



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de secuencia de la ALDH de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus* para determinar  
la presencia de dominios de unión a molibdo-  
pterina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AZUCENA MARALÍ LIRA SÁNCHEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella  
2011



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.

<p>1. Datos del alumno  Apellido paterno  Apellido materno  Nombre(s)  Teléfono  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Carrera  Número de cuenta</p>	<p>Lira  Sánchez  Azucena Maralí  56 85 52 46  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  303179463</p>
<p>2. Datos del tutor  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Dra.  Martha Lucinda  Contreras  Zentella</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Dr.  Arturo Carlos II  Becerra  Bracho</p>
<p>4. Datos del sinodal 2  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Dr.  Juan Luis  Chávez  Pacheco</p>
<p>5. Datos del sinodal 3  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Dra.  María Teresa  Lara  Ortiz</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>M. en C.  Aristides III  Sampieri  Hernández</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito.  Título   Número de páginas  Año</p>	<p>Análisis de secuencia de la ALDH de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> para determinar la presencia de dominios de unión a molibdo-pterina.  55 páginas  2011</p>

## Índice

<b>I.</b>	<b>Introducción</b> .....	1
1.1	Molibdoproteínas.....	1
1.2	Familia xantina oxidasa.....	3
1.3	La xantina oxidoreductasa (XOR) en los seres vivos.....	4
1.4	La XOR: su función como xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO).....	6
1.5	Mecanismos de conversión.....	8
1.6	Diferencias de la xantina oxidoreductasa (XDH/XO) entre organismos eucariontes y procariontes.....	9
<b>II.</b>	<b>Antecedentes</b> .....	11
2.1	Bacterias del ácido acético.....	11
2.2	Cadena respiratoria en <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	12
2.3	Aldehídos deshidrogenasas en bacterias ácido acéticas.....	13
2.4	La aldehído deshidrogenasa (ALDH) de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	15
<b>III.</b>	<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>IV.</b>	<b>Objetivos</b> .....	17
4.1	Objetivo general.....	17
4.2	Objetivos particulares.....	17
<b>V.</b>	<b>Materiales y método</b> .....	18
5.1	Bases de datos utilizadas.....	18
5.2	Análisis de secuencias de aminoácidos.....	18
5.3	Identificación de la secuencia que codifica a la ALDH de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	19
5.4	Identificación de dominios de unión a grupos prostéticos.....	20
5.5	Obtención de una secuencia consenso para el dominio de unión a molibdo-pterina.....	21
<b>VI.</b>	<b>Resultados</b> .....	23

<b>VII.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>40</b>
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>IX.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>47</b>
<b>X.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>48</b>

## Abreviaturas

SO	Sulfito oxidasa
DMSOR	Dimetil sulfóxido reductasa
FeMoco	Cofactor fierro molibdeno
MPT	Molibdo-pterina
MGD	Molibdo-pterina guanina dinucleótido
MCD	Molibdo-pterina citosina dinucleótido
MAD	Molibdo-pterina adenina dinucleótido
MHD	Molibdo-pterina hipoxantina dinucleótido
Mo-co	Cofactor molibdeno
Mo	Molibdeno
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxidoreductasa
FAD	Flavín adenín dinucleótido
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
EXAFS	Estructura por absorción de rayos X
BAA	Bacterias ácido acéticas
AOR	Aldehído oxidoreductasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AO	Aldehído oxidasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
GDH	Glucosa deshidrogenasa
NR	Nitrato reductasa
ON	Óxido nítrico
IsoOr	Isoquinolina 1-oxidoreductasa
PQQ	Pirrol quinolina quinona

## I. Introducción

### 1.1 Molibdoproteínas.

El molibdeno es un elemento traza esencial para microorganismos, plantas y animales <sup>[1, 2]</sup>. Este metal se encuentra asociado a un amplio rango de enzimas redox las cuales catalizan reacciones básicas en el metabolismo del nitrógeno, azufre y carbono <sup>[1]</sup>.

Las molibdeno hidroxilasas son enzimas de baja especificidad involucradas en una gran variedad de tipos de metabolismo oxidativo <sup>[3]</sup>. Generalmente catalizan la transferencia de un átomo de oxígeno, derivado de ó incorporado en el agua, desde ó hacia un sustrato en una reacción de oxidación-reducción de dos electrones <sup>[1]</sup>.

Con base en las similitudes de secuencias y propiedades espectroscópicas, las enzimas que contienen molibdeno se han dividido en 4 diferentes familias: la familia dimetil sulfóxido reductasa (DMSOR), la familia xantina oxidasa (XO), la familia sulfito oxidasa (SO) y la familia aldehído oxidoreductasa (AOR) <sup>[1, 4]</sup> (**Tabla 1**).

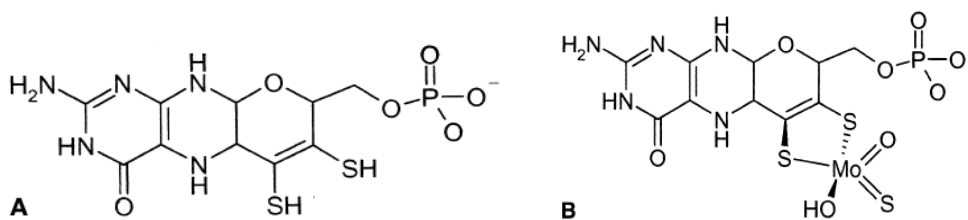
A excepción de la nitrogenasa que contiene un cofactor fierro molibdeno (FeMoco), las molibdeno hidroxilasas poseen un cofactor molibdeno (Mo-co) de bajo peso molecular <sup>[10]</sup>, con un anillo pterina reducido formando molibdo-pterina (MPT) <sup>[11]</sup>; esta molécula contiene una cadena lateral de ditioleno cíclica junto a un átomo de molibdeno (Mo). En la MPT, el Mo está pentacoordinado por dos átomos de ditioleno, por otro de azufre y dos átomos de oxígeno (**Fig. 1**).

El cofactor Mo-co se encuentra tanto en eucariontes como en procariontes, sin embargo en estos últimos puede variar, asociándose a dinucleótidos formando molibdo-pterina guanina dinucleótido (MGD) <sup>[13]</sup>, molibdo-pterina citosina dinucleótido (MCD) <sup>[14]</sup>, molibdo-pterina adenina dinucleótido (MAD) o molibdo-pterina hipoxantina dinucleótido (MHD) <sup>[15]</sup> (**Tabla 1**).

Familia	Enzima	Grupo prostético	Miembros representativos
<b>Sulfito oxidasa</b> <sup>[4]</sup>	Sulfito oxidasa <sup>[4]</sup>	<b>MPT</b> <sup>[5]</sup> <b>* MCD</b> <sup>[4]</sup>	<i>Homo sapiens, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Thiobacillus novellii</i> <sup>[4]</sup>
	Nitrato reductasa (asimilatoria) <sup>[4]</sup>		<i>Neurospora crassa, Chlorella vulgaris, Spinacea oleracea</i> <sup>[4]</sup>
<b>Xantina oxidasa</b> <sup>[4]</sup>	Xantina oxidoreductasa <sup>[4]</sup>		<i>Bos taurus, Homo sapiens, Gallus gallus</i> <sup>[4]</sup> , <i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Rhodobacter capsulatus</i> <sup>[5]</sup>
	Aldehído oxidasa <sup>[4]</sup>		<i>Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus</i> <sup>[4]</sup>
	* CO deshidrogenasa <sup>[4]</sup>		<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> (antes <i>Pseudomonas carboxydoflava</i> ) <sup>[5,6,7]</sup>
	* Quinolina 2 oxidoreductasa <sup>[4, 8]</sup>		<i>Pseudomonas putida 86, Rhodococcus spec. B1</i> <sup>[5]</sup>
	* Aldehído oxidoreductasa <sup>[4]</sup>		<i>Desulfovibrio gigas</i> <sup>[4]</sup>
<b>Aldehído ferredoxina oxidoreductasa</b> <sup>[4]</sup>	Aldehído ferredoxina oxidoreductasa <sup>[4]</sup>		<i>Brevundimonas diminuta</i> (antes <i>Pseudomonas diminuta 7</i> ) <sup>[8]</sup> , <i>Pseudomonas carboxydoflava</i> <sup>[5]</sup>
	Formaldehído ferredoxina oxidoreductasa <sup>[4]</sup>		<i>Pyrococcus furiosus</i> <sup>[4]</sup>
<b>DMSO reductasa</b> <sup>[4]</sup>	Dimetil sulfóxido reductasa <sup>[4]</sup>		<b>MGD</b> <sup>[5]</sup>
	Nitrato reductasa (disimilatoria) <sup>[4]</sup>	<i>Escherichia coli (narZYW), Escherichia coli (napABCD)</i> <sup>[4]</sup> , <i>Rhodobacter sphaeroides, Pseudomonas carboxydoflava</i> <sup>[5]</sup>	
	Formato deshidrogenasa <sup>[4]</sup>	<i>Escherichia coli (fdnGH1), Escherichia coli (fdoGH1), Wolinella succinogenes</i> <sup>[4]</sup> , <i>Methanobacterium formicicum</i> <sup>[5]</sup>	
	Formato deshidrogenasa con W <sup>[4]</sup>	<i>Clostridium thermoaceticum</i> <sup>[4]</sup>	
	N-Formilmetanofuran deshidrogenasa con W <sup>[4]</sup>	<i>Methanobacterium wolfei</i> <sup>[4]</sup> , <i>Methanosarcina barkeri, Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <sup>[5]</sup>	
	Trimetilamina-N-oxidoreductasa <sup>[4]</sup>	<i>Escherichia coli, Rhodobacter sphaeroides</i> <sup>[4]</sup>	
	Biotin sulfóxido reductasa <sup>[4]</sup>	<i>Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Rhodobacter sphaeroides</i> <sup>[4]</sup>	
	Pirogalol-floroglucinol transhidroxilasa <sup>[4]</sup>	<i>Pelobacter acidigallici</i> <sup>[4]</sup>	
	Formilmetanofuran deshidrogenasa <sup>[4]</sup>	<b>MAD</b> <sup>[5]</sup>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <sup>[5]</sup>
	Formilmetanofuran deshidrogenasa <sup>[4]</sup>	<b>MHD</b> <sup>[5]</sup>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <sup>[5]</sup>

**Tabla 1.** Familias de enzimas que contienen Mo-co y miembros representativos. **MPT**, molibdo-pterina, **MGD**, molibdo-pterina guanina dinucleótido, **MAD**, molibdo-pterina adenina dinucleótido; **MHD**, molibdo-pterina hipoxantina dinucleótido, \* **MCD**, molibdo-pterina citosina dinucleótido.





**Fig. 1 (A)** Molibdo-pterina. **(B)** El cofactor Mo-co, formado por molibdeno ligado a molibdo-pterina a través de átomos de azufre del grupo ditioleno. La forma sulfo activa del cofactor es mostrada. En la forma desulfo (inactiva), el Mo=S es reemplazado por Mo=O <sup>[12]</sup>.

## 1.2 Familia xantina oxidasa.

La familia xantina oxidasa es la más grande y más diversa entre las enzimas que contienen el cofactor molibdeno. Entre los miembros de esta familia se encuentran XOR's de origen procarionte y eucarionte, aldehídos oxidadas <sup>[1, 16]</sup>, la 4-hidroxibenzoil CoA reductasa de *Rhodopseudomonas palustris* y *Thauera aromatica* <sup>[17, 18]</sup>, la AOR de *Desulfovibrio gigas* <sup>[1]</sup>, la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *Brevundimonas diminuta* 7, la quinolina 2-oxidoreductasa de *Pseudomonas putida* 86, la quinaldina 4-oxidasa de *Arthrobacter* sp. Rù61a <sup>[8]</sup>, la nicotina deshidrogenasa de *Arthrobacter oxydans* <sup>[19]</sup> y varias carbono monóxido deshidrogenasas como la de *Hydrogenophaga pseudoflava* <sup>[16, 6]</sup>. La AOR de *D. gigas* es la única enzima que ha sido caracterizada estructuralmente <sup>[4]</sup>.

La arquitectura general de la mayoría de los miembros de esta familia parece comprender tres dominios; el dominio N-terminal que posee dos diferentes grupos [2Fe-2S], seguido de un dominio de unión a FAD (el cual no se encuentra en la AOR de *D. gigas*) <sup>[3, 20]</sup> y finalmente el dominio que contiene el cofactor molibdeno que se puede presentar como molibdo-pterina, o bien en diferentes formas dinucleótido de la molibdo-pterina (adenina, citosina, guanina e hipoxantina) <sup>[8]</sup> (**Tabla 1 y 2**).

Las enzimas de la familia xantina oxidasa, se encargan de catalizar reacciones de hidroxilación del siguiente tipo:



donde RH puede ser un aldehído o heterociclo aromático <sup>[4]</sup>

Esta estequiometría es única entre los sistemas biológicos que catalizan la hidroxilación de sus sustratos en presencia de un aceptor de electrones. El átomo de oxígeno incorporado en su producto se origina a partir del agua <sup>[8]</sup>.

El mecanismo de reacción de éstas y otras enzimas relacionadas suele dividirse en reacciones reductivas y oxidativas del ciclo catalítico, dependiendo de la enzima. Es en la reacción de reducción en donde el centro molibdeno se reduce del estado Mo(VI) al Mo(IV) en el curso de la hidroxilación <sup>[22]</sup>.

### **1.3 La xantina oxidoreductasa (XOR) en los seres vivos.**

La xantina oxidoreductasa (XOR) es una molibdoflavoenzima perteneciente a la familia de las xantina oxidasas que ha sido aislada y caracterizada bioquímicamente de distintas fuentes biológicas desde bacterias hasta el hombre <sup>[23, 24]</sup>. La proteína mejor caracterizada es indudablemente la enzima purificada de leche bovina <sup>[12]</sup> (**Tabla 2**).

Esta enzima contiene varios grupos prostéticos entre ellos el molibdeno, el cual forma parte de su sitio activo; además presenta 2 grupos [2Fe-2S] y en la mayoría de los casos un grupo flavín adenín dinucleótido (FAD). Estos grupos prostéticos participan en la transferencia de electrones del centro molibdeno a un aceptor de electrones <sup>[25]</sup>.

Las enzimas son definidas como oxidasas o deshidrogenasas dependiendo del entorno particular del grupo prostético flavina, en la proteína <sup>[26]</sup>. La diferencia entre las funciones de la XO y XDH se basa en la preferencia de cada una por oxidar un determinado tipo de sustrato <sup>[27]</sup>.

Enzima	Fuente	Masa molecular (kDa)	Masa molecular de subunidades (kDa)	Cofactor molibdeno	Grupos FeS	Flavina u otro cofactor
XOR	<i>Pseudomonas putida</i> 86	550	91.0, 46.2	Mo-MPT ((3.9) Mo)	FeSI, FeSII (14.5) Fe, (15.8) S	(4.1) FAD
XOR	<i>Pseudomonas synxantha</i> A3	540	76, 54	n.d. (flavoproteína con hierro)		n.d.
XOR	<i>Comamonas acidovorans</i>	287	90, 60	(2) Mo-MPT ((2.2) Mo)	FeSI, FeSII (8) Fe	(2) FAD
XOR	<i>Rhodobacter capsulatus</i> B10S	275	83.2, 49.3	Mo-MPT	FeSI, FeSII	FAD
XOR	<i>Rhodobacter capsulatus</i> Al	345	84.2	(1.4) Mo	(8.4) Fe, (10.5) S	(1.8-2) FAD
XOR	<i>Pseudomonas putida</i> Fu1	300	55, 25	(1.6) Mo	(5.8) Fe, (2.4) S	(0.9) cit. <i>b</i>
XOR ligada a ferricianida	<i>Pseudomonas putida</i> 40	255	72	(Mo)	n.d.	hemo
XOR	<i>Veillonella atypica</i>	129	82.4, 28.5, 18.4	Mo-MCD ((0.86) Mo)	(1.75) Fe, (1.61) S	(0.68) FAD
XOR	<i>Eubacterium barkeri</i>	530	81, 30, 17.5	MPT dinucleótido ((2.3) Mo; (1.1) W)	(17.5) Fe, (18.4) S (0.95) Se	(2.8) FAD
XOR	<i>Streptomyces cyanogenus</i>	125	67	(<0.41) Mo	(14.3) Fe, (1.55) S	(1.65) FAD
XOR	<i>Arthrobacter</i> sp. S-2	146	79	(Mo) (n.d.)	(Fe, S) (n.d.)	(FAD) (n.d.)
XOR	Leche de vaca	~300	~150	(2) Mo-MPT	FeSI, FeSII (8 Fe), (8) S	(2) FAD
XDH	<i>Drosophila melanogaster</i> 300	300	146.9	(2) Mo-MPT	FeSI, FeSII	(2) FAD

**Tabla 2. Propiedades de XOR's procariontes y dos XOR's eucariontes** <sup>[21]</sup>.

XOR funciona como deshidrogenasa y oxidasa; XDH funciona solo como deshidrogenasa.

