



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA ALCOHOL DESHIDROGENASA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*:
ÁNÁLISIS “IN SILICO” DE LA PROTEÍNA Y
SECUENCIA PARCIAL DEL OPERON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

HIRAM MASSA ANAYA.



TUTOR: DRA. MARTA LUCINDA CONTRERAS ZENTELLA

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Massa
Anaya
Hiram
57 04 56 15
Universidad Nacional Autonoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
096352032

2. Datos del tutor

Dra.
Martha Lucinda
Contreras
Zentella

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Juan Luis
Chávez
Pacheco

6. datos del sinodal 4

M en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

7. Datos del trabajo

La alcohol deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Análisis "in silico"
de la proteína y la secuencia parcial del operon.
92 p.
2009.

Agradecimientos.

Agradesco a la **vida** por quererme tanto, a **Dios** por permitirme terminar un ciclo y a la **luz de mis ojos** que siempre estuvo ahí en mi mente regalándome tantas y tantas sonrisas, así como lágrimas **MJMH**.

Agradesco a las canas verdes, a la gastritis, pero aún mas a la paciencia que la Doctora **Martha L. Contreras Zentella** tuvo conmigo, ayudándome con mucho esfuerzo a construir esta tesis.

Agradesco a **J.R.R. Tolkien, Allan Poe, Herman Hesse, Michael Ende**, que con sus escritos me permitieron seguir adelante día a día, sin claudicar.

Agradesco a el Doctor **Edgardo Escamilla** por su tolerancia y paciencia que mostró conmigo, y mas aún, por permitirme estar alejado de momentos tan difíciles en mi vida, ofreciéndome un refugio a mi cruda realidad.

Muchos pensaran que las frases plasmadas en estos agradecimientos son vacias, sin sentido, o mofas pueriles, pero en verdad os digo, "*gracias por estar, sin estar, por simplemente asomarse a la ventana a ver florecer esté trabajo que és, más que mio, suyo.*"

Con mucho cariño "el pequeño pescador de sueños".

Massa Anaya Hiram.

INDICE

I. Introducción

1. Bacterias acéticas.
2. *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
3. La cadena respiratoria.
4. Las PQQ- deshidrogenasas.
5. Las PQQ-Alcohol deshidrogenasas.
6. Las PQQ-Alcohol deshidrogenasas tipo III.

II. Antecedentes

1. El sistema respiratorio de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
2. El operón que codifica para la PQQ-ADH en bacterias acéticas.

III. Hipótesis

IV. Objetivos

V. Materiales y métodos

1. Material biológico.
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.
3. Purificación de la PQQ-Alcohol deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
4. Análisis electroforético.
 - a) Electroforesis nativa.
 - b) desnaturalizante.
5. Obtención y secuenciación de péptidos internos de la proteína purificada. Análisis en base de datos.
6. Diseño de oligonucleótidos:
 - a) Subunidad I.
 - b) Subunidad II.

7. Purificación de DNA cromosomal de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
8. Protocolos para la reacción de polimerasa en cadena (PCR's).
9. Electroforesis en gel de agarosa.
10. Protocolo extracción en gel.
11. Purificación de productos de PCR's.
12. Análisis de secuencias.

VI. Resultados

1. Purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.
2. Análisis de secuencias de péptidos internos y secuencias de motivos de unión a citocromo *c* :
 - a) Análisis de péptidos internos de la subunidad I.
 - b) Análisis de las secuencias de la subunidad II de PQQ-ADH de Bacterias Acéticas.
3. Diseño de oligonucleótidos utilizados para secuenciar a la PQQ-ADH:
 - a) Oligonucleótidos para secuenciar la Subunidad I.
 - b) Oligonucleótidos para secuenciar la Subunidad II.
4. Fragmentos de DNA obtenidos a partir de oligonucleótidos degenerados. Secuenciación y análisis de las secuencias utilizando Clustal W2 y MegaBlast discontinuo.
5. Diseño de oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias obtenidas.
6. Fragmentos de DNA obtenidos a partir de un oligonucleótido específico y uno degenerado. Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas utilizando Clustal W2 y MegaBlast discontinuo.
7. Operón *adhAB* de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

8. Análisis “in silico” de la PQQ-alcohol deshidrogenasa en *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
 - a) Predicciones de regiones transmembranales y orientación en la membrana.
 - b) Motivos de unión a PQQ y citocromos c.
 - c) Relación filogenética con otras PQQ-ADH de bacterias acéticas.

VII. Discusión

VIII. Conclusiones

IX. Bibliografía

X. Anexos

Anexo I Oligonucleótidos diseñados

Anexo II Secuencias obtenidas

XI. Adendum

I. INTRODUCCION

I.1. Bacterias acéticas.

Las bacterias son conocidas como grandes guerreras en la batalla de la adaptación a los medios en los que ellas se desarrollan. Ellas han conquistado terrenos inexplorables para otros organismos y esto es debido a su gran plasticidad metabólica.

La familia *Acetobacteraceae* pertenece a la subclase α -proteobacterias^(5,46). Son bacterias aeróbicas, Gram negativas que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético, en medios de cultivo con pH neutro ó ácido⁽⁴⁾. Tradicionalmente la familia *Acetobacteraceae* se había dividido en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Después de mucha controversia, el grupo de Yamada y col. (1984⁽⁴⁴⁾ y 1998⁽⁴⁵⁾) propuso la división de la familia en los géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas*, basándose en el análisis del RNA ribosomal 16S y del tipo de ubiquinona predominante.⁽⁴⁵⁾

Dentro del género *Gluconacetobacter*, se encuentra un grupo de bacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Entre ellas, *Gluconacetobacter diazotrophicus* tiene propiedades que la hacen de sumo interés para su estudio tanto desde el punto de vista metabólico, como genético.

I.2. *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Ga. diazotrophicus forma parte del grupo de bacterias acéticas que presentan la característica de diazotrofia ó “capacidad para fijar nitrógeno” y lo hace en un ambiente oxigénico. Fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner en 1988 ⁽³⁾, de tallos de la caña de azúcar (**Figura 1**).

Esta bacteria presenta características especiales que la hacen un microorganismo de interés particular, como son: se un organismo diazotrófo que presentar tolerancia a pH bajos y a altas concentraciones de azúcar; se conoce su capacidad crecer fijando nitrógeno a un pH menor a 2.5; ⁽³⁵⁾, posee una nitrogenasa activa que le permite fijar nitrógeno, aún en altas concentraciones de oxígeno, así como su facilidad de crecimiento en condiciones de laboratorio⁽³⁾.

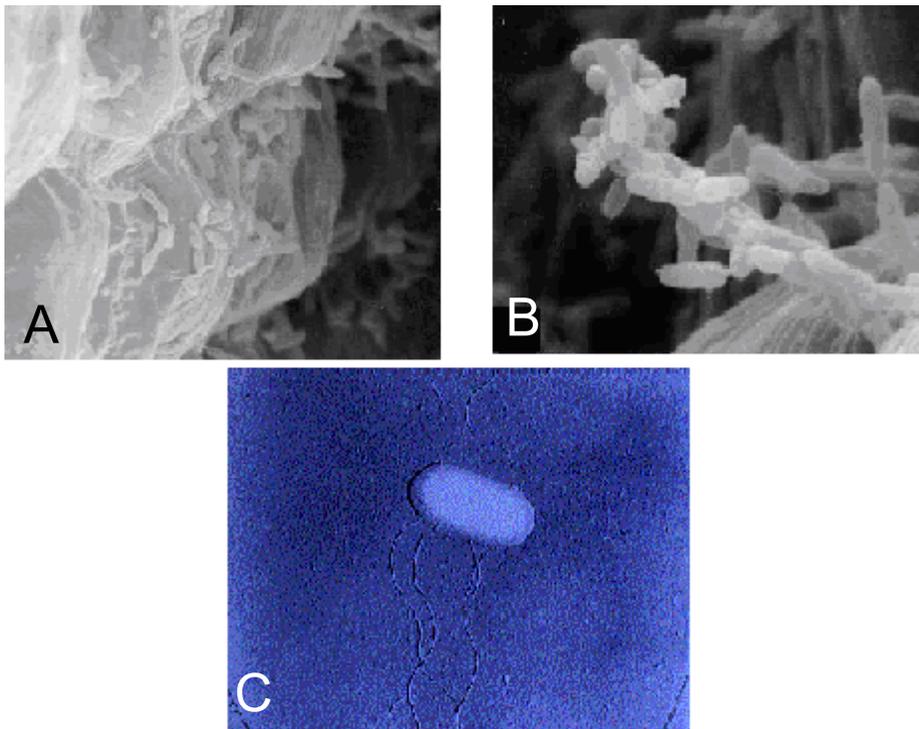


Figura 1. Imágenes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en la raíz de caña de azúcar (A y B) y en condiciones de laboratorio (C).

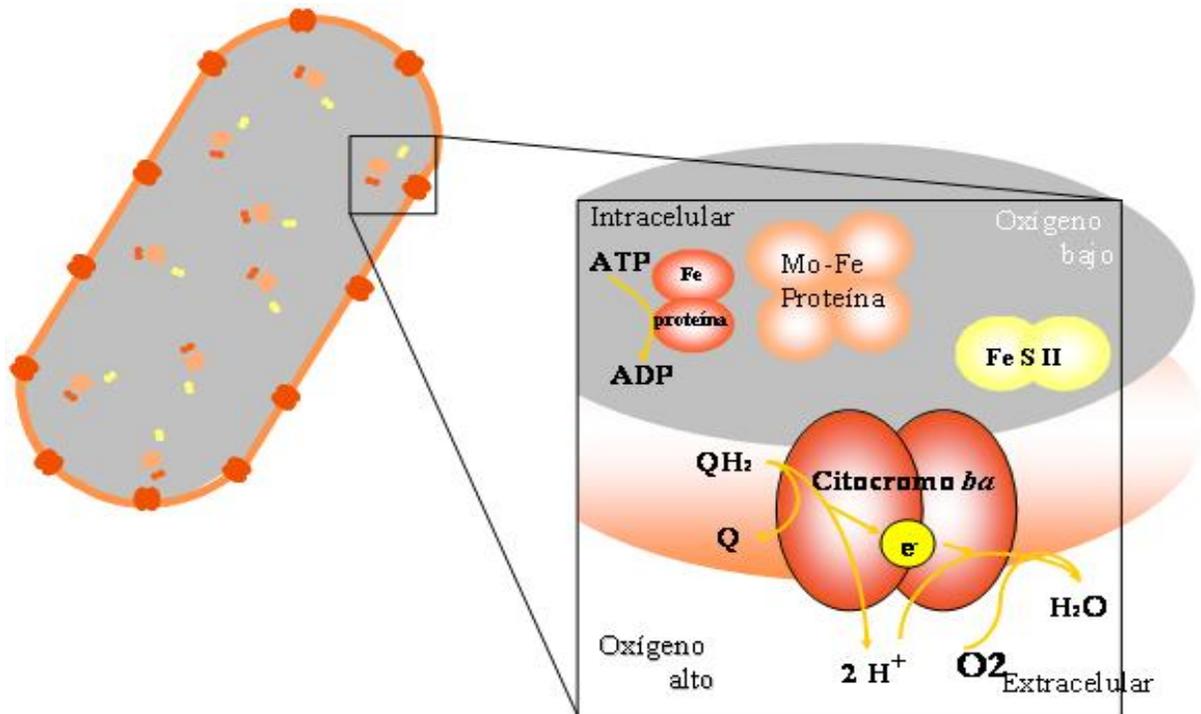
Ga. diazotrophicus puede usar glucosa, fructosa, sacarosa o metanol ^(8,9), como única fuente de carbono, produciendo ácido a partir de estos sustratos; no es capaz de crecer con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono.⁽³⁾ La característica más importante de *Ga. diazotrophicus* es que lleva a cabo la fijación de nitrógeno, aún siendo una bacteria aerobia estricta. Este hecho es de sorprender ya que a la fecha, todas las nitrogenasas descritas, son extremadamente sensibles al oxígeno ^(18,43,34).

Se ha reportado que *Ga. diazotrophicus* presenta un complejo sistema de protección a la nitrogenasa formado principalmente por dos mecanismos: “protección conformacional” y “protección respiratoria”^(34,43). En el primero, en presencia de altas concentraciones de oxígeno, se produce un cambio conformacional al formarse un complejo entre la nitrogenasa y proteínas FeSII (shethna), provocando la inactivación transitoria de la enzima; cuando las concentración de oxígeno disminuye, se rompe el complejo y la nitrogenasa recupera su actividad. El segundo mecanismo, está asociado a un sistema respiratorio muy activo, debido a la presencia de deshidrogenasas muy eficientes, que protegen a la nitrogenasa del oxígeno ambiental; el oxígeno es consumido a nivel membranal, antes de llegar al citoplasma, de tal manera que su concentración intracelular es muy baja, y no afecta la actividad de la nitrogenasa. A este proceso se le conoce protección respiratoria ^(9,34,35,43)(**Figura 2**).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un proceso energéticamente costoso. La ecuación para la reacción química de la FBN es la siguiente:



Ga. diazotrophicus, además de llevar al cabo la “protección respiratoria”, obtiene la gran cantidad de energía necesaria para llevar a cabo este proceso a través de su alta actividad respiratoria ^(34,43,9).



Flores-Encarnación et al., 1999

Figura 2. Esquema que muestra los mecanismos de protección a la nitrogenasa de la presencia de oxígeno en *Ga. diazotrophicus*: la protección conformacional y la protección respiratoria ^(43,9,18).

I.3. La cadena respiratoria

La cadena respiratoria es representada generalmente por la cadena respiratoria mitocondrial; consiste de una serie de acarreadores de electrones los cuales son proteínas o quinonas; los complejos proteicos que la componen contienen diferentes grupos prostéticos capaces de captar y donar electrones en forma secuencial, de acuerdo a su potencial redox. Los electrones fluyen, desde un acarreador con un potencial redox bajo o negativo, hacia uno alto o positivo, en una serie de reacciones. En las oxidasas terminales se lleva a cabo la reducción del oxígeno, que es el aceptor final de electrones en condiciones aeróbicas, para formar agua. Al mismo tiempo, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria (**Figura 3**) genera un gradiente protón motriz transmembranal que conduce a la formación de ATP por el complejo F_1F_0 de la ATP sintetasa ⁽²⁴⁾.

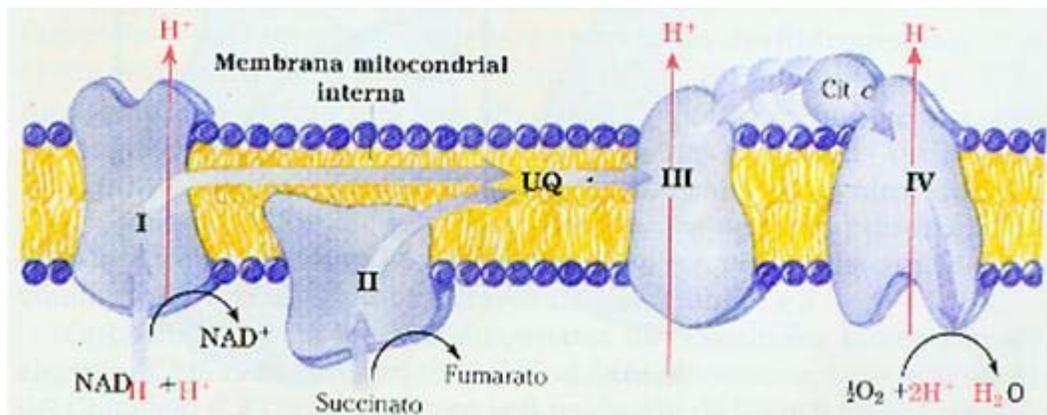


Figura 3. Esquema de la composición de la cadena respiratoria mitocondrial (Imagen tomada de Lenninger & Cox, 1993)⁽²⁴⁾.

Los electrones se mueven del NADH, succinato u otro donador primario, a través de las flavoproteínas, ubiquinona, las proteínas de [Fe-S] y citocromos.

La cadena respiratoria se divide en 4 complejos proteicos:

El complejo I, también conocido como NADH deshidrogenasa, está compuesto por una flavoproteína que presenta como grupos prostéticos Flavin-mononucleotido (FMN) y centros [Fe-S]; cataliza la transferencia de dos electrones a la poza de quinonas.

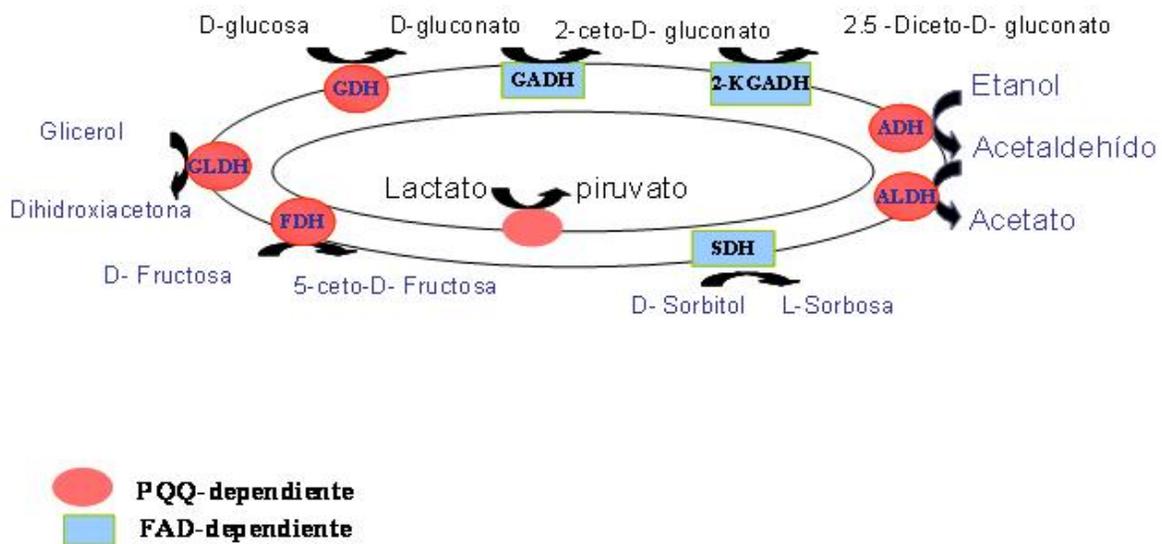
El complejo II ó succinato deshidrogenasa, tiene como grupos prostéticos FAD y centros [Fe-S]; al igual que el complejo I cataliza la transferencia de dos electrones a la poza de quinonas.

