concentrador (10 mL)	Separador (10 mL)	Concentrador (10 mL)	Separador (10 mL)
Monomero (30.8% T, 2.7% CBis)	mL	1.67 mL	4.15 mL	1.67 mL	4.15 mL
Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	mL	2.5 mL	-	2.5 mL	-
Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	-	-	2.5 mL	-	2.5 mL
SDS al 10%		-	-	0.1 mL	0.1 mL
Agua bidestilada	mL	5.7 mL	3.2 mL	5.7 mL	3.2 mL
Persulfato de amonio (APS) ( $\text{N}_2\text{H}_8\text{S}_2\text{O}_8$ ).	150 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
TEMED N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina ( $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ ).	15 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

- **Buffer de Laemmli (25 mM Tris base, 192 mM Gly, 0.1% SDS):**

Reactivo	Concentración
Tris base	-----
Gly	192 mM
SDS	0.1% (peso/vol)
Agua bidestilada	Hasta el aforo

- **Tinción de azul Coomassie para geles de poli(acrilamida) (PAGE)**

Solución de tinción:

- 1) 2.5 g Azul Brillante Coomassie R-250
- 2) 450 mL metanol
- 3) 100 mL ácido acético glacial
- 4) Aforar a 1 L con agua BD

Solución destiñidora:

- 1) 200 mL de metanol
- 2) 150 mL de ácido acético
- 3) 650 mL de agua BD

- **Electroforesis en dos dimensiones**

Buffer de rehidratación para IEF:

Reactivo	Concentración
Urea (PM 60.06)	8 M
CHAPS	2% (peso/vol)
Buffer IPG	0.5% (vol/vol)
Solución de bromofenol al 1%	0.002
Agua bidestilada	Hasta el aforo
DTT *	3 mg para una alícuota de 1.07 mL

\* Se prepara una solución stock con todos los reactivos sin DTT y se almacena en alícuotas, finalmente se añade el DTT.

Buffer de equilibrio:

Reactivo	Concentración
Urea (PM 60.06 g/mol)	6 M
Tiourea (PM 76.12 g/mol)	75 mM
Glicerol	29.3% (peso/vol)
SDS (PM 288.38)	2% (peso/vol)
Solución de bromofenol al 1%	0.002%
Agua bidestilada	Hasta el aforo

\* Se agregan hasta su uso el DTT (100 mg por cada 10 mL) y iodoacetamida (250 mg por cada 10 mL)

Solución de agarosa para sellar (25 mM Tris base, 192 mM Gly, 0.1% SDS, ):

Reactivo	Concentración
Buffer de Laemmli	-----
Agarosa (NA o M)	0.5%
Solución de bromofenol al 1%	0.002% (peso/vol)

Buffer de Laemmli (10 mL) + agarosa (50 mg) + Bromofenol al 1% (200 µl).

**Anexo 2: Análisis *in silico***

❖ **Resumen de las 10 secuencias con mejor calificación (E-value bajo) Blasp**

Descripción	% Identidad	Aminoácidos (Longitud)	E-value
LePrx16 [ <i>Lycopersicon esculentum</i> (Jitomate)]	100	351	0
StPrx14 [ <i>Solanum tuberosum</i> (Potato)]	93	361	0
NtPrx15 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	87	360	0
BpauPrx02 [ <i>Brunfelsia pauciflora</i> ]	86	361	0
LjPrx02 [ <i>Lotus japonicus</i> (corniculatus variedad japónica)]	76	331	0
PtPrx67 [ <i>Populus trichocarpa</i> (bálsamo occidental)]	75	329	0
PpePrx02 [ <i>Prunus persica</i> (durazno)]	72	336	0
GrPrx32 [ <i>Gossypium raimondii</i> ]	76	322	0
FvPrx01 [ <i>Fragaria vesca</i> ]	71	337	0
<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> (álamo gris)]	77	324	0



- ❖ Predicción de características por NCBI (en todos los casos el símbolo # muestra la localización de los residuos implicados en la característica según se trate), se incluyen los resultados del Blast con las 9 secuencias con mejor puntuación:
  - Ligado del hemo (29 residuos):

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Feature 1          # # # # #
1FHFA_1           1 QLTPTFYRE--TCPNLFPIVFGVIFDASftDPRIGASLMRLHFHDCFVggCDGSVLLnnt-dtiESEQDALPni-nSIR- 75
query            41 GLSWTFYDS--ICPNAESIIRRRLOVVEfGDIGOAAGLLRLHFHDCFVggCDGSVLLdgs-aaqPSEKDAPPNI--TLRq 115
gi_223550168     28 ALOVGFYSgkcGFADVEAIVAGVVTPOfFkDPTIVAALLRLOFHDCFVngCDASILLdg----rSSEKTAPENI--SVR- 100
gi_226496139     39 DLSVYFHAD--SCPOLETIVRSSVDAALGqNVRLTAGLLRLLFHDCFVgqCDASILLd-----NGERGLPPNvgLOOE- 109
gi_147827141     24 GLSYSIYQK--SCPQVEDIVRAALGRIFLsDPSSPRAFLRLFHDCFVgqCDASILLVdpagqktPLEMASSKNf--GVR- 98
3HDL_A           1 DLQIGFYNT--SCPTAESLVQAVAAAFannNSGIAPGLIRMEFHDCFVrgCDASVLLdst-annTAEKDAIPNn-pSLR- 75
1SCH_A           1 XLSSNFYAT--KCPNALSTIKSAVNSAVakeEARMGASLLRLHFHDCFVggCDASVLLddt-snftGECTAGPNa-nSIR- 75
gi_3927894       17 QLTETFYDQ--TCPRLPNIVROEVKRAIetDIRAGAKLIRFHFHDCFVggCDGSVLLeda-pqiDSELNGLGNl--GIQ- 90
gi_147779779     112 QLSPDFYDK--LCPQALPTIRSILEKAIyhEPRLGASLLRVHFHDCFVngCDASVLLddt-pnftGECTAGPNI-nSLR- 186
gi_255634941     75 KLSPDFYIK--TCPNAQKIVADALADIVkknPGALGNLLRLQFHDCFVngCDASILLdyspsgdTVEKSSMVNg-lLLK- 150
          90      100     110     120     130     140     150     160
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Feature 1          ###
1FHFA_1           76 -GLDVVNDIKTAVENSC-PDTVSCADILAIAAEIASVLGgGPGWVPLGRRDSltanrTLAnq-----nLPAPFFnLTO 147
query            116 qAFRIIEDLRRRVHRDC-GRVVSCADITAIARDSVFFSgGPDYDLPLGRRDGLt-faTTNtL----anLPPPSFnTSL 189
gi_223550168     101 -GYDIIDQAKTAVERAC-PGVVSCADILAIATRQVVFLSgGGRYNVQTGRRDGL----ISAGqn----vsILGPKAaVPE 170
gi_226496139     110 -AVQLVEDIRKGVHAAC-GPTVSCADITVLRDAVSLSgGPEFTVFLGRIDSa----APASnd--vftLPPPTAtVDE 181
gi_147827141     99 -KRESISLIKSVVEAQC-PGTVSCADILVMAARDAVAfSgGPWIKVFFGRRDS-----SRATsvkladalLPPANXdVNG 171
3HDL_A           76 -GFEVITAAKSAVEAAC-PQTVSCADILAFARDAANLAgNITVQVPSGRRDgtvsLaSEANa-----qLPSLEnATO 147
1SCH_A           76 -GFEVIDTIKSQVESLC-PGVVSCADILAVAARDAVVALgGASWVLLGRRDSttasLSSANa-----dLPAPFFnLSG 147
gi_3927894       91 -GLEIVDAIKAAVESEC-PGVVSCADVLAALAKQSVDVQgGPSWRVLFGRDRSrtanrTGADa-----LPSPEFtLEP 161
gi_147779779     187 -GFEVIDEIKAVNSACgGNVVSCADILAVAARDAVAILgGPSXQVLLGRRDartasLNDANs-----dLRRPIdFPA 259
gi_255634941     151 -GADMIDDIKKLEEQC-PQTVSCADTLAFTANEVMTMAgLLPRKPLGRRDALv-sLSSAAda----dnLPLPDWtMDQ 223
          170     180     190     200     210     220     230     240
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Feature 1          # # # # # # # # #
1FHFA_1           148 LKASFAVQGl-NTLDLVTLSGGHTFGRARCSTFinrlynfsntgnpdptlntTYLEVLRARCPqna---tgdNLTNLDl- 222
query            190 ILASLATKnf-TPTDVVALSGGHTIGISHCSSFtdrlypn----adssmdkTFANNLKTTCptrn---stnTTV-Ldi- 258
gi_223550168     171 AVAAFAEIGl-NTTDMVLLLGAHSVGVTHCSLlkdriydfegsgnppdplmdpFLVNLLRFRCpqt---aidNTVNLDqn 246
gi_226496139     182 LLTAFGSKNlsDPADLVALSGAHTVYKARCSSFgadvag-----patdDVTRCVTATCSapq---sgdTLRDLdf- 247
gi_147827141     172 XLQIFTQKgm-TIKEAVAIIGAHTIGITHCLNIrdrlqrpeg-ggrargmepGFEAFRLRLSCPegsl-issnTFVVND-- 246

```