Los valores que se encuentran entre paréntesis se refieren a mol mol<sup>-1</sup> de enzima.

La XDH se caracteriza por presentar una alta actividad de xantina/NAD<sup>+</sup> y una baja actividad de xantina/O<sub>2</sub>. En contraste, la XO posee alta actividad de xantina/O<sub>2</sub> y poca actividad de xantina/NAD <sup>[28]</sup>.

Generalmente las XOR's son encontradas *in vivo* en su forma deshidrogenasa, por ejemplo la XOR de hígado de rata <sup>[29]</sup>, la cual es dependiente de NAD<sup>+</sup> y a diferencia de la forma oxidasa puede ser inhibida por NADH <sup>[30]</sup>. Bajo condiciones fisiológicas la

XDH representa el 80% de la enzima activa mientras que la XO solo constituye el 20% restante <sup>[31]</sup>.

La XOR se ha aislado de leche bovina tanto en forma de XO como de XDH <sup>[32]</sup>. Existen también formas inactivas de la enzima que son: desulfo, demolibdo y deflavoenzima <sup>[12]</sup>.

#### 1.4 La XOR: su función como xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO).

La xantina oxidoreductasa (XOR) lleva a cabo la oxidación de una amplia variedad de sustratos entre los que se encuentran purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos. La XOR también puede actuar como una NADH oxidasa <sup>[33, 12]</sup>. Al oxidar hipoxantina a xantina, esta enzima produce ácido úrico durante el catabolismo de las purinas <sup>[34]</sup> (Fig. 2 y 3).



**Fig. 2** Actividad enzimática de la XOR. Las reacciones químicas catalizadas por la XOR incluyen la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico.

La oxidación es catalizada por dos formas funcionales distintas de la XOR que se pueden interconvertir: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO) <sup>[34, 31]</sup>. Ambas formas funcionales son capaces de reducir  $O_2$ , sin embargo cuando la XDH se une al  $NAD^+$ , la unión del  $O_2$  se inhibe <sup>[24]</sup>.

Las XOR's de *Micrococcus lactilyticus*, de leche bovina, de músculo esquelético de ratón, y XDH de hígado de ave entre otras, son capaces de realizar esta actividad con oxígeno como aceptor de electrones [30].

La XOR de leche es capaz de utilizar oxígeno como aceptor de electrones pero no  $\text{NAD}^+$ , ni ferredoxina; en cambio la XDH de hígado de pollo emplea  $\text{NAD}^+$  fisiológicamente y tiene una reacción mínima con oxígeno y ferredoxina. A diferencia de éstas, el aceptor preferente de electrones de la XDH de *Micrococcus lactilyticus* es ferredoxina mientras que el oxígeno es un sustituto poco eficiente y  $\text{NAD}^+$  resulta ineficaz. También puede utilizar ferricianida, citocromo *c* y colorantes como dicloroindofenol, azul de metileno y nitro azul de tetrazolio, como aceptores de electrones [36, 23].

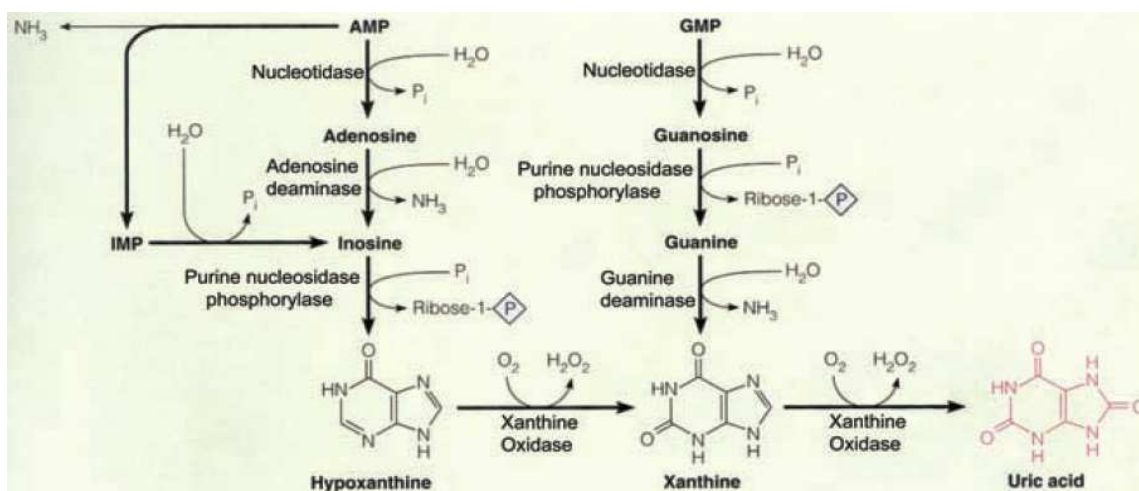
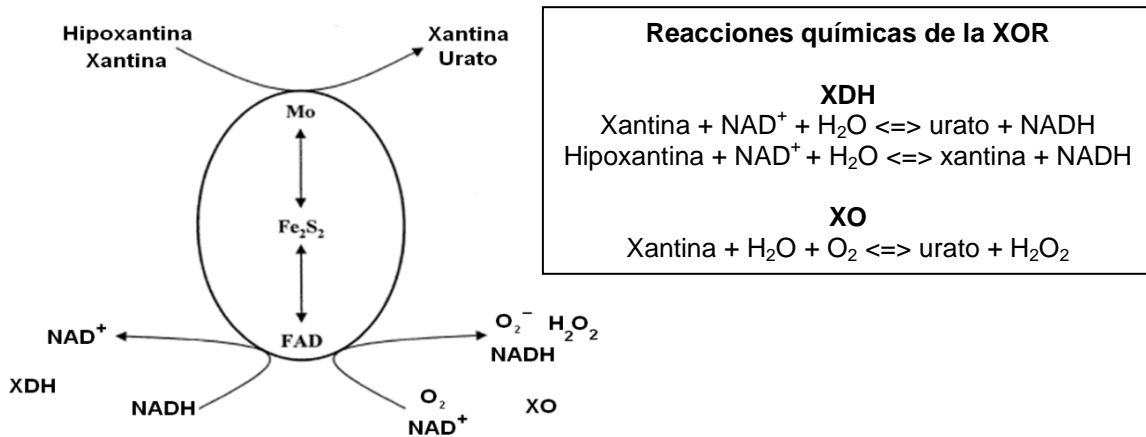


Fig. 3 La ruta de degradación de purinas [35].

Con base en estudios realizados con molibdoenzimas a través de métodos espectroscópicos como EPR y EXAFS, se dice que la reducción de sustratos ocurre en el centro Mo-co, reduciéndose este último del estado  $\text{Mo(VI)}$  al estado  $\text{Mo(IV)}$  [37].  $\text{O}_2$ ,  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  actúan en el sitio de la flavina [3].

Entre los centros redox se da un equilibrio rápido y el  $\text{NADH}$  transfiere sus electrones intramolecularmente al FAD, donde la oxidación fisiológica ocurre. La transferencia de electrones intramolecular entre Mo-co y FAD es mediada por los centros  $[2\text{Fe-2S}]$ . Los electrones pasan del centro FAD a  $\text{NAD}^+$  en el caso de la forma deshidrogenasa o

bien a oxígeno molecular cuando se trata de la forma oxidasa con el fin de producir NADH, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y un anión superóxido ( $O_2^-$ ), respectivamente <sup>[38, 12]</sup> (**Fig. 4**). La enzima es inhibida por alopurinol <sup>[39]</sup>.



**Fig. 4** Diagrama esquemático mostrando la oxidación catalizada por XOR de xantina e hipoxantina (representando los sustratos reducidos) en el sitio Mo, y de NADH en el sitio FAD. La reducción del  $NAD^+$  u oxígeno molecular toma lugar en el FAD <sup>[12]</sup>.

### 1.5 Mecanismos de Conversión.

Durante la purificación ó almacenaje de la XOR, ocurre la conversión de la forma deshidrogenasa a la forma oxidasa <sup>[29, 40]</sup>. El proceso de conversión de XDH a XO se produce mediante dos tipos de mecanismos: la conversión reversible y la conversión irreversible.

#### a) Conversión reversible

La conversión reversible se lleva a cabo por oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo como cisteína o glutatión disulfuro <sup>[41]</sup>, formándose puentes disulfuro, los cuales son responsables de la conversión de XDH a XO. La reducción de estos enlaces opera en sentido contrario <sup>[24]</sup>.

## b) Conversión irreversible

Por otra parte, la conversión irreversible se efectúa a través de la proteólisis parcial de la XOR. Esta puede realizarse con tripsina ó con quimotripsina <sup>[41]</sup>. Únicamente la proteólisis con quimotripsina previene la conversión reductiva de XO a XDH. El cambio conformacional que se da durante la transformación de oxidasa a deshidrogenasa permite que la fenilalanina 560 (phe560) sea accesible al medio, lo que facilita la acción de la quimotripsina sobre este residuo cortando a la proteína en el sitio de unión a FAD, sin afectar el sitio de unión de unión del O<sub>2</sub>. Esto da como resultado que la enzima funcione como oxidasa pero no como deshidrogenasa <sup>[24]</sup>.

La oxidación de grupos sulfhidrilo y la proteólisis ocurre en el dominio de la flavina, sitio donde actúa el NAD, dando lugar a las interconversiones entre las formas deshidrogenasas y oxidasas de las enzimas <sup>[3]</sup>.

Además de los tratamientos ya mencionados, existen otros que pueden convertir la XDH en XO *in vitro*, estos incluyen calentamiento a 37° C, almacenaje a -20° C, anaerobiosis y perturbación con solventes orgánicos <sup>[41, 42]</sup>.

### 1.6 Diferencias de la xantina oxidoreductasa (XDH/XO) entre organismos eucariontes y procariontes.

Las XDH's/XO's eucariontes son homodímeros de 300 kDa <sup>[43]</sup>. Gracias a estudios de cristalografía de rayos X, la secuenciación de cDNA's o de los genes, alineamientos de secuencias de aminoácidos y comparaciones de afinidad se ha determinado que cada enzima se encuentra generalmente dividida en tres fragmentos. El fragmento de ~20 kDa corresponde al dominio NH<sub>2</sub>-terminal, en el cual existen 8 cisteínas bien conservadas ligando átomos de hierro, las cuales unen los dos grupos hierro azufre [2Fe-2S] tipo ferredoxina. El segundo fragmento ha sido asignado a una porción intermedia con una masa molecular de ~40 kDa que posee una molécula de FAD además de sitios de unión a NAD<sup>+</sup> y finalmente el dominio -COOH terminal siendo este el más grande con una masa molecular de ~85 kDa y con unión al cofactor molibdeno (Moco) <sup>[31, 28, 3, 2]</sup>.

Las XOR's procariontes difieren considerablemente con respecto a sus masas moleculares, composición de subunidades e inclusive a sus centros redox activos. La caracterización bioquímica de las XOR's purificadas revela que poseen masas moleculares variables que van desde los 125 kDa hasta los 550 kDa aproximadamente y además pueden encontrarse como monómeros, heterodímeros y heterotrímeros [21, 12, 43].

La XDH de *Pseudomonas putida* Fu1, está compuesta de dos subunidades que poseen molibdeno, centros fierro-azufre pero carecen de flavina; en su lugar presentan cit *b* [21]. Las XDH's de *Clostridium acidurici* y *Clostridium cylindrosporum* necesitan selenio para llevar a cabo su actividad [44].

*P. putida* 86, *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas acidovorans* y *Rhodobacter capsulatus* así como XOR's de origen eucarionte contienen MPT [21].

Análisis de secuencias de DNA revelan que esta enzima está codificada por dos genes, *xdhAB*. El arreglo de dominios de XDH de *Rhodobacter capsulatus*, incluye los sitios de unión de los 2 grupos [2Fe2S], FAD y el cofactor molibdeno (Moco), similar al que se encuentra en eucariontes. Sin embargo, los dominios de unión de fierro-azufre y el cofactor FAD están localizados en la subunidad XDHA mientras que en la subunidad XDHB, se localiza el dominio de unión a Moco. El gen *xdhC* fue identificado y caracterizado como el tercer gen en el operón *xdhABC*, demostrando que se encontraba inmediatamente río abajo de *xdhAB*; sin embargo el producto de este gen, la subunidad XDHC no es una subunidad activa de la XDH, aunque si es requerida para su actividad. Al caracterizar una cepa mutante de *xdhC*<sup>-</sup> se encontró que carecía de MPT y se asumió que la subunidad XDHC está involucrada en la inserción de MPT o actúa como una chaperona favoreciendo el plegamiento adecuado de la enzima durante o después de la inserción del cofactor MPT [43, 45].



## II. Antecedentes

### 2.1 Bacterias del ácido acético.

Las bacterias ácido acéticas (BAA) son un grupo monofilético dentro de la familia Acetobacteriaceae que pertenece al orden Rhodospirillales como parte de las  $\alpha$ -Proteobacteria. Las bacterias ácido acéticas están representadas por 10 géneros que son: Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, Kozakia<sup>[46]</sup>, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia y Granulibacter<sup>[47]</sup>.

Estas bacterias se caracterizan por realizar la oxidación incompleta de etanol, azúcares y otros alcoholes, proceso conocido como fermentación oxidativa, acumulando grandes cantidades de los productos correspondientes en el medio de cultivo. El proceso de mayor relevancia es la oxidación del etanol a ácido acético (producción de vinagre), proceso que llevan al cabo especialmente las familias Acetobacter y Gluconacetobacter. Otros productos de la fermentación oxidativa de gran importancia industrial son D-gluconato, L-sorbose y dihidroxiacetona<sup>[46, 48]</sup>.

Este proceso metabólico es catalizado por las deshidrogenasas membranales, características de estas bacterias y está acoplado a la cadena respiratoria; los electrones generados en la oxidación de los sustratos son transferidos a la oxidasa terminal vía la ubiquinona endógena<sup>[48]</sup>. Las cadenas de transporte de electrones de las bacterias ácido acéticas en general, contienen citocromo *c*, ubiquinol y una oxidasa terminal de tipo *o* ó tipo *d*, aunque en *Ga. diazotrophicus* las oxidasas presentes son de tipo *ba* ó *bb<sub>3</sub>*<sup>[49]</sup>. Los géneros Gluconobacter, Gluconacetobacter, Acidomonas, Kozakia y Asaia usan ubiquinona de tipo Q<sub>10</sub> como transportador de electrones, mientras que Acetobacter posee ubiquinona de tipo Q<sub>9</sub><sup>[46]</sup>.

## 2.2 Cadena respiratoria en *Ga. diazotrophicus*.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria diazótrofa, aerobia obligada. La paradoja que involucra la fijación de nitrógeno en presencia de oxígeno se resuelve con mecanismos de "protección a la nitrogenasa" del efecto inhibitorio del gas. Los mecanismos propuestos son la protección respiratoria, donde la muy alta tasa respiratoria a nivel membranal, resultado de la actividad de las deshidrogenasas presentes, mantiene una concentración suficientemente baja de oxígeno intracelular <sup>[50]</sup>; además, esta alta actividad respiratoria genera grandes cantidades de ATP, el cual es requerido para que se lleve al cabo la fijación de nitrógeno. El otro mecanismo es el de la protección conformacional, donde se forma de manera transitoria un complejo entre la proteína FeSII Shethna y la nitrogenasa, cuando se presentan altas concentraciones de oxígeno <sup>[51]</sup>.

La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* se compone de una gran variedad de deshidrogenasas membranales que donan sus electrones a la UQ<sub>10</sub> endógena. Las enzimas para NADH (NADH deshidrogenasa) y succinato (succinato deshidrogenasa), tienen su sitio catalítico hacia el citoplasma de la membrana, mientras que los sitios catalíticos de la PQQ-glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH) entre otras, están orientados hacia el espacio periplásmico <sup>[49]</sup> (Fig. 5).

