



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LOS SITIOS REDOX DE LA METALOENZIMA ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) DE LA BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q. PEDRO DAVID SARMIENTO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Martha Elena Sosa Torres
Facultad de Química. UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Nuria Sánchez Puig
Instituto de Química. UNAM

Dr. José de Jesús García Trejo
Facultad de Química. UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Noviembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mis abuelos,
a mis padres y a mis hermanos.*

Recuerde el alma dormida,
avive el seso y despierte
contemplando
cómo se pasa la vida,
cómo se viene la muerte
tan callando;
cuán presto se va el placer,
cómo después de acordado
da dolor,
cómo a nuestro parecer
cualquier tiempo pasado
fue mejor.

Jorge Manrique
Coplas a la muerte de su padre.

Debo confesar que las famosas coplas de Manrique siempre me han causado una ligera confusión y que lo mismo me gustan un día, que me incomodan al siguiente. Deseando ser siempre optimista y nunca perder la alegría o la esperanza, me niego rotundamente a creer que haya podido haber algún *tiempo pasado mejor* que aquél en que me ha tocado vivir. En mi casa son testigos de las múltiples discusiones al respecto. Sin embargo, no he sido ajeno a esos sentimientos universales de nostalgia por el pasado, en especial al crecer y ver *cómo pasa la vida* y que tan pronto llegó una vida diferente con grandes retos e incertidumbre por el futuro.

Y así de pronto se me pasó el tiempo, parece que fue apenas ayer el día en que, hace dos años, escribía un texto similar recordando mi infancia y mis primeros estudios, deseoso ya de embestir al futuro y completar mis estudios de maestría. Hoy me encuentro afrontando ese futuro y algo embestido por la maestría pues, al final del camino, llegaron algunas dificultades y muchas dudas para llevar a buen término esta etapa.

Sin embargo, así como Manrique se extiende por otras treinta y nueve coplas hablando del futuro y de la esperanza en una vida plena, una *morada sin pesar*, y nos recuerda que la vida es breve y no vale la pena desvivirse por las cosas temporales de este mundo, deseo

extenderme solo un poco para reflexionar que, si afrontamos las dificultades y los retos y convertimos nuestras dudas en deseos de alcanzar el ideal más alto, podemos tener la esperanza de alcanzar esa vida plena. Al fin y al cabo, *este mundo bueno fue, si bien usásemos de él, como debemos.*

Y así es como, con nuevas esperanzas en el futuro, he llegado al final de esta etapa después de recorrer un camino en el que, ciertamente, nunca me he encontrado solo y por eso es importante detenerme un momento para agradecer a todas aquellas personas que, de una forma u otra, me ayudaron a llegar hasta este punto.

Primeramente agradezco a Dios por todas las gracias que me ha dado y a mi Buena Madre, pues son quienes más me ayudaron en aquellos momentos difíciles y también porque me hacen no perder la alegría o la esperanza.

Agradezco también a mis padres y a mis hermanos. La gran tentación de los científicos me parece que es solamente entender el mundo y olvidarse de admirarlo. Gracias a mi familia, que me escuchaban cada vez que les contaba mi trabajo en el laboratorio, no dejaba de admirar el mundo y de emocionarme con mi proyecto.

De manera muy especial agradezco a la Dra. Martha Sosa, no parece tan lejano el día en que llegué inocentemente a preguntarle por los proyectos de su laboratorio y estoy seguro de que me ha visto crecer, y espero que madurar también. Gracias por su confianza, sus enseñanzas, su pasión por el trabajo y por su cariño durante este tiempo en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 212, Brenda, Juan Pablo, Luis, Poncho, Daniel, Daniela, Marcos, Rodrigo. Gracias por aquellos momentos de trabajo y convivencia en el laboratorio, ¿de qué nos sirve la alegría si no la compartimos? Y muy especialmente les agradezco a Liz y a Malinali pues vivimos juntos la parte del trabajo pesado, así como momentos de gran emoción al ir avanzando en el proyecto. Este trabajo es tanto de ustedes como mío.

Hay también otros amigos, fuera del laboratorio, a los que quisiera agradecerles. A mis amigos de la prepa que, aunque creo que nunca me entendieron al hablarles de mi proyecto, se mostraron dispuestos a escucharme y apoyarme en todo momento. También

quiero agradecerle de manera muy especial a Silvia, pues desde que nos conocimos y durante las distintas etapas que hemos vivido, me ha brindado su amistad y cariño; y cuando ha sido necesario, su apoyo y consejos.

Agradezco también al Dr. Alejandro Solano, no solo por toda su ayuda para obtener los espectros de EPR sino también por ser parte de nuestro grupo de trabajo, por su interés en el proyecto y por los consejos y comentarios durante los seminarios así como sus enseñanzas en la clase de EPR. En este punto también considero importante agradecer al Dr. Juan Pablo Saucedo, quien nos apoyó de manera incondicional al inicio del proyecto y nunca dejó de interesarse y ayudarnos aunque la distancia lo complicara.

En forma especial agradezco al Dr. Peter Kröneck por todos sus consejos, por sus comentarios, por todo el tiempo de discusión del presente trabajo y por todo su interés, amabilidad y alegría al compartirme sus conocimientos que me ayudaron a tener una visión más completa y quizá más crítica de la ciencia.

Quisiera también agradecerle a la Dra. Silvia Castillo y a la Dra. Norah Barba por sus enseñanzas en la clase de Química Bioinorgánica y por ayudarme, junto con la Dra. Sosa y el Dr. Kröneck, a descubrir esa rama de la química que tanto me ha fascinado.

Agradezco a la Dra. Nuria Sánchez y al Dr. José de Jesús García por su disposición y consejos a lo largo del desarrollo del presente trabajo y por su participación en el Comité Tutor.

También agradezco al Jurado Revisor, Dra. Rosario Muñoz, Dr. Peter Kröneck, Dra. Norah Barba, Dr. Alfredo Torres y Dra. Georgina Ramos, por sus valiosísimos comentarios que ayudaron en gran medida a mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares y al Biol. Raúl Mújica por su amable atención y facilidad para emplear equipos de sonicación y centrifugación.

A la maestra Laurel Fábila Ibarra por su gran amabilidad y apoyo para emplear los equipos de centrifugación y ultracentrifugación.

Al Dr. Leobardo Serrano y al técnico Mario Caro por facilitarnos el uso de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto para el crecimiento de la bacteria.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su valiosa ayuda y contribución en la obtención de cristales y su difracción con rayos-X.

A Leticia García y Julio I. Palacios por su disposición y atención para llevar a cabo los trámites necesarios durante el curso de mis estudios de Maestría.

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en particular a la DGAPA por el apoyo IN2311 otorgado.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Facultad de Química en su 100° Aniversario.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 378665 otorgada para la realización de los estudios de maestría y por los proyectos 128921 y 411280-Q.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM y en particular a la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto.

Abreviaturas empleadas

<i>A. lovaniensis</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
<i>Aci. methanolica</i>	<i>Acidomonas methanolica</i>
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosíntrifosfato
<i>B</i>	Campo magnético
CIO	Oxidasa insensible a cianuro
E	Energía
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FDH	Fructosa deshidrogenasa
<i>g</i>	Factor espectroscópico de desdoblamiento.
g_e	Factor espectroscópico de desdoblamiento del electrón = 2.0023
g_x, g_y, g_z	Componentes <i>en</i> x, y, z del tensor-g.
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
GDH	Glucosa deshidrogenasa
<i>h</i>	Constante de Planck (6.63×10^{-34} J·s)
<i>I</i>	Espín nuclear
<i>J</i>	Acoplamiento espín orbita
<i>K. europaeus</i>	<i>Komagataeibacter europaeus</i>
kDa	Kilodaltones
<i>L</i>	Momento angular

m_s	Momento de espín
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ [•]	Pirroloquinolina quinona semireducida. Radical semiquinona.
PQQH ₂	Pirroloquinolina quinona reducida
PQQ-ADH	Alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Espín electrónico total
SUI	Subunidad I
SUII	Subunidad II
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinona reducida
UV-VIS	Ultravioleta-visible
β_e	Magnetón de Bohr (9.2740×10^{-24} J/T)
μ_e	Momento magnético del electrón
μ_n	Momento magnético nuclear
ν	Frecuencia de la onda electromagnética

Nomenclatura de los aminoácidos naturales

Ácido aspártico	D	Asp	Isoleucina	I	Ile
Ácido glutámico	E	Glu	Leucina	L	Leu
Alanina	A	Ala	Lisina	K	Lys
Arginina	R	Arg	Metionina	M	Met
Asparagina	N	Asp	Prolina	P	Pro
Cisteína	C	Cys	Serina	S	Ser
Fenilalanina	F	Phe	Tirosina	Y	Tyr
Glicina	G	Gly	Treonina	T	Thr
Glutamina	Q	Gln	Triptofano	W	Trp
Histidina	H	His	Valina	V	Val

Índice

Abreviaturas empleadas.....	7
Nomenclatura de los aminoácidos naturales.....	9
Resumen.....	13
1. Antecedentes.....	14
1.1 Bacterias ácido acéticas.....	14
1.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	15
1.3 Oxidación de alcoholes	17
1.4 Alcohol deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i>	21
1.5 Propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	25
1.5.1 Pirroloquinolina Quinona PQQ.....	25
1.5.2 Cúmulo [2Fe-2S]	25
1.5.3 Hemos tipo c.....	27
1.6 Resonancia Paramagnética Electrónica.....	28
1.6.1 Fundamentos teóricos.....	28
1.6.2 EPR de proteínas hierro-azufre	36
1.6.3 EPR de proteínas multihemo.....	37
2. Objetivos.....	40
2.1 Objetivo general	40
2.2 Objetivos particulares.....	40
3. Parte Experimental	41
3.1 Condiciones de cultivo.....	41
3.1.1 Crecimiento en laboratorio en matraces Fernbach de 1.5 L.....	41

3.1.2 Crecimiento en biofermentador de 350 L	41
3.2 Obtención de membranas	41
3.3 Purificación por cromatografía.....	42
3.3.1 Columna QAE	42
3.3.2 Columna DEAE	42
3.3.3 Columna Ha	42
3.3.4 Columna S-100.....	42
3.4 Caracterización molecular	43
3.4.1 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	43
3.5 Ensayos enzimáticos	43
3.5.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	43
3.5.2 Cuantificación de la actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa	43
3.6 Caracterización espectroscópica.	43
3.6.1 Espectroscopía electrónica.....	43
3.6.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	44
3.7 Análisis de secuencias de aminoácidos	44
3.8 Modelo de la estructura tridimensional de la SUI de PQQ-ADH.....	44
3.9 Determinación del acoplamiento magnético.....	44
3.10 Determinación de los estados de espín de los hierros de los hemos en la PQQ-ADH	45
3.11 Cristalización de la proteína PQQ-ADH	45
4. Resultados y discusión.....	47
4.1 Crecimiento de la bacteria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	47
4.2 Purificación de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i>	49

4.2.1 Columna QAE.....	49
4.2.2 Columna DEAE	49
4.2.3 Columna Ha	49
4.2.4 Columna S-100.....	50
4.3 Caracterización de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i>	51
4.3.1 Gel de electroforesis.....	51
4.3.2 Espectroscopía de UV-Vis	51
4.3.3 Espectroscopía de EPR.....	52
4.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos y predicción de la estructura de la subunidad I (SUI) de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i>	55
4.4.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos.....	55
4.4.2 Predicción de la estructura de la subunidad I (SUI) de la PQQ ADH	58
4.4.2.1 Sitio de unión del hemo c	61
4.4.2.2 Sitio de unión del PQQ	62
4.4.2.3 Sitio de unión del cúmulo [2Fe-2S].....	63
4.5 Acoplamiento magnético entre los cofactores PQQ y [2Fe-2S] en la proteína PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	70
4.6 Determinación de los estados de espín de los hemos c presentes en la PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	76
4.7 Cristalización de la proteína PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	84
5. Resumen y conclusiones.....	86
Referencias	89

Resumen

La proteína de membrana alcohol deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona de tipo III (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído. Posee como cofactores un PQQ, cuatro hemo *c* y es la primer ADH de este tipo que posee un cúmulo [2Fe-2S] de tipo ferredoxina. A pesar de los potenciales redox de dichos grupos, la proteína siempre es purificada en su estado reducido, aún en presencia de oxígeno. A la fecha se desconoce la razón de dicha estabilidad así como la estructura tridimensional de ninguna ADH de tipo III.

En el presente trabajo se llevó a cabo un nuevo método de cultivo de *Ga. diazotrophicus* para la expresión de la PQQ-ADH completamente activa. Por medio de un análisis de la secuencia de aminoácidos se identificaron los residuos conservados de unión al PQQ y a un hemo *c*. Se realizó, además, un modelo *in silico* de la estructura tridimensional de la SUI de la PQQ-ADH permitiendo proponer el sitio unión para el cúmulo [2Fe-2S], que se propuso coordinado a un par de cisteínas, a un residuo de glutamato y a un residuo de aspartato de manera bidentada. Cabe mencionar que se propuso al PQQ y al [2Fe-2S] como parte del sitio activo. A partir de dicho modelo se propuso también una ruta para la transferencia electrónica del PQQ al cúmulo y de éste al hemo *c*. Por medio de espectroscopía de EPR se observó un acoplamiento antiferromagnético entre el PQQ• y el cúmulo [2Fe-2S]⁺. También por EPR se determinaron los estados de espín de los átomos de hierro de los cuatro hemo *c* en estado oxidado, siendo uno de alto espín y tres de bajo espín. Estos resultados ayudan a comprender la estabilidad de la proteína en estado reducido. Finalmente se obtuvieron cristales de la PQQ-ADH, hasta el momento se sigue trabajando en la obtención de la estructura tridimensional.

1. Antecedentes

1.1 Bacterias ácido acéticas

Dentro de las alfa-proteobacterias, el orden *Rhodospirillales* es conocido por sus aplicaciones en agricultura. En dicho orden se encuentran las familias *Rhodospirillaceae* y *Acetobacteraceae*. Esta última consiste en dos grupos clasificados de acuerdo a sus aplicaciones y a su filogenia: el grupo acético (al que pertenecen las bacterias ácido acéticas) y el grupo acidofílico (con géneros acidofílicos y neutrofílicos como *Acidiphilium* y *Roseomonas*) (Komagata *et al.*, 2014). Son bacterias Gram negativas y aeróbicas estrictas. Tienen la capacidad de crecer en medios ácidos con pH de entre 3.0 y 3.5 aunque el intervalo óptimo es entre 5.0 y 6.5 (Massena y dos Santos., 2015).

Las bacterias ácido acéticas liberan al medio una gran cantidad de productos de la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares, principalmente etanol, pero también pueden oxidar glicerol a dihidroxiacetona, D-sorbitol a L-sorbosa, D-manitol a D-fructosa y D-glucosa a los ácidos D-glucónico, 2-ceto-D-glucónico o 5-ceto-D-glucónico (Komagata *et al.*, 2014). Dichas oxidaciones son conocidas como *fermentaciones oxidantes* y son llevadas a cabo por medio de deshidrogenasas de membrana las cuales se pueden dividir en quinoproteínas y flavoproteínas de acuerdo al grupo prostético que posean ya sea pirroloquinolina quinona (PQQ) o flavina adenina dinucleótido (FAD) respectivamente.

Estas deshidrogenasas dependientes de PQQ o FAD se encuentran en la membrana citoplásmica y tienen un dominio orientado hacia el periplasma. Además están acopladas a la cadena respiratoria que transfiere electrones a su aceptor final, oxígeno, generando energía para el crecimiento de la bacteria (Matsushita, *et al.* 1994).

La mayoría de estas deshidrogenasas de membrana están formadas por tres subunidades: Una subunidad grande de 58 – 80 kDa, una segunda subunidad de 45 - 50 kDa, y una tercera subunidad de entre 15 y 20 kDa. Se puede resaltar el hecho que hay dos tipos de subunidades grandes aquellas con PQQ como grupo prostético (70 – 80 kDa) y otras con FAD como grupo prostético (alrededor de 70 kDa). En muchas deshidrogenasas, la segunda

subunidad posee 3 hemo c como grupos prostéticos. Es importante mencionar que en algunas deshidrogenasas no se encuentra la tercera subunidad e incluso hay enzimas que carecen también de la segunda.

Además de las deshidrogenasas de membrana mencionadas anteriormente, existen deshidrogenasas citoplásmicas para oxidar alcoholes y carbohidratos. Estas deshidrogenasas, a diferencia de las de membrana, son dependientes de NAD(P)⁺ y el pH óptimo de trabajo es mayor que en las proteínas de membrana. También se puede apreciar una considerable diferencia en la actividad específica siendo mayor en las membranas. En general se puede hablar de las proteínas de membrana como parte de la cadena respiratoria y las proteínas solubles en el citoplasma como sistemas para emplear los alcoholes y carbohidratos como fuente de carbono.

1.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

En 1988 Johanna Dobereiner y Vladimir Cavalcante descubrieron una bacteria capaz de fijar nitrógeno en las raíces y tallos de la caña de azúcar en Brasil (Cavalcante y Dobereiner. 1988). Aunque en un principio la bacteria fue llamada *Saccharobacter nitrocaptans* en 1989 fue renombrada como *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis, *et al.* 1989) pero, con nueva evidencia filogenética, su nombre fue corregido a *Gluconacetobacter diazotrophicus*. La bacteria es un bacilo Gram negativo que se mueve con flagelos peritricos. Mide entre 0.5-0.8 y 2.0 μm (fig. 1.1). Es una bacteria endófito de la caña de azúcar, sin embargo, se ha encontrado también en cultivos de café (Jimenez-Salgado, *et al.* 1997), mango, plátano (Muthukumarasamy, *et al.* 2002) y arroz (Muthukumarasamy, *et al.* 2005) entre otros.

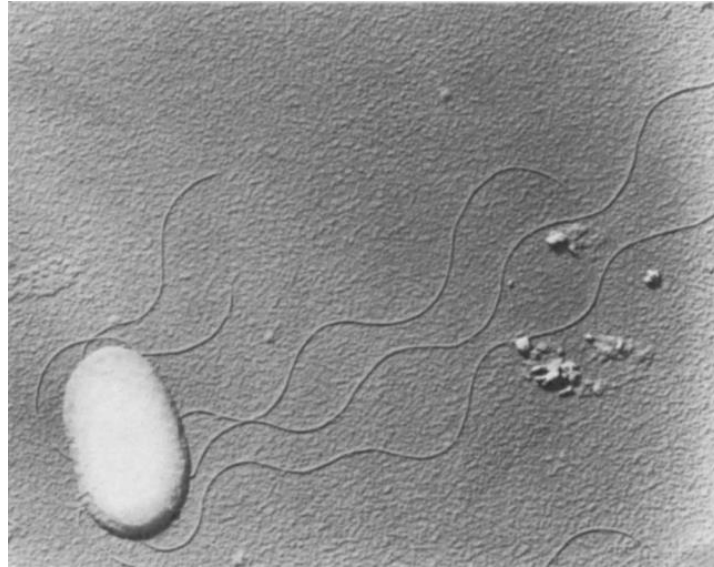


Figura 1.1. Micrografía electrónica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* mostrando los flagelos peritricos. Las dimensiones de la célula son de 0.7 x 0.9 x 2 μm (Gillis, *et al.* 1989).

Ga. diazotrophicus fue la primera especie de la familia *Acetobacteraceae* en la que se describió la fijación biológica de nitrógeno (Cavalcante y Dobereiner. 1988) y durante mucho tiempo se pensó que era la única especie dentro de dicha familia capaz de fijar nitrógeno. Sin embargo, desde hace algunos años se han reportado nuevas especies capaces de fijar nitrógeno como *Gluconacetobacter nitrocaptans* y *Gluconacetobacter azotocaptans* (Ramírez-Fuentes, *et al.* 2001), *Swaminathania salitolerans* (Loganathan y Nair. 2004), *Acetobacter peroxydans* (Burris. 1994), *Acetobacter nitrogenifigens* (Dutta y Gachhui. 2006), *Asaia bogorensis* y *Asaia siamensis* (Samaddar, *et al.* 2011).

Las nitrogenasas son las enzimas encargadas la fijación de nitrógeno y la reacción que catalizan (Ec. 1) requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP, para poder romper el enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ (942 kJ/mol) (Nelson y Cox. 2013).



Debido a que las nitrogenasas son extremadamente sensibles al oxígeno (Maier. 2004) los organismos fijadores de nitrógeno han desarrollado sistemas de protección para dichas

enzimas que evitan la pérdida de actividad de nitrogenasa aún en medios con O₂ presente (Flores-Encarnación, *et al.* 1999).

Uno de ellos consiste en una alta tasa respiratoria por parte de la célula capaz de abatir la tensión del oxígeno y mantener un ambiente intracelular microaerofílico (protección respiratoria) (Dalton y Postgate. 1969). Este mecanismo, además de que mantiene a la enzima activa aún a altas concentraciones de oxígeno, provee ATP suficiente para la fijación de N₂.

Un estudio demostró que al aumentar la aereación aumenta tanto el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* como la actividad de su nitrogenasa. Bajo estas condiciones, hay un sistema membranal de transporte de electrones muy activo compuesto por enzimas deshidrogenasas dependientes de PQQ, principalmente las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas (PQQ-ADH y PQQ-ALDH) (Flores-Encarnación, *et al.* 1999).

1.3 Oxidación de alcoholes

Existen diversas enzimas que oxidan alcoholes y dependiendo del cofactor que empleen pueden clasificarse en 4 grupos (Gvozdev, *et al.* 2012):

- 1) Enzimas que contienen pirroloquinolina quinona (PQQ) o quinoproteínas. Pueden además incluir hemos.
- 2) Enzimas que contienen flavina adenina dinucleótido (FAD)
- 3) Enzimas que contienen nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P)) y suelen subdividirse en enzimas de cadena corta, activadas por Fe y enzimas que contienen Zn.
- 4) Enzimas que contienen hemos y el factor F420

Algunas quinoproteínas contienen, además del PQQ, uno o más grupos prostéticos adicionales hemo tipo *c* y se les conoce como quinohemoproteínas. De este grupo, destacan las alcohol deshidrogenasas dependientes de PQQ (PQQ-ADH). Las PQQ-ADH se pueden encontrar tanto en el espacio periplasmático como unidas a la membrana citoplásmica y forman, junto con la cadena respiratoria el llamado “sistema alcohol oxidasa periplásmico”.

Las PQQ-ADH se pueden clasificar en 3 grupos (Toyama, *et al.* 2004):

- Las PQQ-ADH de tipo I: Contienen sólo un PQQ como grupo prostético. Poseen dos subunidades y generalmente se encuentran solubilizadas en el periplasma. Las principales ADH de tipo I han sido aisladas de *Pseudomonas* (Toyama, *et al.* 1995; Vangnai, *et al.* 2002; Görisch y Rupp, 1989) y *Stenotrophomonas* (Tachibana, *et al.* 2003).
- Las PQQ-ADH de tipo II: Son enzimas solubles, contienen además del PQQ un hemo tipo c. Poseen una sola subunidad y se encuentran principalmente en *Pseudomonas* (Toyama, *et al.* 1995; Vangnai y Arp. 2001; Shima, *et al.* 1986), *Ralstonia* (Zarnt, *et al.* 2001) y *Comamonas* (Groen, *et al.* 1986).
- Las PQQ-ADH de tipo III: Son enzimas de membrana y son específicas de bacterias ácido acéticas. Poseen una subunidad I (de 72-80 kDa) con el PQQ y un hemo c y una subunidad II (de 45 a 55 kDa) con tres hemo c. Adicionalmente pueden tener una subunidad III (de 8 a 16 kDa).

Las bacterias ácido acéticas, como se mencionó anteriormente, se caracterizan por la oxidación parcial de alcoholes a sus ácidos correspondientes (específicamente de etanol a ácido acético). Dicha oxidación se da por medio de la enzima de membrana alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH de tipo III), que oxida el etanol al acetaldehído por medio de una eliminación de $2e^-$ y $2H^+$ (Ec. 2), y la enzima aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH), que oxida el acetaldehído al ácido acético por medio de una eliminación de $2e^-$ y $2H^+$ (Ec. 3). Por otro lado, dentro del citoplasma se puede llevar a cabo una oxidación completa de etanol por medio de enzimas dependientes de $NAD(P)^+$ donde el ácido acético producido es utilizado por la acetil CoA sintetasa para ingresar al ciclo de los ácidos tricarbónicos (fig. 1.2) (Matsushita *et al.* 2004; Mamlouk y Gullo. 2013). Se ha probado en mutantes de especies *Acetobacter* que carecen de la ADH de membrana que la expresión de las enzimas dependientes de $NAD(P)^+$ ADH y ALDH se ve incrementada en presencia de etanol pero sin observar producción de ácido acético (Cinnawirotpisan, *et al.* 2003a; Cinnawirotpisan, *et al.* 2003b). Lo anterior sirve para comprobar que la función de las deshidrogenasas citoplásmicas es únicamente utilizar el etanol como fuente de carbono.

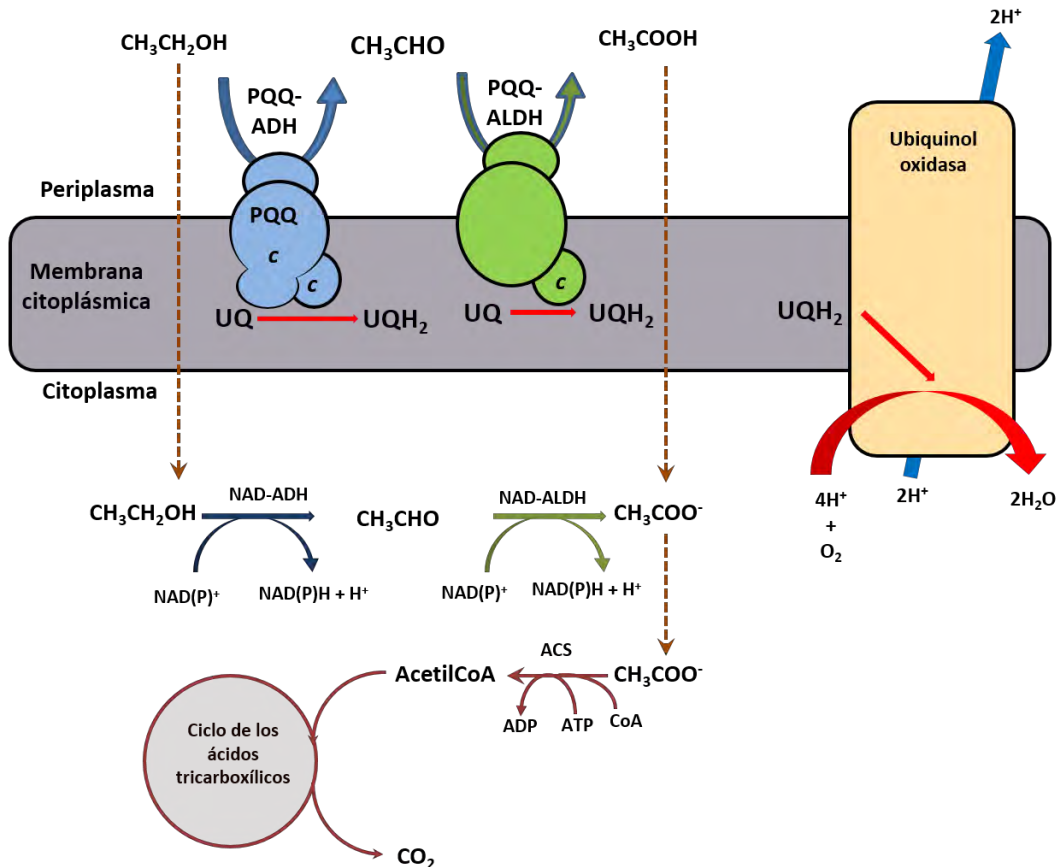
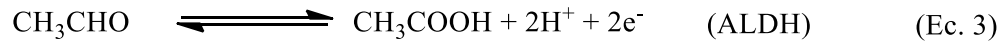
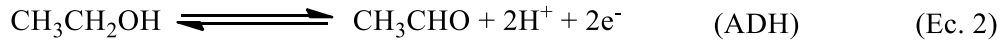


Figura 1.2. Oxidación de alcoholes en las bacterias ácido acéticas. Las proteínas de membrana alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) funcionan como las primeras deshidrogenasas en la fermentación oxidativa de etanol. Las proteínas dependientes de NAD, alcohol deshidrogenasa (NAD-ADH) y aldehído deshidrogenasa (NAD-ALDH), se encuentran en el citoplasma y funcionan para el empleo de etanol como fuente de carbono. (Matsushita, et al. 2004).

Se han aislado PQQ-ADHs de tipo III de distintos géneros de bacterias ácido acéticas *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter* y *Acidomonas* (tabla 1.1) (Yakushi y Matsushita, 2010). Están formadas por 3 subunidades excepto por las ADHs

de los géneros *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* que únicamente tienen dos subunidades.