```

3HDL_A      148 LINSFANKTl-TADEMVTLSGAHSIGVAHCSSPtnrlyfnfngsgidptlepSYAALLRNTCPanst-rftpITVSLDi- 224
1SCH_A      148 LISAEFNKgf-TTKELVTLSGAHTLGOAQCTAErttriyn-----asnldpTYAKSLQANCPavq---gdI.NLSPEFdv- 215
gi 3927894   162 LKQKFEALGl-DSTDLVAPSGAHTPGRSRCMFFsgrfsfnfngtqqdpaldpAYRQELERACTdg-----eTRVNFDp- 233
gi 147779779 260 LLSNRFONHGl-DLNDLWLLSGGHTLGLABCTNERdriyn-----atnikpKEAASLRGLCPkeg---gddNTATLD-- 326
gi 255634941 224 MVKLFTKKgf-NIEEMVILLGAHSIGMAHCDLfiqraynfqntgkpdptltvEAVEEFKACPNvntpkyrnPPVNFd-- 300
                250      260      270      280      290      300      310      320
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|

```

Feature 1

```

1FHF_A      223 -STPDQEDNRYYSNLLQL---NGLLQSDQQLFSGTpgaRTIPIVNSFSSNqNTFFSNFRVSMIKMGNIqvlT--qdeGEIR 296
query       259 -RSPNKFDNKYYVDLMNr---OGLFETSDQDLXTDr--RTRGIWTSEAINeSLFFKFEVNSMIKMGQIqvlT--qtqGEIR 330
gi 223550168 247 pESPFMDVSYXONIMMh---RGILOIDQRLGMDp--LTMPIVRNLAGe-FDEPTREGAAMVKLGTIqvlT--dkqGEIR 318
gi 226496139 248 -LTPAVFDNLYEVELTLrknkGVMLPSDQGLVSDp--RTSNLVOGFADNhwWFFDOERTSMIKMSQLrpgg--qnvGEIR 322
gi 147827141 247 -PSAFTEDNHYYSNAMHg---RGI LRVDARVSSDa--RTAPIVSSFAADqRRDIKEGWVGLFDYGGGAmvgsivypQKGS 320
3HDL_A      225 -ITPSVLDNMYTGVOLT---IGLLTSDQALVTRa--NLSAAVKANAMNITAWASKEAQAMVKMGQIevLT--qtqGEIR 296
1SCH_A      216 -TTPNKFDNAYYINLRnk---KGLLHSDQQLFNGy--STDQVTAYSNNaATENTDEGNAMIKMGNIqplT--qtsGQIR 287
gi 3927894   234 -TTPDTEFDKNYYTNLQAn---RGI L TSDQVLFSGTpgaRTIPIVNRIGSSeGTFFRQFRVSMIKMGNIrplT--pnaqGEIR 307
gi 147779779 327 -ATTANEDTEYFKDLLKl---KGLLHSDQQLFKGygsASDGLVQYXXNpGAFFADEGVSMIKMGNIkplT--qsdGEIR 400
gi 255634941 301 -ATPTVLDNLEYMEMVEK---nRTVELITDSHLITDg--RTIPLVQGFADHqSIERRREFEVMLKLGSIqvlT--qneGEIR 373

```

Feature 1