El complejo III es llamado también complejo bc_1 ; esta compuesto por dos citocromos *b* (b_{562} y b_{566}), citocromo c_1 , centros [Fe-S], y al menos otras 6 subunidades proteicas, las cuales están asimétricamente embebidas en la membrana de la mitocondria; el citocromo c_1 y los centros de hierro- azufre se localizan en la parte superior de la membrana. Este complejo es intermediario entre la poza de quinonas y el citocromo *c* libre.

El complejo IV esta compuesto por citocromos tipo *a*, formando la oxidasa terminal aa_3 . Presenta dos iones Cu (CuA y CuB), que son fundamentales para la transferencia de electrones hacia el oxígeno. Las oxidasas terminales catalizan la reducción del oxígeno por la transferencia de 4 electrones, para formar H_2O .

I.4. Las PQQ-deshidrogenasas

Los grupos prostéticos de las deshidrogenasas se pueden dividir en general en tres grupos: los que presentan flavin nucleótidos, los que presentan nicotinamida adenina dinucleótidos y los que presentan quinonas. Las quinoproteínas son un grupo heterogéneo de proteínas que difieren completamente de aquellas proteínas que dependen de flavin nucleótidos ó de nicotinamida adenina dinucleótidos. Estas proteínas utilizan como cofactor o-quinonas (**Figura 4**).



Matsushita, (1994). Adv. Microb. Physiol. 36: 247-301.

Figura 4. Deshidrogenasas localizadas en la membrana celular de las bacterias acéticas ⁽²⁸⁾.

Se han identificado cinco tipos de o-quinonas que forman parte de las quinoproteínas: pirroloquinolin-quinona (PQQ), 6-hidroxifenilalanina ó topaquinona (TPQ), triptofanotriptofil quinona (TTQ), quinona de tirosil-lisina (LTQ) ó cisteína triptofil quinona (CTQ) ^(10,13,40). La mayoría de las quinoproteínas se han encontrado en las bacterias Gram negativas y en particular en las proteobacterias. Este tipo de enzimas se pueden clasificar de acuerdo a tres criterios: el tipo del cofactor quinona, la presencia de un grupo prostético adicional y por su localización (membranal o soluble) ^(13,31). A la fecha se han reportado 20 proteínas ⁽²⁴⁾ que presentan como cofactor alguna de estas moléculas.

Entre las proteínas que contienen como grupos prostéticos derivados de o-quinonas, aquellas que presentan el grupo PQQ incluyen varias enzimas con actividades de deshidrogenasa, algunas oxidasas y descarboxilasas bacterianas. Este grupo prostético se sintetiza a partir de la tirosina y el ácido glutámico, y es el único entre las o-quinonas, que no se encuentra covalentemente unido a la proteína. El grupo PQQ se ha identificado en aproximadamente 10 diferentes enzimas ^(31,40).

En algunas quinoproteínas, la PQQ puede estar acompañada de otros grupos prostéticos, como el citocromo c, llamándose entonces quinohemoproteínas. Entre las quinoproteínas encontramos la metanol deshidrogenasa (MDH) y las alcohol deshidrogenasas (ADH's) de tipo I, y entre las quinohemoproteínas encontramos a las ADH's de tipo II y III, la lupamina hidroxilasa, la sorbitol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), entre otras. ⁽⁴⁰⁾

Estas enzimas pueden ser solubles (ADH tipo II) ó estar ancladas a la superficie de la membrana (ADH tipo III) ^(13,31,40).

I.5. Las PQQ-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. ^(40,13).

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de PQQ (PQQ-ADHs) son el grupo de enzimas más grande dentro de la familia de quinoproteínas, formado hasta el momento por 18 enzimas diferentes (**Tabla 1**). Estas enzimas 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 parecidas a la PQQ-metanol deshidrogenasa (PQQ-MDH) de metilótrofos. Su único grupo prostético es la PQQ. ⁽⁴⁰⁾

Las ADHs tipo II y III son quinohemoproteínas, es decir tienen como grupos prostéticos a la PQQ y a citocromos tipo c. Las ADHs tipo II son enzimas solubles y están distribuidas ampliamente entre las Proteobacteria. Las ADHs tipo III están unidas a membrana, funcionando en el espacio periplásmico y son únicas de las bacterias ácido acéticas. Estas enzimas están compuestas generalmente, de tres subunidades. La subunidad catalítica contiene a la PQQ y un citocromo c, mientras que la subunidad II contiene tres citocromos c. El papel de la subunidad III no ha sido definido, aunque se postula es importante para la estructura de la enzima. ^(13,31,40)

Enzima	Localización	Organismo
<i>Quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes</i>		
Metano deshidrogenasa	S	Methylotrophs (12)
<i>ADH Tipo I (PQQ)</i>		
Etanol deshidrogenasa (qEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (13)
Alcohol deshidrogenasa (ADH I)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
1-Butanol deshidrogenasa (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
Polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (16)
<i>Otras quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes (PQQ)</i>		
Sorbosa/Sorbosona deshidrogenasa	S	Especies de <i>Gluconobacter</i> (17) <i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i> (18)
Glicerol deshidrogenasa	M	Especies de <i>Gluconobacter</i> (19)
<i>Quinohemoproteínas capaces de oxidar alcoholes</i>		
<i>ADH Tipo II (PQQ/hemo C)</i>		
Poliétilén glicol deshidrogenasa (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (20)
Etanol deshidrogenasa (qhEDH)	S	<i>Comamonas testoteroni</i> (21)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Polivinil alcohol deshidrogenasa (PVADH)	S	<i>Pseudomonas</i> sp. (22)
Tetrahidrofurfuril alcohol deshidrogenasa (THF ADH)	S	<i>Ralstonia eutropha</i> (23)
1-Butanol deshidrogenasa (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
<i>ADH Tipo III (PQQ/hemo c/3 hemo C)</i>		
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter aceti</i> (24)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (25)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconoacetobacter polyoxogenes</i> (26)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acidomonas methanolicus</i> (27)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i> (28)
<i>Otras quinohemoproteínas</i>		
Lupamina hidroxilasa (PQQ/hemo C)	S	<i>Pseudomonas</i> sp. (29) <i>Pseudomonas putida</i> (30)
Amina deshidrogenasa (CTQ/hemo C)	S	<i>Paracoccus denitrificans</i> (31)
S: soluble; M:membranal.		

Tabla 1. Quinoproteínas y quinohemoproteínas alcohol deshidrogenasas. ⁽¹³⁾

I.6. Las PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo III

Se han purificado cinco diferentes PQQ-ADHs tipo III de bacterias acéticas como *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas* y *Gluconobacter* ⁽⁴²⁾. Se ha demostrado, que mientras las PQQ-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 tricarboxílicos. La especificidad por sustratos de las PQQ-ADH's tipo III, está relativamente restringida en comparación a otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas; estas enzimas oxidan preferentemente alcoholes primarios (cadenas de 2 a 6 carbonos), exceptuando el metanol, y no oxidan alcoholes secundarios, como lo hacen diferentes ADHs tipo I en *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, o la quinohemoproteína etanol deshidrogenasa periplásmica (qhEDH), descrita en *Comamonas testosteroni*, una ADH tipo II que además oxida aldehídos. Los pH's óptimos de las PQQ-ADHs tipo III se encuentran entre 4.0 y 6.0.⁽⁴²⁾

Estas enzimas generalmente están compuestas por tres subunidades (**Tabla 2, Figura 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), es una hemoproteína, en cuya secuencia de aminoácidos se han encontrado sitios de unión para tres citocromos *c* ^(13,31,40). Finalmente la subunidad III (14-17kDa), está presente en las ADHs del género *Acetobacter* y ausente en el género *Gluconacetobacter* ⁽¹⁴⁾ su función no ha sido definida.

Organismo	Masa molecular subunidad (kDa)			Referencia
	I	II	III	
<i>A. aceti</i>	72	50	15	Adachi y col, 1978
<i>A. pasteurianus</i>	74	44	16	Kondo y Horinuochi, 1997
<i>G. suboxydans</i>	78	46	14	Matsushita y col, 1995
<i>Ga. europaeus</i>	72	45	-	Trcek y col, 2006
<i>Ga. polyoxogenes</i>	72	44	-	Tayama y col., 1989
<i>Ga. Xylinus</i>	71	44	-	Chavez-Pacheco, 2006
<i>Ga. diazotrophicus</i>	71.4	43.5	-	Gomez-Manzo, 2007

Tabla 2. Estructura molecular de las ADHs membranales purificadas de las bacterias ácido acéticas ⁽¹⁴⁾.

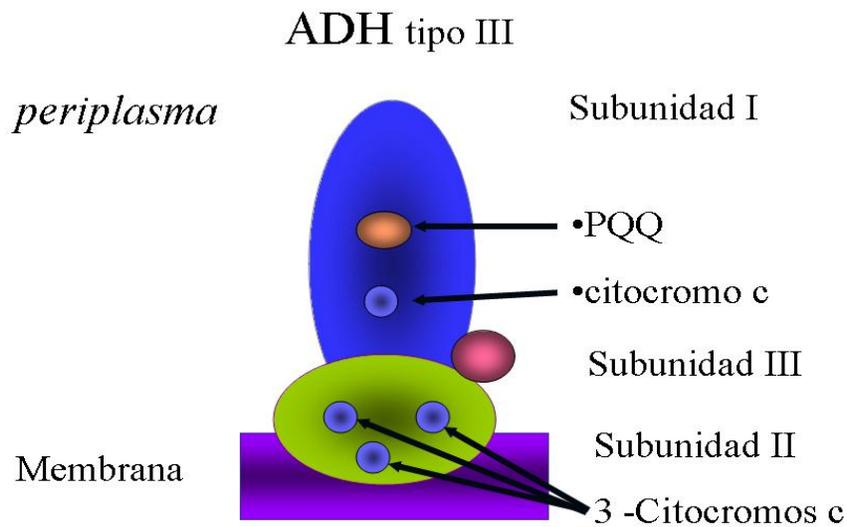


Figura 5. Esquema de la pirroloquinolina quinona alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) tipo III, postulada para bacterias ácido acéticas ⁽¹⁵⁾.

II. ANTECEDENTES

II.1. El sistema respiratorio de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La oxidación incompleta de azúcares y alcoholes o fermentación oxidativa, es característica de las bacterias del ácido acético ⁽²⁷⁾. Es un proceso que está íntimamente ligado al sistema respiratorio y es catalizado 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. ⁽⁹⁾

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, en particular, en esta bacteria ^(9,16). Las cadenas respiratorias que han sido mejor estudiadas en las bacterias ácido acéticas son las de *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter methanolicus*, y *Gluconacetobacter xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*) ^(2,9,11,19,20,21,23,26,29,30,33).

El sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* está compuesto de varias deshidrogenasas y por lo menos tres oxidasas terminales. Las deshidrogenasas pueden ser flavoproteínas ó quinoproteínas y algunas de ellas tienen citocromo *c* ó *b* como grupos prostéticos; estas deshidrogenasas transfieren los electrones, producto de la oxidación de sus respectivos sustratos, a la poza de quinona que en el caso de *Ga. diazotrophicus*, es la ubiquinona 10 (UQ₁₀). Además de las deshidrogenasas y la UQ₁₀, existen como acarreadores de electrones citocromos de tipo *a* y *b*, que forman parte de las oxidasas terminales ^(9,14,15,16,35).

La transferencia de electrones ocurre a partir de la oxidación de sustratos internos como el NADH ó succinato (catalizada por NADH deshidrogenasa: NADH-DH; ó succinato deshidrogenasa: SDH); ó a nivel periplásmico con sustratos como glucosa, acetaldehído ó etanol (catalizada por quinoproteínas como la PQQ-glucosa deshidrogenasa: PQQ-GDH; PQQ aldehído deshidrogenasa: PQQ-ALDH ó PQQ-ADH), entre algunos sustratos. Los electrones producto de la oxidación, son transferidos a la poza de UQ₁₀ y de ahí hacia las citocromo oxidasas terminales donde se reduce el oxígeno (**figura 6**) (9,14,15,16).

Con respecto a las oxidasas, encontramos en *Ga. diazotrophicus* a las oxidasas terminales *ba*₃ y *bb*₃, cuando la bacteria es crecida en condiciones de fijación de nitrógeno (9,16), mientras que cuando la bacteria se crece en condiciones de no fijación (exceso de amonio), la oxidasa predominante es la *bd* (9).

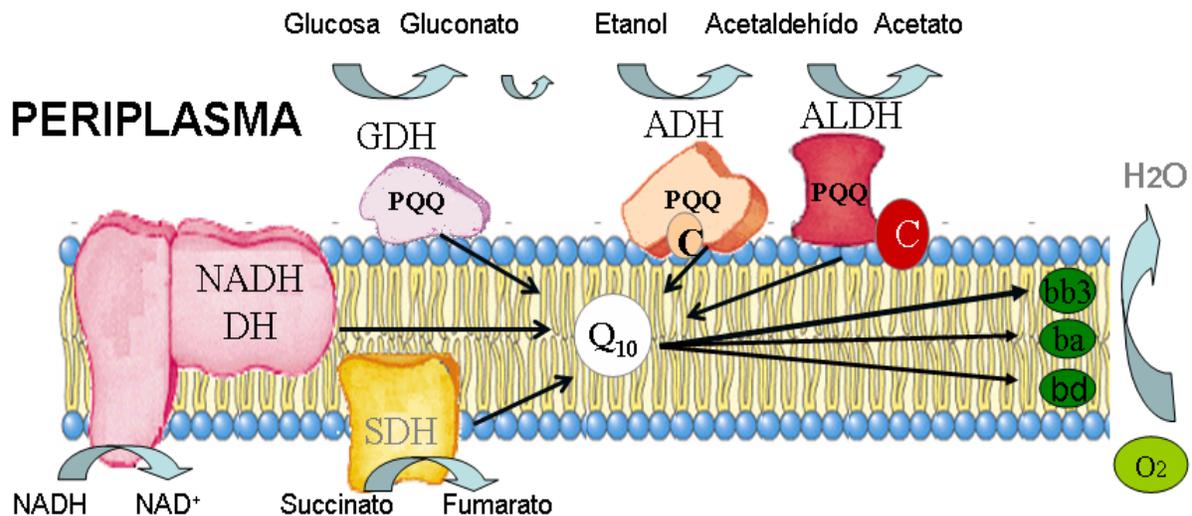


Figura 6. Esquema de la cadena respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (9).

II.2. El operón que codifica para la PQQ-adh en bacterias acéticas

Los genes estructurales de PQQ-ADHs tipo III de algunas especies pertenecientes a la familia de las bacterias acéticas, han sido secuenciados. La clonación y el análisis de secuencias de los genes de PQQ-ADH de *Gluconacetobacter polyoxogenes*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* muestran 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^(23,37,42). Las dos subunidades tienen en el amino terminal un péptido señal característico de proteínas de membrana, el cual es probablemente procesado para dar lugar a las subunidades maduras. En el extremo carboxilo terminal de la subunidad I, se identificó un motivo de unión para citocromo *c*⁽²⁾. La secuencia de aminoácidos de la subunidad II indica que esta subunidad tiene motivos de unión para tres citocromos *c*^(30,19,20,23). La secuencia de la subunidad III solo ha sido indentificada en el genoma completo de *G. suboxydans*.

El potencial económico del uso de *Ga. diazotrophicus* en la inoculación de caña de azúcar cultivada en Brasil, ha estimulado la creación de una red de colaboración llamada RIOGENE en este país, que tuvo como finalidad la secuenciación del genoma de esta bacteria.

En el año 2000 se inició la obtención de la secuencia del genoma completo de *Ga. diazotrophicus*⁽¹⁷⁾; hasta diciembre del 2006 no se había liberado esta secuencia, y tampoco se había secuenciado la PQQ-ADH, en lo particular.

En el laboratorio, la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* ha sido purificada y caracterizada molecular y cinéticamente. Ahora, es nuestro interés obtener el patrón de difracción de rayos X para con estos datos, modelar la estructura de la enzima. La secuencia del operón que codifica esta proteína es un requisito indispensable para poder cumplir con estos objetivos.

Por otro lado, nosotros también estamos interesados en poder obtener mutantes en esta enzima para determinar su papel fisiológico, tanto en la protección respiratoria, en la fijación de nitrógeno, como en la fermentación oxidativa de alcoholes. Para lograrlo, la obtención de la secuencia de la alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus* es también indispensable.

III. HIPÓTESIS

Si *Gluconacetobacter diazotrophicus* pertenece a la familia de las bacterias acéticas, entonces la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para la PQQ-alcohol deshidrogenasa y el arreglo de estos genes formando un operón, será similar a los reportados para otros miembros de la familia de las bacterias del ácido acético.

IV. OBJETIVO

Obtener la secuencia y el arreglo molecular de los genes que codifican las subunidades de la PQQ-alcohol deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

V. MATERIALES Y METODOS

V.I. Material biológico.

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa PAL5.

V.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Ga. diazotrophicus se creció en un medio de cultivo líquido LGIP modificado, adicionado con 5 % de sacarosa y 0.5 % de extracto de levadura. El medio está compuesto por: 5 g de K_2HPO_4 , 4 g de $NaHPO_4$, 0.2 g de $MgCl_2$, 0.02 g de $CaCl_2$, 0.01 g de $FeCl_3$, 5 g de citrato de sodio, 0.2642 g de $(NH_4)_2SO_4$ y 0.002 g de Na_2MoO_2 , disueltos en 1 l de agua. El pH se ajustó a 5.5.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio ó de 2l conteniendo 1l de medio, fueron inoculados con 1 ml ó 25 ml de un cultivo activo, respectivamente. La bacteria fue incubada con una agitación de 250 rpm y a 30°C.

El matraz con 50 ml de cultivo fue cosechado por centrifugación a 7 000 rpm, cuando alcanzó una absorbancia entre 0.8 y 1.0 y las células fueron utilizadas para la obtención de DNA.

Cuatro litros de inóculo fueron utilizados para sembrar un fermentador de 60 l, donde se creció a la bacteria en las mismas condiciones mencionadas anteriormente; a las 24 h de crecimiento, al medio de cultivo se le adicionó etanol al 0.5 %, para inducir la expresión de la PQQ-ADH y el cultivo se dejó crecer durante 12 h más. Las células fueron cosechadas, utilizando una centrífuga de flujo continuo a 5 000 rpm y lavadas 2 veces por centrifugación a 7000 rpm, con un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 6 adicionado de $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 1 mM. Las células lavadas fueron almacenadas a -179 °C hasta su utilización.

V.3. Purificación de la PQQ-ADH de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

La PQQ-ADH de la fracción membranal fue purificada de acuerdo al protocolo descrito por Gómez-Manzo y col. ⁽¹⁵⁾ Las células resuspendidas en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, fueron rotas por French Press a una presión de 1500 psi, en presencia de inhibidores de proteasas. Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 7000 rpm durante 10 min, a 4 °C; a partir del sobrenadante se obtiene la fracción membranal por centrifugación a 30 000 rpm durante 30 min, a la misma temperatura. Las membranas fueron lavadas dos veces con el mismo amortiguador y en las mismas condiciones. La fracción membranal se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.0 a una concentración final de proteína de 10 mg. ml⁻¹.

