



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis “in silico” de la Aldehído deshidrogenasa de
Gluconacetobacter diazotrophicus.
Pirrolo quinolina quinona como grupo prostético.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EMMANUEL GARCIA NORIEGA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella
2012**



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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno: García
Apellido materno: Noriega
Nombre(s): Emmanuel
Teléfono: 56 45 53 08
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
Número de cuenta: 302291058

2. Datos del tutor

Grado: Dra.
Nombre(s): Martha Lucinda
Apellido paterno: Contreras
Apellido materno: Zentella

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dr.
Nombre(s): Lorenzo
Apellido paterno: Patrick
Apellido materno: Segovia

4. Datos del sinodal 2

Grado: M. en C.
Nombre(s): Alfonso José
Apellido paterno: Vilchiis
Apellido materno: Peluyera

5. Datos del sinodal 3

Grado: Dr.
Nombre(s): Juan Luis
Apellido paterno: Chávez
Apellido materno: Pacheco

6. Datos del sinodal 4

Grado: Dra.
Nombre(s): Laura
Apellido paterno: Kawasaki
Apellido materno: Watanabe

7. Datos del trabajo escrito.

Título: Análisis "in silico" de la Aldehído deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Pirrolo quinolina quinona como grupo prostético.

Número de páginas: 76 p
Año: 2012

Índice

Introducción	1
I.1 Bacterias ácido acéticas.....	1
I.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	3
I.3 Sistemas respiratorios bacterianos.....	5
II. Antecedentes	11
II.1 Cadena respiratoria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	11
II.2 Aldehídos deshidrogenasas membranales de bacterias ácido acéticas.....	13
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
IV.1 Objetivo general	16
IV.2 Objetivos específico.....	17
V. Materiales y Métodos	18
V.1 Material biológico.....	18
V.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	18
V.3 Purificación de la PQQ-ALDH de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19
V.4 Análisis Electroforéticos.....	20
a) Electroforesis nativa (PAGE).....	20
b) Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).....	22
V.5 Obtención y secuenciación de péptidos internos de la proteína purificada.....	23
V.6 Cuantificación de proteínas.....	25
V.7 Análisis de secuencias.....	25

V.8 Análisis de Hidrofobicidad.....	26
V.9 Análisis de Topología.....	26
VI. Resultados.....	27
VI.1 Purificación de la ALDH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	27
VI.2 Identificación de los genes que codifican a la ALDH en <i>Ga. diazotrophicus</i>	30
VI.3 Los grupos prostéticos asociados a la ALDH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	34
VI.3.1 Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica de la ALDH de <i>Ga.diazotrophicus</i>	35
VI.3.1.1 La PQQ como grupo prostético.....	35
VI.3.1.2. El citocromo <i>b</i> como grupo prostético.....	43
VI.3.2 Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de la ALDH de <i>Ga.diazotrophicus</i> . El citocromo <i>c</i> como grupo prostético.....	48
VI.3.3 Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad III de la PQQ-ALDH codificada en el genoma de <i>Ga. diazotrophicus</i>	50
VI. 4 Análisis de hidrofobicidad y topología de la PQQ-ALDH de <i>Ga. diazotrophicus</i> ...	53
VII. Discusión.....	59
VIII. Conclusiones.....	66
IX. Bibliografía.....	68

Resumen

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria endófitas de la caña de azúcar, Gram (-), aerobia estricta y diazótropa, lo que obliga a la existencia de un complejo sistema de protección a la nitrogenasa formada por dos mecanismos: el de protección conformacional y el de protección respiratoria. La protección respiratoria se asocia a la presencia de una cadena respiratoria muy activa, que permite que el oxígeno se consuma a nivel de la membrana y no alcance concentraciones altas en el citoplasma donde se encuentra la nitrogenasa. Una característica de la familia de las bacterias ácido acéticas (BAA), a la que pertenece *Ga. diazotrophicus*, es la presencia de deshidrogenasas membranales dependientes de PQQ cuyo sitio activo se orienta hacia el periplasma (PQQ-GDH, PQQ-ADH, ALDH). En la presente tesis se estudió la ALDH membranal, la cual ha sido purificada y caracterizada por Gómez-Manzo y col. Este grupo reportó a la enzima como una proteína hetero-dimérica (79.7 y 50 kDa), que tiene como grupos prostéticos asociados un PQQ y un citocromo *b*, en la subunidad catalítica y a tres citocromos *c* en la subunidad II. Sin embargo, los resultados obtenidos discrepan de lo reportado para otras BAA, en cuanto a su composición oligomérica y grupos prostéticos. Estas discrepancias nos llevaron a buscar los genes que codifican para esta enzima en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* y una vez identificados, hacer un análisis "in silico" para determinar el número de genes que forman el operón y a partir de la secuencia de aminoácidos codificada, localizar los dominios y motivos de unión a grupos prostéticos presentes en las diferentes subunidades que forman la proteína. A partir de la proteína purificada de acuerdo al reporte de Gómez-Manzo y col, se obtuvieron péptidos internos que fueron secuenciados. Localizamos la secuencia de la subunidad I de la ALDH en el genoma de la bacteria. Para identificar el operón completo, se tomaron como base las secuencias de aminoácidos de la subunidad II y III de la ALDH de *Ga. europaeus* y se realizó un análisis de secuencias que nos permitió identificar, en el genoma de *Ga. diazotrophicus*, tres genes adyacentes formando un probable operón. La identificación de tres genes nos lleva a postular la presencia de una tercera subunidad en la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, la cual posiblemente se pierde durante su purificación y cuya función es desconocida. El análisis "in silico" de los dominios de unión de los grupos prostéticos nos permitió localizar en la subunidad I, un 66.6% de los aminoácidos implicados en dominio de unión a PQQ, así como el dominio de unión a citocromo *b*. La identificación del dominio de unión a PQQ aunado a los resultados del análisis bioquímico reportados por Gómez-Manzo, llevan a concluir que la ALDH de *Ga. diazotrophicus* es PQQ dependiente. En la subunidad II identificamos el motivo de unión de tres citocromo *c* como grupos prostéticos. Para la subunidad III localizamos a las ocho cisteínas que son el motivo de unión a un cluster 2Fe:2S. Para concluir nuestro análisis se realizó un perfil de hidrofobicidad y topología el cual muestra que nuestra enzima se encuentra anclada a la membrana por la subunidad II, mientras que la subunidad III y I se encuentran localizadas hacia el espacio periplásmico.

I. Introducción

I.1 Bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas se conocen desde hace siglos por ser grandes productoras de vinagre a nivel industrial, así como también por llevar a cabo la acetificación de bebidas alcohólicas y el deterioro de frutos.

Son bacilos Gram negativos aerobios estrictos, acidófilos, ya que crecen a pH inferiores a 5. Pueden presentarse de forma inmóvil o móvil, con flagelos polares o peritricos. Estas bacterias producen grandes cantidades de exopolisacáridos, entre ellos lévanos y celulosa.

El proceso que caracteriza a las bacterias de la familia ácido acéticas se conoce como fermentación oxidativa, el cual se desarrolla en el periplasma celular, a través de un grupo de deshidrogenasas (flavoproteínas, quinoproteínas o quinohemoproteínas), las cuales oxidan de manera incompleta diversos alcoholes y azúcares, donando los electrones producto de esta oxidación a la quinona endógena de la cadena respiratoria. La oxidación de estos compuestos da como resultado la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el substrato es etanol se produce ácido acético, siendo el producto más común de este proceso en las bacterias acéticas (46).

La taxonomía de esta familia de bacterias ha sido modificada varias veces. Recientemente ha sido reordenada de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de secuencias del rRNA 16S (60, 61). La familia de las bacterias ácido acéticas pertenecen a las Alpha-proteobacterias, orden *Rhodospirillales*; forman un grupo monofilético dentro de la familia *Acetobacteriaceae* (14). Actualmente la familia *Acetobacteraceae* se conforma por diez géneros: *Acetobacter* (A), *Gluconobacter* (G), *Gluconacetobacter* (Ga), *Acidomonas* (Ac), *Asaía* (As), *Kozakia* (K), *Neoasaia* (N), *Swaminathania* (SW), *Saccharibacter* (S) y *Granulibacter* (Gr), siendo esta última la adición mas reciente a esta familia y catalogada como una especie patógena (46).

En la familia de las bacterias acéticas, existen algunas especies que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas, condición en la cual la nitrogenasa encargada de esta fijación debería estar inactiva. Esta es una de las propiedades características de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, la cual la convierte en una bacteria de sumo interés para su estudio.

I.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Ga. diazotrophicus es una bacteria endófitas, aislada por vez primera por Cavalcante y Döbereiner en 1988 (9) a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cultivadas en diversas regiones de Brasil. Fue descrita como “una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido” la cual recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (9). Posteriormente, basándose en estudios de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA fue renombrada como *Acetobacter nitrocarptans*, nomenclatura que fue corregida por Johanna Döbereiner a *Acetobacter diazotrophicus* (24).

Finalmente, Yamada y colaboradores propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*, al comparar secuencias parciales del rRNA 16S de diferentes especies de *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Acidomonas*. Así, el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia fue oficialmente nombrado *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Ga. diazotrophicus ha sido detectado en diversas regiones del mundo en los tejidos internos de varias plantas como el café (29), cereales (34), piña (54), en algunos pastos de Camerún y en cultivos de boniato (44), en la chinche harinosa (16) y en vasos de xilema de raíces de maíz (8). Ocasionalmente se ha detectado también en la rizósfera de la caña de azúcar (32). Recientemente *Ga. diazotrophicus* ha sido aislado en cultivos de zanahoria, rábano, remolacha (36), melón, papaya, flores de calabaza (15), yuca y malanga (47).

La asociación planta-bacteria es de gran beneficio para ambos organismos, ya que la planta le proporciona a la bacteria abundantes fuentes de carbono y menor competencia por los nutrientes y la bacteria excreta el 50% del nitrógeno fijado directamente a la planta (11), así como diversas auxinas, principalmente ácido indol acético (7,21) y citocinas (30) las cuales promueven el crecimiento de la planta. También se ha descubierto que secreta una bacteriocina que inhibe el crecimiento del patógeno *Xanthomonas albilineans* de la caña de azúcar (45).

Ga. diazotrophicus es un bacilo con un tamaño de 0.7 x 2 μm (11), con extremos redondeados, flagelos laterales, aeróbico, Gram negativo. Es capaz de crecer en medios con concentraciones elevadas de sacarosa o glucosa (hasta 30%), en medios acidófilos (pH 3) y fija nitrógeno en cultivo (50,9). Forma colonias de color café, distinguiéndose de otras bacterias fijadoras de nitrógeno. No presenta actividad de nitrato reductasa, pero si puede oxidar etanol llevándolo hasta ácido acético en medios de cultivo con pH ácidos o neutros (12,51); puede usar glucosa, sacarosa ó glicerol como única fuente de carbono (9,22).

Ga. diazotrophicus tiene la paradoja de ser aerobio estricto y a la vez fijador de nitrógeno, lo que podría llevar a la inhibición irreversible de la nitrogenasa (19,48). Para evitar esta inactivación, esta bacteria presenta un complejo sistema de protección a la nitrogenasa. Esta protección se da principalmente a través de dos mecanismos: el de protección conformacional y el de protección respiratoria (58,49).

En el mecanismo de protección conformacional se produce un cambio al formarse un complejo entre la nitrogenasa y proteínas FeSII (shethna), provocando la inactivación transitoria de la enzima y protegiéndola contra los daños por el oxígeno. Cuando la concentración de oxígeno disminuye, se rompe el complejo y la nitrogenasa recupera su actividad (35,58 ,49).

El segundo mecanismo está asociado a un sistema respiratorio muy activo, debido a la presencia de deshidrogenasas muy eficientes, que protegen a la nitrogenasa del oxígeno ambiental; el oxígeno es consumido a nivel membranal, antes de llegar al citoplasma, de tal manera que su concentración intracelular es muy baja y no afecta la actividad de la nitrogenasa. La elevada actividad respiratoria genera, a su vez, el ATP suficiente para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (19,58 ,49).

I.3 Sistemas respiratorios bacterianos

Los sistemas respiratorios aeróbicos bacterianos están constituidos principalmente por dos grupos de enzimas: las que oxidan sustratos orgánicos y reducen ubiquinona y por las enzimas que reducen el oxígeno a agua (5). Estas enzimas se encuentran unidas a la membrana citoplasmática y son encargadas de transferir electrones y protones a través de varios intermediarios hacia el aceptor terminal de electrones generando un gradiente protón motriz transmembranal, que conduce a la formación de ATP por el complejo F_1F_0 (5,18).

Deshidrogenasas

Entre las enzimas que oxidan sustratos orgánicos encontramos a las deshidrogenasas membranales, que son capaces de catalizar la oxidación de un sustrato por sustracción de dos átomos de hidrógeno. Las deshidrogenasas presentan diversos grupos prostéticos asociados a ellas y pueden ser muy versátiles, dependiendo del tipo de enzimas con las cuales estén interaccionando. Se pueden encontrar centros Fe:S, FAD, FMN, citocromos tipo b, citocromos tipo c, pirrolo quinolina quinona y diversos metales (18).

Las PQQ deshidrogenasas

Las PQQ deshidrogenasas, son aquéllas que tienen como grupo prostético a la pirrolo quinolina quinona, son un conjunto de enzimas encargadas de oxidar una amplia variedad de alcoholes y azúcares (20). La gran mayoría de estas enzimas se encuentran presentes en diferentes especies de bacterias Gram negativas, están asociadas a la membrana citoplasmática y poseen su sitio catalítico orientado hacia el lado periplásmico (25).

Las PQQ deshidrogenasas pertenecen al grupo de las quinoproteínas, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que difieren completamente de aquéllas que dependen de los nicotina ó flavín nucleótidos (20,43). Estas proteínas utilizan como cofactor o-quinona (20, 17,59); en algunos casos pueden presentar un grupo prostético adicional, como citocromos *b* o *c*, por lo cual son llamadas quino-

hemoproteínas. Estas deshidrogenasas transfieren los electrones producto de la oxidación de sus sustratos a una poza de quinona en el sistema respiratorio de las bacterias.

Se han identificado cinco tipos de o-quinona que forman parte de las quinoproteínas: pirrolo-quinolina (grupo PQQ), triptofil-triptofano (grupo TTQ), Topa-quinona (grupo TPQ), tirosil-lisina (grupo LTQ) y cisteína triptofil quinona (CTQ) (20,25 ,57).

El grupo de las PQQ-quinoproteínas incluye a múltiples enzimas con actividad de deshidrogenasas, algunas oxidasas y también ciertas descarboxilasas bacterianas (39). Se han identificado más de 20 enzimas que presentan PQQ como grupo prostético (25); este grupo se sintetiza a partir de residuos de tirosina y ácido glutámico y su unión a la enzima a la que está asociada es no covalente (20).

Su estructura consiste en una orto-quinona (o-quinona) que contiene 2N 's y 3H 's, uno de los cuales es intercambiable; las posiciones C4 Y C5 del anillo de las quinonas se reduce a semiquinona y a quinol durante la catálisis ($PQQ \rightarrow PQQH^+ \rightarrow PQQH_2$). El carbonilo C5 en la forma oxidada es muy reactivo a nucleófilos como alcoholes, amonio, cianuro y aminoácidos (25). Con los ácidos fuertes, el grupo PQQ promueve la formación de una lactona interna (20).

El grupo PQQ puede ser excretado al medio en concentraciones variables (entre 1 µg/ml y 1 mg/ml), dependiendo de la composición del medio de crecimiento.

La PQQ-deshidrogenasa mejor estudiada es la metanol deshidrogenasa (MDH) de *Metilobacterium extorquens*; esta enzima ha sido analizada mediante difracción de rayos X, lo cual permitió conocer su estructura (62,6). Es una proteína tetramérica ($\alpha_2\beta_2$); cada subunidad α (66 kDa) posee una molécula de PQQ y un ión Ca^{2+} (6). La subunidad α de la M-DH presenta una estructura en "super-barril", constituida por ocho láminas β -antiparalelas, que están ordenadas radialmente alrededor de una cavidad central, lo que asemeja a los pétalos de una flor o a las aspas de una hélice(6). En esta estructura en "super-barril" se encuentran las regiones proteicas funcionales (sitios catalítico y de unión del grupo PQQ), involucradas en la oxidación del sustrato (42). La base de la cavidad es hidrofóbica y plana y está delimitada por un residuo de triptófano (Trp-243), mientras que la cubierta superior está constituida por cisteínas adyacentes (Cis-103/Cis-104), que forman un doble anillo disulfuro (20). Las cisteínas están unidas en posición *trans* mediante un enlace peptídico no planar (6). En las proximidades del grupo PQQ se encuentra el ion Ca^{2+} , el cual es esencial para mantener firme a grupo PQQ durante la oxidación del metanol; en ausencia de este ión la MDH es inactiva (20,41).

Quinonas

Otro componente de la cadena respiratoria son las quinonas, que son moléculas no proteicas altamente hidrofóbicas las cuales participan en el transporte de electrones. Las quinonas actúan como aceptores de átomos de hidrógeno y como donadores de electrones (38), provenientes de las deshidrogenasas primarias. Las quinonas-

bacterianas son clasificadas en función de su estructura y se pueden dividir en dos tipos principales: ubiquinona y menaquinona (18).

Oxidasas terminales

Las oxidasas terminales son enzimas membranales presentes en bacterias aeróbicas, que catalizan la reducción de oxígeno molecular a agua (18) y en algunos casos pueden translocar protones a través de la membrana.

Existe una gran diversidad de oxidasas bacterianas y la expresión de cada una de ellas dependerá del tipo de medio en el que se encuentre y del estadio de desarrollo; la tensión de O₂ es en general el factor regulador más importante de su expresión (18).

Estas enzimas se pueden dividir en dos grupos: quinol oxidasas y citocromo c oxidasas. Las quinol oxidasas son aquéllas que reciben directamente los electrones de la poza de quinona, mientras que las citocromo c oxidasas reciben los electrones vía citocromo c (5,18).

Una cadena respiratoria bacteriana típica está formada por una serie de deshidrogenasas y dos o tres oxidasas terminales según las condiciones de crecimiento (5).