```

1FHF_A      297 LQCNFV 302
query       331 ANCSVr 336
gi 223550168 319 RSCRAT 324
gi 226496139 323 RNCFRP 328
gi 147827141 321 LGCVPF 326
3HDL_A      297 TNCSVV 302
1SCH_A      288 TNCRKT 293
gi 3927894   308 RNCRGV 313
gi 147779779 401 MNCRKI 406
gi 255634941 374 KICRST 379

```

➤ Sitio activo (31 residuos):

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature 2          # # # # #
1FHF_A           1 QLTPTFYRE--TCPNLFPIVFGVIFDASftDPRIGASLMRLHFHDCFVqgCDGSVLLnnt-dtiESEQDALPni-nSIR- 75
query           41 GLSWTFYDS--ICPNAESLIRRRRLQNVFRqDIGQAAGLLRLEFHDCEVqgCDGSVLLdga-asgPSEKADAPPNI--TLRg 115
gi 223550168    28 ALOVGEYSGkcGEADVEALVAGVVTPOFfkDPTIIVAALLRLOEHDCEVngCDASLLLDg----rSSEKTAPPNI--SVR- 100
gi 226496139    39 DLSVYFHAD--SCRQLETLVRRSSVDABLqgNVRLTAGLLRLEFHDCEPqgCDASILLd-----NGERGLPPNVLQQR- 109
gi 147827141    24 GLSYSIYQK--SCQVEDIVBAALGPIFLsDESSPPAELELLEFHDCEVqgCDASILLVdpaggktPLEMSSKNI--GVR- 98
3HDL_A          1 DLQIGFYNT--SCPTAESLVQQAVAAAFanNSGIAPGLIRMHFHDCEVrgCDASVLLdst-annTAEKDAIPNn-pSLR- 75
1SCH_A          1 XLSSNFYAT--KCPNALSTIKSAVNSAVakEARMGASLLRLHFHDCFVqgCDASVLLddt-anfTGEKTAGPNn-nSIR- 75
gi 3927394      17 QLTFYFDQ--TCPNLENIIVRQEKRAletDIRAGAKLRLEFHDCEVqgCDGSVLLeda-pgidSEELNGLGML--GIQ- 90
gi 147779779    112 QLSPDFYDK--LCPQALPTIRSIIEKAIyhEPRLGASLLRVHFHDCFVngCDASVLLddt-pnftTGEKTAGPNI--nSLR- 186
gi 255634941    75 KLSPDFYIK--TCPNAQKIVADALADIVkknPGALGNLLRLQFHDCEVngCDASILLdyspagdTVEKSSMVNG-LLLK- 150
          90      100     110     120     130     140     150     160
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature 2          #####
1FHF_A           76 -GLDVVNDIKTAVENSC-PQTVSCADILAIAAEIASVLGqGPGWFWPIGRRDSltanrTLANG-----nLRPRTEnLTO 147
query           116 qAFRIIEDLRRRVHRDC-GRVVSCADITAIARDSVFFSgGPDYDLPFGRRDGLt-faTTNETl----anLPPPSFnTSL 189
gi 223550168    101 -GYDIIDQAKTAVERAC-PGVVSCADILAIATRDVVELSgGGRYVWQTGRRDGL----ISAGqn----vsLLGPRbAVPE 170
gi 226496139    110 -AVQLVEDIRGKVHAAC-PEVSCADITVLAIRDVAVSLsGPRFTVPIGRLDsa----APASand--vftLPPPTatVDF 181
gi 147827141    99 -KRESISLIKSVVEAQC-PQTVSCADILVMAARDVAFAFSqGPNIKVPEFGRDS-----SRATaykladalLPPAKdVNG 171
3HDL_A          76 -GFEVITAAKSAVEAAC-PQTVSCADILAFAAARDSANLAqNITYOVESGRRDgkvalaSEANa-----qLRSELEnATO 147
1SCH_A          76 -GFEVIDTIKSQVESLC-PGVVSCADILAVAAARDSVVALqGASVWVLIIGRRDSrtasLSSANa-----dLRPRTEnLSG 147
gi 3927394      91 -GLEIVDAIKAAVESEC-PGVVSCADWLALAAKQSVDVQqGPSYVWVLEFGRDSrtanrTGADe-----LRSPTELEP 161
gi 147779779    187 -GFEVIDRIKEAVNSACcGNVVSCADILAVAAARDSVAILqGPSYVWVLEFGRDartasLNDANa-----dLRPRTEnDFA 259
gi 255634941    151 -GADMIDDIKLLEEQC-PQTVSCADTLAFTANEVMTMAgLLPRKFLGGRRDALv-elSSAAAda----dnLPLFDWtMDQ 223
          170     180     190     200     210     220     230     240
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature 2          # # # # #
1FHF_A           148 LKASFAVQGl-NTLDLVTLSGGHFFGRARCSTFinrlynfentgnpdptlntTYLEVLNARCPqna---tgdNLTNLDl- 222
query           190 ILASLATKNI-TPTDVVALSGGHITIGISBCSSEfdrlypn-----qdasmdkTFANNLKTTCPrn---atnTTK-LDi- 258
gi 223550168    171 AVAAFAEIGl-NTTDMVLLGHAHSVGVTHCSLlkdrlydfegsgnpgdplmdpFLVNLLRFRCPqfp---aidNTVNLDqn 246
gi 226496139    182 LLTAEGSKNladPADLVALSQAHTVGGKABCSSEfgdvq-----patdVTRCMTATCSapq---sgdTLdLdf- 247
gi 147827141    172 XLQIFIQKGM-TIKEAVAIIGAHTIGITHCLNirdrlqrpeg-ggrarqmpGFEAFRLSCLPegsl-iansTFVND-- 246
3HDL_A          148 LINSFANKTl-TADEMVTLSGAHSIGVAHCSSFTnrlynfnsggidptlepSYAALLRNTCPanst-rftpITVSLDi- 224
1SCH_A          148 LISAFSNGf-TTKELVTLSGAHTIGQAQCTAFtrryn-----esnldpTYAKSLQANCPsvg---gdtNLSPEDv- 215

