



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS ENZIMAS DE MEMBRANA
ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) Y 6-FOSFOGLUCONATO
DESHIDROGENASA (6PGD) DE *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
M. en C. PEDRO DAVID SARMIENTO PAVÍA

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Liliana Quintanar Vera
Departamento de Química. CINVESTAV

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

Ciudad de México. Mayo, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sarmiento Pavía Pedro David
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 19 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis funcional y estructural de las enzimas de membrana alcohol deshidrogenasa (ADH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) de Gluconacetobacter diazotrophicus**", dirigida por el/la Dr(a). **Sosa Torres Martha Elena**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Muñoz Clares Rosario
VOCAL	Uribe Carvajal Salvador
VOCAL	Bustos Jaimes Ismael
VOCAL	Barba Behrens Noráh Yolanda
SECRETARIO	González Halphen Diego

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2020



Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Coordinadora

A mis padres,
a mis abuelos Sergio y Tere
y a mi hermano, José Miguel.
Que aquí me acompañan siempre

A mis hermanos Sergio Raúl y Teresita,
a mi abuela Martha,
a mi tía Irma
y a mi tío Pedro.
Que desde el cielo interceden por mí.

A la Dra. Martha Sosa
que me acogió en su laboratorio
durante una década.

Agradecimientos

Freude, schöner Götterfunken...

Froh, wie seine Sonnen fliegen
Durch des Himmels prächt'gen Plan,
Laufet, Brüder, eure Bahn,
Freudig, wie ein Held zum Siegen.

Seid umschlungen, Millionen!
Diesen Kuss der ganzen Welt!
Brüder, über'm Sternenzelt
Muss ein Lieber Vater wohnen.

Ihr stürzt nieder, Millionen?
Ahnest du den Schöpfer, Welt?
Such' ihn über'm Sternenzelt!
Über Sternen muss er wohnen

Alegría, hermosa chispa de los dioses...

Con gozo, como los soles recorren
El glorioso espacio celestial
Recorred, hermanos, su camino,
Alegres, como un héroe hacia la victoria.

¡Sean abrazados, millones!
¡Este beso para el mundo entero!
Hermanos, sobre la bóveda estrellada
Debe vivir un padre amoroso.

¿Os arrodilláis, millones?
¿Presientes, mundo, a tu creador?
¡Buscadlo sobre la bóveda estrellada!
¡Sobre las estrellas debe habitar!

Friedrich Schiller (Oda a la Alegría)

Tomada por L. v. Beethoven para su novena sinfonía Op. 112

Siendo pequeño en alguna ocasión me surgió una duda que derivó en una de mis primeras hipótesis. Se me ocurrió que uno únicamente crecía el día de su cumpleaños. Para probar dicha hipótesis fui ideando mi experimento hasta que, un día antes de mi cumpleaños tomé un lápiz y una cinta métrica y marqué mi estatura en la pared de la casa esperando ansiosamente que corrieran las horas y preguntándome cuánto habría crecido al día siguiente. Evidentemente mi experimento me demostró que mi hipótesis era incorrecta así que empecé a buscar otra explicación para el crecimiento.

Independientemente de mi avance en mis propias teorías y en mi comprensión del metabolismo en los organismos, lo cierto es que crecí. Y así pasé por la primaria y la secundaria hasta llegar a la preparatoria y finalmente a la universidad. Lo cierto es que crecí no sólo el día de mi cumpleaños sino cada día, paso a paso. Y lo cierto es que fui creciendo no sólo en estatura. En la vida van llegando distintas oportunidades y casi siempre tomar unas es rechazar otras.

Así, estando cerca de la mitad de la carrera recibí una invitación a salir un poco de la rutina universitaria y participar en un concierto que, aunque no lo sabía, cambiaría el curso de mi vida dentro y fuera de la química. El programa, anunciado para el 6 de marzo del 2011, ofrecía un concierto para violonchelo de Haydn y la novena sinfonía de Beethoven con la orquesta “La Pequeña Camerata Nocturna” acompañada del coro de la Sociedad Coral *Cantus Hominum* y del Coro del Centro Universitario México. Así que, acompañado de mis mejores amigos, nos enfrascamos en la maravillosa aventura de afinar nuestras voces y *hermanarnos* con un coro y una orquesta desconocidos para preparar tan ansiado concierto.

Siempre he sido bueno para reconocer las caras y fue así como un día en la cafetería de la Facultad de Química me pareció reconocer en el rostro de una maestra, el mismo rostro que había visto el día anterior en alguno de los ensayos para el concierto. Al saludarla y presentarme recibí la invitación de la Dra. Martha Sosa para visitar su laboratorio y conocer sus proyectos. Era el inicio de un largo proceso de diez años en que, con ayuda de la Dra. Sosa, me he ido formando como *científico*. Estando yo en ese momento trabajando en un laboratorio de química orgánica no me veía con futuro en uno de química inorgánica. Sin embargo fui a ver los proyectos y recibí dos artículos, uno de algún tema de magnetismo que no entendí nada y otro artículo que tampoco entendí pero en el título decía algo sobre hierro que me llamó la atención lo suficiente para dedicarme a ese tema los siguientes cuatro años. Por supuesto primero tuve que aprender a pronunciar “deshidrogenación oxidativa”¹ sin trabarme.

Aunque estudiar la deshidrogenación oxidativa me gustó mucho, había algo que no me llenaba y de hecho empecé a ver otro proyecto crecer en el laboratorio así que, platicándolo con la Dra. Sosa, me cambié de área. Esta vez tuve que aprender a pronunciar primero “*Gluconacetobacter diazotrophicus*”, algo un poco más complicado.

¹ En el grupo de trabajo hemos cambiado el título a deshidrogenación oxidante pero nunca me he logrado acostumbrar a este nuevo nombre.

Durante la maestría, y con este nuevo proyecto, fue que descubrí el maravilloso mundo de la química bioinorgánica y tuve que enfrentarme al magnetismo, aquel tema que me había espantado unos años antes. También fue el tiempo de los primeros congresos, de salir y presentar mi trabajo fuera de la facultad por primera vez y de ir conociendo el “mundo académico”.

Así llegué al inicio del doctorado, continuaba creciendo y aprendiendo. Pero con el crecimiento avanza invariablemente la edad, en especial de quienes nos rodean y con la edad el cuerpo se debilita invariablemente. Recién iniciado el doctorado, el mismo día que recibía una carta de aceptación para ir a Bélgica a estudiar un curso de química bioinorgánica, también recibía la noticia de que mi abuela iba camino al hospital por un infarto cerebral. En cierto sentido, ella me acompañó durante todo el doctorado con su enfermedad y sus sufrimientos al preguntarme todos los días, cómo estaba, qué estaba descubriendo y qué tal iba mi proyecto. Y el ver el cuerpo decayendo, aunque nos muestra nuestra propia fragilidad, lejos de desanimarme me ayudó también a seguir creciendo *hacia adentro*.

Describiría el doctorado como un tiempo de contrastes, de grandes alegrías y tristezas, de muchos logros y de algunas caídas. En cierto sentido es un reflejo de lo que es la vida. Durante este tiempo he visto mi vida académica *despegar* y *crecer*. Publiqué algunos artículos y hasta me invitaron a participar en un capítulo en un libro. En el curso en Bélgica y en los congresos a los que he asistido he podido conocer a grandes científicos de mi área. Por primera vez empecé a dar clases y ha sido de las actividades que más he disfrutado en la vida y ver ahora el resultado de mi trabajo plasmado en una tesis es algo que me llena de satisfacción. Pero por otro lado, durante este tiempo también he visto la muerte de cerca, especialmente de mi abuela Martha, de mi tío Pedro y de mi tía Irma. Tres personas sin las que no podría entender mi vida al día de hoy. Tres personas que me ayudaron a forjarme, a veces desde mi infancia, pero sobre todo en los últimos años. Vaya dedicado a ellos especialmente este trabajo.

Agradecimientos

Y así como este tiempo conté con ellos, he contado con muchas otras personas que me han mostrado su cariño, me han dado su consejo, me han escuchado, han sufrido conmigo o simplemente me han acompañado en este crecimiento. Aunque sería imposible agradecerles a todos personalmente en un espacio tan pequeño, no puedo dejar de agradecer a algunas personas en particular.

Agradezco a Dios en primer lugar. Como aficionado a la astronomía sé que Schiller no se equivocaba al decir que *sobre la bóveda estrellada debe vivir un padre amoroso* y a invitarnos *a buscarlo ahí*. Ya lo había dicho el rey David también al preguntar *Cuando miro el cielo y las estrellas...¿qué es el hombre para que te acuerdes de él?* Le doy gracias porque lo he encontrado, y se ha dejado encontrar, no en lo alto del cielo, sino aquí mismo en la Tierra. Al final la ciencia no es más que el hombre intentando responder esa pregunta *¿Qué es el hombre?* Mirando atrás, veo que al hacer ciencia, la química me ha llevado invariablemente a Él.

Reflejo de ese amor de Padre siempre ha sido mi familia, mis papás y mis hermanos, José Miguel, Sergio Raúl y Teresita ¿A quién más habría corrido para compartir mis alegrías y tristezas, mis logros y mis dudas si no era a ellos? Y con ellos a mis abuelos: A *Tita*, que con su sonrisa silenciosa me ha enseñado que la plenitud de la vida está en la sencillez y en el amor. A *Ma* y a abuelo, que me han enseñado a enfrentar el sufrimiento en la vida y que, como mis abuelos y padrinos, se han preocupado siempre por mi crecimiento físico y espiritual.

En el ámbito universitario mi primer y mayor agradecimiento es y será siempre a la Dra. Martha Sosa, que me abrió las puertas de su laboratorio durante 10 años en los cuales, además de haber aprendido algo de ciencia, aprendí de la vida. Porque las alegrías que se pueden compartir en tanto tiempo no son pocas. Porque en su laboratorio me enamoré y sufrí el desamor. Porque aprendí a alegrarme con los demás. Porque me ha mostrado su cariño y confianza todo este tiempo y sobre todo porque me ha dado grandes consejos para esta nueva etapa de mi vida que estoy por empezar. El decir adiós a su laboratorio me llena

de sentimientos encontrados pero sé que me llevo en mi corazón un poco de ese laboratorio y me alegraré si les he dejado también un poco del mío.

También en ese laboratorio he conocido a algunos de los mejores amigos que he encontrado en la vida. He compartido especialmente con Daniel, Malinali, Juan Pablo, Steven, Alfonso, Lizbeth, Brenda, César, Daniela y Roberto. Cada quien con su propia personalidad, hemos aprendido los unos de los otros. Así como Roberto me vio llegar al laboratorio, yo he visto llegar a todos los demás y hemos visto también irse a algunos. Ahora que me toca “despedirme” no sé bien cómo se hace. Sólo les digo, ¡Gracias! Las horas que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio las llevo también en mi corazón con gran cariño.

Parte del laboratorio han sido “los doctores”. Aquéllos que también nos han guiado y acompañado de la mano de la Dra. Sosa. Especialmente el Dr. Peter Kroneck quien siempre con una sonrisa y de manera clara nos da consejos, nos inspira y nos motiva a seguir avanzando en los proyectos. También el Dr. Alejandro Solano sin cuya ayuda gran parte del trabajo no habría sido posible y quien en los seminarios nos ayuda siempre a mejorar la presentación de los proyectos y a seguir imaginando y pensando en *lo que sigue*. Finalmente al Dr. Juan Pablo Saucedo quien me vio llegar al laboratorio de la Dra. Sosa y siempre me ha mostrado cariño y solidaridad.

También agradezco a los doctores y compañeros del *pasillo de Inorgánica*, especialmente a la Dra. Norah Barba y la Dra. Silvia Castillo. Gracias a todos ellos, y a la convivencia en estos años, he crecido académicamente y con muchos de ellos también he podido compartir grandes momentos *de la ciencia y de la vida*.

Quisiera también agradecerles a la Dra. Liliana Quintanar Vera y al Dr. José de Jesús García Trejo por su trabajo, su disposición y todos sus consejos durante las sesiones del Comité Tutor. Definitivamente no habría podido avanzar tanto sin esas largas horas de discusión. También agradezco al jurado revisor, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dra. Norah Barba, Dr. Salvador Uribe, Dr. Ismael Bustos y Dr. Diego González por todos sus valiosísimos comentarios que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

Agradecimientos

Fuera del mundo académico, también fue para mí muy importante ir buscando y aprendiendo este tiempo a discernir mi propia vocación, en este sentido no puedo dejar de agradecer especialmente a mi tío Pedro, al Pbro. Eduardo Llano, al Pbro. José Vázquez, al Pbro. Jorge Valdez, al Pbro. Rubén Alanís, al Pbro. Álvaro Lozano, al Pbro. Genaro Chávez, al Pbro. Augustine Obiwumma y al Pbro. James Comey. A todos ellos les agradezco su ejemplo, su escucha, sus palabras y sus oraciones. Ha sido un tiempo de mucha paciencia, mucho trabajo y muchas dudas, pero definitivamente ha sido un tiempo maravilloso de crecimiento, escucha y aprendizaje.

Quiero agradecer en la parte técnica a la Dra. Adela Rodríguez y a la Dra. Annia Rodríguez por su apoyo con las pruebas de cristalización y difracción de los cristales de Rayos X en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM). A la Dra. Rosario Muñoz Clares, al M. Carlos Mújica y a la M. Laurel Fábila por su gran amabilidad y valioso apoyo para emplear los equipos de lisis celular y centrifugación. Al Dr. Leobardo Serrano y al T.L.I. Mario Caro por su apoyo para emplear la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, UNAM.

A la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C., a la Unión Internacional de Sociedades de Bioquímica y a la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica por la beca otorgada para asistir al *FEBS Combined Practical and Lecture Course Chemistry of Metals in Biological Systems* en la ciudad de Louvain-La-Nouve. Especialmente al Dr. Robert Crichton, al Dr. Roberto Louro y al Dr. Wesley Browne por la organización y la invitación a dicho curso.

Agradezco también a la coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, especialmente a Julio I. Palacios y Adelina González por su disposición y entrega para poder llevar siempre a buen puerto todos los trámites académicos, aun cuando la pandemia por Covid-19 los ha dificultado.

Finalmente agradezco los financiamientos de la Facultad de Química y la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular por el apoyo IN23111 otorgado por la DGAPA. Y al CONACYT por el financiamiento a través del proyecto 128921 así como por la beca otorgada durante los estudios de posgrado (588051).



Resumen

Las bacterias ácido-acéticas se caracterizan por la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares produciendo los ácidos correspondientes y liberándolos al medio. Ese proceso, acoplado a la cadena respiratoria, se lleva a cabo por deshidrogenasas de membrana entre las que destaca la alcohol deshidrogenasa (ADH). Además de este metabolismo externo existe un metabolismo interno para la asimilación de carbono, principalmente por la vía de las pentosas fosfatadas. El presente trabajo es un estudio de la función y estructura de las proteínas alcohol deshidrogenasa (presente en el metabolismo externo de alcoholes) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (presente en el metabolismo interno de azúcares).

Partiendo del estudio previo de la ADH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*GdADH-III*), se reporta la cristalización de la proteína y un estudio de la *GdADH-III* en estado oxidado, lo que permite comprobar la importancia del estado de oxidación de los grupos hemo en la cristalización. Se reporta también la reactividad de la enzima con NO, la caracterización espectroscópica permite identificar la oxidación de tres grupos hemo y la formación de tres aductos Fe(III)-NO y un aducto Fe(II)-NO de bajo espín. Además, se reportan también los resultados preliminares del cultivo de la bacteria y su actividad de alcohol deshidrogenasa en presencia de los iones lantánidos La^{3+} y $\text{Ce}^{3+/4+}$. Por otro lado, se reporta por primera vez el aislamiento y caracterización de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus* (*Gd6PGD*) tanto de la fracción soluble como de la fracción membranal. En términos de su función, *Gd6PGD* utiliza NAD^+ preferentemente sobre NADP^+ . La estructura de *Gd6PGD* determinada a una resolución de 1.9 Å muestra un homodímero de 70 kDa y cada una de las subunidades está formada por tres dominios. Se comparan las secuencias de aminoácidos y la estructura de varias 6PGDs reportadas. La secuencia más corta en *Gd6PGD*, provoca cambios en la estructura y la exposición de regiones con residuos hidrofóbicos en el dominio III lo que podrían permitir su asociación a la membrana. Se describe también una nueva subfamilia de 6PGDs de “cadena corta” (333 residuos de aminoácidos) dependientes de NAD^+ , en contraste con la subfamilia de “cadena larga” (480 residuos) dependiente de NADP^+ .

Summary

Acetic-acid bacteria are characterized by the incomplete oxidation of alcohols and sugars producing and releasing the corresponding acids to the medium. This process, coupled to the respiratory chain, is driven by membrane-dehydrogenases such as the alcohol dehydrogenase (ADH). Besides this external metabolism there is an internal metabolism for carbon assimilation, primarily by the pentose phosphate pathway. The present work studies the function and structure of the proteins alcohol dehydrogenase (present in the external alcohol metabolism) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (present in the internal sugar metabolism).

Going on from the previous study of the ADH from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GdADH-III), the crystallization of the protein is reported and a study of the protein in oxidized state are reported, which allow to prove the importance of the oxidation state of the heme groups in the protein for crystallization. The reactivity of the protein with NO is also reported and the spectroscopical characterization allows to identify the oxidation of three heme groups and the formation of three Fe(III)-NO adducts and one low-spin Fe(II)-NO adduct. Besides, the preliminary results of the bacterium growth and alcohol dehydrogenase activity in presence of the lanthanide ions La^{3+} and $\text{Ce}^{3+/4+}$. On the other hand, it is reported for the first time the isolation and characterization of the 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Ga. diazotrophicus* (Gd6PGD) both from the soluble and membrane fractions. In terms of its function Gd6PGD uses preferentially NAD^+ over NADP^+ . The structure of Gd6PGD determined at 1.9 Å, shows a homodimer of 70 kDa, each of the subunits consisting of three domains. Amino acid sequences and the structure of several reported 6PGDs are compared. The shorter sequence in Gd6PGD induces changes in the structure leading to the exposure of a region with hydrophobic residues in domain III that might allow its association to the membrane. Finally, a new subfamily of “short-chain” 6PGDs (333 amino acids residues) NAD^+ -dependent proteins is described in contrast with the “long-chain” (480 amino acids residues) NADP^+ -dependent proteins.

Abreviaturas empleadas

6PG	6-fosfogluconato
6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa
<i>Aa</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Acetobacter aceti</i> (<i>Aa</i>)
<i>Ap</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Acetobacter pasteurianus</i> (<i>Ap</i>)
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-III	Alcohol deshidrogenasa de tipo III dependiente de PQQ
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosíntrifosfato
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
FAD	Flavina adenina dinucleótido
<i>Gd</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
<i>Gd</i> ADH-III	Alcohol deshidrogenasa de tipo III de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
<i>Ga diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
<i>Gs</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (<i>Gs</i>)
<i>Hs</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Homo sapiens</i> (<i>Hs</i>)
<i>Kp</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>Kp</i>)
<i>Kx</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> (<i>Kx</i>)
<i>Ll</i> 6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Lactococcus lactis</i> (<i>Ll</i>)
MDH	Metanol deshidrogenasa
<i>Mb</i> ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Methylomicrobium buryatense</i>
ME	Método de mínima evolución
<i>Me</i> ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Methylobacterium extorquens</i>
<i>Mf</i> ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Methylophilum fumariolicum</i>
ML	Método de máxima verosimilitud
MP	Método de máxima parsimonia
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD-X	Enzima dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NDH	NADH deshidrogenasa
NJ	Método de vecino más cercano
Oa6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Ovis aries</i> (Oa)
PEG	Polietilenglicol
PDB	Banco de datos de proteínas, <i>Protein Data Bank</i> www.rcsb.org
PPP	Vía de las pentosas fosfatadas
PQQ	Pirroloquinolina quinona
Sc6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc)
Tb6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Trypanosomas brucei</i> (Tb)
Tg6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Trypanosomas grayi</i> (Tg)
UPGMA	Método de agrupación de pares no ponderado con media aritmética
UOX	Ubiquinol oxidasa
UQ	Ubiquinona oxidada
UQH ₂	Ubiquinona reducida
UV-VIS	Ultravioleta visible

Nomenclatura de los aminoácidos proteínogénicos

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	Asn	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

1. Antecedentes

1.1 Bacterias ácido-acéticas

Las bacterias ácido-acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, del orden *Rhodospirillales*, y son parte de las alfaproteobacterias [1]. Se caracterizan por la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares para producir los ácidos correspondientes como productos finales de su metabolismo, liberándolos al medio. A dicho proceso se le conoce como fermentación oxidante. 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 [2].

Debido a la fermentación oxidante, estas bacterias son de gran importancia en la industria de los alimentos, en la producción de bebidas fermentadas, en la producción de vinagre, de vitamina C, en la producción de celulosa, etc. [3-6]. Por ello, el estudio del metabolismo en las bacterias ácido-acéticas es de gran relevancia; en especial en lo concerniente a la relación entre el metabolismo de azúcares y de alcoholes.

La filogenia y taxonomía de las bacterias ácido-acéticas se ha discutido por mucho tiempo y actualmente se reconocen 17 géneros, aunque los más estudiados han sido los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* [7].

1.1.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La bacteria *Saccharobacter nitrocaptans* fue descubierta en Brasil 1988 en las raíces y tallos de la caña de azúcar [8]. En 1989 fue renombrada como *Acetobacter diazotrophicus* [9] y con nueva evidencia filogenética, su nombre fue corregido a *Ga. diazotrophicus*. Es un bacilo Gram negativo que se mueve con flagelos peritricos. Mide entre 0.5-0.8 y 2.0 μm (Figura 1.1). La bacteria es endófita de la caña de azúcar, sin embargo se ha encontrado también en cultivos de café [10], mango, plátano [11] y arroz [12] entre otros.

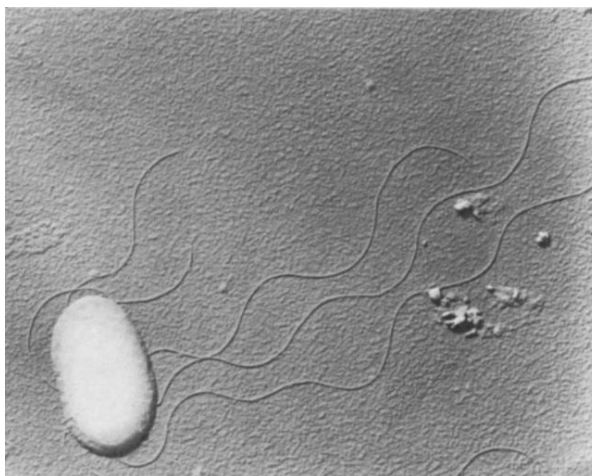
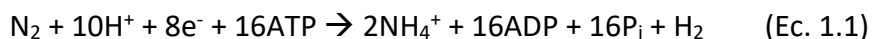


Figura 1.1 Fotografía de microscopía electrónica de *Ga. diazotrophicus* mostrando los flagelos peritricos. Las dimensiones de la célula son de 0.7 x 0.9 x 2 μm [9].

Ga. diazotrophicus fue la primera especie de la familia *Acetobacteraceae* en la que se describió la fijación biológica de nitrógeno (FBN) [8] 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* [13], *Swaminathania salitolerans* [14], *Acetobacter peroxydans* [15], *Acetobacter nitrogenifigens* [16], *Asaia bogorensis* y *Asaia siamensis* [17].

La reacción de reducción de N_2 (Ec. 1.1) requiere de una gran cantidad de energía para romper el enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ (942 kJ/mol). La FBN se lleva a cabo por enzimas nitrogenasas que obtienen la energía en forma de ATP (proveniente de la cadena respiratoria) [18].



Debido a que las nitrogenasas son extremadamente sensibles al oxígeno [19], los organismos fijadores de nitrógeno han desarrollado sistemas de protección que evitan la pérdida de actividad de nitrogenasa aun en medios con O_2 presente [20]. Uno de ellos consiste en una alta tasa respiratoria por parte de la célula capaz de abatir la presión del oxígeno y mantener un ambiente intracelular microaerófilico (protección respiratoria) [21].

Este mecanismo, además de que mantiene a la enzima activa aun a altas concentraciones de oxígeno, provee ATP suficiente para la fijación de N₂.

Un estudio demostró que al aumentar la aireación, aumentan también tanto el cultivo 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) [20].

1.2 Fermentación oxidante y la cadena respiratoria en bacterias ácido-acéticas

Las bacterias ácido-acéticas se caracterizan por liberar al medio una gran cantidad de productos de la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares, principalmente etanol y glucosa. También pueden oxidar glicerol a dihidroxiacetona, D-sorbitol a L-sorbose, D-manitol a D-fructosa y D-glucosa a los ácidos D-glucónico, 2-ceto-D-glucónico o 5-ceto-D-glucónico [1]. Dichas oxidaciones son conocidas como *fermentaciones oxidantes* y son llevadas a cabo por deshidrogenasas primarias de la cadena respiratoria. Estas deshidrogenasas se encuentran localizadas en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica. Generalmente consisten en complejos de dos o tres subunidades. Una subunidad grande de 58 – 80 kDa (con cofactores que pueden variar entre FAD, PQQ, hemo *c* y molibdopterina), una segunda subunidad de 45 - 50 kDa (con tres grupos hemo *c*) y una tercera subunidad de entre 15 y 20 kDa. Es importante mencionar que en algunas deshidrogenasas no se encuentra la tercera subunidad e incluso hay enzimas que carecen también de la segunda (Tabla 1.1) [22, 23].

Antecedentes

Tabla 1.1 Algunas deshidrogenasas de membrana de las bacterias ácido-acéticas, su composición oligomérica y los cofactores presentes en cada subunidad. Tomada de Adachi y Yakushi, 2016 [23].

Enzima	Sustrato	Producto	Subunidades	Grupos prostéticos en α	Grupos prostéticos en β	Ref.
ADH-III	Etanol	Acetaldehído	$\alpha\beta\gamma$ o $\alpha\beta$	PQQ / hemo <i>c</i>	3 hemo <i>c</i>	[24]
ALDH	Acetaldehído	Ácido acético	$\alpha\beta\gamma$	Molibdopterina	3 hemo <i>c</i> / [2Fe-2S]	[25]
GADH	Gluconato	2-cetogluconato	$\alpha\beta\gamma$	FAD	3 hemo <i>c</i>	[26]
2KGDH	2-cetogluconato	2,5-dicetogluconato	$\alpha\beta\gamma$	FAD	3 hemo <i>c</i>	[27]
FDH	Fructosa	5-cetofructosa	$\alpha\beta\gamma$	FAD	3 hemo <i>c</i>	[28]
SLDH	D-Sorbitol	L-Sorbosa	$\alpha\beta\gamma$	FAD	3 hemo <i>c</i>	[29]
GDH	Glucosa	Gluconato	α	PQQ	-	[30]
QDH	Quinato	3-deshidroquinato	α	PQQ	-	[31]
GLDH	Polioles	Cetonas	$\alpha\beta$	PQQ	-	[32]

ADH, alcohol deshidrogenasa. **ALDH**, aldehído deshidrogenasa. **GADH**, gluconato deshidrogenasa. **2KGDH**, 2-cetogluconato deshidrogenasa. **FDH**, fructosa deshidrogenasa. **SLDH**, sorbitol deshidrogenasa. **GDH**, glucosa deshidrogenasa. **QDH**, quinato deshidrogenasa. **GLDH**, glicerol deshidrogenasa.

Los electrones tomados del sustrato por las deshidrogenasas primarias son posteriormente transferidos, por medio de ubiquinona, a las oxidasas terminales que transfieren los electrones al aceptor final, el oxígeno [33]. La mayoría de las bacterias ácido-acéticas carecen de citocromo *c* oxidasa, pero cuentan con una ubiquinol oxidasa, UOX (citocromo *ba₃* o *bo₃*), capaz de generar una fuerza protón-motriz que es utilizada para la síntesis de ATP. Además de la acumulación de los productos de oxidación en el medio, la fermentación oxidante es crucial para la obtención de energía en la bacteria [22, 23] (Figura 1.2).

Existen también un par de oxidasas terminales que, aunque no generan una fuerza protón-motriz, le permiten a la bacteria mantener un metabolismo aerobio en condiciones adversas: el citocromo *bd* oxidasa con alta afinidad al oxígeno que funciona en condiciones de bajo oxígeno y la oxidasa CIO (del inglés, Cyanide-insensitive quinol oxidase) que tiene una alta k_{cat} y que se activa cuando la ubiquinol oxidasa se ha inactivado por cianuro [22, 34-36] (Figura 1.2).

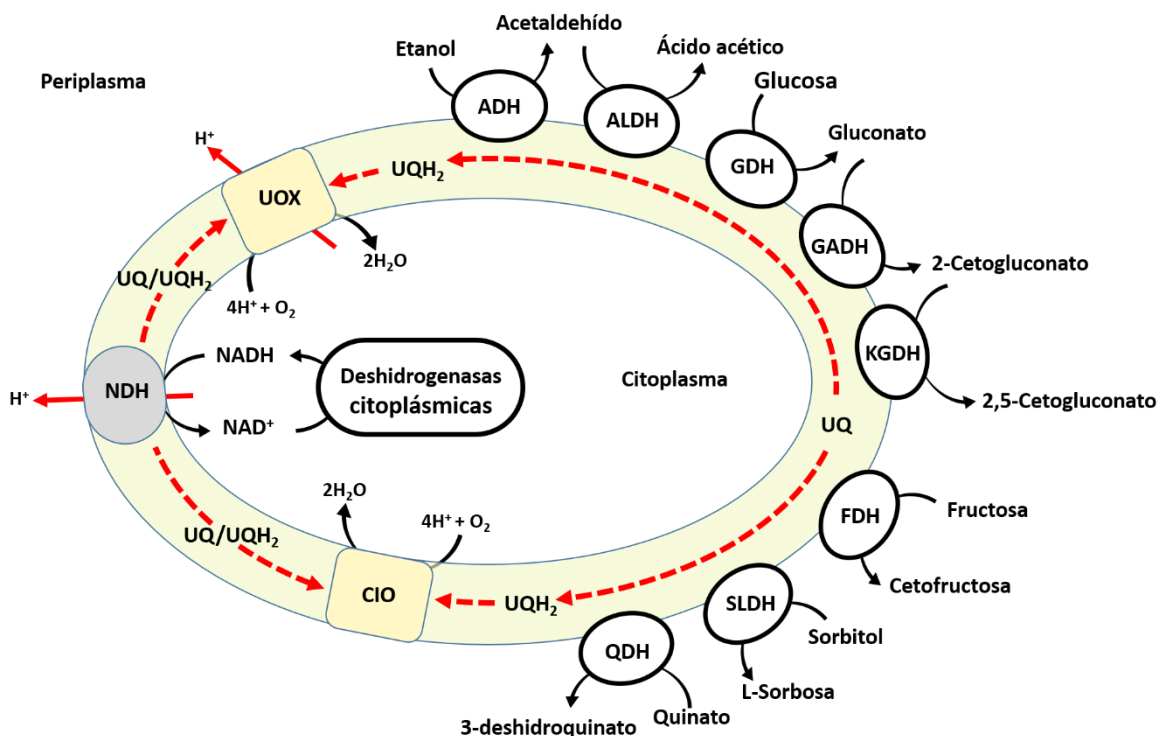


Figura 1.2. Deshidrogenasas primarias acopladas a la cadena respiratoria. La fermentación oxidante se da por medio de deshidrogenasas de membrana (ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; GDH, glucosa deshidrogenasa; GADH, gluconato deshidrogenasa; KGDH, cetogluconato deshidrogenasa; FDH, fructosa deshidrogenasa; SLDH, sorbitol deshidrogenasa; QDH, quinato deshidrogenasa). Los electrones son transferidos a la ubiquinona (UQ) para reducirla a ubiquinol (UQH₂) y posteriormente son transferidos al oxígeno por medio de la ubiquinol oxidasa (UOX) y de la oxidasa terminal resistente a cianuro (CIO). Las deshidrogenasas citoplásmicas reducen NAD⁺ a NADH, el cual es oxidado por la NADH deshidrogenasa (NDH) membranal y los electrones son transferidos a la UQ. Adaptado de [23].

1.2.1 Oxidación citoplásmica y la cadena respiratoria.

Además de las deshidrogenasas de membrana mencionadas anteriormente, existen deshidrogenasas citoplásmicas que oxidan alcoholes y carbohidratos. Estas deshidrogenasas, a diferencia de las de membrana, son dependientes de NAD(P)⁺ y su pH óptimo de trabajo es mayor que el de las proteínas de membrana. También se puede apreciar una considerable diferencia en la actividad específica, siendo mayor en las de membrana (Tabla 1.2) [33]. Estas deshidrogenasas citoplásmicas también se encuentran acopladas a la cadena respiratoria por medio de la NADH deshidrogenasa (NDH) membranal

[33, 35-37] (Figura 1.2). En general se puede hablar de las enzimas de membrana como parte de la cadena respiratoria y las enzimas solubles en el citoplasma como sistemas para emplear los alcoholes y carbohidratos como fuentes de carbono y de energía.

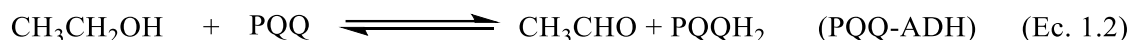
Tabla 1.2. Comparación de deshidrogenasas citoplásmicas y de membrana de bacterias ácido-acéticas [33].

Localización	Cofactor	Dirección	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$)	pH óptimo
Etanol \rightleftharpoons Acetaldehído (<i>Acetobacter</i>)				
Membrana	PQQ	\longrightarrow	1.4	4.0
Citoplasma	NAD ⁺	\longrightarrow	0.005	8.0
	NADH	\longleftarrow	0.35	6.0
Acetaldehído \rightleftharpoons Acetato (<i>Acetobacter</i>)				
Membrana	PQQ	\longrightarrow	3.5	5.0
Citoplasma	NADP ⁺	\longrightarrow	0.54	9.5
D-glucosa \rightleftharpoons D-gluconato (<i>Gluconobacter</i>)				
Membrana	PQQ	\longrightarrow	1.5	6.0
Citoplasma	NADP ⁺	\longrightarrow	0.08	8.5 – 9.0
	NADPH	\longleftarrow	0.003	7.0
D-Gluconato \rightleftharpoons 2-ceto-D-gluconato (<i>Gluconobacter</i>)				
Membrana	FAD	\longrightarrow	2.7	6.0
Citoplasma	NADP ⁺	\longrightarrow	0.08	10.5
	NADPH	\longleftarrow	0.2	6.0
D-fructosa \rightleftharpoons 5-ceto-D-fructosa (<i>Gluconobacter</i>)				
Membrana	PQQ	\longrightarrow	0.8	6.0
Citoplasma	NADP ⁺	\longrightarrow	0.006	8.5 – 10.0
	NADPH	\longleftarrow	0.8	6.5

1.3 Metabolismo de alcoholes

1.3.1 Oxidación periplásmica y citoplásmica de alcoholes

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 a acetaldehído transfiriendo $2e^-$ y $2H^+$ al PQQ (Ec. 1.2), y de la enzima de membrana aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH), que oxida el acetaldehído a ácido acético transfiriendo $2e^-$ y $2H^+$ al PQQ (Ec. 1.3). Por otro lado, dentro del citoplasma se puede llevar a cabo una oxidación completa de etanol por medio de enzimas dependientes de $NAD(P)^+$ y donde el ácido acético producido es utilizado por la acetil CoA sintetasa y el acetil CoA formado ingresa al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Figura 1.3) [36, 38]. Se ha probado en mutantes de especies *Acetobacter* que carecen de la ADH de membrana que la expresión de las enzimas ADH y ALDH dependientes de $NAD(P)^+$ incrementa en presencia de etanol sin observarse producción de ácido acético [39, 40]. Lo anterior demostró que la función de las deshidrogenasas citoplásmicas es la de utilizar el etanol como fuente de carbono y de energía y que no participan en la fermentación oxidante.



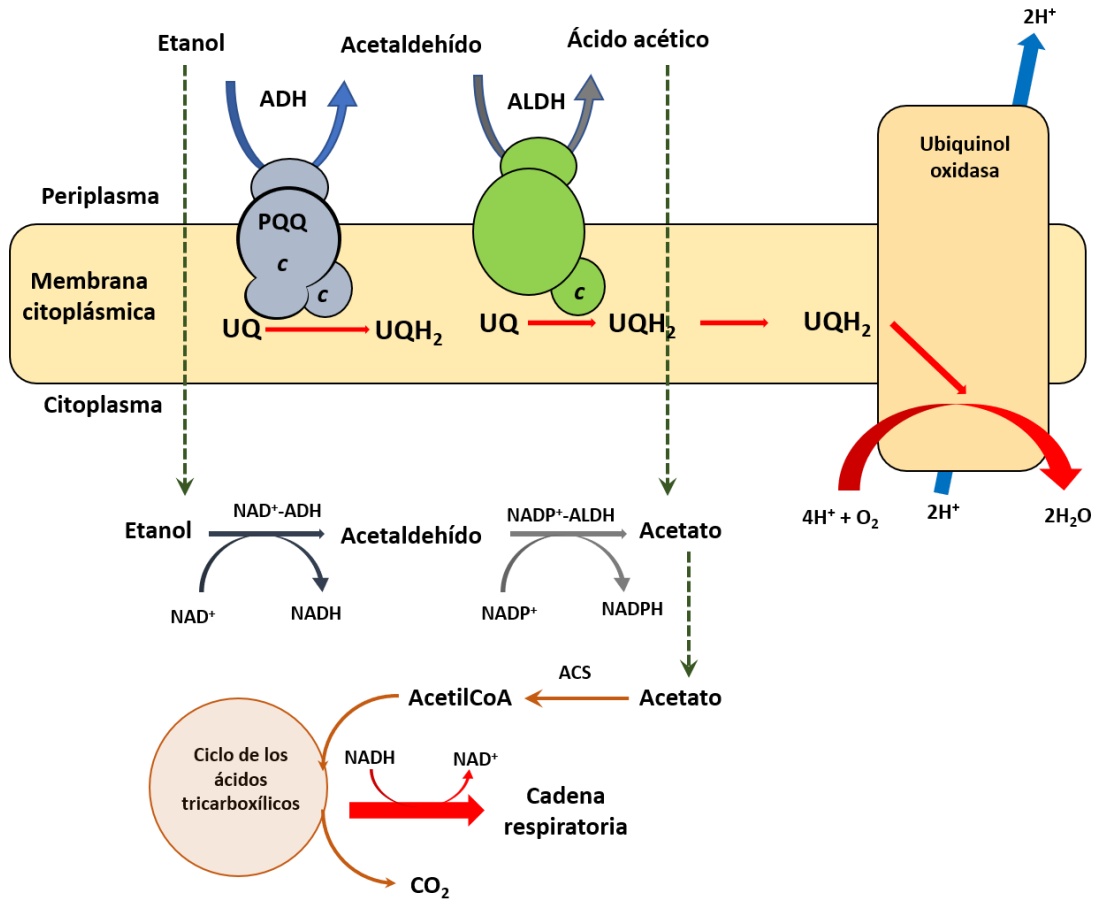


Figura 1.3. Oxidación de alcoholes en las bacterias ácido-acéticas. Las proteínas de membrana alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH) funcionan como las primeras deshidrogenasas en la respiración de etanol. Las proteínas dependientes de NAD(P)⁺, alcohol deshidrogenasa (NAD⁺-ADH) y aldehído deshidrogenasa (NADP⁺-ALDH), se encuentran en el citoplasma y funcionan para la asimilación de etanol y acetaldehído. Adaptado de [36].

1.3.2 Clasificación de las alcohol deshidrogenasas (ADHs)

Las enzimas que oxidan alcoholes, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas desde bacterias hasta mamíferos, se pueden dividir en 4 grupos dependiendo del cofactor que empleen [41]:

- 1) Enzimas que contienen pirroloquinolina quinona (PQQ) o quinoproteínas. Pueden además contener grupos hemo.
- 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 media, dependientes de Zn²⁺; enzimas de cadena larga activadas por Fe y enzimas de cadena corta sin cofactores metálicos.
- 4) Enzimas que contienen grupos hemo y el cofactor F₄₂₀ (similar a la flavina mononucleótido).

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de PQQ (PQQ-ADH) se encuentran principalmente en las α , β y γ -proteobacterias. Se localizan tanto en el espacio periplasmático como unidas a la membrana citoplásmica y forman, junto con la cadena respiratoria, el “sistema alcohol oxidasa periplásmico” [42, 43].

Las PQQ-ADH se pueden clasificar en 3 grupos [42]:

- Las PQQ-ADH de tipo I son enzimas solubles del periplasma y poseen únicamente PQQ como grupo prostético además de un puente disulfuro. Las más estudiadas son la metanol deshidrogenasa (Ca²⁺-MDH) de organismos metilótrofos y la etanol deshidrogenasa (Ca²⁺-QEDH), así como las enzimas análogas dependientes de Ln³⁺.
- Las PQQ-ADH de tipo II son enzimas solubles del periplasma y contienen, además del Ca²⁺-PQQ y el puente disulfuro, un grupo hemo tipo c. Se encuentran principalmente en *Pseudomonas* [44-47], *Ralstonia* [48] y *Comamonas* [49]. A diferencia de las ADHs de tipo I y III, las de tipo II pueden oxidar con relativa facilidad alcoholes primarios de cadena media, alcoholes secundarios e incluso dioles, alcoholes heterocíclicos y glicerol [44, 47, 48, 50, 51].
- Las PQQ-ADH de tipo III son enzimas de membrana y son específicas de bacterias ácido-acéticas. Contienen una subunidad I (de 72-80 kDa) con un PQQ, un puente disulfuro y un grupo hemo c y una subunidad II (de 45 a 55 kDa) con tres grupos hemo c. Adicionalmente pueden tener una subunidad III (de 8 a 16 kDa) cuya función es aún desconocida.

Se han reportado estructuras tridimensionales para las ADH de tipo I de *Methylobacterium extorquens* (PDB 1W6S) [52 PDB 1H4J, 53], *Methylophilus methylotrophus* (PDB 2AD6, 2AD7 y 2AD8) [53], *Methylophilus methylotrophus* W3A1 (PDB

4AAH y 1G72) [54, 55, 56], *Paracoccus denitrificans* (PDB 1LRW) [57], *Hyphomicrobium denitrificans* (PDB 2DOV) [58] y *Methylococcus capsulatus* (PDB 4TQO) [59] y de tipo II de *Comamonas testosteroni* (PDB 1KB0) [60] así como las ADH-IIB (PDB 1KV9) [50] y ADH-IIG (PDB 1YIQ) [45] de *Pseudomonas putida*. Hasta el momento no se ha reportado ninguna estructura de alguna PQQ-ADH de tipo III.

1.3.2.1 PQQ-ADHS de tipo I dependientes de Ln^{3+}

Además de las ADHs de tipo I dependientes de Ca^{2+} existe una alcohol deshidrogenasa dependiente de iones lantánidos. Aunque desde los años 90 se identificó el gen *xoxF*, que codifica para una metanol deshidrogenasa dependiente de PQQ (MDH), no fue sino hasta principios de la última década que se aisló y caracterizó dicha proteína. Se observó que al añadir Nd^{3+} y Sm^{3+} al medio de cultivo de *Methylobacterium radiotolerans* la actividad de MDH se incrementaba ligeramente. Dicho incremento era considerable si se añadían los iones La^{3+} y Ce^{3+} . Además, se caracterizó la proteína Ln^{3+} -XoxF como un homodímero (α_2) a diferencia del heterotetrámero ($\alpha_2\beta_2$) en Ca^{2+} -MDH [61]. Resultados similares se observaron para *Bradryzobium* sp. [62] y *Methylobacterium extorquens* [63].

A la fecha, se conocen cuatro estructuras de MDHs dependientes de lantánidos: Ce^{3+} -XoxF con clave PDB 4MAE [64] y Eu^{3+} -XoxF de *Methylacidiphilum fumarolicum* SolV con clave PDB 6FKW [65], La^{3+} -XoxF de *Methylomicrobium buryatense* con clave PDB 6DAM [66] y La^{3+} -XoxF de *Methylorubrum extorquens* con clave PDB 6OC6 [67]. Todas ellas tienen la misma estructura general que las MDH dependientes de calcio. Consisten en un dominio de “súper barril” donde se encuentra el cofactor Ln^{3+} -PQQ. Los residuos de unión a PQQ y al metal están conservados y el PQQ se encuentra entre un residuo de Trp y un puente disulfuro formado por dos cisteínas adyacentes. Al igual que en las estructuras de calcio, el ion lantánido está coordinado a un Glu, un Asp y una Asn además de al PQQ a través de un oxígeno quinoide, un nitrógeno de un grupo piridil y el oxígeno de un carboxilato. Adicionalmente, en las estructuras de lantánidos hay un Asp que se coordina al metal de manera bidentada. Este residuo ayuda a estabilizar la mayor carga positiva del ion Ln^{3+} así

como el mayor número de coordinación adoptado por los lantánidos. Mientras que el calcio tiene un número de coordinación de entre 6 y 8 en las MDH, los Ln^{3+} presentan un número de coordinación de entre 9 y 10 en las proteínas análogas (Figura 1.4).

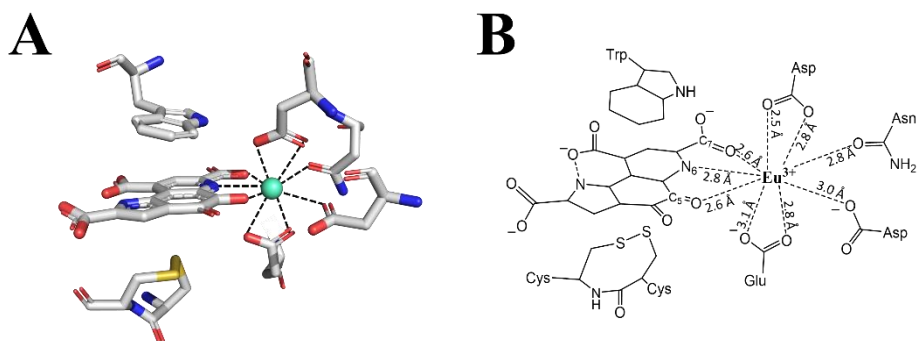


Figura 1.4 Estructura típica del sitio de unión Ln^{3+} -PQQ en Eu^{3+} -XoxF. El PQQ se encuentra entre un Trp y el puente disulfuro. El ion Ln^{3+} además de estar unido al PQQ, se encuentra coordinado a dos Asp, una Asn y un Glu [65]. Se muestran los átomos de carbono en color gris, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul, los de azufre en color amarillo y el ion Eu^{3+} en color cian.

Varios estudios han sugerido la importancia de los iones lantánidos en la proteína, demostrando que el gen *xoxF* se transcribe y se traduce aun en ausencia de dichos iones. Sin embargo, la actividad de XoxF sí depende de la presencia de iones Ln^{3+} [68-70]. En algunos casos como en *Methylococcus fumariolicum*, aislada de pantanos volcánicos, el cultivo de la bacteria es estrictamente dependiente de iones lantánidos (La^{3+} , Ce^{3+} , Nd^{3+} , Pr^{3+}) y la primera estructura cristalina de una Ln^{3+} -MDH, con un ion Ce^{3+} , mostró que dichos iones se encuentran presentes en el sitio activo [64].

A pesar de que las proteínas dependientes de lantánidos se descubrieron recientemente en el 2014, se ha propuesto un papel catalítico y regulatorio para dichos iones [71, 72]. En ausencia de iones lantánidos, la regulación de las proteínas XoxF y MxaF (correspondientes a las Ln^{3+} -MDH y Ca^{2+} -MDH, respectivamente) se da por medio de apo-XoxF, que actúa como sensor de Ln^{3+} e interactúa con las cinasas MxbDM y posiblemente con MxcQE. Finalmente, MxbM activa la expresión de *mxo* y la represión de *xox* (Figura 1.5

A). Por otro lado, en presencia de La^{3+} , el ion metálico puede entrar al periplasma a través de un transportador dependiente de la proteína TonB (probablemente con ayuda de alguna chaperona). La unión de La^{3+} a apo-XoxF produce la forma activa de XoxF, disminuyendo la señal de MxcQE/MxbDM lo que resulta en una regulación positiva de *xox*. Además, se ha observado una vía para detectar La^{3+} y la presencia de un transportador ABC sugiere que el ion metálico entra en el citoplasma probablemente reprimiendo *mx*a y promoviendo la expresión de *xox* (Figura 1.5 B). Resulta interesante que los canales de calcio regulados por voltaje y por ligantes son bloqueados por iones lantánidos [73-76].

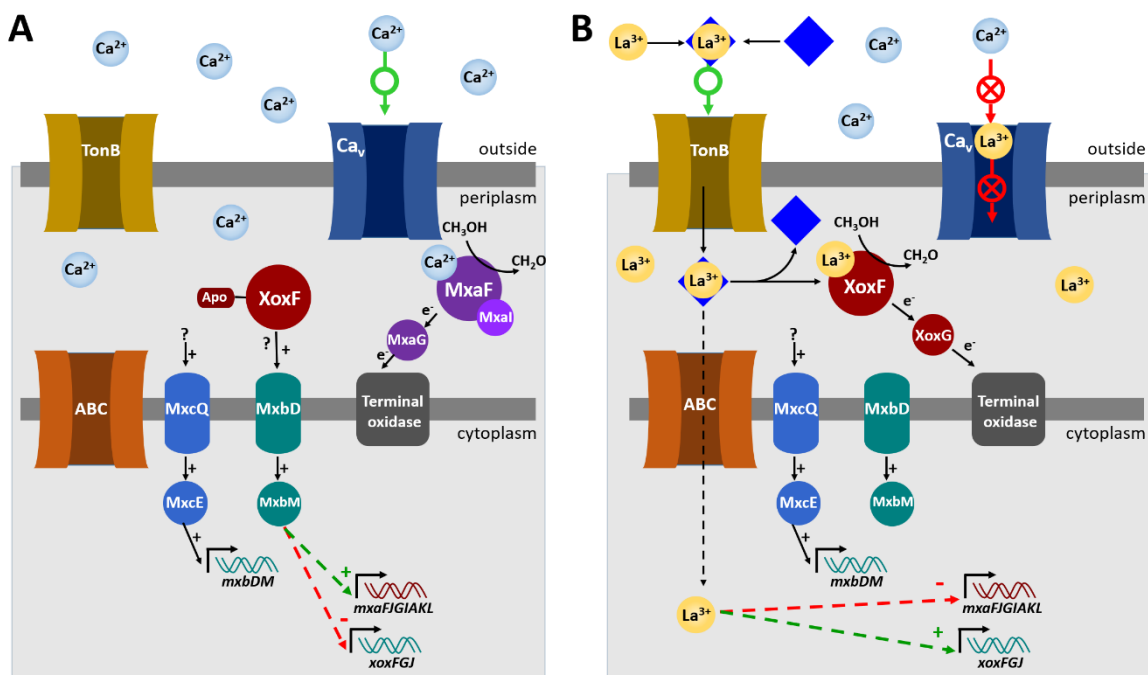


Figura 1.5 Modelo actual para la regulación de las metanol deshidrogenasas dependientes de lantánidos (XoxF) y de calcio (MxaF). A) en ausencia de La^{3+} y B) en presencia de La^{3+} . Se muestra el transportador de Ln^{3+} dependiente de TonB (TonB) así como los canales iónicos para Ln^{3+} (ABC) y para Ca^{2+} (Ca_v). Las cinasas MxbDM y MxcQE, parecen estar involucradas en la regulación de la expresión de los genes *mx*a y *xox*. Tomado de [76]. Adaptado de [71-72].

Hasta el momento, se ha estudiado poco acerca de la homeostasis de Ln^{3+} . Además, sería interesante el estudio de las cascadas de señalización de Ca^{2+} en ambientes naturales ricos en lantánidos así como de las posibles cascadas regulatorias de Ln^{3+} que puedan existir [76].

1.3.3 PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

La proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* de tipo III (*GdADH*-III) fue aislada y estudiada por los grupos de Escamilla y Sosa-Torres [77–81] 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 espectroscopia UV-Vis se identificaron los grupos prostéticos PQQ (con bandas en 317 y 350 nm) y grupos hemo *c* reducidos (con la banda Soret en 418 y las bandas α y β en 523 y 552 nm). La presencia de un Ca^{2+} -PQQ, fue confirmada también por medio de un análisis cuantitativo de HPLC, observando la presencia del grupo PQQ y por espectroscopía de absorción atómica, confirmando un átomo de Ca^{2+} por heterodímero.

La especificidad a sustrato de *GdADH*-III es menos restringida que para otras ADHs de tipo III, pudiendo oxidar acetaldehído además de etanol. Las K_m para etanol y acetaldehído son 4.6×10^{-4} M y 2.9×10^{-3} M respectivamente. De hecho, *GdADH*-III 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 [80].

Adicionalmente se realizaron estudios de EPR para observar el radical de la semiquinona de PQQ a 77 K (Figura 1.6 A) con una señal en $g = 2.0034$. Al bajar la temperatura a 20 K se observó una señal con un patrón de resonancia para un cúmulo de ferredoxina [2Fe-2S] en estado reducido con valores de $g_x = 2.007$, $g_y = 1.941$ y $g_z = 1.920$ (figura 1.6 B). Dichas señales son consistentes con el espectro de UV-Vis al indicar que la proteína se aísla con sus cofactores en estado reducido. La presencia del cúmulo de hierro azufre se confirmó por medio de espectroscopía de absorción atómica y se determinó el hierro total encontrando 6 Fe y un Ca por heterodímero de ADH, lo que es consistente con la presencia de cuatro grupos hemo tipo *c* y un cúmulo [2Fe-2S]. Esto se confirmó también por una determinación cuantitativa de Fe y sulfuros lábil, obteniéndose seis átomos de Fe y dos átomos de azufre lábil por heterodímero de *GdADH*-III [78].

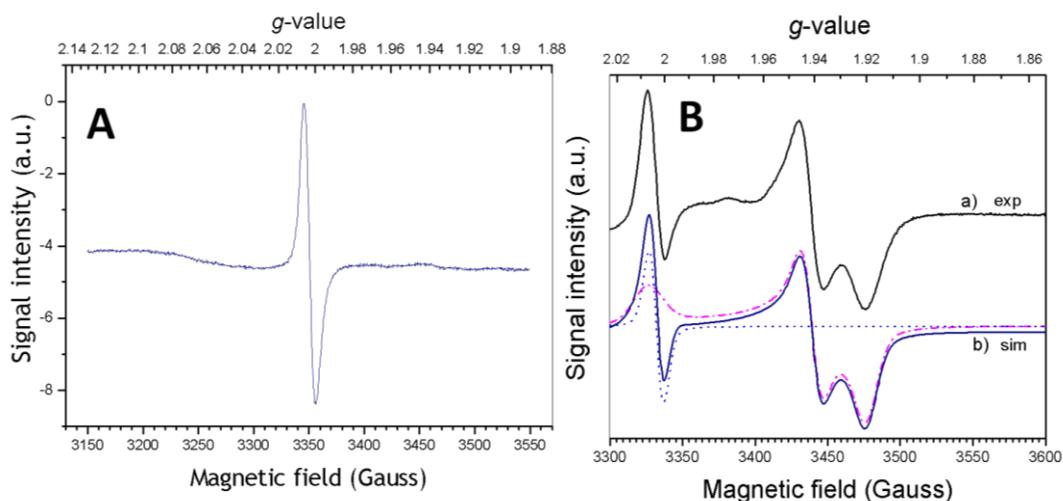


Figura 1.6 Espectros de EPR de la *GdADH-III*. A) Espectro en banda X del radical de semiquinona de PQQ a 77 K. B) Espectro de EPR en banda X del cúmulo [2Fe- 2S] en la *GdADH-III* a 20 K a) espectro experimental y b) línea sólida azul espectro simulado; línea punteada azul: semiquinona de PQQ; línea discontinua rosa: cúmulo [2Fe-2S]. Tomado de Gómez-Manzo et al. 2010 [78].

Se determinaron también los potenciales redox de los grupos hemo tipo *c* por medio de una titulación espectro-electroquímica (UV-Vis - electroquímica) siguiendo el cambio de la banda α en 553 nm. Para la determinación de los potenciales del PQQ y de la ferredoxina, se realizó una titulación potenciométrica seguida por espectroscopía de EPR a baja temperatura. Con los potenciales encontrados, resumidos en la tabla 1.3, se asignaron los grupos PQQ, [2Fe-2S], y un grupo hemo tipo *c* (*cl*) en la SUI y tres grupos hemo tipo *c* (*cl*₁, *cl*₂, *cl*₃) en la SUII. Se propuso, además, una vía hipotética para la transferencia de electrones intra e intermolecular en el heterodímero de *GdADH-III* (Figura 1.7).

Tabla 1.3. Potenciales redox determinados por medio de titulaciones potenciométricas para los grupos prostéticos de *GdADH-III* [78].

Potenciales redox vs ENH a pH 6 (mV)	
PQQ	-210 (±5)
[2Fe-2S]	-250 (±5)
<i>cl</i>	-64 (±5)
<i>cl</i> ₁	-8 (±5)
<i>cl</i> ₂	+185 (±5)
<i>cl</i> ₃	+210 (±5)

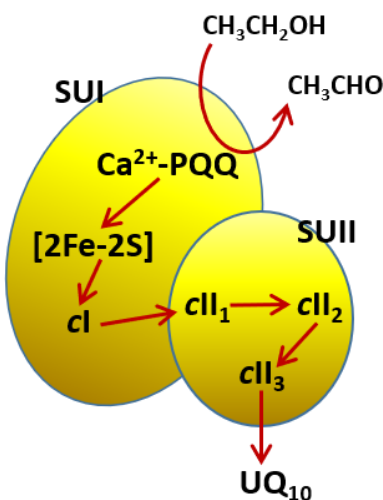


Figura 1.7. Vía propuesta para la transferencia de electrones por la oxidación de etanol a través de los cofactores de *GdADH-III*. El PQQ, el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]$ y el grupo hemo cl se asignan a la primera subunidad (SUI), los grupos hemo cl_1 , cl_2 y cl_3 se asignan a la segunda subunidad (SUII) [78].

Es importante mencionar que *GdADH-III* siempre se aísla en estado reducido, a pesar de los bajos potenciales redox observados para los cofactores. Además, un estudio con una forma inactiva de la *GdADH-III* demostró que existen cambios significativos en dichos potenciales redox. Al comparar la forma activa e inactiva de la proteína, se observó también que la forma activa es un oligómero de tres heterodímeros, a diferencia de la forma inactiva, que es un solo heterodímero [79].

Recientemente, el estudio de *GdADH-III* en nuestro grupo de trabajo [82] ha llevado a proponer un modelo para la estructura de la subunidad I basado en la comparación de la secuencia de aminoácidos con la ADH de tipo II de *P. putida* [45]. De acuerdo con dicha propuesta la subunidad I de *GdADH-III* consistiría en dos dominios. El dominio de “súper barril” consiste en 8 láminas, formadas cada una de 4 hebras beta antiparalelas (motivo W), apiladas radialmente para formar una estructura de tipo propela de 8 hojas (Figura 1.8 A). En este dominio se encontrarían el PQQ y el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]$. El segundo dominio o dominio de citocromo, se encuentra hacia la región C-terminal y es donde se encuentra el motivo CAACH para la unión covalente al grupo hemo tipo c (Figura 1.8 B).

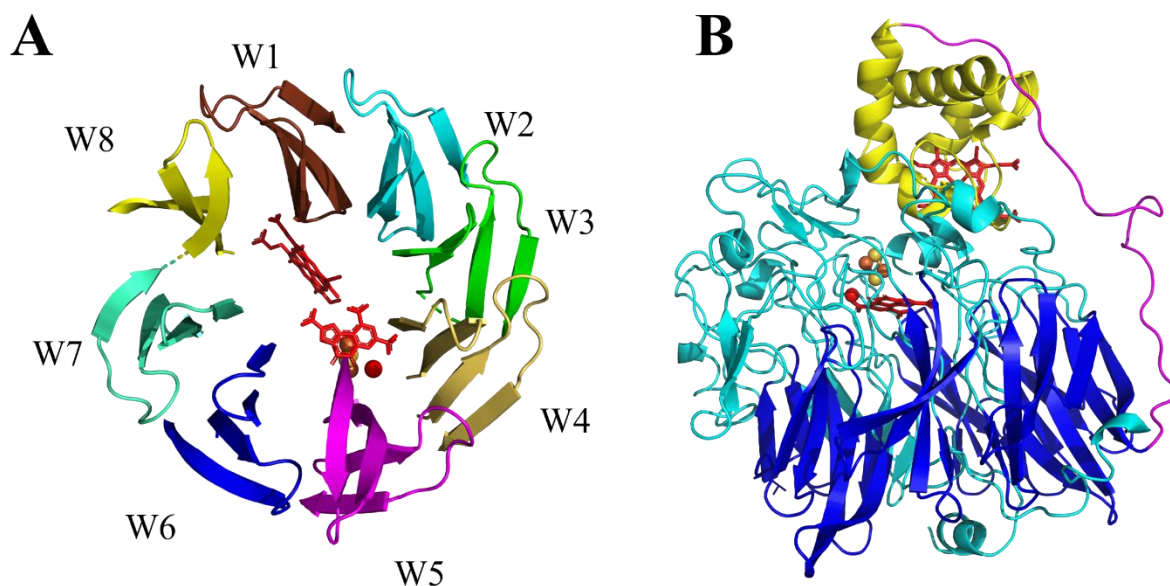


Figura 1.8 Estructura propuesta para la SUI de *GdADH-III*. A) Se muestra la estructura de propela formada por las 8 láminas beta formando los motivos W1-W8. B) Se muestra el dominio de “súper barril” en color azul (con los motivos W1-W8 resaltados) y el dominio de citocromo en color amarillo. Los cofactores Ca^{2+} -PQQ y hemo tipo *c* se muestran en color rojo. Los átomos del cúmulo [2Fe-2S] se muestran como esferas de color naranja (hierro) y amarillo (azufre). Descrito en Sarmiento-Pavía, 2016 [82].

De acuerdo con la estructura propuesta para el Ca^{2+} -PQQ, el átomo metálico está coordinado, además del PQQ, a un residuo de Asn, un Asp y un Glu. Muy cerca en el espacio, se encuentra el cúmulo [2Fe-2S] coordinado a un par de Cys, un Glu (que también está unido al Ca^{2+}) y a un Asp de manera bidentada (Figura 1.9 A). El grupo hemo está unido covalentemente a un par de Cys, y tiene como ligantes axiales a una His y una Met (Fig 1.9 B).