En algunos casos la cadena respiratoria también funciona como “tiradero de poder reductor”, reoxidando al NADH ó controlando los niveles de O₂ intracelular, como es el caso de la nitrogenasa en *Ga. diazotrophicus* (18).

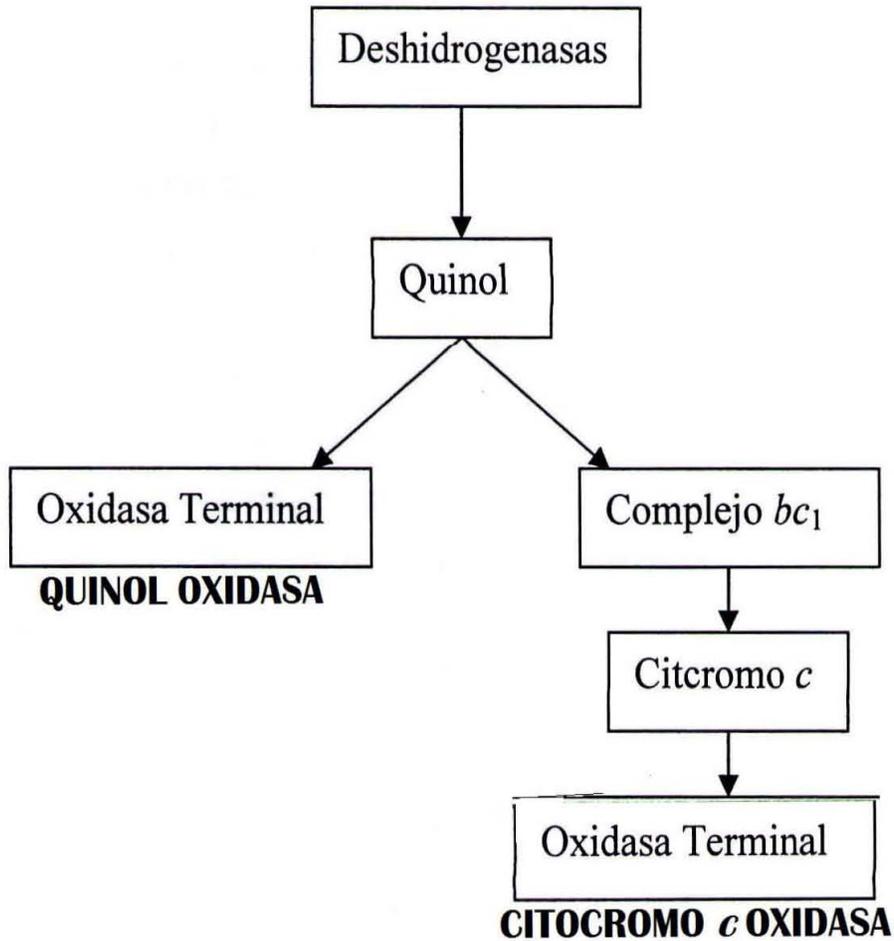


Figura 1. Esquema general de la composición de los sistemas respiratorios de tipo quinol oxidasa y citocromo *c* oxidasa

II. Antecedentes

II.1 Cadena respiratoria *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* está formada por varias deshidrogenasas membranales las cuales son encargadas de oxidar sus correspondientes sustratos para donar los electrones a una UQ₁₀, que a su vez donará los electrones a las oxidasas terminales; en el caso de esta bacteria son ubiquinol oxidasas (19).

Las deshidrogenasas membranales que encontramos en *Ga. diazotrophicus* se pueden clasificar en dos grupos: las que se encuentran orientadas hacia el lado citoplasmático, como la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa y aquéllas que poseen su sitio catalítico orientado hacia el espacio periplásmico, las cuales tienen como grupo prostético, la pirrolo pirrolina quinona (PQQ); entre ellas han sido identificadas la PQQ-glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ ALDH) (19). La PQQ-GDH tiene solamente como grupo prostético al PQQ, mientras que las PQQ-ADH y la PQQ-ALDH además del PQQ tiene citocromos *b* y/o *c*.

Ga. diazotrophicus presenta una regulación de la expresión de oxidasas diferente a la que se presenta en las otras bacterias. La presencia de las oxidasas terminales depende de la concentración de amonio. Cuando las condiciones de crecimiento son

de fijación de nitrógeno (entre 1 y 2 mM de amonio), las oxidasas predominantes son la citocromo oxidasa ba_3 (19,27) y la citocromo oxidasa bb_3 . En condiciones de no fijación de N_2 , la oxidasa prevaeciente es la citocromo bd (19).

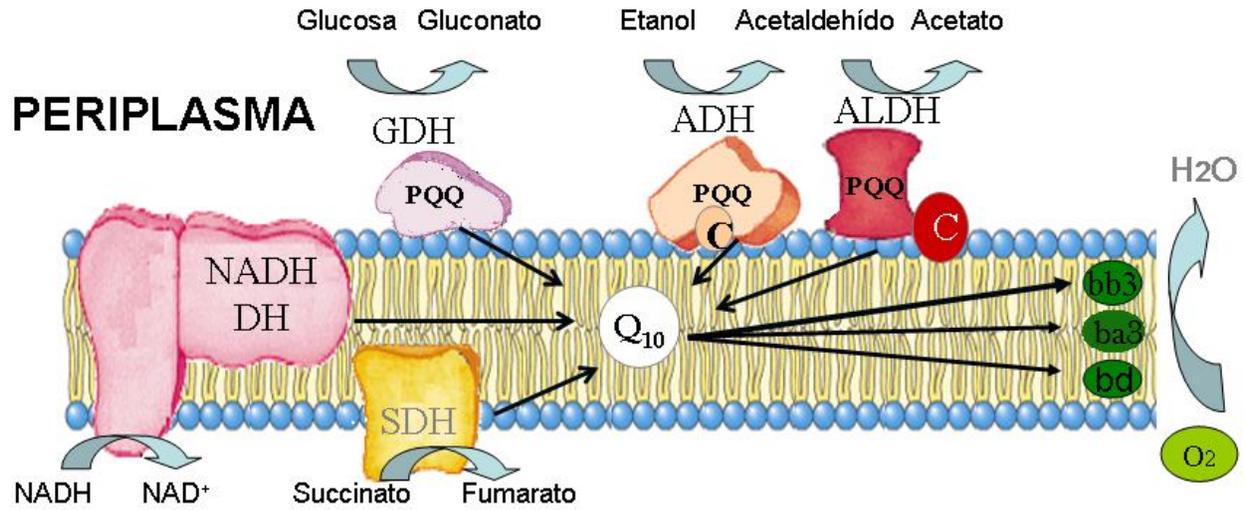


Figura 2. Esquema de la cadena respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (19).

El complejo ALDH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* es un heterodímero de dos subunidades con 79,7 y 50 kDa. Los dos grupos prostéticos probablemente asociados a la subunidad grande (79,7 kDa) son un PQQ el cual fue confirmado por espectroscopia de fluorescencia, EPR, HPLC y una hemo b que fue detectada por espectroscopia UV/VIS y confirmado químicamente mediante análisis de HPLC de ácido-acetona extraídos de la purificación de la enzima. La subunidad menor (50 kDa) es una hemoproteína que contiene tres hemos C . El citocromo c fue evidenciado por tinción de tetrametilbenzidina, hemo catalizado por la actividad de peroxidasa, por espectro de absorción de la diferencia y la valoración redox de los citocromos c (26)

II.2 Aldehídos deshidrogenasas membranales de bacterias ácido acéticas

Las aldehído deshidrogenasas membranales en bacterias acéticas son enzimas de orientación periplásmica, encargadas de catalizar la oxidación de acetaldehído a ácido acético. Se postula que están acopladas con la alcohol deshidrogenasa membranal para que a partir de la oxidación de alcohol, se obtenga ácido acético; los electrones producto de estas oxidaciones son transferidos a la cadena respiratoria.

Estas enzimas forman un grupo heterogéneo en el que podemos encontrar variaciones en cuanto a su estructura molecular, grupos prostéticos y propiedades catalíticas.

Las ALDH's pueden estar conformadas por tres subunidades, como son los casos de *A. aceti* y *Ga.europaeus* (3, 4, 40,56). Sus subunidades tienen un peso molecular relativo de entre 75 y 79 kDa, que corresponde a la subunidad catalítica, 45-46 kDa y 14-17 kDa. En cuanto a los grupos prostéticos, los espectros de absorción obtenidos en la ALDH de *Acetobacter aceti* fueron similares a los de la alcohol deshidrogenasa y la glucosa deshidrogenasa de la misma bacteria, las cuales tienen como grupo prostético PQQ. Por esta razón se considera muy probable que la ALDH de *Acetobacter aceti* contenga PQQ como grupo prostético (3, 4,40).

Se han reportado ALDH's compuestas por dos subunidades, como es el caso de *Acetobacter rancens*, *A. polyoxogenes* *G. suboxydans* y *Ga. diazotrophicus* (26). En general, los pesos moleculares relativos de estas subunidades están entre 75 y 86 kDa para la subunidad mayor, que es la subunidad catalítica y entre 45 y 66 kDa para la

subunidad menor. La excepción la encontramos en *A. polyoxogenes* cuya subunidad mayor se encuentra en el rango mencionado, pero el peso relativo reportado para la subunidad menor es de 19 kDa.

Con respecto a sus grupos prostéticos, espectros de absorción mostraron la presencia de citocromo *c*, asociado a la subunidad de 45-66 kDa, en *G. suboxydans* (1) y *Ga. diazotrophicus* (26). En cuanto a la presencia de PQQ, esta fue evidenciada por estudios de fluorescencia y espectros de absorción y se encuentra asociada a la subunidad catalítica (28,23,1,3). En el caso de *Ga. diazotrophicus*, también se ha encontrado la presencia de citocromo *b*, probablemente asociado también a la subunidad catalítica (26).

Sin embargo, la presencia de PQQ en ALDHs ha sido cuestionada. Takemura, mediante mutagénesis química, obtuvo una mutante PQQ-negativo de *Acetobacter sp.* BPR2001; esta mutante carecía de actividades de GDH y ADH, pero aún era capaz de oxidar aldehído. Basándose en estos resultados, Takemura postula que la ALDH de bacterias ácido acéticas no tiene como grupo prostético PQQ, aunque no purificó a la enzima responsable de la oxidación de aldehído (53). Por otro lado, Thurner purifica y analiza la secuencia de la ALDH purificada de *Ga. europaeus*. Reporta la presencia de 3 citocromos *c* asociados a la subunidad intermedia, basándose en la presencia de 3 motivos de unión a este citocromo presentes en la secuencia de aminoácidos de esta subunidad (56). A la subunidad pequeña no se le ha asignado función, aunque se postula la presencia de un cluster [2Fe:2S], de acuerdo al espectro de absorción de la proteína pura, en donde observan una señal a 465 nm que puede estar asociada a la

presencia de este cluster y al análisis de la secuencia de aminoácidos de esta subunidad, donde encuentran motivos característicos para su unión. En cuanto a la subunidad catalítica propone que contiene un hemo *b* y la posible presencia de un centro molibdeno-pterina, basándose en el alineamiento de secuencias de proteínas eucarióticas que presentan el centro molibdeno-pterina como grupo prostético (56). Con estos resultados y los reportados por Takemura, postulan a la ALDH como una proteína molibdo-pterina dependiente.

Tabla 1. Tabla donde se muestran la composición oligomérica y los grupos prostéticos asociados a las ALDHs membranales (26).

Propiedad	Fuente					
	<i>Acetobacter polyoxogenes</i>	<i>Gluconobacter suboxydans</i>	<i>Acetobacter rancens</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
	23	1	28	4	56	26
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)
Grupos prostéticos:						
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)

III. Hipótesis

Si la ALDH de *Ga.diazotrophicus* es una proteína PQQ-dependiente compuesta de dos subunidades, como lo indican los resultados de su caracterización bioquímica, entonces el análisis de la secuencia de aminoácidos mostrará que el operón que la codifica está compuesto por dos genes estructurales y se podrá identificar la secuencia de la subunidad catalítica y el dominio de unión para este grupo prostético.

IV. Objetivos

IV. 1 Objetivo general

Definir la composición molecular e identificar los dominios de unión a los grupos prostéticos mediante un análisis “in silico” en la secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

IV.2 Objetivos específicos

Identificar los dominios de unión a PQQ y citocromo *b* en la secuencia de la subunidad I (catalítica) de *Ga. diazotrophicus*, mediante un análisis "in silico".

Identificar en la secuencia de la subunidad II ALDH de *Ga. diazotrophicus* los motivos de unión a citocromo *c*, mediante el análisis de su secuencia.

Determinar la presencia de un ortólogo del gen que codifica para la sub III presente en *Ga. europaeus* y de encontrarlo, localizar los dominios de unión a los clusters **2Fe-2S**.

V. Materiales y Métodos

V.1 Material biológico

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa PAL5.

V.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Ga. diazotrophicus PAL5 se creció en un medio de cultivo líquido LGI modificado (19), el cual está compuesto de sacarosa al 3 % y sales: K_2HPO_4 (5g), Na_2HPO_4 (4g), $MgCl_2$ (0.2g), $CaCl_2$ (0.02g), $FeCl_3$ (0.01g), citrato de sodio industrial (5g), para un litro. Se ajusta el pH a 5.

Los pre-cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio ó de 2L conteniendo 1L de medio; se utilizaron como inóculo 1 ml ó 25 ml de un cultivo activo, respectivamente. La bacteria fue incubada con una agitación de 250 rpm y a 30° C.

Cuatro litros de inóculo fueron utilizados para sembrar un fermentador de 60 L, donde se creció a la bacteria en las mismas condiciones mencionadas anteriormente; a las 24 h de crecimiento al medio de cultivo se le adicionó etanol al 0.75 %, lo que induce la expresión de la PQQ-ADH y de la ALDH (52). El cultivo se dejó crecer durante 12 h más. Las células fueron cosechadas, utilizando una centrífuga de flujo continuo marca Sharples Pemwalt (tipo CLT 1, Tlanepantla, México), a 5 000 rpm y lavadas 2 veces por centrifugación a 7000 rpm, con un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 6,

adicionado de 1 mM MgCl₂ y 1 mM CaCl₂. Las células lavadas fueron almacenadas a -179 °C hasta su utilización.

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

La PQQ-ALDH fue purificada de acuerdo al protocolo descrito por Gómez-Manzo y col. (26). Las células fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6 y rotas por una prensa francesa a una presión de 1500 psi, en presencia de los inhibidores de proteasas PMSF (14.72 µg/ml; Sigma-aldrich) y Complete™ (una tableta por cada 50 ml; Roche). Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 7000 rpm durante 10 min; a partir del sobrenadante se obtiene la fracción membranal por centrifugación a 30 000 rpm durante 30 min. Las membranas fueron lavadas dos veces con el mismo amortiguador. Todo el procedimiento se hizo a 4 °C.

Las membranas celulares (10 mg/ml de proteína) se resuspendieron en 0.5% de Triton X100 (v/v) en un amortiguador de 10 mM de fosfato de potasio, pH 6.0, (amortiguador KPb). Se incubaron a 4° C durante dos horas bajo agitación suave y se centrifugaron a 144,000 x g por 60 min. El sobrenadante que contienen la actividad de la ALDH se aplicó en una columna de QAE-Toyopearl (3x18cm), previamente equilibrada con KPb que contiene 0.1% de Triton X-100. Las proteínas no retenidas fueron lavadas con tres volúmenes de KPb. La ALDH se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.25 M NaCl en el mismo amortiguador.

Las fracciones que contenían actividad de acetaldehído ferricianuro-reductasa, pero no de etanol ferricianuro-reductasa, se colectaron y dializaron contra 20 volúmenes de

KPB con 0.1% de Tritón X-100 durante 12 horas. El dializado se aplicó a una columna de Hidroxiapatita-Ultrogel (HA-Ultrogel de 3 x 15 cm), previamente equilibrada con KPB que contiene 0.1% de Tritón X-100. Las proteínas no retenidas fueron lavadas con tres volúmenes del mismo amortiguador. La ALDH se eluyó utilizando un gradiente lineal 0 a 0.25 M de fosfato de potasio (pH 6.0) que contiene 0.1% de Triton X-100, en amortiguador KPB. Las fracciones con actividad de acetaldehído ferricianuro reductasa se colectaron y concentraron 10 veces por ultrafiltración en un Amicon YM30 MW (Amicon Corporation, Danvers, Mass, USA).

La preparación obtenida fue aplicada a una columna de filtración molecular Sephacryl-S200 (65X5cm), previamente equilibrada con cinco volúmenes de amortiguador KPB, que contiene 0.1% de Tritón X-100. Las fracciones con actividad enzimática se colectaron y concentraron 10 veces por ultrafiltración en un Amicon YM30 MW (Amicon Corporation, Danvers, Mass, USA) y fueron almacenadas a 4°C para su posterior utilización.

V.4 Análisis Electroforéticos.

a) Electroforesis nativa (PAGE).

La pureza de la preparación conteniendo a la PQQ-ALDH purificada se analizó por electroforesis nativa discontinua en un gel de poliacrilamida. El resolvedor estaba compuesto por 7.5% de acrilamida, 8.0% de glicerol, 0.1% de tritón X-100 y 375mM de Tris-HCl, pH 8.9; la solución se polimerizó utilizando 10mg de persulfato de amonio y

0.1% de N.N.N'.N',-tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador estaba compuesto por 4% de acrilamida, 8% de glicerol, 0.1% de Tritón X-100 y 125 mM de Tris-HCl; la solución se polimerizó utilizando 10mg de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. 30 μ g de la PQQ-ALDH purificada, se diluyeron en un amortiguador de carga compuesto por 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 15% de glicerol y 0.1 % de Tritón X-100. El amortiguador de corrida está compuesto por 0.33% de Tris y 1.44% de glicina. Se utilizó como marcador de peso molecular el precisión plus Standard™ (BIO-RAD).

