



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio “in silico” de la PQQ-glucosa deshidrogenasa
membranal de *Gluconacetobacter diazotrophicus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DANIEL CERQUEDA GARCÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno.

Cerqueda
García
Daniel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
09825100-3

2. Datos del tutor

Dra.
Contreras
Zentella
Martha Lucinda

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Jiménez
García
Luis Felipe

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Vargas
Parada
Laura del Carmen

5. Datos del sinodal 3

Chávez
Pacheco
Juan Luis

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Sampieri
Hernández
Aristides III

6. Datos del trabajo escrito

Estudio "in silico" de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal de
Gluconacetobacter diazotrophicus
60 p.
2010

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y brindarme una educación de alto nivel.

A mi madre y mis hermanos.

A mis otros hermanos (El Pancho, el Toño (eunuco), El Kalila (Burren). Y a todos mis otros amigos (la güera y el güero, Neri, Don Poter, Gris, Lizeth, torombolo), a la banda de lucha y a todos los que compartieron algún momento en esta travesía.

Al la Dra. Martha Lucinda Contreras Zantella por sus conocimientos y la ayuda brindada y al Dr. Edgardo Escamilla por las facilidades prestadas en el laboratorio.

A Martín Sara Páez por su ayuda

A los miembros del jurado de mi examen;

- Dr. Luis Felipe Jiménez García*
- Dra. Laura del Carmen Vargas Parada*
- Dra. Martha Lucinda Contreras Zantella*
- Dr. Juan Luis Chávez Pacheco*
- M. en C. Aristides III Sampieri Hernández*

Dedicatoria

A mi madre Luisa que con su forma de vida me ha enseñado a nunca claudicar y siempre seguir adelante ya que ningún problema es más grande que uno.

...La rebeldía es la vida; la sumisión es la muerte. ¿Hay rebeldes en un pueblo? La vida está asegurada y asegurados están también el arte y la ciencia y la industria. Desde Prometeo hasta Kropotkin, los rebeldes han hecho avanzar a la humanidad.

Supremo derecho de los instantes supremos es la rebeldía. Sin ella, la humanidad andaría perdida aún en aquel lejano crepúsculo que la historia llama la edad de piedra; sin ella la inteligencia humana hace tiempo que habría naufragado en el lodo de los dogmas; sin ella, los pueblos vivirían aún de rodillas ante los príncipes de derecho divino; sin ella, esta América hermosa continuaría durmiendo bajo la protección del misterioso océano...

-Ricardo Flores Magón

...“Allí donde crece el árbol del conocimiento es donde se halla el paraíso”; tal es la opinión de las serpientes más jóvenes y de las más viejas...

...El diablo es el que tiene respecto a Dios las más vastas perspectivas; por eso se mantiene tan lejos de él. ¿No es acaso el diablo el amigo más viejo del conocimiento?

-F. Nietzsche

Índice.

1	Introducción.	1
1.1	Los microorganismos endófitos	1
1.2	La familia <i>Acetobacteraceae</i>	1
1.3	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>.	4
1.4	Fijación biológica de nitrógeno	4
1.5	Bioenergética bacteriana	6
1.6	Transportadores de electrones	7
1.7	Proteínas dependientes de pirrolo-quinolin-quinona	8
2	Antecedentes.	10
2.1	Cadena respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i>	10
2.2	Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ.	12
2.3	Importancia fisiológica de la PQQ-GDH	16
3	Objetivos.	18
4	Materiales y métodos.	19
4.1	Material biológico.	19
4.2	Obtención de la mutante M3 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PQQ-GDH⁻	19
4.3	Cultivo del material biológico.	20
4.4	Obtención de Membranas	21
4.5	Caracterización de la mutante M3 PQQ-GDH⁻	21
4.5.1	Cinética de crecimiento	21
4.5.2	Actividad de oxidasas	21
4.5.3	Actividad de deshidrogenasas	22
4.6	Análisis electroforético	22
4.6.1	Electroforesis nativa (PAGE)	22
4.6.2	Electroforesis desnaturizante (SDS PAGE)	23
4.7	Secuencias de péptidos internos	24
4.8	Cuantificación de proteína	25
4.9	Perfil hidrofóbico	25

4.10	Análisis filogenético	25
5	Resultados.	26
5.1	Purificación de la PQQ-GDH	26
5.2	Análisis de los péptidos secuenciados	28
5.3	Análisis de la secuencia de la PQQ-glucosa deshidrogenasa	29
5.3.1	Grupo prostético.	29
5.3.2	Perfil hidrofóbico.	32
5.3.3	Filogenia de la PQQ-GDH.	34
5.4	Caracterización de la mutante M3 PQQ-GDH.	36
5.4.1	Curva de crecimiento de la mutante M3.	36
5.4.2	Actividades respiratorias	37
6	Discusión.	42
6.1	Como miembro de las PQQ-GDH	42
6.2	Como proteína de membrana	43
6.3	Sobre la filogenia de la PQQ-GDH	43
6.4	Sobre su importancia fisiológica	43
6.5	Sobre la mutante M3 PQQ-GDH.	45
7	Conclusiones	47
8	Referencias	48
9	Anexo A	57

1 Introducción

1.1 Los microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos son bacterias y hongos que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas durante una parte de su ciclo de vida, y estos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular ^[66]. Especies de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas* han sido aislados frecuentemente de diversas plantas ^[75].

Se ha considerado que los organismos endófitos podrían tener algunas ventajas competitivas con respecto a las bacterias asociadas a las rizósferas, ya que la cantidad de nutrientes en el interior de la planta es mayor y el número de organismos endófitos es menor ^[44]. Además, existe una interacción más estrecha entre la bacteria y la planta hospedera, ya que la bacteria produce nutrientes y fitohormonas que estimulan el desarrollo de la planta.

1.2 La familia *Acetobacteraceae*

La familia *Acetobacteraceae* pertenece a las α -Proteobacterias, que son bacterias Gram negativas, aeróbicas estrictas y se caracterizan por llevar a cabo la fermentación oxidativa (oxidación incompleta de azúcares y alcoholes) ^[58]. Estas bacterias catalizan activamente la oxidación de etanol, D-glucosa, D-sorbitol y glicerol, por lo que tienen gran importancia comercial ya que son productoras de vinagre y precursores de la vitamina c, entre otros ([Figura 1](#)).

Introducción

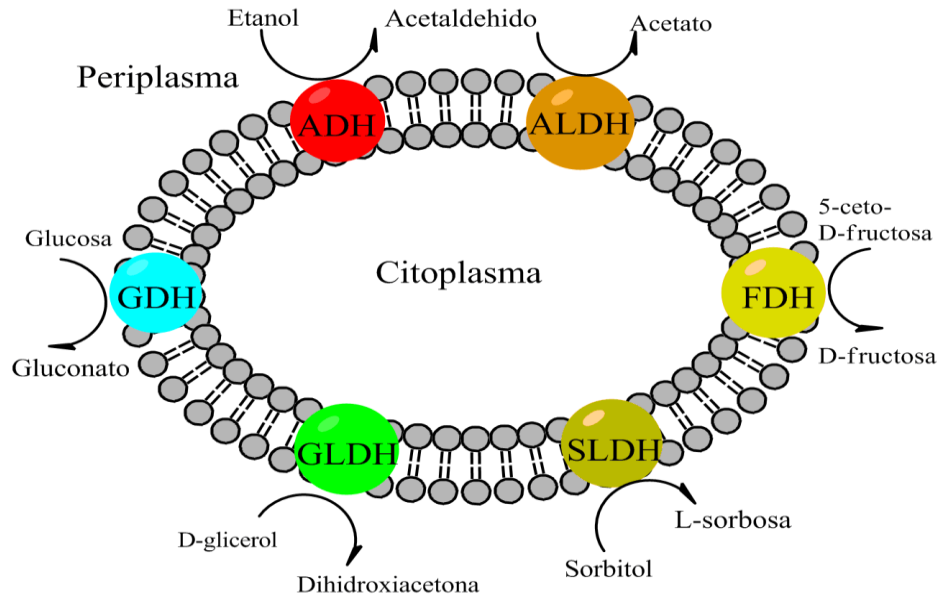


Figura 1. Sistemas de oxidación de alcoholes y azúcares presentes en la membrana citoplásmica de las bacterias acéticas y otros géneros bacterianos. La mayoría de las PQQ-deshidrogenasas tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico. GDH, glucosa deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; FDH, fructosa deshidrogenasa; GLDH, glicerol deshidrogenasa^[35].

La taxonomía de las bacterias ácido acéticas ha sufrido muchos cambios en los últimos 30 años debido al desarrollo de nuevas técnicas. Gradualmente se desarrollaron técnicas quimiotaxonómicas y moleculares por lo que se propuso la familia *Acetobacteraceae*^[19] con base en la hibridación de rRNA-DNA. A finales de los ochentas, Gillis^[37] describió una nueva especie de la familia *Acetobacteraceae* basándose en un método polifásico la cual nombró *A. diazotrophicus*. Posteriormente el primer estudio filogenético basado en el la secuencia 16S rRNA mostró que este organismo forma un grupo en la subclase alfa dentro de las Proteobacterias^[73]. Otro cambio se introdujo cuando Yamada propuso el género *Gluconacetobacter* en con base en la secuencia parcial de gen del 16S rRNA y el tipo de ubiquinona^[84], debido a esto las especies; *A. xilinus*, *A. liquefaciens*, *A. hansenii*, *A. diazotrophicus* y *A. europaeus* se transfirieron al género *Gluconacetobacter*.

Hasta el momento la familia *Acetobacteraceae* cuenta con 45 especies en 10 géneros los cuales son: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*,

Introducción

Gluconobacter, *Granulibacter*, *Kozakia*, *Neosaia*, *Saccharibacter* y *Swaminathania* (tabla 1).

En la familia *Acetobacteraceae* se encuentran especies capaces de fijar nitrógeno atmosférico (*Acetobacter nitrogenifigens*, *Acetobacter peroxydans*, *Gluconacetobacter johannae*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter kombuchae* y *Swaminathania salitolerans*)^[72]. *Gluconacetobacter diazotrophicus* se ha reportado como modelo de bacteria endófito, considerando algunas de sus características importantes: esta bacteria produce auxinas, como el ácido indol acético^[36,10] así como citocinas^[45]; además, tiene la capacidad de fijar nitrógeno^[13], secretando el 50% del nitrógeno fijado^[15].

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Producción de ácido acético	+	+	+	+	-	+	+	V	+	V
Oxidación de:										
Acetato a CO ₂ y H ₂ O	-	+	+	+	P	P	P	-	-	P
Lactato a CO ₂ y H ₂ O	-	+	+	V	P	P	P	P	-	+
Producción de ácido ceto-D-gluconico:										
Acido 2,5-diceto-D-gluconico	V	-	V	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd
Acido 5-ceto-D-gluconico	+	V	V	-	+	+	Nd	+	+	Nd
Acido 2-ceto-D-gluconico	+	V	V	-	+	+	Nd	+	+	Nd
Producción de Y-pironas de:										
D-glucosa	V	-	V	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd
D-fructosa	+	-	-	Nd	V	V	Nd	Nd	Nd	Nd
Producción de ácido de:										
L-arabinosa	+	V	V	+	+	+	+	+	+	Nd
D-arabinosa	+	-	-	V	+	V	Nd	-	P	Nd
D-xilosa	+	V	V	+	+	+	V	+	+	-
L-ramnosa	-	-	-	-	V	-	-	-	P	Nd
D-glucosa	+	V	+	+	+	+	+	+	+	P
D-galactosa	+	V	+	+	+	+	+	+	+	Nd
D-manosa	+	V	V	+	+	+	+	+	+	Nd
D-fructosa	+	-	+	-	+	-	V	V	+	Nd
L-sorbosa	+	-	V	Nd	+	-	Nd	-	-	Nd
Melobiosa	+	-	-	V	+	+	Nd	+	+	Nd
Sacarosa	+	-	-	-	+	V	Nd	+	+	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	+	Nd	-	+	Nd
D-manitol	+	-	V	-	V	-	-	+	P	-
D-sorbitol	+	-	-	-	V	-	+	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	V	-	V	-	P	-
Glicerol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	V
Etanol	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Desarrollo en presencia de 30% de glucosa	-	v	V	+	+	-	Nd	+	+	Nd
Tipo de ubiquinona	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Nd

Tabla 1. Características diferenciales de los géneros de la familia *Acetobacteraceae*. Los géneros son listados como: 1, *Gluconobacter*. 2, *Acetobacter*. 3, *Gluconacetobacter*. 4, *Acidomonas*. 5, *Asaia*. 6, *Kozakia*. 7, *Swaminathania*. 8, *Saccharibacter*. 9, *Neosaia*. 10, *Granulibacter*. Los símbolos indican; +: positivo; -: negativo; P: Poca actividad; V: variable; Nd: no determinado^[14].

Introducción

1.3 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Ga. diazotrophicus fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner^[13], a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cultivadas en Brasil. La bacteria recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans*^[13]; poco tiempo después, se le cambió el nombre a *Acetobacter nitrocaptans*. Posteriormente, basándose en experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA, en la presencia de flagelación peritrica y en la capacidad de oxidar acetato y lactato hasta CO₂ y agua, recibió el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus*^[37].

Debido al esquema propuesto posteriormente por Yamada y colaboradores^[83] para la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*, este fijador de nitrógeno es referido actualmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

1.4 Fijación biológica de Nitrógeno

En la fijación atmosférica del nitrógeno, la energía lumínica rompe la molécula y rinde nitrógeno atómico, que se combina con el oxígeno del aire formando óxidos de nitrógeno. Estos se disuelven en el agua de lluvia dando nitratos que son llevados a la tierra. La fijación atmosférica de N₂ contribuye aproximadamente con el 5-8% del total del nitrógeno fijado anualmente.

En la fijación industrial, empleando elevadas presiones, a una temperatura de 600°C y con el uso de catalizadores, el N₂ y el hidrógeno gaseoso (H₂) se combinan para formar amoníaco (NH₃). El amoníaco puede ser usado directamente para fertilizar, pero su mayoría es procesada transformándolo en urea ((NH₂)₂CO) y/o nitrato de amonio (NH₄NO₃). Esta forma de fijación contribuye en un 25% del total del nitrógeno fijado anualmente.

Introducción

El porcentaje restante del nitrógeno fijado (aproximadamente un 65%), es el resultado de la **Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)**, que puede ser considerada como "la habilidad que poseen algunas especies de microorganismos (bacterias y *Archaea*) de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio". Esta reducción del nitrógeno es debida al complejo enzimático de la nitrogenasa. El sistema de la nitrogenasa transfiere un total de 6[H] al N₂ y libera 2[H] como hidrógeno molecular (H₂). El amoníaco es el primer producto identificable de esta reacción enzimática:

Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden ser aerobios, anaerobios, Gram (+), Gram (-), heterótrofos, autótrofos o fotótrofos, y su única característica en común es la fijación biológica de nitrógeno.

