



EEAD

Estación Experimental de Aula Dei - CSIC



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado: Obtención de diamino oxidasas de plantas mediante tecnologías recombinantes.

Obtention of plant diamino oxidases through
recombinant technologies

Autor: Iván Chicano Pablo
826303@UNIZAR.ES

Director: Miguel Alfonso Lozano
Estación experimental Aula Dei, CSIC

Director: M. Carmen Jarne Lardiés
Departamento de Química Analítica, universidad de Zaragoza

Índice

| | |
|--|----|
| 1.- Resumen..... | 2 |
| 2.- Introducción y objetivos | 3 |
| 3.- Materiales y métodos..... | 4 |
| 3.1.- Análisis bioinformático | 4 |
| 3.1.1.- Obtención de las secuencias de los genes que codifican las diamino oxidasas de soja (<i>GmDAOs</i>)..... | 4 |
| 3.1.2.- Alineamiento de secuencias de las <i>GmDAO</i> | 4 |
| 3.1.3.- Análisis filogenético | 5 |
| 3.1.4.- Bases de datos de expresiones de genes y abundancia proteica | 5 |
| 3.2.- Trabajo experimental..... | 6 |
| 3.2.1.- Cultivo de plantas etioladas de soja | 6 |
| 3.2.2.- Extracción y conservación de los diferentes tejidos | 6 |
| 3.2.3.- Aislamiento de ácido ribonucleico (ARN)..... | 6 |
| 3.2.3.1.- Método del trizol..... | 6 |
| 3.2.3.2.- Método del CTAB | 7 |
| 3.2.4.- Obtención de cDNA por el método de Superscript III..... | 8 |
| 3.2.5.- Análisis de expresión génica mediante RT-PCR | 8 |
| 3.2.6.- Electroforesis en gel de agarosa de ácidos nucleicos | 9 |
| 4.- Resultados y discusión | 10 |
| 4.1.- Caracterización genética de las diamino oxidasas de soja | 10 |
| 4.2.- Alineamiento y matriz de identidad de las <i>GmDAO</i> | 12 |
| 4.3.- Árbol filogenético | 13 |
| 4.4.- Expresión de las diamino oxidasas de soja en plantas etioladas | 15 |
| 4.5.- Análisis bioinformático de la expresión de los genes <i>GmDAO</i> en plantas de soja ... | 18 |
| 5.- Conclusiones..... | 19 |
| 6.- Bibliografía..... | 19 |
| 7.- Anexos | 22 |
| 7.1.- Anexo I: Alineamiento de secuencias génicas de las DAO de soja | 22 |

1.- Resumen

Las diamino oxidasas (DAO) son un grupo de proteínas ampliamente distribuido en las especies, tanto en el reino animal, como en el vegetal y bacteriano, implicadas en varios procesos celulares (síntesis de alcaloides, producción de NO (óxido nítrico) y ROS (especies reactivas de oxígeno)). Esta enzima cataliza la producción de un aldehído a partir de una amina primaria, con la liberación de peróxido de hidrógeno. Entre las posibles aplicaciones biotecnológicas, la que suscita más interés es la capacidad oxidativa de putrescina y cadaverina. Se tratan de aminas biogénicas que se producen junto a la histamina y otras en la hidrólisis de proteínas durante la putrefacción de tejidos. Datos preliminares sugieren que las diamino oxidasas de soja (*Glycine max*) parecen tener cierta selectividad frente a uno de estos sustratos. Por tanto, se planteó, como paso previo a la obtención recombinante del enzima, caracterizar a nivel genético y molecular las diamino oxidasas de soja.

El estudio del genoma de soja mostró la existencia de al menos 6 genes diferentes que codifican proteínas compatibles con las DAO. Estas proteínas mostraron diferente localización cromosómica y alto grado de homología, con elevado parentesco con respecto a las DAO de otras especies vegetales de secuencia accesible. El análisis de la expresión mediante RT-PCR en plantas etioladas de soja mostró un patrón de expresión característico para cada isoforma *GmDAO* en los diferentes tejidos analizados. *GmDAO5* se expresó específicamente en los cotiledones mientras que *GmDAO4* se expresó específicamente en la raíz. *GmDAO1*, *GmDAO2* y *GmDAO5* se expresaron abundantemente en hojas. Estas diferencias en los niveles de expresión podrían estar detrás de las diferencias en la afinidad por sustrato obtenidas en la actividad DAO de extractos de soja.

Diamino oxidases (DAO) are a group of proteins and genes widely distributed in many species, including animal, plant and bacterial kingdoms, involved in various cell processes (synthesis of alkaloids, nitric oxide (NO) and ROS (reactive oxygen species)). This enzyme catalyses the production of an aldehyde from a primary amine, with the release of hydrogen peroxide. Among the possible biotechnological applications, the most interesting one is the oxidative capacity of putrescine and cadaverine. They are biogenic amines that are naturally produced in protein hydrolysis during putrefaction of tissues, alongside histamine and other biogenic amines. Preliminary data suggest that soybean (*Glycine max*) diamine oxidases appear to have some selectivity against one of these substrates. Therefore, it was proposed, as a prior step to obtaining the recombinant enzyme, to characterize the soybean diamino oxidases at the genetic and molecular level.

The study of the soybean genome showed the existence of at least 6 different genes that encode proteins compatible with DAOs. These proteins showed different chromosomal localization, and a high degree of homology, with high phylogenetic relationship with respect to the DAOs of other plant species with accessible sequence. Expression analysis by RT-PCR in etiolated soybean plants showed a characteristic expression pattern for each *GmDAO* isoform in the different tissues analysed. *GmDAO5* was specifically expressed in the cotyledons while *GmDAO4* was specifically expressed in the root. *GmDAO1*, *GmDAO2*, and *GmDAO5* were abundantly expressed in leaves. These differences in their expression levels could be behind the differences in substrate affinity obtained in the DAO activity of soybean extracts.

2.- Introducción y objetivos

Las diamino oxidasas (DAO) son un grupo de proteínas ampliamente distribuido en los organismos vivos, incluyendo animales, plantas y hongos (Vianello et al., 1993). Desde un punto de vista enzimático son oxidasas (EC 1.4.3.21) que oxidan aminas primarias con la ayuda de O₂ y H₂O, resultando en un aldehído y en la producción de peróxido y NH₃.

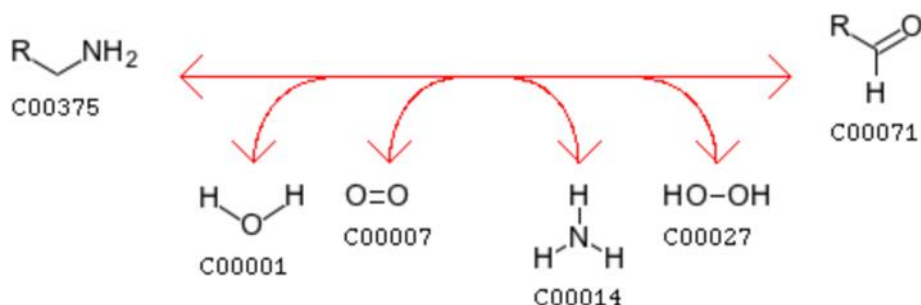


Figura 1: Reacción catalítica realizada por las diamino oxidasas (E.C.1.4.3.21). Imagen proporcionada por KEGG (Kanehisa & Goto, 2000).

La principal característica que las diferencia entre otras oxidasas parecidas es la presencia del cofactor Cu (II) en el sitio activo, el cual cumple un papel fundamental en la reacción, además de ayudar en la formación del cofactor redox topa quinona o TPQ (Kumar et al., 1996a). En el caso de las plantas, se ha descrito la presencia de la enzima en guisantes (*Pisum sativum*; Padiglia et al., 1991), soja (*Glycine max*; Delis et al., 2006), almorta silvestre (*Lathyrus cicera*; Di Fabio et al., 2021), lentejas (*Lens culinaris*, Medda et al., 1996), entre otras.

Desde un punto de vista celular, varios son los procesos en los que estos enzimas están implicados. Así, las diamino oxidasas juegan un papel importante en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos, cicatrización de la herida, desarrollo vascular, síntesis de alcaloides, fragancia y sabor de la fruta, producción de NO (óxido nitroso) y ROS (especies reactivas de oxígeno), moléculas implicadas en las respuestas de defensa de la planta (Tavladoraki et al., 2016).

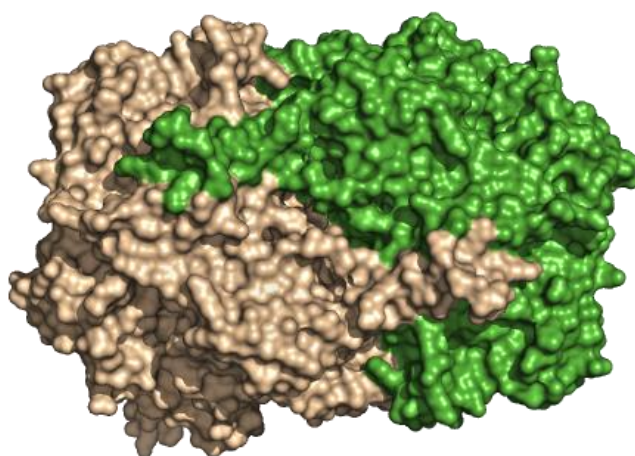


Figura 2: Modelo de la estructura 3D de la diamino oxidasa de soja. Cada color representa la superficie de una de las subunidades que forma el homodímero. Imagen realizada con Pymol (Schrödinger LLC, 2015).