Tabla 1.1. Masas moleculares de las subunidades PQQ-ADHs de diversas especies de bacterias ácido acéticas (Yakushi y Matsushita, 2010).

Especie	Masas moleculares de las subunidades (kDa)		
	I	II	III
<i>A. lovaniensis</i>	72	50	15
<i>A. pasteurianus</i>	72	44	20
<i>Ga. diazotrophicus</i>	71	44	-
<i>K. europaeus</i>	72	45	-
<i>K. intermedius</i>	72	45	-
<i>K. xylinus</i>	71	44	-
<i>G. oxydans</i>	85	49	14
<i>Aci. methanolica</i>	80	54	8

La subunidad I de las ADH es la más grande (72-80 kDa) y contiene un hemo *c* y un grupo PQQ. En ella se encuentra el sitio catalítico para la oxidación de etanol. La subunidad II pesa alrededor de 50 kDa y contiene 3 hemos tipo *c* y en ocasiones una quinona fuertemente unida a la proteína (Matsushita, *et al.* 2008). La tercera subunidad es la más pequeña (20 kDa) y su función es ayudar a mantener asociadas a las subunidades I y II con la membrana además de contribuir a la correcta conformación de la ADH para la correcta transferencia de electrones. (Yakushi y Matsushita, 2010; Kondo y Horinouchi. 1997)

Las bacterias ácido acéticas poseen, además, una forma inactiva de la ADH con la misma composición de subunidades pero con 10 veces menos actividad de oxidoreductasa para Q₁. Sin embargo posee mayor actividad oxidoreductasa para UQH₂:ferricianuro por lo que se piensa que la forma inactiva de la ADH tiene un papel importante en la regulación de los niveles redox de UQ/UQH₂ en la membrana contribuyendo así a la funcionalidad de la bacteria en medios ácidos y en condiciones de aereación alta (Yakushi y Matsushita. 2010). Se ha reportado además una ADH inactiva de *Gluconacetobacter diazotrophicus* donde se

observaban cambios significativos en los potenciales redox de los grupos prostéticos además de que se purifica en estado oxidado (Gómez-Manzo *et al.* 2012).

1.4 Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*

La proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* fue aislada y estudiada por los grupos de Escamilla y Sosa-Torres (Gómez-Manzo, *et al.* 2012; Gómez-Manzo. 2007; Gómez-Manzo, *et al.* 2008; Gómez-Manzo, *et al.* 2010) encontrando que tiene una masa molecular de 115 kDa y que está formada por dos subunidades: SUI y SUII de 71.4 y 43.5 kDa respectivamente. Por medio de estudios de espectroscopía UV-Vis se identificaron los grupos prostéticos PQQ• (con bandas en 317 y 350 nm) y hemo *c* reducidos (con la banda Soret en 417 y las bandas α y β en 523 y 552 nm).

A pesar de que la especificidad de sustrato de las ADH de tipo III es restringida y pueden oxidar alcoholes primarios (C₂-C₆) pero no metanol, alcoholes secundarios ni aldehídos, la ADH de *Ga. diazotrophicus* puede oxidar acetaldehído, glutaraldehído y propionaldehído siendo el primero casi tan buen sustrato como el etanol. Las K_{cat}/K_M para etanol y acetaldehído son 3.6×10^{-8} M y 2.5×10^{-7} M respectivamente (Gómez-Manzo. 2007).

Estudios de pH con distintos aceptores de electrones indican un máximo de actividad en pH = 6. Dicha respuesta depende únicamente de las propiedades de la enzima contrario a lo reportado para otras ADH de membrana que dependen del donador y receptor de electrones.

Adicionalmente se realizaron estudios de EPR para observar el radical de la semiquinona de PQQ• a 77 K (Figura 1.3A) observando una señal en $g = 2.0034$. Al realizar los estudios de EPR a 20 K se observó un patrón de resonancia para un cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina con valores de $g_{xyz} = 2.007, 1.941$ y 1.920 (Figura 1.3B). Dichas señales indican, al igual que el espectro electrónico, que la proteína se aísla con sus cofactores en estado reducido. Por medio de espectroscopía de absorción atómica se determinó el hierro total encontrando 6 Fe y un Ca por heterodímero de ADH, lo que es consistente con la presencia de cuatro hemos tipo *c* y un cúmulo [2Fe-2S] (Gómez-Manzo *et al.* 2010).

Se determinaron también los potenciales de reducción de los hemo tipo c por medio de una titulación espectro-electroquímica (UV-Vis - electroquímica) siguiendo el cambio de la banda α en 553 nm (Figura 1.4). Para la determinación de los potenciales del PQQ y de la ferredoxina se realizó mediante una titulación espectro-electroquímica (EPR - electroquímica) (Figura 1.5).

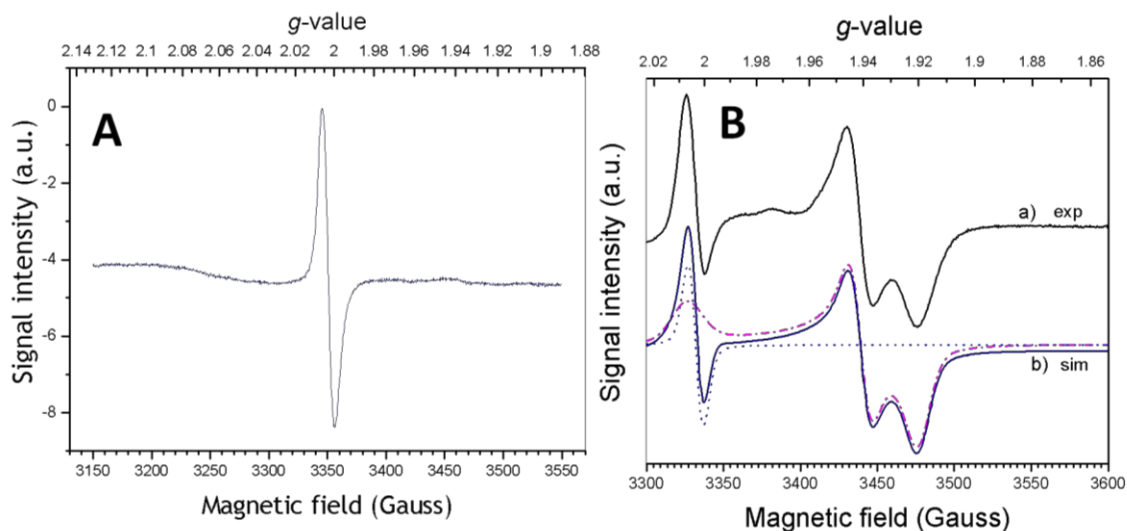


Figura 1.3. Espectros de EPR de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién purificada. A) Espectro en banda X del radical de semiquinona de PQQ• a una frecuencia de 9.393268 GHz a una potencia de 0.20 mW a 77 K. B) Espectro de EPR en banda X del cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* a una frecuencia de 9.342559 GHz a una potencia de 2.00 mW a 20 K a) espectro experimental y b) línea sólida azul espectro simulado; línea punteada azul: semiquinona de PQQ•; línea discontinua rosa: cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ (Gómez-Manzo, et al. 2010).

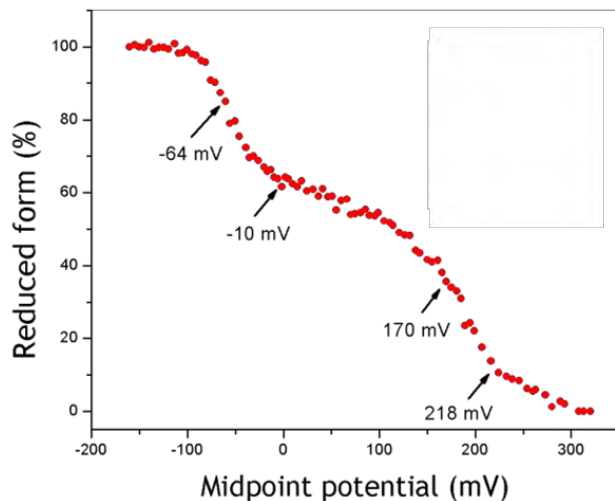


Figura 1.4. Titulación espectro-electroquímica de los hemos tipo *c* de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se realizó con una muestra a una concentración de 15 mg/mL en buffer de fosfatos 50 mM, 0.1 % v/v de Tritón X-100 y pH = 6.0. (Gómez-Manzo, et al. 2010).

Con los potenciales encontrados, resumidos en la tabla 1.3, se asignaron los grupos PQQ, [2Fe-2S], y un hemo tipo *c* (cl) en la SUI y tres hemos tipo *c* (cl₁, cl₂, cl₃) en la SUII. Se propuso además, un mecanismo hipotético para la transferencia electrónica intra e intermolecular en el heterodímero de la PQQ-ADH de membrana de *Ga. diazotrophicus* (Figura 1.6).

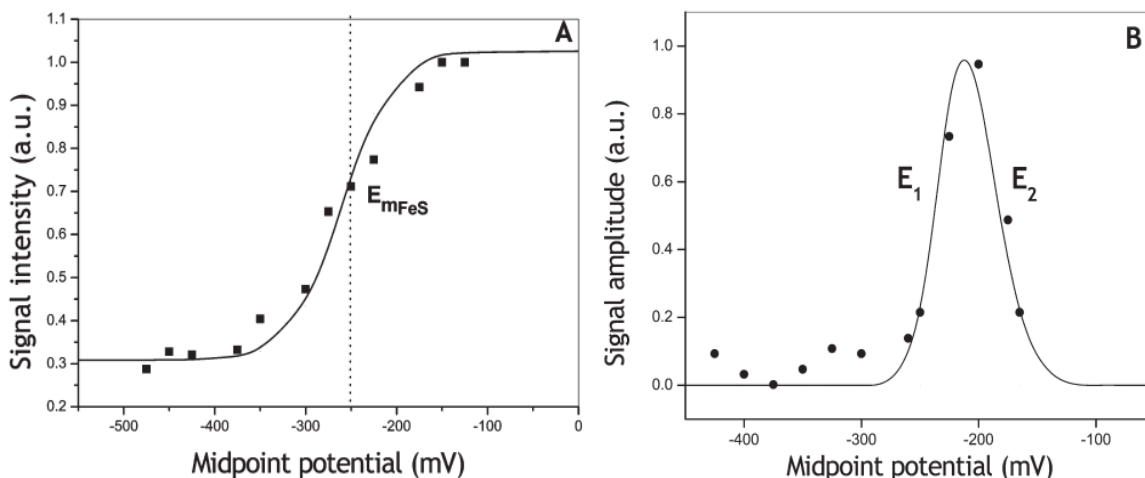


Figura 1.5. Titulación espectro-electroquímica por EPR de A) el cúmulo de ferredoxina [2Fe-2S]⁺ a 20 K y B) la semiquinona de PQQ[•] a 77 K. La titulación se llevó a cabo con una muestra a una concentración de 32 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, 0.1 % v/v de Tritón X-

100 y pH = 6.0 (Gómez-Manzo, et al. 2010). La oxidación de la PQQ-ADH se llevó a cabo por medio de una mezcla de quinonas: antraquinona-2-sulfonato (-225 mV), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (-145 mV), menadiona (0 mV), duroquinona (+50 mV), 1,4-naftoquinona (+69 mV), fenazinmetosulfato (+80 mV), 1,2-naftoquinona (+134 mV) y 1,4-benzoquinona (+285 mV). Los valores de potencial fueron ajustados con $K_3[Fe(CN)_6]$ y ditionita de sodio.

Tabla 1.3. Potenciales determinados por medio de titulaciones espectro-electroquímicas para los grupos prostéticos de la PQQ-ADH de *G. diazotrophicus* (Gómez-Manzo, et al. 2010).

Potenciales redox vs ENH a pH = 6
(mV)

PQQ	-240 (±5) / -180 (±5)
[2Fe-2S] ⁺²⁺	-250 (±5)
cl	-64 (±5)
cll ₁	-8 (±5)
cll ₂	+185 (±5)
cll ₃	+210 (±5)

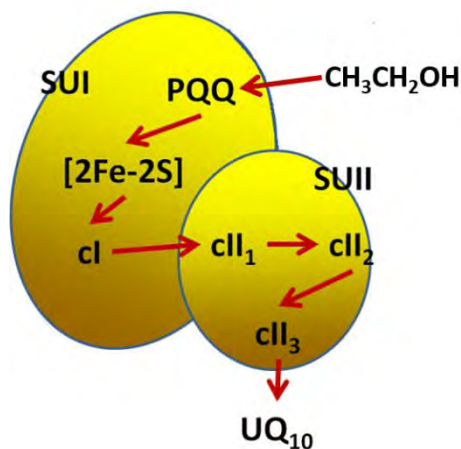


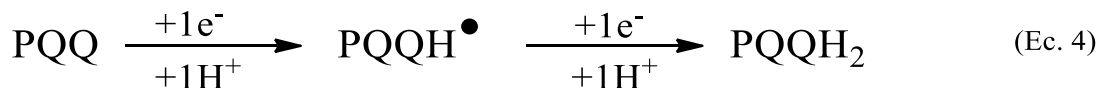
Figura 1.6. Mecanismo propuesto para la transferencia de electrones para la oxidación de etanol a través de los cofactores de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. El PQQ, el cúmulo [2Fe-2S] y el hemo cl, se asignan a la primera subunidad (SUI), los hemos cll₁, cll₂ y cll₃ se asignan a la segunda subunidad (SUII) (Gómez-Manzo, et al. 2010).

Finalmente, en un estudio reciente, se encontró que la PQQ-ADH puede llevar a cabo la oxidación de etanol a acetaldehído y posteriormente llevar a cabo una segunda oxidación del acetaldehído al ácido acético sin liberar en ningún momento el acetaldehído al medio (Gómez-Manzo, *et al.* 2015).

1.5 Propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

1.5.1 Pirroloquinolina Quinona PQQ

Es importante recordar brevemente las propiedades magnéticas de los cofactores. En el caso del PQQ se tienen tres posibles estados. Uno donde se encuentra totalmente oxidado (PQQ), uno donde se encuentra reducido únicamente por un electrón y es el caso en el que existe un radical libre sobre el PQQ (PQQH[•]) y otro donde se encuentra reducido por dos electrones (PQQH₂) (Ec. 4).



En el caso de la PQQ-ADH se aísla en el estado de semiquinona (PQQH[•]) teniendo el sistema un electrón desapareado (radical libre) con un espín electrónico total, $S = 1/2$.

1.5.2 Cúmulo [2Fe-2S]

Para el cúmulo [2Fe-2S] las propiedades magnéticas están dadas por los estados de oxidación de los átomos de hierro. Debido a la geometría tetraédrica de los átomos de hierro, éstos se encuentran en un estado de alto espín. Cuando el cúmulo se encuentra completamente oxidado, (con los dos átomos de hierro en estado de oxidación Fe(III)), cada uno de los hierros posee un espín total de $S = 5/2$. Debido al acoplamiento antiferromagnético entre los Fe(III) (Liu, *et al.* 2014), el espín total del cúmulo resulta de $S = 0$ (Figura 1.7).

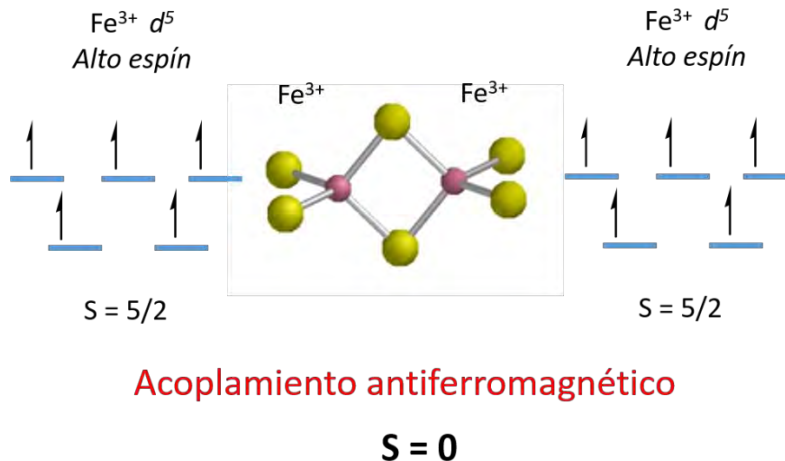


Figura 1.7 Estructura, desdoblamiento de los orbitales *d* en un campo tetraédrico, de los átomos de hierro y estados de espín para un cúmulo [2Fe-2S] en estado oxidado (Liu, *et al.* 2014)

Por otro lado, cuando el cúmulo se encuentra en estado reducido (con un Fe(II) y un Fe(III)) entonces, uno de los dos hierros cambia su espín total, $S = 4/2$ y, debido al acoplamiento antiferromagnético, el espín total es de $1/2$ (Figura 1.8).

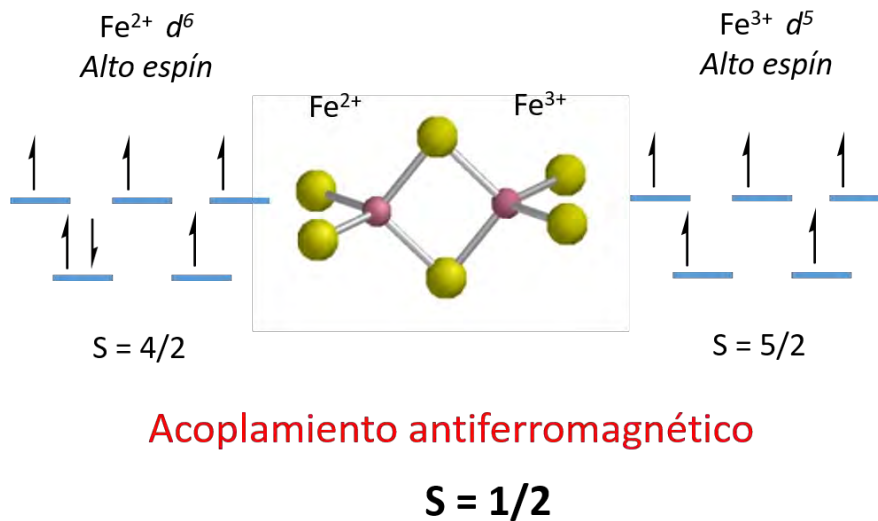


Figura 1.8 Estructura, desdoblamiento de los orbitales *d* en un campo tetraédrico de los átomos de hierro y estados de espín para un cúmulo [2Fe-2S] en estado reducido (Liu, *et al.* 2014).

1.5.3 Hemos tipo c

En el caso de los hemos, las propiedades magnéticas también están dadas por los átomos de hierro. Éstos se encuentran en una geometría octaédrica, la cual puede tener una configuración de alto espín o bajo espín, dependiendo de los ligantes a los que se encuentre unido. En el caso de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, que se aísla siempre en estado reducido, los hemos poseen un átomo de Fe(II) el cual tiene una configuración electrónica de valencia de d^6 . Cuando se encuentra en configuración de bajo espín, todos los electrones se encuentran apareados por lo que el espín total es $S = 0$. Por otro lado, si se encuentra en estado de alto espín, se encuentran dos electrones apareados y cuatro desapareados teniendo un espín total, $S = 2$ (Figura 1.9).

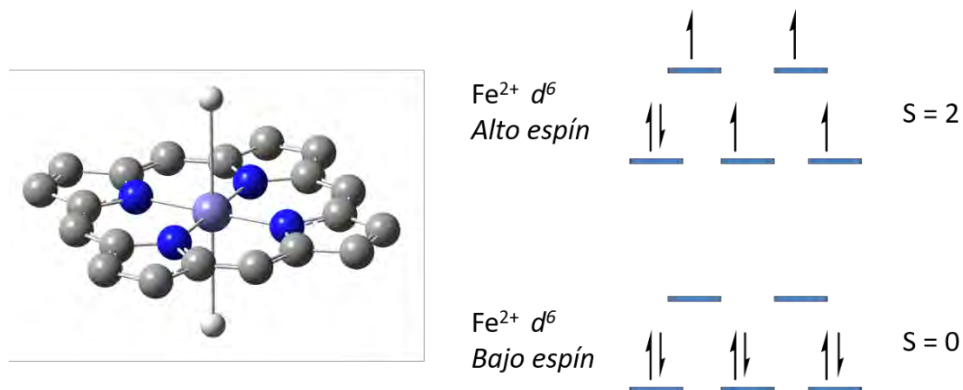


Figura 1.9 Estructura y desdoblamiento de los orbitales d en un campo octaédrico de los átomos de hierro y estados de espín para un hemo en estado reducido.

Cuando los hemos se encuentran oxidados, éstos poseen un átomo de Fe(III) con cinco electrones desapareados en los orbitales d . En este caso existen dos posibilidades: En un estado de bajo espín, únicamente existe un electrón desapareado dando así un espín total, $S = 1/2$. Mientras que en estado de alto espín los cinco electrones se encuentran desapareados resultando en un espín total, $S = 5/2$ (Figura 1.10).

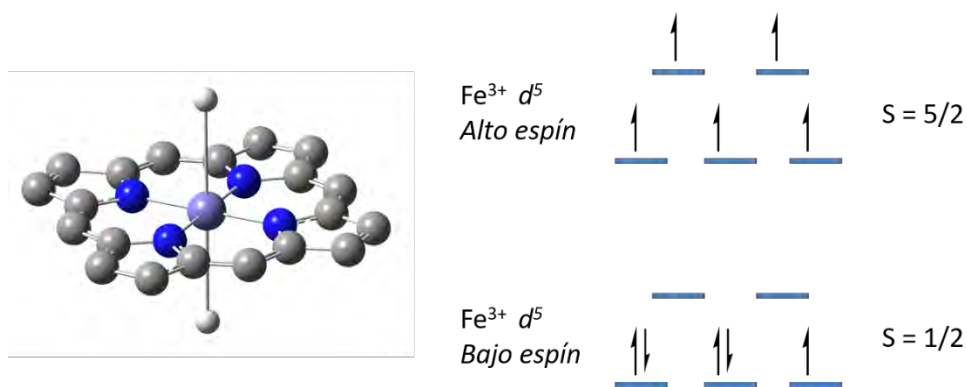


Figura 1.10 Estructura, desdoblamiento de los orbitales d en un campo octaédrico, de los átomos de hierro y estados de espín para un hemo en estado oxidado.

1.6 Resonancia Paramagnética Electrónica

1.6.1 Fundamentos teóricos

La resonancia paramagnética electrónica, RPE (también conocida como EPR por sus siglas en inglés), es una técnica espectroscópica que permite conocer ciertas propiedades de centros paramagnéticos, así como el ambiente en que se encuentran, por medio de su interacción con un campo magnético aplicado (Palmer. 2000). Dicho paramagnetismo surge de los electrones desapareados presentes en la muestra y por ello, cualquier sustancia con electrones desapareados, puede ser estudiada por medio de EPR.

La espectroscopía de EPR es muy parecida, en concepto, a la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y, al igual que ésta, involucra la interacción de radiación electromagnética con momentos magnéticos. En el caso de la RMN, con momentos magnéticos nucleares mientras que en el EPR, el momento magnético pertenece a los electrones (Rudolf. 2004).

El espectrómetro convencional consiste en una cavidad, sometida a un campo magnético, en la que se coloca la muestra, la cual resuena a una frecuencia de microondas determinada. Esto lleva a un realce del campo de microondas y por tanto a un aumento en la sensibilidad. Sin embargo impide la adquisición del espectro de la manera convencional (absorbancia en función de la frecuencia) por lo que se aplica un barrido de campo

magnético B_0 por medio de un electroimán (Cammack y Cooper. 1993). Bajo tales circunstancias, la energía necesaria para la absorción por un electrón desapareado está dada por (Solano-Peralta, 2007):

$$E = -\mu_e \cdot B_0 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde B_0 es el campo magnético aplicado y μ_e el momento magnético del electrón, definido como:

$$\mu_e = -g\beta S \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde β es el magnetón de Bohr ($\beta = (e/2m)(h/2\pi) = 9.27 \times 10^{-24} \text{JT}^{-1}$), g_e es el factor espectroscópico de desdoblamiento ($g_e = 2.0023$) y S es el espín total asociado al electrón ($S = 1/2$).

Así es posible sustituir la Ec. 2 en la Ec. 1:

$$E = g\beta S \cdot B_0 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde el producto punto estaría definido por la componente de S en la dirección del campo B , M_S , multiplicado por la magnitud del campo B_0 .

$$E = g\beta M_S B_0 \quad (\text{Ec. 8})$$

Para el caso del electrón con $S = 1/2$, el valor de M_S puede tomar los valores $+1/2$ y $-1/2$. Por lo tanto, bajo un campo magnético, el electrón puede estabilizarse ($M_S = -1/2$) o desestabilizarse ($M_S = +1/2$) y la magnitud de este efecto varía linealmente con respecto a la intensidad de B_0 . Esta interacción es conocida como Efecto Zeeman electrónico (Solano-Peralta, 2007; Palmer, 2000).

En la figura 1.11 (Rudolf, 2004) se ilustra el Efecto Zeeman electrónico como función de un campo magnético aplicado. De acuerdo a la ley de distribución de Boltzman, cabe esperar que exista un ligero exceso en la población del estado más estable ($M_S = -1/2$), lo que permite la absorción de energía de acuerdo a la condición de resonancia:

$$\Delta E = h\nu = g\beta B_0 \quad (\text{Ec. 9})$$

Es decir, que una transición es observada, cuando el campo magnético separa los niveles de energía a una magnitud igual a la de la energía de la radiación aplicada. Por lo tanto, al medir los valores de ν y de B_0 es posible conocer el valor de g , el cual nos dará información acerca del electrón que absorbió energía.

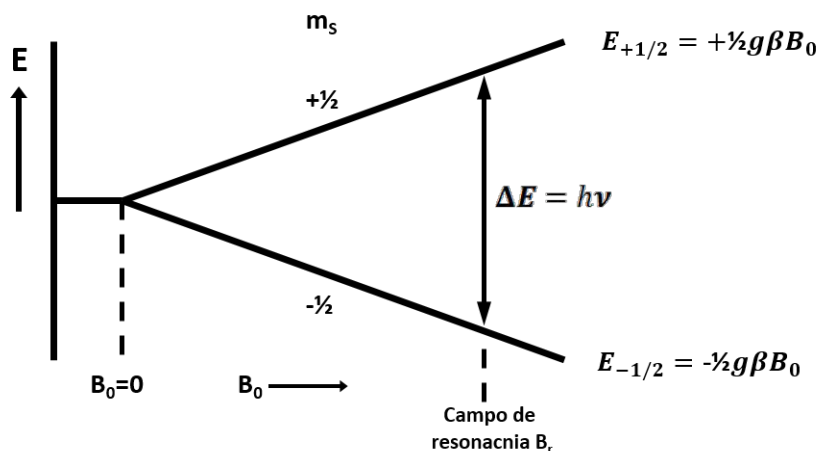


Figura 1.11 Esquema del efecto Zeeman electrónico como función del campo magnético aplicado, B_0 , mostrando la absorción de EPR. $E_{+1/2}$ y $E_{-1/2}$ representan las energías de los estados $M_s = +1/2$ y $M_s = -1/2$ respectivamente. β es el magnetón de Bohr y g es el factor g .

Cuando se cumple la condición de resonancia, la energía de las ondas de microondas iguala a la separación energética entre los dos estados M_s , puede ocurrir una absorción de dicha energía siempre y cuando el ΔM_s sea igual a ± 1 (Palmer, 2000). A esto se le conoce como la regla de selección de las transiciones en EPR. Dicha absorción puede representarse graficando la intensidad de la absorción vs. el campo aplicado (Figura 1.12 A y C). Sin embargo, si la curva de absorción es ancha es más fácil discernir las características de la curva si se grafica la derivada de la intensidad de la absorción (Figura 1.12 B y D) (Drago, 1992).