La FBN requiere de una elevada cantidad de energía. Además de la energía necesaria en forma de equivalentes reductores, el complejo de la nitrogenasa requiere de otra fuente de energía química, la cual es obtenida de la hidrólisis del ATP (16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂ reducida).

Todos los complejos de la nitrogenasa conocidos a la fecha, son inhibidos por la presencia del oxígeno molecular ^[43], por lo que muchos microorganismos solo llevan a cabo la fijación de nitrógeno en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia. Aquellos organismos capaces de fijar nitrógeno aeróbicamente deben proteger a la nitrogenasa de su inactivación, en respuesta a la presencia de oxígeno en el medio ^[60]. Como resultado de estudios sobre la capacidad que tiene *Azotobacter chroococcum* para adaptarse a diferentes concentraciones de oxígeno, se postuló el concepto de "Protección Respiratoria" ^[17]. La "Protección Respiratoria" se define como el mecanismo mediante el cual se protege a la nitrogenasa del efecto inactivador del oxígeno y se permite por tanto la actividad diazótrofa, aún a concentraciones altas de oxígeno. Este mecanismo de protección es el resultado de la alta tasa respiratoria de la bacteria, que consume

Introducción

el oxígeno a nivel de la membrana y así, abate su concentración en el interior de la célula. Además, la elevada actividad respiratoria acoplada, provee la energía suficiente para sostener el alto costo energético de la fijación de nitrógeno: de 16 a 18 ATP's/ mol de N₂ fijado ^[69,13]. *Ga. diazotrophicus* que es un organismo aerobio estricto, puede realizar la fijación de nitrógeno sin ningún problema en condiciones aeróbicas a pH's tan bajos como 3.0 ^[74], llevando al cabo la Protección Respiratoria de la nitrogenasa.

1.5 Bioenergética bacteriana

La célula puede obtener la mayoría de las moléculas pequeñas que necesita del exterior o sintetizarlas a partir de moléculas más simples. No obstante, las macromoléculas son siempre sintetizadas en el interior de la célula.

La síntesis en la célula requiere la utilización de energía química, la cual puede ser obtenida entre otros caminos, por reacciones de oxidación-reducción. En las reacciones bioquímicas las oxidaciones y reducciones implican frecuentemente la transferencia no solo de electrones, sino también de átomos completos de hidrógeno.

En la respiración aeróbica, proceso que implica la oxidación hasta CO₂ de las moléculas combustibles, vía la glucólisis y el ciclo de Krebs y en el que se utiliza O₂ como aceptor final de electrones; estos procesos permiten la mayor liberación de energía debido a la gran diferencia de potencial redox entre los donadores primarios de electrones y el oxígeno, la energía liberada se acopla la síntesis de ATP.

Las bacterias ácido acéticas no realizan glucólisis, debido a que carecen de fosfofructocinasas; en cambio, llevan al cabo la oxidación incompleta (fermentación oxidativa) de un amplio espectro de azúcares, alcoholes y polioles ^[58] y excretan los aldehídos y ácidos orgánicos formados ya sea transitoriamente o

Introducción

como productos finales no utilizables; este proceso está íntimamente ligado a una cadena respiratoria corta que permite la rápida oxidación de sustratos llevada a cabo por diversas deshidrogenasas membranales dependientes de PQQ.

1.6 Transportadores de electrones.

En las células, la transferencia de electrones en reacciones de oxidación-reducción, se da través de intermediarios conocidos como “transportadores de electrones”. Cuando se usan tales transportadores, el donador inicial es el donador primario de electrones y el aceptor final es el aceptor terminal de electrones.

Los transportadores de electrones intermediarios pueden dividirse en dos clases generales: aquellos que difunden libremente y los que están firmemente enlazados a enzimas de la membrana citoplasmática. Aquellos que difunden libremente, incluyen las coenzimas nicotinamida adenin dinucleotido (NAD⁺/NADH) y NAD-fosfato (NADP⁺/NADPH); estas moléculas transfieren dos átomos de hidrógeno y dos electrones al siguiente transportador de la cadena (deshidrogenación).

Los transportadores pueden estar asociados a membranas. Las funciones básicas de estos sistemas son las de aceptar electrones de un donador y transferirlos a un aceptor, conservando algo de la energía liberada durante esta transferencia para la síntesis de ATP.

Existen distintas enzimas de oxidación-reducción implicadas en el transporte de electrones: NADH deshidrogenasas, transportadores que contienen riboflavina y flavin mononucleotido (FMN) o flavin adenin dinucleotido (FAD), que transfieren átomos de hidrógeno a través de sus equivalentes reducidos; proteínas con hierro-azufre y citocromos, que son proteínas que contienen un anillo porfirínico o hemo. Además, existen los transportadores no proteicos, como las quinonas hidrofóbicas; las quinonas pueden difundir libremente a través de la membrana^[32]

1.7 Proteínas dependientes de pirrolo-quinolin-quinona.

No se tenía conocimiento de que las quinonas pudieran funcionar como cofactores hasta que se caracterizó la enzima metanol deshidrogenasa de las bacterias metilotróficas. Los primeros estudios realizados mostraron que esta enzima contenía un grupo poco común y se le confundió con una pteridina. Recientemente se han descrito variados ejemplos de enzimas bacterianas que contienen quinonas y se les ha llamado “quinoproteínas o quinoenzimas” [26,35].

Las quinoproteínas constituyen un grupo muy diverso y heterogéneo de proteínas, que difieren de aquellas dependientes de nicotin y flavin nucleótidos [65]. Las quinoproteínas utilizan como cofactor o-quinona para degradar alcoholes, azúcares o aminoácidos. El grupo de las quinoproteínas dependientes de PQQ, incluye a múltiples enzimas con actividad de deshidrogenasa, algunas oxidasas y también a ciertas descarboxilasas bacterianas [59].

El grupo PQQ se obtuvo por primera vez desnaturalizando la enzima metanol deshidrogenasa; Salisbury y colaboradores [70], aislaron un derivado y propusieron una estructura para la coenzima. Basados en su nombre químico 2, 7,9- tricarboxi-1H-pirrolo (2, 3, f) quinolina-4,5-diona, el nombre sistemático pirrolo-quinolina quinona (PQQ), fue propuesto por Duine y colaboradores [30], en lugar del nombre trivial metoxantina el cual había sido sugerido en un principio [70]. Después de ser reportado como grupo prostético de la enzima metanol deshidrogenasa, también se reportó que algunas otras deshidrogenasas poseían este cofactor. En 1964 Hauge [42] demostró que la glucosa deshidrogenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* contenía un cofactor desconocido, que posteriormente se identificó como PQQ [27]. Este descubrimiento planteó la existencia de una tercera clase de deshidrogenasas, las deshidrogenasas PQQ-dependientes, pertenecientes a un grupo de proteínas que a partir de ese momento se comenzaron a denominar Quinoproteínas. Los grupos prostéticos que estas enzimas presentan, son derivados de o-quinonas y se ha determinado que pueden ser PQQ, LTQ (lisil tirosil quinona), TPQ (topaquinona) o TTQ (triptofil triptofanquinona) [25].

Introducción

Todas las deshidrogenasas dependientes de PQQ parecen ser membranales siendo activas en el espacio periplásmico ^[28], exceptuando la glucosa deshidrogenasa soluble, PQQ-dependiente de *Acinetobacter calcoaceticus* ^[29].

Las bacterias acéticas y otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* y *Arthrobacter*, poseen un conjunto de PQQ-deshidrogenasas que oxidan una amplia variedad de alcoholes y azúcares ^[11,6]. Muchas de ellas, se encuentran asociadas a la membrana citoplásmica y poseen su sitio catalítico orientado hacia el lado periplásmico, lo que les permite oxidar directamente el sustrato. Estas enzimas son importantes debido a que participan en la oxidación de sustratos desde el exterior celular, pueden estar acopladas a la cadena respiratoria y por lo tanto a la producción de ATP ^[7,58].

Muchas bacterias pueden sintetizar grandes cantidades de PQQ y excretarlo al medio. La cantidad de PQQ excretado puede variar entre 1 µg/ml a 1 mg/ml, lo cual depende de la composición del medio de crecimiento; se sabe que la tirosina y el ácido glutámico son los precursores del grupo PQQ ^[35].

2 Antecedentes

2.1 Cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*.

En las bacterias, los sistemas respiratorios son un conjunto de flavoproteínas Fe-S, quinoproteínas, quinohemoproteínas, quinonas liposolubles y citocromos organizados de forma asimétrica en la membrana, formando una cadena que transporta electrones desde proteínas con un potencial redox negativo, hacia uno positivo, en una serie de reacciones redox hacia un aceptor final, generando un gradiente protón motriz transmembranal que conduce a la formación de ATP por un complejo F_1F_0 de la ATPsintetasa ^[32] o empleado para el transporte activo secundario.

Las oxidasas terminales participan en la reducción del oxígeno, aceptor final de la cadena respiratoria de bacterias aeróbicas ^[58]. Hay dos grupos en los cuales se dividen las oxidasas terminales, las quinol oxidasas que reciben electrones desde el quinol (quinona reducida) y las citocromos *c* oxidasas, que reciben los electrones desde el quinol a través del complejo III mitocondrial y el citocromo *c* soluble como donador directo. Los sistemas bacterianos pueden presentar dos o más oxidasas terminales con diferente afinidad al oxígeno, permitiendo la adaptación a un intervalo amplio de concentraciones de oxígeno presentes en el medio ^[58].

La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* está compuesta por diversas deshidrogenasas membranales que donan sus electrones directamente a la UQ_{10} membranal (figura 2) ^[34], aunque también presenta UQ_9 en muy baja concentración ^[39]. Algunas deshidrogenasas presentes en *Ga. diazotrophicus* tienen su sitio activo orientado hacia el citoplasma: la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa. Mientras que otras tienen el sitio activo dirigido hacia el espacio periplásmico: la PQQ glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la PQQ

Antecedentes

alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la PQQ aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH), entre otras [34].

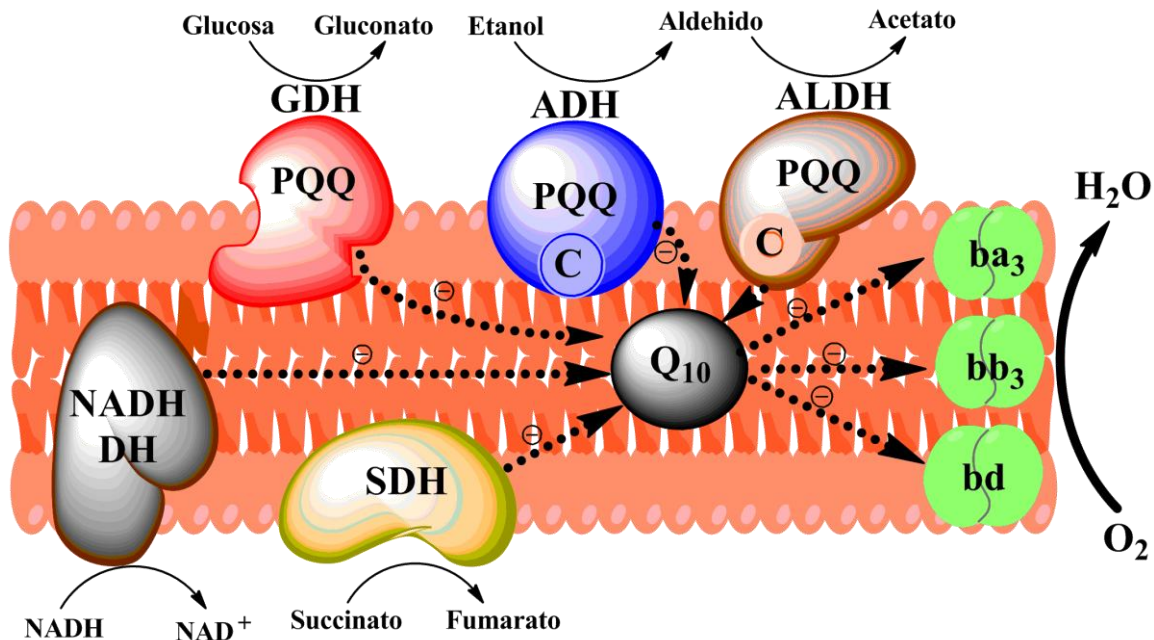


Figura 2. Composición de la cadena respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Las PQQ deshidrogenasas para glucosa (PQQ-GDH), etanol (PQQ-ADH), aldehído (PQQ-ALDH) y las deshidrogenasas membranales para NADH (NADH-DH) y succinato (Succinato-DH) transfieren electrones a la ubiquinona 10 (Q_{10}), quien a su vez, transfiere los electrones a las oxidasas terminales.

Ga. diazotrophicus únicamente posee quinol oxidasas terminales, cuya expresión está regulada por la concentración de amonio en el medio de cultivo [34]. Cuando la concentración de amonio es baja, la bacteria fija nitrógeno atmosférico y expresa dos oxidasas terminales: citocromo ba_3 resistente a cianuro y citocromo bb_3 sensible a cianuro [39]; en condiciones de alta concentración de amonio (sin fijación de nitrógeno) la oxidasa ba_3 es sustituida por una oxidasa bd .

Las deshidrogenasas tienen un papel importante en la fijación de nitrógeno, debido a que la alta tasa respiratoria promovida por ellas, consume el O_2 del

Antecedentes

medio, disminuyendo su concentración en el citoplasma y evitando la inhibición irreversible de la nitrogenasa ^[34].

Resultados obtenidos por el grupo del Dr. Escamilla sugieren que la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal (PQQ-GDHm), es una enzima constitutiva y un componente del sistema respiratorio clave en la diazotrofia aeróbica de *Ga. diazotrophicus*. *Ga. diazotrophicus* es una bacteria endófito de la caña de azúcar y crece en medios con altas concentraciones de sacarosa, por lo que se hace muy importante conocer y caracterizar los procesos de degradación de la glucosa y las enzimas o complejos enzimáticos que intervienen en ella.

2.2 Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ.

Los primeros estudios del metabolismo de la glucosa en bacterias ácido acéticas indicaron que se metabolizaba principalmente por la vía de las fosfato-pentosas ^[18,67], ya que en *Ga. diazotrophicus* las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructoquinasa y 1-fosfofructoquinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato aldolasa) no han sido detectadas ^[3,9]. Se ha reportado que la oxidación directa de la glucosa en el espacio periplásmico es la vía más importante en el metabolismo de la glucosa (figura 3) ^[9,74].

La presencia de una glucosa deshidrogenasa pirrolo-quinolona quinona (PQQ) dependiente, responsable de la conversión periplásmica de glucosa a gluconato, fue reportada por Attwood y colaboradores ^[9] y está ligada a la cadena transportadora de electrones al transferir los electrones producto de la oxidación de la glucosa a la quinona ^[57].