```



➤ Sitio de unión a sustrato (10 residuos):

```

Feature_3
1FHF_A
query
qi 223550168
qi 226496139
qi 147827141
3HDL_A
1SCH_A
qi 3927894
qi 147779779
qi 255634941
90 100 110 120 130 140 150 160
.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
1 QLTPTFYRE--TCPNLPPIVFGVIFDASfctDPRIGASLMRLHFHDFCVgGCDGSVLLnnt-dtiESEQDAPLNI-nSIR- 75
41 GLSWTFYDS--ICENASLIRRRLONFVEfdDGOAAGLMLRLEHDCFXGCDGSVLLdga-aggPKERDAPPNI--TLRq 115
28 ALQVGEYSGKcGEADVRAALVAGVYVTPQEFADETVAALLLOFHDCFXGCDASLlIdg----fSRKTAAPPNI--SVR- 100
qi 226496139 39 DLSVYFHAD--SCPOLBTIVRSVDAALqgqVBLTAGLRLILFHDCFXGCDASLlIdg----MGRGLPPNvgIQQR- 109
qi 147827141 24 GLSYSIYQK--SCQVEDIVRAALGPIELsdESSPPAELRLILFHDCQVgCDASLlIdvDagqktPLEMASSENf--GVR- 98
3HDL_A 1 DLQIGFYNT--SCTPAESLVQAFAAFannSGIAFGLIRMHFHDFCVrgCDASVLLldst-annTAKKDAIPNN-pSLR- 75
1SCH_A 1 KLSNFIYAT--KCPNALSTIKS AVNSAVakEAKMGAKLLRLHFHDFCVgCDASVLLlddt-enfGKKTAGPNa-nSIR- 75
qi 3927894 17 QLTFEYDQ--TCPRLENLVROEVKRAIetDIBAGAKLIRFHFHDCFXGCDGSVLLleda-pqiDSEfLNGfGNL--GIQ- 90
qi 147779779 112 QLSPDFYDK--LCPOALPTIRSILEKAIyHEPLGASLLRVBFHDFCVgCDASVLLlddt-pnfrGKKTAGPNI-nSLR- 186
qi 255634941 75 KLSPDFYIK--TCPNNAQIVADALADIVkknPGALGNLRLQFHDFCVngCDASILLdysepGdTVKXSSMVNg-lLLK- 150
90 100 110 120 130 140 150 160
.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature_3
1FHF_A
query
qi 223550168
qi 226496139
qi 147827141
3HDL_A
1SCH_A
qi 3927894
qi 147779779
qi 255634941
151 170 180 190 200 210 220 230 240
.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
76 -GLDVNDIKTAVNSC-PDYSCADILAIARHIAASVIGGEGGpVPIgHRDStanTLANg-----dLPAPFFDLTQ 147
116 qAFRIIEDLRNRVHRDC-GRVWSCADITAIARDSVFFSGPDYDLPLGHRDGLt-faTtWetl-----anLPPSFfTSL 189
101 -GYDIIDQAKTAVERAC-EGVWSCADILAIARbDVFVLSGGRRYKVVOTGHRDGL--ISAGGL--yallGPKAaVPEK 170
qi 226496139 110 -AVQLVEDIRGKVAAC-GPYWSCADITVLAARDAYLSGGPRTVPIgHRDSt----APASand--yflLPPtATVDEK 181
qi 147827141 99 -XRESISLIKSVZEAQC-EGYWSCADILVWABADAVAFSGPWIKVPEGHRDSt----SRATyKIadaLIIPANXdyVNG 171
3HDL_A 76 -GFEVITAAKSAVEAAC-POCYSCADILAFABADStANLAcNITyOVPSGHRDStvAlaSEANA-----qIPSPLEdATQ 147
1SCH_A 76 -GFEVIDTIKSQVESLC-EGVWSCADILAVABADStVWAlAGASNVNLIgHRDStlaalSSANA-----dLPAPFFDLSG 147
qi 3927894 91 -GLEIVDAIKAAVESEC-EGVWSCADWVLAARQSYDVQGGPSRVVLFGRDStanTIGaDe-----lPSPFELDRP 161
qi 147779779 187 -GFEVIDEIKKAVNSACGNVXSCADILAVABADStVAlIqGSSYQVLIgHRDStaeLNDANA-----dLPRPIFDfPA 259
qi 255634941 151 -GADMIDDIKKALEEQC-PQTVSCADTLAFTANEVMTWAgLLPRKPLGHRDAlv-elSSAAada-----dnLPLPDWtMDQ 223
170 180 190 200 210 220 230 240
.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature_3
1FHF_A
query
qi 223550168
qi 226496139
qi 147827141
3HDL_A
1SCH_A
qi 3927894
148 LKASFAVQGL-NTLDLVTLSGGHTFGRARCSftInrlynfentgnpDptIntTYEVLRARCPqna---tgdNLTNLDl- 222
190 JLASLAtKNI--TPTXVALSGGHTIGISHCSSEtdrlypa-----qdasmdkTFANNLkTTCpTIn---atnTtV-LdI- 258
qi 223550168 171 AVAAFAEIGL-NTTOMVILLGAHSVGVTHCSLLkdrlydfegsnpDplmdpFLVNLlRFRCPqfp---aidNTVNLDqn 246
qi 226496139 182 ILTAFGSKNlADPAILVALSGAHTWgKARCSSEgDwaG-----patdNtRCYtATCSaPa---agdTlRDLdF- 247
qi 147827141 172 XLDQFTQGM-TIKEVAIIGAHTIGITHCLNlrdlrqpeg-ggrargmepGFEAFRLSCpegsI-ismsTFVVND-- 246
3HDL_A 148 LINSFANKTl-TADEMVTLSGABSIGVHCSSEftnrlynfnsngidptIsPSYAAALLNtCpansT-rftptITVSLdI- 224
1SCH_A 148 LISAFSNKGF-TTKELVTLtSGAHTIGOAOCtAftbriyA-----esnidpTYAKSLIqANCPavG---qdtNLSPEdY- 215
qi 3927894 162 LKQKFEALGL-DSTDLVAPSGAHTFGRSRCMFFSgrInfnngtqqDpbaIdpAYRQELERACTdG-----eTRVNFDp- 233

```

```

gi 147779779 260 ILSNFQNBGL-DLNDLVLLSGGHTIQLARCTNFrdrlyq-----atnikpKFAASLRGICPkeg---gddNTATLD-- 326
gi 255634941 224 MVKLFTKKGF-NIEEMVILLGAHSIGMAHCDLfiqraynfqntgkpdptltvEAVEEPEKACPnvntpkyrnPPVNTD-- 300
          250      260      270      280      290      300      310      320
          .....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|

```

Feature 3

```

1FHF_A      223 -STEDQEDNRYYSNLLQL---NGLLQSDQRLFSQpgaDLELVNSFSSNqNTFFSNFRVSMIKMGNIgvlt--gdeGEIR 296
query      259 -RSPNKEDNKYYVDLMNR---QGLETSDDQLYTRr--RIRGIVTSEFJNeSLEFKKEFVNSMIKMGQLnvlt--gtgGEIR 330
gi 223550168 247 pESPEFMDVSYXONIMMh---RGIQLIDQRLGMDp--LMPPIVRNLAGE-EDETRREGAAMVXLGTIgvlt--dkgGEIR 318
gi 226496139 248 -LTPAVFDNLYFVELTLrknkGVMLPSDQGLVSDp--RISNLVQGFADNhWWEFDQERTSMLKMSQLrqpq--gnvGEIR 322
gi 147827141 247 -PSAETFDNHYYSNAMHg---RGIIRVDAEVSSDa--RIARIVSSEFAAQRRRIKRGWVGIPOYGGGsmvgsirypQKGS 320
3HDL_A     225 -ITPSVLDNMYXTGVQLr---LGLLTSQDALVTRa--NLSAAVKANAMNLTANASKEAQAMVVMGQIevlt--gtgGEIR 296
1SCH_A     216 -TTPNKEDNAYYINLRNk---KGLLSDQQLFNGv--SDSQVTAYSNNaATENTDEGNAMIKMGNIrplt--gtsGEIR 287
gi 3927894  234 -TTPDTEFNKYYTNLQAn---RGLLTSQDQLFSQpgaDLELVNRLGSRreGTFERQFRVSMIKMGNIrplt--pngGEIR 307
gi 147779779 327 -ATTANTDCTRYFRDLKl---KGLLSDQRLFSQvgaASRGLVQYXXNNpgaFTADEGYSMIKMGNIkplt--gedGEIR 400
gi 255634941 301 -ATPTVLDNLEYMEMVEK---nRTELITDShLLTDg--RILPLVQGFADpSLERPREPEVMILKLSLnvlt--gneGEIR 373

```

.....\*

Feature 3

```

1FHF_A      297 LQCNFV 302
query      331 ANCSVr 336
gi 223550168 319 RSCRAT 324
gi 226496139 323 RNCFRP 328
gi 147827141 321 LGCVPF 326
3HDL_A     297 TNCSVV 302
1SCH_A     288 TNCRKT 293
gi 3927894  308 RNCRGV 313
gi 147779779 401 MNCRKI 406
gi 255634941 374 KICRST 379

```

➤ Sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> (9 residuos):