La electroforesis fue desarrollada a una corriente constante de 25 mA a 4°C. Una parte del gel fue teñido con azul de Coomassie R250 al 0.05% en una solución de metanol (25% v/v), ácido acético (10 % v/v) y glicerol (5 %) en agua destilada; después de llevarse a cabo la tinción, el gel fue lavado con la misma solución pero sin Coomassie R250.

A la otra parte del gel se le realizó una zimografía para detectar la actividad de ALDH. Para la zimografía se utilizó nitro azul de tetrazolium como aceptor de electrones, metasulfato de fenazina (PMS) como intermediario y como sustrato acetaldehído, de acuerdo a lo descrito previamente por Adachi y col (2) .El gel fue sumergido en 200 ml de amortiguador de McIlvane (fosfatos y citratos), pH 6.0, conteniendo 28 mg de metasulfato de fenazina (PMS) y 8 mg de nitro azul de tetrazolium (NTB). Se incubó en la oscuridad por 20 minutos a 4 °C, con agitación constante. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato a una concentración final de 100 mM. Después de la aparición de bandas azules (reacción positiva), la reacción fue detenida por medio la adición de ácido acético al 7%

b) Electroforesis desnaturalizante. (SDS-PAGE)

La estructura oligomérica de la PQQ-ALDH purificada, fue analizada en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando la técnica de Laemli modificada (13). El gel resolvente se preparó a una concentración final de 10% de acrilamida, 8.0% de glicerol, 1% dodecil sulfato de sodio (SDS) y 375 mM de Tris-HCl a pH 8.9; la solución fue polimerizada por la adición de 10 mg de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. El gel concentrador contenía 4% de acrilamida, 8% de glicerol, 1% de SDS y 125 mM de Tris a pH 6.8; la solución fue polimerizada por la adición de 10 mg de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. 30 µg de la ALDH se diluyen en la mezcla de digestión la cual contenía: 5% de SDS, 3% de β-mercaptoetanol, 15% de glicerol y 125 mM de Tris-HCl a pH 6.8.

La preparación fue puesta en un baño de agua en ebullición por tres minutos. El amortiguador de corrida estuvo compuesto por 1.44% de glicina, 0.33 de Tris y 1% de SDS. Como marcador de peso molecular fue utilizado el Precision Plus Standard™ (BIO-RAD).

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

Para determinar la presencia de citocromo *c* se realizó la tinción de peroxidasa (55). Para ello, el gel teñido con Coomassie fue desteñido con la misma mezcla de metanol, acético, glicerol y agua, lavado con agua e incubado en una mezcla de reacción que contenía 250 mM de acetato de sodio, pH 5.0 (120 ml) y 18 mg de tetrametilbencidina, disueltos en 80 ml de metanol. El gel fue incubado durante 2 horas en oscuridad y con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a una concentración final de 30 mM, como agente revelador de la presencia de citocromos tipo *c*. La reacción fue detenida sumergiendo el gel en 250 mM de acetato de sodio, pH 5.0 en 30 % de isopropanol.

V.5 Obtención y secuenciación de péptidos internos de la proteína purificada.

La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la PQQ-ALDH asociadas a las bandas obtenidas en el gel SDS-PAGE, fue determinada por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para la determinación del amino terminal de cada una de las subunidades, fue utilizada la técnica de degradación de Edman; ambas subunidades se encontraron bloqueadas, por lo que se procedió a obtener secuencia de péptidos internos. Las bandas fueron cuidadosamente cortadas del gel teñido con azul de Coomassie, desteñidas, reducidas, carbaminometiladas, lavadas, digeridas con tripsina y extraídas de acuerdo a lo reportado por Kinter (31). El volumen del extracto fue reducido por evaporación, por medio de una centrífuga al vacío a temperatura ambiente y el volumen se ajustó a 20 µl con ácido fórmico.

El análisis peptídico por espectrometría de masas fue realizado en el sistema 3200 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), el cual está equipado con un nano electrospray y un sistema de nanoflujo (agilent 1100 nano pump, Waldbronn, Germany). Las muestras digeridas fueron desaladas en una punta ZipTic-C18 y separadas en una columna Zorbax 300SB C-18 (3.5 μ m, 50 X 0.075 mm, Agilent, Germany), equilibrada con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico 0.1%, por un periodo de 80 minutos. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo. El calor de interfase para desolvatar fue mantenido a 150°C. El espectro fue registrado en modo automático usando el programa Information Dependent Acquisition (IDA). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1 utilizando el modo Enhanced Ms mode. El intervalo de exploración por EMS fue fijado a t m/z 400-1500 y 4000 amu/s. Los iones seleccionados fueron sujetos a exploración por Enhanced Resolution a una velocidad baja de 250 amu/sec sobre un intervalo de masas estrecho (30 amu), y después sometidos a exploración en un Enhanced Product Ion Scan (Ms/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada de colisión (CAD). Los fragmentos de iones generados fueron capturados y analizados en una trampa de iones lineal Q3. La identificación proteica fue realizada con la base de datos (NCBI nr) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>).

V.6 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry modificado (37) utilizando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

V.7 Análisis de secuencias

Los análisis de secuencias para la identificación de los dominios y motivos de unión a los grupos prostéticos en la ALDH de *Ga. diazotrophicus* se realizaron utilizando el programa Blast en NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), la herramienta Arquitectura de dominios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) y ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

V.8 Análisis de Hidrofobicidad.

El perfil hidrofóbico se realizó utilizando los programas DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), SPOCTOPUS (<http://octopus.cbr.su.se/>) y TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>), que predicen los segmentos transmembranales.

V.9 Análisis de Topología.

El perfil de topología se realizó utilizando los programas:

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

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), que predicen la orientación en la membrana de cada uno de los aminoácidos.

VI. Resultados

VI.1 Purificación de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

Siguiendo el procedimiento descrito por Gómez-Manzo y col. (26), se purificó a la ALDH de *Ga. diazotrophicus* (Figura 3). El análisis electroforético nativo de la enzima purificada, muestra una banda única cuyo peso molecular es de 129 kDa; de acuerdo al ensayo por zimografía, en la que se utilizó acetaldehído como sustrato y NTB y PMS como aceptor y mediador de electrones respectivamente, esta banda se asocia a la actividad de aldehído deshidrogenasa (Figura 3 a-b). El análisis por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), nos mostró dos bandas con un peso molecular de 79.7 y 50 kDa (Figura 3 c). La menor de estas bandas se asocia a la presencia de citocromo c de acuerdo a la reacción de peroxidasa (Figura 3 d). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Gómez-Manzo y col (26) lo cual indican que la proteína purificada es una aldehído deshidrogenasa.

Para corroborar que la proteína purificada corresponde a una ALDH, se decidió secuenciarla y con esta secuencia realizar un análisis en las bases de datos. Para ello, a partir de las bandas obtenidas por SDS-PAGE, se obtuvieron y secuenciaron péptidos internos (Dr. Guillermo Mendoza, laboratorio de proteínas, Facultad de Medicina, UNAM) correspondientes a las dos subunidades de la enzima purificada. Solo se pudieron obtener 8 secuencias de péptidos de la subunidad I.

La subunidad II, al tener como grupos prostéticos 3 citocromos c, contiene una concentración de hierro alta que interfiere con la determinación.

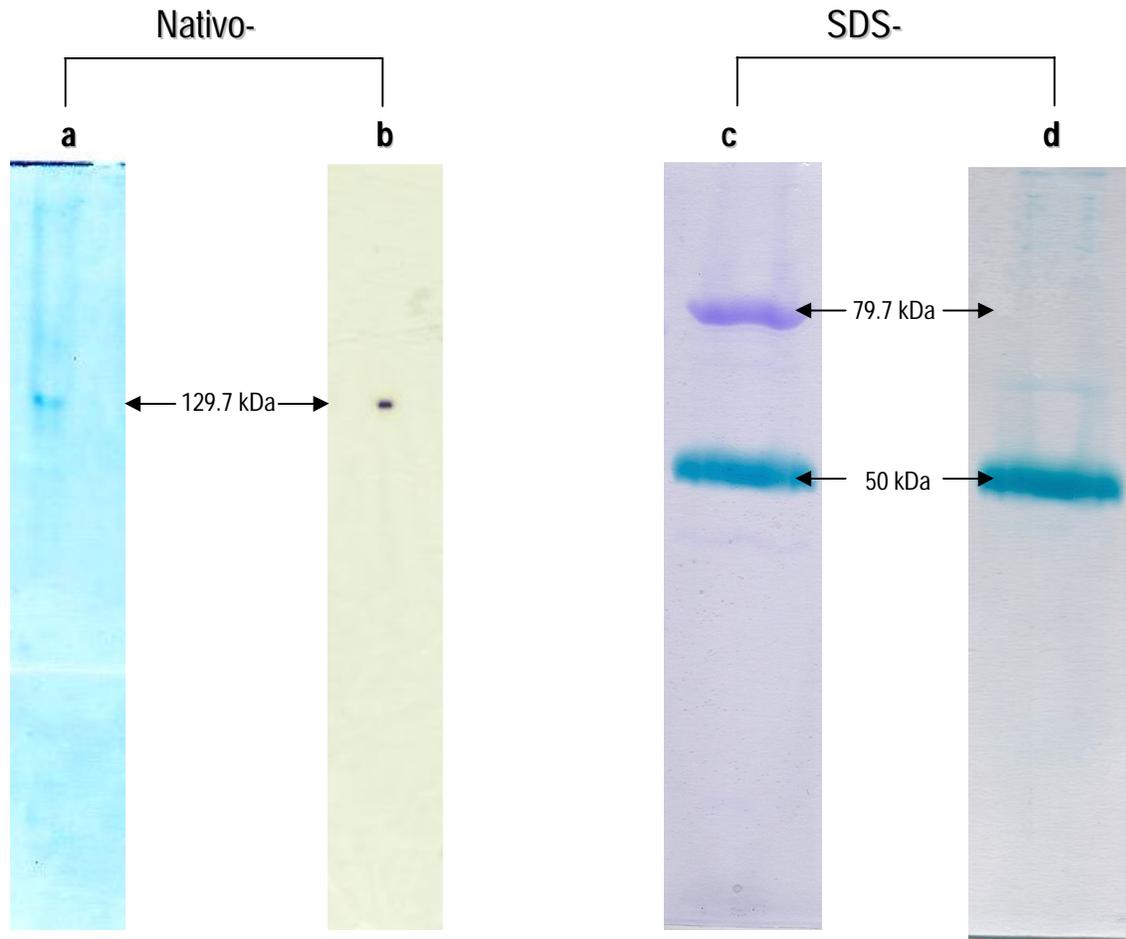


Figura 3. Análisis electroforético de la ALDH purificada. Los carriles **a** y **b** muestran las bandas asociadas a la proteína al ser analizada por electroforesis nativa. Las bandas fueron teñidas con Coomassie Blue R-250 (**a**) y por zimografía (**b**). Los carriles **c** y **d** muestran las bandas asociadas a la enzima al ser analizadas por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE); el carril **c** muestra las bandas teñidas con azul de Coomassie Blue R-250 y el carril **d** muestra la tinción específica para citocromos c (reacción de la peroxidasa).

Los 8 péptidos obtenidos fueron:

- a) LPLKPASER
- b) SYLLGGGFGRRLLNGDYMIPAALASKALGGKPVKLILTR
- c) DDMQFDSF
- d) AIAGGDHWYEVGAFR
- e) NKGQAPDSVGGALR
- f) LPKDTAMGLATTAGQER
- g) NLNTYTPLR
- h) AIFNAVGVR

Estas secuencias se analizaron utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>). En el momento en el que se realizó este análisis no se había liberado aún la secuencia del genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, por lo que los resultados nos permitieron identificar la secuencia de

aminoácidos de los 8 péptidos en la secuencia de la subunidad I de la ALDH de *Gluconacetobacter europaeus* ([GenBank CAA69955.1](#)), otra bacteria de la familia de las ácido acéticas, con una identidad del 100 %.

VI.2. Identificación de los genes que codifican a la ALDH en *Ga. diazotrophicus*.

Poco tiempo después de haber realizado el análisis mencionado, fue liberada la secuencia completa del genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. El análisis se realizó nuevamente y se localizaron estas secuencias de aminoácidos en la subunidad I de la ALDH de esta bacteria ([Figura 4](#)).

La identificación de los péptidos secuenciados en la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, nos permite asegurar la naturaleza de esta enzima.

Como hemos mencionado, de acuerdo a su caracterización bioquímica la proteína en esta bacteria está compuesta por dos subunidades. Sin embargo, en *Ga. europaeus*, otra bacteria que forma parte de la familia de las Bacterias ácido acéticas, la enzima ha sido purificada y de acuerdo a este reporte está formada por tres subunidades cuyos pesos moleculares son de 79, 46 y 17 kDa ([56](#)). Nos preguntamos cuál era la composición molecular de la ALDH que está presente en *Ga. diazotrophicus* ¿es una proteína de dos subunidades, como fue purificada ó es posible que la subunidad III de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* se pierda durante la purificación.

ALDH Sub I péptidos	MDKRGGATGQMSRRGFLMIAAGGAGALFGFPAARAAEQFPAAGLPGNGAFEPTIWCAIAP	60
ALDH Sub I péptidos	DGTVTVNIIRAEMGQHIGSALARIIADEMADWNRVRINYVSDPKWGLMVTGGSWSVWM	120
ALDH Sub I Péptidos	TWDVFRQAGAAAARIALTEAGAGLLGVAPGQCITRDGMVVAGSRISISYGDIVARAHPSHSF	180
ALDH Sub I Péptidos	TPDEMAK LPLKPASER RLVGNNTLKDIPPKTNGTAIYGIDARVEGMVYARPKMPPTRY	240
	----- LPLKPASER -----	9

ALDH Sub I Péptidos	GSRVRSVDDSAARTVKGYQRYIELDDPSGVVQGWVAVASTYTAAIRAADLLKVDWAPGD	300
ALDH Sub I Péptidos	AVHVSEQDVIDHGRAQIDRKDGGVMVFDDPGVDAAFAAAAATTFADYTCASVLHYQLEPT	360
ALDH Sub I Péptidos	NALAFEKDGIFEIHAGNQWQSLILPTLAKALERPEDKIVLRS SYLLGGGFGRRLNGDYMIP	420
	----- SYLLGGGFGRRLNGDYMIP -----	28

ALDH Sub I Péptidos	AALASKALGGKPVKLILTRSDMQFDSF RSFSPSIQRVRVAFDGHKHAITAMEYHASAGWPTQ	480
	AALASKALGGKPVKLILTR - DDMQFDSF -----	55

ALDH Sub I Péptidos	VMAAAFMSKGVGDKKYDPFA AIAGGDHWYEVGAF FRVRLSNDLANRTFRPGWLRVSPGW	540
	----- AIAGGDHWYEVGAF -----	69

ALDH Sub I Péptidos	SWGLESGWDEIAHAQGRDAVQFRLDHLTGAG RNKGQAPDSTGGALR QAAVVRRVAEKAGW	600
	----- RNKGQAPDSVGGALR -----	84
	*****.*****	
ALDH Sub I Péptidos	GRAL PADTGLGIATTFGQER GMPTWIIACCAQVHVDRATGIVRCQKLTIVVDAGTIVDPDG	660
	--- LPKDTAMGLATTAGQER -----	101
	** *. : * : ** *	
ALDH Sub I Péptidos	ARAQTEGAALWGLSMALFEGSEIVNGLPRDR NLDTYTPLR IAADVPEMDIEFLPSTEKPTG	720
	----- NLNTYTPLR -----	110
	** : *****	
ALDH Sub I Péptidos	LGEPGTTVVAPAIGN AIFNAVGV RMHLPIRPADVHLALRSRNGTAST	768
	----- AIFNAVGV -----	119

Figura 4. Localización de los péptidos internos de la ALDH purificada, en la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. (GenBank No. [CAP57224](#)).

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

Decidimos buscar dentro del genoma de *Ga. diazotrophicus* los genes que codifican para esta proteína. Ya habíamos identificado el gen que codifica para la subunidad I, basándonos en la secuencia de los péptidos internos y para la identificación del otro u otros genes se tomaron como base las secuencias de la subunidad II (No. de acceso GenBank: CAA69953.1) y III (No. de acceso GenBank: CAA69954.1) de la ALDH de *Ga. europaeus* y se realizó un Blast. Como resultado, se lograron identificar dos secuencias de aminoácidos que presentaban una alta identidad con las de estas subunidades.

La secuencia con número de acceso GenBank: YP_001603510.1, se identificó como una proteína en la cual se encontraban motivos de unión a citocromo *c*, por lo que la reportaban como una posible PQQ-ADH (sabemos que de acuerdo a la reacción de peroxidasa, los citocromos *c* son grupos prostéticos de la subunidad II de la PQQ-ADH y también de la ALDH en *Ga. diazotrophicus* (26). Esta proteína tuvo una identidad del 88 % con la subunidad II de la ALDH de *Ga. europaeus* (Figura 5A).

La secuencia con No. de acceso GenBank: YP_001603511, correspondía a una proteína en cuya secuencia se encuentran motivos de unión a clusters Fe:S, de manera similar a los que se presentan en las xantinas deshidrogenasas. Esta proteína tuvo una identidad del 100 % con la subunidad III de la ALDH de *Ga. europaeus*.

Estos resultados nos permitieron localizar a tres genes estructurales dentro del operón que codifica para la ALDH en el genoma de *Ga. diazotrophicus*; por lo que apoya

nuestra suposición de que la subunidad III de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* se perdió durante la purificación.

Comparando las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades de la proteína localizadas en *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus*, determinamos que en ambos casos los genes que las codifican están organizados como un operón (Figura 5). Los dos operones tiene la misma organización y se transcriben en el mismo sentido: la subunidad II está codificada primero, seguida de la subunidad III y luego la subunidad I, que es la subunidad catalítica.