Antecedentes

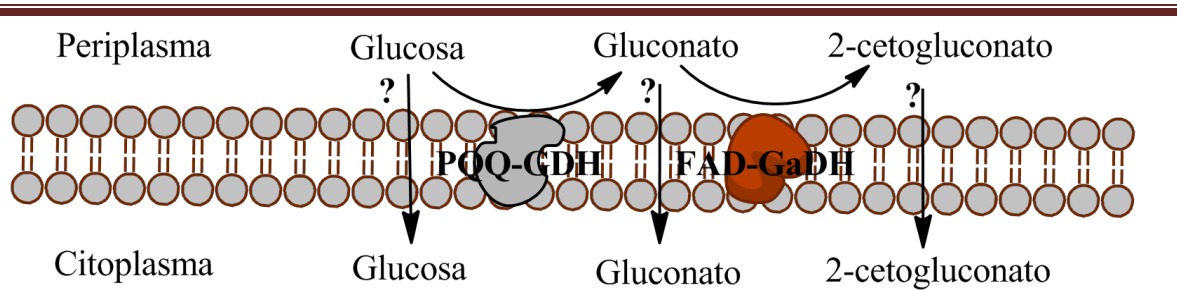


Figura 3. Ruta de oxidación directa de la glucosa en *Ga. diazotrophicus*.

Posteriormente fueron identificadas dos tipos de glucosas deshidrogenasa dependiente de PQQ: una soluble (sGDH) y una membranal (mGDH) en *Acinetobacter calcoaceticus* [27], la mGDH se ha encontrado en otras bacterias como *Pseudomonas sp.* [29], *Gluconobacter sp.* [4], *Klebsiella sp.* [63]; *Rhizobium sp.* [11], mostrando estar extensamente distribuida entre las bacterias Gram (-). Las dos enzimas no muestran homología en sus secuencias ni similaridad en sus características cinéticas e inmunológicas (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de la PQQ-GDH soluble y membranal

	GDH membranal ^a [71]	GDH soluble ^b [76,79]
Tamaño	Monómero 80-86 kDa	2 monómeros 50-57 kDa
Estructura	Superbarril con 8 propelas de 4 beta plegadas	Superbarril con 6 propelas de 4 beta plegadas
pI	7.0	9.5
pH óptimo	6	7
Km	0.63mM	20 mM
Vmax	24.8 ^c	4610 ^c
Sustratos oxidables	Glucosa, monosacáridos,	Glucosa y disacáridos
Aceptores de electrones	UQ.	Desconocido
Termoestabilidad	Inactivación térmica a 55°C en 20 min.	Inactivación térmica a 40°C en 25 min.

^a: *Ga. diazotrophicus*, ^b: *A. calcoaceticus*, ^c μ mol de DCPIP reducidos por min. mg.

La mGDH puede ser sintetizada como holoenzima (forma activa) o como apoenzima (con requerimiento externo de PQQ) y se ha reportado como una enzima monomérica de aproximadamente 86 KDa ligada fuertemente a la membrana por cinco segmentos transmembranales y un sitio de unión a PQQ muy

Antecedentes

conservado en el dominio del carboxilo terminal. Su sitio catalítico ve hacia el periplasma ^[82]. En base a su tolerancia al EDTA, las PQQ-GDH's se subdividen en dos tipos; sensibles a EDTA en las cuales el grupo PQQ puede ser fácilmente removido con EDTA (tipo I) y las tolerantes a EDTA en las cuales el grupo PQQ no puede ser removido con EDTA (tipo II) ^[23].

Se ha propuesto que la mGDH tiene una estructura de superbaril homológamente a la MDH ^[16] compuesta por ocho motivos W (figura 4), cada uno compuesto por cuatro hebras β -plegadas; el motivo W1 interactúa con el W8 (que cuenta con una parte formada por el dominio del amino terminal) para formar la proteína en forma de superbaril.

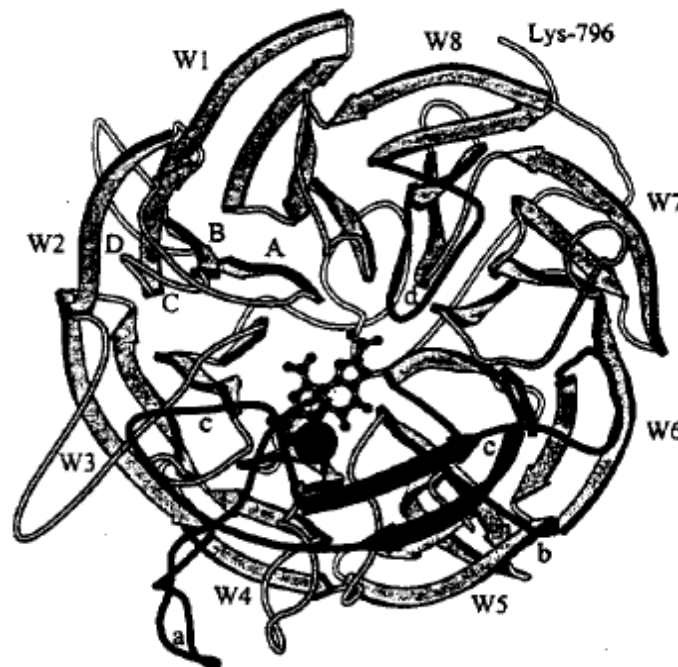


Figura 4. Representación esquemática de la estructura secundaria de la PQQ-GDH en la cual se muestran los ocho motivos W (en forma de propelas), cada uno compuesto de cuatro hebras β -plegadas (etiquetadas como A, B, C y D). También se representa el PQQ (esferas unidas con varas) y el ion metálico (esfera) ^[16].

La mGDH posee una baja afinidad por la glucosa (K_m del orden de mM) y una gran especificidad por el sustrato, convirtiendo aldohexosas y aldopentosas en sus correspondientes aldonolactonas ^[5,23], además de requerir iones de Ca^{2+} o Mg^{2+}

Antecedentes

para su actividad. Algunos compuestos artificiales como metasulfato de fenazina (PMS) ^[64], 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) ^[41], Wurster's Blue (WB) ^[23] y polímeros electro conductores ^[85] actúan como aceptores de electrones de esta enzima.

La PQQ-GDHm tiene al parecer un mecanismo complejo por el cual transfiere electrones a la ubiquinona; se han encontrado dos sitios de unión a ubiquinona ^[61]; uno localizado cerca del PQQ, el cual lleva una ubiquinona ligada (quinona endógena) que ha mostrado ser importante en la actividad catalítica de la enzima. El segundo sitio de unión a ubiquinona transfiere electrones a la poza membranal de ubiquinona (figura 5)

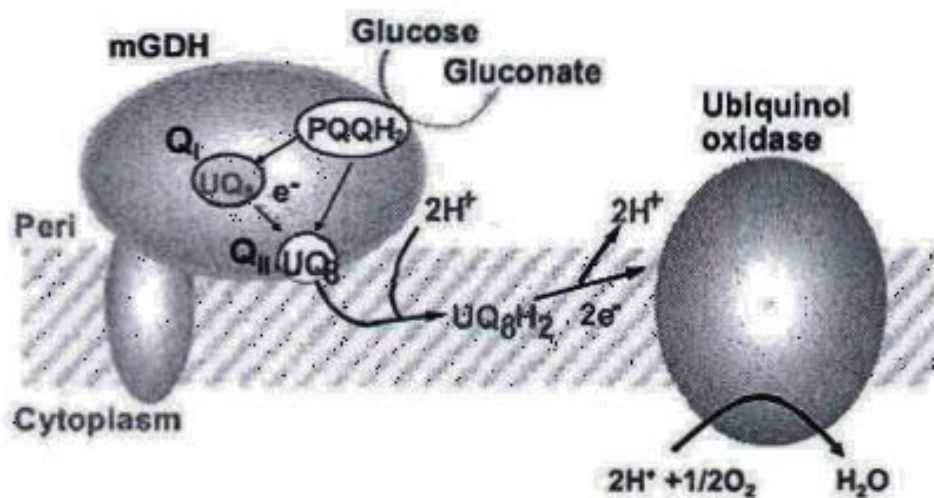


Figura 5. Modelo de la topología de la PQQ-GDH membranal (mGDH) de *E. coli* y su mecanismo de transferencia de electrones a la ubiquinol oxidasa. El modelo muestra dos sitios de unión a la ubiquinona (UQ_8); El Q_I en el cual tiene una UQ_8 ligada y el Q_{II} que transfiere electrones a la poza de UQ_8 . Los electrones del PQQ reducido se transfieren a la UQ_8 ligada y luego a la poza de UQ_8 ó directamente a la poza de UQ_8 ^[61].

2.3 Importancia fisiológica de la PQQ-GDH

La glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH) junto con una gluconato deshidrogenasa membranal (GaDH) constituyen la ruta de oxidación directa de la glucosa en *Ga. diazotrophicus* [9].

El gluconato puede ser metabolizado posteriormente por la vía de las pentosas fosfato (Figura 6) o la vía de Entner-Doudoroff [49]. En *Gluconobacter oxydans*, la glucosa puede ser fosforilada por una hexoquinasa a glucosa-6-fosfato y oxidada a 6-fosfogluconato [21].

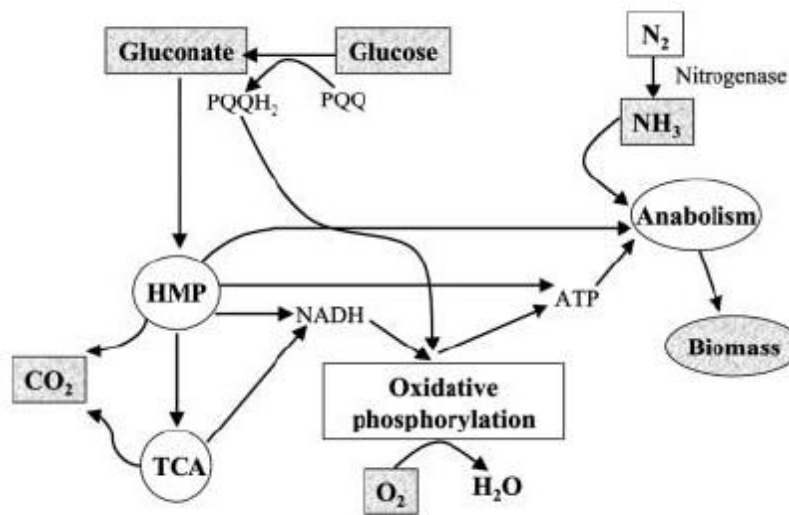


Figura 6. Modelo del metabolismo del carbono y desarrollo de *Ga. diazotrophicus*. Vía de las pentosas fosfato (HMP), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) [52].

En *Ga. diazotrophicus*, también se expresa simultáneamente una GDH dependiente de NAD⁺ como ruta intracelular de la oxidación de glucosa.

La PQQ-GDHm se expresa constitutivamente, [52] en todas las condiciones y fases del cultivo y está regulada por un eficiente uso de la fuente de carbono en condiciones en las que la demanda energética es alta; este tipo de regulación se observa en enzimas envueltas en el secuestro de sustrato o metabolismo de sobreflujo parecido al de *G. oxydans* que acidifica rápidamente el medio confiriéndole una ventaja competitiva frente a otras bacterias [21].

Antecedentes

La NAD-GDH también parece ser constitutiva pero se registra un aumento en su actividad en respuesta al exceso de la fuente de carbono. El gluconato es metabolizado posteriormente por la 2-cetogluconato reductasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa ^[52]. Se ha observado que el desarrollo de la biomasa depende de la fuente de carbono (glucosa o gluconato) y de nitrógeno (N_2 ó amonio), principalmente en condiciones de fijación de nitrógeno y gluconato como fuente de carbono, ya que se presenta un menor rendimiento en la producción de biomasa debido a que el gluconato es una forma más oxidada que la glucosa y la actividad de la PQQ-GDH no se presenta (por lo tanto hay un menor porcentaje de fosforilación oxidativa). La glucosa como fuente de carbono en condiciones de fijación de nitrógeno es una vía más eficiente para la producción de biomasa y la biomasa es sintetizada del gluconato y del amonio irrespectivamente de la fuente de carbono y nitrógeno ^[53].

Por otro lado la importancia fisiológica de la PQQ-GDH se presenta no solo en el poder reductor del grupo PQQ ya que además se ha reportado una alta eficiencia energética de la cadena respiratoria (incremento en los porcentajes de fosforilación oxidativa), y se ha sugerido que *Ga. diazotrophicus* es capaz de desarrollar mecanismos que llevan al mejoramiento en la producción de energía en presencia de aldosas y bajo fijación de nitrógeno las cuales son condiciones naturales en el interior de las plantas hospederas ^[51].

Objetivos

3 Objetivos.

Objetivos generales.

- ⊙ Analizar a la PQQ-GDH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en relación con dominios estructurales determinados por su secuencia de aminoácidos.
- ⊙ Investigar sobre la importancia de la PQQ- GDH de *Ga. diazotrophicus* en cuanto a la fijación de nitrógeno y el metabolismo de la glucosa

Objetivos específicos

- ⊙ Purificar a la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*
- ⊙ Analizar “in silico” la secuencia de la PQQ-GDH purificada, en búsqueda de dominios característicos
- ⊙ Proponer con base en el perfil hidrofóbico la topología membranal de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*
- ⊙ Caracterizar en relación a su cinética de crecimiento y actividades respiratorias a una mutante de *Ga. diazotrophicus* PQQ-GDH

4 Materiales y métodos.

4.1 Material biológico.

Cepa silvestre de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

Cepa M3 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PQQ-GDH⁻

4.2 Obtención de la mutante M3 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PQQ-GDH⁻

La cepa mutante M3 fue obtenida por la estudiante de doctorado Marcela Zuleta (2004), de acuerdo al siguiente protocolo:

Al momento en que la mutante fue obtenida, no se había liberado la secuencia genómica de *Ga. diazotrophicus*, por lo que el diseño de oligonucleótidos se basó en la secuencia reportada para la PQQ-Glucosa deshidrogenasa de *Ga. europaeus*, utilizando el uso de codón de *Ga. diazotrophicus*.

Por medio de la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), se obtuvo un fragmento de DNA de 1050 pb, correspondiente al gen que codifica para la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*.

El fragmento obtenido se introdujo en el vector pUC19, usando los sitios EcoRI-HindIII, que se encuentran tanto entre los sitios únicos de clonación del vector, como en el fragmento obtenido. pUC 19 es un vector de alto número de copias que contiene el gen *bla* que codifica para la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. El vector conteniendo el fragmento se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α crecidas en medio LB-Ap (200 µg/ml).

A partir de una de las clonas seleccionadas por su resistencia a ampicilina, se liberó el vector conteniendo el fragmento de 1050 pb por digestión con EcoRI-

Materiales y métodos

HindIII. El fragmento es interrumpido con un cassette de resistencia a kanamicina, obtenido a partir del plásmido sBSL99 (Ω Km) en el sitio PstI, obteniéndose el plásmido pUC1050:: Ω Km99.

Insertando el plásmido pUC1050:: Ω Km99 en la cepa silvestre de *Ga. diazotrophicus* y por recombinación homóloga, se obtuvo la mutante de *Ga. diazotrophicus* GDH⁻. La inserción del vector se hizo por electroporación en células electrocompetentes de *Ga. diazotrophicus* w.t que se prepararon mediante el protocolo reportado por Arrieta y colaboradores [8].