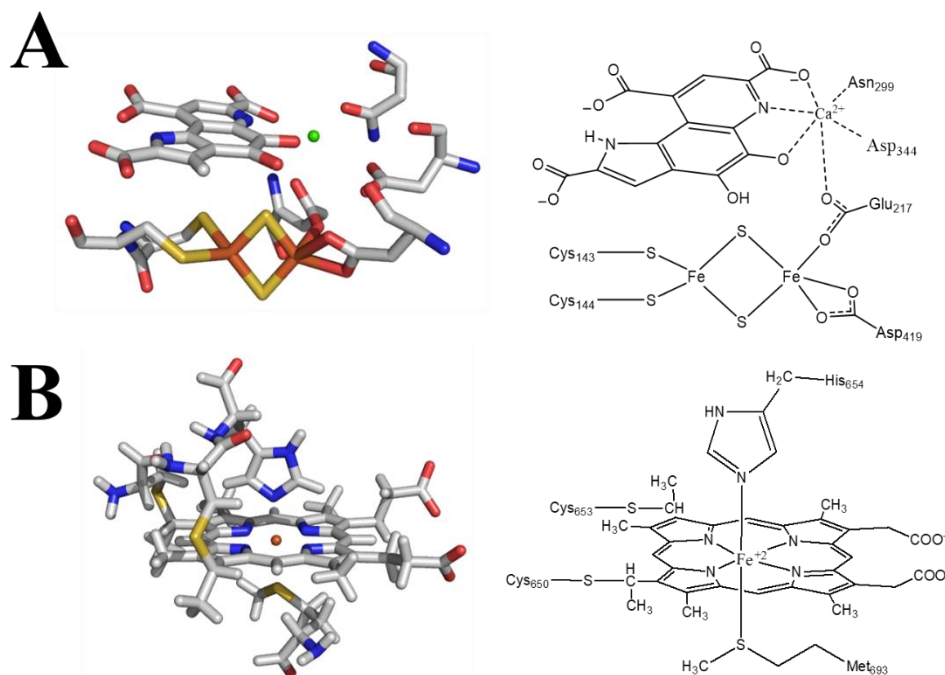


Figura 1.9 Estructura propuesta para los cofactores en la SUI de *GdADH-III*. A) estructura y modo de coordinación para el Ca^{2+} -PQQ y el cúmulo [2Fe-2S]. B) Estructura y modo de coordinación del grupo hemo tipo *c* [82]. Se muestran los átomos de carbono en color gris, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul, los de azufre en color amarillo, el ion Ca^{2+} en color verde y el ion Fe^{2+} en color naranja.

Con la finalidad de entender la estabilidad de la proteína en el estado reducido, se ha estudiado la interacción magnética que existe entre el Ca^{2+} -PQQ y el cúmulo [2Fe-2S] [82, 83]. Dado que la intensidad de la señal en EPR es proporcional a la susceptibilidad magnética [84], se estudió la señal de EPR para el PQQ y el cúmulo [2Fe2S] en función de la temperatura (Figura 1.10). Se observó un comportamiento magnético típico para un acoplamiento de tipo antiferromagnético, el cual se ajustó a la ley de Curie-Weiss obteniendo un valor para la constante de Weiss de $\theta = -33$ K.

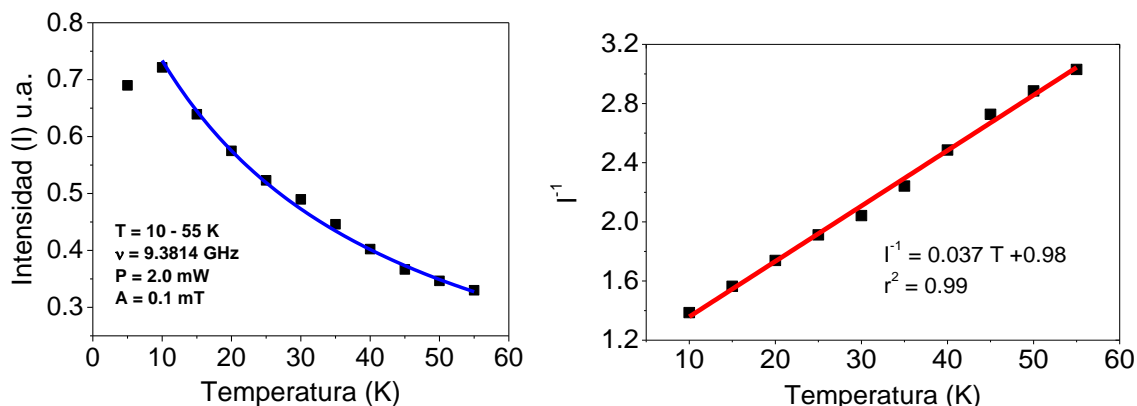


Figura 1.10 Acoplamiento de tipo antiferromagnético entre el PQQ y el cúmulo [2Fe-2S]. A) Gráfica de intensidad de la señal de PQQ en EPR en función de la temperatura. Se observa el aumento de la Intensidad a bajas temperaturas hasta un máximo en 10 K. B) Gráfica del inverso de la intensidad de la señal en función de la temperatura. Se muestra el ajuste a la ley de Curie-Weiss, con un valor de $\theta = -33 \text{ K}$ lo que indica el carácter antiferromagnético del acoplamiento [82, 83].

Estudios de saturación [83] para las señales de EPR de ambos cofactores (Figura 1.11), demostraron que a 10 K la señal de radical semiquinona se satura a una potencia de $P_{1/2} = 9.12 \text{ mW}$ mientras que la del cúmulo [2Fe-2S] se satura a una potencia $P_{1/2} = 15.24 \text{ mW}$. Por otro lado, la señal de EPR del PQQ a 77 K se satura a una potencia $P_{1/2} = 5.51 \text{ mW}$. El alto valor de saturación para el cúmulo [2Fe-2S] es consistente con el acoplamiento de tipo antiferromagnético que le proporciona al cúmulo [2Fe-2S] un mecanismo alternativo de relajación saturándose con mayor dificultad.

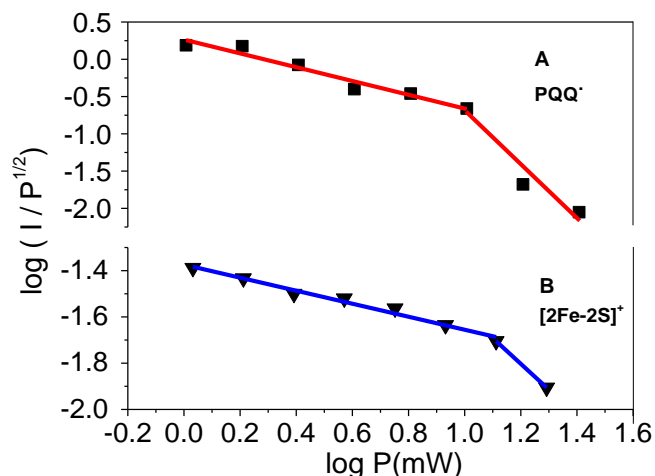


Figura 1.11 Saturación de potencia progresiva a 10 K para las señales de A) radical semiquinona, PQQ* con una saturación en $P_{1/2} = 9.12$ mW y B) cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ con una saturación en $P_{1/2} = 15.24$ mW. Tomado de Rodríguez-Cortés, 2017 [83].

Finalmente, se estudió la proteína *GdADH-III* en estado oxidado [82, 85]. Por medio de una titulación potenciométrica y oxidando la proteína a distintos niveles, fue posible determinar, por espectroscopía de EPR, el potencial y los estados de espín para cada uno de los grupos hemo de tipo *c* (Figura 1.12 y Tabla 1.4). Se encontró que el grupo hemo de la subunidad I es de alto espín con una señal rómbica en $g_x = 10.389$, $g_y = 5.058$ y $g_z = 4.276$. Por otro lado, en la subunidad II se observó una señal altamente anisotrópica en $g_{max} = 3.753$ y $g_{min} = 1.159$, típica para un grupo hemo de tipo I, con una His y una Met como ligantes axiales. También se observaron dos señales para dos grupos hemo de tipo II, con dos His como ligantes axiales, en $g_x = 2.974$, $g_y = 2.289$, $g_z = 1.525$ y $g_x = 2.684$, $g_y = 2.105$, $g_z = 1.428$ [85].

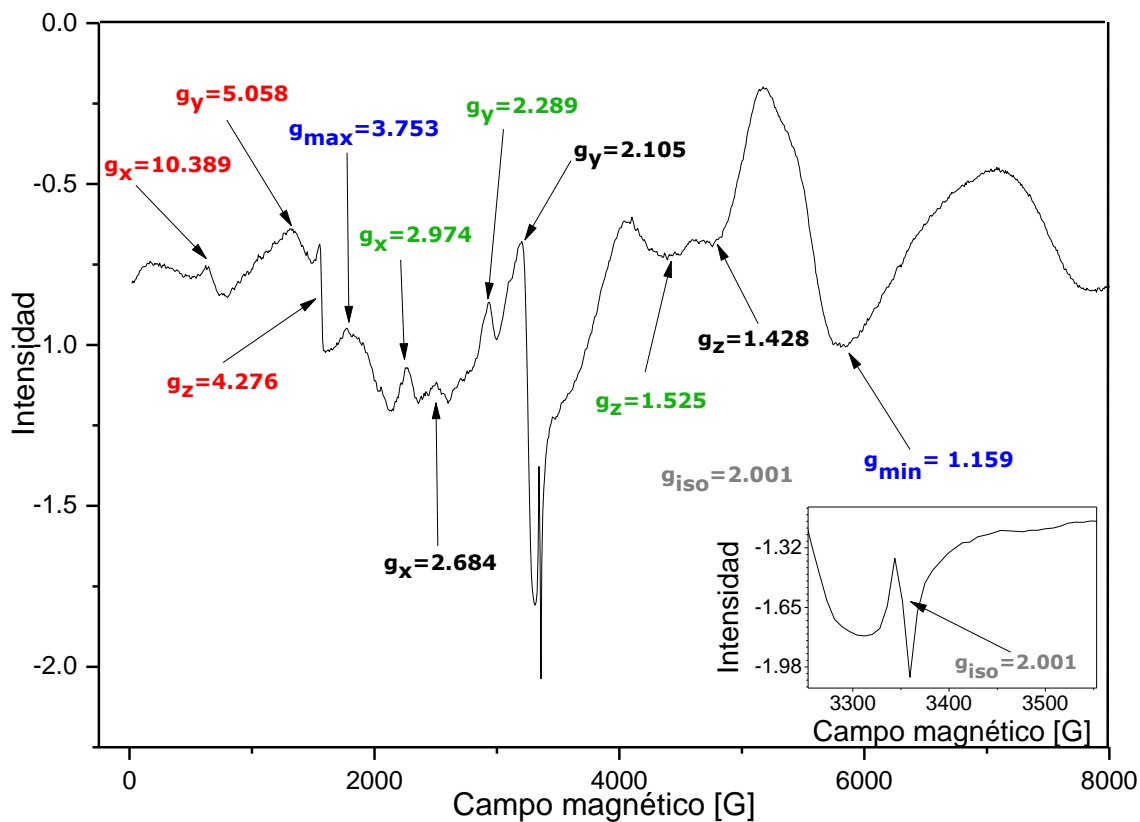


Figura 1.12 Espectro de EPR de *GdADH-III* oxidada con hidropéroxido de terbutilo. Se observan las señales para cada uno de los grupos hemo *c*. Grupo cl con $Fe(III)$ de alto espín en color rojo, grupo cl_1 con $Fe(III)$ de bajo espín en color azul, Grupo cl_2 con $Fe(III)$ de bajo espín en color verde y grupo cl_3 con $Fe(III)$ de bajo espín en color negro. Inserto: Señal de radical atribuida a la especie PQQ^* en estado semirreducido. Sánchez-Ostria, 2019 [85].

Tabla 1.4 Localización, potencial redox, estado de espín y señales en EPR para cada uno de los grupos hemo c oxidados en GdADH-III [85].

Hemo c	Subunidad	Potencial redox (mV)	Estado de espín	Tipo de hemo c	Señales en EPR
cl	SUI	-64	5/2	Alto espín	Rómbica $g_x = 10.389$ $g_y = 5.058$ $g_z = 4.276$
cll ₁	SUII	-8	1/2	Tipo I, bajo espín	Axial $g_{max} = 3.753$ $g_{min} = 1.159$
cll ₂	SUII	+185	1/2	Tipo II, bajo espín	Rómbica $g_x = 2.974$ $g_y = 2.289$ $g_z = 1.525$
cll ₃	SUII	+210	1/2	Tipo II, bajo espín.	Rómbica $g_x = 2.684$ $g_y = 2.105$ $g_z = 1.428$

1.4 Metabolismo de azúcares

1.4.1 Oxidación periplásmica y citoplásmica de azúcares

La oxidación de azúcares se lleva a cabo por fermentación oxidante, de manera similar a la oxidación de alcoholes en las bacterias ácido-acéticas (sección 1.3.1), mediante enzimas de membrana como la glucosa deshidrogenasa (GDH), gluconato deshidrogenasa (GADH) o la 2-cetogluconato deshidrogenasa (2KGDH), aunque existen también deshidrogenasas primarias para otros azúcares como fructosa, sorbitol, etc. Estas enzimas se encuentran acopladas a la cadena respiratoria constituyendo lo que se conoce como la respiración de glucosa de las bacterias ácido-acéticas (Figura 1.13) [36].

Además de las deshidrogenasas de membrana, dentro del citoplasma se puede llevar a cabo una oxidación completa de glucosa y otros azúcares por medio de enzimas dependientes de NAD(P)⁺. El metabolismo interno de glucosa se puede dar por medio de la glucólisis o por medio de la vía de las pentosas fosfato, comenzando con la fosforilación

de la glucosa al ingresar a la célula (catalizada por la glucocinasa), o bien con la fosforilación del gluconato al interior de la célula (Figura 1.13) (catalizada por la gluconocinasa) [36, 38].

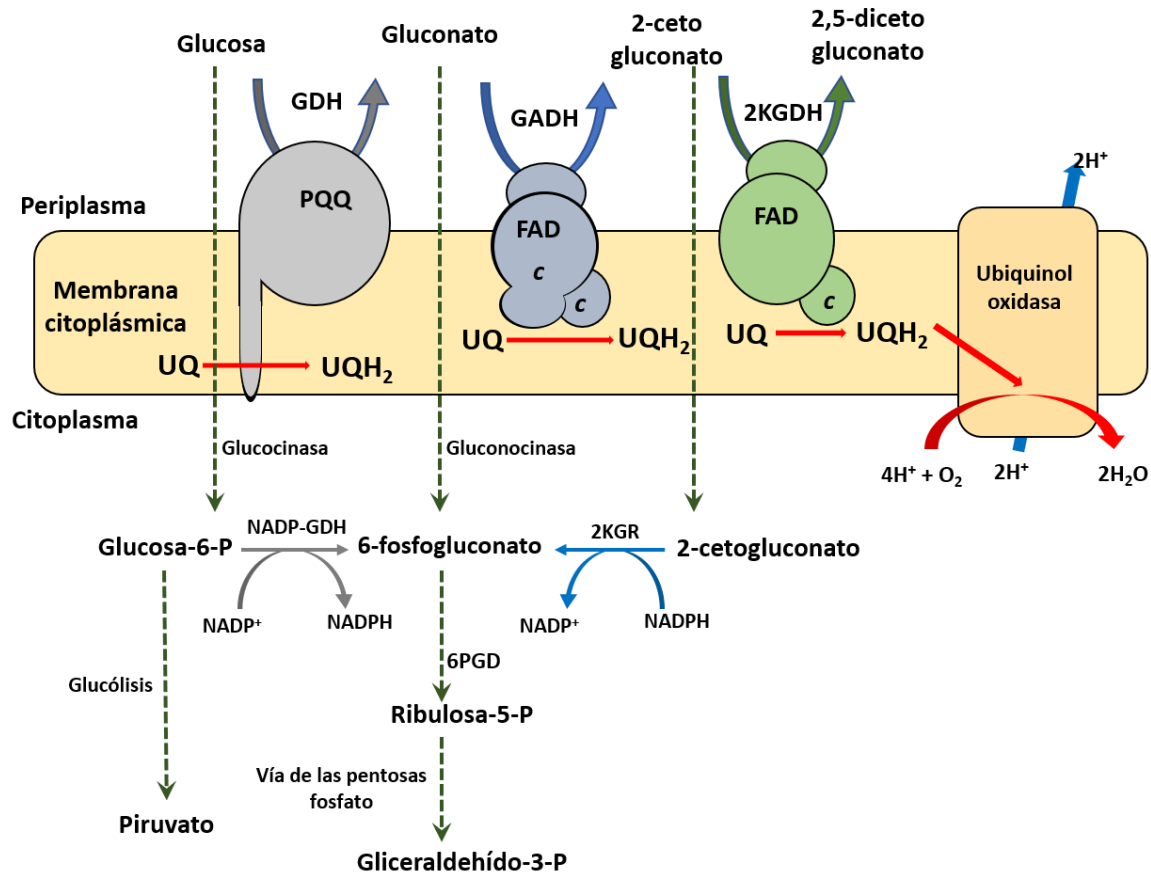


Figura 1.13 Oxidación de azúcares en las bacterias ácido-acéticas. Las proteínas de membrana glucosa deshidrogenasa (GDH), gluconato deshidrogenasa (GADH) y 2-cetogluconato deshidrogenasa (2KGDH) funcionan como las primeras deshidrogenasas en la oxidación de glucosa. Las proteínas dependientes de NAD(P)⁺, glucosa deshidrogenasa (NADP-GDH), 2-cetogluconato reductasa (NAD-2KGR) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) se encuentran en el citoplasma y funcionan para la asimilación de glucosa [36].

1.4.2 Vía de las pentosas fosfatadas en bacterias ácido-acéticas.

Se ha observado que varios géneros de las bacterias ácido-acéticas carecen de la ruta metabólica de Entner-Doudorof. Y en aquellas que sí poseen dicha ruta, ésta funciona únicamente durante la producción de celulosa [38]. En consecuencia, la ruta de las pentosas fosfato es la vía principal para el catabolismo de carbohidratos [86-93]. Esta ruta comienza con la oxidación de glucosa-6-fosfato a fosfogluconato, el cual es posteriormente oxidado por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Esquema 1) [87-91]. Esta vía es crucial para la célula pues mediante una serie de interconversiones se produce ribosa-5-fosfato que es un precursor esencial para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Figura 1.14) [94,95].

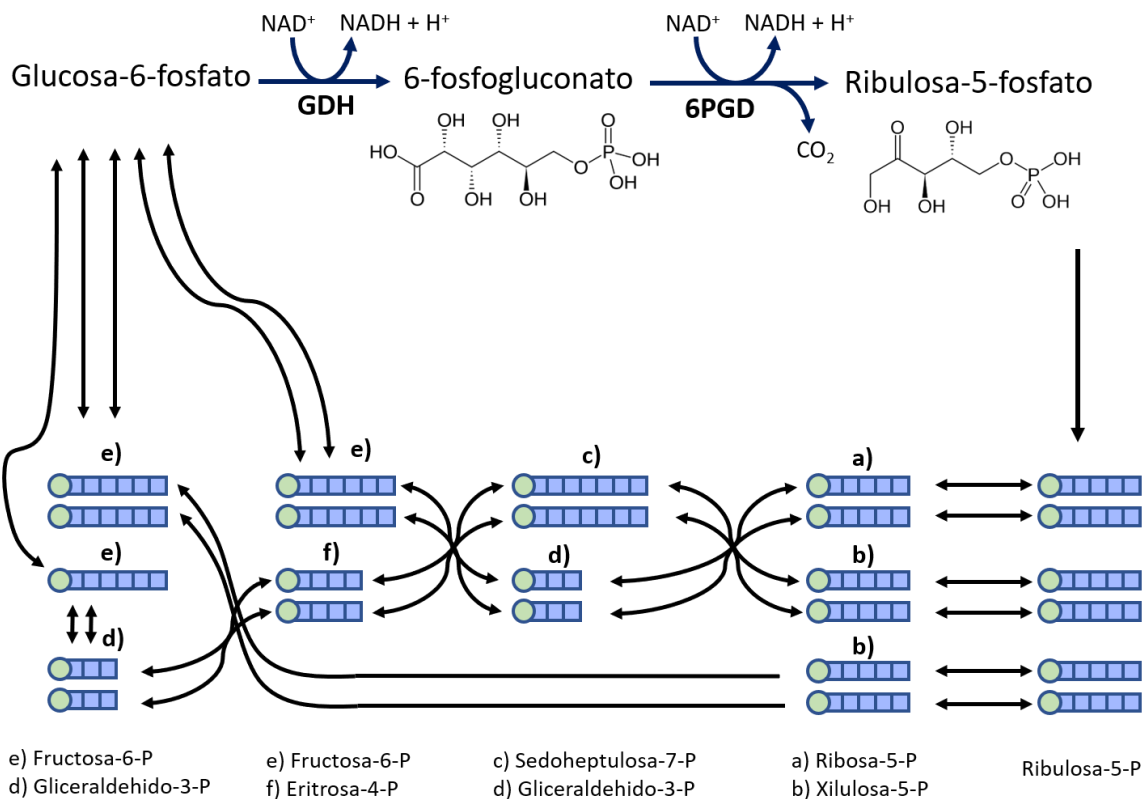


Figura 1.14 Vía de las pentosas fosfato. En un primer paso, la glucosa-6-fosfato es oxidada a fosfogluconato por medio de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GDH) y a continuación es oxidado a ribulosa 5-fosfato por medio de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD). Por medio de una serie de interconversiones se produce ribosa-5-fosfato, precursor esencial para la síntesis de nucleótidos y de ácidos nucleicos [95].

1.4.3 La enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa 6PGD

A pesar de la importancia de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) en la vía de las pentosas fosfatadas, la enzima fue poco estudiada hasta la década de los 80 [96]. Hoy en día ha recobrado la atención siendo propuesta incluso como blanco potencial para medicamentos antiparasitarios [97] y para tratamientos anticancerígenos [98, 99]. Debido a ello, el interés en los estudios estructurales de dichas proteínas se ha incrementado.

Se han reportado estructuras tridimensionales de 6PGDs de organismos como *Ovis aries* (PDB 1PGO) [100], *Trypanosoma brucei* (PDB 1PGJ) [101], *Lactococcus lactis* (PDB 2IYO) [102], *Saccharomyces cerevisiae* [103], *Geobacillus stearothermophilus* (PDB 2W8Z) [104], *Escherichia coli* (PDB 2ZYA) [105], *Klebsiella pneumoniae* (PDB 2ZYG) [105] y *Homo sapiens* (PDB 4GWG) [106]. Es importante mencionar que, hasta el momento, todas las 6PGDs se han reportado como enzimas solubles en el citoplasma.

La primera 6PGD aislada de una bacteria ácido-acética fue de *Gluconobacter suboxydans* [107] y hay algunos estudios del metabolismo de azúcares que estudiaron la cinética y la especificidad a NAD^+ y NADP^+ de dicha proteína [108-110]. En *Ga. diazotrophicus* se ha confirmado la presencia y la actividad de una 6PGD [86-91], sin embargo, estos estudios metabólicos se realizaron empleando extractos celulares sin haber aislado la enzima.

1.5 Relación entre el metabolismo de alcoholes y azúcares

Como se mencionó en las secciones 1.3.1 y 1.4.1 existe un metabolismo externo de alcoholes y azúcares en el periplasma (fermentación oxidante) [1, 33, 36, 38, 111, 112] y un metabolismo interno en el citoplasma [20, 113, 114]. Aunque hay pocos estudios enzimáticos de las proteínas responsables del metabolismo en el citoplasma de bacterias ácido acéticas, análisis del genoma de algunas bacterias como *Acetobacter aceti* han permitido elucidar las principales rutas metabólicas y su relación [115]. Al comparar dichos

estudios con el genoma de *Ga. diazotrophicus* [116], se puede plantear un panorama general del metabolismo central del carbono (Figura 1.15) en la bacteria.

Por un lado, la glucosa puede entrar a la vía de la glucólisis o bien, ser oxidada a gluconato y entrar a la vía de las pentosas fosfato. Ambas rutas llevan a la producción de gliceraldehído-3-fosfato que se convierte posteriormente a piruvato, el cual ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), ya sea por medio de una conversión a malato por la malato deshidrogenasa (*mod1*) o bien por medio de un par de conversiones a Acetil-CoA (por la piruvato deshidrogenasa, *pdh*) y finalmente a citrato (por la citrato sintasa, *aarA*) [94, 115]. Debido a que *Ga. diazotrophicus* carece de la fosfofructocinasa, la asimilación de glucosa se da únicamente a través de la vía de las pentosas fosfato como en la mayoría de las bacterias ácido acéticas [38, 86-91]. Además del TCA, también está disponible la ruta del glioxilato en la que participan la isocitrato liasa (*aceA*) y la malato sintasa (*glcB*).

Por otro lado, el etanol puede ser oxidado en el citoplasma a acetaldehído por la NAD⁺-ADH (*adh*) y éste a su vez, ser oxidado a acetato por la NADP⁺-ADH deshidrogenasa. En *Ga. diazotrophicus* puede haber dos rutas para la conversión de acetato en acetil-CoA: la primera es catalizada por la acetil-CoA sintetasa (*acs*) y la otra es por medio de la fosfotransacetilasa (*pta*) y la acetato cinasa (*ack*). Además, la actividad de la succinil-CoA sintetasa (*sucCD*) puede llevarse a cabo por medio de la succinil-CoA:acetato-CoA transferasa (*aarC*), lo que también permite la conversión de acetato en acetil-CoA.

Se ha observado en *A. aceti* [115] que cuando la bacteria crece en presencia de glucosa y acetato hay una mayor expresión de los genes del TCA, pero que estos genes se ven reprimidos cuando crece en presencia de etanol, sin importar la presencia de glucosa. Cuando la bacteria crece en presencia de etanol o de acetato, hay una mayor expresión del ciclo del glioxilato además de que cuando crece en presencia de etanol y glucosa, hay una gran expresión de la piruvato descarboxilasa (*pdh*) que convierte el piruvato en acetaldehído, lo que indica que el piruvato formado a partir de la glucosa rara vez entra en el TCA directamente cuando hay presencia de etanol.

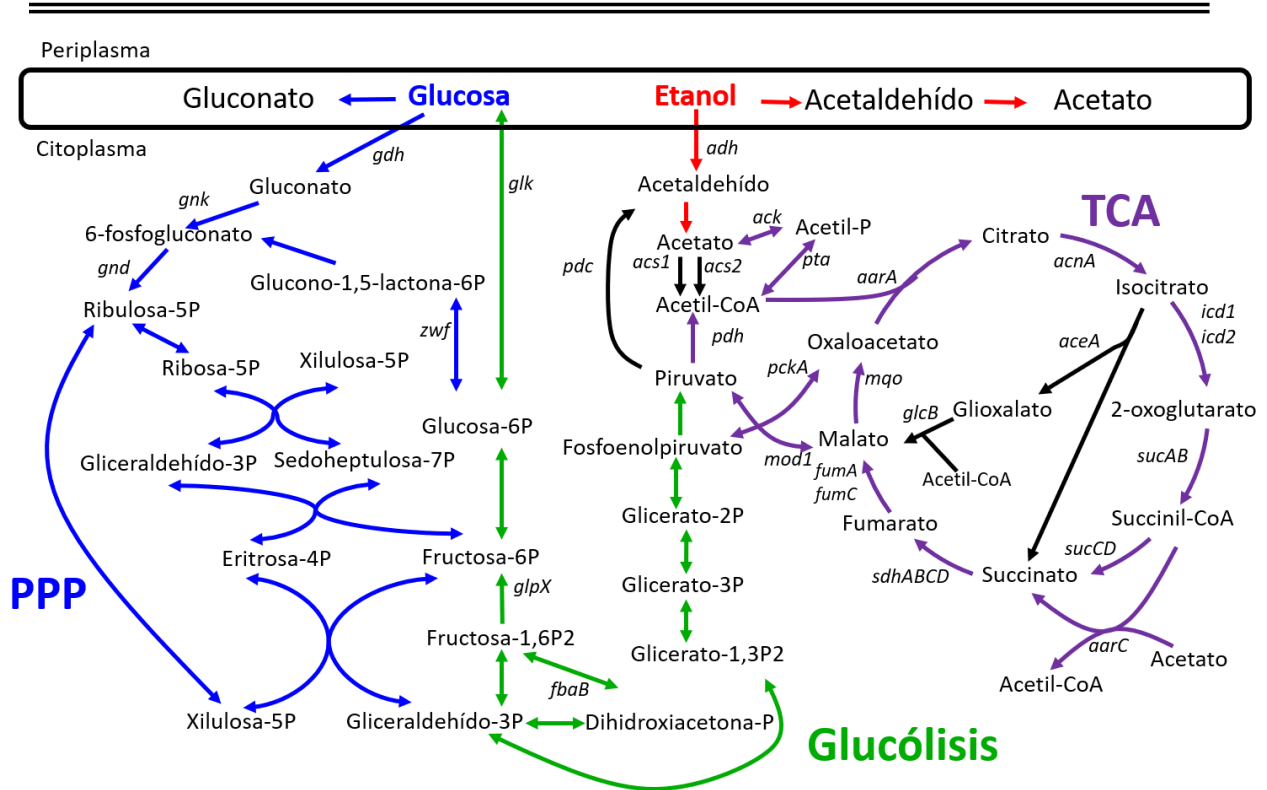


Figura 1.15 Relación entre el metabolismo de alcoholes y azúcares. Además del metabolismo externo que ocurre en la membrana, existe un metabolismo interno para alcoholes y azúcares relacionados por medio del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). La glucosa puede ser oxidada por medio de la glucólisis o de la vía de las pentosas fosfatadas (PPP) y ser convertida en piruvato para ingresar al TCA. El etanol puede ser oxidado a acetato y formar Acetil-CoA, el sustrato del TCA [115].

Se ha observado en *A. aceti* [115] que cuando la bacteria crece en presencia de glucosa y acetato hay una mayor expresión de los genes del TCA, pero que estos genes se ven reprimidos cuando crece en presencia de etanol, sin importar la presencia de glucosa. Cuando la bacteria crece en presencia de etanol o de acetato, hay una mayor expresión del ciclo del glioxilato además de que cuando crece en presencia de etanol y glucosa, hay una gran expresión de la piruvato descarboxilasa (*pdc*) que convierte el piruvato en acetaldehído, lo que indica que el piruvato formado a partir de la glucosa rara vez entra en el TCA directamente cuando hay presencia de etanol.

Ga. diazotrophicus es un aerobio estricto por lo que el aceptor final de los electrones es el oxígeno. Como se ha mencionado anteriormente, las deshidrogenasas primarias de membrana que llevan a cabo la fermentación oxidante ceden sus electrones a la ubiquinona

y ésta los transfiere a la ubiquinol oxidasa (Figuras 1.3 y 1.13) mientras que las deshidrogenasas dependientes de NAD^+ del citoplasma producen NADH el cual es oxidado por la NADH deshidrogenasa (NDH) (Figura 1.2). En *Ga. diazotrophicus* se ha observado la presencia de una NDH-1 que genera una fuerza protón motriz y la de una NDH-2 que no genera una fuerza protón motriz [22, 35].

Existe una competencia entre la respiración citoplásmica (NADH) y la respiración periplásmica (fermentación oxidante) en términos de transferencia de electrones pues tanto la NDH como las deshidrogenasas de membrana ceden los electrones a la ubiquinona y a la cadena respiratoria [22]. De hecho, en *Gluconacetobacter oxydans* se ha propuesto que la actividad de la NDH es un factor clave para controlar el crecimiento de la célula y la actividad de las deshidrogenasas de membrana [117].

A pesar de la relevancia de entender la regulación de la fermentación oxidante, se ha estudiado poco la relación entre el metabolismo interno y externo de alcoholes y azúcares en las bacterias ácido acéticas [22, 115].

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El estudio de las enzimas *GdADH-III* y *Gd6PGD* ayudará a comprender mejor su funcionamiento y el papel que desempeñan en el metabolismo externo e interno de la bacteria *Ga. diazotrophicus*.

2.2 Objetivo general

Determinar aspectos funcionales y estructurales de las enzimas alcohol deshidrogenasa (*GdADH-III*) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*Gd6PGD*) de *Ga. diazotrophicus* que participan en el metabolismo externo e interno de la bacteria, respectivamente.

2.3 Objetivos particulares

Purificar la proteína *GdADH-III* y obtener cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X.

Analizar la estructura de *GdADH-III* y confirmar el modo de coordinación de los cofactores que, junto con el antiferromagnetismo observado por EPR, permita entender su funcionamiento y estabilidad, así como la transferencia de electrones en dicha enzima

Estudiar la unión de *GdADH-III* a la membrana para comprender mejor su relación con la cadena respiratoria.

Estudiar la reactividad de *GdADH-III* con NO para estudiar el estado de espín de los átomos de hierro en los grupos hemo *c*.

Purificar la proteína *Gd6PGD* y obtener cristales adecuados para ser analizados por difracción de rayos X.

Estudiar la actividad de la proteína *Gd6PGD* para entender mejor su papel en el metabolismo de la bacteria y determinar su especificidad a los cofactores NAD⁺ y NADP⁺.

Analizar la estructura de *Gd6PGD* para esclarecer su localización en la célula y su relación con la cadena respiratoria.

Realizar un estudio filogenético que explique las diferencias en estructura y función entre *Gd6PGD* y otras 6PGDs reportadas anteriormente.

3. Procedimientos experimentales

3.1 Condiciones de cultivo

3.1.1 Cultivo de *Ga. diazotrophicus* en laboratorio en matraces de 1.5 L

Un liofilizado de la cepa PAL5 se cultivó en un medio LGIP sólido (K_2HPO_4 , 29 mM; KH_2PO_4 , 37 mM; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 mM; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 μ M; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 37 μ M; citrato de sodio 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM y sacarosa 90 mM; pH 5.5). Posteriormente se realizó un preinóculo de la bacteria en 100 mL con medio LGIP líquido enriquecido con $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM. Luego de 24 h se inocularon 1.5 L de medio LGIP líquido con sacarosa al 5 % m/v enriquecido con $(NH_4)_2SO_4$. Después de 36 h se adicionó alcohol etílico al 0.5 % v/v para inducir la expresión de las enzimas del sistema de oxidación de alcoholes. A las 48 h de cultivo las células se recuperaron por centrifugación a 8,800 x *g*.

3.1.2 Cultivo de *Ga. diazotrophicus* en biofermentador de 350 L

Se obtuvieron células a gran escala utilizando un fermentador con 350 L de medio LGIP líquido con sacarosa al 5 % m/v enriquecido con $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM inoculado con 20 L de cultivo en el mismo medio. A las 39 h de cultivo se adicionó etanol al 0.5 % v/v para inducir la expresión de las enzimas del sistema de oxidación de alcoholes. Luego de 50 h de cultivo se recuperaron las células por medio de una centrífuga tubular a 13,000 x *g*. Durante el cultivo de la bacteria se controló el valor de pH a 6 ± 1 y se mantuvo una aireación constante a 30 mL/min. 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.

3.1.3 Cultivo de *Ga. diazotrophicus* en laboratorio empleando iones lantánidos

Se partió de un liofilizado de la cepa PAL5 y se cultivó en un medio LGIP sólido sustituyendo el Ca^{2+} por los iones lantánidos La^{3+} y Ce^{4+} en cada caso. Posteriormente se realizó un preinóculo de la bacteria en 100 mL con medio LGIP modificado (K_2HPO_4 , 29 mM; KH_2PO_4 , 37 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 37 μM ; citrato de sodio 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM; sacarosa 90 mM y LaCl_3 , 0.1 mM ó $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0.1 mM; pH 5.5) enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM. Luego de 24 horas se inoculó 1.5 L de medio LGIP modificado con sacarosa al 5 % m/v y enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de 36 h se adicionó alcohol etílico al 0.5 % v/v para inducir la expresión de las enzimas del sistema de oxidación de alcoholes. A las 48 h de cultivo las células se recuperaron por centrifugación a 8,800 x g.

3.2 Obtención de la fracción soluble para la purificación de *Gd6PGD*.

Las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de PCM ($[\text{PO}_4^{3-}]$, 30 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mM, pH 6.0) a una temperatura de 4 °C y posteriormente fueron sonicadas para romperlas en el mismo medio en presencia de desoxirribonucleasas de bovino y de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMS) como inhibidor de proteasas. Se centrifugó a 178,800 x g por 60 min y se recuperó el sobrenadante.

3.3 Obtención de la fracción membranal para la purificación de *GdADH-III* y *Gd6PGD*.

Las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de PCM ($[\text{PO}_4^{3-}]$, 30 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mM; pH 6.0) a una temperatura de 4 °C y posteriormente fueron sonicadas para romperlas en presencia de 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. Para eliminar las posibles impurezas de proteínas de la fracción soluble, la fracción membranal fue lavada y resuspendida con solución amortiguadora PCM y posteriormente centrifugada a 178,800 x *g* por 60 min.

Finalmente, la fracción membranal fue resuspendida en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, con Tritón X-100 al 0.7 % v/v, pH 5.8 y se incubó a 4 °C por 24 h. Se centrifugó a 178,800 x *g* durante 1 h obteniendo un sobrenadante de color rojo.

3.4 Purificación de GdADH-III por cromatografía

La purificación de la proteína *GdADH-III* 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 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v, pH 5.8.

3.4.1 Columna QAE

Se utilizó una resina de intercambio aniónico fuerte QAE Toyopearl QAE-550C. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH 5.8 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v para recuperar la fracción con la proteína *GdADH-III*. El resto de las proteínas se eluyeron con una solución 250 mM de NaCl.

3.4.2 Columna DEAE

Se utilizó una resina de intercambio aniónico débil DEAE Toyopearl DEAE-650M. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH 5.8 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v para recuperar la fracción con la proteína *GdADH-III*. El resto de las proteínas se eluyeron con una solución 250 mM de NaCl.

3.4.3 Columna HA

Se utilizó una resina de hidroxiapatita HA-Ultrogel de Sigma-Aldrich. Para la elución de las proteínas se empleó una solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.8 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v utilizando un gradiente lineal de 10 a 250 mM de fosfatos. La proteína *GdADH-III* se recuperó a una concentración de 60 mM.

3.4.4 Columna S-100

Su utilizó una resina de exclusión molecular Sephacryl S100-HR. La proteína fue eluída con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM con Tritón X-100 al 0.1 % v/v, pH 5.8.

3.5 Purificación de *Gd6PGD* por cromatografía

La purificación de la proteína *Gd6PGD* se hizo por medio de cromatografía empleando columnas de intercambio aniónico y de hidroxiapatita. Todas las columnas fueron equilibradas con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 5.8. Para la purificación de la fracción membranal se adicionó, además, Tritón X-100 al 0.1 % v/v.

3.5.1 Columna QAE

Se utilizó una resina de intercambio aniónico fuerte QAE Toyopearl QAE-550C. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH 5.8 para recuperar la fracción con la proteína *Gd6PGD* (para la purificación de la fracción membranal se adicionó, además, Tritón X-100 al 0.1 % v/v.) El resto de las proteínas fueron eluídas con una solución 250 mM de NaCl.

3.5.2 Columna HA

Se utilizó una resina de hidroxiapatita HA-Ultrogel de Sigma-Aldrich. Para la elución de las proteínas se empleó una solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.8 (para la purificación de la fracción membranal se adicionó, además, Tritón X-100 al 0.1 % v/v.) utilizando un gradiente lineal de 10 a 250 mM de fosfatos. La proteína *Gd6PGD* se recuperó a una concentración de 210 mM.

3.6 Caracterización molecular

3.6.1 Electroforesis nativa (PAGE)

La electroforesis nativa en gel de poliacrilamida de la proteína *Gd6PGD* se realizó con un gel de corrida con acrilamida al 7 % m/v y un gel concentrador con acrilamida al 5 % m/v. Se utilizó una solución amortiguadora de corrida con TRIS-HCl, 125 mM; pH 6.8. El gel fue teñido con azul de Coomassie al 0.1 % m/v. El sistema de electroforesis empleado fue una cámara de electroforesis vertical Hoefer SE300 miniVE utilizando una corriente de 120 V.

3.6.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para las proteínas *GdADH-III* y *Gd6PGD*, 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 Coomassie al 0.1 % m/v. El sistema de electroforesis empleado fue una cámara de electroforesis vertical Hoefer SE300 miniVE utilizando una corriente de 120 V.

3.7 Ensayos enzimáticos

3.7.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

La cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry [118] empleando como estándar albúmina bovina.

3.7.2 Cuantificación de la actividad enzimática de *GdADH-III*

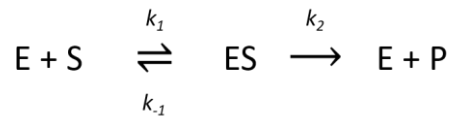
Las pruebas de actividad para la proteína *GdADH-III* se realizaron por el método de ferricianuro de potasio de acuerdo con lo reportado anteriormente [81]. Se utilizó una solución amortiguadora de Mcllvaine (K_2HPO_4 , 126 mM; ácido cítrico, 37 mM; pH 6.0) empleando $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.1 M como aceptor 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; $Fe_2(SO_4)_3$, 0.5 % m/v; H_3PO_4 , 8 % m/v). Finalmente se ajustó el volumen a 5 mL y se determinó la absorbancia a 680 nm. La unidad de actividad enzimática está definida como la oxidación de 1 μ mol de etanol por minuto. Cada incremento en 0.02 de absorbancia equivale a 1 μ mol de etanol oxidado [81, 119].

3.7.3 Cuantificación de la actividad enzimática de *Gd6PGD*

Las pruebas de actividad de *Gd6PGD* se realizaron por el método de Beutler de acuerdo con lo reportado en la literatura [120]. Los ensayos contenían una solución amortiguadora de Tris-HCl, 0.1 mM; EDTA, 0.5 mM; ácido 6-fosfogluónico, 0.6 mM; $NAD(P)^+$, 0.2 mM; pH, 7.5 en un volumen total de 1 mL. La reacción se inició por adición de 0.03 mg de proteína y por espectroscopía UV-Vis se siguió la A_{340} durante 3 min. La unidad de actividad enzimática se definió como la reducción de 1 μ mol de $NAD(P)^+$ min^{-1} .

3.7.4 Estudios cinéticos de la enzima Gd6PGD.

Para la determinación de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de NAD(P)⁺, los ensayos contenían, en un volumen de 1 mL, una solución amortiguadora de Tris-HCl, 0.1 mM; EDTA, 0.5 mM; ácido 6-fosfogluónico, 0.6 mM; pH 7.5 y se varió la concentración del cofactor NAD(P)⁺ de 0.2 – a 2.0 mM. Para la determinación de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) del sustrato (ácido 6-fosfogluónico), los ensayos contenían, en un volumen de 1 mL, una solución amortiguadora de Tris-HCl, 0.1 mM; EDTA, 0.5 mM; NAD⁺, 0.2 mM; pH 7.5 y se varió la concentración del ácido 6-fosfogluónico de 0.2 – 6.0 mM. En todos los casos se midió el incremento en la A_{340} y se siguió la reacción por 3 min. Se calculó la actividad específica en cada caso y los parámetros cinéticos se determinaron por regresión no lineal ajustando al modelo de Michaelis-Menten con el programa GraphPad Prism 7. Todos los ensayos cinéticos se hicieron por triplicado para la fracción soluble y de membrana. Adicionalmente, a la fracción membrana se le eliminó el Tritón X-100 por medio de columnas *Pierce Detergent Removal* de Thermo Scientific. Las curvas de saturación en función de la concentración de sustrato se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Ec 3.1):



$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ec 3.1})$$

dónde

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad V_{max} = k_{cat}[E] \quad k_{cat} = k_2$$

3.8 Caracterización espectroscópica

3.8.1 Espectroscopía de UV-Vis

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.

3.8.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

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

3.9 Análisis de secuencias de aminoácidos

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se llevó a cabo con ayuda del programa *DIALIGN* desarrollado por Morgenstern [121, 122] utilizando las secuencias de aminoácidos de la *Gd6PGD* reportadas por el grupo de Ferreira [116].

3.10 Cristalización de la proteína *Gd6PGD* y colección y procesamiento de datos.

La proteína *Gd6PGD* se purificó de la fracción membranal. Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo empleando 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 μ L de solución cristalizante al depósito (solución amortiguadora de Tris-citrato de sodio, 0.1 M; isopropanol, 10% v/v; PEG 4000 10, mg/mL; pH 5.6). La proteína se dializó en una

Procedimientos experimentales

solución con fosfato de sodio, 10 mM; Tritón X-100, 0.1 % v/v; pH 5.8 y se concentró a 22, 33 y 64 mg/mL. La gota se preparó con una mezcla 1:1 de solución cristalizante y solución de proteína. El tamaño de las gotas fue de 4 μ L.

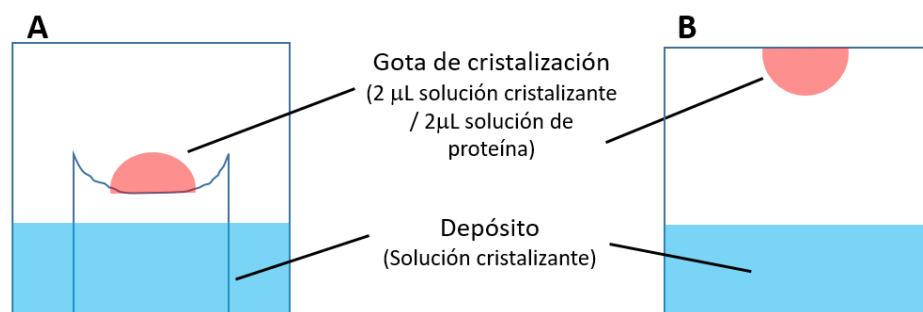


Figura 3.1 Representación de la técnica de cristalización por difusión de vapor por medio de los métodos de A) gota sedente y B) gota colgante.

En el caso del método de gota sedente, se observó la formación de cristales a los 15 días a 20 °C. Para el método de gota colgante, las muestras se incubaron a 18 °C durante un año.

Los mejores cristales fueron sumergidos en una solución crioprotectora saturada de sulfato de litio y difractados en un difractómetro Micromax007-HF a 103 K en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM). Los cristales difractaron a un máximo de resolución de 1.87 Å. Se colectó un conjunto de datos con alta redundancia para resolver la estructura cristalina *de novo* por el método de difracción anómala simple (SAD). El conjunto de datos fue integrado y escalado usando HKL3000 [123]. Se utilizó AutoSol de Phoenix [124] para obtener las fases iniciales y el modelo se construyó manualmente con el programa Coot usando la secuencia de proteínas. Se refinó la estructura con varias rondas de Phoenix.refine y la construcción manual del modelo con Coot [125, 126].

3.11 Análisis filogenético

Se recuperaron 150 secuencias de aminoácidos de las bases de datos no redundantes UniProt [127] y GenBank [128]. Con el programa MUSCLE [129, 130] se calcularon múltiples alineamientos progresivos de las secuencias de aminoácidos. Una vez alineadas las secuencias se seleccionó el mejor modelo de sustitución con ayuda del programa MEGA X versión 10.1.6 [131] y se realizaron los análisis filogenéticos con cinco distintos algoritmos. Se emplearon los métodos basados en distancia, agrupación de pares no ponderado con media aritmética (UPGMA) vecino más cercano (NJ) y método de mínima evolución (ME) así como los métodos basados en caracteres, método de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) con valor de confianza de Bootstrap de 500 réplicas para todos los algoritmos. Se empleó el método de Jones-Taylor-Thornton para la sustitución de aminoácidos tratando los huecos (*gaps*) con delección por pares (*pair-wise*). Las diferencias entre secuencias de aminoácidos fueron corregidas por múltiples sustituciones asumiendo una distribución γ ($\alpha = 1.0$).

4. Resultados y discusión

4.1 Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*, GdADH-III

4.1.1 Cultivo de la bacteria *Ga. diazotrophicus*

El cultivo de la bacteria se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado previamente [82]. Se empleó un medio de cultivo LGIP con sacarosa al 3 % m/v, se adicionó etanol al 0.7 % v/v y controló el pH en un intervalo de 5.0 -7.0. Se cosecharon las células luego de 39 h de cultivo en la fase exponencial tardía (Figura 4.1).

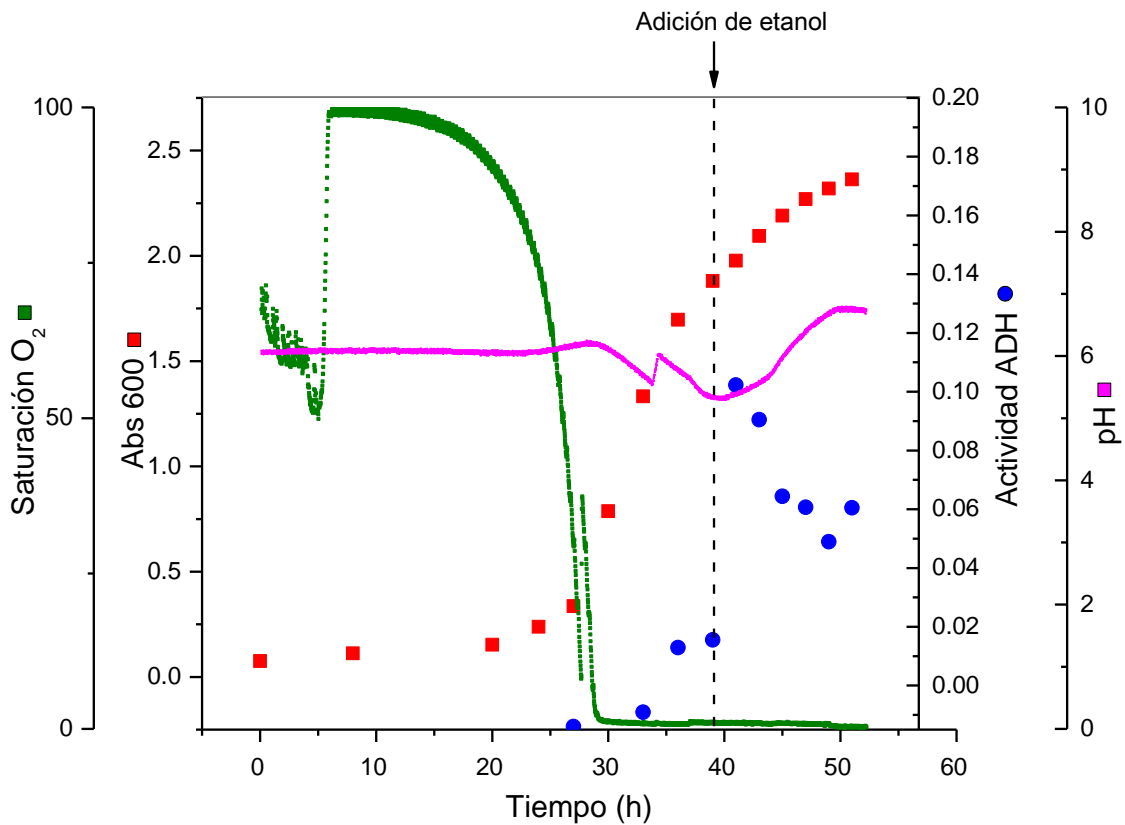


Figura 4.1 Curva de cultivo de *Ga. diazotrophicus* en un biofermentador de 350 L empleando un medio LGIP con sacarosa al 3 % m/v. A las 39 h se adicionó etanol al 0.5 % v/v. (■ Crecimiento del cultivo: A_{600 nm}; ● Actividad de ADH; ■ Oxígeno disuelto en el medio; ■ pH)

Es importante resaltar que reportes previos [79] indicaron la presencia de una fracción de alcohol deshidrogenasa inactiva. Sin embargo, al controlar el pH entre 5.0 -7.0 en el medio de cultivo, la *GdADH-III* conserva su actividad [82].

4.1.2 Purificación de la proteína *GdADH-III*

Luego de la lisis celular por sonicación, las membranas se recuperaron y se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos, 0.01 M; Tritón X-100, 0.7 % v/v; pH 5.8. La fracción membranal se centrifugó a 178,800 x *g* y se obtuvo un sobrenadante de color rojo. Dicho sobrenadante se aplicó sucesivamente a las columnas de intercambio aniónico QAE y DEAE, a la columna de hidroxapatita y finalmente a la columna de exclusión molecular S100.

4.1.2.1 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; Tritón X-100, al 0.1 % v/v; pH 5.8. Se obtuvo un lavado de color rojo indicando la presencia de la proteína *GdADH-III*. El resto de las proteínas fueron eluidas con NaCl 0.25 M.

4.1.2.2 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; Tritón X-100, al 0.1 % v/v; pH 5.8. Se obtuvo un lavado de color rojo indicando la presencia de *GdADH-III*. El resto de las proteínas se eluyeron con NaCl 0.25 M.

4.1.2.3 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; Tritón X-100, al 0.1 % v/v; pH 5.8. Se obtuvo un lavado de color verde. El resto de las proteínas fueron

eluidas con un gradiente lineal de fosfatos de 0.01 a 0.25 M. A una concentración de 0.06 M se observó un frente de elución de color rojo indicando la presencia de *GdADH*-III.

4.1.2.4 Columna S-100

Finalmente, la fracción de color rojo recuperada de la columna de hidroxapatita fue aplicada a la columna Sephacryl S-100 previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos, 0.01 M; Tritón X-100, al 0.1 % v/v; pH 5.8. En esta columna se observó un solo frente de elución de color rojo.

En la tabla 4.1 se presentan los pasos de purificación de *GdADH*-III. Se puede observar que en la fracción recuperada de la columna de hidroxapatita, (Ha) la actividad específica aumenta considerablemente al igual que en la fracción recuperada de la columna Sephacryl S-100; sin embargo en esta última, disminuye el rendimiento.

Tabla 4.1 Tabla de purificación de la proteína *GdADH*-III.

Pasos de purificación ^a	Proteína total (mg)	Actividad total ^b (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento %
Solubilizado de membrana	1227	1773	1.4	1	100
QAE	188	1670	8.9	6	94
DEAE	106	1628	15.4	11	92
HA	20	1619	80.9	58	91
Sephacryl S-100	3	718	239.3	171	40

^a 100 g de células (masa húmeda)

^b 1 unidad equivale a 1 μ mol de etanol oxidado por minuto

4.1.3 Caracterización de la proteína *GdADH-III*

4.1.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Por medio de electroforesis en 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 4.2 se muestra el perfil polipeptídico obtenido, en el que se observa la presencia de dos subunidades de acuerdo con lo reportado en la literatura [78]. La subunidad grande (SUI) con una masa de 72 kDa y la subunidad pequeña (SUII) con una masa de 44 kDa.

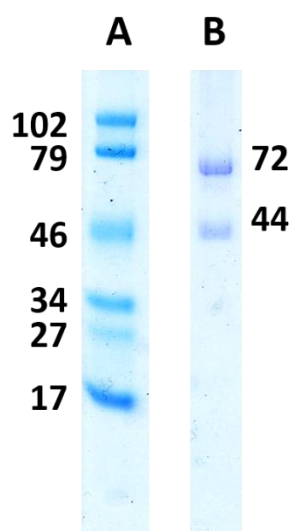


Figura 4.2 Gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes con SDS de la *GdADH-III*. A) Marcador comercial de masas moleculares. B) *GdADH-III* donde se pueden observar dos bandas que corresponden a la SUI de 77 kDa y a la SUII de 44 kDa. Se muestran los resultados para la tinción del gel con azul de Coomassie. Se muestran los marcadores de masas moleculares: fosforilasa b (103 kDa), BSA (73 kDa); ovoalbúmina (48 kDa); anhidrasa carbónica (34 kDa); inhibidor de tripsina de soya (27 kDa) y lisozima (17 kDa).

4.1.3.2 Espectroscopía de UV-Vis

Se realizó un espectro de UV-Vis (Figura 4.3) donde se pueden observar las bandas correspondientes al PQQ en 313 y 350 nm y las bandas correspondientes a los hemo *c* reducidos en 523 y 554 nm así como la banda Soret en 418 nm.

Para obtener el coeficiente de absorptividad molar de los hemo *c* se empleó la banda β (554 nm) del espectro de la proteína en estado reducido 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 $782 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, cualitativamente es posible apreciar el alto valor del coeficiente de absorptividad por el intenso color rojo de una solución de *GdADH*-III.

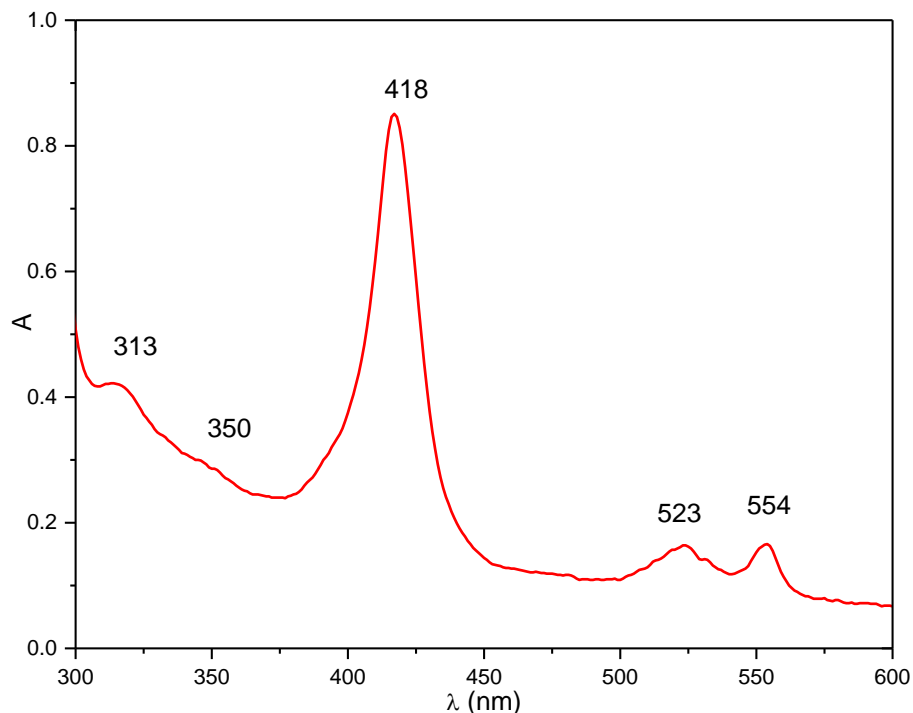


Figura 4.3 Espectro de UV-Vis de la *GdADH*-III recién purificada en estado reducido. Se llevó a cabo a una concentración de 7 mg/mL en una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a $\text{pH } 5.8$ con Tritón X-100 al 0.1 \% v/v .

4.1.3.3 Espectroscopía de EPR

Al realizar un espectro de EPR a 77 K de la *GdADH*-III 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 $g = 1.918$ (Figuras 4.4 y 4.5). La señal en $g = 2.003$ corresponde a un radical libre, lo que indica que el cofactor PQQ se encuentra como semiquinona (PQQ^{\bullet}). Por otro lado, la señal anisotrópica es una señal característica para un cúmulo metálico tipo ferredoxina en estado reducido ($[\text{2Fe-2S}]^+$).

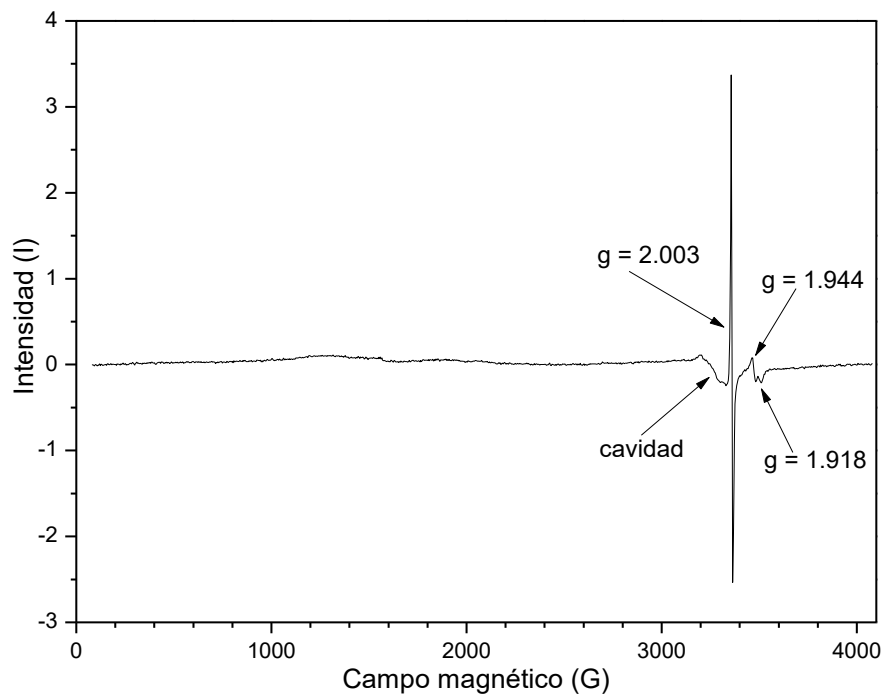


Figura 4.4 Espectro de EPR de *GdADH-III* recién purificada en estado reducido. El ensayo se llevó a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 5.8 a una temperatura de 10 K, una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.392166 GHz.

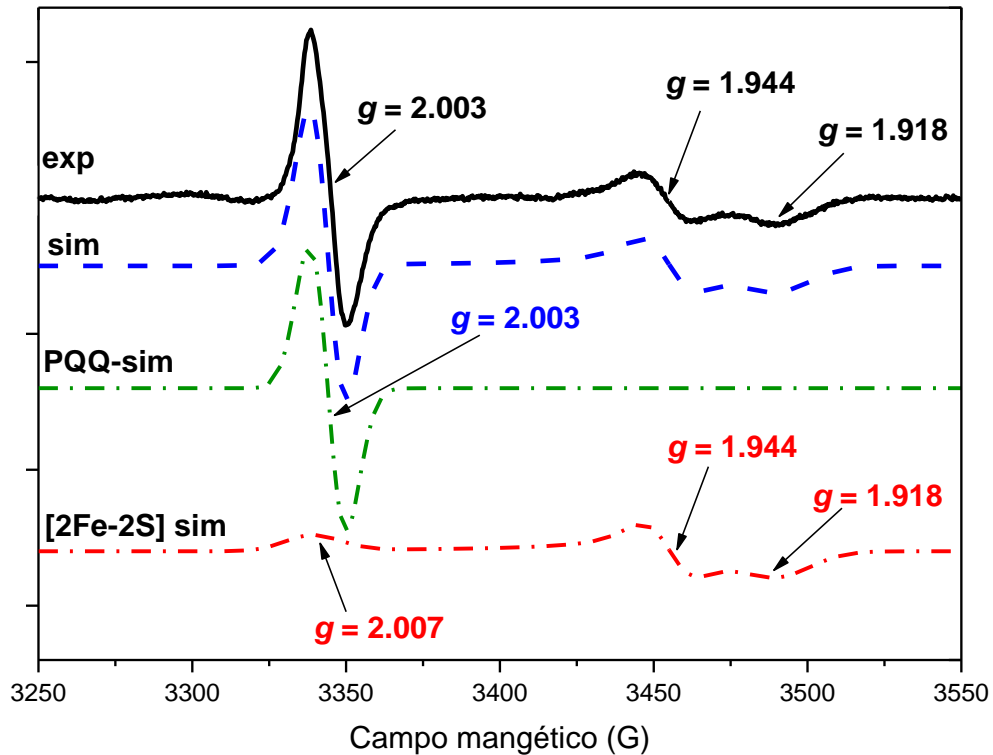


Figura 4.5 Espectro de EPR y simulación del espectro de la *GdADH-III* purificada. El ensayo se llevó a cabo a una concentración de proteína de 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 5.8 a una temperatura de 10 K a una potencia de 2 mW y una frecuencia de 9.381409 GHz.