Desde un punto de vista más estructural, la proteína DAO presenta un péptido señal en el extremo N-terminal, que provocará una localización cloroplástica o plastidial predominante (Tabla 5). Por otra parte, se organiza en homodímeros, teniendo dos partes de la estructura que actúan a modo de brazos que se prolongan hasta el otro dominio, cerrando de esta manera el centro activo (son necesarios los dos monómeros de DAO para que la proteína sea funcional). Véase Figura 2.

Las aplicaciones biotecnológicas de las DAO son varias, como la administración de DAOs a pacientes con intolerancia a la histamina, reduciendo las molestias (Sánchez-Pérez et al., 2018); síntesis enzimática de aldehídos, para su aplicación industrial en síntesis de resinas, colorantes, fragancias; biosensor de aminas biogénicas, entre otras. La opción que suscita mayor interés en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza es la última, la utilización de la DAO como biosensor, en concreto de putrescina y cadaverina. Este sensor biológico tendría aplicaciones en la industria alimenticia, al poder medir de manera cuantitativa, o semicuantitativa, el nivel de putrefacción que presenta un alimento.

Resultados preliminares de actividad enzimática DAO llevados a cabo en extractos de plantas etioladas de soja sugieren que las DAO de soja presentan una mayor afinidad por sustratos de tipo cadaverina que frente a putrescina. Estas diferencias no han sido observadas en otras especies vegetales como el guisante (Medda et al., 1995). Por tanto, es plausible el uso de las DAO de soja para la creación del biosensor. Sin embargo, previamente al desarrollo de DAO recombinante es necesario caracterizar desde el punto de vista genético las DAO de soja e investigar las bases moleculares que pudiesen explicar esas diferencias en afinidad por sustrato y que pudiesen ser utilizadas para el diseño de dianas biotecnológicas específicas.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Análisis bioinformático

3.1.1.- Obtención de las secuencias de los genes que codifican las diamino oxidasas de soja (*GmDAOs*)

Este trabajo se ha basado en 6 genes que codifican diamino oxidasas en tejidos de soja. Dichas secuencias se obtuvieron a partir de la base de datos Phytozome (Goodstein et al., 2012), en donde se utilizó la búsqueda de similitud por BLASTP (BLAST realizado para las secuencias de aminoácidos) directamente en la especie vegetal *Glycine max* Williams 82 (*Glycine max* Wm82.a6.v1) con la matriz de comparación BLOSUM62. Para ello, se utilizó como cebador una secuencia de DAO de soja procedente del código de acceso de NCBI ('National Center for Biotechnology Information') KRH02147.1.

Se hizo un filtrado de los resultados, donde se tuvo en cuenta como criterio básico no utilizar secuencias con un porcentaje de identidad menor al 50%, debido a que un menor porcentaje puede llevar a que aparezcan secuencias con dominios similares, pero que en realidad no sean diamino oxidasas. De esta manera, se pudieron identificar 6 secuencias codificantes para DAO, las cuales van a ser referidas como *GmDAO1* hasta *GmDAO6*.

3.1.2.- Alineamiento de secuencias de las *GmDAO*

A partir de los datos obtenidos, se realizaron dos alineamientos, uno para la secuencia de nucleótidos, en concreto la secuencia de CDS (región codificadora), eliminando las regiones

intrónicas, y un alineamiento de la secuencia de proteína. Los alineamientos se hicieron mediante Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2018) en el caso de las secuencias proteicas, y ClustalW (Larkin et al., 2007) para la secuencia genómica de las diamino oxidasas.

A partir de los datos obtenidos del alineamiento, se realizó una matriz de identidad entre los genes *GmDAO*. La matriz de identidad es una representación en la que se compara, de manera porcentual, el grado de similitud entre dos secuencias, utilizando datos de alineamiento. Se utilizó para ello la base de datos Uniprot.

3.1.3.- Análisis filogenético

Este trabajo presenta dos árboles filogenéticos: uno frente a las secuencias proteicas de las DAO de soja y otro que incorpora los datos del anterior, pero añadiendo amino oxidasas de otras especies.

En el caso del primer árbol, se partió de los datos genéticos obtenidos en Phytozome (Goodstein et al., 2012), en los cuales se realizó un alineamiento para su posterior construcción filogenética. En cuanto al segundo árbol filogenético, se diseñó en base a una secuencia proteica que se utilizó como cebador, en concreto se trata de la diamino oxidasa de soja (*Glycine max*), o *GmDAO1*, con código de Uniprot I1MRA7. A partir de este dato, se realizó una búsqueda por BLAST ('Basic Local Alignment Search Tool') con la base de datos de Uniprot (Bateman et al., 2023) de proteínas que presentasen cierta nivel de parentesco.

Por último, ambos árboles se realizaron a partir del programa bioinformático MEGA11 (Tamura et al., 2021). Los árboles se construyeron con el método estadístico de máxima verosimilitud, con un Bootstrap de 500 y el método de sustitución de Jones-Taylor-Thornton (JJT).

3.1.4.- Bases de datos de expresiones de genes y abundancia proteica

Además de las bases de datos que contienen información sobre la proteína, como Uniprot (Bateman et al., 2023), y del genoma, como GenBank, Gramene o Phytozome para plantas (Benson et al., 2013; Goodstein et al., 2012; Tello-Ruiz et al., 2022), existen otras bases de datos que recaban información de carácter ómico. Este es el caso de datos de transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc. En el caso de este trabajo, se utilizó una base de datos relacionada con la expresión de genes, eFPBrowser.

eFP Browser (Winter et al., 2007) es un servicio creado por la entidad BAR ('the Bio-Analytic Resource for Plant Biology'), de la universidad de Toronto. Se utilizó la variante eFP Plants, la cual se conecta a una variedad de páginas web relacionadas con la interactómica y transcriptómica, mostrando los datos de una manera visual. Se introdujeron las secuencias de las DAO para ver si esta base de datos proporcionaba información de diferencias de expresión según el tejido de la planta.

3.2.- Trabajo experimental

3.2.1.- Cultivo de plantas etioladas de soja

Se sembraron semillas de soja (*Glycine max* L. Williams) en una bandeja utilizando una mezcla de perlita/vermiculita al 50% durante dos semanas. Las plantulitas fueron cubiertas durante su germinación con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz (plantas etioladas). Al final de su crecimiento, ya mostraban un tallo alargado y las primeras hojas verdaderas, las cuales podían estar parcialmente tapadas por el cotiledón o tegumento, o estar totalmente abiertas, además de una raíz con pocas ramificaciones. Ejemplo de esta descripción es la Figura 3.

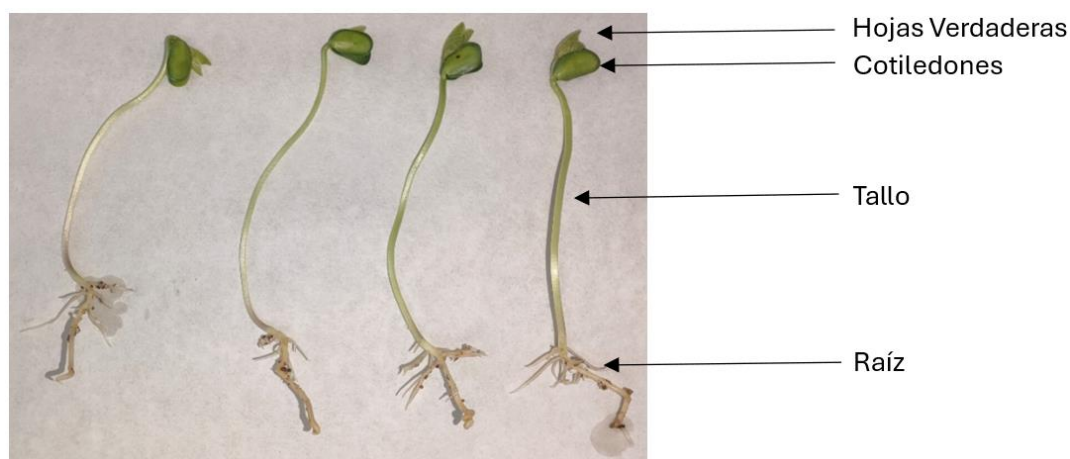


Figura 3: Plántulas etioladas de soja (*Glycine max*) tras ser retiradas de la tierra. Las flechas indican los diferentes tejidos que se utilizaron en el proyecto.

Estas plantas etioladas son las utilizadas para la obtención de extractos a los que se determina la actividad DAO.

3.2.2.- Extracción y conservación de los diferentes tejidos

La finalidad de este trabajo es observar las diferencias de expresión de las DAO entre los tejidos de la planta, por lo cual es necesario una correcta separación de los mismos. Una vez eliminados los restos de perlita/vermiculita presentes en la raíz, se cortó la raíz, se separaron los cotiledones y se cortaron las hojas verdaderas, dejando el tallo libre de otro tejido. Cada tejido se guardó en un papel de aluminio debidamente marcado, sumergido en un tanque que contenía nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C hasta su uso posterior.