4.3 Cultivo del material biológico.

Ga. diazotrophicus PAL5 fue crecida en medio LGI modificado [34] conteniendo sacarosa al 5% y sales: K₂HPO₄ (5g), Na₂HPO₄ (4g), MgCl₂ (0.2g), CaCl₂ (0.02g), FeCl₃ (0.01g), citrato de sodio industrial (5g), para un litro. El pH se ajusta a 5.5.

Ga. diazotrophicus fue cultivada en un fermentador New Brunswick Scientific (Bioflo 2000) de 80 l de capacidad con 60 l de volumen de trabajo, a 30 °C, una aeración de 60 l de aire/min y agitado a 120 rpm. El fermentador fue inoculado con 4 l de un cultivo activo de la bacteria crecida durante 24 h en el mismo medio y condiciones. Después de 36 h, el cultivo fue recuperado por centrifugación, utilizando una centrífuga de flujo continuo marca Sharples Pemwalt (tipo CLT1, Tlalnepantla, México).

La mutante M3 de *Ga. diazotrophicus* fue cultivada en medio LGI ó en medio LGI con 0.2% de glicerol (v/v), adicionados de kanamicina (120 μ g/ml); para el cultivo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio ó de 2L conteniendo 1L de medio. Las células fueron crecidas durante 4 días a 30 °C y una agitación de 250 rpm y cosechadas por centrifugación a 7000 rpm por 30 min.

Materiales y métodos

El paquete celular de ambas cepas, fue lavado con un amortiguador de fosfatos 50mM adicionado de 1 mM de CaCl_2 y 1 mM MgCl_2 , pH 6.0. Las células fueron usadas inmediatamente o almacenadas a -79°C para su uso posterior.

4.4 Obtención de membranas

Las membranas de ambas cepas se obtuvieron por ruptura mecánica del paquete celular, utilizando perlas de vidrio de $0.150\ \mu\text{m}$ en una licuadora BEAD BEATER (Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma USA) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.0 adicionado de los inhibidores de proteasas PMSF ($14.72\ \mu\text{g/ml}$) y 1 tableta de CompleteTM por cada 50 ml (Roche). La preparación fue centrifugada a 7000 rpm por 10 min para eliminar los restos celulares y las membranas fueron aisladas a partir del sobrenadante por centrifugación a 30 000 rpm durante 30 min. Todo el proceso se efectúa a 4°C . La preparación de membranas fue lavada dos veces con amortiguador de fosfatos y almacenada hasta ser utilizada a -79°C .

4.5 Caracterización de la mutante M3 PQQ-GDH⁻

4.5.1 Cinética de crecimiento

Para determinar la curva de crecimiento de la mutante M3 se tomaron muestras del cultivo cada hora; a cada muestra se le midió el pH y la densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC.

4.5.2 Actividad de oxidasas

Las actividades de oxidasas fueron determinadas polarográficamente a $30\ ^\circ\text{C}$, empleando un oxímetro provisto de un electrodo tipo Clark (Yellow Springs, Instruments). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 2 ml conteniendo: amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6.0 para glucosa, etanol, y acetaldehído oxidasa, ó pH 7.4 para NADH oxidasa) y suspensión membranal (0.1 mg de proteína) ó suspensión celular (5 mg de peso húmedo). La reacción se

Materiales y métodos

inició por la adición del sustrato: glucosa, etanol, acetaldehído, NADH y glicerol a una concentración final de 10mM

4.5.3 Actividad de deshidrogenasas

La actividad de deshidrogenasa fue ensayada utilizando el método de DCPIP reductasa, en el cual se emplea PMS y DCPIP como mediador y aceptor de electrones respectivamente ^(1,2); la mezcla de reacción contenía 0.08 mM de DCPIP, 0.6 mM de PMS, 1.5 mM de KCN y 0.03 mg de proteína en un volumen total de 1ml de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6.0 para glucosa, etanol, acetaldehído y glicerol ó a pH 7.4 para NADH). La reacción fue iniciada por la adición del sustrato a 1 mM final. Se determinó el cambio de absorbancia a 600 nm durante 1 min, a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC. La actividad se calcula utilizando un coeficiente de extinción molar de 21 mM cm⁻¹ para el DCPIP reducido.

4.6 Análisis electroforético

4.6.1 *Electroforesis nativa (PAGE)*.

La pureza de la preparación conteniendo a la PQQ-GDH purificada se analizó por electroforesis nativa discontinua en un gel de poliacrilamida. El gel resolvidor estaba compuesto por 7.5 % de acrilamida, 8.0 % de glicerol, 0.1 % de Triton X-100 y 375 mM de Tris-HCl, pH 8.9; la solución se polimerizó utilizando 10mg de persulfato de amonio y 0.1 % de N.N.N'.N',-Tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador contenía 4% de acrilamida, 8% de glicerol, 0.1% de Triton X-100 y 125 mM de tris-HCl; la solución se polimerizó utilizando 10 mg de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. 30 µg de la PQQ-GDH purificada se diluyeron en amortiguador de carga compuesto por 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 15 % de glicerol y 0.1 % de Triton X-100. El amortiguador de corrida estaba compuesto por

Materiales y métodos

0.33% de Tris y 1.44 % de glicina. Como marcador de peso molecular se utilizó el Precision Plus Standard™ de BIO-RAD.

La electroforesis se realizó a una corriente constante de 25 mA a 4 °C. Una parte del gel fue teñido con azul de Coomassie R250 al 0.05% en solución de metanol (25% v/v), ácido acético (10% v/v) y glicerol (5%) en agua destilada; después de la tinción el gel fue lavado con la misma solución pero sin Coomassie R250. A la otra parte del gel se le realizó una zimografía para actividad de PQQ-GDH. Para la zimografía se utilizó nitro azul de tetrazolium (NTB) y metasulfato de fenazina (PMS) como aceptor e intermediario de electrones respectivamente, utilizando glucosa como sustrato [2]. El gel fue sumergido en 200 ml de amortiguador de McIlvane (fosfatos y citratos) a pH 6.0 conteniendo 28 mg de PMS y 8 mg de NTB. Se incubó en ausencia de luz por 20 minutos a 4 °C en agitación constante. La reacción se inició por la adición de 100 mM de glucosa. Después de la aparición de bandas azules (reacción positiva), la reacción fue detenida por la adición de ácido acético al 7%.

4.6.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).

La estructura oligomérica de la PQQ-GDH purificada fue analizada en gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando la técnica de Laemli modificada [20]. El gel resolvente se preparó a una concentración final de 10% de acrilamida, 8.0% de glicerol, 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 375 mM de Tris-HCl a pH 8.9; la solución fue polimerizada por la adición de 10 mg de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. El gel concentrador contenía 4% de acrilamida, 8% de glicerol, 1% de SDS y 125 mM de Tris-HCl a pH 6.8; la solución fue polimerizada por la adición de 10 mg de persulfato de amonio, 0.1% de TEMED. 30 µg de la PQQ-GDH purificada se diluyeron en la mezcla de digestión que contenía: 5% de SDS, 3% de β-mercaptoetanol, 15% de glicerol y 125 mM de Tris-HCl a pH 6.8. La preparación fue puesta en un baño de agua en ebullición por 3 minutos. El buffer de corrida estuvo compuesto por 1.44% de

Materiales y métodos

glicina, 0.33% de Tris y 1% de SDS. Como marcador de peso molecular se utilizó el Precision Plus Standard™ de BIO-RAD.

La electroforesis se realizó a 25mA de corriente constante a temperatura ambiente. Al termino de la corrida el gel fue teñido con azul de Coomassie R250 al 0.05% en una mezcla de metanol (25% v/v), ácido acético (10% v/v), glicerol (5% v/v) y agua en agitación constante; después de la tinción el gel fue lavado con la misma solución pero sin Coomassie R250.

4.7 Secuencias de péptidos internos.

La secuencia de aminoácidos de la banda asociada a la PQQ-GDH en la electroforesis SDS-PAGE, fue determinada por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. La banda fue cuidadosamente cortada del gel teñido con azul de Coomassie, desteñida, reducida, carbaminometilada, lavada, digerida con tripsina y extraída de acuerdo a lo reportado por Kinter ^[46]. El volumen del extracto fue reducido por evaporación, por medio de una centrífuga al vacío a temperatura ambiente y el volumen se ajustó a 20 µl con ácido fórmico.

La muestra se analizó por espectrometría de masas utilizando el sistema 3200 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canadá), el cual está equipado con un nano-electrospray y un sistema de nano-flujo (agilent 1100 nano pump, Waldbronn, Germany). Las muestras digeridas fueron desaladas en una punta ZipTic-C18 y separadas en una columna Zorbax 300SB C-18 (3.5 µm, 50 X 0.075 mm, Agilent, Germany), equilibrada con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico 0.1%, por un periodo de 80 minutos. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo. El calor de interfase para desolvatar fue mantenido a 150 °C. El espectro fue registrado en modo automático usando el programa Information Dependent Acquisition (IDA). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1 utilizando el modo Enhanced Ms mode. El intervalo de

Materiales y métodos

exploración por EMS fue fijado a t m/z 400-1500 y 4000 amu/s. Los iones seleccionados fueron sujetos a exploración por Enhanced Resolution a una velocidad baja de 250 amu/sec sobre un intervalo de masas estrecho (30 amu), y después sometidos a exploración en un Enhanced Product Ion Scan (Ms/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada de colisión (CAD). Los fragmentos de iones generados fueron capturados y analizados en una trampa de iones lineal Q3. La identificación proteica fue realizada con la base de datos (NCBI nr) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>).

4.8 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry modificado^[55] utilizando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

4.9 Perfil hidrofóbico

El perfil hidrofóbico se realizó utilizando los programas DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), CINEMA (<http://www.utopia.cs.man.ac.uk>), y TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), que predicen los segmentos transmembranales.

4.10 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó por medio del programa Bioedit^[40] (<http://www.mb.mahidol.ac.th/Downloads/Mol-Bio/Bioedit.html>) y el programa MEGA 4.0.1^[78] (<http://www.megasoftware.net/>).

Resultados

5 Resultados.

5.1 Purificación de la PQQ-GDH.

Se llevó a cabo la purificación de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* siguiendo el protocolo descrito por Sara Páez ^[71], en el cual se utilizaron columnas de intercambio iónico (DEAE-Toyopearl y CM-celulosa) y una columna de exclusión molecular (Sephacryl-S200).

La PQQ-GDH purificada se analizó en electroforesis nativa (PAGE), la cual nos reveló una banda única de 86 kDa (figura 7B). La banda dio reacción positiva en una zimografía en la que se utilizó glucosa como sustrato y NTB y PMS como aceptor y mediador de electrones respectivamente (figura 7C). Este resultado nos permitió verificar que la banda obtenida está asociada a la actividad de glucosa deshidrogenasa. Asimismo se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), la cual nos mostró la naturaleza monomérica de la PQQ-GDH purificada (figura 7D). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Sara Páez ^[71] y con los datos obtenidos para PQQ-GDHs provenientes de otras especies de bacterias *E. coli*, *A. calcoaceticus* *G. oxydans* y *P. fluorescens* ^[81, 82, 54, 7].

Resultados

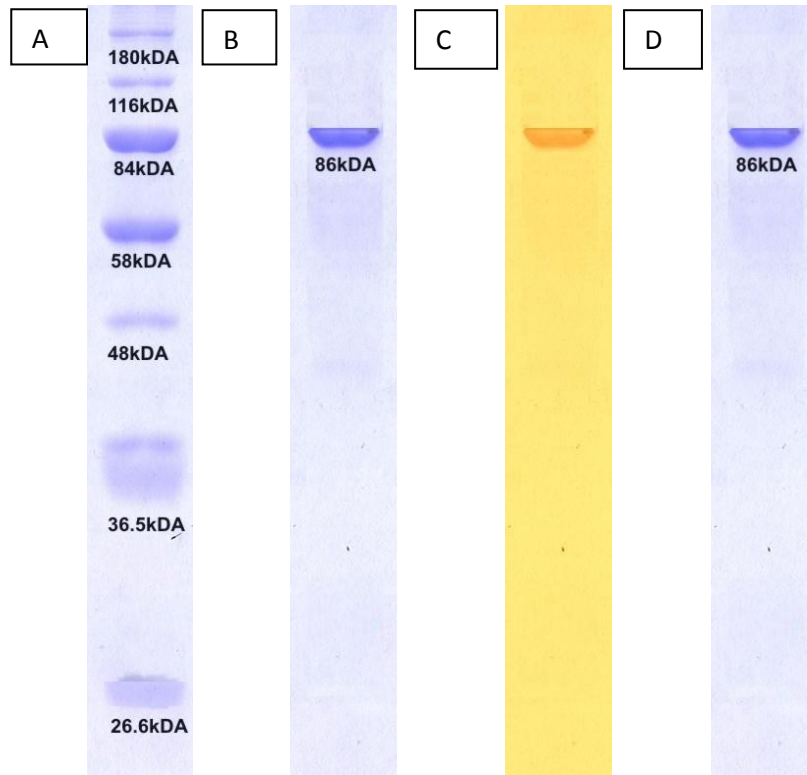


Figura 7. Análisis electroforético de la PQQ-GDH purificada. El carril A muestra el marcador de peso molecular; los carriles B y C muestran la banda asociada a la PQQ-GDH al ser analizada por electroforesis nativa y teñida con Coomassie Blue R-250 y por zimografía, respectivamente. El carril D muestra la banda asociada a la enzima al ser analizada por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE), teñida con Coomassie Blue R-250.

La banda asociada a la PQQ-GDH obtenida por SDS-PAGE, fue cuidadosamente recortada y tratada de acuerdo a Kinter ^[46] para obtener péptidos internos. Se obtuvieron 5 péptidos internos que fueron secuenciados por espectrofotometría de masas (Dr. Guillermo Mendoza Hernández, laboratorio de Proteínas Facultad de Medicina, UNAM):

- 1) IEHHKNFQHMT
- 2) IFLPTDDGR
- 3) TGNIFWLDRR
- 4) PLPLPFK
- 5) LPAGGKSTPMTYEAGGRQYIVTVDGGHGSFGTR

Resultados

5.2 Análisis de los péptidos secuenciados.

Las secuencias de los péptidos obtenidos se analizaron utilizando la base de datos (NCBI nr) del National Center for Biotechnology Information (Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>), para identificar a la proteína purificada con base en su secuencia de aminoácidos. Los resultados obtenidos nos confirman que los péptidos internos secuenciados forman parte de la PQQ-glucosa deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus* (GenBank No. de acceso [AM889285](#); [CAP57220.1](#)).