Al realizar una simulación del espectro de EPR (Figura 4.5), se observa que el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ presenta una señal rómbica con valores en $g = 2.007$, $g = 1.944$ y $g = 1.918$. Estos valores difieren de los reportados normalmente para una ferredoxina $[2\text{Fe-2S}]^+$ con el grupo prostético unido a cuatro cisteínas con valores de g en $g = 2.05$, $g = 1.95$ y $g = 1.89$ [135]. Estas diferencias en los valores de g corresponden a un cambio en el entorno magnético del cúmulo probablemente debido a cambios en el modo de coordinación del centro $[2\text{Fe-2S}]^+$. Como se ha propuesto anteriormente [82], el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ en *GdADH-III* estaría coordinado a un par de Cys, un Glu y un Asp de manera bidentada.

4.1.4 Cristalización de *GdADH-III*

De acuerdo con lo observado anteriormente [82], se llevaron a cabo pruebas de cristalización empleando una solución amortiguadora de citrato de sodio (citrato de sodio, 0.1 M; isopropanol, 10 % v/v; PEG 4000, 10 % m/v; pH 5.6) de acuerdo con lo reportado en el procedimiento experimental de la sección 3.9. Las pruebas de cristalización se realizaron por el método de gota sedente empleando una gota de 2 μ L de solución amortiguadora para cristalizar y 2 μ L de una solución de proteína 15 mg/mL. En las pruebas de cristalización en estas condiciones se observó la formación de cristales (Figura 4.6).

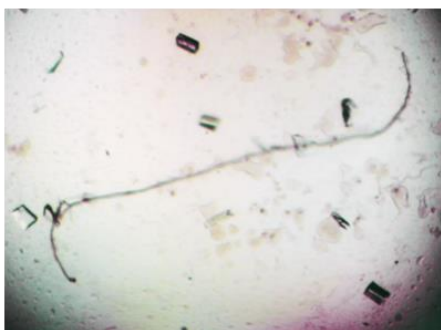


Figura 4.6 Cristales formados a una concentración de *GdADH-III* de 15 mg/mL, empleando una solución amortiguadora de citrato de sodio, 0.1M; isopropanol, 10 % v/v; PEG 4000, 10 % m/v; pH 5.6.

Se realizaron variaciones a la solución amortiguadora aumentando el porcentaje de PEG 4000 con la finalidad de aumentar el tamaño de los cristales obtenidos. Cuando la concentración de PEG 4000 se aumentó a 12 % m/v, se observó la formación de cristales más pequeños que los obtenidos a una concentración de 10 % (Figura 4.7A) y al incrementar la concentración de PEG 4000 a 15 % m/v ya no se observó la formación de cristales (Figura 4.7 B).

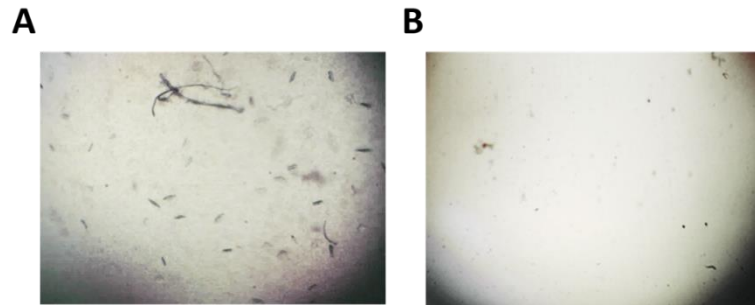


Figura 4.7 Resultados de las pruebas de cristalización con solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1M; pH 5.6 y una concentración de *GdADH-III* de 15 mg/mL, variando la concentración de PEG. A) Solución amortiguadora de citratos con PEG al 12 % m/v y pH 5.6 B) Solución amortiguadora de citratos con PEG al 15 % m/v.

A 10 % de PEG se formaron dos tipos de cristales, unos de color rojo (Figura 4.8 A) y otros incoloros (Figura 4.8 B). Debido al color rojo de la proteína *GdADH-III* por la presencia de los grupos hemo reducidos, los cristales rojos se asociaron a esta proteína. Algunos cristales incoloros, se seleccionaron para ser secuenciados, lo que permitió identificarlos como 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus* (*Gd6PGD*) como se mencionará más adelante a partir de la sección 4.2. Resulta interesante ver que, como se muestra en las figuras 4.6 y 4.8, la proteína cristaliza aun cuando no se encuentre pura la muestra y haya presencia de otras proteínas; en este caso, de la *Gd6PGD*.



Figura 4.8 Cristales obtenidos con solución amortiguadora de citratos con PEG al 10 % m/v y pH 5.6 Solución amortiguadora de citratos con PEG al 10 % m/v y pH 5.6. A) Cristales rojos correspondientes a *GdADH-III* B) Cristales incoloros identificados posteriormente como *Gd6PGD*.

Ambos tipos de cristales se recolectaron con un asa y se sumergieron en una solución amortiguadora crioprotectora de citrato de sodio 0.1 M, 10 % v/v de isopropanol, 10 % v/v de glicerol y 10 % m/v de PEG 4000, pH 5.6. Posteriormente se comenzó a coleccionar los datos de la difracción de rayos X a 77 K comprobando que ambos eran cristales de proteína. En estas difracciones preliminares se observó la presencia de cristales de agua cuya difracción interfería con la difracción de los cristales de *GdADH-III*.

Con la finalidad de reducir la formación de los cristales de agua, se aumentó la concentración del glicerol a 12 % v/v lo que provocó que los cristales de la proteína de membrana se disolvieran en la solución crioprotectora impidiendo así la colección de datos para la determinación de la estructura tridimensional.

Empleando nuevos lotes de proteína purificada, se realizaron pruebas de cristalización adicionales bajo las mismas condiciones y empleando la misma solución amortiguadora de citrato de sodio, 0.1 M; isopropanol, 10 % v/v; PEG 4000, 10 % m/v; pH 5.6. En un par de experimentos de cristalización, y luego de cuatro semanas, no se observó la formación de cristales.

Para confirmar que la muestra *GdADH-III* era homogénea y adecuada para realizar pruebas de cristalización, se realizó un estudio de dispersión dinámica de luz. Dicho análisis nos confirmó que la muestra era homogénea y que no existían distintos estados conformacionales de la proteína. Además, con dicho estudio fue posible determinar un tamaño de partícula de 8.15 nm que corresponde a un heterodímero de *GdADH-III*.

Para comprobar la presencia de todos los cofactores en la muestra de *GdADH-III* y descartar que la ausencia de éstos impidiera la cristalización, se realizó un experimento de EPR. En dicho estudio se observó que los grupos hemo cl y clI_1 en *GdADH-III*, aquellos con un potencial redox más negativo, se encontraban parcialmente oxidados. Las señales para el PQQ, en $g = 2.001$, y para el cúmulo [2Fe-2S], en $g = 1.938$ y $g = 1.927$, eran todavía visibles.

Estos estudios de EPR indican que, para que la proteína pueda cristalizar, es indispensable que todos los cofactores se encuentren en estado reducido. Resulta también interesante que, aun cuando se observaron las señales en EPR de los grupos hemo cl y cl_{II_1} en $g = 10.879$ $g = 4.975$ y $g = 4.280$, aún se observan las señales correspondientes al radical semiquinona y al cúmulo [2Fe-2S] lo que indica la estabilidad de estos dos cofactores en estado reducido.

Hasta el momento, no existe reportada ninguna estructura de una alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ de tipo III, por lo que la cristalización de *GdADH-III* es 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.

4.1.5 Estudio de *GdADH-III* en estado oxidado

Con la finalidad de caracterizar y estudiar los estados de espín de los hierros de los grupos hemo presentes en la proteína se han realizado diversos experimentos de oxidación de *GdADH-III*. Se ha observado que la reacción de *GdADH-III* con diversos oxidantes como nitrito (NO_2^-) ferricianuro ($[Fe(CN)_6]^{3-}$) y peroxodisulfato ($S_2O_8^{2-}$) produce una forma oxidada de la proteína que se precipita rápidamente. Recientemente la oxidación con hidroperóxido de terbutilo ha permitido estudiar los grupos hemo por medio de espectroscopía de EPR a baja temperatura (Figura 1.12) [82, 85].

Como se mencionó en la sección 4.1.4, al realizar experimentos de EPR a baja temperatura con una fracción de la proteína *GdADH-III* que no cristalizaba se determinó que los grupos hemo cl y cl_{II_1} se encontraban parcialmente oxidados, mostrando una señal rómbica para un Fe(III) de alto espín en $g = 10.879$ $g = 4.975$ y $g = 4.280$, correspondiente a cl y una señal altamente anisotrópica para un Fe(II) de bajo espín en $g = 3.254$, correspondiente a cl_{II_1} . En esta muestra las señales correspondientes al radical semiquinona en $g = 2.001$, y al cúmulo [2Fe-2S], en $g = 1.938$ y $g = 1.927$, indican la estabilidad de dichos cofactores en el estado reducido.

A diferencia de la proteína oxidada anteriormente con hidroperóxido de terbutilo mostrada en la Figura 1.12 [85], esta muestra se oxidó naturalmente debido al oxígeno del medio y después de haber tenido almacenadas las membranas durante un año a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta oxidación natural nos permitió confirmar la presencia de un grupo hemo con un Fe(III) de alto espín además de observar la gran estabilidad en el estado reducido de los cofactores PQQ y el cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. Esta estabilidad se debe probablemente al acoplamiento de tipo antiferromagnético que existe entre dichos cofactores [82, 83].

4.1.6 Estudio de la reactividad de *GdADH-III* con NO

En otro experimento, para poder caracterizar los grupos hemo por medio de la formación de aductos de Fe(II) con NO, se llevó a cabo la reacción de *GdADH-III* con espermina-NONOato como donador de NO. Con el paso del tiempo se observó la oxidación de la *GdADH-III* y esta reacción fue seguida por espectroscopía UV-Vis como se muestra en la Figura 4.9. Se puede observar que disminuye la absorción a 317 nm atribuida al PQQ en estado reducido, así como la disminución en la absorción en 418, 523 y 553 nm y un incremento en 527 nm indicando la oxidación de los grupos hemo. Cuando se compara la oxidación por el espermina-NONOato con la oxidación por ferricianuro de potasio (Inserto en la Figura 4.9), se puede observar que en el caso de la *GdADH-III* oxidada por NO únicamente hay cerca de un 75% de Fe(III) y un 25 % de Fe(II) indicando que uno de los grupos hemo no está siendo oxidado.

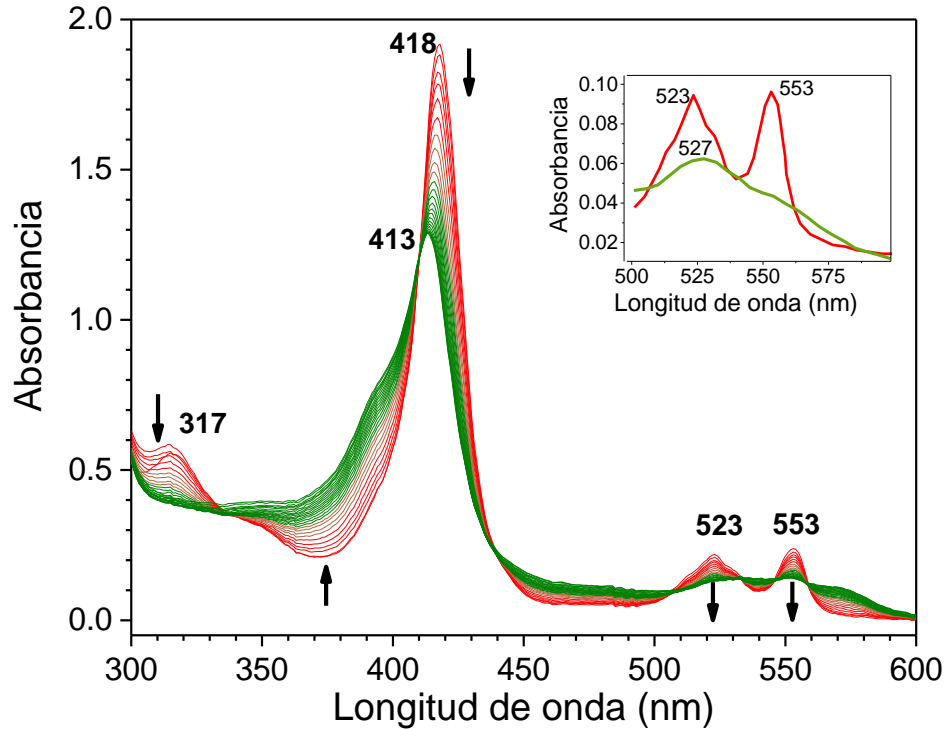


Figura 4.9 Reacción de *GdADH-III* con espermina-NONOato en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM; pH 7.4 bajo atmósfera de N_2 . Inserto: Oxidación de *GdADH-III* con ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$. Línea roja, proteína reducida; línea verde, proteína oxidada.

La reactividad de los grupos hemo en *GdADH-III* frente a NO es importante pues el NO es capaz de oxidar tres de los cuatro grupos hemo en *GdADH-III* (Figura 4.9). Esto contrasta con lo que se ha observado anteriormente en otras hemoproteínas [133, 133] en las que el NO únicamente forma aductos con los grupos hemo sin oxidarlos. Al analizar el cambio en la absorbancia para el pico de 418 nm respecto al tiempo y realizando gráficas de $\ln|A_t - A_\infty|$ vs. tiempo (Figura 4.10) se pueden observar dos líneas rectas que se asignan a dos reacciones de pseudo primer orden. El primer paso con una $k_{obs} = 12.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ corresponde a la unión del NO a los grupos hemo (cl , cll_1 , cll_2 , cll_3) mientras que el segundo paso con una $k_{obs} = 20.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ corresponde a la oxidación de tres grupos hemo (cl , cll_1 , cll_2).

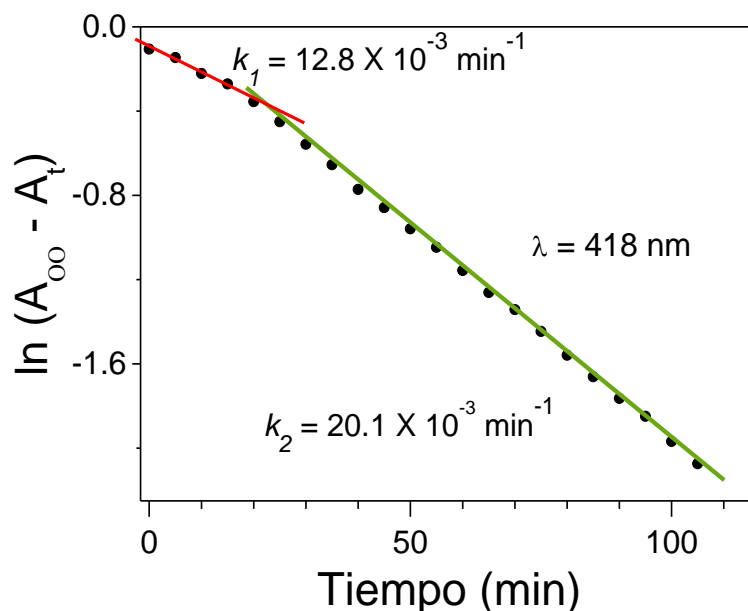


Figura 4.10 Determinación de las constantes de pseudo primer orden para la unión de NO a los grupos hemo (línea roja) y la oxidación de los grupos hemo por NO (línea verde). Se siguió la absorción a 418 nm para la reacción de *GdADH-III*, 4 μM con espermina-NONOato, 1 mM en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4 a 37 °C bajo atmósfera de N_2 .

Se han reportado valores de $k_{\text{obs}} = 18.2 \times 10^1 \text{ min}^{-1}$ para la unión de NO al citocromo c_{554} de *Nitrosomonas europaea* [134] y valores de $k_{\text{cat}} = 18.24 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ para la transferencia de electrones de la NO reductasa de *Pseudomonas nautica* al citocromo c_{552} [135]. En la reacción con *GdADH-III* y espermina-NONOato se concluye que el paso limitante es la liberación de NO por parte del donador de NO con una $k = 15 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ bajo las condiciones de reacción ensayadas [136].

La proteína oxidada se estudió por EPR a 10 K (Figura 4.11) observando una señal rómbica con un ancho de banda de 168 G y con valores de g en $g_x = 2.079$, $g_y = 2.005$ y $g_z = 1.974$. El ancho de cada señal es consistente con un acoplamiento al ^{14}N del nitrosilo coordinado a Fe(II) con valores de acoplamiento hiperfino $^{\text{NO}}A_x = 30 \text{ MHz}$, $^{\text{NO}}A_y = 60 \text{ MHz}$ y $^{\text{NO}}A_z = 31 \text{ MHz}$. Además, se observa un desdoblamiento adicional en la señal en g_y que se asigna al acoplamiento con un ^{14}N de una His *trans* al Fe(II)-NO con una constante de acoplamiento hiperfino $^{\text{His}}A_y = 25 \text{ MHz}$.

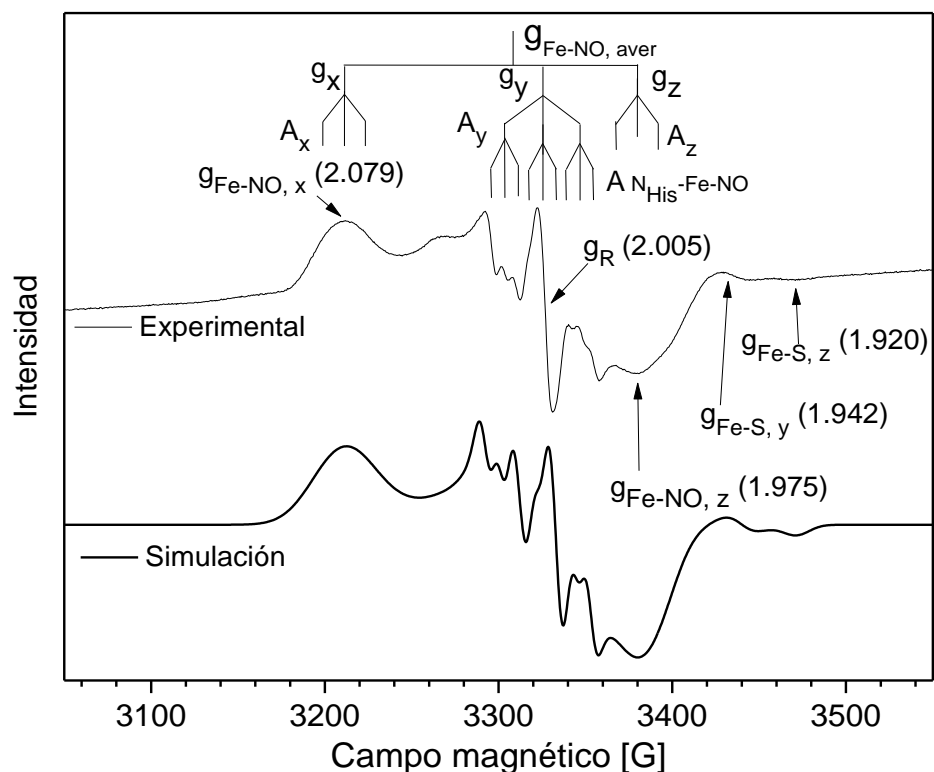


Figura 4.11 Espectro de EPR experimental y simulado del producto de la reacción de *GdADH-III* con espermina-NONOato en una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, bajo atmósfera de nitrógeno. Condiciones del EPR: Frecuencia 9.342660 GHz, potencia: 2.0 mW, amplitud 0.3 mT y $T = 10$ K.

El NO forma aductos con los cuatro grupos hemo en *GdADH-III* oxidando a tres de ellos. Los aductos Fe(III)-NO forman una especie diamagnética, $S = 0$, por lo que no darían señal en un espectro de EPR mientras que el aducto Fe(II)-NO forma una especie paramagnética, $S = \frac{1}{2}$, cuya señal es la que se observa. Es importante resaltar también que en el espectro de EPR de la *GdADH-III* parcialmente oxidada con NO es posible aún ver las señales correspondientes al radical semiquinona en $g = 2.007$, y al cúmulo de [2Fe-2S] con valores de $g_z = 1.920$ y $g_y = 1.942$. Una vez más, esto indica la gran estabilidad de ambos cofactores debido al acoplamiento de tipo antiferromagnético entre el PQQ y el cúmulo [2Fe-2S].

4.1.7 Cultivo de la bacteria *Ga. diazotrophicus* con iones lantánidos, La³⁺ y Ce⁴⁺.

Como se discute en la introducción (Sección 1.3.2.1), recientemente se ha estudiado el papel catalítico y regulatorio de los iones lantánidos en α -proteobacterias y γ -proteobacterias como *Methylobacterium extorquens* ó *Methylobacterium buryatense*. Se ha observado que dichos iones tienen un efecto importante sobre la oxidación de alcoholes y en particular sobre la actividad de las alcohol deshidrogenasas dependientes de PQQ de tipo I. Por ello se decidió estudiar el efecto de iones lantánidos en el cultivo de *Ga. diazotrophicus* y en la actividad de alcohol deshidrogenasa.

Se crecieron tres lotes diferentes de bacteria empleando medio LGIP modificando el contenido de Ca²⁺ de acuerdo con lo descrito en la sección 3.1.3. En el primer medio se empleó CaCl₂ 0.1 mM; en el segundo LaCl₃, 0.1 mM y finalmente el tercero con Ce(SO₄)₂ 0.1 mM. En todos los casos se adicionó etanol luego de 36 h de cultivo.

Las células se recuperaron por centrifugación a 4000 x g y se determinó el crecimiento relativo en cada uno de los medios (Tabla 4.2). Se observó un crecimiento muy similar tanto en el medio con Ca²⁺ como en el medio con Ce⁴⁺. Resulta interesante el hecho de que el crecimiento es el doble en el medio con La³⁺.

Tabla 4.2 Crecimiento y actividad relativa de ADH de *Ga diazotrophicus* en presencia de iones lantánidos.

Ion metálico	Crecimiento relativo de la bacteria	Actividad relativa de alcohol deshidrogenasa	Radio iónico (pm)
Ca ²⁺	1	100 %	114
La ³⁺	2	60 %	117
Ce ⁴⁺	1	90 %	101 (Ce ³⁺ 115)

Al medir la actividad de alcohol deshidrogenasa de las bacterias crecidas en cada uno de los medios (Tabla 4.2) se observó que la actividad en el medio con Ce⁴⁺ era

ligeramente menor a la actividad en el medio con Ca^{2+} . Por otro lado, en el caso de las células cultivadas en el medio con La^{3+} la disminución en la actividad fue más notoria.

Se puede ver que aun en presencia de iones lantánidos y ausencia de calcio hay una alta actividad de alcohol deshidrogenasa, principalmente en el caso de Ce^{4+} . Tanto el La^{3+} como el Ca^{2+} tienen radios iónicos muy similares, mientras que Ce^{4+} es aproximadamente un 10 % más pequeño, sin embargo el Ce^{3+} también es similar al Ca^{2+} . Basándonos en el tamaño parece factible que el Ca^{2+} pudiera estar siendo reemplazado por el ion La^{3+} y posiblemente por el ion Ce^{3+} . En este caso, dado que la bacteria creció en un medio rico en Ce^{4+} , parecería haber algún mecanismo en la célula para asimilar Ce ya fuera en estado oxidado (Ce^{4+}) o reducido (Ce^{3+}). El hecho de que las células de *Ga diazotrophicus* crecen al doble en presencia de La^{3+} parece indicar también que la bacteria posee un mecanismo para reconocer y asimilar iones lantánidos.

Al realizar una búsqueda en la base de datos UniProt [127] para la alcohol deshidrogenasa de *Ga diazotrophicus*, se encontró que existen dos genes que codifican alcohol deshidrogenasas. El gen *gdiA* que codifica una ADH dependiente de Zn y de NAD^+ (soluble en el citoplasma) y el gen *adhAB* que codifica a la enzima dependiente de PQQ, *GdADH-III*. Sin embargo, es importante resaltar que, los estudios de actividad fueron realizados midiendo la reducción de ferricianuro de potasio, el cual actúa tiene actividad como aceptor de electrones frente a las deshidrogenasas de membrana en *Ga diazotrophicus* [77-83, 85].

Con el fin de estudiar un posible modo de coordinación de los iones lantánidos en *GdADH-III*, se tomó la secuencia de aminoácidos de esta proteína y se alineó con las secuencias de las metanol deshidrogenasa dependientes de Ln^{3+} , Ce^{3+} -XoxF [64; [WP_009058797.1](#)] y Eu^{3+} -XoxF de *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV [65; [WP_009058797.1](#)], La^{3+} -XoxF de *Methylomicrobium buryatense* [66; [WP_017842117.1](#)] y La^{3+} -XoxF de *Methylorubrum extorquens* [67; [SOR30768.1](#)]. Al comparar los residuos de unión al ion metálico (Figura 4.12) se observa que en la *GdADH-III*, al igual que en todas las enzimas PQQ-ADH, se encuentran conservados los residuos Glu217, Asn299 y Asp344.

<i>GdADH</i> -III	215	GS	EFGARGFV	SAFDAETGKL	DWRFYTPNA	QNKPDNAPSD	AVL-----	257
<i>MfADH</i> -Ce	204	GG	EFGVRGRV	GAYDINTGNR	VWLAYSQGP	EEVLLDSDFN	KEF----PQH	249
<i>MfADH</i> -Eu	204	GG	EFGVRGRV	GAYDINTGNR	VWLAYSQGP	EEVLLDSDFN	KEF----PQH	249
<i>MbADH</i> -La	195	GG	EFGVRGFL	AAYNIRTGEL	DWKGYSMPD	ADTLINPTKT	TTWKDGKVQP	244
<i>MeADH</i> -La	195	GG	EFGVQCHV	TAYDLKSGKK	VWRGYSIGPD	DQLIVDPEKT	TSL----GKP	240
<i>GdADH</i> -III	258	--	MSKAYPTW	SPTGAWTTQG	GGGTVWDSIV	YDPVTDLVYL	GVGNGSPWNY	305
<i>MfADH</i> -Ce	250	GG	PGDGTKTW	P-GEQW--KL	GGGTTGWY	YDPALDLFYY	GTSNPGTWNA	296
<i>MfADH</i> -Eu	250	GG	PGDGTKTW	P-GEQW--KL	GGGTTGWY	YDPALDLFYY	GTSNPGTWNA	296
<i>MbADH</i> -La	245	VG	KDSSTSTW	E-GDQW--KI	GGGTTGWY	YDPELNLVYY	GSGNPSTWNP	291
<i>MeADH</i> -La	241	IG	KDSSLKTW	E-GDQW--KT	GGGCTGWFS	YDPKLDLMMY	GSGNPSTWNP	287
<i>GdADH</i> -III	306	KFR	SDGKGDN	LFLGSIWALK	PETGEYVWHF	QETPMDQWDY	TSVQQIMTLD	355
<i>MfADH</i> -Ce	297	EQR	KG--GDN	KWSCTIFARR	PDTGKARWAY	QMPWDSWDY	DGVNEMILPD	344
<i>MfADH</i> -Eu	297	EQR	KG--GDN	KWSCTIFARR	PDTGKARWAY	QMPWDSWDY	DGVNEMILPD	344
<i>MbADH</i> -La	292	AQR	P--GDN	KWSMSLWARN	ADTGEVKWVY	QMPHDEWDY	DGINEVALVD	339
<i>MeADH</i> -La	288	KQR	P--GDN	KWSMTIWARN	PDTGMAKWVY	QMPHDEWDF	DGINEMILTD	334

Figura 4.12 Alineación de las secuencias de *GdADH*-III y las ADH dependientes de lantánidos Ce³⁺-XoxF (*MfADH*-Ce) y Eu³⁺-XoxF de *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV (*MfADH*-Eu), La³⁺-XoxF de *Methylomicrobium buryatense* (*MbADH*-La) y La³⁺-XoxF de *Methylorubrum extorquens* (*MeADH*-La).

Por otro lado, al observar el residuo Asp335 en *MfADH*-Ce, vemos que éste se encuentra conservado en todas las secuencias de Ln³⁺-ADH, sin embargo en *GdADH*-III está sustituido por una Thr346. Dado que en las proteínas dependientes de lantánidos se ha observado que este Asp335 estabiliza la carga y el mayor número de coordinación de dichos iones, su ausencia en *GdADH*-III podría explicar la disminución en la actividad cuando la proteína se expresa en presencia de La³⁺ y Ce⁴⁺. Sin embargo, la Thr346 de *GdADH*-III posee un átomo de oxígeno que podría, en determinado momento, coordinarse también al ion metálico La³⁺ o Ce^{4+/3+}. Con base en la estructura propuesta para la subunidad I de *GdADH*-III [82], se puede proponer un modo de coordinación para los iones Ln³⁺ en dicha proteína (Figura 4.13).

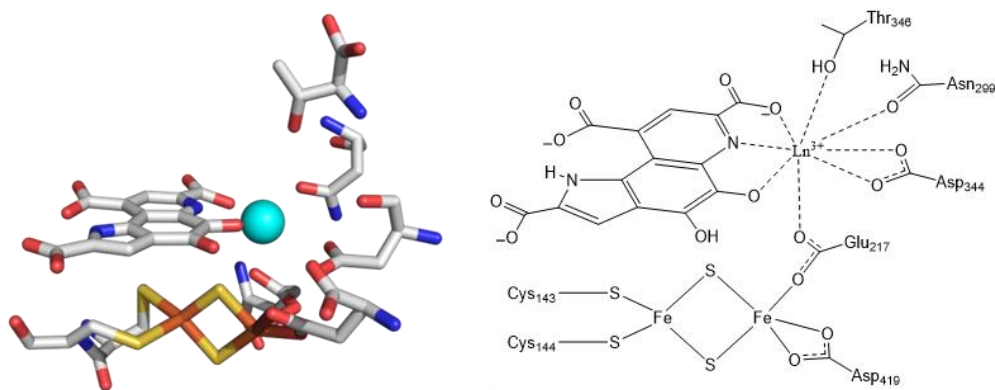


Figura 4.13 Modo de coordinación propuesto para un ion Ln^{3+} (La^{3+} o Ce^{3+}) en *GdADH-III*. Se muestran los átomos de carbono en color gris, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul, los de azufre en color amarillo, los de hierro en color naranja y el ion lantánido en color cian.

Debido a la pandemia ocasionada por el SARS-Cov 2, el trabajo del efecto de los iones lantánidos en el crecimiento y actividad de alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus* se vio interrumpido, por lo que sólo se reportan resultados preliminares. Éstos muestran que en el caso de *Ga. diazotrophicus* hay un efecto importante de La^{3+} y Ce^{4+} tanto en el crecimiento de la bacteria como en la actividad de la alcohol deshidrogenasa. El aislamiento de la proteína *GdADH-III* a partir del cultivo de la bacteria en presencia de lantánidos, permitiría confirmar la incorporación de dichos iones a la proteína.

4.2 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*, Gd6PGD

4.2.1 Cultivo de la bacteria *Ga. diazotrophicus*

El cultivo de la bacteria se llevó a cabo del mismo modo que para el estudio de la *GdADH-III* (Sección 4.1.1).

4.2.2 Purificación de la proteína *Gd6PGD*

Luego de la lisis celular por sonicación la fracción soluble se obtuvo por centrifugación a 178,800 x *g*, recuperando el sobrenadante. Dicho sobrenadante se aplicó a la columna de intercambio aniónico QAE y a la columna de hidroxapatita.

4.2.2.1 Columna QAE

Se aplicó la fracción soluble a la columna de intercambio aniónico QAE previamente equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos, 0.01 M; pH 5.8. Se obtuvo un lavado de la columna cuyas fracciones presentaban actividad de *Gd6PGD*. El resto de las proteínas fueron eluidas con NaCl 0.25 M.

4.2.2.2 Columna Ha

El lavado de la columna QAE se aplicó a la columna de hidroxapatita equilibrada con la solución amortiguadora de fosfatos, 0.01 M; pH 5.8. El lavado de la columna presentó un perfil de elución con un solo pico sin actividad de *Gd6PGD*. El resto de las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de fosfatos de 10 a 250 mM. A una concentración de 210 mM se obtuvo una fracción con actividad de 6PGD, indicando la presencia de la proteína *Gd6PGD*. En la Tabla 4.3 se presentan los resultados del proceso de purificación de la proteína *Gd6PGD*.

Tabla 4.3 Tabla de purificación de la proteína *Gd6PGD*.

Pasos de purificación ^a	Proteína total (mg)	Actividad total ^b (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Fracción soluble	175	31.7	0.2	1	100
QAE	10	7.9	0.8	4	25
Ha	2	5.1	2.8	15	16

^a 11 gramos de células (masa húmeda).

^b una unidad equivale a 1 $\mu\text{mol NAD}^+ \text{min}^{-1}$.

La purificación de la *Gd6PGD* a partir de la fracción membranal se realizó de la misma manera que para la proteína de la fracción soluble, con la diferencia de que se usó Triton X-100 al 0.1 % v/v en todas las disoluciones. Los patrones de elución para las columnas fueron muy parecidos y la proteína se recuperó de la columna de hidroxiapatita a la misma concentración de fosfatos.

4.2.3 Caracterización oligomérica de *Gd6PGD*

4.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Por medio de electroforesis con un gel de poliacrilamida al 10 % m/v se realizó un gel nativo empleando Tritón X-100 y un gel desnaturante con SDS y se determinó la composición oligomérica de la PQQ-ADH. En el gel en condiciones no desnaturantes, se observó una única banda que indica que la composición oligomérica de *Gd6PGD* es homogénea. Por otro lado, en la Figura 4.14 se muestra el gel en condiciones desnaturantes donde se ve que cada uno de los monómeros presenta una masa molecular de ≈ 35 kDa.

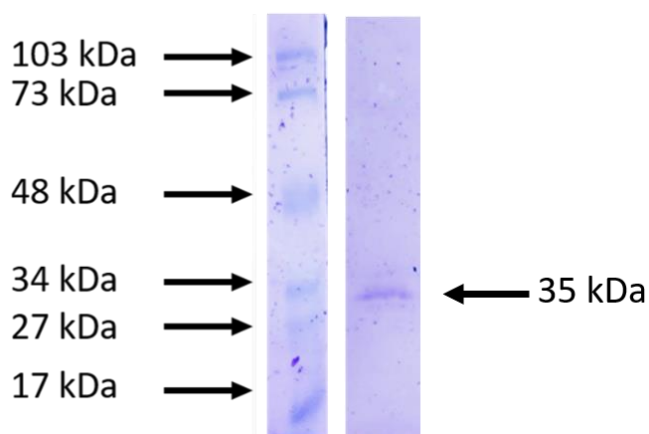


Figura 4.14 Gel de electroforesis de *Gd6PGD* en condiciones desnaturalizantes con SDS. Se muestran los resultados para la tinción del gel con azul de Coomassie. Se muestran los marcadores de masas moleculares: fosforilasa b (103 kDa), BSA (73 kDa); ovoalbúmina (48 kDa); anhidrasa carbónica (34 kDa); inhibidor de tripsina de soya (27 kDa) y lisozima (17 kDa).

4.2.4 Estudios de actividad de *Gd6PGD*

Existen diversos reportes estructurales y de actividad para diversas 6PGDs y siempre se han reportado como enzimas solubles en el citoplasma. Específicamente, en *Ga. diazotrophicus* se han reportado diversos estudios metabólicos [86-91] que detectan la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa como participante de la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, ninguno de estos estudios reporta un posterior aislamiento o caracterización de la *Gd6PGD*.

Además, existe una discrepancia en algunos resultados. Inicialmente, se propuso que *Gd6PGD* en la cepa PAL5 era dependiente exclusivamente de NADP^+ [86] como en la mayoría de las bacterias. Posteriormente se reportó que *Gd6PGD* en la cepa PAL3 era dependiente de NAD^+ [87] y que probablemente las cepas PAL5 y PPe4 también eran dependientes de NAD^+ .

4.2.4.1 Actividad de *Gd6PGD* en la fracción soluble y la fracción membranal.

A diferencia de lo que se ha reportado anteriormente, en *Ga. diazotrophicus* hemos observado actividad de 6PGD tanto en las fracciones solubles como en las fracciones membranales. La presencia de actividad en la fracción membranal es consistente en varios lotes de aislamiento.

Con la finalidad de determinar la localización de la *Gd6PGD* en la célula, se midió la actividad enzimática tanto en la fracción soluble como en la fracción membranal de la bacteria encontrando actividad en ambas fracciones (Tabla 4.4). Si bien es claramente mayor en la fracción soluble, no es despreciable en la fracción membranal.

La actividad relativa es entre 2 y 4 veces mayor en la fracción soluble indicando que entre 20 % y 33 % de la proteína se encuentra en la membrana. Por otro lado, es posible ver que, en ambas fracciones, la proteína es activa tanto con NAD^+ como con NADP^+ aunque la actividad es claramente mayor con NAD^+ .

Tabla 4.4 Actividad de 6PGD en las fracción soluble y fracción de membrana para NAD^+ y NADP^+ . Los ensayos se realizaron a una concentración de 6-fosfogluconato 0.6 mM y NAD(P)^+ , 0.2 mM, pH, 7.5 como se describe en la sección 3.7.3.

Fracción	NAD^+ (U / mg*)	NADP^+ (U / mg*)
Fracción soluble	0.18	0.011
Fracción membranal	0.04	0.005

U = reducción de 1 mmol de NAD(P)^+ min^{-1}

* mg de proteína en la fracción

4.2.4.2 Actividad específica con NAD^+ y NADP^+

Con el fin de aclarar las inconsistencias reportadas anteriormente para la actividad de *Gd6PGD*, se determinó la actividad específica de la enzima pura en presencia de los cofactores NAD^+ y NADP^+ . Las pruebas de actividad se realizaron con una concentración de 6-fosfogluconato de 0.6 mM; NAD(P)^+ , 0.2 mM; pH 7.4 como se describe en la sección 3.7.3.

Se encontró que la actividad específica con NAD^+ es de $2.88 \pm 0.08 \text{ U mg}^{-1}$, mientras que con NADP^+ es de $0.34 \pm 0.03 \text{ U mg}^{-1}$. Es importante resaltar que *Gd6PGD* es activa con ambos cofactores aunque es notorio que, bajo las condiciones de ensayo, tiene una actividad específica mayor (8 veces) con NAD^+ en comparación con la actividad específica con NADP^+ .

4.2.5 Estudios cinéticos de *Gd6PGD*

Con la intención de profundizar en la actividad de la *Gd6PGD*, se realizaron estudios de cinética enzimática con la proteína purificada del citoplasma y de la membrana y se determinaron los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y k_{cat}/K_m para el sustrato (6-fosfogluconato) y los cofactores NAD^+ y NADP^+ .

En la Figura 4.15 se muestra la curva de saturación de la enzima por el sustrato. Se puede observar que la proteína purificada del citoplasma (línea azul) alcanza una velocidad máxima mucho mayor que la proteína purificada de la membrana (línea roja). Ambos datos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos obtenidos de dicho ajuste para proteína del citoplasma son $K_m = 934 \pm 114 \mu\text{M}$; $V_{max} = 6.25 \pm 0.21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 3.91 \pm 1.05 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, mientras que para la proteína de membrana son $K_m = 33 \pm 4 \mu\text{M}$; $V_{max} = 1.67 \pm 0.04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 29.39 \pm 5.00 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

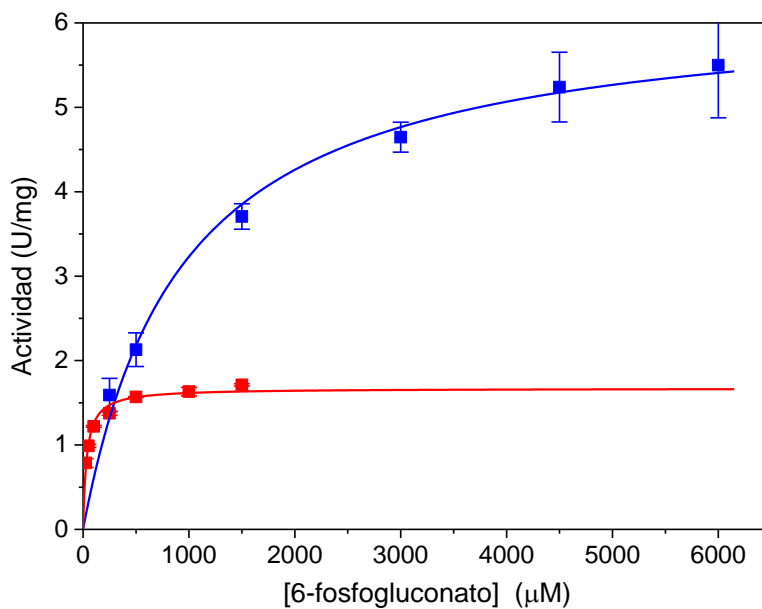


Figura 4.15 Curva de saturación de *Gd6PGD* purificado del citoplasma (línea azul) y de la membrana (línea roja) con el sustrato 6-fosfogluconato. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado. El estudio se realizó a una concentración de NAD^+ , 0.2 mM; pH 7.5, variando la concentración de 6PG de 0.2 a 6.0 mM como se describe en la sección 3.7.4.

El estudio saturación de *Gd6PGD* por el cofactor NAD^+ se reportan en la Figura 4.16. Nuevamente se aprecia que la velocidad máxima alcanzada es mucho mayor en la proteína de citoplasma (línea azul). Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten son $K_m = 103 \pm 17 \mu\text{M}$; $V_{max} = 5.22 \pm 0.18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 29.61 \pm 6.47 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$. Para la proteína de membrana, se obtuvieron los siguientes parámetros $K_m = 53 \pm 6 \mu\text{M}$; $V_{max} = 2.26 \pm 0.04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 24.91 \pm 3.33 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$.

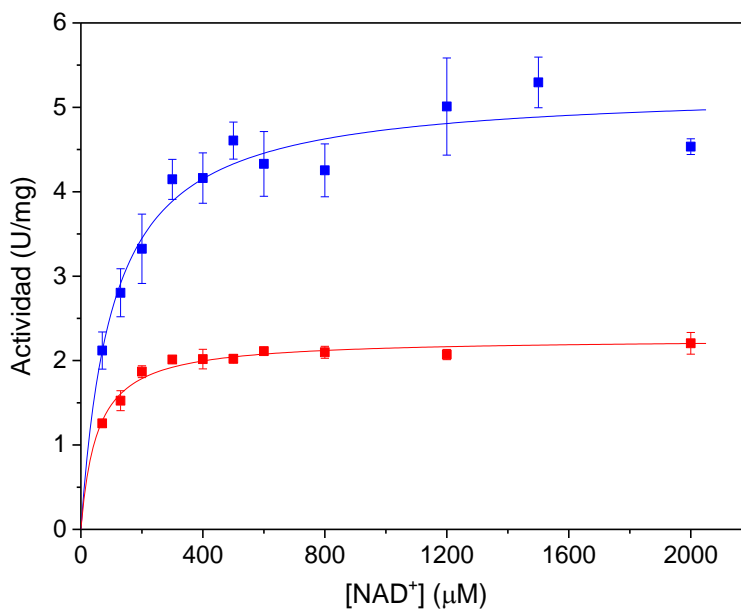


Figura 4.16 Curva de saturación de *Gd6PGD* purificado del citoplasma (línea azul) y de la membrana (línea roja) con el cofactor NAD^+ . Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado. El estudio se realizó a una concentración de 6PG 0.6 mM; pH 7.5, variando la concentración de NAD^+ de 0.2 a 2.0 mM como se describe en la sección 3.7.4.

Finalmente, para los estudios de saturación de *Gd6PGD* por el cofactor NADP^+ (presentados en la Figura 4.17), se observa también una velocidad inicial máxima mayor en la proteína del citoplasma (línea azul). Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten para la proteína del citoplasma son $K_m = 2386 \pm 338 \mu\text{M}$; $V_{max} = 2.41 \pm 0.23 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 0.59 \pm 0.38 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, mientras que para la proteína de membrana son $K_m = 870 \pm 66$; $V_{max} = 0.87 \pm 0.03 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $k_{cat}/K_m = 0.58 \pm 0.15 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

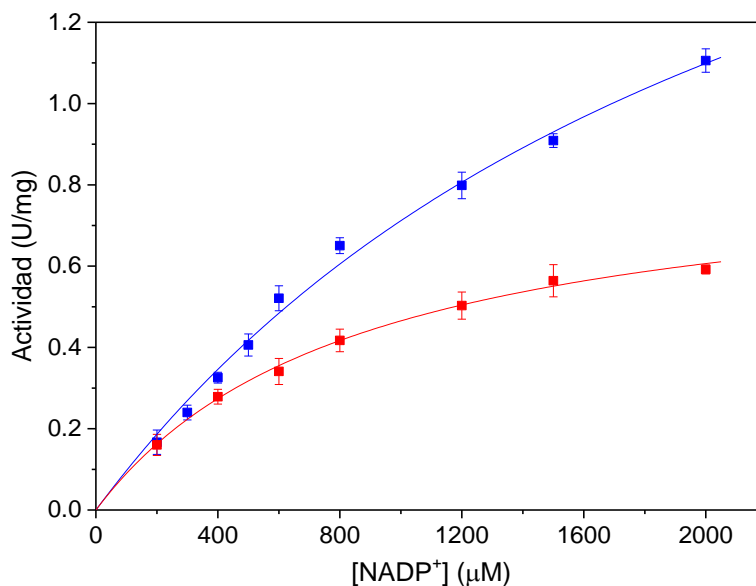


Figura 4.17 Curva de saturación de *Gd6PGD* purificada del citoplasma (línea azul) y de la membrana (línea roja) con el cofactor NADP⁺. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado. El estudio se realizó a una concentración de 6PG 0.6 mM; pH 7.5, variando la concentración de NAD⁺ de 0.2 a 2.0 mM como se describe en la sección 3.7.4.

Un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos se presenta en la Tabla 4.5. Se puede apreciar que tanto en la proteína del citoplasma como de la membrana los valores de K_m son mucho menores para el cofactor NAD⁺ con respecto a la del cofactor NADP⁺. Al observar los valores de k_{cat}/K_m se puede observar que son mucho mayores con NAD⁺ que con NADP⁺ lo que indica que la *Gd6PGD* emplea preferentemente NAD⁺.

Resultados y discusión

Tabla 4.5 Parámetros cinéticos de la proteína *Gd6PGD* purificada del citoplasma y de la membrana.

Enzima		K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Purificada del citoplasma	6PG	934 ± 114	6.25 ± 0.21	3.65 ± 0.12	3.91 ± 1.05
	NAD ⁺	103 ± 17	5.22 ± 0.18	3.05 ± 0.11	29.61 ± 6.47
	NADP ⁺	2386 ± 338	2.41 ± 0.23	1.41 ± 0.13	0.59 ± 0.38
Purificada de la membrana	6PG	33 ± 4	1.67 ± 0.04	0.97 ± 0.02	29.39 ± 5.00
	NAD ⁺	53 ± 6	2.26 ± 0.04	1.32 ± 0.02	24.91 ± 3.33
	NADP ⁺	870 ± 66	0.87 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.58 ± 0.15

Por otro lado, también se observa que los valores de K_m y de V_{max} son menores en la proteína de membrana tanto para el sustrato como para los cofactores. Esto nos llevó a preguntarnos si la proteína de membrana y del citoplasma era la misma o si, por el contrario, existían dos proteínas con actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa por lo que se realizó un estudio para determinar el papel del Tritón X-100 en las muestras de membrana.

Para estudiar el efecto que el Tritón X-100 pudiera tener en el estudio cinético, se realizaron dos experimentos independientes. Por un lado, a la proteína purificada del citoplasma se le adicionó, en un ensayo, Tritón X-100 a una concentración de 0.1 % v/v. En ese caso se observó que los parámetros cinéticos K_m ($103 \pm 17 \mu\text{M}$), V_{max} ($5.22 \pm 0.18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$) y k_{cat} ($3.05 \pm 0.11 \text{s}^{-1}$) disminuyeron cerca de un 50 % ($42 \pm 13 \mu\text{M}$, $2.54 \pm 0.14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y $1.06 \pm 0.08 \text{s}^{-1}$, respectivamente). Por otro lado, a la proteína purificada de la membrana se le eliminó el Tritón X-100 con ayuda de unas columnas para eliminar detergente (“Pierce Detergent Removal Spin Columns” adquiridas de Thermo Scientific). Luego de eliminar el Tritón X-100 se observó que los parámetros cinéticos K_m ($53 \pm 6 \mu\text{M}$), V_{max} ($2.26 \pm 0.04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$) y k_{cat} ($1.32 \pm 0.02 \text{s}^{-1}$) aumentaron prácticamente al doble ($94 \pm 23 \mu\text{M}$, $4.08 \pm 0.26 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ y 2.38 ± 0.31 , respectivamente). Por otro

Resultados y discusión

lado, el valor de k_{cat}/K_m se mantuvo constante independientemente de la adición o eliminación del detergente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Parámetros cinéticos para el NAD^+ de la proteína del citoplasma, antes y después de adicionar Tritón X-100, y de la proteína de membrana, antes y después de eliminar el Tritón X-100.

Enzima	Tritón X-100	K_m (μM)	V_{max} (mmol min^{-1} $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Citoplasma	0.0 %	103 ± 17	5.22 ± 0.18	3.05 ± 0.11	29.61 ± 6.47
	0.1 %	42 ± 13	2.54 ± 0.14	1.06 ± 0.08	25.24 ± 6.15
Membrana	0.1 %	53 ± 6	2.26 ± 0.04	1.32 ± 0.02	24.91 ± 3.33
	0.0 %	94 ± 23	4.08 ± 0.26	2.38 ± 0.31	25.32 ± 13.48

De los resultados mostrados en la Tabla 4.6 es posible apreciar que la proteína del citoplasma y la de membrana tienen parámetros cinéticos muy similares en ausencia de Tritón X-100, así como a una concentración de 0.1 % independientemente de si el detergente fue adicionado o eliminado.

Se realizó también un estudio de saturación de *Gd6PGD* en función de la concentración de NAD^+ con la proteína de membrana sin Tritón X-100 y adicionando el mismo detergente a distintas concentraciones a la proteína citoplásmica. Los resultados se muestran en la Figura 4.18, donde se puede observar un patrón de líneas paralelas en la gráfica de Lineweaver-Buck (Figura 4.18 B) que nos indica que existe una inhibición de tipo acompetitiva sobre la proteína *Gd6PGD*. Esto nos llevó a la conclusión de que, en la célula, existe únicamente una proteína con actividad 6PGD que, además de estar presente en el citoplasma, puede asociarse a la membrana.

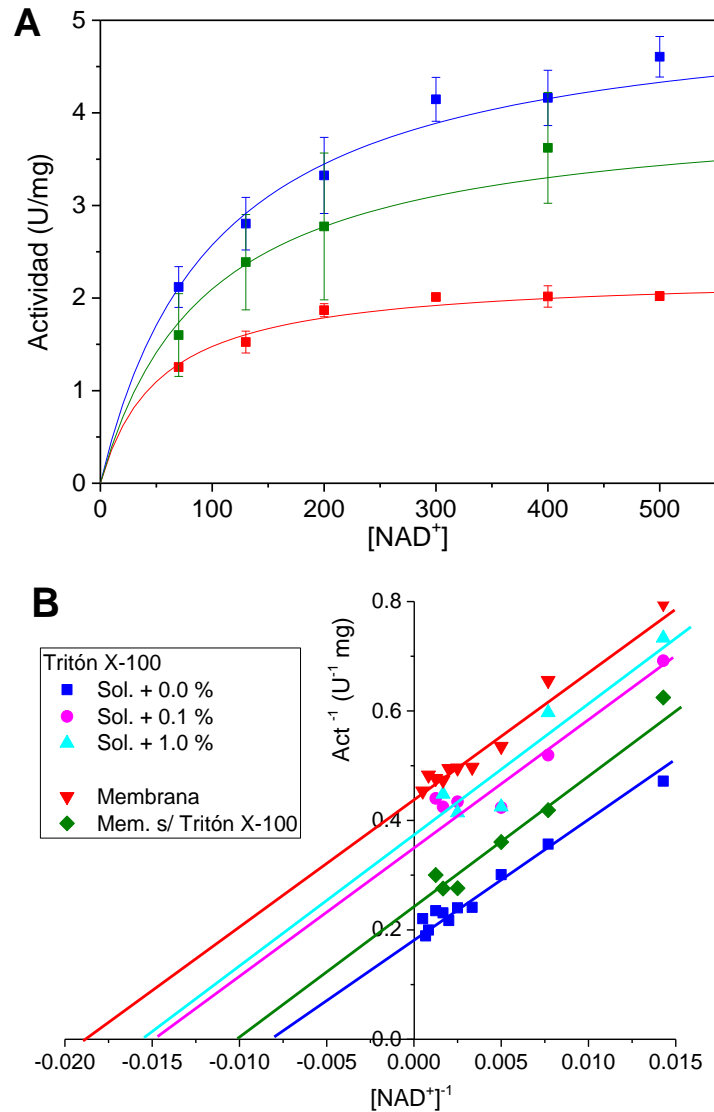


Figura 4.18 Efecto del Tritón X-100 sobre la cinética de *Gd6PGD*. A) Curvas de saturación con NAD⁺ de *Gd6PGD* purificada del citoplasma (línea azul), de la membrana (línea roja) y de la membrana después de haber removido el Tritón X-100 (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados de los experimentos realizados por triplicado. B) Gráficos de Lineweaver-Buck a diferentes concentraciones de Tritón X-100 indicando una inhibición acompetitiva.

4.2.5.1 Constantes de afinidad K_m para distintas 6PGDs reportadas

En la Tabla 4.7 se pueden observar las constantes de afinidad K_m para varias 6PGDs de diversos organismos desde bacterias hasta mamíferos. Es importante recordar que todas las 6PGDs reportadas en la literatura son enzimas citoplásmicas. Tanto *Ga. diazotrophicus*

Resultados y discusión

como *G. suboxydans* son bacterias ácido-acéticas y es posible apreciar que, mientras en otros organismos la K_m para el sustrato 6PG se encuentran en el intervalo de 3 – 120 μM , en las bacterias ácido-acéticas se encuentra en el intervalo de 440 – 940 μM . Por otro lado, en las proteínas que claramente son dependientes de NADP^+ , la K_m varía entre 1 y 150 μM para dicho cofactor mientras que los valores de las K_m de NAD^+ en las proteínas dependientes de NAD^+ , pertenecientes a *Ga. diazotrophicus*, *Gluconobacter suboxydans* y *Haloferax volcanii*, se encuentran entre 33 y 103 μM .

Tabla 4.7 Comparación de las constantes de afinidad (K_m) de 6PGDs de diferentes organismos.

Organismo	K_m 6PG (μM)	K_m NADP^+ (μM)	K_m NAD^+ (μM)	Referencia
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> *	934 \pm 114	2386 \pm 338	103 \pm 17	Este trabajo
<i>Gluconobacter suboxydans</i> *	440	440	64	[87]
<i>Haloferax volcanii</i>	21	2940	33	[143]
<i>Trypanosoma brucei</i>	3.5	1		[144]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	20	25		[145]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25 \pm 1	153 \pm 4		[146]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35 \pm 6	50 \pm 9		[103]
<i>Ovis aries</i>	118 \pm 23	107 \pm 4		[105]
	6.76 \pm 1.6	16.1 \pm 1.3		[147]
	2.9	22.7		[148]
<i>Homo sapiens</i>	30	20		[149]
	6.9 \pm 2.0	33.7 \pm 7.1		[97]

* Bacterias ácido-acéticas

4.2.6 Análisis bioinformático de las secuencias de 6PGD.

Una búsqueda realizada en UniProt [127] y en GeneBank [128] mostró que existe únicamente una secuencia no redundante para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en *Ga. diazotrophicus* codificada en el gen *gnd* lo que confirma la existencia de una sola proteína que puede estar en el citoplasma y asociada a la membrana como se demostró con los estudios cinéticos. Por la secuencia reportada para *Gd6PGD* (NCBI Ref. Seq. WP_012222546.1) se sabe que contiene 332 residuos de amino ácidos al igual que otras 6PGDs de bacterias ácido-acéticas como *A. aceti* (*Aa*), *A. pasteurianus* (*Ap*) and *K. xylinus* (*Kx*) que tienen 332, 333 y 333 residuos respectivamente. Sin embargo, las 6PGDs de otros organismos generalmente tienen una secuencia más larga como en el caso de *V. diazotrophicus* (*Vd*) con 482 residuos, *O. aries* (*Oa*) 483, *T. grayi* (*Tg*) 476, *T. brucei* (*Tb*) 477, *L. lactis* (*Ll*) 472, *G. stearothermophilus* (*Gs*) 469, *S. cerevisiae* (*Sc*) 489 y *K. pneumoniae* (*Kp*) 468.

Estas diferencias se pueden ver también en el grado de identidad de las secuencias. Mientras que las secuencias de *Aa*, *Ap* y *Kx* comparten una identidad de 82 %, 76 %, y 79 % respecto a *Gd6PGD*, la identidad con las secuencias de *Vd*, *Oa*, *Tg*, *Tb*, *Ll*, *Gs*, *Sc* y *Kp* se encuentra alrededor del 20 %.

La Figura 4.19 muestra la alineación de 12 secuencias de proteínas 6PGD pertenecientes a 4 bacterias ácido-acéticas y a 8 organismos diferentes. Destaca que, en general, en todas las secuencias, independientemente del número de residuos, están conservados los residuos de unión al sustrato y al cofactor. Además, es posible observar la diferencia en la longitud de la secuencia de la enzima de las bacterias ácido-acéticas respecto a las de otros organismos.

Resultados y discusión

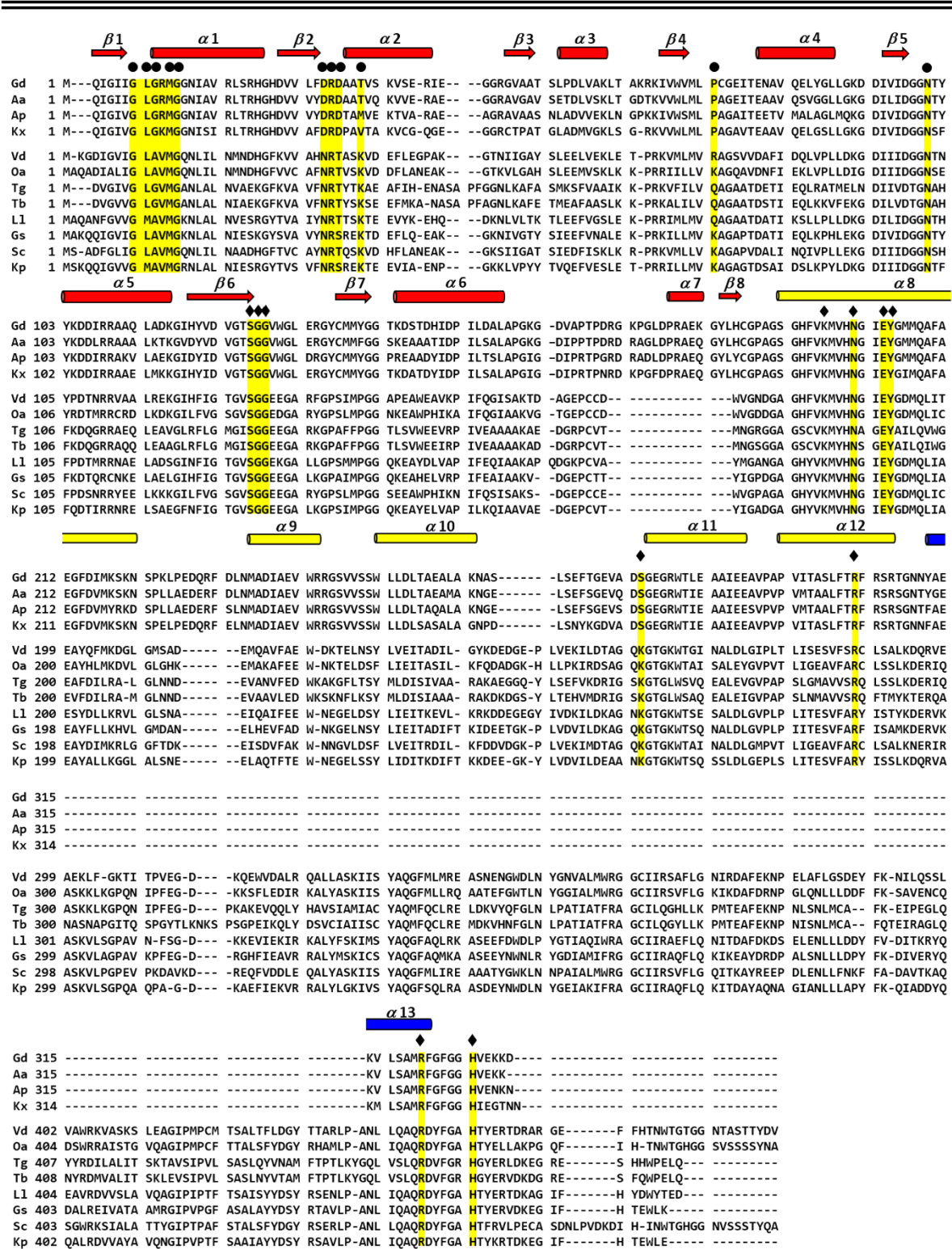


Figura 4.19 Alineado de las secuencias de amino ácidos de diversas 6PGDs. Se muestran las secuencias de aminoácidos de 6PGDs de *G. diazotrophicus* (*Gd*), *A. Aceti* (*Aa*), *A. pasteurianus* (*Ap*), *K. xylinus* (*Kx*), *V. diazotrophicus* (*Vd*), *O. arius* (*Oa*), *T. grayi* (*Tg*), *T. brucei* (*Tb*), *L. lactis* (*LI*), *G.*

stearothermophilus (*Gs*), *S. cerevisiae* (*Sc*) y *K. pneumoniae* (*Kp*). Los residuos de unión a sustrato y al cofactor en el sitio activo, se muestran resaltadas con color amarillo. Los círculos indican los residuos de unión al cofactor NAD(P)⁺ y los diamantes, los residuos de unión al sustrato. Se muestra también la estructura secundaria de *Gd*6PGD de acuerdo con los dominios de unión a sustrato (rojo), dominio helicoidal (amarillo) y el dominio carboxilo terminal (azul). Las flechas indican las hojas β (β 1 – β 8) y los cilindros las hélices α (α 1- α 13). Los números de acceso de la base de datos UniProt son: *Gd*, WP_012222546.1; *Aa*, A0A1U9KHR6; *Ap*, A0A1A0C5M2; *Kx*, A0A318PH64; *Vd*, A0A2J8G5Y6; *Oa*, P00349; *Tg*, XP_009309412.2; *Tb*, P31072; *Ll*, Q9CHU6; *Gs*, A0A087LGM2; *Sc*, P38720; *Kp*, P41576.