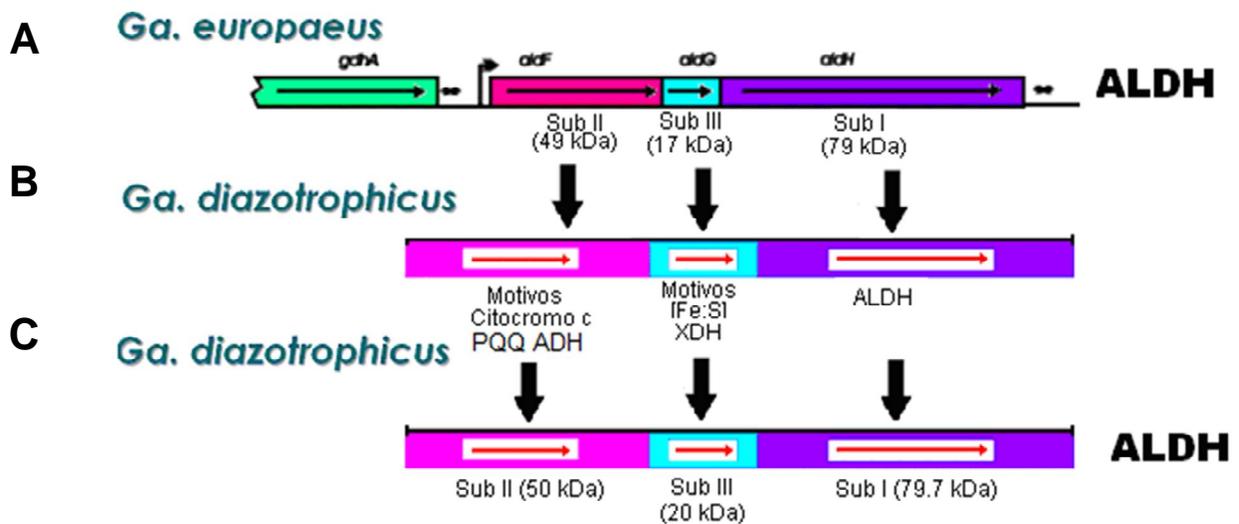


Figura 5. Organización del operón que codifica para la ALDH. Se Comparan los operones que codifican para la enzima en *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus*. **A.** Operón en *Ga. europaeus*. **B.** Se representan los genes de acuerdo a las proteínas que se postulan codifican y que tienen alta homología con la subunidades II y III de *Ga. europaeus*. **C.** Operón en *Ga. diazotrophicus* en el que se identifican las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades de la proteína.

VI.3 Los grupos prostéticos asociados a la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

La aldehído deshidrogenasa estudiada en la presente tesis es una deshidrogenasa periplásmica de membrana, que se presenta únicamente en bacterias ácido acéticas (26).

Hay una gran controversia en cuanto a cual es el grupo prostético en la subunidad catalítica de las aldehído deshidrogenasas en esta familia de bacterias: PQQ o un grupo molibdo-pterina. Como hemos mencionado Takemura y col (53), postulan que el grupo prostético de las ALDH membranales de estas bacterias no es PQQ. Thurner y col purificaron a la proteína en *Ga. europeus* y basándose en el análisis de la secuencia de aminoácidos postularon que los grupos prostéticos que se asocian a la subunidad catalítica son un hemo *b* y un centro molibdeno-pterina (56). Este grupo reportó también que están asociados como grupos prostéticos tres citocromos *c* a la subunidad II (No. de acceso: CAA69953.1) y un cluster [2Fe:2S] a la subunidad III (No. de acceso: CAA69954.1) (56).

Sin embargo, estudios bioquímicos (espectrofotometría, titulación redox, titulación potenciométrica, HPLC, EPR) realizados por Gómez-Manzo y col en la ALDH purificada de *Ga. diazotrophicus* (26), muestran que los grupos prostéticos son PQQ y citocromo *b*, para la subunidad catalítica y tres citocromos *c* para la subunidad II.

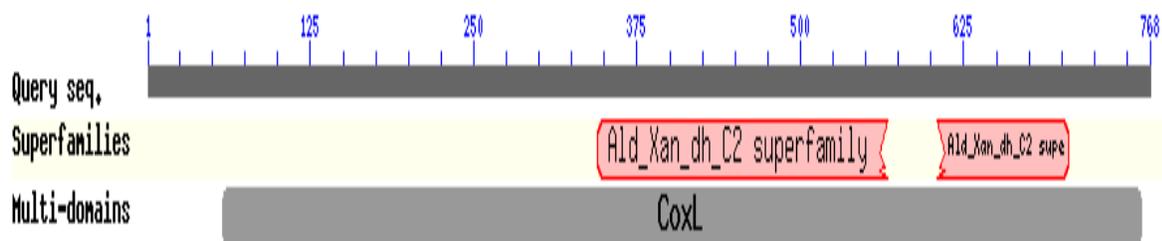
Decidimos realizar un análisis "in silico" para identificar los dominios y motivos de unión presentes en la secuencia de aminoácidos de las 3 subunidades codificadas para la ALDH en *Ga. diazotrophicus*.

VI.3.1 Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

VI.3.1.1 La PQQ como grupo prostético

Se analizó la secuencia de la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* en busca de dominios y sitios de unión a grupos prostéticos. El resultado del análisis nos mostró que la secuencia de aminoácidos presentaba el dominio pfam 02738 que es característico de oxido-reductasas que tienen como grupo prostético a la molibdeno-pteridina ([Figura 6](#)).

La discrepancia entre los resultados obtenidos del análisis bioquímico y el análisis "in silico", nos llevaron a buscar de manera más detallada si existe un posible dominio de unión a PQQ en la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

A**B**

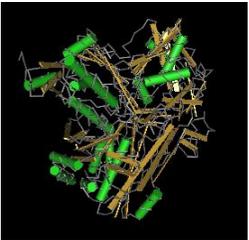
	<p>Dominio pfam02738</p> <p>Ald_Xan_dh_C2</p> <p>Ald_Xan_dh_C2 superfamily</p> <p>Proteínas con dominios de unión a molibdo-pterina.</p>
---	---

Figura 6. A) Esquema en donde se muestran los dominios de unión a grupos prostéticos identificados en la secuencia de aminoácidos de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. B) Las superfamilias detectadas pertenecen al pfam 02738, que agrupa a las oxidoreductasas que tienen dominios de unión a molibdo-pterina.

Utilizando diferentes bases de datos (pfam <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>, blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un programa de alineamiento de secuencias (Clustal W2 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), se identificó la secuencia del dominio de unión reportado para la PQQ. Las proteínas representativas que tienen asociado a este grupo prostético, son las PQQ-ADH de la familia de Bacterias Acéticas (Figura 7).

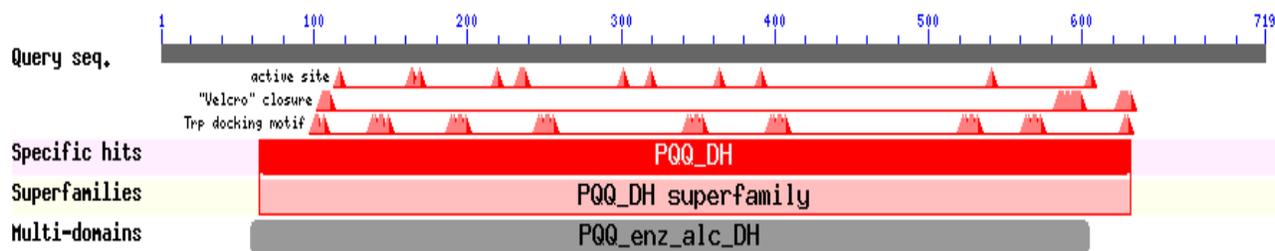
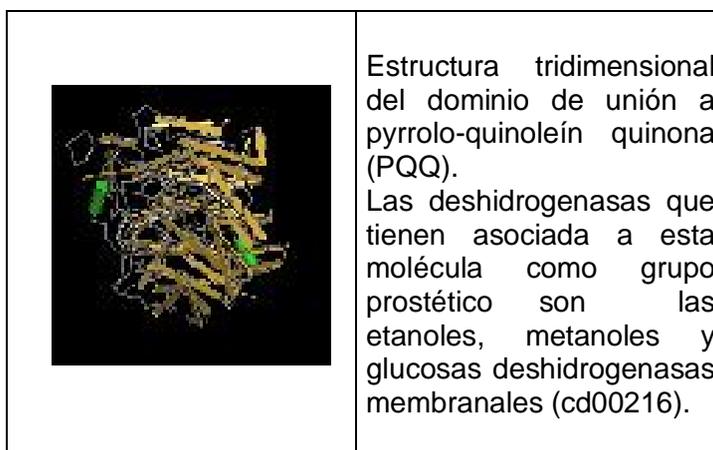
A**B**

Figura 7. A. Esquema del dominio de unión representativo del grupo prostético PQQ en la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Los triángulos representan la localización de los dominios de unión a PQQ en el sitio activo. También se señalan los motivos de triptófano que colaboran en la formación de la estructura de superbarril de la proteína. **B.** Estructura tridimensional del dominio de unión de PQQ.

Basándonos en el dominio representativo de unión a PQQ reportado en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* y haciendo hincapié en aquellos aminoácidos que son indispensables para la unión del grupo prostético, identificamos el dominio en las secuencias de las PQQ-ADH de las bacterias acéticas reportadas a la fecha (*Ga. europeus*, No. de acceso GenBank: Q44002.1; *Ga diazotrophicus*, No. de acceso GenBank: YP_002274674.1; *A. aceti*, No. de acceso GenBank: P18278.1 y *G. oxydans*, No. de acceso GenBank: YP_191493.1) (Figura 8).


```

ADH Ga.europaeus VKDLKGWIVAWDPQKQAEAWRVDHKGPNNGGILATGGDLLFQGLANGEFH 542
ADH Ga.diazotrophicus IKDLKGWIVAWDPVKQQEAFRVDHKGPNNGGIVATGGDLLFQGLANGEFH 543
ADH A.aceti IKDLHGWLLOWDPVKMETVWKIDHKGPNNGGILATGGDLLFQGLANGEFH 541
ADH G.oxydans LKVLKGWTVAWDPEKMAPAFTINHKGPNNGLLATAGNVI FQGLANGEFH 545
:* :*: * :***** * .: :*****:***.***:*****

ADH Ga.europaeus AYDATNGSDLFHFHAADSGIIAPPVTYLANGKQYVAVEVWGGIYPPFLGG 592
ADH Ga.diazotrophicus AYDATNGADLFHFHAAQSGIIAPPVTYMANGKQYVAVEVWGGIYPPFLGG 593
ADH A.aceti AYDATNGSDLYKFDAQSGIIAPPMTYSVNGKQYVAVEVWGGIYPI SMGG 591
ADH G.oxydans AYDATNGNDLYSFPQSAIIAPPVTYTANGKQYVAVEVWGGIYPPFLYGG 595
***** **: * *:*.*****:***.*****:*****: **

ADH Ga.europaeus LARTSGWTVNHSRIIAFSLDGTKSGPLPKQNDQGFLPVKPPAQFDSKRTDN 642
ADH Ga.diazotrophicus LARTSGWTVNHSRVIAFSLDG-AAKLPQNDKGF LPVKPPAQFDGKRTDN 642
ADH A.aceti VGRTSGWTVNHSYIAAFSLDG-KAKLPALNMRGFLPVKPPAQYDQKVVDN 640
ADH G.oxydans VARTSGWTVNHSRVIAFSLDG-KDSLPPKNELGFTPVKPVPTYDEARQKD 644
:.******:***** ** *: ** ***** .:* .:

ADH Ga.europaeus GYFQFQTYCAACHGDNAEGAGVLPDLRWSGSIRHEDAFYNVVGRGALTAY 692
ADH Ga.diazotrophicus GYFQFQTYCAACHGDNAEGAGVLPDLRWSGAIHQDAFYNVVGRGALTAY 692
ADH A.aceti GYFQYQTYCQTCHGDNGEGAGMLPDLRWAGAIRHQDAFYNVVGRGALTAY 690
ADH G.oxydans GYFMYQTFCSACHGDNAISGGVLPDLRWSGRPRGRESFYKLVGRGALTAY 694
*** :*: * :***** . .:*****:*** * .:***:*****

ADH Ga.europaeus GMDRFDGNMNPTEIEDIRQFLIKRANETYQREVDARKNADGIPEQLP--- 739
ADH Ga.diazotrophicus GMDRFDASMKPEQIEDIRQFLIKRSNDTYQREVDARKNVDGIPAQ----- 737
ADH A.aceti GMDRFDTSMTPEIEAIRQYLIKRANDTYQREVDARKNDKNIPENPTLGI 740
ADH G.oxydans GMDRFDTSMTPEQIEDIRNFIVKRANESYDDEVKARENSTGVPNDQFLNV 744
***** .*. * :*** **::*****:*** **.* ** .:* :

ADH Ga.europaeus -----
ADH Ga.diazotrophicus -----
ADH A.aceti NP----- 742
ADH G.oxydans PQSTADVPTADHP 757

```

Figura 8 Alineamiento de las secuencias de la subunidad I de las **PQQ-ADHs** de las bacterias acéticas. Se alinearon las secuencias de *Ga. europaeus* (No. de acceso GenBank: Q44002.1), *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP_002274674.1), *A. aceti* (No. de acceso GenBank: P18278.1) y *G. oxydans* (No. de acceso GenBank: YP_191493.1). La secuencia marcada en color rojo corresponde al dominio de unión a PQQ. En azul se marcan los aminoácidos del sitio unión a PQQ.

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

Una vez identificado el dominio de unión y los aminoácidos del sitio de unión a PQQ, decidimos buscar si estaba presente en las ALDH de bacterias acéticas. Para ello se alinearon las secuencias de aminoácidos de la subunidad I de la PQQ-ADH, con las secuencias de la subunidad catalítica de las ALDH de *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus*. Comparando las secuencias, logramos identificar el dominio de unión a PQQ en las ALDH (Figura 9).

```

ADH A. acetii -----MTRPA-SAKRRSLLGILAAGTICAAALP-YAAVPARADGQ--G--NTG----EAI IHA 48
ADH Ga. europaeus -----MISAV-FGKRRSLRSTLTAGTICAAALISGYATMASADDG-Q-G--ATG----EAI IHA 49
ADH Ga. diazotrophicus -----MMRAV-YGKRRSLRGTAVGTICAAATFFGYTAATSAAES-EFG--ATG----EAI IHA 50
ADH G. oxydans -----MTSGL-LTPIKVTKRLLS---CAAALAFSAAVP-VAF--AQ--EDTG----TAITSS 47
ALDH Ga. diazotrophicus -----MDKRGG-ATGQMSRRGFMLIAAGGAGALGFPAARAAEQFPAAG--LPGNGAF EPTIWC 56
ALDH Ga. europaeus MGRLNRFRLGKDGRRREQASLSRRGFVLTSLG-AGVMFGFARPSSANQIFPLDRSLPGDGA F EPTIWC 66

ADH A. acetii DD--HPENWLSYGRTYSEQRYSPLDQINRSNVGDLKLLGYYTLDTNRGQEA--TPLVVDGIMYATT 110
ADH Ga. europaeus DD--HPGNWMTYGRTYSEQRYSPLDQINRSNVGNLKLAWYLDLDTNRGQEG--TPLVIDGVMYATT 111
ADH Ga. diazotrophicus DD--HPGDWLTYGRTYSEQRYSPLDQINRSNVGNLKLAWYYDLDTNRGQEG--TPLIVDGMVYATT 112
ADH G. oxydans DNGGHPGDWLSYGRSYSEQRYSPLDQINTENVGKLLAWHYDLDTNRGQEG--TPLIVNGVMYATT 109
ALDH Ga. diazotrophicus AI--APDGTVTVNIIRAEMGQHIGSALARI IADEMDADWNRVRINYVDS DPKWGLMVTGGSSVWM 120
ALDH Ga. europaeus SI--APDGEITVNIIRAEMGQHIGTALARI IADEMEADWSKVRINYVDT DPKWGLMVTGGSSVWM 130

ADH A. acetii NWSKMEALDAATGKLLWQYDPKVPGNIAADKGC CDTVNRGAGYWNGKVFWGTFDGRLLVAADAKTGKK 180
ADH Ga. europaeus NWSMMKAVDAATGKLLWSYDPRVPGNIADKGC CDTVNRGAAYWNGKVYFGTFDGRLLIALDAKTGKL 181
ADH Ga. diazotrophicus NWSKMKALDAATGKLLWAYDPRVPGNIADKGC CDTVNRGAAYWNGKVYFGTFDGRLLIALDAKTGKL 178
ADH G. oxydans NWSKMKALDAATGKLLWSYDPRVPGNIADKGC CDTVSRGAAYWNGKVYFGTFDGRLLIALDAKTGKL 179
ALDH Ga. diazotrophicus TWDVFRQAGAAARIALTEAGALLG--VAPG C ITRDGMVVAGSRISYGDIVARAHPSHSFTPE 184
ALDH Ga. europaeus TWDVFRQAGAARTAMVEEGARLLG--TTPDK C TVANSIVSAGGKQISFGDIVAKGHPHSHTPEE 194

ADH A. acetii VWAVNTIPA-DASLGKQRSYTV DGAVRVAKGLVLIGNGG-----AEFGARGFVSAFD 227
ADH Ga. europaeus VWSVNTIPP-EAELGKQRSYTV DGAPRIAKGRVIIGNGG-----SEFGARGFVTAFD 228
ADH Ga. diazotrophicus VWSVNTIPA-DAALGHQRSYTV DGAPRIAKGRVIIGNGG-----SEFGARGFVSAFD 228
ADH G. oxydans VWSVYTI PK-EAQLGHQRSYTV DGAPRIAKGKVLIGNGG-----AEFGARGFVSAFD 226
ALDH Ga. diazotrophicus MAKLPKLPASERRLVGNDTLKALDIPKTNGTAIYGI DARVEGMVYARPKMPP TRYGSR--VRSVD 249
ALDH Ga. europaeus MAKLPKLPASERRLIGNAELKALDIPAKTNGTAIYGI DAKVEGMLYGRPKMPP TRYGSK--VRSVD 269

ADH A. acetii AETGKCLKWRFYTPNKNKNEPDHAASDNI LMNKAYKTWGPKGAWVRQGGGGTV WDSLVDYDPVSDLIY 293
ADH Ga. europaeus AETGKVDWRFAPTPNPKNEPDHTASDSVLMNKAYQTWSPTGAWTRQGGGGTV WDSIVYDPVADLVY 294
ADH Ga. diazotrophicus AETGKLDWRFYTPVNAQNKPNDNAPSDAVLMSKAYPTWSPTGAWTTQGGGGTV WDSIVYDPVTDLVY 295
ADH G. oxydans AETSKLDWRFYTPNPNENKPDGAASDDILMSKAYPTWGKNGAWKQQGGGGTV WDSLVDYDPVTDLVY 292
ALDH Ga. diazotrophicus DSAARTVKGYQRYIELDDPSGVVQGWVAVASTYTAIRAADLLKVDWAPGDAVHVSEQDVIDHGR 314
ALDH Ga. europaeus DTEAKKIKGYVRYLLIDDPSQVVQGWVVLAESYSAAIRATDALKVEWTPGETIHTSERDIQDRGR 324

ADH A. acetii LAVGNGSPWNYKYRSEGI GSNLFLGSI VALKPETGEYVWHFQATPMDQW DYTS-----VQQIMTLD 354
ADH Ga. europaeus LGVNGSPWNYKYRSEKGDNLFLGSI VALKPETGEYVWHFQETPMDQW DFTS-----VQQIMTLD 355
ADH Ga. diazotrophicus LGVNGSPWNYKFRSDGKGDNLFLGSI VALKPETGEYVWHFQETPMDQW DYTS-----VQQIMTLD 356
ADH G. oxydans LGVNGSPWNYKFRSEKGDNLFLGSI VAINPDTGKYVWHFQETPMDQW DYTS-----VQQIMTLD 353
ALDH Ga. diazotrophicus AQIDRDKDGGVMVFDPPGVDAFAAAATTFQAQDYTCASVLHYQLEPTNALAFKDGIFEIHAGNQWQ 380
ALDH Ga. europaeus ELINNKAGGVYIFNDDGVDQAFGSAHTVMDQ EYTCASVLHYQLEPTNALAFKDGIVYI HAGNQWQ 390