La PQQ-ADH fue solubilizada de la membrana celular utilizando Triton X100 al 0.5 % (v/v); la suspensión membranal se incubó a 4°C por 120 min, con agitación constante y se centrifugó a 30 000 rpm durante 30 min. Los siguientes dos pasos de purificación fueron por cromatografía líquida de intercambio iónico.

El sobrenadante conteniendo la enzima fue aplicado a una columna de QAE-Toyopearl, previamente equilibrada y lavada con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, conteniendo tritón X-100 al 0.1% (amortiguador inicial). La PQQ-ADH fue eluída de la columna con un gradiente lineal de 0 a 250 mM de NaCl en el mismo amortiguador.

Las fracciones activas fueron colectadas y dializadas toda la noche contra el amortiguador inicial y aplicadas a una columna de DEAE-Toyopearl, equilibrada y lavada con el amortiguador inicial. La enzima fue eluída con un gradiente lineal de 0 a 250 mM NaCl, en el mismo amortiguador. Las fracciones activas fueron colectadas y dializadas durante toda la noche contra el amortiguador inicial.

El siguiente paso de purificación fue utilizando una columna de Hidroxiapatita-Ultrogel (HA-Ultrogel); la fracción activa y dializada fue aplicada a esta columna, la cual había sido equilibrada y lavada con la misma solución amortiguadora de fosfatos. La PQQ-ADH fue eluída con un gradiente lineal de 0 a 250 mM de fosfatos pH 6.0 Triton X100 0.1%. Las fracciones activas fueron colectadas y concentradas por centrifugación a 5 000 rpm utilizando columnas con filtros Amicon YM30 MW (Amicon corporation, Danvers, Mass, USA), para ser aplicada a la columna de exclusión molecular Sephacryl 200, previamente equilibrada con el amortiguador inicial. La columna fue desarrollada utilizando este mismo amortiguador y las fracciones con actividad de PQQ-ADH son colectadas y concentradas. La pureza y composición oligomérica de la enzima fue corroborada por electroforesis nativa y desnaturizante.

V.4. Análisis Electroforético.

a) Electroforesis nativa.

La pureza de la preparación de PQQ-ADH obtenida, fue analizada por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE) al 7.5 %. El gel resolvidor estaba compuesto por 7.5% de acrilamida, 8.0 % de glicerol, 0.1% de Tritón X-100, 0.028% de persulfato de amonio, 0.1% de N,N,N',N',-Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 375 mM de Tris-HCl, pH 8.9. El gel concentrador contenía 4% de acrilamida, 8 % de glicerol, 0.1% de Tritón X-100, 0.066% de persulfato de amonio, 0.05 % de TEMED y 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8. La preparación de PQQ-ADH, fue diluida con el amortiguador de carga en una relación 1:4 (muestra / amortiguador de carga). El amortiguador de carga estuvo constituido por 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 15% de glicerol y 0.1 % de Tritón X-100.

La electroforesis se realizó a 25 mA de corriente y a 4 °C. Una parte del gel fue teñido con azul de coomassie R250 en solución de metanol (20% v/v), ácido acético (7% v/v) y agua y a otra parte del gel se le realizó la zimografía para PQQ-

ADH. Para la zimografía se utilizó nitro azul de tetrazolium como aceptor de electrones, metasulfato de fenazina (PMS) como intermediario y como sustrato etanol, de acuerdo a lo descrito previamente por Adachi y col⁽²⁾.

El gel fue sumergido en 200 ml de amortiguador de McIlvane (Fosfatos y Citratos), pH 6.0, conteniendo 28 mg de metasulfato de fenazina (PMS) y 8 mg de nitro azul de tetrazolium (NTB). Se incubó en la oscuridad por 20 minutos a 4 °C, con agitación constante. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato a una concentración final de 100 mM. Después de la aparición de bandas azules (reacción positiva), la reacción fue detenida por medio la adición de ácido acético al 7%.

b) Electroforesis desnaturizante (SDS PAGE).

La estructura oligomérica de la PQQ-ADH purificada fue analizada en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE 10%), utilizando la técnica de Laemli modificada ⁽⁶⁾.

El gel resoledor se preparó a una concentración final de 10% de acrilamida, 8.0 % de glicerol, 1% de SDS, 0.028% de persulfato de amonio, 0.1% de TEMED y 375 mM de Tris-HCl, pH 8.9. El gel concentrador contenía 4% de acrilamida, 8 % de glicerol, 1 % de SDS, 0.066% de persulfato de amonio, 0.05 % de TEMED y 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8.

La enzima purificada fue precipitada y desnaturizada por adición de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 5% y lavada tres veces con agua desionizada. Posteriormente, la muestra fue resuspendida en la mezcla de digestión que contenía: 5 % de SDS, 3% de β-mercaptoetanol, 15 % de glicerol y 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8. La preparación fue puesta en un baño de agua a ebullición por 3 minutos y centrifugada a 14 000 rpm durante 5 min.

El amortiguador de corrida estuvo compuesto por 1.44 % de glicina, 0.33 % de Tris-HCl y 1.0 % de SDS. La electroforesis se realizó a 25 mA de corriente constante. Se utilizó como marcador de peso molecular el precision plus Standard™ de BIO-RAD.

El gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 al 0.05% en una mezcla de Metanol (25%), ácido acético (10%) y glicerol (5%) en agua. Para corroborar la presencia de citocromo *c* se realizó la tinción de peroxidasa ⁽³⁹⁾. Para ello, el gel teñido con Coomassie fue desteñido con la misma mezcla de metanol, acético, glicerol y agua, lavado con agua e incubado en una mezcla de reacción que contenía 250 mM de acetato de sodio, pH 5.0 (120 ml) y 18 mg de tetrametilbencidina, disueltos en 80 ml de metanol. El gel fue incubado durante 2 horas en oscuridad y con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a una concentración final de 30 mM como agente revelador de la presencia de citocromos tipo *c*. La reacción fue detenida sumergiendo el gel en 250 mM de acetato de sodio, pH 5.0 en 30 % de isopropanol.

V.5. Obtención y secuenciación de péptidos internos de la proteína purificada. Análisis en base de datos.

La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la PQQ-ADH asociadas a las bandas obtenidas en el gel SDS-PAGE, fue determinada generosamente por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para la determinación del amino terminal de cada una de las subunidades, fue utilizada la técnica de degradación de Edman; ambas subunidades se encontraron bloqueadas, por lo que se procedió a obtener secuencia de péptidos internos. Las bandas fueron cuidadosamente cortadas del gel teñido con azul de Coomassie, desteñidas,

reducidas, carbaminometiladas, lavadas, digeridas con tripsina y extraídas de acuerdo a lo reportado por Kinter ⁽²²⁾. El volumen del extracto fue reducido por evaporación, por medio de una centrífuga al vacío a temperatura ambiente y el volumen se ajustó a 20 μ l con ácido fórmico.

El análisis peptídico por espectrometría de masas fue realizado en el sistema 3200 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), el cual está equipado con un nano electrospray y un sistema de nanoflujo (agilent 1100 nano pump, Waldbronn, Germany). Las muestras digeridas fueron desaladas en una punta ZipTic-C18 y separadas 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 0.1%, por un periodo de 80 minutos. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo. El calor de interfase para desolvatar fue mantenido a 150°C. El espectro fue registrado en modo automático usando el programa 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 en un Enhanced Product Ion Scan (Ms/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada de colisión (CAD). Los fragmentos de iones generados fueron capturados y analizados en una trampa de iones lineal Q3. La identificación proteica fue realizada con la base de datos (NCBI nr) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>).

V.6. Diseño de oligonucleótidos.

a) Subunidad I.

Los primeros oligonucleótidos diseñados para la secuenciación de la subunidad I de la PQQ-ADH, fueron diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos internos obtenidos de la banda de 71 kDa. Los oligonucleótidos fueron diseñados con degeneraciones de acuerdo al uso de codón reportado para *Ga. diazotrophicus*.

Una vez que se obtuvieron secuencias de nucleótidos de ésta subunidad, se diseñaron oligonucleótidos específicos para continuar con la secuenciación.

b) Subunidad II.

Los intentos para poder secuenciar tanto amino terminal como péptidos internos de la subunidad de 44 kDa, fueron infructuosos. Por ello, realizamos el alineamiento de secuencias de aminoácidos reportadas para la subunidad II de PQQ-ADH de bacterias ácidas, utilizando Clustal W2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Se alinearon las secuencias de aminoácidos de *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconacetobacter europaeus*, obtenidas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Sabemos que hay 3 citocromos c como grupos prostéticos en la subunidad II de las PQQ-ADH, por lo que localizamos en las secuencias alineadas la secuencia reportada como motivo de unión para citocromos tipo c: CXXCH (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). También obtuvimos una secuencia consenso a partir del alineamiento de las secuencias, de la parte media del gen y del carboxilo terminal. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron oligonucleótidos degenerados utilizando el uso de codón de *Ga. diazotrophicus*.

V.7. Purificación de DNA cromosomal de *Ga. diazotrophicus*

Para la purificación del DNA cromosomal de *Ga. diazotrophicus* se utilizaron 50 ml de cultivo, cosechados en fase logarítmica de crecimiento (D.O. entre 0.8 y 1.0), basándonos en el protocolo de fenol-cloroformo ⁽³²⁾:

1. Cosechar las células por centrifugación a 3000rpm, durante 10min a 4°C.
2. Resuspender el paquete celular obtenido en 10 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 25mM, pH 8.0, EDTA 1mM).
3. Adicionar 10mg de lisozima e incubar a 30°C, durante 15 min.
4. Adicionar 1ml de SDS al 20%, agitar con pipeta 15 segundos. La solución se volverá viscosa.
5. Adicionar 10ml de fenol (saturado con amortiguador TE) y 1.5ml de NaCl 5M. Invertir el tubo rápidamente a temperatura ambiente por 20 min.
6. Separar las fases por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min.
7. Retirar las fases con una pipeta despuntada y transferirla a un tubo limpio.
8. Adiciona un volumen de una mezcla de fenol cloroformo (1:1) y mezclar invirtiendo por 10 min.
9. Repetir los pasos 7 y 8.
10. Adicionar un volumen de cloroformo y mezclar invirtiendo durante 10 min.
11. Repetir los pasos 7 y 8.
12. Adicionar un volumen de isopropanol suavemente por las paredes del tubo (se van a formar dos fases).
13. Con una varilla de vidrio mezclar suavemente en la zona de interfase para recoger el DNA en forma de fibras enrolladas en la varilla.
14. Lavar el DNA con etanol frío al 70 %.
15. Secar el DNA a temperatura ambiente.
16. Resuspender el DNA en 1ml de amortiguador TE. Se debe disolver totalmente.

17. Adicionar RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml e incubar a 50°C durante 1h.
18. Adicionar proteinasa K a una concentración final de 100 mg/ ml. Incubar a 37° C por 1h.
19. Adicionar amortiguador TE para ajustar el volumen a 5 ml.
20. Adicionar un volumen de fenol: cloroformo. Mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
21. Centrifugar y recuperar la fase superior.
22. Adicionar un volumen de cloroformo. Mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
23. centrifugar y recuperar la fase superior.
24. Repetir los pasos 13, 14,15, 16 y 17.
25. El DNA está listo para utilizarlo.

V.8. Protocolos para la reacción de polimerasa en cadena

Se utilizaron dos tipos de DNA-polimerasas, la Taq polimerasa (PCR Super Mix, Invitrogen), cuando el fragmento que queríamos obtener era menor ó igual a 1 Kb y una Pfx DNA polimerasa de alta fidelidad (Accuprime™ pfx Super Mix, Invitrogen), recomendada para la obtención de fragmentos mayores a 1 Kb con secuencia de alto contenido en GC, como es el caso de *Ga. diazotrophicus*. Utilizamos un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient y los programas se modificaron de acuerdo a la enzima utilizada y el tamaño del fragmento esperado.

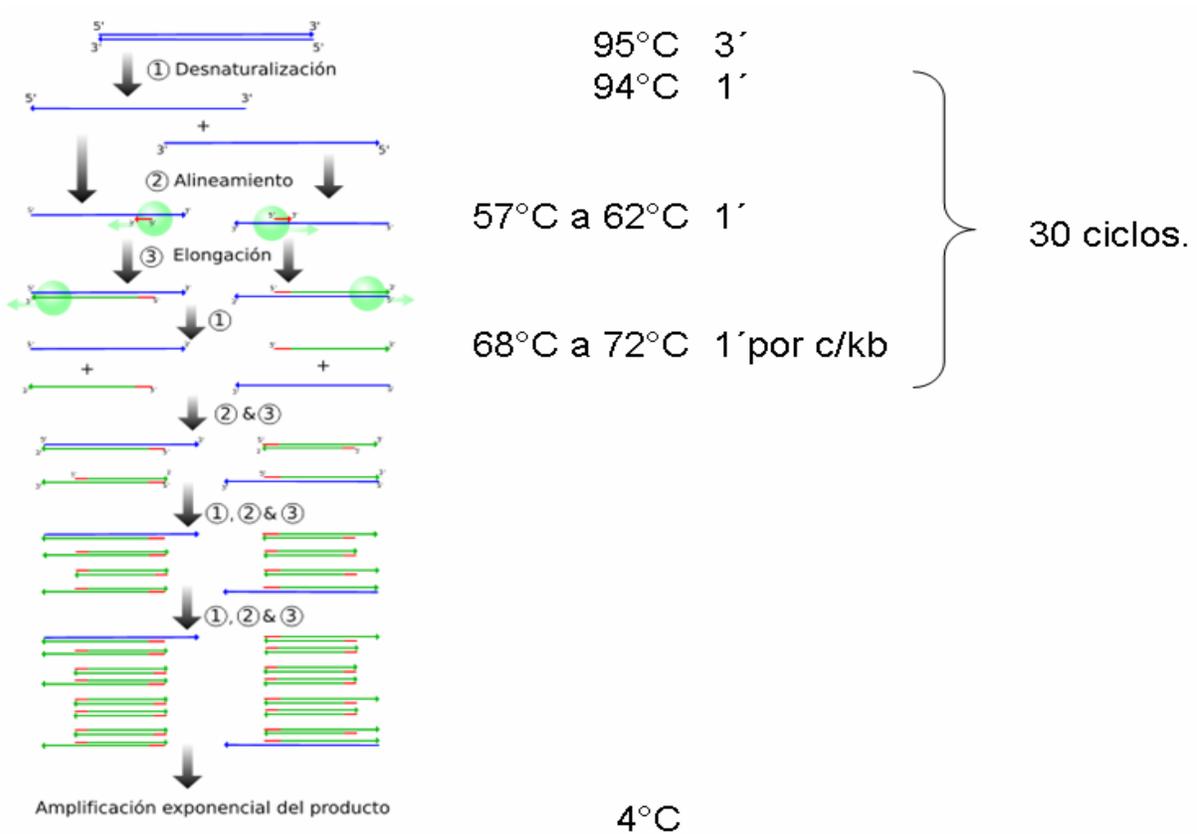


Figura 7. Esquema de la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Tomado de wikipedia:

<http://es.wikipedia.org>.

La temperatura de alineamiento depende de la T_m de los oligonucleótidos y de la temperatura de extensión del tipo de DNA polimerasa utilizada. Para la Taq DNA polimerasa, la temperatura de extensión fue de 72°C (temperatura óptima de funcionamiento para esta enzima), mientras que para la Pfx DNA polimerasa la temperatura fue de 68°C. El tiempo de elongación también depende del tamaño del fragmento esperado; para cada Kb se permite 1 min de tiempo de extensión (Figura 7).

La concentración de DNA cromosomal fue de 40 pmoles y la de los oligonucleótidos de 40 μ M.

V.9. Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar los fragmentos obtenidos como resultado de la reacción en cadena de la polimerasa, se realizaron varias electrofóresis en gel de agarosa al 1 ó 2%, dependiendo del fragmento esperado. La agarosa de bajo punto de fusión (Sigma-Aldrich), se disuelve en amortiguador TBE (1.089 % de Tris, 0.3802 % de EDTA sal sódica y 0.556 % de ácido bórico).

A las muestras obtenidas del PCR se les añade como amortiguador de carga, una solución compuesta por glicerol al 30%, azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y EDTA sal sódica a 1 mM, en una de proporción de 5 a 1. Como marcador se utilizó el 1 Kb plus (Invitrogen).

V.10. Protocolo extracción en gel.

Se utilizó el Kit de extracción de gel (QIAquick^R gel extraction, QIAGEN), de acuerdo a la técnica sugerida:

1. Se corta la banda deseada lo más angosta posible, evitando el exceso de agarosa.
2. Se coloca la banda en un tubo eppendorf previamente pesado y se pesa el tubo con la banda.
3. Se obtiene el peso de la banda, este valor es un volumen.
4. Agregar 3 volúmenes de buffer QG.
5. Incubar por 10 min a 55 °C, ó hasta que la agarosa se halla fundido. (mezclar invirtiendo suavemente el tubo hasta tenerlo homogéneo. La mezcla debe de ser amarilla).
6. Agregar un volumen de isopropanol a 4°C.

7. Invertir el tubo suavemente y pasarlo a una columna del kit.
8. Centrifugar a 14 000 rpm por 75 seg. Desechar el sobrenadante y centrifugar 30 seg más.
9. A la columna se le agrega 750 µl de buffer PE.
10. Se centrifuga dos veces a 14 000 rpm por 75 seg.
11. Se tira el sobrenadante, y se centrifuga por 2 min más.
12. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio.
13. Se agregan entre 10 y 30 µl (dependiendo de la intensidad de la banda) de agua desionizada a 50 - 60 °C y se deja reposar por 5 min.
14. Se centrifuga durante 75 segundos.
15. El sobrenadante es el DNA recolectado.

V.11. Purificación de productos de PCR's.

Para mandar a secuenciar los fragmentos obtenidos, el DNA obtenido a partir del gel de agarosa, se re-purifica con el Kit de purificación de productos de PCR (QIAquick^R PCR purification, QIAGEN):

1. Adicionar 5 vol de buffer PB, por cada volumen de producto de DNA extraído del gel.
2. El contenido trasladarlo a una columna de QIAquick kit.
3. Centrifugar por 1 min.
4. Tirar el sobrenadante,
5. Lavar, adicionar 750 µl de buffer PE en una columna y centrifugar de 30 seg a 1 min.
6. Tirar el sobrenadante y centrifugar 1 min.
7. Poner la columna en un tubo eppendorf.