3.2.3.- Aislamiento de ácido ribonucleico (ARN)

Extraer ARN de alta calidad a partir de plantas puede suponer un desafío importante si lo comparamos con otras especies en las que no es posible el uso de kits comerciales. Esto es debido a que el tejido vegetal contiene polifenoles y otros compuestos que, durante la extracción, se pueden adherir al RNA y precipitar con ellos. De esta manera, en este trabajo, se intentaron columnas de purificación (kit RNeasy de QIAGEN), pero se llegó a la conclusión, a partir de ensayo y error, que los métodos idóneos para el aislamiento de RNA son los basados en trizol (o TRIzol, tiocianato de guanidinio) y los basados en CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

3.2.3.1.- Método del trizol

El protocolo del TRIzol es comúnmente usado para el aislamiento de ARN total en muestras vegetales, sobre todo de tejido verde (hojas). En este caso, se utilizaron 0,2 g de tejido congelado,

el cual se trituró con un mortero hasta formar un polvo blanquecino fino, añadiendo de vez en cuando nitrógeno líquido para mantener el tejido congelado y, por tanto, la actividad de determinadas enzimas como las RNasas controlada. Las muestras se transfieren a tubos eppendorf de 2 ml, en los cuales se añadió 1 ml de trizol por cada 100 mg de tejido molido. Se agitó con vortex durante 15 s para que homogenice bien y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, por cada ml de trizol, se añadieron 200 µl de cloroformo. Se agitó de nuevo con vortex y la muestra se incubó a Tª ambiente durante 2 min. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 10000 rpm, 15 minutos y 4 °C (Beckman Allegra™ 21R). Esta centrifugación provocó la separación de dos capas o fases: una acuosa, la de interés, y una orgánica, conteniendo material contaminante (proteínas, azúcares, etc.). Se recuperó la fase acuosa y se añadió 500 µl de isopropanol, incubándose durante la noche a -20 °C.

Tras esta incubación a la que se añadió 500 µl de isopropanol, dejándose incubar durante la noche a -20 °C, la muestra se centrifugó a 12000 rpm, 30 minutos y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y manteniendo el pellet, conteniendo el ARN. Este pellet fue lavado con 400 µl de etanol 75% + DEPC (dietil pirocarbonato, reduce el riesgo que el ARN se degrade por la acción de las RNasas). Se volvió a centrifugar durante 10 min con los mismos parámetros, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos al aire. Por último, la muestra se resuspendió suavemente con agua + DEPC (20-70 µl). Se detectó la concentración de ARN medible mediante la absorbancia 260/280 nm por NanoDrop. Se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en el nanodrop, utilizando un coeficiente de extinción de 40. Las muestras se almacenaron en el congelador de -80 °C para su posterior uso en la síntesis de cDNA.

3.2.3.2.- Método del CTAB

Este proceso se utiliza especialmente con material con alto contenido en albúmina o azúcares como la semilla, o tejido no fotosintético como la raíz. El protocolo es el descrito en (Claver et al., 2017).

Se parte de 0,3 g de una muestra de tejido vegetal, que fueron molidos en un mortero de cerámica aplicando nitrógeno líquido en intervalos para que la muestra se mantenga congelada. El polvo fino resultante se transfirió a tubos de 2 ml, donde se añadieron 500 µl de tampón CTAB (4% CTAB, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA pH8, 1,4 M NaCl y 1% PVP (polivinil pirrolidona)) previamente calentado (55 °C), junto a 10 µl de β-mercaptoetanol (0,28 M). Las muestras se mezclaron fuertemente con el vortex durante aproximadamente 1 minuto, lo suficiente como para que esté homogéneo. Seguidamente, se incubaron durante 15 minutos a 55 °C, favoreciendo la mezcla mediante inversión del tubo cada 5 min. Luego, se añadieron 500 µl de cloroformo:isoamil alcohol 24:1 (v/v), se mezclaron los líquidos por inversión durante dos minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Este paso provocó que la muestra se separe en dos fases: una fase orgánica donde se encontró el ARN y una fase orgánica donde se deposita el resto del contenido celular, ambas separadas por una interfase. Se dejaron en hielo durante 20 minutos para que las fases se diferencien y precipiten correctamente. A continuación, se extrajo la fase acuosa (capa superior) en un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 300 µl de cloroformo:isoamil alcohol 24:1. Se volvió a centrifugar durante 5 minutos, tras lo cual la muestra se incubó en hielo durante 10 min. Se recuperó de nuevo la fase acuosa en un nuevo tubo (tubo final), donde se mezcló con LiCl 4M y se dejó precipitar el ARN durante la noche.

En el segundo día, las muestras del día anterior se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El ARN pudo precipitar completamente a partir de este punto, por lo cual se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µl de LiCl 0,8 M, mezclando suavemente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 µl EtOH 70% + DEPC y se realizó una centrifugación adicional a 12000 rpm durante 5 min y a 4 °C para recoger todo el precipitado posible. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire durante 15 min. Por último, se resuspendió con cuidado el pellet con 30 µl de agua + DEPC estéril. Se almacenaron las muestras en el -80 °C para su posterior utilización.

3.2.4.- Obtención de cDNA por el método de Superscript III

La síntesis de cDNA se produce utilizando una enzima, la transcriptasa reversa, que es capaz de sintetizar una hebra simple de ADN utilizando ARN como molde y un cebador complementario en 3' que inicie la reacción.

El protocolo se divide en dos partes: tratamiento con DNasa y síntesis de cDNA propiamente dicha. En todas las muestras se decidió realizar el tratamiento de DNasas previo a la medición de ARN total por NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™), permitiendo un dosaje más preciso debido al empleo de la DNasa, ya que permite la eliminación del ADN genómico presente en la muestra. Para el tratamiento DNasa, se utilizaron 10 µl de ARN, los cuales se mezclaron con 1 µl de DNasa (Roche) y 2,5 µl de agua DEPC. Se incubó a 37 °C durante 20 minutos y se inactivó la DNasa mediante 0,6 µl EDTA 0,2 M y 10 min de incubación a 75 °C. Por último, se recogió la muestra mediante microcentrífuga (Eppendorf miniSpin) y se pudo cuantificar el ARN total.

Para la segunda parte del protocolo, en la que se lleva a cabo la síntesis de cDNA propiamente dicha, se partió de 5 µg de ARN en un volumen inicial de 9 µl, por lo que se calculó la cantidad necesaria de muestra para alcanzar ese valor con los datos de absorbancia del NanoDrop. Luego, se añadió 1 µl de oligodT (T₂₀) 50 µM y 1 µl de dNTPs 10 mM (Biotools) y se incubó durante 5 min a 65 °C para que el cebador se una correctamente (annealing). Seguidamente, se puso en hielo 10 min (evitar estructuras secundarias del ARN) y se recogió por spin (homogeneizado). A continuación, se añadió a la muestra 4 µl de 'First strand buffer' (Biotools), 1 µl DTT, 1 µl RNasa OUT (Invitrogen™) y 1 µl de la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen™). La síntesis de cDNA se produjo a 50 °C, durante 50 minutos. Se inactivó la transcriptasa reversa por calor durante 5 min a 85 °C. Se incubó en hielo 2 min, se recogió por spin de microcentrífuga y se añadió 1 µl de RNasa H (Thermo Scientific™) para eliminar el ARN de la reacción, incubando la muestra a 37 °C, 20 minutos. Tras esto, la muestra se guardó en el congelador de -20 °C hasta su uso.

3.2.5.- Análisis de expresión génica mediante RT-PCR

La técnica de RT-PCR, permite estudiar la expresión génica a partir de la amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos del gen diana, y cDNA obtenido a partir de ARN total como molde. La representatividad de cada gen es proporcional a los niveles de transcrito (ARNm) en el tejido original.

En todas las muestras se han utilizado estas proporciones para realizar la PCR, a excepción de la PCR con los cebadores de DAO5 y DAO6 dado que, al usarse un primer reverso común para ambas secuencias, es necesario aumentar la cantidad utilizada. En esos casos, se empleó 3 µl en vez de 2 µl. Las cantidades utilizadas se muestran en la Tabla 1.

| Volumen utilizado para realizar la PCR (μl) | | | | | | | | |
|---|---------------|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|--------------------------------|------------|
| cDNA | Tampón x10 | MgCl ₂ (50 mM) | dNTPs (10 mM) | Cebador directo (10μM) | Cebador reverso (10μM) | H ₂ O | Taq polimerasa (5U/10μl) | Vol. total |
| 3,5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5,5 | 1 | 20 |

Tabla 1: Cantidades utilizadas en un experimento tipo de PCR de este trabajo

Los cebadores empleados se muestran en la **Tabla 2**.

| Gen | Cebador | Secuencia 5'→3' | Tm (°C) |
|-----------------|----------|---------------------------|---------|
| GmDAO1 | F_DAO1 | GTTGTCTCTGTAACACCACTG | 47 |
| | R_DAO1 | GTATAATGCCACCGTCGTGA | 47 |
| GmDAO2 | F_DAO2 | CCTTCTCTCCCCGCGAAACGT | 53 |
| | R_DAO2 | CGGAGAAGGTGGTGCAAGC | 50 |
| GmDAO4 | F_DAO4 | CATATTTTGACAGCAAGATTGTTG | 45 |
| | R_DAO4 | ACTTGATGTTGGGTCCATG | 44 |
| GmDAO5 | F_DAO5 | TACACTGTTCTCAATCCTCATG | 46 |
| | R_DAO5/6 | GCATAGGGTATCCATTTCCTTC | 48 |
| GmDAO6 | F_DAO6 | GCAGCCGTTGGCCCATTGCAACTGA | 58 |
| | R_DAO5/6 | GCATAGGGTATCCATTTCCTTC | 48 |
| GmActina | GmACTF | ATTGTAGGTCGTCCTCGTC | 46 |
| | GmACTR | TTGCATAAAGTGAAAGAACAG | 41 |
| 18SADNr | 18SADNrF | AGCCTGCGGCTTAATTTGAC | 52 |
| | 18sADNrR | CAACTAAGAACGGCCATGCA | 52 |

