



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Función y biogénesis de la pirroloquinolina-quinona
alcohol-deshidrogenasa (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter*
diazotrophicus. Caracterización de una mutante PQQ-ADH”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA :

Erika Antúnez Argüelles



TUTOR

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

CO-TUTORA

Martha Lucinda Contreras Zentella



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**" Función y biogénesis de la pirroloquinolina-quinona alcohol-deshidrogenasa (PQQ-ADH) de
Gluconacetobacter diazotrophicus. Caracterización de una mutante PQQ-ADH "**

realizado por **Antúnez Argüelles Erika**, con número de cuenta **401054369** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	Luisa Alvarina Alba Lois	
Propietario	Dr.	Heliodoro Celis Sandoval	
Tutor(a) Propietario	Dr.	José Edgardo Escamilla Marván	
Suplente	Dr.	Roberto Arreguín Espinosa	
Suplente	Dra.	Martha Lucinda Contreras Zentella	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Univeritaria, D. F., a 5 de junio del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le presente la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Las bacterias ácido acéticas.....	4
1.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	6

II. ANTECEDENTES

2.1 Sistemas respiratorios bacterianos.....	10
2.2 Sistemas respiratorios en bacterias ácido acéticas.....	12
2.3 Cadena respiratoria en <i>Ga. diazotrophicus</i>	13
2.4 Alcohol deshidrogenasas.....	14
2.5 Las PQQ-alcohol deshidrogenasa tipo III.....	15
2.6 Función de las PQQ-ADH tipo III.....	18
2.7 La PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	19

III. OBJETIVOS.....

21

IV. JUSTIFICACIÓN.....

22

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico.....	23
5.2 Medios de cultivo.....	23
5.3 Mantenimiento del material biológico.....	23
5.4 Cultivo de material biológico.....	24
5.5 Obtención del material biológico.....	24
5.6 Selección de mutantes espontáneas PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	25
5.7 Actividad de oxidasas terminales.....	26
5.8 Actividad de deshidrogenasas.....	26
5.9 Análisis espectroscópico de los citocromos.....	27
5.10 Solubilización de enzimas conteniendo citocromo <i>c</i>	28

5.11 Electroforesis desnaturalizante.....	28
5.12 Zimografía para citocromo <i>c</i>	29
5.13 Inmunodetección de la PQQ-ADH.....	30
5.14 Cuantificación de proteína.....	31
5.15 Medición de pH y densidad Óptica.....	31
5.16 Secuenciación de proteína.....	31

VI. RESULTADOS

6.1. Selección y aislamiento de mutantes espontáneas PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	33
6.2 Estandarización del medio de cultivo para la mutante <i>Ga. diazotrophicus</i> C6 PQQ-ADH	36
6.3 Cinética de Crecimiento de <i>Ga. diazotrophicus</i> PQQ-ADH	38
6.4 Cinética de inhibición con KCN.....	40
6.5 Espectrofotometría diferencial.....	42

Glucosa				
Acetaldehído				
Etanol				

6.6 Actividad de deshidrogenasas membranales.....	47
6.7 Zimografía para citocromo <i>c</i>	51
6.8 Inmunodetección de la PQQ-ADH.....	53

VII. DISCUSIÓN

7.1 De cómo la ausencia de PQQ-ADH no tiene efecto en la fijación de nitrógeno de <i>Ga. diazotrophicus</i>	57
7.2 De cuál es la función de la PQQ-ADH en la vía resistente a cianuro de la cadena respiratoria.....	58
7.3 Acerca de la biogénesis de la PQQ-ADH en <i>Ga. diazotrophicus</i>	60

VIII. CONCLUSIONES.....	63
IX. ANEXO.....	65
X. ABREVIACIONES.....	66
XI. REFERENCIAS.....	67

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido acéticas han formado parte de la vida del hombre desde tiempos remotos, debido a las diferentes aplicaciones y beneficios que le proveen a éste. Sin duda, el uso más antiguo que se le ha dado a estas bacterias, y por el cual reciben su nombre, es la producción de vinagre o ácido acético. Este producto es generado por estas bacterias a través de la oxidación incompleta del etanol. Desde la antigüedad y hasta hoy en día forma parte de la alimentación humana como condimento o como conservador de alimentos. Otras aplicaciones que han tenido las bacterias ácido acéticas han sido de gran interés para la industria biotecnológica, tales como la obtención de sorbosa, un precursor del ácido ascórbico, gluconato y cetogluconato, de utilidad alimenticia y farmacéutica; la síntesis de ácido tartárico y dihidroxiacetona, precursores empleados en la industria cosmética; y biopolímeros como la celulosa y acetan.

El mejoramiento en el rendimiento de estos productos es lo que motiva a los científicos e industriales a profundizar en el conocimiento de los procesos que los generan. No obstante, hay que decir que el valor del conocimiento por sí mismo ya resulta invaluable y es por ello que consideramos la investigación básica de la cadena respiratoria relevante, además de necesaria para cualquier otro logro en el tema. Es por ello que el presente trabajo tiene como objeto contribuir al conocimiento de la cadena respiratoria en bacterias ácido acéticas, específicamente *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

1.1 Las bacterias ácido acéticas

La primera relación de las bacterias ácido acéticas con la investigación científica se debió al interés sobre el vinagre de vino por parte del ilustre Louis Pasteur, en los años 1861-1868. Este sabio demostró que el ácido acético procedía de la oxidación del etanol y que por su oxidación prolongada éste se transforma en ácido carbónico y agua.

Este famoso científico francés podría también considerarse como el primer taxónomo de este grupo de bacterias, a las cuales les dio la denominación común de *Mycoderma aceti*. Ya en épocas más recientes y hasta hace unos pocos años, las bacterias acéticas eran divididas en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* dentro de la familia *Acetobacteraceae*, de la subclase α -Proteobacteria (Young, 1992). En 1997, se les sumó la definición de dos nuevos géneros de bacterias acéticas: *Gluconacetobacter* y *Acidomonas* en base al análisis de secuencias parciales del gen 16S ARN-ribosomal (Fig. 1) y del tipo de ubiquinona predominante (Yamada *et al.*, 1997) y, pocos años después se han definido otros dos nuevos géneros: *Asaia* (Yamada *et al.*, 2000) y *Kozakia* (Lisdiyanti *et al.*, 2002).

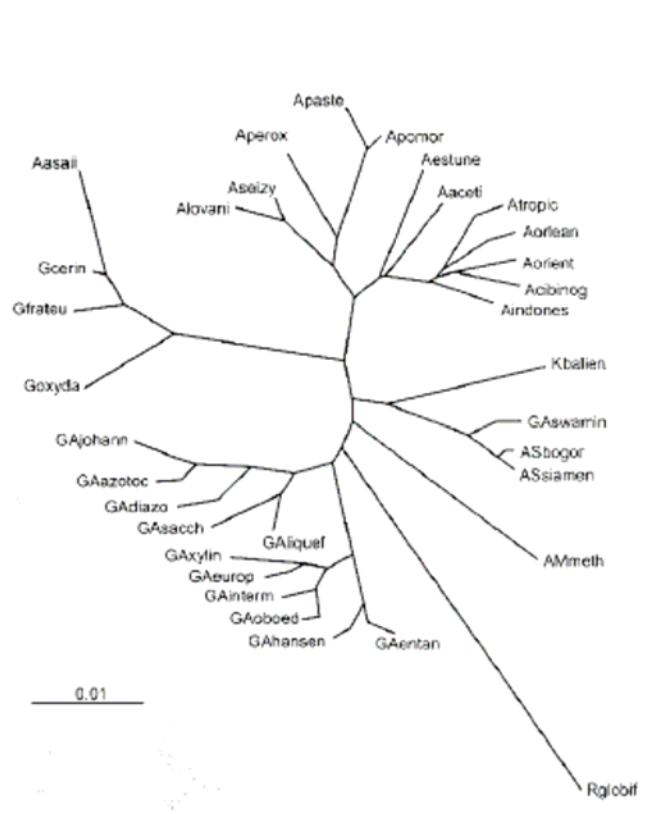


Fig. 1 Relaciones filogenéticas de la familia *Acetobacteraceae* con base en el gen ribosomal 16S. El grupo *Acetobacter* incluye *A. pasteurianus* (Apaste); *A. aceti* (Aceti); *A. pomorum* (Apomor); *A. estunensis* (Aestune); *A. indonesiensis* (Aindones); *A. tropicalis* (Atropic); *A. peroxydans* (Aperox); *A. lovaniensis*

(Aloban); *A. orleanensis* (Aorlean); *A. seizygii* (Aseizy); *A. cibinogensis* (Acibinog); y *A. orientalis* (Aorient). El grupo *Asaia* incluye *A. bogorensis* (ASbogor); *A. siamensis* (ASsiamen); “*Gluconacetobacter swaminathaniana*” (GAswamin). El grupo *Kosakia* incluye *Kosakia baliensis* (Kbalien). El grupo *Gluconacetobacter* incluye *Ga. sacchari* (GAsacch); *Ga. johannae* (GAjohann); *Ga. azotocaptans* (GAazotoc); *Ga. entani* (GAentan); *Ga. europaeus* (GAeurop); *Ga. intermedius* (GAinterm); *Ga. hansanii* (GAhansen); *Ga. xylinus* (GAXylin); *Ga. liquefaciens* (GAliquef); *Ga. diazotrophicus* (GAdiazo) y *Ga. oboediens* (GAoboed). El grupo *Gluconobacter* incluye *G. asaii* (Gasaii); *G. cerinus* (Gcerin); *G. frateurii* (Gfrateu) y *G. suboxydans* (Goxyda). El grupo de *Acidomonas* incluye *Ac. Methanolica*. (Imagen tomada de Fuentes R., *et al.*, 2003)

La principal característica de las bacterias acéticas es su capacidad para transformar a pH neutro o ácido (3-4) el alcohol en ácido acético (De Ley, Gillis & Swings, 1984; J. Swings, 1992). Estas bacterias se caracterizan por ser aerobias estrictas y son principalmente Gram negativas. Cuando se observan al microscopio óptico se presentan en formas variables (elipsoidal, redondeada, bastones); pueden encontrarse solas, en parejas o formando cadenas. Su tamaño varía entre 0.4 a 1µm de ancho y de 0.8 a 4.5 µm de longitud. Pueden presentar flagelos polares o peritricos. Algunas de las especies presentan diferentes pigmentos en los cultivos sólidos y pueden producir diferentes tipos de polisacáridos. Su temperatura óptima es de 25-30°C y su pH óptimo es de 5-6, aunque crecen bien en pH inferiores a 4. Las bacterias del ácido acético normalmente no crecen en medios complejos a menos de que se incluya un azúcar o un alcohol; en cambio, sí crecen en algunos azúcares y alcoholes como única fuente de carbono (Goodwing & Anthony, 1998).

Estas bacterias pueden encontrarse sobre substratos azucarados y/o con presencia de alcohol tales como: zumos de frutas, vino, sidra, cerveza y vinagre. Es sobre estos substratos donde llevan a cabo una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Estos microorganismos son capaces de oxidar la glucosa a ácido glucónico, la galactosa a ácido galactónico, la arabinosa a ácido arabónico o el etanol a ácido acético.

1.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Ga. diazotrophicus es una bacteria ácido acética, endófito, Gram-negativa, con actividad reductora de acetileno y de fijación de nitrógeno, aerobia estricta. Tiene muchas

características fisiológicas inusuales para un diazótrofo (fijador de nitrógeno) como la tolerancia a pH bajos y a altas concentraciones de azúcar. Para la mayoría de los diazótrofos el crecimiento celular y la fijación biológica del nitrógeno son óptimos a pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo esta bacteria no crece a valores de pH mayores a 7.0. Su crecimiento óptimo ocurre a pH 5.5, aunque el crecimiento y fijación de nitrógeno se han reportado hasta un pH menor a 2.5 (Stephan *et al*, 1991). Mediciones de la respuesta de la actividad respiratoria al pH, muestran que las células de *Ga. diazotrophicus* respiran en un intervalo amplio de pH, aunque es óptimo a valores bajos (6-3). Esta bacteria también crece y fija nitrógeno en niveles de sacarosa mayores a 30%, indicando que esta adaptada a crecer dentro de la caña de azúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Li & McRae, 1991).

Ga. diazotrophicus fue aislada por vez primera por Cavalcante y Döbereiner en 1988 (Cavalcante & Döbereiner, 1988), a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diversas regiones de Brasil. Recién descubierta, la bacteria fue descrita como "una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido" y por ello se le otorgó el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante & Döbereiner, 1988). Durante el período de impresión de este trabajo se incluyó como *addendum* el cambio del nombre propuesto, dándole a la nueva bacteria el nombre de *Acetobacter nitrocaptans*, sobre la base de experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA. De manera anecdótica, el sobretiro recibido por JCM venía con una corrección, hecha de puño y letra de Johanna Döbereiner, en la que se indicaba el nombre de la especie como *Acetobacter diazotrophicus*. Y así, solo algunos meses después, fue cuando *Acetobacter nitrocaptans* recibía el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989).

Sin embargo, Yamada y col. en 1997, propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*. Con el cambio en la clasificación de las bacterias acéticas, las especies de *Acetobacter* equipadas con ubiquinona Q₁₀ fueron transferidas al género *Gluconoacetobacter* con la especie tipo *Gluconoacetobacter liquefaciens* y, así actualmente el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Esta bacteria llamó la atención al ser descubierta, por su capacidad de fijar nitrógeno en plantas de familias diferentes a las leguminosas en presencia de nitratos (Cavalcante & Döbereiner, 1988). y por su carácter endófito. La bacteria en el interior de la caña de azúcar, sufre menor competencia por los nutrientes en comparación con el ambiente rizosférico, donde otros organismos fijan nitrógeno. Además, dispone de abundantes fuentes de carbono, producto de la fotosíntesis, para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Por otro lado el nitrógeno fijado es excretado directamente en el interior de los tejidos de la planta, la cual los usa para cubrir al menos parcialmente sus requerimientos en la síntesis de macromoléculas esenciales. Estas características, más su excelente crecimiento en condiciones *in vitro*, similares a las encontradas en la caña de azúcar (Urquiaga *et al.*, 1991), convirtieron a esta bacteria en un modelo pionero de bacterias endófitas, y abrió un nuevo capítulo en la investigación sobre la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas.

El potencial agrobiotecnológico se amplió cuando se demostró que *Ga. diazotrophicus* tenía efectivamente la capacidad de excretar el 50% del nitrógeno fijado (Cojho *et al.*, 1993), así como de producir diversas auxinas, especialmente ácido indol acético (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993; Bastian *et al.*, 1998) y citocininas (Jiménez-Salgado *et al.*, 1994), las cuales podrían ejercer efectos directos sobre la fisiología de la planta e influir sobre el crecimiento de la caña de azúcar.

Hacia el año 2000 muy poco se conocía sobre las características del genoma de *Ga. diazotrophicus*, en comparación con otras bacterias que se asocian con plantas de interés agrícola, tales como *Rhizobium* o *Azospirillum*. En la década de los 90's muchos genes involucrados en la fijación de nitrógeno de *Ga. diazotrophicus* fueron clonados y secuenciados (Sevilla *et al.*, 1997, Teixeira *et al.*, 1999). Por ejemplo, se conoce la organización de los genes *nif*, *fix* y *mop*; sin embargo los mecanismos involucrados en su regulación quedan por ser estudiados (Lee *et al.*, 2000).

Otros estudios genéticos se han llevado a cabo sobre la bacteria. Debido a su estilo de vida endófito, esta bacteria ha sido utilizada como vector para expresar genes heterólogos de interés. Un ejemplo es la expresión de los genes *cry3A* y *cry1Ab* aislados de *Bacillus thuringiensis* que son responsables de la actividad entomopatogénica contra

insectos coleópteros que causan daño a la caña de azúcar principalmente (Salles *et al.* 2000; Baldani *et al.* 2002b).

Hace pocos años se iniciaron los estudios para conocer la secuencia completa del genoma de *Ga. diazotrophicus* (Herlache *et al.*, 2000) y actualmente se conoce que el genoma de esta especie bacteriana tiene un tamaño aproximado de 4.2 Mb. El potencial económico del uso de *Ga. diazotrophicus* en la inoculación de caña de azúcar cultivada en Brazil ha estimulado la creación de una red de colaboración llamada RIOGENE en este país, que tiene como finalidad la secuenciación del genoma de esta bacteria.

El interés sobre esta bacteria ha sido también en el aspecto bioquímico, debido a que tiene la capacidad de fijar nitrógeno al mismo tiempo que es aerobio estricto. (Thomas *et al.*, 1976). Llama la atención, que la bacteria sea aerobia estricta y fijadora de nitrógeno, ya que todas las nitrogenasas examinadas hasta el momento en diversos organismos son extremadamente sensibles al oxígeno (Hill, 1998; Ng *et al.*, 1995). Esta característica suscitó el interés sobre el mecanismo por medio del cual la nitrogenasa se protege de la presencia de oxígeno en el medio de cultivo. Muy poco se sabe sobre el metabolismo aerobio y específicamente sobre el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*, aunque nuestro grupo ha hecho una importante contribución (Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

II. ANTECEDENTES

2.1 Sistemas respiratorios bacterianos

Los sistemas respiratorios bacterianos son un conjunto de flavoproteínas Fe-S, quinoproteínas, quinhemoproteínas, quinonas liposolubles y citocromos, organizadas de forma asimétrica en la membrana (Fig. 2). Dichos componentes conforman una cadena que transporta electrones desde proteínas con un potencial redox bajo o negativo, hacia uno alto o positivo, en una serie de reacciones redox hasta un aceptor final y, al mismo tiempo, generan un gradiente protón motriz transmembranal que conduce a la formación de ATP por el complejo F₁F₀ de la ATP sintetasa (Escamilla *et al.*, 1999).

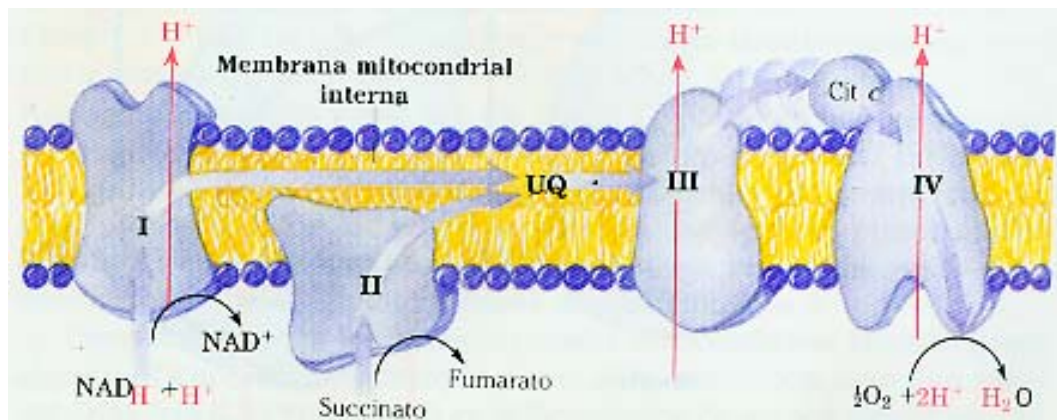


Fig.2 Composición general de una cadena respiratoria aeróbica adaptado de Lehninger & Cox, (1993).