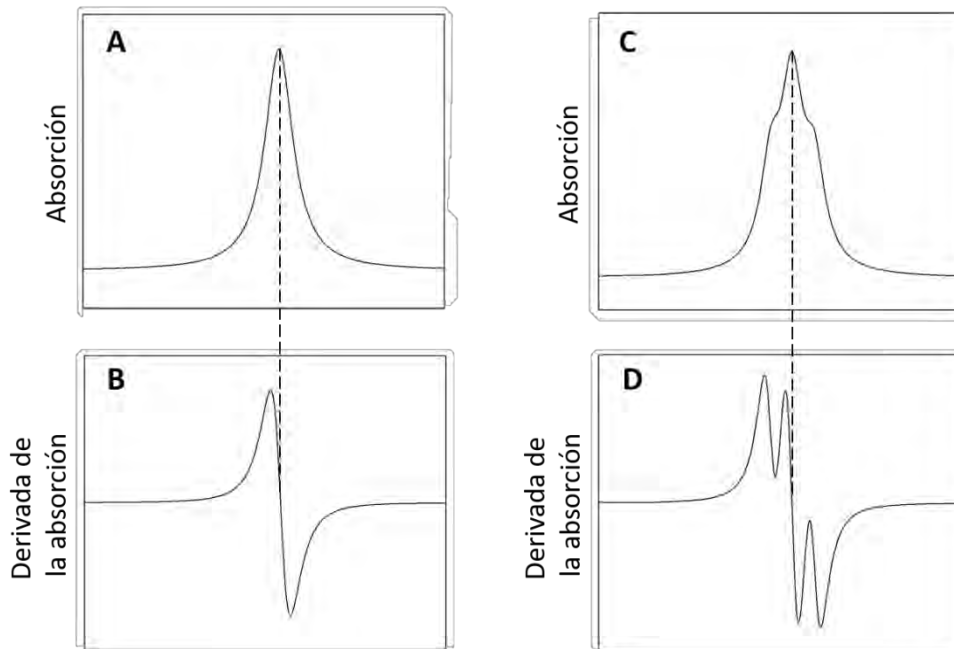


Figura 1.12 Comparación de la representación de los espectros como absorción (A y B) y como derivadas de la absorción (C y D). En D, se puede observar como al representar la derivada de la absorción se pueden discernir más fácil los detalles de la curva.

Hasta el momento hemos considerado únicamente el caso más simple del electrón libre. Sin embargo, el ambiente en que se encuentra un electrón influye fuertemente en éste, causando anisotropía, lo que provoca un cambio en el valor de g .

Una primera consideración es la anisotropía que existe en el valor de g , es decir, que dicho valor es dependiente de la orientación de los ejes magnéticos de la molécula con respecto al campo magnético (Solano-Peralta, 2007). En muchos casos, una muestra se compone de materiales policristalinos, es decir pequeños cristales orientados al azar en el espacio. El espectro resultante de EPR *en polvos* es el resultado de todas las orientaciones posibles de la especie paramagnética con respecto al campo magnético. El perfil del espectro está determinado por varios parámetros, entre ellos la simetría del tensor- g , el valor de sus componentes (g_x, g_y, g_z), así como la forma y el ancho de la curva de resonancia. Con

respecto a la simetría del tensor- g se pueden identificar tres casos: isotrópica, axial y rómbica (Figura 1.13) (Rudolf, 2004; Palmer, 2000).

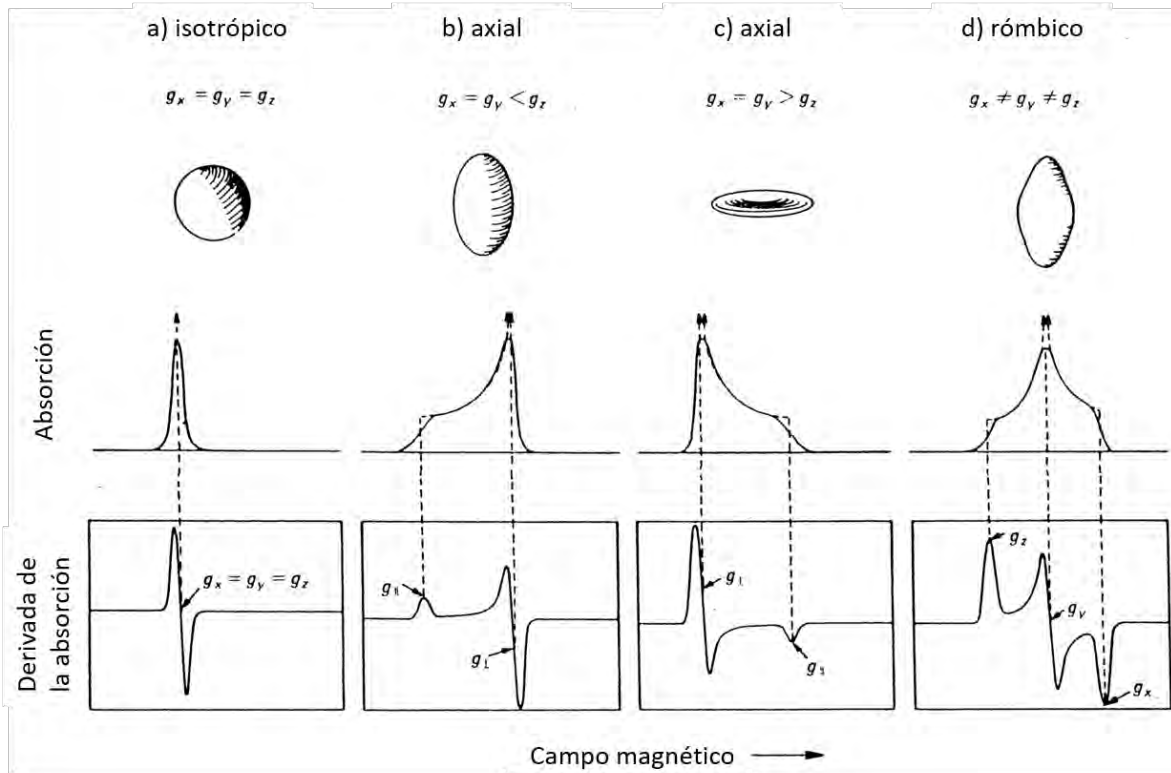


Figura 1.13 Representación esquemática de los tres posibles casos de simetría del tensor- g . Las columnas a-d, muestran cada uno de los casos con su nombre, el patrón asociado a cada uno (tanto numérica como gráficamente), y el perfil esperado para la representación de la absorción y de su derivada (Rudolf, 2004; Palmer, 2000).

Otra contribución importante se da al considerar que cuando un electrón está en un ion o átomo, posee un momento angular orbital (L) además del momento de espín (S). Estos dos momentos pueden acoplarse entre sí para dar un momento angular total J (Figura 1.14). Esto se conoce como el acoplamiento espín-orbita. Estos acoplamientos espín-orbita son propiamente los responsables del cambio en el valor del factor- g por lo que éste será una propiedad característica de cada especie paramagnética (Solano-Peralta, 2007; Cruz-Valverde y Garritz-Ruiz, 1991).

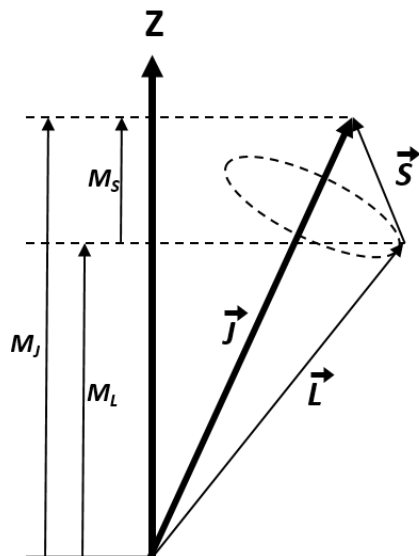


Figura 1.14 Representación esquemática de los momentos angulares de espín (S) y orbital (L) y la resultante del acoplamiento espín-orbita (J). Se muestran también las proyecciones en el eje Z del momento angular de espín (M_S), momento angular orbital (M_L) y la resultante del acoplamiento espín-orbita (M_J) (Cruz-Valverde y Garritz-Ruiz, 1991).

Otras interacciones que pueden afectar la energía de los niveles electrónicos es cuando el electrón interactúa con el núcleo del centro paramagnético cuando éste tiene un espín nuclear (I) diferente de 0, o bien cuando el electrón interactúa con el núcleo de átomos vecinos (por ejemplo de los ligantes en compuestos de coordinación). A estas interacciones se les conoce como interacción hiperfina y superhiperfina respectivamente. Es decir, que dado que el núcleo posee un espín (I) y una carga, tiene un momento magnético nuclear (μ_n) definido como

$$\mu_n = -g_n \beta_n I \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde g_n es el factor- g nuclear y β_n el magnetón nuclear. Nótese la semejanza de la ecuación 10 con la ecuación 6. Bajo un campo magnético, el núcleo puede adoptar $2I + 1$ orientaciones, de acuerdo a los valores permitidos para m_I (efecto Zeeman nuclear). Este momento magnético del núcleo es una fuente de un campo magnético (B_{HF}) que se puede sumar al campo magnético aplicado (B_0) para dar un momento magnético B_R tal que cumpla la condición de resonancia (Figura 1.15).

$$h\nu = g\beta B_R \quad (\text{Ec. 11})$$

$$B_R = B_0 + B_{HF} \quad (\text{Ec. 12})$$

Debido al efecto Zeeman nuclear, y dado que el núcleo puede adoptar $2I + 1$ orientaciones, las interacciones hiperfinas causan un desdoblamiento de la señal en EPR en $2nI + 1$ líneas donde n es el número de núcleos con espín nuclear $I \neq 0$ (Solano-Peralta, 2007; Palmer, 2000) (Figura 1.15).

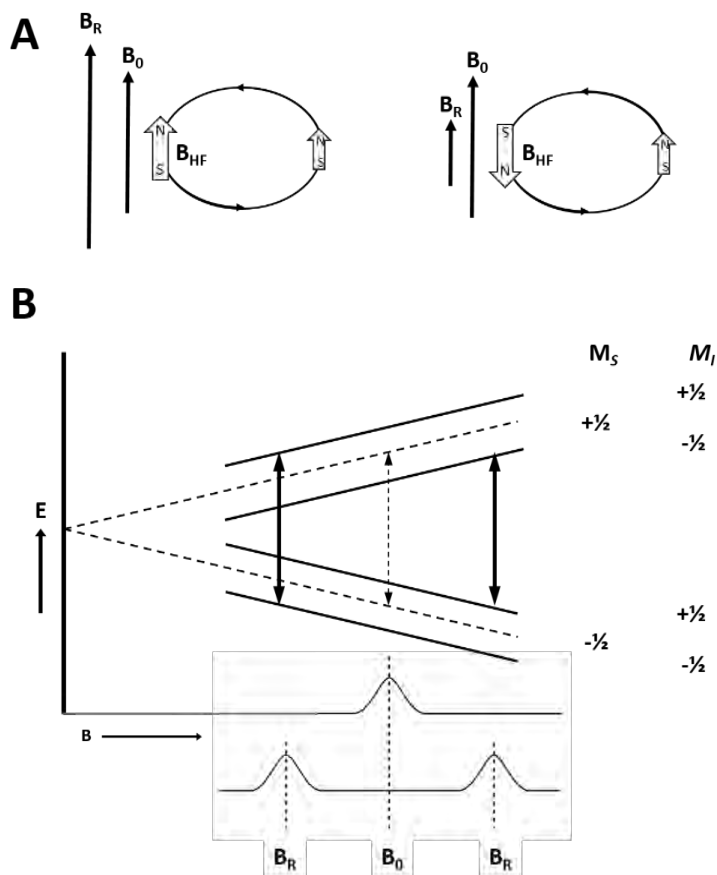


Figura 1.15 Representación esquemática de la interacción hiperfina. A) Al alinearse el campo magnético del núcleo, debido al momento nuclear (μ_n), con el campo magnético aplicado (B_0) se produce un campo magnético total (B_R). B) Comportamiento de los niveles de energía para los estados $M_S = \pm\frac{1}{2}$ antes (línea punteada) y después (línea continua) de interactuar con un núcleo con $I = \frac{1}{2}$. La interacción hiperfina, que provoca un desdoblamiento de las señales en $2nI + 1$ (Eaton, *et al.* 2010; Palmer, 2000).

Cuando una especie paramagnética tiene un espín total mayor a $\frac{1}{2}$ (es decir, con más de un electrón desapareado), un electrón puede sentir un campo eléctrico generado por los otros electrones desapareados. Esto provoca que, aun en ausencia de un campo magnético externo, exista una diferencia de energía entre diferentes estados de espín en la especie paramagnética. A esta diferencia de niveles se le conoce como desdoblamiento de campo cero o interacción espín-espín.

Finalmente conviene hablar acerca de las frecuencias necesarias para llevar a cabo la resonancia. Éstas se encuentran en la región de las microondas. La mayoría de los equipos opera a una frecuencia de aproximadamente 9.5 GHz (Banda X). Sin embargo, en muchas ocasiones se realizan experimentos a otras frecuencias. Cuando se realizan espectros a bajas frecuencias (por ejemplo 3 GHz o banda S) se mejora la resolución de la estructura hiperfina. A altas frecuencias (por ejemplo 35 GHz o banda Q) se aumenta la resolución de la anisotropía en el factor-*g*. Esto es debido a que la anisotropía es dependiente del campo mientras que las interacciones hiperfinas no lo son (Palmer, 2000). En la tabla 1.4 se muestran las distintas frecuencias usadas en EPR.

Tabla 1.4 Frecuencias usadas en la Resonancia Paramagnética Electrónica (Solano-Peralta, 2007).

Banda	Intervalo (GHz)	Frecuencia (GHz)	Campo central* (Gauss)
L	0.39 – 1.55	1.5	540
S	1.55 – 3.90	3.0	1100
C	3.90 – 6.20	6.0	2200
X	6.20 – 10.9	9.5	3400
K	10.9 – 32	23	8200
Q	32 – 46	35.4	13000
V	45 – 56	50	18000
W	75 – 110	95	34000
D	110 – 130	120	46500

*Campo central: Campo magnético en el cual aparece una señal con $g = 2.00$

Debido a la alta sensibilidad de la técnica de EPR, a que los diferentes centros paramagnéticos pueden diferenciarse por sus parámetros espectroscópicos (valores de *g*)

y a la selectividad de la técnica (los centros diamagnéticos no afectan los centros paramagnéticos), se ha utilizado ampliamente en la caracterización y estudio de cofactores paramagnético en las proteínas (Cammack, *et al.* 1985).

1.6.2 EPR de proteínas hierro-azufre

Los cúmulos de Fe-S se encuentran entre los primeros catalizadores que existieron en la naturaleza. Las proteínas de Fe-S se encuentran en prácticamente todos los seres vivos y juegan un papel importante en procesos cruciales como la respiración o la fotosíntesis. Fueron descubiertas por primera vez en la década de los 60 (Beinert y Sands. 1960) al observar en estudios de EPR una señal en $g = 1.9$ que no se había observado anteriormente para ninguna metaloproteína. Los cúmulos de Fe-S se pueden clasificar en: Rubredoxinas ([Fe-S]), Ferredoxinas (cúmulos [2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S] de bajo potencial), Rieske (cúmulos [2Fe-2S] de alto potencial) y HiPIPs (proteínas hierro-azufre de alto potencial [4Fe-4S]) (Liu, *et al.* 2014; Crichton. 2012).

Normalmente los espectros de metales de transición deben realizarse a bajas temperaturas. Las proteínas de hierro-azufre por ejemplo suelen observarse a temperaturas menores a los 77 K. Una característica de suma importancia es que la forma del espectro de EPR de los cúmulos de hierro-azufre depende de la estructura de éste, lo que ha permitido la caracterización del tipo de cúmulo que se estudia, aun cuando no se cuente con una estructura tridimensional de la proteína. En la figura 1.16 se muestran una serie de espectros correspondientes a diferentes tipos de cúmulos (Cammack, *et al.* 1985; Kroneck, 2004).

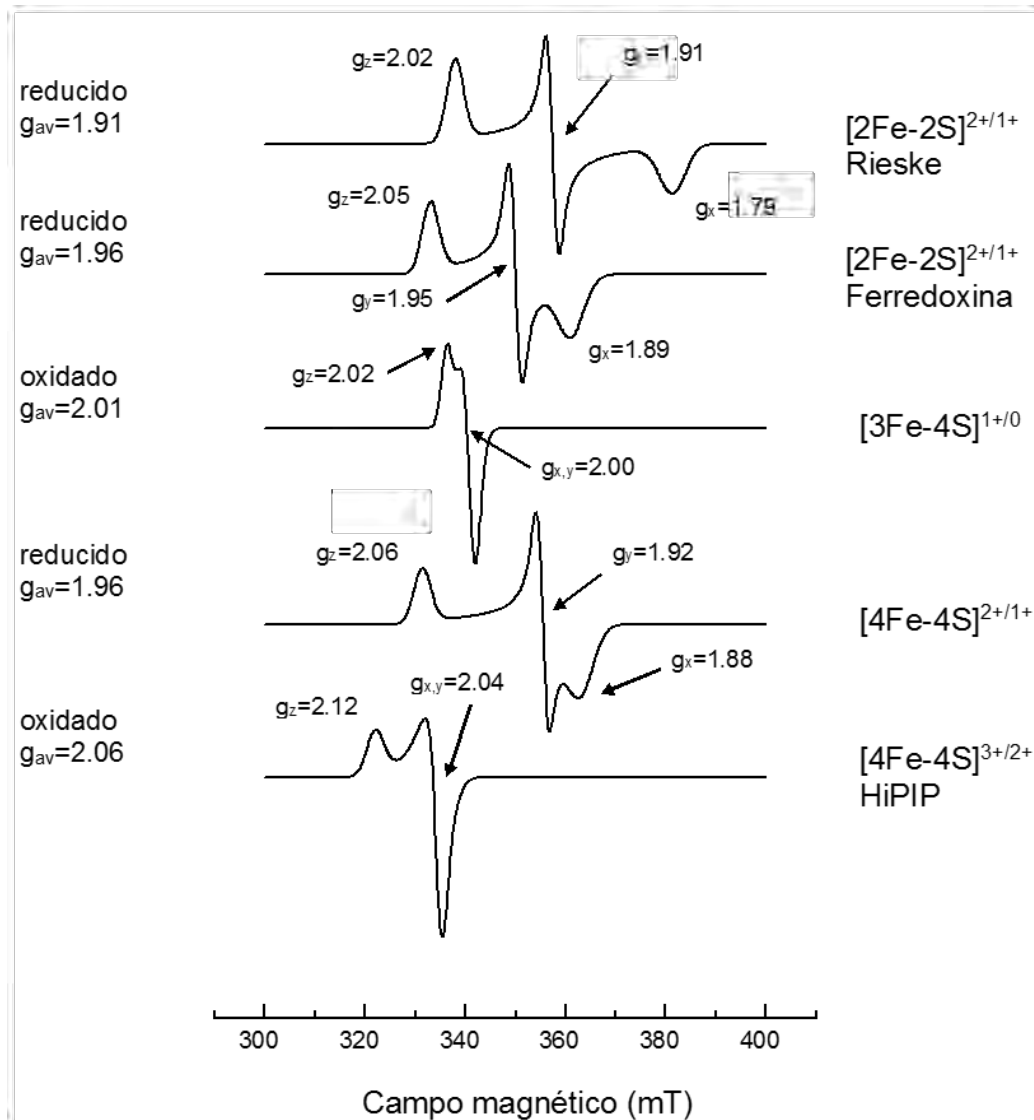


Figura 1.16 Espectros de EPR de diferentes cúmulos hierro-azufre. A) *Clostridium pasteurianum*. B) *Desulfovibrio gigas* C) *Bacillus stearothermophilus* D) *Chromatium vinosum* HiPIP E) *Mastigocladus laminosus*. Todos los espectros fueron obtenidos entre 10 y 20 K (Cammack, et al. 1985; Kroneck, 2004).

1.6.3 EPR de proteínas multihemo

Se han realizado anteriormente diversos estudios de EPR con proteínas multihemo. El espectro de EPR del hemo *c* nitrito reductasa de *Wolinella succinogenes* presenta, por ejemplo, dos señales rómbicas, una con valores de $g = 2.98, 2.32$ y 1.50 y otra con valores

de $g = 2.50, 2.15$ y 1.45 las cuales son asignadas a hemos con un hierro (III) de bajo espín (Rudolf, 2004). De manera similar, en el espectro de EPR del hemo c_3 de *Desulfovibrio desulfuricans* (Figura 1.17) se observa una señal rómbica con valores de $g = 2.95, 2.29, 1.54$ y 1.43 que resulta también consistente para hemos de bajo espín. En el caso del hemo c_3 se observa además, una señal en 3.29 (Einsle, *et al.* 2001). Valores de g muy similares ($g = 2.93, 2.26$ y $1.51; g = 3.05, 2.24$ y $1.34; g = 3.41$) se observan en el caso del hemo c_3 de *Desulfovibrio baculatus* (Moura *et al.* 1988).

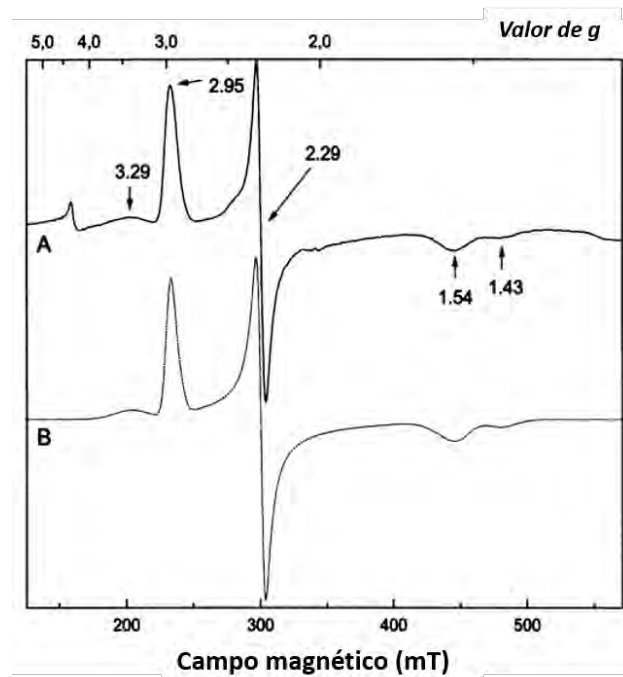


Figura 1.17 A) Espectro del hemo c_3 de *Desulfovibrio desulfuricans* en estado oxidado (recién purificada) B) espectro simulado. Espectro realizado a una temperatura de 10 K, una frecuencia de 9.629 GHz y una potencia de 2 mW (Moura, *et al.* 1988).

En un estudio realizado con la proteína hexahemo nitrato reductasa de *Desulfovibrio desulfuricans* (Figura 1.18) fue posible observar, en distintos estados de oxidación de la proteína, los distintos hemos encontrando señales características de Fe(III) de bajo espín ($g = 2.96, 2.28$ y $1.50; g = 3.2, 2.14; g = 4.8$) además de una señal correspondiente a un Fe(III) de alto espín ($g = 6.30, 5.36$ y 1.99) (Costa *et al.* 1990).

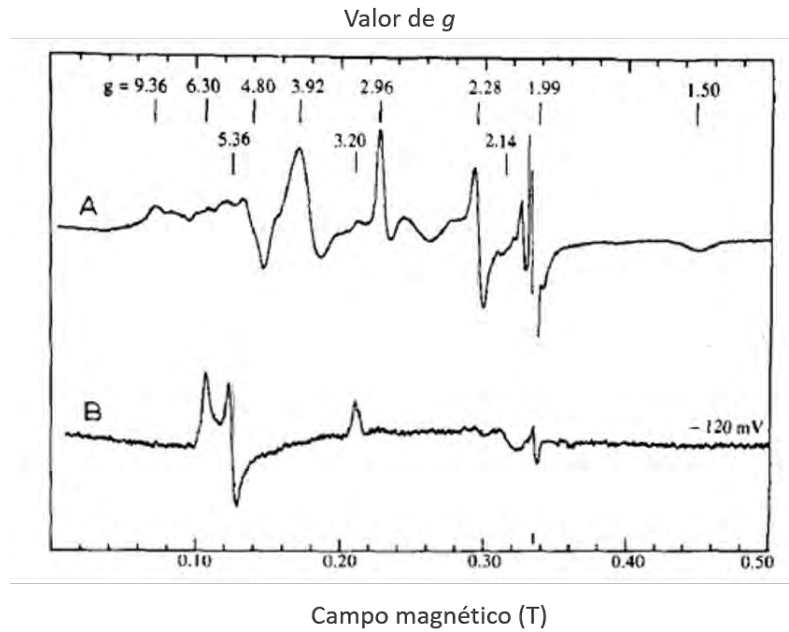


Figura 1.18 Espectro de EPR de la proteína nitrito reductasa de *D. desulfuricans*. A) Proteína recién purificada. B) Proteína a un potencial de -120 mV, se pueden apreciar la señal para un hierro de alto espín con $g = 6.30, 5.36$ y 1.99 . Espectros realizados a una frecuencia de 9.43 GHz, potencia de 2 mW y una temperatura de 9.5 K (Adaptado de Costa, *et al.* 1990).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la estructura y propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la proteína de membrana dependiente de PQQ (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* de manera que ayuden a explicar la estabilidad de la proteína en estado reducido.

2.2 Objetivos particulares

Optimizar las condiciones de cultivo de la bacteria *Ga. diazotrophicus* para la expresión de la metaloproteína PQQ-ADH

Optimizar el proceso de purificación de la metaloproteína PQQ-ADH.

Determinar las propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la PQQ-ADH por medio de espectroscopía de EPR.

Determinar la estructura tridimensional de la metaloproteína PQQ-ADH por medio de:

- a) Crecimiento de cristales de la PQQ-ADH que sean adecuados para su difracción de rayos X y posterior resolución de la estructura tridimensional de la proteína.
- b) Un estudio preliminar *in silico* de la estructura de la subunidad I (SUI) empleando datos de difracción de rayos X de una proteína similar realizando un análisis de la secuencia de aminoácidos que permita identificar los sitios de unión de los cofactores PQQ, [2Fe-2S] y hemos tipo c.

3. Parte Experimental

3.1 Condiciones de cultivo

3.1.1 Crecimiento en laboratorio en matraces Fernbach de 1.5 L

Para el crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*, se partió de un liofilizado de la cepa PAL5 y se cultivó en un medio LGIP sólido. Posteriormente se realizó un preinóculo de la bacteria en 100 mL con medio LGIP enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 mM). Luego de 24 horas se inoculó 1.5 L de medio LGIP con sacarosa al 5 % m/v y enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de 36 horas se adicionó alcohol etílico al 0.5 % v/v para la sobreexpresión de las enzimas del sistema de oxidación de alcoholes. A las 48 horas de crecimiento las células se recuperaron por centrifugación a 8,800 x g.

3.1.2 Crecimiento en biofermentador de 350 L

En gran escala se obtuvieron las células por medio de un fermentador con 350 L de medio LGIP con sacarosa al 5 % m/v y enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 mM) inoculado con 20 L de cultivo en el mismo medio. A las 39 hrs. se adicionó etanol (0.5 % v/v) para la expresión de la enzima de interés. Luego de 50 hrs de crecimiento se recuperaron las células por medio de una centrífuga tubular a 13,000 x g. Durante el crecimiento de la bacteria se controló el valor de pH a un valor de $\text{pH} = 6 \pm 1$. El cultivo de la bacteria se llevó a cabo en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto (UEPP) del Instituto de Biotecnología de la UNAM en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

3.2 Obtención de membranas

Las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de PCM ((PO_4^{3-}) 30 mM a $\text{pH} = 6.0$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30 mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mM) a una temperatura de 4 °C y posteriormente fueron sonicadas para romperlas usando desoxirribonucleasas de bovino y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMS) como inhibidor de proteasas. Las membranas fueron obtenidas por centrifugación a 178,800 x g por 60 min. La fracción membranal fue resuspendida en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, $\text{pH} 6.0$ con Tritón X-100 al 0.7 % v/v.

Finalmente la suspensión membranal se incubó a 4 °C por 24 hrs y se centrifugó a 178,800 x *g* durante 1 hora obteniendo un sobrenadante de color rojo. La obtención de las membranas se llevó a cabo en el conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

3.3 Purificación por cromatografía

La purificación de la proteína PQQ-ADH se hizo por medio de cromatografía empleando columnas de intercambio aniónico, de hidroxapatita y de exclusión molecular. Todas las columnas fueron equilibradas con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v

3.3.1 Columna QAE

Se utilizó una resina de intercambio aniónico fuerte QAE Toyopearl QAE-550C. La proteína de interés fue lavada con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. El resto de las proteínas fueron eluidas con una solución 250 mM de NaCl.

3.3.2 Columna DEAE

Se utilizó una resina de intercambio aniónico débil DEAE Toyopearl DEAE-650M. La proteína de interés fue lavada con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. El resto de las proteínas fueron eluidas con una solución 250 mM de NaCl.

3.3.3 Columna Ha

Se utilizó una resina de hidroxapatita HA-Ultrogel de Sigma-Aldrich. Para la elución de las proteínas se empleó una solución amortiguadora de fosfatos a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v utilizando un gradiente lineal de 10 a 250 mM de fosfatos.

3.3.4 Columna S-100

Se utilizó una resina de exclusión molecular Sephacryl S100-HR. La proteína fue eluida con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v.

3.4 Caracterización molecular

3.4.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE se realizó con un gel de corrida de acrilamida al 7 % m/v y un gel concentrador de acrilamida al 5 % m/v. La muestra de proteína fue diluida en una mezcla de digestión con SDS 5 % m/v; β -mercaptoetanol 3 % v/v; glicerol 15 % v/v y TRIS-HCl 125 mM, pH = 6.8. La digestión se llevó a cabo durante tres minutos a ebullición. Se utilizó una solución amortiguadora de corrida con SDS. El gel fue teñido con azul de Comassie al 0.1 % m/v.