8. Adicionar H₂O en el centro de la columna, (directamente en la membrana); el volumen puede variar de acuerdo al ancho de banda entre 30 a 50 microlitros.

Nota. Para mejores resultados, en el paso 5 se puede lavar por segunda vez adicionando 500 µl de amortiguador PE y centrifugando 1 min.

V.12. Análisis de secuencias

El análisis se realizó con ayuda de Blast de NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>), ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), y otros programas como DAS(<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), Mega (<http://www.megasoftware.net/>), bioedit (<http://www.mb.mahidol.ac.th/Downloads/Mol-Bio/Bioedit/Bioedit.htm>), y pDRAW32 versión 1.1.93. (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>)

VI. RESULTADOS.

VI.1. Purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Al realizar la purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, siguiendo el procedimiento reportado por Gómez-Manzo y col.⁽¹⁵⁾ obtuvimos una preparación pura a homogeneidad. La electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) nos mostró, dos subunidades de 71 kDa y 44 kDa respectivamente(Figura 8A). Así mismo, al teñir con la reacción de peroxidasa pudimos observar dos bandas que nos revelan la presencia de citocromo *c*, asociados a ambas subunidades (Figura 8B).

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Gómez-Manzo y col.⁽¹⁵⁾, quienes purificaron y caracterizaron a la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* y proponen el esquema que se muestra en la Figura 9. En este esquema se muestra que la enzima esta compuesta por dos subunidades; la subunidad I es la subunidad catálitica, donde se da la oxidación del etanol; los electrones producto de esta oxidación, reducen a los grupos prostéticos presentes en esta subunidad, PQQ y citocromo *c*, que a su vez pasa los electrones de manera secuencial a los tres citocromos *c* que se encuentran en la subunidad II. El último citocromo *c* de la subunidad II reduce a la Ubiquinona 10, que se encuentra en la membrana plasmática y conecta a la deshidrogenasa con la cadena respiratoria de la bacteria.

La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* se postula como una enzima bifuncional, que oxida el etanol y su producto oxidado, el acetaldehído, permanece en la enzima y es re-oxidado por la misma enzima para producir acetato, que es el producto final.

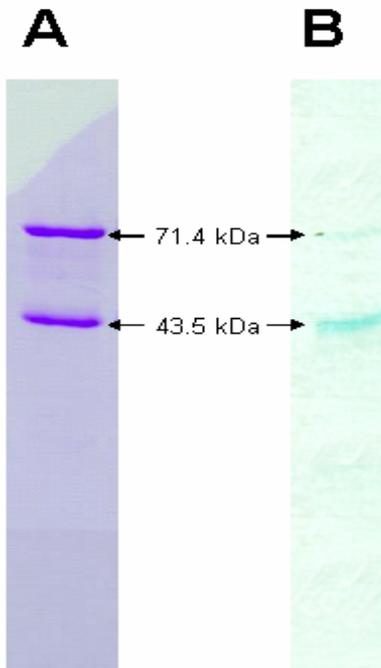


Figura 8. SDS PAGE de la PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus*. El carril A, muestra la tinción para proteína con azul de Coomassie y el carril B, la tinción por reacción de peroxidasa para citocromos tipo c.

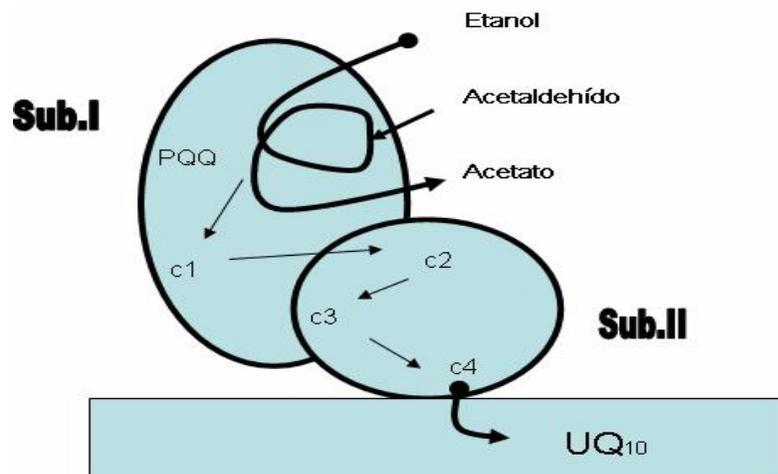


Figura 9. Esquema propuesto por Gómez-Manzo y col⁽¹⁵⁾ de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

VI.2. Análisis de secuencias de péptidos internos y secuencias de motivos de unión a citocromo c.

A partir de las bandas de SDS-PAGE, correspondientes a las dos subunidades de la enzima purificada, se obtuvieron péptidos internos por digestión con tripsina, los cuales fueron secuenciados por espectrofotometría de masas. Solamente se pudieron obtener las secuencias de fragmentos internos de la subunidad I, debido probablemente a que la subunidad II tiene mayor concentración de citocromos c como grupos prostéticos y la gran cantidad de hierro contenida en ellos, interfiere en la determinación.

VI.2.a. Análisis de péptidos internos de la subunidad I.

Para la subunidad I se obtuvieron los siguientes péptidos internos:

- 1) YSPLDQINR.
- 2) GQEGTPLVIDGVMYATTNWSK.
- 3) VPGNIADK.
- 4) VYFGTFDGR.
- 5) VIIGNGGSEFGAR.
- 6) HVIVHAPH.
- 7) NGFFYIIDAK.
- 8) NYVYVNWASGLDPK.
- 9) GALTAYGMD.

Las secuencias fueron analizadas utilizando la base de datos de Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este análisis nos mostró que los péptidos tienen una identidad entre el 75% y el 100%, con la secuencias de PQQ-ADH de

bacterias acéticas (*Ga. polyoxogenes*: No. de acceso GenPept [BAA00529.1](#); *Ga. europaeus*: No. de acceso GenPept [CAA70689.1](#); *A. pasteurianus*: No. de acceso GenPept [BAA02993](#); y *G. suboxydans*: No. de acceso GenPept [BAA19754.1](#)). De hecho, los péptidos secuenciados pueden ser localizados dentro de la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. europaeus* (Figura 10).

misavfgkrrslsrItagticaalisgyatmasaddgqgatgeaiihaddhpgnwmtym
 grtyseqr**yspldqinrs**snvgnlklawylldtntn**rgqegtplvidgvm**attnws**m**
 mkavdaatgkllwsydpr**vpgniadk**gccdtvnrgaaywngk**vyfgtdgr**liald
 aktgklwsvntippeaelgkqrsytvdgapriakgr**viingggsefgar**gfvtafda
 etgkvdwrfftapnpknepdhtasdsvlmnkayqtwspgawtrqgggggtvwdsiv
 ydpvadlvylgvngngspwnykyrsegkgdnlflgsivalkpetgeywwhfqetpmd
 qwdftsvqqimtlldlpingetr**hvvhapkngffyiidakt**gefigsk**knyvvnwas**
gldpktgrpiynpdalytltgkewygiipgdlgghnfaamafspktglvyipaqqvpfly
 tnqvggftphpdswnlglldmknkgipdspeakqafvkdllkgwivawdpqkqaea
 wrvdhkgpwnggilatggdlifqglangefhaydatngsdlfhfaadsgiiappvtyla
 ngkqyvavevgwggiypfflgglartsgwtvnhsrifaflsdgksgplpkqndqgflpv
 kppaqfdskrtdngyfqqfycaachgdnaegagvlpdlrwsgsirhedafynvgr
galtaygmdrfdgnmnpteiedirqflikranetyqrevdarknadgipeqlp

Figura 10. Localización de los péptidos internos secuenciados de la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* purificada, en la secuencia reportada de la PQQ-ADH de *Ga. europaeus* (No de acceso GenPept [CAA70689.1](#)).

El análisis por Blastp de los péptidos dos, tres y cuatro, nos indica también, que estas secuencias forman parte del sitio activo de la enzima y de un dominio conservado de unión de PQQ.

Se eligieron las secuencias de los péptidos 1 (extremo amino terminal), 5 y 8 (parte media del gen) y 9 (extremo carboxilo terminal), para diseñar a partir de ellos y utilizando el uso de codón de *Ga. diazotrophicus*, los oligonucleótidos que nos permitirán obtener la secuencia de la subunidad I de la PQQ-ADH.

VI.2.b. Análisis de las secuencias de la subunidad II de PQQ-ADH de Bacterias Acéticas.

Como hemos mencionado, no fue posible obtener ni la secuencia amino-terminal ni secuencias de péptidos internos de la subunidad II, por lo que hicimos un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de esta subunidad con las PQQ-ADH reportadas de bacterias acéticas. Alineamos las secuencias de *G. suboxydans*, *A. pasteurianus*, *Ga. polyoxogenes* y *Ga. europaeus*, utilizando Clustal W2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html); en este procedimiento, buscamos las secuencias consenso de unión de citocromos tipo c: CxxCH (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y además localizamos dos secuencias conservadas, una en el primer tercio del gen (aminoácidos entre el 129 y 135) y la otra en el extremo carboxilo Terminal (Figura 11).

		UNION CIT CI	
pasteurianus	----MMINRLKAALG-----AVAVGLLAG-TSLAHAQNADEDLIKKG EYVARLG	DCVACH	50
europaeus	-----MINRLKVTFS-----AAAFSLLAG-TALAQTPDADSALVQKGAYVARLG	DCVACH	49
polyoxogenes	-----MINRLKVTFS-----AAAFSLLAG-TALAQTPDADSALVQKGAYVARLG	DCVACH	49
suboxydans	MLNALTRDRLVSEMKGWKLAAAIGLMAVSFGAAHAQDADEALIKRGEYVARLS	DCIACH	60
pasteurianus	T SLNGQKYAGGLSIKTPIGTIYSTNITPDPTYGIGTYTFKEFDEAVRHGVRKDGATLYPA		110
europaeus	T ALHGQSYAGGLEIKSPIGTIYSTNITPDPTYGIGRYTFAEFDEAVRHGIRKDGSTLYPA		109
polyoxogenes	T ALHGQSYAGGLEIKSPIGTIYSTNITPDPTYGIGRYTFAEFDEAVRHGIRKDGSTLYPA		109
suboxydans	T ALHGQPYAGGLEIKSPIGTIYSTNITPDPEHGIGNYTLEDFTKALRKIRKDGATVYPA		120

CONSERVADA

pasteurianus	MPYPSFARITQDDMKAL YAYFMHGV QPIAQKNHPTDISWPMSMRWPLSIWRSVFAPAPKD	170
europaeus	MPYPSFSRMTKEDMQAL YAYFMHGV KPVAQPKQPDISWPLSMRWPLGIWRMMFSPSPKD	169
polyoxogenes	MPYPSFSRMTKEDMQAL YAYFMHGV KPVAQPKQPDISWPLSMRWPLGIWRMMFSPSPKD	169
suboxydans	MPYPEFARLSDDDIRAM YAFFMHGV KPVALQNKAPDISWPLSMRWPLGMWRAMFVPSMTP	180

UNION CIT CII

pasteurianus	FTPATGTDAE IARGEYLVTGPGH CGACHTPRG FQMKEKALDASGGPDFLGGGVVIDNWIA	230
europaeus	FTPAPGTDPEIARGDYLVTGPGH CGACHTPRG FAMQEKALDAAGGPDFLGGGAPIDNWVA	229
polyoxogenes	FTPAPGTDPEIARGDYLVTGPGH CGACHTPRG FAMQEKALDAAGGPDFLGGGAPIDNWVA	229
suboxydans	GVDKSIDPEVARGEYLVNGPGH CGECHTPRG FGMQVKAYGTAGGNAYLAGGAPIDNWIA	240

pasteurianus	PSLRNDPVLGLGRWSEDEDLFLFLKSGRTDHSAAFMMADVVGWSTQYFTDADLHAMVKYI	290
europaeus	PSLRNDPVVGLGRWSEDDIYTFLLKSGRIDHSAVFGMGDVVAWSTQYFTDDDLHAIKYL	289
polyoxogenes	PSLRNDPVVGLGRWSEDDIYTFLLKSGRIDHSAVFGMGDVVAWSTQYFTDDDLHAIKYL	289
suboxydans	PSLRNSDVTGLGRWSEDDIVTFLLKSGRIDHSAVFGMGADVVAYSTQHWSDDDLRAKYL	300

UNION CIT CIII

pasteurianus	KSLPPVPPARGDYSYDASTAQM LNSNFGNAGAKTYVEQ CAI CHRND GGGVARMFPPLA	350
europaeus	KSLPPVPPSQGNITYDPSTANMLASGNTASVP GADTYVKE CAI CHRND GGGVARMFPPLA	349
polyoxogenes	KSLPPVPPSQGNITYDPSTANMLASGNTASVP GADTYVKE CAI CHRND GGGVARMFPPLA	349
suboxydans	KSMFAVPEGNLQDDGQTTALLNKGQ-QGNAGAEVYLHN CAI CHMND GTGVNRMFPPLA	359

pasteurianus	GNPVVSDNPTSVAHIVVDGGVLPPTN WAPS AVAMPDYKNILSDQQIADV VNFIRSAWGN	410
europaeus	GNPVVTENPTSLVNVI AHGGVLP P SNWAPS AVAMPGYSKSLSAQQIADV VNFIRTSWGN	409
polyoxogenes	GNPVVTENPTSLVNVI AHGGVLP P SNWAPS AVAMPGYSKSLSAQQIADV VNFIRTSWGN	409
suboxydans	GNPVVITDDPTSLANVVA FGGILP P TNSAPS AVAMPGFKNHLSDQEMADV VNFMRKGWGN	419

CONSERVADA

pasteurianus	RAPANTTAADIQKLRRLDHTPLPTPGWANATEESATWGLFMPQPYGAGWTFAP QTHAGVDE	470
europaeus	KAPGTVTAADVTKLRD TGAPVSSSGWN---SVSSGWSVFLPQPYGSGWTFAP QTHTGQDA	466
polyoxogenes	KAPGTVTAADVTKLRD TGAPVSSSGWN---SVSSGWSVFLPQPYGSGWTFAP QTHTGQDA	466
suboxydans	NAPGTVSASDIQKLRRTTGAPVSTAGWN---VSSKGWMAYMPQPYGEDWTFSP QTHTGVD	476

pasteurianus	AQ 472
europaeus	AQ 468
polyoxogenes	AQ 468
suboxydans	AQ 478

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de *Gluconobacter suboxydans* (No de acceso GenPept [BAA19754.1](#)), *Acetobacter pasteurianus* (No de acceso GenPept [BAA02993](#)), *Gluconacetobacter polyoxogenes* (No de acceso GenPept [BAA00529.1](#)) y *Gluconacetobacter europaeus* (No de acceso GenPept [CAA70689.1](#)), utilizando Clustal W2.

Como era de esperarse, de acuerdo a lo reportado por Gómez-Manzo y col, encontramos 3 sitios de unión para citocromos tipo c ⁽¹⁵⁾. Basándonos en las regiones conservadas y de acuerdo al uso de codón reportado para *Ga. diazotrophicus*, diseñamos 4 oligonucleótidos para secuenciar esta subunidad.

VI.3 Diseño de oligonucleótidos utilizados para secuenciar a la PQQ-ADH.

Para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos a partir de las secuencias de aminoácidos escogidas, traducimos a nucleótidos utilizando el uso de codón reportado para *Ga. diazotrophicus* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=33996>); para indicar las degeneraciones utilizamos el código universal (Tabla 3).

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5

USO DE CODON

chromosome				
amino acid	codon	number	1000 minute ratio	tRNAscan anti codon
Arg	AGA	1298	1.1	1
	AGG	3952	3.3	0
	CGA	3986	3.4	0
	CGC	48668	41.2	0
	CGG	31199	26.4	1
	CGU	9068	7.7	1
Leu	CUA	1173	1.0	1
	CUC	12341	10.4	1
	CUG	93232	78.8	2
	CUU	6824	5.8	0
	UUA	790	0.7	1
	UUG	6427	5.4	1
Ser	AGC	16457	13.9	1
	AGU	2374	2.0	0
	UCA	2413	2.0	1
	UCC	15993	13.5	1
	UCG	22021	18.6	1
	UCU	1879	1.6	0
Ala	GCA	8996	7.6	4
	GCC	74221	62.8	1
	GCG	65199	55.1	1
	GCU	5071	4.3	0
Gly	GGA	10151	8.6	1
	GGC	61711	52.2	1
	GGG	25098	21.2	1
	GGU	8873	7.5	0
Pro	CCA	3018	2.6	1
	CCC	24500	20.7	1
	CCG	38762	32.8	1
	CCU	3344	2.8	0
Thr	ACA	3794	3.2	1
	ACC	33152	28.0	1
	ACG	27233	23.0	1
	ACU	1691	1.4	0
Val	GUA	2823	2.4	1
	GUC	41166	34.8	1
	GUG	39010	33.0	1
	GUU	5302	4.5	0
Ile	AUA	1943	1.6	0
	AUC	47402	40.1	4
	AUU	6557	5.5	0

Asn	AAC	17939	15.2	1
	AAU	8664	7.3	0
Asp	GAC	47945	40.5	2
	GAU	21576	18.2	0
Cys	UGC	9898	8.4	1
	UGU	1905	1.6	0
Gln	CAA	4269	3.6	1
	CAG	33164	28.0	1
Glu	GAA	26693	22.6	1
	GAG	27198	23.0	1
His	CAC	12907	10.9	1
	CAU	15565	13.2	0
Lys	AAA	5634	4.8	1
	AAG	19456	16.5	1
Phe	UUC	33580	28.4	1
	UUU	5860	5.0	0
Tyr	UAC	11646	9.8	1
	UAU	13173	11.1	0
Met	AUG	29557	25.0	6
Trp	UGG	16809	14.2	1

Código para indicar las degeneraciones en los nucleótidos diseñados:

C+T=Y	C+G=S	A+C+G=V	T+C+G=B
A+T=W	A+G=R	A+T+C=H	A+C+T+G=N
G+T=K	C+A=M	A+T+G=D	

Tabla 3. Uso de codón de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 y código universal para las degeneraciones.

VI.3.a. Oligonucleótidos para secuenciar la Subunidad I.