El arreglo que poseen los distintos componentes de la cadena suele ser modular, y éste puede cambiar en función de los nutrientes presentes en el medio donde crecen. En general, los sistemas respiratorios bacterianos pueden contener los mismos componentes hallados en la mitocondria; tales como la NADH-deshidrogenasa (NADHDH: complejo I) y la succinato deshidrogenasa (SDH: complejo II), proteínas que funcionan como enzimas alimentadoras de la cadena respiratoria oxidando NADH o succinato, además de una gama variable de otras deshidrogenasas, que oxidan diferentes sustratos (Fig.3). La ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III o citocromo *bc*₁) y la citocromo oxidasa terminal (complejo IV) también suelen estar presentes, así como componentes móviles transportadores de electrones tales como quinonas y citocromo *c* soluble (Anraku & Gennis, 1987).

Las oxidasas terminales participan activamente en la reducción del oxígeno, aceptor final de las cadena respiratorias de bacterias aeróbicas (Matsushita *et al.*, 1994). Existen dos grupos en los cuales se dividen a las oxidasas terminales, las quinol oxidasas que reciben electrones desde el quinol (quinona completamente reducida) y las citocromo *c* oxidasa que reciben los electrones desde el quinol a través del complejo III mitocondrial y el citocromo *c* soluble como donador directo. Muchos sistemas bacterianos pueden presentar dos o más oxidasas terminales con diferente afinidad al oxígeno, generando ramificaciones en el sistema respiratorio y permitiendo la adaptación a un intervalo amplio de concentraciones de oxígeno presentes en el medio.

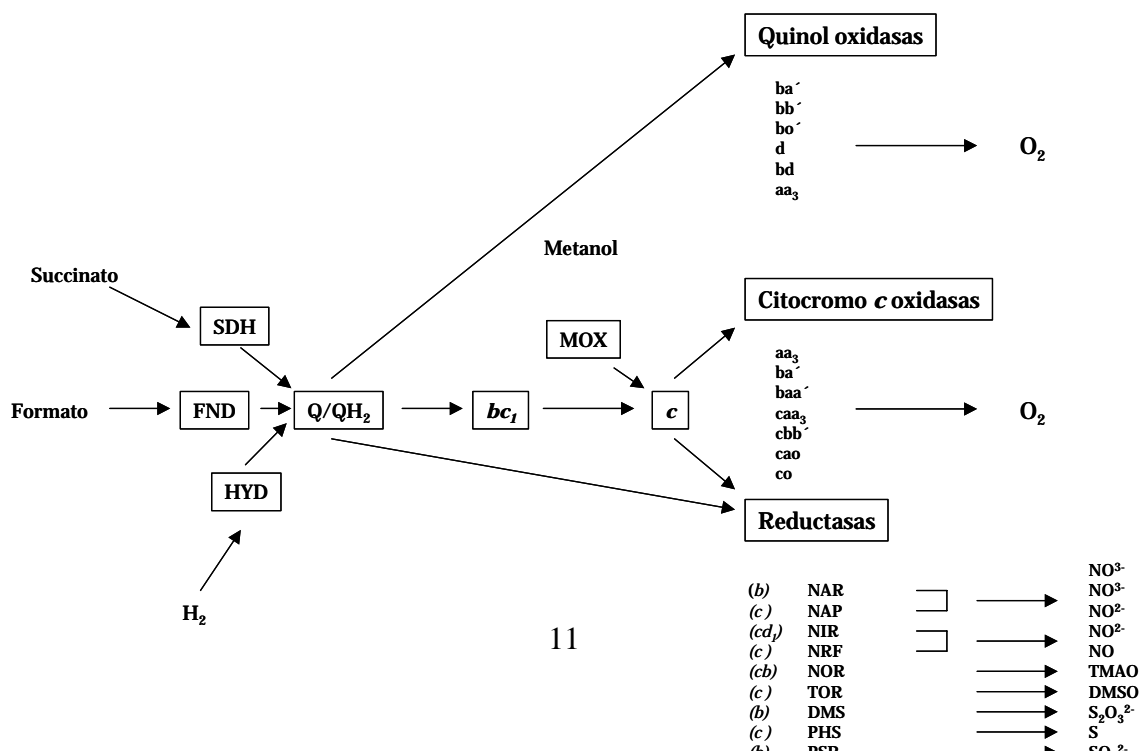


Fig. 3 Composición de diferentes cadenas respiratorias bacterianas.

2.2 Sistemas respiratorios en bacterias ácido acéticas

La oxidación incompleta de azúcares y alcoholes o Fermentación Oxidativa (Matsushita *et al.*, 1994) llevada a cabo por las bacterias del ácido acético es un proceso que está íntimamente ligado al sistema respiratorio, y es llevado a cabo por diferentes deshidrogenasas membranales (flavoproteínas y quinoproteínas). El acoplamiento de estas dos vías metabólicas hace que la velocidad de respiración llegue a ser 10-20 veces superior a las que se registran en otras bacterias aeróbicas típicas (Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

Estas deshidrogenasas aportan los electrones en forma directa a la cadena respiratoria a través de la quinona endógena. Sin embargo existe poco conocimiento sobre la cadena respiratoria en general y de la relación que existe entre las deshidrogenasas y la bioenergética celular (Flores-Encarnación *et al.*, 1999; Gonzáles *et al.*, 2006). Las cadenas respiratorias que han sido mejor estudiadas en las bacterias ácido acéticas son las de *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter methanolicus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (antes *Acetobacter diazotrophicus*) y *Gluconoacetobacter xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*).

Existen diferencias en los sistemas respiratorios de los miembros representativos de los diferentes géneros de las bacterias ácido acéticas (Matsushita *et al.*, 1994). El género *Gluconobacter* está equipado con UQ₁₀ como la mayor ubiquinona, mientras que el género *Acetobacter* posee mayoritariamente UQ₉. El género *Gluconobacter* posee grandes cantidades de citocromo *c*, una citocromo *bo* quinol oxidasa y una oxidasa sensible a cianuro de naturaleza desconocida. El género *Acetobacter* posee citocromo *c*, una ubiquinol oxidasa sensible a cianuro que, de acuerdo a las condiciones de cultivo (Matsushita *et al.*,

1992), puede intercambiar los grupos prostéticos ba_3 y bo_3 . A la oxidasa ba_3 también se le conoce como a_1 . Para ambos géneros existe un gran número de deshidrogenasas membranales que alimentan la cadena respiratoria. El género *Gluconacetobacter* es un género que ha sido introducido relativamente hace poco tiempo y su sistema respiratorio no está totalmente entendido (Flores-Encarnación *et al.*, 1999), sin duda los estudios hechos sobre el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* han ayudado a revelar la naturaleza de los componentes de la cadena.

2.3 Cadena respiratoria en *Ga. diazotrophicus*

La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* es una de las cadenas que mejor se ha estudiado (Fig. 4). Esta compuesta por diversas deshidrogenasas membranales que donan sus electrones directamente a una poza de UQ₁₀ membranal, aunque se ha visto que también posee UQ₉ en muy bajas cantidades (González *et al.*, 2006). Los electrones colectados por la UQ₁₀ son cedidos directamente a las oxidasas terminales.

Las deshidrogenasas que se encuentran en *Ga. diazotrophicus* son diversas, algunas tienen su sitio activo orientado hacia el citoplasma, como la NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa; mientras que otras poseen su sitio catalítico dirigido hacia el espacio periplásmico, como la PQQ glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la PQQ alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la PQQ aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) (Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

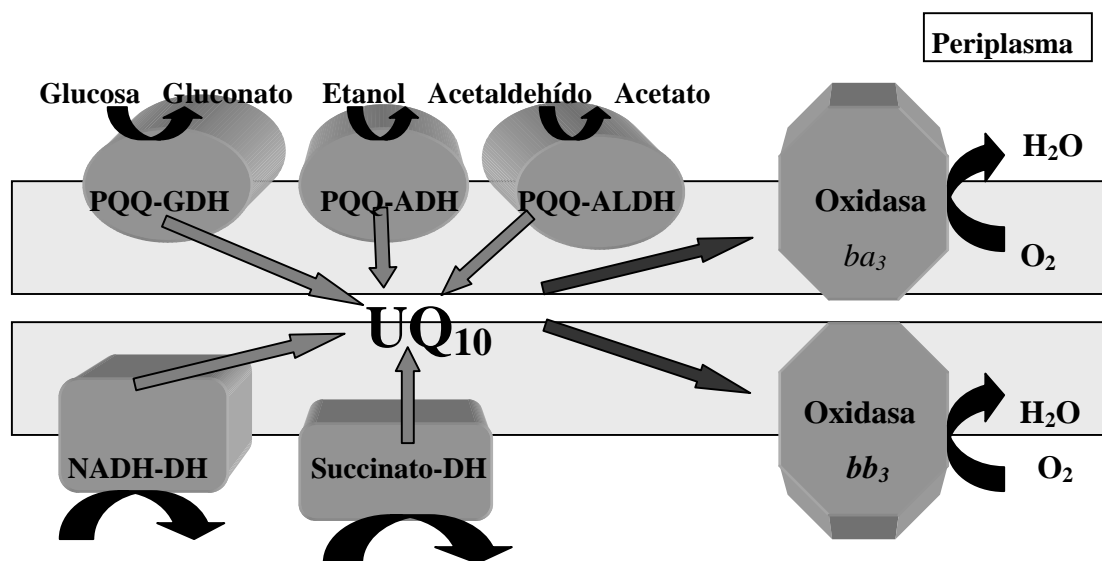


Fig. 4 Composición del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. Las PQQ deshidrogenasas periplásmicas para alcohol (PQQ-ADH), aldehído (PQQ-ADH), glucosa (PQQ-ADH) y las deshidrogenasas membranales para NADH (NADH-DH) y succinato (Succinato-DH) que entregan los electrones a la ubiquinona-10 (UQ₁₀). La UQ₁₀ cede los electrones a las distintas oxidasas terminales (en esta caso se esquematizan las oxidasas expresadas en condiciones de fijación de nitrógeno).

La expresión de las distintas quinol-oxidasas terminales que posee esta bacteria, se encuentra regulada por la concentración del amonio en el medio de cultivo (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). Cuando la concentración de amonio es baja, la bacteria fija nitrógeno atmosférico y expresa dos oxidasas terminales: citocromo *ba*₃, resistente a cianuro y citocromo *bb*₃ sensible a este inhibidor (González *et al.*, 2006); En condiciones de alto amonio (no fijación de nitrógeno), la oxidasa *ba*₃ es sustituida por una oxidasa *bd*.

La concentración de amonio también afecta la actividad de las deshidrogenasas periplásmicas. En condiciones de no fijación de nitrógeno (alto amonio), la actividad de estas enzimas es baja. Se ha determinado que las deshidrogenasas tienen un papel fundamental en la fijación de nitrógeno, debido a que la alta tasa respiratoria consume el O₂ del medio, evitando que inhiba de manera irreversible a la nitrogenasa, que es la enzima encargada de la fijación de nitrógeno (Flores- Encarnación *et al.*, 1999). A este fenómeno se le conoce como “protección respiratoria” y ha sido postulado para la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* (Drozd & Postgate, 1970; Poole & Hill, 1997), y por nuestro grupo en *Ga. diazotrophicus* (Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

2.4 Alcohol deshidrogenasas

Existe una gran diversidad de alcohol-oxidoreductasas encargadas de catalizar la interconversión de alcoholes, aldehídos y cetonas. Estas pueden ser divididas en tres grandes grupos, (a) las alcohol deshidrogenasa dependientes de NAD(P); (b) las alcohol deshidrogenasas independientes de NAD(P), que utilizan pirrolo-quinolina-quinona (PQQ) y citocromos tipo *c* como grupos prostéticos; y (c) alcohol oxidasas dependientes de FAD

que catalizan la reacción irreversible de oxidación de alcoholes (Toyama *et al.*, 2004; Gómez-Manzo *et al.*, 2005).

Las ADHs dependientes de PQQ son el grupo de enzimas más grande dentro de la familia de quinoproteínas, formado a la fecha por 18 enzimas diferentes. Sus miembros se han clasificado en tres grupos, las ADHs de tipo I, II y III. Las ADHs tipo I se encuentran en un número limitado de Proteobacteria y son muy similares a la metanol deshidrogenasa quinoproteína (MDH) de metilótrofos. Son quinoproteínas simples que contienen PQQ como único grupo prostético. A diferencia de las ADHs tipo I, las ADHs tipo II y III son quinohemoproteínas. Las ADHs tipo II son enzimas solubles en el periplasma y están distribuidas ampliamente entre Proteobacteria. Las ADHs tipo III están unidas a membrana, funcionando en el espacio periplásmico y son únicas de la bacterias ácido acéticas.; están compuestas generalmente, de tres subunidades, dos de las cuales son quinohemoproteínas. La subunidad catalítica contiene a la PQQ y un citocromo *c*, mientras que la subunidad II contiene tres citocromos-*c* (Toyama *et al.*, 2004).

2.5 Las PQQ-alcohol deshidrogenasa tipo III

Cinco diferentes ADHs tipo III se han aislado de especies de bacterias acéticas como *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas* y *Gluconobacter* (Toyama *et al.*, 2004). Estas enzimas, como hemos mencionado, se encuentran asociadas a la membrana (Toyama *et al.*, 2004) y son las encargadas de catalizar la oxidación de etanol a acetaldehído, el primer paso de la producción de ácido acético (Matsushita *et al.*, 1996), además de funcionar como deshidrogenasas primarias en la cadena respiratoria. Se ha demostrado que mientras las ADHs tipo III en bacterias ácido acéticas están involucradas en la producción de ácido acético, las ADH dependientes de NAD^+ son empleadas únicamente en la asimilación de etanol a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Las ADHs tipo III tienen una especificidad por sustratos relativamente restringida en comparación a otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas, ya que oxidan preferentemente alcoholes primarios (cadenas de 2 a 6 carbonos), exceptuando el metanol y

no oxidan alcoholes secundarios, como si lo hace diferentes ADHs tipo I en *Pseudmonas* y *Stenotrophomonas*; o la quinohemoproteína etanol deshidrogenasa periplásmica (qhEDH) descrita en *Comamonas testosteroni*, una ADH tipo II que además oxida aldehídos. Por otro lado, a diferencia de éstas, las ADHs tipo III no requieren amonio como activador y tienen pH's óptimos de 4.0 y 6.0.

Las ADHs tipo III generalmente están compuestas por tres subunidades (Fig.5). La subunidad I (72-80 kDa) es una quinohemoproteína similar a la quinohemoproteína soluble tipo II; y tiene como grupos prostéticos una sola molécula de PQQ y un citocromo *c*. La subunidad II (48-53kDa), aparentemente es una hemoproteína, cuya secuencia de aminoácidos indica que une a tres citocromos *c* (Matsushita *et al.*, 1996). En total la enzima tiene cuatro hemos *C* (unidas a la subunidad I y II). Finalmente la subunidad III (14-17kDa), está presente en las ADHs del género *Acetobacter* y ausente en el género *Gluconacetobacter* (Gómez-Manzo *et al.*, 2007).

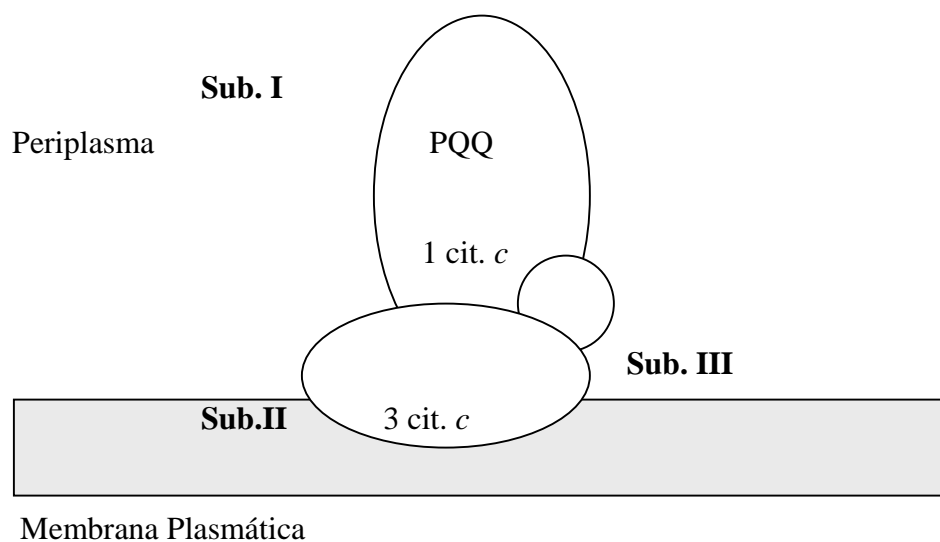


Fig. 5 Esquema de la pirroloquinolina quinona alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) tipo III en las bacterias ácido acéticas.

Los genes estructurales de ADHs tipo III de diversas bacterias ácido acéticas han sido secuenciados en diferentes especies del género *Acetobacter* y en *Gluconobacter suboxydans*. Se observó que los genes que codifican para las subunidades I y II están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura, formando un operón (Kondo & Horinouchi, 1997). Las dos subunidades tienen en el amino terminal un péptido señal típico de proteínas de membrana, el cual es probablemente procesado para dar lugar a las subunidades maduras. Las secuencias de aminoácidos de la subunidad I indican que es una proteína soluble, con gran similitud en la primera parte con la secuencia de la metanol deshidrogenasa soluble; en el extremo carboxilo terminal tiene un sitio de unión para el citocromo *c* (Inoue *et al.*, 1989). La secuencia de aminoácidos de la subunidad II indica que esta subunidad une a tres citocromos *c* (Matsushita *et al.*, 1996). Los genes que codifican la subunidad III no están localizados junto a los genes que codifican a las otras dos subunidades. La secuencia de aminoácidos deducida para la subunidad III indica que el tamaño del péptido señal es grande (alrededor de 20 kDa); y que la subunidad madura tiene una masa molecular aparente de 14kDa en SDS-PAGE.