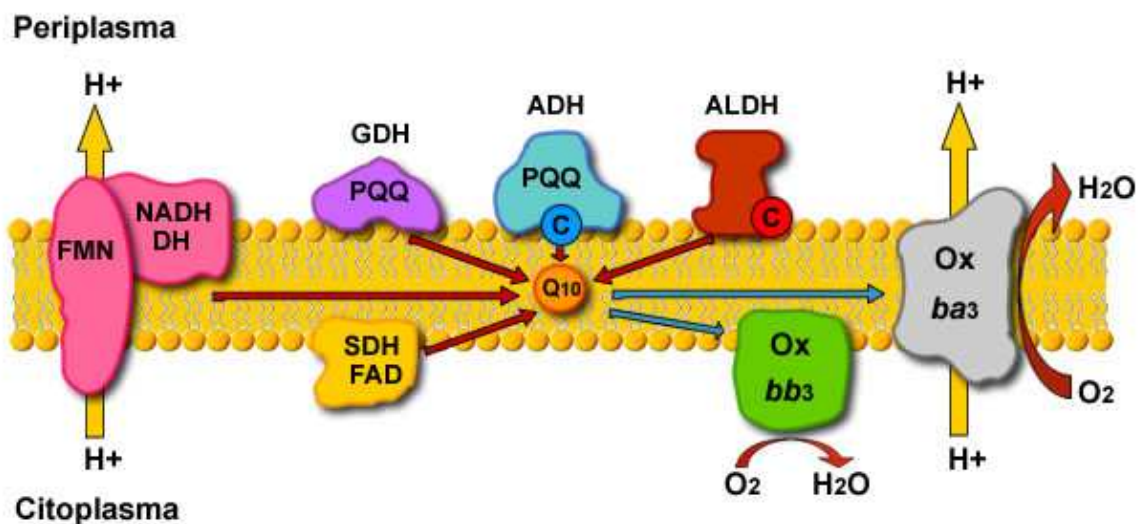


Fig. 5 Cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* en condiciones de fijación de nitrógeno.

Modificado de Lehninger (1993).

### 2.3 Aldehídos deshidrogenasas en bacterias ácido acéticas.

En las bacterias ácido acéticas, la mayoría de las enzimas que participan en la fermentación oxidativa contienen pirrol quinolina quinona (PQQ) como grupo prostético y reciben el nombre de quinoproteínas <sup>[52]</sup>; algunas de estas enzimas además tienen citocromo *c* como un grupo prostético adicional; a estas proteínas se les conoce como hemoquinoproteínas <sup>[53]</sup>.

La aldehído deshidrogenasa (ALDH) es también una deshidrogenasa membranal con su sitio activo orientado hacia el periplasma, que cataliza la oxidación de acetaldehído a ácido acético y por tanto es una enzima clave en la fermentación oxidativa del alcohol. La naturaleza de los grupos prostéticos asociados a la ALDH en las bacterias ácido acéticas, ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo <sup>[52, 53]</sup>.

Dentro de la familia de las bacterias ácido acéticas, se han purificado y caracterizado las ALDH's de diferentes especies. Los reportes nos muestran que existe una gran variabilidad tanto en su composición oligomérica como en sus grupos prostéticos <sup>[53-59]</sup> (**Tabla 3**).

Las ALDH's purificadas presentan de dos a tres subunidades cuyos pesos moleculares relativos van de entre 75 y 86 kDa para la subunidad catalítica, de 45 a 66 kDa para la subunidad intermedia y de 14 a 19 kDa para la subunidad pequeña. La ALDH de *G. suboxydans*, *A. aceti*, *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus* contienen hemo C en la subunidad intermedia <sup>[54, 55, 56]</sup>, mientras que ALDH's de *A. polyoxogenes* y *A. rancens* no contienen hemo C <sup>[57, 58]</sup>.

El espectro de absorción de las ALDH's de *A. aceti* y *G. suboxydans* presenta gran similitud con el de la PQQ-ADH, por lo que se ha postulado en estas bacterias a la ALDH como una enzima dependiente de PQQ <sup>[60]</sup>.

**Tabla 3.** Propiedades de la ALDH membranal de bacterias ácido acéticas.

Propiedad	Fuente					
	<i>Acetobacter polyoxogenes</i>	<i>Gluconobacter suboxydans</i>	<i>Acetobacter rancens</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Gluconacetobacter europaeus</i> (antes <i>Acetobacter europaeus</i> )	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
	57	54	58	56	59	53
Masa molecular (kDa)	90	140	145	157	ND	129.7
Subunidades (kDa)	Sub I (75), Sub II (19)	Sub I (86), Sub II (55)	Sub I (78), Sub II (66)	Sub I (78), Sub II (45), Sub III (14)	Sub I (79), Sub II (46), Sub III (17)	Sub I (79.7), Sub II (50)
<b>Grupos prostéticos:</b>						
PQQ	(Sub I)	(Sub I)	(Sub I)	(Sub I)	nd	(Sub I)
Hemo C	ND	(Sub II)	ND	(Sub II)	3 (Sub II)	3 (Sub II)
Hemo B	ND	ND	ND	ND	(Sub I)	(Sub I)
[2Fe:2S]	nd	Nd	nd	nd	(Sub III)	ND
Molibdo- pterina	nd	Nd	nd	nd	(Sub I)	nd

**ND** = No detectado, **nd** = No determinado

**Sub I:** subunidad catalítica, **Sub II:** subunidad intermedia, **Sub III:** subunidad pequeña.

(Gómez Manzo, 2010)

Takemura y col. <sup>[52]</sup> mediante mutagénesis química obtuvieron una cepa mutante de *Acetobacter* sp. BPR2001 la cual no producía PQQ. Esta cepa carecía de actividad de ADH y GDH, enzimas conocidas por presentar PQQ como grupo prostético. Sin embargo, la bacteria era capaz de oxidar aldehído. De acuerdo a Takemura y col. <sup>[52]</sup>, este hecho indica que el grupo prostético en la ALDH de bacterias ácido acéticas no es PQQ. Es importante señalar que en este trabajo no se purificó a la enzima

responsable de la oxidación de aldehído, por lo que no podemos asegurar que se trate de la ALDH membranal. También se ha reportado un tipo inusual de ALDH independiente de NAD(P)<sup>+</sup> en *Comamonas testosteroni* (antes *Pseudomonas testosteroni*). Esta enzima posee una masa molecular de 186 kDa y consiste de 2 subunidades de igual tamaño (92,000). Sus grupos prostéticos son FAD, un grupo [4Fe-4S] y molibdo-pterina como cofactor pero no PQQ<sup>[61]</sup>.

Por otro lado, Thurner y col.<sup>[59]</sup> purificaron a la ALDH y clonaron el operón que codifica para esta enzima de *Ga. europaeus* (antes *A. europaeus*); a partir de la secuencia del operón dedujeron la secuencia de aminoácidos de las tres subunidades que componen a la proteína. El análisis de la secuencia de la subunidad catalítica y su comparación con la secuencia de otras proteínas, como la subunidad catalítica de la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *Brevundimonas diminuta* 7 (antes *Pseudomonas diminuta*)<sup>[59]</sup>, que presenta una molibdo-pterina citosina dinucleótido y un centro molibdeno tipo monooxo-monosulfido<sup>[9]</sup> y algunas XOR's, les permite identificar en la secuencia de la subunidad catalítica la presencia de 8 aminoácidos que se asocian con el dominio de unión a molibdo-pterina<sup>[59]</sup>. Con estos resultados y apoyándose en lo reportado por Takemura y col., postulan que el grupo prostético de la ALDH en *Ga. europaeus* es una molibdo-pterina<sup>[52]</sup>, de la misma manera que se postula para *A. polyoxogenes*<sup>[57]</sup>.

#### **2.4 La aldehído deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*.**

En el laboratorio del Dr. Escamilla, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, Gómez Manzo y col.<sup>[53]</sup>, purificaron la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. Sus resultados reportan a la proteína como una enzima heterodimérica, que contiene PQQ y citocromo *b* como grupos prostéticos en la subunidad catalítica y citocromos tipo *c* en la subunidad pequeña (análisis electroforético, espectroscopia de fluorescencia, EPR y HPLC)<sup>[53]</sup>.

Utilizando diferentes bases de datos, Gómez Manzo y col.<sup>[53]</sup> localizaron dentro del genoma de esta bacteria, ortólogos a los genes que codifican para las tres subunidades de la ALDH de *Ga. europaeus*. La presencia de un ortólogo del gen que

codifica para la subunidad III de *Ga. europaeus* (de ~20 kDa) en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* sugiere que esta subunidad se encuentra codificada y que posiblemente se haya perdido durante la purificación.

Se concluyó que en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* se encuentra un operón que codificaba para 3 subunidades de la ALDH <sup>[53]</sup>. La organización del operón es idéntica respecto a la de *Ga. europaeus* en la que el orden es *aldhB*, *aldhC*, *aldhA*, encontrándose también de manera similar el gen codificante de la GDH río arriba del operón <sup>[59]</sup>.

La identificación de los genes que codifican para la ALDH en *Ga. diazotrophicus* abrió la posibilidad de desarrollar un análisis "*in silico*" de la secuencia de aminoácidos de su subunidad catalítica. Este análisis se desarrollo en el laboratorio del Dr. Escamilla tanto en búsqueda de un dominio de unión a PQQ (tesis de licenciatura de Emanuel García Noriega <sup>[74]</sup>), como un dominio de unión a molibdo-pterina (presente tesis).

Tratando de definir a través de un análisis "*in silico*" cuál de los dos grupos prostéticos está asociado a la ALDH membranal de *Ga. diazotrophicus*, decidimos obtener una secuencia consenso del dominio de unión a la molibdo-pterina, analizando las secuencias de esta proteína desde eucariontes hasta procariontes, especialmente las secuencias de las bacterias ácido acéticas.

Basándonos en la secuencia del dominio de unión a molibdo-pterina obtenido, buscamos en la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* el dominio correspondiente.

### III. Hipótesis

Si la ALDH membranal de *Ga. diazotrophicus* es una molibdo-pterina, deberemos encontrar en la secuencia de aminoácidos de su subunidad catalítica, su dominio de unión, tal y como se presenta en la secuencia de aminoácidos de las XOR's, que son las enzimas representativas con este grupo prostético asociado.

### IV. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general.

- Investigar si el grupo molibdo-pterina es el grupo prostético asociado a la ALDH membranal de *Ga. diazotrophicus*, por medio de la comparación de la secuencia de aminoácidos de su subunidad catalítica, con una secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de este grupo prostético en enzimas representativas y de bacterias ácido acéticas.

#### 4.2 Objetivos particulares.

- Identificar el dominio de unión a molibdo-pterina reportada para la familia de la xantina oxidasa representativa en eucariontes y procariontes. Obtener una secuencia consenso.
- Localizar la secuencia de aminoácidos de la xantina deshidrogenasa en bacterias ácido acéticas así como en el genoma de *Ga. diazotrophicus*, e identificar el dominio de unión a molibdo-pterina.
- Comparar la secuencia del dominio de unión a molibdo-pterina en las bacterias del ácido acético con la secuencia consenso generada; obtener un nuevo consenso del dominio.
- Comparar la secuencia consenso del dominio obtenida con la reportada para la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, buscando identificar la secuencia del dominio de unión a molibdo-pterina.

## V. Materiales y métodos

### 5.1 Bases de datos utilizadas.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas utilizadas en este estudio se encuentran registradas en diferentes bases de datos:

- Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), el cual provee acceso a información biomédica así como genética (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)<sup>[69]</sup>.
- Instituto de Bioinformático Europeo (EBI) que es a su vez una organización académica que forma parte del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL). EBI, es un centro de búsqueda y servicios bioinformáticos, que maneja bases de datos de información biológica relacionada a ácidos nucleicos, secuencias de proteínas y estructuras macromoleculares (<http://www.ebi.ac.uk/>)<sup>[70]</sup>.
- Base de datos de Braunschweig (BRENDA) (<http://www.brenda-enzymes.org/>)<sup>[71]</sup>.

Se consultó también la base de datos de Pfam, que es una colección de familias de proteínas, cada una representada por alineamientos múltiples de secuencia y modelos ocultos de Márkov (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)<sup>[72]</sup>.

Las proteínas se componen de una o más regiones funcionales, llamadas dominios. Diferentes combinaciones de dominios brindan un rango diverso de proteínas encontradas en la naturaleza. La identificación de los dominios en cada proteína puede proporcionar una visión de su función, por esta razón fue consultada la base de datos de dominios conservados (CDD) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)<sup>[64]</sup>.



## 5.2 Análisis de secuencias de aminoácidos.

Los análisis de secuencias de aminoácidos se realizaron empleando los siguientes programas:

El programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fue utilizado para llevar a cabo la búsqueda de homologías entre secuencias de aminoácidos que se encuentran almacenadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)<sup>[62]</sup>.

Los alineamientos de secuencias de aminoácidos se realizaron con ayuda del programa CLUSTAL W2 el cual se encuentra disponible en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)<sup>[63]</sup>.

## 5.3 Identificación de la secuencia que codifica a la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

Para poder identificar la secuencia que codifica para la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP\_001603512.1 ó CAP57224.1 (Bertalan y col.<sup>[65]</sup>) y No. de acceso GenBank: YP\_002277431.1 ó ACI52816.1 (Lucas y col.<sup>[66]</sup>) se utilizaron las secuencias de los péptidos internos analizados de la enzima ya purificada por Gómez Manzo en el laboratorio del Dr. Escamilla del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

En las bases de datos mencionadas se buscaron y obtuvieron las secuencias de las siguientes proteínas:

**Tabla 4.** Localización de diferentes secuencias de proteínas.

	<b>Enzima</b>	<b>Organismo</b>	<b>Número de acceso</b>
1	ALDH subunidad III	<i>Ga. europaeus</i>	GenBank: CAA69955.1
2	ALDH subunidad I	<i>Ga. diazotrophicus</i> PAL 5	GenBank: YP_001603512.1 o CAP57224.1 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup> ) y GenBank: YP_002277431.1 o ACI52816.1 (Lucas y col. <sup>[66]</sup> ).
3	ALDH subunidad III	<i>Ga. diazotrophicus</i> PAL 5	GenBank: YP_001603512.1 o CAP57224.1 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup> ) y GenBank: YP_002277431.1 o ACI52816.1 (Lucas y col. <sup>[66]</sup> )

4	Isoquinolina 1-oxidoreductasa	<i>B. diminuta</i>	GenBank: CAA88754.1
5	XO purificada a partir de leche bovina	<i>Bos taurus</i>	PDB: 1FIQC
6	XDHC	<i>G. oxydans</i> 621 H	YP_191085.1 o GenBank: AAW60429.1
7	XDHB	<i>G. oxydans</i> 621 H	YP_191086.1 o GenBank: AAW60430.1
8	XDHA	<i>G. oxydans</i> 621 H	YP_191087.1 o GenBank: AAW60431.1
9	XDHC	<i>Ga. diazotrophicus</i> PAL 5	GenBank: CAP55944.1 o YP_001602246 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup> ) GenBank: ACI50021.1 o YP_002274636 (Lucas y col. <sup>[66]</sup> )
10	XDHB	<i>Ga. diazotrophicus</i> PAL 5	GenBank: CAP55945.1 o YP_001602247 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup> ) GenBank: ACI50022.1 o YP_002274637 (Lucas y col. <sup>[66]</sup> )
11	XDHA	<i>Ga. diazotrophicus</i> PAL 5	GenBank: CAP55946.1 o YP_001602248 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup> ) GenBank: ACI50023.1 o YP_002274638 (Lucas y col. <sup>[66]</sup> )

#### 5.4 Identificación de dominios de unión a grupos prostéticos.

La secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* obtenida fue analizada con el programa de identificación de dominios (CD-search) de la base de datos de NCBI (CDD).

Para obtener la secuencia del dominio de unión a molibdo-pterina, se buscó en el programa Pfam, la familia de proteínas con este dominio de unión, identificándose el dominio pfam02738 que tiene como proteína representativa a la xantina deshidrogenasa/oxidasa de leche bovina (No. de acceso PDB: 1FIQC).