Los oligómeros diseñados para la subunidad I fueron:

-Traduciendo el péptido YSPLDQINR; este oligonucleótido fue diseñado hacia delante:

Secuencia : Y S P L D Q I N R

Oligonucleótido 1: 5' TAY WSS CCG CTG GAC CAG ATC AAC CGS 3'

-Traduciendo el péptido VIIGNGGSEFGAR; este oligonucleótido fue diseñado hacia delante:

Secuencia : V I I G N G G S E F G A R

Oligonucleótido 2: 5'GTS ATC ATC GGC AAC GGC GGC TCS GAR TTC GGC GCS CGS
3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido 2A: 5' SCG SGC GCC GAA YTC SGA GCC GCC GTT GCC GAT GAT
SAC 3'

-Traduciendo el péptido NYVYVNWASGLDPK; este oligonucleótido fue diseñado hacia delante:

Secuencia: N Y V Y V N W A S G L D P

Oligonucleótido 3: 5' AAC TAY GTS TAY GTS AAC TGG GCS TCS GGC CTG GAC CCG
K
AAG 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido 3A: 5' CTT CGG GTC CAG GCC SGA SGC CCA GTT SAC RTA SAC RTA
GTT 3'

-Traduciendo el péptido GALTAYGMD; este oligonucleótido fue diseñado hacia delante:

Secuencia: G A L T A Y G M D

Oligonucleótido 4: 5' GGC GCS CTG ACS GCS TAY GGC ATG GAC 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido 4A : 5'GTC CAT GCC RTA SGC SGT CAG SGC GCC 3'

VI.3.b. Oligonucleótidos para secuenciar la Subunidad II

Basándonos en las regiones conservadas de unión a citocromos tipo c y en las secuencias de aminoácidos conservadas identificadas para la parte media del gen y el extremo carboxilo terminal, traducimos los aminoácidos con el uso de codón reportado para *Ga. diazotrophicus*, y diseñamos los 4 oligonucleótidos que serían utilizados para secuenciar esta subunidad.

-Traduciendo la secuencia de aminoácidos del primer sitio de unión de citocromo c; este oligonucleótido fue diseñado hacia adelante:

Secuencia: D C V/I A C H T

Oligonucleótido SIIC1: 5' GAC TGC RTS GCS TGS CAY ACS 3'

-Traduciendo la secuencia consenso localizada entre los aminoácidos 129 y 135. Este oligonucleótido se diseñó inverso complementario:

Secuencia: Y A Y/F F M H G V

5' TAY GCS TWY TTC ATG CAY GGS GTS 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido SIIR1: 5' SAC SCC RTG CAT GAA RWA SGC RTA 3'

-Traduciendo la secuencia de aminoácidos del segundo sitio de unión de citocromo c; este oligonucleótido fue diseñado hacia delante:

Secuencia: C G A/E C H T P R G

Oligonucleótido SIIC2: 5' TGC GGC GMV TGC CAY ACS CCS CGS GGC 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido SIIC2R: 5' GCC SCG SGG SGT RTG GCA BKC GCC GCA 3'

-Traduciendo la secuencia de aminoácidos del tercer sitio de unión de citocromo c; este oligonucleótido fue diseñado hacia adelante:

Secuencia: C A I C H R/M N D

Oligonucleótido SIIC3: 5' TGC GCS ATC TGC CAY MKS AAC GAC 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido SIIC3R: 5' GTC GTT SMK RTG GCA GAT SGC GCA 3'

-Traduciendo la secuencia de aminoácidos consenso del carboxilo terminal. Se diseñó para usarse como inverso complementario:

Secuencia: Q T H A/T G V/Q D

Oligonucleótido: 5' CAG ACS CAY RCS GGC SWS GAC 3'

Su inverso complementario:

Oligonucleótido SIICAR: 5' GTC SWS GCC SGY RTG SGT CTG 3'

VI.4. Fragmentos de DNA obtenidos a partir de oligonucleótidos degenerados. Secuenciación y análisis de las secuencias utilizando Clustal W2 y MegaBlast discontinuo.

De los oligonucleótidos diseñados, se escogieron distintos pares (hacia delante y reverso) y se corrieron las reacciones de polimerasa en cadena. Los productos se analizaron en gel de agarosa; si correspondían al tamaño esperado,

se purificaban, utilizando el Kit de purificación de gel de agarosa, así como el Kit para purificar productos de PCR. Para estar seguros de los productos obtenidos, los fragmentos fueron utilizados como templado y se reamplificaron en las mismas condiciones.

1. Fragmento 1-2A. Este fragmento corresponde al inicio del gen que codifica para la subunidad I de la PQQ-ADH. Para la reacción de la polimerasa se utilizaron los oligonucleótidos:

Oligonucleótido 1 (hacia delante): 5' TAY WSS CCG CTG GAC CAG ATC AAC CGS 3'

Oligonucleótido 2A (reverso): 5' SCG SGC GCC GAA YTC SGA GCC GCC GTT GCC GAT GAT SAC 3'.

2. Fragmento 3-4A. Este fragmento corresponde a la parte final del gen que codifica para la subunidad I de la PQQ-ADH. Para la reacción de la polimerasa se utilizaron los oligonucleótidos:

Oligonucleótido 3 (hacia delante): 5' AAC TAY GTS TAY GTS AAC TGG GCS TCS GGC CTG GAC CCG AAG 3'

Oligonucleótido 4A (reverso): 5'GTC CAT GCC RTA SGC SGT CAG SGC GCC 3'

La mezcla de reacción de la polimerasa en cadena para obtener ambos fragmentos fue:

Oligonucleótido hacia delante	2 μ l
Oligonucleótido Reverso	2 μ l
DNA	1 μ l
SuperMIX (taq Pol)	45 μ l
<hr/>	
Volúmen final	50 μ l

El protocolo utilizado para la reacción de la polimerasa en cadena, para ambos fragmentos fue:

- 95°C – 5 min. 1 ciclo
- 94°C – 1 min. } 30 ciclos
- 58°C – 1 min. }
- 72°C – 1 min. }
- 72°C – 10 min. 1 ciclo
- 4°C ∞ min.

Los fragmentos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 12A), obteniéndose el peso aproximado esperado: 400 Kb para el fragmento 1-2A y 850 Kb para el fragmento 3-4A. Los fragmentos fueron purificados y reamplificados y una vez que estuvimos seguros de que la pureza y la concentración eran adecuadas, se mandaron a secuenciar a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El fragmento 1-2A se secuenció con el oligonucleótido 1 (hacia adelante) y se obtuvo una secuencia de

381pb. En el caso del fragmento 3-4A, la secuencia se obtuvo con el oligonucleótido 3 (hacia adelante) y la secuencia obtenida fue de 274pb.

Las secuencias (anexo II), fueron analizadas utilizando las facilidades del MegaBlast discontinuo de NCBI (Mega blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), así como el ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Se encontró que ambos fragmentos tenían una elevada similitud con el gen que codifica para la subunidad I de la PQQ-ADH de bacterias acéticas:

Fragmento 1-2A: 87% de similitud para *Ga. europaeus* (No de acceso GenBank; [Y09480.1](#)); 87% de similitud para *Ga. polyoxogenes* (No de acceso GenBank; [D00635.1](#)) y 83% de similitud para *G. oxydans* (No de acceso GenBank; [CP000009.1](#)).

Fragmento 3-4A: 84 % similitud para *Ga. europaeus* (No de acceso GenBank; [Y09480.1](#)); 84% de similitud para *Ga. polyoxogenes* (No de acceso GenBank; [D00635.1](#)); 75% de similitud para *G. oxydans* (No de acceso GenBank; [CP000009.1](#)) y 75% de similitud para *Ga. xylinus* (No de acceso GenBank; [AJ635220.1](#)).

La localización de los fragmentos secuenciados, dentro de la secuencia del gen que codifica para la subunidad I de *Ga. europaeus*, se muestra en la Figura 12 B.

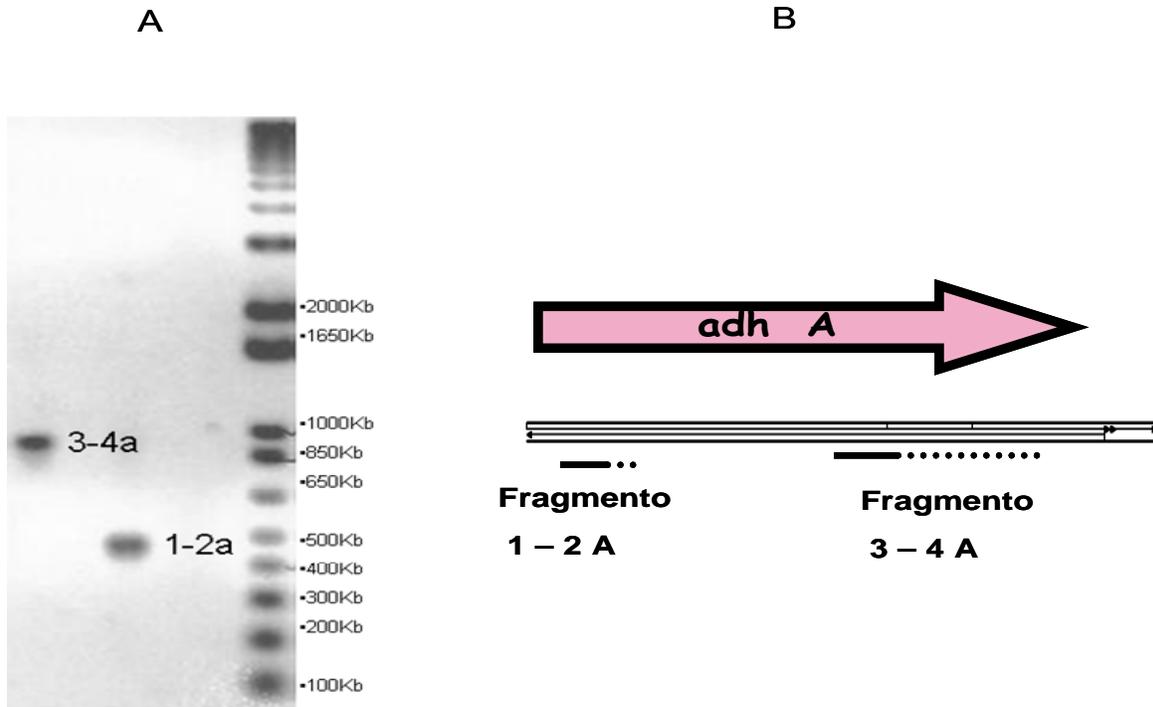


Figura 12. Análisis de los fragmentos obtenidos por PCR con los pares de oligonucleótidos 1-2A y 3-4A. El panel A muestra la electroforesis en agarosa de los fragmentos. El Panel B muestra el esquema de la secuencia del gen *adh A*, que codifica para la subunidad I de *Ga. europaeus*, obtenida utilizando el programa pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>). La localización en el gen de los fragmentos, se muestra como barras debajo del esquema; la parte sólida de la barra representa la porción del fragmento que fue secuenciada.

3. Fragmento 4-SIIRI. Este fragmento corresponde a la parte final del gen que codifica para la subunidad I y la secuencia consenso traducida a nucleótidos, que se localiza entre los aminoácidos 129 y 135, de la secuencia de la subunidad II, de la ADH de *Ga. europaeus*. Para la reacción de la polimerasa se utilizaron los oligonucleótidos:

Oligonucleótido 4 (hacia delante): 5' GGC GCS CTG ACS GCS TAY GGC ATG GAC 3'

Oligonucleótido SIIRI (reverso): 5' SAC SCC RTG CAT GAA RWA SGC RTA 3'

La mezcla de reacción de la polimerasa en cadena fue la misma que para la reacción con los oligonucleótidos anteriores.

El protocolo utilizado para la reacción de la polimerasa en cadena fue:

- 95°C – 5 min. 1 ciclo
- 94°C – 1 min. } 30 ciclos
- 60°C – 1 min. }
- 72°C – 1 min. }
- 72°C – 10 min. } 1 ciclo
- 4°C ∞ min.

El fragmento obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 13A), obteniéndose el peso aproximado esperado (580Kb); el fragmento fue purificado, reamplificado y una vez seguros de que la pureza y la concentración eran adecuadas, se mandó a secuenciar a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El fragmento se secuenció con ambos oligonucleótidos y se obtuvo una secuencia de 584pb.

La secuencia obtenida fue analizada utilizando las facilidades del MegaBlast discontinuo de NCBI y el CLUSTAL W2. Se encontró una elevada similitud con el operon que codifica para la PQQ-ADH de *Ga. europaeus* (77% de similitud; No de acceso GenBank [Y09480.1](#)), *Ga. polyoxogenes* (77% de similitud; No de acceso GenBank [D00635.1](#)), *G. oxydans* (75% de similitud; No de acceso GenBank [CP000009.1](#)) y *A. pasteurianus* (74% de similitud; No de acceso GenBank [D13893.1](#)); de acuerdo a lo esperado, la secuencia obtenida fue localizada entre la parte final de la subunidad I y el principio de la subunidad II (Figura 13 B).

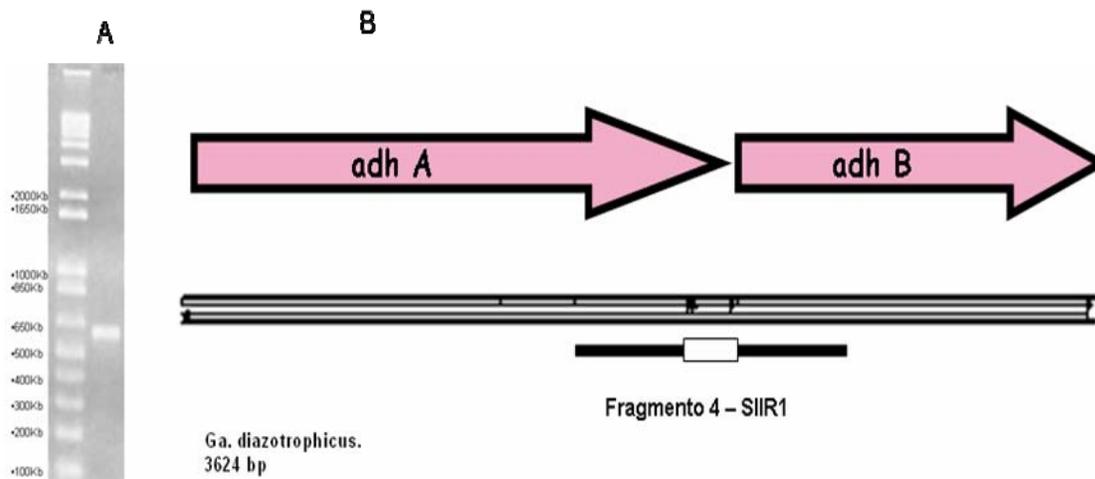
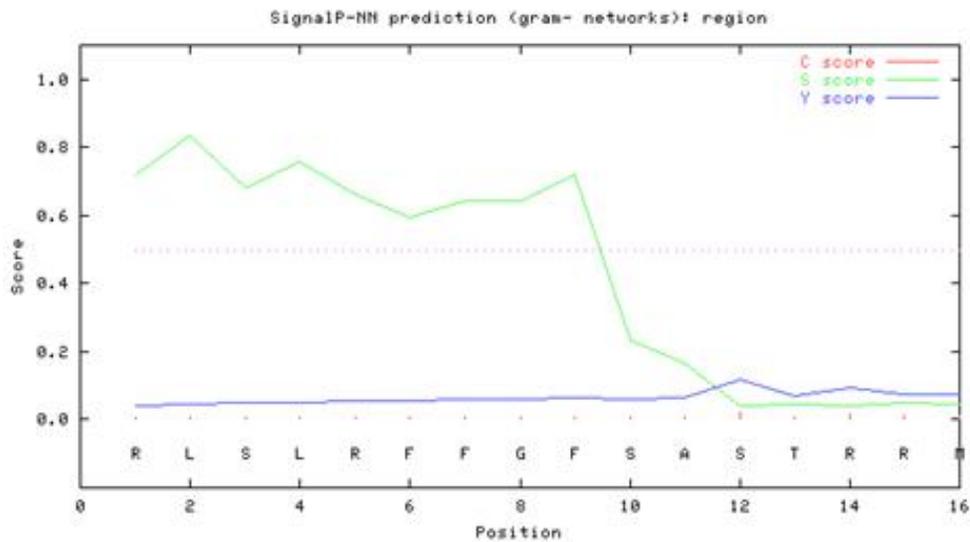


Figura 13. Análisis del fragmento obtenido por PCR con el par de oligonucleótidos 4-SIIR1. El panel A muestra la electroforesis en agarosa del fragmento. El Panel B muestra el esquema de la secuencia del operon que codifica para la PQQ-ADH de *Ga. europaeus*, obtenida utilizando el programa pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>). La localización del fragmento en el operon se muestra como una barra debajo del esquema; la parte clara de la barra representa la zona intergénica secuenciada.

Fue muy importante encontrar una zona intergénica de 52 pares de bases, que se encuentra entre las secuencias de los genes que codifican para la subunidad I y la subunidad II de la enzima. Se realizó la traducción de esta secuencia intergénica a aminoácidos, utilizando el uso de codón de *Ga. diazotrophicus*.

CGT CTT TCC CTA CGG TTT TTC GGA TTT TCC GCA TCA ACA CGA CGC
 R L S L R F F G F S A S T R R

La secuencia de aminoácidos traducida contiene un 42 % de aminoácidos no polares ó aromáticos, así como aminoácidos positivos, lo que nos sugería que podía corresponder a la secuencia de un péptido señal. Para determinar si esta secuencia correspondía con la secuencia de un péptido señal, se analizó con el programa SignalP 3.0” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). (Figura 14).



Longitud del fragmento: 16 aa.
 Péptido señal: 1-11 aa
 Sitio de rompimiento más probable entre el aa 11 y el 12

Figura 14. Análisis de la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia intergénica de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos corresponde con el fragmento 4-SIIRI. La secuencia de aminoácidos fue analizada con el programa SignalP 3.0. El valor de C nos indica el sitio de la hendidura determinada por la acción de la peptidasa I. El valor de S nos indica la predicción de un péptido señal: el valor más alto está asociado con aminoácidos que forman parte de un péptido señal; valores bajos indican que los aminoácidos forman parte de una proteína madura. El valor de Y, combina los valores de C y S y da una mejor predicción de sitio de la hendidura.

El análisis de la secuencia intergénica nos permite corroborar que corresponde con la secuencia de un péptido señal, entre los aminoácidos 1 y 11. El sitio de rompimiento más probable se encuentra entre los aminoácidos 11 y 12. Este resultado está de acuerdo con lo reportado para *Ga. europeaus*, *G. oxydans* y *Acetobacter pasteurianus* ⁽²³⁾, donde postulan a esta región como la que codifica para el péptido señal de la subunidad II.

Además es importante señalar que la obtención de esta secuencia nos permitió determinar el orden de los genes en el operon que codifica para la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*: *adhAB*, codificando en ese orden para la subunidad I y subunidad II de la PQQ-ADH, respectivamente. Este arreglo de los genes está de acuerdo con lo reportado para *Ga. europeaus*, *G. oxydans* y *A. pasteurianus* ⁽²³⁾.

VI.5. Diseño de oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias obtenidas.