El aceptor natural de electrones de las ADHs tipo III es la ubiquinona endógena (Q_9 y Q_{10}) de la membrana; aunque las alcohol deshidrogenasas de las bacterias ácido acéticas pueden también usar ubiquinonas de cadena corta (Q_1 y Q_2) como aceptores incorporados artificialmente. Se ha concluido que la transferencia de electrones hacia la quinona se lleva a cabo a través de los hemo *C* de las subunidades I y II. Se ha postulado que la secuencia de transferencia de electrones inicia con la oxidación del etanol, su sustrato, entregando dos electrones a la PQQ para generar PQQH₂; éste cede los electrones al hemo *C* de la subunidad I, como en el caso de la ADH tipo II. En un segundo paso, los electrones pueden ser transferidos a uno de los hemo *C* de la segunda subunidad y otro de los hemo *C* de esta subunidad puede estar involucrado en la transferencia de electrones para reducir a la quinona endógena. (Fig. 6). Análisis cinéticos de la ADH nativa de *G. suboxydans* indican que sólo dos de los tres hemo en la subunidad II (cII_2 o cII_3) pueden estar involucrados en la transferencia de electrones del PQQ reducido a la ubiquinona endógena (Matsushita *et al.*, 1996).

Análisis de localización de las subunidades de la PQQ-ADH en *G. suboxydans* y *A. pasteurianus* sugiere que los citocromos de la subunidad II están embebidos en la membrana, que las subunidades I y III están fuertemente unidas a la subunidad II, y que esta unión ayuda a la subunidad I a acoplarse adecuadamente con los citocromos *c* de la subunidad II y así tener la conformación correcta (Inoue *et al.*, 1989).

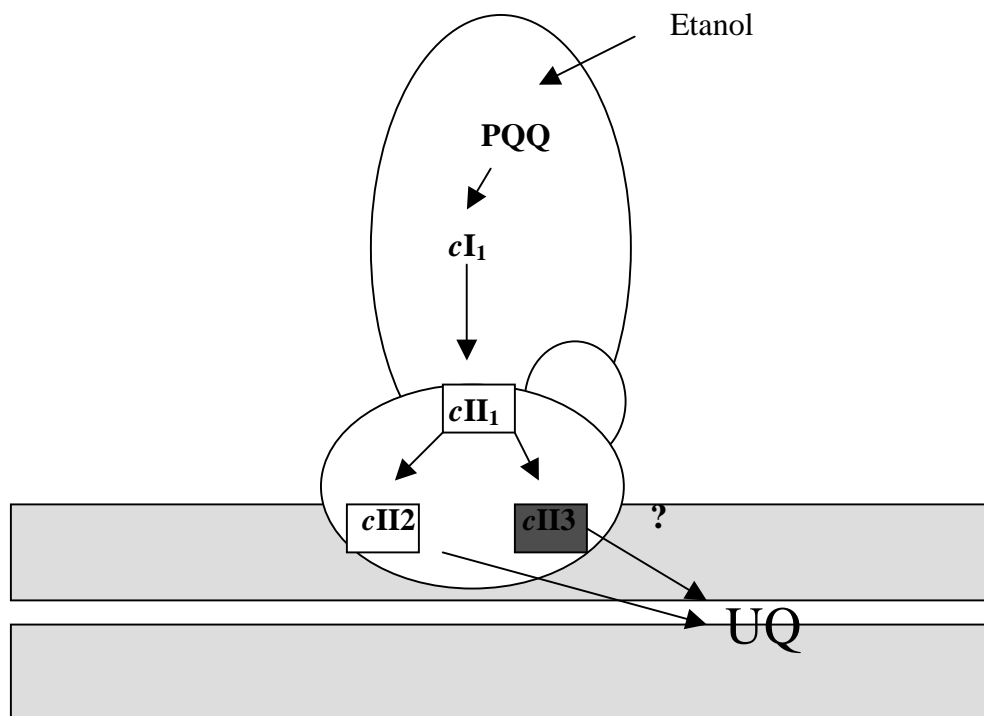


Fig. 6 Ruta propuesta para la transferencia intramolecular de electrones en las PQQ-ADH tipo III.

2.6 Función de las PQQ-ADH tipo III

Las PQQ-alcohol deshidrogenasas de las bacterias ácido acéticas tienen una importante participación fisiológica; la rápida oxidación de etanol produce una alta concentración de ácido acético en el medio, el cual es sumamente tóxico para muchos otros microorganismos permitiéndole así conservar su nicho. Se ha estimado que la velocidad de reacción de la PQQ-ADH de bacterias ácido acéticas es aproximadamente 10 veces mayor

que lo observado en quinohemoproteínas solubles. Otra función es la generación de energía mediante el acoplamiento a la cadena respiratoria.

También se ha propuesto en bacterias del ácido acético, que la PQQ-Alcohol deshidrogenasa forma parte funcional de la vía resistente a cianuro. De acuerdo con evidencia bioquímica y genética existente en *Gluconobacter suboxydans* se ha postulado que la SII-cit *c* de la quinoproteína ADH es un acarreador electrónico obligado en la vía resistente a cianuro de la cadena respiratoria (Matsushita *et al.*, 1994). En este esquema se propone que uno de los citocromos *c* de la SII de la PQQ-ADH, podría ser un paso intermedio entre la ubiquinona endógena y la oxidasa terminal resistente a cianuro (Fig. 7).

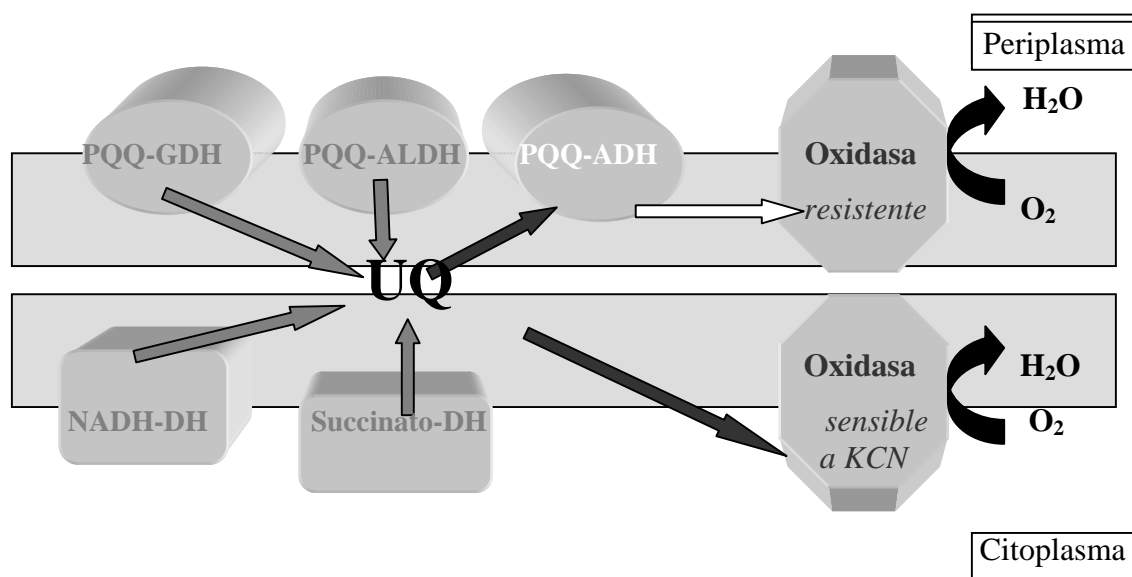


Fig. 7 Esquema del flujo electrónico del sistema respiratorio de *G. suboxydans* propuesta por Matsushita y colaboradores (1994). Las deshidrogenasas periplásmicas de esta bacteria donan los electrones a la quinona endógena, la cual puede ceder los electrones a la SII de la PQQ-ADH. La SII dona los electrones a la oxidasa terminal en la vía resistente a cianuro.

2.7 La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

Ga. diazotrophicus posee una alcohol deshidrogenasa de tipo III que se encuentra anclada a la membrana. A diferencia de otras PQQ-ADH tipo III solo posee dos subunidades, tal como se ha visto en *Ga. polyoxigenes*; la subunidad I (71kDa) posee PQQ

y un citocromo *c* y la subunidad II (44kDa) posee tres citocromos *c* (Gómez-Manzo, S., 2005).

La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* tiene una alta afinidad por etanol ($K_m=0.27\text{mM}$) y puede oxidar alcoholes primarios y secundarios; y, de manera atípica se ha reportado que oxida aldehídos (Gómez-Manzo, S., 2005).

Esta enzima cede sus electrones directamente a la quinona endógena y no parece ser intermediario obligado de la vía resistente a cianuro de esta bacteria. De acuerdo con un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, la sobre-expresión de la PQQ-ADH en la membrana de *Ga. diazotrophicus* e inclusive la ausencia de síntesis de citocromos *c* en una mutante de esta bacteria (la mutante *ccm-MAd21*), no afectaron significativamente la respuesta de titulación con cianuro (González, *et al.*, 2006).

III. OBJETIVOS

I. Seleccionar y aislar una mutante *Ga. diazotrophicus* deficiente de PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH), cuya actividad de alcohol-oxidasa fuera nula.

II. Determinar que la PQQ-ADH es el único componente afectado en la cadena respiratoria de la mutante caracterizando parcialmente los demás componentes de la cadena.

III. Determinar el impacto de mutación PQQ-ADH en la expresión de los citocromos tipo *c* de la membrana de *Ga. diazotrophicus*.

IV. Estudiar algunos aspectos de la biogénesis de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* mediante la detección inmunológica de sus subunidades en las membranas de la cepa silvestre y la mutante PQQ-ADH.

IV. JUSTIFICACIÓN

La caracterización bioquímico-inmunológica de mutantes deficientes en la actividad de PQQ-alcohol deshidrogenasa contribuirá a entender el proceso de biogénesis de esta enzima: su síntesis, exportación al espacio periplásmico, incorporación de los grupos prostéticos citocromo *c* y su incorporación a la membrana. Paralelamente nos servirá para definir si, la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es un intermediario obligado de la vía resistente a KCN tal como ocurre en *G. suboxydans*,

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Ga. diazotrophicus PAL5 ATCC49037 (cepa silvestre), la mutante espontánea de *Ga. diazotrophicus* ADH⁻ y la mutante de *Ga. diazotrophicus ccm-* MAd21, obtenida por mutación al azar con el transposón Tn5 y que tiene la característica de carecer de citocromos *c* debido a mutaciones en los genes que intervienen en su biogénesis. (Lee, *et al.*, 2004).

5.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron Caldo Nutritivo (Bioxon ®) 8 g/L adicionado con sacarosa (azúcar refinada del supermercado) al 5%, pH 5.5; medio LGIP modificado (Flores-Encarnación *et al.*, 1999) el cual contiene K₂HPO₄ (5g), KH₂PO₄ (4g), MgCl₂ (0.2g), CaCl₂ (0.02g), NaMoO₄ (0.002g), FeCl₃ (0.01g), citrato de sodio industrial (5g), (NH₄)₂SO₄ (0.1321g) y azúcar refinada (50g) para un litro de medio. Ambos medios ajustados a pH 5.5 con ácido clorhídrico. Para el crecimiento de la mutante *ccm*-MAd 21 los medios fueron adicionados con estreptomicina (350 µg ml⁻¹) y en el caso de la mutante PQQ-ADH⁻ con alcohol alílico (2mM).

5.3 Mantenimiento del material biológico

Para su conservación, todas las cepas *Ga. diazotrophicus* fueron crecidas a 30°C en agitación constante (200 r.p.m.) y almacenadas a 4° C para su uso posterior como inóculo. *Ga. diazotrophicus* PAL5 (cepa silvestre) se mantuvo indistintamente en medio LGIP modificado pH 5.5 (Stephan *et al.*, 1991) o Caldo Nutritivo con sacarosa al 5%, pH 5.5 La mutante *Ga. diazotrophicus ccm-MAd21* fue mantenida de la misma manera, adicionando al medio de cultivo estreptomycin (350 µg ml⁻¹). La mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH fue mantenida únicamente en Caldo Nutritivo con sacarosa al 5%, pH 5.5 y alcohol alílico (2mM). Las células fueron retiradas de la agitación constante al inicio de la fase estacionaria, a las 36 horas para el caso de la cepa PAL5 y el mutante *ccm-MAd21*; o a las 48 para la mutante PQQ-ADH.

5.4 Cultivo de material biológico

Los cultivos para obtención de células y membranas se llevaron a cabo según Flores-Encarnación y colaboradores (1999). Las células fueron crecidas en un biofermentador (Bioflo 2000, New Brunswick) con capacidad de 60 l a 30°C manteniendo un flujo de aire de 4.0 l min⁻¹ y una agitación de 200 r.p.m. o en matraces Ferenbach con capacidad de 2 litros conteniendo 1 litro de medio, con agitación constante de 200 r.p.m. a una temperatura de 30°C. Las células fueron cosechadas como se menciona anteriormente.

Ga. diazotrophicus PAL5 y la mutante PQQ-ADH fueron crecidos en medio LGIP modificado o en Caldo nutritivo adicionado con sacarosa al 5%, pH 5.5, según el ensayo realizado. El mutante PQQ-ADH siempre se creció en presencia de alcohol alílico a una concentración de 2mM, excepto en los casos donde se indica en Resultados. La mutante *ccm-MAd21* se creció en medio LGIP modificado adicionado con estreptomycin (350 µg ml⁻¹) según Lee *et al.* (2004).

5.5 Obtención del material biológico

Las células de cualquier cultivo fueron recuperadas por centrifugación (7 000 r.p.m. durante 10 minutos), y lavadas dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 50mM, CaCl₂ (1mM) y MgCl₂ (1mM) según Flores-Encarnación (1999). Las células fueron empleadas inmediatamente o guardadas a -80°C para su uso posterior.

Las membranas se obtuvieron por rompimiento celular a alta presión empleando una prensa de French a 1,500 psi o por lisis celular con lisozima y sonicación según Matsushita *et al.* (1981). En este caso el segundo lavado para obtener células se hizo con solución amortiguadora TNE compuesta de Tris-HCl (0.1M, pH 8.2) conteniendo NaCl (0.5M) y EDTA (1 mM). Cada gramo de células obtenido se incubó en 6 ml de solución amortiguadora TNE en presencia de lisozima (2.5 g por gramo de células) en agitación constante a temperatura ambiente hasta formar esferoplastos (observables al microscopio). Los esferoplastos fueron sonicados a 4°C en ciclos de 30 segundos hasta el rompimiento celular observable al microscopio óptico.

5.6 Selección de mutantes espontáneas ADH⁻ de *Ga. diazotrophicus*

La enzima alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) de *Ga. diazotrophicus* es capaz de llevar a cabo la oxidación del alcohol alílico (Gómez-Manzo, S., Tesis doctoral, 2007). El producto de esta reacción (Fig. 8), la acroleína, es altamente tóxico para la bacteria y conlleva a su muerte, y por ello es que el alcohol alílico es considerado un sustrato “suicida”. De este modo, en presencia del alcohol alílico, se pueden seleccionar mutantes espontáneos deficientes en la actividad de PQQ-ADH.



Fig. 8 Reacción de oxidación del alcohol alílico catalizada por la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Ga. diazotrophicus PAL5 fue crecido en placas de agar nutritivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bioxon) suplementado con sacarosa al 5% pH 5.5 y de alcohol alílico 1mM como factor de selección para cepas PQQ-ADH. Las cepas que crecieron fueron resembradas en el mismo medio aumentando la concentración de alcohol alílico a 2mM para hacer más preciso el mecanismo de selección. Se aislaron las cepas con nula actividad de etanol-oxidasa.

5.7 Actividad de oxidasas terminales

La actividad fue medida polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs, Instruments) a 30°C como se describe en Escamilla *et al.* (1987) empleando 0.1mg de peso húmedo de células enteras o entre 0.1 y 0.2 mg de proteína de membranas, en un volumen final de 2ml de solución amortiguadora de fosfatos 50mM, pH 6.0 en el caso de las PQQ-DH y pH 7.4 para el caso de la NADHDH. Los sustratos utilizados fueron etanol, glucosa, acetaldehído o NADH (10mM final). Para inhibir la actividad de oxidasa terminal se empleó KCN a distintas concentraciones.

5.8 Actividad de deshidrogenasas membranales

La actividad de las deshidrogenasas membranales se determinó espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor artificial de electrones (Matsushita *et al.*, 1995). ferricianuro de potasio $[(K_3Fe(CN)_6)]$ recibe electrones entre otras fuentes, de los citocromos tipo *c* asociados a las deshidrogenasas tipo hemoquinoproteínas (PQQ-ADH ó PQQ-ALDH, entre otras). La mezcla de reacción contiene

ferricianuro de potasio (0.01mM final), KCN (1.5mM final) y acetaldehído o etanol (10mM final), ajustándose el volumen de reacción a 1ml con solución amortiguadora MacIlvaine pH 6.0 (Na_2HPO_4 0.2M ajustada a pH 6.0 con ácido cítrico 0.1M). La reacción se inició con 0.03mg de proteína membranal, seguida de incubación por 10 minutos a 30°C. La reacción se paró con Dupanol (0.5ml), para después llevarla a un volumen final de 5ml con agua desionizada. Después de diez minutos la actividad se cuantificó por cambio de absorbancia a 660 nm respecto a una muestra blanco carente de sustratos.

La actividad de deshidrogenasas también fue determinada espectrofotométricamente empleando metasulfato de fenazina (PMS) y diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptores artificiales de electrones (Adachi *et al.*, 1978a; Adachi *et al.*, 1978b). El PMS tiene la capacidad de recibir electrones desde quinoproteínas, interactuando directamente con la PQQ, o al menos en lugares de la enzima cercanos a este grupo prostético (Goodwin & Anthony, 1998) y puede a su vez reducir otros colorantes redox como el DCPIP. Este último, al ser reducido cambia de color azul hasta volverse transparente.

La mezcla contiene KCN (1.5mM final), DCPIP (0.8mM final), PMS (0.6mM final) y diferentes sustratos: glucosa, acetaldehído y etanol (10mM); el volumen de la reacción se ajustó a 1ml con solución amortiguadora de fosfatos 50mM, pH 6.0. La reacción se inició con 0.03mg de proteína membranal. La actividad fue cuantificada en el lapso de un minuto por cambio de absorbancia a 600 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC, en modo de cinética, inmediatamente después de iniciada la reacción.

5.9 Análisis Espectroscópico de los citocromos

El análisis de los citocromos se llevó a cabo espectrofotométricamente a temperatura de nitrógeno líquido (77K), en un espectrofotómetro OLIS-SLM DW 2000 en celdas de 0.2 cm. Los espectros diferenciales reducido menos oxidado se obtuvieron resuspendiendo entre 5 y 7 mg de proteína de membranas o solubilizados membranales de *Ga. diazotrophicus* en solución reguladora de fosfatos 50mM, pH 6.0 (pH 7.4 para NADH)

adicionado con DMSO al 30% (para obtener una congelación homogénea). Los espectros reducidos fueron obtenidos reduciendo las preparaciones membranales con unos granos de ditionita (con y sin KCN), o con los siguientes sustratos a una concentración final de 10mM: etanol, acetaldehído, glucosa o NADH. Después de incubar por 30 minutos las preparaciones fueron congeladas a 77K con nitrógeno líquido. Los espectros oxidados fueron obtenidos adicionando unos granos de persulfato de amonio a las preparaciones membranales, después de lo cual fueron congeladas. Los espectros diferenciales (reducidos menos oxidados), fueron obtenidos por sustracción de los espectros absolutos. Para la obtención de los espectros de los complejos citocromo-CO, se hizo burbujear monóxido de carbono (CO) por 5 minutos, en una muestra previamente reducida con ditionita. El espectro obtenido es restado del espectro reducido previamente obtenido. Los aductos citocromo-CO fueron fotodisociados con 3 disparos de luz blanca producida por un flash de fotografía, aplicado sobre la ventana de la celda congelada.