3.5 Ensayos enzimáticos

3.5.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

La cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry empleando como estándar albúmina bovina.

3.5.2 Cuantificación de la actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa

Para las pruebas de actividad se realizaron por el método de ferricianuro de potasio de acuerdo a Gómez-Manzo, 2007. Se utilizó una solución amortiguadora de McIlvaine pH = 6 (K_2HPO_4 126 mM y ácido cítrico 37 mM) con $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.1 M como aceptor de electrones y etanol 20 mM ajustando a 1 mL. La reacción se inició por adición de 0.03 mg de proteína y se incubó durante 20 min. Para detener la reacción se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Dupanol (SDS 0.3 % m/v, de $Fe_2(SO_4)_3$ 0.5 % m/v y H_3PO_4 8 % m/v. Finalmente se ajustó el volumen a 5 mL y se determinó la absorbancia. La actividad está definida como la oxidación de 1 μ mol de etanol por minuto. Dicha oxidación se siguió por medio del cambio en la absorbancia a 680 nm. Cada incremento en 0.02 equivale a 1 μ mol de etanol oxidado (Gómez-Manzo, 2007; Adachi, *et al.* 1978).

3.6 Caracterización espectroscópica.

3.6.1 Espectroscopía electrónica

Todos los espectros de UV-Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro *Agilent 8453* con arreglo de diodos de barrido rápido en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los

espectros se realizaron a una concentración de proteína de 7 mg/mL en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.8 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v.

3.6.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

Los espectros de EPR se obtuvieron en espectrómetro Bruker Elexys E500 en banda X (≈ 9.4 GHz). El control de la temperatura a 10 K se realizó con un crióstato de flujo continuo de helio líquido marca Oxford. Los experimentos se llevaron a cabo a concentraciones de proteína de 10 - 21 mg/mL a una potencia $P \approx 2$ mW. Los experimentos de EPR se realizaron en el laboratorio de resonancia paramagnética electrónica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI).

3.7 Análisis de secuencias de aminoácidos

El alineado de las secuencias de aminoácidos se llevó a cabo con ayuda del programa *DIALIGN 2.2.1* (Al Ait *et al.* 2013) utilizando las secuencias de aminoácidos reportadas por Ferreira *et al* (Bertalan *et al.* 2009) para la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

3.8 Modelo de la estructura tridimensional de la SUI de PQQ-ADH

La predicción de la estructura terciaria de la subunidad I de la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* se llevó a cabo por medio de un modelo realizado con ayuda del programa SWISS-MODEL (Biasini, *et al.* 2014; Arnold, *et al.* 2006; Kiefer, *et al.* 2009; Guex, *et al.* 2009) empleando como molde la estructura de la proteína PQQ-alcohol deshidrogenasa de tipo II de *Pseudomonas putida* encontrada en la base de datos PDB con la clave 1YIQ.

3.9 Determinación del acoplamiento magnético

Los espectros de EPR para determinar el acoplamiento magnético entre el PQQ y el cúmulo [2Fe-2S] se obtuvieron a una frecuencia de 9.381409 GHz. El control de la temperatura de 5 - 55 K se realizó con un crióstato de flujo continuo de helio líquido. Los experimentos se llevaron a cabo a una concentraciones de proteína 10 mg/mL a una potencia $P = 2$ mW en una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH = 5.8 con Tritón X-100 0.1 % v/v. Para determinar el acoplamiento magnético se midió la intensidad de la señal vs. temperatura. Los experimentos de EPR se realizaron en el laboratorio de

resonancia paramagnética electrónica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI).

3.10 Determinación de los estados de espín de los hierros de los hemos en la PQQ-ADH

Se obtuvieron los espectros de EPR de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* con la proteína oxidada por medio de tres métodos de oxidación:

- 1) Se adicionó persulfato de amonio a la una solución de PQQ-ADH.
- 2) De acuerdo a lo reportado por el grupo de Sosa-Torres (Gómez-Manzo, 2010), por medio de una mezcla de quinonas: antraquinona-2-sulfonato(-225 mv), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (-145 mV), menadiona (0 mV), duroquinona (+50 mV), 1,4-naftoquinona (+69 mV), fenazinmetosulfato (+80 mV), 1,2-naftoquinona (+134 mV) y 1,4-benzoquinona (+285 mV). Los valores de potencial fueron ajustados con persulfato de amonio y ditionita. Cuando se alcanzaron los potenciales redox de -55 mV, +43 mV, +133 mV y +229 mV, se extrajo una alícuota de la muestra, la cual se introdujo en un baño de nitrógeno líquido y posteriormente fue analizada a 10 K por EPR.
- 3) Se oxidó una muestra concentrada de PQQ-ADH con hidroperóxido de terbutilo y se realizó el espectro de EPR. Dicha muestra fue almacenada a una temperatura de -70 °C y se midió nuevamente el espectro de EPR una vez que la oxidación fue total.

Los experimentos de EPR se realizaron en el laboratorio de resonancia paramagnética electrónica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI).

3.11 Cristalización de la proteína PQQ-ADH

Para cristalizar la PQQ-ADH se empleó la técnica de difusión de vapor por medio de los métodos de a) gota sedente y b) gota colgante (Figura 3.1). En ambos casos, se adicionaron 500 µL de solución cristalizante al depósito. La gota fue preparada con una mezcla 1:1 de

solución cristalizante y solución con proteína recién purificada. El tamaño de las gotas varió de 4 a 6 μL .

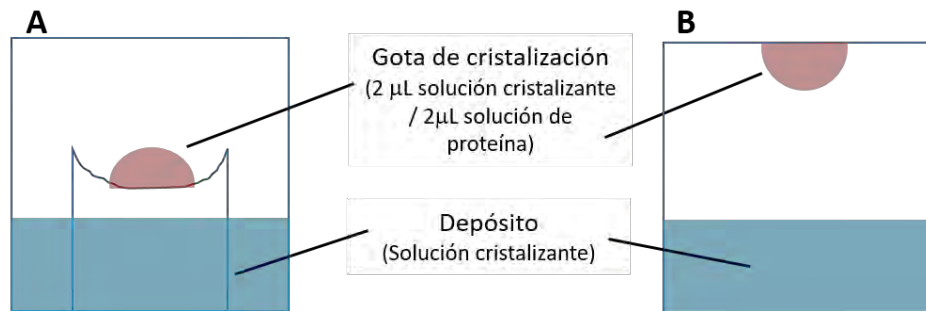


Figura 3.1 Representación de la técnica de cristalización por difusión de vapor por medio de los métodos de A) gota sedente y B) gota colgante.

Los cristales fueron difractados en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas con sede en el Instituto de Química (LANEM-IQ). Se utilizó un difractor de ánodo rotatorio Micromax-007 con un detector de Rayos X Dectris Pilatus 3RT 200K-A.

4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*

En la figura 4.1 se observa la curva de crecimiento reportada (Gómez-Manzo, 2007) para el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* (en biofermentador de 350 L) en medio LGIP con sacarosa al 5 % m/v y adicionando etanol al 0.7 % v/v luego de 36 horas. Se observa que conforme aumenta la densidad óptica en el medio, disminuye el pH y la concentración de oxígeno disuelto en el medio (lo que permite la expresión de la nitrogenasa a pesar de la alta aereación en el medio). Luego de la adición de etanol se observa una disminución en la densidad óptica como respuesta al etanol adicionado al medio de cultivo.

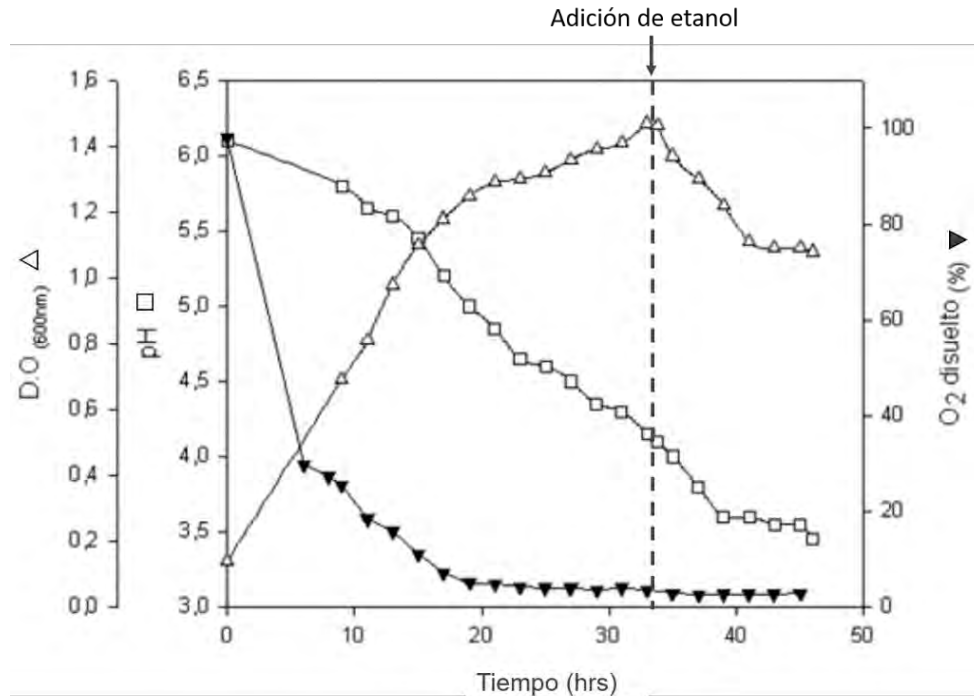


Figura 4.1 Cinética de crecimiento reportada para *Ga. diazotrophicus* en biofermentador de 350 L empleando un medio LGIP con sacarosa al 5 % m/v. A las 36 horas se adicionó etanol al 0.7 % v/v como segunda fuente de carbono. (Δ) Crecimiento del cultivo: $A_{560 \text{ nm}}$. (\blacktriangledown) Oxígeno disuelto en el medio. (\square) pH (Adaptado de Gómez-Manzo, 2007)

Comparativamente, la figura 4.2 muestra la curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* (en biofermentador de 350 L) realizada para el presente trabajo. El medio de cultivo fue un medio LGIP (descrito en la sección 3.1) con sacarosa al 3 % m/v y se adicionó etanol al

0.7 % v/v luego de 39 horas de crecimiento (fase exponencial tardía). Al igual que en caso reportado anteriormente, se observa una disminución en la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Sin embargo se controló el pH evitando que bajara de 5.5. Se puede observar también un aumento en la actividad relativa de la proteína PQQ alcohol deshidrogenasa luego de la adición de etanol a las 39 horas.

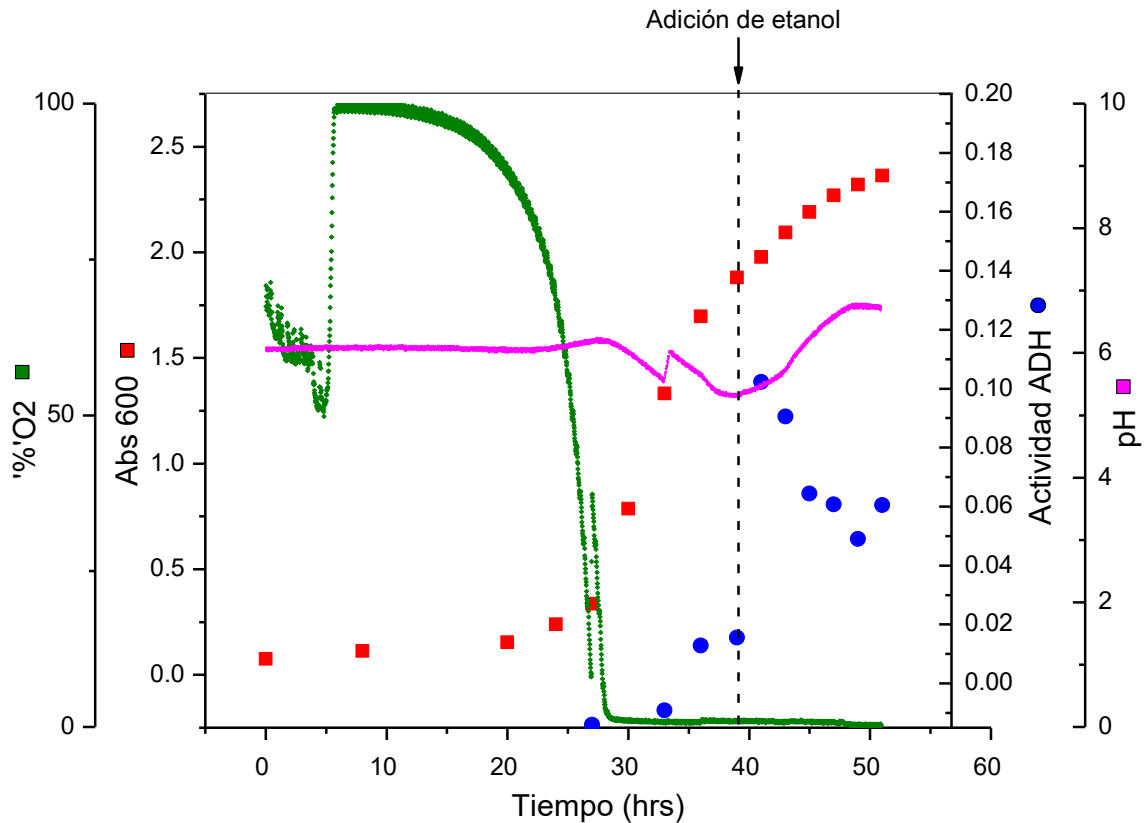


Figura 4.2 Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en un biofermentador de 350 L empleando un medio LGIP con sacarosa al 3 % m/v. A las 39 horas se adicionó etanol al 0.5 % v/v. (■ Crecimiento del cultivo: $A_{600\text{ nm}}$; ● Actividad de ADH; ■ Oxígeno disuelto en el medio; ■ pH)

Es importante recordar que el intervalo de pH en el que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* conserva su actividad es entre 4 y 8. Dado que en el crecimiento reportado en la figura 4.1 no se controló el pH, éste disminuyó hasta 3.5 lo que podría explicar la presencia de una PQQ-ADH inactiva (Gómez-Manzo, *et al.* 2012).

Aunque en general se siguió el método reportado (Gómez-Manzo, 2007) para el crecimiento de la bacteria, el control de pH (5.5 – 7) que se realizó en el presente trabajo, fue de suma importancia para obtener el máximo rendimiento de la proteína activa.

4.2 Purificación de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*.

Luego de la lisis celular por sonicación, las membranas se recuperaron y se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.7 % v/v. El resuspendido de las membranas se centrifugó a 178,800 x *g* y se obtuvo un sobrenadante de color rojo. Dicho sobrenadante se aplicó a las columnas de intercambio aniónico QAE y DEAE, a la columna de hidroxapatita y finalmente a la columna de exclusión molecular S300.

4.2.1 Columna QAE

Se aplicó el sobrenadante de las membranas a la columna de intercambio aniónico QAE previamente equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. Se obtuvo un lavado de color rojo indicando la presencia de la proteína de interés. El resto de las proteínas fueron eluidas con NaCl 0.25 M.

4.2.2 Columna DEAE

El lavado de color rojo de la columna QAE fue aplicado a la columna de intercambio aniónico DEAE previamente equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. De dicha columna se obtuvo un lavado de color rojo indicando la presencia de la proteína de interés. El resto de las proteínas fueron eluidas con NaCl 0.25 M.

4.2.3 Columna Ha

El lavado de color rojo obtenido en la columna DEAE se aplicó a la columna de hidroxapatita equilibrada con la solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. Se obtuvo un lavado de color verde. El resto de las proteínas fueron eluidas con

un gradiente linear de fosfatos de 0.01 a 0.25 M. Se observó un pico de elución de color rojo en 0.06 M de fosfatos indicando la presencia de la proteína de interés.

4.2.4 Columna S-100

Finalmente la fracción de color rojo recuperada de la columna de hidroxiapatita fue aplicada a la columna Sephacryl S-100 previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 6 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v. En esta columna se observó un solo frente de elución de color rojo.

En la tabla 4.1 se presentan los resultados del proceso de purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Finalmente se recuperaron 3 mg de proteína.

Tabla 4.1 Tabla de purificación de la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)
Solubilizado de membrana	1227	1773	1.4
QAE	188	1670	8.9
DEAE	106	1628	15.4
Ha	20	1619	80.9
Sephacryl S-100	3	718	239.3

Se puede observar que en la fracción recuperada de la columna de hidroxiapatita, (Ha) la actividad específica aumenta considerablemente al igual que en la fracción recuperada de la columna Sephacryl S-100; sin embargo en esta última, se da una mayor pérdida de proteína. En trabajos anteriores (Gómez-Manzo, 2007), al emplear las columnas de intercambio aniónico, se utilizó una solución amortiguadora cuyo pH se encontraba por encima del punto isoeléctrico de la proteína por lo que era necesario eluir la proteína de las columnas QAE y DEAE empleando gradientes de NaCl. En el presente trabajo se empleó una solución amortiguadora de trabajo con pH = 5.8 inferior al punto isoeléctrico por lo que la proteína fue lavada de las columnas. La elución con gradiente de NaCl/fosfatos y la posterior

recuperación de la proteína por medio de diálisis condujo, en los trabajos mencionados, a una pérdida de proteína en las columnas de intercambio aniónico. Dicha pérdida no se observó en el presente trabajo.

4.3 Caracterización de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*.

4.3.1 Gel de electroforesis

Por medio de electroforesis con un gel de poliacrilamida al 10 % m/v, empleando SDS como agente desnaturizante, se determinó la composición oligomérica de la PQQ-ADH. En la figura 4.3 se muestra el gel obtenido en el que se observa la presencia de dos subunidades de acuerdo a lo reportado en la literatura. La subunidad grande (SUI) con un peso de 72 kDa y la subunidad pequeña (SUI) con un peso de 44 kDa.



Figura 4.3 Gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes con SDS de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se muestran los resultados para la tinción del gel con azul de Coomassie.

4.3.2 Espectroscopía de UV-Vis

Se realizó un espectro de UV-Vis (fig. 4.4) donde se pueden observar las bandas correspondientes al PQQ en 313 y 350 nm y las bandas correspondientes a los hemos *c* reducidos en 523 y 554 nm así como la banda Soret en 417 nm.

Para obtener el coeficiente de absortividad molar de los hemos *c* se empleó la banda β (554 nm) del espectro de la proteína en estado reducida y se restó la absorbancia de la proteína

oxidada. El valor obtenido del coeficiente de absorptividad molar de los hemos de la PQQ-ADH es de $782 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

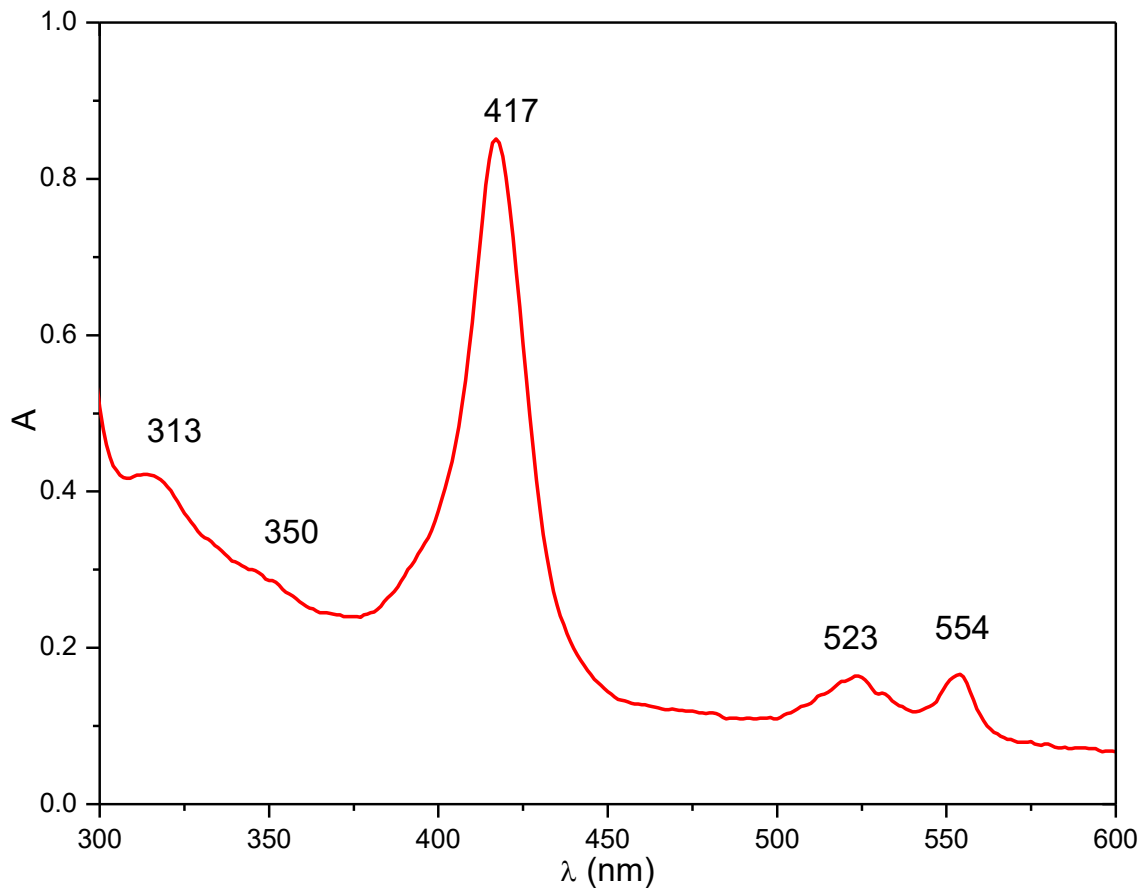


Figura 4.4 Espectro de UV-Vis de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién purificada en estado reducido. Se llevó a cabo a una concentración de 7 mg/mL en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.8 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v.

4.3.3 Espectroscopía de EPR

Al realizar un espectro de EPR a temperatura ambiente de la PQQ-ADH recién purificada, se observó una señal en $g = 2.003$. Cuando el mismo experimento se llevó a cabo a 10 K se obtuvo un espectro con una señal isotrópica en $g = 2.003$ y una señal anisotrópica en $g = 1.944$ y $g = 1.918$ (fig. 4.5 y 4.6). La señal en $g = 2.003$ corresponde a un radical libre lo que indica que el cofactor PQQ se encuentra en estado de semiquinona. Por otro lado la señal anisotrópica es una señal característica para un cúmulo metálico tipo ferredoxina en estado reducido ($[2\text{Fe-2S}]^+$).

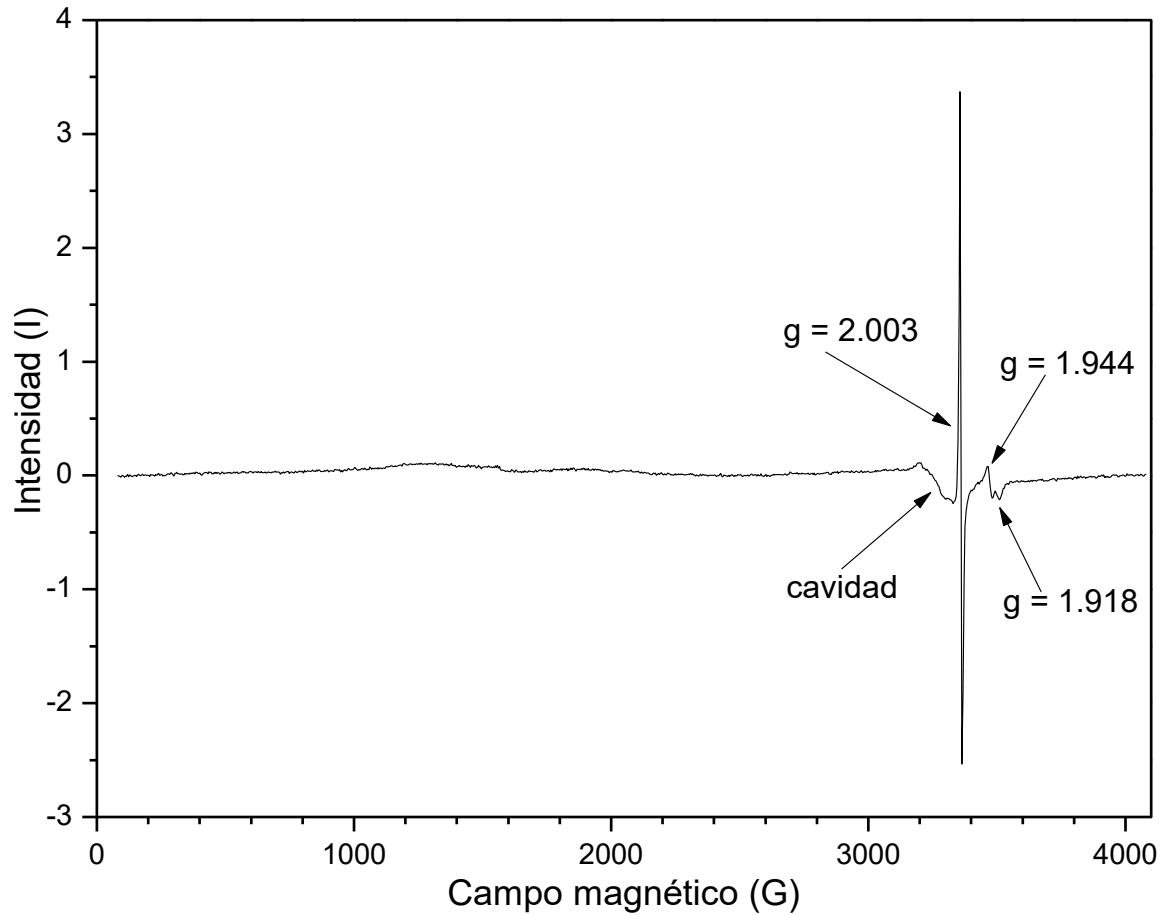


Figura 4.5 Espectro de EPR de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién purificada en estado reducido. Se llevó a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL, a una temperatura de 10 K, una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.392166 GHz.

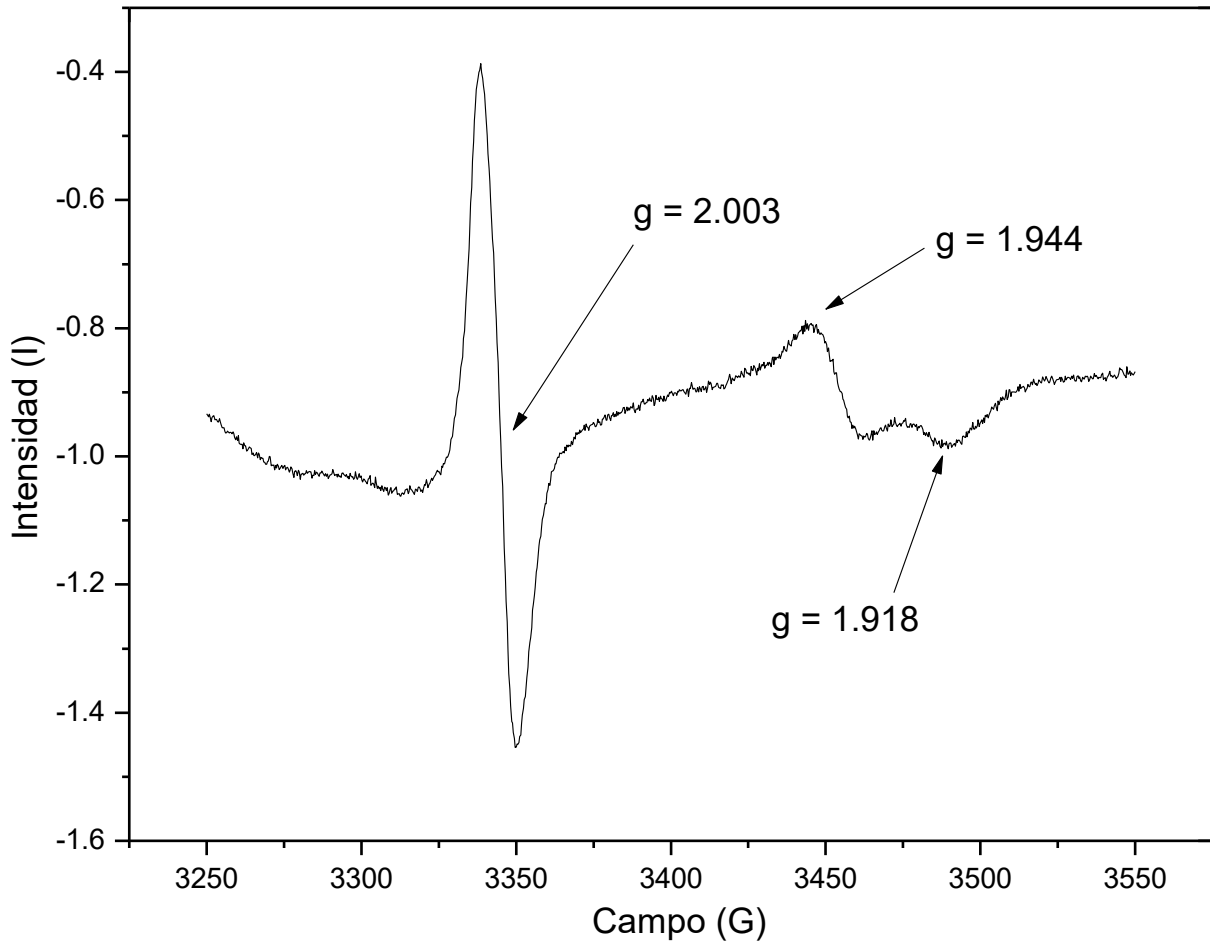


Figura 4.6 Espectro de EPR de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién purificada. Se llevó a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL, a una temperatura de 10 K a una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.381409 GHz.