A partir de las secuencias obtenidas, se decidió diseñar oligonucleótidos específicos para continuar con la secuenciación.

De la secuencia obtenida para el principio del gen que codifica para la subunidad I, se diseñó un oligonucleótido:

Oligonucleótido 1SIF1 5'CCC GCC GAC GCG GCC CTG GGC CAC CAG CGT TCC
TAC ACC G 3'

De la secuencia obtenida para el principio del gen que codifica para la subunidad II se diseñaron dos oligonucleótidos:

Oligonucleótido 4SIIRI: 5'GGC TGT CGT CAG GCA TGT GCA GG 3'

Oligonucleótido 4SIIF2: 5'CCG ATC GGC ACG ATC TAT TCG ACG AAC ATC ACG CC3'

VI.6. Fragmento de DNA obtenido a partir de un oligonucleótido específico y uno degenerado. Secuenciación y análisis de la secuencia obtenida utilizando ClustalW2 y MegaBlast discontinuo.

Fragmento 1SIF1-3A. Para la reacción de la polimerasa se utilizaron el oligonucleótido 1SIF1, el cuál es hacia delante y específico; este oligonucleótido se diseñó a partir de la secuencia de la parte final del fragmento 1-2A, que corresponde al inicio del gen que codifica para la subunidad I (anexoII). El oligonucleótido 3A es degenerado y corresponde a la parte media del mismo gen.

Oligonucleótido 1SIF1 (hacia delante): 5'CCC GCC GAC GCG GCC CTG GGC CAC CAG CGT TCC TAC ACC G3'

Oligonucleótido 3A (reverso):5' CTT CGG GTC CAG GCC SGA SGC CCA GTT SAC RTA SAC RTA GTT 3'

Para la obtención de este fragmento utilizamos Accuprime *pfx* supermix. La mezcla de reacción de la polimerasa en cadena fue la misma que utilizamos para la obtención de los fragmentos anteriores.

El protocolo utilizado para la reacción de la polimerasa en cadena fue:

- 95°C – 5 min. 1 ciclo
- 94°C – 1 min. } 30 ciclos
- 60°C – 2 min. }
- 68°C – 3 min. }
- 68°C – 10 min. 1 ciclo
- 4°C ∞ min.

El fragmento obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 15A), obteniéndose el peso aproximado esperado (640 Kb); el fragmento fue purificado y reamplificado y una vez que estuvimos seguros de que la pureza y la concentración eran adecuadas se mandó a secuenciar. El fragmento se secuenció con el oligonucleótido hacia delante y se obtuvo una secuencia de 491pb.

La secuencia obtenida fue analizada utilizando las facilidades del MegaBlast discontinuo de NCBI y el CLUSTAL W2. Se encontró una elevada similitud con el gen que codifica para la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. europaeus* (87% de similitud; No de acceso GenBank [Y09480.1](#)), *Ga. polyoxogenes* (86% de similitud; No de acceso GenBank [D00635.1](#)) y *G. oxydans* (83% de similitud; No de acceso GenBank [CP000009.1](#)). De acuerdo a lo esperado, la secuencia obtenida se localizó en la primera mitad de la de la subunidad I (Figura 15 B).

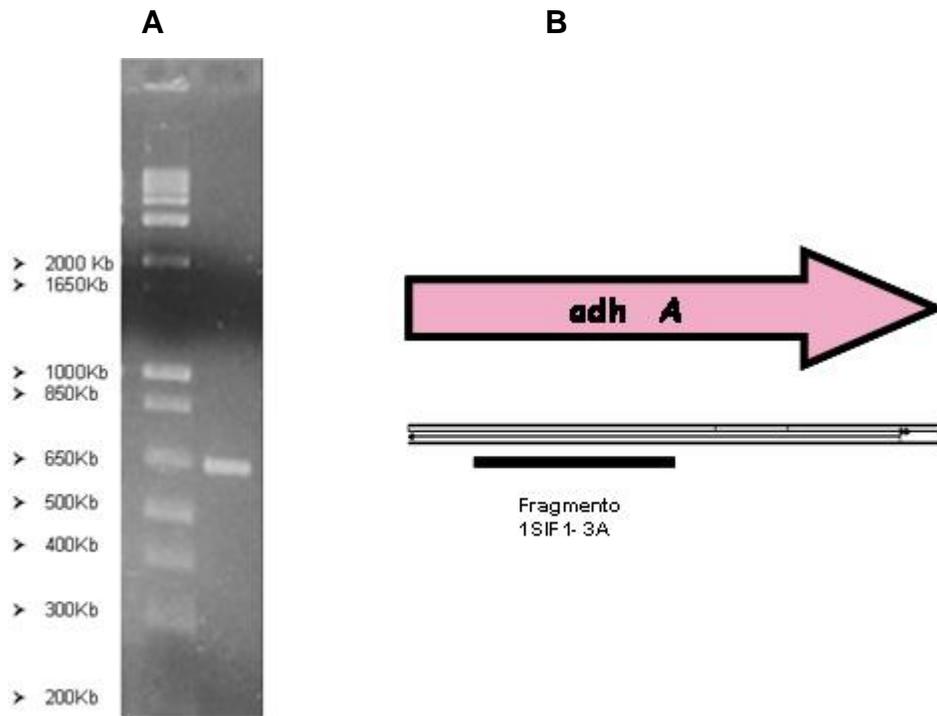


Figura 15. Análisis del fragmento obtenido por PCR con el par de oligonucleótidos 1SF1-3A. En el panel A se muestra la electroforesis en agarosa del fragmento. El Panel B muestra el esquema de la secuencia del gen que codifica para la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. europaeus*, obtenido utilizando el programa pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>). La localización en el operon del fragmento esperado, se muestra como una barra debajo del esquema.

El grupo RIOGEN Brasil ⁽¹⁷⁾, tenía varios años trabajando en el proyecto de la secuenciación del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* PAL5, y para principios del 2008, fue liberada la secuencia del genoma completo. La secuencia del operon *adhAB* fue identificada en el genoma, motivo por el cual se detuvo la secuenciación que estábamos realizando.

VI.7. Operon adhAB de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Con la secuencia liberada (No. de acceso .GenBank™ AM889285), se analizaron los fragmentos ya secuenciados. El análisis demostró que los fragmentos obtenidos, tanto de la subunidad I como de la subunidad II, tienen un 99% de identidad con la secuencia registrada en la base de datos de NCBI para *Ga. diazotrophicus* PAL5, correspondientes con los genes *adhA* (locus_tag="GDI2040; No. de acceso GenBank™ CAP55983.1) y *adhB* (locus_tag="GDI2041; No. de acceso GenBank™ CAP55984.1).

Utilizando las facilidades de MegaBlast de NCBI, se analizaron cada uno de los fragmentos:

El fragmento 1-2A, que corresponde al inicio del gen que codifica para la subunidad I, tiene un 100% de identidad con la secuencia correspondiente al gen *adhA* de *Ga. diazotrophicus*.

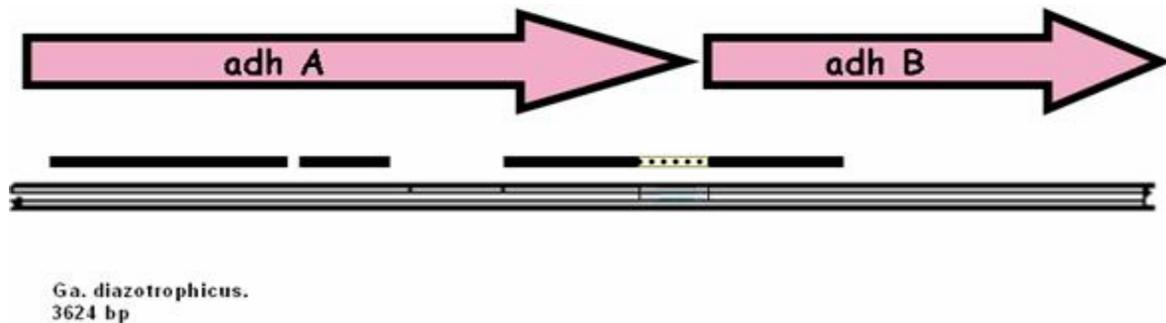
El fragmento 3-4A, que corresponde a la parte final del gen que codifica para la subunidad I, tiene un 96 % de identidad con la secuencia correspondiente al gen *adhA* de *Ga. diazotrophicus*.

El fragmento 4 – SIIRI, que corresponde al final del gen que codifica para la subunidad I y principio del gen que codifica para la subunidad II, tiene un 97 % de identidad con las secuencias correspondientes a los genes *adhA* y *adhB* de *Ga. diazotrophicus*. De acuerdo con los resultados que habíamos obtenido, se encontró una región intergénica que se localiza entre 2085221pb – 2085265 pb del genoma completo, confirmando la presencia de una secuencia que codifica para el péptido señal de la subunidad II y el arreglo de los genes como operon *adhAB*.

El fragmento 1Slf1- 3A, que corresponde a la parte media del gen que codifica para la subunidad I, tiene un 99 % de identidad con la secuencia correspondiente al gen *adhA* de *Ga. diazotrophicus*.

Los fragmentos secuenciados fueron localizados en el operon *adhAB* y los resultados se muestran en la figura 16. También mostramos la posible zona reguladora.

A



B

```

2082661 agcgattcggcatggcgatgacgggatccgaatgcatggatggatgcatattatcata
2082721 acatgggataattattcataaacgcagccagacttcacgtcccacatgccggcgccccgcttt
2082781 tcagcctgaaatcggcggaaaacagccaaaatctcctctgcccctctgctcgcccgaatac
2082841 gggcatactgcaagttccgccgtcggctcctcacgaatgaggcgatgcagaacactaaatc
2082901 gtcagaagactgtcacaacagtcacattatgttcgcatcgaacggaccgtctgcggtccg
2082961 gacccgatcatccggttttttcttttcacgagacatcggacatgatcgcgagccgt
2083021 ttacgggaaaagacgttctctccgcggaacgcttgccgtcggaacgatatgcgcccgac
2083081 attcttggatatacggcggcgaccagtgcgccgaatccgaattcggcgcgacgggtga
2083141 agcaattatccatgcggacgaccatcccggcgactggctgacctacggccgcacctattc
2083201 cgagcagcgttatagcccgtggaccagatcaaccgggtccaatgtcggcaacctgaagct
2083261 ggcctggtattacgacctggacaccaacctgggaggaaggcacgccgctgatcgtcga
2083321 tggcgtgatgtacgccaccacgaactggagcaagatgaaggccctggacgcggccacggg
2083381 caagctgctgtgggcgtacgacccccgcgtgcccggcaatatcgccgacaagggatgctg
2083441 tgacaccgtcaatcgcggtgcgccctactggaacggcaaggtctatttcggcacgttcga
2083501 cgggaaggctgatcgcgctggacgccaagaccggcaagctggtctggagcgtgaacaccat
2083561 ccccgccgacgcccctgggcccaccagcttctacaccgtggacggcgcgccgctat
2083621 cgccaaggccgggtcatcatcggcaatggtggatcggcaatcggcgcgcgggcttcgt

```


secuencia entre los pares de bases 2082661 y 2086678 del genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, que contiene al operon *adhAB* y su posible zona reguladora. En la secuencia fue localizado, utilizando el programa softberry para búsqueda de promotores (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), el posible promotor; los sitios -35, y -10, son enmarcados en un rectángulo y las posibles secuencias Shine Dalgarno para ambas subunidades, en un ovalo, los sitios de inicio de la traducción (ATG) y codones de paro de cada subunidad (TGA y TAA), también son señalados. Se marca en gris las secuencias de las regiones codificantes y la región intergénica, obtenidas en este trabajo.

VI.8. Análisis “in silico” de la PQQ-alcohol deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

VI.8.a. Predicciones de regiones transmembranales y orientación en la membrana.

Para poder proponer un modelo de arreglo membranal de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* analizamos, utilizando varios programas de predicción de regiones transmembranales y orientación en la membrana (<http://www.predictprotein.org>), la secuencia de aminoácidos de esta enzima.

Para el análisis, se tomó la secuencia de aminoácidos desde la parte intergénica entre el gen de una probable RNA ligasa y el operón de la PQQ-ADH. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17 y 18. Con los resultados postulamos un modelo de la probable topología de la proteína en la membrana plasmática (Figura 19).

De acuerdo a los resultados obtenidos, ambas subunidades tienen un cruce transmembranal de 21 a.a. en la parte amino de su secuencia de proteína, que las ancla a la membrana. También se localizaron fragmentos hidrofóbicos y positivos, uno en la subunidad I y otro en la subunidad II, que podrían corresponder a los

péptidos señales que orientan a ambas subunidades en su localización membranal.

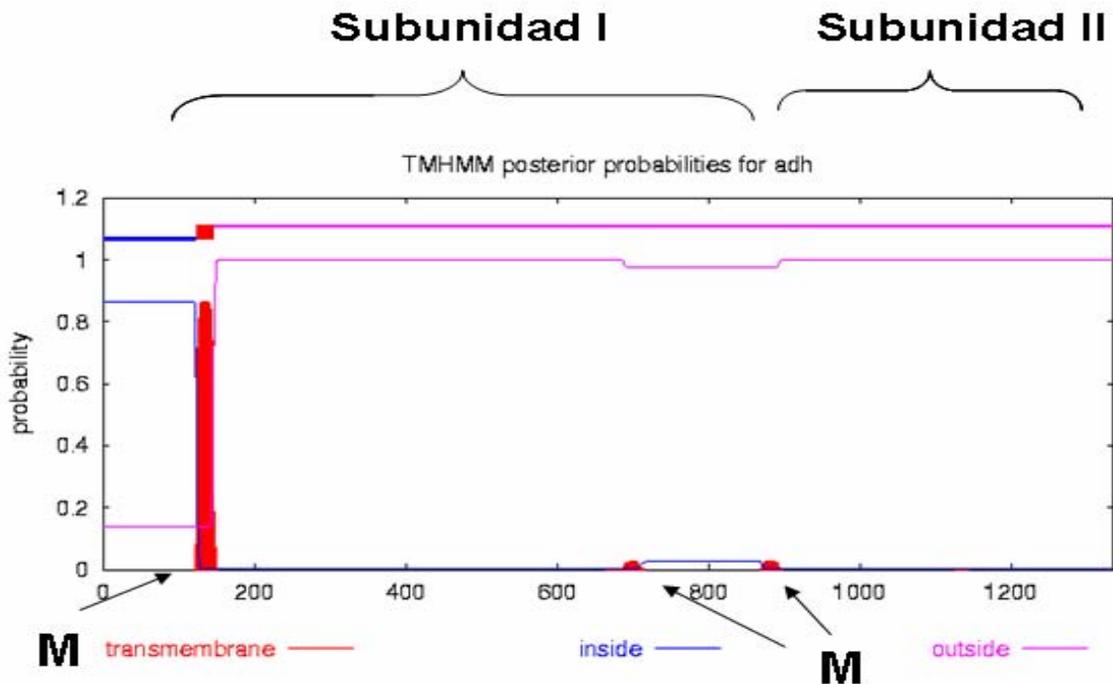
VI.8.b. Motivos de unión a PQQ y citocromos *c*.

La alcohol deshidrogenasa estudiada en la presente tesis, es una deshidrogenada independiente de NAD^+ , que utiliza pirrolo-quinolin-quinona (PQQ) y citocromos tipo *c* como grupos prostéticos. Es una PQQ-ADH tipo III unida a membrana, que se presenta unicamente en bacterias acéticas. Ha sido reportado que la subunidad catalítica contiene a la PQQ y un citocromo *c*, mientras que la subunidad II contiene tres citocromos *c*⁽¹¹⁾.

Decidimos hacer un análisis “in silico”, buscando los motivos de unión de los grupos prostéticos característicos de esta enzima. Se analizó la secuencia liberada de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso .GenBank™[AM889285](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/AM889285)); fueron localizadas, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la de nucleótidos obtenida en la presente tesis, así como la de los péptidos internos. Utilizando Blastp y Pfam (pfam.sanger.ac.uk/search), se logró identificar en la subunidad I, el posible sitio activo y la secuencia consenso de unión de PQQ:

GQEGTPLIVDGVMYATTNWSKMKALDAATGKLLWAYDPRVPGNIADKGCCDTVN
RGAAYWNGKVYFGTFDGRLIALDAKTGKLVWSV,

así como el motivo de unión para un citocromo *c* (CXXCH). En la subunidad II se identificaron también los motivos de unión de los citocromos *c* correspondientes (Figura 18).



Dentro de la membrana	1 al 122 aa
Trans-Membranal	123 al 143 aa
Fuera de la membrana	144 al 692 aa
Trans-Membranal	693 al 713 aa
Dentro de la membrana	714 al 870 aa
Trans-Membranal	871 al 891 aa
Fuera de la membrana	892 al 1335 aa

Figura 17. Gráfico que muestra los resultados del análisis de las regiones transmembranales (M) y orientación en la membrana de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, de acuerdo al programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

LSSQIADVNFIRTGWGNHAPASVTAADVAKMRDTGAPVSSSGWNTSSSGWLVLHPQPY
ff

GAGWTFAPQTHSGVDQAQ
ffffffffffffffffffffffff

Figura 18. Análisis “in silico” de la secuencia de aminoácidos de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Debajo de cada aminoácido se indica su orientación en la membrana de acuerdo al programa SPOCTOPUS* (<http://octopus.cbr.su.se/>). Las metioninas de inicio de cada subunidad se encuentran marcadas con mayúsculas. El posible sitio activo y la secuencia consenso de unión a PQQ se muestra en un recuadro. Los motivos de unión a citocromo *c* se encuentran subrayados. La secuencia marcada en gris claro corresponde a la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida en la presente tesis. La secuencia marcada en gris oscuro corresponde a la secuencia de péptidos internos obtenidos a partir de la enzima purificada. Las secuencias de aminoácidos que corresponden a las secuencias de nucleótidos de las regiones intergénicas y que podría corresponder a un péptido señal, se muestran en itálicas.