5.10 Solubilización de enzimas conteniendo citocromo *c*

Para solubilizar selectivamente a las enzimas que contienen citocromo *c* de la membrana, se empleó Triton X 100 al 0.2%. A esta concentración de detergente, las PQQ-ADH y PQQ-ALDH son solubilizadas de la fracción membranal (Flores-Encarnación, 1999). Membranas de cualquiera de las cepas de *Ga. diazotrophicus* fueron incubadas durante dos horas a 4°C en Triton X100 al 0.2% a una relación final de 10 mg de proteína por ml de la suspensión membranal. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 4°C, por 30 minutos a 30 000 r.p.m. en un rotor 50 Ti para ultracentrífuga Beckman Optima L-60 y se recuperó el sobrenadante (solubilizado).

5.11 Electroforesis desnaturalizante

La electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) se llevó a cabo utilizando la técnica de Laemli modificada (Del Arenal *et al.*, 1997). El gel separador se preparó en placas de 6

x 10 cm a una concentración final de acrilamida de 10 %, Tris-HCl 0.375M pH 8.9, Glicerol (8%), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 1%, 1µl por ml de solución de persulfato de amonio al 10% y 1µl/ml de solución de N,N,N',N'- Tetrametiletilenediamina (TEMED). El gel concentrador se preparó a una concentración final de acrilamida de 4.5%, Tris-HCl 0.125M, pH 6.7, Glicerol al 8%, SDS al 1%, y persulfato de amonio y TEMED en las mismas concentraciones del gel separador. El gel se corrió a 15mA de corriente constante en solución amortiguadora Tris-HCl (27mM) y Glicina (192 mM) con SDS (0.1%). Se utilizó Precision Plus ProteinTM Standards de BIO-RAD como referencia de peso molecular.

Las muestras en todos los casos fueron fracciones solubilizadas obtenidas al tratar las membranas de las diferentes cepas de *Ga. diazotrophicus* con Triton X 100 al 0.2%. Los solubilizados fueron concentrados por ultrafiltración, centrifugando a 4 000 r.p.m. en “columnas de centricon con un cut off” de 10,000, el tiempo necesario para obtener la concentración deseada de proteína. Las muestras fueron calentadas 5 minutos en agua hirviendo y centrifugadas a 10,000 r.p.m. durante cinco minutos en presencia de SDS (5 %) y β - Mercaptoetanol (3 %) en solución amortiguadora Tris-HCl 0,15M, pH 6.7 y Glicerol (15%).

5.12 Zimografía para citocromo c

Para la detección de citocromo *c* se utilizó una reacción cromógena basada en la actividad de peroxidasa inherente a el grupo hemo según Thomas *et al.*, (1976) y Flores-Encarnación *et al* (1999). Se corrió un gel SDS-PAGE en las condiciones antes mencionadas. El gel fue incubado en una solución de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (0.11%), disuelta en una solución de metanol puro (30%) y acetato de sodio 0.25M pH 5.0 (70%) durante dos horas en oscuridad a temperatura ambiente y agitación constante. Las bandas de citocromo *c* se revelaron al agregar H₂O₂ al 0.4%. El gel fue lavado con acetato de sodio (0.25M) pH 5.0 para detener la reacción y para quitar el excedente de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, tóxica al contacto directo. La 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, al

oxidarse, da lugar a un precipitado color azul insoluble revelando la ubicación de los citocromos *c* en el gel SDS-PAGE (Goodhew *et al.*, 1986).

5.13 Inmunodetección de la PQQ-ADH

Para la inmunodetección de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* se corrió un gel SDS-PAGE. La proteína contenida en el gel fue transferida a una membrana de nitrocelulosa según el manual de BIO-RAD manteniendo el patrón de ubicación en la membrana. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 15 V durante 40 minutos con ayuda de una cámara semi-seca BIO-RAD. La solución amortiguadora pH 8.3 para la transferencia contenía glicina (192mM), Tris-HCl (25mM) y metanol (20%), sugerido en el manual de uso de la cámara semiseca de BIO-RAD. La membrana fue incubada 30 segundos en metanol puro y enjuagada con agua desionizada durante dos minutos. Posteriormente la membrana, junto con el gel y los filtros, fueron incubados en la solución amortiguadora de transferencia durante media hora, previo a la transferencia. Después de la transferencia el patrón de ubicación de la proteína en el gel fue mantenido en la membrana. Ésta fue bloqueada con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS-tween 20 (0.05%) (ANEXO) toda una noche a 4°C para evitar la adhesión de proteínas inespecíficas a la membrana después de la transferencia. Posterior al bloqueo, la membrana se incubó 1 hora en presencia del anticuerpo primario en PBS-tween 20 (0.05%) adicionado con BSA (1mg/ml); el anticuerpo empleado fue un anticuerpo policlonal de coneja contra PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus* PAL5 diluido 1:2500. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario, un antiIgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1:20 000 en PBS-tween20 (0.05%)-BSA (1mg/ml), el cual reconoce al primer anticuerpo y permite su localización cuando la peroxidasa interactúa con un sustrato quimioluminiscente haciéndolo brillar.

Antes y después de cada incubación en los anticuerpos, la membrana se lavó con PBS-tween 20 (0.05%) tres veces durante diez minutos cada lavado, para eliminar el exceso

de los anticuerpos. Después del último lavado se hicieron tres lavados más, esta vez únicamente con PBS.

Para el revelado de la enzima la membrana se incubó en oscuridad en una solución con sustrato quimioluminiscente para detección de peroxidasa (de PIERCE©) durante diez minutos y se expuso en una placa de revelado durante diez minutos, acto seguido se reveló en solución reveladora y fijó en solución fijadora (PIERCE © ambas soluciones).

5.14 Cuantificación de Proteína

La proteína de las distintas preparaciones fue determinada con el método de Lowry modificado (Markwell *et al.*, 1981).

5.15 Medición de pH y Densidad Óptica

Los valores de densidad óptica para determinar crecimiento de cultivos fueron medidos a 560 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC en modo de absorbancia. El pH se midió empleando un electrodo de pH Corning Co.

5.16 Secuenciación de proteína

La secuenciación de proteína a partir de geles de acrilamida SDS-PAGE fue llevada a cabo por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del departamento de Bioquímica en la torre de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La banda de interés fue cortada de un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue R 250, posteriormente desteñido, reducido, carbaminometilado, lavado, digerido con tripsina y extraído de acuerdo al procedimientos publicado en Kinter y Sherman (2000). El volumen

de los extractos fue reducido por evaporación en una centrifuga de vacío a temperatura ambiente y después fue ajustado a 20 μ l con ácido fórmico al 1%.

El análisis peptídico por Espectrometría de masas fue llevado a cabo un Sistema 3200 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), equipado con una fuente de nanoelectrospray y un sistema de nanoflujo LC (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn, Germany). Las muestras digeridas fueron desaladas en una punta ZipTip-C 18, y separada en una columna Zorbax 300SB C 18 (3.5 μ m, 50 x 0.075 mm, Agilent, Germany) equilibrada con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0.1%. Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo, 0.1% de ácido por 80 minutos, a una tasa de flujo de 300 nl/min. El calor de interfase para desolvatar fu mantenido a 150°C. El voltaje fue de 2.4 kV. El espectro fue adquirido en modo automático utilizando Information Dependent Acquisition (IDA). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1 utilizando el modo Enhanced MS mode. El intervalo de exploración por EMS fue fijado a t m/z 400-1500 y 4000 amu/s. Los iones seleccionados fueron sujetos a exploración por Enhanced Resolution a una velocidad baja de 250 amu/sec sobre un intervalo de masas estrecho (30 amu) y después sometidos a exploración Enhanced Product Ion Scan (MS/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada por colisión (CAD). Los fragmentos de iones generados fueron capturados y analizados en una trampa de iones lineal Q3. La base de datos (NCBIInr) y la identificación proteica fueron llevadas a cabo con el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>).

VI. RESULTADOS

6.1. Selección y aislamiento de mutantes espontáneas PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* PAL5.

Para seleccionar mutantes espontáneas PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* PAL5, la cepa fue crecida en placas de agar nutriente con sacarosa al 5% y alcohol alílico (1mM) como factor de selección. De aquí se seleccionaron varias cepas resistentes que fueron resembradas en el mismo medio, aumentando la concentración de alcohol alílico a 2 mM. En esta ocasión se lograron seleccionar 8 cepas; de las cuales tres fueron estudiadas para seleccionar la más adecuada. Estas cepas, la cepa 2 (C2), cepa 6 (C6) y cepa 7 (C7) fueron aisladas y sembradas por estría para asegurar su pureza. Colonias individuales de cada caja fueron aisladas y conservadas después de probar su fenotipo PQQ-ADH. Estas cepas fueron crecidas en medio LGIP modificado y Caldo Nutritivo adicionado con sacarosa al 5% ambos a pH 5.5. A partir de las células crecidas se determinó su capacidad para oxidar, además de etanol, otros sustratos que donan electrones al sistema respiratorio desde el espacio periplásmico: acetaldehído y glucosa. Lo anterior con el propósito de conocer el grado de afectación que tenían los mutantes en otras vías de oxidación. Nuestro propósito era trabajar con el mutante que tuviera menos defectos secundarios en el sistema respiratorio.

Como se muestra en la Tabla 1, la cepa C6 fue la única cepa mutante que creció en el medio LGIP modificado, un medio donde es necesaria la fijación de nitrógeno, ya que la concentración de amonio presente en el medio es muy baja (1 mM). Esta cepa alcanzó su máximo crecimiento en un tiempo relativamente corto (3 días, un día más que la línea silvestre), lo que también resultó adecuado para el trabajo en el laboratorio.

En caldo nutritivo adicionado con sacarosa al 5%, todas las cepas mutantes crecieron, alcanzando su máximo crecimiento hasta el tercer día.; C7 fue la cepa que más biomasa generó. Por el contrario C6 fue la cepa que menos creció, aunque llamó la atención que acidificó más el medio, de manera muy similar a la cepa silvestre. La acidificación del medio está íntimamente vinculada con la actividad respiratoria en bacterias ácido acéticas; pues las deshidrogenasas membranales son las encargadas de alimentar la cadena respiratoria. Los sustratos oxidados por estas enzimas generan ácidos orgánicos como productos, como ácido acético, ácido glucónico, etc. que se depositan en el medio de cultivo provocando su acidificación (Matsushita *et al.*, 1994). Esto sugirió inicialmente que la cepa 6 podría carecer de la actividad de PQQ-ADH, manteniendo las actividades de las demás deshidrogenasas sin variación.

a) LGIP modificado				b) Caldo Nutritivo-5% sacarosa			
Cepa	Tiempo de incubación (días)	Crecimiento D.O. 560nm	pH	Cepa	Tiempo de incubación (días)	Crecimiento D.O. 560 nm	Ph
C2	>8	*	*	C2	3	8.39	5.7
C6	3	2.36	3.3	C6	3	6.65	2.6
C7	>8	*	*	C7	3	10.8	5.3
WT	2	1.95	4	WT	2	4	2.95

Tabla 1. Crecimiento de *Ga. diazotrophicus* PAL5 y cepas mutantes PQQ-ADH⁻ en diferentes medios.
 (*) La cepa no mostró crecimiento al tiempo mostrado

De acuerdo con estos resultados se decidió determinar las actividades de glucosa-oxidasa y acetaldehído-oxidasa de las tres cepas mutantes, crecidas en ambos medios (ver Tabla 2).

Se encontró que, entre todas las cepas mutantes, la cepa C6 poseía actividades similares a la silvestre en cualquiera de los dos medios donde creció.

CEPA	PAL5		C6		C2		C7	
	LGIP Mod.	C.N.	LGIP Mod.	C.N.	LGIP Mod.	C.N.	LGIP Mod.	C.N.
GLUCOSA	136*	96	88	112	12	48	12	1.44
ACETALDEHÍDO	112	78	72	70	7.3	3.2	12	2
ETANOL	52	54.5	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Actividad respiratorias de las cepas mutantes *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ crecidas en medio LGIP modificado (LGIP Mod.) y Caldo Nutritivo adicionado con sacarosa al 5% (C.N.).

*La actividad está dada en nanoátomos de O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de peso húmedo de células enteras.

Los bajos niveles de acidificación encontrados en las cepas 2 y 7, revelan problemas en la utilización de otros sustratos oxidables, además de etanol. La baja actividad de glucosa oxidasa y acetaldehído oxidasa en las mismas cepas, sugiere que las deshidrogenasas específicas para estos sustratos y/u otro componente de la cadena respiratoria no funcionan adecuadamente en estos mutantes. La baja actividad registrada para acetaldehído y glucosa, además de la ausencia de actividad para etanol, sugiere que se

trata de mutantes regulatorias, donde los genes afectados no son aquellos que codifican directamente para estas enzimas.

Para cumplir el propósito de estudiar la biogénesis de la PQQ-ADH, sin la interferencia de la afectación en otras actividades, las mutantes C2 y C7 quedaron descartadas. En cambio, la cepa 6 mostró buena actividad respiratoria para glucosa y acetaldehído, muy cercanas a las determinadas en la cepa silvestre; la mutante mantiene el fenotipo de PQQ-ADH sin importar el medio de cultivo donde se crezca y genera suficiente biomasa para los estudios planteados, especialmente cuando fue crecida en Caldo Nutritivo con sacarosa al 5%.

6.2 Estandarización del medio de cultivo para la mutante *Ga. diazotrophicus* ADH C6

La cepa C6 fue elegida como modelo de estudio y con la finalidad de optimizar su cultivo, se comparó su crecimiento en los medios: LGIP modificado, LGIP modificado adicionado con extracto de levadura al 0.5% y en Caldo Nutritivo con sacarosa al 5%, todos a pH 5.5.

El crecimiento de la cepa C6 en caldo nutritivo con sacarosa al 5% fue mayor que en los otros medios; seguido del medio LGIP modificado con extracto de levadura al 0.5% y finalmente el medio LGIP modificado (ver Fig. 9). El grado de acidificación del medio fue proporcional al crecimiento. Tomando en cuenta que el Caldo Nutritivo adicionado con sacarosa al 5%, es entre los medios utilizados, el más rico; el grado de acidificación del medio revela la cantidad de fuente de carbono (sacarosa) oxidada a ácido glucónico.

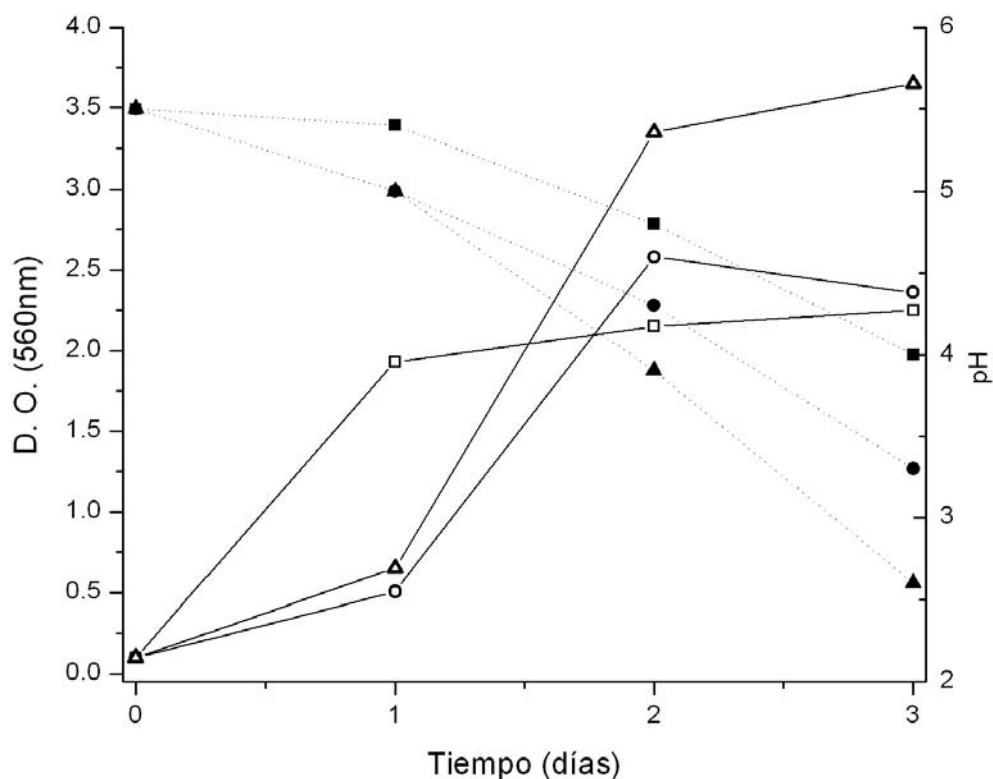


Fig. 9 Optimización del medio de cultivo para la mutante PQQ-ADH⁻ C6 de *Ga. diazotrophicus*. Crecimiento en medio (□) LGIP modificado, (○) LGIP modificado adicionado con 0.5% de extracto de levadura, (Δ) Caldo Nutritivo adicionado de 5% sacarosa. Determinación de pH en medio (■) LGIP modificado, (●) LGIP modificado adicionado de 0.5% de extracto de levadura, (▲) Caldo Nutritivo adicionado de 5% de sacarosa.

La actividad respiratoria de células de la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, fue medida en los diferentes medios donde se creció. Los niveles de las actividades de glucosa oxidasa y acetaldehído oxidasa fueron muy similares, independientemente del medio utilizado (Ver Tabla. 3), lo que sugirió que los niveles de actividades expresadas en el mutante eran estables sin importar la composición del medio utilizado. Por otra parte, el fenotipo PQQ-ADH⁻ de la mutante aislada, fue confirmado por la nula actividad de etanol

oxidasa determinada en las células, en cualquiera de los medios donde se creció. Este resultado sugiere que se trata de una mutación estructural y estable.

	Caldo Nutriente + Sacarosa al 5%	LGIP modificado	LGIP modificado + Extracto de levadura al 0.5%
Glucosa	76.8*	72	59.2
Acetaldehído	44	38.4	44.8
Etanol	0	0	0

Tabla 3. Actividades respiratorias de células de *Ga. diazotrophicus* ADH⁻ crecida en diferentes medios de cultivo. Las células fueron crecidas durante 3 días.

*La actividad está dada en nanoátomos de O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de peso húmedo.

6.3 Cinética de Crecimiento de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻

Debido a que el Caldo Nutritivo con sacarosa al 5% fue el medio donde se obtuvo mayor crecimiento de la mutante, se determinó una curva de crecimiento en este medio, a partir de la medición de la turbidez (densidad óptica a 560 nm), del peso seco y de la acidificación de un cultivo de 60 l de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ (Fig.10).