## 5.5 Obtención de una secuencia consenso para el dominio de unión a molibdo-pterina.

Se localizaron y compararon las secuencias del dominio de unión a molibdo-pterina de diversas proteínas:

a. La XO de leche bovina (No. de acceso PDB: 1FIQC) con la de la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* (No. de acceso GenBank: CAA88754.1) por medio del programa de alineamiento de secuencias Clustal W2. En este alineamiento se buscaron y marcaron los aminoácidos que pertenecen al dominio de unión de molibdo-pterina pfam02738. Se eligieron los aminoácidos idénticos (\*), conservados (:) y semiconservados (.) y se obtuvo una secuencia consenso (**Anexo A**).

b. Se buscaron las secuencias de aminoácidos de xantina oxidoreductasa de bacterias acéticas utilizando la base de datos de NCBI. Se obtuvo la secuencia de esta proteína en *G. oxydans* 621H (No. de acceso: YP\_191086.1 o GenBank: AAW60430.1).

c. Con la secuencia de aminoácidos de las tres subunidades de la XDH de *G. oxydans* 621H, fue posible localizar por medio de un análisis de homología (blast), los aminoácidos correspondientes a la XDH en las dos secuencias del genoma de *Ga. diazotrophicus* PAL5 liberadas:, No. de acceso GenBank: [AM889285](#) (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y [NC\\_011365](#), No. de acceso GenBank: [CP001189](#) (Lucas y col. <sup>[66]</sup>).

d. Empleando las secuencias de XDH's de *Ga. diazotrophicus* y *G. oxydans* 621H se realizó un análisis (blast) para conocer el porcentaje de identidad entre ellas.

e. Se analizaron las secuencias de las XDH's de *Ga. diazotrophicus* y *G. oxydans* con las bases de datos para identificar el dominio de unión a molibdo-pterina.

f. Se comparó la secuencia del dominio de unión identificado en *Ga. diazotrophicus* y *G. oxydans* con el consenso obtenido anteriormente.

**g.** Se obtuvo un segundo consenso del dominio de unión del grupo prostético molibdo-pterina, que abarca desde proteínas representativas de eucariontes hasta aquellas que se encuentran presentes en la familia de bacterias ácido acéticas (*G. oxydans* 621H y *Ga. diazotrophicus*). De esta manera, este consenso incluye proteínas con función de xantina oxidoreductasa y proteínas que pertenecen a la familia de la aldehído deshidrogenasa en eucariontes, que son enzimas íntimamente relacionadas.

**h.** Se identificaron los aminoácidos de la secuencia consenso obtenida en la secuencia de la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP\_001603512.1 o CAP57224.1 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y GenBank: YP\_002277431.1 o ACI52816.1 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>).

**i.** Mediante el conjunto de análisis y comparaciones de secuencias anteriores, se elaboró una tabla en la que fueron registrados los aminoácidos específicos correspondientes al dominio de unión a molibdo-pterina que se encuentran en la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

## VI. Resultados

Como se mencionó en los antecedentes, existe gran controversia sobre la presencia del grupo prostético PQQ en las ALDH's de las bacterias ácido acéticas <sup>[52, 53]</sup>.

Takemura y col. <sup>[52]</sup> postulan que el grupo prostético de las ALDH membranales de estas bacterias no es PQQ; Thurner y col. <sup>[59]</sup>, purificaron a la enzima ALDH de *Ga. europaeus* (No. de acceso GenBank: CAA69955.1), con base en la secuencia de aminoácidos postulan que posee el grupo prostético molibdo-pterina.

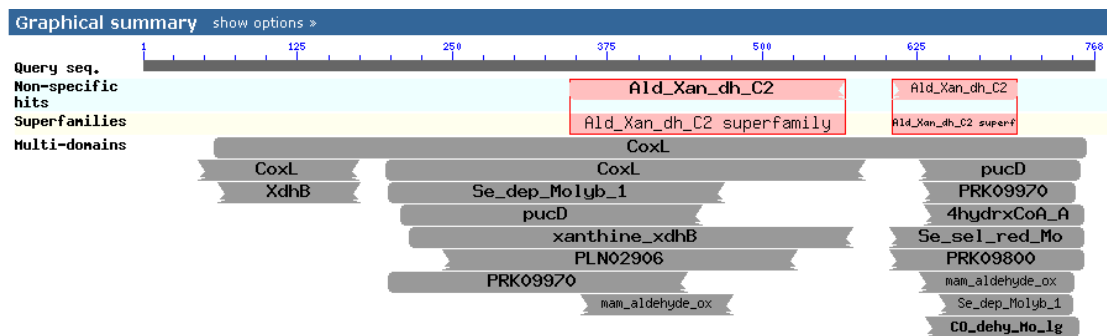
En contraparte, Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup>, purificaron a la ALDH de *Ga. diazotrophicus* y por espectroscopia de fluorescencia, EPR y HPLC, demuestran que contiene a la PQQ como grupo prostético.

No obstante, cuando se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup> e identificada en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP\_001603512.1 o CAP57224.1; Bertalan y col. <sup>[65]</sup> No. de acceso GenBank: YP\_002277431.1 o ACI52816.1; Lucas y col. <sup>[66]</sup>), en búsqueda del dominio de unión de PQQ, el dominio de unión a grupos prostéticos identificado fue el dominio pfam02738, que está asociado a la súper familia de proteínas aldehído xantina deshidrogenasa (No. de acceso NCBI: [cl10595](#)). Este corresponde a un dominio de unión a molibdo-pterina, como fue reportado por Thurner y col. para la enzima de *Ga. europaeus* <sup>[59]</sup> (**Fig. 6**).

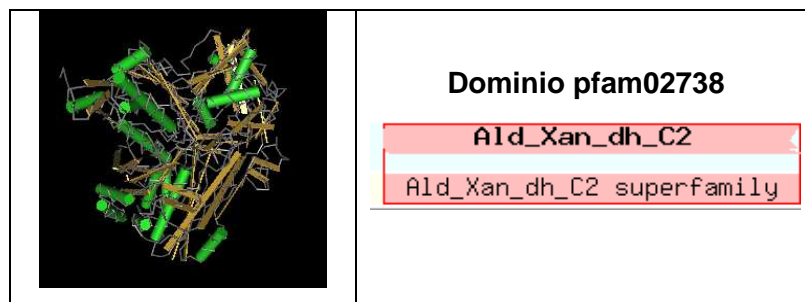
Entonces, de acuerdo al análisis bioquímico de la ALDH purificada de *Ga. diazotrophicus*, esta enzima es PQQ dependiente <sup>[53]</sup>, pero con base en el análisis de su secuencia de aminoácidos, el dominio de unión identificado es para una enzima molibdo-pterina dependiente. Las preguntas que surgen son, ¿la presencia de la secuencia de un dominio de unión a un determinado grupo prostético asegura que este grupo esté presente en la proteína activa? ¿Cuál es el grupo prostético de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*?

Con la finalidad de resolver estas incógnitas, decidimos identificar una secuencia consenso del dominio de unión a molibdo-pterina, por medio de comparaciones entre sus secuencias de aminoácidos, desde eucariontes hasta las de bacterias ácido acéticas. Empezamos buscando dentro de la base de datos Pfam el dominio pfam02738 para saber cuáles son las secuencias asociadas. De esta forma se encontró que la XO purificada a partir de leche bovina (No. de acceso PDB: 1FIQC) es la enzima mejor caracterizada entre aquellas que poseen como grupo prostético a la molibdo-pterina (**Fig. 7**).

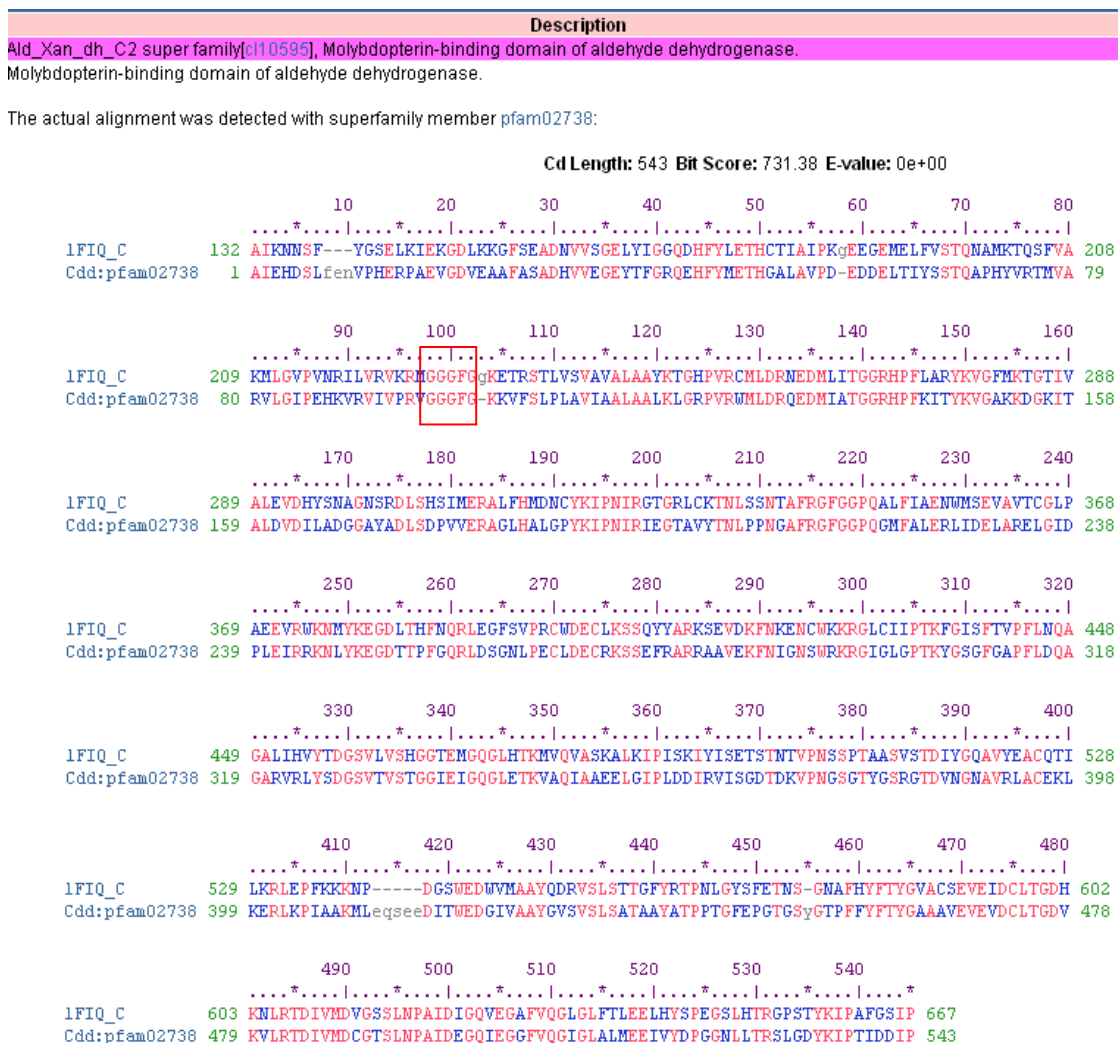
A)



B)



**Fig. 6 A)** Esquema que muestra los dominios de unión de la subunidad ALDH I (subunidad catalítica) de *Ga. diazotrophicus*. **B)** Estructura tridimensional del dominio de unión a molibdo-pterina (pfma02738), asociado a la súper familia de proteínas aldehído xantina deshidrogenasa.



**Fig. 7 Dominio de unión (pfam02738) de la XO de leche bovina.** El dominio consta de 543 aminoácidos. Los aminoácidos que se encuentran en color gris son los que no se alinearon y tienen un mínimo grado de conservación. La escala de color rojo a azul representa el grado de conservación, con rojo para designar los aminoácidos altamente conservados dentro del dominio de unión a molibdo-pterina. En el recuadro se marcan los 5 primeros de 8 aminoácidos reportados por Thurner y col. [59] como parte del dominio de unión a molibdo-pterina (GGGFGRRRL). Se puede observar que son los últimos 3 aminoácidos los que se encuentran ausentes.

En el reporte de Thurner y col. [59], el análisis de grupos prostéticos se realizó comparando la secuencia de ALDH que purificaron con la reportada para la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* (No. de acceso GenBank: CAA88754.1), enzima que posee dominios conservados de unión a molibdo-pterina.

Decidimos entonces comparar las secuencias de aminoácidos de la XO de leche bovina (No. de acceso PDB: 1FIQC) y de isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* (No. de acceso GenBank: CAA88754.1).

De esta comparación pudimos localizar los aminoácidos conservados correspondientes al dominio de unión del grupo prostético en estas enzimas. El dominio es muy grande, de aproximadamente 543 aminoácidos, dentro de cual están 5 de los 8 aminoácidos identificados por Thurner y col. <sup>[59]</sup> (**Fig. 8**).

```

XOcatlechebovina  -----
IsoOrcatdiminuta  ---MKTVLPSPVETVRLSRRGFLVQAGTITCSVAFGSVPAAAGDTAESTPSIAAVSPNVW 57

XOcatlechebovina  -----
IsoOrcatdiminuta  VRVHADGIVDIVCPAVELGQGAHTALPRFVAEELDADWDRVVRVQQAGASDKVYGNPLAWG 117

XOcatlechebovina  -----
IsoOrcatdiminuta  TQFTAASRRTVGYFDVLRVAGAQRFLVQTAARRWSVPADQLETQKGVVLHRRSRRSAT 177

XOcatlechebovina  -----EDTVGRPLPHLAAAMQASGEAV 22
IsoOrcatdiminuta  YGELVASVQVPESFPHFFARNEATQP---ADDYFGAAPPVVAQAAGPASGAIALKHRST 234
                                     ..*:. . :.*:  . .:.

XOcatlechebovina  YCDDIPRYENELFLRLVTSTRAHAKIKSIDVSEAQKVPGFVCFLSADDIPG---SNETGL 79
IsoOrcatdiminuta  YRLIGKDAPRKDIPPKVNGQACYGMDVQVPGMLYAMVETGPVAGMAPERVDDGAARQVPG 294
*           . : : * . . . . . : : : *           * : . . : . .

XOcatlechebovina  FNDET VFAKDTVTTCVGHII GAVVADTPEHAERAAHVVKVTYEDLP AIITIEDAI KNNSFY 139
IsoOrcatdiminuta  IHHVLSLPHGVAVVGRDIFAVRAARARLLVNWKANPDKQSYDSGQVLDEFSDLCRNGIER 354
: : . . : : . . . . . : . * : . . : : * : * : * : . : . * : * .

XOcatlechebovina  GSELKIEKGD---LKKGFSEADNVVSG-ELYIGGDH FYLETHCTIAIPKGE EGE MELFV 195
IsoOrcatdiminuta  NAVQAWKQGE LSSIDA VFARPDVRIESFEMQS D LVYQAPME PQSAVI QPH-ADGS AEAWW 413
. :           : * :           . : * : . . *           : . : * : : : * : * : * *

XOcatlechebovina  STQ NAMKTQSFVAKMLGVPVNRILVRVKRMGGGFGGKETRSTLV SVA-VALAAYKTGHPV 254
IsoOrcatdiminuta  GTQWP TVEQGFAAGILGIA PDKLT MHLPLVGGGFG-RRLE--PGALVDAAHIVRAIGKTV 470
.* . . * . * * : * : . : : : : * * * * . . . : : . * . . * : *

```



```

XOcatlechebovina   RCMLDRNEDMLITGGRHPFLARYKVGFMKTGTIVALEVDHYSNAGNSRDLSHSI----- 308
IsoOrcatdiminuta   KVIWSREDDLKRNPFQRQALACRVEAAVLEKDQRILALRHTVAADSWLARLFPQYfnayqq 530
                   : : .*::*: . *::: .* :. . * *::*. ::: :* :.: :
XOcatlechebovina   -MERALFHMDNCYKIPNIRGT-----GRLCKTNLSSNTAFRFGGGPQALFIAENWMSE 360
IsoOrcatdiminuta   tDPGNWIGMVAYDVPLQRIDaltprrsVDVCY-----MRGIGVAQVKFAQESLVDQ 582
                   : . *.:* * ::* :***:.*. * *. :.:
XOcatlechebovina   VAVTCGLPAEEVWRWKNMYKEGDLTHFNQRLEGFVSPRCWDECLKSSQYYARKSEVDKFNK 420
IsoOrcatdiminuta   IARRLNADPVDFRLAHL----NTSPRGAAV-----VRTVAEMSDWKRRSADAGGGMA 630
                   :* . . :.* :: : : . : : *:: *. :.:.
XOcatlechebovina   ENCWKKRGLCIIPKFGISFTVPFLNQAGALIHVYTDGSVLVSHGGTEMGQGLHTKMVQV 480
IsoOrcatdiminuta   LGLAYTPYSNAHVAVLSEVHFNRSENTLSVSRVWCAVDVGMVAQPDIVKAQMEGGIIQGL 690
                   . . : .. . * .. : . :*: . .* : :
XOcatlechebovina   ASKALKIPISKIYISE-TSTNTVPNSSP-----TAASVSTDIYQQAVYEACQTILKRL 532
IsoOrcatdiminuta   SVALMERVQVAKGVLQHSNFHDYPLMRMSQVPQIHVRLVETDQAMAGVAELGLLQIGPAI 750
                   : :: : :. : * : : . . . * :
XOcatlechebovina   EPFKKKNP-----DGSWEDWVMAAYQDRVSLSTTGFYRTPNLGYSFETNS-GNAFHYFTY 586
IsoOrcatdiminuta   NNAFARITGQHLRSLMPALAQMKRSGPTA 781
                   : : . . : : :

```

**Fig. 8** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio de unión a molibdo-pterina de la XO de leche bovina y la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta*. Para realizar dicho alineamiento se utilizó el programa Clustal W2 <sup>[63]</sup>. En rojo se marcan los aminoácidos de un fragmento del dominio de unión a molibdo-pterina. En la secuencia de la isoquinolina 1-oxidoreductasa se encuentran señalados con color amarillo los 8 aminoácidos identificados por Thurner y col. mientras que en la secuencia de XO de leche bovina solo se encuentran los primeros 5 aminoácidos <sup>[59]</sup>.