Es importante mencionar que, la región en $g = 2.00$ del espectro de EPR de la PQQ-ADH, presenta una contribución, no solo del radical semiquinona sino también del cúmulo $[2\text{Fe-}2\text{S}]^+$ (Gómez-Manzo *et al*, 2010). El valor de g_{max} para el cúmulo de PQQ-ADH ($g_{max} = 2.007$) difiere del observado para otros cúmulos $[2\text{Fe-}2\text{S}]^+$ de tipo ferredoxina ($g_{max} \approx 2.05$) lo que podría ser consecuencia de cambios estructurales en el cúmulo.

4.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos y predicción de la estructura de la subunidad I (SUI) de la proteína PQQ-Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*.

4.4.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos.

Hasta el momento, no se ha reportado ninguna estructura de una PQQ-ADH de tipo III, sin embargo se encuentran en la literatura varios ejemplos de PQQ-ADH's de tipo II que tienen gran similitud con la subunidad I de la PQQ-ADH de tipo III, además de tener como cofactores un PQQ y un hemo *c*. Es importante recordar que en ninguna PQQ-ADH de tipo II se ha encontrado un cúmulo de tipo ferredoxina.

El grupo de Matsushita (Toyama, *et al.* 2005) reportó una estructura de la PQQ-ADH-II de *Pseudomonas putida* cuya secuencia fue alineada junto con otras deshidrogenasas para establecer los diversos dominios de unión a los grupos PQQ y hemo. Para el presente trabajo se alineó la secuencia de la proteína PQQ-ADH-II de *P. putida* (ADH-II-*Pp*) con la primera subunidad de la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* (ADH-SUI-*Ga*). El alineado, mostrado en la tabla 4.2, se llevó a cabo con ayuda del programa *DIALIGN 2.2.1*. La identidad entre ambas secuencias es de 47.83 %.

De acuerdo a lo reportado por Matsushita (Toyama, *et al.* 2005), la proteína ADH-II-*Pp* se divide en dos dominios, uno de unión al PQQ (residuos 1-586) y otro de unión al hemo (residuos 621-718). En el primero de ellos, el PQQ se encuentra dentro de una estructura de "súper barril" compuesta por 8 láminas formadas a su vez por cuatro hojas beta antiparalelas (motivos W1-W8). Estos 8 motivos se encuentran en general bastante conservados en ADH-SUI-*Ga*.

Tabla 4.2 Secuencias de aminoácidos alineadas de las proteínas ADH de tipo II de *Pseudomonas putida* (ADH-II-*Pp*) y ADH de tipo III de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (ADH-SUI-*Ga*). Se muestran en color rojo, los aminoácidos que participan en la unión del grupo PQQ. En color rosa, los residuos de unión al hemo. En color azul los residuos de unión a sustrato y en color naranja los residuos de cisteína que forman un puente disulfuro. Además se indican las regiones conservadas para la formación del "súper barril" (W1-W8) que contiene al grupo PQQ.

Resultados y discusión

ADH-SUI- <i>Ga</i>	1	MRAVYGKRRS	LRGTLAVGTI	CAATFFGYTA	ATSAAESEFG	ATGEAIIHAD
ADH-II- <i>Pp</i>	1	MRQTGLASLP	LKSLAVAVLL	SLAGTPAL--	---AADIPAN	VDGARIIAAD
W8						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	51	DHPGDWLTYG	RTYSEQRYSP	LDQINRSNVG	NLKLAWYYDL	DTNRGQEGTP
ADH-II- <i>Pp</i>	46	KEPGNWMSTG	RTYDEQRYSP	LKQISDQNVG	QLGLAWSYKL	DLDRGVEATP
W1						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	101	LIVDGVMYAT	TNWSKMKALD	AATGKLLWAY	DPRVPGNIAD	KGCCDTVNRG
ADH-II- <i>Pp</i>	96	IVVDGAMYTT	GPFSVYYALD	ARDGRLIWKY	DPQSDRHRAG	EACCDAVNRG
W2						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	151	AAYWNGKVYF	GTFDGRLLIAL	DAKTGKLVWS	VNTIPADAAL	GHQRSYTVDGG
ADH-II- <i>Pp</i>	146	VAVWKGKVYV	GVLDRLEAI	DAKTGQRAW	VDTRAD----	-HKRSYITIG
W3						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	201	APRIAKGRVI	IGNGSEFGA	RGFVSAFDAE	TGKLDWRFYT	VPNAQNKPDN
ADH-II- <i>Pp</i>	191	APRVVNGKVV	IGNGAEFGV	RGYVTAYDAE	TGKEAWRFYT	VPNDPKLPPE
ADH-SUI- <i>Ga</i>	251	APSDAVLMSK	AYPTWSPTGA	WTTQGGGGTV	WDSIVYDPVT	DLVYLVGVNG
ADH-II- <i>Pp</i>	241	GKGMEIAAKT	WFGD-----A	YVEQGGGGTA	WDSFAYDPEL	NLLYIGVNG
W4						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	301	SPWNYKFRSD	GKGDNLFLGS	IVALKPETGE	YVWHFQETPM	DQWDYTSVQQ
ADH-II- <i>Pp</i>	286	SLWDPKWRSQ	AKGDNLFLSS	IVAVNADTGE	YVWHYQTTPG	DAWDYTATQH
W5						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	351	IMTLDLPING	QTRHVIVHAP	KNGFFYIIDA	KTGEFLSGKN	YVYVNWASGL
ADH-II- <i>Pp</i>	336	MILAELPIDG	KPRKVLQAP	KNGFFYVIDR	ATGELLSAKG	IVPQSWTKGM
ADH-SUI- <i>Ga</i>	401	DPKTGRPIYN	P-DALYTLNG	KEWYGIPGDL	GGHNFAMAFA	SPRTGLVYIP
ADH-II- <i>Pp</i>	386	DMKTGRPILD	EENAAYWKNG	KRNLVTPAFW	GAHDWQPM	NPDTGLVYIP
ADH-SUI- <i>Ga</i>	450	AQQVPFLYTS	QVGGFKPHPD	SWNLGLDMNK	VGVTDSPEAK	QAFIKDLKGW
ADH-II- <i>Pp</i>	436	AHIMSAYYEH	IPEAPKRNP	KSMYQLGLRT	GMM---PEGA	EGLLEMAKSW
W6						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	500	---IVAWDPV	KQQEAFRVDH	KGPWNGGIVA	TGGDLLFQGL	ANGEFHAYDA
ADH-II- <i>Pp</i>	483	SGKLIAWDPV	KQQAWEVPY	VTIFNGGTLS	TAGNLVFEGS	ADGRVIAYAA
W7						
ADH-SUI- <i>Ga</i>	547	TNGADLHFHFA	AQSGIAPPV	TYMANGKQYV	AVEVGWGGIY	PFFLGGLART
ADH-II- <i>Pp</i>	533	DTGEKLWEQP	AASGVMAAPV	TYSVDGEQYV	TFMAGWGGAF	STFAGALSRLR

			W8					
ADH-SUI- <i>Ga</i>	597	SGWTVNHSRV	I	AFSLD	GAAK	LPPQNDKGFL	PVKPPAQFDG	KRTDNGYFEF
ADH-II- <i>Pp</i>	583	AGVQP-YAQV	L	TYKLG	GTAK	LQEPAPRPDT	PKPPALSNDT	ASIEAGAKLY
ADH-SUI- <i>Ga</i>	647	QTF	CAACH	GD	NAEAGGVLPD	LRWSGAIHQ	DAFYNVVGRG	ALTAYGMDRF
ADH-II- <i>Pp</i>	632	DGY	CSQCH	GI	HAVSGGVLPD	LRKLTPEKHQ	MFLGILFGGR	VPD--GMPSF
ADH-SUI- <i>Ga</i>	697	DASMKPEQIE	DIRQFLIKRS	NDTYQREVDA	RKNVDGIPAQ	736		
ADH-II- <i>Pp</i>	680	ADAFTPEQVD	QIHQYLIKRA	HDLHQEGDTW	KQFSAKSSH-	718		

El PQQ de ADH-II-*Pp* está unido a la proteína por puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Glu₉₂, Arg₁₄₄, Thr₁₈₉, Thr₂₆₄, Trp₂₆₆, Lys₃₅₆, Asp₄₁₉, Trp₄₂₀ y unido por puentes de hidrógeno al grupo amido de los residuos Gly₂₀₅ y Ala₂₀₆ (se muestran en rojo en la tabla 4.2). Estos residuos están altamente conservados en ADH-SUI-*Ga* salvo por los residuos Thr₁₈₉, Asp₄₁₉ y Trp₄₂₀ que han sido reemplazados por los residuos Asp₁₉₉, Asn₄₃₃ y Phe₄₃₄. No obstante, es frecuente encontrar estas variantes en las PQQ-ADH de tipo III.

En la ADH-II-*Pp*, el ion de Ca²⁺ que da estabilidad al radical semiquinona se encuentra coordinado al PQQ y a los residuos Glu₂₀₇, Asn₂₈₄ y Asp₃₂₉ (mostrados en color rojo y subrayados en la tabla 4.2). Estos residuos están conservados en la ADH-SUI-*Ga*.

En el dominio de unión al hemo de ADH-II-*Pp* se encuentra, entre los residuos Cys₆₃₅-His₆₃₉, el motivo CXXCH altamente conservado en las hemoproteínas. El hemo *c* se encuentra unido a los residuos de Cys₆₃₅ y Cys₆₃₈. El ion de Fe se encuentra coordinado al anillo de porfirina y a los residuos His₆₄₀ y Met₆₇₆ (se muestran en morado en la tabla 4.2). Estos residuos están conservados en ADH-SUI-*Ga*.

Es importante mencionar que los residuos cercanos al sitio activo de ADH-II-*Pp* (mostrados en azul la tabla 4.2), en general se encuentran altamente conservados en las diversas alcohol deshidrogenasas. Sin embargo, destacan los residuos de Phe₄₁₄ y Trp₄₁₅ en la ADH-II-*Pp* (que en ADH-SUI-*Ga* se han modificado por los residuos de Asp₄₂₈ y Leu₄₂₉ respectivamente) ya que se ha observado que variaciones en estos residuos, pueden afectar la especificidad a diversos sustratos.

Existe además en ADH-II-*Pp* un puente disulfuro entre los residuos Cys₁₃₈ y Cys₁₃₉ (mostrados en naranja en la tabla 4.2) que tiene interacciones de van der Waals con el PQQ. Probablemente en la ADH-SUI-*Ga* estas cisteínas no se encuentran formando un puente disulfuro sino que están unidas a uno de los Fe del cúmulo [2Fe-2S]. Se ha observado que dichos cúmulos se encuentran preferentemente unidos a cuatro cisteínas o bien a tres cisteínas y una histidina (aunque también se encuentran ejemplos de cúmulos [4Fe-4S] o [3Fe-4S] unidos a cisteínas y residuos de aspartato de acuerdo a Liu *et al*, 2014).

4.4.2 Predicción de la estructura de la subunidad I (SUI) de la PQQ ADH

Con ayuda del programa SWISS-MODEL se hizo una propuesta de la estructura terciaria, de la subunidad I de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* (ADH-SUI-*Ga*), empleando como molde la estructura tridimensional previamente reportada para la ADH de tipo II de *Pseudomonas putida* (ADH-II-*Pp*) (Toyama, *et al.* 2005) que se encuentra en el PDB con la clave 1YIQ.

La identidad entre las secuencias de ADH-SUI-*Ga* y de ADH-II-*Pp* es de 47.83 % y tienen una similitud de 43 %. En la figura 4.7 se puede observar la similitud local de la predicción con el molde empleado. Es importante mencionar que la similitud local tiende a ser mayor en el dominio de unión al PQQ (residuos 1-586). El parámetro QMEAN del modelo es de -1.81 y el factor GMQE del modelo es de 73 %.

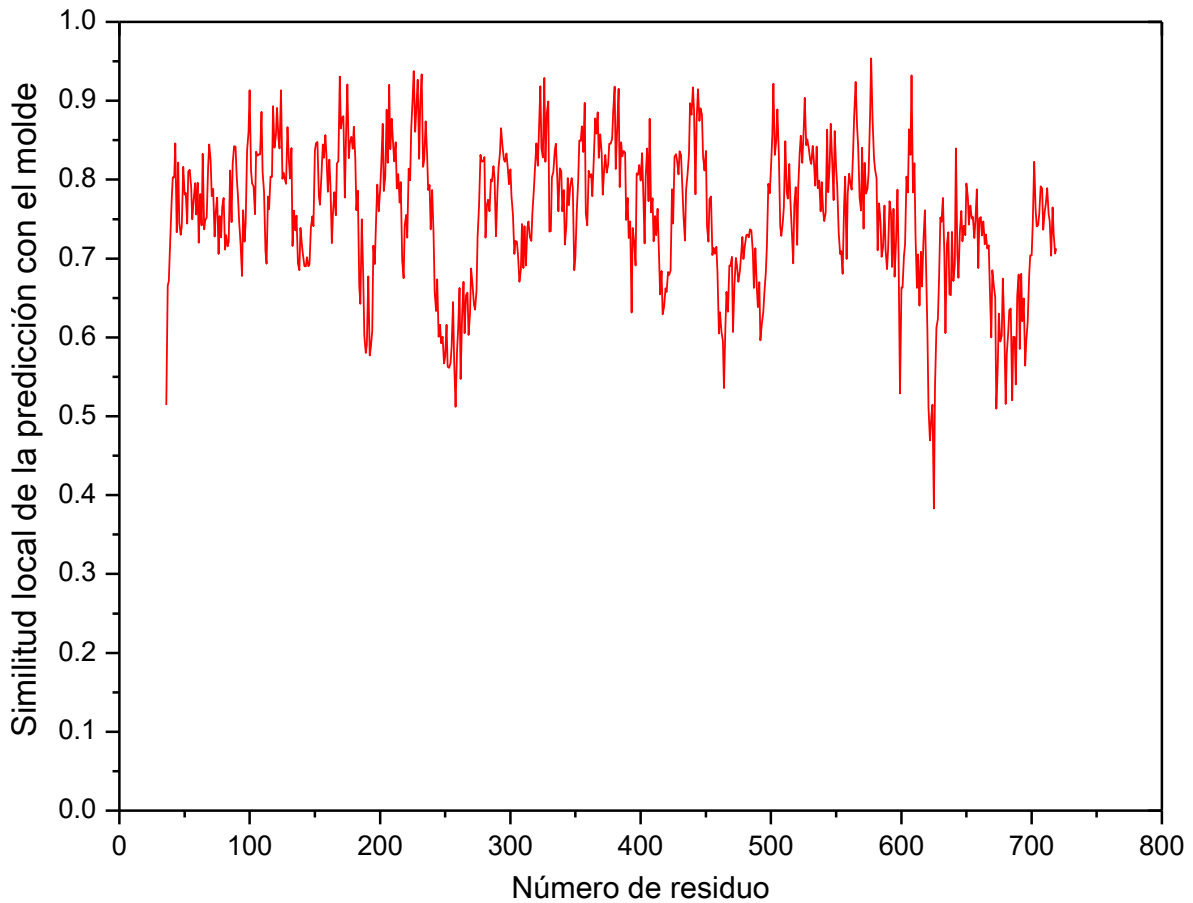


Figura 4.7. Similitud local de la predicción de la estructura de la SUI de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se empleó como molde la estructura publicada para la ADH de tipo II de *Pseudomonas putida* (Toyama, *et al.* 2005).

La figura 4.8 muestra la sobreposición de la predicción de la estructura de ADH-SUI-*Ga* (en color verde) con la estructura reportada para ADH-II-*Pp* (en color naranja). Se observa que se conserva el dominio de PQQ con hojas beta formando una estructura de “súper barril” así como el dominio de unión al hemo *c* formado por hélices alfa.



Figura 4.8. Superposición de la predicción de la estructura de ADH-SUI-*Ga* (■) y la estructura reportada de ADH-II-*Pp* (■) indicando los dominios de unión al PQQ y al hemo *c*.

En la figura 4.9 se puede observar la probabilidad de error en la posición de cada aminoácido en la predicción de la estructura de ADH-SUI-*Ga*. Es importante el hecho de que en el dominio de unión al PQQ el error es muy bajo mientras que en el dominio de unión al hemo *c* tiende a ser un poco más alto.

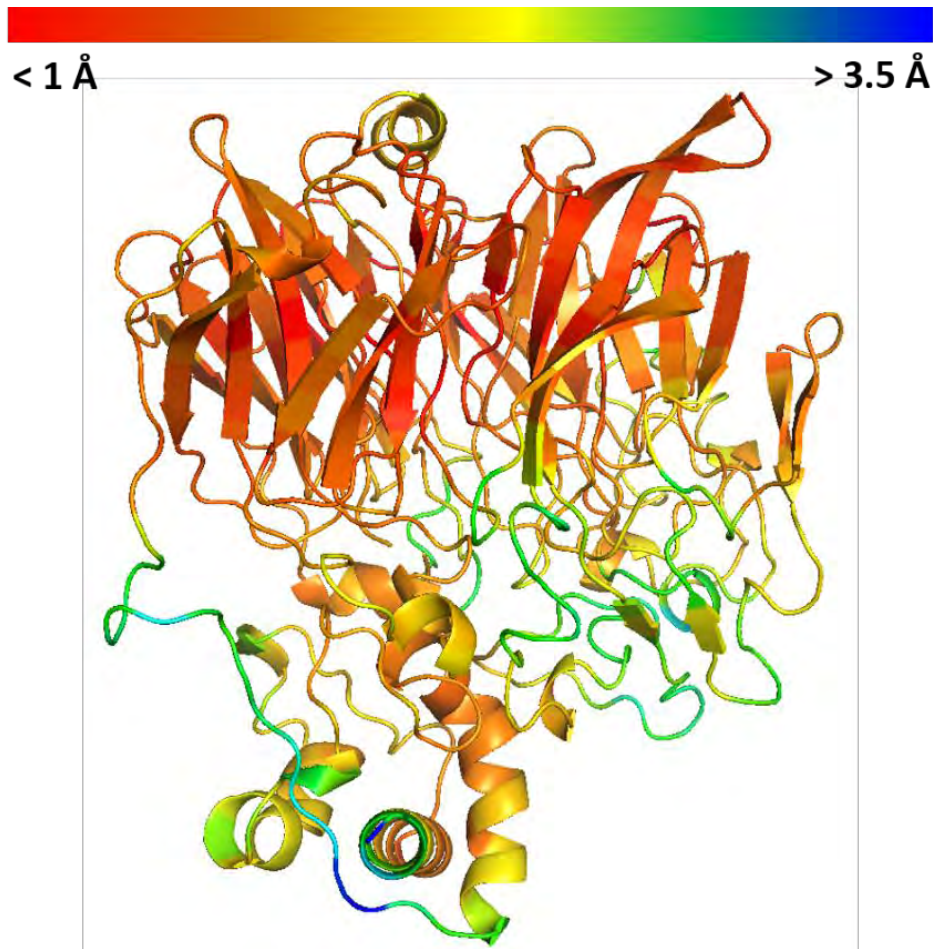


Figura 4.9 Probabilidad de error en la posición de cada aminoácido en la predicción de la estructura de ADH-SUI-*Ga* realizada por medio del programa SWISS-MODEL.

Uno de las principales interrogantes a resolver es el sitio de unión de los distintos cofactores presentes en la subunidad I de la PQQ-ADH (un hemo *c*, un PQQ y un cúmulo [2Fe-2S]). La predicción de la estructura obtenida por medio del programa SWISS-MODEL únicamente representa la cadena de aminoácidos, por ello el modelo obtenido no presenta los cofactores.

4.4.2.1 Sitio de unión del hemo *c*

Como se mencionó anteriormente, las ADH de tipo II y III se dividen en dos dominios, uno de unión a PQQ y otro de unión al hemo *c*. Al analizar la secuencia de ADH-SUI-*Ga* se observa, en el dominio de unión al hemo *c*, el motivo CSQCH correspondiente al motivo

CXXC de unión al hemo tipo *c*. Como se mencionó anteriormente, los residuos de His y Met que coordinan al Fe, también se encuentran conservados. Tomando en cuenta lo anterior, se propone que en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, el anillo de porfirina se encuentra unido covalentemente por los residuos de cisteína y se propone al átomo central de Fe con una geometría octaédrica coordinado en el plano a los átomos de nitrógeno de la porfirina y en una de las posiciones axiales un residuo de His₆₅₄ y en la otra, a un residuo de Met₆₉₃. El modo de unión del hemo *c* se muestra en la figura 4.10.

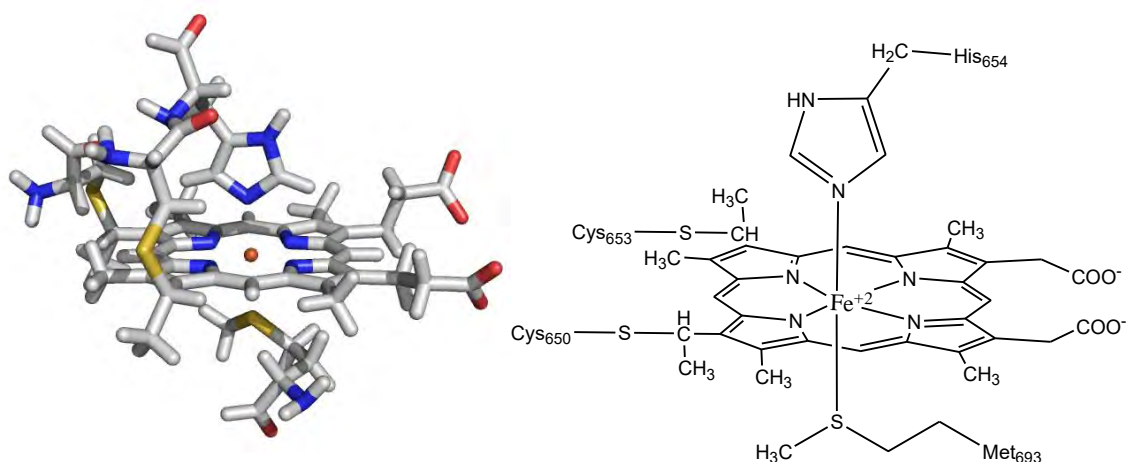


Figura 4.10. Estructura propuesta para el hemo tipo *c* de la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus* con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína y en el modelo realizado de su estructura tridimensional.

4.4.2.2 Sitio de unión del PQQ

Del análisis de la secuencia mostrado en la sección 4.4.1 podemos ver que dentro del dominio de unión al PQQ se han encontrado residuos de unión a dicho cofactor que se encuentran conservados tanto en las ADH's de tipo II como en las ADH's de tipo III, con algunas modificaciones. Por ello se puede asumir que el PQQ se encuentra unido en ADH-SUI-*Ga* de manera muy similar a como se encuentra unido en ADH-II-*Pp*. Esto es, con el ion Ca^{2+} unido a los residuos Glu₂₁₇, Asn₂₉₉ y Asp₃₄₄. La figura 4.11 muestra la estructura propuesta para el cofactor PQQ.

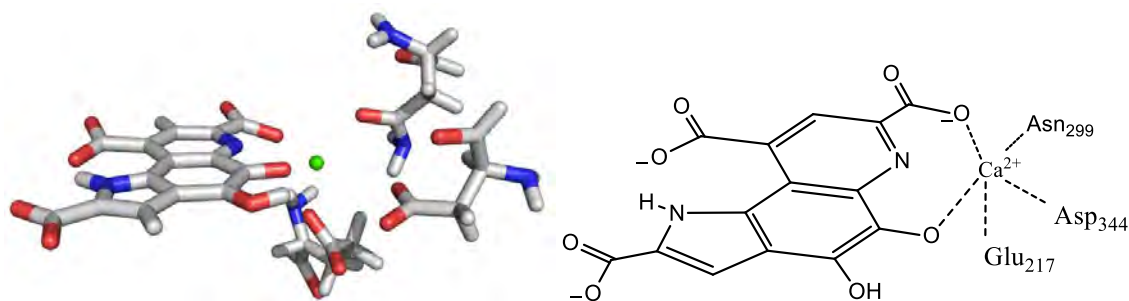


Figura 4.11 Estructura propuesta para el PQQ de la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus* con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína y en el modelo realizado de su estructura tridimensional.

4.4.2.3 Sitio de unión del cúmulo [2Fe-2S]

Para el sitio de unión al cúmulo [2Fe-2S] se propuso el par de cisteínas libres coordinando a uno de los átomos de Fe. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el modo de coordinación del cúmulo más común es de 4 Cys seguido de 2 Cys y 2 His. Con base en la secuencia de aminoácidos y en la estructura predicha para la SUI se observó que, en la estructura, las histidinas se encuentran alejadas del par de cisteínas por lo que no podrían estar coordinadas al cúmulo metálico. Se propuso entonces, la unión a residuos de metionina por medio de átomos de S, pero al igual que con las histidinas los residuos de metionina se encuentran retiradas. La figura 4.12 muestra la estructura propuesta para la SUI con los residuos de Cys y los residuos encontrados de His (en color azul) y de metionina (color rojo).

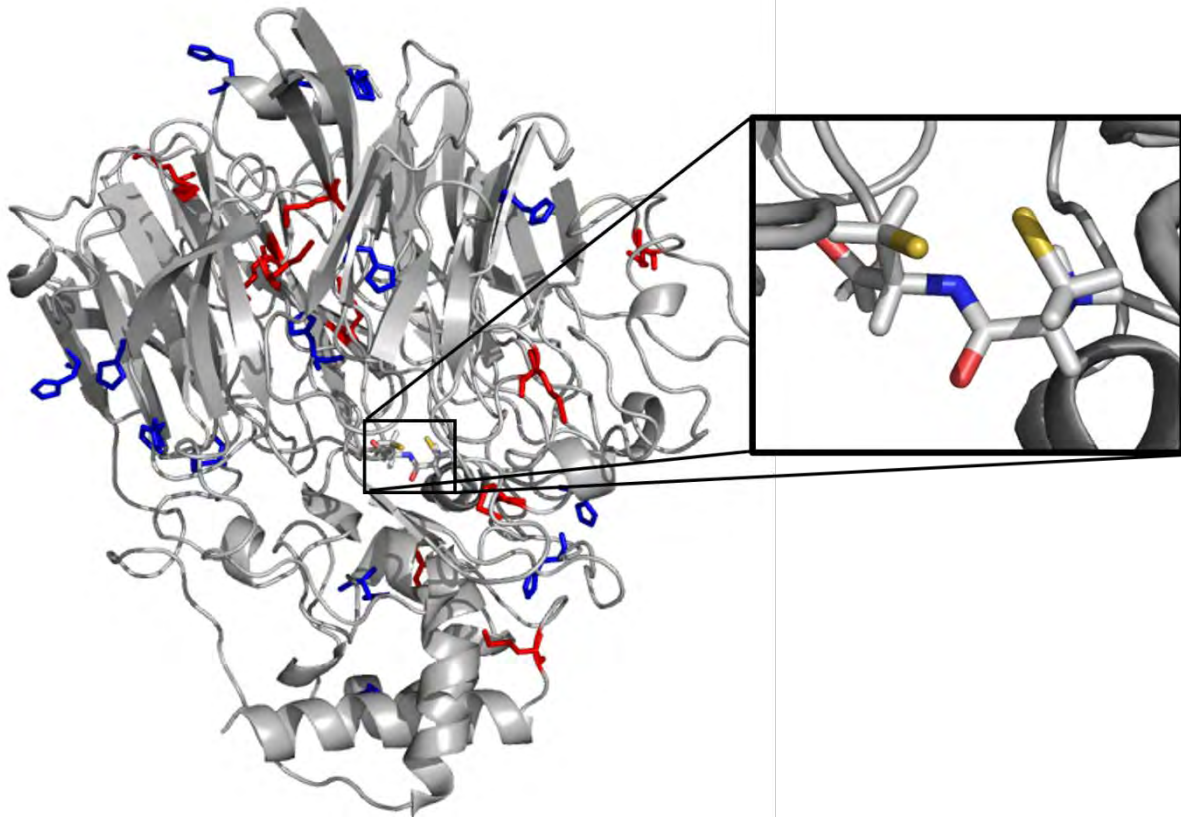


Figura 4.12 Estructura propuesta para la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se muestran en amarillo los residuos de cisteína, en azul los residuos de histidina y en rojo los de metionina. Se puede observar que tanto los residuos de histidina como de metionina se encuentran alejados del par de cisteínas.