```

ADH <i>A. aceti</i>	MPVKGEMRHVIVHAPKNGFF--YVLDAKTGEFLSGKNYVYQNWAN-GLDPLTGRPMYNPDGLYTLN	417
ADH <i>Ga. europaeus</i>	LPINGETRHVIVHAPKNGFF--YIIDAKTGEFLSGKNYVYVNWAS-GLDPKTGRPIYNPDALYTLN	418
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	LPINGQTRHVIVHAPKNGFF--YIIDAKTGEFLSGKNYVYVNWAS-GLDPKTGRPIYNPDALYTLN	419
ADH <i>G. oxydans</i>	MPVNGEMRHVIVHAPKNGFF--YIIDAKTGFITGKPYTYENWAN-GLDPVTGRPNYVPDALWTLT	416
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	SLILPTLAKALERPEDKIVLRSYLLGGGFGRRLLNGDYMIPAALASKALGGKPVKLLILTRSDDMQFD	446
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	SLILPTLAKSLQVPEKSVILRSYLLGGGFGRRLLNGDYMIPAALASKALGGKPVKLLILTRSDDMQFD	456
ADH <i>A. aceti</i>	GKFWYGI PGPLGAHN--FMAMAYSPKTHLVYIPA HQIPFGYKNQVGGFKPHADSWNVGLDMTKNGL	481
ADH <i>Ga. europaeus</i>	GKEWYGI PGDLGGHN--FAAMAFSPKTGLVYIPAQQVPFLYTNQVGGFTPHPD SWNLGLDMNKVGI	482
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	GKEWYGI PGDLGGHN--FAAMAFSPRTGLVYIPAQQVPFLYTSQVGGFKPHPD SWNLGLDMNKVGI	483
ADH <i>G. oxydans</i>	GKPWLGIPGELGGHN--FAAMAYSPKTKLVYIPAQQIPLLYDQKGGFKAYHDAWNLGLDMNKIGL	480
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	SFRSPSIQRVRFVAFDGKHAITAMEYHASAGWPTQVMAAAFMSKGVGDKKYPFAIAGGDHWYEVGA	512
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	SFASPSVQRVRFVAFDASDRITAMDYQAAAGWPTGVMAEAFMEKGVGDKPYDQFAIAGGDHWYEVGA	522
ADH <i>A. aceti</i>	PDTPE-----ARTAYIKDLHGWLAWDPVKMETVWKIDHKGPWNGGILATGGDLLFQGLANGEFHA	542
ADH <i>Ga. europaeus</i>	PDSPE-----AKQAFVKDLKGWIVAWDPQKQAEAWRVDHKGPWNGGILATGGDLLFQGLANGEFHA	543
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	TDSPE-----AKQAFIKDLKGWIVAWDPVKQQAERVDHKGWNGGIVATGGDLLFQGLANGEFHA	544
ADH <i>G. oxydans</i>	FDDNDPEHVAAKKDFLVLKGWTVAWDPEKMAPAFTINHKGWNGGILLATAGNVI FQGLANGEFHA	546
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	FRVRA-----LSNDLAN--RTFRPGWLRVSPGWTSWGLESGWDEIAHAQGRDAVQFRLDHLTGAG	571
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	FRVRA-----LRNDLAE--KTRFRPGWLRVSPGWTSWGVCEFLDEVAHRQKKDPAQFRLELLTAQG	581
ADH <i>A. aceti</i>	YDATNGSDLYKFDAQSGIIAPPMTYSVNGKQY-VAVEVGWGGIYPIISMG-GVGRVTSWTVNHSYIA	606
ADH <i>Ga. europaeus</i>	YDATNGSDLFHF AADSGIIAPPVTYLANGKQY-VAVEVGWGGIYPPFLG-GLARTSGWTVNHSRII	607
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	YDATNGADLFHF AFAQSGIIAPPVTYMANGKQY-VAVEVGWGGIYPPFLG-GLARTSGWTVNHSRVI	608
ADH <i>G. oxydans</i>	YDATNGNDLYSFPQSAI IAPPVTYTANGKQY-VAVEVGWGGIYPPFLG-GVARTSGWTVNHSRVI	610
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	RNKGQAPDSTGGALRQA AAVRRVAEKAGWGRA-LPADTGLG-IATTF--GQERGMPTWIACCAQVH	633
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	RNKGQAPDSVGGALRQA AAVRRLMKVSWGKTNLPKDTAMG-LATTA--GQERGMPTWIGCVAQVH	644
ADH <i>A. aceti</i>	AFSLDG--KAK-LPALNNRGFLPVKPPAQYDQKVVVDNGYFQYQTYCQTC HGDNGEGA---GMLPDL	646
ADH <i>Ga. europaeus</i>	AFSLDG--KSGLPLKQNDQGF L PVKPPAQFDSKRTDNGYFQYQTYCAACHGDNAEGA---GVL PDL	648
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	AFSLDG--AAKLPQNDKGF L PVKPPAQFDGKRTDNGYFQYQTYCAACHGDNAEAG---GVL PDLR	668
ADH <i>G. oxydans</i>	AFSLDG--KDS-LPPKNELGFTPVKPVPTYDEARQKDG YFM YQTFCSACHGDNAISG---GVL PDL	650
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	VDRATGIVR-CQKLTIVVDAGTIVDPD GARAQTEGAALWGLSMALFEGSEI VNGLPRDRNLDTYTP	698
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	VDRSTGVVT-CQKLTIVVDAGTVVDPD GAKAQTEGAALWGLSMVLFENTEI VNGMPVDRNLNTYTP	709
ADH <i>A. aceti</i>	RWAGAIRHQDAFYNVVGRGAL TAYGMDRFDTSMTPEIEAIRQYLIK RANETYQREVDARKNDKNI	735
ADH <i>Ga. europaeus</i>	RWSGSIRHEDAFYNVVGRGAL TAYGMDRFDGNMNPTEIEDIRQFLIKRANETYQREVDARKNADGI	737
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	WSGAI RHEDAFYNVVGRGAL TAYGMDRFDGNMNPTEIEDIRQFLIKRANETYQREVDARKNV DGI P	735
ADH <i>G. oxydans</i>	RWSGRPRGRESFYKLVGRGAL TAYGMDRFDTSMTPEQIEDIRNFIVKRANESYDDEVKARENSTGV	741
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	LR IADVP EMDIEFLPST EKPTGLGEPGTTVVAPAIGNAIFNAVGVRMRHLP IRPADVLHALRSRNG	767
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	LR IADTPEMDIEFLPST EKPMGLGEPGTTVVGPAIGNAIFNAVGVR LRHMPVRPADVLRGLQNG---777	
ADH <i>A. aceti</i>	PENPTLGINP-----	746
ADH <i>Ga. europaeus</i>	PEQLP-----	747
ADH <i>Ga. diazotrophicus</i>	AQ-----	739
ADH <i>G. oxydans</i>	PNDQFLNV PQSTADVPTADHP	760
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	TAST-----	773
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	-----	777

Figura 9. Alineamiento de secuencias de la subunidad catalítica de PQQ-ADH's y ALDH's de Bacterias Acéticas. Se alinearon las secuencias de las PQQ-ADH de *Ga. europaeus* (No. de acceso GenBank: Q44002.1), *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP_002274674.1), *A. aceti* (No. de acceso GenBank: P18278.1) y *G. oxydans* (No. de acceso GenBank: YP_191493.1) y las ALDH de *Ga. europaeus* (No de acceso GenBank: CAA69955.1) y *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank: YP_001603512.1). La secuencia marcada en color rojo corresponde al dominio de unión a PQQ. En azul se marcan los aminoácidos del sitio de unión a PQQ.

Basándonos en el dominio reportado y los alineamientos anteriores, se realizó una tabla en la cual se comparan los aminoácidos del sitio de unión a PQQ (Tabla 2).

Tabla 2. Aminoácidos del sitio de unión a PQQ.

Enzimas	Aminoácidos															%
ADH <i>A.aceti</i>	E	C	C	R	D	G	G	A	E	W	N	D	K	N	I	100%
ADH <i>G.oxydans</i>	E	C	C	R	D	G	G	A	E	W	N	D	K	N	I	100%
ADH <i>Ga.europaeus</i>	E	C	C	R	D	G	G	S	E	W	N	D	K	N	I	100%
ADH <i>Ga.diazotrophicus</i>	E	C	C	R	D	G	G	S	E	W	N	D	K	N	I	100%
ALDH <i>Ga.europaeus</i>	D		C			D	A	T	R		N		S	D	L	66.6%
ALDH <i>Ga.diazotrophicus</i>	D		C			D	A	T	R		R		D	D	I	66.6%

La comparación entre las ADH y las ALDH de las bacterias acéticas nos muestran que el 66% de los aminoácidos del sitio de unión a PQQ están presentes en las aldehídos deshidrogenasas.

Azucena Lira tesista de licenciatura en el laboratorio, en su trabajo describe la obtención de una secuencia consenso del dominio de unión de la molibdo-pterina a partir de varias secuencias de la xantina oxido-reductasa, que es la proteína representativa con este grupo prostético asociado. La comparación de la secuencia consenso obtenida para el dominio de unión de la molibdo-pterina con la secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, permitió calcular que el 54.5% de los aminoácidos

más importantes para la unión de la molibdo-pterina, estaban presentes en la secuencia de aminoácidos de la enzima (33).

Entonces, basándonos en la presencia de las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a PQQ o molibdo-pterina, la probabilidad de que la ALDH de *Ga. diazotrophicus* tenga uno u otro grupo prostético, es casi la misma.

Estos resultados nos llevan a concluir que a partir de la presencia de las secuencias de los dominios de unión a grupos prostéticos reportados, no es posible predecir cuál es el grupo prostético asociado a una proteína.

Para el caso de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, los resultados del análisis bioquímico aunados al análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos, nos llevaron a concluir que esta enzima es PQQ dependiente.

VI.3.1.2. El citocromo *b* como grupo prostético

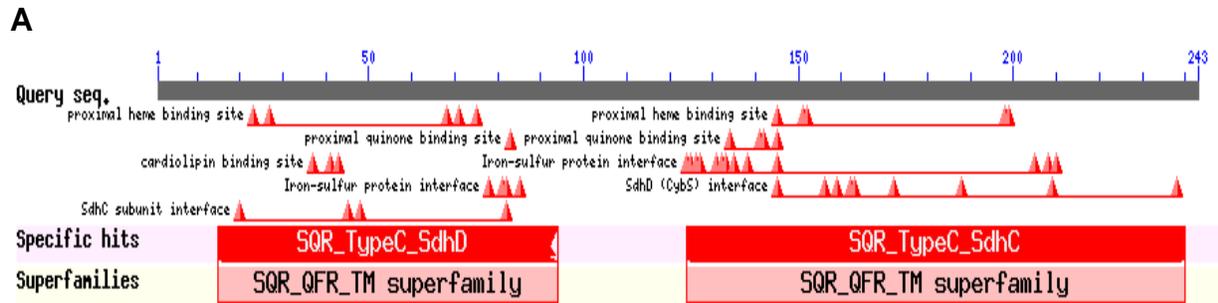
De acuerdo al reporte de Gómez-Manzo y col, sabemos que la subunidad catalítica de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, también presenta como grupo prostético citocromo *b* (26). Siguiendo con el análisis "in silico" de la proteína, se procedió a identificar el dominio de unión de este citocromo en la secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para poder identificar el dominio de unión a citocromo *b* en nuestra secuencia, se buscó en la base de datos NCBI dominios conservados de unión a citocromo *b*.

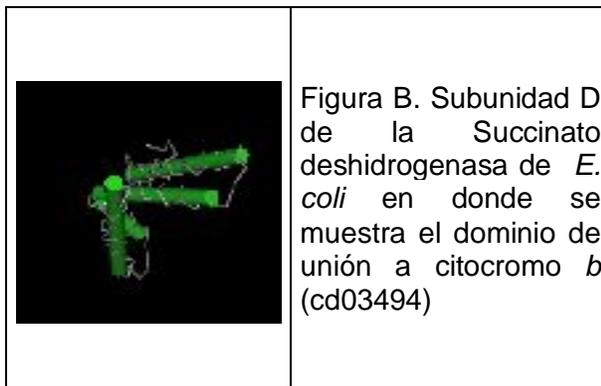
La succinato deshidrogenasa (SDH) de *E. coli*, es la enzima representativa que contiene este tipo de dominios; esta proteína está formada por cuatro subunidades, de las cuales dos subunidades hidrofóbicas contienen el dominio de unión a citocromo *b*: las subunidades D (No. de acceso al dominio [cd03494](#)) y C (No. de acceso al dominio: [cd03499](#)) (Figura 10).

En las secuencias de estas dos subunidades de la SDH (subunidad C, No. de acceso [NP_286437.1](#); Subunidad D, No. de acceso [NP_415250.1](#)), se identificaron los aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b*, entre ellos a las histidinas 71 en la subunidad D y 84 en la subunidad C, que han sido reportadas como los ligandos axiales de unión al citocromo *b* en esta enzima (10) (Figura 11).

Una vez identificado el dominio de la SDH de *E. coli*, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estas dos subunidades con la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la PQQ-ALDH de algunas bacterias acéticas, incluyendo *Ga. diazotrophicus* (Figura 12).



B



C

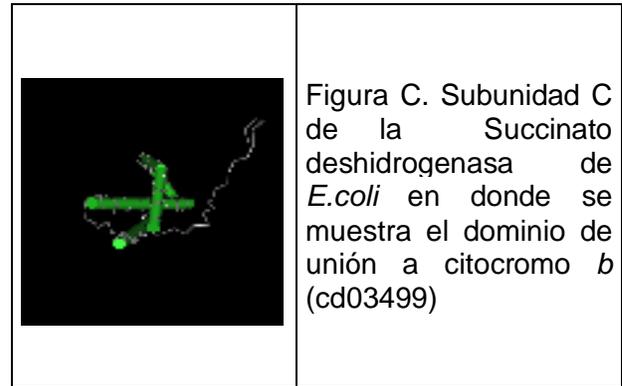


Figura 10. Dominio de unión a citocromo *b* presente en las subunidades C y D de la SDH de *E. coli*. **A.** Esquema de los diferentes dominios localizados (indicados por los triángulos). Representación de la estructura tridimensional del dominio de unión a citocromo *b* en la subunidad D (**B**) y en la unidad C (**C**)

Subunidad D

MVSNASALGRNGVHDFILVRATAIVLTLYIIMVGFFATSGELTYE VWIGFFASAFTKVF
 TLLALFSILIHAWIGMWQVLTDYVKPLALRLMLQLVIVVALVVYVIYGFVVVWG
 71

Subunidad C

MIRNVKKQRPVNL DQTIRFPITAIASILHRVSGVITFVAVGILLWLLGTSLSPEGF EQAS
 AIMGSFFVKFIMW GILTALAYHVVGIRHMMMDFGYLEETFEAGKRS AKISFVITVLSL
 84
 LAGVLVW

Figura 11. Dominio de unión a citocromo *b* en la SDH de *E. coli*. Se localizó el dominio y los aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b* en las secuencias de las subunidades D (No. de acceso: NP_415250.1) y C (No. de acceso: NP_415250.1). En rojo se encuentra marcada la secuencia que forma parte del dominio y en azul están marcados los aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b*.