Como se esperaba, tanto la turbidez como el peso seco, que son criterios que representan el crecimiento, generaron una cinética con el mismo comportamiento. La curva formada mostró dos fases de crecimiento, la primera es rápida y está ubicada entre las 0 y

15 horas, y la segunda, lenta y ubicada entre las 20 y 44 horas, separadas por un periodo de adaptación de 5 horas.

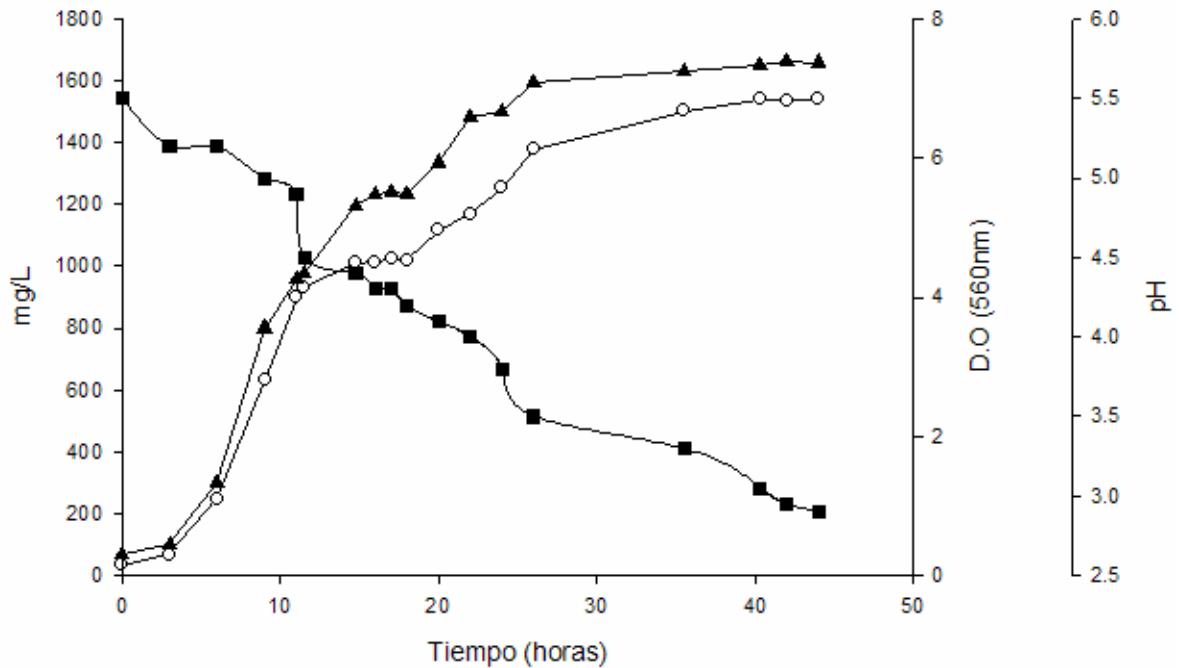


Fig. 10 Cinética de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH C6 crecida en Caldo Nutritivo con sacarosa al 5%. (○) D.O. (560nm), (▲) peso seco (mg/l) y (■) pH durante las primeras 48 horas de crecimiento.

El comportamiento bifásico en una curva de crecimiento puede deberse a la utilización secuencial de un nutriente de rápida utilización (crecimiento rápido) seguida de la utilización de un nutriente de lenta utilización (crecimiento lento). Se ha visto que el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios con limitado amonio, presenta este comportamiento bifásico (Flores-Encarnación, 1999). Durante la primera fase, la bacteria ocupa el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que en la segunda depende de la actividad fijadora de nitrógeno. La fase de latencia que existe entre una y otra fase se debe al cambio en el metabolismo de este componente, durante el cual la nitrogenasa, complejo

enzimático que fija nitrógeno atmosférico, es activada. Sin embargo, los aminoácidos presentes en el Caldo Nutritivo como fuente de nitrógeno parecerían no ser limitante para el crecimiento.

Sin embargo, el medio utilizado es un medio muy rico y no se vislumbra limitación en fuente de carbono o de nitrógeno. Alternativamente, el crecimiento bifásico podría ser debido a la acumulación rápida de ácidos orgánicos en el medio, lo que produce también su rápida acidificación dando lugar a una disminución en la velocidad de crecimiento.

Lo mismo podría estar ocurriendo si hablamos de azúcares; la concentración de sacarosa utilizada (50 g/l) no parecería ser limitante para el crecimiento alcanzado. De hecho sabemos que al final del crecimiento aun hay sacarosa remanente en el medio.

CADENA RESPIRATORIA DE *Ga. diazotrophicus* C6 PQQ-ADH⁻

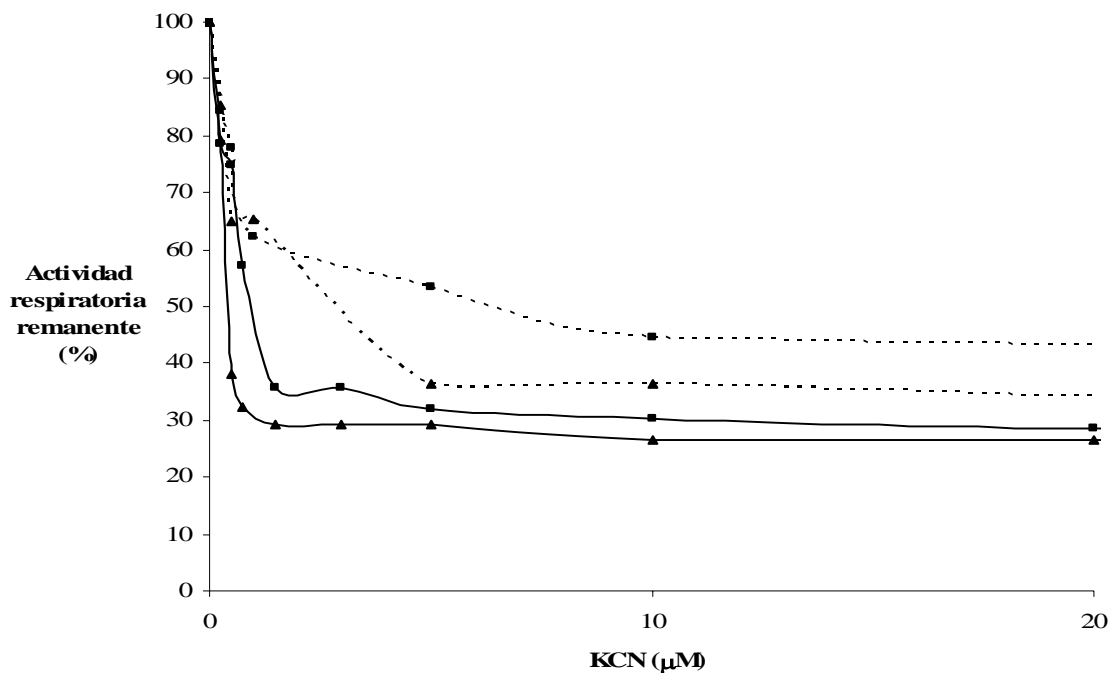
6.4 Cinética de inhibición con KCN

La actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ fue inhibida con cianuro de potasio (KCN) a diferentes concentraciones. Este inhibidor actúa como ligando alternativo del O₂ y es capaz de unirse con alta afinidad al Cu²⁺ del sitio activo de las oxidasas de la familia Fe:Cu ó, con menor afinidad, al Fe²⁺ de los hemos de otro tipo de oxidasas, siempre actuando en el sitio de unión al oxígeno (S. Jünemann, 1997).

Existen dos componentes respiratorios en *Ga. diazotrophicus* PAL5, uno sensible a bajas concentraciones de KCN (menor a 5uM) y otro resistente (se mantiene a 50uM) (Flores-Encarnación, 1999). Esta respuesta se puede observar también en la cepa PQQ-ADH⁻ de *Ga. diazotrophicus*. La cepa muestra un comportamiento bifásico similar al de la cepa silvestre, cuando se emplea glucosa o acetaldehído como donadores de electrones a la

cadena (ver Fig. 11A). Entre 30 y 50% de la actividad respiratoria es inhibida empleando una concentración menor a 5 μM de KCN en células enteras de ambas cepas.

A



B

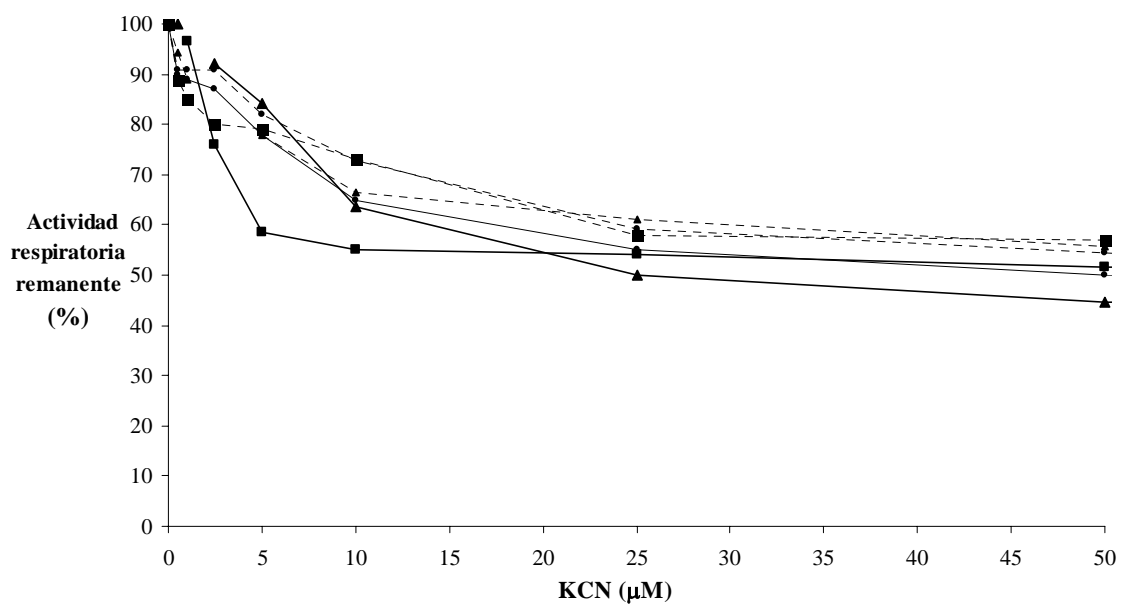


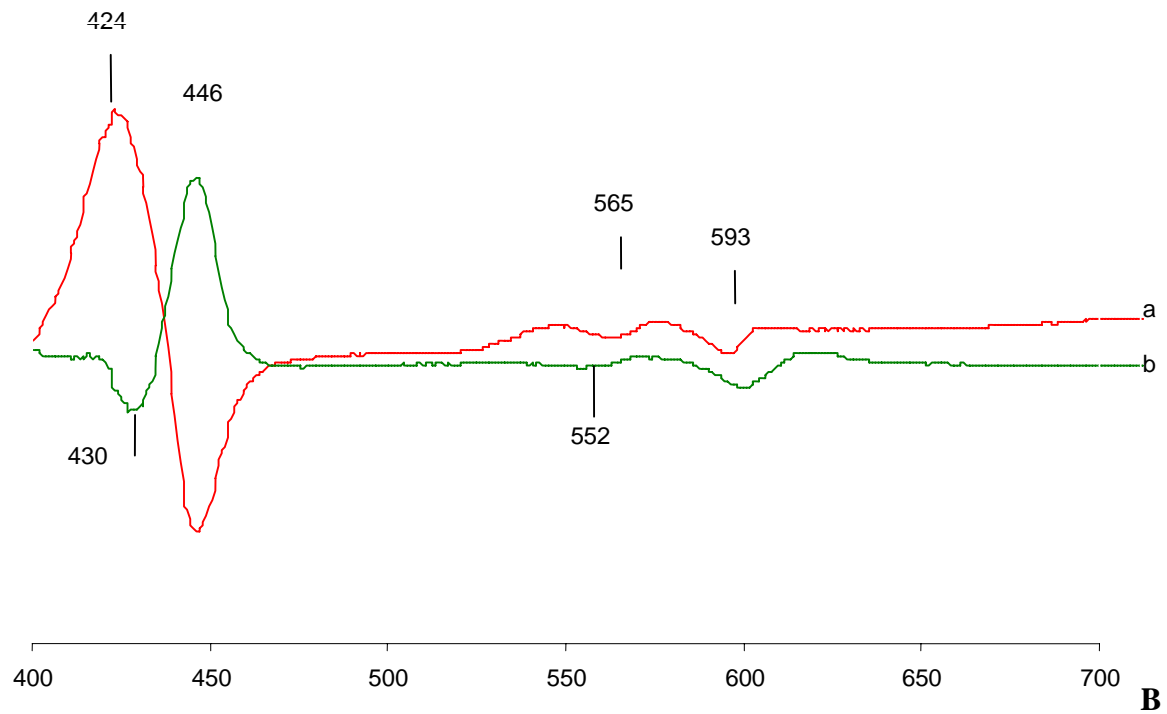
Fig. 11 Cinética de inhibición con KCN de la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* sobre células (A) y membranas (B) de *Ga. diazotrophicus* PAL5 (–) y ADH C6 (---). los sustratos utilizados fueron: (▲) Glucosa (10 mM), (■) Acetaldehído (10 mM), y (●) NADH (10mM) como sustratos donadores de electrones.

Al igual que en células, el comportamiento de la cinética de inhibición de la actividad respiratoria de la cepa mutante y silvestre fue similar cuando el ensayo se llevó a cabo en membranas. El comportamiento fue bifásico (Fig. 11B) y entre un 20 y 40% de la actividad es inhibida con 10 μ M de KCN.

6.5 Espectrofotometría diferencial

Los espectros diferenciales con monóxido de carbono (CO) (Fig. 12) revelan la formación del aducto oxidasa a_1 -CO (presencia de citocromo a_1 reactivo con CO) (picos a 423 y 589 nm y valles a 445 y 610 nm) en *Ga. diazotrophicus* PAL5 y PQQ-ADH (Fig.12, trazo a en ambas gráficas). Su presencia pudo ser confirmada por las señales espectrales al realizar el espectro de fotodisociación del complejo con CO (picos a 445 y 611nm, valles a 428 y 593 nm) (Fig. 12, trazo b en ambas gráficas). Este citocromo es una de las oxidasas terminales presentes en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, cuando se crece en condiciones de fijación de nitrógeno (Flores-Encarnación, 1999).

A



B

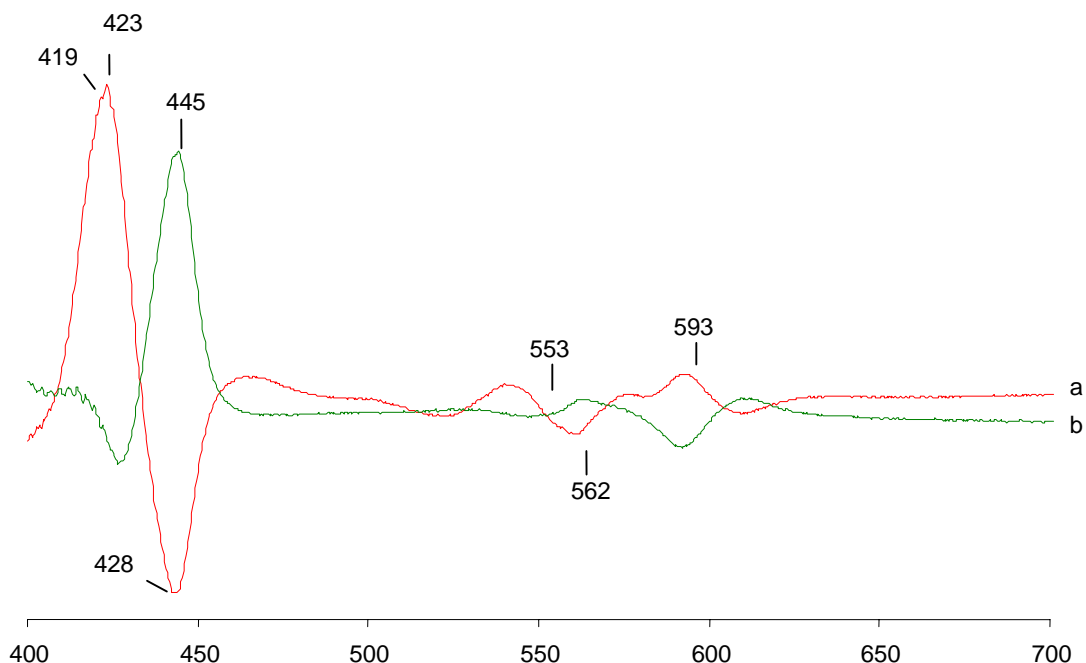
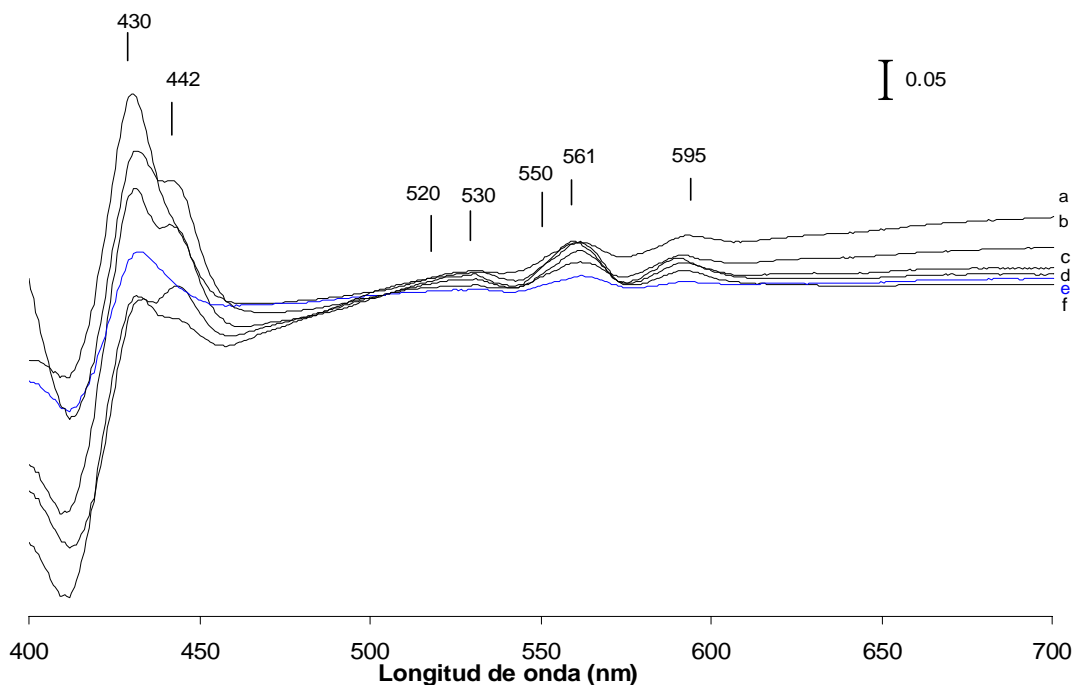


Fig. 12 Espectro diferencial de (A) *Ga. diazotrophicus* PAL5 y (B) *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH con (a) monóxido de carbono y (b) de fotodisociación.