Una vez identificada la secuencia de la PQQ-GDH dentro del genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, se procedió a localizar en ella la secuencia de aminoácidos correspondiente a los péptidos secuenciados (Figura 8):

Localización de los péptidos internos en la secuencia de la PQQ-GDH

```
MNIKQGLRPVLAITAVVYALVGLYLLAGGIWLTALGGSLYYLIAGALLLVAVLLLRQQ 60
EALWVYAALLIGTMVWAVGEVGLDFWALAPRGDILVPLGIWLMPPITRNLGTRNLGTRD 120
LAPPSRAAQVPLGLAVGAAVVVVVAALTDQDPQDIAGSLPQVAQNAPTPGDAGEIPDEDWQ 180
AYGRTGFGDRFSPLKQITPDNVHNLKVAVTFRTGDVKGPHDPGEFTDETTPIKIRDTVYL 240
CSPHQILFALDAATGKCLKWKFDPKLTYNSTFOHMTCRGVSYHETAQGAETIDGAQAPVDC 300
                                IEHHKNFOHMT
                                : : : . . * * * * *
GHRIFLPTNDGRLFALDAETGERCHNFGDDGMVDLKAGEVVKTAGFFEATSPPVVTDKMW 360
IFLPTDDGR
***** : ***
IVSGAVMDNYSTHEPSGVTRGFDVYTGRLVWVFDAGNPDNEMPSDTHHFVGNPNSWIV 420
SSYDPKLNLIPIPMGVQTPDIWGGNRGADAERYASSILALNADTGKLAWSYQTVHHDLWD 480
MDIPAQPSLVDVRTAGGDIVPALYAPAKTGNIFVLDRRTGTPIVPAPETRVPOGPAPGDH 540
                                TGNIFWLDRR
                                ***** * * * * *
LSPTQPFSELTFRPKNNLTGADMWGGTTFDQIMCRIMFHQLRYDGPFTPPSLQGTLVFPG 600
NLGMFEWGGGLAVDPVRQIAIANPIAIPFVSRLIPRGPNNPASPDASQPSGSETGVQPMFG 660
VPYGVTLSPFLSPLGLPCKKPAWGF MAGIDLKTNITIVWMHRNGTIRDSAPLPIPFLGVP 720
                                PLPLPFK
                                *** : ***
SLGGPLTTAGGVAFLTSTADFYIRAYDVTGTGRQLWQDRLPAGGQSTPMTYAVGGRQFIVT 780
                                LPAGGKSTPMTYEAGGRQYIVT
                                ***** : ***** . ***** : ***
ADGGHGSFGTRLGDYVVAYALPEAH 805
VDGCHGSFGTR
. ***** :
```

Figura 8. Localización de los péptidos internos en la secuencia de aminoácidos de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* (GenBank No. de acceso [CAP57220.1](#)).

(*)=identidad, (:)=sustitución conservativa; (.)=sustitución semiconservativa.

Resultados

5.3 Análisis de la secuencia de la PQQ-glucosa deshidrogenasa.

5.3.1 Grupo prostético.

Por medio del análisis de dominios conservados en la secuencia de aminoácidos de la PQQ-GDH, utilizando la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), se confirmó la presencia de los dominios de unión al grupo prostético PQQ, existentes en el sitio activo de las enzimas de la familia de las deshidrogenasas dependientes de este cofactor (figura 9).

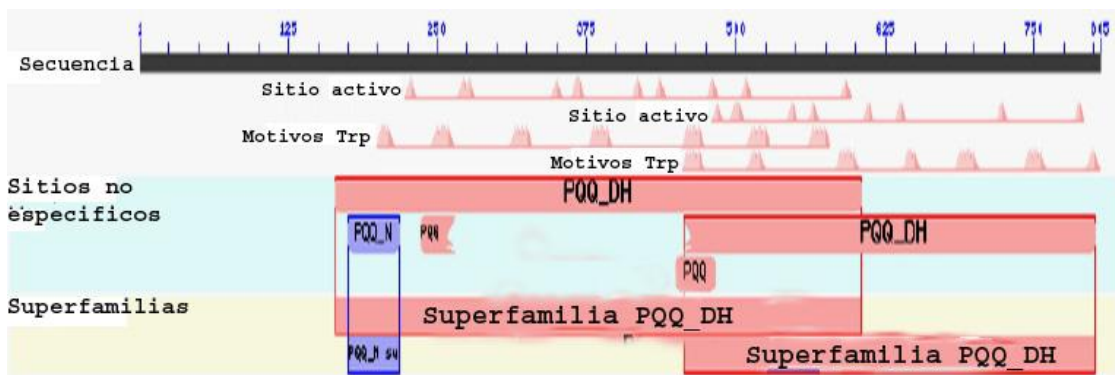


Figura 9. Esquema de los dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*. Los triángulos representan la localización de los dominios de unión a PQQ en el sitio activo. También se señalan los motivos de triptófano que colaboran en la formación de la estructura de superbaril de la proteína.

Se localizaron los motivos de triptófano, altamente conservados entre las deshidrogenasas dependientes de PQQ (motivos W) ^[7,16] (figura 10).

La región de unión a la quinona membranal está compuesta por 80 aminoácidos, de acuerdo con lo reportado para la PQQ-GDH de *E. coli* por Yamada ^[81]. Esta región fue localizada en la PQQ_GDH de *Ga. diazotrophicus* entre el aminoácido