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, los ejemplos más comunes en la literatura son de cúmulos Fe-S unidos a átomos de azufre y nitrógeno se han encontrado también cúmulos unidos a átomos de oxígeno, principalmente de residuos de Asp. Al buscar los residuos de Asp y Glu presentes en la SUI se encontró que existen dos residuos de Asp (Asp₃₄₄ y Asp₄₁₉) y uno de Glu (Glu₂₁₇) en los alrededores del par de cisteínas. La figura 4.13 muestra en azul los residuos de Asp y en rojo los residuos de Glu.

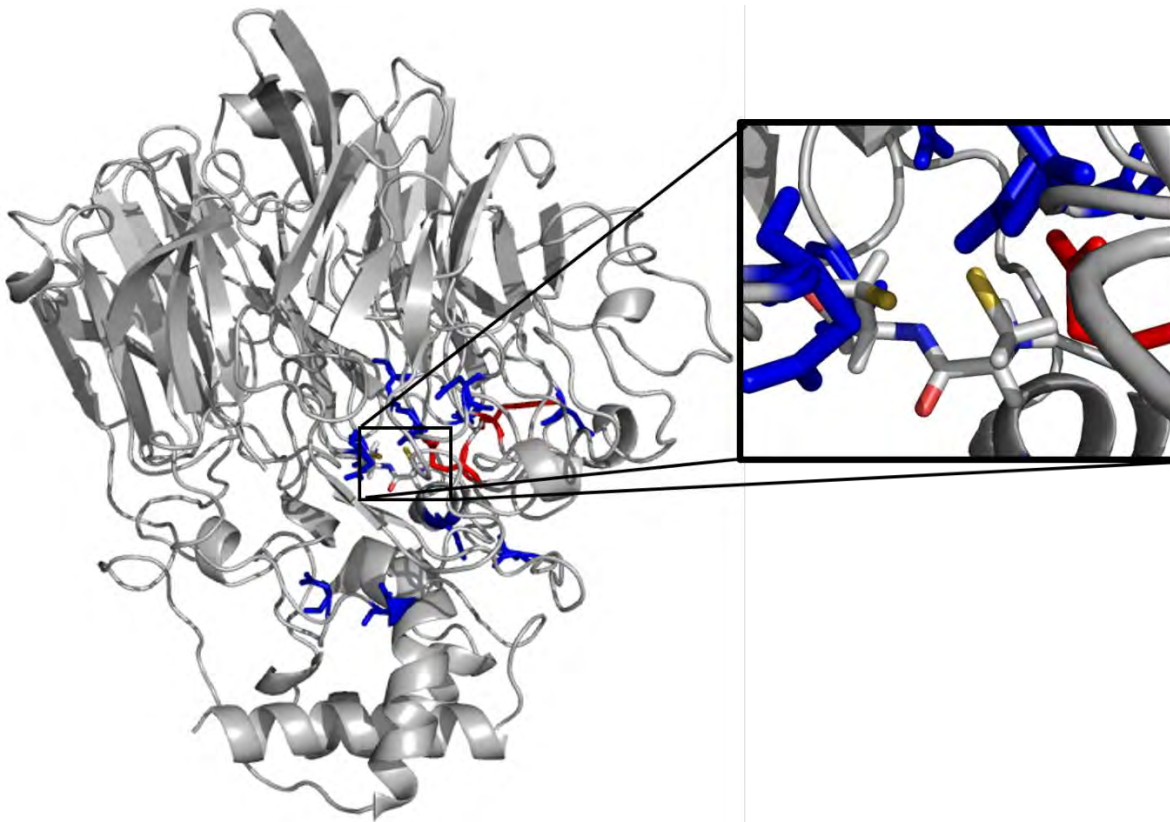


Figura 4.13 Estructura propuesta para la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se muestran en amarillo los residuos de cisteína, en azul los residuos de aspartato y en rojo los de glutamato.

De dichos residuos, el Asp₃₄₄ se encuentra unido al Ca del PQQ al igual que uno de los oxígenos del residuo de Glu₂₁₇. Se propuso por lo tanto, que el cúmulo [2Fe-2S] se encuentra unido, por un lado, a los dos residuos de cisteína (Cys₁₄₃ y Cys₁₄₄) y el por otro al residuo de Asp₄₁₉ (por medio del grupo COO⁻) y al oxígeno libre de Glu₂₁₇. En la figura 4.14 se muestra la estructura propuesta para el cúmulo [2Fe-2S].

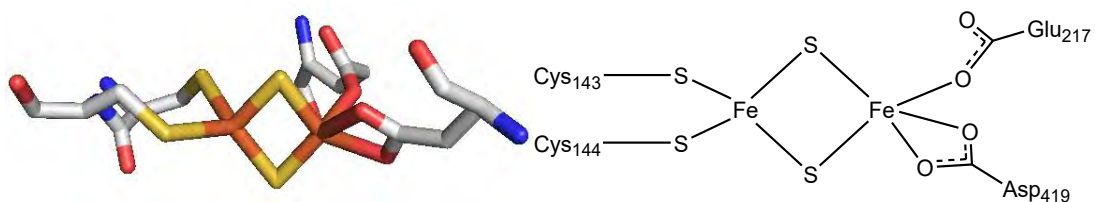


Figura 4.14 Estructura propuesta para el cúmulo [2Fe-2S] de la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus* con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína y en el modelo realizado de su estructura tridimensional.

Este modo de unión, a un residuo de aspartato, aunque poco común, se ha propuesto anteriormente al realizar análisis de secuencias de aminoácidos en la sulfuro deshidrogenasa de *Pyrococcus* (Hagen, *et al.* 2000). Además, la estructura tridimensional de la succinato deshidrogenasa de *E. coli* (Figura 4.15), presenta un cúmulo [2Fe-2S] unido a tres residuos de cisteína y uno de aspartato. Este último unido al cúmulo de forma bidentada (Yankovskaya, *et al.* 2003; Hägerhäll, 1997; Werth, *et al.* 1992. Estructura registrada en el PDB como 1NEN).

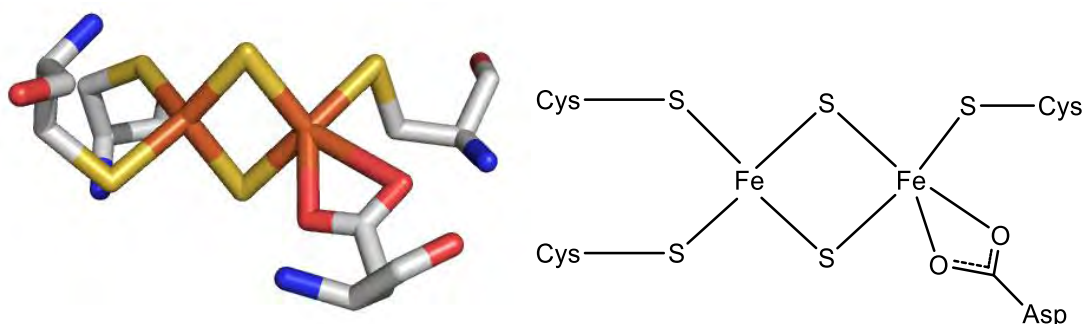


Figura. 4.15 Estructura del cúmulo [2Fe-2S] de la succinato deshidrogenasa de *E. coli*. El modo de coordinación del cúmulo es a tres cisteínas y un aspartato. Este último unido de forma bidentada (Yankovskaya, *et al.* 2003; estructura registrada en el PDB como 1NEN).

Como se mencionó anteriormente en la PQQ-ADH, el residuo Glu₂₁₇ se encuentra coordinado tanto al átomo de Ca²⁺ como a uno de los átomos de Fe del cúmulo [2Fe-2S] por lo que, de acuerdo a esta propuesta, dicho cúmulo se encuentran muy cerca del PQQ. Con el análisis anterior es posible identificar al cúmulo [2Fe-2S] unido por medio del par de cisteínas libres y cercano en el espacio al PQQ. La figura 4.16 presenta la estructura propuesta ambos cofactores.

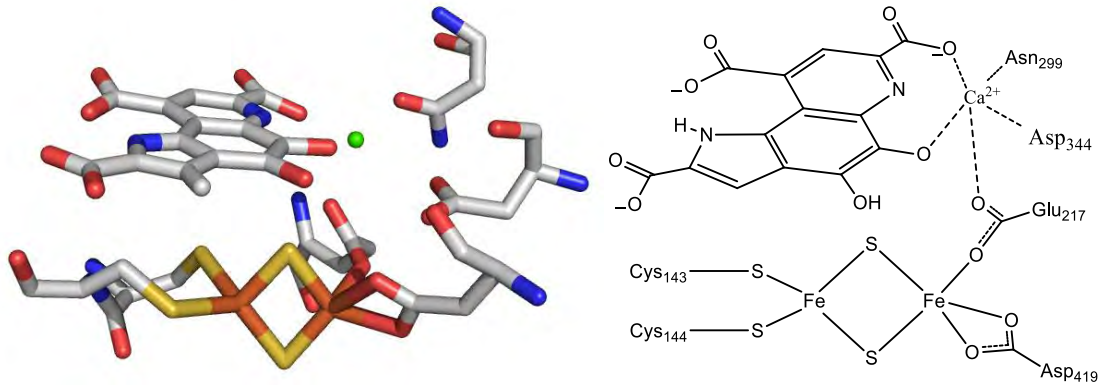


Figura 4.16 Estructura propuesta para los cofactores PQQ y [2Fe-2S] de la SUI de la ADH de *Ga. diazotrophicus* con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína y en el modelo realizado de su estructura tridimensional

En la figura 4.17 se puede observar el modelo de la proteína ADH de *Ga. diazotrophicus* con los distintos cofactores presentes. Como se mencionó anteriormente existe un dominio de unión al PQQ, donde se encuentra el cúmulo [2Fe-2], y otro de unión al hemo tipo *c*.

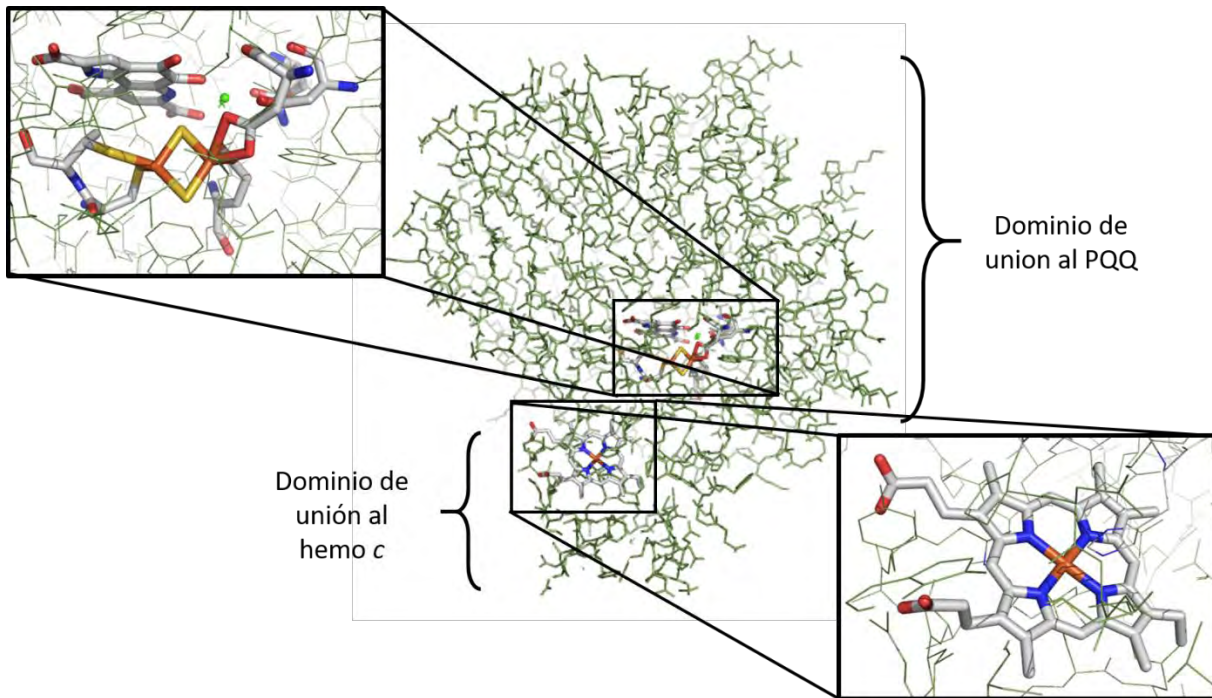


Figura 4.17 Modelo propuesto para la SUI de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* mostrando los cofactores presentes en la proteína, el dominio de unión al PQQ, donde se encuentra el cúmulo [2Fe-2], y el dominio de unión al hemo tipo *c*.

El modelo propuesto es consistente con los potenciales redox reportados (Tabla 1.5; Gómez-Manzo, 2010) donde el primer aceptor de los electrones provenientes del sustrato sería el PQQ, seguido del cúmulo [2Fe-2S] y finalmente los hemo *c*. Al observar la estructura propuesta (Fig. 4.17) se ve que existe una posible ruta para la transferencia electrónica del cúmulo metálico al hemo *c* por medio de la cadena de aminoácidos Ala₁₃₉-Cys₁₄₃. La transferencia electrónica (Figura 4.18) involucra una transferencia monoelectrónica del PQQ al [2Fe-2S] y de éste al esqueleto de los aminoácidos Cys₁₄₃-Gly₁₄₂-Lys₁₄₁-Asp₁₄₀-Ala₁₃₉. Finalmente la transferencia electrónica del residuo de Ala₁₃₉ al residuo Cys₆₅₃ perteneciente al hemo, se da por medio de un salto en el espacio de 3.3 Å. Esta ruta para la transferencia electrónica sería semejante a la reportada anteriormente para alcohol deshidrogenasas de tipo II (Toyama, *et al.* 2005).

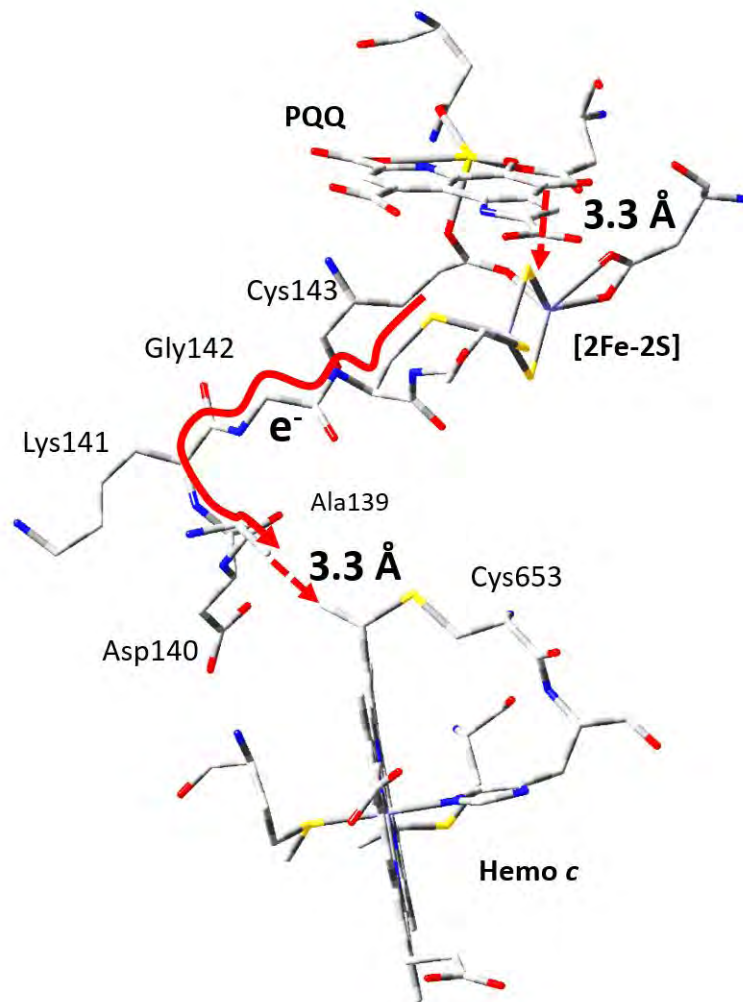


Figura 4.18 Ruta propuesta para la transferencia electrónica desde el PQQ, a través del [2Fe-2S] y finalmente al hemo, de la SUI de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Al analizar la secuencia de aminoácidos, se mencionó que, en las ADH's dependientes de PQQ, se han encontrado algunos residuos conservados que son de unión a sustrato y por lo tanto se asocian al sitio activo de la proteína. Además de dichos residuos se ha encontrado al PQQ formando parte de dicho sitio activo. Cuando se observan dichos residuos en el modelo (Figura 4.19), es posible apreciar que se encuentran cercanos, formando una cavidad que sería propiamente el sitio activo. Algo importante de mencionar es que no sólo se encuentran dichos residuos y el PQQ sino que también se encuentra, formando parte del sitio activo, el cúmulo [2Fe-2S].

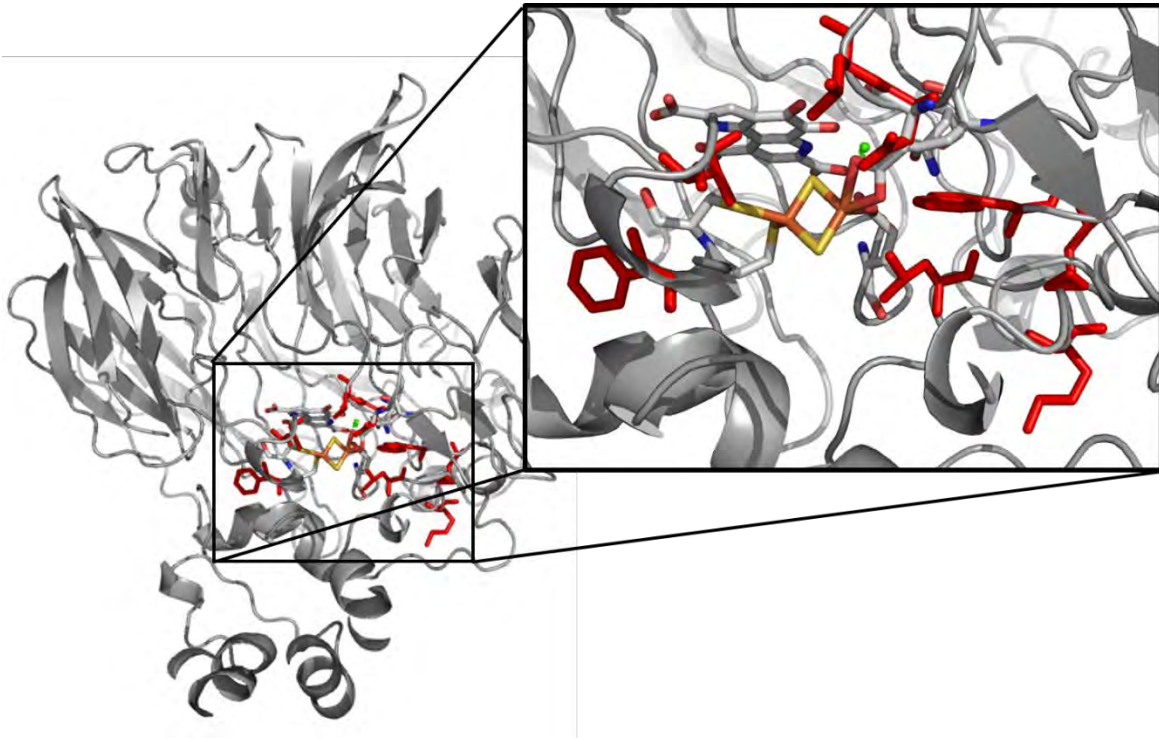


Figura 4.19 Modelo propuesto para la SUI de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* mostrando los cofactores [2Fe-2S] y PQQ y en rojo los residuos de aminoácidos asociados al sitio activo.

4.5 Acoplamiento magnético entre los cofactores PQQ y [2Fe-2S] en la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Debido a los resultados encontrados en el modelo descrito anteriormente, que muestran al PQQ[•] y al cúmulo [2Fe-2S]⁺ cercanos, y que ambos son paramagnéticos, se decidió llevar a cabo un estudio de EPR a temperatura variable para determinar si existe un acoplamiento magnético entre ambos. Dicho acoplamiento es posible debido a que, en estado reducido, el PQQ[•] presenta un estado de espín $S = 1/2$ debido al radical libre presente en el cofactor. Por otro lado el cúmulo [2Fe-2S]⁺, en estado reducido, presenta a su vez un estado de espín $S = 1/2$ debido al electrón desapareado que se encuentra deslocalizado en el cúmulo.

Es importante mencionar que el estudio de EPR se realizó a bajas temperaturas debido a que el [2Fe-2S]⁺ no se observa a altas temperaturas. El experimento se realizó con una

muestra de PQQ-ADH recién purificada y se registró el espectro de dicha muestra a diferentes temperaturas (5-55 K).

La intensidad de la señal en EPR depende proporcionalmente de la susceptibilidad magnética (χ) de acuerdo a la ecuación (Eaton, *et al.* 2010):

$$I = \chi'' \eta Q \sqrt{P Z_0} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde χ es la susceptibilidad magnética, η es el factor de llenado, Q el factor de calidad del resonador, Z_0 es la impedancia de la línea de transmisión y P la potencia de microondas del resonador.

Dado que la Intensidad de la señal es proporcional a la susceptibilidad magnética, para estudiar el comportamiento magnético de los cofactores se graficó la intensidad de la señal del PQQ• vs. la temperatura absoluta (Figura 4.20 A); así como la del cúmulo [2Fe-2S]⁺ vs. temperatura absoluta (Figura 4.20 B). En ambas curvas es posible observar un aumento de la intensidad conforme disminuye la temperatura hasta alcanzar un máximo en 10 K, a partir de este punto la intensidad comienza a decaer.

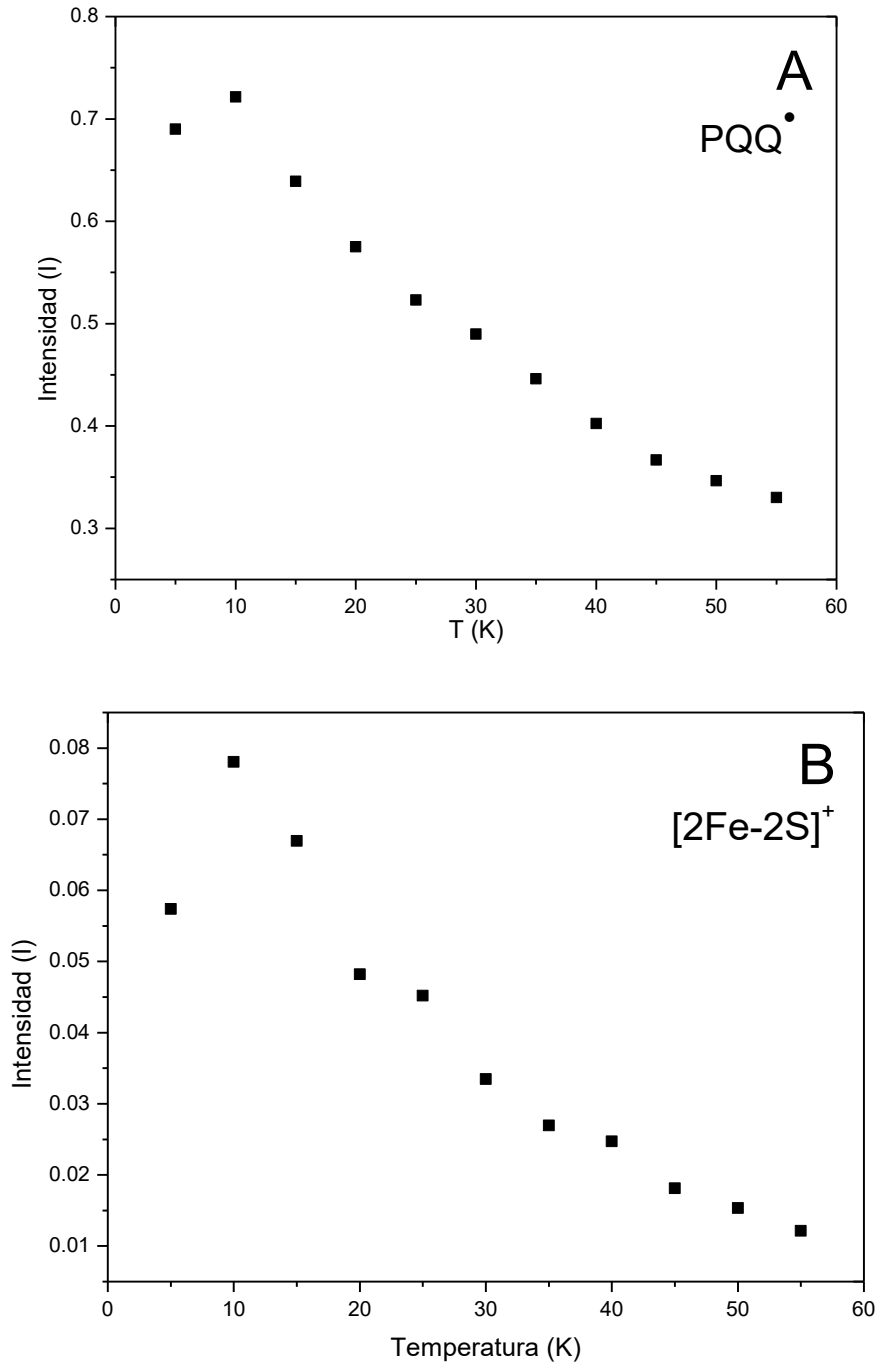


Figura 4.20. Dependencia de la temperatura de la intensidad de la señal observada en EPR de A) PQQ• y B) cúmulo [2Fe-2S]⁺. Los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL, una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.381409 GHz.

El comportamiento observado en la figura 4.20, corresponde a un comportamiento de un acoplamiento de tipo antiferromagnético. El cual se puede, a partir de 10 K, ajustar por medio de la ecuación de Curie-Weiss:

$$\chi = \frac{C}{T-\theta} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde χ es la susceptibilidad magnética, C la constante de Curie y θ la temperatura de Weiss. Una gráfica del inverso de la susceptibilidad (χ^{-1}) en función de T, para un sistema que cumple la ley de Curie-Weiss, presentará una línea recta cuya pendiente será C^{-1} de acuerdo a:

$$\chi^{-1} = \frac{T}{C} - \frac{\theta}{C} \quad (\text{Ec. 16})$$

Además es posible identificar el valor de θ evaluando la función para $\chi^{-1} = 0$. En la figura 4.21 A se puede observar la gráfica del inverso de la intensidad de la señal del PQQ• en función de la temperatura, que es una línea recta, lo que indica que este comportamiento magnético es de tipo Curie –Weiss. El valor negativo de la constante de Weiss, $\theta = -32 K$, confirma también el tipo de acoplamiento encontrado, sin embargo, es necesario un estudio de magnetización para poder obtener el valor de las constantes de acoplamiento. Por otro lado, en la figura 4.20 B se observa que la tendencia para el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ es muy similar a la del PQQ•, sin embargo, al graficar el inverso de la intensidad de la señal del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ en función de la temperatura la tendencia no es lineal. Esto se debe a que, en el caso del cúmulo, la gráfica χ^{-1} vs. T presenta no solo la contribución del acoplamiento entre el PQQ• y el cúmulo metálico sino también la contribución del acoplamiento de tipo antiferromagnético que hay entre los dos átomos de Fe dentro del cúmulo.