4.2.6.1 Residuos de unión al cofactor NAD(P)⁺

En el análisis de la secuencia de *Gd* 6PGD (Figura 4.19) se observa la presencia del motivo Gly7-Leu8-Gly9-Arg10-Met11-Gly12 que corresponde a la huella digital para NAD⁺, Gly-X-Gly-X-X-Gly [137, 138]. Este motivo también se observa en todas las secuencias de bacterias ácido-acéticas. Por el contrario, las secuencias de otros organismos poseen el motivo Gly-X-Ala-X-X-Gly que corresponde a la huella digital para NADP⁺ [101, 138]. Otro motivo importante para la unión al cofactor es el de Asp30-Arg31-Asp32, conservado en todas las bacterias ácido-acéticas, pero que cambia a Asn-Arg-Thr en otros organismos. Algunos estudios ya han hablado de la importancia de esta Thr para la unión a NADP⁺ [105, 139] y del Asp para la unión a NAD⁺ [138]. Esto es totalmente consistente con las actividades observadas para *Gd*6PGD frente a NAD⁺ y NADP⁺ (sección 4.2.4.2) y a los valores reportados de K_m para diversas 6PGDs (Tabla 4.7).

También son importantes los residuos Asn100, Ser126, Gly127 y Gly128 conservados en todas las 6PGDs. Por otro lado, los residuos Thr35 y Pro73 muestran una significativa diferencia entre las secuencias de bacterias ácido-acéticas y las de otros organismos. Mientras que no hay consenso entre las bacterias ácido-acéticas para la Thr35, en las secuencias de otros organismos se encuentra una Lys. Por el contrario, la Pro73 está conservada en todas las bacterias ácido-acéticas pero en otros organismos encontramos una Lys o bien una Gly.

4.2.6.2 Residuos de unión al sustrato 6-fosfogluconato

Al igual que para los residuos de unión al cofactor, existen reportes que han estudiado los residuos de unión al sustrato en las 6PGDs [94, 102]. Destaca principalmente el motivo Ser126-Gly127-Gly128 conservado en todas las secuencias estudiadas. Además, se ha propuesto la unión al sustrato por medio de puentes de hidrógeno a través de los residuos: Lys196, Asn200, Glu203, Tyr204, Ser276, Arg303, Arg 321 e His327. Todos estos residuos, excepto Ser276, están conservados en todas las secuencias. La Ser276, conservada en las bacterias ácido-acéticas, es reemplazada generalmente por una Lys en las secuencias de otros organismos.

Además de los residuos mencionados anteriormente, se ha propuesto que los residuos Glu203 y Glu278 interactúan indirectamente con el sustrato por medio de puentes de hidrógeno con moléculas de agua del medio. Mientras que el Glu203 está conservado en todas las secuencias, el Glu278 sólo está conservado en las bacterias ácido-acéticas y difiere de una Thr conservada en los otros organismos.

Las pocas diferencias encontradas en los residuos de unión al sustrato en las secuencias de las bacterias ácido-acéticas parecen ser suficientes para disminuir significativamente la afinidad de la enzima por el 6-fosfogluconato. Esto se puede ver en los altos valores de K_m (Tabla 4.7) en comparación con los de otros organismos.

4.2.7 Estructura tridimensional de la proteína *Gd6PGD*.

Una vez purificada la proteína, se montaron pruebas de cristalización empleando una solución amortiguadora de citrato de sodio (citrato de sodio 0.1 M, isopropanol, 10 % v/v; PEG 4000, 10 % m/v; pH 5.6) de acuerdo con lo reportado en la parte experimental 3.9.

Las pruebas de cristalización se llevaron a cabo por el método de gota sedente y de gota colgante utilizando una gota de 2 μ L de solución amortiguadora para cristalizar y 2 μ L de una solución de proteína a diferentes concentraciones (22, 33 y 69 mg/mL).

Resultados y discusión

Los mejores cristales (Figura 4.20) se sumergieron en una solución crioprotectora de sulfato de sodio saturado y difractaron a 1.9 Å (Tabla 4.8). Los cristales pertenecen al grupo espacial C121 y la dimensión de la celda unitaria encontrada fue de $a = 91.76 \text{ \AA}$, $b = 82.10 \text{ \AA}$ y $c = 81.83 \text{ \AA}$ con ángulos de $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 103.41^\circ$ y $\gamma = 90.00^\circ$.



Figura 4.20 Cristales de *Gd*6PGD obtenidos con una solución amortiguadora de citrato de sodio (citrato de sodio 0.1 M; isopropanol, 10 % v/v; PEG 4000, 10 % m/v ; pH 5.6) empleados para la resolución de la estructura tridimensional de *Gd* 6PGD.

Tabla 4.8 Datos cristalográficos del cristal de *Gd6PGD*

Código PDB	6VPB
Estadísticas de la difracción^a	
Longitud de onda (Å)	1.54
Grupo espacial	C121
Dimensiones de la celda	
a, b, c (Å)	91.76, 82.10, 81.83
α , β , γ (°)	90.00, 103.41, 90.00
Intervalo de resolución (Å)	36.48-1.87 (1.97-1.87)
Reflexiones únicas	48489 (2380)
Totalidad (%)	99.23 (99.9)
Multiplicidad	16.5 (8.2)
I/ σ (I)	51.6 (2.1)
R _{merge}	0.094 (1.156)
R _{meas}	0.097 (1.235)
R _{pim}	0.023 (0.426)
Factor-B de Wilson (Å ²)	25.7
CC1/2	0.95 (0.54)
Estadísticas de refinamiento	
R _{work} /R _{free}	0.184/0.220
Valor-B promedio (Å ²)	30.0
Átomos totales	5125
Proteína	4755
Ligantes (PEG)	11
Agua	358
Mg ²⁺	1
Enlaces-RMS (Å)	0.009
Ángulos-RMS (°)	0.995
Ramachandran favorecidos/atípicos (%)	98.43/1.57

^a Se muestran en paréntesis los valores para la capa con más alta resolución.

De acuerdo con la estructura tridimensional elucidada para Gd6PGD, la celda unitaria contiene ocho subunidades, o cuatro homodímeros (Figura 4.21).

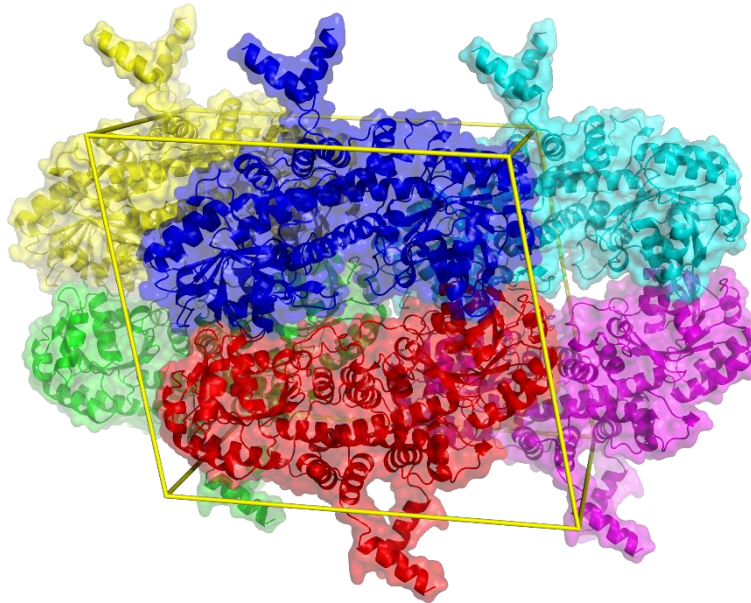


Figura 4.21 Celda unitaria de la estructura tridimensional de *Gd6PGD*. Podemos encontrar 4 homodímeros por celda unitaria.

Cada subunidad está formada por 3 dominios. El dominio I formado por los primeros 188 residuos, adopta la estructura típica del dominio Rossman y constituye el sitio de unión al nucleótido. Consiste en 8 hojas β paralelas en el orden β_3 , β_2 , β_1 , β_4 , β_5 , β_6 , β_7 y β_8 , rodeadas de siete hélices α . El dominio II, o dominio helicoidal, está formado por los residuos 189 – 307. El núcleo del dominio II lo forma una hélice α grande (α_8) rodeada de cuatro hélices α más pequeñas (α_9 – α_{12}). Finalmente, el dominio III está formado por los últimos 25 residuos (308-332) y consiste en una sola hélice alfa (Figura 4.22).

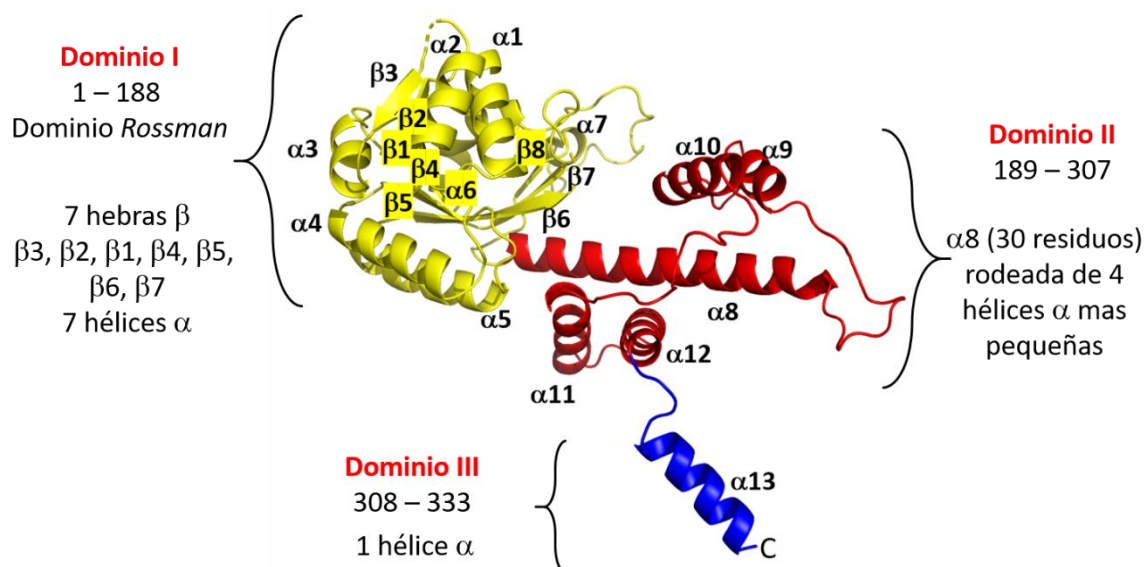


Figura 4.22 Estructura tridimensional del monómero de *Gd6PGD* mostrando el dominio I (amarillo), el dominio II (rojo) y el dominio III (azul).

Es importante mencionar que la estructura de *Gd6PGD* es la primera estructura de una 6PGD de bacteria ácido acética. La estructura es un homodímero y cada monómero está formado por tres dominios, algo que también se ha observado en otras 6PGDs reportadas [100-106], aunque hay diferencias importantes como se discutirá más adelante.

En *Gd6PGD*, la hélice α en el dominio III, hacia la región C-terminal, posee una secuencia (YAEKVLSAMRFGF) rica en residuos neutros e hidrofóbicos. Además, todos los residuos hidrofóbicos se encuentran orientados hacia el mismo lado de la hélice α , lo que le confiere un cierto carácter anfipático a la hélice α del dominio III (Figura 4.23). Recientemente se ha observado que las hélices α con carácter anfipático pueden asociarse a las membranas (e incluso modificar su estructura) y que pueden variar mucho en tamaño y composición de residuos [140, 141].

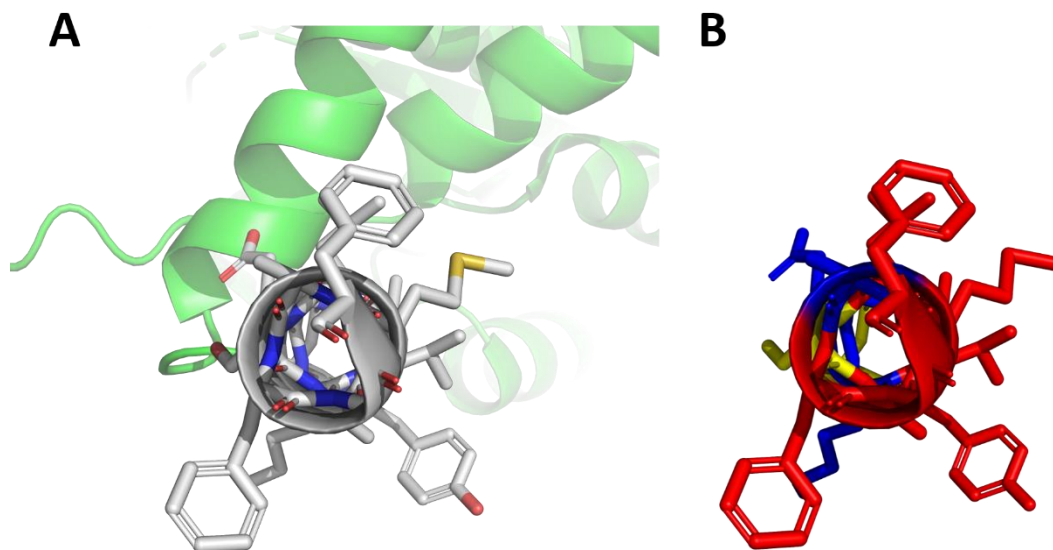


Figura 4.23 Dominio III de Gd6PGD. A) Se muestra la hélice α con las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. Los átomos de carbono se muestran en color gris, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul y los de azufre en color amarillo. B) Se muestra las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en rojo (residuos hidrofóbicos Y, A, V, L, M, R, F), amarillo (residuos polares neutros S) y azul (residuos polares con carga E, K, R).

El dímero está formado por dos cadenas iguales (Figura 4.24 A) que se encuentran unidas principalmente por fuerzas de van der Waals entre las dos hélices α 8 en el dominio helicoidal (Figura 4.24 B).

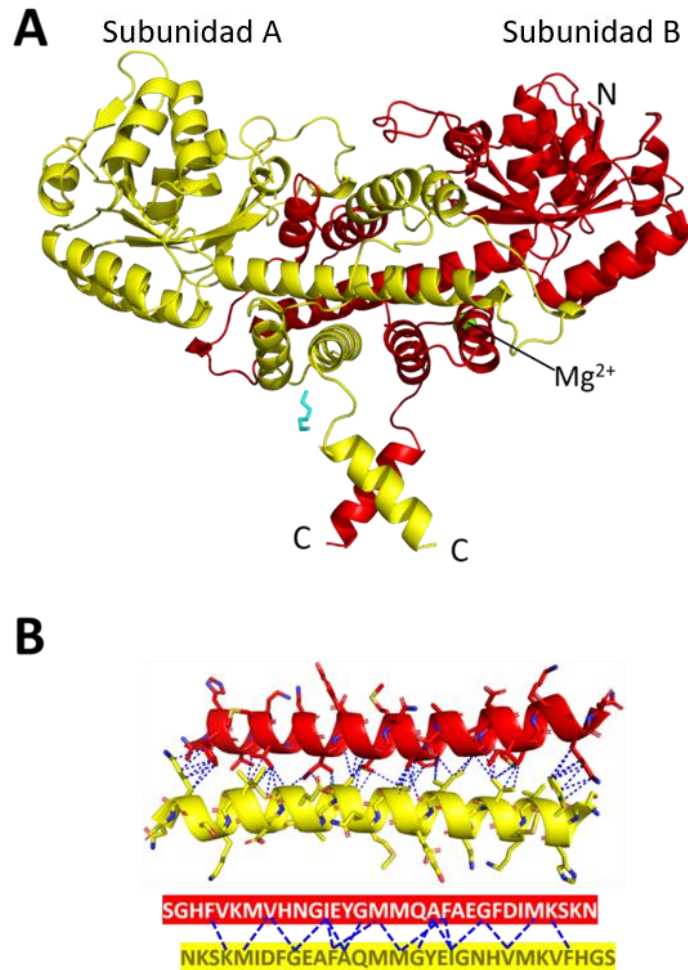


Figura 4.24 Dímero de *Gd6PGD*. A) estructura del homodímero con las subunidades A (amarillo) y B (rojo) B) interacción de las hélices $\alpha 8$ de la subunidad A (amarillo) y B (rojo).

En el dominio II de la subunidad B, en la hélice $\alpha 11$, existe un sitio de unión para un ion Mg^{2+} . Este catión está coordinado al oxígeno de la cadena principal de la Ser276, a una distancia de 2.2 Å, correspondiente a la distancia Mg^{2+} -oxígeno en otras proteínas. Además, está coordinado a la cadena lateral de Tyr203, Asp275 y a los nitrógenos de la cadena principal de la Gly279 y Arg280. El sitio de unión al ion Mg^{2+} se muestra en la Figura 4.25.

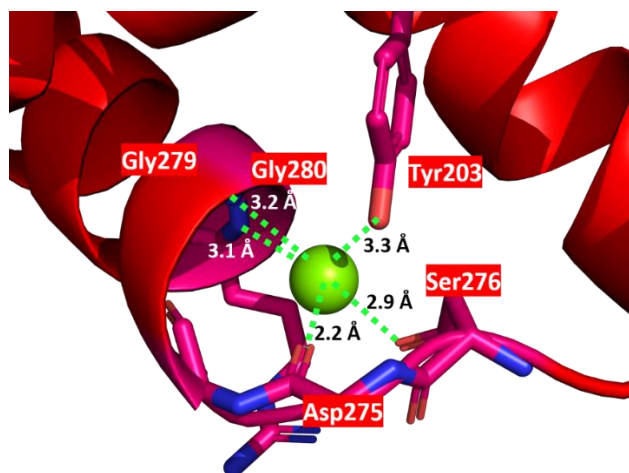


Figura 4.25 Sitio de unión y esfera de coordinación del ion Mg^{2+} en la subunidad B de *Gd6PGD*. Se muestran en color magenta los átomos de carbono, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul y el ión Mg^{2+} como esfera de color verde.

En la posición equivalente en la subunidad A, se encuentra en lugar de un ion Mg^{2+} , una molécula de agua unida por puentes de hidrógeno al Asp275 y a los nitrógenos de la cadena principal de Gly277, Gly279 y Arg280 como se muestra en la figura 4.26. Todas las distancias de enlace entre la molécula de agua y la proteína están en el intervalo de 3.0 – 3.3 Å. Dada la diferencia encontrada en el mismo sitio en la subunidad A y en la subunidad B, no parece que la coordinación a Mg^{2+} sea un elemento estructural esencial en el monómero de *Gd6PGD*.

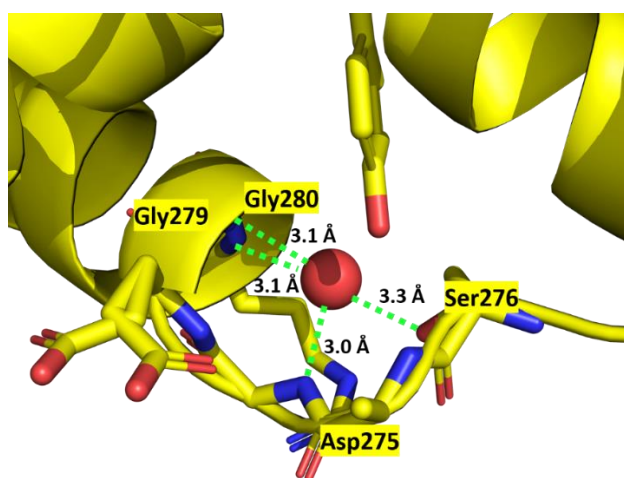


Figura 4.26 sitio de unión de la molécula de H_2O en la subunidad A de *Gd6PGD*. Se muestran los átomos de carbono en color amarillo, los de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul y la molécula de agua como esfera de color rojo.

4.2.7.1 Estructura del sitio de unión a NAD(P)⁺

De acuerdo con el análisis de los residuos de aminoácidos que unen al cofactor (sección 4.2.6.1) y observando la estructura obtenida para *Gd6PGD* es posible identificar el sitio de unión para NAD(P)⁺. Como se espera, estos residuos se encuentran en el dominio I. Específicamente el motivo Gly7-Leu8-Gly9-Arg10-Met11-Gly12, propio de unión a NAD⁺, se encuentra en el giro entre $\beta 1-\alpha 1$. El motivo Asp30-Arg31-Asp32 se localiza en el giro $\beta 2-\alpha 2$. Finalmente, en el giro $\beta 6 - \beta 7$ se pueden encontrar los residuos Ser126, Gly127 y Gly128.

La estructura de la 6PGD de *Ovis aries* se ha reportado en presencia del cofactor NADP⁺ con clave PDB 1PGO [100]. El comparar esta estructura con la de *Gd6PGD* (Figura 4.27) nos permite identificar los residuos de unión al cofactor NAD⁺ en esta última.

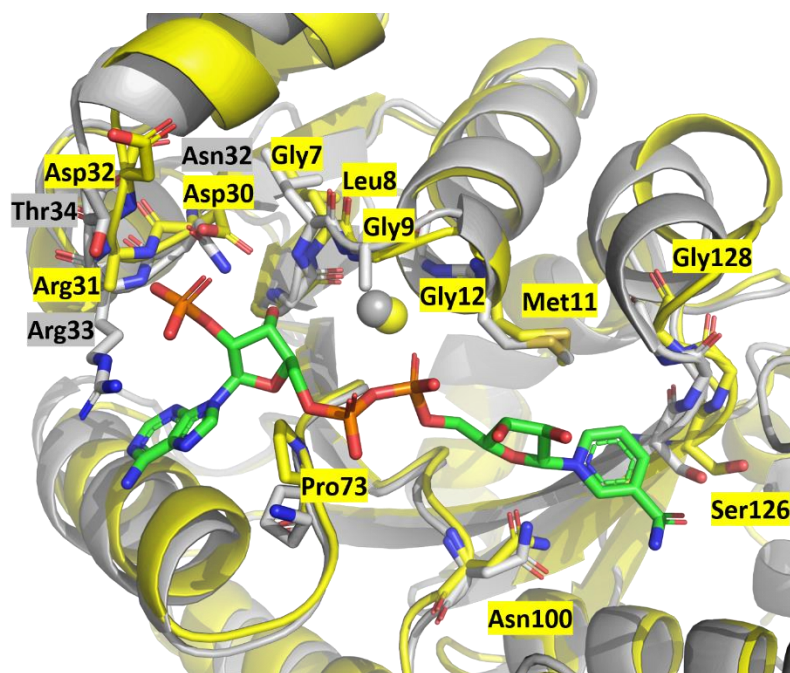


Figura 4.27 Sitio de unión al cofactor NAD(P)⁺ de las proteínas *Gd6PGD* (amarillo) y *Oa6PGD* (gris, PDB 1PGO [100]). El NADP⁺ de la estructura de *Oa* se muestra en verde y las moléculas de agua se muestran como esferas. Se muestran los átomos de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul y los de fósforo en color naranja.

Como se observa en la Figura 4.27, ambas estructuras son muy parecidas y resaltan los residuos Asp30, Arg31 y Asp32 en *Gd6PGD* que han sido sustituidos por Asn32, Arg33 y Thr34 en *Oa6PGD*. En particular, Thr34 en *Oa6PGD* interactúa con el grupo fosfato del NADP^+ . Por el contrario, el Asp32 en *Gd6PGD*, confiere una carga negativa que puede formar un puente de hidrógeno con el grupo 2'-hidroxilo de la adenina ribosa del NAD^+ (Figura 4.28) mientras que podría repeler al fosfato en el NADP^+ . Esta interacción del Asp32 en *Gd6PGD* explica la mayor afinidad por NAD^+ con respecto a NADP^+ ya deducida de antemano a partir de los valores de K_m para ambos cofactores (Tabla 4.7)

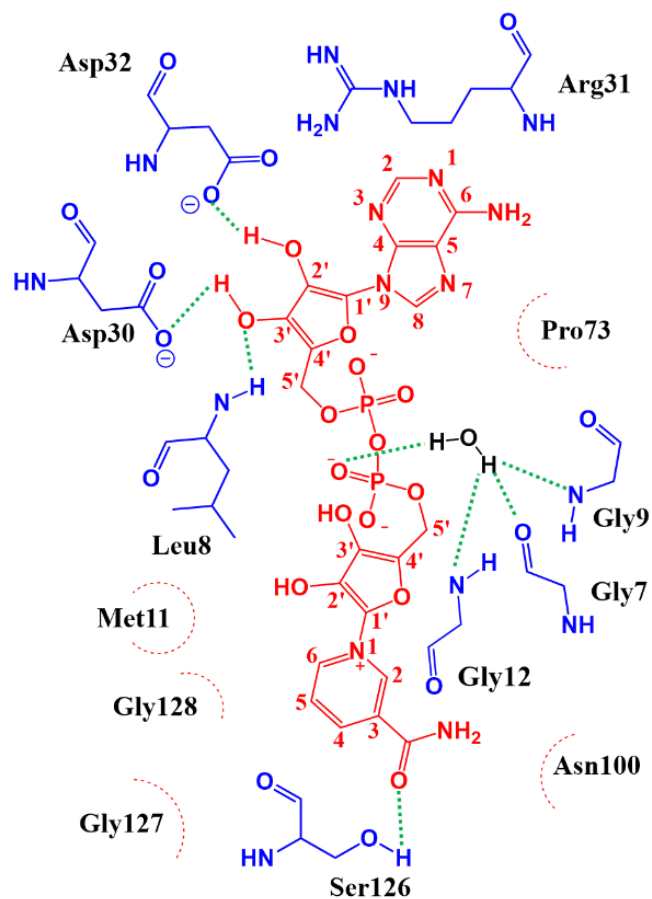


Figura 4.28 Interacción propuesta entre la proteína *Gd6PGD* y el cofactor NAD^+ . Se muestran los residuos de aminoácidos en color azul y el cofactor en color rojo. Las interacciones de puentes de hidrógeno se muestran como líneas punteadas de color verde.

4.2.7.2 Estructura del sitio de unión al sustrato 6-fosfogluconato

Al observar la estructura de *Gd*6PGD y considerando los residuos de unión al sustrato discutidos anteriormente (Sección 4.2.6.2) se puede identificar el sitio de unión al sustrato entre el dominio I y el dominio II. En el giro $\beta 6 - \beta 7$ se pueden encontrar los residuos Ser126, Gly127 y Gly128. En la hélice $\alpha 8$ los residuos Lys196, Asn200, Glu203 y Tyr204. Y los residuos Ser276 en el giro $\alpha 10 - \alpha 11$ y Ar303 en $\alpha 12$.

Se ha reportado la estructura de la 6PGD de *Lactococcus lacti* en presencia del sustrato 6-fosfogluconato con clave PDB 2IYO [102]. Al sobreponer esta estructura con la de *Gd*6PGD (Figura 4.29) podemos observar los residuos de unión al sustrato.

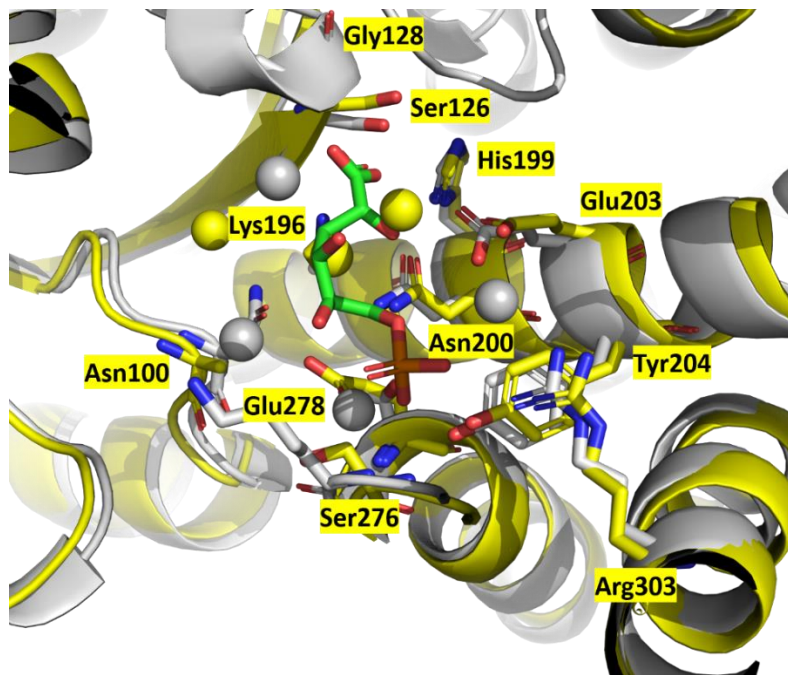


Figura 4.29 Sitio de unión al sustrato, 6-fosfogluconato, de las proteínas *Gd*6PGD (amarillo) y *L*/6PGD (gris, PDB 2IYO [102]). El 6-fosfogluconato de la estructura de *L* se muestra en verde y las moléculas de agua se muestran como esferas. Se muestran los átomos de oxígeno en color rojo, los de nitrógeno en color azul y los de fósforo en color naranja.

Como se observa en la Figura 4.29, ambas estructuras son muy parecidas y como se mencionó anteriormente, los residuos de unión al sustrato están, en general, bastante conservados en todas las 6PGDs. Con base en el análisis de las secuencias y la comparación

de la estructura del sitio activo se puede proponer el modo de unión del 6-fosfogluconato en la enzima *Gd6PGD* (Figura 4.30).

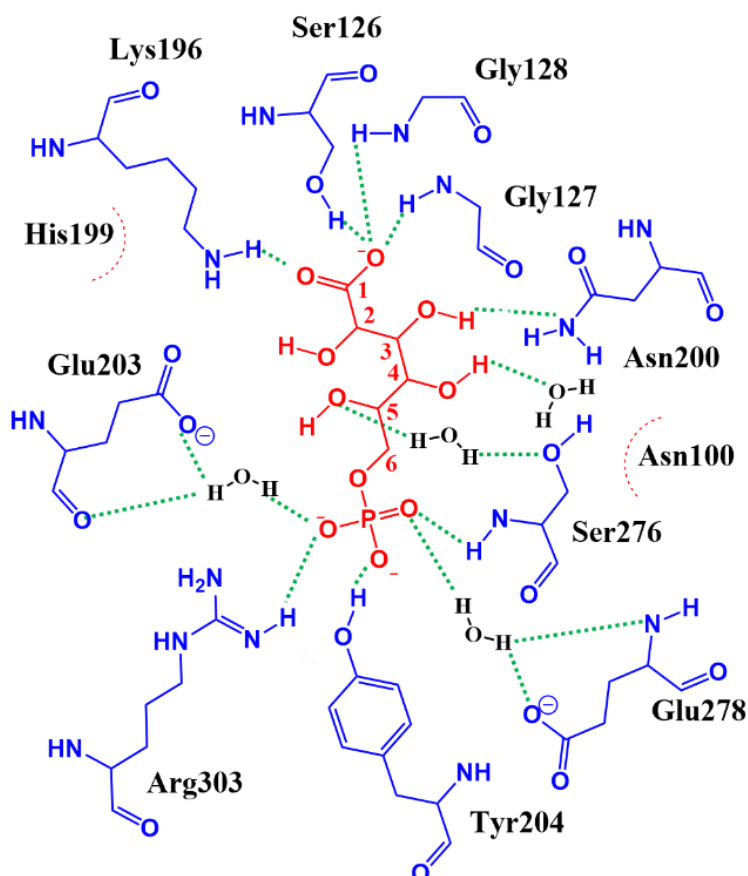


Figura 4.30 Interacción propuesta entre la proteína *Gd6PGD* y el sustrato 6-fosfogluconato. Se muestran los residuos de aminoácidos en color azul y el sustrato en color rojo. Las interacciones de puentes de hidrógeno se muestran como líneas punteadas de color verde.

4.2.8 Comparación de la estructura de *Gd6PGD* con otras proteínas

4.2.8.1 Estructura de diversas 6PGDs reportadas previamente

Existen en la base de datos del PDB 35 estructuras reportadas para 6PGDs de distintos organismos. Entre las proteínas más estudiadas se encuentran la de *Trypanosoma brucei* (*Tb*) (PDB 1PGJ) [101], *Lactococcus lactis* (*Ll*) (PDB 2IYO) [102], *Geobacillus stearothermophilus* (*Gs*) (PDB 2W8Z) [104], *Ovis aries* (*Oa*) (PDB 1PGO) [100] y *Homo*

sapiens (*Hs*) (PDB 4GWG) [106]. Todas las estructuras reportadas anteriormente poseen una estructura similar y de hecho, es posible sobreponerlas con valores de RMSD entre 0.72 y 0.82 Å.

Al igual que la *Gd6PGD*, la estructura general para las 6PGDs consiste en tres dominios. Un dominio I de unión a nucleótido con siete hélices α rodeando siete u ocho hojas β . El dominio helicoidal está formado por dos hélices α grandes rodeadas de 9 hélices α más pequeñas. El dominio III está formado por una única pequeña hélice α (Figura 4.31).

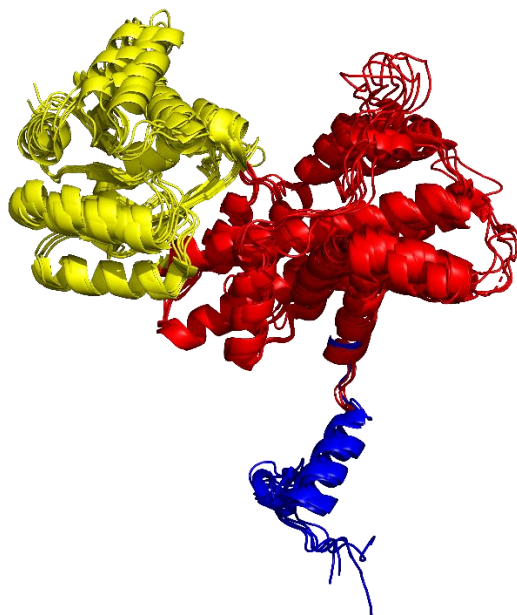


Figura 4.31 Sobreposición de las estructuras de 6PGD de *Trypanosoma brucei* (*Tb*) (PDB 1PGJ) [101], *Lactococcus lactis* (*Ll*) (PDB 2IYO) [102], *Geobacillus stearothermophilus* (*Gs*) (PDB 2W8Z) [104], *Ovis aries* (*Oa*) (PDB 1PGO) [100] y *Homo sapiens* (*Hs*) (PDB 4GWG) [106]. La desviación RMSD para la sobreposición de las estructuras está entre 0.72 y 0.82 Å. Se muestra el dominio I (amarillo), dominio II (rojo) y dominio III (azul).

4.2.8.2 Comparación estructural entre *Gd6PGD* y *Oa6PGD*

Al comparar las estructuras presentadas en la Figura 4.31 con la estructura de la *Gd6PGD* (Figura 4.22) resulta evidente que el dominio helicoidal es más pequeño en la *Gd6PGD*. Mientras que en *Gd6PGD* consiste en una hélice α grande rodeada de 4 hélices α

más pequeñas, en las otras estructuras consiste en dos hélices α grandes rodeadas de 9 hélices α más pequeñas. Lo anterior se debe a que, como se comentó en la sección 4.2.6, la secuencia de las bacterias ácido-acéticas es más corta que las de otros organismos en aproximadamente 150 residuos. De hecho, ya se había reportado anteriormente [142] que existía una repetición del dominio II en *Oa6PGD* como se puede observar en los diagramas topológicos de la Figura 4.32. Estructuralmente, en *Oa6PGD* las hélices $\alpha 8 - \alpha 12$ se pueden superponer a las hélices $\alpha 14 - \alpha 18$ en un 83%.

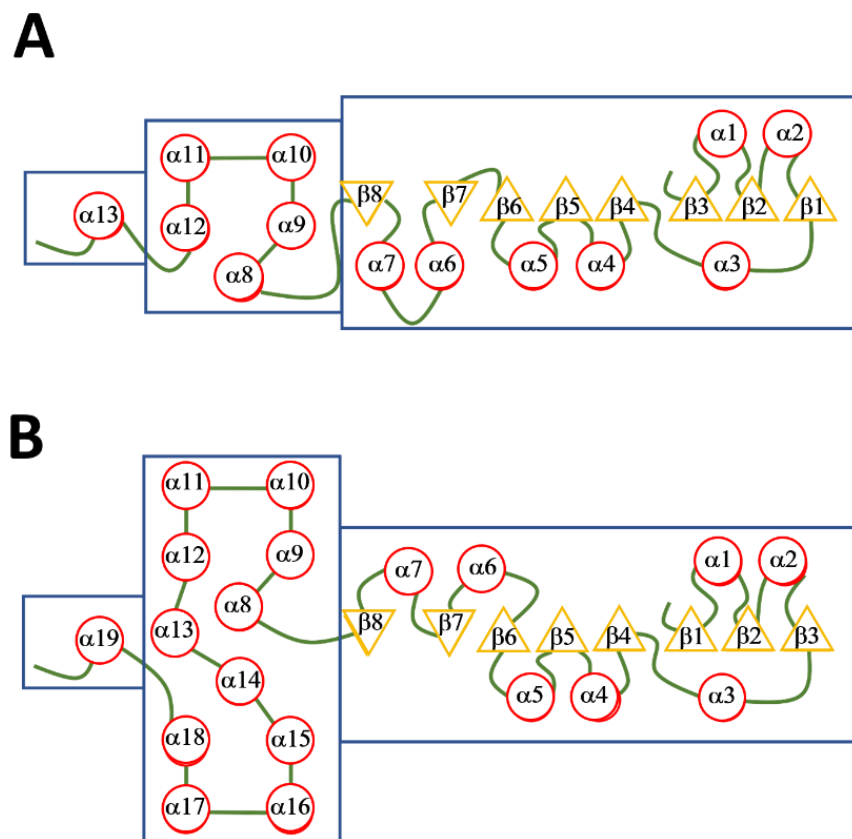


Figura 4.32 Diagramas topológicos para las proteínas A) *Gd6PGD* y B) *Oa6PGD*. Se muestran la estructura secundaria de las proteínas, las hélices α como círculos rojos, las hojas β como triángulos amarillos y los giros como líneas verdes. Se puede observar la repetición del dominio II en *Oa6PGD* (hélices $\alpha 8 - \alpha 18$).

Las estructuras de la *Gd6PGD* y de la *Oa6PGD* se superponen muy bien en el dominio I y en la mitad del dominio II (con una desviación RMSD de 1.08 Å) (Figura 4.33).

Sin embargo, al ser el dominio II más corto en *Gd6PGD*, los dominios III quedan orientados hacia lados opuestos.

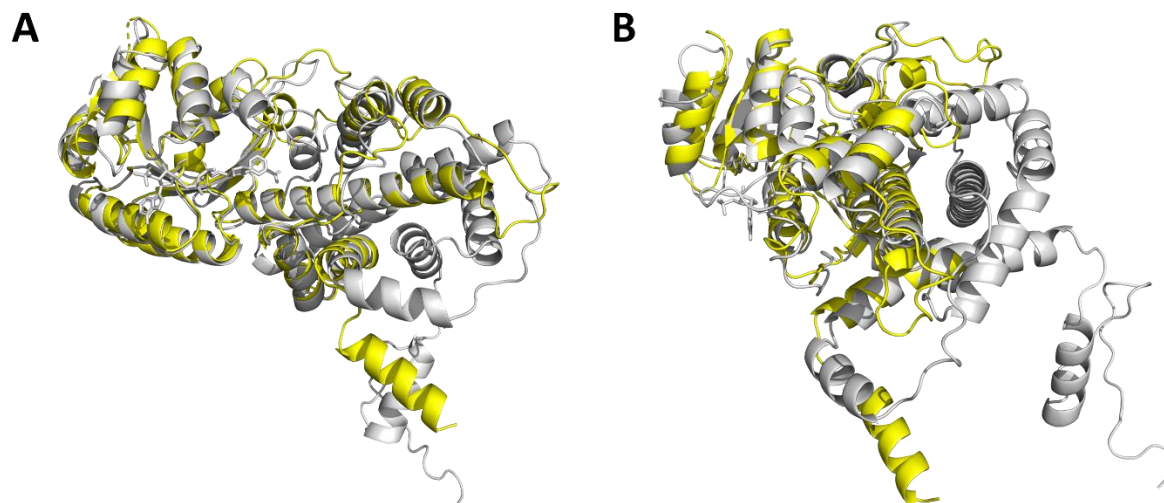


Figura 4.33 Sobreposición de las estructuras de *Gd6PGD* (amarillo) y *Oa6PGD* (gris). A) se puede apreciar la sobreposición del dominio I en ambas estructuras. B) Al girar 90 ° a la izquierda, se observa la sobreposición únicamente en la mitad del dominio II. Como consecuencia, los dominios III quedan orientados hacia lados opuestos.

4.2.8.3 Comparación de los dímeros de *Gd6PGD* y *Gs6PGD*

Todavía más importante resulta el comparar los dímeros de estructuras previamente reportadas (*Gs6PGD*) con el dímero de *Gd6PGD* (Figura 4.34). En el caso de *Gs6PGD*, el dominio III de cada una de las subunidades se inserta en el dominio helicoidal de la otra subunidad. Por el contrario, dado que en *Gd6PGD* el dominio III está orientado hacia el lado opuesto, en el dímero quedan las hélices α en los dominios III expuestos al medio como se mencionó anteriormente (sección 4.2.7).

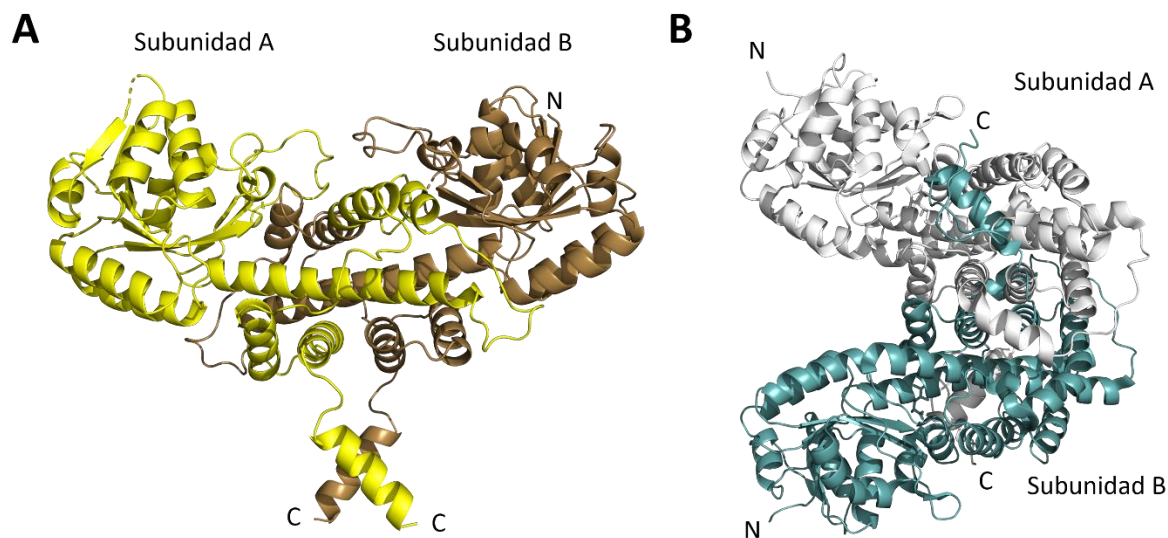


Figura 4.34 Comparación de los dímeros de A) *Gd6PGD* y B) *Gs6PGD*. Se puede observar que en el caso de *Gd6PGD* las hélices α de los dominios III quedan expuestas a diferencia de lo que ocurre en *Gs6PGD*.

La exposición de los dominios III en *Gd6PGD*, con residuos neutros e hidrofóbicos que le confieren un carácter anfipático, podría permitir su asociación a la membrana. Al comparar los dímeros de la Figura 4.34 es claro que en las estructuras reportadas anteriormente esta asociación no sería posible, lo que explica que no haya reportes anteriores de 6PGDs asociadas a la membrana. Dado que esta característica de la secuencia más corta se observa en todas las secuencias de las bacterias ácido-acéticas, cabría preguntarse si todas ellas tienen la misma propiedad de asociarse a la membrana. Por otro lado, sería conveniente la preparación de una mutante de *Gd6PGD* sin el dominio III que permitiera confirmar que la asociación a la membrana se da de la manera propuesta.

4.2.9 Papel biológico de *Gd6PGD*

Ga. diazotrophicus como la mayoría de las bacterias ácido-acéticas usa la vía de las pentosas fosfatadas como la ruta principal para el catabolismo del carbono y obtención de energía [86-91]. Por ello, *Gd6PGD* es una enzima clave en el metabolismo interno que se lleva a cabo en el citoplasma de la bacteria y el hecho de que pudiera asociarse a la

membrana le permitiría una difusión más rápida del NADH a la NDH debido a la proximidad de ambas proteínas. En la célula, tanto la respiración citoplásmica (por medio de la NDH) como la fermentación oxidante (por medio de las deshidrogenasas de membrana como *GdADH-III*) compiten por ceder sus electrones a la ubiquinol oxidasa por medio de la ubiquinona [22, 115]. Ambos procesos ocurren en distintos momentos del cultivo de la bacteria [22] y no es del claro el mecanismo por el cual se regula la actividad de la fermentación oxidante [115]. En *Ga. diazotrophicus* la asociación de *Gd6PGD* a la membrana podría actuar como sensor de la actividad del metabolismo interno ayudando así a la regulación de la fermentación oxidante (Figura 4.35).

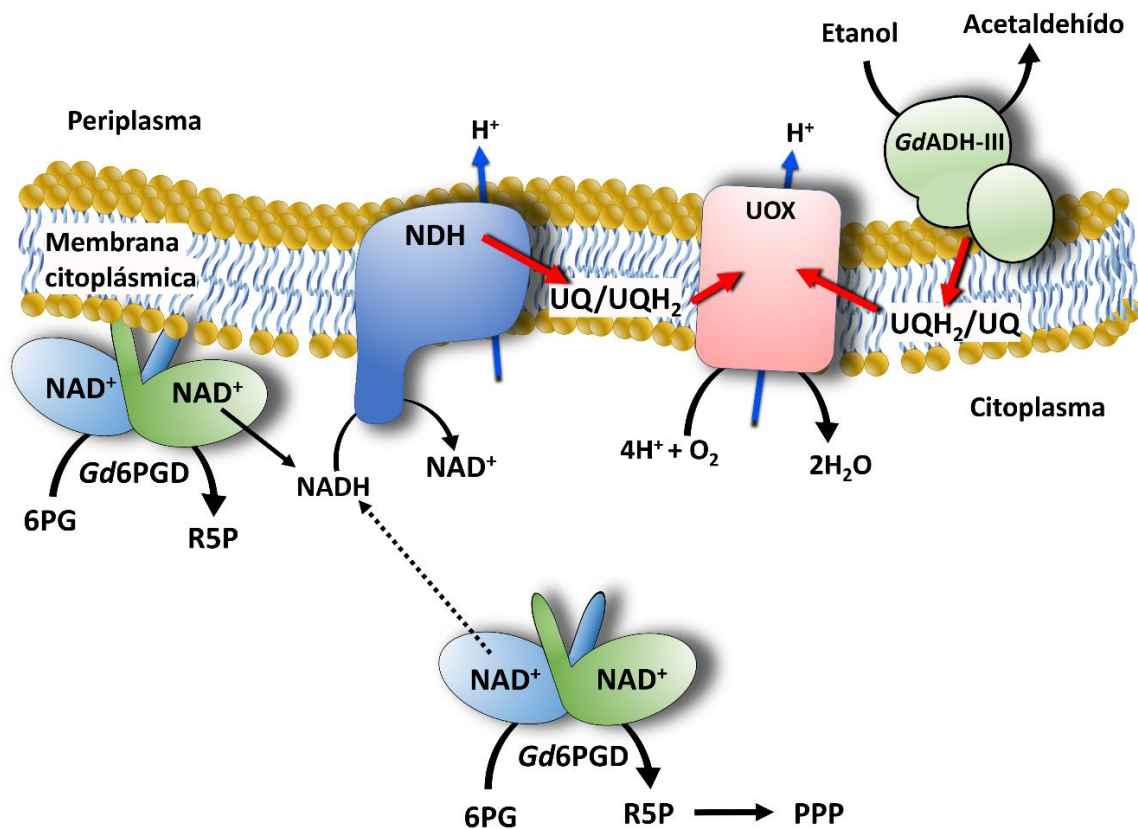


Figura 4.35 Relación entre el metabolismo interno de azúcares (*Gd6PGD*) y externo de alcoholes (*GdADH-III*) en *Ga. diazotrophicus*. *GdADH-III* participa en la fermentación oxidante y se encuentra acoplada a la cadena respiratoria para proveer de energía a la bacteria. En el citoplasma, la proteína *Gd6PGD* participa en la vía de las pentosas fosfatadas siendo esencial para el metabolismo interno de la bacteria. El NADH difunde hasta la NADH-deshidrogenasa (NDH) que cede sus electrones a la ubiquinona (UQ) y posteriormente a las ubiquinol oxidasa (UOX). La asociación de *Gd6PGD* a la membrana le permite una rápida difusión del NADH a la NDH debido a la proximidad de ambas proteínas, pudiendo actuar como sensor de la actividad del metabolismo interno de la bacteria.

4.2.10 Análisis filogenético de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Con la intención de comprender mejor las diferencias encontradas entre las 6PGDs, se decidió llevar a cabo un análisis filogenético para dichas proteínas. Se analizaron un total de 150 secuencias de aminoácidos, no redundantes, obtenidas de las bases de datos UniProt [127] y GeneBank [128]. De las especies estudiadas hay 91 bacterias, 2 arqueas, 8 hongos, 14 protozoarios, 11 plantas y 24 animales.

Las secuencias se clasificaron de acuerdo con la longitud de la secuencia (Figura 4.36) encontrando dos grupos principales. Un grupo de proteínas de entre 290 y 350 residuos de amino ácidos, al cual se le llamó de “cadena corta”, y otro grupo de proteínas de entre 450 y 500 residuos al que se le llamó de “cadena larga”.

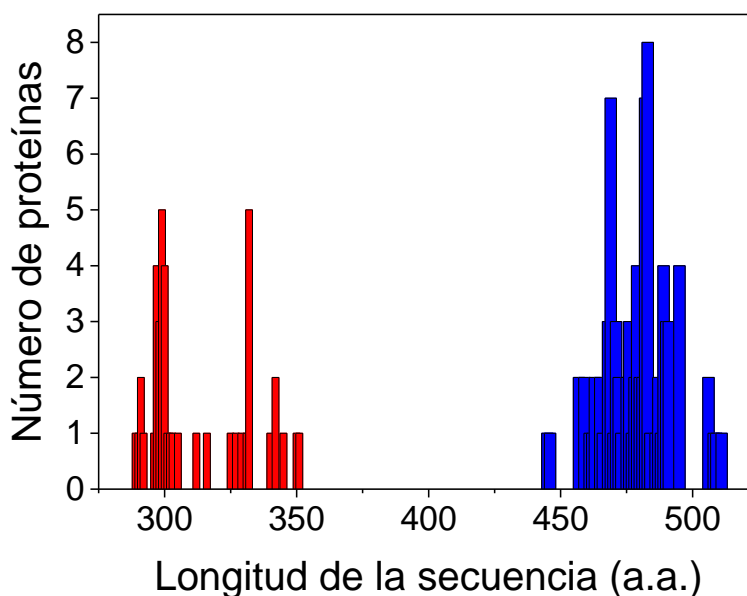


Figura 4.36 Distribución de las secuencias estudiadas de acuerdo con el número de residuos de amino ácidos de la secuencia. Existe un grupo de secuencias de “cadena corta” de entre 290 y 350 residuos (rojo) y un grupo de secuencias de “cadena larga” de entre 450 y 500 residuos (azul).

Las 150 secuencias fueron alineadas por medio del programa MUSCLE [129, 130] y posteriormente se realizaron varios análisis filogenéticos con el programa MEGA 10.1.6 [131]. Se emplearon métodos basados en distancia (pares de grupos no ponderados usando la media aritmética, UPGMA; vecino más cercano, NJ y mínima evolución, ME) y métodos

basados en caracteres (máxima parsimonia, MP y máxima verosimilitud, ML). Se utilizó un valor de confianza de Bootstrap de 500 réplicas en todos los casos. Una lista de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético se puede encontrar en el Apéndice C.

Al analizar las secuencias de 150 6PGDs, lo primero que resalta es que existan proteínas de “cadena corta” y de “cadena larga” como se observa en la Figura 4.36. El análisis filogenético muestra que, de hecho, existen dos subfamilias de las 6PGDs (Figura 4.37). Aunque ya se había reportado la existencia de deshidrogenasas de cadena corta y de cadena larga (específicamente para la gluco-6-fosfato deshidrogenasa [143]), nunca se había mencionado la existencia de una subfamilia de enzimas de cadena corta para las 6PGDs.

En la Figura 4.37 se muestra el árbol filogenético obtenido por el método de máxima parsimonia. En dicho árbol es posible observar dos ramas bien diferenciadas, mostradas en rojo y azul en la Figura 4.37, que corresponden a los grupos de proteínas de cadena corta y cadena larga respectivamente. Esto nos indica que cada grupo estaría formando una subfamilia dentro de las 6-fosfogluconato deshidrogenasas.

En cuanto a la distribución de las diferentes especies, podemos encontrar arqueas y bacterias en ambas subfamilias. Sin embargo, los eucariontes se encuentran únicamente dentro de la subfamilia de las 6PGDs de cadena larga.

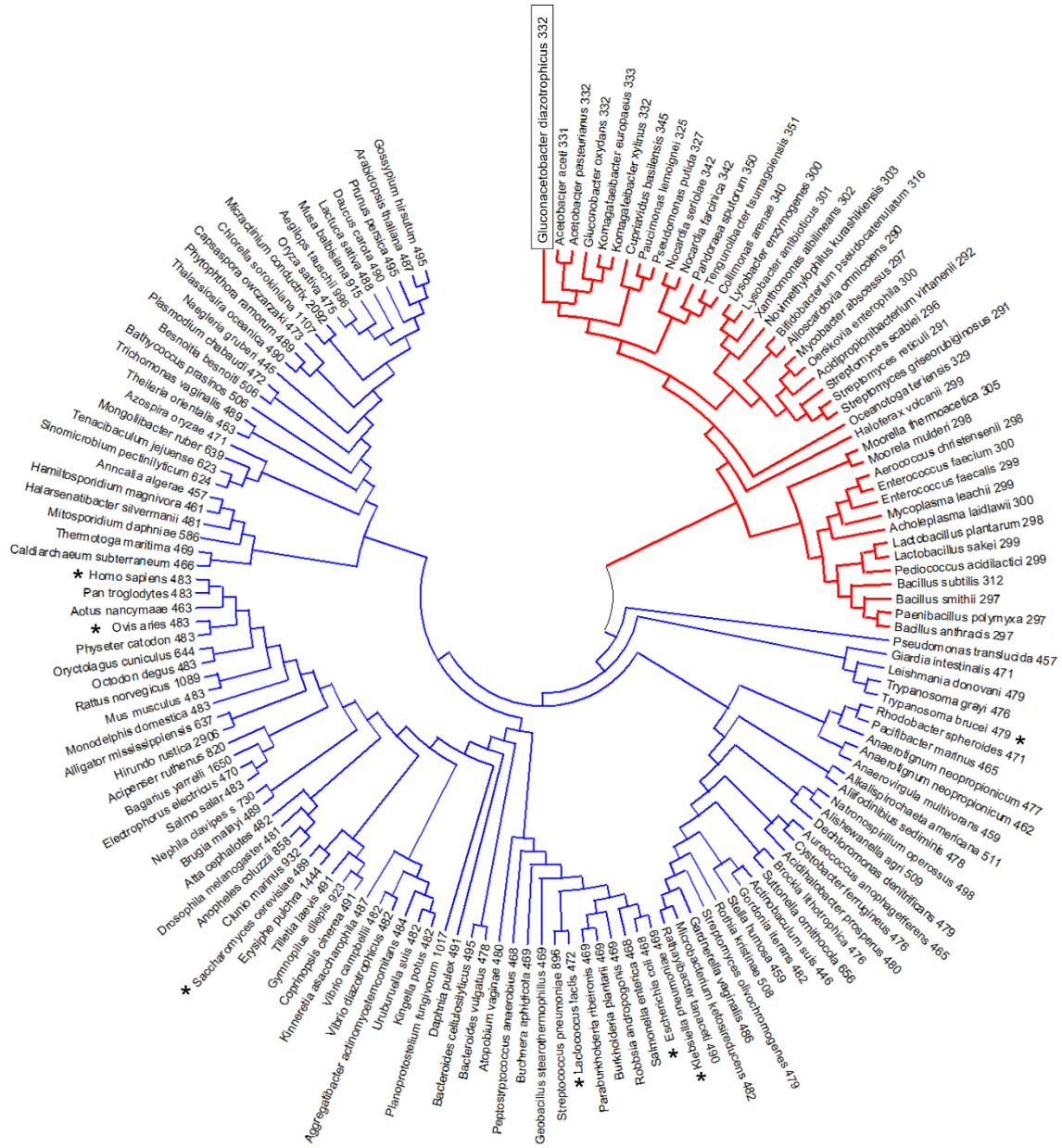


Figura 4.37 Árbol filogenético construido para las secuencias de 6PGDs. Las ramas azules indican la subfamilia de proteínas de cadena larga y las ramas rojas la subfamilia de las proteínas de cadena corta. Las especies que representa cada nodo están indicadas junto con la longitud de la secuencia. Los asteriscos indican las proteínas cuya estructura tridimensional se conoce.

4.2.10.1 Unión a los cofactores NAD⁺ y NADP⁺ en las subfamilias de 6PGDs

Al analizar las secuencias para cada una de las subfamilias de 6PGDs se puede observar que, en las proteínas de cadena corta (Figura 4.38), el motivo Gly-X-Gly-X-X-Gly está conservado. Como se ha discutido anteriormente, éste corresponde a la huella digital de unión para el NAD⁺. Además, entre los residuos de unión a nucleótido, el Asp en el motivo Asp-Arg-X está conservado en el 75 % de las secuencias. De acuerdo con lo discutido en la sección 4.2.7.1, este Asp promueve la interacción con el grupo 2'-hidroxilo de la adenina ribosa del NAD⁺. Todo esto indica que la subfamilia de 6PGDs de cadena corta son enzimas dependientes de NAD⁺.

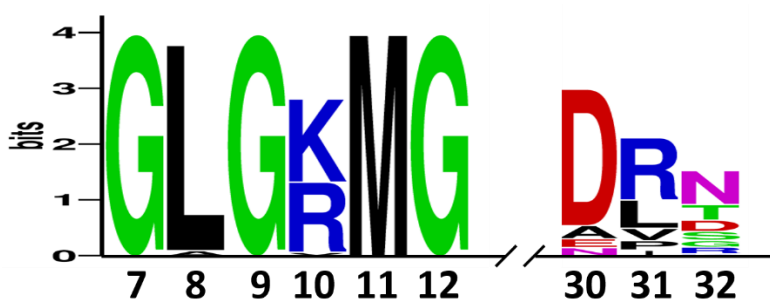


Figura 4.38 Secuencias LOGO de las proteínas de cadena corta donde se observa de la conservación de las secuencias en los residuos de unión al cofactor NAD⁺. Se muestra el número de residuos correspondientes a *Gd6PGD*. La altura del símbolo representa la frecuencia de dicho aminoácido en esa posición. Secuencia generada con ayuda de WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>)

Por el contrario, en las proteínas de cadena larga (Figura 4.39), el motivo Gly-X-Ala/Gly-X-X-Gly está conservado en la huella digital para unión a nucleótido. Además, el motivo Asn-Arg-X, está conservado en el 85 % de las secuencias. En contraste con la secuencia en las proteínas de cadena corta, en estos residuos no existe una carga negativa por lo que no habría repulsión con el grupo fosfato del NADP⁺. Esto sugiere que la mayoría de las proteínas de la subfamilia de 6PGDs de cadena larga son dependientes de NADP⁺.



Figura 4.39 Secuencias LOGO de las proteínas de cadena larga donde se observa de la conservación de las secuencias en los residuos de unión al cofactor NADP⁺. Se muestra el número de residuos correspondientes a Gd6PGD. La altura del símbolo representa la frecuencia de dicho aminoácido en esa posición. Secuencia generada con ayuda de WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>)

Lo anterior es consistente con los valores de K_m mostrados en la Tabla 4.7. Las proteínas de cadena corta (*Ga. diazotrophicus*, *G. suboxydans* y *H. volcanii*) tienen valores mucho más pequeños para NAD⁺ que para NADP⁺, lo que indica su mayor afinidad. Por el contrario, en las proteínas de cadena larga, los valores de NADP⁺ tienden a ser pequeños y en general se reporta que no presentan actividad frente a NAD⁺.

5. Conclusiones

Se cristalizó la proteína *GdADH-III*. Para que la proteína pueda cristalizar es importante que todos los cofactores se encuentren completamente reducidos. En particular, la oxidación parcial de Cl y ClI_1 impide que la proteína cristalice.

El NO es capaz de oxidar parcialmente a *GdADH-III* formando tres aductos Fe(III)-NO y un aducto Fe(II)-NO que ha sido estudiado por EPR. Esto contrasta con otras proteínas donde el NO únicamente forma aductos con los grupos hemo sin oxidarlos.

El estudio de la proteína oxidada confirma la presencia de un grupo hemo con hierro de alto espín y confirma la estabilidad del estado reducido del PQQ y del cúmulo [2Fe-2S].

La bacteria *Ga. diazotrophicus* es capaz de crecer en ausencia de Ca^{2+} y en presencia de lantánidos, específicamente La^{3+} y Ce^{4+} , sin perder la actividad de ADH. Esto parece indicar que la bacteria tiene un mecanismo molecular de reconocimiento de iones lantánidos y que la *GdADH-III* podría incorporar dichos iones en sustitución al Ca^{2+} .

La *Gd6PGD* se puede aislar y purificar tanto de la fracción soluble como de la fracción membranal. Los estudios cinéticos muestran que la proteína en ambas fracciones es la misma y que existe una inhibición por el Tritón X-100 de tipo incompetitiva. Además, hay una preferencia por el NAD^+ aunque también es activa con NADP^+ . Esto se confirmó con el análisis bioinformático y comparación de secuencias de varias 6PGDs.