Tabla 2: Cebadores y condiciones utilizadas para la PCR

La actina y el 18SADNr son genes ‘housekeeping’, los cuales son considerados estables y cuya expresión no varía entre tejidos o entre tratamientos. En el caso de las rampas de temperatura, se siguió este esquema general:

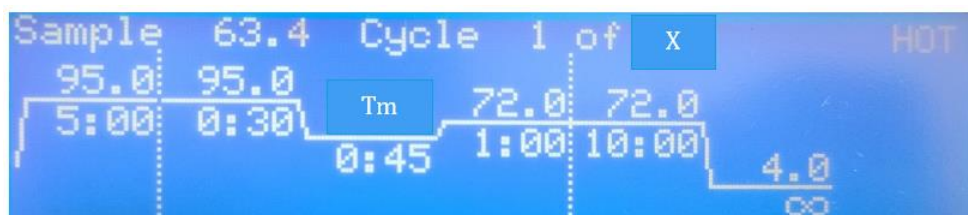


Figura 4: Esquema de ciclos del termociclador seguidos para realizar la PCR

Las únicas variaciones que se hicieron en cada PCR fueron la Tm utilizada, ya que depende de los cebadores utilizados.

3.2.6.- Electroforesis en gel de agarosa de ácidos nucleicos

Para poder observar los ácidos nucleicos de una muestra, es necesario realizar técnicas de visualizado. Entre ellas, la más empleada es la electroforesis en gel. Este método se empleó para el análisis de los productos de la PCR y comprobar la presencia e integridad del ARN antes de realizar el cDNA.

Para empezar, se utilizaron 50 ml de tampón TBE 1x (Tris-HCl 90 mM, pH 8, H₃BO₃ 90 mM y EDTA 2 mM) y se pesó agarosa (1,5%) en el granatario. Luego, se añadieron 4 µl de SYBR® safe (Invitrogen) y se dejó polimerizar a temperatura ambiente en un molde.

El tratamiento de las muestras previo a la electroforesis es distinto según si se trata de ARN o ADN. En el primer caso, a 1 µl de RNA, se le añadió 5 µl de formamida 5% y 4 µl de agua ultrapura (milliQ). Se calentó durante 10 min a 55 °C y se pudo añadir directamente al gel tras esperar el tiempo requerido. Para muestras de ADN, se partió de 20 µl, a los cuales se les añadió 5 µl de tampón de carga (0,025 g Orange G, 3 ml glicerol y 7 ml de H₂O milliQ). Por último, se cargó todo el volumen (20 µl) en el gel.

Las muestras preparadas se cargaron una por pocillo, al lado de ellas se situó un marcador de peso molecular, GeneRuler DNA Ladder mix (Thermo Scientific™), cargando 4 µl. Los geles se introdujeron en cámaras de electroforesis y se dejaron migrar durante 20 minutos aproximadamente, con un voltaje de 100 V, una corriente de 80 mA y una potencia de 50 W. Por último, se visualizó mediante ultravioleta del equipo ‘Bio-Rad Universal Hood II’.

4.- Resultados y discusión

4.1.- Caracterización genética de las diamino oxidasas de soja

Según el criterio descrito en el apartado 3.1.1., hemos localizado 6 genes *DAO* en el genoma de soja. Cada secuencia se localizó en distintas regiones cromosómicas y en distintos cromosomas. Las secuencias de los diferentes genes *GmDAO* en soja presentaban una serie de características similares. Todos ellos codifican para proteínas de tamaño muy similar (673-678 aminoácidos) con secuencias codificantes también muy similares, superiores a los 2 kb (Tabla 3). Se trata por tanto de proteínas relativamente grandes. En todos los casos las secuencias genómicas contenían intrones en un número variable (4-5 intrones en cada secuencia; Figura 5). Debido a la presencia de secuencias intrónicas en la secuencia genómica, el análisis genómico mostró la posibilidad de que en algunas de las isoformas de *GmDAO* pudiesen existir variantes de “splicing”. Es el caso del gen *GmDAO1* (2 variantes de splicing), *GmDAO3* (1 variante de splicing), o *GmDAO5* (2 variantes de splicing). Estas variantes de splicing son muy frecuentes en soja y pueden dar lugar a formas truncadas de las proteínas que pueden presentar diferente actividad o localización subcelular (Román et al., 2012).

Otro aspecto interesante derivado del estudio de las secuencias genómicas de los genes *GmDAO* es la disposición cromosómica de los mismos. Así, en el cromosoma 20, encontramos las secuencias de las *GmDAO4*, *GmDAO5* y *GmDAO6* en configuración de tándem (véase Tabla 3). Esta estructura en tándem sugiere la posible existencia de una unidad de expresión funcional, de tipo policistónico, que sugiere, a priori, un sistema de regulación de esos tres genes diferente del de *GmDAO1*, *GmDAO2* y *GmDAO3*.

| Nombre | Código de acceso | Localización cromosómica | Secuencia codificante (pb) | Secuencia peptídica (aa.) |
|----------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>GmDAO1</i> | KRH02147.1 | Gm17:1445647...1448780 (+) | 2025 | 675 |

| | | | | |
|---------------|------------|---------------------------------|------|-----|
| GmDAO2 | KRH75095.1 | Gm01:8695401...8702097 (+) | 2019 | 673 |
| GmDAO3 | KRH70957.2 | Gm02:11606465...11613342 (+) | 2034 | 678 |
| GmDAO4 | KRG91282.1 | Gm20:38350993...38354540 (+) | 2028 | 676 |
| GmDAO5 | KRG91283.1 | Gm20:38357144...38362272 (+) | 2028 | 676 |
| GmDAO6 | KRG91286.1 | Gm20:38368693...38372734 (+) | 2034 | 678 |

Tabla 3: Características generales de las diamino oxidasas de soja.

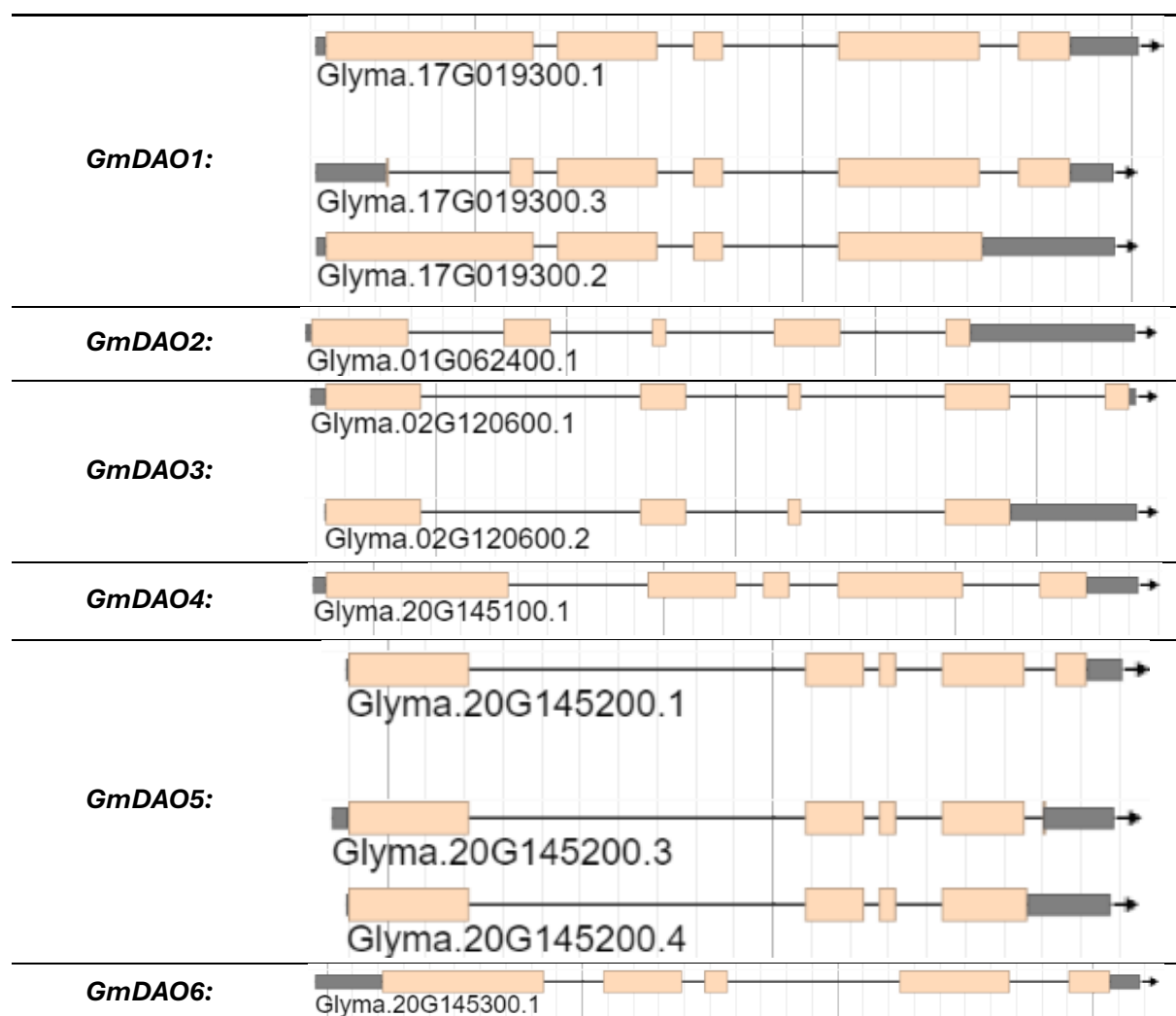


Figura 5: Estructura genómica de las secuencias de los genes GmDAO. Se indica el número de acceso de cada gen, su localización cromosómica y la distribución de exones (rectángulos) e intrones (líneas) en cada secuencia. En aquellos casos en los que el análisis genómico mostró al posible existencia de variantes de splicing, éstas se muestran para cada gen GmDAO.