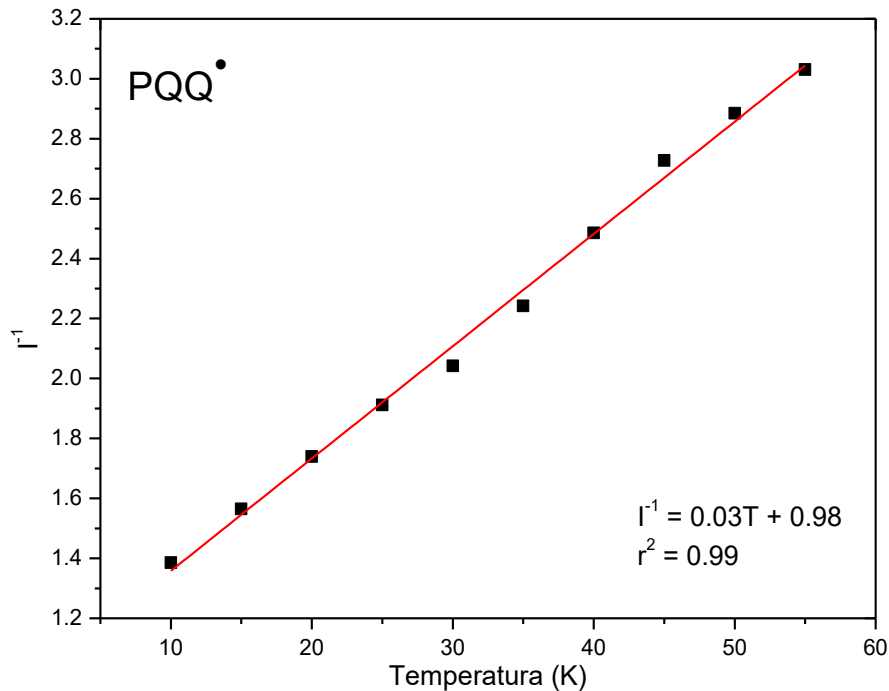


Figura 4.21 Dependencia de la temperatura del inverso de la intensidad de la señal (I^{-1}) de EPR del A) PQQ•. Se puede apreciar el comportamiento esperado de acuerdo a la ley de Curie-Weiss. Se muestra en rojo el ajuste a la ecuación $\chi^{-1} = \frac{T}{C} - \frac{\theta}{C}$. Los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL, una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.381409 GHz.

Se ha reportado en la literatura (Pierce, *et al.* 2003; Eaton, *et al.* 2010), gráficas de la Intensidad de la señal en EPR multiplicado por la temperatura (población fraccionaria de espín) en función de la temperatura (n_S vs. T). En dichas gráficas se observa un decaimiento de la población fraccionaria a bajas temperaturas es indicativo de un acoplamiento antiferromagnético. En el presente trabajo se realizaron gráficas de la población fraccionaria de espín vs. temperatura para las señales de EPR del PQQ• (Figura 4.22 A) y del cúmulo $[2Fe-2S]^+$ (Figura 4.22B). Un estudio complementario del acoplamiento magnético se podrá encontrar en Rodríguez-Cortés. En preparación.

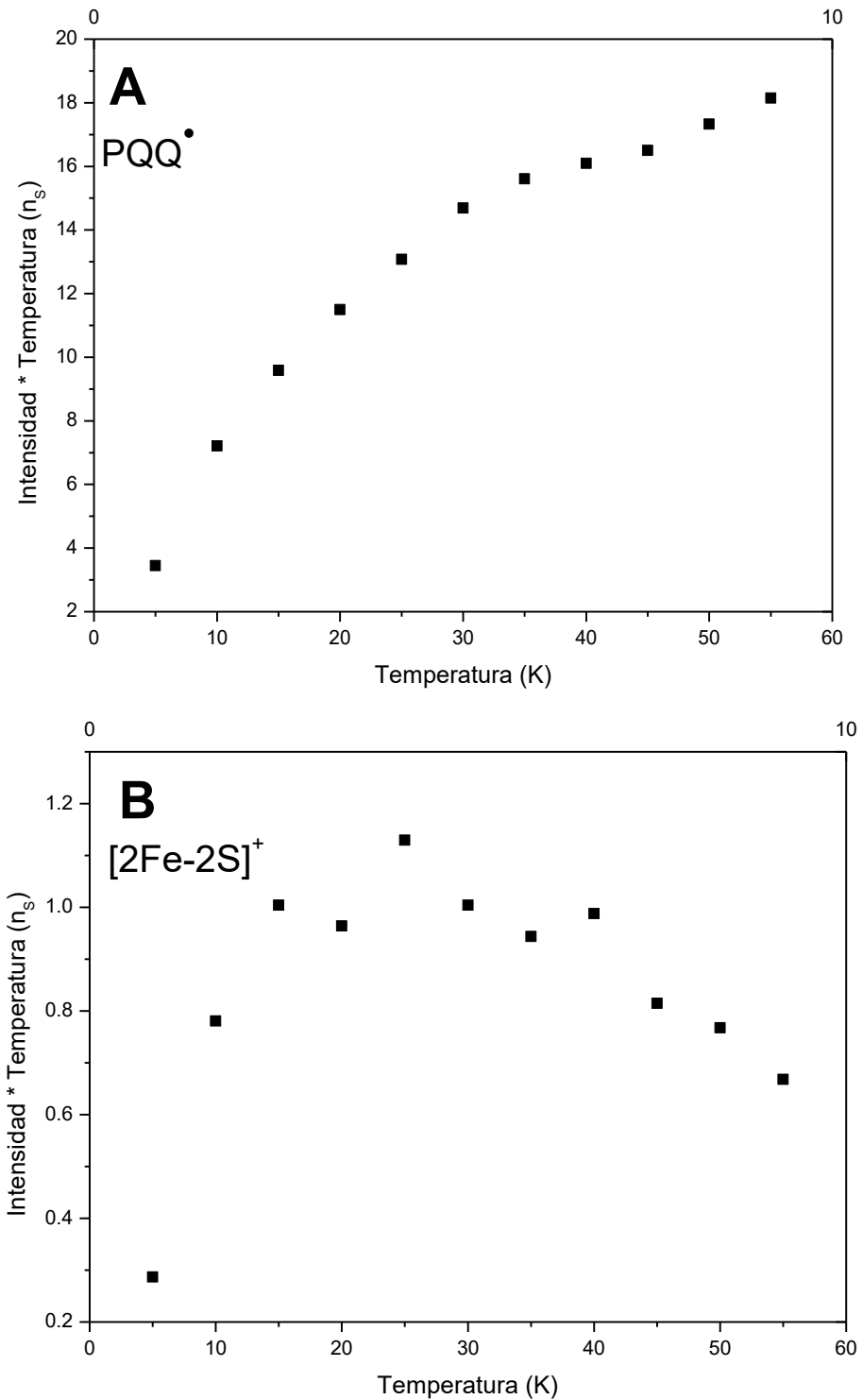


Figura 4.22 Dependencia de la intensidad de la señal multiplicada por la temperatura (población fraccionaria de espín) en función de la temperatura para las señales A) del PQQ• y B) del cúmulo [2Fe-2S]⁺. Se puede apreciar el decaimiento de la función a bajas temperatura, consistente con un

acoplamiento de tipo antiferromagnético. Los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL, una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.381409 GHz.

Es importante mencionar que el acoplamiento encontrado entre el PQQ[•] y el cúmulo [2Fe-2S]⁺ es consecuencia del paramagnetismo y de la cercanía en el espacio de ambos lo que es consistente con lo encontrado en el modelo propuesto en el punto 4.4.2.

4.6 Determinación de los estados de espín de los hemos c presentes en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* contiene cuatro hemos c. Dado que la proteína se aísla siempre en estado reducido, es posible observar, en el espectro de UV-Vis las señales correspondientes a los hemos, con la banda Soret en 417 nm y las bandas α y β en 523 y 553 nm respectivamente (Figura 4.5). Dichos espectros también pueden brindar información acerca del estado de espín en que se encuentran los hierros en los hemos. Para tener una mayor resolución en los máximos del espectro se absorción se realizó la segunda derivad del espectro de UV-Vis (Figura 4.23). Se pueden observar mínimos en 417, 421, 551 y 553. Los mínimos en 417 y 551 se asocian a hemos c con un Fe(II) de bajo espín, mientras que los mínimos en 421 y 553 nm se asocian a hemos c con un Fe(II) de alto espín. (Rudolf. 2004; Wood. 1984)

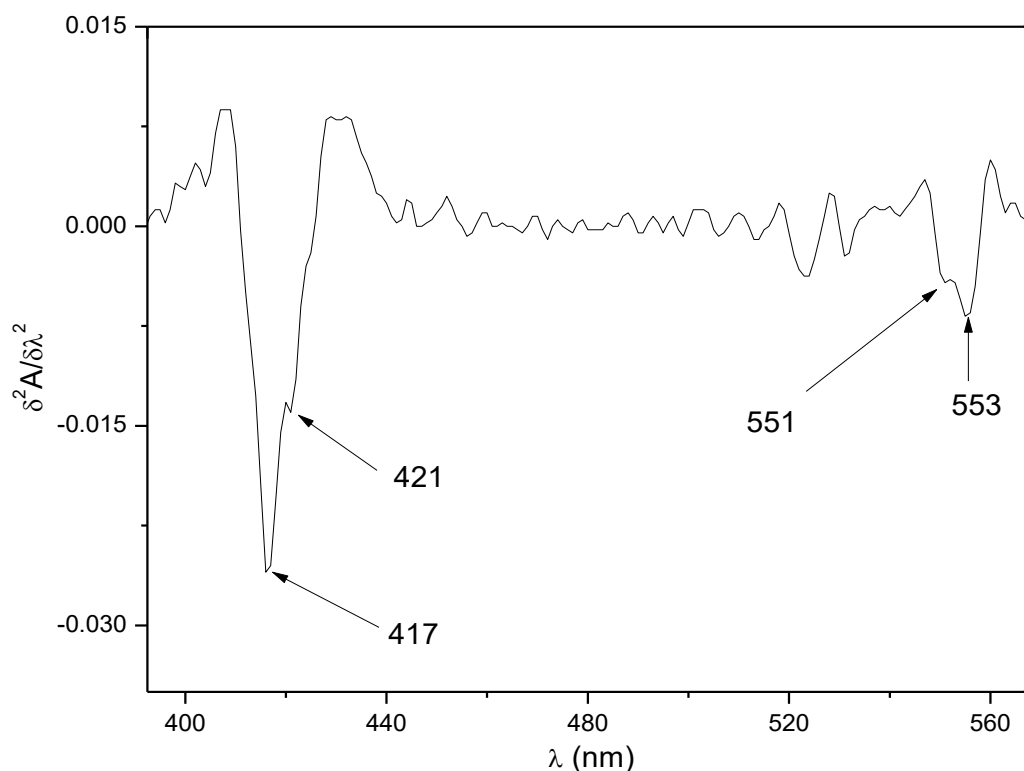


Figura 4.23. Segunda derivada del espectro de UV-Vis de PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Se muestran los mínimos asociados a un Fe(II) de bajo espín (417 y 551 nm) así como los asociados a un Fe(II) de alto espín (421 y 553 nm).

En una muestra de PQQ-AHD recién purificada, no es posible observar los hemos en EPR, porque ésta se encuentra reducida y los átomos de Fe(II) en los hemos no presentan señal en EPR. Por lo anterior se decidió oxidar la proteína con diversos agentes oxidantes de acuerdo a lo mencionado en la sección experimental (3.2.12). La primera oxidación, con un pequeño cristal de persulfato de amonio, mostró un espectro de EPR (Figura 4.24) con dos señales, una rómbica con valores de $g_1 = 10.388$, $g_2 = 5.058$ y $g_3 = 4.276$, que corresponden a un Fe(III) de alto espín y otra señal con valor de $g = 3.752$ que se asigna a un Fe(III) de bajo espín. Estos valores se asemejan a los reportados anteriormente por el grupo de Moura para los hemos del tetrahemo hemo c_3 de *Desulfovibrio baculatus* (Moura. *Et al.* 1988) y de la nitrito reductasa de *Desulfovibrio desulfuricans* (Costa, *et al.* 1990).

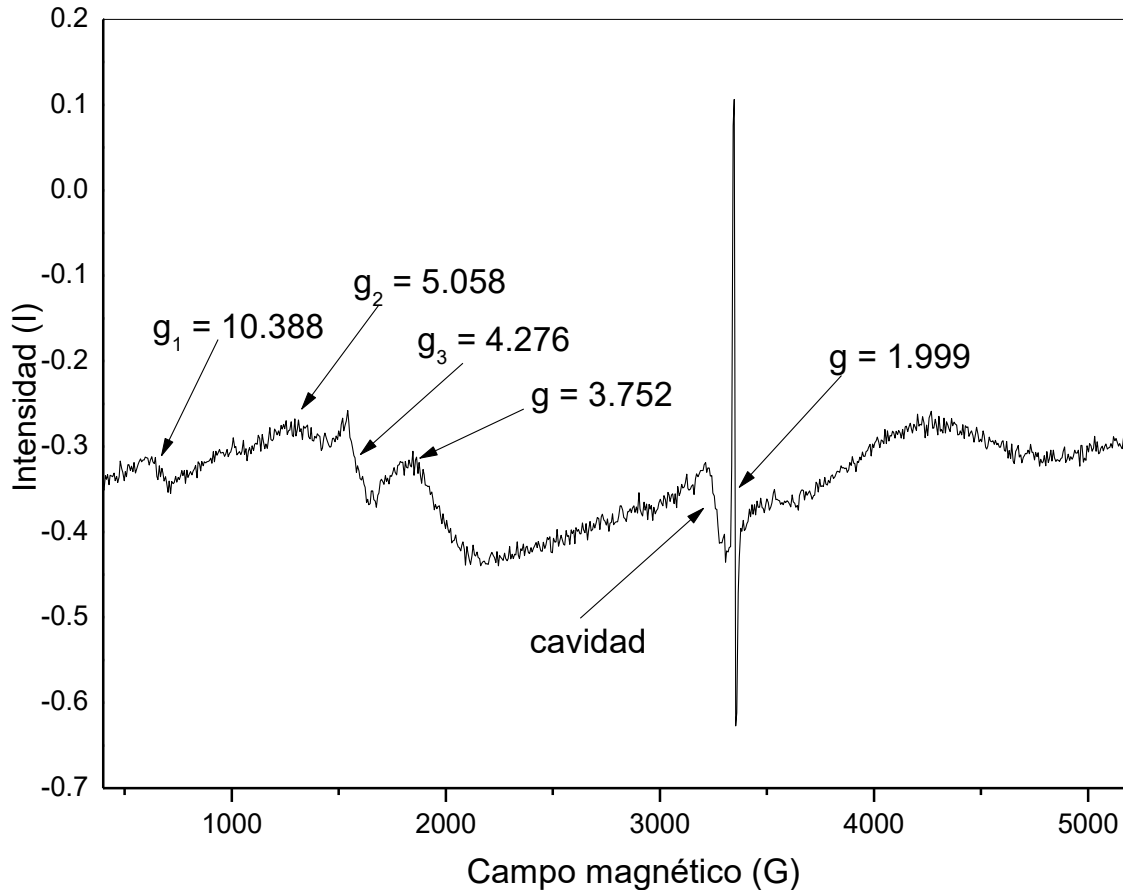


Figura 4.24 Espectro de EPR de una muestra de PQQ-ADH parcialmente oxidada con un pequeño cristal de persulfato de amonio. El espectro fue medido a una frecuencia de 9.382277 GHz, una temperatura de 4 K y una potencia de 2 mW.

Para obtener las señales de los hemos faltantes, se adicionó una mayor cantidad de persulfato, lo que ocasionó un cambio de color en la proteína a verde-oliváceo así como que ésta se precipitara.

En un segundo experimento (sección 3.2.12), se tomaron alícuotas de la titulación espectro-electroquímica, cuando el potencial alcanzó los valores: -55 mV, 43 mV, 133 mV y 229 mV las cuales fueron congeladas a 77 K para su registro en EPR. En el espectro de EPR de la muestra a -55 mV (Figura 4.25), se observa una señal correspondiente a un Fe(III) de alto espín con valores de $g_1 = 10.889$, $g_2 = 6.049$ y $g_3 = 4.276$. También se observa una señal con una $g = 3.748$ correspondiente a un Fe(II) de bajo espín. Estas señales coinciden con lo observado para la oxidación con persulfato. Al aumentar el potencial, con el fin de observar

las señales de los restantes hemos, comienzan a observarse una serie de señales debidas a la mezcla de quinonas que, sumado a la baja concentración de la proteína, dificultaron la interpretación de los espectros.

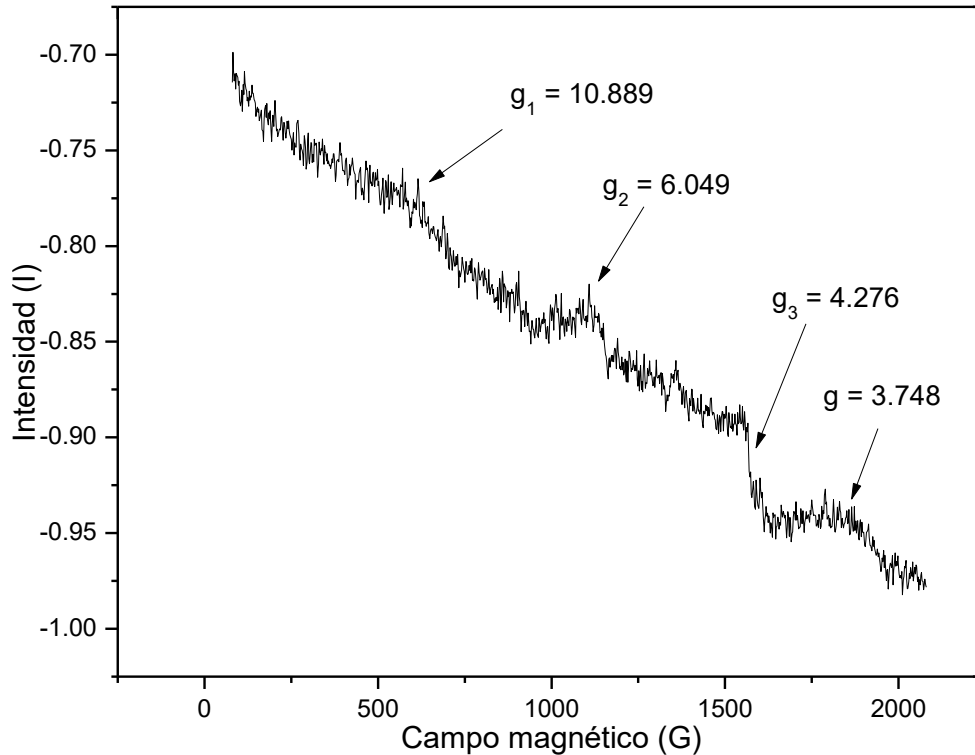


Figura 4.25 Espectro de EPR de una muestra de PQQ-ADH oxidada con una solución amortiguadora redox de quinonas a un potencial de -55 mV. El espectro fue medido a una frecuencia de 9.390102 GHz, una temperatura de 4 K y una potencia de 2 mW.

En un tercer experimento, se realizó la oxidación con una muestra más concentrada de PQQ-ADH (21 mg/mL) y con un agente oxidante que no presentara señales en EPR. El agente utilizado fue hidroperóxido de terbutilo. A los pocos minutos de haber adicionado el agente oxidante, aún fue posible observar las señales del PQQ• ($g = 1.9966$) y del cúmulo $[2Fe-2S]^+$ ($g_1 = 1.937$ y $g_2 = 1.911$). Además, el espectro muestra las señales previamente observadas para los dos primeros hemos, una señal rómbica con valores de $g_1 = 10.074$, $g_2 = 5.222$ y $g_3 = 4.281$ (señal del Fe(III) de alto espín) y la señal con valor de $g = 3.652$ de un Fe(III) de bajo espín. Adicionalmente a esto, aparecen dos nuevas señales, una con valores de $g_1 = 2.948$ y $g_2 = 2.293$ y otra con valores de $g_1 = 2.714$ y $g_2 = 2.091$, ambas correspondientes a Fe(III)

de bajo espín. Estas señales son semejantes a las señales reportadas anteriormente para hemos de enzimas multihemo (Moura. *Et al.* 1988; Costa, *et al.* 1990; Rudolf, 2004).

La muestra fue congelada a $-66\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se volvió a medir el espectro de EPR cuando la oxidación de la proteína fue total (Figura 4.26) y las señales de los Fe(III) de los hemos se observaban con mayor claridad. Se encontró nuevamente la señal de Fe(III) de alto espín (cl) con valores de $g_1 = 10.389$, $g_2 = 5.058$ y $g_3 = 4.276$. Además se observan tres señales correspondientes a Fe(III) de bajo espín: una señal con valor de $g = 3.752$ (cl₁), una segunda señal con valores de $g_1 = 2.974$, $g_2 = 2.289$ y $g_3 = 1.524$ (cl₂) y la tercera señal con valores de $g_1 = 2.684$, $g_2 = 2.104$ y $g_3 = 1.428$ (cl₃). Es importante mencionar que a pesar de que la señal correspondiente al cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ ha desaparecido por completo, la señal del radical semiquinona ($g = 2.001$) aún es visible.

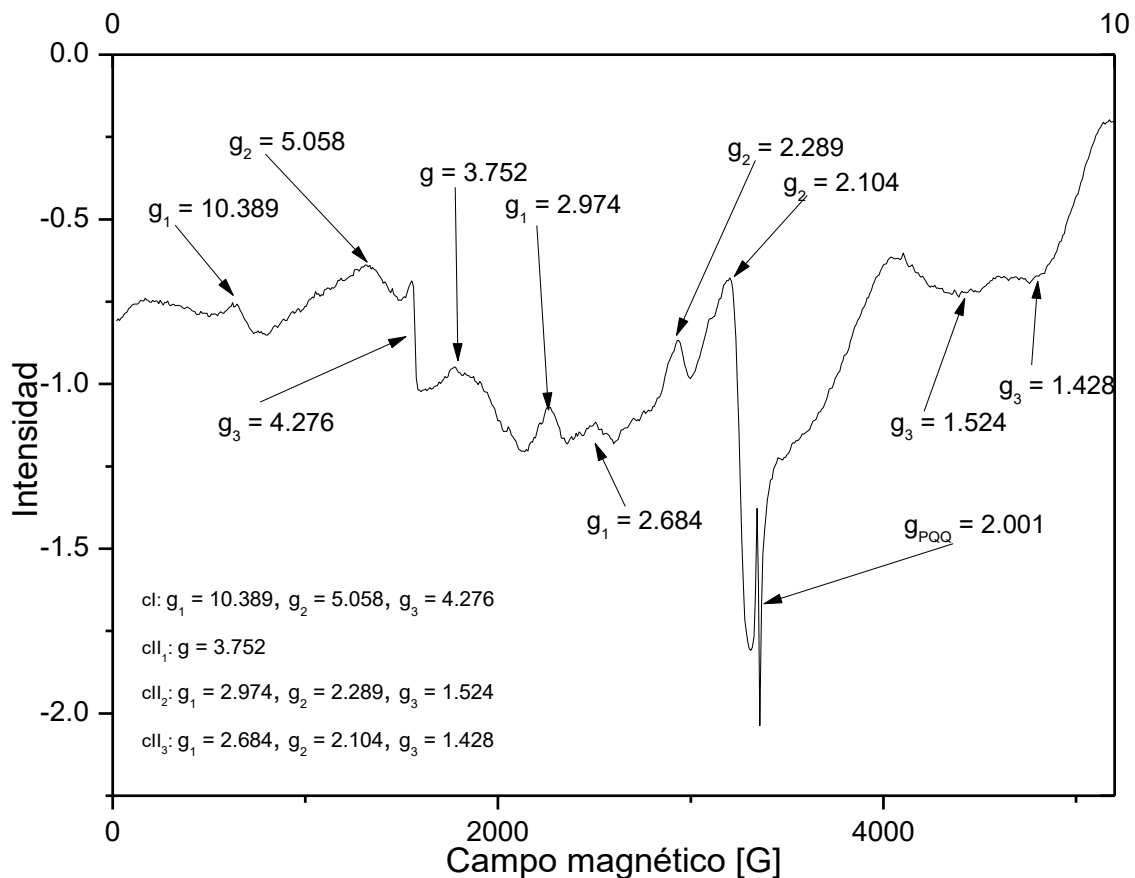


Figura 4.26 Espectro de EPR de una muestra de PQQ-ADH (21 mg/mL) oxidada con hidroperóxido de terbutilo. El espectro fue medido a una frecuencia de 9.39415 GHz, una temperatura de 10 K y una potencia de 2 mW.

Cabe mencionar que la señal en $g = 2.104$ (cll_3) se ve ligeramente afectada por una señal propia de la cavidad del equipo de EPR utilizado. Al restar la línea base al espectro de la figura 4.26, se obtiene un espectro (Figura 4.27) donde se siguen observando las señales antes mencionadas pero se puede observar también que la intensidad relativa de la señal correspondiente al hemo cll_3 disminuye.

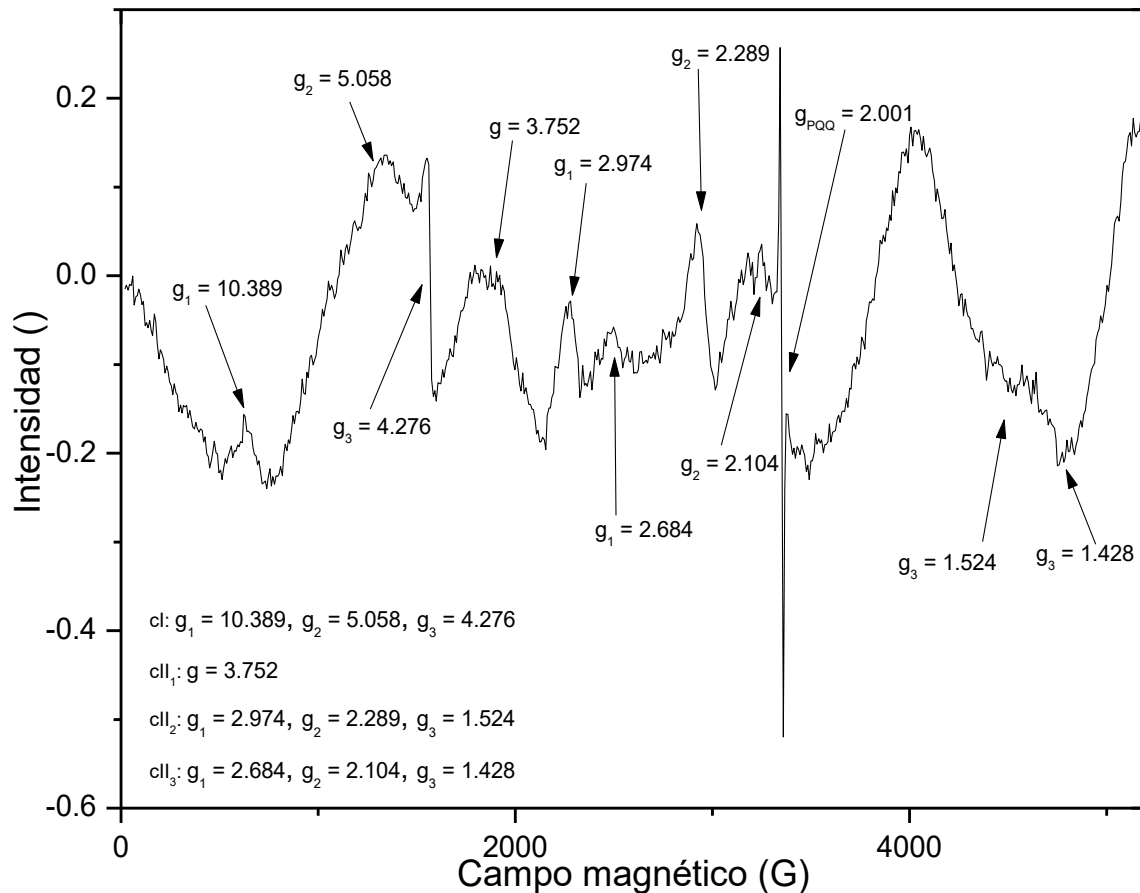


Figura 4.27 Espectro de EPR de una muestra de PQQ-ADH (21 mg/mL) oxidada con hidroperóxido de terbutilo. El espectro fue medido a una frecuencia de 9.39415 GHz, una temperatura de 10 K y una potencia de 2 mW. La línea base del equipo ha sido sustraída del espectro.

De las muestras de PQQ-ADH oxidada con persulfato de amonio y la mezcla de quinonas, fue posible asignar las señales de EPR de los hemos que tienen los potenciales de oxidación más bajos (-64 y -8 mV respectivamente) siendo uno de estos de alto espín (cl) y otro de bajo espín (cll_1). Al analizar también las intensidades relativas de las señales, se asignó la señal con valor de $g_{max} = 10.389$ al hemo cuyo potencial es de -64 mV, siendo dicho grupo

aquél con el Fe(III) de alto espín (cl). Por tanto, la señal con valor de $g = 3.752$ corresponde a un Fe(III) de bajo espín que se encuentra en el hemo con potencial de -8 mV (cII₁).

AL oxidar con hidroperóxido de terbutilo se pudieron asignar las señales faltantes. La señal con valor de $g_{max} = 2.974$ fue asignada al hemo cuyo potencial es $+185$ mV (cII₂). Mientas que al hemo con potencial de $+210$ mV (cII₃), se le asignó una señal de EPR con valor de $g_{max} = 2.684$. Ambos siendo de bajo espín. En la tabla 4.3 se enlistan los potenciales de oxidación, así como las señales de EPR asignados a cada uno de los hemos tipo c. Un estudio complementario de los estados de espín de los hemos c se podrá encontrar en Sánchez-Ostria. En preparación.