Resultados

510 y el 590 (figura 10), encontrando que estos aminoácidos se encuentran altamente conservados entre ambas enzimas. Los aminoácidos con interacción axial formando un "pocket" para la PQQ y aquellos que interactúan ecuatorialmente con este grupo y el ión metálico en el sitio activo en la enzima de *E. coli* [16,7], fueron localizados en la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* (Figuras 11 y 12)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 5      15      25      35      45      55      65
MNIKQGLRPV LAITAVVYAL VGLYLLAGGI WLTAALGGSY YLIAGALLLV TAVLLRRRQ EALWVYAALL
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 75     85     95    105    115    125    135
IGTMVWAVGE VGLDFWALAP RGDILVPLGI WLMLPPITRN LGTRNLGTRD LAPPSRAAQV PLGLAVGAAV
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
145    155    165    175    185    195    205
VVVVAALTQD PQDIAGSLPQ VAQNAPTPGD AGEIPDEDWQ AYGRTGFGDR FSPLKQITPD NVHNLKVAWTF
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
215    225    235    245    255    265    275
FRTGDKVKGPH DPGEFTDETT PIKIRDTVYL CSPHQILRAL DAATGKLLKWK FDPKLTYNST FQHMTCRGVS
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
285    295    305    315    325    335    345
YHETAQGAET IDGAQAPVDC GHRIFLPTND GRLFALDAET GERCHNFGDD GMVDLKAGEV VKTAGFFEAT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
355    365    375    385    395    405    415
SPPVVTDKMV IVSGAVMDNY STHEPSGVTR GFDVYTGRLV WVF DAGNPD NEMPSDTHHF VGNSPNSWIV
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
425    435    445    455    465    475    485
SSYDPKLNLI FIPMGVQTPD IWGGNRGADA ERYASSILAL NADTGKLAWS YQTVVHDLWD MDIPAQPSLV
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
495    505    515    525    535    545    555
DVRTAGGDIV PALYAPAKTG NIFVLDRTG TPIVPAPETR VPQGPAPGDH LSPTQPFSEL TFRPKNLGTG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
565    575    585    595    605    615    625
ADMWGGTMFD QLMCRIMFHQ LRYDGPFTPP SLQGTLVFPG NLGMFEWGL AVDPVRQIAI ANPIAIPFVS
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
635    645    655    665    675    685    695
RLIPRGPNNP ASPDASQPSG SETGVQPMFG VPYGVTLSPF LSPLGLPCKK PAWGFMAQID LKTNITIVMIH
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
705    715    725    735    745    755    765
RNGTIRDSAP LPIPFKLGVP SLGGPLTTAG GVAFLTSTAD FYIRAYDVTT GRQLWQDRLP AGGQSTPMTY
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
775    785    795    805
AVGGRQFIVT ADGGHGSFGT KLGDYVVAYA LPEAHLW8

```

Figura 10. Localización de los motivos de interacción del triptófano (W en rojo) y el motivo de unión a la quinona membranal (en negro) en la secuencia de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*

Resultados

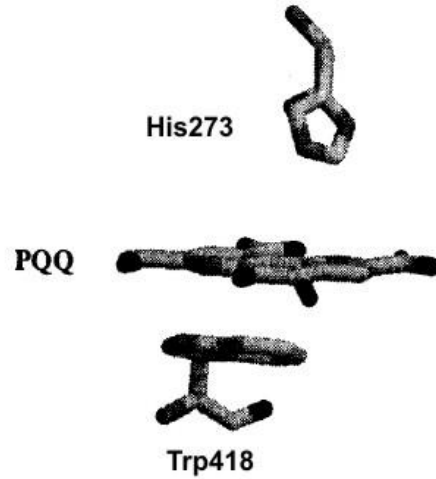


Figura 11. Modelo de interacción del PQQ con los aminoácidos axiales en *Ga. diazotrophicus*, de acuerdo al modelo postulado para *E. coli* ^[16]. El PQQ se encuentra entre el triptófano 418 y la histidina 273.

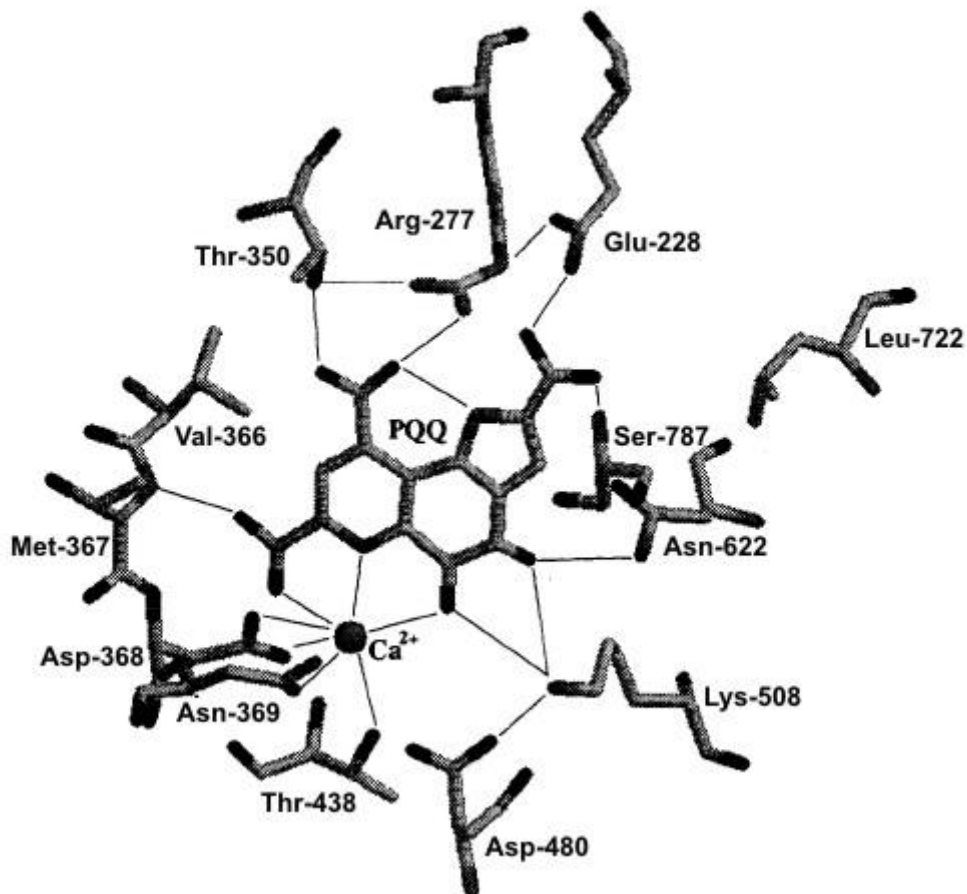


Figura 12. Modelo de las interacciones del PQQ con los aminoácidos ecuatoriales y el calcio divalente en la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*, basado en el modelo para la PQQ-GDH de *E. coli* ^[16].

Resultados

5.3.2 Perfil hidrofóbico.

Se realizó el perfil hidrofóbico de la PQQ-GDH para predecir sus segmentos transmembranales y su topología en la membrana. Los resultados obtenidos del análisis de la secuencia de aminoácidos utilizando los programas:

DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>),

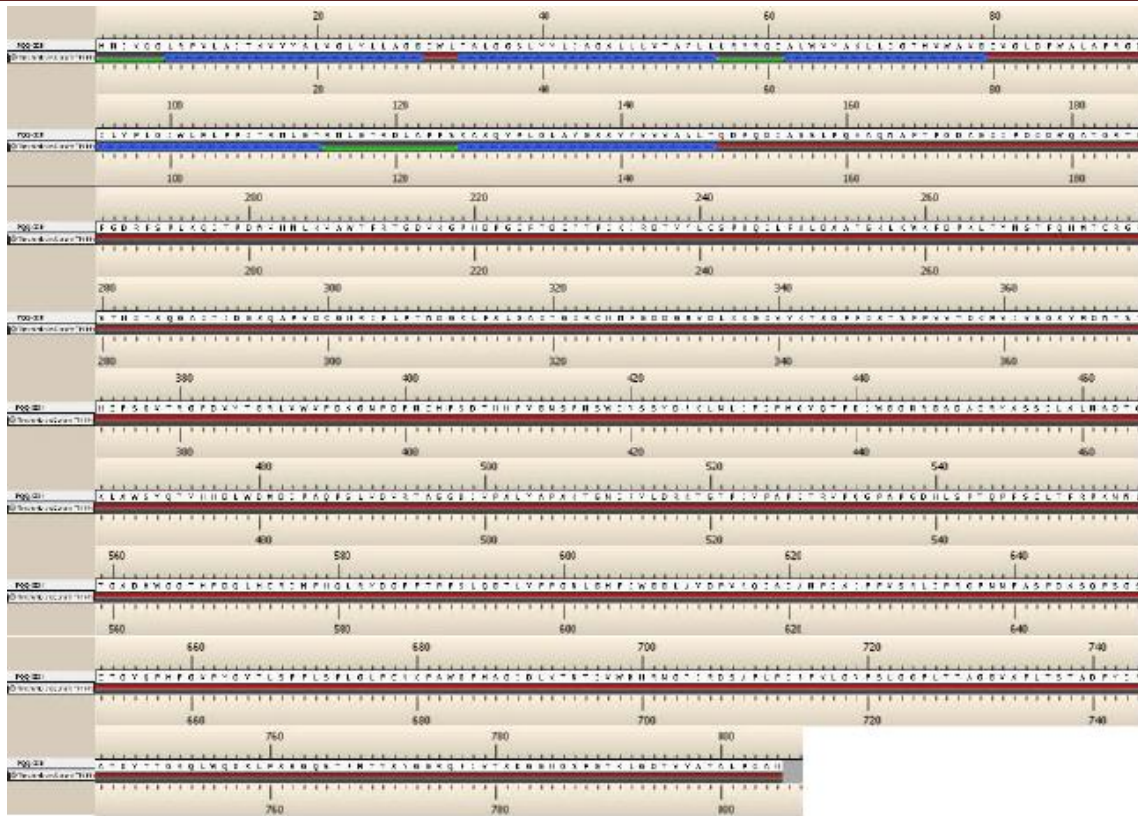
TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), CINEMA

(<http://www.utopia.cs.man.ac.uk>)

y Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>),

demuestran que el dominio del carboxilo terminal está localizado hacia el periplasma y existen cinco segmentos (hélices transmembranales), que pasan a través de la membrana y que se localizan en el dominio del amino terminal ([Figura 13](#)).

Resultados



- Citoplasma 1-6
- Transmembranal 7-29
- Periplasma 30-32
- Transmembranal 33-55
- Citoplasma 56-61
- Transmembranal 62-79
- Periplasma 80-93
- Transmembranal 94-113
- Citoplasma 114-125
- Transmembranal 126-148

Figura 13. Esquema en el que se muestra la orientación de los aminoácidos en la membrana de la secuencia de la PQQ-GDH analizada con los programas CINEMA y TMHMM.

Los aminoácidos en el citoplasma se muestran en verde, las hélices transmembranales en azul y los aminoácidos orientados hacia el periplasma en rojo.

Con base en estos resultados se realizó un modelo de la posible topología de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* (figura 14). En este esquema se señalan también la lisina-508 y el ácido aspártico-480 que interactúa con la Quinona endógena (Q_E). Este aminoácido también es importante en el sitio activo iniciando la reacción de abstracción de un protón de la glucosa de acuerdo a lo reportado para *E. coli*^[61].

Resultados

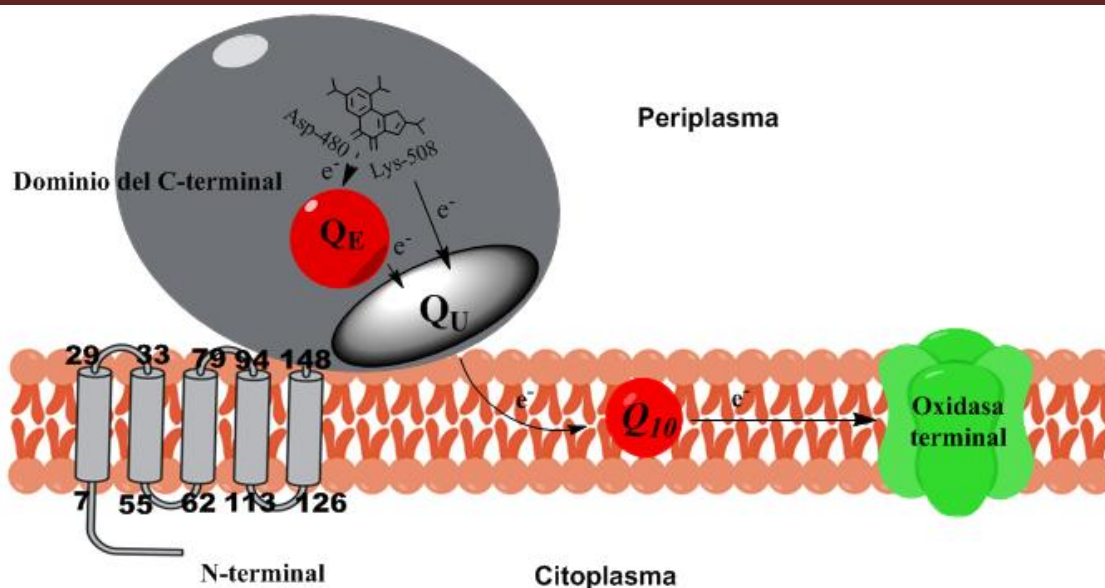


Figura 14. Modelo propuesto de la topología de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* en el cual se muestran los cinco segmentos transmembranales, el sitio de unión de la quinona endógena (Q_E) y el sitio de unión a la quinona membranar.

5.3.3 Filogenia de la PQQ-GDH.

Para realizar el análisis filogenético, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de PQQ-GDHs membranales de varias bacterias en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se compararon aquellas secuencias que mostraron homología mayor a 70% con la secuencia de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* (Anexo 1), usando como grupo externo la subunidad grande 1-alfa de la metanol deshidrogenasa (PQQ-MDH) de *Methylobacterium extorquens* (figura 15).

La filogenia de la PQQ-GDH fue inferida utilizando el método de máxima parsimonia [31]. El árbol consenso inferido de 200 replicaciones [33], representa la filogenia de las secuencias analizadas, y fue obtenido usando el algoritmo Close-Neighbor-interchange (CNI) [62]. Todas las posiciones conteniendo gaps fueron excluidas, encontrando un total de 394 posiciones, de las cuales 317 fueron informativas. El análisis se realizó con el programa MEGA 4.0.

Resultados

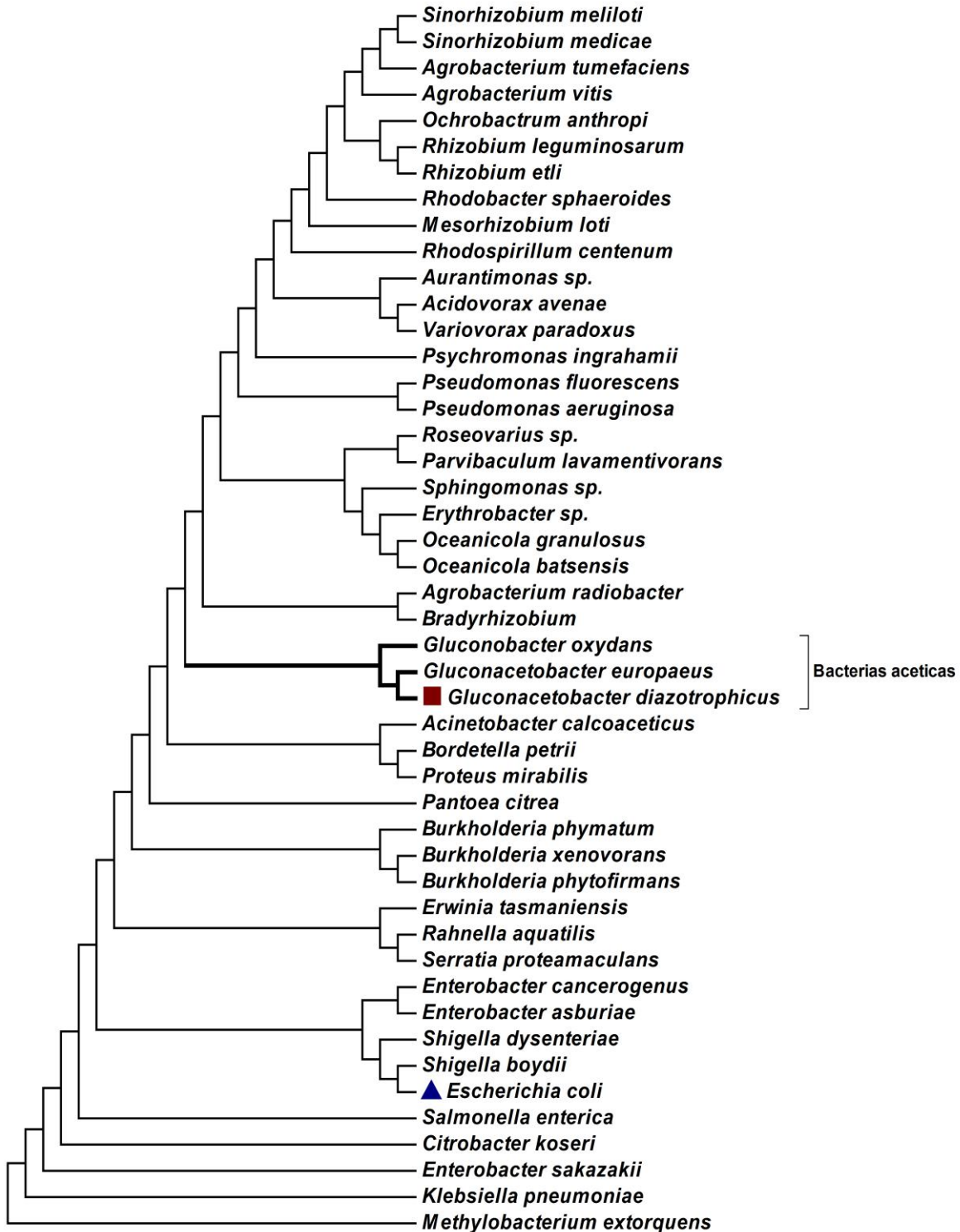


Figura 15. Filogenia de las PQQ-GDHs membranales de proteobacterias, se utilizó la PQQ-MDH de *Methylobacterium extorquens* como grupo externo. No. de acceso de las secuencias utilizadas en Anexo A.

Resultados

5.4 Caracterización de la mutante M3 PQQ-GDH⁻

Como mencionamos en la introducción, la oxidación directa de la glucosa en el espacio periplásmico es la vía más importante para su utilización en *Ga. diazotrophicus* [9, 74]. En esta bacteria las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructoquinasa y 1-fosfofructoquinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato aldolasa) están ausentes [3, 9].

Por esta razón, es muy importante determinar cuál es la importancia fisiológica de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal y para ello se caracterizó, en cuanto a crecimiento y actividades relacionadas con el sistema respiratorio, una mutante carente de actividad de PQQ-GDH obtenida en nuestro laboratorio.

5.4.1 Curva de crecimiento de la mutante M3.

Se determinó la curva de crecimiento de la mutante *Ga. diazotrophicus* PQQ-GDH⁻ (M3) en un medio mínimo con sales (LGI modificado), donde la bacteria para crecer necesita fijar nitrógeno; la fuente de carbono es sacarosa. Se midieron la D.O._{560nm} y el pH hasta alcanzarse la fase estacionaria. La curva de crecimiento obtenida se comparó con la de la cepa silvestre (wt), crecida en las mismas condiciones (figura 16).

La mutante alcanzó una D.O._{560nm} similar a la de la wt (2.5), aunque su fase de adaptación (fase lag) fue más larga (5 h para la wt y 15 h para la mutante), indicando que en la mutante fue necesario activar vías metabólicas que le permitieran crecer en el medio con sacarosa. Sin embargo, una vez que la mutante se adaptó al medio, su fase logarítmica es más rápida (aproximadamente 17 h para la wt y 13 para la mutante); a pesar de ello, la fase estacionaria fue alcanza a las 26 h en la wt, mientras que la cepa mutante lo hizo a las 32 h.

Resultados

La cepa silvestre acidifica el medio hasta un pH de 2.5, como resultado del ácido glucónico producto de la oxidación de la glucosa por la PQQ-GDH. En contraste, ante la ausencia de esta enzima, la mutante no produjo acidificación en el medio.

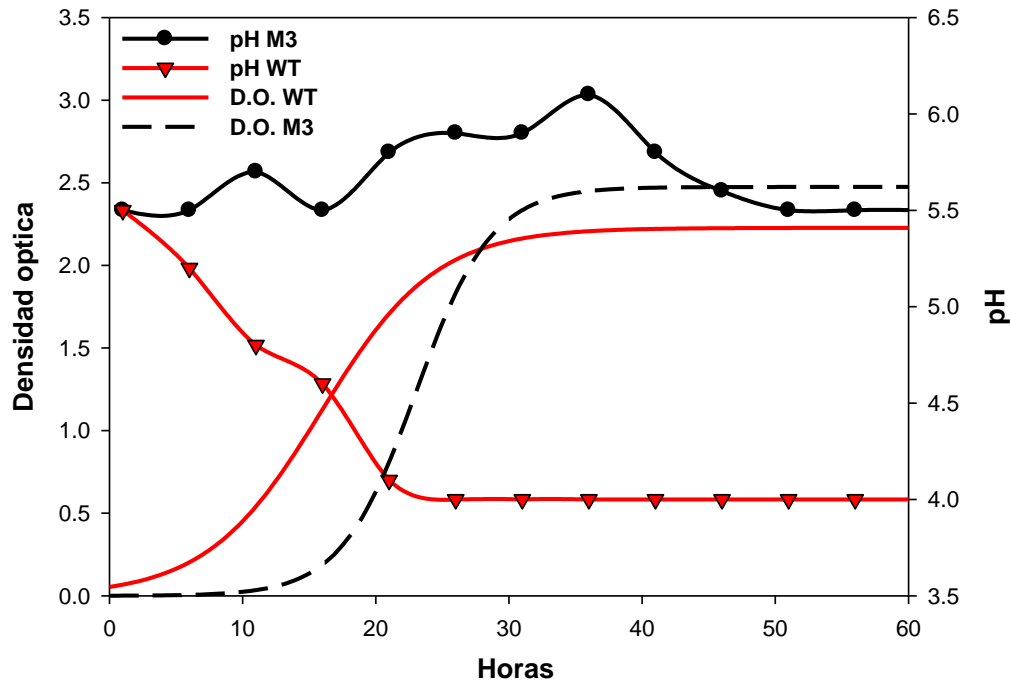


Figura 16. Cinéticas de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* PQQ-GDH⁻(M3) y WT, crecidas en medio LGI. La densidad óptica (D.O.) se midió a 560 nm

5.4.2 Actividades respiratorias

Para conocer si la falta de acidificación se debía a la ausencia de la PQQ-GDH, se determinaron las actividades de oxidasas en células enteras de la mutante M3 y con fines comparativos en células de la cepa wt. Se utilizaron como sustrato además de glucosa, etanol y acetaldehído, que son los otros sustratos de las deshidrogenasas periplásmicas presentes en *Ga. diazotrophicus*.

Las actividades de las tres oxidasas medidas se ven afectadas en la mutante M3 (tabla 3). Las actividades de glucosa y etanol oxidasa son las más disminuidas

Resultados

(hay una pérdida de 93 y 88 % de la actividad respectivamente), mientras que en el caso de la aldehído oxidasa se pierde la mitad de la actividad.

Actividad de oxidasas en células enteras				
Sustrato	Cepa Silvestre		Mutante M3	
	Actividad Específica ^a	Actividad Total	Actividad Específica	Actividad Remanente ^b
Glucosa	74	1	5.2	0.07
Etanol	56	1	12.4	0.22
Aldehído	60	1	29	0.5

Tabla 3. Comparación de la actividad de oxidasa entre células de la mutante M3 y de la cepa silvestre.

^aátomos de O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de peso húmedo celular.

^bLa actividad remanente se calculó respecto a la actividad total de las células de la cepa wt.

Para determinar si la disminución en la actividad de oxidasa era consecuencia de una afectación a nivel de las deshidrogenasas que donan los electrones a la cadena respiratoria, se obtuvieron membranas de cada una de las cepas y se determinaron las actividades de deshidrogenasas con los mismos sustratos probados en células, además de la NADH deshidrogenasa que por su orientación en la membrana no puede ser medida en células enteras.

Los resultados obtenidos al medir las actividades de deshidrogenasa, muestran que solo la actividad de PQQ-GDH esta disminuida (13 % de actividad remanente; Tabla 4), indicando que el gen que codifica a la enzima fue interrumpido. La NADH-deshidrogenasa, cuya localización en la membrana es hacia el citoplasma, no muestra ningún cambio (Tabla 4). Sin embargo, de manera sorprendente, de acuerdo a los resultados obtenidos al medir las oxidasas en células enteras, las actividades de las otras deshidrogenasas periplásmicas no solo no disminuyen sino por el contrario aumentan, siendo el incremento más importante a nivel de la PQQ-aldehído deshidrogenasa, cuya actividad aumentó 10 veces (Tabla 4).

Resultados

Actividad de deshidrogenasas membranales				
Sustrato	Cepa silvestre		Cepa M3	
	Actividad específica ^a	Actividad total	Actividad específica	Actividad remanente ^b
Glucosa	1954.6	1	256	0.13
Etanol	866.6	1	1466	1.7
Aldehído	1838.4	1	18215	10
NADH	2200	1	2191	1

Tabla 4. Actividades de deshidrogenasas membranales de células de la mutante M3 y de la cepa silvestre, crecidas en medio LGI (sacarosa como fuente de carbono).

^aLas actividades están dadas en $\eta\text{moles de DCPIPH}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

^bLa actividad remanente fue calculada con respecto a la actividad total de la cepa silvestre.

Decidimos medir las actividades de oxidasas en las membranas de ambos tipos celulares y corroborar los resultados obtenidos. De la misma manera que se observó para las células enteras, todas las actividades de oxidasas en la mutante M3 fueron bajas en comparación con la cepa silvestre (tabla 5).

Actividad de Oxidasa en membranas				
Sustrato	Cepa Silvestre		Cepa M3	
	Actividad específica ^a	Actividad total	Actividad específica	Actividad remanente ^b
Glucosa	1457.52	1	7.1	0
Etanol	220.84	1	7.1	0.04
Aldehído	706.67	1	320	0.36
NADH	2252.52	1	448	0.12

Tabla 5. Actividades de oxidasas determinadas en membranas de células de la mutante M3 y de la cepa silvestre, crecidas en medio LGI (sacarosa como fuente de carbono).

^aLas actividades están dadas en $\eta\text{AtO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

^bLa actividad remanente fue calculado con respecto a la actividad total de la cepa silvestre.

Resultados

Los resultados anteriores nos indican que la mutante M3 carece de la PQQ-GDH; entonces, ¿por qué vía está siendo utilizada la sacarosa que se encuentra en el medio de crecimiento?

Como se mencionó anteriormente, carece de las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructoquinasa y 1-fosfofructoquinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato aldolasa) y se plantea que la utilización de azúcares es por la vía de las pentosa fosfatos.