4.2.- Alineamiento y matriz de identidad de las GmDAO

Como se puede observar en la Figura 6, las diamino oxidasas son proteínas remarcablemente similares, aun habiendo entre ellas diferencias significativas en el porcentaje de identidad. Entre los residuos, los más relevantes son aquellos que forman parte del sitio activo: el ácido aspártico (D335), que actúa como aceptor de protones, la tirosina (Y423), la cual es modificada a TPQ (topaquinona) y los residuos de histidina (H478, H480 y H640) los cuales forman una estructura piramidal junto al Cu y dos moléculas de agua (Kumar et al., 1996b).

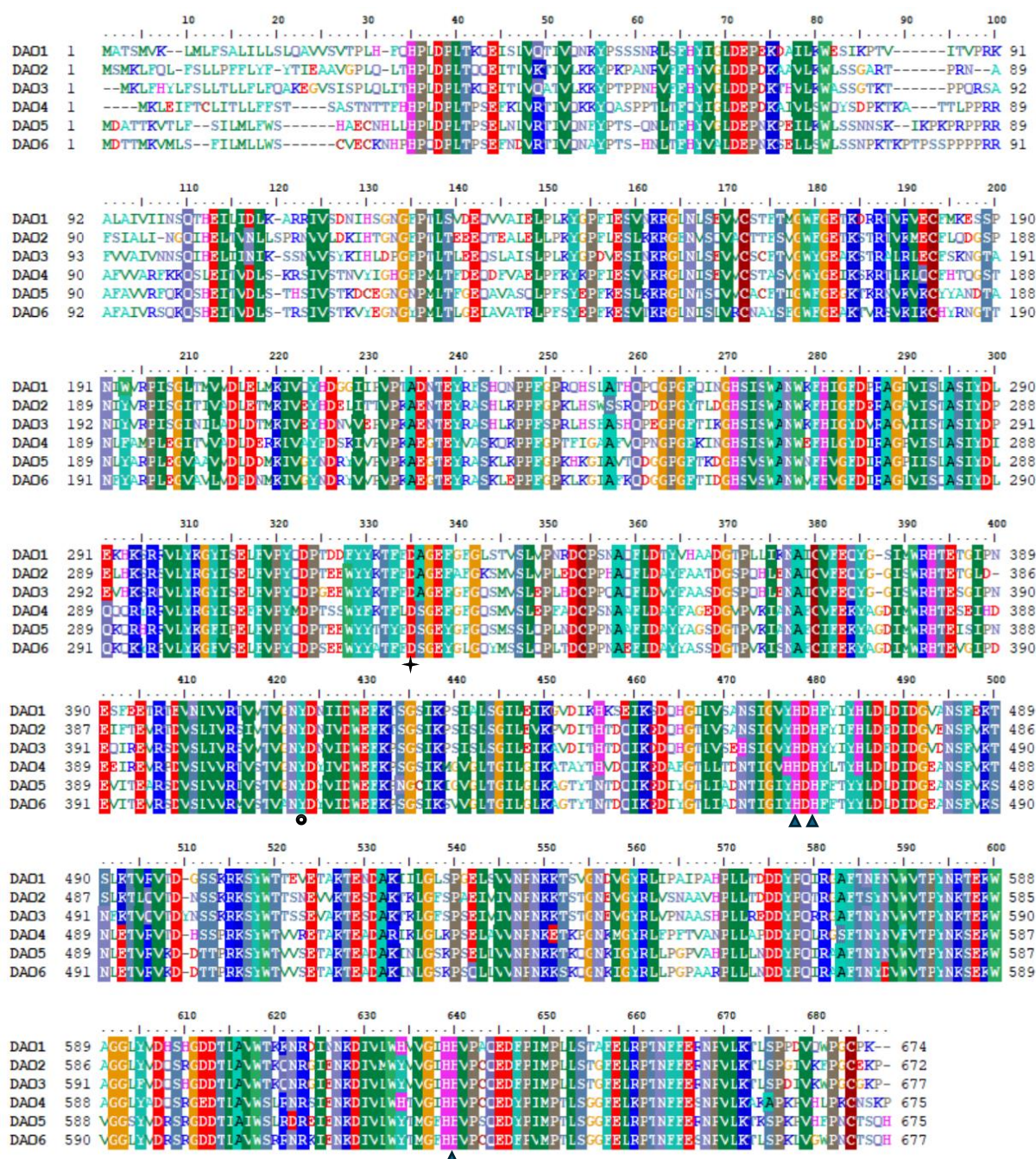


Figura 6: Alineamiento de secuencias proteicas de las DAO de soja. La estrella indica el residuo aceptor de protones ubicado en el centro activo, el círculo indica el residuo que se modifica postraduccionalmente a topaquinona (TPQ), la cual actúa como mediador de la reacción enzimática junto a la ayuda del cofactor de cobre y el aceptor de protones y los triángulos señalan los residuos por donde el Cu se une.

Analizando los residuos que rodean el ácido aspártico del centro catalítico, se encuentran diferencias entre las distintas diamino oxidasas. Primero, el aminoácido situado en la posición 331 del alineamiento (Figura 6), a excepción de *GmDAO5* y *GmDAO6*, es lisina (K331), aminoácido básico que tiene una cadena lateral larga. Mientras tanto, *GmDAO5* presentan en esa posición una treonina (T331), residuo polar nucleofílico y *GmDAO6* una alanina (A331), aminoácido apolar con una cadena lateral corta ($-\text{CH}_3$). Dicho residuo se sitúa cerca del cofactor, por lo que la disminución del tamaño de la cadena lateral implicaría un aumento del espacio libre y, por tanto, un aumento de las cavidades cercanas. Además, la lisina puede interaccionar con TPQ mediante un puente de hidrógeno, difícilmente realizable por los otros residuos. Por otra parte, el residuo anterior al ácido aspártico está bastante conservado, siendo este una fenilalanina (F334). Este dato no se cumple en el caso de *GmDAO4*, teniendo una leucina (L334). El cambio es de especial relevancia porque la cadena lateral pasa de ser un anillo aromático a ser un isobutilo, perdiendo las posibles interacciones de apilamiento (interacciones $\pi - \pi$) y ganando interacciones no covalentes hidrofóbicas. Por otra parte, el alto nivel de desorden localizado en el extremo N-terminal de las proteínas puede indicar la existencia de un péptido señal. Esto es confirmado mediante los datos de predicción proporcionados por Uniprot y estructuras tridimensionales de otras diamino oxidasas como la de guisante (Kumar et al., 1996b).

Los datos de alineamientos se suplementan con la matriz de identidad (Tabla 4). En ella, se puede observar que *GmDAO1* está muy distanciada, en lo que se refiere a porcentaje, de las demás DAO. Por otra parte, *GmDAO2* y *GmDAO3* no distan mucho, como se puede observar en el gradiente de colores. También es el caso de *GmDAO5* y *GmDAO6*.

| | <i>GmDAO1</i> | <i>GmDAO2</i> | <i>GmDAO3</i> | <i>GmDAO4</i> | <i>GmDAO5</i> | <i>GmDAO6</i> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>GmDAO1</i> | 100 | 68,16 | 68,01 | 60,06 | 58,35 | 57,89 |
| <i>GmDAO2</i> | 68,16 | 100 | 78,77 | 58,22 | 57,55 | 56,65 |
| <i>GmDAO3</i> | 68,01 | 78,77 | 100 | 59,55 | 58,17 | 58,32 |
| <i>GmDAO4</i> | 60,06 | 58,22 | 59,55 | 100 | 67,96 | 66,87 |
| <i>GmDAO5</i> | 58,35 | 57,55 | 58,17 | 67,96 | 100 | 83,11 |
| <i>GmDAO6</i> | 57,89 | 56,65 | 58,32 | 66,87 | 83,11 | 100 |

Tabla 4: Matriz de identidad de las diaminoxidasas de soja. Los datos se presentan en forma de porcentaje (%)

4.3.- Árbol filogenético

Con el fin de estudiar la similitud filogenética de las diamino oxidasas de soja (*GmDAO*), se construyeron dos árboles filogenéticos. El primer árbol muestra el alineamiento de las 6 secuencias proteicas de *GmDAO* de soja, utilizando Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2018) y FigTree (FigTree, n.d.). En el segundo árbol se utilizaron 14 secuencias proteicas de proteínas DAO alineadas mediante el método Clustal Omega, pertenecientes de 9 especies distintas, incluyendo soja (Figura 8). Los nombres y los números de acceso de cada uno son los siguientes: *Glycine max*; *GmDAO1* (KRH02147.1), *GmDAO2* (KRH75095.1), *GmDAO3* (KRH70957.2), *GmDAO4* (KRG91282.1), *GmDAO5* (KRG91283.1) y *GmDAO6* (KRG91286.1), *Cicer arietinum* (XP_004508349.1), *Trifolium subterraneum* (GAU41594.1), *Pisum sativum* (AAA62490.1), *Lens culinaris* (AAB34918.3), *Phaseolus vulgaris* (ESW26286.1), *Abrus precatorius* (XP_027332827.1), *Cajanus cajan* (KYP58168.1) y *Vigna radiata var. Radiata* (XP_014490689.1).