El espectro diferencial, reducido con ditionita menos oxidado con persulfato de amonio, de membranas de *Ga. diazotrophicus* PAL5 (Fig. 13A) muestra la presencia de citocromos tipo *b* (picos a 430, 530 y 560 nm), citocromo *a*₁ (hombro a 442nm y una señal débil a 593 nm intensificada por efecto hipercrómico, cuando se añade KCN a la muestra) y citocromos *c* (hombros a 520 y 550nm); estos últimos son claramente observados cuando se les extrae de la porción membranal con Triton X 100 al 0.2%; así, el solubilizado muestra, casi exclusivamente, las señales de citocromos *c* (418, 520 y 550nm; ver Fig. 14). Los mismos componentes citocrómicos, aunque en diferente proporción, se encuentran cuando etanol, acetaldehído, glucosa o NADH se emplean como agentes reductores y así podemos asegurar que todos los sustratos fisiológicos reducen los mismos componentes membranales. Dichos componentes forman parte de la cadena respiratoria, teniendo como oxidasa terminal a la citocromo *ba* o *a*₁ y como grupos prostéticos de las deshidrogenasas PQQ-ADH y PQQ-ALDH a los citocromos *b* y *c* (Flores-Encarnación, 1999).

Los espectros diferenciales reducido menos oxidado de membranas de la cepa mutante PQQ-ADH⁻ (ver Fig. 13 B) muestran los mismos componentes citocrómicos encontrados en el tipo silvestre, al emplear cualquiera de los reductores antes mencionados, excepto etanol, el cual no reduce a la cadena. Este resultado indicaría que la cepa mutante posee una cadena respiratoria funcional, conformada de la misma manera que la cepa silvestre y que puede ser reducida a través de sus distintas deshidrogenasas, excepto cuando el etanol es sustrato, pues su deshidrogenasa es defectuosa en la mutante.

A



B

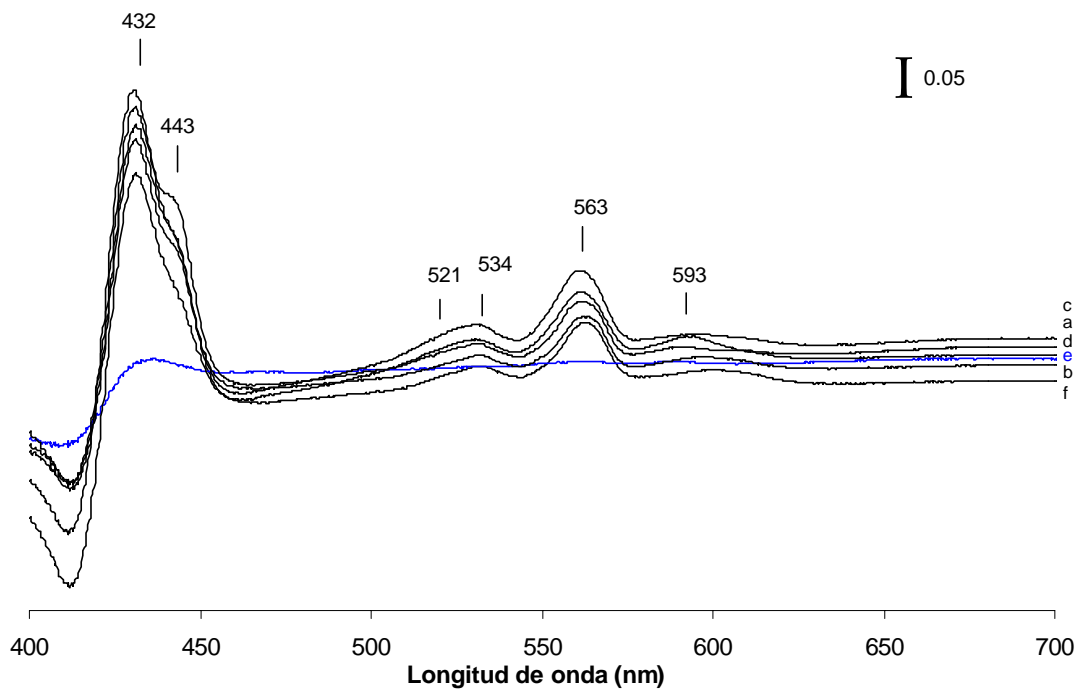
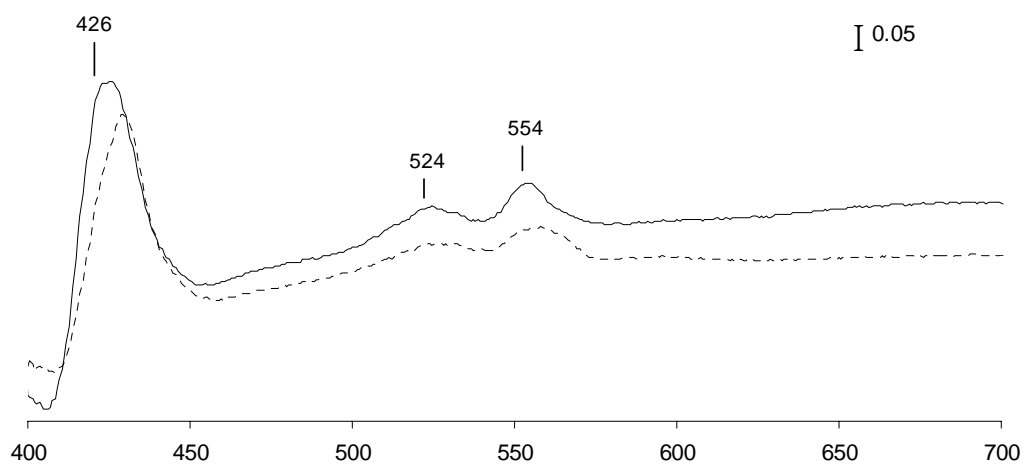
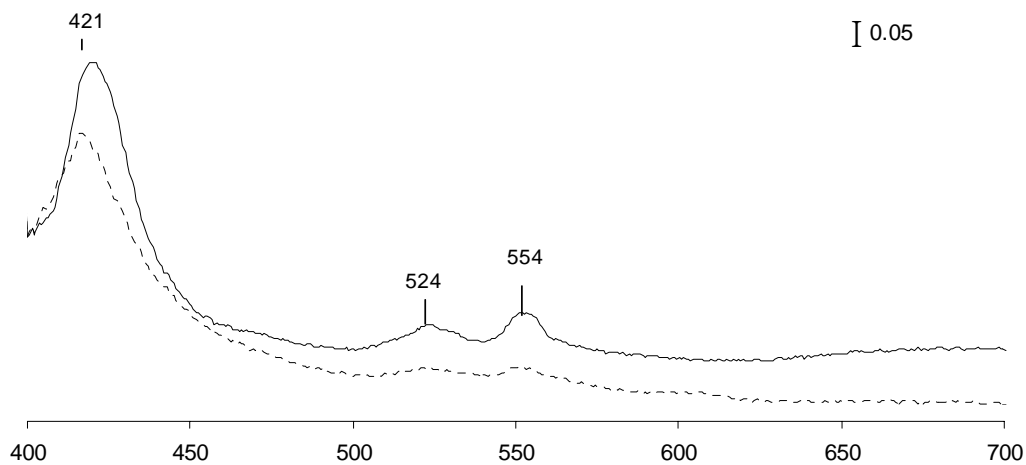


Fig. 13 Espectros diferenciales de membranas de (A) *Ga. diazotrophicus* PAL5 y (B) *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH. reducido con: (a) Ditionita + CN, (b) Glucosa, (c) Ditionita, (d) NADH (e) Etanol, , (f) Acetaldehído.

A



B



C

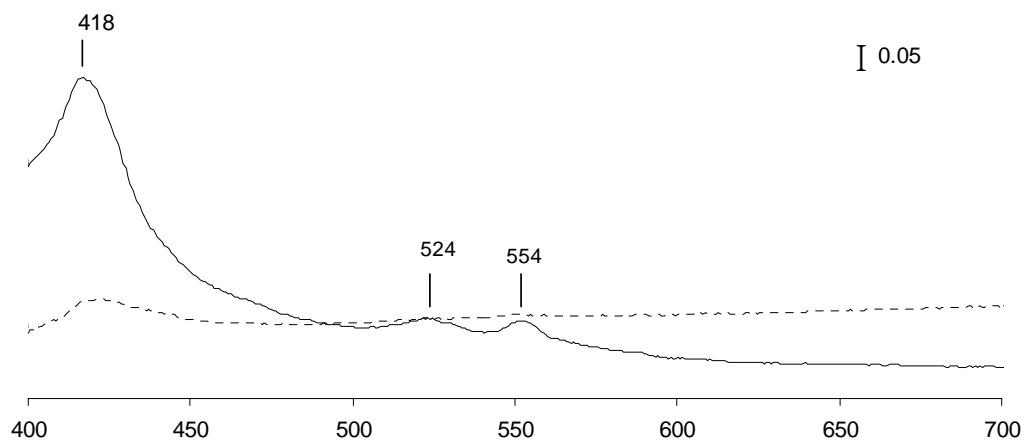


Fig. 14 Espectros diferenciales de solubilizados membranales con Tritón X 100 al 0.02% de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH (---) en comparación con la cepa silvestre (—). (A) Ditionita vs. Persulfato de amonio; (B) Acetaldehído vs. Persulfato de amonio y (C) Etanol vs. Persulfato de amonio.

6.6 Actividad de deshidrogenasas membranales

Las actividades reductoras de la PQQ-ADH, PQQ-ALDH y PQQ-GDH periplásmicas fueron medidas empleando PMS y DCPIP como aceptores de electrones; para PQQ-ADH y PQQ-ALDH se usó también el ferricianuro de potasio como aceptor de electrones; este último aceptor no es empleado para PQQ-GDH ya que esta enzima carece de citocromo *c* (Tabla 4). Se comparan las actividades obtenidas con membranas de las cepas mutantes PQQ-ADH (C6), *ccm-* MAd21 y la cepa silvestre PAL5 de *Ga. diazotrophicus*.

El PMS tiene la capacidad de recibir electrones desde quinoproteínas, interactuando directamente con la PQQ, o al menos en lugares de la enzima cercanos a este grupo prostético (Goodwin & Anthony, 1998) y puede a su vez reducir otros colorantes redox como el DCPIP. La actividad reductora de las quinohemoproteínas también puede ser medida con ferricianuro de potasio $[(K_3Fe(CN)_6)]$, que logra oxidar citocromos *c* tanto solubles como unidos a la membrana (Goodwin & Anthony, 1998). De acuerdo con ello, el ferricianuro puede recibir electrones entre otras fuentes, de los citocromos tipo *c* asociados a las deshidrogenasas tipo hemo-quinoproteínas (PQQ-ADH ó PQQ-ALDH, entre otras).

Los resultados obtenidos nos muestran que la actividad de PQQ-GDH medida con PMS-DCPIP, en ambos mutantes, fue menor a la que presenta la cepa silvestre PAL5. La mutante PQQ-ADH⁻ mostró una actividad equivalente al 40 % de la actividad de la cepa silvestre, mientras que la cepa mutante *ccm*-MAd21 presentó una actividad mucho menor, equivalente a el 23% de la actividad de la cepa PAL5 (Tabla 4A y Fig. 15A). Por otro lado, la actividad de PQQ-ALDH en cualquiera de los dos ensayos, mostró una disminución entre el 75 y 80 % (Fig. 13) en la mutante PQQ-ADH⁻, con respecto a la cepa silvestre PAL5. La actividad de esta enzima no fue detectada en la mutante carente de citocromo *c*, *ccm*-MAd21, en ninguno de los dos ensayos realizados.

A

	PAL5	Mutante PQQ-ADH⁻	Mutante <i>ccm</i>-Mad21
Glucosa	1.476*	0.6	0.342
Acetaldehído	2.263	0.55	0
Etanol	0.5	0	0

B

	PAL5	Mutante	Mutante

		PQQ-ADH ⁻	<i>ccm-Mad21</i>
Acetaldehído	16.5**	3.38	0
Etanol	17.48	2.34	0

Tabla 4. A. Actividad de deshidrogenasas periplásmicas (PQQ-GDH, PQQ-ADH y PQQ-ALDH) de *Ga. diazotrophicus* PAL5, mutante PQQ-ADH⁻ y mutante *ccm-Mad21* empleando PMS y DCPIP como aceptores de electrones.

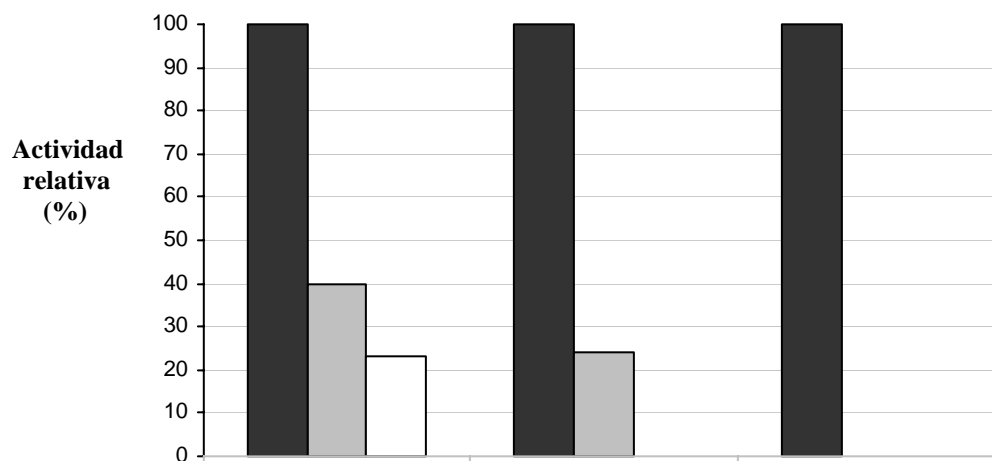
B. Actividad de deshidrogenasas membranales (PQQ-ADH y PQQ-ALDH) de *Ga. diazotrophicus* PAL5, mutante PQQ-ADH⁻ y mutante *ccm-Mad21* empleando Ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.

*La actividad está expresada en micromol mg⁻¹ min⁻¹.

**La actividad está expresada en micromol mg⁻¹ min⁻¹.

En cuanto a la actividad de PQQ-ADH, en la mutante *ccm-MAd21* no fue detectada en ninguno de los dos ensayos (Tabla 4). Aunque lo mismo se esperaba para el caso de la mutante PQQ-ADH⁻, únicamente en el ensayo de DCPIP y PMS la actividad no se detectó. En el ensayo de ferricianuro de potasio, fue equivalente al 13% de la actividad de la cepa silvestre PAL5. Basándonos en que los resultados obtenidos empleando PMS-DCPIP, donde no se detectó actividad de PQQ-ADH, podemos considerar que esta actividad no es representativa, ya que la técnica para medir la actividad de deshidrogenasas membranales empleando ferricianuro de potasio no es tan precisa como lo es con PMS-DCPIP. Por lo tanto, podemos decir que esa cepa carece de actividad de PQQ-ADH; este resultado es consistente con la falta de actividad respiratoria, al emplear etanol como sustrato, tanto en membranas como en células de esta mutante (Tablas 2 y 3).

A



B

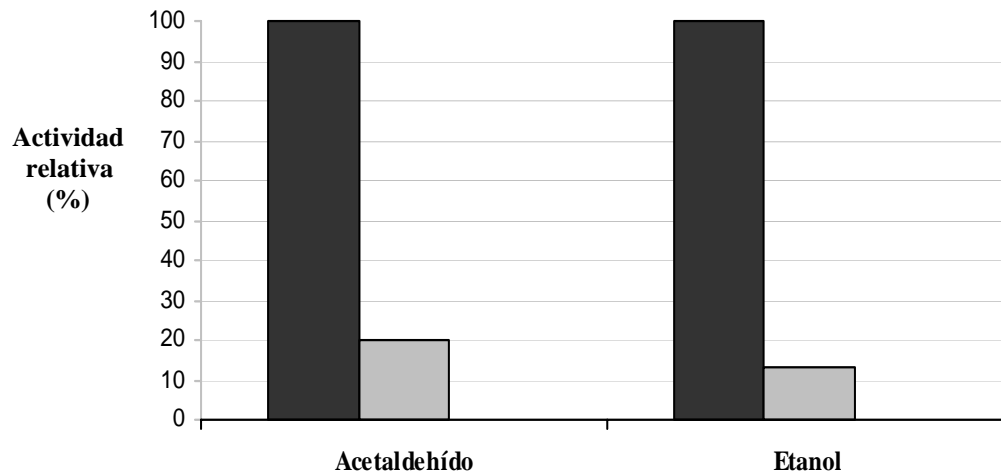


Fig.15. Actividad relativa (%) de deshidrogenasas periplásmicas en membranas de *Ga. diazotrophicus* PAL5 (barra de fondo negro), mutante PQQ-ADH (barra de fondo gris) y mutante *ccm*-MAd21 (barra de fondo blanco) empleando A) PMS y DCPIP y B) Ferricianuro de Potasio como aceptores de electrones.

La falta de actividad de ferricianuro-reductasa con etanol o acetaldehído en la mutante *ccm*-MAd21, apoya la ausencia de citocromos *c*, confirmando el fenotipo PQQ-ADH y PQQ-ALDH de esta mutante. Además, la ausencia de actividad con los mismos sustratos, usando PMS + DCPIP como aceptores de electrones, indicó que no solo los citocromos *c* están ausentes, sino que también, las actividades dependientes del PQQ de ambas enzimas están afectadas, y por tanto, si las subunidades ADH-I y ALDH-I están presentes, éstas no son funcionales. Por otra parte, los resultados encontrados en *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH, mostraron que la mutante solo carecía de la actividad dependiente de etanol, medida por cualquiera de los dos ensayos descritos, manteniendo la actividad de PQQ-ALDH; esta actividad representó el 40% de la registrada en la cepa silvestre. Esta aparente baja expresión de las actividades asociadas a la PQQ-ALDH en la

mutante PQQ-ADH⁻ es en parte debida a que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es una enzima de doble función, capaz de oxidar tanto etanol como acetaldehído, con cercana eficiencia (Gómez-Manzo, S., Tesis Doctoral, 2007). Al estar ausente la PQQ-ADH en la mutante PQQ-ADH⁻ la oxidación del acetaldehído corre solo a cuenta de la PQQ-ALDH, todavía presente.