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
          # # # #
Feature 4
1FHF_A      1 QLTPTFYRE--TCPNLFPIVFGVIFDASftDPRIGASLMRLHFHDCFVqgCDGSVLLnnt-dtiESEQDALPni-nSIR- 75
query      41 GLSWTFYDS--ICPNAESIIRRRRLONVFRqDIGQAAGLLRLHFHDCFVqgCDGSVLLdga-aaqPSEKDAPPNI--TLRq 115
gi 223550168 28 ALOWGEYSgkGFAQVRAIVAGVVTPOQfkdPTIVAALLRLQFHDCFVngCDASILLdg----rSSEKTAPPNI--SVR- 100
gi 226496139 39 DLSVYFHAD--SCPOLETIVRSSVDAaLgqVWRLTAGLLRLHFHDCFPgqCDASILLd-----NGEBGLPPNvgLQGF- 109
gi 147827141 24 GLSYSIYQK--SCRQVEDIVRAALGPIELsDRSSPPAFIRLLLFHDCQVqgCDASILLVdpaggktPLEMASKNf--GVR- 98
3HDL_A      1 DLQIGFYNT--SCPTABSLVQQAVAAAFanNSGIAPGLIRMHFHDCFVrgCDASVLLdst-annTAEKDAIPNn-pSLR- 75
1SCH_A      1 XLSSNFYAT--KCPNALSTIKSAVNSAVakEARMGASLLRLHFHDCFVqgCDASVLLddt-enftTGEKTAGPNa-nSIR- 75
gi 3927894   17 QLTETFDYDQ--TCPRLEPNIVROEVKRAletDIRAGAKLIRFHFHDCFVqgCDGSVLLeda-pgidSEINLGIgnl--GIQ- 90
gi 147779779 112 QLSPDFYDK--LCPQALPTIRSILEKAIyhEPRLGASLLRVHFHDCFVngCDASVLLddt-pnftTGEKTAGPNI-nSLR- 186
gi 255634941 75 KLSPDFYIK--TCPNAQKIVADALADIVkkNPGALGNLLRLQFHDCFVngCDASILLdyspegdTVEKSSMVNg-LLK- 150
          90      100     110     120     130     140     150     160
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
Feature 4
1FHF_A      76 -GLDVVNDIKTAVENSC-PDTVSCADILATAARIASVLIgGPGGFWVPLGRRDSltanrTLANg-----nLEPPEEnLTO 147
query      116 qAFRIIEDLRRRVHRDC-GRVVSCADITAIARDSVFFSgGPDYDLPLGRRDGLt-faTTNETl----anLPPPSFnTSL 189
gi 223550168 101 -GYDIIDQAKTAVERAC-PGVVSCADILALATRDVVFSLgGGRYNVOTGRRDGL----ISAGqn---waJLGPkSaVPE 170
gi 226496139 110 -AVQLVEDIRGKVHAAC-GPTVSCADITVLAATRDVAVSLgGPRFTVPELGRLOSa---APASand--yftLEPPTAtVDF 181
gi 147827141 99 -KRESISLIKSVVEAQC-PGTVSCADILVMAARDAVAfSgGPWIKVPEGRRDS----SRATaykladalLPPANXdVNG 171
3HDL_A      76 -GFEVITAAKSAVEAAC-PQTVSCADILAFABARDSANLAgNITYOVPSGRRDgtvalaSEANa-----qLPSPLEnATO 147
1SCH_A      76 -GFEVIDTIKSQVESLC-PGVVSCADILAVAARDSVVALgGASGNVLLGRRDSttaslSSANa-----dLEPPEEnLSE 147
gi 3927894   91 -GLEIVDAIKAAVESEC-PGVVSCADVLAALAKQSVVDVQgGPSWVPLFGRRDSxtanrTGADe-----LPSPEELLEP 161
gi 147779779 187 -GFEVIREIKAEVNSACCgNVVSCADILAVAARDSVAIlGGRSYOVLLGRRDartaalNDANa-----dLRRRIFdFPA 259
gi 255634941 151 -GADMIDDIKLLEBQC-PQTVSCADTLAFTANEVMTMagLLPRKPLGGRRDAlv-slSSAAda----dnLPLPDWtMDQ 223
          170     180     190     200     210     220     230     240
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
          #
Feature 4
1FHF_A      148 LKASFAVQGl-NTLDLVTLGGHTFGRARCSTFinrlynfsntgnpdptlntTYLEVLRARCPqna---tgdNLTNLDl- 222
query      190 JLASLATKnf-PTDQVALSGGHTIGISHCSSSEtdrlypn-----gdssmdkTFANNLKTTCPtrn---atnTV-Ldi- 258
gi 223550168 171 AVAAFAEIGl-NTTDMVLLLGaHsvGVTHCSLlkdrlydfegsgnppdplmdpFLVNLFRFCpfp---aidNTVNLdqn 246
gi 226496139 182 LLTAFGSKMladPARLVALSGAHTVVGKARCSSEgdwag-----patdDVTTCVTATCSapg---sgdTLDLdf- 247
gi 147827141 172 XLQIFTQKGM-TIKEAVAIIGAHITIGITHCLNirdrlqrpeg-ggrargmepGFEAFRLRLSCpegsl-isnsTFVVND-- 246
3HDL_A      148 LINSFANKTl-TADEMVTLGSAHSIGVAHCSSFtnrlynfnsqsqidptlslpSYAALLRNTCPanst-rftptIVSLDi- 224

```

```

1SCH_A      248  IISAESNKGf-TTKELWTLGSAHTIGQAQCTAEtrriyn-----esnidpTYAKSLQANCPavg---gdtNLSPEFDv- 215
gi 3927894  162  LKQKFEALGf-DSTDLVAPSGAHTFGRSRCMFFsgrfsanfngtgqpdaldpAYRQELERACTdg-----eTRVNFDp- 233
gi 147779779 260  ILSNFQNHGf-DLNRLWLLSGGHTIGLARCTNERdriyn-----etnikpKEAASLRGICPkeg---gddNTATLD-- 326
gi 255634941 224  MVKLFTKKgf-NIEEMVILLGAHSIGMAHCDLFIqraynfqntgkpdptltvEAVEEFKACPNvntpkyrnPPVNFD-- 300
                250      260      270      280      290      300      310      320
                .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|

```

Feature 4