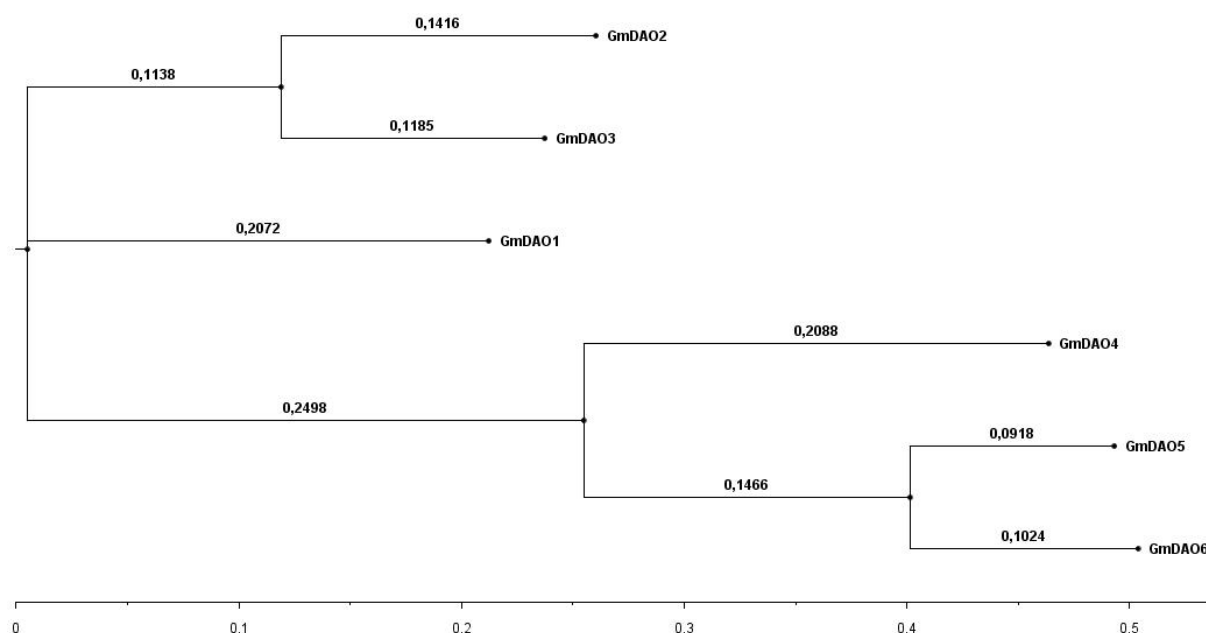


Figura 7: Árbol filogenético de las DAO de soja.

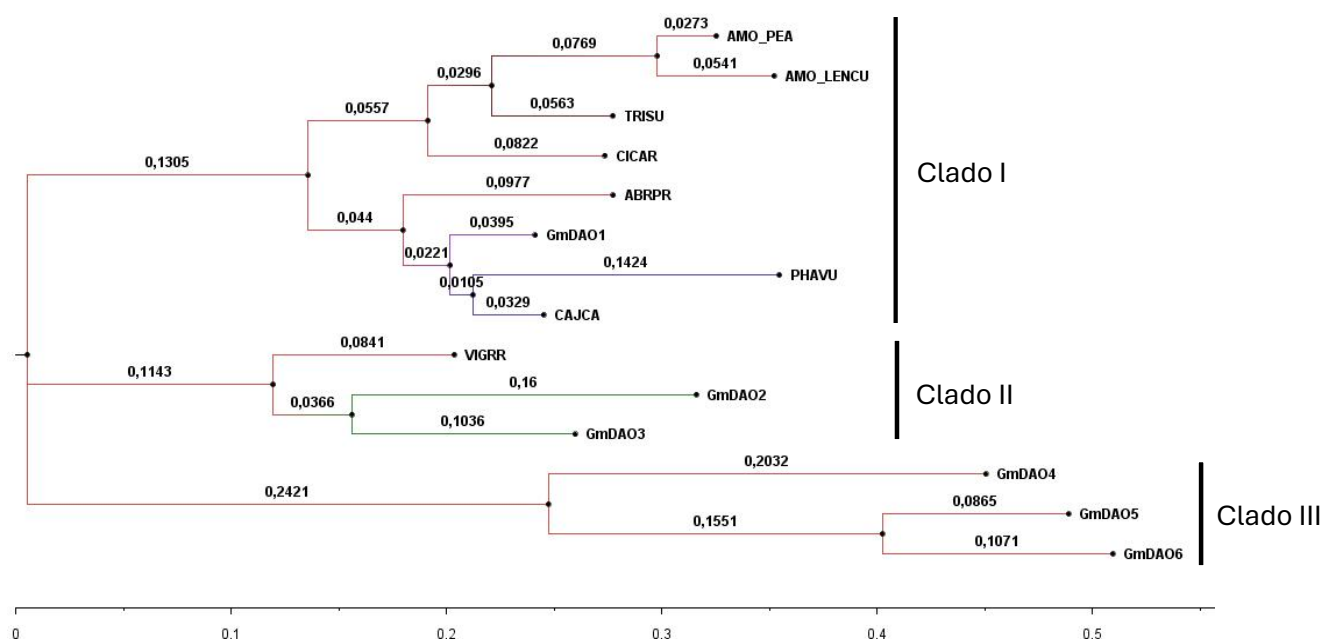


Figura 8: Árbol filogenético de las amino oxidasas en plantas. Los colores se realizaron con el gradiente de color por Bootstrap.

Tal y como se puede observar en el árbol filogenético (Figura 7), las diamino oxidasas de soja se organizan en distintos clados. El primer clado está compuesto por *GmDAO2* y *GmDAO3*, el segundo clado por *GmDAO1* y el tercer clado por *GmDAO4*, *GmDAO5* y *GmDAO6*. Esta distribución se sigue conservando en el árbol 2, cuando se incluyen secuencias DAO de otras especies (Figura 8), estando la *GmDAO1* en el clado 1, cerca de la amino oxidasa de *Phaseolus vulgaris* y de *Cajanus cajan*; *GmDAO2* y *GmDAO3* en el segundo clado, junto con la DAO de *Vigna radiata* y, por último, *GmDAO4*, *GmDAO5* y *GmDAO6* en el clado 3, separados de demás secuencias. La distribución de las secuencias proteicas de *Glycine max* es la esperada, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la matriz de identidad (Tabla 4). Por otra parte, los datos de alineamiento (Figura 6) muestran que, aun habiendo dichas diferencias, las secuencias

presentan regiones con alta conservación. Esto puede ser debido a que residuos implicados en la actividad del enzima, tales como en la actividad oxidasa, residuos que promueven la formación de los homodímeros, conservación de su estructura tridimensional y zona de reconocimiento del péptido señal, están muy conservados.

4.4.- Expresión de las diamino oxidasas de soja en plantas etioladas

La expresión se observó mediante RT-PCR a partir de cDNA de cada tejido, utilizando ARN total como molde. Se realizó la amplificación con cebadores, directos y reversos, de *GmDAO1*, *GmDAO2*, *GmDAO4*, *GmDAO5* y *GmDAO6*. No se pudo encontrar unos buenos cebadores específicos para *GmDAO3*. Por otra parte, se utilizó el mismo cebador reverso para la *GmDAO5* y para la *GmDAO6* (similitud de secuencia), pero cebadores directos específicos de cada uno.

Tras el aislamiento, se observó la integridad y estado del ARN total mediante un gel de agarosa, donde se podían observar dos bandas predominantes, los ARN ribosómicos 28S (banda superior) y el 18S (banda inferior), característicos de las células eucariotas. En el caso de que en la electroforesis se mostrase un gradiente, o lo que se suele denominar como ‘smear’, sería indicativo de degradación del ARN, dejando inservible la muestra para la síntesis de cDNA.

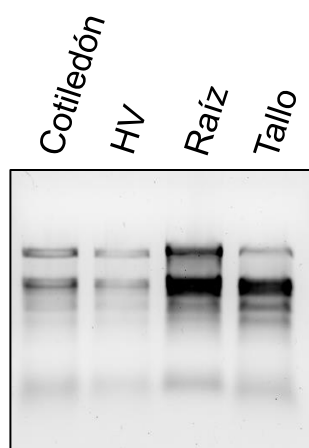


Figura 9: Gel de ARN total de los diferentes tejidos de soja. La banda superior corresponde al ARN ribosómico 28S y la banda inferior al ARN ribosómico 18S.

Según los resultados obtenidos (Figura 9), se obtuvo un buen ARN, observando dos bandas claras indicativas de la presencia del ARN más abundante, el ribosómico y ausencia de degradaciones.