*Orientación en la membrana: d = dentro; M = región transmembranal; r =reentrada; f = fuera

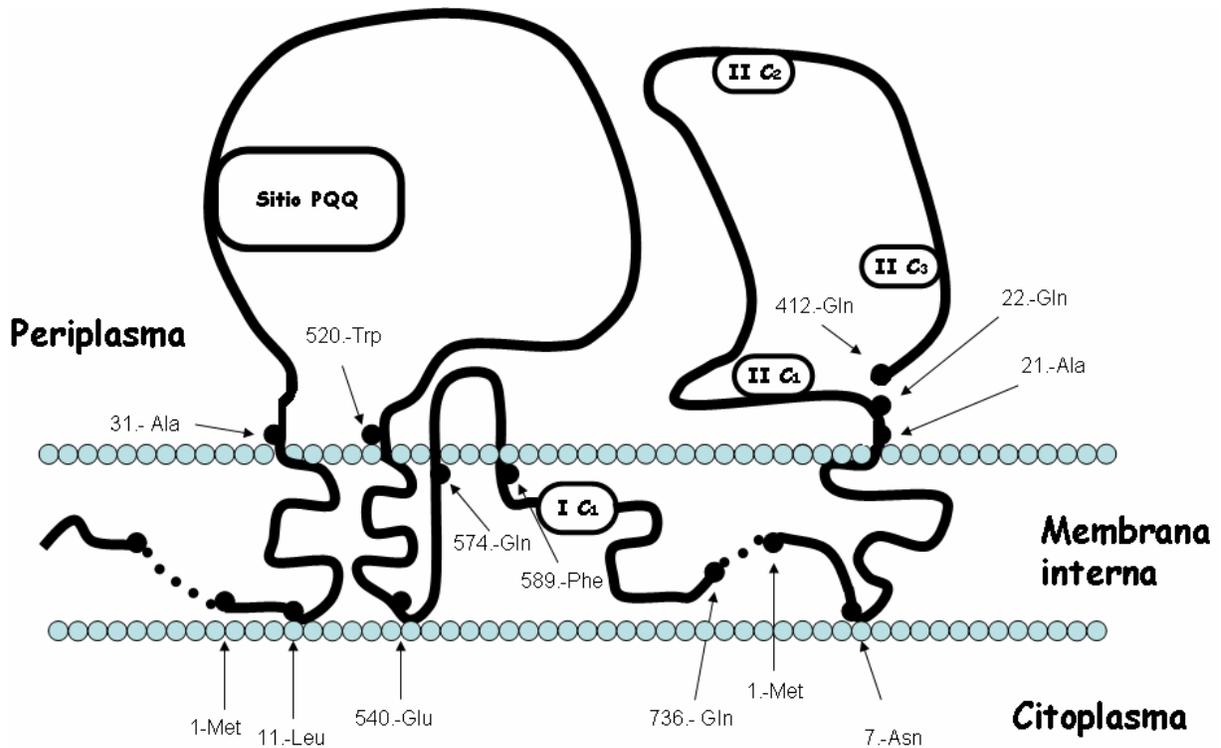


Figura 19. Modelo propuesto para la topología en la membrana de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, basándonos en el análisis de la secuencia de aminoácidos y utilizando varios programas de predicción de regiones transmembrales y orientación en la membrana (<http://www.predictprotein.org/>) las regiones intergénicas se encuentran representadas por líneas discontinuas.

VI.8.c.Relación filogenética con otras PQQ-ADH de bacterias acéticas.

Ga. diazotrophicus pertenece al grupo de bacterias acéticas, las cuales forman parte de las α -proteobacterias. Se realizó el análisis filogenético de las secuencias de las PQQ-ADH tipo III reportadas en ese grupo de bacterias, por el método de máxima parsimonia. Los resultados nos muestran el orden de jerarquías para esta enzima, entre *Ga. europaeus*, *Ga. polyoxogenes*, *Ga. diazotrophicus*, *G. oxydans* y *A. aceti*. La secuencia de *Methylobacterium extorquens* se utilizó para “enraizar” el árbol (figura 20).

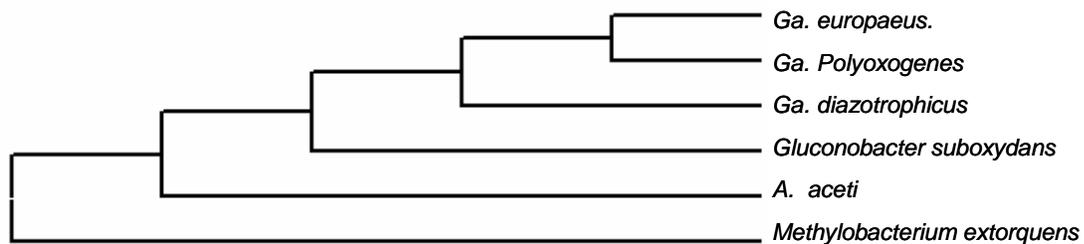


Figura 20. Análisis filogenético de las PQQ-ADH tipo III secuenciadas a la fecha. El programa utilizado fue MEGA (<http://www.megasoftware.net/>).

VII. DISCUSIÓN.

La PQQ-alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*, estudiada en la presente tesis, es una deshidrogenasa independiente de NAD^+ , que utiliza pirrolo-quinolin-quinona (PQQ) y citocromos tipo c como grupos prostéticos. Es una PQQ-ADH tipo III unida a membrana, que se presenta unicamente en bacterias acéticas. La proteína se postula como una enzima bifuncional ya que cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído y, sin liberar al acetaldehído de su sitio activo, lo oxida a ácido acético, el cuál es liberado al medio ⁽¹⁴⁾. Ha sido reportado que la subunidad catalítica contiene a la PQQ y un citocromo c como grupos prostéticos, mientras que la subunidad II contiene tres citocromos c ⁽¹⁴⁾.

A partir de la PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus*, siguiendo la metodología reportada por Gómez-Manzo y col ⁽¹⁴⁾, se obtuvieron péptidos internos de la subunidad I, por digestión con tripsina, los cuales fueron secuenciados por espectrofotometría de masas. El análisis de la secuencia de los péptidos internos obtenidos, utilizando la base de datos Blastp; nos permitió confirmar que pertenecían a la subunidad I de una PQQ-ADH, de acuerdo con el alto grado de identidad obtenido (entre 75 y 100%), con la misma enzima de bacterias acéticas (*Ga. europaeus*, *Ga. polyoxogenes*, *G. suboxydans*, *A. pasteurianus*). No fue posible obtener secuencias de péptidos internos de la subunidad II de la PQQ-ADH purificada, debido a la interferencia del alto contenido de fierro que encontramos en los tres citocromo c, que son sus grupos prostéticos.

A partir de las secuencias de los péptidos internos de la subunidad I y utilizando las secuencias de aminoácidos consenso de unión a citocromo c y conservadas de la parte media y el carboxilo terminal de la subunidad II, se diseñaron oligonucleótidos degenerados, utilizando el uso de codon de *Ga. diazotrophicus*. Con los oligonucleótidos degenerados y un oligonucleótido específico diseñado a partir de la primera secuencia de nucleótidos obtenida, utilizando la técnica de PCR, fuimos capaces de secuenciar el 50 % del operon de

la PQQ-ADH de la bacteria (65% de la subunidad I y 26.75% de la subunidad II). Las secuencias obtenidas tuvieron un alto grado de similitud (entre el 74 y el 87%), con las secuencias correspondientes de otras bacterias acéticas (*Ga. europaeus*, *Ga. polyoxogenes*, *Ga. xylinus*, *G. suboxydans*, *A. pasteurianus*).

Fue muy importante encontrar una zona intergénica de 45 pares de bases, que se encuentra entre los genes de la subunidad I y la subunidad II. Se realizó la traducción de esta secuencia intergénica a aminoácidos, utilizando el uso de codón de *Ga. diazotrophicus*. La secuencia de aminoácidos está compuesta por aminoácidos hidrofóbicos y positivos, lo que nos sugería que podía corresponder a la secuencia de un péptido señal. Utilizando bases de datos para determinar péptidos señal, determinamos que esta secuencia intergénica efectivamente corresponde a un péptido señal, que orientaría a la subunidad II de la PQQ-ADH a su localización membranal. Secuencias similares son reportadas para otras bacterias acéticas, como *Ga. europaeus*, *G. suboxydans* y *A. pasteurianus*⁽²³⁾.

Además, la obtención de esta secuencia nos permitió determinar el arreglo de los genes que codifican para las subunidades I y II de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se determinó que estos genes están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura, formando un operón. El arreglo es *adhAB*, codificando para la subunidad I y la subunidad II de la enzima, respectivamente. Este arreglo de los genes está de acuerdo con lo reportado para *Ga. europaeus*, *G. oxydans* y *A. pasteurianus*.⁽²³⁾

Desde hace aproximadamente 10 años, el grupo RIOGEN-Brasil⁽¹⁷⁾, estaba trabajando en el proyecto de la secuenciación del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* PAL5, y desafortunadamente para nosotros a principios del 2008, la secuencia fue liberada. La secuencia del operon *adhAB* fue identificada en el genoma, motivo por el cual se detuvo la secuenciación que estábamos realizando.

Para validar nuestros resultados, las secuencias obtenidas fueron comparadas contra la secuencia liberada, obteniéndose un 99% de identidad entre ambas. La región intergénica también fue localizada.

Con la secuencia liberada nos fue posible realizar un estudio “in silico” de la enzima. En la secuencia de nucleótidos identificamos el posible promotor del operón (las posibles secuencias -35 y -10), río arriba del ATG (el inicio de la traducción), de la subunidad I. Como era de esperarse por tratarse de un operón, no se encontraron secuencias consenso que pudieran asociarse con un probable promotor de la subunidad II. También identificamos en ambos genes las probables secuencias Shine Dalgarno para el reconocimiento por el ribosoma del inicio de la traducción de ambas subunidades (Figura 16).

La secuencia de aminoácidos fue analizada con varios programas de predicción de regiones transmembranales y orientación en la membrana (Figura 18), para proponer un modelo de arreglo membranal de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* (Figura19).

Así mismo se localizó en la secuencia de aminoácidos, la secuencia consenso de unión a PQQ en la subunidad I, que como era de esperarse, se encuentra dentro del posible sitio activo de la enzima, de acuerdo al reporte de Blastp. También se localizaron las secuencias consenso de unión de citocromo *c*, en ambas subunidades (Figura 18). Estos resultados indican que ambas subunidades se encuentran ancladas a la membrana por su amino-terminal. El sitio activo de la enzima y por tanto la secuencia consenso de unión de la PQQ, se encuentra hacia el espacio periplásmico; la secuencia consenso de unión del citocromo *c* de la subunidad I se localiza dentro de la membrana plasmática. En la subunidad II, las tres secuencias de unión para sus correspondientes citocromo *c* se encuentra hacia el espacio periplásmico. La orientación en la membrana reportada en este trabajo de acuerdo a los programas de predicción, necesariamente deben ser corroborados por otro tipo de análisis (fusión con

fosfatasa alcalina y betagalactosidasa, por ejemplo), ya que la orientación propuesta por el análisis “in silico”, no explicaría la transferencia de electrones desde el tercer citocromo *c* de la subunidad II, a la ubiquinona que se encuentra embebida en la membrana plasmática.

Por otra parte, la PQQ-ADH ha sido purificada en otras bacterias acéticas. Se ha reportado que para los casos de *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *G. oxydans* ⁽²³⁾, la enzima está compuesta de tres subunidades: las subunidades correspondientes a la subunidad I (71 kDa) y II (43 kDa) de *Ga. diazotrophicus*, y una subunidad pequeña de entre 14 y 16 kDa, cuya función aún es desconocida, y que no se presenta en la enzima purificada de esta última bacteria. Solamente para el caso de *G. oxydans*, la secuencia de la subunidad pequeña ha sido reportada. Decidimos buscar el ortólogo de la subunidad pequeña de la PQQ-ADH de *G. oxydans* en la secuencia de *Ga. diazotrophicus*, utilizando la base de datos de Blast discontinuo. No se pudo identificar ningún gen ortólogo a esta subunidad en el genoma de *Ga. diazotrophicus*. Este resultado nos permite concluir que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* está compuesta por solo dos subunidades, como se ha reportado para aquellas bacterias del género *Gluconacetobacter* (Tabla 2). Esta conclusión se ve reforzada por el análisis filogenético realizado para las PQQ-ADH tipo III secuenciadas a la fecha (Figura 20). Las especies del género *Gluconacetobacter* están muy relacionadas entre sí, mientras que las del género *Gluconobacter* y *Acetobacter* se encuentran más alejadas filogenéticamente.

VIII. CONCLUSIONES

-A partir de la subunidad I de PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus*, obtuvimos péptidos internos cuya secuencia nos permitió corroborar que la enzima purificada era una PQQ-alcohol deshidrogenasa.

-Los oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de las secuencias de los péptidos internos de la subunidad I de *Ga. diazotrophicus*, así como de secuencias consenso y secuencias de motivos de unión a citocromo *c* identificadas en la subunidad II de la PQQ-ADH de *Ga. europeus*, nos permitió obtener, utilizando la técnica de PCR, el 50 % de la secuencia del operón *adhAB* de *Ga. diazotrophicus*.

-Con la secuencia obtenida, pudimos identificar una región intergénica que codifica para el péptido señal de la subunidad II de la PQQ-ADH.

-La obtención de la secuencia de la región intergénica, nos permitió determinar que los genes que codifican para la PQQ-ADH están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura, formando un operón. El arreglo es *adhAB*, codificando para la subunidad I y la subunidad II, respectivamente.

-La secuencia obtenida en este trabajo tuvo una identidad del 99%, con la secuencia identificada como la del operón *adhAB*, en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, liberada recientemente.

-El estudio “in silico” de la secuencia de aminoácidos de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, nos permitió identificar las secuencias de unión a PQQ y citocromos *c* en esta enzima.

-Con los resultados del análisis, utilizando programas para predicción de regiones transmembranales y orientación en la membrana, de la secuencia de aminoácidos de la PQQ-ADH, proponemos que ambas subunidades están ancladas a la membrana por su amino terminal; el sitio activo se encuentra hacia el espacio periplásmico; el citocromo c de la subunidad I se encuentra dentro de la membrana plásmica, mientras que los citocromos c de la subunidad II, se encuentran en el espacio periplásmico.

-No existe un ortólogo en *Ga. diazotrophicus*, para la subunidad III de las PQQ-ADH reportada en *Gluconobacter oxydans* y *Acetobacter aceti*; este resultado corrobora que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* esta compuesta por dos subunidades, de manera similar a lo que ocurre en otras especies del mismo género.

IX. BIBLIOGRAFÍA:

1. Adachi O., Miyagawa E., Shinagawa E., Matsushita K., Ameyama M. (1978). Purification and Properties of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.*, 42 (12): 2331- 2340.
2. Adachi O., Tamaya K., Shinagawa E., Matsushita K and Ameyama M. (1978). Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* 42: (11) 2045 -2056.
3. Cavalcante V. A., and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
4. Davidson V. L. (2004). Electron Transfer in Quinoproteins. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 428: 32-40.
5. De Ley J., Gillis M., Swings J., (1984). Family VI. Acetobacteraceae, p. 267-278. *In* Krieng N. R., Holt, J. G. (ed), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 Williams and Wilkins, Baltimore.
6. Del arenal I. P., Contreras M. L., Svlateorova B. B., Rangel P., Lledias F., Dávila J. R. and Escamilla J. E. (1997) Haem O and putative cytochrome bo in mutante of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis or haem A. *Arch. Microbiol.* 167: 24- 31.
7. Diune J.A, (1999). The PQQ Story. *J of Bioscience and Bioengineering*, 88 (3): 231-236.
8. Domínguez P, M. (2003) Crecimiento y Expresión del Sistema Respiratorio de *Acetobacter Diazotrophicus* en Etanol como Única Fuente de Carbono. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de licenciatura.
9. Encarnación F. M., Contreras Z. M., Urzua S. L., Aguilar R. G., Baca E. B. and Escamilla E. J. (1999). The Respiratory System and Diazotrophic Activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. of Bacteriol.* 181: 6987 – 6995.

10. Encarnación F. M., Sánchez C. M, and Ortiz, G. F. (2004). las PQQ. deshidrogenadas. Un novedoso Ejemplo de Quínoproteínas Bacterianas. Rev. Latinoam. Microbiol. 46: (1–2) 47 – 59.
11. Escamilla E., Contreras M., Flores-Encarnación M., Flores L.M. (1999) Los Sistemas Respiratorios Bacterianos. Mensajes Bioquímicos, 23: 67- 103.
12. Finn R. D., Tate J., Mistry J., Coggill P. C., Sammut J. S., Hotz H. R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E. L. and Bateman, A. (2008) Nucleic Acids Research Database Issue 36:D281-D288
13. Gómez M. S., Arreguín E. R., Contreras Z. M. y Escamilla M. E. (2005). Las quinoproteínas Alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos distribución, clasificación, estructura y función. Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol. 8 (1): 28 -37.
14. Gómez M. S., (2007). Papel de las Deshidrogenasas periplásmicas para Etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. tesis doctoral. UNAM . Instituto de Fisiología Celular.
15. Gómez M. S., Contreras Z. M., González V. A., Sosa T. M., Arreguín E. R., and Escamilla M. E., (2007). The PQQ- Alcohol Dehydrogenase Of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Inter. J. Food and Microbiol. 125 (1): 71-78.
16. Gónzales 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 Oxidase. Bioquim. Biophys. Acta. 1757 (12): 1614-1622.
17. Herlache T., 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, Canada. Abs. P. 82
18. Hill S. ((1998)). How is nitrogenase Regulated by Oxigen?. FEMS. Microbio. Lett. 54: 111 -130.

19. Inoue T., Sunagawa M., Mori A., Imai Ch., Fukuda Masao., 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.
20. Inoue T., Sunagawa M., Mori A., Imai Ch., Fukuda M., Yano K. (1992). Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the 45- Kilodalton Subunit of alcohol dehydrogenase from *acetobacter aceti*. *J. Ferm. Bioengineer.* 73 (6): 419-424.
21. Jitka F., Matsushita K., Yakushi T., Toyama H., Adachi O. (1996). Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase of Acetic Acid Bacteria: Kinetic Study on the Enzyme Purified from *Acetobacter methanolicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(3): 459-465.
22. Kinter M., and Sherman N. E. (2000) In protein sequencing and identification using tandem mass spectroscopy, Desidero, D. M., Nibbering, N. M. M. Eds; Jhon Wiley- interscience, inc. New York. Pp 147 – 165.
23. Kondo K., Horinouchi S. (1997). Characterization of the Genes Encoding the Three-Component Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and Expression in *Acetobacter pasteurians*. *Appli. and Environ. Microbiol.* 63 (3): 1131-1138.
24. Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. M. (1998). principles or Biochemistry, 2nd edition. Chapter 18, Oxidative phosphorylation and Photophosphorilation. Worth Publisher. Unites States of America.
25. Lee S., Reth A., Meletzus D., Sevilla M. and Kennedy C. (2000) Characterization of the major Cluster of nif, nix, and Associates Genes in Sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* 182: 7088-7091.
26. Matsushita K., Yoshiro K., Shinegawa E., Ameyama M., Adachi O. (1992). Ethanol Oxidase Respiratory Chain of Acetic Bacteria. Reactivity With Ubiquinone of Pyrroloquinoline Quinone-dependent Acohol Dehydrogenases Purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter Suboxydans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (2): 304-310.