```

# # #
1FHF_A      223  -STPQEDNRYYSNLLQL--NGLLQSDQQLFSTpgaDTIPIVNSESSNqNTFESNERVSMIKMGNLqvlt--gdeGEIR 296
query       259  -RSPNKEDNKYYVDLNR--QGLFETSDQDLXTDr--RTRGIIVTSEAINaSLFEKFEVNSMIKMGQLnvlt--gtqGEIR 330
gi 223550168 247  pFSPEFMDVSYQNIIMh--RGILQIDQQLGMDp--LTMPIVRNLAGE-FDEETREGAAMVKLGTIqvlt--dkqGEIR 318
gi 226496139 248  -LTPAVEDNLYFVELTLrknkGYMLRSDQGLVSDp--RTSNLVOGFADNhWWEFDQERTSMIKMSQLrqpq--gnwGEIR 322
gi 147827141 247  -PSAETEDNHYYSNAMHg--RGILRVDARVSSDa--RTAPIVSSFAADqRRDIKKGWVGIPDYGGGsmwgaivypQKGS 320
3HDL_A      225  -ITPSVLDNMYTGVQLt--IGLLTSDQALVTEa--NLSAAVKANAMNLTANASKEFAQAMVKMGQIevlt--gtqGEIR 296
1SCH_A      216  -TTPNKEDNAYYINLRNk--KGLLHSDQQLFNGv--STDQVTAYSNNaATENTDEGNAMIKMGNLsplt--gtaGQIR 287
gi 3927894  234  -TTPDTEFNKYVTNLQAn--RGLLTSQVLEFSTpgaDTIPIVNRLLGSReGTFERQERVSMIKMGNLrplt--pnaGEIR 307
gi 147779779 327  -ATTANEDTEYFKDLIKL--KGLLHSDQQLFKGvgsASDGLVOYXXNNpGAFFADFGVSMIKMGNMkplt--gadGEIR 400
gi 255634941 301  -ATPTVLDNLEYMRNVEk--nRTELITQSHLLTDg--RTLPLVQGFADHqSLEPRRFEPEVMLKLGSLnvlt--gnaGEIR 373

```

.....\*

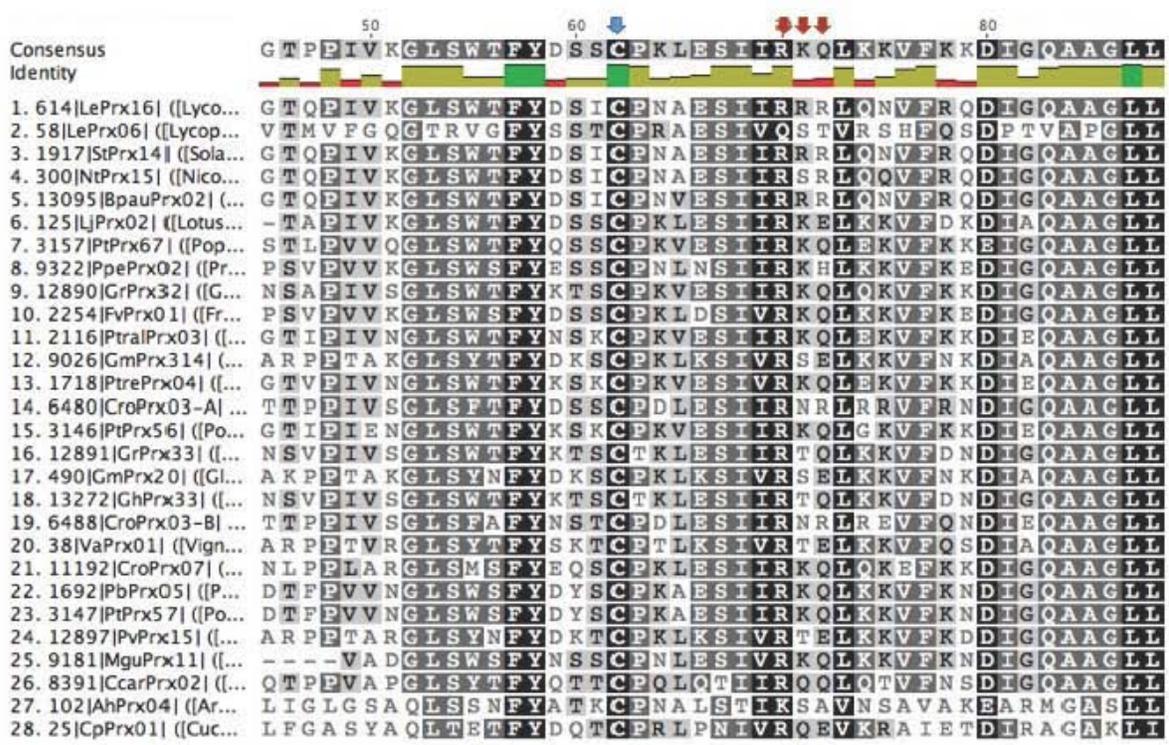
Feature 4