Tabla 4.3 Potenciales redox, estados de espín y señales de EPR asignados a cada uno de los hemos.

Hemo	Subunidad en la que se encuentra	Potencial de oxidación (mV)	Estado de espín	Señal de EPR
cl	SUI	-64	alto espín	$g_1 = 10.389$ $g_2 = 5.058$ $g_3 = 4.276$
cII ₁	SUII	-8	bajo espín	$g = 3.752$
cII ₂	SUII	+185	bajo espín	$g_1 = 2.974$ $g_2 = 2.289$ $g_3 = 1.524$
cII ₃	SUII	+210	bajo espín	$g_1 = 2.684$ $g_2 = 2.104$ $g_3 = 1.407$

Finalmente se llevó a cabo una simulación del espectro de EPR de la PQQ-ADH en estado oxidado. La figura 4.28 muestra los espectros simulados para cada uno de los hemos (C – F)

así como el espectro simulado para el radical semiquinona (G), el espectro total simulado (B) y el espectro experimental (A).

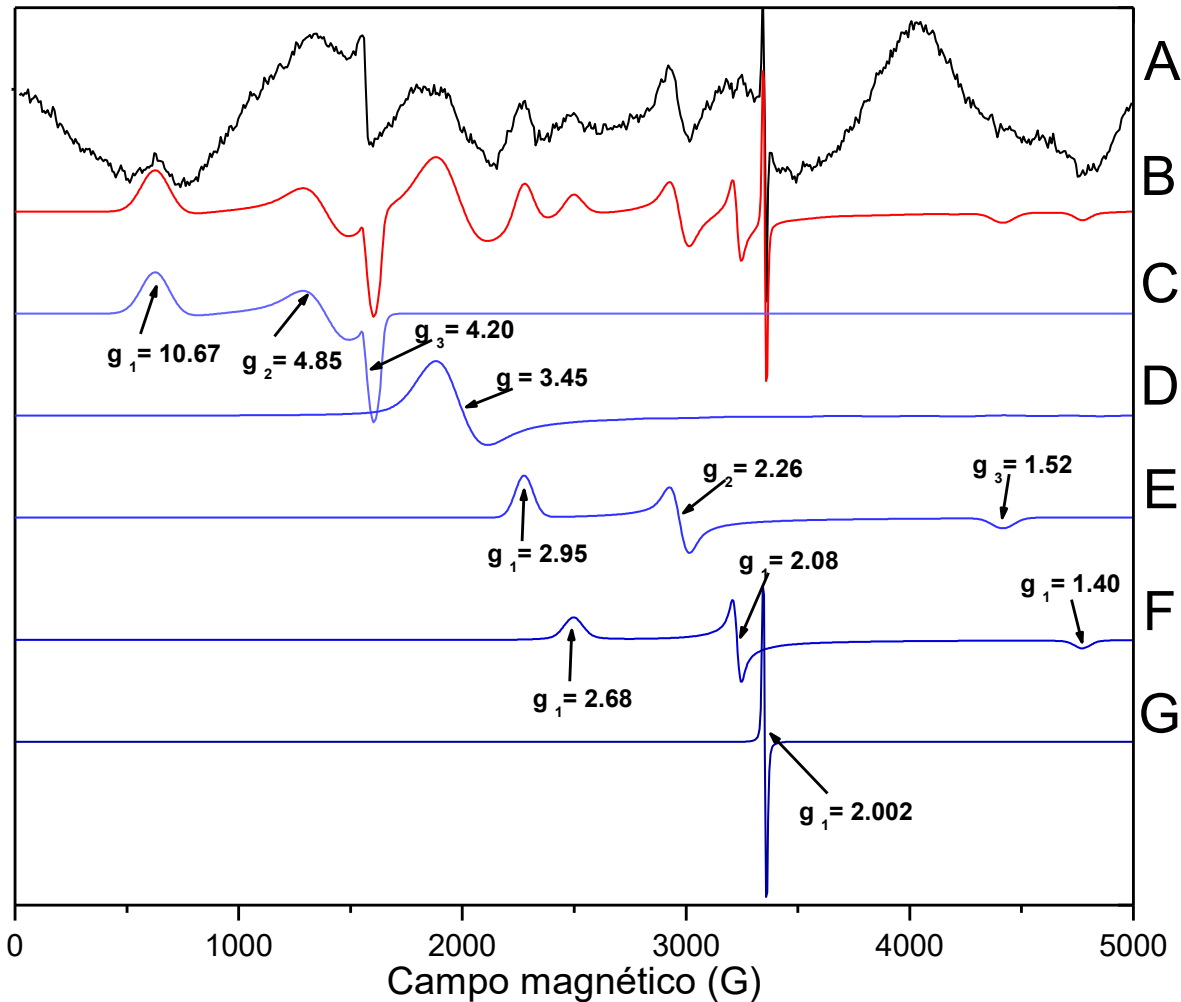


Figura 4.28 A) Espectro de la PQQ-ADH oxidada con hidropéroxido de terbutilo. El espectro fue medido a una frecuencia de 9.39415 GHz, una temperatura de 10 K y una potencia de 2 mW. B) Simulación del espectro de la PQQ-ADH en estado oxidado. C) Simulación del espectro de EPR del Fe(III) de alto espín del hemo cI. D) Simulación del espectro de EPR del Fe(III) de bajo espín del hemo cII₁. E) Simulación del espectro de EPR del Fe(III) de bajo espín del hemo cII₂. F) Simulación del espectro de EPR del Fe(III) de bajo espín del hemo cII₃. G) Simulación del espectro de EPR del radical semiquinona.

4.7 Cristalización de la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

De acuerdo a lo observado anteriormente por Sosa-Torres, de las pruebas de cristalización en las que se emplearon 96 soluciones amortiguadoras con diferentes condiciones de concentración de proteína, presencia de sales y pH, se encontró que las mejores condiciones para cristalizar la PQQ-ADH eran empleando una solución amortiguadora de citrato de sodio (citrato de sodio 0.1 M, pH = 5.6 con un 10 % v/v de isopropanol y 10 % m/v de PEG 4000) y una solución amortiguadora de sulfato de amonio con cloruro de cobalto pH = 6.5 (sulfato de amonio 0.9 M, CoCl_2 0.01 M, pH = 6.5, MES 0.1 M) de acuerdo a lo reportado en la parte experimental 3.1.2.7.

Se llevaron a cabo pruebas de cristalización empleando soluciones amortiguadoras de citrato de sodio y de cloruro de cobalto. Las pruebas de cristalización se realizaron por el método de gota sedente empleando una gota de 2 μL de solución amortiguadora para cristalizar y 2 μL de una solución de proteína 15 mg/mL.

En las pruebas donde se empleó la solución amortiguadora de citratos se observó la formación de pequeños cristales. Dichos cristales resultaron ser de proteína, sin embargo, su difracción no fue adecuada para la adquisición de datos.

Al observar los resultados de las pruebas de cristalización con la solución amortiguadora de cloruro de cobalto se encontraron unos cristales rojizos que resultaron ser cristales de cloruro de cobalto.

Se realizaron posteriormente variaciones a la solución amortiguadora de citratos aumentando el porcentaje de PEG 4000 (10 % m/v, 12 % m/v y 15 % m/v) y una variación de pH (5.6 y 5.8) Las pruebas de cristalización se realizaron por el método de gota sedente empleando una gota de 2 mL de solución amortiguadora para cristalizar y 2 mL de una solución de proteína 15 mg/mL.

A una concentración de 10 % m/v de PEG se pudo observar la formación de cristales (Figura 4.29 A). Al aumentar dicha concentración a 12 % m/v los cristales disminuyeron considerablemente su tamaño (Figura 4.29 B). Finalmente a una concentración de 15 % m/v

no fue posible observar cristales. Al aumentar el pH a 5.8 se formaron fibras y precipitados de color rojo.

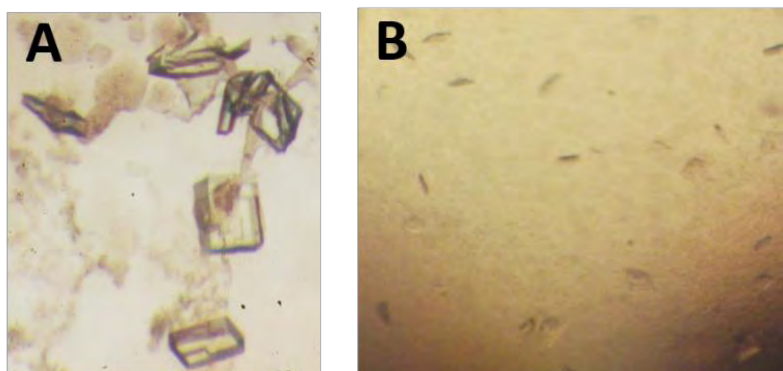


Figura 4.29 Resultados de las pruebas de cristalización variando la concentración de PEG y pH. A) Solución amortiguadora de citratos con PEG al 10 % m/v y pH = 5.6 C) Solución amortiguadora de citratos con PEG al 12 % m/v y pH = 5.6.

De las diversas *crio-soluciones amortiguadoras* utilizados se obtuvo la mejor resolución con una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1 M, pH = 5.6, 10 % v/v de isopropanol, 10 % v/v de glicerol y de PEG 4000 al 10 % m/v. Al aumentar el porcentaje de glicerol a 12 % v/v se observó que los cristales se disolvieron.

Los cristales obtenidos con la solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1 M y una concentración de PEG de 10 % m/v, figura 4.29 A, difractaron aproximadamente a 4.3 Å, la simetría de dichos cristales es de C_2 . La dimensión de la celda unitaria encontrada fue de $a=89.10$ Å, $b=70.17$ Å y $c= 80.18$ Å. Actualmente se está trabajando en la obtención de la estructura tridimensional de la PQQ-ADH.

Hasta el momento, no existe reportada ninguna estructura de una alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ de tipo III, por lo que los avances en la cristalización de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* son de gran relevancia y se espera contar pronto con cristales adecuados para su difracción de rayos X y posterior elucidación de la estructura tridimensional de la metaloenzima.

5. Resumen y conclusiones

Se desarrolló un método de cultivo para la bacteria *Ga. diazotrophicus* que permitiera la expresión de la proteína de membrana dependiente de PQQ alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) en su forma completamente activa. Para ello se controló el pH durante el crecimiento de la bacteria, ya que ésta libera ácido acético, lo que disminuye el pH de del medio.

Se purificó la PQQ-ADH y se confirmó la presencia de los grupos prostéticos PQQ, un cúmulo [2Fe-2S] de tipo ferredoxina y cuatro hemo *c*, todos ellos en estado reducido. Por medio de espectroscopía de UV-Vis se determinó el coeficiente de absortividad molar para la banda β (con máximo en 554 nm) correspondiente a los hemo tipo *c*. El valor determinado es de $782 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que corrige el valor reportado anteriormente para esta proteína.

Por medio de un análisis de secuencias de aminoácidos de la PQQ-ADH y al compararla con otras deshidrogenasas dependientes de PQQ, fue posible establecer la existencia, en la subunidad I (SUI), de un dominio de unión al PQQ y otro al hemo *c*. También se observó que existen regiones conservadas que dan a la proteína una estructura de súper barril dentro del cual se encuentra el PQQ estabilizado por un ion de Ca^{2+} . También se observó la presencia del motivo CXXCH, así como un residuo de Met conservado, que corresponden al sitio de unión al hemo *c*. Finalmente, se propuso un par de cisteínas unido al cúmulo de tipo ferredoxina [2Fe-2S].

Con ayuda de la secuencia de aminoácidos y empleando como molde una estructura de la ADH de tipo II de *Pseudomonas putida* se realizó una predicción de la estructura que tendría la subunidad I (SUI) de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. El modelo presenta un dominio con una estructura de súper barril (de unión al PQQ) y un dominio de unión al hemo *c*. De acuerdo al modelo la probabilidad de error es menor en el dominio de unión al PQQ.

En el modelo propuesto se estableció el sitio de unión al PQQ y al hemo *c* de acuerdo a lo observado en el análisis de secuencias. Se propuso además al cúmulo [2Fe-2S] unido al par de cisteínas libres por un lado y por el otro a un residuo de Glu y a uno de Asp coordinado de manera bidentada. Este modo de unión a un Asp y a un Glu, dando lugar a un hierro pentacoordinado, es novedoso y no ha sido descrito en la literatura un cúmulo similar. Es

importante mencionar que la diferencia estructural encontrada puede explicar el desplazamiento observado en el espectro de EPR para la señal del cúmulo de la PQQ-ADH con una $g_{max} = 2.007$ que difiere del valor de $g \approx 2.05$ comúnmente reportado para estos cúmulos.

Con el modelo realizado también se propuso al PQQ y al cúmulo [2Fe-2S] dentro del sitio activo de la proteína, y se propuso una ruta para la transferencia electrónica en la proteína la cual comienza con una transferencia monoelectrónica del PQQ al cúmulo [2Fe-2S]. Posteriormente la transferencia electrónica se da a través de la cadena lateral de aminoácidos hasta llegar a uno de los residuos de cisteína del hemo c. Dicha transferencia es consistente con los potenciales redox de los cofactores encontrados previamente en esta enzima.

Por medio de espectroscopía de EPR se realizó una serie de experimentos a temperatura variable con los que se determinó un acoplamiento de tipo antiferromagnético entre el PQQ• y el cúmulo [2Fe-2S]⁺. Dicho acoplamiento es consistente con el modelo propuesto en el cual tanto el PQQ como el cúmulo [2Fe-2S] se encuentran muy cercanos en el espacio. Por otro lado, el acoplamiento encontrado podría tener consecuencias para la estabilidad observada de la proteína en el estado reducido explicando porqué, a pesar de los bajos potenciales redox de los cofactores, la proteína se purifica siempre en estado reducido, aún en presencia de oxígeno.

Por medio de espectroscopía de EPR, y empleando diversos agentes oxidantes, se determinó el estado de espín de los hemos c en la PQQ-ADH. Se encontró que el hemo c con el potencial más bajo (-64 mV) posee un átomo de hierro de alto espín mientras que los hierros en los hemos c restantes son de bajo espín lo cual es consistente con otros ejemplos descritos en la literatura.

Finalmente se llevaron a cabo experimentos de cristalización con los cuales se obtuvieron cristales de la PQQ-ADH que difractaron a 4.3 Å. Actualmente se sigue trabajando para obtener la estructura tridimensional de la proteína. La obtención de dicha estructura es de

gran relevancia debido a que, a la fecha, no ha sido reportada la estructura de ninguna alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ de tipo III.

Referencias

Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., Ameyama, M. (1978). Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agr. Biol. Chem.*, 42 (11), 2045.

Al Ait, L., Yamak, Z. (2013). Morgenstern, B., DIALIGN at GOBICS - multiple sequence alignment using various sources of external information. *Nucl. Acids Res.* 41. W3.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22. 195.

Beinert, H., Sands, R.H. (1960). Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3. 41.

Bertalan,M., Albano,R., de Padua,V., Rouws,L., Rojas,C., Hemerly,A., Teixeira,K., Schwab,S., Araujo,J., Oliveira,A., Franca,L., Magalhaes,V., Alqueres,S., Cardoso,A., Almeida,W., Loureiro,M.M., Nogueira,E., Cidade,D., Oliveira,D., Simao,T., Macedo,J., Valadao,A., Dreschsel,M., Freitas,F., Vidal,M., Guedes,H., Rodrigues,E., Meneses,C., Briosso,P., Pozzer,L., Figueiredo,D., Montano,H., Junior,J., de Souza Filho,G., Martin Quintana Flores,V., Ferreira,B., Branco,A., Gonzalez,P., Guillobel,H., Lemos,M., Seibel,L., Macedo,J., Alves-Ferreira,M., Sachetto-Martins,G., Coelho,A., Santos,E., Amaral,G., Neves,A., Pacheco,A.B., Carvalho,D., Lery,L., Bisch,P., Rossle,S.C., Urmenyi,T., Rael Pereira,A., Silva,R., Rondinelli,E., von Kruger,W., Martins,O., Baldani,J.I. and Ferreira,P.C. (2009). Complete genome sequence of the sugar cane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10. 450.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Casarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 42 (W1). W252.

- Burris, R.H.** (1994). Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandi* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH. *Protoplasma*. 183, 62.
- Cammack, R., Patil, D.S., Fernandez, V.M.** (1985). Electron-spin-resonance/electron-paramagnetic-resonance spectroscopy of iron-sulphur enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 13 (3). 572
- Cammack, R., Cooper, C.E.,** (1993). Electron Paramagnetic Spectroscopy of Iron Complexes and Iron-Containing Proteins. *Methods in Enzymol.* 227. 12. 353
- Cavalcante, V.A., Döbereiner, J.** (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 108. 23.
- Cinnawirotpisan, P., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O., Limtong, S., Theeragool, G.** (2003a). Purification and characterization of two NAD-dependent alcohol dehydrogenases (ADHs) induced in the quinoprotein ADH-deficient mutant of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(5). 958
- Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K.** (2003b). Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *J. Biosci. Bioeng.* 96. 564.
- Cojho, E.H., Reis, V.M., Schenberg, A.C.G., Döbereiner, J.** (1994) Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylyotic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbial. Let.*, 106. 341.
- Costa, C., Moura, J.G., Moura, I., Liu, M.Y., Peck, H.D., LeGall, J., Wang, Y., Huynh, B.H.** (1990). Hexaheme nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans*. Mössbauer and EPR characterization of the heme groups. *J. Biol. Chem.* 265 (24). 14382.
- Crichton, R.R.,** *Biological Inorganic Chemistry. A new introduction to molecular structure and function.* ELSEVIER. 2a ed.

- Cruz-Valverde, D., Garritz-Ruiz, A.** (1991). ¿Qué es el acoplamiento Russell-Saunders?. En: Cruz-Valverde, D., *Química Inorgánica. Cuadernos de la DGAPA No. 1*. UNAM. México.
- Dalton, H., Postgate, J.R.** (1969) *Growth and physiology of Azotobacter chroococccumm in continuous culture*. J. Gen. Microbiol. 54. 463.
- Drago. R.S.** (1992). Physical methods for chemists. Saunders College Publishing. 2a ed. México.
- Dutta, D., Gachhui, R.** (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrofigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56. 1899.
- Eaton, G. R., Eaton, S.S., Barr, D.P., Weber, R.T.** (2010). Quantitative EPR. Springer-Verlag. Wien.
- Einsle, O., Foerster, S., Mann, K., Fritz, G., Messerschmidt, A., Kroneck, P.M.H.** (2001) Spectroscopic investigation and determination of reactivity and structure of the tetraheme cytochrome c_3 from *Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6. *Eur. J. Biochem.* 268. 3028.
- Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzua, L., Aguilar, R.C., Baca, B.E., Escamilla, J.E.** (1999) The Respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bact.* 181. 6987.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., De Ley, J.** (1989). *Acetobacter diazotrophicum* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39(3). 361.
- Gómez-Manzo, S.** (2007). El papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. UNAM, México. Tesis de doctorado.
- Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez, A., Sosa-Torres, M.E., Arreguin-Espinoza, R., Escamilla-Marvan, J.E.** (2008). The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int. J. of Food Microbiol.* 125. 71.

Gómez-Manzo, S., Solano-Peralta, A., Saucedo-Vazquez, J.P., Escamilla-Marva, J.E., Kroneck, P.M., Sosa-Torres, M.E. (2010) The membrane-bound quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*, 49, 2409.

Gómez-Manzo, S., González-Valdéz, A.A., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas, H., Arreguín-Espinoza, R., Kroneck, P.M.H., Sosa-Torres, M.E., Escamilla, J.E. (2012). The active (ADHa) and inactive (ADHi) forms of the PQQ-alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* differ in their respective oligomeric structures and redox state of their corresponding prosthetic groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 328. 106.

Gómez-Manzo, S., Escamilla, J.E., González-Valdéz, A., López-Velázquez, G., Vanoye-Carlo, A., Marcial-Quino, J., de la Mora-de la Mora, I., García-Torres, I., Enríquez-Flores, S., Contreras-Zentella, M.L., Arreguín-Espinoza, R., Kroneck, P.M.H., Sosa-Torres, M.E. (2015) The Oxidative Fermentation of Ethanol in *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a Two-Step Pathway Catalyzed by a Single Enzyme: Alcohol-Aldehyde Dehydrogenase (ADHa). *Int. J. Mol. Sci.* 16. 1293.

Görisch, H., Rupp, M. (1989). Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56(1). 35.

Groen, B.W., van Kleef, M.A., Duine, J.A. (1986). Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.*, 234. 611.

Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(S1). S162.

Gvozdev, A.R., Tukhvatullin, I.A., Gvozdev, R.I. (2012). Quinone-dependent alcohol dehydrogenases and FAD-dependent alcohol dehydrogenases. *Biochemistry (Moscow)*, 77(8). 843.

Hagen, W.R., Silva, P.J., Amorim, M.A., Hagedoorn P.L., Wassink, H., Haaker, H., Robb, F.T. (2000). Novel structure and redox chemistry of the prosthetic groups of the iron-sulfur

flavoprotein sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*; evidence for a [2Fe-2S] cluster with Asp(Cys)₃ ligands. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5. 527.

Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1320. 107.

Hunt, S., Layzell, D.B. (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 44. 483.

Jimenez-Salgado, T., Fuentes, Ramirez, L.E., Tapia-Henandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (1997) *Coffea arabica L.*, a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing bacteria. *J., Appl. and enviromental microbiology*, 63, 3676.

Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research.* 37. D387.

Komagata, K., Iino, T., Yamada, Y. (2014) 1. The family *Acetobacteraceae*. En: Rosenberg. E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., *The Prokaryotes. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria.* Springer-Verlag. 4a edición. Berlin Heidelberg.

Kondo, K., Horinouchi, S. (1997). Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3). 1131.

Koolman, J., Rohem, K.H. (2005). Color atlas of biochemistry. Thieme. 2^a ed. Stuttgart

Kroneck, P.M.H. (2004). Electron Paramagnetic Resonance (EPR): A Major Technique in Biology and Bio-Inorganic Chemistry. Practical Approach. Curso impartido en la Facultad de Química, UNAM.

Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, Yu, Y., Tian, S., Petrik I., Bhagi, A., Lu. Y. (2014). Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron-Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* 114. 4366.

- Loganathan, P., Nair, S.** (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54. 1185.
- Maier, R.J.** (2004). Nitrogen fixation and respiration: Two processes linked by the energetic demands of nitrogen. En: Zannoni, D., *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of prokaryotic respiratory systems.* 2004. Springer. Dordrecht.
- Mamlouk, D., Gullo, M.** (2013). Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J. Microbiol.* 53(4). 377.
- Massena, V., dos Santos, K.R.** (2015) Nitrogen fixing bacteria in the family *Acetobacteraceae* and their role in agriculture. *J. Basic. Microbiol.* 55. 931.
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O.** (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. in Microbial Physiol.* 36. 247.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M.** (1987). Purification, characterization and reconstitution of cytochrome o-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biochim. Biophys. Acta* 894. 304.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., Meyama, M.** (1990). Cytochrome a_1 of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87. 9863.
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O.** (2004). Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respiration. En: Zannoni, D., *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of prokaryotic respiratory systems.* Springer. Dordrecht.
- Matsushita, K., Kobayashi, Y., Mizuguchi, M., Toyama, H., Adachi, O., Sakamoto, K., Miyoshi, H.** (2008). A tightly bound quinone functions in the ubiquinone reaction sites of quinoprotein alcohol dehydrogenase of an acetic acid bacterium, *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(10). 2723.

- Miura, H., Mogi, T., Ano, Y., Migita, C.T., Matsutani, M., Yakushi, T., Kita, k., Matsushita, K.** (2013). Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter oxydans* is a unique terminal oxidase subfamily of cytochrome *bd*. *J. Biochem.* 153(6). 535.
- Moshiri, F., Kim, J.K., Fu, C., Maier, R.J.** (1994) The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo *Mol. Microbiol.* 14. 101.
- Moura, I., Teixeira, M., Huyhnh, B.H., LeGall, J., Moura, J.G.** (1988) Assignment of individual heme EPR signals of *Desulfovibrio baculatus* (strain 9974) tetraheme cytochrome *c₃*. A redox study. *Eur. J. Biochem.* 176. 365.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C.** (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, 83 137.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Gum, K.U., Park, K.D., Son, C.Y., Sa, T., Caballero-Mellado, J.** (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 277.
- Nelson, D., Cox, M.M.** (2013) Lehninger principles of Biochemistry. Freeman 6^a ed. Nueva York.
- Palmer, G.** (2000). Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins. En: Que, L., *Physical Methods in Bioinorganic chemistry. Spectroscopy and Magnetism*. University Science Books. Sausalito, California.
- Pierce, B.S., Elgren, T.E., Hendrich, M.P.** (2003). Mechanistic Implications for the Formation of the Diiron Cluster in Ribonucleotide Reductase Provided by Quantitative EPR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 125. 8748.
- Ramírez-Fuentes, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapía-Hernández, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E.T., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J.** (2001). Novel nitrogen-fixing acetic

acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51. 1305.

Reis, V.M., Döbereiner, J. (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171. 13.

Rodríguez-Cortés, L. (En preparación). Determinación del acoplamiento magnético entre los cofactores PQQ y [2Fe-2S] en la alcohol dehidrogenasa (ADH) de la bacteria fijadora de nitrógeno *Gluconacetobacter diazotrophicus*, por Resonancia Paramagnética Electrónica. Facultad de Química, UNAM, México. Tesis de licenciatura.

Rudolf, M. (2004). Cytochrome c Nitrite Reductase: Further investigations of the Multiheme Enzyme by X-Ray Crystallography, Site-Directed Mutagenesis, and EPR Spectroscopy. Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, Alemania. Tesis de doctorado.

Samaddar N., Paul, A., Chakravorty, S., Chakraborty, W., Mukherjee, J., Chowdhuri, D., Gachhui, R. (2011). Nitrogen fixation in *Asai* sp. (Family *Acetobacteraceae*). *Curr. Microbiol.* 63. 226.

Sánchez-Ostria, M. (En preparación). Estudio de los estados de espín de los hierros de los hemos tipo c en la alcohol dehidrogenasa (ADH) de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, fijadora de nitrógeno. UNAM, México. Tesis de licenciatura.

Shimao, M., Ninomiya, K., Kuno, O., Kato, N., Sakazawa, C. (1986). Existence of a novel enzyme, pirroloquinolina quinone-dependnt polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* 51. 268.

Solano-Peralta, A., (2007). Estudio de resonancia paramagnética electrónica y de susceptibilidad magnética de compuestos de cromo(III) con ligantes tetraazamacrocíclicos. UNAM, México. Tesis de doctorado.

Sosa-Torres, M.E. (2005-2006) Estancia sabática en la Universität Konstanz, Alemania. Konstanz, Alemania.

- Tachibana, S., Kuba, N., Kawai, F., Duine, J.A., Yasuda, M.** (2003). Involvement of a quinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218. 345
- Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M., Adachi, O.** (1995). Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* 177. 2442.
- Toyama, H., Mathews, F.S., Adachi, O., Matsushita, K.** (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function and physiology. *Archives of biochemistry and biophysics.* 428. 10.
- Toyama, H., Chen, Z.W., Fukumoto, M., Adachi, O., Matsushita, K., Mathews, F.S.** (2005). Molecular Cloning and Structural Analysis of Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase ADH-IIIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J. Mol. Biol.* 352. 91.
- Vangnai, A.S., Arp, D.J.** (2001) An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohemoprotein, is involved in the oxidation of butane by *Pseudomonas butanovora*. *Microbiology*, 147. 745.
- Vangnai, A.S., Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A.** (2002). Two distinct alcohol dehydrogenases participate in butane methabolism by *Pseudomonas butanovora*. *J. Bacteriol.* 184(7). 1916.
- Vu, H.T.L., Yukpha, P., Chaipitakchoniatham, W., Malimas, T., Muramatasu, Y., Bui, U.T.T., Tanasuapwat, S., Duong, K.C., Nakagawa, Y., Pham, Ht, Yamada, Y.** (2013). *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59. 153.
- Werth, M.T., Sices, H., Cecchini, G., Schröder, I., Lasage, S., Gunsalus, R.P., Johnson, M.K.** (1992). Evidence for non-cystenyl coordination of the [2Fe-2S] cluster in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 299. 1.
- Wood, P.M.** (1984). Bacterial Proteins with CO-binding b- or c.type Haem Functions and Absorption Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 768. 293.

Yakushi, T., Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86. 1257.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S. (2003) Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science.* 299. 700.

Zarnt, G., Schrader, T., Andreessen, J.R. (2001). Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *J. Bacteriol.* 183. 1954