Tras el aislamiento del ARN total se procedió a la obtención del ADN complementario (cDNA) a partir del ARN mensajero según el protocolo descrito en el apartado 3.2.4. de metodología. Tras la obtención del cDNA se realizó una primera RT-PCR con sendos genes control o “housekeeping”. Por definición la expresión de estos genes control o “housekeeping” debe ser estable y no variar en los tejidos o en las condiciones del experimento a analizar. Los resultados mostraron expresión de ambos genes control *18SrDNA* (que codifica el 18S rRNA ribosómico) y *ACTINA* (que codifica la proteína actina, que forma parte del citoesqueleto y es una proteína abundante y estable). En estudios de expresión que utilizan la metodología de PCR, tanto RT-PCR como qPCR, es aconsejable la utilización de al menos dos genes control que permitan analizar de forma adecuada la expresión de nuestros genes diana. Tal y como se observa en la Figura 10, ambos genes control mostraron expresión en todos los tejidos analizados.

A continuación, analizamos la expresión mediante RT-PCR de los genes *GmDAO* identificados a nivel genómico con la excepción del gen *GmDAO3* para el que no pudimos diseñar cebadores específicos. Los resultados se muestran en la Figura 10. Se obtuvieron 7 amplicones, con las siguientes longitudes: 627 pb para *GmDAO1*, 278 pb para *GmDAO2*, 313 pb para *GmDAO4*, 389 pb para *GmDAO5* y *GmDAO6*, 332 pb para la *GmACTINA* y 120 pb para el *18SrDNA*.

En el caso de los genes de la diamino oxidasas (*GmDAO*) de *Glycine max* analizados, los resultados de expresión mostraron patrones específicos de expresión en los diferentes tejidos dependiendo del gen analizado. Así, *GmDAO1* y *GmDAO2* mostraron un alto nivel de expresión en tejidos fotosintéticos (o tejido verde): las hojas verdaderas y los tallos. Cabe destacar que en el caso de *GmDAO1*, su expresión era similar, mientras que para *GmDAO2*, la expresión en hojas era muy alta mientras que en tallos los niveles de mRNA eran más bajos (Figura 10). Por el contrario, *GmDAO4* fue la única diamino oxidasa cuya expresión se detectó en la raíz (Figura 10). Curiosamente, *GmDAO4* no mostró expresión en hojas o tallos como se observó para *GmDAO1* y *GmDAO2*. En la RT-PCR de *GmDAO4* se observaron productos de amplificación tanto en cotiledones como en hojas, pero sin un tamaño preciso (Figura 10). Esto podría deberse a una amplificación inespecífica de los cebadores o a la presencia de formas de “splicing” alternativo que, sin embargo, no eran detectadas en el estudio genómico (Figura 5). Los resultados obtenidos con *GmDAO5* resultaron interesantes, ya que a diferencia de *GmDAO1* o *GmDAO2*, se detectó una expresión abundante en el cotiledón o tegumento (Figura 10), siendo el único gen *GmDAO* con expresión inequívoca en este tejido. Por último, no detectamos expresión significativa del gen *GmDAO6* en las condiciones experimentales de este trabajo lo que sugeriría una menor expresión de este gen en comparación con el resto.

En definitiva, *GmDAO1*, *GmDAO2*, *GmDAO4* y *GmDAO6* mostraron un patrón diferente de expresión en cada tejido analizado.

Los genes *GmDAO1*, *GmDAO2* y *GmDAO5* mostraron expresión en hojas. Un dato que apoyaría la importancia de estos genes en este tejido es la presencia de un péptido señal en estos genes con localización plastidial. Esta hipótesis se corroboró con la herramienta de predicción de localización subcelular WolfPsort (Horton et al., 2007). La mayor parte de las diamino oxidasas mostraron una localización preferencialmente como proteínas del cloroplasto o plastidiales, a excepción de *GmDAO1* y *GmDAO6*, que mostraron una localización preferencialmente en el citoplasma y en la vacuola, respectivamente. Estos datos son informativos y no son definitivos, al provenir de predicciones, pero pueden ayudar a interpretar los resultados de expresión.

| | Nivel de predicción de la localización subcelular (cuanto mayor número, mejor) | | | | | | |
|----------------------|--|------------|---------|--------|------|--------------|--------------|
| | Cloroplasto | Citoplasma | Vacuola | Núcleo | R.E. | Extracelular | Mitocondrial |
| <i>GmDAO1</i> | 1 | 4 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| <i>GmDAO2</i> | 7 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>GmDAO3</i> | 5 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>GmDAO4</i> | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| <i>GmDAO5</i> | 7 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| <i>GmDAO6</i> | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 |

Tabla 5: Datos de predicción de localización subcelular de las diamino oxidasas de soja según su secuencia proteica. Se realizó mediante WolfPsort. Números en negrita son aquellos con mayor probabilidad.

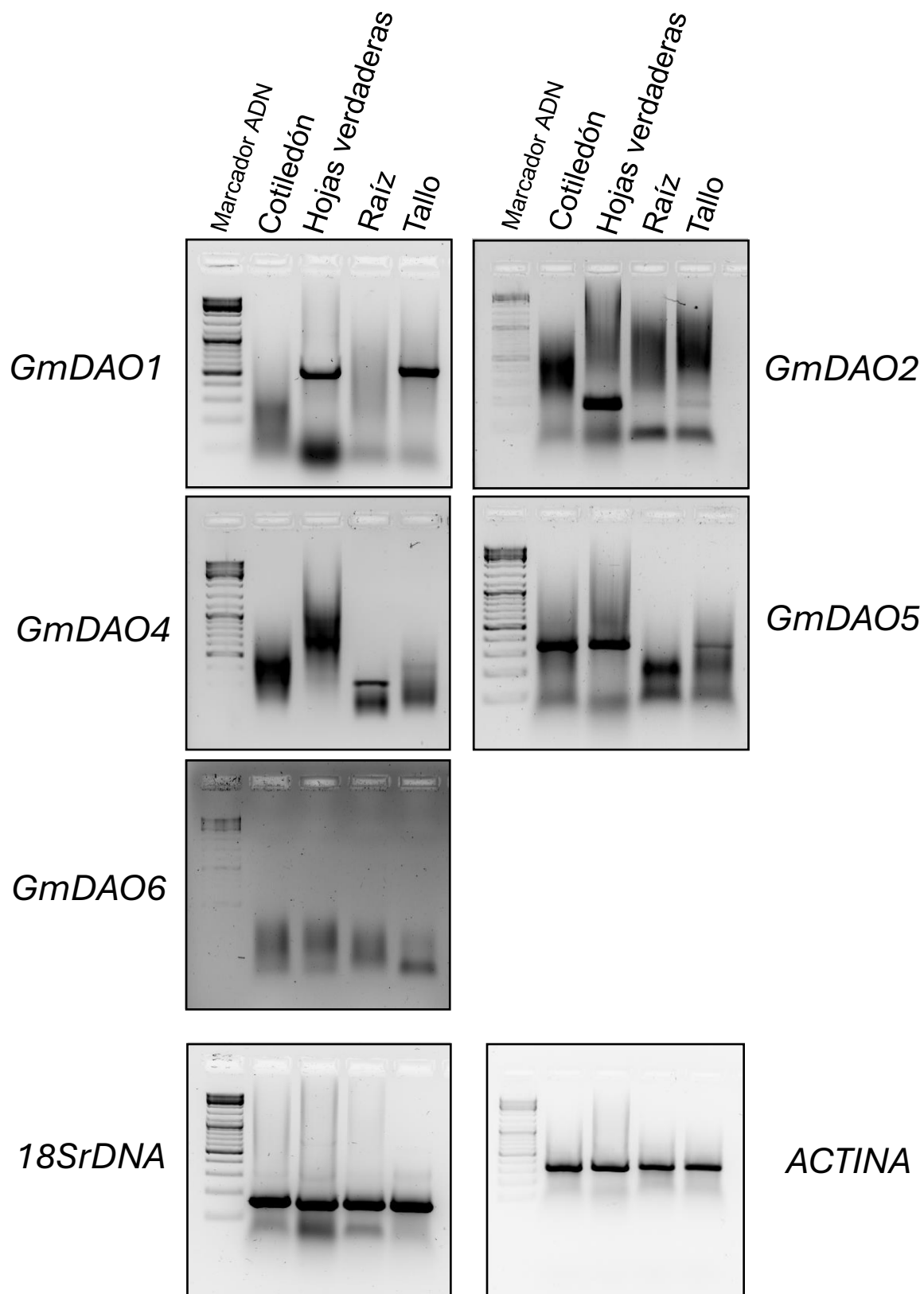


Figura 10: Niveles de expresión de los genes diamino oxidasa de soja según el tejido. En cada gel se analizó 1 gen DAO, seguido de un marcador de peso molecular (GeneRuler).

En definitiva, los resultados de expresión sugieren que las diamino oxidasas en soja forman un sistema biológico complejo en el cual un tejido expresa diferentes DAO y que, seguramente, tengan controles de regulación distintos. Se producirá sobre todo en los cotiledones, ya que esta estructura tiene un sistema de regulación de la transcripción muy alejado de los otros tejidos, debido a su parentesco con la semilla.