```

1FHF_A      297  LQCNFV 302
query       331  ANCSVr 336
gi 223550168 319  RSCRAT 324
gi 226496139 323  RNCFRP 328
gi 147827141 321  LGCVPF 326
3HDL_A      297  TNCVVV 302
1SCH_A      288  TNCRKT 293
gi 3927894  308  RNCRGV 313
gi 147779779 401  MNCRKI 406
gi 255634941 374  KICRST 379

```

- ❖ Alineamiento con respecto a las 25 secuencias con mejor puntuación en contra del banco de Peroxibase, se incluyen las secuencias de cacahuate (*Arachis hypogaea*) y del calabacín (*Cucurbita pepo*); se muestran con flechas azules los residuos de Cys conservados, con flechas naranjas las His catalíticas, con flechas verdes los residuos putativos de unión a la pared descritos por Carpin y colaboradores (2001) y en flechas rojas los residuos que se encontraron con parte del parche con carga positiva de mayor superficie en LePrx16:



	90	100	110	120	130
Consensus	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFETI				
Identity					
1. 614 LePrx16  ([Lycos...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRQQAFRIT				
2. 58 LePrx06  ([Lycop...)	RMHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRKAFQIT				
3. 1917 StPrx14  ([Sola...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRQQAFRIT				
4. 300 NtPrx15  ([Nico...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRQQAFRIT				
5. 13095 BpauPrx02  (...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRQQAFRIT				
6. 125 LjPrx02  ([Lotus...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRQQAFTIT				
7. 3157 PtPrx67  ([Pop...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRARAFETIT				
8. 9322 PpePrx02  ([Pr...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFQITIT				
9. 12890 GrPrx32  ([G...)	RLHFHDCFVQGCDASVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFETIT				
10. 2254 FvPrx01  ([Fr...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
11. 2116 PtralPrx03  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFETITIT				
12. 9026 GmPrx314  (...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTLRPEAFKITIT				
13. 1718 PtrrePrx04  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFETITIT				
14. 6480 CroPrx03-A  (...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
15. 3146 PtPrx56  ([Po...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTLRKAFETITIT				
16. 12891 GrPrx33  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
17. 490 GmPrx20  ([G...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTSLRPEAFKITIT				
18. 13272 GhPrx33  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
19. 6488 CroPrx03-B  (...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
20. 38 VaPrx01  ([Vign...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTSLRKAFAQITIT				
21. 11192 CroPrx07  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSERDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
22. 1692 PbPrx05  ([P...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
23. 3147 PtPrx57  ([Po...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQDAPPNLTSLRKAFAQITIT				
24. 12897 PvPrx15  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKDAAPPNLTSLRKAFAQITIT				
25. 9181 MguPrx11  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEQTAPPNLTSLRKAFAQITIT				
26. 8391 CcarPrx02  ([...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDGSASGSPSEKSAIPNLTSLRKAFAQITIT				
27. 102 AhPrx04  ([Ar...)	RLHFHDCFVQGCDASVLLDTSNFTGKTAGPNAN-SIRGFETIT				
28. 25 CpPrx01  ([Cuc...)	RLHFHDCFVQGCDGSLVLLDAPGIDSELNGLGNLGLT--QGLTIT				

	140	150	160	170
Consensus	EDLRRRVHKECGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
Identity				
1. 614 LePrx16  ([Lycos...)	EDLRRRVHRCGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPDYDLPLGRR			
2. 58 LePrx06  ([Lycop...)	DDAKQQIEAVCPGVVSCADILALAARDSVLVTKGLTWSDVPTGRT			
3. 1917 StPrx14  ([Sola...)	EDLRRRVHRCGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPDYDLPLGRR			
4. 300 NtPrx15  ([Nico...)	EDLRRRVHRCGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPDYDLPLGRR			
5. 13095 BpauPrx02  (...)	EDLRRRVHRCGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPDYDLPLGRR			
6. 125 LjPrx02  ([Lotus...)	EDLRSQIEKRCGRNVVSCADITATAAARDAVFLSGGPDYDLPLGRR			
7. 3157 PtPrx67  ([Pop...)	DDLREERTHKECGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
8. 9322 PpePrx02  ([Pr...)	NDLREELTHKECGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
9. 12890 GrPrx32  ([G...)	NDLRARVHKECGRNVVSCADIALAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
10. 2254 FvPrx01  ([Fr...)	NDLREIVHSKCGRNVVSCADLATAAARDAVFLSGGPEDYDVPLGRR			
11. 2116 PtralPrx03  ([...)	EDLRRRVVEKACGLVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
12. 9026 GmPrx314  (...)	ENLRGLLEKSCGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
13. 1718 PtrrePrx04  ([...)	EDLRRRVVEKACGLVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
14. 6480 CroPrx03-A  (...)	NDLRRRVVHSRCGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPEDYDVPLGRR			
15. 3146 PtPrx56  ([Po...)	EDLRRRVVEKACGLVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
16. 12891 GrPrx33  ([...)	NDLRRRVVEKACGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
17. 490 GmPrx20  ([G...)	ENLRGLLEKSCGRNVVSCSDITATAAARDAVFLSGGPDYDVPLGRR			
18. 13272 GhPrx33  ([...)	NDLRRRVVEKACGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
19. 6488 CroPrx03-B  (...)	NDLRRRVVHSRCGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPEDYDVPLGRR			
20. 38 VaPrx01  ([Vign...)	ERIRGLLEKSCGRNVVSCSDITATAAARDAVFLSGGPDYDVPLGRR			
21. 11192 CroPrx07  ([...)	DDLRRRVHKECGRNVVSCSDITATAAARDSVFLSGGPDYDVPLGRR			
22. 1692 PbPrx05  ([P...)	DDLREERTHKECGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPEDYDVPLGRR			
23. 3147 PtPrx57  ([Po...)	DDLREERTHKECGRNVVSCADITATAAARDSVFLSGGPEDYDVPLGRR			
24. 12897 PvPrx15  ([...)	EKLRAILEKSCGRNVVSCSDITATAAARDAVFLSGGPDYDVPLGRR			
25. 9181 MguPrx11  ([...)	DDLRRRVHKECGRNVVSCADILALASRDSIFLSGGPDYDVPLGRR			
26. 8391 CcarPrx02  ([...)	ENLRRRVVHNAENRNVVSCADITATAAARDAVFLSGGPDYDVPLGRR			
27. 102 AhPrx04  ([Ar...)	DTIKSQVESLCPGVVSCADILAVAARDSVVALGGA SWNVPLGRR			
28. 25 CpPrx01  ([Cuc...)	DAIKAAVBSKCPGVVSCADVLALAAKRSDVQGGPSWRVPLGRR			



	270	280	290	300	
Consensus	-NS	TNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DK	
Identity					
1. 614 LePrx16  ([Lycos...	-NS	TNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
2. 58 LePrx06  ([Lycop...	G	DGSKRVALDTG	SVNNEFDTSYFSNLRN	GRGILESDQILWT	--DA
3. 1917 StPrx14  ([Sola...	-NS	TNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
4. 300 NtPrx15  ([Nico...	-NS	TNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
5. 13095 BpauPrx02  (...	-NS	TNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
6. 125 LjPrx02  ([Lotus...	-NT	DNTTVLDLRSPN	TFDNKYYVDLMNRQGLF	ESDQDLYT	--DK
7. 3157 PtPrx67  ([Pop...	-DS	NSSTTVLDIRSPN	NFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NK	