La estructura de *Gd6PGD* a una resolución de 1.9 Å es la primera de una 6PGD de bacterias ácido acéticas. La estructura es un homodímero de 70 kDa y cada subunidad consiste en tres dominios.

En el dímero de *Gd6PGD* las hélices α de los dominios III, con carácter anfipático, quedan expuestas lo que podría explicar su asociación a la membrana. Esta particularidad en la estructura de *Gd6PGD* resulta de la secuencia de aminoácidos más corta en comparación con otras 6PGDs.

Conclusiones

Además de su importancia para el metabolismo interno de la bacteria, la asociación a la membrana de *Gd6PGD*, permitiría una rápida transferencia del NADH a la NDH debido a su proximidad. Lo que le permitiría actuar como sensor del metabolismo interno ayudando a la regulación de la fermentación oxidante.

Gd6PGD pertenece a una nueva subfamilia de 6PGDs de cadena corta, dependientes de NAD⁺ como lo demuestra el análisis filogenético.

Publicaciones

Como consecuencia directa del trabajo de tesis, se publicaron los siguientes trabajos:

- Sarmiento-Pavía, P.D., Rodríguez-Hernández, A., Rodríguez-Romero, A., Sosa-Torres, M.E. (2021) The structure of a novel membrane-associated 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd6PGD) reveals a subfamily of short-chain 6PGDs. *FEBS J.* 288, 1286. DOI: 10.1111/febs.15472 (Apéndice A)
- Sarmiento-Pavía, P.D., Sosa-Torres, M.E. (2021) Bioinorganic insights of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem.* DOI: 10.1007/s00775-021-01852-0. (Apéndice B)

Parte de este trabajo ha sido presentado en los siguientes foros:

- FEBS Combined practical and lecture course Chemistry of Metals in Biological Systems, 2017. Louvain-la-Nouve, Bélgica.
- V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias, 2017 Chautla, Puebla
- Encuentro de Química Inorgánica, 2017. Hermosillo Sonora

Además, durante el desarrollo del trabajo de doctorado se publicaron los siguientes trabajos:

- Castro-Martínez, F.M., Páez-López, R.D., Sarmiento-Pavía, P.D., Kroneck, P.M.H., Sosa-Torres, M.E. (2020) Cytochrome P450, the Dioxygen-Activating Heme Thiolate. (En: Sosa-Torres, M.E., Kroneck, P.M.H. Transition metals and sulfur – A strong relationship for life) *Metal Ions in Life Science* 20. 165-197 DOI: [10.1515/9783110589757-012](https://doi.org/10.1515/9783110589757-012)
- Sarmiento-Pavía, P.D., Flores-Álamo, M., Solano-Peralta, A., Kroneck, P.M.H., Sosa-Torres, M.E. (2017) Copper (II)-mediated oxidative dehydrogenation of amine ligands. *Inorgánica Chimica Acta* 481. 189. DOI: 10.1016/j.ica.2017.10.019

Referencias

1. Komagata, K., Lino, 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.
2. Massena, V., dos Santos, K.R. (2015) Nitrogen fixing bacteria in the family *Acetobacteraceae* and their role in agriculture. *J. Basic. Microbiol.* 55, 931.
3. Shinjoh, M., Toyama, H. (2016) Industrial application of acetic acid bacteria (vitamin C and others). (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
4. Pothakos, V., Illegghems, K., Lureys D., Spitaels, F., Vandamme, P., De Vuyst, J. (2016) Acetic acid bacteria in fermented food and beverages ecosystems (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
5. Murooka, Y. (2016) Acetic acid bacteria in production of vinegars and traditional fermented foods. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.)
6. Tonouchi N. (2016) Cellulose and other capsular polysaccharides of acetic acid bacteria. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
7. Yamada, Y. (2016) Systematics of acetic acid bacteria. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
8. Cavalcante, V.A., Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108, 23.
9. Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J., De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicum* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 361.
10. 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. Environ. Microbiol.* 63, 3676.
11. Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Curr. Sci.* 83, 137.
12. 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.
13. Ramírez-Fuentes, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-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.

14. 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.
15. Burris, R.H. (1994). Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandi* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH. *Protoplasma.* 183, 62.
16. Dutta, D., Gachhui, R. (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrofigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1899.
17. 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.
18. Nelson, D., Cox, M.M. (2013) *Lehninger principles of Biochemistry*. Freeman 6^a ed. Nueva York.
19. 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*. Springer. Dordrecht.
20. Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urdua, 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.
21. Dalton, H., Postgate, J.R. (1969) *Growth and physiology of Azotobacter chroococcum in continuous culture*. *J. Gen. Microbiol.* 54, 463.
22. Matsushita, K., Matsutani, M. (2016) Distribution, evolution and physiology of oxidative fermentation. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
23. Adachi, O., Yakushi, T. (2016) Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. *Acetic Acid Bacteria*). Springer, Tokio.
24. Yakushi, T., Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1257.
25. Thurner, C., Vela, C., Thony-Meyer, L., Meile, L., Teuber, M. (1997) Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Arch Microbiol.* 168, 81.
26. Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1984) D-gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyaceticus*: purification and characterization. *Agr Biol Chem.* 48, 1517.
27. Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M (1981) Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem.* 45, 1079.
28. Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. (1981) D-Fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. *J Bacteriol.* 145, 814.
29. Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1982) Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. alpha. *Agric Biol Chem.* 46, 135.

30. Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi O. (1981) D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: solubilization, purification and characterization. *Agric Biol Chem.* 45, 851.
31. Vangnai A.S., Toyama, H., De-Eknamkul, W., Yoshihara, N., Adachi, O., Matsushita, K. (2004) Quinate oxidation in *Gluconobacter oxydans* IFO3244: purification and characterization of quinoprotein quinate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* 241,157.
32. Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T., Adachi, O. (2003) 5-Keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol.* 69, 1959.
33. Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 36, 247.
34. 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*. *Biochem.* 153, 535.
35. González, B., Martínez, S., Chávez, J.L., Lee, S., Castro, N.A., Domínguez, M.A., Gómez, S., Contreras, M.L., Kennedy, C., Escamilla, J.E. (2006) Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence of a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Biochim et Biophys Acta.* 1757, 1614.
36. 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.
37. Matsutani, M., Hirakawa, H., Sriherfyna, F. H., Yakushi, T., Matsushita, K. (2019) Diversity of NADH dehydrogenases in acetic acid bacteria: adaptation to modify their phenotype through gene expansions and losses and neo-functionalization. *Microbiology.* 165, 287.
38. Mamlouk, D., Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J. Microbiol.* 53, 377.
39. Chinnawirotpisan, P., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O., Limtong, S., Theeragool, G. (2003). 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, 958
40. Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K. (2003). 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.
41. Gvozdev, A.R., Tukhvatullin, I.A., Gvozdev, R.I. (2012). Quinone-dependent alcohol dehydrogenases and FAD-dependent alcohol dehydrogenases. *Biochemistry (Moscow)* 77, 843.
42. Toyama, H., Mathews, F.S., Adachi, O., Matsushita, K. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function and physiology. *Arch.Biochem. Biophys.* 428, 10.
43. Keltjens JT, Pol A, Reimann J, Op den Camp HJM (2014) PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 6163.

44. 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.
45. 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-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J. Mol. Biol.* 352, 91.
46. Vangnai, A.S., Arp, D.J. (2001) An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohemoprotein, is involved in the oxidation of butane by *Pseudomonas butanovora*. *Microbiol.* 147, 745.
47. 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.
48. Zarn, G., Schrader, T., Andreesen, J.R. (2001). Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *J. Bacteriol.* 183, 1954
49. Groen, B.W., van Kleef, M.A., Duine, J.A. (1986). Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem.* 234, 611.
50. Chen ZW, Matsushita K, Yamashita T, Fujii TA, Toyama H, Adachi O, Bellamy HD, Mathews FS (2002) Structure at 1.9 Å resolution of a quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5. *Structure* 10, 837.
51. Yasuda M, Cherepanov A, Duine JA (1996) Polyethylene glycol dehydrogenase activity of *Rhodospseudomonas acidophila* derives from a type I quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 23.
52. Afolabi PR, Mohammed F, Amaratunga K, Majekodunmi O, Dales SL, Gill R, Thompson D, Cooper JB, Wood SP, Goodwin PM, Anthony C (2001) Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c. *Biochemistry* 40, 9799
53. Li J, Gan JH, Mathews FS, Xia ZX (2011) The enzymatic reaction-induced configuration change of the prosthetic group PQQ of methanol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 621
54. Xia ZX, Dai WW, Xiong JP, Hao ZP, Davidson VL, White S, Mathews FS (1992) The three-dimensional structures of methanol dehydrogenase from two methylotrophic bacteria at 2.6-Å resolution. *J Biol Chem* 267, 22289
55. Xia Z, Dai W, Zhang Y, White SA, Boyd GD, Mathews FS (1996) Determination of the gene sequence and the three-dimensional structure at 2.4 Å resolution of methanol dehydrogenase from *Methylophilus W3A1*. *J Mol Biol* 259, 480
56. Zheng YJ, Xia Zx, Chen Zw, Mathews FS, Bruce TC (2001) Catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase: A theoretical and x-ray crystallographic investigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 432
57. Xia ZX, Dai WW, He YN, White SA, Mathews FS, Davidson VL (2003) X-ray structure of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* and molecular modeling of its interactions with cytochrome c-551i. *J Biol Inorg Chem* 8, 843

58. Nojiri M, Hira D, Yamaguchi K, Okajima T, Tanizawa K, Suzuki S (2006) Crystal structures of cytochrome c_L and methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: structural and mechanistic insights into interactions between the two proteins. *Biochemistry* 45,3481
59. Culpepper MA, Rosenzweig AC (2014) Structure and protein-protein interactions of methanol dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry* 53,6211
60. Oubrie A, Rozeboom HJ, Kalk KH, Huizinga EG, Dijkstra BW (2002) Crystal structure of quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer. *J Biol Chem* 277,3727
61. Hibi Y, Asai K, Arafuka H, Hamajima M, Iwama T, Kawai K (2011) Molecular structure of La^{3+} -induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans*. *J Biosci Bioeng* 111, 547 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.017
62. Fitriyanto NA, Fushimi M, Matsunaga M, Pertiwinigrum A, Iwama T, Kawai K (2011) Molecular structure and gene analysis of Ce^{3+} -induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *J Biosci Bioeng* 111, 613
63. Nakagawa T, Mitsui R, Tani A, Sasa K, Tashiro S, Iwama T, Hayakawa T, Kawai K (2012) A catalytic role of XoxF1 as La^{3+} -dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS One* 7, e50480
64. Pol A, Barends TR, Dietl A, Khadem AF, Eygensteyn J, Jetten MS, Op den Camp HJ (2014) Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environ Microbiol* 16, 255
65. Jahn B, Pol A, Lumpe H, Barends TRM, Dietl A, Hogendoorn C, Op den Camp HJM, Daumann LJ. (2018) Similar but Not the Same: First Kinetic and Structural Analyses of a Methanol Dehydrogenase Containing a Europium Ion in the Active Site. *Chem Bio Chem* 19, 1147
66. Deng YW, Ro SY, Rosenzweig AC (2018) Structure and function of the lanthanide-dependent methanol dehydrogenase XoxF from the methanotroph *Methylococcus buryatense* 5GB1C. *J Biol Inorg Chem* 23, 1037
67. Good, N.M., Fellner, M., Demirer, K., Hu, J., Hausinger, R.P., Martínez-Gómez, C. (2020) Lanthanide-dependent alcohol dehydrogenase require an essential aspartate residue for metal coordination and enzymatic function. *J Biol Chem*. 295, 8272.
68. Beck DA, McTaggart TL, Setboonsarng U, Vorobev A, Kalyuzhnaya MG, Ivanova N, Goodwin L, Woyke T, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2014) The expanded diversity of *methylophilaceae* from Lake Washington through cultivation and genomic sequencing of novel ecotypes. *PLoS One* 9, e102458
69. Vorobev A, Beck DA, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2013) Comparative transcriptomics in three *Methylophilaceae* species uncover different strategies for environmental adaptation. *PeerJ* 1, e115
70. Chistoserdova L. (2016) Lanthanides: New life metals? *World J Microbiol Biotechnol* 32, 138
71. Vu HN, Subuyuj GA, Vijayakumar S, Good NM, Martinez-Gomez NC, Skovran E (2016) Lanthanide-Dependent Regulation of Methanol Oxidation Systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Their Contribution to Methanol Growth. *J Bacteriol* 198, 1250
72. Ochsner AM, Hemmerle L, Vonderach T, Nüssli R, Bortfeld-Miller M, Hattendorf B, Vorholt JA (2019) Use of rare-earth elements in the phyllosphere colonizer *Methylobacterium extorquens* PA1. *Mol Microbiol* 111, 1152

73. Lansman JB (1990) Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J Gen Physiol* 95, 679
74. Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A (2000) Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275, 37423
75. Nesmerak K (2013) Lanthanide/Actinide in Health and Disease. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds) *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, New York, NY
76. Sarmiento-Pavía, P.D., Sosa-Torres, M.E. (2021) Bioinorganic insights of the PQQ-ADHs. *J Biol Inorg Chem* DOI: 10.1007/s00775-021-01852-0.
77. Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez, A., Sosa-Torres, M.E., Arreguín-Espinoza, R., Escamilla-Marvan, J.E. (2008). The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int. J. of Food Microbiol.* 125, 71.
78. 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. *Biochem.*, 49, 2409.
79. 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.
80. 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.
81. Gómez-Manzo, S. (2007) El papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. UNAM, México. Tesis de doctorado.
82. Sarmiento Pavía, P.D. (2016) Análisis funcional y estructural de los sitios redox de la metaloenzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de la bacteria fijadora de nitrógeno *Gluconacetobacter diazotrophicus*. UNAM, México. Tesis de maestría.
83. Rodríguez Cortés, L.A. (2017) Determinación del acoplamiento magnético entre los cofactores PQQ y el cúmulo [2Fe-2S] en la enzima ADH de la bacteria fijadora de nitrógeno *Gluconacetobacter diazotrophicus* por resonancia paramagnética electrónica. UNAM, México. Tesis de licenciatura.
84. Eaton, G.R., Eaton, S.S., Barr, D.P., Weber, R.T. (2010) *Quantitative EPR*. Springer-Verlag. Wien
85. Sánchez Ostría, M. (2019) Estudio de los estados de espín de los hierros de los citocromos tipo c en el alcohol deshidrogenasa (ADH) de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* fijadora de nitrógeno. UNAM, México. Tesis de licenciatura.
86. Attwood, M. M., Dijken, J. P., Pronk, J. T. (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng.* 72, 101.
87. Alvarez, B., Martinez-Drets, G. (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol.* 41, 918.




88. Tejera, N. A., Ortega, E., Rodés, R., Lluch, C. (2004) Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can. J Microbiol.* 50, 745.
89. Luna, M. F., Bernardelli, C. E., Galar, M.L., Boiardi, J.L. (2006) Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Curr. Microbiol.* 52, 163.
90. Luna, M. F., Boiardi, J. L. (2008) Growth yields and glucose metabolism of N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World J Microbiol Biotechnol.* 24, 587.
91. Lery, L. M. S., Coelho, A., Kruger, W. M. A., Gonçalves, M. S. M., Santos, M. F., Valente, R. H., Santos, E. O., Rocha, S. L. G., Perales, J., Domont, G. B., Teixeira, K. R. S., Bertalan, M., Ferreira, P. C. G., Bisch, P. M. (2008) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugar cane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics.* 8, 1631.
92. Arai, H., Sakurai, K., Ishii, M. (2016) Metabolic features of *Acetobacter aceti*. (Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. Acetic Acid Bacteria). Springer, Tokio.
93. Bringer, S., Bott, M. (2016) Central carbon metabolism and respiration in *Gluconobacter oxydans*. (Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A. Acetic Acid Bacteria). Springer, Tokio.
94. Wünschiers, R. (2012) Carbohydrate metabolism and citrate cycle. In *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology* (Michal G and Schomburg D, eds.) 2nd pp. 51-52. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
95. Koolman, J., Rohem, K.H. (2005). Color atlas of biochemistry. Thieme. 2^a ed. Stuttgart
96. Rosemeyer, M. A. (1987) The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochem Funct.* 5, 79.
97. Haeussler, K., Fritz-Wolf, K., Reichmann, M., Rahlfs, S., Becker, K. (2018) Characterization of *Plasmodium falciparum* 6-phosphogluconate dehydrogenase as an antimalarial drug target. *J Mol Biol.* 430, 4049.
98. Cho, E. S., Cha, Y. H., Kim, H. S., Kim, N. H., Yook, J. I. (2018) The pentose phosphate pathway as a potential target for cancer therapy. *Biomol Ther.* 26, 29.
99. Yang, X., Peng, X., Huang, J. (2018) Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase selectively targets breast cancer through AMPK activation. *Clin Transl Oncol.* 20, 1145.
100. Adams, M. J., Ellis, G. H., Gover, S., Naylor, C. E., Phillips, C. (1994). Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure.* 2, 651.
101. Phillips, C., Dohnalek, J., Gover, S., Barret, M. P., Adams, M. J. (1998) A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues. *J Mol Biol.* 282, 667.
102. Sundaramoorthy, R., Lulek, J., Barrett, M. P., Bidet, O., Ruda, G. F., Gilbert, I. H., Hunter, W. N. (2007) Crystal structures of a bacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase reveal aspects of specificity, mechanism and mode of inhibition by analogues of high-energy reaction intermediates. *FEBS J.* 274, 275.

103. He, W., Wang, Y., Liu, W., Zhou, C. Z. (2007) Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphoglucuronate dehydrogenase Gnd1. *BMC Struct Biol.* 7, 38.
104. Cameron, S., Martini, V. P., Iulek, J., Hunter, W. N. (2009) *Geobacillus stearothermophilus* 6-phosphoglucuronate dehydrogenase complexed with 6-phosphoglucuronate. *Acta Crystallogr Sect F.* 65, 450.
105. Chen, Y. Y., Ko, T. P., Chen, W. H., Lo, L. P., Lin, C. H., Wang, A. H. J. (2010) Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphoglucuronate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Implications for enzyme mechanism. *J Struct Biol.* 169, 25.
106. Hitosugi, T., Zhou, L., Elf, S., Fan, J., Kang, H. B., Seo, J. H., Shan, C., Dai, Q., Zhang, L., Xie, J., Jin, P., Alečković, M., LeRoy, G., Kang, Y., Sudderth, J. A., DeBerardinis, R. J., Luan, C. H., Chen, G. Z., Muller, S., Shin, D. M., Owonikoko, T. K., Lonial, S., Arellano, M. L., Khoury, H. J., Khuri, F. R., Lee, B. H., Ye, K., Boggon, T. J., Kang, S., He, C., Chen, J. (2012) Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell.* 22, 585.
107. Adachi, O., Ameyama, M. (1982) 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Methods Enzymol.* 89, 291.
108. Rauch, B., Pahlke, J., Schweiger, P., Deppenmeier, U. (2010) Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88, 711.
109. Richhardt, J., Bringer, S., Bott, M. (2012) Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner-Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a $\Delta edd \Delta eda$ mutant on mannitol. *Appl Environ Microbiol.* 78, 6975.
110. Richhardt, J., Bringer, S., Bott, M. (2013) Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 4315.
111. Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., Frébortova, J. (2015) Acetic acid bacteria: a group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1260.
112. De Roos, J., De Vuyst, L. (2018) Acetic acid bacteria in fermented food and beverages. *Curr Opin Biotechnol.* 49, 115.
113. Kitos, P. A., Wang, C. H., Mohler, B. A., King, T. E., Cheldelin, V. H. (1958) Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem.* 233, 1295.
114. White, G., Wang, C. (1964) The dissimilation of glucose and gluconate by *Acetobacter xylinum*. 1. The origin and the fate of triose phosphate. *Biochem J.* 90, 408.
115. Arai, H., Sakurai, K., Ishii, M. (2016) Metabolic features of *Acetobacter aceti*. (En: Matsushita K, Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A. Acetic Acid Bacteria). Springer, Tokio.
116. 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., Dreschel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, 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.
117. Kostner, D., Luchterhand, B., Junker, A., Volland, S., Daniel, R., Büchs, J., Liebl, W., Ehrenreich, A. (2015) The consequence of an additional NADH dehydrogenase paralog on the growth of *Gluconobacter oxydans* DSM3504. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 375.
118. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
119. 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, 2045.
120. Çakmakçi, R., Erat, M., Oral, B., Erdogan, Ü., Sahin, F. (2009) Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria. *J Hortic Sci Biotechnol.* 84, 375.
121. Morgenstern, B. (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics.* 15, 211.
122. Morgenstern, B. (2004) DIALIGN: Multiple DNA and protein sequence alignment at BiBiServ. *Nucleic Acids Res.* 32, W33.
123. Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., Chruszcz, M. (2006) HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution - from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr D.* 62, 859.
124. Terwilliger, T. C., Adams, P. D., Read, R. J., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Zwart, P. H., Hung, L. W. (2009) Decision-making in structure solution using bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr D.* 65, 582.
125. Emsley, P., Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D.* 60, 2126.
126. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., Adams, P. D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D.* 68, 352.
127. The UniProt Consortium. (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Res.* 47, D506.
128. NCBI Resource Coordinators. (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 44, D7.
129. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792.
130. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 5, 113.
131. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150.
132. Lehnert, N. (2008) *EPR and Low-Temperature MCD Spectroscopy of Ferrous Heme Nitrosyls* (En: Ghosh, A. The Smallest Biomolecules Diatomics and their Interactions with Heme Proteins) Elsevier B.V.

133. Henry, Y.A., Guissanni, A., Ducastel B., (eds) (1997) *Nitric Oxide research from Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*. Austin: R.G. Landes Co.
134. McGarry, J.M., Pacheco, A.A. (2018) Upon further analysis, neither cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea* nor its F156A variant display NO reductase activity, though both proteins bind nitric oxide reversibly. *J. Biol. Chem.* 23, 861.
135. Duarte, A.G., Cordas, C.M., Moura, J.J.G., Moura, I. (2014) Steady-state kinetics with nitric oxide reductase (NOR): New considerations on substrate inhibition profile and catalytic mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1837, 375.
136. Ramamurthi, A., Lewis, R.S. (1997) Measurement and modeling of nitric oxide release rates from nitric oxide donors. *Chem Res Toxicol* 10, 408.
137. Wierenga, R. K., Terpstra, P., Hol, W. G. J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -folding in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol.* 187, 101.
138. Scrutton, N. S., Berry, A., Perham, R. N., (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature.* 343, 38.
139. Tetaud, E., Hanau, S. Wells, J. M., Le Page, R. W. F., Adams, M. J., Arkison, S., Barrett, M. P., (1999) 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme. *Biochem J.* 338, 55.
140. Giménez-Andrés, M., Copic, A., Antonny, B. (2018) The many faces of amphipathic helices. *Biomolecules.* 8, 45.
141. Ford, M.G.J., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J.K., Evans, P.R., McMahon, H.T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419. 361.
142. Adams, M. J., Gover, S., Leaback, R., Phillips, C., Somers, D. O. (1991) The structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr B.* 47, 817.
143. Pickl, A., Schönheit, P. (2015) The oxidative pentose phosphate pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of glucose-6-phosphate dehydrogenase – The archaeal Zwischenferment. *FEBS Lett.* 589, 1105.
144. Hanau, S., Rippa, M., Bertelli, M., Dallochio, F., Barrett, M.P. (1996) 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur J Biochem.* 240. 592.
145. Veronese, F.M., Boccu, E., Fontana, A., Benassi, C.A., Scoffone, E. (1974) Isolation and some properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta.* 334. 31.
146. Rendina, AR., Hermes, J.D., Cleland, W.W. (1984) Use of multiple isotope effects to study the mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochemistry.* 23. 6257.
147. Dyson, J.E., D’Orazio, R.E., Hanson, W.H. (1973) Sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase: isolation procedure and effect of pH, ionic strength and metal ions on the kinetic parameters. *Arch Biochem Biophys.* 154. 623.
148. Topham, C.M., Matthews, B., Dalziel, K. (1986) Kinetic studies of 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. *Eur J Biochem.* 156. 555.
149. Pearse, B.M., Rosemeyer, M.A. (1974) Human 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions and NADPH on its activity. *Eur J Biochem* 42. 213.

The structure of a novel membrane-associated 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Gd6PGD*) reveals a subfamily of short-chain 6PGDs

Pedro D. Sarmiento-Pavía¹ , Annia Rodríguez-Hernández², Adela Rodríguez-Romero²  and Martha E. Sosa-Torres¹ 

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico

² Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico

Keywords

6-phosphogluconate dehydrogenase; enzyme subfamily; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; membrane-associated enzyme; X-ray structure

Correspondence

A. Rodríguez-Romero, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

Tel: +52 55 56224568

E-mail: adela@unam.mx

M. E. Sosa-Torres, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Tel: +52 55 56223808

E-mail: mest@unam.mx

(Received 24 February 2020, revised 11 June 2020, accepted 30 June 2020)

doi:10.1111/febs.15472

The enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase catalyzes the conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate. It represents an important reaction in the oxidative pentose phosphate pathway, producing a ribose precursor essential for nucleotide and nucleic acid synthesis. We succeeded, for the first time, to determine the three-dimensional structure of this enzyme from an acetic acid bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Gd6PGD*). Active *Gd6PGD*, a homodimer (70 kDa), was present in both the soluble and the membrane fractions of the nitrogen-fixing microorganism. The *Gd6PGD* belongs to the newly described subfamily of short-chain (333 AA) 6PGDs, compared to the long-chain subfamily (480 AA; e.g., *Ovis aries*, *Homo sapiens*). The shorter amino acid sequence in *Gd6PGD* induces the exposition of hydrophobic residues in the C-terminal domain. This distinct structural feature is key for the protein to associate with the membrane. Furthermore, in terms of function, the short-chain 6PGD seems to prefer NAD⁺ over NADP⁺, delivering NADH to the membrane-bound NADH dehydrogenase of the microorganisms required by the terminal oxidases to reduce dioxygen to water for energy conservation.

Enzyme

ECnonbreakingspace1.1.1.343.

Database

Structural data are available in PDB database under the accession number 6VPB.

Introduction

Acetic acid bacteria are obligate aerobic organisms known for their ability to partially oxidize a variety of sugars and alcohols and to release the products to the media [1]. This process, known as oxidative fermentation, is carried out by several membrane-bound dehydrogenases located in the periplasmic space and

coupled to the respiratory chain to provide energy to the bacteria [2–4]. Many studies related to the membrane-bound alcohol dehydrogenase (ADH), aldehyde dehydrogenase (ALDH), and glucose dehydrogenase (GDHm) from *Gluconacetobacter diazotrophicus* have been published in recent years [5–10]. Besides the

Abbreviations

6PGD, 6-phosphogluconate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; Gd, *Gluconacetobacter diazotrophicus*; NAD(P)⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate).

importance of this outer-oxidative pathway in the food and biotechnology industries [11,12], inner carbon assimilation by glucose metabolism has been studied in several acetic acid bacteria [1,13–16].

In nitrogen-fixing *Ga. diazotrophicus* as in all the *Acetobacter* and *Gluconacetobacter* strains, it has been found that the Entner–Doudoroff pathway only occurs in cellulose-synthesizing bacterium [1]; therefore, the oxidative pentose phosphate pathway (PPP) becomes the main pathway for carbon catabolism [17–24]. The first step in the PPP is glucose oxidation by the membrane-bound PQQ-dependent glucose dehydrogenase. The gluconate product is then phosphorylated and introduced into the cell to be oxidized by the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) [18–22]. The latter is a crucial step (Scheme 1) because it produces, after a decarboxylation, ribulose-5-phosphate, a precursor for ribose that is essential for nucleotide and nucleic acid synthesis [25].

In spite of the importance of the 6PGD enzyme in the PPP, very little attention received since the late 80s [26]. Nowadays, this enzyme has recovered importance, as it has been proposed as a potential target for drug discovery [27] and cancer treatment [28,29]; consequently, interest in the structural analysis of 6PGD has increased.

Several structures of 6PGD have been reported from organisms such as *Ovis aries* [30], *Trypanosoma brucei* [31], *Lactococcus lactis* [32], *Saccharomyces cerevisiae* [33], *Geobacillus stearothermophilus* [34], *Escherichia coli* [35], *Klebsiella pneumoniae* [35], and *Homo sapiens* [36]. It is worth mentioning that all the isolated 6PGDs reported so far have been found soluble in the cytoplasm.

The first 6PGD isolated from an acetic acid bacteria was from *Gluconobacter suboxydans* [37] and there are also some studies of sugar metabolism in *Gluconobacter oxydans* that measured the kinetics and the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)/nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) specificity of the 6PGD [38–40], such as those mentioned before

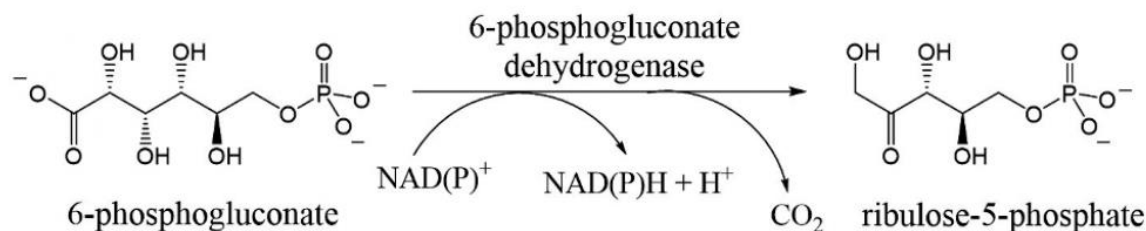
for *G. diazotrophicus* [17–22]. However, no structural studies of any 6PGD from acetic acid bacteria have been described so far.

Interested in the function and structure of the membrane-bound dehydrogenases from *Ga. diazotrophicus*, during the isolation and characterization of the ADH, in our research group, we discovered the 6PGD enzyme. In the present study, we report the isolation and characterization of the 6PGD from *Ga. diazotrophicus* (*Gd6PGD*) showing that both soluble fraction and membrane fraction exhibit enzymatic activity. We determined the 3D structure of the enzyme recovered from the membrane fraction by using X-ray diffraction techniques, with the sulfur single-wavelength anomalous dispersion method [41]. The structure of *Gd6PGD* represents the first from an acetic acid bacterium and shows relevant differences with other 6PGD structures previously reported. Based on kinetic studies, we suggest the functional importance of these differences. Finally, a phylogenetic analysis identified *Gd6PGD* as a member of a newly described subfamily of 6PGDs.

Results and Discussion

Cellular fractions with 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gd6PGD is a homodimer of about 70 kDa consisting of two subunits of 35 kDa, as seen in native and SDS/PAGE gels (Fig. 1). Specific activities in soluble and membrane fractions of *Ga. diazotrophicus* indicated that *Gd6PGD* activity in the membrane is not negligible, even though it is about twice higher in the cytoplasm (Table 1). This result indicated that *Gd6PGD* is located in both the cytoplasm and membrane. The protein was indeed purified from both extracts by exclusion chromatography, as described in **Materials and methods**. The elution profiles for both extracts are



Scheme 1. Reaction of 6PGD. The NAD(P)⁺-dependent enzyme catalyzes the conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate by a decarboxylation.

identical, and the only difference is the Triton X-100 0.1% solution used in the membrane extract to purify the enzyme. Table 2 shows the purification data for the *Gd6PGD*. The results are consistent within several batches of cytoplasm and membrane extraction.

As mentioned before, the activity of the *Gd6PGD* has been measured in glucose metabolic studies [17–19]. Attwood *et al.* [17] reported that the *Gd6PGD* PAL 5 strain was NADP⁺-dependent, as in most of the 6PGDs reported in bacteria. However, Alvarez and Martínez-Drets [18] found that *Gd6PGD* in the PAL 3 strain was NAD⁺-dependent and mentioned that *Gd6PGD* from PPe 4 and PAL 5 strains might also be active with NAD⁺. Another important remark is that in the previously mentioned works, the emphasis was on the sugar metabolic pathway and therefore the enzyme assays were done on cell-free extracts with no further purification. In our assays, we found that *Gd6PGD* from PAL 5 strain is active with NADP⁺ as are most 6PGDs; however, its activity is much higher when using NAD⁺ (Table 1). This preference is independent of the fraction from which the *Gd6PGD* was purified. Specifically, the *Gd6PGD* from the soluble fraction prefers NAD⁺ 8.4 times over NADP⁺.

Protein activity and kinetic studies

The kinetic parameters were determined for isolated and purified enzymes from both soluble and membrane fractions of *Gd6PGD*. A typical Michaelis–Menten kinetics is observed for NAD⁺ and NADP⁺ cofactors as well as for the substrate 6PG (Fig. 2A–C). We first noticed that both K_m and k_{cat} values were lower for the membrane-purified protein (Table 3). As the purification of the membrane protein requires Triton X-100, this reagent was added at different concentrations to the cytoplasm-purified protein (Fig. 2D) in order to find its effect on the reactivity of the enzyme.

Table 1. Enzyme activities of the 6PGD from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. Enzyme activities are expressed as U·mg⁻¹.

Fraction	NAD ⁺	NADP ⁺
Soluble fraction	0.18	0.011
Membrane fraction	0.04	0.005
Purified enzyme from soluble fraction	2.88 ± 0.08	0.34 ± 0.03
Purified enzyme from membrane fraction	2.30 ± 0.01	0.81 ± 0.13

Table 2. Purification of *Gd6PGD*.

Purification ^a	Total protein (mg)	Total activity ^b (U)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Purification factor	% Yield
Soluble fraction	175	31.7	0.2	1	100
QAE-Toyopearl	10	7.9	0.8	4	25
Ha-Ultrigel	2	5.1	2.8	15	16

^aEleven grams of cells (wet weight).; ^bOne unit of activity is equal to 1 μmol NAD⁺·min⁻¹.

These results are shown in Fig. 2E. The parallel lines in the Lineweaver–Burk plots showed the typical pattern of an uncompetitive inhibition [42] by Triton X-100 to the *Gd6PGD*.

When 0.1% Triton X-100 was added to the cytoplasm-purified protein, K_m and k_{cat} values (102.8 μM and 6.06 s⁻¹, respectively) dropped down nearly fifty percent (57.03 μM and 3.22 s⁻¹) and were very similar to those from the membrane-purified protein (Table 4). Furthermore, when Triton X-100 was removed from the membrane-purified protein, K_m and k_{cat} values were increased around twice its values (110 μM and 4.61 s⁻¹) which are pretty similar to those

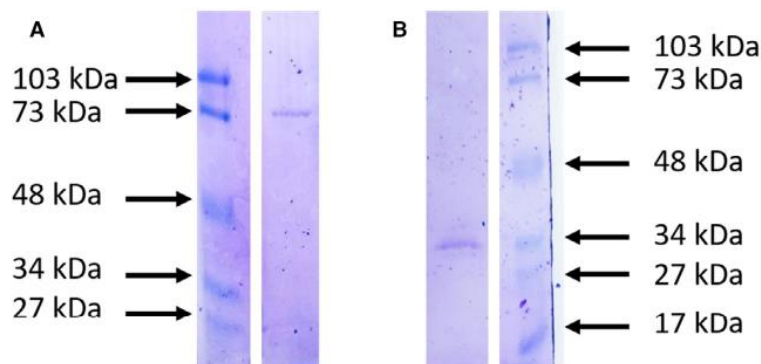


Fig. 1. Electrophoresis analysis of *Gd6PGD*. (A) Native-PAGE. Only one band in 70 kDa is observed, corresponding to the homodimer of *Gd6PGD*. (B) SDS/PAGE. Only one band in 35 kDa is observed, corresponding to one subunit of *Gd6PGD*. The molecular weight of the markers is shown. Proteins in the molecular marker are phosphorylase b (103 kDa); BSA (73 kDa); ovalbumin (48 kDa); carbonic anhydrase (34 kDa); soybean trypsin inhibitor (27 kDa); and lysozyme (17 kDa).

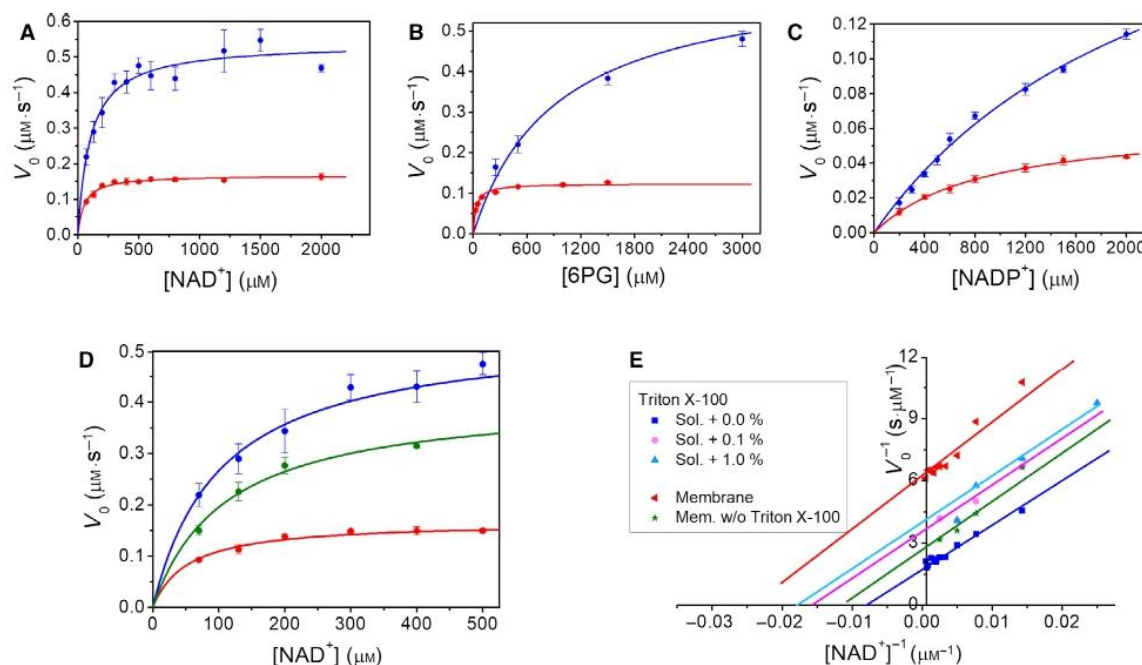


Fig. 2. Kinetics of *Gd*6PGD and Triton X-100 inhibition. Michaelis–Menten curves of the kinetic studies of *Gd*6PGD purified from the soluble fraction (blue) and from the membrane fraction (red). (A) NAD^+ as cofactor or coenzyme. (B) 6PG as substrate. (C) NADP^+ as cofactor or coenzyme. (D) Michaelis–Menten curves of the kinetic studies of *Gd*6PGD when using NAD^+ as substrate. Protein was purified from the soluble fraction (blue) and from the membrane fraction (red), and Triton X-100 was removed from the membrane protein (green). (E) Lineweaver–Burk plots of the 6PGD from *Gd* indicate an uncompetitive inhibition by Triton X-100 when NAD^+ was used. Standard deviation of three different experiments is shown as error bars in A–D.

Table 3. Kinetic parameters of the 6PGD from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5.

Enzyme	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Cytoplasm-purified enzyme			
6PG	934.30 ± 124	3.63 ± 0.14	3.9×10^{-3}
NAD^+	102.80 ± 13.5	6.06 ± 0.16	5.9×10^{-2}
NADP^+	2393 ± 231.2	2.80 ± 0.18	1.2×10^{-3}
Membrane-purified enzyme			
6PG	33.41 ± 2.42	0.97 ± 0.01	2.9×10^{-2}
NAD^+	52.89 ± 4.57	2.62 ± 0.04	4.9×10^{-2}
NADP^+	869.50 ± 91.83	1.74 ± 0.08	2.0×10^{-3}

values of the cytoplasm-purified protein ($102.8 \mu\text{M}$ and 6.06 s^{-1}) (Table 4). As it is difficult to remove all traces of detergent, it is quite probable that the small differences observed are due to small traces of Triton X-100. As the activity is the same for the cytoplasm protein as well as for the membrane-bound protein, we conclude that the protein *in vivo* is the same in both fractions.

As expected, K_m for NAD^+ ($102.8 \mu\text{M}$) is much lower than that for NADP^+ ($2393 \mu\text{M}$) (Table 3), indicating the higher affinity for NAD^+ . Presumably, the lower affinity for NADP^+ is due to the negatively charged residues Asp30 and Asp32 in *Gd*6PGD that may repel the phosphate group from the NADP^+ as it is discussed in the Residues in coenzyme-binding site section.

A comparison of the kinetic constants for 6PGDs from several organisms (Table 5) shows that the K_m for 6PGD is in the range of 3.5–118 μM for non-acetic acid bacteria and other organisms, and it is considerably higher (440–934 μM) in acetic acid bacteria especially in *Gd*6PGD. On the other hand, K_m for NADP^+ and NAD^+ demonstrates that 6PGDs from acetic acid bacteria use NAD^+ as a main cofactor, although they might also use NADP^+ .

Bioinformatic analyses of the sequences

A search in UniProt [43] and GenBank [44] shows only one nonredundant sequence for *Gd*6PGD,

→Kinetic parameters of the Gd6PGD with and without Triton X-100 using NAD⁺ as cofactor.

Enzyme	Triton X-100	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Cytoplasm-purified enzyme	0.0%	102.80 ± 13.5	6.06 ± 0.16	5.9×10^{-2}
	0.1% added	57.03 ± 12.93	3.22 ± 0.19	5.6×10^{-2}
Membrane-purified enzyme	0.1%	52.89 ± 4.57	2.62 ± 0.04	4.9×10^{-2}
	Removed	110 ± 14.79	4.61 ± 0.23	4.2×10^{-2}

Table 4. Kinetic parameters of the Gd6PGD with and without Triton X-100 using NAD⁺ as cofactor.

Table 5. Comparison of kinetic parameters of 6PGDs from different species.

Organism	K_m 6PG (μM)	K_m NADP ⁺ (μM)	K_m NAD ⁺ (μM)	Reference
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ^a	934.3 ± 124	2393 ± 231.2	102.8 ± 13.55	This work
<i>Gluconobacter suboxydans</i> ^a	440	440	64	[18]
<i>Haloferax volcanii</i>	21	2940	33	[70]
<i>Trypanosoma brucei</i>	3.5	1		[71]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	20	25		[72]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25 ± 1	153 ± 4		[73]
	35 ± 6	50 ± 9		[33]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	118 ± 23	107 ± 4		[35]
<i>Ovis aries</i>	6.76 ± 1.6	16.1 ± 1.3		[74]
	2.9	22.7		[75]
<i>Homo sapiens</i>	30	20		[76]
	6.9 ± 2.0	33.7 ± 7.1		[27]

^aAcetic acid bacteria.

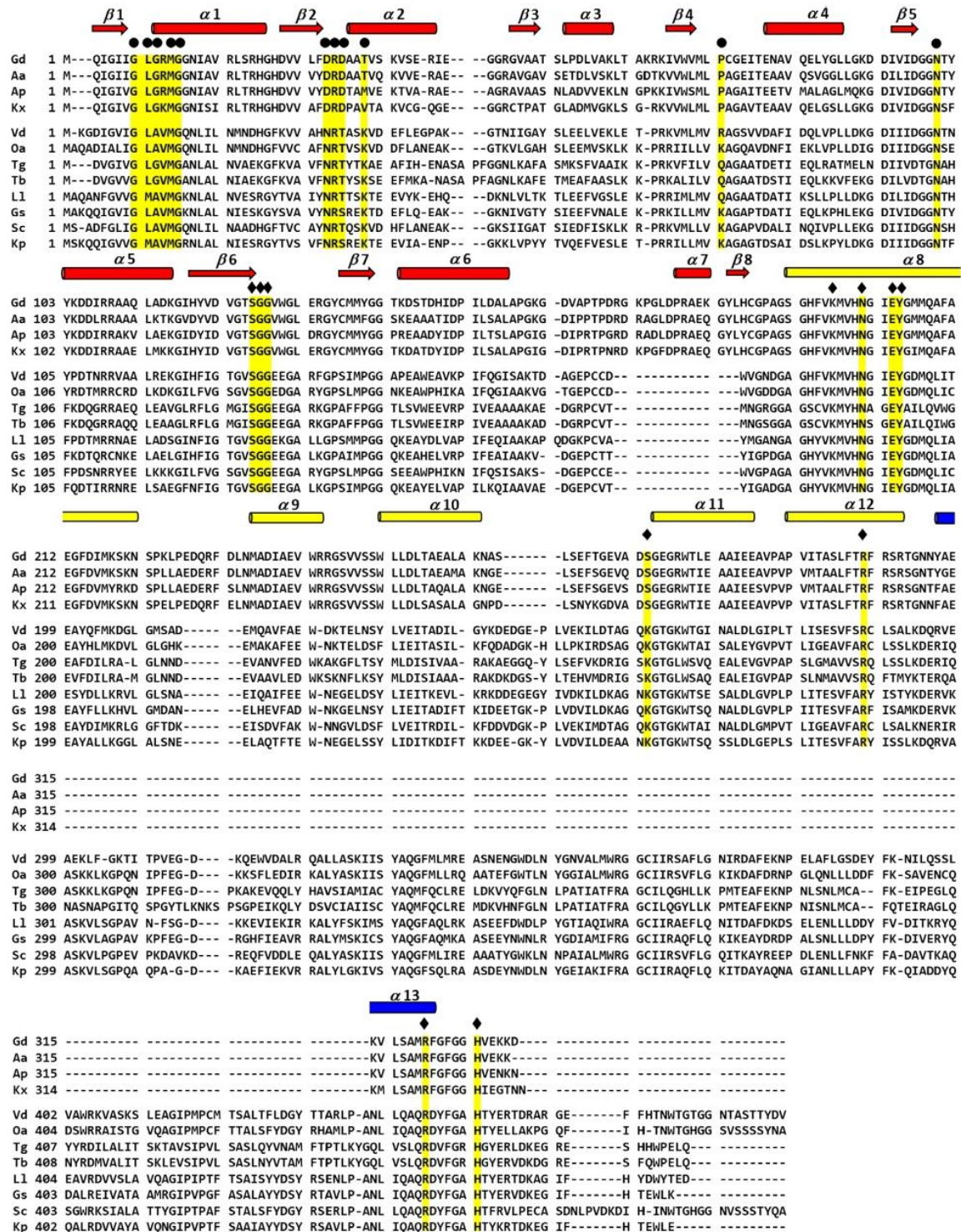
encoded by the *gnd* gene. This supports the existence of only one *Gd6PGD*, either in the soluble or in the membrane fractions, as was demonstrated by the kinetic measurements. From available genome sequencing reports for *Ga. diazotrophicus*, *Gd6PGD* is known to contain 332 amino acid residues (NCBI Ref. Seq. WP_012222546.1), which is in concordance with other 6PGD from acetic acid bacteria such as *A. acetii* (*Aa*), *A. pasteurianus* (*Ap*), and *K. xylinus* (*Kx*) with 332, 333, and 333 residues, respectively. However, 6PGDs from other organisms are usually longer: *V. diazotrophicus* (*Vd*) 482, *O. aries* (*Oa*) 483, *T. grayi* (*Tg*) 476, *T. brucei* (*Tb*) 477, *L. lactis* (*Ll*) 472, *G. stearothermophilus* (*Gs*) 469, *S. cerevisiae* (*Sc*) 489, and *K. pneumoniae* (*Kp*) 468 amino acids. These nearly 150 fewer residues in enzymes from acetic acid bacteria result in important differences in their quaternary structure and dimeric interaction, as explained below. The difference

between acetic acid bacteria and the other organisms can be also noticed in the sequences' homology. The 6PGD from *Aa*, *Ap*, and *Kx* sequences share 82%, 76%, and 79% identity with *Gd*, respectively, in contrast with the roughly 20% identity with *Vd*, *Oa*, *Tg*, *Tb*, *Ll*, *Gs*, *Sc*, and *Kp* sequences. Despite the differences in the protein length, the ligand and cofactor-binding residues are, in general, well conserved among all the 6PGD considered. The latter can be observed in Fig. 3, which shows the alignment of the 12 studied sequences, four from acetic acid bacteria and eight from non-acetic acid bacteria or other organisms.

Overall structure

We determined the 3D structure of the *Gd6PGD* at 1.9 Å using X-ray diffraction techniques (Table 6). The overall structure of the *Gd6PGD* shows a

Fig. 3. Amino acid sequence alignment. Aligned sequences of 6PGDs from *Ga. diazotrophicus* (*Gd*), *A. acetii* (*Aa*), *A. pasteurianus* (*Ap*), *K. xylinus* (*Kx*), *V. diazotrophicus* (*Vd*), *O. aries* (*Oa*), *T. grayi* (*Tg*), *T. brucei* (*Tb*), *L. lactis* (*Ll*), *G. stearothermophilus* (*Gs*), *S. cerevisiae* (*Sc*), and *K. pneumoniae* (*Kp*). Residues of the active site are shown by black letters in yellow background. Bullets identify residues that have been reported to interact with NAD(P)⁺ and diamonds those interacting with 6PG. *Gd* secondary structures are colored according to coenzyme-binding domain (red), helix domain (yellow), tail domain (blue) with arrows, and cylinders depicting β strands (β1–β8) and a helices (α1–α13), respectively. UniProt accession numbers are *Gd*, WP_012222546.1; *Aa*, A0A1U9KHR6; *Ap*, A0A1A0C5M2; *Kx*, A0A318PH64; *Vd*, A0A2J8G5Y6; *Oa*, P00349; *Tg*, XP_009309412.2; *Tb*, P31072; *Ll*, Q9CHU6; *Gs*, A0A087LGM2; *Sc*, P38720; and *Kp*, P41576. The sequence alignment was carried on with the DIALIGN software developed by Morgenstern [58,59].



homodimer in the asymmetric unit (Fig. 4A). Each subunit consists of three domains (Fig. 4B), as has been found for other 6PGD structures [32]. The N-terminal domain or domain I is formed by 188 residues that adopt the Rossmann fold and constitutes the dinucleotide-binding site: Eight parallel β strands in the order β_3 , β_2 , β_1 , β_4 , β_5 , β_6 , β_7 , and β_8 are buried and surrounded by seven α helices. A helical domain, or domain II, is formed by residues 189–307. There is one large helix (α_8) that forms the core of the domain enclosed by the other four helices (α_9 – α_{12}). Finally, domain III or tail domain comprises the last 25 residues (308–333) and consists of a single α helix. The coenzyme-binding site lies at the bottom of the Rossmann fold, and α_8 from the helical domain forms the floor of the active site.

In the domain II of subunit B, a Mg^{2+} ion is found, with a distance of 2.2 Å to the main-chain oxygen of Ser276 which lies in the range of magnesium–oxygen distances in proteins. This Mg^{2+} ion is also coordinated to Tyr203, Asp275, and the main-chain nitrogens of Gly279 and Arg280, as shown in Fig. 4C. The equivalent position in subunit A has a water molecule

linked by hydrogen bonds to Asp275, and the main-chain nitrogens of Gly277, Gly279, and Arg280 as shown in Fig. 4D. All distances to the water molecule are between 3 and 3.3 Å. The difference between the two subunits may indicate that the Mg^{2+} ion is not an essential structural feature. Finally, a PEG molecule is also present in the structure near the domain III of subunit A.

Residues in coenzyme-binding site

In *Gd6PGD*, the sequence Gly7–Leu8–Gly9–Arg10–Met11–Gly12, at the β_1 – α_1 turn, corresponds to the NAD^+ fingerprint, Gly–X–Gly–X–X–Gly [45,46]. This fingerprint can be found in all acetic acid bacteria. However, in non-acetic acid bacteria 6PGDs, the motif Gly–X–Ala–X–X–Gly is found instead, corresponding to the $NADP^+$ fingerprint [31,46]. The motif Asp30–Arg31–Asp32, in the β_2 – α_2 loop in *Gd6PGD*, is well conserved among all the 6PGD from acetic acid bacteria but differs with the conserved Asn–Arg–Thr in other 6PGDs. Earlier studies [35,47] have shown that this Arg residue is essential for the $NADP^+$ specificity. Nonetheless, Asp30 in *Gd6PGD* would provide a negatively charged residue which forms a hydrogen bond with the 2'-hydroxyl group of the adenine ribose of the NAD^+ as in several NAD^+ -dependent enzymes [46]. On the other hand, this negative charge on Asp30 might repel the negatively charged phosphate group in $NADP^+$, thus, explaining the difference in K_m values, which are higher about 20 times than those for NAD^+ , found in this work (Table 3).

Other $NAD(P)^+$ -binding residues are conserved among all the 6PGDs, such as Asn100, Ser126, Gly127, and Gly128 in the β_6 – β_7 loop (Fig. 4). The residues Thr35 and Pro73 show relevant differences between the acetic acid enzymes and those from other organisms. While in most organisms, a Lys residue replaces Thr35, there is no consensus among the acetic acid bacteria. On the contrary, Pro73 is conserved in all the acetic acid bacteria, while in other organisms, either a Lys or a Gln is commonly found. These coenzyme-binding residues are identified with a bullet in the sequence alignment in Fig. 3. Additionally, the structural comparison of the coenzyme-binding site in *Oa6PGD* [30] (PDB entry 1PGO) with the *Gd6PGD* (Fig. 5A) shows that the coenzyme-binding site structure is the same for both. From these results, the interaction of NAD^+ with *Gd6PGD* in the active site is proposed in Fig. 5B.

Residues in substrate-binding site

Some studies [32,35] have previously shown essential residues in the substrate-binding site that are well

Table 6. Data collection and refinement statistics.

PDB code	6VPB
Diffraction statistics ^a	
Wavelength (Å)	1.54
Space group	C121
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.76, 82.10, 81.83
α , β , γ (°)	90.00, 103.41, 90.00
Resolution range (Å)	36.48–1.87 (1.97–1.87)
Unique reflections	48 489 (2380)
Completeness (%)	99.23 (99.9)
Multiplicity	16.5 (8.2)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	51.6 (2.1)
<i>R</i> _{merge}	0.094 (1.156)
<i>R</i> _{meas}	0.097 (1.235)
<i>R</i> _{pim}	0.023 (0.426)
Wilson <i>B</i> -factor (Å ²)	25.7
CC1/2	0.95 (0.54)
Refinement statistics	
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.184/0.220
Average <i>B</i> -value (Å ²)	30.0
Total atoms	5125
Protein	4755
Ligand (PEG)	11
Water	358
Ion (Mg^{2+})	1
RMS-bonds (Å)	0.009
RMS-angles (°)	0.995
Ramachandran favored/outliers (%)	98.43/1.57

^aStatistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

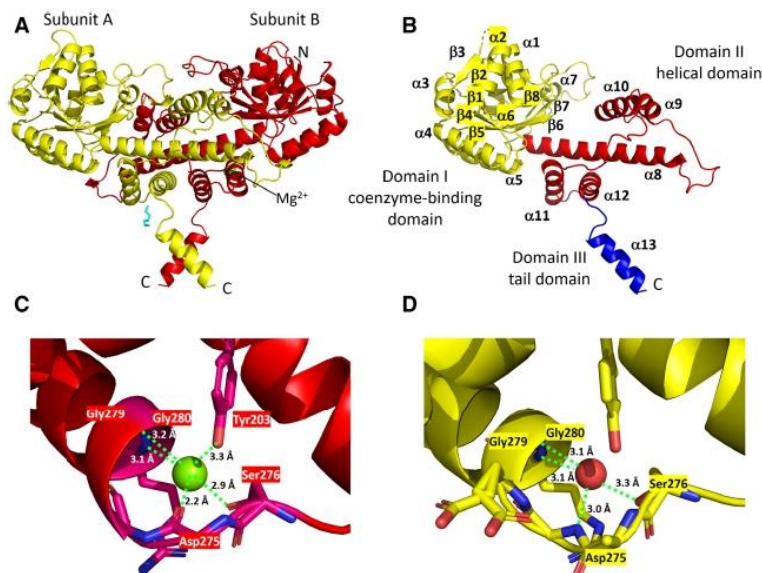


Fig. 4. Overall structure of *Gd6PGD*. (A) Ribbon diagram of the *Gd6PGD* dimer, subunits A and B are shown in yellow and red, respectively. Mg^{2+} ion is shown as a green sphere, and PEG molecule is shown in cyan. (B) One subunit of the *Gd6PGD* showing the N-terminal coenzyme-binding domain in yellow, the helical domain is shown in red and the C-terminal in blue. (C) Close-up of the Mg^{2+} ion (green) coordination sphere in subunit B. (D) Close-up of the water molecule linkages in subunit A. Images were created using PVMOL [77].

conserved among all the 6PGD sequences. In the $\beta 6$ – $\beta 7$ loop, in the coenzyme-binding domain of the *Gd6PGD*, the residues Ser126, Gly127, and Gly128 are conserved among all the 6PGDs. In the helical domain, six residues establish hydrogen bonds with the substrate: Lys196, Asn200, Glu203, and Tyr204 in $\alpha 8$, Ser276 in the $\alpha 10$ – $\alpha 11$ loop, and Arg303 in $\alpha 12$. All these residues are conserved among all 6PGDs, except for Ser276 that is only conserved among all the acetic acid bacteria's protein. Instead, a Lys is usually found in the other organisms. The tail domain has two residues, Arg321 and His327, which are conserved among all the 6PGDs and are essential in substrate binding when the homodimer is formed. Other residues link the substrate trough water-mediated hydrogen bonds such as Glu203 and Glu278. Glu203 is well conserved among all the 6PGDs studied, while Glu278 is only conserved in the acetic acid bacteria's enzyme and differs from the conserved Thr in other organisms. All the substrate-binding residues are identified with diamonds in the sequence alignment in Fig. 3. Furthermore, the structural comparison of the substrate-binding site in *Ll6PGD* ([32] PDB entry 2IYO) with the *Gd6PGD* (Fig. 5C) shows that the active site structure is the same for both. From these results, the interaction of 6PG with *Gd6PGD* in the active site is proposed in Fig. 5D.

From the whole analysis above, the active site in *Gd6PGD* would be located between both domains (I and II), as shown in Fig. 5E.

Structural comparisons

The structure of the *Gd6PGD* was compared to other 6PGD structures reported in the literature such as those from *Tb* (PDB: 1PGJ [31]), *Ll* (PDB: 2IYO [32]), *Gs* (PDB: 2W8Z [34]), and *Oa* (PDB: 1PGO [30]). Figure 6 shows a structural alignment of the *Gd6PGD* and *Oa6PGD*, with a root mean square deviation (RMSD) of 1.08 Å. The two models are very similar in their secondary structure, and both exhibit a three-domain fold (the nucleotide-binding domain, a helical domain, and the tail domain; Fig. 6A). The nucleotide-binding domain structure is practically identical in all the reported structures; seven α helices surround seven β strands (or eight in some cases); however, there is a small extra loop (Fig. 6B) in the *Gd6PGD* structure, with a 15 residues (170–185) insertion in the proteins from acetic acid bacteria (Fig. 3).

Significant differences were found when comparing the helical domain with other 6PGD structures. While in *Gd6PGD*, it consists of one large helix, surrounded by four helices, in the structures from non-acetic bacteria, it is formed by two large helices enclosed by eight smaller helices, or two five-helix motifs. Adams *et al.* [48] had already noticed that the five-helix motif in domain II in *Oa6PGD* was repeated and that 83% of the residues could be structurally superposed. *Gd6PGD* structure can only be well superposed to the other structures in the first five-helix motif, that is, half of the helical domain in *Oa6PGD* (Fig. 6B, PDB entry 1PGO), this can also be noticed in the topology diagrams in Fig. 6C,D. This important difference is due

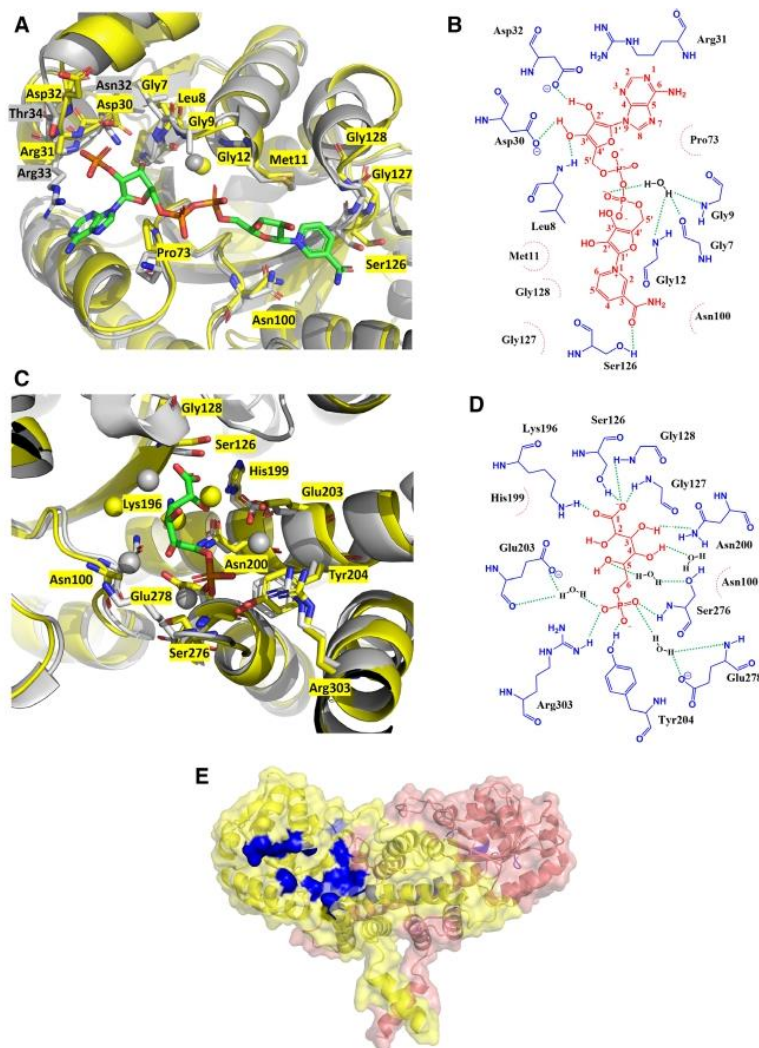


Fig. 5. Coenzyme- and substrate-binding site. (A) Close-up of the superimposed Gd6PGD coenzyme-binding site (yellow) and of the NADP-Oa6PGD (gray; PDB entry 1PGO [30]). NADP is shown in green. Water molecules are shown as spheres. (B) Proposed residues in the coenzyme-binding site in Gd6PGD considering the alignment in Fig. 3. NAD⁺ is shown in red. (C) Close-up of the superimposed Gd6PGD substrate-binding site (yellow) and of the 6PG-L6PGD (gray; PDB entry 1IYO [32]). 6PG is shown in green. Water molecules are shown as spheres. (D) Proposed residues in the substrate-binding site in Gd6PGD considering the alignment in Fig. 3. 6PG is shown in red. (E) Gd6PGD dimer with the active site shown in blue. Images A, C, and D were created using PYMOL [77].

to the length of the sequences. As mentioned before, the acetic acid bacteria sequences for 6PGD are about 150 residues shorter than the enzyme from other organisms (Fig. 3). Thus, this difference in the helical domain forces domain III to move to the opposite side in Gd6PGD compared to the other structures. Finally, another significant difference in the structures arises from the dimer comparisons. While in most of the 6PGD structures reported, such as in Gs6PGD (PDB entry 2W8Z [34]), the tail domain of each subunit protrudes directly into the other subunit (Fig. 7B), in Gd6PGD the interaction between the subunits is driven primarily by van der Waals forces between the large α helices from the two subunits in the helical domain (Fig. 7C). This difference in the dimer leaves the two small α helices of the tail domain exposed in the dimer

of Gd6PGD (Fig. 7A). It is relevant to notice that in the tail domain sequence of Gd6PGD, Ala–Glu–Lys–Val–Ser–Ala–Met–Arg–Phe–Gly–Phe, there are several hydrophobic and neutral residues that are exposed in the dimer. We assume that this structural feature might contribute to the association of the protein to the membrane. Probably, this characteristic is shared in other acetic acid bacteria's 6PGD. Associated with the cytoplasmic membrane by the tail domain, the protein active site would be facing the cytoplasm (Fig. 8).