Por estudios bioquímicos se ha establecido la presencia de la levansacarasa en la bacteria ^[56]; nosotros identificamos el gen que codifica para esta enzima en el genoma de *Ga. diazotrophicus* (GenBank [CAP 57679.1](#)); la levansacarasa permite a *Ga. diazotrophicus* romper la sacarosa en glucosa y fructosa. Sabemos que la cepa silvestre crece en glucosa que es la fuente de carbono original del medio LGI, pero no es capaz de crecer en fructosa ^[50].

Quisimos probar si la mutante M3 es capaz de crecer en estas dos fuentes de carbono, en una alternativa como glicerol, así como en el producto de la oxidación de la glucosa, el ácido glucónico.

Los resultados obtenidos nos muestran que, de la misma manera que sucede en la cepa silvestre ^[50], la cepa M3 no utiliza a la fructosa como fuente de carbono.

La mutante puede crecer bien en glucosa y en ácido glucónico, alcanzando D.O. semejantes a las obtenidas cuando se crece en sacarosa (~2.2), y aún mejor en glicerol (D.O._{.560nm} =3.8). En todos los casos, las D.O. _{.560nm} alcanzadas son semejantes a las que se observan en la cepa silvestre. Como era de esperarse, con ninguna de las fuentes de carbono utilizadas se observa acidificación del medio.

Resultados

Estos resultados nos indican que la mutante M3 está usando como fuente de carbono la glucosa, por una vía en la que la PQQ-GDH no participa.

La vía de las pentosas fosfato implican la presencia de una glucosa deshidrogenasa soluble que convierte, dentro de la célula, la glucosa en gluconato el cual entra como 6-fosfogluconato en la vía de las pentosas fosfato.

En *Ga. diazotrophicus* ha sido reportada la existencia de esta enzima, la cual representa entre el 10 y el 17 % en comparación a la PQQ-GDH ^[9]; confirmamos la presencia del gen que codifica a la GDH dependiente de NAD⁺ en el genoma de *Ga. diazotrophicus* ([GenPept YP_001602867](#)).

Otra posibilidad es la fosforilación de la glucosa a glucosa 6-P por la glucocinasa; esta reacción es el primer paso en la vía de las pentosas fosfato; localizamos en el genoma de *Ga. diazotrophicus* ([GenPept YP_001602005.1](#)), el gen que codifica para esta enzima.

Entonces, lo más probable es que la mutante esté creciendo a expensas de la utilización de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato, a pesar de la falta de la PQQ-GDH.

6 DISCUSIÓN

6.1 Como miembro de las PQQ-GDH

La enzima purificada a partir de *Ga. diazotrophicus* es una enzima monomérica de acuerdo al análisis electroforético, que oxida a la glucosa como lo confirma la zimografía utilizando glucosa como sustrato. El análisis de la secuencia de los péptidos obtenidos a partir de la digestión de esta proteína, permitió su identificación como GDH en el genoma de *Ga. diazotrophicus*. Con el análisis "in silico" de la secuencia identificamos los dominios que caracterizan a las deshidrogenasas dependientes de PQQ.

Entre estos dominios fueron localizados, de acuerdo al modelo postulado para *E. coli* ^[16], las secuencias de los ocho motivos de triptofano (W), los cuales le dan la estructura de superbarril a la enzima (Figura 10); los aminoácidos que interactúan como ligandos axiales de la PQQ y aquellos que interactúan ecuatorialmente con este grupo y el ión metálico (Figuras 11 y 12), en el sitio activo de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus*.

Así mismo se localizó el dominio de unión con la UQ de la cadena respiratoria, que muestran una secuencia de aminoácidos altamente conservada y que fue identificado entre los motivos triptófano W5 y W6. Se ha reportado que esta región no se encuentra en las PQQ-Metanol deshidrogenasas y PQQ-Alcohol deshidrogenasas de *Methylobacterium extorquens* y *Pseudomonas aeruginosa* ^[7], pero muestra una identidad de 35% con el sitio de unión a quinona de la sorbitol deshidrogenasa (PQQ-SLDH) ^[81] de *G. oxydans*.

Con estos resultados podemos afirmar que la enzima purificada por nosotros a partir de *Ga. diazotrophicus* es una PQQ-Glucosa deshidrogenasa.

6.2 Como proteína de membrana

El análisis hidrofóbico de la secuencia permitió la identificación de cinco hélices transmembranales localizadas en la porción del amino terminal, en concordancia con la topología de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal reportada para otras bacterias [81, 82, 54, 7], lo cual confirma a la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* como proteína integral de membrana. Este resultado es apoyado por datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales demuestran que la solubilización de la GDH a partir de preparaciones membranales requiere un tratamiento con una concentración mayor de detergente (Triton X-100 1%), en comparación con la concentración requerida para la solubilización de las otras deshidrogenasas membranales estudiadas (PQQ-alcohol deshidrogenasa y PQQ-aldehído deshidrogenasa, que requieren 0.5 % de TritonX-100 [38, 71]).

Como mencionamos anteriormente, la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* también interactúa con la membrana celular por medio del sitio de unión a la poza de quinona membranal, que se encuentra localizado en el extremo del carboxilo terminal de la proteína. Este resultado también era de esperarse ya que la PQQ-GDH es una deshidrogenasa que cede los electrones a la poza de quinonas y alimenta de esta manera a la cadena respiratoria de la bacteria.

6.3 Sobre la filogenia de la PQQ-GDH

La secuencia de la PQQ-GDH de *Ga. diazotrophicus* presentó relación filogenética con bacterias del grupo de las bacterias acéticas.

6.4 Sobre su importancia fisiológica

Ya se ha mencionado que la PQQ-GDH tiene gran importancia en la producción de energía, ya que es la principal vía en la oxidación de glucosa y funciona como una deshidrogenasa primaria para la cadena respiratoria. Los resultados obtenidos

Discusión

al medir las actividades respiratorias en la mutante PQQ-GDH⁻ (M3), nos confirman la falta de actividad de la PQQ-GDH. Como resultado de la falta de esta enzima la glucosa debe ser metabolizada por otra vía, no conectada a la cadena respiratoria y donde será utilizada únicamente como fuente de carbono. Debido a este hecho, por tanto aumenta la velocidad de crecimiento de la mutante es mayor (una fase log más rápida).

Este rápido crecimiento posiblemente se dé a expensas de la oxidación de la glucosa en el citoplasma por la actividad de la GDH-NAD⁺, la cual ya ha sido reportada en *Ga. diazotrophicus* ^[51] y está regulada por la concentración de sustrato; el gen que codifica para esta enzima fue localizado por nosotros dentro del genoma de la bacteria. El producto de esta oxidación, el ácido glucónico, puede ser utilizado directamente en la vía de las pentosas fosfato (Figura 17).

Otra opción podría ser la fosforilación de la glucosa una vez que se encuentre en el citoplasma, por la glucosa cinasa, obteniéndose glucosa 6-P, la cual entra directamente a la vía de las pentosas fosfato (Figura 17).

El crecimiento de la mutante PQQ-GDH⁻ en un medio de sacarosa y sales, con una cantidad "trazas" de amonio, nos sugiere que la mutante está fijando nitrógeno, ya que la cantidad de amonio presente en el medio no puede sostener el crecimiento. Que se produzca el proceso de la fijación de nitrógeno en una mutante PQQ-GDH⁻ sugiere que la presencia de esta enzima no es requisito indispensable para que el proceso ocurra. Posiblemente la actividad de las deshidrogenasas dependientes de PQQ en su conjunto, sea la que explique el mecanismo de la protección respiratoria a la nitrogenasa.

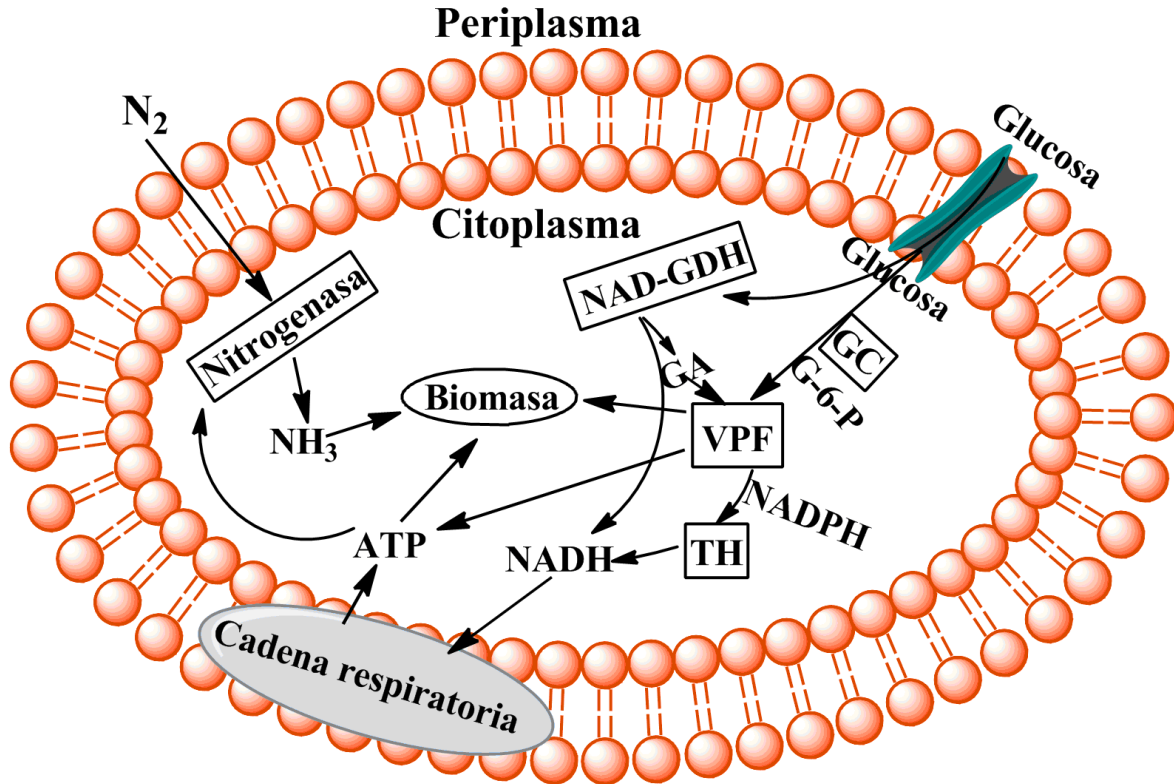


Figura 17. Metabolismo interno de la glucosa. Via de las pentosas fosfato (VPF), glucocinasa (GC), glucosa-6-fosfato (G-6-P), gluconato (GA), transhidrogenasa (TH).

6.5 Sobre la mutante PQQ-GDH⁻

Los resultados obtenidos al medir las actividades respiratorias nos muestran que efectivamente no hay actividad de PQQ-GDH, tanto medida en su actividad de deshidrogenasa, como determinada como enzima donadora de electrones hacia la cadena respiratoria.

Sin embargo, es muy importante destacar que las otras actividades de deshidrogenasas dependientes de PQQ también se vieron afectadas. La PQQ-ADH y de manera muy importante también la PQQ-ALDH, aumentaron en su actividad 0.5 y 10 veces. A pesar de ello las actividades de oxidasas asociadas a estas deshidrogenasas disminuyeron apreciablemente. Estos resultados nos muestran que como resultado de la mutación no solo la PQQ-GDH, sino aparentemente toda la cadena respiratoria se vio afectada en su función. La falta

Discusión

de actividad a nivel de oxidasas, aún con actividades de deshidrogenasas aumentadas, nos sugiere una afectación posiblemente a nivel de la síntesis de la ubiquinona o de la oxidasa terminal.

Estos resultados nos llevan a postular a la cepa PQQ-GDH⁻ obtenida, como una mutante pleiotropica.

Conclusiones

7 Conclusiones

A partir de la enzima purificada se obtuvieron las secuencias de varios péptidos internos que nos permitieron la localización de la secuencia completa de una GDH, en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* disponible en la base de datos del GenBank.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la GDH localizada, nos mostró que en la secuencia de la enzima se encontraban los motivos de triptófano (W), así como las secuencias de unión a PQQ, ubiquinona endógena y ubiquinona membranal, característicos de enzimas pertenecientes a la familia de las PQQ-deshidrogenasas.

El análisis hidrofóbico nos permitió modelar el arreglo de la enzima en la membrana, así como su posible interacción con la UQ10. La enzima cuenta con los 5 cruces membranales y el extremo carboxilo terminal está orientado hacia el periplasma, de manera semejante a lo que se ha descrito para la enzima de *E. coli*

Los resultados obtenidos nos permiten postular a la glucosa deshidrogenasa purificada en el laboratorio como una proteína perteneciente a la familia de las PQQ-deshidrogenasas.

La carencia de la PQQ-GDH parece no afectar el desarrollo de la bacteria en condiciones de crecimiento que requieren de la fijación de nitrógeno.

Los resultados sugieren que la mutante de *Ga. diazotrophicus* PQQ-GDH⁻ obtenida es una mutante pleiotrópica

Referencias

8 Referencias

1. Adachi O., Miyagawa E., Shinagawa E., Matsushita K. & Ameyama M. (1978b). Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 42(12):2331-2340.
2. Adachi O., Tayama K., Shinagawa E. & Ameyama M. (1978a). Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* 42(11):2045-2056.
3. Alvarez B. & Martínez-Drets G. (1995). Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 41:918-924.
4. Ameyama M., Matsushita K., Ohno Y., Shinagawa E. & Adachi O. (1981) Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenase of oxidative bacteria. *FEBS Letters.* 130:179-183.
5. Ameyama M., Nonobe M., Shinagawa E., Matsushita K., Takimoto K. & Adachi O. (1986) Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 50:49-57.
6. Anthony C. (1996). Quinoprotein-catalysed reactions. *Biochem. J.* 320:697-711
7. Anthony C. & Ghosh M. (1998). The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 69:1-21.
8. Arrieta J., Hernandez L., Coego A., Suarez V., Balmori E., Menendez C., Petit-glatron M., Chambert R. & Selmain-Housein G. (1996) Molecular characterization of the levansucrase gene from endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiol.*142:1077-1085.
9. Attwood MM., Van Dijken JP. & Pronk JT. (1991).Glucose metabolism in gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioeng.*72(2):101-105.

Referencias

10. Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Balardi R. & Bottini R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* 24:7-11.
11. Bernardelli CE., Luna MF., Galar ML. & Boiardi JL. (2001). Periplasmic PQQ-dependent glucose oxidation in free-living and symbiotic Rhizobia. *Curr. Microbiol.* 42:310-315.
12. Bulygina ES., Gulikova OM., Dikanskaya EM., Netrusov AI., Tourova TP. & Chumakov KM. (1992). Taxonomic studies of genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *J. Gen. Microbiol.* 138:2283-2286.
13. Cavalcante VA. & Döbereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108:23-31
14. Cleenwerck I. & De Vos P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *Int J Food Microbiol.* 125:2-14.
15. Cojho EH., Reis VM., Schenberg AC. & Döbereiner J. (1993). Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:23-31.
16. Cozier GE. & Anthony C. (1995). Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modeled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem J.* 312:679-685.
17. Dalton H. & Postgate JR. (1969). Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 54:463-473.
18. De Ley J. (1961) Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 24:31.

Referencias

19. De Ley J., Gillis M. & Swings J. (1984). Family VI. Acetobacteraceae, p. 267-278. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