Si bien no sabemos la razón de la disminución en la actividad de la PQQ-GDH en la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, se puede plantear que tanto la actividad de esta enzima como de la PQQ-ALDH en la cepa silvestre no son un factor limitante para la actividad respiratoria., ya que la actividad de oxidasa, utilizando como sustratos glucosa o acetaldehído, en ambas cepas, son prácticamente las mismas (Tabla 2). Estos resultados sugieren que para la actividad de las oxidasas, la actividad de PQQ-GDH y PQQ-ALDH, son suficientes en la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, para saturar la cadena de transporte de electrones.

6.7 Zimografía para citocromo *c*

Para determinar si la falta de actividad de PQQ-ADH en la cepa mutante PQQ-ADH⁻ se debía a la ausencia de citocromos tipo *c* (sus grupos prostéticos), se realizó un ensayo para la detección de estos citocromos por zimografía en un gel SDS-PAGE. Este ensayo basado en la actividad de peroxidasa inherente al grupo hemo de los citocromos, permite también, detectar los citocromos *c* de la membrana de *Ga. diazotrophicus* sin la interferencia de otros tipo de citocromos. Debido a que el citocromo *c* es el único cuyo hemo esta unido de manera covalente a la proteína. El tratamiento con β - Mercaptoetanol, SDS y calor, que se realiza en la electroforesis SDS-PAGE, provoca que aquellos hemos

que no están covalentemente unidos sean liberados y por tanto no son detectados. Así solo las bandas asociadas al citocromo *c* pueden ser observadas.

En los ensayos de zimografía en solubilizados membranales con Triton X 100 al 0.2%, observamos que los citocromos *c* asociados a la PQQ-ADH no están presentes en la mutante *ccm*-MAd21, como se esperaba, pero tampoco en la mutante PQQ-ADH⁻. Al teñir el mismo gel para proteínas, utilizando Coomassie Blue R 250, observamos las bandas esperadas para las dos subunidades de PQQ-ADH en la cepa silvestre (SI: 70 kDa y SII: 45 kDa), pero no fue así para la mutante PQQ-ADH⁻, ni para la mutante *ccm*-MAd21, carente de citocromos *c* (ver Fig.16). De acuerdo a los resultados obtenidos, se hace necesario determinar si las apoproteínas de ADH se encuentran presentes, tanto en la cepa PQQ-ADH⁻ como en la *ccm*-MAd21.

Anteriormente habíamos encontrado que en la mutante PQQ-ADH⁻, al reducir con ditionita, había presencia de citocromos *c*; sin embargo, al utilizar etanol como sustrato, no se observaba reducción (ver espectros “reducido menos oxidado”, Fig. 14A y 14B); Existe la posibilidad de que los citocromos *c* que observamos reducidos con ditionita pertenezcan a la PQQ-ALDH.

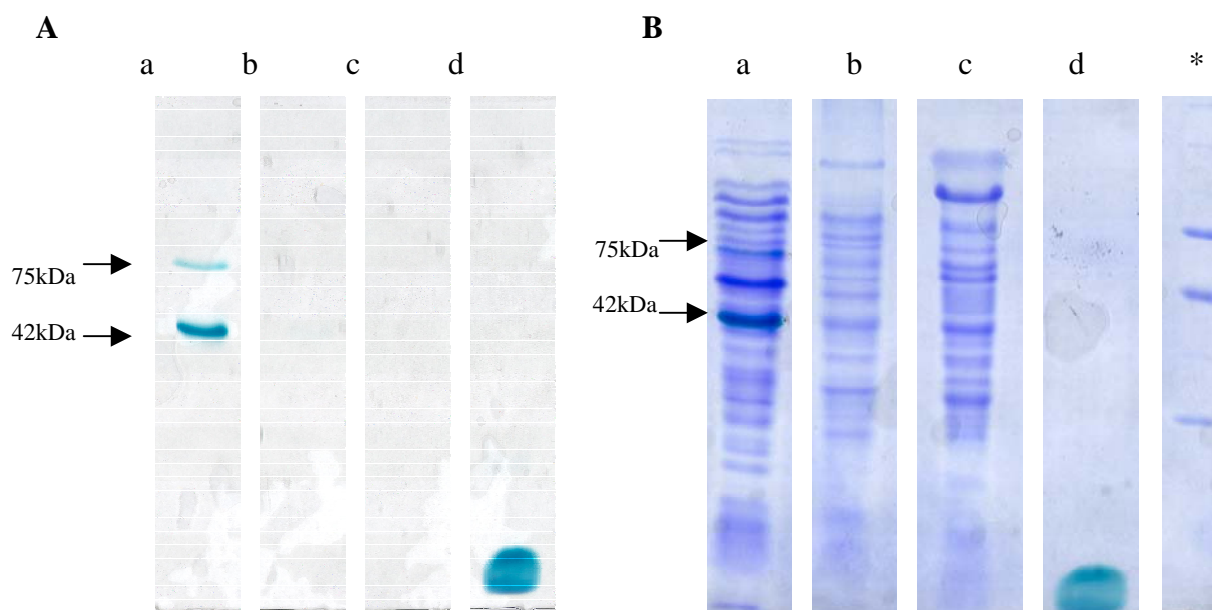


Fig. 15. (A) Zimografía en SDS-PAGE para citocromo *c* de solubilizados membranales con Triton X 100 al 0.2% de *Ga. diazotrophicus* (a) PAL5, (b) mutante PQQ-ADH y (c) *ccm*-MAd21, empleando (d) citocromo *c* de caballo como control de la zimografía (10µg). (B) El mismo gel teñido con Coomassie Blue R 250 después de hecha la reacción, (*) Marcador de peso molecular. Los carriles con las diferentes muestras contienen 240µg de proteína de solubilizados membranales.

Hasta este punto, podíamos concluir que la enzima PQQ-ADH de la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH, carecía de los citocromos *c* en ambas subunidades, y probablemente también del grupo PQQ, ya que no fue posible determinar la actividad de etanol-PMS-DCPIP-reductasa, que es dependiente de la presencia de PQQ (ver Tabla 4A). Con estos resultados, la ausencia de actividad de etanol-oxidasa es explicable, ya que ninguno de los grupos prostéticos encargados del transporte de electrones en esta enzima están presentes.

La ausencia de los grupos prostéticos despertó la inquietud de conocer si la porción proteica estaba presente o no en el mutante PQQ-ADH. La ausencia de actividades y grupos prostéticos podrían ir de la mano con la posible ausencia de una o ambas de las subunidades que conforman esta proteína (ADH-SI y ADH-SII). Para evaluarlo, decidimos realizar un ensayo de Inmunodetección de la PQQ-ADH en el mutante PQQ-ADH.

6.8 Inmunodetección de la PQQ-ADH

El análisis de inmunodetección de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* se llevó a cabo sobre solubilizados membranales con Triton X 100 al 0.2 % de la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH. Para ello empleamos un antisuero de conejo contra la PQQ-ADH completa de la cepa silvestre, purificada en el laboratorio (Gómez-Manzo, S., Tesis doctoral, 2007) y realizamos el ensayo comparativo sobre la cepa silvestre PAL5 y el mutante *ccm*-MAd21, como control. Para discernir la presencia de ambas subunidades por separado, el ensayo fue llevado a cabo a partir de un gel SDS-PAGE. Esto nos permitiría conocer si había alguna alteración en la estructura cuaternaria de la enzima.

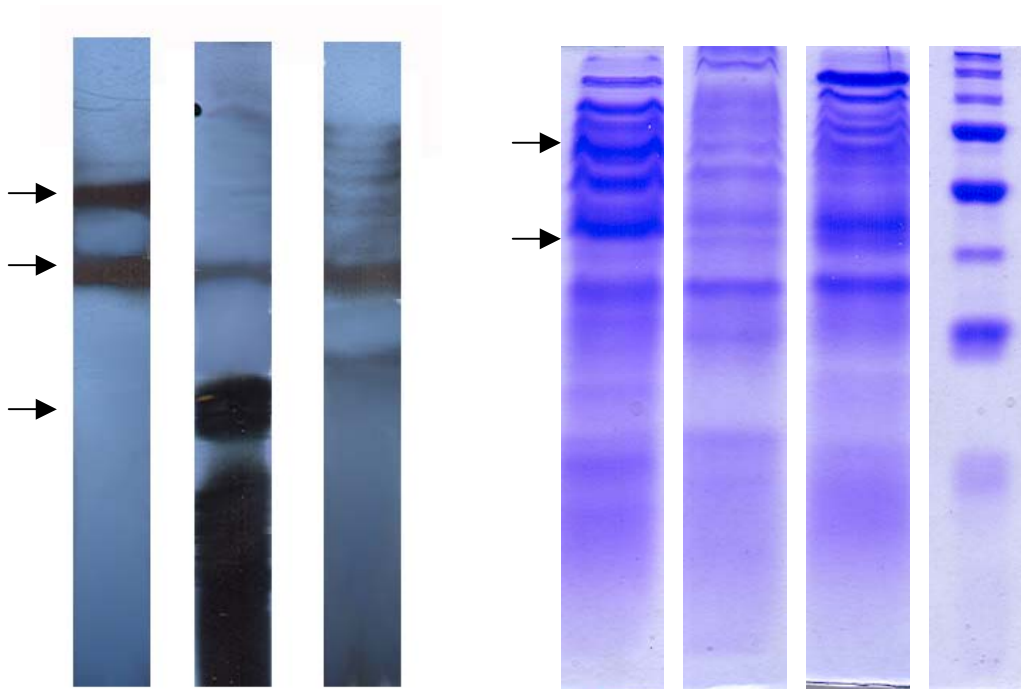


Fig. 16. A. Inmunodetección de la PQQ-ADH en solubilizados membranales con Triton X 100 al 0.2% de *Ga. diazotrophicus* (a) PAL5, (b) *ccm-MAd21* y (c) mutante PQQ-ADH⁻ crecida en presencia de alcohol alílico (2mM); **B.** el mismo gel teñido con Coomassie Blue R 250 (*) Marcador de peso molecular. Cada muestra fue cargada con 21 µg de proteína de solubilizados membranales.

La secuencia encontrada coincidió con secuencias de OMPs en *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sodalis glossinidius* y *Proteus mirabilis* (Tabla 5), todas ellas bacterias Gram negativas (Bornet *et al.*, 2004). Entre las OMP'S, las porinas son una clase específica de proteínas encargadas del transporte de moléculas a través de la membrana externa de bacterias Gram negativa (Godfrey & Bryan, 1987). Agentes nocivos tales como antibióticos y ácidos biliares pueden excretarse a través de estas proteínas (Harder, Nikaido & Matsuhashi, 1981). Debido a la acumulación de alcohol alílico en el espacio periplásmico, es probable que la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ pudiera expresar una porina para excretarlo al medio.

Acceso	Proteína	Organismo	Score
--------	----------	-----------	-------

Q99123_ENTAE	Proteína de membrana externa II	<i>Enterobacter aerogenes</i>	82
1OSMA	Ompk36, cadena A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
Q2NU93_SODGM	Proteína de Membrana externa F	<i>Sodalis glossinidius</i> (línea <i>morsitans</i>)	82
Q9R659_PROMI	Proteína de membrana externa OMPA=39 kDa	<i>Proteus mirabilis</i>	79

Tabla 5. La tabla muestra las diferentes proteínas con las que coinciden segmentos internos secuenciados por espectrometría de masas de una banda de 32 kDa de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH. La identificación de los péptidos se determinó con el programa Mascot Search. Se muestra el número de acceso de cada proteína encontrada en la base de datos, el tipo de proteína que es, así como el organismo al que pertenece y el score obtenido, al compararlas con péptidos internos de la banda de la mutante PQQ-ADH. Un score > 55 indica identidad o gran homología.

Pensando que el alcohol alílico pudiera ser un factor de “stress” para la bacteria, el cual indujera la producción de porinas en la membrana externa, decidimos crecer a la bacteria en Caldo Nutriente con sacarosa al 5% sin añadir alcohol alílico. La banda de 32 kDa se redujo de manera notable. Sin embargo otras bandas de bajo peso molecular permanecieron (Fig. 17). Es muy probable que las proteínas tipo porina que encontramos en el mutante efectivamente se deban a la presencia de alcohol alílico, sin embargo faltaría dilucidar la naturaleza de las bandas restantes.

El hecho de que el antisuero producido en contra de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* haya reaccionado con una banda que contiene aparentemente una porina

probablemente sea debido a que ambas proteínas posean dominios de unión a membrana con secuencias parecidas y por tanto, reconocidas por el antisuero-PQQ-ADH.

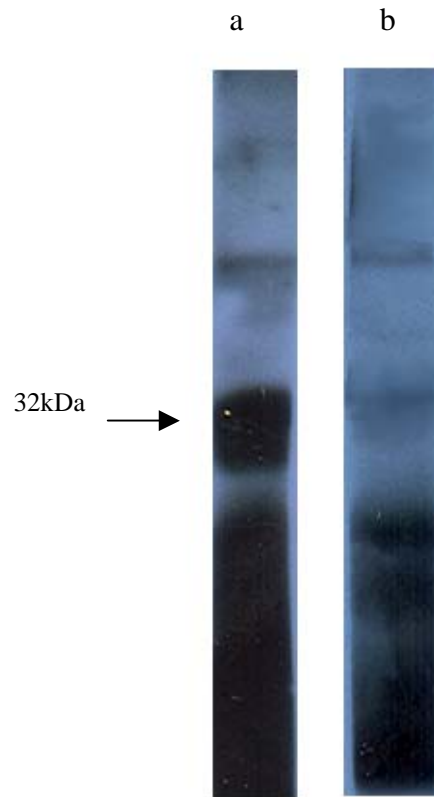


Fig. 17. *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH crecida en Caldo Nutritivo con sacarosa al 5% en a) presencia de alcohol alílico (2mM) y b) en su ausencia. Se empleó 21 μ g de proteína de solubilizado membranar con Triton X 100 al 0.2%

VII. DISCUSIÓN

7.1 De cómo la ausencia de PQQ-ADH no tiene efecto en la fijación de nitrógeno de *Ga. diazotrophicus*.

Ga. diazotrophicus es una bacteria capaz de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). La fijación de nitrógeno es llevada a cabo por la nitrogenasa, un complejo enzimático que transforma el nitrógeno atmosférico en amonio, una fuente nitrogenada utilizable en el metabolismo. La nitrogenasa es sumamente sensible al oxígeno, inactivándose irreversiblemente. Se ha reportado que *Ga. diazotrophicus* es capaz de llevar a cabo la fijación de nitrógeno en condiciones de alta aeración, bajo un proceso llamado “protección respiratoria” (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). La alta tasa respiratoria es la responsable de consumir el oxígeno en la interfase membranal, impidiendo que su concentración sea alta en el medio intracelular y protegiendo así a la nitrogenasa. Así mismo, la alta tasa respiratoria provee las condiciones adecuadas para la generación de ATP por medio de la fosforilación oxidativa. La fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente costoso, pues se requieren de 16 a 18 moléculas de ATP por molécula de N₂ fijado.

Bajo la “protección respiratoria”, la mayor aereación en cultivos favorece de manera lineal una mayor actividad diazotrófica. En una publicación previa (Flores-Encarnación, 1999), nuestro laboratorio demostró que existe una respuesta lineal de la fijación de N₂ con el incremento de la aereación, cuando menos hasta un valor ensayado de 4.0 l de aire por min/ l de medio, nivel de aereación que fue equivalente a un valor del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) al medio, de 145 mmol de O₂ l⁻¹h⁻¹. Se determinó que K_{La} altos, lejos de inhibir a la nitrogenasa, promueven la fijación de nitrógeno (Flores-Encarnación, 1999).

La mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, mostró tener tasas de consumo de O₂ y una curva de crecimiento, muy similares a las de la cepa silvestre, incluso en un medio en donde para sostener el crecimiento la bacteria debe fijar nitrógeno (LGIP modificado), ya que contiene cantidades limitadas de amonio (1 mM). Este resultado sugiere que esta mutante es capaz de llevar a cabo la “protección respiratoria” y por lo tanto la fijación de

nitrógeno a niveles comparables con la cepa silvestre (Lee *et al.*, 2004). En medios donde la fuente de carbono es únicamente la glucosa, como es el medio LGIP modificado, se ha reportado que la PQQ-GDH es la deshidrogenasa que más participa en el consumo de O₂. Sin embargo, la actividad de otras deshidrogenasas también puede contribuir en la “protección respiratoria”. De acuerdo a nuestros resultados, la PQQ-ADH, que sin duda puede participa en este proceso, no resulta indispensable en las mutantes *ccm*-MAd carentes de PQQ-ADH y PQQ-ALDH, ó en la PQQ-ADH⁻. En estas mutantes, es probable que las otras quino-hemoproteínas presentes se encarguen de la “protección respiratoria” y las células fijen cantidades normales de N₂ en medios de cultivo con glucosa o sacarosa como únicas fuentes de carbono (Lee *et al.*, 2004). También, hemos determinado que a pesar que las actividades de deshidrogenasas en las mutantes *ccm*-MAd ó en la PQQ-ADH⁻, son bastante inferiores a las actividades correspondientes en la cepa silvestre, son suficientes para promover una actividad de oxidasas comparables a la de esta última cepa.

7.2 De cuál es la función de la PQQ-ADH en la vía resistente a cianuro de la cadena respiratoria.

Los resultados de inmunodetección indican que la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ posee una alcohol deshidrogenasa defectuosa cuya subunidad mayor (SI) no parece sintetizarse ó de hacerlo, no se integra a la membrana. Esta condición resulta en la incapacidad de la enzima para oxidar etanol y por tanto, de inyectar electrones a la cadena respiratoria. También, la inmunodetección mostró que la subunidad II está presente, aunque en menor concentración y, de acuerdo a los resultados de la zimografía, carece de los citocromos *c*, sus grupos prostéticos.

De acuerdo a K. Matsushita y colaboradores (1994), uno de los citocromos *c* de la subunidad II de la PQQ-ADH en *G. suboxydans*, podría ser un elemento fundamental en la vía resistente a cianuro, en la cadena respiratoria de dicha bacteria. Si este mismo argumento, fuera cierto para *Ga. diazotrophicus*, la mutante PQQ-ADH⁻, que carece de

todos citocromos de la subunidad II, debería exhibir una respiración altamente sensible a cianuro mostrando una cinética de inhibición con un solo componente.

Nuestros resultados mostraron que este no es el caso. La titulación de células enteras y membranas de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH con KCN, continuaron mostrando dos componentes cinéticos; una oxidasa altamente sensible a KCN y otra resistente al inhibidor. Ambos componentes contribuyen en la misma proporción a la capacidad respiratoria total tanto en esta cepa, de la misma manera que ocurre en la silvestre, con cualquiera de los diferentes sustratos empleados. De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que los citocromos *c* de la subunidad II de la PQQ-ADH no son un componente obligado en la vía respiratoria resistente a cianuro en *Ga. diazotrophicus*.