Por otra parte, la comparación de estos resultados con las medidas de actividad de extractos de la parte aérea de soja sugiere la necesidad de llevar a cabo medidas de actividad específicas para cada tejido de forma individualizada (y no a partir de la mezcla de hojas, tallos y cotiledones utilizada actualmente) que podrían permitir analizar de forma más precisa, la diferente afinidad para putrescina y cadaverina identificada en esos extractos.

También, al observar los niveles de expresión de los diferentes genes *GmDAO* en tejido fotosintético de la planta, sería interesante la obtención de muestras de tejidos de soja crecidos en luz, pudiendo recabar incluso más información e incluso poder diseñar un protocolo de enriquecimiento de diamino oxidasas si la abundancia de ellas es lo suficientemente alta, sin necesidad de realizar una aproximación mediante tecnologías recombinantes.

4.5.- Análisis bioinformático de la expresión de los genes *GmDAO* en plantas de soja

Los datos de expresión se obtuvieron gracias a eFP Browser (Winter et al., 2007), brindando un aspecto visual a los resultados de los experimentos ómicos. Las *GmDAO* que se han podido encontrar han sido las siguientes: *GmDAO1*, *GmDAO2*, *GmDAO3* y *GmDAO6*. Hay que tener en cuenta que este estudio se basa en datos transcriptómicos de plantas cultivadas en luz a madurez (producción de semilla) y, por tanto, los resultados no son comparables con los obtenidos por nosotros en plantas etioladas.

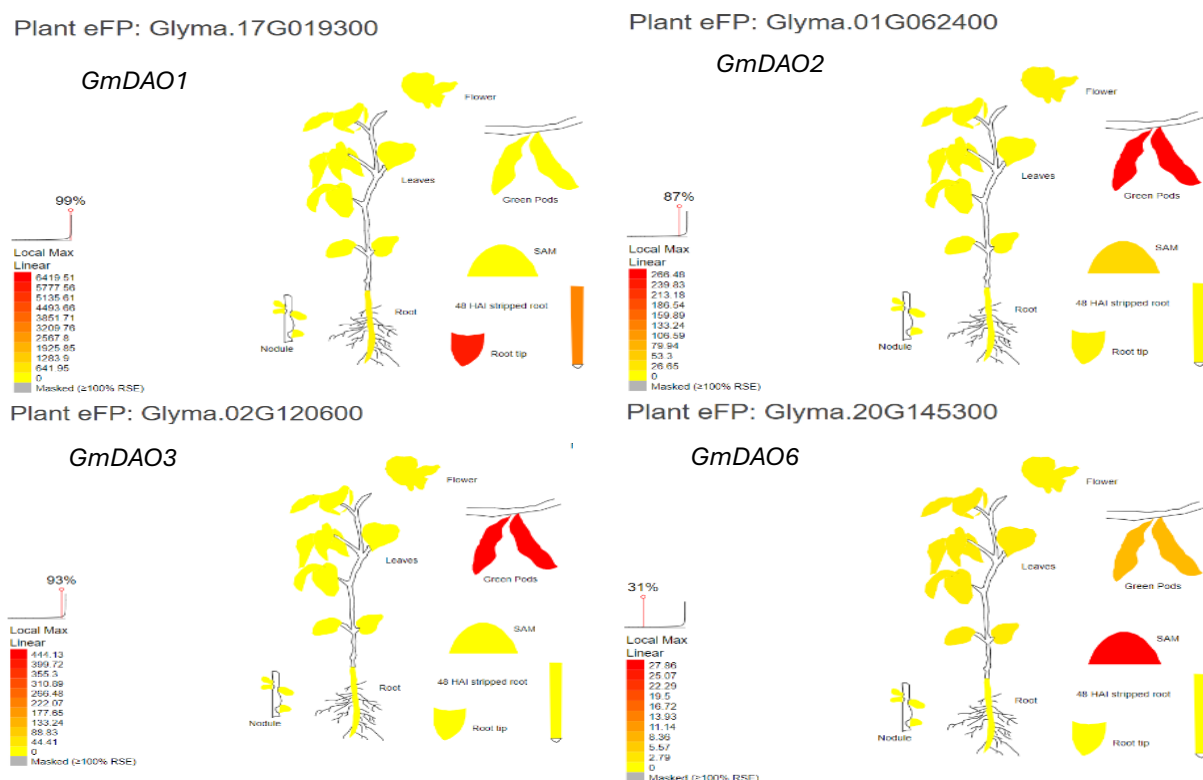


Figura 11: Representación visual de los datos de transcriptómica proporcionados por eFP Browser de soja (Waese et al., 2017). El gradiente de color está basado en la cantidad absoluta de datos sobre ese gen.

Observando la Figura 11, se pueden extraer dos resultados o conclusiones. La primera es que los genes *GmDAO* se expresan a niveles bajos en la planta de soja. Esto puede ser debido a que las DAO son enzimas que pueden estar más expresadas en situaciones de estrés, implicando un sistema de regulación fino. En cuanto a la segunda conclusión, es que no se aprecian diferencias en la expresión de los genes DAO entre los diferentes tejidos de plantas maduras de soja (raíces, tallos, hojas), con alguna diferencia en el caso de *GmDAO1* (mayor expresión en la punta de la raíz), y *GmDAO2*, *GmDAO4* y *GmDAO6* en las vainas de las semillas (Figura 11).

5.- Conclusiones

La soja (*Glycine max*), presenta 6 genes que codifican proteínas con homología a las traducen diamino oxidasas (DAO). Estos 6 genes DAO presentan un patrón complejo de expresión en plantas etioladas, con diferencias en los niveles de expresión en los diferentes tejidos de la planta. Tanto la existencia de diferentes isoformas de las DAO en soja como su diferente patrón de expresión podrían estar relacionados con las diferencias en actividad y la afinidad por sustrato frente a putrescina y cadaverina en experimentos previos realizados sobre extractos de plantas de soja etioladas.

Por tanto, el análisis de actividad en cada tejido de forma específica podría aportar información básica y valiosa para el uso biotecnológico de la DAO de soja, en este caso, para la realización de un biosensor selectivo a putrescina o cadaverina.

The soybean plant (*Glycine max*) has 6 genes that encode proteins with homology to the diamine oxidases (DAO). These 6 *GmDAO* genes show a different complex expression pattern in etiolated plants, with differences in expression levels in different plant tissues. Both the existence of different DAO isoforms in soybean as well as their different expression pattern could be related to the differences in activity and affinity for substrate against putrescine and cadaverine observed in previous experiments carried out on extracts of etiolated soybean plants.

Therefore, the analysis of activity in each tissue specifically could provide basic and valuable information for the biotechnological use of soybean DAO, in this case, for the development of a selective biosensor for putrescine or cadaverine.

6.- Bibliografía

- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1052>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D36. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1195>
- Claver, A., Rey, R., López, M. V., Picorel, R., & Alfonso, M. (2017). Identification of target genes and processes involved in erucic acid accumulation during seed development in the

- biodiesel feedstock Pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Journal of Plant Physiology*, 208, 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2016.10.011>
- Delis, C., Dimou, M., Flemetakis, E., Aivalakis, G., & Katinakis, P. (2006). A root- and hypocotyl-specific gene coding for copper-containing amine oxidase is related to cell expansion in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 57(1), 101–111. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ009>
- Di Fabio, E., Incocciati, A., Boffi, A., Bonamore, A., & Macone, A. (2021). Biocatalytic production of aldehydes: Exploring the potential of lathyrus cicera amine oxidase. *Biomolecules*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/BIOM11101540/S1>
- FigTree. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR944>
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W585. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM259>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>
- Kumar, V., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Harvey, I., McGuirl, M. A., Wilce, M. C. J., & Zubak, V. M. (1996a). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure*, 4(8), 943–955. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00101-3)
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM404>
- Medda, R., Padiglia, A., & Floris, G. (1995). Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00756-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00756-J)
- Medda, R., Padiglia, A., Pedersen, J. Z., Lorrai, A., & Floris, G. (1996). Substrate specificity of lentil seedling amine oxidase. *IUBMB Life*, 40(3), 629–637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15216549600201223>
- Padiglia, A., Cogoni, A., & Floris, G. (1991). Characterization of amine oxidases from pisum, lens, Lathyrus and Cicer. *Phytochemistry*, 30(12), 3895–3897. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83429-O](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83429-O)
- Román, Á., Andreu, V., Hernández, M. L., Lagunas, B., Picorel, R., Martínez-Rivas, J. M., & Alfonso, M. (2012). Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4973. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERS174>
- Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Vidal-Carou, M. C. (2018). Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are

- they Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods*, 7(12).
<https://doi.org/10.3390/FOODS7120205>
- Schrödinger LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8*.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/PRO.3290>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016). Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Frontiers in Plant Science*, 7, 195327.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00824/BIBTEX>
- Tello-Ruiz, M. K., Jaiswal, P., & Ware, D. (2022). Gramene: A Resource for Comparative Analysis of Plants Genomes and Pathways. *Methods in Molecular Biology*, 2443, 101–131.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2067-0_5/FIGURES/4
- Vianello, F., Di Paolo, M. L., Stevanato, R., Gasparini, R., & Rigo, A. (1993). Purification and Characterization of Amine Oxidase from Soybean Seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307(1), 35–39. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1993.1556>
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W., & Provart, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. *The Plant Cell*, 29(8), 1806–1821. <https://doi.org/10.1105/TPC.17.00073>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*, 2(8), 718. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000718>

7.- Anexos

7.1.- Anexo I: Alineamiento de secuencias génicas de las DAO de soja