Biological role of the 6PGD in *Gluconacetobacter diazotrophicus*

In *Ga. diazotrophicus*, as in several other acetic acid bacteria, the oxidative pentose phosphate pathway is

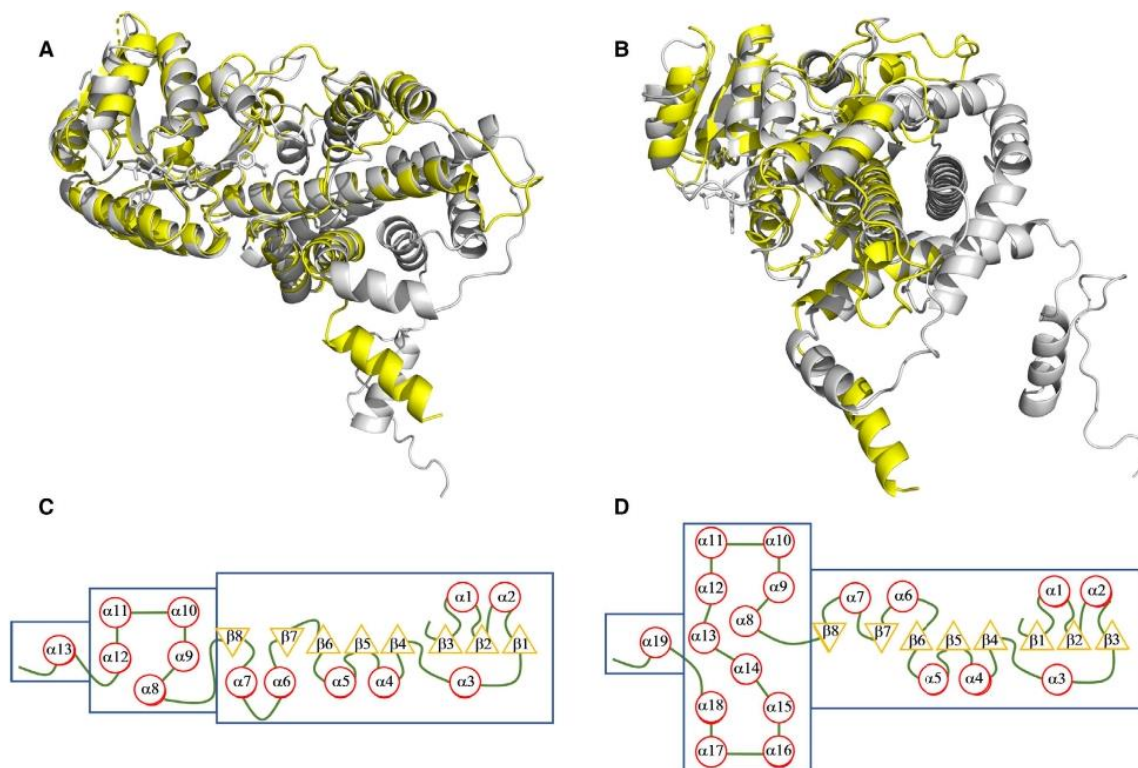


Fig. 6. Comparison of the 6PGDs structures. Comparison of the superimposed secondary structures from *Gα6PGD* (yellow), *Oα6PGD* (gray). (A) The same view depicted in Fig 4. (B) 90° twist to show the extra loop in domain I of *Gα6PGD* (yellow) and the extra α helices in domain II of *Oα6PGD* (gray). (C) Topology diagram of *Gα6PGD* and (D) topology diagram of *Oα6PGD*. References: *Oα6PGD* structure, (PDB entry: 1PGO [30]) and *Oα6PGD* topology diagram, [48]. Images were created using PYMOL [77].

the main route for carbon catabolism [17–24]. Therefore, 6PGD is a crucial enzyme in the central metabolism that takes place at the cytoplasm (Fig. 8).

Besides, as stated before, the membrane and periplasmic oxidase systems in the acetic acid bacteria have been studied and its coupling to the respiratory chain is well documented [2–10]. Additionally, the NAD(P)-dependent dehydrogenases located in the cytoplasm are also coupled to the respiratory chain via NADH dehydrogenases (NDHs) [3,16,23,24]. In particular, in *Ga. diazotrophicus* it has been shown the presence of a NDH-1 that generates a proton-motive force (genes *nuoX* in the locus *Gdia_0706-Gdia_0718* and *Gdia_3328-Gdia_3340*) as well as a NDH-2 enzyme that does not generate a proton-motive force (gene *ndh* in the locus *Gdia_2371*) [49,50]. Therefore, we propose that the association of the 6PGD to the membrane allows a fast NADH diffusion to NADH dehydrogenase due to its proximity (Fig. 8) and thus providing both H^+ and electrons to the respiratory chain, in concordance with previous results in

G. oxydans, where it has been proposed that NDH activity is a key factor controlling biomass formation and in membrane-bound dehydrogenases activity (by competition for feeding electrons in the electron transport chain) [51]. Similarly, in *Ga. diazotrophicus*, the membrane-bound 6PGD might help the regulation of the periplasmic oxidase system via the NDH by sensing the inner carbon metabolism activity.

Phylogenetic analysis

Additionally, and to a better understanding of the differences among the 6PGD enzymes, we carried out a phylogenetic analysis. One hundred and fifty nonredundant 6PGD sequences were analyzed. Of these, ninety one proteins belong to bacteria, two to archaea, eight to fungi, fourteen to protozoans, eleven to plants, and twenty four to animals. Two main sizes of proteins were found: small-chain 6PGDs with a sequence length of 290–350 amino acids and long-chain 6PGDs of 450–500 amino acids

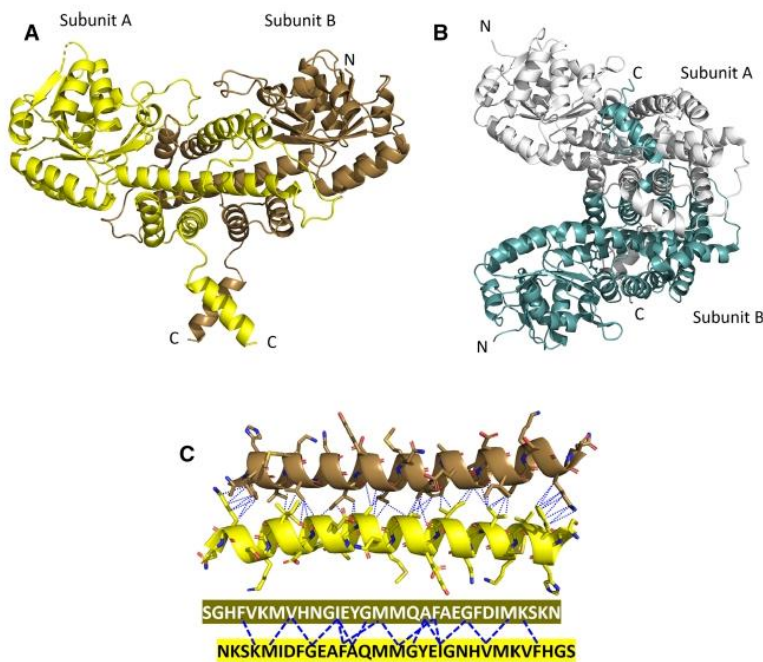


Fig. 7. Dimer interactions of the 6PGDs. (A) Dimer of the *Gα6PGD*. Subunit A (in yellow) is oriented in the same angle than that in Fig. 6A. (B) Dimer of the 6PGD from *Geobacillus stearothermophilus* (*Gs*; PDB entry: 2W8Z, [34]). Subunit A (gray) is oriented in the same angle than that in Fig. 6A. (C) van der Waals interactions between the large helices of subunit A and subunit B in the dimer from *Gα6PGD*. Images were created using PYMOL [77].

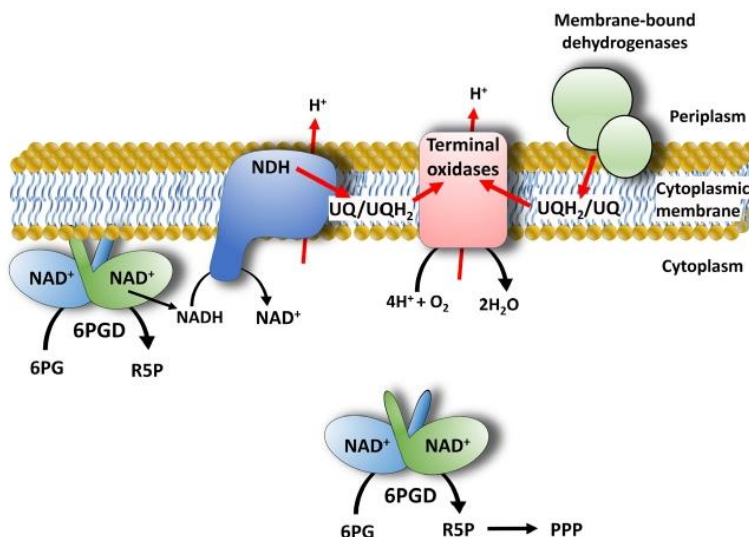


Fig. 8. Phosphogluconate oxidation in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 6PGD in the cytoplasm oxidizes 6-phosphogluconate (6PG) to ribulose-5-phosphate (R5P) using NAD^+ or NADP^+ , and it goes to the pentose phosphate pathway (PPP) for inner carbon assimilation. Membrane-associated 6PGD produces NADH that diffuses to the membrane-bound NADH dehydrogenase (NDH), providing both H^+ and electrons to the respiratory chain. The electrons go to the membranous ubiquinone (UQ/UQH_2) and to the terminal oxidases to reduce O_2 to H_2O . 6PGD may control the activity of membrane-bound dehydrogenases by competition for feeding electrons into the electron transport chain.

(although there are proteins longer than 2000 amino acids). The sequence length of 6PGDs classified by size is shown in Fig. 9. It is worth mentioning that although there are archaea and bacteria among both groups, all eukaryotes belong to the long-chain group.

The phylogenetic analysis from the alignment of the 6PGDs sequences was performed as described in Materials and methods, using both distance-based

methods (unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA, neighbor-joining, NJ, and minimum evolution, ME) and character-based methods (maximum parsimony, MP and maximum likelihood, ML). Figure 10 shows the constructed phylogenetic tree, which presents two well-differentiated clusters. This reveals the existence of two subfamilies of 6PGDs which correspond to the small-chain (red) and long-chain (blue) 6PGDs.

Description of different phylogenetic methods and their own merits are described and reviewed elsewhere in the literature [52–55]. The use of several methods and algorithms allowed us to compare the results. It is worth noticing that all the obtained trees were similar, regardless of the algorithms employed to perform the phylogenetic analysis, especially, when it comes to show the existence of the ‘short-chain’ 6PGDs subfamily.

When we compare all the sequences, it is observed that among all the short-chain proteins, the Gly–X–Gly–X–X–Gly motif is conserved in the nucleotide fingerprint (Fig. 11A) suggesting that they would be NAD⁺-dependent. In the nucleotide-binding residues, the Asp from the Asp–Arg–X motif is conserved in 75% of the sequences. As it was discussed before, this Asp would provide a negative charge promoting a hydrogen bond with the NAD⁺ by the 2' OH of the ribose ring that carries the adenine moiety (Fig. 4B).

On the other hand, among the long-chain sequences, the Gly–X–Ala/Gly–X–X–Gly motif is conserved (Fig. 11B) in the nucleotide fingerprint, which suggests that most of these proteins would be NADP⁺-dependent. Also, the Asn–Arg–X motif in the nucleotide-binding residues is conserved in 83% of the sequences. And due to the lack of negative charges on this motive, the phosphate group from NADP⁺ would easily interact.

Summary and conclusions

Since most acetic acid bacteria lack the Entner–Doudoroff pathway, the PPP is the main pathway for carbon catabolism. Therefore, the 6PGD becomes essential to

understand the metabolism of these bacteria. We have isolated and purified the *Gd6PGD*, from both soluble and membrane fractions. To our knowledge, no other 6PGD has been described to be associated with the membrane. Kinetic studies with and without Triton X-100 showed that the protein in each fraction is the same. Additionally, kinetic parameters and the specific activities for NAD⁺ and NADP⁺ indicated a preference for NAD⁺ over NADP⁺. This was confirmed by a bioinformatics analysis comparing the amino acid sequences of several 6PGD from acetic acid bacteria.

The three-dimensional X-ray structure of the membrane-associated *Gd6PGD* has been presented, being the first structure for an acetic acid bacteria 6PGD. The structure shows a homodimer in which each subunit comprises domain I, domain II, and domain III. *Gd6PGD* structure was compared with other 6PGD structures reported. The shorter sequence in *Gd6PGD* makes that in the dimer, the two small α helices of the domain III are exposed. The amino acid sequence of this domain presents several hydrophobic and neutral residues which would contribute to the protein's association to the membrane.

Besides the importance of *Gd6PGD* in the cytoplasm for the PPP, its association to the membrane might allow a fast NADH diffusion to NADH dehydrogenase (NDH) due to its proximity, providing both H⁺ and electrons to the respiratory chain, helping the regulation of the periplasmic oxidase system via the NDH by sensing the inner carbon metabolism activity.

Finally, the phylogenetic analysis shows that *Gd6PGD* belongs to a newly described subfamily of 6PGDs. This new family would be short-chain (320 a.a.), NAD⁺-dependent enzymes, in contrast with the long-chain (480), NADP⁺-dependent proteins.

Materials and methods

Cultivation of bacteria and protein purification

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 (ATCC, Manassas, VA, USA) was grown at 30 °C in a sugar-rich medium consisting of 5 g K₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄, 0.2 g MgCl₂, 0.02 g CaCl₂, 0.01 g FeCl₃, 5 g Na₃C₆H₅O₇ (sodium citrate), 0.2642 g (NH₄)₂SO₄, 0.002 g Na₂MoO₂, and 50 g C₁₂H₂₂O₁₁ (sucrose) in 1 L of H₂O (pH 5.8) and in the same medium in a 350 L working-volume fermenter stirred at 350 r.p.m. The fermenter was seeded with 20 L of active culture. After 39 h of growth, ethanol was added at 0.75%. Cells were harvested in the late stationary phase (50 h) and washed twice with cold 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (potassium phosphate) buffer (pH 6.0) containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂.

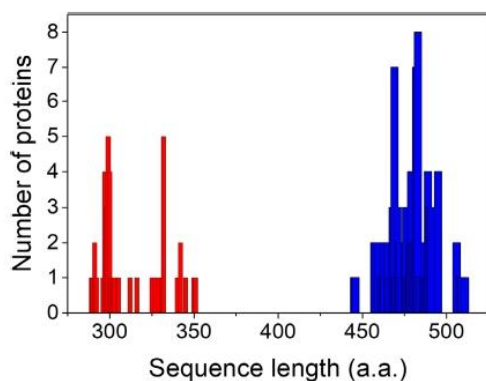


Fig. 9. Sequence length distribution of the analyzed 6PGDs. The first group (red columns) is the short-chain 6PGDs with a sequence length of 290–350 amino acids. The second group (blue columns) is the long-chain 6PGDs with a sequence length of 450–500 amino acids.

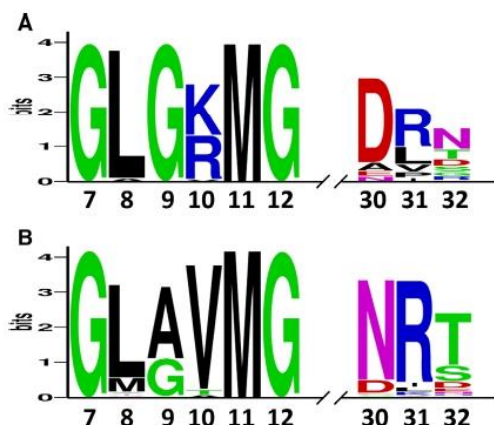


Fig. 11. Sequence conservation analysis of 6PGDs. Residues from the nucleotide fingerprint and some of the nucleotide-binding residues. (A) Sequence logos for the short-chain 6PGDs. (B) Sequence logos for the long-chain 6PGDs. Residue numbers are labeled according to the *Gd6PGD*. The height of the symbols indicates the relative frequency of each amino acid at that position. WebLogo online tool (<https://weblogo.berkeley.edu/>) was used to generate this sequence logos.

Purification of *Gd6PGD* from the soluble fraction of *Ga. diazotrophicus*

The cell suspension was supplemented with $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ (phenylmethylsulfonyl fluoride) and sonicated to break cells. The crude extract was centrifuged at $180\,000\text{ g}$ for 45 min. The pellet was discarded, and the supernatant containing both periplasmic and cytoplasmic proteins (soluble fraction) was used for enzyme preparation. This fraction was applied to a QAE-Toyopearl column ($5 \times 18\text{ cm}$; Supelco-Sigma-Aldrich Corp., Bellefonte, PA, USA) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 5.8. 6PGD was washed away with three bed volumes of the same buffer. The recovered 6PGD was then applied to a Ha-Ultrogel column (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA) ($2.5 \times 15\text{ cm}$) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 5.8. Nonretained protein was washed, and *Gd6PGD* was eluted with a $0.01\text{--}0.25\text{ M}$ potassium phosphate buffer linear gradient (pH 5.8). Protein concentrations were determined by a standard Lowry procedure [56]. Protein was stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$ for no more than 2 days. For long-term storage, the protein was stored at $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Purification of *Gd6PGD* from the membrane extracts of *Ga. diazotrophicus*

The cell suspension was supplemented with $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ phenylmethylsulfonyl fluoride and sonicated to break cells. The crude extract was centrifuged at $180\,000\text{ g}$ for 45 min.

The obtained pellet was resuspended in 10 mM phosphate buffer, pH 5.8, and centrifuged again at $180\,000\text{ g}$ for 45 min. Membranes were recovered from the later pellet and suspended in a 10 mM potassium phosphate buffer, pH 5.8 and 0.5% (v/v) Triton X-100 and incubated at $4\text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h under gentle stirring. The mixture was thereafter centrifuged at $180\,000\text{ g}$ for 45 min, and the supernatant (containing the active 6PGD) was applied to a QAE-Toyopearl column ($5 \times 18\text{ cm}$) (Supelco-Sigma-Aldrich Corp. Bellefonte PA, USA) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 5.8 containing 0.1% (v/v) Triton X-100. 6PGD was washed away with three bed volumes of the same buffer. The recovered 6PGD was then applied to a Ha-Ultrogel column ($2.5 \times 15\text{ cm}$; Sigma-Aldrich, Corp.) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 5.8 containing 0.1% (v/v) Triton X-100. Nonretained protein was washed, and *Gd6PGD* was eluted with a 0.01 to 0.25 M potassium phosphate buffer linear gradient containing 0.1% Triton X-100 (pH 5.8). Protein concentrations were determined by a standard Lowry procedure [56]. We stored the protein at $4\text{ }^\circ\text{C}$ for no more than 2 days and long-term storage at $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Enzyme assays

The 6PGD activity was determined according to the Beutler method, as described by Çakmakçi *et al.* [57]. The assay system contained 0.1 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.6 mM 6-phosphogluconic acid, and 0.2 mM NAD^+ or 0.2 mM NADP^+ in a total volume of 1 mL . The increase in A_{340} was monitored over 3 min. One unit of enzyme activity was defined as the reduction of $1\text{ } \mu\text{mol NAD}^+\cdot\text{min}^{-1}$ or the reduction of $1\text{ } \mu\text{mol NADP}^+\cdot\text{min}^{-1}$ under the assay conditions. Electronic absorption spectra were recorded on an Agilent 8453 diode array spectrophotometer.

Kinetic studies

For the cofactor (NAD(P)^+) K_m value determination, a typical assay contained 0.1 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.6 mM 6-phosphogluconic acid, and $0.2\text{--}2.0\text{ mM}$ NAD^+ or $0.2\text{--}2.0\text{ mM}$ NADP^+ . For the substrate (6-phosphogluconic acid) K_m value determination, a typical assay contained 0.1 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM NAD^+ , and $0.2\text{--}6.0\text{ mM}$ 6PG. In all cases, the reduction of NAD(P)^+ to NAD(P)H was measured by UV-Vis as the increase in A_{340} and monitored over 3 min. The initial rates were analyzed, and the kinetical parameters were determined from the nonlinear regression of the Michaelis-Menten model with the GRAPH PAD PRISM 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All kinetical assays were done in triplicate. Triton X-100 was removed with 0.5 mL Pierce Detergent Removal Spin Columns (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Sequences alignment

Amino acid sequences of four 6PGDs from acetic acid bacteria, namely *Ga. diazotrophicus* (*Gd*), *A. aceti* (*Aa*), *A. pasteurianus* (*Ap*), and *K. xylinus* (*Kx*), were aligned together with other eight 6PGD from non-acetic acid bacteria and superior organisms, namely *V. diazotrophicus*, *O. aries*, *T. grayi*, *T. brucei*, *L. lactis*, *G. stearothermophilus*, *S. cerevisiae*, and *K. pneumoniae*. The sequence alignment was carried on with the DIALIGN software developed by Morgenstern [58,59]. A search in UniProt [43] and GenBank [44] gives only one nonredundant sequence for *Gd6PGD* encoded by the *gnd* gene.

Crystallization of Gd6PGD

Gd6PGD was purified from the membrane fraction of the bacteria. Crystallization assays were carried out at 18 °C by the hanging-drop vapor diffusion method. The protein was dialyzed in 10 mM sodium phosphate pH 6.0 and 0.1 % Triton X-100, and concentrated to 22, 33, and 63.8 mg·mL⁻¹ using Amicon centrifugal devices with 10 000 MW cutoff (Merck KGaA, Rockland, MA, USA). Two microliters of the protein solution were mixed two microliters of the crystallization solution (0.1 M Tris/sodium citrate pH 5.6, 10 % v/v isopropanol, and 10 w/v PEG 4000) onto siliconized glass cover slides and incubated in a sealed crystallization plate for 1 year. Crystals grew from the three different concentrations. The best crystal had dimensions of 30 × 50 μm.

Data collection and processing

The best *Gd6PGD* crystals were cryoprotected in a saturated lithium sulfate solution and diffracted in an in-house X-ray diffractometer Micromax007-HF with a rotating anode generator (Cu, $\lambda = 1.5416$ Å) under cryogenic conditions (103 K) at the Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM). For sulfur-SAD phasing, considering eleven Met and three Cys residues present in the protein, we collected highly redundant data at 1.87 Å using a DECTRIS Pilatus detector. The dataset was integrated and scaled using HKL3000 to obtain a.sca file [60] that was used in AutoSol from Phenix [61] to obtain the initial phases and model. Crystals belong to the C121 space group, as shown in Table 6.

We used the suite of programs in PHENIX for structure determination and refinement [62]. Experimental phasing was performed with the AUTOSOL program [61], which is a phasing algorithm that uses Hybrid Substructure Search (HySS) [63] for finding heavy-atom sites and SOLVE and RESOLVE [64] for calculating experimental phases and for density modification. After SAD phases were calculated, AutoSol automatically carried out density modification (Resolve) and NCS identification. The program found

eleven sulfur atoms with a FOM of 0.456 and LLG of 171. The polypeptide chain was partially built automatically with the AUTOBUILD Program and completed manually using COOT [65], the protein sequence, and the 2Fo-Fc and Fo-Fc electron density maps. The protein model was iteratively refined with Phenix.refine and built with COOT [65,66]. Then, double conformations of Ser 249, Glu284, and Ile296 in monomer A and Ser 249 in monomer B were added, as well as the solvent, one PEG and one Mg²⁺ ion, according to the electron density maps.

Phylogenetic analysis

Protein sequence data were retrieved in November 2019 from UniProt [43] and GenBank [44] nonredundant protein sequence databases. Progressive multiple protein sequence alignments were calculated with MUSCLE [67,68]. Phylogenetic analyses were carried out with MEGA X version 10.1.6 software [69], using both character-based (MP and ML) and distance-based methods (UPGMA, NJ, and ME), with the aid of the empirical Jones-Taylor-Thornton amino acid substitution model; gaps were treated by pair-wise deletion. Differences between amino acid sequences were corrected for multiple substitutions assuming a γ -distribution for rate variations between sites ($a = 1.0$). Confidence limits of branch points were estimated by 500 bootstrap replications. A list with the UniProt database accession number for each sequence is given in Table S1.

Acknowledgements

MES-T and AR-R gratefully acknowledge the financial support by CONACYT (Projects 128921 and 299048) and by DGAPA-UNAM (Projects IN231111 and IN208418). PDS-P thanks CONACYT for a Ph.D. scholarship (588051). The authors are thankful to Dr. Carol Martínez-Caballero for setting the crystallization trials, to M.C. Georgina Espinosa-Pérez from LANEM-IQ-UNAM for assistance during data collection and processing, and to Q. Malinali Sánchez-Ostria from FQ-UNAM for her help in the enzyme assays. We also thank Dr. Leobardo Serrano and T.L.I. Mario Caro from IBT-UNAM for letting us the use of the fermenter to grow the bacteria at large scale and especially Q. Laurel Elide Fábila Ibarra from FQ-UNAM for technical assistance. We express our gratitude to Prof. Peter M. H. Kroneck from the University of Konstanz for the critical review of this manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

MES-T conceived the project and designed the experiments. PDS-P performed all the experiments. AR-R and AR-H determined the crystal structure. PDS-P, MES-T, AR-H, and AR-R performed structural analysis. PDS-P, MES-T, and AR-R wrote the manuscript. PDS-P, AR-H, AR-R, and MES-T discussed experimental design and data analysis besides a critical read and improvement of the manuscript.

References

- Mamlouk D & Gullo M (2013) Acetic acid bacteria: physiology and carbon source oxidation. *Indian J Microbiol* **53**, 377–384.
- Matsushita K, Toyama H & Adachi O (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* **36**, 247–297.
- Matsushita K, Toyama H & Adachi O (2004) Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respiration. In *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems* (Zannoni D, ed), pp. 81–99. Springer, Dordrecht.
- Komagata K, Lino T & Yamada Y (2014) The family *Acetobacteraceae*. In *The Prokaryotes. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, Vol. 1 (Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E & Thompson F, eds), pp. 3–78. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Gómez-Manzo S, Contreras-Zentella M, González-Valdez A, Sosa-Torres ME, Arreguín-Espinoza R & Escamilla-Marván E (2008) The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int J Food Microbiol* **12**, 71–78.
- Gómez-Manzo S, Solano-Peralta A, Saucedo-Vázquez JP, Escamilla-Marván JE, Kroneck PMH & Sosa-Torres ME (2010) The Membrane-bound quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* **49**, 2409–2415.
- Gómez-Manzo S, Chavez-Pacheco JL, Contreras-Zentella M, Sosa-Torres ME, Arreguín-Espinoza R, Pérez de la Mora M, Membrillo-Hernández J & Escamilla JE (2010) Molecular and catalytic properties of the aldehyde dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a quinoxinoprotein containing pyrroloquinoline quinone, cytochrome *b*, and cytochrome *c*. *J Bacteriol* **192**, 5718–5724.
- Yakushi T & Matsushita K (2010) Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1257–1265.
- Gómez-Manzo S, González-Valdez AA, Oria-Hernández J, Reyes-Vivas H, Arreguín-Espinoza R, Kroneck PMH, Sosa-Torres ME & Escamilla JE (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**, 106–113.
- Gómez-Manzo S, Escamilla JE, González-Valdez A, López-Velázquez G, Vanoye-Carlo A, Marcial-Quino J, de la Mora-de la Mora I, Garcia-Torres I, Enríquez-Flores S, Contreras-Zentella ML *et al.* (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**, 1293–1311.
- Saichana N, Matsushita K, Adachi O, Frébert I & Frebortova J (2015) Acetic acid bacteria: a group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol Adv* **33**, 1260–1271.
- De Roos J & De Vuyst L (2018) Acetic acid bacteria in fermented food and beverages. *Curr Opin Biotechnol* **49**, 115–119.
- Hauge JG, King TE & Cheldelin VH (1955) Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* **214**, 11–26.
- Kitos PA, Wang CH, Mohler BA, King TE & Cheldelin VH (1958) Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* **233**, 1295–1298.
- White G & Wang C (1964) The dissimilation of glucose and gluconate by *Acetobacter xylinum*. 1. The origin and the fate of triose phosphate. *Biochem J* **90**, 408–423.
- Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Soto-Urzuza L, Aguilar GR, Baca BE & Escamilla JE (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J Bacteriol* **181**, 6987–6995.
- Attwood MM, Dijken JP & Pronk JT (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng* **72**, 101–105.
- Alvarez B & Martinez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* **41**, 918–924.
- Tejera NA, Ortega E, Rodés R & Lluch C (2004) Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* **50**, 745–750.
- Luna MF, Bernardelli CE, Galar ML & Boiardi JL (2006) Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Curr Microbiol* **52**, 163–168.

- 21 Luna MF & Boiardi JL (2008) Growth yields and glucose metabolism of N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 587–590.
- 22 Lery LMS, Coelho A, Kruger WMA, Gonçalves MSM, Santos MF, Valente RH, Santos EO, Rocha SLG, Perales J, Domont GB *et al.* (2008) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugar cane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics* **8**, 1631–1644.
- 23 Arai H, Sakurai K & Ishii M (2016) Metabolic features of *Acetobacter aceti*. In *Acetic Acid Bacteria* (Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N & Okamoto-Kainuma A eds), pp. 255–271. Springer, Tokio.
- 24 Bringer S & Bott M (2016) Central carbon metabolism and respiration in *Gluconobacter oxydans*. In *Acetic Acid Bacteria* (Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N & Okamoto-Kainuma A, eds), pp. 235–253. Springer, Tokio.
- 25 Wünschiers R (2012) Carbohydrate metabolism and citrate cycle. In *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology* (Michal G & Schomburg D, eds), 2nd edn, pp. 51–52. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- 26 Rosemeyer MA (1987) The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochem Funct* **5**, 79–95.
- 27 Haeussler K, Fritz-Wolf K, Reichmann M, Rahlfs S & Becker K (2018) Characterization of *Plasmodium falciparum* 6-phosphogluconate dehydrogenase as an antimalarial drug target. *J Mol Biol* **430**, 4049–4067.
- 28 Cho ES, Cha YH, Kim HS, Kim NH & Yook JI (2018) The pentose phosphate pathway as a potential target for cancer therapy. *Biomol Ther* **26**, 29–38.
- 29 Yang X, Peng X & Huang J (2018) Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase selectively targets breast cancer through AMPK activation. *Clin Transl Oncol* **20**, 1145–1152.
- 30 Adams MJ, Ellis GH, Gover S, Naylor CE & Phillips C (1994) Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure* **2**, 651–668.
- 31 Phillips C, Dohnalek J, Gover S, Barret MP & Adams MJ (1998) A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues. *J Mol Biol* **282**, 667–681.
- 32 Sundaramoorthy R, Iulek J, Barrett MP, Bidet O, Ruda GF, Gilbert IH & Hunter WN (2007) Crystal structures of a bacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase reveal aspects of specificity, mechanism and mode of inhibition by analogues of high-energy reaction intermediates. *FEBS J* **274**, 275–286.
- 33 He W, Wang Y, Liu W & Zhou CZ (2007) Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. *BMC Struct Biol* **7**, 38.
- 34 Cameron S, Martini VP, Iulek J & Hunter WN (2009) *Geobacillus stearothermophilus* 6-phosphogluconate dehydrogenase complexed with 6-phosphogluconate. *Acta Crystallogr Sect F* **65**, 450–454.
- 35 Chen YY, Ko TP, Chen WH, Lo LP, Lin CH & Wang AHJ (2010) Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: implications for enzyme mechanism. *J Struct Biol* **169**, 25–35.
- 36 Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, Shan C, Dai Q, Zhang L, Xie J *et al.* (2012) Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* **22**, 585–600.
- 37 Adachi O & Ameyama M (1982) 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Methods Enzymol* **89**, 291–295.
- 38 Rauch B, Pahlke J, Schweiger P & Deppenmeier U (2010) Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 711–718.
- 39 Richhardt J, Bringer S & Bott M (2012) Mutational analysis of the pentose phosphate and entner-doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a $\Delta edd \Delta eda$ mutant on mannitol. *Appl Environ Microbiol* **78**, 6975–6986.
- 40 Richhardt J, Bringer S & Bott M (2013) Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4315–4323.
- 41 Liu Q & Hendrickson WA (2015) Crystallographic phasing from weak anomalous signals. *Curr Opin Struct Biol* **34**, 99.
- 42 Bisswanger H (2008) *Enzyme Kinetics*, 2nd edn. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. 91–119.
- 43 The UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* **47**, D506–D515.
- 44 NCBI Resource Coordinators (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **44**, D7–D19.
- 45 Wierenga RK, Terpstra P & Hol WGJ (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -folding in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**, 101–107.
- 46 Scrutton NS, Berry A & Perham RN (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**, 38–43.

- 47 Tetaud E, Hanau S, Wells JM, Le Page RWF, Adams MJ, Arkison S & Barrett MP (1999) 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme. *Biochem J* **338**, 55–60.
- 48 Adams MJ, Gover S, Leback R, Phillips C & Somers DO (1991) The structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr B* **47**, 817–820.
- 49 González B, Martínez S, Chávez JL, Lee S, Castro NA, Domínguez MA, Gómez S, Contreras ML, Kennedy C & Escamilla JE. (2006) Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome bb and cyanide-resistant cytochrome ba quinol oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1614–1622.
- 50 Matsutani M, Hirakawa H, Sriherfyna FH, Yakushi T & Matsushita K (2019) Diversity of NADH dehydrogenases in acetic acid bacteria: adaptation to modify their phenotype through gene expansions and losses and neo-functionalization. *Microbiology* **165**, 287.
- 51 Kostner D, Luchterhand B, Junker A, Voland S, Daniel R, Büchs J, Liebl W & Ehrenreich A (2015) The consequence of an additional NADH dehydrogenase paralog on the growth of *Gluconobacter oxydans* DSM3504. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 375.
- 52 Huelsenbeck JP & Rannala B (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**, 227.
- 53 Nei M & Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc., New York, NY. 73–186.
- 54 Bleidorn C (2017) Phylogenetic analyses. In *Phylogenomics* (Bleidorn C, ed), pp.143–172. Springer, Cham.
- 55 Ajawatanawong P (2016) Molecular phylogenetics: concepts for a newcomer. In *Network Biology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Nookaew I, ed), pp. 160. Springer, Cham.
- 56 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265.
- 57 Çakmakçi R, Erat M, Oral B, Erdogan Ü & Sahin F (2009) Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria. *J Hort Sci Biotechnol* **84**, 375–380.
- 58 Morgenstern B (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**, 211–218.
- 59 Morgenstern B (2004) DIALIGN: Multiple DNA and protein sequence alignment at BiBiServ. *Nucleic Acids Res* **32**, W33–W36.
- 60 Minor W, Cymborowski M, Otwinowski Z & Chruszcz M (2006) HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution - from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr D* **62**, 859–866.
- 61 Terwilliger TC, Adams PD, Read RJ, McCoy AJ, Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Afonine PV, Zwart PH & Hung LW (2009) Decision-making in structure solution using bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr D* **65**, 582–601.
- 62 Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D* **66**, 213–221.
- 63 Grosse-Kunstleve RW & Adams PD (2003) Substructure search procedures for macromolecular structures. *Acta Crystallogr D* **59**, 1966–1973.
- 64 Terwilliger TC (2003) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Methods Enzymol* **374**, 22–37.
- 65 Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* **60**, 2126–2132.
- 66 Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH & Adams PD (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D* **68**, 352–367.
- 67 Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792–1797.
- 68 Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 113.
- 69 Kumar S, Tamura K & Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150–163.
- 70 Pickl A & Schönheit P (2015) The oxidative pentose phosphate pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of glucose-6-phosphate dehydrogenase – the archaeal Zwischenferment. *FEBS Lett* **589**, 1105.
- 71 Hanau S, Rippla M, Bertelli M, Dalocchio F & Barrett MP (1996) 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur J Biochem* **240**, 592–599.
- 72 Veronese FM, Boccu E, Fontana A, Benassi CA & Scoffone E (1974) Isolation and some properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta* **334**, 31–44.
- 73 Rendina AR, Hermes JD & Cleland WW (1984) Use of multiple isotope effects to study the mechanism of 6-

- phosphogluconate dehydrogenase. *Biochemistry* **23**, 6257–6262.
- 74 Dyson JE, D’Orazio RE & Hanson WH (1973) Sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase: isolation procedure and effect of pH, ionic strength, and metal ion on the kinetic parameters. *Arch Biochem Biophys* **154**, 623–635.
- 75 Topham CM, Matthews B & Dalziel K (1986) Kinetic studies of 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. *Eur J Biochem* **156**, 555–567.
- 76 Pearse BM & Rosemeyer MA (1974) Human 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions and NADPH on its activity. *Eur J Biochem* **42**, 213–223.
- 77 Schrodinger L (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.4. Schrodinger LLC, New York, NY.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. UniProt database accession numbers for sequences used in the Phylogenetic analysis.



Bioinorganic insights of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenases

Pedro D. Sarmiento-Pavía¹ · Martha E. Sosa-Torres¹

Received: 9 October 2020 / Accepted: 7 January 2021
© Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2021

Abstract

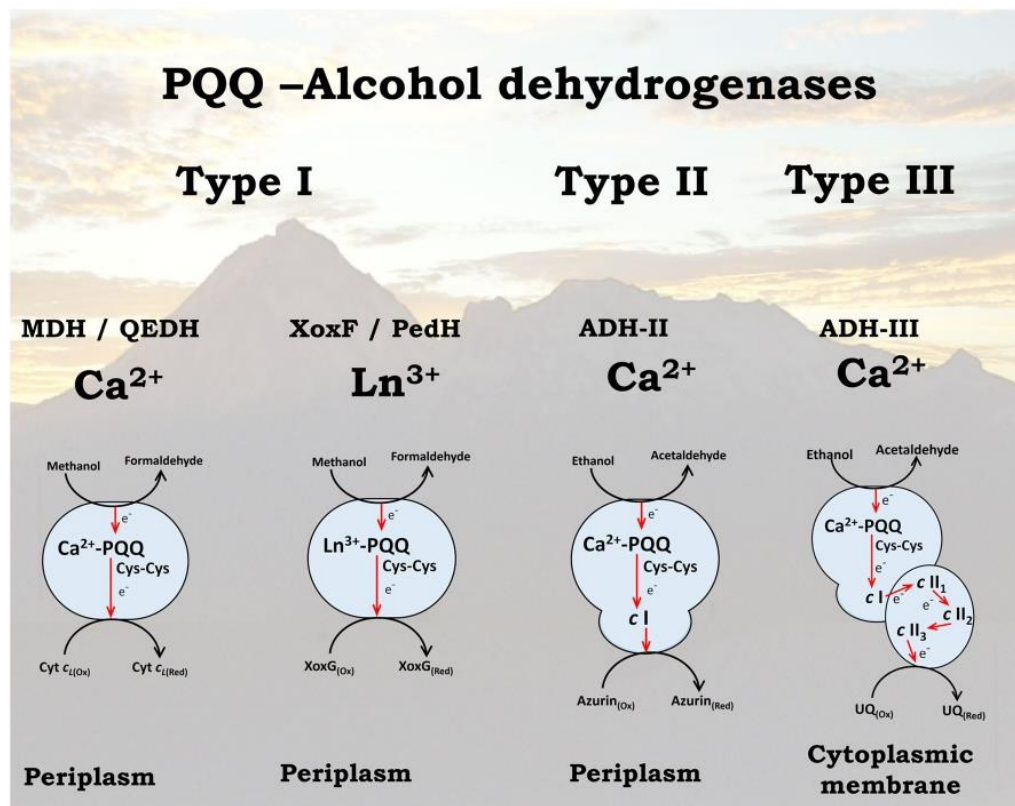
Among the several alcohol dehydrogenases, PQQ-dependent enzymes are mainly found in the α , β , and γ -proteobacteria. These proteins are classified into three main groups. Type I ADHs are localized in the periplasm and contain one Ca^{2+} -PQQ moiety, being the methanol dehydrogenase (MDH) the most representative. In recent years, several lanthanide-dependent MDHs have been discovered exploding the understanding of the natural role of lanthanide ions. Type II ADHs are localized in the periplasm and possess one Ca^{2+} -PQQ moiety and one heme *c* group. Finally, type III ADHs are complexes of two or three subunits localized in the cytoplasmic membrane and possess one Ca^{2+} -PQQ moiety and four heme *c* groups, and in one of these proteins, an additional [2Fe-2S] cluster has been discovered recently. From the bioinorganic point of view, PQQ-dependent alcohol dehydrogenases have been revived recently mainly due to the discovery of the lanthanide-dependent enzymes. Here, we review the three types of PQQ-dependent ADHs with special focus on their structural features and electron transfer processes.

This work is dedicated to the memory of Prof. José Edgardo Escamilla who introduced us into the fascinating field of the alcohol dehydrogenases.

✉ Martha E. Sosa-Torres
mest@unam.mx

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Graphic abstract



The PQQ-Alcohol dehydrogenases are classified into three main groups. Type I and type II ADHs are located in the periplasm, while type III ADHs are in the cytoplasmic membrane. ADH-I have a Ca-PQQ or a Ln-PQQ, ADH-II a Ca-PQQ and one heme-c and ADH-III a Ca-PQQ and four hemes-c. This review focuses on their structural features and electron transfer processes.

Keywords Alcohol dehydrogenases · PQQ · Calcium · Magnesium · Heme *c* · Lanthanide proteins · Disulfide bridge · Electron transfer

Abbreviations

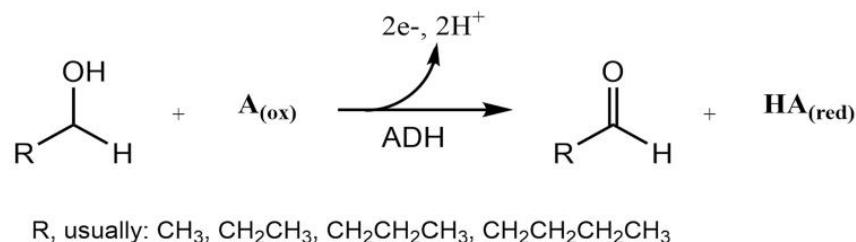
- ADH Alcohol dehydrogenase
- ADHa Active form of the alcohol dehydrogenase
- ADHi Inactive form of the alcohol dehydrogenase
- ADH-I Type I alcohol dehydrogenase
- ADH-II Type II alcohol dehydrogenase
- ADH-III Type III alcohol dehydrogenase
- EPR Electron paramagnetic resonance
- GDH Glucose dehydrogenase
- Ln³⁺ Lanthanide ions
- MDH Methanol dehydrogenase
- MxaF Calcium-dependent methanol dehydrogenase
- MxaG MxaF electron acceptor, cytochrome *c*_L
- PQQ Pyrroloquinoline quinone
- QEDH Ethanol dehydrogenase
- SUI Subunit I

- SUII Subunit II
- UQ Ubiquinone
- XoxF Lanthanide-dependent methanol dehydrogenase
- XoxG XoxF electron acceptor, cytochrome *c*

Introduction

Alcohol dehydrogenases (ADHs) are widely distributed in nature, from bacteria to mammals. They catalyze the general oxidation reaction of a hydroxyl group via an electron acceptor *A*_(ox), as shown in the Scheme 1. According to the nature of the cofactor used as the electron acceptor, enzymes that oxidize alcohols have been classified into four groups [1]: (1) NAD(P)⁺-dependent AHDs, (2) FAD-dependent alcohol

Scheme 1 General oxidation reaction of alcohols by alcohol dehydrogenases (ADHs)



oxidases, (3) Heme and the cofactor F₄₂₀-containing ADHs, and (4) Pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent ADHs.

1. NAD(P)⁺-dependent enzymes are the most common ADHs. They are usually divided into three groups [2, 3]. Group I enzymes belong to the “medium-chain” dehydrogenase/reductase family (MDR) and it is, by far, the most studied group. They are Zn²⁺-dependent enzymes [2, 4], and have been sorted into eight classes due to their sequence homology, catalytic activity, and gene expression features [2]. Group II belong to the “short-chain” (SDR) family. They have no metal cofactor and are usually called the “insect” ADH as the best studied example comes from *D. melanogaster* [2, 4]. Group III ADHs are described as “iron-dependent/activated” enzymes. Compared to group I and II, iron-dependent ADHs have not been as extensively studied [5, 6].
2. FAD-dependent alcohol oxidases are produced by some methylotrophic yeast and fungi. They differ from alcohol dehydrogenases in that they oxidize alcohols to aldehydes irreversibly producing hydrogen peroxide [1, 3].
3. F₄₂₀-containing ADHs belong to the Luciferase-Like Hydride Transferase (LLHT) family of the cofactor F₄₂₀-dependent enzymes [6, 7]. They usually catalyze the reversible oxidation of secondary alcohols and have been proposed to participate in cascades for deracemization/stereoinversion of *sec*-alcohols and in chiral amine synthesis [8, 9].
4. PQQ-dependent ADHs are mainly found in the α , β , and γ -proteobacteria and may be subdivided into [10–12]:

Type I quinoproteins localized in the periplasm, contain one Ca²⁺-PQQ moiety, and include the methylotroph’s Ca²⁺-methanol dehydrogenases Ca²⁺-MDH, and the ethanol dehydrogenases Ca²⁺-QEDH [10, 13]. In recent years, some alcohol dehydrogenases of type I have been described with other metal ions instead of Ca²⁺, such as the Mg²⁺-MDH [14] and the lanthanide-dependent dehydrogenases Ln³⁺-MDH and Ln³⁺-QEDH [12, 15].

Type II quinohemoproteins monomeric proteins localized in the periplasm, contain Ca²⁺-PQQ, and a covalently bound heme *c* [1, 10].

Type III membrane-bound quinohemoproteins specific of acetic acid bacteria, either dimeric or trimeric proteins localized in the cytoplasmic membrane. Contain Ca²⁺-PQQ and a covalently bound heme *c* in the first subunit and three heme *c* groups in the second subunit [1, 12, 16]. Additionally, in recent years, a [2Fe-2S] cluster was found in the first subunit of the ADH-III from *Ga. diazotrophicus* [17].

In contrast with the Zn-dependent ADHs [18, 19], other multi-heme enzymes [20–22], or the well-known cytochromes [22–29], PQQ-dependent alcohol dehydrogenases had received little attention from a bioinorganic point of view; however, this topic has been revived recently, mainly due to the discovery of the lanthanide-dependent enzymes [15, 30, 31]. Interestingly, PQQ-dependent alcohol dehydrogenases present inorganic sites with metal ions like Ca²⁺ and Mg²⁺ or La³⁺ and Ce³⁺, several heme groups, or novel coordination mode for a [2Fe-2S] cluster, yet to be crystallographic determined.

In the present work, we review the three types of PQQ-dependent ADHs with special focus on their structural features and electron transfer processes. Besides, we go a little deeper into the biological role of Ln³⁺ and their regulatory system.

Type I, soluble, alcohol dehydrogenases

The PQQ cofactor was first isolated in the 60’s from a GDH [32] and from a MDH [33]. EPR studies in the late 70’s showed a quinone-radical signal at 2.004 with hyperfine couplings to two ¹⁴N nuclei and to three ¹H [34]. Fully structural characterization was possible by X-ray crystallography [35]. Its function in dehydrogenases was studied and described primarily by Duine’s group between the 80’s and the 90’s [36–40], showing that the orthoquinone becomes reduced to quinol during catalysis. Besides, the first X-ray MDH structures [41–44] confirmed the presence of a Ca²⁺ ion coordinated to the PQQ.

Ca²⁺-PQQ methanol dehydrogenases (MDHs)

Since its discovery at the mid-60s [45] and up to the last decade, MDHs were the best described class of quinoproteins [1, 11]. These proteins are found in Gram-negative methylotrophic bacteria and in most of methanotrophs. It catalyzes the oxidation of methanol to formaldehyde in the periplasmic region, donating the electrons to the cytochrome c_L and then to the electron transfer chain generating one ATP per methanol molecule [46]. Several MDH X-ray structures have been reported from *Methylobacterium extorquens* (formerly known as *Methylobacterium extorquens* [47]) [43, 44, 48–50] PDB: 1H4J, 1W6S], *Methylophilus methylotrophus* [51, 52 PDB 2AD6, 2AD7, 2AD8], *M. methylotrophus* W3A1 [42, 53 PDB 4AAH, 1G72] *Paracoccus denitrificans* [54 PDB 1LRW], *Hyphomicrobium denitrificans* [55 PDB 2D0V], and *Methylococcus capsulatus* [56 PDB 4TQO].

All the above enzymes have a very similar structure consisting in an α subunit (60–66 kDa) and a β subunit (8.5–10 kDa) forming heterotetramers $\alpha_2\beta_2$ of about 140 kDa [1]. Subunit α is a super-barrel made up of eight four-stranded antiparallel twisted β sheets (W-shaped) that stack radially around a pseudo-eightfold symmetry axis going through the center of the subunit, forming an 8-bladed propeller-like super-barrel (Fig. 1a). This β -propeller fold motif was described in the early 90's [57] and has been found in several enzymes [58]. Subunit β is a seven-turn, α -helix at its C-terminus and several turns with a disulfide bridge and a Pro-enriched region at the N-terminus. It has the shape of a letter J and interacts with the α subunit by ionic and hydrophobic interactions (Fig. 1b). The role of this small subunit is not clear, but it may have a specific function such as stabilizing the enzyme structure, interacting with the electron carrier cytochrome c_L , or influencing indirectly the catalytic function [1].

The PQQ cofactor and the Ca²⁺ ion are located in the center of the propeller. PQQ is sandwiched between the almost coplanar indole ring of a Trp and a disulfide bridge formed by adjacent cysteine residues. In all known MDHs structures, the Ca²⁺ ion is seven coordinated to C-7 carboxylate O, C-5 carbonyl O, and N-6 quinoline N atoms from PQQ and to both carboxylate O atoms from a Glu as well as to an O atom from the side-chain of an Asn residue (Fig. 2). The distance between Ca²⁺ and these O atoms in all cases is between 2.1 and 3.2 Å (Table 1). There is also an additional Asp residue usually coordinated to Ca²⁺ with distances between 2.9 and 3.2 Å (Table 1). However, in the structure of Ca²⁺-MDH from *M. extorquens* at 1.2 Å resolution, the distance to the Asp is of 3.7 Å, indicating a six coordination sphere for the Ca²⁺ (Fig. 3). When comparing the distance range of the Asp residue to the Ca²⁺ with the distance range of Ca to side-chain oxygen atoms of 1.6–3.5 Å [59], it seems that the coordination of the Asp residue to the Ca²⁺ may be labile.

Calcium ion role in the Ca²⁺-MDH

It is important to mention that PQQ in these proteins is normally isolated in the semireduced state, as a semiquinone with a typical UV absorbance at 345 nm [60, 61] and the Ca²⁺ ion tightly bound to the PQQ and, therefore, is not usually possible to remove the metal ion from MDH [11]. This semireduced protein was usually called as “green” enzyme [60]. However, the MDH from *Methylophaga marina*, a marine methylotroph, was occasionally isolated as a “redish” enzyme with a UV spectrum with higher absorbance by the prosthetic group at 520 and a lower absorbance at 345 nm. In this latter enzyme, the activity was about 42% lower than in the normal “green” enzyme. The low activity was due to the lack of calcium, but the activity could be restored by incubation in 10–20 mM Ca²⁺ [60].

MxaA, MxaK, and MxaL genes involved in Ca²⁺ incorporation [62–64] were identified and deflected observing normal levels of α and β subunits but with no activity and with abnormal UV spectra [62]. Later, it was confirmed that these mutants had PQQ incorporated but lacked Ca²⁺. Incubation of the mutants with high concentrations of Ca²⁺ and pH higher than 9.5 reconstituted the active enzyme with a normal UV spectrum [61].

Some studies have shown a replacement of the Ca²⁺ by Sr²⁺ by growing the bacteria *P. denitrificans* [65, 66] and *Methylobacillus glycogenes* [67] in media with strontium instead of calcium, while other studies [68, 69] used MxaA mutants for isolation of inactive calcium-free methanol dehydrogenases from *M. extorquens* and then studied the reconstitution of the enzyme with Ca²⁺, Sr²⁺, and Ba²⁺ ions (reconstitution was not possible when using Li⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺, Mg²⁺, or La³⁺). The high activation energies for the process implied a large conformational change during the incorporation of the ions. The affinities of the proteins for the three ions were quite similar; however, the activation energy for the Ba²⁺ incorporation was considerably higher [69]. The kinetics of the Ca²⁺, Sr²⁺, and Ba²⁺ enzymes showed that the activation energy for methanol oxidation in Ba²⁺-MDH was less than half of the Ca²⁺-MDH and that the V_{max} value was twice as high (Table 2). However, the affinity for substrate of the Ba²⁺-MDH was reduced compared to those of the Ca²⁺-MDH and Sr²⁺-MDH (Table 2). These differences are probably due to a change in the conformation of the active site that leads to a decrease in the free energy of substrate binding and therefore to a decrease in activation energy with a lower affinity [68]. Computational studies showed that the decrease in the activation energy was indeed due to the high stabilization of the transition states in Ba²⁺-MDH [70]. Metal ion-exchange experiments seem to confirm that the Ca²⁺ not only holds the PQQ in place but also puts in place the active site amino-acid residues

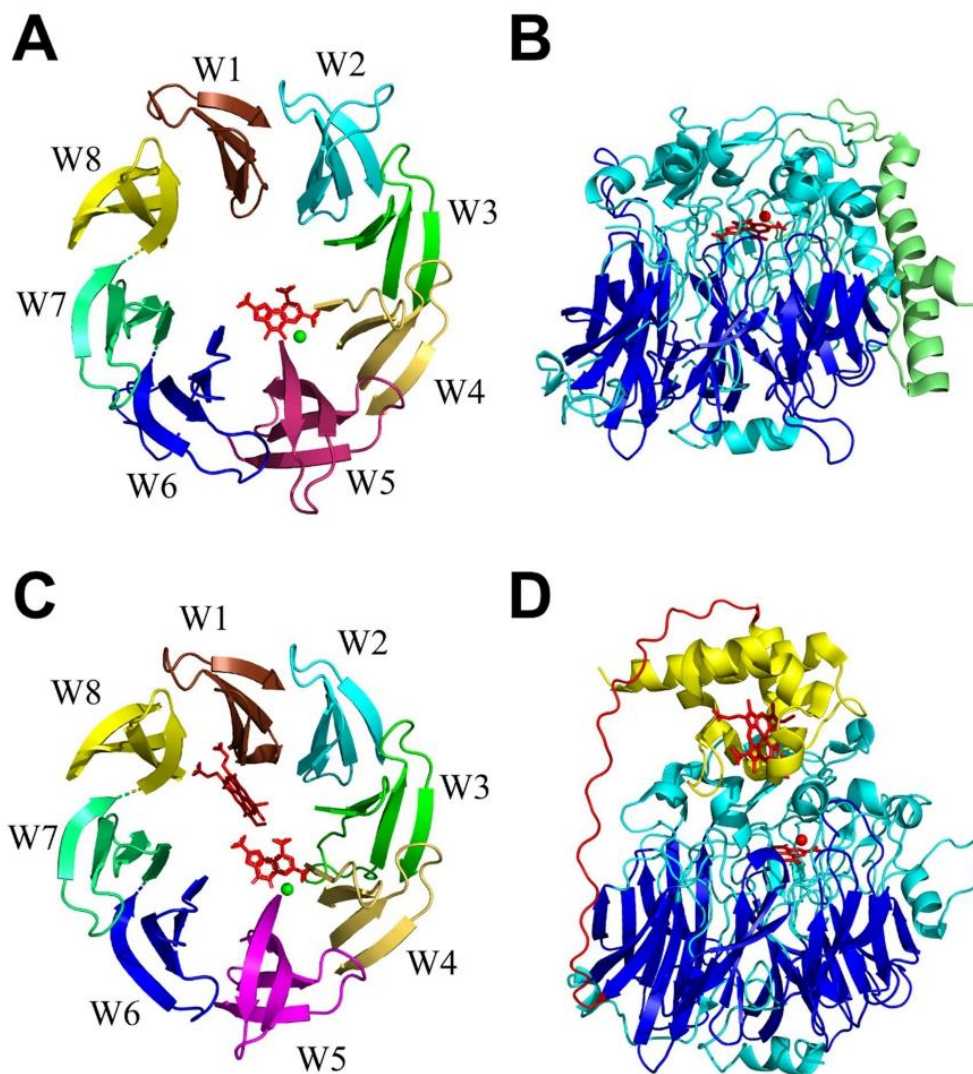


Fig. 1 **a** β -propeller fold motif for the super-barrell in the structure of methanol dehydrogenase, MDH, from *Methylobacterium extorquens* [50, PDB 1W6S]. **b** Structure of the α subunit (blue) and β subunit (green) of the MDH from *Methylobacterium extorquens*. The super-barrel motif has been highlighted in deep blue [50, PDB 1W6S]. **c** β -propeller fold motif for the super-barrell in the structure of quino-

protein alcohol dehydrogenase, ADH-IIB, from *Pseudomonas putida* [141, PDB entry 1KV9]. **d** Structure of the PQQ domain (blue) and heme domain (yellow), connected by a long linker (red), of the ADH-IIB from *Pseudomonas putida*. The super-barrel motif has been highlighted in deep blue [141, PDB entry 1KV9]. Images were created using Pymol [198]

for the binding of substrate and maintains the geometry of the transition state influencing the rate of the reaction [65].

As it was mentioned before, MDH is usually isolated in the free-radical, semiquinone form and it has to be oxidized prior to substrate reaction. However, oxidation of the enzyme (by one-electron acceptors) leads to an inactive enzyme, unless it was protected by competitive inhibitor

cyanide to form an adduct at C5 in PQQ. Besides, in the presence of artificial electron acceptors, it required the presence of an activator (ammonium salts, methylamine, or glycine ethyl ester) [71–73]. Therefore, the lower substrate affinity in Ba^{2+} -MDH allowed to better study the oxidized form in the absence of adducts or activators. The oxidized Ba^{2+} -MDH with absorbance peaks at 405 nm was slowly

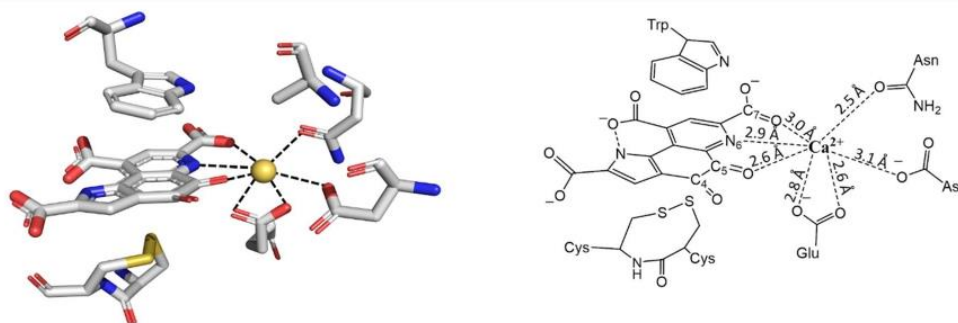


Fig. 2 Ca^{2+} -PQQ structure of the Ca^{2+} -MDH from *M. methylotrophus* [52, PDB 2AD8]. PQQ is sandwiched between a Trp residue and the disulfide bridge. Ca^{2+} is coordinated to Asp, Asn, and Glu residues as well as to PQQ. Image was created using Pymol [198]

reduced by endogenous substrate, and the absorbance at 345 nm was increased while decreased at 405 nm. Addition of methanol increased the rate of reduction, and in both cases, the observed isosbestic point indicated that only two species were present (the initial oxidized form and the final reduced form) and the reaction could be described with a single first-order rate equation [68]. A very recent paper on the enzyme assays with artificial electron acceptors may be especially useful to better understand these assays [31].

In addition to Ca^{2+} structural importance, some studies have gone deeper in the understanding of the role of the metal ion in the catalytic mechanism of MDH [13, 74–78]. Typically, two mechanisms for methanol oxidation were considered [53, 70, 77–79] (Fig. 3), (1) hydride transfer mechanism, where a hydride equivalent is transferred directly to PQQ and (2) the addition–elimination mechanism, where substrate adds to the PQQ forming a hemi-ketalate intermediate. Over the years, the hydride mechanism has been considered the most probable one [1]. The metal ion plays a structural role by maintaining the PQQ moiety in the active conformation but also by acting as a Lewis acid by its coordination to the C5 carbonyl oxygen of PQQ, and therefore increasing the electrophilicity of C5 for the hydride attack [1, 13, 49, 80] (Fig. 3).

Role of the disulfide bridge in the electron transfer

Another important structural feature in MDH (and in most of PQQ-dependent ADHs) is the disulfide bridge in the active site. This is formed by two adjacent cysteine residues and it is located at a distance of 2–3 Å from the PQQ [1]. Even though disulfide bridges are quite common in proteins, vicinal disulfides are pretty rare. Very few vicinal disulfides had been described in some enzymes, receptors, and toxins [81], being the most noticeable in MDHs [43], α subunit of acetylcholine receptor [82], and in some insecticidal neurotoxins [83].

Disulfide bridge in MDH was the first vicinal disulfide reported [43] and the adjacent cysteines were described as bonded by an unusual non-planar *trans-peptide* bond within a strained eight-membered ring and with a smaller S–S distance than in a typical disulfide bond [84]. Although this was in contrast with the theoretical predictions for *cis* vicinal disulfides [85, 86], nowadays have been reported enzymes with both *cis* and *trans-peptide* bond in the vicinal disulfide [81, 87].