20. Del Arenal IP., Contreras ML., Slatonova BB., Rangel P., Leedias F., Davila JR. & Escamilla JE. (1997). Haem O and putative cytochrome bo in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. Arch. Microbiol. 167:24-31.
21. Deppenmeier U. & Ehrenreich A. (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 16:16-69.
22. Dewanti AR., Duine JA. (1998). Reconstitution of membrane-integrated quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme with PQQ and the holoenzyme's mechanism of action. Biochemistry. 37(19):6810-6819.
23. Dokter P., Frank J. & Duine JA. (1986). Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Biochem. J. 239:163-167.
24. Duine JA. (1989). PQQ and the quinoproteins: an important novel field in enzymology. Anton Van Leeuwenhoek. 56:3-12.
25. Duine JA. (1991) Quinoproteins: enzymes containing the quinoid cofactor pyrroloquinoline quinone, tetrapterin or tryptophan-tryptophan-quinone. Eur. J. Biochem. 200:271-284.
26. Duine JA. (1999). The PQQ story. J. Biosci. Bioeng. 88 (3):231-236.
27. Duine JA. Frank Jzn. & Ruiters LG. (1979) Isolation of a methanol dehydrogenase with a functional coupling to cytochrome c. J. Gen. Microbiol. 115:523-526.
28. Duine JA., Frank J. & Jongejans JA. (1986). PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidation. FEMS Microbiol. Rev. 32:165-178.
29. Duine JA., Frank J. & Van der Meer R. (1982). Different forms of quinoprotein aldose-(glucose-) dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch Microbiol. 131:27-31.

Referencias

30. Duine JA., Frank J. & Verwiel PEJ. (1980). Structure and activity of the prostetic group of metanol dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 108:187-192.
31. Eck RV. & Dayhoff MO. (1966) Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
32. Escamilla E., Contreras M., Flores-Encarnacion M., Flores LM. (1999). Los sistemas respiratorios bacterianos. Mensaje Bioquimico, Vol. XXIII: 67-103.
33. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
34. Flores-Encarnacion M., Contreras-Zentalla M., Soto-Ursua L., Aguilar GR., Baca BE. & Escamilla JE. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. J. Bacteriol. 181(22):6987-6995.
35. Flores-Encarnacion M., Sanchez-Cuevas M. & Ortiz-gutierrez F. (2004). Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteinas bacterianas. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 47 (1-2):47-59.
36. Fuenres-Ramírez LE., Jiménez-Salgado TR., Abarca-ocampo IR. & Caballero-Mellado J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus* and indol acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant Soil. 154:145-150.
37. Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt RM., Stephan P., Teixeira KRS., Döbereiner J., & De Ley J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp, nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J, Syst. Bacteriol. 39:361-364.
38. Gómez-Manzo S. (2007). Papel de las deshidrogenasas periplásmicas para Etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Tesis doctoral. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
39. Gónzales B., Martínez S., Chávez JL., Lee S., Castro NA., Domínguez MA., Gómez S., Contreras M., Kennedy C. & Escamilla JE. (2006). Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a Cyanide-Sensitive Cytochrome bb and Cyanide-resistant Cytochrome ba Quinol oxidase. Bioquim. Biophys. Acta. 1757 (12):1614-1622.

Referencias

40. Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
41. Hauge JG. (1960). Kinetics and specificity of glucose dehydrogenase from *Bacterium anitratum*. Biochem. Biophys. Acta. 45:263-269.
42. Hauge JG. (1964). Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. J. Biol. Chem. 239:3630-3639.
43. Hill S. (1988). How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Lett. Microbiol Rev. 54:111-130.
44. James EK. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res.. 65:197-209.
45. Jiménez-Salgado TR., Aparicio F. & Caballero-mellado J. (1994). Detección de citocinas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana Cuba.
46. Kinter M. & Sherman NE. (2000). In protein sequencing and identification using tandem mass spectroscopy, Desidero DM., Nibbering NMM. Eds; Jhon Wiley-interscience, inc. New York. P:174-165.
47. Kobayashi K., Mustafa G., Tagawa S. & Yamada M. (2005). Transient formation of neutral ubisemiquinone radical and subsequent intramolecular electron transfer to pyrroloquinoline quinone in the Escherichia coli membrane-integrated glucose dehydrogenase. Biochemistry. 44:13567-13572.
48. Lery LMS., Coelho A., Von Kruger WMA., Goncalves MSM., Santos MF., Valente RH., Santos EO., Rocha SLG., Perales J., Domont GB., Texeira KRS. & Bish PM. (2008) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. Proteomics (8):1631-1644.
49. Lessie TG. & Phibbs PV. (1984). Alternative Pathways of carbohydrates utilization in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Microbiol. 38:359-387.
50. López-Carbajal HM. (2010). La fermentación oxidativa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y la especificidad por alcoholes y

Referencias

- azucares para el crecimiento y la respiración. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias UNAM.
51. Luna MF., Bernardelli CE., Galar ML. & Boiardi JL. (2006). Glucose Metabolism in Batch and Continuous Cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL3. *Curr. Microbiol.* 52:163-168.
 52. Luna MF., Bernardelli CE., Mignone CF. & Boiardi JL. (2002). Energy generation by extracellular aldose oxidation in N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):2054-2056.
 53. Luna MF., Mignone CF. y Boiardi JL. (2000). The carbón source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54:564-569.
 54. Marcinkevičienė L., Bachmatova I., Semėnaitė R., Rudomanskis R., Bražėnas G., Meškiene R. & Meškis R. (1999). Purification and characterization of PQQ-dependent glucose dehydrogenase from *Erwinia sp.* *Biotechnol. Lett.* 21:187-192.
 55. Markwell MAK., Hass SM., Tolber NE & Bieber LL. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* 72:296-303.
 56. Martínez Fleites C., Ortíz Lombardía M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor EJ., Arrieta JG., Hernández L. & Davies GJ. (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* 390:19-27.
 57. Matsushita K., Shinawa E., Adachi O. & Ameyama M. (1989). Reactivity with ubiquinona of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biochem.* 105:633-637.
 58. Matsushita K., Toyama H., & Adachi O. (1994). Respiratory chain and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 36:247-297.
 59. McIntire WS. (1994). Quinoproteins. *The FASEB J.* 8:513-519.
 60. Merrick MJ. (1992). Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. P. 835-876. *Biological nitrogen fixation*. Chapman & Hall. N.Y.

Referencias

61. Mustafa G., Ishikawa Y., Kobayashi K., Migita CT., Tagawa S. & Yamada M. (2008) Function of a bound ubiquinone in *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *BioFactors*. 32:23-29.
62. Nei M. & Kumar S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
63. Neijssel OM., Tempest DW., Duine JA. & Frank Jzn. (1983). Glucose metabolism by K^+ -limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase. *FEMS microbial. Lett.* 20:35-39.
64. Olsthoorn AJJ. & Duine JA. (1996). Production, characterization and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase /soluble type; Ec 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 336:42-48.
65. Outbrie A., Rozeboom HJ., Kalk KH., Olsthoorn AJJ., Duine JA. & Dijkstra BW. (1999). Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. *The EMBO J.* 18:5187-5194.
66. Quispel A. (1992). A search for signal in endophytic microorganism, p.471-491. In verna D. P. S. (ed.), *Molecular signals in plant-microbe communications*, CRC press. Boca Raton.
67. Rainbow C. (1966) Nutricion and metabolism of acetic acid bacteria. *Wallerstein Lab. Commun.* 94:615.
68. Reis VM. & Dobereiner J. (1998). Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch microbial.* 171:13-18.
69. Robson RL. & Postgate JR. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
70. Salisbury SA. Forrest HS. Cruse WBT. & Kennard O. (1979). A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenase. *Nature.* 280:843-844.
71. Sara Páez M. (2009) Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

Referencias

72. Saravanan VS., Madhaiyan M., Osborne J., Thangaraju M. & Sa TM. (2007). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microb. Ecol.* 39:130-140.
73. Sievers M., Ludwig W. & Teuber M. (1994). Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodophila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:189-196
74. Stephan MP., Aliviera M., Teixeira KRS., Martínez-Drets G. & Döbereiner J. (1991). Physiology and nitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:67-72.
75. Strobel GA., & Long DM. (1998). Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM news.* 64:263-268.
76. Swarnalatha YR. & Bruce TC. (2004). Determination of enzyme mechanism by molecular dynamics: Studies on quinoprotein, methanol dehydrogenase and soluble glucose dehydrogenase. *Protein Sci.* 13:1965-1978.
77. Swings J. (1992). The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, P. 2268-2286. *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: acophysiology, isolation, identification, applications*, Vol. III. Springer-Verlag, N.Y.
78. Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumrlab.net/publications>).
79. Tanaka S., Igarashi S., Ferri S. & Sode K. (2005). Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface. *BMC Biochemistry.* 6:1.
80. Urakami T., Tamaoka J., Susuki KI. & Komagata K. (1989). *Acidomonas* gen. Nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomona mathanolica* comb. Nov. *J. Syst. Bacteriol.* 39:50-55.

Referencias

81. Yamada M., Elias MD., Matsushita K., Migita CT. & Adachi O. (2003). *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1647:185-192.
82. Yamada M., Sumi K., Matsushita K., Adachi o. & Yamada Y. (1993) Topological análisis of quinoprotein glucosa dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *J. Biol. Chem.* 268; 12812-12817.
83. Yamada Y., Hoshino K. & Ishikawa T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1244-1251.
84. Yamada Y., Hoshino K. & Ishikawa T. (1998). *Gluconacetobacter* nom, corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no 64. *J. Syst. Bacteriol.* 48:327-328.
85. Yee L., Hamerle M., Olsthoorn AJJ., Schuman W., Schmidt HL., Duine JA. & Heller A. (1993). High current density wired quinoprotein glucose dehydrogenase electrode. *Anal. Chem.* 65:238-241.

Anexo A

9 Anexo A.

Secuencias de PQQ-GDHs y MDH* de proteobacterias tomadas del GenBank

α -proteobacterias	No. de acceso	β - proteobacterias	No. de acceso	γ - proteobacterias	No. de acceso
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	ACM28710.1	<i>Burkholderia xenovorans</i>	ABE36098.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	ABM68634.1
<i>Bradyrhizobium sp</i>	CAL74537.1	<i>Burkholderia phymatum</i>	ACC74637.1	<i>Serratia proteamaculans</i>	ABV42200.1
<i>Gluconobacter oxydans</i>	AAW60048.1	<i>Bordetella petrii</i>	CAP44995.1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ABU78430.1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ABS13025.1	<i>Acidovorax avenae</i>	ABM31018.1	<i>Citrobacter koseri</i>	ABV14327.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	BAB48858.1	<i>Variovorax paradoxus</i>	EED71987.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>	ACI08200.1
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	CAA69952.1	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	ACD16092.1	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	CAO97431.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	EDR77798.1			<i>Salmonella enterica</i>	AAX64075.1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AAK89297.1			<i>Enterobacter cancerogenus</i>	EEA16045.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	CAC45553.1			<i>Shigella boydii</i>	ABB64846.1
<i>Rhizobium etli</i>	ACE90290.1			<i>Enterobacter asburiae</i>	AAQ93677.2
<i>Agrobacterium vitis</i>	ACM37047.1			<i>Escherichia coli</i>	BAA02174.1
<i>Rhodospirillum centenum</i>	ACJ01230.1			<i>Pantoea citrea</i>	AAD23735.1
<i>Sinorhizobium medicae</i>	ABR59451.1			<i>Shigella dysenteriae</i>	EDX34459.1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ABN76440.1			<i>Proteus mirabilis</i>	CAR43687.1
<i>Sphingomonas sp</i>	EAT10486.1			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ABA76314.1
<i>Erythrobacter sp.</i>	EDL48207.1			<i>Psychromonas ingrahamii</i>	ABM04785.1
<i>Roseovarius sp</i>	ZP_01442666.1			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ABR84525.1
<i>Oceanicola granulosus</i>	ZP_01158268.1			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	P05465.1
<i>Oceanicola batsensis</i>	EAQ02270.1				
<i>Aurantimonas sp</i>	EAS49419.1				
<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	NC009719.1				
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	CAP57220.1				
<i>Methylobacterium extorquens*</i>	P16027.1				