\* aa idénticos (: ) aa conservados ( ) aa semiconservados

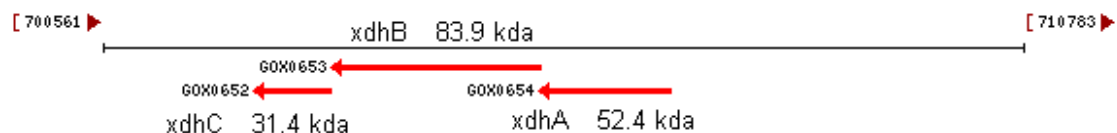
De la comparación anterior, se obtuvo una secuencia de aminoácidos que resultó de haber elegido los aminoácidos idénticos (\*), conservados (: ) y semiconservados ( ) pertenecientes al dominio de unión a molibdo-pterina (**Fig. 9**).

E/K - G D/E - - - - - F S/A - A/P D - - V/I S/E G/S - E - - - G/D - - - H/Q - - L/M E T/P  
 H/Q - T/A - - - P - - - E/D - E/S - - - - S/G T Q - A/P - - - - - V/A A - - L G V/I P/A - -  
 R/K - - V/M - V/L - - M/V G G G F G - K/R E/R - - - - - S/A V/L - - V/A A - - A/V - - - G  
 - P/T V R/K - M/I - D/S R - E/D D M/L - - T/N - - R H/Q P/A F/L - - - - K/E V/A - - - - K - -  
 - I - A L - - - - - S/A N/D - - - - - L/F S/P - Y K/D I/V P - - R - -  
 - - - - - G/V - - - - - - - - - - - F/M R G F/I G G/V P/A Q - - F - - E - - - S/D E/Q - A - - -  
 G/N - - A/P - E/D - R - - N/H M/L - - - - D/N - T/S - - N/G - - L/V - - - - - - - - - - - K/E  
 - S - - - - R - - - V/A - - - - - N/G - - - K/T - - - - - T/A - - G/S - - F/H - - - - - N - - G/S  
 A/V - - - - - G/D - V/G - V S/A - - G/D - - - G/A Q - - - - - A/S - - - L/M - - - - -  
 - - - - - P - - - - - - - - - - - D/Q - - G/A - A/V V/A - - A/G - - - - - L/I - -  
 - - - K/R - - - - - E/R - - - - - S/T

**Fig. 9** Secuencia consenso obtenida de elegir los aminoácidos idénticos (\*), conservados y semiconservados [(:), (.)] del alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondiente al dominio de unión a molibdo-pterina de la XO de leche bovina e isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta*. Los aminoácidos idénticos se encuentran en color rojo.

Una vez localizados estos aminoácidos, buscamos en la base de datos de NCBI la presencia de ortólogos a la XO en los genomas de las bacterias ácido acéticas.

Se encontró el operón (*xdhABC*) que codifica para una XDH en el genoma de *G. oxydans* 621 H. Está formada por tres subunidades: XDHABC. El orden del operón es *xdhA* (No de acceso YP\_191087.1 o GenBank: AAW60431.1), *xdhB* (subunidad catalítica; No de acceso YP\_191086.1 o GenBank: AAW60430.1) y *xdhC* (No de acceso YP\_191085.1 o GenBank: AAW60429.1). Los pesos moleculares calculados para las subunidades son de 52.4 kDa, 83.9 kDa y 31.4 kDa, respectivamente (**Fig. 10**).



**Fig. 10** Esquema del arreglo del operón que codifica para la XDH en el genoma de de *G. oxydans* 621 H.

Con la secuencia de aminoácidos para las tres subunidades de la XDH de *G. oxydans* se realizó un Blast, lo que permitió localizar la secuencia de aminoácidos de la XDH codificada en las dos secuencias del genoma de *Ga. diazotrophicus* PAL 5: NC\_010125, No. de acceso GenBank: AM889285 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y NC\_011365, No. de acceso GenBank: CP001189 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>).

Las secuencias con No. de acceso GenBank: CAP55944.1 o YP\_001602246 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y No. de acceso GenBank: ACI50021.1 o YP\_002274636 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>), se identifican como una proteína accesoria, posible chaperona que tiene un 60% de identidad con la secuencia de la XDHC de *G. oxydans* 621 H (**Tabla 5**).

Locus	Proteína	Organismo	Peso molecular	No. de aa	Porcentaje de identidad
YP_191085.1 AAW60429.1	Xantina deshidrogenasa xdhC	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621 H	31405	290	290/290 100%
YP_002274636.1 ACI50021.1 (Lucas <sup>[66]</sup> )	Xantina deshidrogenasa proteína accesoria xdhC	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	30121	287	161/266 (60%)
YP_001602246.1 CAP55944.1 (Bertalan <sup>[65]</sup> )	Posible xantina deshidrogenasa chaperona	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	30095	287	161/266 (60%)

**Tabla 5.** Proteínas ortólogas a la XDHC de *G. oxydans* 621H (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), identificadas en el genoma de *Ga. diazotrophicus*.

Las secuencias con No. de acceso GenBank: CAP55945.1 o YP\_001602247 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y No. de acceso GenBank: ACI50022.1 o YP\_002274637 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>), se identifican como una xantina oxidasa/deshidrogenasa, con dominio de unión a molibdo-pterina, que tiene un 80% de identidad con la secuencia de la XDHB de *G. oxydans* 621H (**Tabla 6**).

Locus	Proteína	Organismo	Peso molecular	No. de aa	Porcentaje de identidad
YP_191086.1 AAW60430.1	Xantina deshidrogenasa xdhB	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621 H	83978	771	771/771 (100%)
YP_002274637.1 ACI50022.1 (Lucas <sup>[66]</sup> )	Xantina deshidrogenasa, subunidad con unión a molibdo-pterina	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	84995	793	601/759 (79%)
YP_001602247.1 CAP55945.1 (Bertalan <sup>[65]</sup> )	Posible xantina deshidrogenasa/o xidasa	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	83017	772	601/756 (79%)

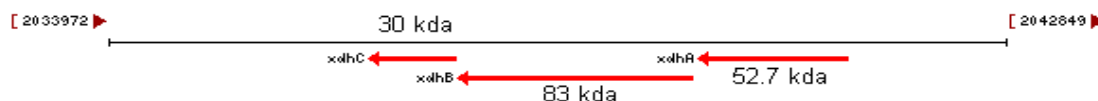
**Tabla 6.** Proteínas ortólogas a la XDHB de *G. oxydans* 621H (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), identificadas en el genoma de *Ga. diazotrophicus*.

Las secuencias con No. de acceso GenBank: CAP55946.1 o YP\_001602248 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y No. de acceso GenBank: ACI50023.1 o YP\_002274638 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>), se identifican como una subunidad pequeña de xantina deshidrogenasa, que tiene un 71% de identidad con la secuencia de la XDHA de *G. oxydans* 621H (**Tabla 7**).

Locus	Proteína	Organismo	Peso molecular	No. de aa	Porcentaje de identidad
YP_191087.1 AAW60431.1	Xantina deshidrogenasa xdhA	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621 H	52496	486	486/486 (100%)
YP_002274638.1 ACI50023.1 (Lucas <sup>[66]</sup> )	Xantina deshidrogenasa subunidad pequeña	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	52687	497	341/476 (71%)
YP_001602248.1 CAP55946.1 (Bertalan <sup>[65]</sup> )	Posible xantina deshidrogenasa xdhA	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	52716	497	340/476 (71%)

**Tabla 7.** Proteínas ortólogas a la XDHA de *G. oxydans* 621H (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), identificadas en el genoma de *Ga. diazotrophicus*.

Por tanto la XDH/XO de *Ga. diazotrophicus*, está constituida por 3 subunidades con pesos moleculares de 53, 83 y 30 kDa respectivamente. El arreglo del operón de esta enzima es similar al de la XDH de *G. oxydans* (**Fig. 11**).



**Fig. 11** Esquema del arreglo del operón que codifica para la XDH de *Ga. diazotrophicus*.

### Dominios conservados en la XDH de *Ga. diazotrophicus*

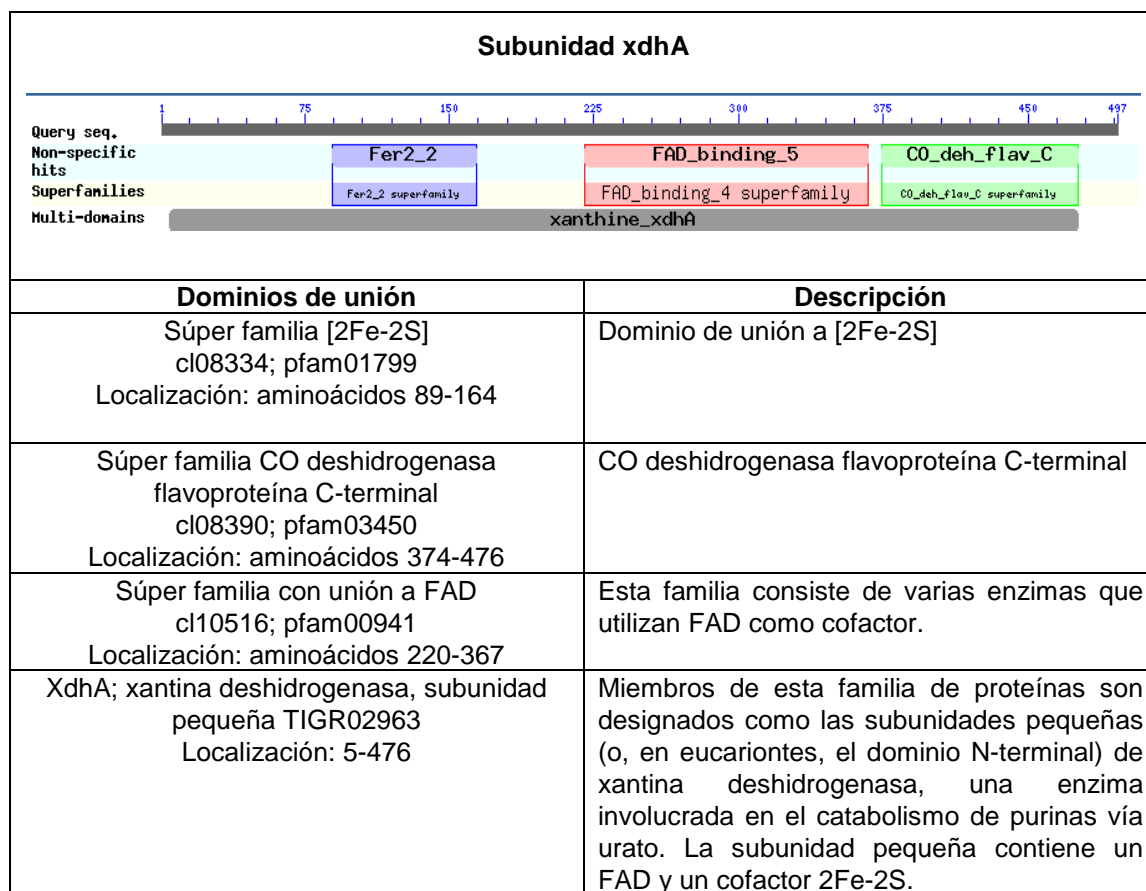
Utilizando las bases de datos para dominios conservados de unión a grupos prostéticos, determinamos cuáles de ellos estaban presentes en las secuencias de aminoácidos de la XDH de *Ga. diazotrophicus*. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 8, 9 y 10 en el orden en el que se encuentra arreglado el operón.

Subunidad xdhC	
Dominios de unión	Descripción
XdhC y súper familia CoxI cl03654; pfam02625 Localización: aminoácidos 11-57	Los miembros de esta familia de proteínas son proteínas accesorias XdhC, cuya función se efectúa durante la inserción del cofactor molibdeno a la subunidad catalítica (XdhB) de la xantina deshidrogenasa.
XdhC (proteína accesoria) TIGR02964 Localización: aminoácidos 28-250	
XdhC, factor de maduración de xantina y CO deshidrogenasa, familia XdhC/CoxF COG1975	Modificación post-traducciona l y reemplazo de células viejas por la generación de otras nuevas. Proteína considerada como chaperona.

**Tabla 8.** Dominios de unión a grupos prostéticos detectados en la secuencia de aminoácidos de la subunidad C de la XDH de *Ga. diazotrophicus*.

<b>Subunidad xdhB (subunidad catalítica)</b>	
Dominios de unión	Descripción
<p>Súper familia Aldehído/ Xantina deshidrogenasa C 2            cl03161; pfam01315            Localización: aminoácidos 20-127</p>	<p>Aldehído oxidasa y xantina deshidrogenasa</p>
<p>Súper familia Aldehído/ Xantina deshidrogenasa C 2            cl10595; pfam02738            Localización: aminoácidos145-691</p>	<p>Dominio de unión a molibdo-pterina en la aldehído deshidrogenasa</p>
<p>XdhB; xantina deshidrogenasa, subunidad con unión a molibdo-pterina            TIGR02965            Localización: aminoácidos 8-763</p>	<p>Miembros de esta familia de proteínas son definidos como subunidades grandes que contienen molibdo-pterina (o en eucariontes, el dominio de unión a molibdo-pterina) en la xantina deshidrogenasa. XdhB es la subunidad catalítica de una enzima que reduce el pool de purinas por el catabolismo de xantina a urato. Este modelo está basado principalmente en secuencias de bacterias por lo que no incluye todas las xantinas deshidrogenasas eucariontes, lo que les discrimina de la enzima íntimamente relacionada, aldehído deshidrogenasa.</p>

**Tabla 9.** Dominios de unión a grupos prostéticos detectados en la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la XDH de *Ga. diazotrophicus*.



**Tabla 10.** Dominios de unión a grupos prostéticos detectados en la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la XDH de *Ga. diazotrophicus*.