SDH D *E. coli* -----MVSNASALG---RNGVHDFILVRAT--AIVLTLTY-IIYMVGFFA 40
ALDH *Ga.europaeus* MGRNLNRFRLGKDGREQASLSRRGFLVTSLG-AGVMFGFARPSSANQIFP 49
ALDH *G. oxydans* MAKIEQIAKKSATR----LSRRNFLMTAAG-AGLMFGFARKAGAAATLTP 45
ALDH *Ga.diazotrophicus* -----MDKRGGATG---QMSRRGFLMIAAGGAGALFGFP-AARAAEQFP 40

•
71

SDH D *E. coli* TS----GELTYEVWIGFFASAFKVFVFTLLALFSLIH---AW--IG --- 75
ALDH *Ga.europaeus* LDRSLPGDGAPEPTIWCSIAPDGEITVNIIRAEMGQHIGTALARIIADEM 99
ALDH *G. oxydans* S--AMPPEAAFEPNIWCAIAPDGSINVNIVRAEMGQHVGTALARIIADEM 93
ALDH *Ga.diazotrophicus* AA-GLPGNGAPEPTIWCAIAPDGTVTVNIIRAEMGQHIGSALARIIADEM 89

: *

SDH D *E. coli* -----MWQVLTDYVKP-LALRLMLQL 95
ALDH *Ga.europaeus* EADWSKVRINYVDTPDKWG-LMVTGGSWSVWMTWDVFRQAGAATRTAMVE 148
ALDH *G. oxydans* DADWDKIKITQVDTAPKWAGKYVTGGSWSVWDTWDTFRQAGAAARSVMIE 143
ALDH *Ga.diazotrophicus* DADWNRVRINYVSDPKWG-LMVTGGSWSVWMTWDVFRQAGAAARIALTE 138

SDH D *E. coli* V-----IVVALVVYVIYGFVVVWGV----- 115
ALDH *Ga.europaeus* EGARLLGTTDPDKCTVANSIVSAGGKQISFGDIVAKGHPSHSFTPEEMAKL 198
ALDH *G. oxydans* EGAKLLGTTDRCTAHESVVSAGSKSISFGDIVARAKPRTFTPEEMAKL 193
ALDH *Ga.diazotrophicus* AGAGLLGVAPGQCITRDGMVVAGSRISYGDIVARAHPSHSFTPEEMAKL 188

SDH D *E. coli* -----
ALDH *Ga.europaeus* PLKPASERRLIGNAELKALDIPAKTNGTAIYGIDAKVEGMLYGRPKMPPT 248
ALDH *G. oxydans* PLKPTGNRRLLIS-KQVPALDIPDKTTGKAIYGIDVKLDGMVYGRPKMPPT 242
ALDH *Ga.diazotrophicus* PLKPASERRLVGNDTLKALDIPPKTNGTAIYGIDARVEGMVYARPKMPPT 238

SDH C *E. coli* -----MIRNVK-KQRPVNL----- 14
ALDH *Ga.europaeus* RYGSKVRSDVDEAKKIKGYVRYLLIDDPSSQVVQGWVVLAESYSAAIRA 298
ALDH *G. oxydans* RYAAKVISVDDSAAKKIPGYLRYVVLDDPSGIVPGWVVVALAKTYPAAIRA 292
ALDH *Ga.diazotrophicus* RYGSRVRSVDDSAARTVKGYQRYIELDDPSGVVQGWVAVASTYTAAIRA 288

SDH C *E. coli* -----
ALDH *Ga.europaeus* TDALKVEWTPGETIHTSERDIQDRGRELINNKAGGVYIFNDDGVDQAFGS 348
ALDH *G. oxydans* ADALKVQWNPGETINVSEADIIEHGRKLAADPKNGTRVFNKGVDEALTI 342
ALDH *Ga.diazotrophicus* ADLLKVDWAPGDVAHVSEQDVIDHGRAQIDRKDGGVMVFDPPGVDAAFAA 338

SDH C *E. coli* -----LQTIRFPITAIASILHRVSG VITFVA---VGILLWLL 48
ALDH *Ga.europaeus* AH-TVMDQEYTCASVLHYQLEPTNALAFKDGVEYIEHAGNQWQSLILPTL 397

•
:

ALDH *G. oxydans* HPGQVFERSYTCASVAHYQLEPVNVARHIDGMWEIHTGNQWQSLILPQL 392

•
:

ALDH *Ga.diazotrophicus* AA-TTFAQDYTCASVLHYQLEPTNALAFKDGIFEI HAGNQWQSLILPTL 387

•

SDH C *E. coli* GTSLSPE-----GFEQ-----ASAIMGSFFVKFIM 74
ALDH *Ga.europaeus* AKSLQVPEKSVILRSYLLGGGFRRLNGDYMIPAALASKALGGKPKVLIL 447
ALDH *G. oxydans* AKSLQVPEEQVMRMYMLGGGFRRLNGDYCIPAALASKAIGGAPVKLIL 442
ALDH *Ga.diazotrophicus* AKALERPEDKIVLRSYLLGGGFRRLNGDYMIPAALASKALGGKPKVLIL 437

84

SDH C *E. coli* WG-----ILTALAYHVVVGIHMMDFGY 98
ALDH *Ga.europaeus* TRSDDMQFDSFASPSVQRVRMAFDAS-DRITAMDYQAAGWPTGVMAEAF 496

:

ALDH *G. oxydans* TRSDDMELDSIRSPSIQTIKVALDNRKKIVGMDYVAVAGWPTQVMAPAF 492

ALDH *Ga.diazotrophicus* TRSDDMQFDSFRSPSIQRVRVAFDVK-HAITAMEYHASAGWPTQVMAAAF 486

*

SDH C *E. coli* LEETFEGAKRS-----AKISFVITVVLSSL 122
ALDH *Ga.europaeus* MEKGVDGKPYDQFAIAGGDHWYEVGAFRVRALRNDLAEKTFRPGWLRSVS 546
ALDH *G. oxydans* LATGEDGKKYDPFAIAGADHWYETGPTVRVAISNDLANATFRPGWLRSVS 542
ALDH *Ga.diazotrophicus* MSKGVDGKKYDPFAIAGGDHWYEVGAFRVRALSNDLANRTRPGWLRSVS 536

SDH C <i>E. coli</i>	AGVLVW-----	129
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	PGWTSWGVCEFLDEVAHRQKKDPAQFRLELLTAQGRNKGQAPDSVGGALR	596
ALDH <i>G. oxydans</i>	AGWTPWALECFLDELAHSTKQDPLAFRLSMFTAQGRNAGQAPNSVGGAKR	592
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	PGWTSWGLESGWDEIAHAQGRDAVQFRLDHLTGAGRNKGQAPDSTGGALR	586

SDH C <i>E. coli</i>	-----	
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	QAAVVRRLMEKVSWGKTNLPKDTAMGLATTAGQERGMPTWIGCVAQVHVD	646
ALDH <i>G. oxydans</i>	QAAVLQRLADKIGYANKQLPADTGIGIATSFGQERGMPTWTAAAQIHVD	642
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	QAAVVRRAEKAGWG-RALPADTGLGIATTFGQERGMPTWIACCAQVHVD	635

SDH C <i>E. coli</i>	-----	
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	RSTGVVTCQKLTIVVDAGTVVDPDGAKAQTEGAALWGLSMVLFENTEIVN	696
ALDH <i>G. oxydans</i>	RKTGVVTCQKLLWLVDAGTIVDPGGALAQTEGAALWGFSMALFEGTEIVN	692
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	RATGIVRCQKLTIVVDAGTIVDPDGARAQTEGAALWGLSMALFEGSEIVN	685

SDH C <i>E. coli</i>	-----	
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	GMPVDRNLNTYTPLRIADTPEMDIEFLPSTEKPMGLGEPGTTVVGPAIGN	746
ALDH <i>G. oxydans</i>	GTIKDRNLNTYTPLRIPDVPDIDIEFIQNTTEKPTGLGEPGTTVVAPAIGN	742
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	GLPRDRNLDTYTPLRIADVPEMDIEFLPSTEKPTGLGEPGTTVVAPAIGN	735

SDH C <i>E. coli</i>	-----	
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	AIFNAVGVRLRHMPVRPADVLRGLQNG-----	773
ALDH <i>G. oxydans</i>	AIFNAVGI RLRHMPMRPADVRRELQQHTS----	771
ALDH <i>Ga. diazotrophicus</i>	AIFNAVGV RMRHLP IRPADVLHALRSRNGTAST	768

Figura 12. Alineamiento de secuencias de la subunidad I de ALDH's de bacterias ácido acéticas con las subunidades D y C de la SDH de *E. coli*. SDH D (No. de acceso: NP_415250.1) y SDH C (No. de acceso: NP_286437.1), se alinearon con las secuencias de *Ga. europaeus* (No. de acceso: CAA69955.1), *G. oxydans* (No. de acceso: YP_191021.1) y *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso: YP_001603512.1). Los aminoácidos marcados con rojo forman parte del dominio de unión a citocromo *b*; en color azul se marcan los aminoácidos del sitio de unión, incluyendo a las histidinas 71 y 84 que son los ligandos axiales para la unión al citocromo *b*.

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

Como se muestra en el alineamiento, fuimos capaces de localizar a las histidinas axiales que unen al citocromo *b* y que forman parte del dominio de unión. En *Ga. diazotrophicus* las histidinas D71 y C84 corresponden con las histidinas 76 y 472 respectivamente; en *Ga. europaeus*, la histidina 86 corresponde a la histidina 71 de la SDH D, pero la histidina 84 de la SDH C se encuentra sustituida de manera semi-conservativa por la glutamina 482. En *G. oxydans* solamente una histidina (histidina 80), correspondiente a la histidina D71 pudo ser localizada; probablemente la ALDH de esta bacteria no tenga como grupo prostético al citocromo *b*, ya que son necesarias las

dos histidinas para poder unir a este citocromo. Basándonos en la comparación anterior, se hizo una tabla en la cual determinamos el porcentaje de conservación de los aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b* en las diferentes secuencias. La ALDH de *Ga. daizotrophicus* presenta el 70 % de los aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b* conservados (Tabla 3).

Tabla 3. Aminoácidos del sitio de unión a citocromo *b* conservados en Bacterias Acéticas.

Enzimas	Aminoácidos										%
SDH <i>E.coli</i>	A	T	I	H (D 71)	G	R	T	F	H (C84)	V	100 %
ALDH <i>Ga. europaeus</i>	G	-	M	H (86)	-	E	-	I	Q (482)	A	70%
ALDH <i>G. oxydans</i>	G	-	M	H (80)	-	H	-	I	-	A	60%
ALDH <i>Ga.diazotrophicus</i>	G	-	M	H (76)	-	E	-	I	H (472)	A	70 %

VI.3.2 Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. El citocromo *c* como grupo prostético.

De acuerdo a la caracterización bioquímica realizada por Gómez-Manzo y col (26) en la ALDH purificada a partir de *Ga. diazotrophicus*, se detectó la presencia de citocromos tipo *c* en la subunidad II de la enzima. La determinación de potenciales redox de estos grupos prostéticos indicó que existían 3 citocromos *c* asociados a esta subunidad.

De acuerdo a la base de datos de NCBI para motivos y dominios de unión, la secuencia CXXCH es el motivo de unión para citocromos tipo c.

Se analizó la secuencia de la subunidad II de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus* en busca de este motivo. Dicho análisis nos mostró que la secuencia presentaba 3 motivos de unión a citocromo c (Figura 13).

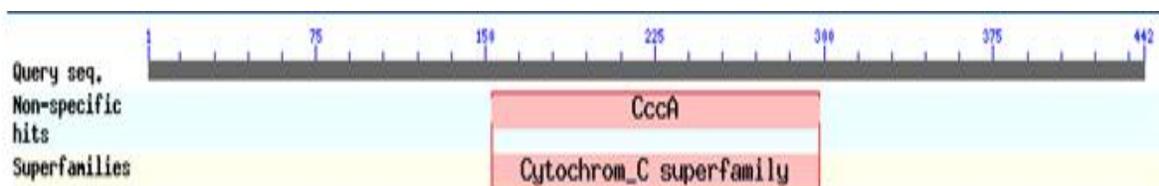


Figura 13 Esquema de los motivos de unión a grupos prostéticos presentes en la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*. El rectángulo de color rosa indica que nuestra secuencia pertenece a la superfamilia de las enzimas que presenta motivos de unión a citocromo c.

Estos motivos de unión fueron identificados en la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de ALDH (Figura 14)

```

MIGRIVAALTGIGVVAGAGFLAIAWHPAIAPVAPPTAGSFDTASIE
RGRVLAAGGYCAECHTRRDGQQGAPLAGDYAMATPFGTIHSS
NITPDPETGIGRWSLAAFTRAMRHGVS RDGANLFPAPFDHFT
HMTDGD IADVYAFLMTRPPVHAQKRENTVPFPANIRLFQGGWK
LLFLHPGVYRPDPAHDAQWNRGAYLAEGLSHCGACHTPRNML
GAEKSDAAYDGAPVDNWIAPPLNATNPTPVTWTENEFFSYLRY
GVAPLHGSAAGPMSPVVHGLSEMPESDVRAIAVYLADLDHAA
SRQGGDSARLTAAMASSTRDLTGPQTPDARLYAGACAACHA
NTGAQVPGRPDLALNNALWLSEPTNLYQVVLRGIGTAEGQAG
ITMPSFYHSLTDADLARLAAYLRTRRTTLPPWTDLEKKA AVRS
TLPAPPVAASH

```

Figura 14. Localización de los motivos de unión a citocromo c (CXXCH), en la secuencia de aminoácidos de la subunidad II de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis "in silico" de las secuencias de aminoácidos de las subunidades que conforman a la ALDH de *Ga. diazotrophicus* como fue purificada por Gómez-Manzo y col, la enzima es PQQ dependiente, que contiene también en la subunidad catalítica a un citocromo *b* como grupo prostético y a 3 citocromos *c* en la subunidad II. Estos resultados están de acuerdo con la caracterización bioquímica de la ALDH realizada por Gómez-Manzo y col.

VI.3.3. Análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la subunidad III de la PQQ-ALDH codificada en el genoma de *Ga. diazotrophicus*.

Como hemos mencionado, la PQQ-ALDH *Ga. diazotrophicus* purificada por Gómez-Manzo, está compuesta por dos subunidades de 79.7 y 50 kDa. Sin embargo, cuando analizamos el operón que codifica para esta enzima, tanto en *Ga. diazotrophicus* como en *Ga. europeaus*, éste está compuesto de tres genes. La ALDH de *Ga. europeaus*, ya fue purificada (56) y está formada por tres subunidades. Postulamos que posiblemente la tercera subunidad de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* (20 kDa, de acuerdo a la secuencia del gen), se perdió durante su purificación.

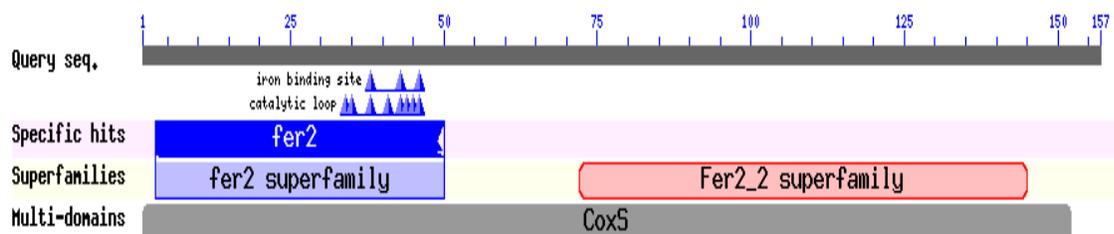
Decidimos analizar la secuencia de aminoácidos de la subunidad III de la PQQ-ALDH identificada por nosotros en el genoma de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso: [YP_001603511.1](#)). Dicho análisis nos mostró que la secuencia presentaba motivos de unión a los clusters 2Fe-2S ([figura 15-A, B](#)).

Dentro del dominio de unión de los clusters 2Fe:2S, se ha reportado la presencia de 8 cisteínas que son las encargadas de interaccionar con él. Dichas cisteínas fueron localizadas en la secuencia de aminoácidos de la subunidad III analizada (Figura 16).

Estos resultados nos permiten postular que la subunidad III de la PQQ-ALDH codificada en el genoma de *Ga. diazotrophicus*, posiblemente tiene como grupo prostético un cluster 2Fe:2S.

Los resultados obtenidos del análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la PQQ-ALDH en *Ga. diazotrophicus*, nos indica que esta enzima está codificada como un complejo de tres subunidades. La subunidad I tiene asociados como grupos prostéticos a la PQQ y a un citocromo *b*; la subunidad II a tres citocromos *c* y la subunidad III posiblemente a un cluster 2Fe:2S.