27. Matsushita K. & Adachi O. (1993). Principles and Applications of Quinoproteins. edited by V. L. Davidson, pp. 47-63. New York: Marcel Dekker.
28. Matsushita K., Toyama H. and Adachi O. (1994). Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 36: 247-301.
29. Matsushita K., Yoshiharu Y., 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*. *J. Bacteriol.* 177: 6552 – 6559.
30. Matsushita K., Yakushi T., Toyama. H., Sinagawa T., 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 (9): 4850 – 4857.
31. Matsushita K., Toyama H., Yamada M and Adachi O. (2002). Quinoproteins: Structure, Function, and Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:13 – 22.
32. Mendez O. M. M. (2007). Estudio del Papel del Segundo Mensajero Bis-(3'-5') Ácido Diguanílico Cíclico (e- di- GMP) en el Metabolismo de *Escherichia coli*. Tesis doctoral, Instituto de Ciencias Biomedicas UNAM.
33. Ng. T. C. N., Laker A. N. and Marer R. J. (1995). Cloning, Sequencing and Mutagenesis of the Citochrome C4 gene from *Azotobacter vinelandii*. Characterization of the Mutant Strain and a Proposed New Branch in Respiratory Chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1230: 119-129.
34. Soto U. L. y Baca E. B. (2001) Mecanismos de proteccion de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Rev. Latin. Microbiol.* 43: 37-49.
35. Stephan M., Olivera K.R.S., Teixeira G. Martínez-D and J. Dörebereiner. (1991). Physiology and Dinitrogen Fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.

36. Takemura H., Kondo K., Horinouchi S. and Beppu T. (1993) Induction by Ethanol of Alcohol Dehydrogenase Activity in *Acetobacter pasteurianus*. J. Bacteriol. 175(21): 6857-6866
37. Tamaki T., Fuyama M., Takemura H., Tamaya K., Okumura H., Kawamura Y., Nishiyama M., Horinouchi S. and Beppu T. (1991) Cloning and Sequencing of the Genes Cluster Encoding two Subunit of Membrana-Bound Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. Biochem. Biophys. Acta. 1088: 292-300.
38. Tamaya K., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y. and Beppu T. (1989). Purification and Characterization of Membrana Bound Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 181 – 185.
39. 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 polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 75 (1):168 – 176.
40. Toyama H., Mathews S., Adachi O. and Matsushita K. (2004). Quinohemo Protein Alcohol Dehydrogenase: Structure, Function, and Physiology. Archives of Biochemistry and Biophysic. No. 428: 10 – 21.
41. Toyama H., Chen Z.W., Fukumoto M., Adachi O., Matsushita K. and Mathews S. (2005). Molecular Cloning and structural Analysis of Quinohemoprotein Acohol Dehydrogenase ADH – IIG from *Pseudomona putida* HK5. J. Mol. Biol. 352. (1): 91 – 104.
42. Trcek J., Toyama H., Czuba J., Misiewicz A., Matsushita K. (2005) correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ – dependent ADH in acetics acid bacteria. Apply. Microb. Biotech. 70: 366 – 373.
43. Ureta A., Nordlund S. (2002) Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. J. Bacteriol. 184 (20): 5805 – 5809

44. Yamada Y., Kondo K., (1984). *Gluconoacetobacter* , a New Subgenus Comprising the Acetate-Oxidizing Acetic Acid Bacteria with Ubiquinone-10 in Genus *acetobacter*. J. Gen. Appl. Microbiolo., 30: 297-303.
45. Yamada Y., Hoshino K. And Ishikawa T. (1998). The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Base on the Partial Sequence of 16S ribosomal RNA: the Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to Generic Level. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1244-1251.
46. Young J. P. W. (1992) Phylogenetic Classification of Nitrogen-fixing Organism, p. 43-86. *In* G. Stacey, R. h. Burris and J. Evans (ed.) Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York.

X. ANEXOS.

Anexo I Oligonucleótidos diseñados.

Degenerados:

Subunidad I.

Hacia adelante:

- Oligonucleótido 1 5´TAY WSS CCG CTG GAY CAG ATC AAC CGS3´.
- Oligonucleótido 2 5´ GTS ATC ATC GGCAAC GGC TCS GAR TCS GGC GCS CGS3´
- Oligonucleótido 3 5´AAC TAY GTS TAY GTS AAC TGG GCS TCS GGC CTG GAC CCG AAG3´
- Oligonucleótido 4 5´GGC GCS CTG ACS GCS TAY GGC ATG GAC3´

Reversos:

- Oligonucleótido 2A -5´ SCG SGC GCC SGA YTC SGA GCC GCC GTT GCC GAT GAT SAC3´
- Oligonucleótido3A 5´CTT CGG GTC CAG GCC SGA SGC CCA GTT SAC RTA SAC RTA GTT3´
- Oligonucleótido4A 5´GTC CAT GCC RTA SGC SGT CAG SGC GCC3´

Subunidad II:

Hacia adelante:

- Oligonucleótido SIIC1 5 GAC TGC RTS GCS TGS CAY ACS3´
- Oligonucleótido SIIC2 5´TGC GGC GMV TGC CAY ACS CCS CGS GGC3´
- Oligonucleótido SIIC3 5´TGC GCS ATC TGC CAY MKS AAC GAC3´

Reverso

- Oligonucleótido SIIC1R -5'SAC SCC RTG CAT GAA RWA SGC RTA3'
- Oligonucleótido SIIC2R 5'GCC SCG SGG SGT RTG GCA BKC GCC GCA3'
- Oligonucleótido SIIC3R 5'GTC GTT SMK RTG GCA GAT SGC GCA3'
- Oligonucleótido SIICAR 5' GTC SWS GCC SGY RTG SGT CTG3'

Específicos.

Subunidad I

Hacia adelante

- Oligonucleótido 1SIF1 5'CCC GCC GAC GCG GCC CTG GGC CAC CAG CGT TCC TAC ACC G3'

Subunidad II

Hacia adelante

- Primer 4SIIF2 5' CCG ATC GGC ACG ATC TAT TCG ACG AAC ATC ACG CC3'

Reverso

- Primer 4SIIRI 5'GGC TGT CGT CAG GCA TGT GCA GG.3'

Anexo II. Secuencias Obtenidas

Fragmento 1- 2A:

CTGAAGCTGGCCTGGTATTACGACCTGGACACCAACCGTGGGCAGGAAGGCAC
GCCGCTGATCGTCGATGGCGTGATGTACGCCACCACGAAGTGGAGCAAGATGA
AGGCCCTGGACGCGGCCACGGGCAAGCTGCTGTGGGCGTACGACCCCCGCGT
GCCCCGCAATATCGCCGACAAGGGATGCTGTGACACCGTCAATCGCGGTGCGG
CCTACTGGAACGGCAAGGTCTATTTTCGGCACGTTTCGACGGAAGGCTGATCGCG
CTGGACGCCAAGACCGGCAAGCTGGTCTGGAGCGTGAACACCATCCCCGCCGA
CGCGGCCCTGGGCCACCAGCGTTCCTACACCGTGGACGGCGCGCCGCGTATC
GCCAAGGGCCGG

Fragmento 3- 4A.

AAGACCGGCCGTCCGATCTATAACCCGGATGCGCTCTATACCCTGAACGGCAAG
GAATGGTACGGCATCCCGGGCGATCTGGGCGGCCACAATTTTCGCGGCCATGGC
CTTCAGCCCCCGGACCGGACTGGTCTATATCCCGGCCCAGCAGGTGCCATTCC
TGTATACGAGCCAGGTTCGGCGGCTTCAAGCCGCATCCGGACAGCTGGAATCTC
GGCCTCGACATGAACAAGGTTCGGCGTCACGGATTCGCCCGAGGCCAAGCAGGC
CTTCATCAAGG

Fragmento 4 – 4SIIR1

TTTCCCGGTTTCGATGCCTCGATGATGCCGGATCAGATCGAGGACATCCGGCATT
CCTGATCAAGCGTTCCACGACACCTACCAGAGGGAGGTTGATGCCCGGAAGAA
CGTGGACGGCATAACCCGCACAGTGACGTCTTTCCCTACGGTTTTTCGGATTTTC
CGCATCAACACGACGCATGGTGAACAGAATGCTCAACAGGCTTAAGGTTGCGAT
CGGCACGGCGGCGTTTCAGTCTGCTGGCCACGAGCGCAATGGCACAGGCGCCC
GACCAGGCGCTGATCGACAAGGGCGCCTACGTGGCGCGGCTGGGCGACTGCG
CCGCCTGCCACACTGCCCTGCACGGACAGGCCTATGCGGGTGGCCTGCAGATC
AAGAGCCCGATCGGCACGATCTATTCGACGAACATCACGCCCGATCCGACCTAT
GGCATCGGCCAGTACAGTTTCGAGGATTTTCGAGCAGGCCGTACGGCACGGCGT
GAGAAAGGACGGGACGACGCTGTATCCGGCAATGCCCTATCCCGCGTTCTCGC
GCATGACGCAGGACGACCTGCGGGCGCTCTATGCCTACTTCATGCACGAGGT

Fragmento 1SIF1 – 3A.

ATGGTACGGCGCGCCGCGTATCGCCAAGGGCCGGGTCATCATCGGCAATGGTG
GATCGGAATTCGGCGCGCGGGCTTCGTTTTCGGCCTTCGACGCCGAGACCGGC
AAGCTGGACTGGCGCTTCTACACGGTGCCGAATGCGCAGAACAAGCCGGACAA
CGCGCCGTCCGACGCTGTCCTGATGAGCAAGGCGTACCCGACCTGGAGCCCGA
CCGGCGCATGGACGACCCAGGGCGGGCGGCACGGTATGGGATTCGATCGT
CTATGACCCCGTGACCGATCTGGTCTATCTGGGCGTGGGCAACGGGTCGCCCT
GGAECTACAAGTTCCGTTCCGACGGCAAGGGCGATAACCTGTTCCCTGGGCAGC
ATCGTCGCGCTCAAGCCCGAAACCGGCGAATATGTCTGGCATTTCAGGAAACG
CCGATGGACCAGTGGGACTATACCTCGGTCCAGCAGATCATGACGCTGGATCTG
CCCATCAACGGGCAGACGCGGCATGTCATCGTCCATGCGCCGAAGAACGGCTT
CTTCTACATCATCGACGCCAAGACCGGCGAATTCCTGTCTGGGCAAGAAGTACGT
CTACGTCAACTGGGCGTCCGGCC

XI. ADENDUM A LA TESIS DE LICENCIATURA

A finales del 2008, Lucas,S. y colaboradores, del Joint Genome Institute, CA., USA (No. de acceso GenBank [CP001189](#)), reportaron otra secuencia del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* PAL5. En esta secuencia buscamos la correspondiente al operón *adhAB* y la comparamos con la reportada por el grupo RIOGENE. Ambas secuencias tienen un 100% de identidad.

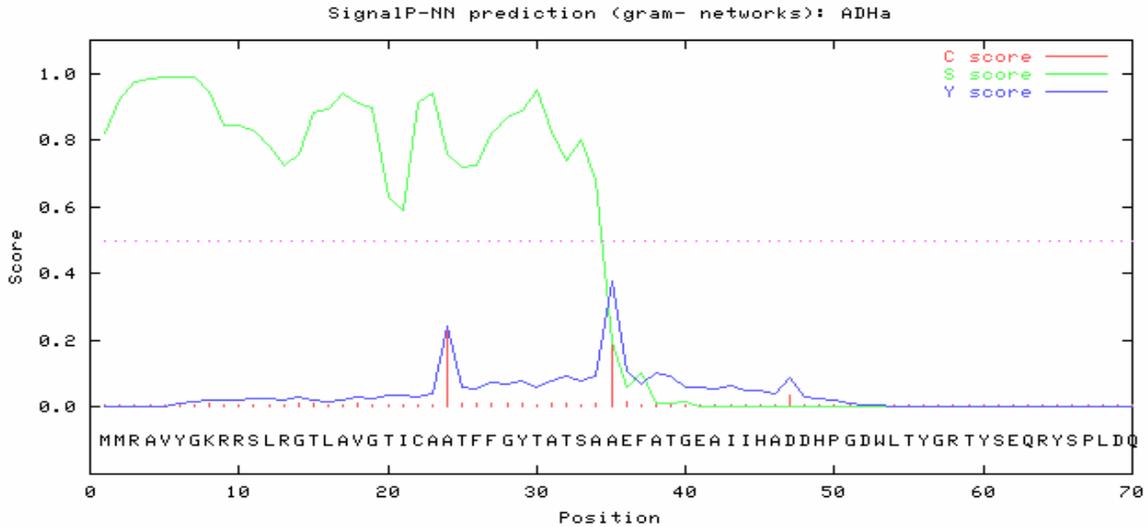
En el análisis de hidrofobicidad y localización en la membrana que hicimos para ambas subunidades de la PQQ-ADH, solo un número limitado de aminoácidos, después de la metionina inicial reportada por el grupo RIOGEN estaban dentro de la membrana, por lo que supusimos que alguna de las metioninas anteriores podría ser el inicio de la traducción y de acuerdo a ello propusimos las secuencias péptido señal para ambas subunidades. Al liberarse la nueva secuencia, el grupo de Estados Unidos reporta que las secuencias del péptido señal para la subunidad I corresponde con los primeros 36 aminoácidos y para la subunidad II con los primeros 28.

Decidimos repetir el análisis, poniendo especial atención en la región reportada por el grupo estadounidense. Encontramos que para la subunidad I (Figura 21), el péptido señal estaría formado por los primeros 35 aminoácidos, de los cuales los últimos 4, estarían localizados fuera de la membrana; de hecho, en el modelo que postulamos basándonos en dicho análisis, la alanina 31 se encuentra hacia el exterior.

Para la subunidad II (Figura 22), la secuencia del péptido señal corresponde con los primeros 28 aminoácidos. De la misma manera que para la subunidad I, los últimos 6 estarían fuera de la membrana (de acuerdo al modelo propuesto, a partir de la alanina 21). Los resultados obtenidos concuerdan con la propuesta del grupo estadounidense; sin embargo, el hecho que, de acuerdo al análisis mencionado, los

últimos aminoácidos se localicen fuera de la membrana, no correspondería con el concepto de péptido señal.

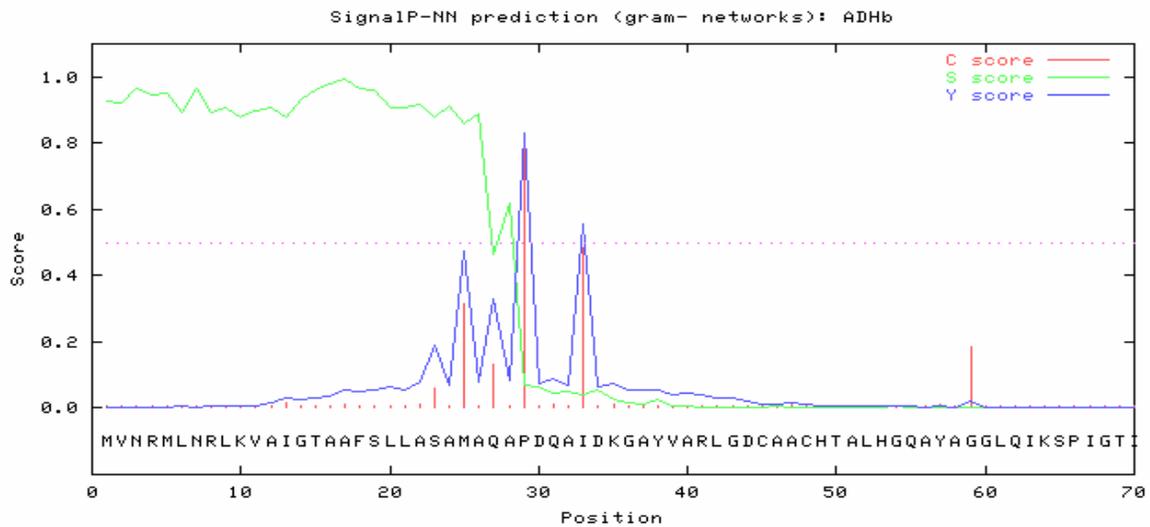
Por otro lado, de acuerdo a los reportes para otras PQQ-deshidrogenasas ^(1,2) este tipo de enzimas se encuentran ancladas a la membrana por su amino-terminal; los resultados obtenidos no explicarían como las subunidades de la enzima están ancladas a la membrana. Además, como mencionamos en la discusión, el modelo propuesto basándonos en los resultados del análisis de hidrofobicidad, tampoco explicaría la transferencia de electrones de la PQQ-ADH hacia la ubiquinona que se encuentra embebida en la membrana. Serán necesarios más experimentos (fusión con *phoA* o *LacZ*; cristalografía de rayos X), para poder definir cual es la topología de la enzima en la membrana.



```
>ADH I                               length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
  max. C    24       0.228  0.52   NO
  max. Y    35       0.379  0.33   YES
  max. S     6       0.991  0.92   YES
  mean S    1-34     0.846  0.49   YES
  D        1-34     0.613  0.44   YES
```

#el sitio de hendidura se localiza entre la posición 34 y 35: TSA-AE

Figura 21. Gráfico que muestra los resultados obtenidos del análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* con el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>). El valor de C nos indica el sitio de la hendidura determinado por la acción de la peptidasa I. El valor de S nos indica la predicción de un péptido señal: el valor mas alto está asociado con los aminoácidos que forman parte de un péptido señal; valores bajos indican que los aminoácidos forman parte de una proteína madura. El valor Y, combina dichos valores para una mejor predicción del sitio de hendidura.



```
>ADH II                      length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
max. C     29         0.809  0.52   YES
max. Y     29         0.829  0.33   YES
max. S     17         0.992  0.92   YES
mean S     1-28       0.895  0.49   YES
D         1-28       0.862  0.44   YES
```

el sitio de hendidura se localiza en la posición 28 y 29 : AQA-PD

Figura 22. Gráfico que muestra los resultados obtenidos del análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* con el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>). Los parámetros son los mismos de la figura anterior.

También nos pareció importante buscar en la secuencia liberada por el grupo estadounidense, un ortólogo para la subunidad III de la PQQ-ADH de *G. oxydans*. De la misma manera que reportamos para la secuencia liberada por el grupo RIOGEN, no encontramos un ortólogo para esta subunidad en la secuencia de *Ga. diazotrophicus*.

1. Matsushita K., Toyama H., Yamada M and Adachi O. (2002). Quinoproteins: Structure, Function, and Biotechnological Applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:13 – 22.
2. Yamada, M., Elias, MD., Matsushita, K. ,Migita, CT,Adachi, A. (2003). *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. Biochimica et Biophysica Acta 1647:185-92.