La localización de la XDH en miembros de la familia de bacterias ácido acéticas (*G. oxydans* y *Ga. diazotrophicus*) nos permitió realizar un alineamiento (Clustal W2) de las secuencias de sus subunidades catalíticas. En este alineamiento se localizan los aminoácidos del consenso obtenido al comparar las secuencias del dominio de unión a molibdo-pterina de la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *B. diminuta* y la XO de leche bovina (**Fig. 12**).

```

xdhoxydans    MSDLVPGAASTSMKHESALLHVTGRAAYIDDLPEPRGTLHLVPLSTKAHARIVSMDLDA 60
xdhIGadiaz0  ---MTGGASHSLRHESAAHVAGAAAYIDDMPEPKGLLHVVPGLSTRAHARIVSMDLDA 56
              :.*.** *::**** :**:* *****:***:* **::*****:*****
xdhoxydans    IRAAPGVVCLTAADVPGENQISPVHREDEPLLATDHHVHFWGQVMFAVVATSRQAARQAV 120
xdhIGadiaz0  VRAAPGVVRLTAADIPGHNVSPVGRNDEPLLATDLVSYGQPIFAVVAETRLQARHAA 116
              :***** *****:*.**:*** *:***** * :** :***** :* **:*
xdhoxydans    RLAKIEYEKPAILNIAQARENGSPMVWRSLTMQRGDVERGLKAAAPRRLSGQIEIGGQEH 180
xdhIGadiaz0  RLARIEYEDLPAILDIAQARAAGGAMVWRPLTMQRGDAPSGLAASPRRVAGRITMGGQEH 176
              ***:***: ****:**** *.*.***.*****. ** *:*:*:*:* :*****
xdhoxydans    FYLEGQAALAQPGEAGEMRVWSSTQHPSETQHLVAAVLGRPHHLVTTEVRRMGGAFGGKE 240
xdhIGadiaz0  FYLEGQAAMAQPGEAGEMRVWSSTQHP TETQHMVAHVLDLPSNLVTTEIRRMGGGFCGKE 236
              *****:***** *****:****:* ** * :*****:***** .*****
xdhoxydans    TQANAWACLAAIAADRTGQAVKARLDRDDMMVTGKRHDFLIDYDVGFTDEGDILAVDMV 300
xdhIGadiaz0  TQANTPACLAALAAELTGRAAKIRLDRDDMMMTGKRHDFVVDYDVGFDGGRIRAVDMV 296
              ****: *****:**: **:*.* *****:*****:*****:***** *:* * *****
xdhoxydans    LAARCGWAPDLSGPVTDRALFHADNAYFYPDVRLKSEPLRTNTQSN TAYRFGGGPQGIVA 360
xdhIGadiaz0  LAARCGWSADLSGPVTDRALFHADNAYYYPDVRLRSEPLKNTQSN TAYRFGGGPQGIVA 356
              *****: .*****:*****:*****:*****:*****:*****
xdhoxydans    AERVIEEVAFATGLDPVTVRLRNVTGTGRNLTTPYHMTVEDSITAEIITKLVERCYQAR 420
xdhIGadiaz0  AERVIEEIAFATGLDPLDVRLRNVTGTGRDLTPYHMTVEDSISADIMAKLADDCAYRAR 416
              *****:*****: *****:*****:*****:***:*. : * **:*
xdhoxydans    KAEIRAFNRNSRIIRRGIALTPVKFGISFTATHYNQAGALVHVYTDGSVQVNHGGTEMGQ 480
xdhIGadiaz0  RAALRAANEGSPHIRRGIALTPVKFGISFTATHYNQAGALVHVYTDGSVQVNHGGTEMGQ 476
              :* :* * . * *****:*****:*****:*****:*****:*****
xdhoxydans    GLHTKMQIVLREFGLTADRVRITATTTGKVPNTSATAASSGADLNGMAVLD AVRRIKNR 540
xdhIGadiaz0  GLHTKMQIAMREFGLPADRVRITATTTGKVPNTSATAASSGADLNGMAVLD AVRRIKDR 536
              ***** :***** . *****:*****:*****:*****:*****:***: *
xdhoxydans    MITFAAEKWSVPEDIHFRPDGVHVGAEVMTFQQLAWQAYFARVSLSNSGFYKTPKISWN 600
xdhIGadiaz0  LVEFAAGHWGDAAQVRFLPDGVHVGATVVPFDLTRAAYFARVSMSSSGFYKTPKISWN 596
              :: ** :*. * . :::* ***** *:.* :*: *****:*. *****
xdhoxydans    PETGGRPPFFYFAYGAACAESVDLLTGEHSIDRVLDLHDAGQSLNPDIDIGQIEGGFVQ 660
xdhIGadiaz0  AETGGRPPFFYFAYGAACA EVAIDLLTGETRIEQVDILHDAGQSLNPAIDIGQIEGGFVQ 656
              .** *****:***** *::***** *****
xdhoxydans    GAGWLTTEELVWDPAGRLRTHAPSTYKIPACSDRPRIFNVELLENAPNREETIFRSKAVG 720
xdhIGadiaz0  GAGWLTTEELVWDASGRLRTHAPSTYKIPACSDRPRRFVTKLLDHAPNREDTIFRSKAVG 716
              ***** .: ***** ***** * . *:*:*:*****:*****
xdhoxydans    EPPFVHGVAVLQAI SDAIASLDDYRTCPKLDAPATPERVLKTLMALQERAD----- 771
xdhIGadiaz0  EPPFVHGVAVLHAI SDALASIDGYRTCPRLDAPATPETILRTAERMRLAATRPVG 772
              *****:*****:**:*. *****:***** :** : : *

```

**Fig. 12 Alineamiento de las XDH's de *Ga. diazotrophicus* y *G. oxydans*.** En color rojo se marcan los aminoácidos del dominio reportado para *G. oxydans* y *Ga. diazotrophicus* así como los aminoácidos de la secuencia consenso obtenida anteriormente (**Fig. 9**). En ambas secuencias se encuentran señalados con color amarillo algunos de los aminoácidos identificados por Thurner y col. <sup>[59]</sup>.

\* aa idénticos (:) aa conservados (.) aa semiconservados



Con los resultados obtenidos de este alineamiento, nos fue posible obtener una segunda secuencia consenso del dominio de unión del grupo prostético molibdo-pterina (**Fig. 13**), que abarca desde proteínas representativas de eucariontes hasta aquellas que se encuentran presentes en la familia de bacterias ácido acéticas (*G. oxydans* 621H y *Ga. diazotrophicus*). Es decir, en esta secuencia se incluyen proteínas con función de xantina oxidasa/deshidrogenasa y proteínas que pertenecen a la familia de la aldehído deshidrogenasa en eucariontes, que son enzimas íntimamente relacionadas.

G D V/A - - - - - A/S - - - - L/V S/A G - - - - G - Q E H F Y L E - Q - A L/M A - P - E - - E - - -  
- S S T Q - P - - - - - L/M V A - V L G/D - P - H/N - V - - - V/I - R M G G A/G F G - K E - - - -  
- - A - - A A I/L A A - - - G Q/R - V/A K - - L D R - D D M - - T G - R H - F - I/V - Y - V G - - -  
E/D G - I - A - D - - - - A - - G - - P/A D L S - P V - - R A - - H A - - - Y - - P - - R - - - - - T  
N - - - N - A - R G F G G P Q G - - A - E R - I - E - A - - - G - D P V/L - - R - - N - Y - - G - -  
N/D - T P - - - - - V - - - - - E/D - - - - - E/D - - - - - Q/R A R K/R A - - - - F/A N - N/G - - - - - R  
G I - L - P - K - G - - F - A - - N Q A G A - V - - Y - D G S V - V - - G G - E - G Q G L - T K  
- - Q I V/A - - E - G - T/P - D - - R - - - - - T - K V P N - S - T - - S - G - D - N G - A V - - A - -  
K/R - K - R M/L - - - A A - - - - - D/Q I/V - - - - D G - - - - - Q/D - - - - A Y - - - V  
S L/M S - - - - Y - T P - - - - P/A - T G - G - P F F Y F - Y G A A - - E V - V/I D - L T G - - - -  
- R/Q - D I - - D - G - S L N P - I D - G Q I E G G F V Q G - G - - - - E E - V - D P/A - G - L -  
T - - - - - Y K I P - - - - D - P

**Fig. 13** Secuencia consenso obtenida de elegir los aminoácidos idénticos (\*), conservados y semiconservados [(:), (.)] del alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio de unión a molibdo-pterina de xantina oxidasa de eucarionte (XO de leche bovina; No. de acceso PDB: 1FIQC) y secuencias de procariontes como la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *Brevundimonas diminuta*; No. de acceso GenBank: CAA88754.1) y subunidades catalíticas de xantinas deshidrogenasas de *G. oxydans* (No. de acceso YP\_19086.1 o GenBank: AAW60430.1) y de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso: GenBank: CAP55945.1 o YP\_001602247, Bertalan y col. <sup>[65]</sup>); GenBank: ACI50022.1 o YP\_02274637, Lucas y col. <sup>[66]</sup>). Los aminoácidos idénticos se encuentran en color rojo.

XDHcatGadiazo -----  
 ALDHcatGadiazo MDKRGGATGQMSRRGFLMIAAGGAGALFGFPAARAAEQFPAAGLPGNGAFEPTIWCAIAP 60

XDHcatGadiazo -----MTGGASHSLRH 11  
 ALDHcatGadiazo DGTVTVNIIRAEMGQHIGSALARI IADEMADWNRVVRINYVDSDPKWGLMVTGGSWVWM 120  
 \* . \* . \* \* :

XDHcatGadiazo ESAAMHVAGAAAYIDDMPEPKGLLHVVPGLSTRAHARIVS----- 51  
 ALDHcatGadiazo TWDVFRQAGAAARIALTEAGAGLLGVAPGQCITRDGMVVAGSRISYGDIVARAHPSHSF 180  
 . : : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . . . : \* :

XDHcatGadiazo --MDLDAVRAAPGVVR-----VLTAADIPGHNQVSPVG----- 82  
 ALDHcatGadiazo TPDEMAKLPKPAERRLVGNNTLTKALDIPPKTNGTAIYGIDARVEGMVYARPKMPPTRY 240  
 : : : \* . \* . \* . \* \* \* \* : : : : :

XDHcatGadiazo ----RNDEPLLATDLVSYYG-----QPIFAVVAETRLQARHAARLARIEYEDLP 127  
 ALDHcatGadiazo GSRVRSVDDSAARTVKGYQRYIELDDPSGVVQGWVAVASTYTAAIRAADLLKVDWAPGD 300  
 \* . : \* : \* \* \* \* . . . \* \* \* \* \* : : :

XDHcatGadiazo AILDIAQARAAGG-AMVWRP----LTMQRGDAPSGLAASPRRVAGRITMGGQEHFYLEGQ 182  
 ALDHcatGadiazo AVHVSEQDVIDHGRAQIDRKDGGVMVFDGPDGVDAFAAAATTFADYTCASVLHYQLEPT 360  
 \* : \* \* \* \* : \* : : : . . : : \* \* : . \* \* . . \* : \* \*

XDHcatGadiazo **AAMAQPGEEGEMRVWSSTQHPTETQHMVAHVLDLRPSNLVTEIRRMGGGFGGKETQANTP** 242  
 ALDHcatGadiazo **NALA-FEKDGIFEIHAGNQWQSLILPTLAKALERPEDKIVLRSYLLGGGFG--RRL**NGDY 417  
 \* : \* : \* : : . \* : : \* : \* \* \* : : . \* \* \* \* . .

XDHcatGadiazo **ACLAAALAEELTG-RAAKIRLDRDDMMMTGKRHDFVVDYDVGFDGRIIRAVDMVLAARC** 301  
 ALDHcatGadiazo **MIPAAALASKALGGKPKVLIILTRSDMQFDSFRSPSIQRVRVAFDGKHAITAMEYHAS--A** 475  
 \* \* \* \* : \* : . \* : \* \* \* \* : . \* : \* \* \* . \* \* : : .

XDHcatGadiazo **GWSADLSGPVTDRALFHADNA-----YYYPDVRLRSEPLKTNTQSN**TAY 345  
 ALDHcatGadiazo **GW-----PTQVMAAAFMSKGVGDKKYDPFAIAGGDHWYEVGAFVRAL---**SNDLANRTF 527  
 \* \* . . \* \* : . . . \* . \* \* : \* : \* : \* :

XDHcatGadiazo **R-----GFGGPGQIVAAERVIEEIAFATGLDPLDVRLRNVYGTGTRDLTPYHMTVE** 396  
 ALDHcatGadiazo **RPGLWRSVSPGW---**TSWGLESGWDEIAHAQGRDAVQFRDLHDLTGAGRNKQAPDSTGG 583  
 \* \* : \* : \* \* \* \* \* \* : : \* \* : \* \* . . . \*

XDHcatGadiazo DSISADIMAKLADDCAYRARRAALRAANEGSPHIRGIALTPVKFGISFTATHYNQAGAL 456  
 ALDHcatGadiazo ALRQAAVVRRVAEKAGWGRAL----- 604  
 \* : : \* : . . . :

XDHcatGadiazo **VHVYTDGSVQVNHGGTEMGQGLHTKMVQIAMREFGLPADRVRITATTTGKVPNTSATAAS** 516  
 ALDHcatGadiazo -----

XDHcatGadiazo **SGADLNGMAVLDAVRRIKDRLVEFAAGHWGVDAQVRFPLDGVHVGATVVPFDLTRAAY** 576  
 ALDHcatGadiazo -----

XDHcatGadiazo **FARVSMSSSGFYKTPKISWNAETGR-GRPFYFYAYGAACA EVAIDLTTGETRIEQVDILH** 635  
 ALDHcatGadiazo -----**PADTGLGIAT-TFGQERGMPTWIACCAQVHVDRA**TGIVRCQKLTIVV 650  
 . . . . \* \* : : \* \* \* : \* \* \* . \* : : \* :

XDHcatGadiazo **DAGQSLNPAIDIGQIEGGFVQAGWLTTE--ELVWDASGRLRTHAPSTYKIPACSDRPRR** 693  
 ALDHcatGadiazo **DAGTIVDPDGAQAQTEGALWGLSMALFEGSEIV--NGLPRDRNLDTYTPLRIADVP**EM 707  
 \* \* \* : \* \* . \* \* \* : \* . \* \* \* \* . \* \* : . \* \* . \* \*

```

XDHcatGadiazo   FTVKLLDHAPNREDTIFRSKAVGEPFVHGVAVLHAISDALASIDGYRTCPRLDAPATPE 753
ALDHcatGadiazo  DIEFLPSTKPTGLGEPGTTVVAPAIGNAIFNAVGVRRHLPIRPADVLHALRSRNGTAS 767
                * . . . . . :...*. . . . . * . . . . . *...
XDHcatGadiazo   TILRTAERMRLAATRPVG 772
ALDHcatGadiazo  T---- 768
                *

```

**Fig. 14** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio de unión a molibdo-pterina de la XDH B, subunidad catalítica (No. de acceso: GenBank: CAP55945.1 o YP\_001602247 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>), GenBank: ACI50022.1 o YP\_02274637 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>) y ALDH I, subunidad catalítica (No. de acceso GenBank: YP\_001603512.1 o CAP57224.1 (Bertalan y col. <sup>[65]</sup>) y YP\_002277431.1 o ACI52816.1 (Lucas y col. <sup>[66]</sup>) de *Ga. diazotrophicus*. En color rojo se encuentran marcados los aminoácidos que pertenecen al dominio de unión a molibdo-pterina de acuerdo a la secuencia consenso obtenida. En ambas secuencias se encuentran señalados con color amarillo algunos de los aminoácidos identificados por Thurner y col. <sup>[59]</sup>.

\* aa idénticos (: ) aa conservados ( ) aa semiconservados

### Secuencia consenso de unión a molibdo-pterina en las subunidades catalíticas de la ALDH y la XDH de *Ga. diazotrophicus*.