A



B

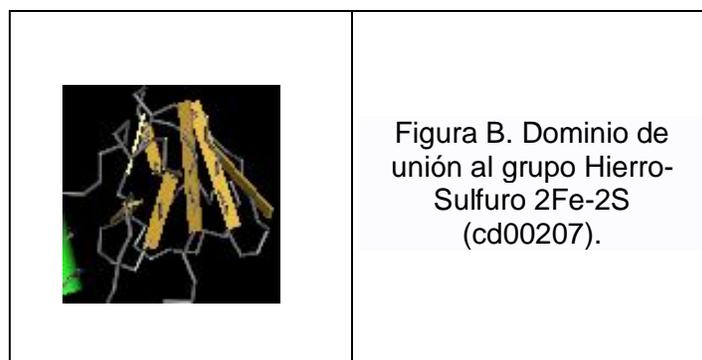


Figura 15 A. Esquemas de los dominios presentes en la secuencias de aminoácidos de la subunidad III de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*. Los triángulos representan la localización de los dominios de unión a hierro. Los rectángulos representan los dominios de unión a 2Fe-2S. El rectángulo de color gris representa que nuestra secuencia presenta homología con una deshidrogenasa aeróbica de tipo monóxido de carbono. **B.** Estructura tridimensional reportada para el dominio de unión de cluster's 2Fe:2S.

```

MTTFRLNGHDVSDVPDDTPLLWVIRDEIGLTGTKFGC
GIGMCGACTVHVGGGRATRSCITPIVAVQGADITIEGLD
PAGAHPLQEAWKDLQVPQCGYCSGQIMQAASLLRD
YPNPTDEDIDAVMGGSLCRCMTYIRIRDAIKKAALAMRE
EPSNG

```

Figura 16 Localización de las cisteínas que interactúan con el cluster 2Fe:2S, que están presentes en el dominio de unión identificado en la subunidad III de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

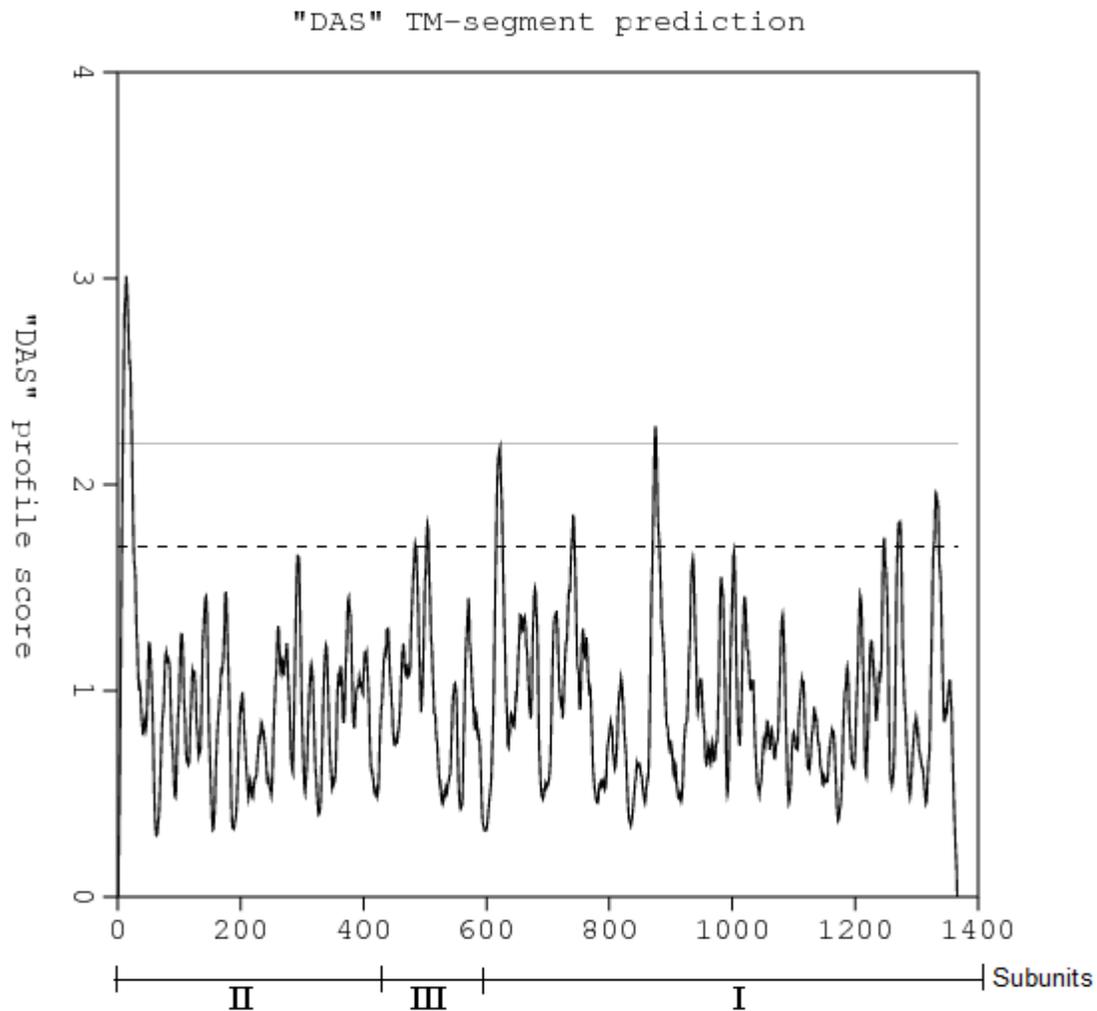
VI.4 Análisis de hidrofobicidad y topología de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*

Para continuar el análisis "in silico" de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* se determinó, utilizando las herramientas del programa DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), el perfil hidrofóbico de la PQQ-ALDH, intentando predecir sus segmentos transmembranales. Los resultados obtenidos mostraron que la subunidad II posiblemente presente un segmento transmembranal (alfa hélice), hacia el amino terminal (aminoácidos del 9 al 23), que permitiría que la enzima estuviera anclada a la membrana. El resto de la enzima estaría localizada hacia el espacio periplásmico (Figura 17).

Para corroborar estos resultados se obtuvo un perfil de topología de la PQQ-ALDH utilizando los programas TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), CINEMA (<http://utopia.cs.man.ac.uk>) y Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>), que además de predecir sus segmentos transmembranales nos indican con mayor certidumbre su orientación en la membrana. Los resultados obtenidos corroboraron que la subunidad II está anclada a la membrana por una alfa hélice y que las subunidad III y I se encontrarían orientadas hacia el espacio periplásmico (Figura 18)

Basándonos en los resultados obtenidos de estos análisis y en los resultados de la caracterización bioquímica reportados por Gómez-Manzo y col, proponemos un modelo de topología para la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus* (Figura 19). De acuerdo a este modelo, la subunidad III no participaría en la transferencia de electrones desde la deshidrogenasa hacia la quinona endógena que forma parte de la cadena respiratoria de la bacteria. Esta propuesta la apoyamos en el hecho de que esta subunidad está ausente en la enzima purificada por Gómez-Manzo, la cual sin embargo es activa y puede donar los electrones producto de la oxidación del aldehído al sistema

respiratorio, promoviendo el consumo de oxígeno. Es muy probable que la función de esta subunidad sea estructural. En cuanto a la subunidad I, su localización en el espacio periplásmico está de acuerdo con su función catalítica, ya que en este espacio es donde puede tomar a su sustrato, el aldehído, para catalizar su oxidación. La localización topológica de la subunidad II, como ancla de la enzima a la membrana, explicaría el flujo de los electrones hacia la quinona, la cual se encuentra sumergida en la membrana plasmática.



Potenciales segmentos transmembranales

Start	Stop	Length	~	Cutoff
7	26	20	~	1.7 Periplasma
9	23	15	~	2.2 Transmembranal
484	484	1	~	1.7 periplasma
503	506	4	~	1.7 periplasma
616	626	11	~	1.7 periplasma
739	743	5	~	1.7 periplasma
871	881	11	~	1.7 periplasma
874	876	3	~	2.2 En la membrana
1246	1247	2	~	1.7 periplasma
1270	1274	5	~	1.7 periplasma
1328	1336	9	~	1.7 periplasma

Figura 17. Esquema en donde se muestra el análisis de hidrofobicidad de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus* analizado con el programa DAS. Los picos mayores a 2.2 (línea continua) representan una hélice transmembranal. Los picos menores a 1.7 representan los aminoácidos que se encuentran orientados así el lado periplásmico.

10 20 30 40 50 60 70 80
 M I G R I V A A A L T G I G V V A G A G F L A I A W H P A I A P V A P P T A G S F D T A S I E R G R V L A A G G Y C A E C H T R R D G Q Q G A P L A G D V A M A T
 10 20 30 40 50 60 70 80
 P P G T I H S S N I T P D P E T G I G R W S L A A F T R A M R H G V S R D G A N L P P A F P F D H F T H M T D G D I A D V Y A F L M T R P P V H A Q K R E N T V
 90 100 110 120 130 140 150 160
 P P P A N I R L F Q G G W K L L F L H P G V Y R P D P A H D A Q W N R G A Y L A E G L S H C G A C H T P R N M L G A E K S D A A Y D G A P V D N W I A P P L N A
 170 180 190 200 210 220 230 240
 P P P A N I R L F Q G G W K L L F L H P G V Y R P D P A H D A Q W N R G A Y L A E G L S H C G A C H T P R N M L G A E K S D A A Y D G A P V D N W I A P P L N A
 250 260 270 280 290 300 310 320
 T N P T P V T W T E N E F F S Y L R Y G V A P L H G S A A G P H S P Y V H G G L S E H P E S D V R A I A V Y L A D L D H A A S R Q G G D S A R L T A A H A S S T F
 250 260 270 280 290 300 310 320
 R D L T G P Q T D P D A R L Y A G A C A A C H A N T G A Q P V P G R P D L A L N N A L W L S E P T N L Y Q V V L R G I G T A E G Q A G I T H P S F Y H S L T D A C
 330 340 350 360 370 380 390 400
 D L A R L A A Y L R R T R T T L P P W T D L E K K A A A V R S T L P A P P V A A S H M T T F R L N G H D V S V D V P D D T P L L W V I R D E I G L T G T K F G C C
 410 420 430 440 450 460 470 480
 S I G H C G A C T V H V G G R A T R S C I T P I V A V Q G A D I T T I E G L D P A G A H P L Q E A W K D L Q V P Q C G Y C Q S G Q I M Q A A S L L R D Y P N P T
 490 500 510 520 530 540 550 560
 D E D I D A V M G G S L C R C H T Y I R I R D A I K K A A L A M R E E P S H G M D K R G G A T G Q H S R R G F L M I A A G G A G A L F G F P A A R A A E Q F P A
 570 580 590 600 610 620 630 640
 A G L P G N G A F E P T I W C A I A F D G T V T V N I I R A E M G Q H I G S A L A R I I A D E H D A D W H R V R I N Y V D S D P K W G L M V T G G S W S V W H T
 650 660 670 680 690 700 710 720
 W D V F R Q A G A A A R I A L T E A G A G L L G V A P G Q C I T R D G H V V A G S R S I S Y G D I V A R A H P S H S F T P D E M A K L P L K P A S E R R L Y G N
 730 740 750 760 770 780 790 800
 D T L K A L D I P P K T N G T A I Y G I D A R V E G H V Y A R P K M P P T R Y G S R V R S V D D S A A R T V K G Y Q R Y I E L D D P S G V V Q G W V V A V A S T
 810 820 830 840 850 860 870 880
 Y T A A I R A A D L L K V D W A P G D A V H Y S E Q D V I D H G R A Q I D R K D G G V M V F D D P G V D A A F A A A A T T F A Q D Y T C A S V L H Y Q L E P T N
 890 900 910 920 930 940 950 960
 A L A F E K D G I F E I H A G N Q W Q S L I L P T L A K A L E R P E D K I V L R S Y L L G G G F G R R L N G D Y M I P A A L A S K A L G G K P V K L I L T R S D
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 D H Q F D S F R S P S I Q R V R V A F D G K H A I T A N E Y H A S A G W P T Q V M A A A F M S K G V D G K K Y D P F A I A G G D H W Y E V G A F R V R A L S N D L
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 A N R T F R P G W L R S V S P G W T S W G L E S G W D E I A H A Q G R D A V Q F R L D H L T G A G R N K G Q A P D S T G G A L R Q A A V V R R V A E K A G W G R
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 A L P A D T G L G I A T T F G Q E R G H P T W I A C C A Q V H Y D R A T G I V R C Q K L T I V V D A G T I V D P D G A R A Q T E G A A L W G L S H A L F E G S E
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280



Figura 18. Esquema en el que se muestra la orientación en la membrana de las diferentes subunidades de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*. La secuencia fue analizada con los programas CINEMA y TMHMM. Los aminoácidos orientados hacia el citoplasma se muestran en verde, la hélice transmembranal en azul y los aminoácidos orientados hacia el periplasma en rojo.

Orientación en la membrana	Aminoácidos
Citoplasma	1-4
Transmembranal	5-27
Periplasma	28-1350

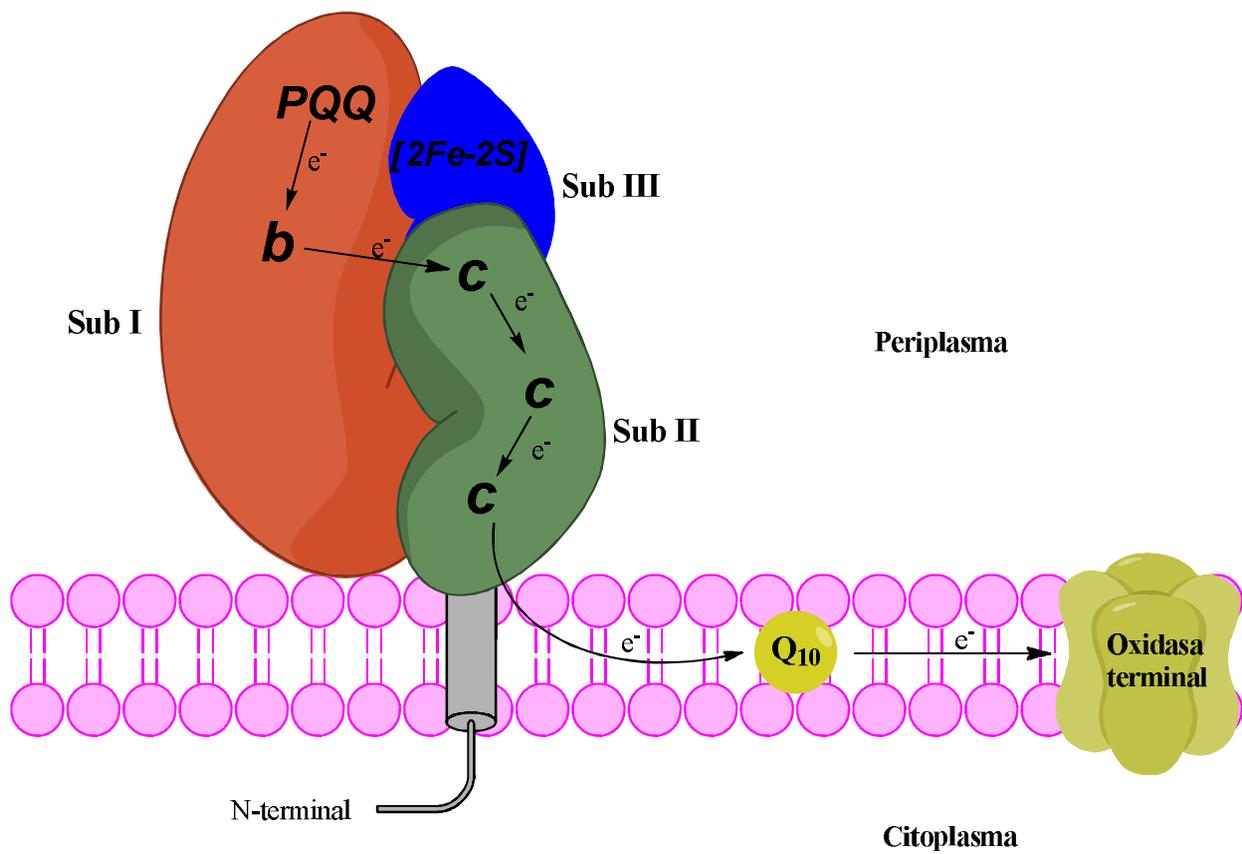


Figura 19. Modelo propuesto para la topología de la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*, en el cual se muestra como se encuentra anclada a la membrana a través de la subunidad II, la distribución que de acuerdo al análisis de hidrofobicidad presentan sus subunidades y sus grupos prostéticos asociados.

VII. Discusión

La aldehído deshidrogenasa estudiada en la presente tesis es una deshidrogenasa periplásmica de membrana, que se presenta únicamente en bacterias ácido acéticas (26). En *Ga. diazotrophicus*, la enzima ha sido purificada y caracterizada por Gómez-Manzo y col (26). Este grupo reporta a la ALDH como una proteína heterodimérica (79.7 y 50 kDa), que al ser caracterizada por medio de diferentes tipos de análisis bioquímicos (espectrofotometría, titulación redox, potenciométrica, HPLC, EPR), se determinó que tiene como grupos prostéticos asociados al PQQ y al citocromo *b*, en la subunidad catalítica y a tres citocromos *c* en la subunidad II.

Sin embargo, los resultados obtenidos discrepan de lo reportado para otras bacterias ácido acéticas. En *Ga. europaeus*, la ALDH se ha reportado como un heterotrímero cuyos pesos moleculares son de 79, 46 y 17 kDa (56).

Además, existe gran controversia en la familia de las bacterias ácido acéticas en cuanto a cuáles son los grupos prostéticos en la subunidad catalítica de las aldehído deshidrogenasas (56,53). En relación a la subunidad II, tanto en *G. oxydans* como en *Ga. europaeus*, el análisis de la secuencia de aminoácidos sugiere que en esta subunidad se asocian citocromos *c* como grupo prostético (un citocromo *c* para el caso de *G. oxydans*, mientras que se identifican 3 motivos de unión para este citocromo en la secuencia de aminoácidos en *Ga. europaeus*).

Estas discrepancias nos llevaron a buscar los genes que codifican para esta enzima en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* y una vez identificados, hacer un análisis "in silico" para determinar el número de genes que forman el operón y a partir de la secuencia de aminoácidos codificada, localizar los dominios y motivos de unión a grupos prostéticos presentes en las diferentes subunidades que forman la proteína.

Utilizando el procedimiento descrito por Gómez-Manzo y col. (26) obtuvimos una preparación pura de esta enzima de *Ga. diazotrophicus*, como lo muestra el análisis electroforético y el ensayo por zimografía. A partir de la secuencia de péptidos internos de la subunidad I (la subunidad catalítica) de la enzima purificada, nos fue posible localizar la secuencia de esta subunidad dentro del genoma de la bacteria, lo que nos permitió asegurar la naturaleza de esta proteína.

Sin embargo, sabíamos que al menos debería encontrarse un gen más, aquel que codifica para la subunidad II de la enzima purificada por nosotros; además, existía la posibilidad de la presencia de un tercer gen que codificara para la subunidad III, de acuerdo a lo que se reporta para *Ga. europaeus*.

Para la identificación del (los) gen(es) se tomaron como base las secuencias de aminoácidos de la subunidad II y III de la ALDH de *Ga. europaeus*; logramos identificar dos secuencias de aminoácidos que presentaban una alta identidad con estas subunidades.

Una de ellas fue una proteína a la cual reportaban como posible PQQ-ADH, debido a que en su secuencia se encontraban motivos de unión a citocromo *c*. Esta proteína fue identificada como la subunidad II de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, debido a que presenta una alta identidad con la subunidad II de la ALDH de *Ga. europaeus*. El análisis "in silico" de esta subunidad nos permitió localizar 3 motivos de unión de citocromo *c*, lo que apoya los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica reportada por Gómez-Manzo y col, quienes reportan que esta subunidad tiene como grupos prostéticos a tres citocromos *c*.

La otra secuencia identificada correspondía a una proteína con una alta identidad con la subunidad III de la ALDH de *Ga. europaeus*. Esta secuencia tiene un dominio de unión a clusters 2Fe:2S. El análisis "in silico" nos permitió localizar las ocho cisteínas que caracterizan estos dominios, de manera similar a los que se presentan en las xantinas deshidrogenasas.