Reduction of the vicinal disulfide bridge in MDH led to inactivation with the natural electron acceptor cytochrome c_L , but there was no inactivation when phenazine ethosulfate was used as the electron acceptor [43]. At first, these results were interpreted as the unusual disulfide bridge was playing an important role in the electron transfer reaction. However, oxidation in air and carboxymethylation of the free thiols (which can no longer be involved in redox activity) returned the activity of the enzyme, and additional biochemical experiments indicated that the disulfide bond is not reduced during the reaction cycle. Thus, a possible role in electron transfer appeared to be ruled out [13, 84]. Nonetheless, based on proposals for electron transfer in type II PQQ-ADH, possible electron and proton transfer pathways have been suggested in the MDH from *M. extorquens* in which the disulfide bridge could be implied in the electron transfer (through covalent bonds along the amino-acid chain and through-space jumps) (Fig. 4a, e). As the proton transfer pathway involves Asp303, Glu177 and several water molecules instead of the Cys103 and Cys104, there would be no need to reduce the S–S bond during the electron transfer [50].

Additionally, no important structural changes have been observed upon reduction of the disulfide bridge, so it cannot be considered as a merely structural feature. Besides, not all the PQQ-dependent enzymes have a vicinal disulfide (e.g., glucose dehydrogenase lacks one of the Cys residue). However, in glucose dehydrogenase, the electron acceptor is a membrane ubiquinone (in a two-electron transfer), while

Table 1 Distances to metal ion in crystal structures of several ADHs structures found in the PDB

Type	Metal ion	Distances to metal ion in crystal structure (Å)										CN	PDB entry	Organism	Refs
		PQQ		N-6 quinoline		Asn		Glu		Asp					
		C-7 carboxylate	C-5 carbonyl	O1	O2	O1	O2	O1	O2	O1	O2				
Type I Ca ²⁺ -MDH	Ca ²⁺	2.9	2.7	3.0	2.9	2.7	2.6	2.9	2.9	2.9	2.9	7	2AD6	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	[52]
	Ca ²⁺	3.0	2.6	2.9	2.8	2.6	2.5	3.0	3.0	3.0	3.0	7	2AD8		[52]
	Ca ²⁺	2.4	2.3	2.3	2.4	2.8	3.2	3.7	3.7	3.7	3.7	6	1W6S	<i>Methyloburium extorquens</i>	[50]
	Ca ²⁺	2.6	2.6	2.3	2.5	2.7	2.7	2.4	2.4	2.4	2.4	7	1H4J		[48]
	Ca ²⁺	2.9	2.5	2.8	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	7	4TQO	<i>Methylococcus capsulatus</i>	[56]
	Ca ²⁺	3.2	2.4	2.9	2.4	2.5	3.0	3.2	3.2	3.2	3.2	7	1LLRW	<i>Paracoccus denitrificans</i>	[54]
Type I Ln ³⁺ -MDH	Ce ³⁺	2.7	2.6	2.8	2.9	2.7	2.7	2.9	2.5	2.8	2.8	10	4MAE	<i>Methylacidiphilum fumarolicum</i>	[98]
	Eu ³⁺	2.6	2.6	2.8	3.1	2.8	2.8	3.0	2.5	2.8	2.8	9	6FKW		[102]
	La ³⁺	2.5	2.6	2.8	2.7	2.6	2.6	3.2	2.7	2.5	2.8	9	6DAM	<i>Methylochromobium buryatense</i>	[30]
	La ³⁺	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.8	2.7	2.7	2.7	9	6OC6	<i>Methyloburium extorquens</i> AM1	[103]
Type I Mg ²⁺ -MDH	Mg ²⁺	2.5	2.4	2.7	2.5	2.5	2.6	3.2	3.2	3.2	3.2	7	5XM3	<i>Methylophaga aminisulfivorans</i>	[14]
Type I Ca ²⁺ -QEDH	Ca ²⁺	2.8	2.7	2.9	2.8	2.9	2.9	2.8	2.8	2.8	2.8	7	1FLG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[133]
Type II Ca ²⁺ -ADH	Ca ²⁺	2.4	2.5	2.5	2.4	2.5	2.4	2.7	2.7	2.7	2.7	7	1KB0	<i>Comamonas testosteroni</i>	[146]
	Ca ²⁺	2.4	2.3	2.5	2.4	2.5	2.6	2.7	2.7	2.7	2.7	7	1KY9	<i>Pseudomonas putida</i>	[141]
	Ca ²⁺	2.6	2.4	2.8	2.4	2.9	2.5	2.9	2.9	2.9	2.9	7	1YIQ		[151]

CN coordination number

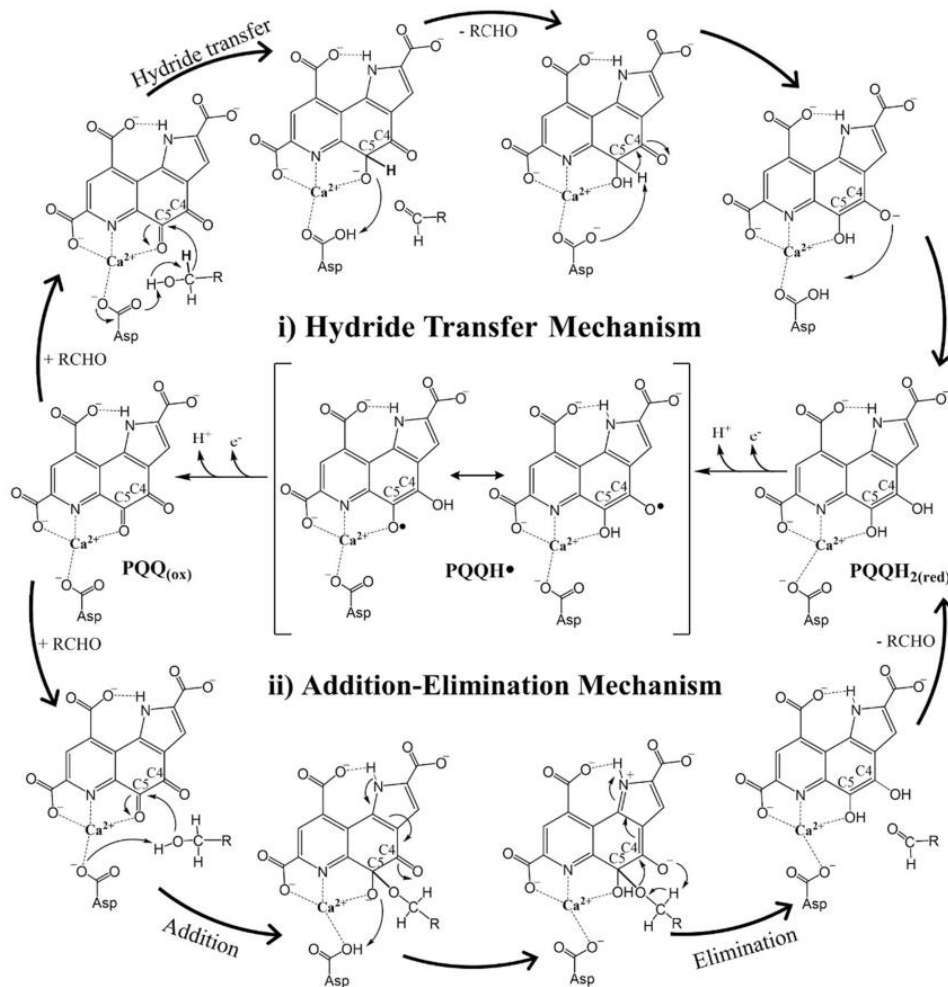


Fig. 3 Reaction cycle mechanisms for alcohol oxidation in quinoproteins by (i) hydride transfer and (ii) addition–elimination [53, 70, 77–79]

Table 2 Kinetics parameters and thermodynamics by Ca²⁺, Sr²⁺, and Ba²⁺-containing MDHs Adapted from [68]

Enzyme	V _{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _M (methanol) (mM)	Activation energy (kJ/mol)
Ca ²⁺ -MDH	810	0.003	35.4
Sr ²⁺ -MDH	1080	0.022	28.2
Ba ²⁺ -MDH	1610	3.5	14.0

in MDH and in most of the PQQ- alcohol dehydrogenases, the electron acceptor is a cytochrome *c*. As the PQQ mediates between the two-electron oxidation of methanol and the one-electron reduction of cytochrome *c*, the formation of a semiquinone radical in the alcohol dehydrogenases becomes a relevant step (Fig. 3), and therefore, it has also

been suggested that the disulfide ring stabilizes the free-radical form of the PQQ [1, 84].

Ln³⁺-PQQ methanol dehydrogenases XoxF

Genome sequencing studies in the mid 90's, revealed the existence of an *xoxF* gene with approximately 50% identity to *mxoF* gene that encodes for the classical Ca²⁺-PQQ MDH. As all the crucial residues involved in PQQ and Ca²⁺ binding in MxoF were conserved in XoxF, it was considered to be a PQQ-linked dehydrogenase [88–90]. Several attempts to identify a robust activity for XoxF failed [90, 91], but studies in *Rhodobacter spheroides* that lacks the *mxoF* gene showed that upon *xoxF* deletion, the bacterium was not able to use methanol for aerobic respiration and photosynthesis, identifying XoxF-type enzyme as a MDH [92].

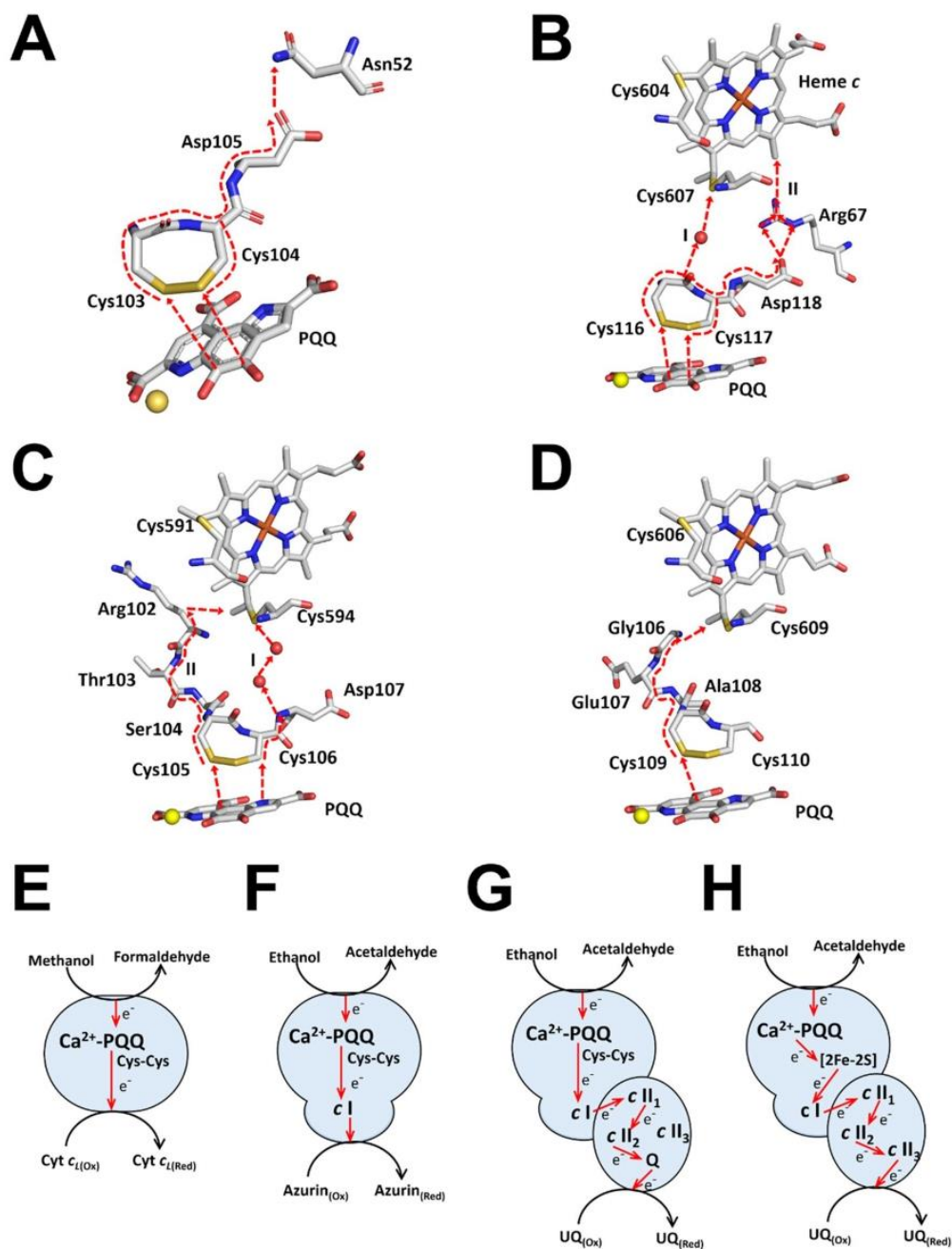


Fig. 4 Proposed pathways for electron transfer for **a** Ca²⁺-MDH *Methylobacterium extorquens* [Adapted from 50, PDB 1W6S], **b** ADH-II from *Comamonas testosteroni* [Adapted from 146, PDB 1KB0], **c** ADH-IIB from *Pseudomonas putida* [Adapted from 141, PDB 1KV9], **d** ADH-IIG from *Pseudomonas putida* [Adapted from 151, PDB 1YIQ]. And models for the intramolecular and intermolecular

electron transfer of **e** type I Ca²⁺-MDH, **f** type II-ADH, **g** type III ADH from *A. methanolica* and *G. suboxydans* [Adapted from 175] **h** type III ADH from *Ga. diazotrophicus* [Adapted from 17]. Axial ligands, His and Met, from heme groups in **b–d** have been omitted for clarity. Images **a–d** were created using Pymol [198]

Full characterization of the XoxF was not achieved until the beginning of the 2010's decade. Interested in the effect of lanthanide-group rare-earth elements (REE) in microbial activity, Pr³⁺, Nd³⁺, and Sm³⁺ were added to *Methylobacterium radiotolerans* growth media observing a slightly increase in MDH activity and a remarkable increase when Ce³⁺ and La³⁺ were added. Additionally, the La³⁺-induced MDH encoded by *xoxF* gene was characterized as a homodimeric protein (α_2) in contrast with the heterotrimeric Ca²⁺-MDH ($\alpha_2\beta_2$) [93]. Similar results were observed by Ce³⁺ addition to soil bacterium *Bradyrhizobium* species [94]. Furthermore, deletion of the *mxoF* gene in *M. extorquens* resulted in the failure of growth on methanol in Ca²⁺ media, but the addition of La³⁺ into the media restores the growth of the bacterium [95].

Some studies had shown that transcription and translation from *xoxF* could be observed in the absence of Ln³⁺, but that XoxF activity depends on Ln³⁺ suggesting the importance of these metal ions in the protein [91, 96, 97]. Furthermore, growth of *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV, isolated from volcanic mudpots, has shown to be strictly dependent on the presence of lanthanides (La³⁺, Ce³⁺, Nd³⁺, and Pr³⁺) and the structure of the Ce³⁺-MDH, the first Ln³⁺-MDH structure, showed that the metal ion is indeed present at the catalytic site [98].

Later, phylogenetic analyses of MxoF and XoxF showed that there were at least five different XoxF families (XoxF1-F5) separated from the MxoF-type. Besides, while only one copy of MxoF is present in the genome of a certain microorganism, it may encode several XoxF paralogs and orthologs [12, 99]. These studies also showed that the Ln³⁺-dependent XoxF enzymes are more widespread in nature and may be evolutionary older than their Ca²⁺-dependent counterparts [99].

Nowadays, understanding of the role of XoxF in methanol oxidation, the significant divergence of these enzymes as

well as their wide distribution among bacterial taxa seem to indicate the importance of these proteins for the environment [100]. This is confirmed by several-omic studies [91], e.g., a metaproteogenomic study showed that XoxF is greatly expressed upon plant colonization by *Methylobacterium* [101]. Besides, the wide occurrence of XoxF suggests that methylotrophy is much more widespread among bacteria than previously assumed [91, 100].

Structure and catalytic role of La³⁺ in Ln³⁺-PQQ MDH

To date, four structures of lanthanide-dependent MDHs have been reported: Ce³⁺-XoxF [98, PDB 4MAE] and Eu³⁺-XoxF from *M. fumariolicum* SolV [102, PDB 6FKW], La³⁺-XoxF from *Methylomicrobium buryatense* [30, PDB 6DAM], and La³⁺-XoxF from *M. extorquens* AM1 [103, PDB 6OC6]. All of them have the same overall structure as the Ca²⁺-PQQ MDH consisting in an eight-bladed propeller-like superbarrel made up of eight four-stranded antiparallel twisted β sheets (W-shaped) (Fig. 1a). PQQ and metal-binding residues are conserved and PQQ is sandwiched between a Trp and a disulfide bridge formed by adjacent cysteine residues. As in calcium structures, lanthanide ions are coordinated to one Glu, one Asp, and one Asn residues, and to the PQQ through one quinoid oxygen atom, the pyridyl nitrogen atom, and one PQQ carboxylate moiety. The major difference lies in an additional bidentate Asp in the lanthanide structures. This is presumably due to the higher charge and the higher coordination number preferences of lanthanides. While Ca²⁺ is six-to-seven coordinated in MDHs, Ln³⁺ are nine coordinated in Eu³⁺-XoxF from *M. fumariolicum* (Fig. 5), La³⁺-XoxF from *M. extorquens*, and La³⁺-XoxF from *M. buryatense*. However, in Ce³⁺-XoxF from *M. fumariolicum*, an additional (poly)ethyleneglycol density was found coordinated to the metal ion, thus exhibiting a ten coordinated Ce³⁺. All distances to Ln³⁺ are in the range of 2.5 and 3.1 Å

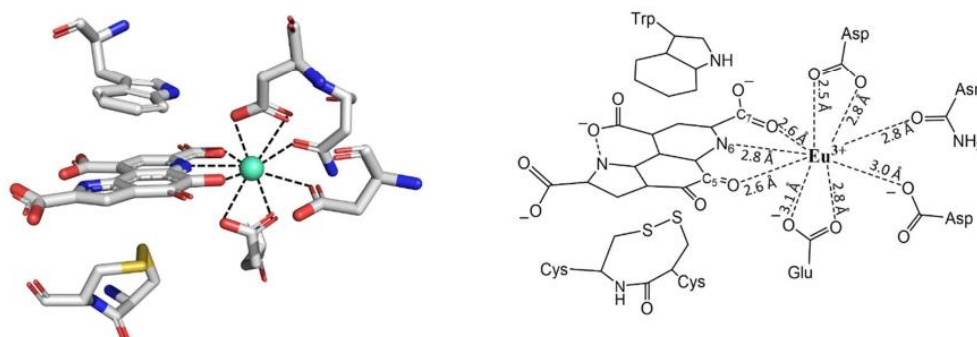


Fig. 5 Eu³⁺-PQQ structure in Eu³⁺-XoxF from *M. fumariolicum* [102, PDB 6FKW]. PQQ is sandwiched between a Trp residue and the disulfide bridge. Eu³⁺ is coordinated to two Asp, one Asn, and one bidentate Glu residues as well as to PQQ. Image was created using Pymol [198]

(Table 1) and it is worth noticing that Asp-Ln³⁺ distances are shorter than in the Ca²⁺-MDH structures. Furthermore, the additional Asp coordinated in XoxF is crucial for lanthanide-binding and activity. When this Asp was changed for an Ala, the protein was loaded with Ca²⁺, regardless of the presence or absence of La³⁺, and exhibited no activity at all [103].

Enzyme kinetics of XoxF MDHs, is still limited, but so far, they suggest that Ln³⁺-dependent proteins oxidize methanol with higher rates and affinity than Ca²⁺-dependent MDHs (Table 3) [12]. While K_m for Ca²⁺ MDHs vary between 0.15 and 0.45 mM, for Ln³⁺ vary between 0.0008 and 0.05 mM and k_{cat} for Ln³⁺ are around ten times higher than their Ca²⁺ counterparts. Both types of proteins, Ca²⁺ and Ln³⁺, are able to oxidize a wide range of alcohols, but worth mentioning are the high rates and affinities of Ln³⁺ MDHs for oxidizing formaldehyde. Indeed, the direct conversion of methanol into formate, by a four-electron oxidation, has been described in *M. fumariolicum* which lacks a formaldehyde dehydrogenase [12, 98].

When comparing different Ln³⁺ ions, it seems that XoxF activity is higher with lighter lanthanides namely: La–Nd [104, 105]. In *M. fumariolicum*, the lanthanide contraction showed to have a negative effect on the activity with a maximum activity observed with Pr and Nd [104]. In artificial dye-linked studies in *M. extorquens* with La, Ce, and Nd, activity showed maximum V_{max} and k_{cat} parameters with La, and they decreased when studied with Ce and Nd, although they all kept similar methanol K_m values. Interestingly, when studying the oxidation of methanol with the natural electron acceptor XoxG, no significant differences in V_{max} and k_{cat} parameters were observed, but an important increase in the K_m value was observed when increasing the atomic number. This was associated with a higher reduction potential of the Ln³⁺-PQQ cofactor with more Lewis-acidic ions resulting in a less effective electron transfer and higher concentrations of XoxG needed for maximal activity [105].

Theoretical studies with DFT optimizations of the active site in Ce³⁺-MDH [106] showed that the Ce³⁺ indeed stabilizes the PQQ radical found in the crystal structure. A comparison between Ca²⁺-PQQ⁰ and Ce³⁺-PQQ⁰ configurations found that the PQQ-based LUMO molecular orbital was lower in energy for the Ce³⁺-PQQ MDH than the Ca²⁺ one, indicating the impact of the stronger Lewis acid. Additionally, the lower energy of Ce³⁺-PQQ⁰ state than that of Ce⁴⁺-PQQ⁻, indicates that no redox chemistry is involved in Ln³⁺-PQQ catalysis. A mechanistical DFT study [107] showed that the formation of a methanolate and a hemiketal states are more stable thermodynamically in Ce³⁺-MDH than in Ca²⁺-MDH, suggesting that an addition–elimination mechanism (Fig. 3) could be possible for Ln³⁺-MDHs. However, further mechanistic studies must be performed to clarify the mechanism.

La³⁺ regulatory role

Although the biological importance of lanthanides has just been discovered a few years ago, a catalytic role as well as a regulatory role has been suggested. So far, two major types of lanthanide-utilizing bacteria can be identified, those that possess both *mxoF* and *xoxF* encoding for Ca²⁺- and Ln³⁺-MDHs, respectively, and those that only have *xoxF*. The latter organisms strictly depend on lanthanides for their metabolism of methanol [15]. In those organisms that possess both proteins, a “lanthanide switch” has been proposed and has been seen that concentrations of La³⁺ as low as 2.5 nM increased the expression of *xox* promoter and between 25 and 50 nM decreased expression of *mxo* promoter with full repression at 250 nM [108]. Interestingly, even in the presence of 95 μM of Ca²⁺, as little as 1 μM of La³⁺ completely abolishes *mxo* gene transcription [109]. XoXF/MxoF regulation has led to reveal several new La³⁺-regulated proteins, a TonB-dependent transporter and an ABC transporter required for La³⁺ growth on methanol [110]. Furthermore, it is interesting that in studies of the growth of *Pseudomonas putida* KT2440 with a Ln³⁺-dependent ethanol dehydrogenase PedH, it has been observed that the iron availability severely affects the lanthanide switch. In high Fe^{2+/3+}/La³⁺ ratios, the critical La³⁺ concentration required for PedH-dependent growth is decreased. This is probably due to mis-metalation and that La³⁺-binding sites of proteins could be occupied by Fe^{2+/3+} ions in excess [111].

Current proposals for XoXF/MxoF regulation (Fig. 6) suggest that in the absence of lanthanides, apo-XoxF could act as a Ln³⁺-sensor (as it has been proved to express even in the absence of lanthanides) interacting with the sensor kinase MxoB and maybe also MxoC and thus, signaling MxoM and/or MxoE that are response regulators to activate *mxo* expression and repress *xox* expression. In the presence of La³⁺, the metal ion may enter to the periplasm through a TonB-dependent transporter that binds some putative lanthanide-chelator and converting apo-XoxF into the active XoxF, decreasing the signal to MxoC/MxoB resulting in upregulation of *xox*. Besides the MxoF/XoxF system, because many organisms encode multiple XoxF enzymes, differentially regulated transcription of such enzymes has also been observed [97, 100, 112, 113]. Additionally, an unknown sensing pathway for La³⁺ has been observed and the additional ABC transporter (most likely to be an importer) suggest that La³⁺ actually enters the cytosol and may be repressing *mxo* while upregulating *xox* [108, 110]. Furthermore, trivalent lanthanides ions are known to block both, voltage-operated and receptor-operated calcium channels [114–116]. In recent years, another lanthanide-binding protein, the Lanmodulin, has been reported [117, 118] and lanthanide homeostasis is starting to be understood [108,

Table 3 Catalytic, structural properties and cofactors used by some PQQ-dependent alcohol dehydrogenases (ADH) Adapted from [12]

Type I ADH									
Ca ²⁺ -PQQ MDH (MxaF)									
Source	<i>M. methylotrophicus</i>			<i>Methylosinus</i> sp. W1			<i>Pseudomonas</i> W1		
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
MeOH	100	0.020	800	100	0.45	13	100	0.015	240
EtOH	76	0.028	430	114	3.58	2	93	0.016	200
Formaldehyde	81	1.01	15	146			80	3.300	1
1-PropOH	94	0.280	50	91	3.69	1	100	0.040	90
1-ButOH	89	0.285	50	172	6.38	2	93	0.041	80
Subunits	α ₂ β ₂			α ₂			α ₂ β ₂		
Cofactors	Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys		
Mol. mass	148.5			125			141		
References	[192]			[193]			[194]		
Ln ³⁺ -PQQ MDH (XoxF)									
Source	<i>M. extorquens</i>			<i>M. fumariolicum</i>			<i>Bradyrhizobium</i> sp.		
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
MeOH	100 (69)	0.011 (0.049)	3 (57)	100	0.0008	11,600	100	0.029	1.090
EtOH	160	0.014	4	100	0.003	3100	90		
Formaldehyde	93	0.065	0.5	100	0.007	1330			
1-PropOH				100	0.007	1330	90		
1-ButOH				100	0.006	1550	90		
Subunits	α ₂			α ₂			α ₂		
Cofactors	Ce ³⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ce ³⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ce ³⁺ -PQQ/Cys-Cys		
Mol. mass	126			127			126		
Reference	[105, 195]			[98]			[94]		
Ca ²⁺ -PQQ QEDH									
Source	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Pseudomonas putida</i>			<i>Pseudomonas</i> BB1		
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
MeOH	62	94	0.1				79	31.7	0.8
EtOH	100	0.014	860	100	0.163	370	100	0.010	2970
Formaldehyde	29						256	0.04	2090
1-PropOH	138	0.021	790	103			103	0.013	2580
1-ButOH	115	0.37	37	87	1.62	32			
Subunits	α ₂			α ₂			α ₂		
Cofactors	Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys		
Mol. mass	128			137.5			128		
References	[131]			[132]			[134]		

Table 3 (continued)

Source	Ln ³⁺ -PQQ QEDH			P. putida					
	<i>M. extorquens</i>			<i>P. putida</i>					
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)			
MeOH	100	5.980	2						
EtOH	97	0.0009	14,500	100	0.177	66			
Formalde- hyde	123	0.066	259						
Acetaldehyde	41	0.285	20	79	2.261	4.1			
Subunits	α ₂			Pr ³⁺ -PQQ/Cys-Cys					
Cofactors	La ³⁺ -PQQ/Cys-Cys			Pr ³⁺ -PQQ/Cys-Cys					
Mol. mass	126.4								
References	[147]			[149]					
Type II-ADH									
Ca ²⁺ -PQQ-ADH-II									
Source	<i>Pseudomonas putida</i> ADH-IIB			<i>Pseudomonas putida</i> ADH-IIG			<i>Comamonas testosteroni</i>		
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
MeOH									
EtOH	100	0.163	115	100	33.2	0.4	70	50	3
Formalde- hyde							20	3.0	1
Acetaldehyde	82			16			80	0.9	
Glycerol				151	0.105				
1-ButOH	201	0.015	2500	74	0.043	250	85	0.005	3100
1-Propanol	70			41			80	0.06	
1-Pentanol	100			40			100	0.005	
Subunits	α ₁			α ₁			α ₁		
Cofactors	Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys/1 heme c			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys/1 heme c			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys/1 heme c		
Mol. mass	72.6			75.3			73.3		
References	[132, 151]			[132, 151]			[152]		
Type III ADH									
Ca ²⁺ -PQQ-ADH-III									
Source	<i>Ga. diazotrophicus</i>			<i>G. polyoxogenes</i>					
	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V _{max} (%)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹ mM ⁻¹)			
MeOH	9			0					
EtOH	95	0.46	360,000	100	1.2				
Formalde- hyde	4			62					
Acetaldehyde	87	2.9	25,000	18	4.2				
1-PropOH	90			96					
1-ButOH	98			99					
Subunits	α ₁ β ₁			α ₁ β ₁					
Cofactors	Ca ²⁺ -PQQ/[2Fe-2S]/4 heme c			Ca ²⁺ -PQQ/Cys-Cys/4 heme c					
Mol. mass	115			116					
References	[179, 181]			[183]					

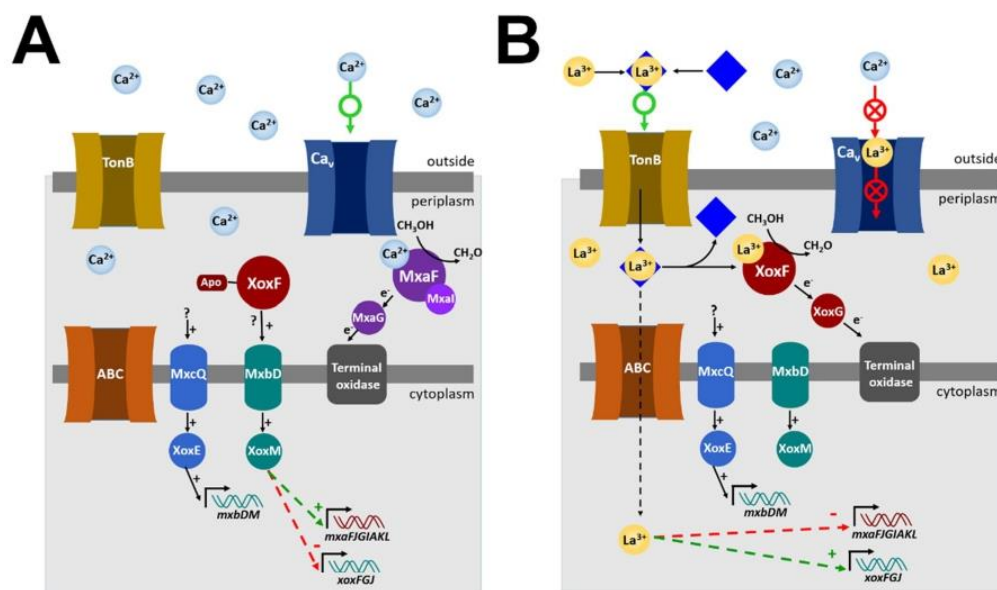


Fig. 6 Current model of regulation of methanol dehydrogenases in **a** the absence and **b** the presence of La^{3+} . Besides the catalytic role of La^{3+} in La^{3+} -PQQ MDHs, the regulation role of La^{3+} is shown. Adapted from [108] and [110]

[110, 119–121]. It would be also interesting to study metal homeostasis and signal scaffold of calcium in natural lanthanide-rich environments as well as the Ln^{3+} regulatory cascades that may exist.

Electron transfer in Ln^{3+} -MDH

Just like the MxaF protein is localized in an operon together with MxaJ and MxaG proteins, XoxF protein is in an operon with XoxJ and XoxG proteins [12, 105]. As the cytochrome c_L encoded by *mxoG* is a dedicated electron acceptor for MxaF [122], the highly expressed gene *xoxG* in γ -proteobacterial methanotrophs was proposed to encode a cytochrome *c* for XoxF [123]. Knockout mutations in *xoxF*, *xoxG*, *mxoF*, and *mxoG* in the methanotroph *Methylomonas* sp. LW13, showed that indeed, XoxG4 is a cytochrome *c* that can be directly reduced by XoxF. However, the lack of transcriptional regulation of XoxG4 by Ln^{3+} suggests a secondary function of this cytochrome that remains to be understood [124]. Interestingly, in contrast with MxaG cytochromes, XoxG cytochromes encoded by α - β - and γ -proteobacteria are very divergent and phylogeny studies have separated them into four different groups, namely, XoxG1, XoxG2, XoxG3, and XoxG4 [123]. As alternative cytochromes XoxG1, XoxG2, and XoxG3, encoded by non-gamaproteobacterial methylotrophs, are unable to substitute XoxG4, there may be differences in redox biochemistry of

different XoxF/XoxG pairs. And while properties of the MxaF/MxaG pair are similar in phylogenetically divergent methylotrophs, XoxF/XoxG pairs seem to be quite different [124].

The electron transfer process between XoxF and XoxG was studied in *M. extorquens*. Structurally, XoxG correspond to a class I, *c*-type cytochrome with His and Met as axial ligands. The heme center is located in a hydrophobic pocket formed by three α -helices. As helix IV, common in class I *c*-type cytochromes, is lacking in XoxG, it leaves one heme edge open to solvent. This structural environment decreases the heme redox potential. Indeed, with a spectrophotometric titration, the $E_m = 172 \pm 1$ mV of XoxG was determined (Table 4). It is significantly low compared to the +256 mV for MxaG (Table 4) and relatively low for a class I *c*-type cytochrome with His/Met ligation (typically +200 to +300 mV). A docking model between the experimental structure of XoxG and a homology model for XoxF suggested an interaction mediated through flexible loops located on the surface of both proteins. The distance between the C5 position of PQQ and the heme edge is ~ 16 Å. Interestingly, this docking model is somehow similar to the structure of the ADH-IIG from *P. putida* which natively possesses a cytochrome *c* domain as discussed later [105].

Together with XoxF and XoxG, a XoxJ protein is located in the operon [12, 105]. XoxJ is analogous to MxaJ, and both are predicted to be members of the

Table 4 Redox potentials of the prosthetic groups in PQQ-ADHs

Source	<i>M. extorquens</i>	<i>M. extorquens</i>	<i>P. putida</i>		<i>Ga. diazotrophicus</i> (active)		<i>Ga. diazotrophicus</i> (inactive)	<i>A. methanolica</i>	
	Ca ²⁺ -MDH	Ln ³⁺ -MDH	ADH-II		ADH-III		ADH-III	ADH-III	
pH	7.0		7.0	6.0	6.0	6.0	6.0	7.0	4.5
Cofactor	mV	mV	mV	mV	mV	mV	mV	mV	mV
PQQ		+90 (Free PQQ)			+33 ^b −12 ^c	−240 ^d −180 ^e			−17
[2Fe-2S]	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	−250		NP ^a	NP ^a
Heme c I	NP ^a	NP ^a	+185	+189	+190	−64	−34	−130	+24
Heme c II ₁	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	−8	+90	+49	+187
Heme c II ₂	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	+185	−215	+188	+190
Heme c II ₃	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	+210	+270	+188	+255
Q	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a		+220
Electron acceptor	MxaG	XoxG		Azurin		UQ	UQ	UQ	
	+256 mV	+172 mV	306	291					
References	[196]	[105]	[163]	[163]	[17]	[17]	[191]	[165, 187]	

Q Quinone covalently bound to SUII

^aNP Cofactor not present in that enzyme

^bAs measured in soluble GDH for the reduced/semiquinone couple [197]

^cAs measured in soluble GDH for the semiquinone/oxidized couple [197]

^dFor the reduced/semiquinone couple

^eFor the semiquinone/oxidized couple

periplasmic-binding proteins [105]. The function of these proteins remains unknown; however, facilitation for the MxaFI/MxaG electron transfer [125] or essential role for XoxF activation has been proposed [105]. Furthermore, a fused XoxGJ cytochrome, present only in *Bradrhizobium* and *Verrucomicrobia* species, has been reported from *M. fumariolicum* SolV. This XoxGJ exhibits an unusual absorbance spectrum, and the Soret band of the reduced protein is found at 440 nm, extremely red shifted for a cytochrome *c*_L. In addition, the α and β bands are found in 552 and 595 nm. As this red shift is not modified by changes in the axial ligands, and the α band resembles that of heme *a*, it suggests that one of the methyl groups of the porphyrin ring might be oxidized to a formyl group. XoxGJ has shown to function as the direct electron acceptor for XoxF in *M. fumariolicum* SolV and it is readily oxidized by an additional cytochrome partner, indicating that it could fuel respiration via a terminal oxidase [126]. The $E_m = +255$ mV for XoxGJ has been determined and, in contrast with the catalytic response, the redox properties of this cytochrome are pH-independent. This would allow XoxGJ to keep functioning under its natural acidic conditions [126, 127].

Mg²⁺-substituted methanol dehydrogenase

When a marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga aminisulfidivorans*, was grown on methanol, two MDHs were isolated. MDH-I consisted in an $\alpha_2\beta_2$ tetramer of 146 kDa, while MDH-II had an additional γ -subunit or MxaJ protein of about 30 kDa and showed more specific activity and specificity toward methanol (K_m values were 0.050 mM and 0.013 mM, respectively) [128]. Recently, the structure of MDH-I has been reported [14, PDB 5XM3], and despite its similarity to the Ca²⁺-MDH structure, it has one Mg²⁺ ion instead of the common Ca²⁺ in terrestrials MDHs. The coordination sphere of the magnesium ion is quite the same than the calcium ion in Ca²⁺-MDH, (Fig. 2, Table 1). Although this is consistent with the fact that Mg²⁺ concentration is threefold higher than Ca²⁺ in natural sea water, and Mg²⁺ is critical for osmotic adaptation in marine bacteria, it is not clear whether the Mg²⁺ is indeed the natural form of the enzyme or it is due to the cultivation process. As there is only one Mg²⁺-MDH report [14], more studies of MDHs from marine organisms are required to establish whether the Mg²⁺ is a natural occurring or a substituted metal ion.

Other quinoprotein alcohol dehydrogenases (QADHs)

Besides the Ca^{2+} and Ln^{3+} MDHs, several other type I PQQ-ADHs have been reported; especially in *Pseudomonas*, *Rastolnia*, and *Comamonas* species [129]. Instead of methanol, they usually use as substrate several alcohols like ethanol [80, 130–135], butanol [136], propylene glycol [137], polyvinyl alcohol [138], sorbose [139], or quinate [140].

Probably, the ethanol dehydrogenases (QEDHs) from *Pseudomonas* species are the most representative of this type of enzymes. They consist of two α -subunit almost identical to α -subunit in Ca^{2+} -MDH, and although they poorly oxidize methanol and seem to prefer ethanol as a major substrate, they are able to oxidize a wide range of alcohols (Table 3) [1, 133]. The structure of the QEDH from *Pseudomonas aeruginosa* [133, PDB 1FLG] shows a typical eight-bladed β -propeller fold as in MDHs. In the active site, residues binding, PQQ and Ca^{2+} , as well as the disulfide ring are strictly conserved in QEDH in comparison with MDHs with identical relative positions of the moieties in the corresponding structures. Differences in substrate binding arose from differences in amino-acid residues lining the active site cavity and the entrance to the active site; besides, the active site cavity in QEDH of $\approx 62 \text{ \AA}^3$ [133, 141] is larger than the $\approx 18 \text{ \AA}^3$ in MDH [53, 141]. In QEDH, an additional calcium ion was found near the N-terminus, coordinated by Asp11, Thr14, and Asp17 acting as bidentate ligands. This Ca^{2+} may contribute to stabilizing the native conformation of the enzyme. With chelating agents, Ca^{2+} is removed and PQQ dissociates. Activity can be restored upon Ca^{2+} or Sr^{2+} addition [135] in contrast with Ca^{2+} -MDHs that initially no activity was restored [142] and that a mutant apo-enzyme was needed to study the effect of other metal ions as discussed before [61].

Natural electron acceptor from QEDH is cytochrome c_{550} , [143] and it differs significantly from the Ca^{2+} -MDH-electron acceptor cytochrome c_L [144]. A mutant of QEDH lacking the disulfide bridge (Cys105Ala/Cys106Ala) was heterologously expressed and the activity was restored by adding Ca^{2+} and PQQ [145]. While it showed increased K_m values for primary alcohols, in the artificial dye tests, specific activities were higher than in the wild-type QEDH. However, with natural electron acceptor (Cyt c_{550}) the activity of the mutant was 15-fold lower than in the wild type. As the K_D for QEDH/cytochrome complex was not altered, it was assumed that the disulfide bridge is essential for the efficient electron transfer pathway from the PQQ to the heme group as described for others PQQ-ADHs [49, 50, 54, 141, 146]. On the other hand, in the structure of the monomeric alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* [129], an eight-bladed β -propeller fold was found, but three of the four Ca^{2+} -ligands differ from

other PQQ-ADHs and it lacks the disulfide bridge. In consequence, the active site is a more open cavity that allows it to oxidize a broader range of substrates. However, no further studies have been performed to understand the electron transfer in this unique PQQ-ADH.

Ln^{3+} -dependent ethanol dehydrogenases

Worth mentioning is the fact that in *M. extorquens*, a putative quinoprotein ethanol dehydrogenase was found to be Ln^{3+} -dependent [147, 148]. When this QEDH was purified from Ca^{2+} -only media, minimal activity with ethanol as substrate was detected and no activity upon methanol oxidation. When purified from La^{3+} -added media, activity upon ethanol oxidation was detected along with secondary activities with formaldehyde, acetaldehyde, and methanol (Table 3). Besides, a lanthanide-dependent PQQ-ADH (PedH) from the nonmethylotrophic bacterium *P. putida*, was characterized and it exhibits activity only with lanthanides, particularly La–Nd and a substrate range similar to that of its Ca^{2+} -equivalent (PedE). However, even when Ln^{3+} -PedH exhibits higher V_{max} values, affinities for substrates tend to be higher in the Ca^{2+} -PedE. Finally, PedH seems to have not only a catalytic function, but it is also involved in the transcriptional regulation of *pedH* and *pedE*, acting probably as a sensory module [149]. The wider substrate range may also have biological effects. When studying the cellular response to lanthanum with several substrates, a novel route for glycerol metabolism was found in *P. putida* KT2440. While the usually known pathway was an uptake of the glycerol, followed by its phosphorylation and subsequent oxidation to dihydroxyacetone-3-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, this new route is initiated by PedE or PedH, depending on La^{3+} availability. It is not clear yet if this ADHs oxidize glycerol to glyceraldehyde or perform a second oxidation to glycerate. Even though this is clearly not the main route for glycerol oxidation, it may have an important benefit for cells during growth on glycerol as it strongly reduces the lag phase, especially in the presence of La^{3+} [150].

Type II, soluble, alcohol dehydrogenases

Localized in the periplasm, type II alcohol dehydrogenases are monomeric, quinoxinoproteins of around 70–75 kDa [1] and are relatively wide distributed among Proteobacteria [10] being the most studied those from *P. putida* (ADH-IIB and ADH-IIG) [132, 141, 151] and *Comamonas testosteroni* [146, 152–154], although there are reports on other species like *Pseudomonas* sp. VM15C [138, 155], *Rhodospseudomonas acidophila* [156], *Pseudomonas butanovora* [157], or *Ralstonia eutropha* [158]. Besides the Ca^{2+} -PQQ, these

proteins have a covalently bound *c*-type heme group [141, 146, 151]. Type II ADHs are particularly divergent in its substrate specificities (Table 3), and ADH-IIB and ADH-IIG are expressed when the bacterium grows on 1-butanol and 1,2-propanediol, respectively, but they are also able to oxidize several primary alcohols of medium-chain length and ADH-IIG may additionally oxidize diols and glycerol [132]. Besides, other type II-ADH have been found to oxidize secondary alcohols, polyols, heterocyclic alcohols, polyethylene glycol, or polyvinyl alcohol [138, 141, 156, 158].

Structure of the type II ADHs

Three structures have been reported for ADH-II from *Comamonas testosteroni* [146, PDB 1KB0], ADH-IIB [141, PDB 1KV9], and ADH-IIG [151, PDB 1YIQ] from *P. putida*. They all consist in a two-domain monomer of 670–690 amino acids. PQQ domain and heme domain are connected by a long linker of about 20–25 residues (Fig. 1c, d), the difference in this linker's length causes a difference of about 11° in the angle between both domains in ADH-IIB and ADH-IIG structures [151]. Like those of type I, type II ADHs' PQQ domain is formed by an eight-bladed β-propeller, super-barrel structure (Fig. 1c). Inside the super-barrel, lies the Ca²⁺-PQQ entity, while PQQ is sandwiched between a Trp residue and a disulfide bridge, Ca²⁺ is coordinated to PQQ via its ring O5 and N6 atoms and its O7A carboxylate atom as well as to an Asp, an Asn, and a Glu residues in a

very similar way to the coordination mode in Ca²⁺-MDHs (Fig. 2). Nonetheless, the Asp-Ca²⁺ distances in type II ADHs seem to be shorter than in Ca²⁺-MDHs (Table 1). As the catalytic machinery of Ca²⁺-MDH is conserved in type II ADHs, the mechanism for alcohol oxidation is most likely the same for both proteins probably by a hydride attack (Fig. 3) [146]. It is worth noticing that the active site in type II ADHs cavity (≈ 120 Å³ in ADH-IIB and 150 Å³ in ADH-IIG [141, 151]) is larger than that of type I QEDH (≈ 62 Å³ [133, 141]) and MDH (≈ 18 Å³ [53, 141]) which is consistent with the broader range of substrate specificity in type II ADHs.

Heme c group in type II ADHs

In all three structures, the heme domain contains a *c*-type heme group covalently bound through its two vinyl groups and the S atoms of the two cysteines of the conserved CXXCH cytochrome motif. The heme group (Fig. 7a) is coordinated by a His (from the CXXCH motif) and a Met (that seems to be conserved in all the type II and type III ADHs [151]). The distance of the iron atom of the heme and the C5 atom of the PQQ is about 20 Å, but the edge-to-edge distance between the heme group and the PQQ is roundly 13–15 Å, while the angle between the two cofactors is about 70° in ADH-II from *C. testosteroni*, 74° in ADH-IIB, and 80° in ADH-IIG from *P. putida* (Fig. 7b). Experiments with oxidized ADH-II from *C. testosteroni*, and with PQQ added

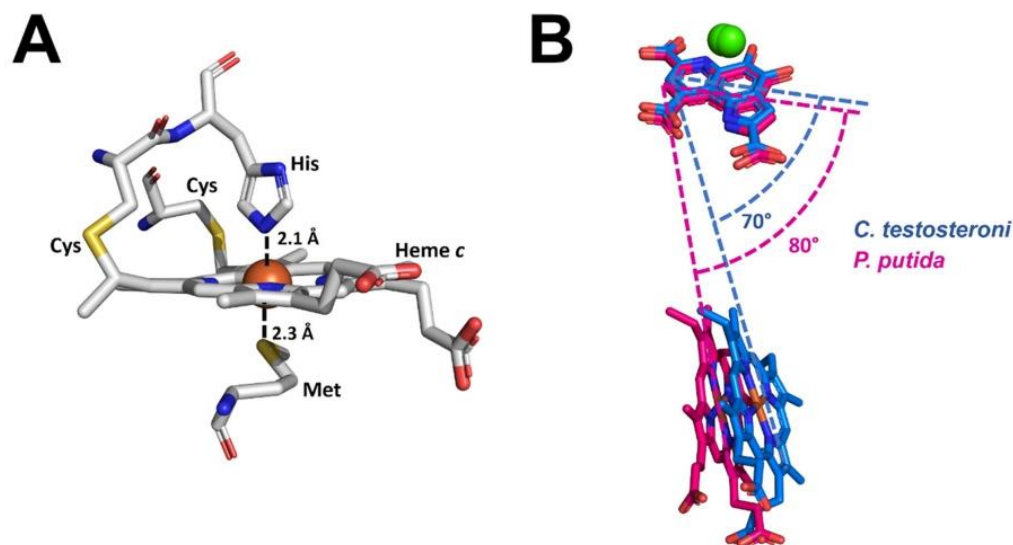


Fig. 7 Heme *c* group in type II ADHs. **a** Heme group coordination mode in ADH-II from *C. testosteroni* [146, PDB 1KB0]. It is covalently bound by two Cys residues and the iron is axially coordinated to a His and a Met residues. **b** Angles between the PQQ moiety and

the heme *c* group in ADH-II from *C. testosteroni* (blue) [146, PDB 1KB0] and ADH-IIG from *P. putida* [151, PDB 1YIQ]. Images were created using Pymol [198]

to the apo-enzyme, showed an EPR signal with g values of $g_x = 1.340$, $g_y = 2.260$ and $g_z = 3.012$ typical for anisotropic low-spin heme proteins [153].

Electron transfer in type II ADHs

The apo-ADH-II from *C. testosteroni*, with no PQQ but with the heme group present, shows no activity and in the holo-enzyme, the heme group is reduced upon alcohol oxidation. These two experiments indicate that the alcohol oxidation does not occur in the heme group, but it is actually involved in the electron transfer process [152]. However, as the heme c is a one-electron acceptor, PQQ must transfer the electrons one-by-one going from the reduced PQQH₂ state to the oxidized PQQ state, passing through the radical semiquinone PQQH[•] state [153, 154, 159].

Based on the type II structures, several possible pathways for intramolecular electron transfer have been proposed. In ADH-II from *C. testosteroni*, where PQQ and heme group are separated by 12.9 Å (close to the maximum 14 Å distance between two redox centers that electron may travel [160]), it was suggested that one function of the protein medium is to reduce that distance [146]. Disulfide bridge may act as such, because it is positioned right between PQQ and the heme group. Thus, an optimal electron transfer pathway was calculated with Harlem software [161] involving a through-space jump from PQQ to Cys116, Cys117, and then a jump through a water molecule to Cys607 covalently bound to the heme c . A longer pathway is through covalent bonds from Cys117, Asp118, and two jumps to Arg67 and to heme c (Fig. 4b, f) [146]. Another pathway was calculated with Greenpath 0.97 [162] for ADH-IIB from *P. putida* [141] where after a through-space jump from N1 of PQQ to Cys106, the electron travels to the amide nitrogen of Asp107 and along hydrogen bonds through two water molecules followed by another through-space jump to Cys594, covalently bound to the heme. If water molecules are removed, another possible pathway is through Cys105 and then travel along the main chain up to Arg102 followed by a jump to the heme ring (Fig. 4c, f). A similar pathway was proposed for ADH-IIG from *P. putida* [151] where after an initial jump from PQQ to Cys109, the electron travels along the backbone chain up to Gly106 and then reaches, by a second jump, to Cys609 that is attached to the heme group (Fig. 4d, f).

It is worth noticing that, as it was discussed earlier, it is not clear the role of the disulfide bridge in the electron transfer in PQQ-ADHs. While reduction of the disulfide bridge in Ca²⁺-MDH leads to inactivation with the natural electron acceptor, cytochrome c_L [43], it has been proved that it is not reduced during the reaction cycle [13, 84]. However, even when all the possible pathways proposed for type II ADHs involve one Cys from the disulfide bridge, none of

them actually requires the reduction of the disulfide bond, thus supporting the one-by-one-electron transfer by PQQ.

Finally, while protons are released to the periplasm contributing to the proton-motive force, the electrons are transferred from the heme c to the blue copper protein azurin and finally to a terminal cytochrome oxidase coupling alcohol oxidation to the generation of an electrochemical gradient necessary for ATP synthesis [146, 163]. Redox potentials for the heme group and the blue copper azurin from *P. putida* were calculated at pH = 7.0 and pH = 8.0 (Table 4) [163]. Interestingly, the redox potential of the heme group seems to be pH-independent, while the relatively high redox potential of the azurin goes from +306 mV at pH = 7.0 to +291 mV at pH = 8.0 [146].

Type III, membrane-bound, alcohol dehydrogenases

Probably, the type III ADHs are the least studied quinoxinoproteins, but they have several interesting features that make them worth noticing and quite unique among the ADHs. They are peripheral membrane proteins localized on the periplasmic surface of the cytoplasmic membrane of acetic acid bacteria [16]. Besides the Ca²⁺-PQQ-dependent, ADH-III have also 1 heme c group in the first subunit (SUI) and three heme groups in subunit II (SUII) [164, 165], and in the case of ADH-III from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, an additional [2Fe-2S] cluster in SUI has been discovered recently [17].

Acetic acid bacteria, as other oxidative bacteria, are characterized by its ability to produce, and accumulate in the growth medium, acids from the incomplete oxidation of sugars and alcohols. This process known as oxidative fermentation is carried out through several membrane-bound alcohol, aldehyde, and sugar dehydrogenases, linked to the respiratory chain by reducing the membranous ubiquinone (UQ). Reduced ubiquinone is then re-oxidized by terminal ubiquinol oxidases [16, 164, 166]. Several of these membranous dehydrogenases are PQQ-dependent, such as GDH glucose dehydrogenase [167], GLDH glycerol dehydrogenase [168], and QDH quinate dehydrogenase [169]. In recent years, a membrane-associated dehydrogenase has been reported to use NAD⁺ as a cofactor like the 6PGD phosphogluconate dehydrogenase [170]. Other membrane dehydrogenases utilize FAD and 3 type c hemes such like GADH gluconate dehydrogenase [171], 2KGDH 2-ketogluconate dehydrogenase [172], FDH fructose dehydrogenase [173], and SLDH sorbitol dehydrogenase [174]. Among ALDH acetaldehyde dehydrogenase from several organisms, a plethora of cofactors have been detected such as PQQ, c and b type hemes, [2Fe-2S] clusters, and molybdopterin [175]. However, there

are few reports for systematic research on ALDH, and therefore, some properties remain controversial [16].

ADH-III enzymes are not as widely distributed as other quinoproteins, since they only occur in five acetic acid bacteria genera from the α -proteobacteria, namely *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, and *Acidomonas* [165, 176]. Interestingly, an ADH-III has been isolated from the γ -proteobacterium, *Frateriuria aurantia*, where a horizontal gene transfer event might have taken place [177].

Membranous ADHs show wide substrate specificity (Table 3) being able to oxidize primary alcohols, except for methanol, up to hexanol, with propanol in a similar level to ethanol [16, 165]. They may even oxidize glycerol at a significant rate under high concentration [178]. Some strains can oxidize acetaldehyde [164, 179, 180], and in *Ga. diazotrophicus*, it has been observed that ethanol and acetaldehyde oxidation goes in a two-step process without releasing acetaldehyde to the media [181].

Structure of the type III ADHs

Typically, ADH-III consists of two (in *Gluconacetobacter* and *Komagataeibacter* genera) or three subunits (in *Gluconobacter*, *Acetobacter*, and *Acidomonas* genera) [16, 182–184]. The first subunit, SUI, is about 70–85 kDa and it has a Ca^{2+} -PQQ, a couple of vicinal Cys and one heme *c* group (just like the ADH-II). The second subunit, SUII of about 44–55 kDa, is a cytochrome protein having three hemes *c* [16, 182, 183]. The third subunit, SUIII of 15–20 kDa, is a small subunit with no prosthetic group [184]. In ADH-III from *Gluconobacter oxydans*, the three subunit complex has been dissociated into a smaller I/II complex which presents ethanol:ferricyanide oxidoreductase activity but no ethanol:Q1 oxidoreductase activity. SUII has no dehydrogenase activity, but when the complex I/II/III is reconstituted, it is active for both ethanol:ferricyanide and ethanol:Q1 assays [185], indicating that SUI has the dehydrogenase activity while SUII is the responsible for ubiquinone reduction. The role of SUIII is not clear, and in *Acetobacter*, it seems to act as a chaperon by binding itself to SUI and assisting it in folding properly [184]; however, it is worth noticing that the gene *adhS*, that encodes for SUIII, is apart from the *adhAB* operon encoding for SUI and SUII [16].

To date, no ADH-III structure has been reported, but there are some analyses and comparisons of the amino-acid sequences between ADH of types I, II, and III [10, 141, 151]. ADH-IIB from *P. putida* showed 44% identity with ADH-III from *Komagataeibacter europaeus* and only 30% within the cytochrome domain. [141] However, while PQQ domain of ADH-IIG from *P. putida* showed 37% identity with ADH-III from *K. europaeus*, cytochrome domain

showed a higher 44% identity [151]. Identity among all ADH-III is about 70% [10]. Despite these differences, some structural features are quite conserved among all the PQQ-ADHs such as the several AXDXXXGK(E)XXW motifs that form the eight-bladed, β -shaped, super-barrel structure. Besides, most of the Ca^{2+} -PQQ-binding residues are conserved. Furthermore, among the quinohemoproteins (type II and III), the motif CXXCH...GM signature sequence involved in heme *c* ligation is conserved [10]. From these analyses, it is possible to propose that ADH-III SUI is very similar to those type II ADHs consisting of a super-barrel domain (Fig. 1c) where the Ca^{2+} -PQQ is linked in a very similar way to other Ca^{2+} -PQQ proteins (Fig. 2) with the PQQ sandwiched between a Trp and a disulfide bridge. In the cytochrome domain (Fig. 1d), the covalently bound heme group may be coordinated to an His and an Met as in type II ADHs (Fig. 7a).

Iron-sulfur cluster in type III ADH from *Ga. diazotrophicus*

The EPR spectrum at 20 K of the ADH-III from *Gluconacetobacter diazotrophicus* showed a resonance pattern at $g_{av} = 1.956$ ($g_x = 2.007$, $g_y = 1.941$, $g_z = 1.920$) that corresponds to a reduced $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster [17]. This particular cluster lies between the PQQ and the heme *c* group coordinated by the two conserved vicinal cysteine residues and thus, replacing the disulfide bridge (common to other PQQ-ADHs) by the $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster [17]. Looking at its amino-acid sequence, at that time, we proposed that the $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster was coordinated by three cysteines and a histidine or serine residues [17]. A deeper study of the amino-acid sequence of SUI of this ADH-III let us build a three-dimensional structure model by homology to the ADH-IIG from *P. putida* [Submitted for publication]. According to this model, the $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster is coordinated to the vicinal cysteines, one Glu residue and one bidentate Asp residue. This novel coordination mode for a $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster might explain the differences in the *g* values found for the ADH-III from *Ga. diazotrophicus* compared to the typical ferredoxin-like clusters $g_{av} \approx 1.95$, $g_x \approx 2.05$, $g_y \approx 1.96$, $g_z \approx 1.88$ [22]. To determine whether the $[2\text{Fe-2S}]^+$ cluster is present in all ADH-III enzymes or it is specific of the *Ga. diazotrophicus* enzyme, low-temperature EPR spectra of other ADH-III enzymes remain to be done.

Electron transfer in type III ADH

Natural electron acceptor from ADH-III is the ubiquinone UQ present in the cytoplasmic membrane, and then, to the terminal ubiquinol oxidases [164, 185]. Ethanol oxidation takes place at the Ca^{2+} -PQQ site, which is a two-electron mediator acceptor, these electrons are transferred

subsequently in single electron processes to the hemes *c*, namely *c* I, in SUI and *c* II₁, *c* II₂, and *c* II₃ in SUII [16]. To understand the electron transfer in ADH-III between the prosthetic groups, kinetics and redox titrations studies have been done in *Acidomonas methanolica* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* [17, 186, 187]. Redox potentials of the prosthetic groups are summarized in Table 4. In *Ga. diazotrophicus*, redox potentials were determined at pH=6.0 and in *A. methanolica* were determined at pH=7 as well as at pH=4.5 [165], observing a shift to more positive redox potentials at pH=4.5.

Worth noticing is that the redox potential of the *c*II₂ heme group in *A. methanolica* is pH-independent (Table 4). Besides, at pH=4.5, only 63% of the heme *c* was oxidized in the presence of ubiquinone, and because one of the heme groups (*c* II₃; 255 mV) has higher redox potential than ubiquinone (+220 mV [188] as cited by [165]), it was suggested that the *c* II₃ heme is not involved in the electron transfer to UQ [187]. Some kinetics studies also indicate that in *G. suboxydans* at least one of the heme sites in SUII is not involved in the reduction of UQ [185]. In *G. suboxydans*, an additional tightly bound quinone (Q) has been found in SUII [189], suggesting that before the electron transfer to the membrane UQ, they are received by the bound Q thus having a first, two-electron reduction of PQQ, then several one-electron transfer through the heme groups, and then a final double-electron transfer process from bound Q to UQ (Fig. 4g) preventing leakage of electrons, that could produce undesired compounds like reactive oxygen species [165].

However, in the ADH-III from *Ga. diazotrophicus*, that no bound quinone has been found, and all the heme groups are fully reduced by ethanol [179], a slightly different electron transfer pathway has been proposed. Here, the Ca²⁺-PQQ ($E_m = -240$ mV for PQQ/PQQ) first oxidizes the ethanol by two electrons. And then, a first one-electron transfer to the [2Fe-2S]⁺ occurs ($E_m = -250$ mV). In this ADH-III, all the heme groups are involved in the electron transfer and UQ is reduced directly by the heme *c* II₃ (Fig. 4h) [17]. The redox potential of *c* II₃ is +210 mV, so there is no potential barrier for such a transfer to UQ. Further studies including a type III ADH structure will be very helpful for a better understanding of the electron transfer in these enzymes.

Inactive form of the type III ADH

It is interesting that in *A. acetii*, *G. suboxydans*, and *Ga. diazotrophicus*, inactive forms of the ADH-III have been reported [190, 191]. In *G. suboxydans*, the content of ADH was increased when grown under acidic conditions but without increasing the ADH activity. Isolation of the inactive ADH (ADHi), showed ten times less activity than active ADH (ADHa). ADHi and ADHa in *P. putida* showed no differences in subunit composition, molecular size, or

prosthetic groups. However, ADHi had a relatively loose conformation with a partially oxidized state in contrast with the tight conformation and completely reduced state in ADHa [190]. Additionally, ADHi showed higher ubiquinol oxidation activity suggesting that this inactive form of the ADH, may have an unidentified function other than ethanol oxidation [16, 190]. In *Ga. diazotrophicus*, ADHi showed no difference in subunits or prosthetic groups compared to ADHa; it showed nine times less activity. ADHi complex was found to be a single heterodimer while ADHa complex seems to be an oligomeric association of three heterodimers [191]. ADHi from *Ga. diazotrophicus* was also isolated in a partially oxidized state, with all the prosthetic groups oxidized except one-quarter of the cytochrome *c* content. This reduction level was not increased by substrate addition. Furthermore, a redox titration showed that mid-potential values for the heme *c* groups in ADHi were significantly more positive than in ADHa (Table 4) [191].