De hecho, ninguno de los citocromos *c* involucrados en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* parece participar en la respiración resistente a cianuro. En un trabajo anteriormente publicado en el laboratorio, reportamos que la cadena respiratoria de la mutante *ccm*-MAd de *Ga. diazotrophicus*, carente de todos los citocromos *c*, inclusive los que se encuentran como grupos prostéticos de la PQQ-ALDH, no presenta cambios en la sensibilidad a cianuro (González *et al.*, 2006). En este mismo trabajo se reportó que el crecimiento en etanol como única fuente de carbono, que es una condición en la que se sobreexpresa la PQQ-ADH, lo que conlleva la sobreexpresión de citocromos *c*, presenta cinéticas de inhibición con cianuro prácticamente idénticas a las de la cepa silvestre. Con estos resultados podemos afirmar que ninguna de las deshidrogenasas que contienen citocromo *c*, la PQQ-ADH y la PQQ-ALDH, presentes en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, funcionan como un elemento indispensable en la vía resistente a cianuro.

Así la PQQ-ADH queda como una deshidrogenasa que tiene como función donar electrones a la cadena respiratoria a través de la oxidación de diferentes alcoholes y aldehídos. Esta enzima entrega los electrones directamente a la quinona endógena. Y su función como *bypass* (ruta de desviación) entre la quinona endógena y la oxidasa terminal de la vía resistente a cianuro queda descartada en esta bacteria.

7.3 Acerca de la biogénesis de la PQQ-ADH en *Ga. diazotrophicus*

La falta de la subunidad I de la PQQ-ADH en la membrana de la mutante PQQ-ADH⁻ es un hallazgo importante en la biogénesis de esta enzima. Al parecer no es necesario que la holoproteína esté completamente ensamblada antes de asociarse a la membrana plasmática. El ensayo de inmunodetección de la enzima mostró que en la membrana de la mutante PQQ-ADH⁻ esta presente la subunidad II, lo que indica que dicha subunidad es capaz de asociarse a la membrana de manera independiente sin que sea necesario su unión previa a la subunidad I. Esto podría sugerir el orden en que la enzima es ensamblada y unida a la membrana. El primer paso de la secuencia o evento independiente, podría ser la unión de la subunidad II a la membrana.

Como se menciona en Antecedentes, la subunidad II funcional de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* posee tres citocromos *c* y al menos dos de ellos parecen funcionar como acarreadores de electrones desde la subunidad II hasta la Q₁₀ membranar. Según el ensayo de zimografía, la subunidad II de la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ no contiene ninguno de los citocromos *c*. Pese a ello, la asociación de la subunidad II de la enzima a la membrana ocurre, mostrando no estar condicionado este evento por la presencia de los citocromos *c* en esta porción proteica.

Alternativamente podría pensarse que los citocromos *c* se incorporan después de que la SII se une a la membrana en el proceso de biogénesis de la PQQ-ADH, y posterior al plegamiento de esta subunidad. La solubilización de la enzima con bajas cantidades de detergente (Triton X 100 al 0.2%), sugieren que la enzima está asociada débilmente a la membrana, y no embebida en ésta a través de dominios trans-membranales. Si no fuese así, necesariamente la incorporación de citocromo *c* tendría que ocurrir antes de la asociación de la subunidad II a la membrana.

En la mutante *ccm*-Mad21, como se esperaba, no hay presencia de citocromos *c* de acuerdo al zimograma. Este resultado esta de acuerdo con lo reportado en un artículo previo (Lee *et al.*, 2004), donde se concluye que esta mutante está afectada en la biogénesis de este tipo de citocromos. Por otra parte, esta misma mutante posee únicamente la subunidad II de

la PQQ-ADH, en una cantidad ligeramente menor a la de la cepa silvestre. Estos resultados apoyan las conclusiones a las que llegamos con la mutante PQQ-ADH⁻. Es decir, la SII puede unirse a la membrana de manera independiente, sin que la holoproteína este ensamblada completamente; además, aportan información adicional sobre los citocromos *c*. La subunidad II puede asociarse normalmente a la membrana, a pesar de que los citocromos *c* no son sintetizados.

Es probable que la mutación en *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ este relacionada con los genes estructurales, ya que el único componente afectado en la cadena respiratoria resulta ser la enzima PQQ-ADH. Los grupos prostéticos que la conforman están presentes en otras enzimas de la cadena respiratoria de esta bacteria. La obtención de la secuencia de esta enzima aportará información sobre el daño que existe en dicha enzima en el mutante. Es probable que la ausencia de citocromo *c* en la subunidad II se deba a una mutación que impida que estos citocromos se incorporen. Aunado a ello, la ausencia de la subunidad I también podría deberse a una mutación en la porción que codifica para esta subunidad, o bien que sea incapaz de asociarse a la subunidad II.

El hecho de que la subunidad I este ausente también en el mutante *ccm*-MAd21, nos permite postular que en ausencia de los citocromos *c*, ninguna de las dos subunidades puede alcanzar la conformación adecuada para que puedan interactuar entre ellas y por tanto, la SI no se encuentre en la membrana. En todo caso será necesario conocer la secuencia de los genes estructurales en la cepa silvestre y cepas mutadas para alcanzar conclusiones seguras. Aunque todavía no se ha secuenciado el operón que codifica para la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, los genes estructurales de diversas bacterias ácido acéticas han sido secuenciados. Se observó que los genes que codifican para las subunidades I y II están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura formando un operón (Kondo & Horinouchi, 1997). Si este fuera el caso de *Ga. diazotrophicus* es posible que parte de la subunidad I de la PQQ-ADH de la mutante *ccm*-MAd21 sea codificada, pues se observan niveles normales de SII. Probablemente ambas subunidades sean incapaces de asociarse debido a una conformación tridimensional deficiente, debida a la ausencia de citocromo *c*. En este caso la presencia de este grupo

prostético podría vislumbrarse como determinante en el plegamiento correcto, y por lo tanto la correcta función, de la enzima. Una vez obtenida la secuencia de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, trabajo que actualmente se está llevando a cabo en nuestro laboratorio, será posible determinar sin lugar a dudas si este postulado es correcto.

VIII. CONCLUSIONES

- La mutante C6 PQQ-ADH⁻ de *Ga. diazotrophicus* carece de actividad de PQQ-ADH.
- La mutante C6 PQQ-ADH⁻ de *Ga. diazotrophicus*, expresa otras quinoproteínas (PQQ-GDH) y quinohemoproteínas (PQQ-ALDH).
- Los niveles de deshidrogenasas de aldehído y glucosa en el mutante *Ga. diazotrophicus* C6 PQQ-ADH⁻ están muy disminuidos en comparación a los que se encuentran en *Ga. diazotrophicus* PAL5.
- A pesar de este resultado, la capacidad respiratoria de el mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ con glucosa y aldehído es cercana a la de *Ga. diazotrophicus* PAL5.
- El análisis espectrofotométrico en el mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ confirma que el etanol no es capaz de reducir a la cadena respiratoria. Sin embargo, la composición de citocromo *b* y *a* no está afectada y, glucosa y acetaldehído continúan reduciendo a la cadena respiratoria completa, como sucede en la cepa silvestre.
- El análisis inmunológico revela que la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻ carece de la subunidad catalítica de la PQQ-ADH y contiene poca cantidad de la SII en comparación a la cepa silvestre. A cambio presenta niveles muy elevados de tres proteínas inmunoreactivas más pequeñas.
- Una de las proteínas inmunoreactivas encontradas en el análisis inmunológico, parece ser una proteína de membrana externa (OMP) tipo porina, probablemente expresada en respuesta a la presencia del alcohol alílico.
- La mutante *ccm*-MAd21, de la misma manera que la mutante PQQ-ADH⁻, carece de la subunidad catalítica de PQQ-ADH, aunque presenta niveles casi normales de la

SII en membranas. Puede concluirse que la mutación en la biogénesis de citocromo *c* no afecta la incorporación de la SII a la membrana, aunque posiblemente si afecta la asociación de ambas subunidades.

- La sobreexpresión o la ausencia de la PQQ-ADH en la mutante de *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, no altera la cinética de inhibición por KCN en la actividad de las oxidasas.
- En *Ga. diazotrophicus*, los citocromos *c* que son los grupos prostéticos de las PQQ-ADH y PQQ-ALDH, no están involucrados en la respiración resistente a KCN.
- Es probable que la mutación en *Ga. diazotrophicus* C6 PQQ-ADH⁻ este relacionada con los genes estructurales de la PQQ-ADH⁻, ya que el único componente afectado en la cadena respiratoria es la proteína por sí misma, y no sus grupos prostéticos.

IX. ANEXO

10.1 PBS 10X

IX. ANEXO

10.1 PBS 10X

NaCl80g
KCL.....2g
Na₂HPO₄.....11.49g
KH₂PO₄.....2g
Para 1L de solución

10.2 PBS-tween 20 (0.05%)

Tween 20.....0.05ml
PBS 1X.....100ml

10.3 PBS-tween 20 (0.05%)- BSA 3%

Tween 20.....0.05ml
Albúmina de suero bovino.....3 mg
PBS 1X.....100ml

10.4 PBS-tween 20 (0.05%)- BSA (1mg/ml)

Tween 20.....0.05ml
Albúmina de suero bovino.....100mg
PBS 1X.....100ml

X. ABREVIACIONES

ADH Alcohol deshidrogenasa

ALDH Aldehído deshidrogenasa

ccm- MAd21 Cepa mutante de *Ga. diazotrophicus*, obtenida por mutación al azar con el transposón Tn5, que tiene la característica de carecer de citocromos *c* debido a mutaciones en los genes que intervienen en su biogénesis. (Lee, *et al.*, 2004).

DCPIP Diclorofenolindofenol

GDH Glucosa deshidrogenasa

KCN Cianuro de potasio

LGIP Medio de cultivo

NADHDH NADH deshidrogenasa (Nicotidamina adenina dinucleótido deshidrogenasa)

PAL5 Cepa silvestre de *Ga. diazotrophicus* PAL5 ATCC49037

PQQ Pirroloquinolina quinona

PMS Metasulfato de fenazina

XI. REFERENCIAS

1. **Adachi O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Ameyama, M.** 1978a. Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* **42(12)**: 2331-2340.
2. **Adachi O., Tayama, K., Shinagawa, E. and Ameyama, M.** 1978b. Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* **42(11)**: 2045-2056.
3. **Ameyama, M. and Adachi, O.** 1982. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 450-457.
4. **Anraku, Y. and Gennis B.** 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 262-266.
5. **Baldani V.L.D., Baldani J.I. and Döbereiner J.** 2000. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *herbaspirillum seropediaceae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soil.* **30**: 485-491.
6. **Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. and Bottini, R.** 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 y A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropediaca* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* **24**:7-11.
7. **Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis, and J. Döbereiner.** 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil.* **137**: 111-117.
8. **Bornet, C., Saint, N., Fetnaci, L., Dupont, M., Davin-Régli, A., Bollet, C. and Pages, J.M.** 2004. Omp35, a New *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. *Antimicrob. Agents chemother.* **48**: 2153-2158.
9. **Cavalcante, V. A. and Döbereiner, J.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.
10. **Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, A. C. and Döbereiner, J.** 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 23-31.
11. **Del Arenal, I.P., Contreras, M.L., Slateorova, B.B., Rangel, P., Leedias, F., Dávila, J.R. and Escamilla, J.E.** 1997. Haem O and putative cytochrome bo in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. *Arch. Microbiol.* **167**: 24-31.

12. **De Ley J., M. Gillis, J. Swings.** 1984. Family VI. *Acetobacteraceae*, p. 267-278. In Krieg N. R., Holt J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
13. **Drozd, J. and Postgate R. J.** 1970. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73
14. **Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I. P., Zarzoza, G, and V. Linares.** 1987. Expresión of cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73.
15. **Escamilla, J.E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M. and Flores L.M.** 1999. Los sistemas respiratorios bacterianos. *Mensaje bioquímico.* **XXIII**: 67-103.
16. **Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G.A., Baca, B.E., and J.E. Escamilla.** 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* **181**: 6987-6995.
17. **Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* **154**:145-150.
18. **Fuentes-Ramírez, L. E., Jiménez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R. and Caballero-Mellado, J.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*. **154**:145-150.
19. **Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J.** 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1305-1314.
20. **Fuentes R., L. E., Tapia H., A., Jiménez S., T., Mascarúa E., M.A., Santoyo P., Y., Caso V., L. R., Romero H., H. T., Cajica E., M. del R., León B., D., Rosales P., M., Fügemann M., P. y Castillo R., M.G.** 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas. *Elementos.* **49**: 47-51
21. **Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J., and De Ley, J.** 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:361-364.

22. **Gómez Manzo, Saúl**, 2007. Papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Tesis doctoral. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
23. **Gómez, S., Arreguín, R., Contreras, M. y Escamilla, E.** 2005. Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, UNAM. D.F., México. **8**: 28-37.
24. **Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., Gonzáles-Valdés, A., Sosa Torres, M., Arreguín-Espinosa, R. and Escamilla-Marván, E.** 2007. The PQQ-Alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Internacional Journal of Food Microbiology*. (en prensa).
25. **Gonzales, B., Martínez, S., Chávez, J.L., Lee, S., Castro, N.A., Domínguez, M.A., Gómez, S., Contreras, M.A., Kennedy, C. and Escamilla, J.E.** 2006. Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Bioquim. Biophys. Acta.* **1757 (12)**: 1614-1622.
26. **Goodwin, P.M. and Anthony, C.** 1998. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* **40**:1-80.
27. **Hill, S.** 1998. How is nitrogenase regulated by oxygen?. *FEMS Microbio. Lett.* **54**:111-130.
28. **Herlache, T. C., Kent, A. D., Riggs, P., Iñiguez, A., Chelius, M. K., and Triplett, E. W.** 2000. The *Gluconacetobacter diazotrophicus* genome project. 17th. North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. Quebec, Canadá. Abs. p. 82.
29. **Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi M. and Yano K.** 1989. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **171(6)**: 3115-3122.
30. **Jünemann, S.** 1997. Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1321**: 107-127.
31. **Jiménez-Salgado, T., Aparicio Fabrè, R. y Caballero-Mellado, J.** 1994. Detección de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba.
32. **Kinter, M., Sherman, N. E.** 2000. In *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, Desiderio, D. M., Nibbering, N. M. M. Eds; John Wiley-Interscience, Inc. New York. pp. 147-165.

33. **Kobayashi, Y., Takahashi, I., and Nakae, T.** 1982. Diffusion of β -lactam antibiotics through liposome membranes containing purified porins. *Antimicrob. Agents chemother.* **22**:775-780.
34. **Kondo, K. and Horinouchi, S.** 1997. Characterization of the genes encoding the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurians*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1131-1138.
35. **Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M. and Kennedy, C.** 2000. Characterization of a major cluster of nif, fix, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* **182**:7088-7091.
36. **Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., García-Flores, L., Escamilla-Marván, J.E., Kennedy C.** 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains mutated in cytochrome *c* biogenesis genes. *Journal Bacteriology.* **186**:5384-5391.
37. **Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M.** 1998. Principles of biochemistry, 2nd edition. Chapter 18, Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Worth Publishers. United States of America.
38. **Li, R. P. and MacRae, I. C.** 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* **23**:999-1002.
39. **Lisdiyanti, P., Kwasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchinura, T. and Komagata, K.** 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(3):813-8.
40. **Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tolber, N.E. and Bieber L.L.** 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein sample: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* **72**: 296-303.
41. **Matsushita, K., Sinagawa, E., Adachi, O. and Ameyama, M.** 1981. Spheroplast of acetic acid bacteria *Agric. Biol. Chem.* **45**(6): 1515-1518
42. **Matsushita, K., Ebisuya, H. and Adachi, O.** 1992. Homology in the structure and the prosthetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, cytochrome *a1* and cytochrome *o*, of *Acetobacter aceti*. *J Biol Chem.* **267**(34):24748-53.
43. **Matsushita, K., Toyama, H. and Adachi, O.** 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301.
44. **Matsushita, K., Yakushi, T., Takaki Y., Toyama H. and Adachi O.** 1995. Generation mechanism and purification of an inactive form convertible in vivo to

the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology*. p. 6552-6559.

45. **Matsushita, K., Yakushi, T. Toyama, H., Shinagawa, E. and Adachi, O.** 1996. Function of multiple heme *c* moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome *c* complex of *gluconobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* **271**: 4850-4857.
46. **Ng T.C.N., Laker, A.N. and Marer R.J.** 1995. Cloning, sequencing and mutagenesis of the cytochrome C4 gene from *Azotobacter vinelandii*. Characterization of the mutant strain and a proposed new branch in respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1230**: 119-129.
47. **Nikaido, H., Rosenberg, E.Y. and Foulds, J.** 1983a. Porin channels in *Escherichia coli* studies with β -lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* **153**:232-252.
48. **Nikaido, H. and Rosenberg, E.Y.** 1983b. Porins channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* **153**:241-252.
49. **Nikaido, H.**, 2003, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **67**: 593-656.
50. **Poole, R. K. and Cook G.M.** 1997. Respiratory protection on nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*-roles of the terminal oxidases. *Biosci.Rep.* **17**:303-317.
51. **Salles J.F., Gitahy, P.M., Skot, L. and Baldani J.I.** 2000. Use of endophytic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Braz. J. Microbiol.* **31**: 155-161.
52. **Sevilla, M., Meletzus, D., Teixeira, K., Lee, S., Nutakki, A., Baldani I., and Kennedy, C.** 1997. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol. Biochem.* **29**:871-874.
53. **Stephan, M. P., M. Oliveira, K. R. S. Teixeira, G. Martínez-Drets, and J. Döbereiner.** 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:67-72.
54. **Sunhee, L., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., García-Flores L., Escamilla, J.E. and Kennedy, C.** 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. *J. Bacteriol.* **186 (16)**: 5384-5391
55. **Swings, J.** 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Vol. III. Springer-Verlag, New York, N. Y. p. 2268-2286

- 56. Tayama, H., Fukawa, M., Okumura, H., Kawamuri, Y., and Beppu, T.** 1989. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 181-185
- 57. Teixeira, K. R. S., M. Wülling, T., Morgan, R., Galler, E. M. Zellermann, J. I., Baldani, C., Kennedy, and D. Meletzus.** 1999. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:521-530.
- 58. Thomas, P.E., Ryan, D. and Levin, W.** 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry.* **75 (1)**: 168-176.
- 59. Toyama, H., Mathews, F.S., Adachi, O. and Matsushta, K.** 2004. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase: structure, function, and physiology. *Arch. Biochem. Biophys.* **428(1)**: 10-21.
- 60. Urquiaga, S., Cruz, K.H.S. and Boddey, R.M.** 1992 Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil. Sci. Am. J.* **56**: 105-114.
- 61. Young J. P. W.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism. In G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, London, U.K. pp. 43-86.
- 62. Yamada Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T.** 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**:1244-1251.
- 63. Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T.** 1998. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:327-328.
- 64. Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T. and Komagata, K.** 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**:823-829.