Gracias a estas comparaciones fue posible obtener una serie de aminoácidos específicos correspondientes al dominio de unión a molibdo-pterina que son compartidos por las enzimas ALDH y XDH en *Ga. diazotrophicus*. Estos datos se encuentran registrados en la siguiente tabla:

<b>XDH</b>	G	D	A	S	V	A	G	-	T	G	Q	E	H	F	Y	L	E	Q	A	M	A	P	E	E	E	V	S	S	T
<b>ALDH</b>	-	G	V	A	F	A	-	Y	T	A	-	-	H	Y	-	L	E	-	A	L	A	-	K	D	-	I	A	G	N
	.	.	:	.	*			*	.			*	:		*	*		*	:	*		:	:		:	:	.	.	
<b>XDH</b>	Q	P	M	V	A	V	L	D	P	S	N	-	V	T	I	R	M	G	G	G	F	G	K	E	A	A	A	L	A
<b>ALDH</b>	Q	-	-	L	A	A	L	E	P	E	D	K	I	V	-	-	L	G	G	G	F	G	-	R	-	A	A	L	A
	*			:	*	.	*	:	*	.	:		:	.			:	*	*	*	*	*	.		*	*	*	*	
<b>XDH</b>	A	-	G	R	A	A	K	L	D	R	D	D	M	T	G	R	H	-	F	V	Y	V	G	D	G	I	-	A	D
<b>ALDH</b>	S	L	G	K	P	V	K	L	-	R	D	D	M	-	S	R	-	P	-	-	-	V	A	K	-	I	T	A	E
	:		*	:	.	.	*	*		*	*	*	*	.	*						*	.	.	*		*	*	:	

<b>XDH</b>	A	G	A	D	L	S	P	V	T	R	A	H	A	N	Y	P	R	T	N	N	A	Y	R	G	F	G	G	P	Q
<b>ALDH</b>	-	G	-	-	-	-	T	-	V	-	A	-	S	G	Y	-	R	S	N	N	T	F	R	G	W	-	-	-	-
		*				.	.			*	:	.	*		*	:	*	*	:	:	*	*	:						
<b>XDH</b>	G	A	-	E	R	I	E	E	A	G	D	P	L	R	N	V	Y	G	D	T	P	V	D	D	R	A	R	R	A
<b>ALDH</b>	-	G	L	E	-	-	D	E	A	G	D	A	V	R	-	L	-	G	K	-	A	-	-	E	-	-	-	-	
		.	*			:	*	*	*	*	.	:	*		:		*	.		.			:						
<b>XDH</b>	A	N	G	R	G	I	L	P	K	G	F	A	N	Q	A	G	A	V	Y	D	G	S	V	V	G	G	E	G	Q
<b>ALDH</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>XDH</b>	G	L	T	K	Q	I	A	E	G	P	D	R	T	K	V	P	N	S	T	S	G	D	N	G	A	V	A	R	K
<b>ALDH</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>XDH</b>	R	L	A	A	Q	V	D	G	D	A	Y	V	S	M	S	Y	T	P	-	S	A	T	G	G	P	F	F	Y	F
<b>ALDH</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	A	T	G	-	T	-	G	-	-	-	-	-	
															.	.		.			*	*							
<b>XDH</b>	A	Y	G	A	A	E	V	I	D	L	T	G	T	Q	D	I	L	D	G	-	S	L	N	P	I	D	G	Q	I
<b>ALDH</b>	T	W	-	A	C	Q	V	V	D	-	T	G	V	K	-	I	V	D	G	T	-	V	D	P	-	-	A	Q	-
	.	.	*	.	:	*	:	*		*	*	.	:	*	:	*	*			:	:	*			.	*			
<b>XDH</b>	E	G	G	F	V	Q	G	G	-	-	E	E	L	V	D	A	G	L	T	H	-	Y	K	I	P	-	D	P	
<b>ALDH</b>	E	G	A	-	L	-	G	S	A	L	E	E	I	V	-	-	G	-	-	R	L	Y	T	-	-	I	D	P	
	*	*	.	:		*	.		*	*	:	*		*		*		:	*	.				*	*				

**Tabla 11.** Aminoácidos de importancia en el dominio de unión a molibdo-pterina que se encuentran tanto en la XDH como en la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. Los aminoácidos idénticos se encuentran en color rojo mientras que señalados con color amarillo se encuentran algunos de los aminoácidos identificados por Thurner y col. <sup>[59]</sup>.

\* aa idénticos (: ) aa conservados ( ) aa semiconservados

De los 277 aminoácidos localizados en la XDH de *Ga. diazotrophicus* correspondientes con la secuencia consenso obtenida para el dominio de unión de molibdo-pterina, encontramos 146 en la secuencia de aminoácidos de la ALDH de la misma bacteria, que representan el 52.707 %; este porcentaje es significativo, indicando que ambas proteínas comparten un posible dominio de unión para el grupo prostético molibdo-pterina.

Por otro lado, Emanuel García Noriega en su tesis de licenciatura realizada en nuestro laboratorio <sup>[74]</sup>, efectuó la contraparte a este estudio. Basándose en la secuencia de péptidos internos obtenidos a partir de la ALDH purificada de *Ga. diazotrophicus* por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup>, localizó la secuencia de aminoácidos codificada para dicha proteína e identificó el probable dominio de unión a PQQ y comparó su secuencia con las secuencias de aminoácidos que forman este dominio en proteínas representativas cuyo grupo prostético es PQQ (las PQQ ADH de bacterias ácido acéticas) <sup>[52]</sup>. De esta comparación se encontró que entre ambas secuencias existe un 66.6% de similitud, indicando también que ambas proteínas comparten un posible dominio de unión para el grupo prostético PQQ.

## VII. Discusión

Una característica de las bacterias acéticas es la presencia de un conjunto de deshidrogenasas membranales muy activas, entre las que se encuentra la ALDH <sup>[60]</sup>. La actividad de estas deshidrogenasas es independiente de FADH<sub>2</sub> ó NADH.

Gómez Manzo y col. purifican y caracterizan a la ALDH membranal de *Ga. diazotrophicus*. Basándose en su análisis bioquímico (análisis electroforético, zimografía, espectroscopía, HPLC, EPR), proponen que la enzima es un heterodímero que tiene como grupos prostéticos citocromo *b* y PQQ en su subunidad catalítica (79.7 kDa) y citocromos *c* en la subunidad pequeña (50 kDa) <sup>[53]</sup>.

Thurner y col. purificaron la ALDH membranal de *Ga. europeus*. A partir del análisis electroforético proponen que la enzima es un heterotrímero; por análisis espectroscópico reportan que la proteína tiene como grupos prostéticos: un grupo [2Fe:2S] en la subunidad pequeña (16.7 kDa), citocromos *c* en la subunidad intermedia (49 kDa), y un citocromo *b* en la subunidad catalítica (84.1 kDa). Así mismo, por análisis de secuencia de la subunidad catalítica localizan 8 aminoácidos que corresponden con una parte del dominio de unión de un grupo molibdo-pterina, por lo que reportan que la ALDH de esta bacteria es molibdo-pterina dependiente <sup>[59]</sup>.

Como mencionamos en la introducción, las molibdoenzimas cuyo grupo prostético es una molécula de molibdo-pterina (Mo-co), se encuentran tanto en eucariontes como en procariontes <sup>[1, 2]</sup>. Estas proteínas son oxidoreductasas que reducen a sus sustratos en el centro Mo-co, produciéndose un cambio en el estado redox del Mo de Mo(VI) a Mo(IV) <sup>[37]</sup>. En general tienen 3 centros redox (grupo [Fe:S], FAD+ y Mo-co). El NAD<sup>+</sup>, NADH y O<sub>2</sub> actúan en el sitio de la flavina <sup>[3, 20]</sup>. Entre los centros redox se da un equilibrio rápido y el NADH transfiere sus electrones intramolecularmente al FAD, donde la oxidación fisiológica ocurre. La transferencia de electrones intramolecular entre Mo-co y FAD es mediada por los centros [2Fe:2S] <sup>[38, 12]</sup>.

Sin embargo, se han reportado molibdoenzimas (XOR de *P. putida* cepa Ful y cepa 40; *P. synxantha* A3; *D. gigas*), que carecen del FAD y tienen en su lugar a un citocromo *b* <sup>[21]</sup>. Estos reportes apoyarían la propuesta de Thurner y col. <sup>[59]</sup>.

Entonces la controversia sobre los grupos prostéticos de la ALDH en bacterias acéticas estaba centrada en si la enzima era PQQ ó molibdo-pterina dependiente.

El objetivo de la presente tesis es tratar de aportar resultados que ayuden a resolver la controversia generada por los reportes de Takemura <sup>[52]</sup>, Thurner <sup>[59]</sup> y Gómez Manzo <sup>[53]</sup>, en cuanto al grupo prostético de la ALDH en bacterias acéticas.

Para ello, decidimos determinar los dominios de unión a grupos prostéticos presentes en la secuencia de aminoácidos de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, purificada por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup>. Para llevarlo al cabo, se recurrió al programa más utilizado para analizar secuencias en búsqueda de la arquitectura y organización de dominios proteicos, que es el Pfam. Pfam es una colección de alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos de Márkov, que cubren una buena parte de dominios proteicos y familias de proteínas, cuya estructura y/o función son similares (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) <sup>[72]</sup>.

Un modelo oculto de Márkov o HMM (por sus siglas del inglés, *Hidden Markov Model*) es un modelo estadístico en el que el objetivo es determinar los parámetros desconocidos (u *ocultos*, de ahí el nombre) a partir de los parámetros observables, existiendo una distribución de probabilidad que se resuelve por medio de algoritmos. Se utilizan alineamientos múltiples en donde el alineamiento "semilla" contiene al conjunto de secuencias representativas alineadas, que se usaron para construir el perfil HMM. Este alineamiento completo contiene todos los "hits" significativos contra el HMM que se pudieron encontrar en la base de datos subyacente (los "hits" son secuencias que están en las bases de datos y que tienen un nivel significativo de similitud con las secuencia que se usa como sonda) <sup>[67]</sup>.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup> e identificada en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, de acuerdo al programa pfam mostró la presencia del dominio pfam02738, que está asociado a la súper familia de proteínas aldehído deshidrogenasas/xantina deshidrogenasas. Este dominio corresponde a un dominio de unión a molibdo-pterina, como fue reportado por Thurner y col. para *Ga. europeus* <sup>[59]</sup>. No obstante, los resultados deben analizarse con cuidado ya que una única proteína puede pertenecer a varias familias Pfam.

Decidimos realizar un cuidadoso análisis de las secuencias de aminoácidos de proteínas representativas con grupo prostético molibdo-pterina. Se eligió este tipo de análisis de secuencias de aminoácidos y no de nucleótidos, por ser el método más apropiado para encontrar ortólogos y porque nos permite encontrar repeticiones de aminoácidos que suelen ser las más conservadas y por lo tanto las más importantes, en muchos casos formando dominios. Entonces, una vez determinada la secuencia de aminoácidos de la proteína, esta resultará ser una fuente valiosa de información sobre su posible función, estructura e historia <sup>[68]</sup>.

El análisis se realizó desde la proteína mejor caracterizada, la xantina deshidrogenasa/oxidasa de leche bovina <sup>[12]</sup> hasta las xantinas deshidrogenasas reportadas a la fecha en bacterias acéticas. A partir de este análisis se obtuvo una secuencia consenso que se comparó con la secuencia de aminoácidos de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

El dominio de unión al grupo prostético molibdo-pterina en la xantina deshidrogenasa/oxidasa de leche bovina es muy grande, consta de 543 aminoácidos (**Fig. 7**).

Es cuestionable que, tratándose de un dominio tan grande, Thurner y col. basándose en la presencia de únicamente 8 aminoácidos que se encuentran en forma sucesiva (GGGFGRRL), postulen a esta proteína como molibdo-pterina dependiente <sup>[59]</sup>.

Para determinar que tanto de este dominio se conserva en proteínas ortólogas (tiene la misma función) presentes en bacterias y en particular en bacterias acéticas, era necesario primero buscar si ya se encontraban secuenciadas estas proteínas ó en caso contrario, identificar las secuencias correspondientes en los genomas de estos organismos liberados a la fecha.

El hecho de que el genoma completo de un organismo se encuentre liberado, no implica que cada secuencia codificante identificada pueda estar asociada a una proteína en particular. Generalmente es necesario basarnos en una secuencia conocida para, a través de una base de datos como el Blast, poder localizar la secuencia de la proteína de interés.



Blast es uno de los programas de búsqueda de similitudes utilizado en este estudio que es adecuado porque explora todas las bases de datos disponibles y se puede realizar en relativamente poco tiempo (segundos o minutos) en una computadora. Los resultados de estas comparaciones permiten saber si la proteína de interés es miembro de algún tipo establecido de proteínas, lo que en segunda instancia nos permitirá deducir información sobre la función de la misma. De esta forma si presenta un alto porcentaje de semejanza puede que sea parte de la misma familia de proteínas. Por otro lado, con la comparación de secuencias de una proteína en diferentes especies, podemos también conocer información sobre las vías evolutivas [62].

En el reporte del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* no se reconocía a ninguna xantina deshidrogenasa/oxidasa, pero encontramos que en *G. oxydans* si estaba identificada una xantina deshidrogenasa compuesta con 3 subunidades.

La utilización de estas secuencias nos permitió localizar la secuencia de la XDH de *Ga. diazotrophicus*, la cual también esta compuesta de 3 subunidades con pesos moleculares de 53, 83 y 30 kDa, respectivamente. La subunidad de 53 kDa, es el sitio de unión a FAD; la subunidad de 83kDa es la subunidad catalítica, identificada como una xantina oxidasa/deshidrogenasa, con dominio de unión a molibdo-pterina; la subunidad de 30kDa es considerada una proteína accesoria, posible chaperona. El arreglo del operón también es semejante en las dos proteínas (**Figuras 10 y 11**).

La composición molecular de las XOR's de bacterias es muy variada, aunque la composición molecular encontrada en estas dos especies de bacterias acéticas es semejante a la reportada para la xantina oxidoreductasa de *Veillonella atypica* y *Eubacterium barkeri*, las cuales también están compuestas de tres subunidades [21]. A la fecha ninguna XDH de bacterias acéticas ha sido caracterizada.

La comparación de secuencias entre las subunidades catalíticas de las XDH's localizadas en bacterias acéticas (*G. oxydans* y *Ga. diazotrophicus*), nos permitió identificar el dominio de unión a este grupo prostético, el cual comparamos con la secuencia consenso obtenida anteriormente, para obtener una secuencia consenso final en la que se incluyen proteínas con función de xantina oxidasa/deshidrogenasa y

proteínas que pertenecen a la familia de la aldehído deshidrogenasa en eucariontes, que son enzimas íntimamente relacionadas.

La comparación entre la secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* y la secuencia consenso final nos permitió determinar que el 52.7 % de los aminoácidos correspondientes a la secuencia consenso del dominio de unión a molibdo-pterina se encuentran presentes en la ALDH, es decir la ALDH tiene en su secuencia un potencial dominio de unión a molibdo-pterina.

Por otro lado, García Noriega en su tesis de licenciatura desarrollada en nuestro laboratorio <sup>[74]</sup>, realizó la contraparte a este estudio. Comparó la secuencia del dominio de unión a PQQ presente en proteínas representativas que tienen a esta molécula como grupo prostético (las alcoholes deshidrogenasas de bacterias acéticas), con la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* purificada por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup>; localizó el probable dominio de unión a PQQ y determinó que entre ambas secuencias existe un 66.6% de similitud. Este resultado indica que la ALDH también tiene en su secuencia un potencial dominio de unión a PQQ.

Los resultados obtenidos muestran que el postular, como lo hicieron Thurner y col. <sup>[59]</sup> en el caso de la ALDH de *Ga. europeaus*, cual es el grupo prostético asociado a una proteína, basándose en la probable arquitectura dictada por la secuencia primaria, para formar un determinado dominio de unión, es poco certero. La posible presencia de uno u otro dominio puede tomarse como un indicio de una determinada arquitectura ó función, pero no es determinante en la composición molecular de una proteína. En todo caso, las determinaciones bioquímicas aunadas a los resultados de análisis de secuencia, será los que den la certeza de la estructura y composición de la molécula.

En el caso específico de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, los resultados reportados por Gómez Manzo y col. <sup>[53]</sup>, aunados a lo reportado en la tesis de licenciatura de García Noriega <sup>[74]</sup> y la presente tesis, nos permiten postular a esta enzima como PQQ dependiente.

## VIII. Conclusiones

- El análisis de la secuencia de aminoácidos de la ALDH, muestra, de acuerdo al programa pfam, la presencia del dominio de unión a molibdo-pterina (pfam02738), que está asociado a la súper familia de proteínas aldehído deshidrogenasas/xantina deshidrogenasas; este dominio es característico de las molibdoenzimas como se ha reportado para la CoxL, XdhB, Aldh\_Xan\_dh y ALDH de *Ga. europaeus*.
- El genoma de *Ga. diazotrophicus* tiene una secuencia correspondiente a una XDH codificada. La proteína es codificada por el operón *xdhABC*. Los pesos moleculares calculados para las 3 subunidades de la proteína son de 31.4 kDa, 83.9 kDa y 52.4 kDa, respectivamente. Estas características son similares a las de la XDH localizada en el genoma de *G. oxydans*, organismo miembro de la familia de las bacterias acéticas.
- La XDH's de *G. oxydans* y *Ga. diazotrophicus* muestran una composición molecular semejante a la reportada para las XOR's de *Veillonella atypica* y *Eubacterium barkeri*, que está compuesta por 3 subunidades.
- El análisis de dominios de la XDH de *Ga. diazotrophicus* revela que existe un dominio de unión a molibdo-pterina en su subunidad catalítica.
- Se obtuvo mediante análisis de secuencias de aminoácidos de proteínas representativas con molibdo-pterina como grupo prostético un nuevo consenso para el dominio de unión de este cofactor.
- La secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* tiene un 52.7 % de identidad con respecto al nuevo consenso del dominio de unión a molibdo-pterina, lo cual indica que esta enzima posee un potencial dominio de unión a este grupo prostético.