Interaction of heme *c* centers with NO

As stated before, ADH-III from *Ga. diazotrophicus* is found in the reduced state, even though it is isolated in the presence of oxygen [17, 191]. In some experiments, we added several oxidants to oxidize the ADH-III and to be able to assign the spin state of the Fe(III) of the heme *c* groups. When nitrite (NO²⁻), ferricyanide ([Fe(CN)₆]³⁻) or peroxydisulfate (S₂O₈²⁻) were added, the oxidized protein always precipitated. However, when spermine NONOate (NO donor) was added, the enzyme could be oxidized without further denaturalization. This process was studied by UV/Vis spectroscopy, in a first step NO binds to the four heme *c* groups (*c* I, *c* II₁, *c* II₂, and *c* II₃) followed by a second step assigned to the oxidation of 75% of the heme *c* centers (*c* I, *c* II₁, *c* II₂) to Fe(III). The EPR characterization of the final product shows a rhombic signal assigned to a heme Fe(II)-NO species, $S = 1/2$, with $g_x = 2.079$, $g_y = 2.005$, and $g_z = 1.975$ ($g_{\text{aver}} = 2.020$). [Submitted for publication].

Conclusions

Alcohols can be oxidized by a wide variety of enzymes such as the PQQ-dependent alcohol dehydrogenases (PQQ-ADHs) in the α , β , and γ -proteobacteria. These bacteria have been widely studied due to their impact on the chemical and food industries. To date, bioinorganic interest of PQQ-ADHs has been revived due to the recent discovery of lanthanide-dependent enzymes. We expect that this review enlightens the current knowledge and the aspects that remain unknown in PQQ-ADHs, especially the role of the inorganic species in the electron transfer processes and activity mechanism of these enzymes.

The PQQ moiety is always coordinated to a metal ion, and for many years, Ca^{2+} was considered the only natural ion present in these proteins. Nowadays, in the light of recent discoveries, it is known that in one marine methylotrophic bacterium, the Ca^{2+} may be substituted by a Mg^{2+} ion and that methylotrophs prefer Ln^{3+} ions, changing the original conception of what we understand by bio-elements. On the basis of these new discoveries, more studies on Ln^{3+} -dependent proteins are needed to fully understand the uptake and homeostasis of these ions.

As stated, several of these ADHs are particularly stable in the reduced state, even under oxic condition with a M^+ -semiquinone moiety present. The reason of this stabilization is not fully understood yet, as the influence on the metal by the disulfide bridge present has not been fully established. The tridimensional structure of a type III ADHs is needed to fully determine the nature, properties, and role in the electron transfer of the several heme *c* groups and other cofactors found in these enzymes.

Acknowledgements M.E.S.T. acknowledges the financial support by CONACYT (Project 128921) and by DGAPA-UNAM (Project IN231111). P.D.S.P. thanks CONACYT for a Ph.D. scholarship (588051). The authors are grateful to Peter M. H. Kroneck from the University of Konstanz for his continuous encouragement and valuable suggestions. The authors are thankful to the Facultad de Química-UNAM for continuous support and specially to the referees for their critical review of the manuscript that greatly improved it.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Gvozdev AR, Tukhvatullin IA, Gvozdev RI (2012) Quinone-dependent alcohol dehydrogenases and fad-dependent alcohol oxidases. *Biochem (Mosc)* 77:843. <https://doi.org/10.1134/S0006297912080056>
- Hernández-Tobías A, Julián-Sánchez A, Piña E, Rivero-Rosas H (2011) Natural alcohol exposure: Is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? *Chem-Biol Interact* 191:14. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.02.008>
- Reid MF, Fewson CA (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* 20:13. <https://doi.org/10.3109/10408419409113545>
- Jörnvall H, Landreh M, Östberg LJ (2015) Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem-Biol Interact* 234:75. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.017>
- Gaona-Lopez C, Julián-Sánchez A, Rivero-Rosas H (2016) Diversity and evolutionary analysis of iron-containing (type-iii) alcohol dehydrogenases in eukaryotes. *PLoS ONE* 11:e0166851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166851>
- Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermiler U (2004) Coenzyme binding in F420-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure* 12(3):361–370. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.010>
- Mascotti ML, Kumar H, Nguyen QT, Ayub MJ, Fraaije MW (2018) Reconstructing the evolutionary history of F_{420} -dependent dehydrogenases. *Sci Rep* 8:17571. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35590-2>
- Shah MV, Antoney J, Kang SW, Warden AC, Hartley CJ, Nazem-Bokaei H, Jackson CJ, Scott C (2019) Cofactor F_{420} -dependent enzymes: an under-explored resource for asymmetric redox biocatalysis. *Catalysts* 9:868. <https://doi.org/10.3390/catal9100868>
- Taylor M, Scott C, Grogan G (2013) F_{420} -dependent enzymes—potential for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 31(2):63–64. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.09.003>
- Toyama H, Mathews FS, Adachi O, Matsushita K (2004) Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys* 428(1):10. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.037>
- Goodwin PM, Anthony C (1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* 40:1. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60129-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60129-0)
- Keltjens JT, Pol A, Reimann J, Op den Camp HJM (2014) PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6163. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5766-8>
- Anthony C (2001) Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxid Redox Signal* 3:757. <https://doi.org/10.1089/15230860152664966>
- Cao TP, Choi JM, Kim SW, Lee SH (2018) The crystal structure of methanol dehydrogenase, a quinoprotein from the marine methylotrophic bacterium *Methylophaga aminisulfidivorans* MPT. *J Microbiol* 56:246. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7483-y>
- Daumann LJ (2019) Essential and ubiquitous: the emergence of lanthanide metallochemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 58:12795. <https://doi.org/10.1002/anie.201904090>
- Adachi O, Yakushi T (2016) Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (eds) *Acetic acid bacteria*. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_13
- Gómez-Manzo S, Solano-Peralta A, Saucedo-Vázquez JP, Escamilla-Marván JE, Kroneck PMH, Sosa-Torres ME (2010) The membrane-bound quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* 49(11):2409. <https://doi.org/10.1021/bi9015007>
- Crichton R (2019) *Biological inorganic chemistry. A new introduction to molecular structure and function*. 3rd edn, Elsevier, Oxford ISBN: 978-0-12-811741-5, pp 351–352
- Parkin G (2004) Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chem Rev* 104(2):699. <https://doi.org/10.1021/cr0206263>
- Rudolf M, Einsle O, Neese F, Kroneck PM (2002) Pentahem cytochrome *c* nitrite reductase: reaction with hydroxylamine, a potential reaction intermediate and substrate. *Biochem Soc Trans* 30(4):649. <https://doi.org/10.1042/bst0300649>
- Umhau S, Fritz G, Diederichs K, Breed J, Welte W, Kroneck PM (2001) Three-dimensional structure of the nonheme cytochrome *c* from *Desulfovibrio desulfuricans* Essex in the Fe(III) state at 1.89 Å resolution. *Biochemistry* 40(5):1308. <https://doi.org/10.1021/bi001479a>
- Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, Yu Y, Tian S, Petrik I, Bhagi A, Lu Y (2014) Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chem Rev* 114(8):4366. <https://doi.org/10.1021/cr400479b>
- Castro Martínez FM, Páez López D, Sarmiento Pavía PD, Sosa Torres ME, Kroneck PMH (2020) Cytochrome P450. The

- dioxygen-activating heme thiolate. In: Sosa-Torres ME, Kroneck PMH (eds) Transition metals and sulfur—a strong relationship for life, vol 20. Metal ions in life sciences, pp 165–197 <https://doi.org/10.1515/9783110589757-012>
24. Huang X, Groves JT (2017) Beyond ferryl-mediated hydroxylation: 40 years of the rebound mechanism and C-H activation. *J Biol Inorg Chem* 22:185. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1414-3>
 25. Yosca TH, Ledray AP, Ngo J, Green MT (2017) A new look at the role of thiolate ligation in cytochrome P450. *J Biol Inorg Chem* 22:209. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1430-3>
 26. Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu Rev Biochem* 69:1005. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.1005>
 27. Walker FA (2004) Models of the bis-histidine-ligated electron-transferring cytochromes. Comparative geometric and electronic structure of low-spin ferro- and ferrihemes. *Chem Rev* 104:589. <https://doi.org/10.1021/cr020634j>
 28. Reedy CJ, Gibney BR (2004) Heme protein assemblies. *Chem Rev* 104:617. <https://doi.org/10.1021/cr0206115>
 29. Bertini I, Cavallaro G, Rosato A (2006) Cytochrome *c*: occurrence and functions. *Chem Rev* 106:90. <https://doi.org/10.1021/cr050241v>
 30. Deng YW, Ro SY, Rosenzweig AC (2018) Structure and function of the lanthanide-dependent methanol dehydrogenase XoxF from the methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1C. *J Biol Inorg Chem* 23:1037. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1604-2>
 31. Jahn B, Jonasson NSW, Hu H, Singer H, Pol A, Good NM, Op den Camp HJM, Martinez-Gomez NC, Daumann LJ (2020) Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wuster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *J Biol Inorg Chem* 25:199. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01752-9>
 32. Hauge JG (1964) Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. *J Biol Chem* 239:3630
 33. Anthony C, Zatman LJ (1967) The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27: a new oxidoreductase prosthetic group. *Biochem J* 104:960
 34. Westerling J, Frank J, Duine JA (1979) The prosthetic group of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X*: electron spin resonance evidence for a quinone structure. *Biochem Biophys Res Commun* 87:719. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(79\)92018-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(79)92018-7)
 35. Salisbury SA, Forrest HS, Cruse WB, Kennard O (1979) A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature* 280:843. <https://doi.org/10.1038/280843a0>
 36. Duine JA (1981) Quinoproteins: a novel class of dehydrogenases. *Trends Biochem Sci* 6:278. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90100-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90100-6)
 37. Duine JA, Frank J, Verwiel EJ (1981) Characterization of the second prosthetic group in methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X*. *Eur J Biochem* 118:395. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06415.x>
 38. Duine JA, Frank J, Jongejan JA (1987) Enzymology of quinoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 59:169. <https://doi.org/10.1002/9780470123058.ch4>
 39. Duine JA (1991) Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem* 200:271. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16183.x>
 40. Duine JA (1999) The PQQ story. *J Biosci Bioeng* 88:231. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80002-x](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80002-x)
 41. White S, Boyd G, Mathews FS, Xia ZX, Dai WW, Zhang YF, Davidson VL (1993) The active site structure of the calcium-containing quinoprotein methanol dehydrogenase. *Biochemistry* 32:12955. <https://doi.org/10.1021/bi00211a002>
 42. Xia Z, Dai W, Zhang Y, White SA, Boyd GD, Mathews FS (1996) Determination of the gene sequence and the three-dimensional structure at 2.4 angstroms resolution of methanol dehydrogenase from *Methylophilus W3A1*. *J Mol Biol* 259:480. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0334>
 43. Blake CC, Ghosh M, Harlos K, Avezoux A, Anthony C (1994) The active site of methanol dehydrogenase contains a disulphide bridge between adjacent cysteine residues. *Nat Struct Biol* 1:102. <https://doi.org/10.1038/nsb0294-102>
 44. Ghosh M, Anthony C, Harlos K, Goodwin MG, Blake C (1995) The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. *Structure* 3:177. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00148-4](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00148-4)
 45. Anthony C, Zatman LJ (1964) The Microbial oxidation of methanol 2. The methanol-oxidizing enzyme of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem J* 92:614
 46. Anthony C (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv Microb Physiol* 27:114
 47. Green PN, Ardley JK (2018) Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2727. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002856>
 48. Afolabi PR, Mohammed F, Amaratunga K, Majekodunmi O, Dales SL, Gill R, Thompson D, Cooper JB, Wood SP, Goodwin PM, Anthony C (2001) Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_1 . *Biochemistry* 40:9799. <https://doi.org/10.1021/bi002932i>
 49. Anthony C, Williams P (2003) The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1647:18. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00042-6)
 50. Williams PA, Coates L, Mohammed F, Gill R, Erskine PT, Coker A, Wood SP, Anthony C, Cooper JB (2005) The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:75. <https://doi.org/10.1107/S0907444904026964>
 51. Xia ZX, Dai WW, Xiong JP, Hao ZP, Davidson VL, White S, Mathews FS (1992) The three-dimensional structures of methanol dehydrogenase from two methylophilic bacteria at 2.6-Å resolution. *J Biol Chem* 267:22289
 52. Li J, Gan JH, Mathews FS, Xia ZX (2011) The enzymatic reaction-induced configuration change of the prosthetic group PQQ of methanol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 406:621. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.107>
 53. Zheng YJ, Zx X, Zw C, Mathews FS, Bruce TC (2001) Catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase: a theoretical and X-ray crystallographic investigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:432. <https://doi.org/10.1073/pnas.021547498>
 54. Xia ZX, Dai WW, He YN, White SA, Mathews FS, Davidson VL (2003) X-ray structure of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* and molecular modeling of its interactions with cytochrome c_1 . *J Biol Inorg Chem* 8:843. <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0485-0>
 55. Nojiri M, Hira D, Yamaguchi K, Okajima T, Tanizawa K, Suzuki S (2006) Crystal structures of cytochrome c_1 and methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: structural and mechanistic insights into interactions between the two proteins. *Biochemistry* 45:3481. <https://doi.org/10.1021/bi051877j>
 56. Culpepper MA, Rosenzweig AC (2014) Structure and protein-protein interactions of methanol dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry* 53:6211. <https://doi.org/10.1021/bi500850j>

57. Murzin AG (1992) Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for seven-fold symmetry. *Proteins* 14:191. <https://doi.org/10.1002/prot.340140206>
58. Jawad Z, Paoli M (2002) Novel sequences propel familiar folds. *Structure* 10:447. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00750-5](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00750-5)
59. Kirberger M, Wang X, Deng H, Yang W, Chen G, Yang JJ (2008) Statistical analysis of structural characteristics of proteins Ca²⁺-binding sites. *J Biol Inorg Chem* 13:1169
60. Chan HTC, Anthony C (1992) Characterisation of a red form of methanol dehydrogenase from the marine methylotroph *Methylobacterium marina*. *FEMS Microbiol Lett* 97:293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05478.x>
61. Richardson IW, Anthony C (1992) Characterization of mutant forms of the quinoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *Biochem J* 287:709. <https://doi.org/10.1042/bj2870709>
62. Nunn DN, Lidstrom ME (1986) Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium* sp. Strain AM1. *J Bacteriol* 166:581
63. Nunn DN, Lidstrom ME (1986) Phenotypic characterization of 10 methanol oxidation mutant classes in *Methylobacterium* sp. Strain AM1. *J Bacteriol* 166:591
64. Lidstrom ME (1990) Genetics of carbon metabolism in methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 87:431
65. Harris TK, Davidson VL, Chen L, Mathews FS, Xia ZX (1994) Ionic strength dependence of the reaction between methanol dehydrogenase and cytochrome *c*-551i: evidence of conformationally coupled electron transfer. *Biochemistry* 33:12600. <https://doi.org/10.1021/bi00208a010>
66. Harris TK, Davidson VL (1994) Thermal stability of methanol dehydrogenase is altered by the replacement of enzyme-bound Ca²⁺ with Sr²⁺. *Biochem J* 303:141. <https://doi.org/10.1042/bj3030141>
67. Adachi O, Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M (1990) Calcium in quinoprotein methanol dehydrogenase can be replaced by strontium. *Agric Biol Chem* 54:2833. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870441>
68. Goodwin MG, Anthony C (1996) Characterization of a novel methanol dehydrogenase containing a Ba²⁺ ion at the active site. *Biochem J* 318:673. <https://doi.org/10.1042/bj3180673>
69. Goodwin MG, Avezoux A, Dales SL, Anthony C (1996) Reconstitution of the quinoprotein methanol dehydrogenase from inactive Ca²⁺-free enzyme with Ca²⁺, Sr²⁺ or Ba²⁺. *Biochem J* 319:839. <https://doi.org/10.1042/bj3190839>
70. Idupulapati NB, Mainardi DS (2010) Quantum chemical modeling of methanol oxidation mechanisms by methanol dehydrogenase enzyme: effect of substitution of calcium by barium in the active site. *J Phys Chem A* 114:1887. <https://doi.org/10.1021/jp9083025>
71. Duine JA, Frank J Jr (1980) Studies on methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. Isolation of an oxidized form of the enzyme. *Biochem J* 187:213. <https://doi.org/10.1042/bj1870213>
72. de Beer R, Duine JA, Frank J, Westerling J (1983) The role of pyrrolo-quinoline semiquinone forms in the mechanism of action of methanol dehydrogenase. *Eur J Biochem* 130:105. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07123.x>
73. Frank J Jr, Dijkstra M, Duine JA, Balny C (1988) Kinetic and spectral studies on the redox forms of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. *Eur J Biochem* 174:331. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14102.x>
74. Itoh S, Kawakami H, Fukuzumi S (1998) Model studies on calcium-containing quinoprotein alcohol dehydrogenases. Catalytic role of Ca²⁺ for the oxidation of alcohols by coenzyme PQQ (4,5-dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2, 7,9-tricarboxylic acid). *Biochemistry* 37:6562. <https://doi.org/10.1021/bi9800092>
75. Itoh S, Kawakami H, Fukuzumi S (2000) Development of the active site model for calcium-containing quinoprotein alcohol dehydrogenases. *J Mol Catal B Enzym* 8:85
76. Zheng YJ, Bruce TC (1997) Conformation of coenzyme pyrroloquinoline quinone and role of Ca²⁺ in the catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11881. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.11881>
77. Leopoldini M, Russo N, Toscano M (2007) The preferred reaction path for the oxidation of methanol by PQQ-containing methanol dehydrogenase: addition-elimination versus hydride-transfer mechanism. *Chemistry* 13:2109. <https://doi.org/10.1002/chem.200601123>
78. Reddy SY, Mathews FS, Zheng YJ, Bruce TC (2003) Quinoprotein methanol dehydrogenase: a molecular dynamics study and comparison with crystal structure. *J Mol Struct* 655:269. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(03\)00257-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00257-6)
79. Reddy SY, Bruce TC (2003) In silico studies of the mechanism of methanol oxidation by quinoprotein methanol dehydrogenase. *J Am Chem Soc* 125:8141. <https://doi.org/10.1021/ja034406y>
80. Kay CW, Mennenga B, Görlich H, Bittl R (2006) Structure of the pyrroloquinoline quinone radical in quinoprotein ethanol dehydrogenase. *J Biol Chem* 281:1470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511132200>
81. Carugo O, Cemazar M, Zahariev S, Hudáky I, Gáspári Z, Perczel A, Pongor S (2003) Vicinal disulfide turns. *Protein Eng* 16:637. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg088>
82. Kao PN, Karlin A (1986) Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem* 261:8085
83. Wang X, Connor M, Smith R, Maciejewski MW, Howden ME, Nicholson GM, Christie MJ, King GF (2000) Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nat Struct Biol* 7:505. <https://doi.org/10.1038/75921>
84. Avezoux A, Goodwin MG, Anthony C (1995) The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem J* 307:735. <https://doi.org/10.1042/bj3070735>
85. Ramachandran GN, Sasisekharan V (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* 23:283. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60402-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60402-7)
86. Chandrasekaran R, Balasubramanian R (1969) Stereochemical studies of cyclic peptides. VI. Energy calculations of the cyclic disulphide cysteinyl-cysteine. *Biochim Biophys Acta* 188(1):1. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(69\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(69)90039-7)
87. Richardson JS, Videau LL, Williams CJ, Richardson DC (2017) Broad analysis of vicinal disulfides: occurrences, conformations with *cis* or with *trans* peptides, and functional roles including sugar binding. *J Mol Biol* 429:1321. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.017>
88. Harms N, Ras J, Koning S, Reijnders WNM, Stouthamer AH, van Spanning RJM (1996) Genetics of C1 metabolism regulation in *Paracoccus denitrificans*. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds) *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 126–132. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0213-8_18
89. Chistoserdova L (1996) Metabolism of formaldehyde in *M. extorquens* AM1. Molecular genetic analysis and mutant characterization. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds.) *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 16–24. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0213-8_4

90. Chistoserdova L, Lidstrom ME (1997) Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 143:1729. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1729>
91. Chistoserdova L (2016) Lanthanides: New life metals? *World J Microbiol Biotechnol* 32:138. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2088-2>
92. Wilson SM, Gleisten MP, Donohue TJ (2008) Identification of proteins involved in formaldehyde metabolism by *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* 154:296. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011346-0>
93. Hibi Y, Asai K, Arafuka H, Hamajima M, Iwama T, Kawai K (2011) Molecular structure of La³⁺-induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans*. *J Biosci Bioeng* 111:547. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.017>
94. Fitriyanto NA, Fushimi M, Matsunaga M, Pertiwiningrum A, Iwama T, Kawai K (2011) Molecular structure and gene analysis of Ce³⁺-induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *J Biosci Bioeng* 111:613. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.015>
95. Nakagawa T, Mitsui R, Tani A, Sasa K, Tashiro S, Iwama T, Hayakawa T, Kawai K (2012) A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS ONE* 7:e50480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050480>
96. Beck DA, McTaggart TL, Setboonsarng U, Vorobev A, Kalyuzhnaya MG, Ivanova N, Goodwin L, Woyke T, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2014) The expanded diversity of *Methyl-ophilaceae* from Lake Washington through cultivation and genomic sequencing of novel ecotypes. *PLoS ONE* 9:e102458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102458>
97. Vorobev A, Beck DA, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2013) Comparative transcriptomics in three *Methyl-ophilaceae* species uncover different strategies for environmental adaptation. *PeerJ* 1:e115. <https://doi.org/10.7717/peerj.115>
98. Pol A, Barends TR, Dietl A, Khadem AF, Eygensteyn J, Jetten MS, Op den Camp HJ (2014) Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environ Microbiol* 16:255. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12249>
99. Chistoserdova L (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol* 13:2603. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02464.x>
100. Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG (2018) Current trends in methylotrophy. *Trends Microbiol* 26:703. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.011>
101. Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlappbach R, von Mering C, Vorholt JA (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16428. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905240106>
102. Jahn B, Pol A, Lumpe H, Barends TRM, Dietl A, Hogendoorn C, Op den Camp HJM, Daumann LJ (2018) Similar but not the same: first kinetic and structural analyses of a methanol dehydrogenase containing a europium ion in the active site. *Chem Bio Chem* 19:1147. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800130>
103. Good NM, Fellner M, Demirev K, Hu J, Hausinger RP, Martínez-Gómez NC (2020) Lanthanide-dependent alcohol dehydrogenases require an essential aspartate residue for metal coordination and enzymatic function. *J Biol Chem* 295:8272. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013227>
104. Lumpe H, Pol A, Op den Camp HJM, Daumann LJ (2018) Impact of the lanthanide contraction on the activity of a lanthanide-dependent methanol dehydrogenase—a kinetic and DFT study. *Dalton Trans* 47:10463. <https://doi.org/10.1039/c8dt01238e>
105. Featherston ER, Rose HR, McBride MJ, Taylor EM, Boal AK, Cotruvo JA Jr (2019) Biochemical and structural characterization of XoxG and XoxJ and their roles in lanthanide-dependent methanol dehydrogenase activity. *Chem Bio Chem* 20:2360
106. Bogart JA, Lewis AJ, Schelter EJ (2015) DFT study of the active site of the XoxF-type natural, cerium-dependent methanol dehydrogenase enzyme. *Chemistry* 21:1743. <https://doi.org/10.1002/chem.201405159>
107. Prejanò M, Marino T, Russo N (2017) How can methanol dehydrogenase from *Methylacidiphilum fumarolicum* work with the alien ceii ion in the active center? A theoretical study. *Chemistry* 23:8652. <https://doi.org/10.1002/chem.201700381>
108. Vu HN, Subuyuj GA, Vijayakumar S, Good NM, Martínez-Gómez NC, Skovran E (2016) Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth. *J Bacteriol* 198:1250. <https://doi.org/10.1128/JB.00937-15>
109. Chu F, Lidstrom ME (2016) XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense*. *J Bacteriol* 198:1317. <https://doi.org/10.1128/JB.00959-15>
110. Ochsner AM, Hemmerle L, Vonderach T, Nüssli R, Bortfeld-Miller M, Hattendorf B, Vorholt JA (2019) Use of rare-earth elements in the phyllosphere colonizer *Methylobacterium extorquens* PA1. *Mol Microbiol* 111:1152. <https://doi.org/10.1111/mmi.14208>
111. Wehrmann M, Berthelot C, Billard P, Klebensberger J (2019) Rare Earth Element (REE)-dependent growth of *Pseudomonas putida* KT2440 relies on the ABC-transporter PedA1A2BC and is influenced by iron availability. *Front Microbiol* 10:2494
112. Krause SM, Johnson T, Samadhi Karunaratne Y, Fu Y, Beck DA, Chistoserdova L, Lidstrom ME (2017) Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619871114>
113. Wu ML, Wessels JC, Pol A, Op den Camp HJ, Jetten MS, van Niftrik L, Keltjens JT (2015) XoxF-type methanol dehydrogenase from the anaerobic methanotroph “*Candidatus Methylo-mirabilis oxyfera*”. *Appl Environ Microbiol* 81:1442. <https://doi.org/10.1128/AEM.03292-14>
114. Lansman JB (1990) Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J Gen Physiol* 95:679. <https://doi.org/10.1085/jgp.95.4.679>
115. Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A (2000) Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275:37423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007010200>
116. Nesmerak K (2013) Lanthanide/actinide in health and disease. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds) *Encyclopedia of metalloproteins*. Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_152
117. Cotruvo JA Jr, Featherston ER, Mattocks JA, Ho JV, Laremore TN (2018) Lanmodulin: a highly selective lanthanide-binding protein from a lanthanide-utilizing bacterium. *J Am Chem Soc* 140:15056. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b09842>
118. Cook EC, Featherston ER, Showalter SA, Cotruvo JA Jr (2019) Structural basis for rare earth element recognition by *Methylobacterium extorquens* lanmodulin. *Biochemistry* 58:120. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01019>
119. Cotruvo JA Jr (2019) The chemistry of lanthanides in biology: recent discoveries, emerging principles, and technological applications. *ACS Cent Sci* 5:1496. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00642>
120. Roszczenko-Jasińska P, Vu HN, Subuyuj GA, Crisostomo RV, Cai J, Lien NF, Clippard EJ, Ayala EM, Ngo RT, Yarza F, Wingett JP, Raghuraman C, Hoerber CA, Martínez-Gómez NC, Skovran E (2020) Gene products and processes contributing

- to lanthanide homeostasis and methanol metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Sci Rep* 10:12663. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69401-4>
121. Featherston ER, Cotruvo JA Jr (2021) The biochemistry of lanthanide acquisition, trafficking, and utilization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868:118864. <https://doi.org/10.1016/j.bbamc.2020.118864>
 122. Williams P, Coates L, Mohammed F, Gill R, Erskine P, Bourgeois D, Wood SP, Anthony C, Cooper JB (2006) The 1.6 Å X-ray structure of the unusual c-type cytochrome, cytochrome c_L , from the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *J Mol Biol* 357:151. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.055>
 123. Yu Z, Beck DAC, Chistoserdova L (2017) Natural selection in synthetic communities highlights the roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption. *Front Microbiol* 5:2392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02392>
 124. Zheng Y, Huang J, Zhao F, Chistoserdova L (2018) Physiological effect of XoxG(4) on lanthanide-dependent methanotrophy. *mBio* 9:e02430-e2517. <https://doi.org/10.1128/mBio.02430-17>
 125. Choi JM, Cao TP, Kim SW, Lee KH, Lee SH (2017) MxaJ structure reveals a periplasmic binding protein-like architecture with unique secondary structural elements. *Proteins* 85:1379. <https://doi.org/10.1002/prot.25283>
 126. Versantvoort W, Pol A, Daumann LJ, Larrabee JA, Strayer AH, Jetten MSM, van Niftrik L, Reimann J, Op den Camp HJM (2019) Characterization of a novel cytochrome c_{G1} as the electron acceptor of XoxF-MDH in the thermoacidophilic methanotroph *Methyacidiphilum fumariolicum* SolV. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1867:595. <https://doi.org/10.1016/j.bbapa.2019.04.001>
 127. Kalimuthu P, Daumann LJ, Pol A, Op den Camp HJM, Bernhardt PV (2019) Electrocatalysis of a europium-dependent bacterial methanol dehydrogenase with its physiological electron-acceptor cytochrome c_{G1} . *Chemistry* 25:8760. <https://doi.org/10.1002/chem.201900525>
 128. Kim HG, Han GH, Kim D, Choi JS, Kim SW (2012) Comparative analysis of two types of methanol dehydrogenase from *Methylophaga aminisulfidivorans* MPT grown on methanol. *J Basic Microbiol* 52:141. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000479>
 129. Rozeboom HJ, Yu S, Mikkelsen R, Nikolaev I, Mulder HJ, Dijkstra BW (2015) Crystal structure of quinone-dependent alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobactersaccharoketogenes*. A versatile dehydrogenase oxidizing alcohols and carbohydrates. *Protein Sci* 24:2044. <https://doi.org/10.1002/pro.2818>
 130. Groen B, Frank J Jr, Duine JA (1984) Quinoprotein alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 223:921. <https://doi.org/10.1042/bj2230921>
 131. Görisch H, Rupp M (1989) Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 56:35. <https://doi.org/10.1007/bf00822582>
 132. 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. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2442-2450.1995>
 133. Keitel T, Diehl A, Knaute T, Stezowski JJ, Höhne W, Görisch H (2000) X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *J Mol Biol* 297:961. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3603>
 134. Dijkstra M, van den Tweel WJJ, de Bont JAM, Frank JJ, Duine JA (1985) Monomeric and dimeric quinoprotein alcohol dehydrogenase from alcohol-grown *Pseudomonas* BB1. *J Gen Microbiol* 131:3163
 135. Mutzel A, Görisch H (1991) Quinoprotein ethanol dehydrogenase: preparation of the apo-form and reconstitution with pyrroloquinoline quinone and Ca^{2+} or Sr^{2+} ions. *Agric Biol Chem* 55:1721. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870854>
 136. Vangnai AS, Arp DJ (2001) An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by "*Pseudomonas butanovora*". *Microbiology* 147:745. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-745>
 137. Tachibana S, Kuba N, Kawai F, Duine JA, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11540.x>
 138. Shima M, Ninomiya K, Kuno O, Kato N, Sakazawa C (1986) Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl Environ Microbiol* 51:268
 139. Shibata T, Ishii Y, Noguchi Y, Yamada H, Saito Y, Yamashita M (2001) Purification and molecular characterization of a quinoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* IFO 14464. *J Biosci Bioeng* 92:524. <https://doi.org/10.1263/jbb.92.524>
 140. van Kleef MA, Duine JA (1988) Bacterial NAD(P)-independent quinate dehydrogenase is a quinoprotein. *Arch Microbiol* 150:32. <https://doi.org/10.1007/bf00409714>
 141. Chen ZW, Matsushita K, Yamashita T, Fujii TA, Toyama H, Adachi O, Bellamy HD, Mathews FS (2002) Structure at 1.9 Å resolution of a quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudomonasputida* HK5. *Structure* 10:837. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00774-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00774-8)
 142. Patel RN, Hou CT, Felix A (1978) Microbial oxidation of methane and methanol: crystallization of methanol dehydrogenase and properties of holo- and apomethanol dehydrogenase from *Methylomonas methanica*. *J Bacteriol* 133:641
 143. Reichmann P, Görisch H (1993) Cytochrome c_{550} from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 289:173. <https://doi.org/10.1042/bj2890173>
 144. Schobert M, Görisch H (1999) Cytochrome c_{550} is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and sequencing of the genes encoding cytochrome c_{550} and an adjacent acetaldehyde dehydrogenase. *Microbiology* 145:471. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-471>
 145. Mennenga B, Kay CW, Görisch H (2009) Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: the unusual disulfide ring formed by adjacent cysteine residues is essential for efficient electron transfer to cytochrome c_{550} . *Arch Microbiol* 191:361. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0460-4>
 146. Oubrie A, Rozeboom HJ, Kalk KH, Huizinga EG, Dijkstra BW (2002) Crystal structure of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer. *J Biol Chem* 277:3727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109403200>
 147. Good NM, Vu HN, Suriano CJ, Subuyuj GA, Skovran E, Martinez-Gomez NC (2016) Pyrroloquinoline quinone ethanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 extends lanthanide-dependent metabolism to multicarbon substrates. *J Bacteriol* 198:3109. <https://doi.org/10.1128/JB.00478-16>
 148. Good NM, Moore RS, Suriano CJ, Martinez-Gomez NC (2019) Contrasting in vitro and in vivo methanol oxidation activities of lanthanide-dependent alcohol dehydrogenases XoxF1 and ExaF from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Sci Rep* 9:4248. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41043-1>
 149. Wehrmann M, Billard P, Martin-Meriadec A, Zegeye A, Klebensberger J (2017) Functional role of lanthanides in enzymatic

- activity and transcriptional regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenases in *Pseudomonas putida* KT2440. *mBio* 8:e00570-e617. <https://doi.org/10.1128/mBio.00570-17>
150. Wehrmann M, Toussaint M, Pfannstiel J, Billard P, Klebensberger J (2020) The cellular response to lanthanum is substrate specific and reveals a novel route for glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *mBio* 11:e00516-e520. <https://doi.org/10.1128/mBio.00516-20>
 151. Toyama H, Chen ZW, Fukumoto M, Adachi O, Matsushita K, Mathews FS (2005) Molecular cloning and structural analysis of quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J Mol Biol* 352:91. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.078>
 152. Groen BW, van Kleef MA, Duine JA (1986) Quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteronei*. *Biochem J* 234:611. <https://doi.org/10.1042/bj2340611>
 153. de Jong GAH, Geerlof A, Stoorvogel J, Jongejan JA, de Vries S, Duine JA (1995) Quinoxinoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteronei* Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *Eur J Biochem* 230:899. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0899g.x>
 154. de Jong GA, Caldeira J, Sun J, Jongejan JA, de Vries S, Loehr TM, Moura I, Moura JJ, Duine JA (1995) Characterization of the interaction between PQQ and heme c in the quinoxinoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteronei*. *Biochemistry* 34:9451. <https://doi.org/10.1021/bi00029a021>
 155. Shima M, Tamogami T, Nishi K, Harayama S (1996) Cloning and characterization of the gene encoding pyrroloquinoline quinone-dependent poly (vinyl alcohol) dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:1056
 156. Yasuda M, Cherepanov A, Duines JA (1996) Polyethylene glycol dehydrogenase activity of *Rhodospseudomonas acidophila* derives from a type I quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 138:23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08129.x>
 157. Vangnai AS, Arp DJ, Sayavedra-Soto LA (2002) Two distinct alcohol dehydrogenases participate in butane metabolism by *Pseudomonas butanovora*. *J Bacteriol* 184:1916. <https://doi.org/10.1128/jb.184.7.1916-1924.2002>
 158. Zart G, Schröder T, Andreesen JR (1997) Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia eutropha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 63:4891
 159. Geerlof A, Rakels JJ, Straathof AJ, Heijnen JJ, Jongejan JA, Duine JA (1994) Description of the kinetic mechanism and the enantioselectivity of quinoxinoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteronei* in the oxidation of alcohols and aldehydes. *Eur J Biochem* 226:537. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20078.x>
 160. Page CC, Moser CC, Chen X, Dutton L (1999) Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402:47
 161. Kurnikov Kurnikov IV (2000) Harlem computer program. University of Pittsburgh, Pittsburgh
 162. Regan JJ, Risser SM, Beratan DN, Onuchic JN (1993) Protein electron transport: single versus multiple pathways. *J Phys Chem* 97:13083. <https://doi.org/10.1021/j100152a009>
 163. Matsushita K, Yamashita T, Aoki N, Toyama H, Adachi O (1999) Electron transfer from quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase to blue copper protein azurin in the alcohol oxidase respiratory chain of *Pseudomonas putida* HK5. *Biochemistry* 38:6111. <https://doi.org/10.1021/bi990121f>
 164. Matsushita K, Toyama H, Adachi O (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* 36:247. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60181-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60181-2)
 165. Yakushi T, Matsushita K (2010) Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1257. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2529-z>
 166. Matsushita K, Toyama H, Adachi O (2004) Respiratory chains in acetic acid bacteria: membrane-bound periplasmic sugar and alcohol respirations. In: Zanoni D (ed) *Respiration in archaea and bacteria*, vol. 2: diversity of prokaryotic respiratory systems. Springer, Dordrecht, pp 81–99
 167. Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O (1981) d-Glucose Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: solubilization, purification and characterization. *Agric Biol Chem* 45:851. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864633>
 168. Matsushita K, Fujii Y, Ano Y, Toyama H, Shinjoh M, Tomiyama N, Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T, Adachi O (2003) 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol* 69:1959. <https://doi.org/10.1128/aem.69.4.1959-1966.2003>
 169. Vangnai AS, Toyama H, De-Eknamkul W, Yoshihara N, Adachi O, Matsushita K (2004) Quinate oxidation in *Gluconobacter oxydans* IFO3244: purification and characterization of quinoprotein quinate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 241:157. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.014>
 170. Sarmiento-Pavia PD, Rodríguez-Hernández A, Rodríguez-Romero A, Sosa-Torres ME (2020) The structure of a novel membrane-associated 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd6PGD) reveals a subfamily of short-chain 6PGDs. *FEBS J*. <https://doi.org/10.1111/febs.15472>
 171. Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M (1984) d-Gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyacetonicus*: purification and characterization. *Agric Biol Chem* 48:1517. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866357>
 172. Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M (1981) Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem* 45:1079. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864678>
 173. Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O (1981) D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. *J Bacteriol* 145:814. <https://doi.org/10.1128/JB.145.2.814-823.1981>
 174. Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, Ameyama M (1982) Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobactersuboxydans* var. α . *Agric Biol Chem* 46:135. <https://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865042>
 175. Gómez-Manzo S, Chavez-Pacheco JL, Contreras-Zentella M, Sosa-Torres ME, Arreguín-Espinosa R, Pérez de la Mora M, Membrillo-Hernández J, Escamilla JE (2010) Molecular and catalytic properties of the aldehyde dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a quinoxinoprotein containing pyrroloquinoline quinone, cytochrome b, and cytochrome c. *J Bacteriol* 192:5718. <https://doi.org/10.1128/JB.00589-10>
 176. Matsushita K, Matsutani M (2016) Distribution, evolution, and physiology of oxidative fermentation. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (eds) *Acetic acid bacteria*. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_7
 177. Trček J, Matsushita K (2013) A unique enzyme of acetic acid bacteria, PQQ-dependent alcohol dehydrogenase, is also present in *Frateria aurantia*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7369. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5007-6>

178. Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K, Sakaki K (2009) Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Appl Environ Microbiol* 75:7760. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-09>
179. Gómez-Manzo S, Contreras-Zentella M, González-Valdez A, Sosa-Torres M, Arreguín-Espinoza R, Escamilla-Marván E (2008) The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int J Food Microbiol* 125:71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.015>
180. Kanchanarach W, Theeragool G, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Matsushita K (2010) Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:741. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2203-5>
181. Gómez-Manzo S, Escamilla JE, González-Valdez 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 ML, Arreguín-Espinoza R, Kroneck PMH, Sosa-Torres ME (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. <https://doi.org/10.3390/ijms16011293>
182. Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, Matsushita K, Ameyama M (1978) Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* 42:2045. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863306>
183. Tayama K, Fukaya M, Okumura H, Kawamura Y, Beppu T (1989) Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:181. <https://doi.org/10.1007/BF00165885>
184. Kondo K, Beppu T, Horinouchi S (1995) Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurianus*. *J Bacteriol* 177:5048. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5048-5055.1995>
185. Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Shinagawa E, Adachi O (1996) Function of multiple heme c moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. *J Biol Chem* 271:4850. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4850>
186. Frébortová J, Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Adachi O (1997) Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:459. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.459>
187. Frébortová J, Matsushita K, Arata H, Adachi O (1998) Intramolecular electron transport in quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter methanolicus*: a redox-titration study. *Biochim Biophys Acta* 1363:24. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00090-x)
188. Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) *Biochim Biophys Acta* 726:133
189. 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* 72:2723. <https://doi.org/10.1271/bbb.80363>
190. Matsushita K, Yakushi T, Takaki Y, Toyama H, Adachi O (1995) Generation mechanism and purification of an inactive form convertible in vivo to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *J Bacteriol* 177:6552
191. Gómez-Manzo S, González-Valdez AA, Oria-Hernández J, Reyes-Vivas H, Arreguín-Espinoza R, Kroneck PM, Sosa-Torres ME, Escamilla JE (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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02487.x>
192. Ghosh R, Quayle JR (1981) Purification and properties of the methanol dehydrogenase from *Methylophilus methylotrophus*. *Biochem J* 199:245. <https://doi.org/10.1042/bj1990245>
193. Grosse S, Voigt C, Wendlandt KD, Kleber HP (1998) Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14. *J Basic Microbiol* 38:189
194. Sperl GT, Forrest HS, Gibson DT (1974) Substrate specificity of the purified primary alcohol dehydrogenases from methanol-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* 118:541
195. Schmidt S, Christen P, Kiefer P, Vorholt JA (2010) Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein XoxF in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 156:2575
196. O'Keeffe DT, Anthony C (1980) The two cytochromes c in the facultative methylotroph *Pseudomonas* AM1. *Biochem J* 192:411. <https://doi.org/10.1042/bj1920411>
197. Sato A, Takagi K, Kano K, Kato N, Duine JA, Ikeda T (2001) Ca²⁺ stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone. *Biochem J* 357:893. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570893>
198. Schrodinger L (2015) The PyMOL molecular graphics system, version 2.0.4. Schrodinger LLC, New York

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

The structure of a novel membrane-associated 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd 6PGD) reveals a subfamily of short-chain 6PGDs

Pedro D. Sarmiento-Pavía,¹ Annia Rodríguez-Hernández,² Adela Rodríguez-Romero,^{2*} Martha E. Sosa-Torres,^{1*}

¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX.

²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, CDMX.

*Corresponding authors: Prof. A. Rodríguez-Romero, adela@unam.mx and Prof. M.E. Sosa-Torres mest@unam.mx

Supplementary Material

Table S1. UniProt database accession numbers for sequences used in the Phylogenetic analysis.

UniProt Code	Species	Sequence length	Taxonomy		
A0A1U9KHR6	Acetobacter aceti 331	331	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria Rhodospirillales Acetobacteraceae
A0A1A0C5M2	Acetobacter pasteurianus 332	332	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria Rhodospirillales Acetobacteraceae
A0A553IHE1	Acholeplasma laidlawii 300	300	Bacteria	Terrabacteria	Tenericutas Acholeplasmatales
A0A1D8K845	Acidihalobacter prosperus 480	480	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias Chromatiales Ectothiorhodospiraceae
A0A344UVB5	Acidipropionibacterium virtanenii 292	292	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria Propionibacteriales
A0A444UK28	Acipenser ruthenus 820	820	Eukaryota	Animalia	Chordata Actinopterygii Acipenseriformes
A0A0K9ETE0	Actinobaculum suis 446	446	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria Actinomycetales Actinomycetaceae
NIR4D0	Aegilops tauschii 479 (996)	479	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes Angiosperma Monocots
A0A211K6K4	Aerococcus christensenii 298	298	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas Bacillales Lactobacillus
P70718	Aggregatibacter actinomycetemcomitans 484	484	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias Pasteurellales
A0A521BIE8	Aliifodinibius sediminis 478	478	Bacteria	FCB	Bacteroidetes Balneolales

I9P6K5	<i>Alishewanella agri</i> 509	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Alteromonadales
AOA1INGUWP9	<i>Alkalispirochaeta americana</i> 511	Bacteria	Spirochaetes	Spirochetia	Spirochaetales
AOA15JIN3V9	<i>Alligator mississippiensis</i> 637	Eukaryota	Animalia	Chordata	Reptilia
AOA211M1D9	<i>Alloscardovia omnicoles</i> 290	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales
AOA136WE26	<i>Anaerotrignum neopropionicum</i> 462	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Clostridia
AOA2N5IIA9	<i>Amylibacter cionae</i> 477	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales
AOA239CDH4	<i>Anaerovirgula multivorans</i> 459	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Clostridia
AOA059EW14	<i>Anncalia algerae</i> 457	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Microsporidia
AOA182L788	<i>Anopheles coluzzii</i> 858	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Insecta
AOA2K5EY65	<i>Aotus nancymae</i> 463	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia
Q9FFR3	<i>Arabidopsis thaliana</i> 487	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma
F1T5V5	<i>Atopobium vaginae</i> 480	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales
AOA158NK91	<i>Atta cephalotes</i> 482	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Insecta
FOYEX7	<i>Aureococcus anophagefferens</i> 465	Eukaryota	Stramenopiles	Pelagophyceae	Pelagomonadales
PZR37767.1	<i>Azospira_oryzae_471</i>	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Rhodocyclales
AOA2P0HGU5	<i>Bacillus anthracis</i> 297	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
AOA0H4PD20	<i>Bacillus smithii</i> 297	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
WP_063694977.1	<i>Bacillus subtilis</i> 312	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
AOA0P0G6Z0	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> 495	Bacteria	FCB	Bacteroidetas	Bacteroidales
AOA174WDU0	<i>Bacteroides vulgatus</i> 478	Bacteria	FCB	Bacteroidetas	Bacteroidales
AOA556V1P9	<i>Bagarius yarrelli</i> 1650	Eukaryota	Animalia	Chordata	Actinopterygii
K8ERY2	<i>Bathycoccus prasinos</i> 506	Eukaryota	Viridiplantae	Chlorophyta	Mamiellophyceae
AOA2A9MGZ1	<i>Besnoitia besnoiti</i> 506	Eukaryota	Alveolata	Apicomplexa	Conoidasida
C0BQV3	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> 316	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales
AOA2T5G479	<i>Brockia lithotrophica</i> 476	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Clostridia
AOA158PUG2	<i>Brugia malayi</i> 489	Eukaryota	Animalia	Nematoda	Secernentea

WP_013877801.1	Buchnera aphidicola 469	469	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Enterobacteriales
A0A102NYS1	Burkholderia_cepacia_289	289	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales
A0A0B6RX67	Burkholderia_plantarii_469	469	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales
E6N6A2	Caldiarchaenum_subterraneum 466	466	Archaea	Thaumarchaeota		
A0A0D2WWJ7	Capsaspora_owczarzaki 473	473	Eukaryota	Opisthokonta	Ichthyosporia	Capsaspora
A0A2P6TZ91	Chlorella_sorokiniana 1107	1107	Eukaryota	Viridiplantae	Chlorophyta	Trebouxiophyceae
A0A1J1HKM4	Clunio_marinus 932	932	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Insecta
A0A0A1FH02	Collimonas_arenae_340	340	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales
A8N212	Coprinopsis_cinerea 491	491	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Dikarya
A0A0C4YJW6	Cupriavidus_basilensis_345	345	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales
A0A1L9B5J2	Cystobacter_ferrugineus 476	476	Bacteria	Proteobacterias	Deltaproteobacteria	Mycococcales
E9HFF7	Daphnia_pulex 491	491	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Crustacea
A0A175YN99	Daucus_carota 490	490	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma
A0A133XLZ0	Dechloromonas_denitrificans_479	479	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Rhodocyclales
P41572	Drosophila_melanogaster 481	481	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Insecta
A0A4W4H955	Electrophorus_electricus 470	470	Eukaryota	Animalia	Chordata	Gymnotiformes
Q82ZC2	Enterococcus_faecalis 299	299	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
WP_002325733.1	Enterococcus_faecium 300	300	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
A0A2S4PNEZ	Erysiphe_pulchra 1444	1444	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Dikarya
P37754	Escherichia_coli 468	468	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Enterobacteriales
A0A133NNR9	Gardnerella_vaginalis 486	486	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales
A0A087LGM2	Geobacillus_stearothermophilus 469	469	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales
A8BWM8	Giardia_intestinalis 471	471	Eukaryota	Metamonada	Diplomonadida	Hexamitidae
WP_012222546.1	Gluconacetobacter_diazotrophicus 332	332	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales
G5EBD7	Gluconobacter_oxidans 332	332	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobactaria	Rhodospirillales
A0A250KCC2	Gordonia_iterans 482	482	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales

A0A1U8NDS2	Gossypium hirsutum 495	495	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma	Eudicots
A0A409XY04	Gymnopilus dilepis 923	923	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Dikarya	Basidiomycota
A0A1G9SE78	Halarsenatibacter silvermanii 481	481	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Clostridia	Halanaerobiales
D4GST8	Haloferax volcanii 299	299	Archaea	Eunyarcaeota	Halobacteria		
A0A4Q9LHR3	Hamiltosporidium magnivora 461	461	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Microsporidia	Pansporblastina
A0A3M0IRU7	Hirundo rustica 2906	2906	Eukaryota	Animalia	Chordata	Aves	Passeriformes
P5Z209	Homo sapiens 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Primates
A0A377QYG3	Kingella_potus_482	482	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Neisseriales	Neisseriaceae
A0A4V3CJF0	Kinneretia_asaccharophila_487	487	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales	Comamonadaceae
P41576	Klebsiella pneumoniae 469	469	Bacteria	Proteobacterias	Gammaaproteobacterias	Enterobacterales	
A0A0M0EKL1	Komagataeibacter europaeus 333	333	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobactaria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae
A0A318PH64	Komagataeibacter xylinus 332	332	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobactaria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae
A0A0M4CUB2	Lactobacillus plantarum 298	298	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Bacillales	Lactobacillus
A0A221MWB0	Lactobacillus sakei 299	299	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Bacillales	Lactobacillus
Q9CHU6	Lactococcus lactis 472	472	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Bacillales	Lactobacillales
A0A2J6KRC8	Lactuca sativa 488	488	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma	Eudicots
Q18L04	Leishmania donovani 479	479	Eukaryota	Euglenozoa	Kinetoplastida	Trypanosomatidae	Leishmaninae
A0A0S2F6H6	Lysobacter antibioticus 301	301	Bacteria	Proteobacterias	Gammaaproteobacterias	Xanthomonadales	
A0A0S2DMI4	Lysobacter enzymogenes 300	300	Bacteria	Proteobacterias	Gammaaproteobacterias	Xanthomonadales	
A0A2P6VPO0	Micractinium conductrix 2092	2092	Eukaryota	Viridiplantae	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorellales
A0A0M2H145	Microbacterium ketosireducens 482	482	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae
A0A098VTQ2	Mitosporidium daphniae 586	586	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Microsporidia	Mitosporidium
A0A2T0WF20	Mongolilbacter ruber 639	639	Bacteria	FCB	Bacteroidetes	Cytopagia	Cytophagales
F7DHT9	Monodelphis domestica 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Didelphimorphia
A0A151AZP9	Moorella mulderi 298	298	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales
A0A1J5J93	Moorella thermoacetica 305	305	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales

Q9DCD0	Mus musculus 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Rodentia
A0A4S8BN2	Musa balbisiana 915	915	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma	Monocots
A0A0U0ZJP3	Mycobacter abscessus 297	297	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteraceae
E4PU82	Mycoplasma leachii 299	299	Bacteria	Terrabacteria	Tenericutas	Mycoplasmatales	
Q8TA06	Naegleria gruberi 445	445	Eukaryota	Heterolobosea	Tetramitida	Vahlkampfiidae	
A0A4Z0WDC4	Natronospirillum operosus 498	498	Bacteria	Natronospirillum			
A0A2P6KGP1	Triconephila clavipes 730	730	Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Chelicerata	Arachnida
A0A449GKR4	Nocardia farcinica 342	342	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae
A0A0B8N7Y7	Nocardia seriolae 342	342	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae
A0A2R5F8G2	Novimethylophilus_kurashikiensis_303	303	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Nitrosomonadales	Methylophilaceae
A0A316D171	Oceanotoga teriensis 329	329	Bacteria	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	
XP_004639706.1	Octodon degus 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Rodentia
A0A161YEJ1	Oerskovia enterophila 300	300	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Micrococcales	
G117Z0	Oryctolagus cuniculus 644	644	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Lagomorpha
B8B1K3	Oryza sativa 475	475	Eukaryota	Plantae	Tracheophytes	Angiosperma	Poales
P00349	Ovis aries 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Bovidae
A0A1Y5TEP7	Pacificibacter marinus 465	465	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobactaria	Rhodospirillales	Rhodobacteraceae
A0A074L8C2	Paenibacillus polymyxa 297	297	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales	Paenibacillus
K7C115	Pan troglodytes 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Primates
A0A5E5B8K9	Pandoraea_sputorum_350	350	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales	Burkholderiaceae
A0A1N7RIR8	Paraburkholderia_ribeironis_469	469	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales	Burkholderiaceae
A0A2X4AST2	Paucimonas_lemoinei_325	325	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Burkholderiales	Burkholderiaceae
A0A1A5VR31	Pediococcus acidilactici 299	299	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Bacillales	Lactobacillus
A0A135YW54	Peptostreptococcus anaerobius 468	468	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Clostridia	Peptostreptococcaceae
A0A2Y9SSV4	Physeter catodon 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Cetaceae
H3G9Q8	Phytophthora ramorum 489	489	Eukaryota	Stramenopiles	Oomycetas	Peronosporales	

A0A2P6P0P6	Planoprotostelium fungivorum 1017	1017	Eukaryota	Amoebozoa	Evosea	Variosea	Cavosteliida
A0A077TNM0	Plasmodium chabaudi 472	472	Eukaryota	Alveolata	Apicomplexa	Aconoidasida	Haemosporida
A0A251P6U8	Prunus persica 495	495	Eukaryota	Viridiplantae	Tracheophytes	Angiosperma	Eudicotas
Q88FP6	Pseudomonas- putida 327	327	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Pseudomonadales	
A0A0U2VHJ0	Pseudoalteromonas translucida 457	457	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Alteromonadales	
WP_132504520.1	Rathayibacter tanacetii 490	490	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae
A0A0G2K7Q8	Rattus norvegicus 1089	1089	Eukaryota	Animalia	Chordata	Mammalia	Rodentia
A0A2W5SEY6	Rhodobacter sphaeroides 471	471	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae
A0A0F5K2X3	Robbia andropogonis_ 469	469	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae
A0A1S2MZB1	Rothia kristinae 508	508	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Micrococcales	
P38720	Saccharomyces cerevisiae 489	489	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Ascomycota	
COH9U3	Salmo salar 483	483	Eukaryota	Animalia	Chordata	Actinopterygii	Salmoniformes
P14062	Salmonella enterica 468	468	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Enterobacterales	
A0A3N0DRA3	Sinomicrobium pectiniyiticum 624	624	Bacteria	FCB	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
A0A3N1MDY7	Stella humosa 459	459	Bacteria	Proteobacterias	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae
A0A0I9ASW0	Streptococcus pneumoniae 481	481	Bacteria	Terrabacteria	Firmicutas	Lactobacillales	Streptococcaceae
A0A385ZP40	Streptomyces griseorubiginosus 291	291	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	
A0A250VLZ0	Streptomyces olivochromogenes 479	479	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	
CUW29094.1	Streptomyces reticuli 291	291	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	
A0A100ITV5	Streptomyces scabiei 296	296	Bacteria	Terrabacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	
A0A380MVE6	Suttonella ornithocola 656	656	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Cardiobacteriales	
A0A238UBC4	Tenacibaculum jejuense 623	623	Bacteria	FCB	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales
A0A402A1A9	Tengunoibacter tsumagoiensis 351	351	Bacteria	Terrabacteria	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	
K0SPA2	Thalassiosira oceanica 490	490	Eukaryota	Stramenopiles	Bacillariophyta	Coscinodiscophyceae	
A0A2T7IB18	Theileria orientalis 463	463	Eukaryota	Alveolata	Apicomplexa	Aconoidasida	
Q9WYR9	Thermotoga maritima 469	469	Bacteria	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	

KAE8184059.1	<i>Tilletia laevis</i> 491	491	Eukaryota	Opisthokonta	Fungi	Dikarya	Basidiomycota
AZGAV3	<i>Trichomonas vaginalis</i> 489	489	Eukaryota	Metamonada	Parabasalia	Trichomonadida	
P31072	<i>Trypanosoma brucei</i> 479	479	Eukaryota	Euglenozoa	Kinetoplastida	Trypanosomatidae	
XP_009309412.1	<i>Trypanosoma grayi</i> 476	476	Eukaryota	Euglenozoa	Kinetoplastida	Trypanosomatidae	
A0A4R2MPRO	<i>Uruburuella suis_482</i>	482	Bacteria	Proteobacterias	Betaproteobactaria	Neisseriales	Neisseriaceae
A0A1Q1P9B1	<i>Vibrio campbellii</i> 482	482	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Vibrionales	Vibrionaceae
A0A2J8G5Y6	<i>Vibrio diazotrophicus</i> 482	482	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Vibrionales	Vibrionaceae
D2UCV1	<i>Xanthomonas albilineans</i> 302	302	Bacteria	Proteobacterias	Gammaproteobacterias	Xanthomonadales	

Agradecimientos	3
Resumen	11
Abreviaturas empleadas	13
1. Antecedentes	15
1.1 Bacterias ácido-acéticas	15
1.1.1 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	15
1.2 Fermentación oxidante y la cadena respiratoria en bacterias ácido-acéticas	17
1.2.1 Oxidación citoplásmica y la cadena respiratoria	19
1.3 Metabolismo de alcoholes	21
1.3.1 Oxidación periplásmica y citoplásmica de alcoholes	21
1.3.2 Clasificación de las alcohol deshidrogenasas (ADHs)	22
1.3.2.1 PQQ-ADHS de tipo I dependientes de Ln ³⁺	24
1.3.3 PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	27
1.4 Metabolismo de azúcares	35
1.4.1 Oxidación periplásmica y citoplásmica de azúcares	35
1.4.2 Vía de las pentosas fosfatadas en bacterias ácido-acéticas	37
1.4.3 La enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa 6PGD	38
1.5 Relación entre el metabolismo de alcoholes y azúcares	38
2. Hipótesis y Objetivos	42
3. Procedimientos experimentales	44
3.1 Condiciones de cultivo	44
3.1.1 Cultivo de <i>Ga. diazotrophicus</i> en laboratorio en matraces de 1.5 L	44
3.1.2 Cultivo de <i>Ga. diazotrophicus</i> en biofermentador de 350 L	44
3.1.3 Cultivo de <i>Ga. diazotrophicus</i> en laboratorio empleando iones lantánidos	45
3.2 Obtención de la fracción soluble para la purificación de <i>Gd6PGD</i>	45
3.3 Obtención de la fracción membranal para la purificación de <i>GdADH-III</i> y <i>Gd6PGD</i>	45
3.4 Purificación de <i>GdADH-III</i> por cromatografía	46
3.4.1 Columna QAE	46
3.4.2 Columna DEAE	46
3.4.3 Columna HA	47
3.4.4 Columna S-100	47
3.5 Purificación de <i>Gd6PGD</i> por cromatografía	47
3.5.1 Columna QAE	47
3.5.2 Columna HA	48
3.6 Caracterización molecular	48
3.6.1 Electroforesis nativa (PAGE)	48
3.6.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	48
3.7 Ensayos enzimáticos	49
3.7.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	49
3.7.2 Cuantificación de la actividad enzimática de <i>GdADH-III</i>	49

3.7.3 Cuantificación de la actividad enzimática de <i>Gd6PGD</i>	49
3.7.4 Estudios cinéticos de la enzima <i>Gd6PGD</i>	50
3.8 Caracterización espectroscópica	51
3.8.1 Espectroscopía de UV-Vis	51
3.8.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	51
3.9 Análisis de secuencias de aminoácidos	51
3.10 Cristalización de la proteína <i>Gd6PGD</i> y colección y procesamiento de datos.	51
3.11 Análisis filogenético.....	53
4. Resultados y discusión	54
4.1 Alcohol deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i> , <i>GdADH-III</i>	54
4.1.1 Cultivo de la bacteria <i>Ga. diazotrophicus</i>	54
4.1.2 Purificación de la proteína <i>GdADH-III</i>	55
4.1.2.1 Columna QAE	55
4.1.2.2 Columna DEAE	55
4.1.2.3 Columna HA	55
4.1.2.4 Columna S-100.....	56
4.1.3 Caracterización de la proteína <i>GdADH-III</i>	57
4.1.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	57
4.1.3.2 Espectroscopía de UV-Vis	57
4.1.3.3 Espectroscopía de EPR.....	58
4.1.4 Cristalización de <i>GdADH-III</i>	61
4.1.5 Estudio de <i>GdADH-III</i> en estado oxidado	64
4.1.6 Estudio de la reactividad de <i>GdADH-III</i> con NO	65
4.1.7 Cultivo de la bacteria <i>Ga. diazotrophicus</i> con iones lantánidos, La ³⁺ y Ce ⁴⁺	69
4.2 6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Ga. diazotrophicus</i> , <i>Gd6PGD</i>	73
4.2.1 Cultivo de la bacteria <i>Ga. diazotrophicus</i>	73
4.2.2 Purificación de la proteína <i>Gd6PGD</i>	73
4.2.2.1 Columna QAE	73
4.2.2.2 Columna Ha.....	73
4.2.3 Caracterización oligomérica de <i>Gd6PGD</i>	74
4.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	74
4.2.4 Estudios de actividad de <i>Gd6PGD</i>	75
4.2.4.1 Actividad de <i>Gd6PGD</i> en la fracción soluble y la fracción membranal.	76
4.2.4.2 Actividad específica con NAD ⁺ y NADP ⁺	76
4.2.5 Estudios cinéticos de <i>Gd6PGD</i>	77
4.2.5.1 Constantes de afinidad <i>K_m</i> para distintas 6PGDs reportadas.....	83
4.2.6 Análisis bioinformático de las secuencias de 6PGD.	85
4.2.6.1 Residuos de unión al cofactor NAD(P) ⁺	87
4.2.6.2 Residuos de unión al sustrato 6-fosfogluconato	88
4.2.7 Estructura tridimensional de la proteína <i>Gd6PGD</i>	88
4.2.7.1 Estructura del sitio de unión a NAD(P) ⁺	96

4.2.7.2 Estructura del sitio de unión al sustrato 6-fosfogluconato	98
4.2.8 Comparación de la estructura de <i>Gd6PGD</i> con otras proteínas	99
4.2.8.1 Estructura de diversas 6PGDs reportadas previamente	99
4.2.8.2 Comparación estructural entre <i>Gd6PGD</i> y <i>Oa6PGD</i>	100
4.2.8.3 Comparación de los dímeros de <i>Gd6PGD</i> y <i>Gs6PGD</i>	102
4.2.9 Papel biológico de <i>Gd6PGD</i>	103
4.2.10 Análisis filogenético de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa	105
4.2.10.1 Unión a los cofactores NAD ⁺ y NADP ⁺ en las subfamilias de 6PGDs	108
5. Conclusiones	110
Publicaciones	112
Referencias	113
Apéndice A: The structure of a novel membrane-associated 6-phosphogluconate dehydrogenase from <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (<i>Gd6PGD</i>) reveals a subfamily of short-chain 6PGDs. <i>FEBS J</i> 288. 1286.....	123
Apéndice B: Bioinorganic insights of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenases. <i>JBIC</i>	142
Apéndice C: Lista de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético de las 6PGDs. Material Suplementario del artículo publicado en <i>FEBS J</i> 288. 1286.....	169