El análisis de la organización del operón que codifica para la ALDH es similar en *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus*, lo que sugiere que efectivamente los genes identificados corresponden a aquellos que codifican para las subunidades II y III de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*. Este resultado nos lleva a suponer que la subunidad III de la enzima se pierde durante su purificación.

No ha sido reportado cuál es la función de esta tercera subunidad en las ALDH's. Sin embargo, Gómez-Manzo y col (26) reportan que la enzima purificada es inestable, lo

que hace probable que la función de esta subunidad tenga que ver con su adecuada estructuración.

En cuanto a los grupos prostéticos asociados a la subunidad catalítica, el análisis inicial de la secuencia de la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus* en las bases de datos, nos mostró que la secuencia de aminoácidos presentaba el dominio pfam 02738 que es característico de oxido-reductasas que tienen como grupo prostético a la molibdeno-pteridina. Este resultado apoyaría los resultados obtenidos para su ortólogo en *Ga. europaeus*.

Ante las diferencias entre el análisis de la secuencia de aminoácidos en las bases de datos y los resultados de los análisis bioquímicos, decidimos buscar el dominio de unión a PQQ en las secuencias de aminoácidos de las proteínas PQQ-dependientes representativas y obtener una secuencia consenso que compararíamos con la secuencia de aminoácidos de la subunidad I de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*.

Encontramos que las proteínas representativas de este dominio son las PQQ-ADH de las bacterias acéticas. Basándonos en el dominio de unión a PQQ reportado y haciendo hincapié en aquellos aminoácidos que son indispensables para la unión del grupo prostético, identificamos este dominio en las secuencias de las bacterias acéticas *Ga. europaeus*, *Ga. diazotrophicus*, *A. acetii*, y *G. oxydans*. Al comparar la secuencia consenso obtenida para el dominio de unión a PQQ, con las secuencias de aminoácidos de las ALDH de *Ga. europaeus* y *Ga. diazotrophicus*, determinamos que

el dominio de unión a PQQ estaba presente en las secuencias de estas proteínas, con un 66% de identidad de los aminoácidos del sitio unión de la PQQ.

Azucena Lira, tesista de licenciatura en el laboratorio, describe en su trabajo la obtención de una secuencia consenso del dominio de unión de la molibdo-pterina como grupo prostético de proteínas, desde eucariontes hasta las bacterias acéticas, analizando las secuencias de la xantina oxido-reductasa, que es la proteína representativa con este grupo prostético asociado, El dominio de unión a la molibdo-pterina es muy grande, consta de 112 aminoácidos; la comparación de la secuencia consenso obtenida por nosotros con la secuencia de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, permitió calcular que el 54.5% de los aminoácidos más importantes para la unión de la molibdo-pterina (60aa), estaban conservados en la secuencia de la enzima.

En el caso de la ALDH de *Ga. europaeus*, Thurner llega a la conclusión de que la enzima es molibdo-pterina dependiente al encontrar 8 aminoácidos conservados cuando compara la secuencia de la proteína con su homóloga en *Brevundimonas diminuta*. Por otro lado Takemura reporta que la ALDH de bacterias acéticas no es PQQ dependiente, al obtener mutantes en la síntesis de PQQ que aún conservan la actividad de la ALDH en *Acetobacter sp*, pero no purifica ni caracteriza a la enzima.

Entonces, basándonos en las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a PQQ o a molibdo-pterina, la probabilidad de que la ALDH de *Ga. diazotrophicus* tenga uno u otro grupo prostético, es casi la misma.

Estos resultados nos llevan a concluir que a partir de las secuencias de los dominios de unión a grupos prostéticos reportados, no es posible predecir cuál es el grupo asociado a una proteína.

Para el caso de la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, los resultados del análisis bioquímico aunados al análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos, nos llevaron a concluir que esta enzima es PQQ dependiente.

En cuanto al citocromo *b*, el otro grupo prostético que ha sido reportado como parte de la subunidad catalítica de la ALDH tanto en *Ga. europaeus* (56) como en *Ga. diazotrophicus* (26), fuimos capaces de identificar su dominio y el sitio de unión, incluyendo las histidinas axiales con las que interactúa este citocromo, en la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica de *Ga. diazotrophicus*; en el caso de *Ga. europaeus*, fueron identificadas una histidina y una glutamina (que tiene una identidad semiconservativa con la histidina). En la secuencia de aminoácidos de la ALDH de *G. oxydans*, otra de las bacterias acéticas en la que se ha reportado la presencia de esta enzima, solo una histidina esta conservada, por lo que es posible que en esta enzima el citocromo *b* no sea su grupo prostético.

El análisis "in silico" de la secuencia de aminoácidos de la ALDH codificada en *Ga. diazotrophicus*, nos indica que esta enzima esta codificada como un complejo de tres subunidades. La subunidad I tiene asociados como grupos prostéticos a la PQQ y a un

citocromo *b*; la subunidad II a tres citocromos *c* y la subunidad III posiblemente a un cluster 2Fe:2S.

Como hemos mencionado, la PQQ-ALDH en las bacterias acéticas se ha reportado como una enzima periplásmica unida a membrana. Tratando de predecir la topología de la proteína en la membrana, se analizó la secuencia de aminoácidos con los programas para obtener perfil de hidrofobicidad y topología. El análisis predice que la enzima se encuentra anclada a la membrana por el amino terminal de la subunidad II (aminoácidos de 9 al 23), mientras que el resto de la enzima estaría localizada hacia el espacio periplásmico.

Basándonos en estos resultados proponemos un modelo de topología de la enzima en la membrana. El análisis nos habla de una enzima que no está fuertemente unida a membrana, lo que apoya el hecho de que no son necesarias concentraciones muy altas de detergente (Tritón X 100 al 0.5%), para solubilizarla. Además, esta topología concordaría con el hecho de que la subunidad catalítica, la que toma el aldehído para convertirlo en ácido acético, debe estar en el espacio periplásmico que es el lugar donde se encuentra su sustrato; los electrones producto de la oxidación del aldehído van hacia la poza de quinonas de la cadena respiratoria, vía los citocromos *c* que son los grupos prostéticos de la subunidad II por lo que, de acuerdo con la predicción, esta subunidad debe estar unida en algún punto a la membrana (Figura 19).

VIII. Conclusiones

1. A partir de la enzima purificada se obtuvieron las secuencias de 8 péptidos internos que nos permitieron localizar la secuencia de la subunidad I en el genoma de *Ga. diazotrophicus*.

2. El análisis "in silico" de la secuencia que codifica a la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, nos permitió identificar tres genes adyacentes en el genoma formando un probable operón.

3. El arreglo de los genes identificados es B, C y A, codificando para la subunidad II, III y I respectivamente, de manera semejante a lo que se presenta en *Ga. europeus*. Este resultado nos lleva a postular la presencia de una tercera subunidad en la ALDH de *Ga. diazotrophicus*, la cual posiblemente se pierde durante su purificación y cuya función es desconocida.

4. El análisis "in silico" de la subunidad I de la ALDH, nos permitió localizar un 66.6% de los aminoácidos implicados en el sitio de unión a PQQ que se encuentran presentes en las ADH de bacterias acéticas así como el dominio y sitio de unión a citocromo *b*.

5. La identificación del dominio de unión a PQQ, aunada a los resultados del análisis bioquímico reportados por Gómez-Manzo, llevan a concluir que la ALDH de *Ga. diazotrophicus* es PQQ dependiente.

6. El análisis “in silico” de la subunidad II de la ALDH, nos permitió identificar el motivo de unión de tres citocromo *c* como grupos prostéticos.

7. El análisis “in silico” de la subunidad III de la ALDH, nos permitió identificar a las ocho cisteínas que son el motivo de unión a un cluster 2Fe:2S.

8. El análisis hidrofóbico aunado al análisis de topología, nos permitió modelar el arreglo de la enzima en la membrana. La enzima se encuentra anclada a la membrana por la subunidad II, que es el medio por el cual los electrones son cedidos a la quinona endógena, Las subunidades III y I se encuentran localizadas hacia el espacio periplásmico.

IX. Bibliografía

1. 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.* 44:503-515.
2. Adachi O., Tamaya K., Shinagawa E., Matsushita K. & Ameyama M. (1978). Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.* 42: (11) 2045 -2056.
3. Ameyama M. & Adachi O. (1982). Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89:491-497.
4. Ameyama M., Osada K., Shinagawa E., Matsushita K. & Adachi O. (1981). Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 45:1889-1890.
5. Anraku Y. & B. Gennis. (1987). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 12: 262-266.
6. Anthony C., Ghosh M. & Blake C.C.F. (1994). The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone. *Biochem. J.* 304:665-674.
7. Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Balardi R. & Bottini R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* 24:7-11.

8. Caballero-Mellado J., Martínez-Romero E., Estrada de los Santos P. & Fuentes-Ramírez L. E. (1998). Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*, In C: Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (ed.), Biological nitrogen fixation for the 21st century. Kluwer Academic Publisher. p. 381-382.
9. Cavalcante VA. & Döbereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil 108:23-31.
10. Cecile Rose T. Vibat ‡,§ Gary Cecchini,^ Kayako Nakamura, Kiyoshi Kita. & Robert B. Gennis*,‡ (1998). Localization of Histidine Residues Responsible for Heme Axial Ligation in Cytochrome b556 of Complex II (Succinate:Ubiquinone Oxidoreductase) in *Escherichia coli*. Biochemistry, 37: 4148-4159.
11. Cojho EH., Reis VM., Schenberg AC. & Döbereiner J. (1993). Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. FEMS Microbiol. Lett. 106:23-31.
12. De Ley J., Gillis M. & Swings J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae*, p. 267-278. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
13. Del Arenal IP., Contreras ML., Slateorova BB., Rangel P., Leedias F., Davila JR. & Escamilla JE. (1997). Haem O and putative cytochrome bo in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. Arch. Microbiol. 167:24-31.
14. Deppenmeier U. & Ehrenreich A. (2009). Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. J. Mol. Microbial. Biotechnol. 16:16-69.

15. Dibut B., Martínez-Viera R., Ríos Y., Ortega M. & Fey L. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, vol.26, no.2, p. 5-10.
16. Döbereiner J., Reis V. M., Paula M. A. & Olivares F. L. (1993). Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, p. 671-676. *In* R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
17. Duine J.A, (1999). The PQQ Story. *J of Bioscience and Bioengineering*, 88 (3): 231-236).
18. Escamilla, E., Contreras, M., Flores –Encarnación, M. & Flores L.M. (1999). Los sistemas respiratorios bacterianos. *Mensajes bioquímicos*. XXIII: 67-103
19. Flores-Encarnación M., Contreras-Zentella M., Soto-Ursua L., Aguilar GR., Baca BE. & Escamilla J.E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* 181(22):6987-6995.
20. Flores-Encarnación M., Sánchez-Cuevas M. & Ortiz-gutiérrez F. (2004). Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.47 (1-2):47-59
21. Fuenres-Ramírez LE., Jiménez-Salgado TR., Abarca-ocampo IR. & Caballero-Mellado J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus* and indol acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*. 154:145-150.

22. Fuentes-Ramírez L. E., Bustillos-Cristales R., Tapia-Hernández A., Jiménez-Salgado T., Wang E. T., Martínez-Romero E. & Caballero-Mellado J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and 15 *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1305-1314.
23. Fukaya M., Tayama K., Okumura H., Kawamura Y. & Beppu T. (1989). Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:176-180.
24. Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R.M., Stephan M. P., Teixeira K. R. S., Dobereiner J. & De Ley J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:361-364.
25. Gómez-Manzo S., Arreguín E. R., Contreras Z. M. & Escamilla M. E. (2005). Las quinoproteínas Alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos distribución, clasificación, estructura y función. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 8 (1): 28 -37.
26. Gómez-Manzo S, Chavez-Pacheco JL, Contreras-Zentella M, Sosa-Torres ME, Arreguín-Espinosa R, Pérez de la Mora M, Membrillo-Hernández J. & Escamilla JE. (2010). The Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) of *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a Quinohemeprotein containing PQQ, Cytochrome b and Cytochrome c. Molecular and Catalytic Properties, *Journal of Bacteriology*, Vol. 192, No. 21p. 5718-5724,
27. González B., Martínez S., Chávez J. L., Lee S., Castro N. A., Domínguez M. A., Gómez S., Contreras M. A., Kennedy C. & Escamilla J. E. (2006). Respiratory System of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a Cyanide-Sensitive Cytochrome bb and Cyanide-resistant Cytochrome ba Quinol Oxidase. *Bioquim. Biophys. Acta.* 1757 (12): 1614-1622.

28. Hommel R. & Kleber H.P. (1990). Properties of the quinoprotein aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rances*. J. Gen. Microbiol. 136:1705-1711.
29. Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez L, Tapia-Hernández A, Mascarúa-Esparza M. A, Martínez-Romero E. & Caballero-Mellado J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63:3676-3683.
30. Jiménez-Salgado TR., Aparicio F. & Caballero-mellado J. (1994). Detección de citocinas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana Cuba.
31. Kinter M. & Sherman N. E. (2000). In protein sequencing and identification using tandem mass spectroscopy, Desidero, D. M., Nibbering, N. M. M. Eds; John Wiley- interscience, inc. New York. P: 147– 165.
32. Li R. P. & MacRae I. C. (1991). Specific association of *diazotrophic acetobacters* with sugarcane. Soil Biol. Biochem. 23:999-1002.
33. Lira, A. (2011) Análisis de la secuencia proteica (o de aminoácidos) de la ALDH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para determinar la presencia de dominios de unión a molibdo-pterina. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
34. Loganathan, P., Sunlta R., Parlda A. K. & Nair S. (1999). Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. J. Appl. Microbiol. 87:167-172.
35. Loiret F. G., Ortega E., Ortega-Rodés P., Rodés R. & Fuente E. de la. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus* es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*, vol. 18, no. 2, p. 113-122.

36. Madhaiyan M., Saravanan V. S., Jovi D.B.S.S., Hyoungseok J., Thenmozhi R., Ari K. & Sa T. (2004). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of western hills, India. *Microbial. Res*, Vol 159, p. 233- 243.
37. Markwell MAK., Has SM., Tolber NE. & Bieber LL. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* 72:296-303.
38. Martínez Yee Suri Karina. (2005). "El sistema de deshidrogenasas del periplasma y la ubiquinona (UQ₁₀) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5". Tesis de Maestría. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de Maestría.
39. McIntire W.S. (1994). Quinoproteins. *The FASEB J.* 8:513-519.
40. Muraoka H., Matabe Y., Ogasawara N. & Takahashi H. (1981). Purification and properties of coenzyme-independent aldehyde dehydrogenase from the membrane fraction of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Technol.* 59:247-255.
41. Olsthoorn A.J.J., Otsuki T. & Duine J.A. (1997). Ca²⁺ and its substitutes have two different binding sites and roles in soluble, quinoprotein (pyrroloquinoline quinone-containing) glucosedehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 247:659-665.
42. Oubrie A. & Dijkstra B.W. (2000). Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymes. *Protein Sci.* 9:1265-1273.
43. Oubrie A., Rozeboom H.J., Kalk K.H., Olsthoorn A.J.J., Duine J.A. & Dijkstra B.W. (1999). Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. *The EMBO J.* 18:5187-5194.

44. Paula M. A., Urquiaga S., Siqueira J.O. & Döbereiner J. (1992). Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils* 14:61-66.
45. Piñón D., Casas M., Blanch M., Fontaniella B., Blanco Y., Vicente C., Solas MT. & Legaz ME. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res. Microbiol.*, 153, 345–351.
46. Raspor P. & Goranovič D. (2008). 'Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria', *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 2, 101- 124.
47. Rios Y. (2007). Efectos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de yuca (*Manihot esculenta crantz*) var CMC-40. [Tesis de maestría]; Universidad de la Habana, 57 p.
48. Saravanan VS., Madhaiyan M., Osborne J., Thangaraju M. & Sa TM. (2007). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb. Ecol.* 39:130-140.
49. Soto U. L. & Baca E. B. (2001). Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Rev. Latin. Microbiol.* 43: 37-49.
50. Stephan MP., Aliviera M., Teixeira KRS., Martínez-Drets G. & Döbereiner J. (1991). Physiology and nitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:67-72.

51. Swings J. (1992). The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, p. 2268-2286. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Vol. III. Springer-Verlag, New York, N. Y.
52. Takemura H., Kondo K., Horrinduchi S. & Beppu T. (1993). Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. Journal of Bacteriology. 175. 6857-6866
53. Takemura H., Tsuchida T., Yoshinga F., Matsushita K. & Adachi O. (1994). Prosthetic group of aldehyde dehydrogenase in acetic acid bacteria is not pyrroloquinoline quinone. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58:2082-2083.
54. Tapia-Hernandez A., Bustillo M. R., Jimenez Salgado T., Caballero Mellado J. & Fuentes-Ramirez L.E. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microbial Ecology, Vol. 39, no. 1, P. 49-55.
55. Thomas P. E., Ryan D. & Levin W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P – 450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 75 (1):168 – 176.
56. Thurner, C., Vela C., Meyer L., Meile L. & Teuber M. (1997). Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. Arch. Microbiol. 168:81-91.
57. Toyama H., Mathews S., Adachi O. & Matsushita K. (2004). Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase: Structure, Function, and Physiology. Archives of Biochemistry and Biophysic. No. 428: 10 – 21.
58. Ureta A. & Nordlund S. (2002). Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. J. Bac. Vol.184 No.20. pp 5805 – 5809.

59. Yamada M., Elias MD., Matsushita k., Migita CT. & Adachi O. (2003). *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: ist structure comparison with other quinoproteins. *Biochim. Biophys.Acta.* 1647:185-192.
60. Yamada Y., Hoshino K. & Ishikawa T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1244-1251.
61. Yamada Y., Hoshino K. & Ishikawa T. (1998). *Gluconacetobacter* nom, corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no 64. *J. Syst. Bacteriol.* 48:327-328.
62. Zheng Y.J., Xia Z.X., Chen Z.W., Mathews F.S. & Bruice T.C. (2001). Catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase: A theoretical and X-ray crystallographic investigation. *Proc. Natl. Sci. USA.* 98:432-434.