- Resulta poco certero proponer cual es el grupo prostético funcional de una proteína solo basándose en la probable arquitectura determinada por una secuencia primaria. Es necesario integrar resultados obtenidos a partir de estudios bioquímicos así como de análisis de secuencias.
- Los resultados de la caracterización bioquímica efectuada por Gómez Manzo y col., aunados a los resultados de la comparación de la secuencia de aminoácidos de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* con la secuencia consenso del dominio de unión a PQQ obtenida por García Noriega, sugieren que esta enzima es PQQ dependiente.

## IX. Perspectivas

La purificación y caracterización de la XDH y el estudio sobre su participación en el metabolismo de *Ga. diazotrophicus*, podría ser de interés ya que esta enzima es una oxidoreductasa que cataliza la hidroxilación de diferentes compuestos, entre ellos de aldehídos y posiblemente pueda participar en su metabolismo dentro de la célula; aunque actualmente esta enzima no forma parte del proyecto general sobre la Fermentación Oxidativa que se lleva al cabo en el laboratorio del Dr. Escamilla.

En cuanto a la ALDH, sería interesante tratar de purificarla como holoenzima. Esta enzima ha sido purificada como heterodímero, aunque es codificada como una enzima de tres subunidades. Es posible que la subunidad pequeña se pierda durante la solubilización de la proteína de la membrana, Sería conveniente probar con diferentes detergentes, para tratar de purificar a la enzima trimérica.

Si es posible purificar a la enzima trimérica, su caracterización sería importante para determinar cual es la función de la subunidad pequeña en cuanto a estructura y actividad catalítica.

Además sería interesante realizar la cristalización de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* la cual proporcionaría mayor información sobre la estructura de la enzima.

## X. Referencias

1. Kisker C., Schindelin H. & Rees D. C. (1997) Molybdenum-cofactor containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:233-267.
2. Thoenes U., Flores O. L., Neves A., Devreese B., Van Beeumen J. J., Huber R., Romão M. J., Legall J., Moura J. G. & Rodrigues-Pousada C. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of the gene of the molybdenum-containing aldehyde oxido-reductase of *Desulfovibrio gigas*. The deduced amino acid sequence shows similarity to xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 220:901-910.
3. Hughes R. K., Doyle W. A., Chovnick A., Whittle J. R. S., Burke J. F. & Bray R. C. (1992) Use of *rosy* mutant strains of *Drosophila melanogaster* to probe the structure and function of xanthine dehydrogenase. *Biochem. J.* 285:507-513.
4. Kisker C., Schindelin H., Baas D., Reètey J., Meckenstockk R. U. & Kroneck P. M. H. (1999) A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 22:503-521.
5. Rajagopalan K. V. & Johnson J. L. (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* 267(15):10199-10202.
6. Meyer O. & Rajagopalan K. V. (1984) Molybdopterin in carbon monoxide oxidase from carboxydophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 157(2): 643-648.
7. Willems, A., Busse J., Goor M., Pot B., Falsen E., Jantzen E., Hoste B., Gillis M., Kersters K., Auling G. & De Ley J. (1989) *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. Nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and "*Pseudomonas carboxydoflava*"), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:319-333.
8. Canne C., Stephan I., Finsterbusch J., Lingens F., Kappl R., Fetzner S. & Hüttermann J. (1997) Comparative EPR and redox studies of three prokaryotic enzymes of the xanthine oxidase family: quinoline 2-oxidoreductase, quinaldine 4-oxidase, and isoquinoline 1-oxidoreductase. *Biochem* 36:9780-9790.
9. Lehmann M., Tshisuaka B., Fetzner S. & Lingens F. (1995) Molecular cloning of the isoquinoline 1-oxidoreductase genes from *Pseudomonas diminuta* 7, structural analysis of *lorA* and *lorB*, and sequence comparisons with other molybdenum-containing hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 270(24):14420-14429.

10. Van Spanning R. J. M., Wansell-Bettenhausen C. W., Oltmann L. F. & Stouthamer A. H. (1987) Extraction and purification of molybdenum cofactor from milk xanthine oxidase. *Eur. J. Biochem.* 169:349-352.
11. Johnson J. L., Hainline B. E. & Rajagopalan K. V. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *J. Biol. Chem.* 255(5):1783-1786.
12. Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology & Medicine* 33(6):774-797.
13. Johnson J. L., Bastian R. N. & Rajagopalan K.V. (1990) Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis *denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* 87:3190-3194.
14. Johnson, J. F., Rajagopalan, K. V. & Meyer, O. (1990) Isolation and characterization of a second molybdopterin dinucleotide: molybdopterin cytosine dinucleotide. *Arch. Biochem. Biophys.* 283(2):542-545.
15. Börner, G., Karrasch, M. & Thauer, R.K. (1991) Molybdopterin adenine dinucleotide and molybdopterin hypoxanthine dinucleotide in formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Marburg). *FEBS Lett.* 290(1-2):31-34.
16. Schwarz G., Mendel R. R. & Ribbe M. W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature.* 460: 839-847.
17. Boll M., Fuchs G., Meier C., Trautwein A., El Kasmi A., Ragsdale SW., Buchanan G., Lowe DJ. (2001) Redox centers of 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase, a member of the xanthine oxidase family of molybdenum-containing enzymes. *J. Biol Chem.* 276(51):47853-62.
18. Gibson J., Dispensa M. & Harwood CS. (1997) 4-hydroxybenzoyl coenzyme a reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. *J. Bacteriol.*179(3):634-42.
19. Freudenberg W., König K. & Andreesen J. R. (1988) Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxydans*: A molybdenum containing hydroxylase. *FEMS Microbiol. Letters.* 52(1-2): 13-17.
20. Neumann M., Mittelstädt G., Iobbi-Nivol C., Saggiu M., Lenzian F., Hildebrandt P. & Leimkühler S. (2009) A periplasmic aldehyde oxidoreductase

represents the first molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor containing molybdo-flavoenzyme from *Escherichia coli*. FEBS J. 276:2762-2774.

21. Parschat K., Canne C., Huttermann J., Kappl R. & Fetzner S. (2001) Xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas putida* 86: specificity, oxidation-reduction potentials of its redox-active centers, and first EPR characterization. Biochemical et Biophysical Acta 1544:151-165.

22. Hille R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. Chem. Rev. 96:2757-2816.

23. Smith S. T., Rajagopalan K. V. & Handler Philip (1967) Purification and properties of xanthine dehydrogenase from *Micrococcus lactilyticus*. J. Biol. Chem. 242(18):4108-4117.

24. Mendoza U., García J.C., Gastell P.L. & Amador A. (2005) Xantina oxidoreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. Rev. Cubana Invest. Biomed. 24(2).

25. Romão M.J., Knäblein J., Huber R. & Moura J.J.G. (1997) Structure and function of molybdopterin containing enzymes. Prog. Biophys. Molec. Biol. 68(2-3):121-144.

26. Turner N., Barata B., Bray R.C., Deistung J., Le Gall J. & Moura J.J.G. (1987) The molybdenum iron-sulphur protein from *Desulfovibrio gigas* as a form of aldehyde oxidase. Biochem. J. 243:755-761

27. Hille R. & Nishino T. (1995) 4. Flavoprotein structure and mechanism. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. FASEB J. (9):995-1003.

28. Sato A., Nishino T., Noda K., Amayama Y. & Nishino T. (1995) The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. cDNA cloning and the domain structure. J. Biol. Chem. 270(6):2818-2826.

29. Kamiński Z. W. & Jeżewska M. M. (1979) Intermediate dehydrogenase-oxidase form of xanthine oxidoreductasa in rat liver. Biochem. J. 181:171-182.

30. Kamiński Z. W. & Jeżewska M. M. (1981) Effect of NADH on hypoxanthine hydroxylation by native NAD<sup>+</sup>-dependent xanthine oxidoreductase of rat liver, and the possible biological role of this effect. Biochem. J. 200:597-603.

31. Zarepour M., Kaspari K., Stagge S., Rethmeier R., Mendel R. & Bittner F. (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. Plant. Mol. Biol. 72:301-310.



32. Harris C. M. & Massey V. (1997) The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 272(13):8370-8379.
33. Enroth C., Eger B.T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T. & Pai E. F. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *PNAS* 97(20):10723-10728.
34. Sanders S. A., Eisenthal R. & Harrison R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* 245:541-548.
35. Berry C. E. & Hare J. M. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555(3):589-606.
36. Rajagopalan K. V. & Handler P. (1967) Purification and properties of chicken liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 242(18):4097-4107.
37. Turner N. A., Doyle W. A., Ventom A. M. & Bray R. (1995) Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to xanthine oxidase and dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 232:646-657.
38. Ichimori K., Fukahori M., Nakazawa H., Okamoto K. & Nishino T. (1999) Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *J. Biol. Chem.* 274(12):7763-7768.
39. Peglow S., Toledo A. H., Anaya-Prado R., López-Neblina F. & Toledo-Pereyra L. H. (2010) Allopurinol and xanthine oxidase inhibition in liver ischemia reperfusion. *J. Hepatobiliary Pancreat Sci.*
40. Amaya Y., Yamazaki K., Sato M., Noda K., Nishino T. & Nishino T. (1990) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the  $O_2$ -dependent type. *J. Biol. Chem.* 265(24):14170-14175.
41. Engerson T. D., McKelvey G., Rhyne D. B., Boggio E. B., Snyder S. J. & Jones H. P. (1987) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J. Clin. Invest.* 79:1564-1570.
42. (<http://www.expasy.org/enzyme/1.17.1.4>)
43. Leimkühler S., Kern M., Solomon P. S., McEwan A. G., Schwarz G., Mendel R. R. & Klipp W. (1998) Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Molecular microbiology* 27(4):853-869.

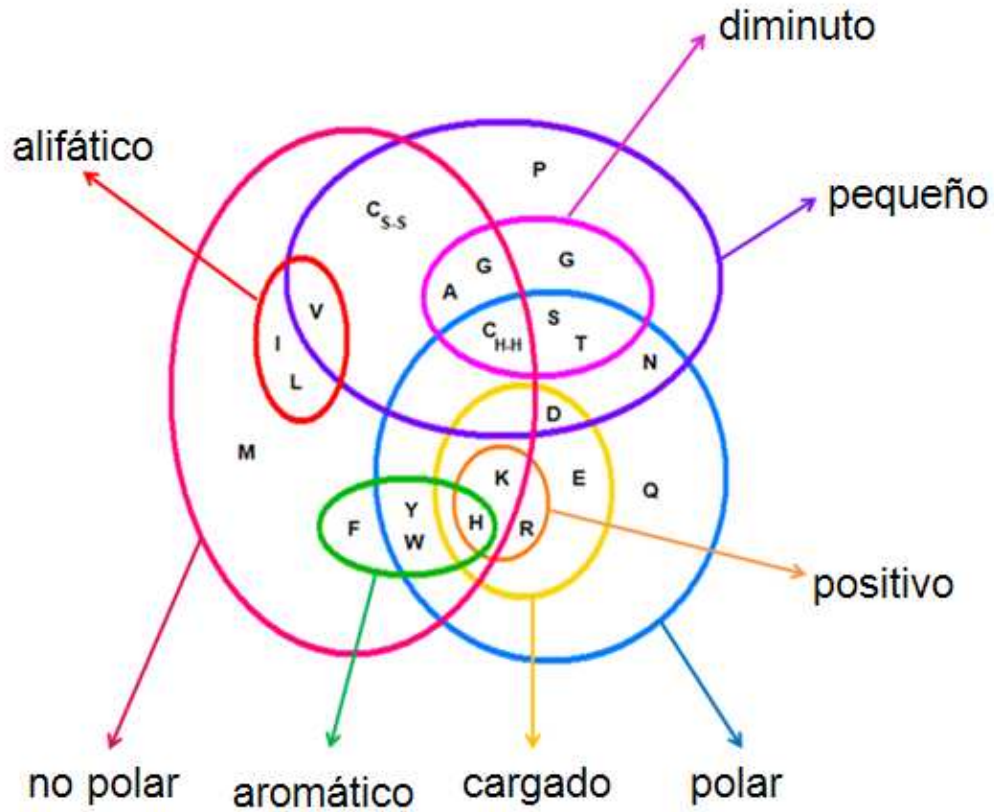
44. Wagner R. & Andreesen J. R. (1979) Selenium requirement for active xanthine dehydrogenase from *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum*. Arch. Microbiol. 121(3):255-260.
45. Leimkühler S. & Klipp W. (1999) Role of XDHC in molybdenum cofactor insertion into xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 181(9):2745-2751.
46. Deppenmeier U. & Ehrenreich A. (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 16:69-80.
47. Yamada Y. & Yukphan P. (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 125:15-24.
48. Ano Y., Toyama H., Adachi O. & Matsushita K. (2008) Energy metabolism of a unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, that lacks ethanol oxidation activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(4):989-997.
49. González B., Martínez S., Chávez J.L., Lee S., Castro N. A., Domínguez M. A., Gómez S., Contreras M. L., Kennedy C. & Escamilla J. E. (2006) Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. Biochimica et Biophysica Acta 1757:1614-1622.
50. Flores M., Contreras M., Soto L., Aguilar G. Baca B. E. & Escamilla J. E. (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. J. Bacteriol. 181(22):6987-6995.
51. Ureta A. & Nordlund S. (2002) Evidence for a conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. J. Bacteriol. 184(20):5805-5809.
52. Takemura H., Tsuchida T., Yoshinaga F., Matsushita K. & Adachi O. (1994) Prosthetic group of aldehyde dehydrogenase in acetic acid bacteria not pyrroloquinoline quinone. Biosci. Biotech. Biochem. 58(11):2082-2083.
53. Gómez S., Chávez J. L., Contreras M., Sosa M. E., Arreguín R., Pérez M., Membrillo J. & Escamilla E. (2010) Molecular and catalytic properties of the aldehyde dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a quinoxaline protein containing pyrroloquinoline quinone, cytochrome *b*, and cytochrome *c*. J. Bacteriol. 192(21):5718-5724.

54. Adachi O., Tayama K., Shinagawa E., Matsushita K. & Ameyama M. (1980) Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* 44(3):503-515.
55. Muraoka H., Watabe Y., Ogasawara N. & Takahashi H. (1981) Purification and properties of coenzyme independent aldehyde dehydrogenase from the membrane fraction of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Technol.* 59(4):247-255.
56. Ameyama M., Osada K., Shinagawa E., Matsushita K. & Adachi O. (1981) Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 45(8):1889-1890.
57. Fukaya M., Tayama K., Okumura H., Kawamura Y. & Beppu T. (1989) Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:176-180.
58. Hommel R. & Kleber H. P. (1990) Properties of the quinoprotein aldehyde dehydrogenase from "*Acetobacter rancens*". *J. Gen. Micro.* 136:1705-1711.
59. Thurner C., Vela C., Thöny-Meyer L., Meile L. & Teuber M. (1997) Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Arch. Microbiol.* 168:81-91.
60. Ameyama M. & Adachi O. (1982) Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods in enzymology*, 89:450-457.
61. Poels, P. A., Groen, B. W. & Duine, J. A. (1987) NAD(P)<sup>+</sup> from *Pseudomonas testosteroni*. A novel type of molybdenum-containing hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 166:575-579.
62. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)
63. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)
64. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)
65. Bertalan, M. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10:450 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM889285>)
66. Lucas, S. (2008) Complete sequence of chromosome of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. J. Unpublished. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP001189>).
67. (<http://es.scribd.com/doc/47030955/Cadenas-de-Markov>)
68. Berg, J. M. (2008) *Bioquímica*. Editorial Reverté, Sexta edición, Barcelona, 1026 p.p.
69. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

70. (<http://www.ebi.ac.uk/>)
71. (<http://www.brenda-enzymes.org/>)
72. (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)
73. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
74. García, E. (2011) Análisis “in silico” de la aldehído deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Pirrol quinolina quinona como grupo prostético. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

## Anexo A

### Diagrama de Venn de aminoácidos



El diagrama de Venn muestra la relación de los 20 aminoácidos a una selección de propiedades fisicoquímicas que se cree que son importantes en la determinación de la estructura de la proteína. Este diagrama es el utilizado por el programa Clustal W2 para definir las equivalencias o semiequivalencias en los alineamientos de secuencias.