8. 9322 PpePrx02  ([Pr...	-DT	NAATTVLDIRSPD	TFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DK	
9. 12890 GrPrx32  ([G...	-NS	SNTTVLDIRTPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NS	
10. 2254 FvPrx01  ([Fr...	-DT	NAATTVLDIRSPD	TFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DK	
11. 2116 PtralPrx03  ([...	-DF	NNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NK	
12. 9026 GmPrx314  ([...	-NT	DNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLLNRQGLFTSDQDLYT	--DK	
13. 1718 PtrrePrx04  ([...	-DF	NNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NR	
14. 6480 CroPrx03-A  (...	-NT	TNTTVLDIRSPN	RFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
15. 3146 PtPrx56  ([Po...	-DF	NNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NK	
16. 12891 GrPrx33  ([...	-NS	TNTTVMDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DS	
17. 490 GmPrx20  ([Gl...	-NT	DNTTVLDIRSPN	TFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--NT	
18. 13272 GhPrx33  ([...	-NS	TNTTVMDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DS	
19. 6488 CroPrx03-B  (...	-NT	TNTTVLDIRSPN	RFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DR	
20. 38 VaPrx01  ([Vign...	-T	TNTTVLDIRSPN	TFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DK	
21. 11192 CroPrx07  (...	-NS	NNTV FQDIRSPN	KFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDMYT	--DR	
22. 1692 PbPrx05  ([P...	-S	SNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLVNRQGLFTSDQDLYS	--YK	
23. 3147 PtPrx57  ([Po...	-S	SNTTVLDIRSPN	KFDNKYYVDLVNRQGLFTSDQDLYS	--YK	
24. 12897 PvPrx15  ([...	-T	TNTTVLDIRSPN	TFDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DT	
25. 9181 MguPrx11  ([...	-NS	NNTTQLDLRSPN	I FDNKYYVDLMNRQGLFTSDQDLYQ	--DS	
26. 8391 CcarPrx02  ([...	-NT	TNTTFMDIRSPN	V FDNRYYYVDLMNRQGLFTSDQDLYT	--DS	
27. 102 AhPrx04  ([Ar...	G	GDTNLS PFDV TTPN	KFDNAYYINLRNKKGLLHSDQQLFN	--GV	
28. 25 CpPrx01  ([Cuc...	-D	G E T R V N F D P T T P D T	F D K N Y Y T N L Q A N R G L L T S D Q V L F S T P G A		

	310	320	330	340	350
Consensus	RTRGIVTSFAVNQSL	----	FFEKFVVAMIKMGQLSVLTGN	QGEI	
Identity					
1. 614 LePrx16  ([Lycos...	RTRGIVTSFAINESL	----	FFKEFVNSMIKMGQLNVLTGT	QGEI	
2. 58 LePrx06  ([Lycop...	S	TKV FVQR YLGLR G F L G L R	FGL EFG KSMVKMSNIEVLTGT	NGBI	
3. 1917 StPrx14  ([Sola...	RTRGIVTSFAINESL	----	FFQEFVNSMIKMGQLNVLTGT	QGQI	
4. 300 NtPrx15  ([Nico...	RTRGIVTSFAINESL	----	FFQEFVNSMIKMGQLNVLTGT	QGEI	
5. 13095 BpauPrx02  (...	RTRGIVTSFAINESL	----	FFQEFVNSMIKMGQLNVLTGT	QGEI	
6. 125 LjPrx02  ([Lotus...	R	TKD I V T S F A V N Q S L	----	FFK F V V A M I K M G Q L N V L T G S Q G E I	
7. 3157 PtPrx67  ([Pop...	K	T R G I V T S F A A N Q S L	----	F F E K F V V A M I K M S Q L S V L T G K E G E I	
8. 9322 PpePrx02  ([Pr...	R	T K D I V K S F A V N Q T L	----	F F E E F V V K S M I K M G Q L S V L T G S R G E I	
9. 12890 GrPrx32  ([G...	R	T R G I V T S F A V N Q T L	----	F F E K F V A A M V K M S Q L S V L T G K A G E I	
10. 2254 FvPrx01  ([Fr...	R	T R D I V T S F A V N Q T L	----	F F E K F V H S M I K M G Q L S V L T G S K G E I	
11. 2116 PtralPrx03  ([...	K	T R G I V T S F A V N Q S L	----	V F D K F V V A M I K M S Q L K V L T G N Q G E I	
12. 9026 GmPrx314  ([...	R	T K G I V S D F A V N Q N L	----	F F E K F V F A M L K M G Q L N V L T G K Q G E I	
13. 1718 PtrrePrx04  ([...	K	T R G I V T S F A V N Q S L	----	F F D K F V V A M I K M S Q L K V L T G N Q G E I	
14. 6480 CroPrx03-A  (...	R	T R G I V T D F A V N Q T L	----	F F E K F V Y A M I K M G Q L N V L T G N Q G E I	
15. 3146 PtPrx56  ([Po...	K	T R G I V T S F A V N Q S L	----	F F D K F V V A M I K M S Q L K V L T G N Q G E I	
16. 12891 GrPrx33  ([...	R	T R G I V T S F A I N E T L	----	F F E K F V V S M I K M G Q L S V L T G N N G E I	
17. 490 GmPrx20  ([Gl...	R	T K G I V T D F A V N Q S L	----	F F D K F V F A M L K M G Q L N V L T G N Q G E I	
18. 13272 GhPrx33  ([...	R	T R G I V T S F A I N E T L	----	F F E K F V V S M I K M G Q L S V L T G N N G E I	
19. 6488 CroPrx03-B  (...	R	T R G I V T D F A V N Q T L	----	F F E K F V Y A M I K M G Q L N V L T G N Q G E I	
20. 38 VaPrx01  ([Vign...	R	T R G I V T S F A V N Q S L	----	F F E K F V F A M L K M G Q L S V L T G N Q G E I	
21. 11192 CroPrx07  (...	R	T R G I V T N F A V N E T L	----	F F E K F V I G M I K M G Q M N V L T G T Q G E I	
22. 1692 PbPrx05  ([P...	K	T R G I V T S F A E D E A L	----	F F E K F V V A M I K M S Q L S V L T G N Q G E I	
23. 3147 PtPrx57  ([Po...	K	T R G I V T S F A E D E A L	----	F F E K F V V A M I K M S Q L S V L T G N Q G E I	
24. 12897 PvPrx15  ([...	R	T K G I V T S F A V N Q G L	----	F F E K F V F A M L K M G Q L S V L T G N Q G E I	
25. 9181 MguPrx11  ([...	R	T R A I V T S F A A N Q T I	----	F F E N F V T A V V K M S Q L N V L T G A Q G E I	
26. 8391 CcarPrx02  ([...	R	T R G I V T N F A I N Q T L	----	F F Q N F V N A M I K M S Q L S V L T G T Q G E I	
27. 102 AhPrx04  ([Ar...	S	T D S Q V T A Y S N N A A T	----	F N T D F G N A M I K M G N L S P L T G T S G Q I	
28. 25 CpPrx01  ([Cuc...	D	T I E I V N R L G S R E G T	----	F F R Q F R V S M I K M G N I R P L T G N Q G E I	

Consensus Identity	360	370	380	386
	RANCSVRNSBN	SYLSVVVEEXXE	ELSEMXL	*
1. 614 LePrx16  ((Lyc...	RANCSVRNSNNY	--NLIQGTWSEI		
2. 58 LePrx06  ((Lycop...	RKVCSAFN			
3. 1917 StPrx14  ((Sola...	RANCSVRNSNNYNLILPSS	IGDQEKQGTWSEI		
4. 300 NtPrx15  ((Nico...	RANCSVRNSANYNLLLS	TSVAEEQQRWSEI		
5. 13095 BpauPrx02  (...	RANCSVRNSANYNLLLPSS	VEEKIKQGTWSEI		
6. 125 LjPrx02  ((Lotus...	RANCSVRNADKKK	-SFLTTVVVEEVVEELIEM		
7. 3157 PtPrx67  ((Pop...	RASCVRNSGSGS	--SYLESVVVEEGFEALSELI		
8. 9322 PpePrx02  ((Pr...	RADCSVRNSDNK	--SYLSVVVEEDEESLSEF		
9. 12890 GrPrx32  ((G...	RANCSVRNANNN	--SLLASVVVEEARSEY*		
10. 2254 FvPrx01  ((Fr...	RANCSMRNSDNA	--NYLSVVVEEDEESLSEF*		
11. 2116 PtralPrx03  ((...	RTSCSERNSGY	--SYLESVVVEEGLDA		
12. 9026 GmPrx314  (...	RANCSVRNANNK	--SLLTSVVVEDVVEETLIEM*		
13. 1718 PtrePrx04  ((...	RTSCSERNSGY	--SYLESVVVEEGLDS		
14. 6480 CroPrx03-A  (...	RANCSVRNAAASGRS	SSLVSVVEDAAEVGLSMF		
15. 3146 PtPrx56  ((Po...	RASCSEERNSGY	--SYLESVVVEEGLDALSGLI		
16. 12891 GrPrx33  ((...	RANCSVRNADNK	--SYLASVVVEELPVEEAWSDL*		
17. 490 GmPrx20  ((G...	RANCSVRNANNK	--SLLTSVVVDVVEETLIEM*		
18. 13272 GhPrx33  ((...	RANCSVRNADNK	--SYFASVVVEELPVEEAWSDL*		
19. 6488 CroPrx03-B  (...	RANCSVRNAAASGRS	SSLVSVVEDAAEVGLSMF		
20. 38 VaPrx01  ((Vign...	RANCSVRNANSK	--AFLSVVVENVAQEFIEM		
21. 11192 CroPrx07  (...	RAKCSVRNRDN	--SMISTVVDEIEDIGLSMF		
22. 1692 PbPrx05  ((P...	RANCSVRNSDN	--SYLVSEVEEDLETKSE		
23. 3147 PtPrx57  ((Po...	RANCSVRNSDN	--SYLVSEVEEDLETKSELR		
24. 12897 PvPrx15  ((...	RANCSVRNANSK	--AFLTSVVVENVAQEFIEM*		
25. 9181 MguPrx11  ((...	RANCSARNSGS	--LLLSPVVVAGEEKELRSTV*		
26. 8391 CcarPrx02  ((...	RANCSRRRNGND	--LFLLPGMKNDDEKVASY		
27. 102 AhPrx04  ((Ar...	RTNCRKTN			
28. 25 CpPrx01  ((Cuc...	RRNCRRVNELGGEAGHDVM			