

LAS QUINOPROTEÍNAS ALCOHOL DESHIDROGENASAS EN LOS SISTEMAS BACTERIANOS: DISTRIBUCIÓN, CLASIFICACIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

SAÚL GÓMEZ-MANZO¹, ROBERTO ARREGUÍN-ESPINOSA²,

MARTHA CONTRERAS-ZENTELLA¹ Y EDGARDO ESCAMILLA-MARVÁN^{1*}

Depto. de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular¹, Instituto de Química², UNAM.
Apdo. Postal 70-242, México, D.F. E-mail: *eescami@ifc.unam.mx

RESUMEN

Existe una gran diversidad de alcohol deshidrogenasas (ADHs) microbianas; las cuales son divididas en tres grandes grupos: (a) Las que son dependientes de las coenzimas NAD o NADP, (b) Las que son independientes de estas coenzimas; sin embargo, utilizan pirroloquinolina quinona (PQQ) y hemo tipo C como grupo prostético y (c) Las oxidases dependientes de FAD que catalizan la reacción irreversible de alcoholes. Las ADHs que utilizan el PQQ, se encuentran a su vez divididas en tres tipos. Las ADHs tipo I que contienen sólo PQQ como grupo prostético y se les conoce como quinoproteínas; mientras que las ADHs tipo II y tipo III además del PQQ contienen hemo tipo C y se les conoce como quinohemoproteínas. Las ADHs tipo II son enzimas solubles que se encuentran en el espacio periplásmico y están presentes en proteobacterias como *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* y *Comamonas testosteroni*. Las ADHs tipo III son enzimas que se encuentran ancladas a la membrana y trabajan orientadas hacia el espacio periplásmico. Se les ha identificado y caracterizado únicamente en bacterias ácido acéticas. Las ADH tipo III, por lo general contienen tres subunidades. El transporte intramolecular de electrones en las ADHs tipo II y III se propone que es del PQQ al hemo C de la primera subunidad y de ahí, de hemo en hemo en la segunda subunidad hasta llegar a la quinona endógena. Los tres tipos de PQQ-ADHs son discutidas en esta revisión.

Palabras clave: Alcohol deshidrogenasas (ADHs), pirrolo-quinolina-quinona (PQQ), quinohemoproteína alcohol deshidrogenasa (qhADH), quinohemoproteína etanol deshidrogenasa (qhEDH), quinoproteína etanol deshidrogenasa (QEDH), quinoproteína metanol deshidrogenasa (QMDH).

ABSTRACT

Microbial alcohol oxidoreductases constitute a very diverse group. They can be divided into three major categories. (a) NAD(P)-dependent dehydrogenases. (b) NAD(P)-independent enzymes that use pyrroloquinoline quinone (PQQ), heme C as cofactor. (c) FAD-dependent oxidases that catalyze an essentially irreversible oxidation of alcohols. The ADHs that have PQQ as the prosthetic group are divided into 3 groups; types I, II and III. Type I ADH is a simple quinoprotein having PQQ as the prosthetic group; while type II and type III ADHs are quinohemoprotein having heme C as well as PQQ. Type II are soluble periplasmic enzymes and are widely distributed in Proteobacteria such as *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* and *Comamonas testosteroni*. Type III ADHs are membrane-bound enzymes and oriented towards the periplasmic surface. They have been identified and characterized solely in acetic acid bacteria. Type III ADH consists of three subunits. The intramolecular electron transfer in the type II and III ADHs is the PQQ to heme C of the first subunit and there, from heme to heme in the second subunit until arriving at ubiquinone. The three types of PQQ-ADHs are discussed in this paper.

Key Words: Alcohol dehydrogenases (ADHs), pyrroloquinoline-quinone (PQQ), quinohemeprotein alcohol dehydrogenase (qhADH), quinohemeprotein ethanol deshydrogenase (qhEDH), quinoprotein ethanol dehydrogenase (QEDH), quinoprotein methanol dehydrogenase (QMDH).

INTRODUCCIÓN

La interconversión de alcoholes, aldehídos y cetonas son procesos esenciales tanto en organismos procariotas como eucariotas. Las etanol oxidoreductasas son las encargadas de catalizar estas reacciones usando una gran variedad de aceptores de electrones y pueden ser divididas en tres grandes grupos: (a) *las alcohol deshidrogenasas (ADHs) dependientes de NAD(P)* son las mejor caracterizadas de estos tres grupos. Muchas ADHs dependientes de NAD(P) se encuentran presentes en una gran variedad de animales, plantas y microorganismos y presentan similitudes entre ellas a nivel estructural y funcional¹; (b) *las alcohol deshidrogenasas independientes de NAD(P)*, que usan como grupo prostético a la pirrolo-quinolina-quinona (PQQ), y grupos hemo tipo C; y (c) *alcohol oxidasas dependientes de FAD*, que catalizan la oxidación irreversible de metanol a formaldehído con la producción de peróxido de hidrógeno² en levaduras y hongos.

Anthony y Zantman (1967) reportaron por primera vez el grupo prostético PQQ al caracterizar la enzima metanol deshidrogenasa. La enzima resultó ser no dependiente de NAD(P) y poseía un espectro de absorción muy diferente al de las flavoproteínas. Después de desnaturarizar la proteína, se encontró un compuesto de baja masa molecular que presentó un espectro de emisión de fluorescencia similar al de las pteridinas³. Posteriormente, se observó que la estructura del PQQ es una *ortho*-quinona (*o*-quinona) que contiene 2N's y 3H's, uno de los cuales es intercambiable; y que las posiciones C4 y C5 del anillo de la quinona, se reduce a semiquinona y a quinol durante la catálisis (PQQH⁺ y PQQH₂) (Fig. 1). El carbonilo C5 en la forma oxidada es muy reactivo a nucleófilos como alcoholes, amonio, cianuro y aminoácidos; y esta reactividad debe de ser tomada en cuenta

cuando se quiere determinar el mecanismo de acción de la enzima. El uso del nombre sistemático (2,7,9-tricarboxi-1H-pirrol(2,3-f)quinolina-4,5-diona) es impráctico y se introdujo el nombre semi-sistemático nombrándolo como pirrolo-quinolina-quinona y abreviado como PQQ.

Se han identificado más de 20 enzimas diferentes que presentan PQQ como grupo prostético⁴. La mayoría de estas deshidrogenasas se ubican en el lado periplásmico de las bacterias Gram negativas y están involucradas en los primeros pasos de la oxidación de alcoholes, aminas y azúcares. Dependiendo de la naturaleza de la deshidrogenasa, la transferencia de electrones ocurre del PQQ hacia un citocromo *c*, citocromo *b*, proteína azul de cobre o alas quinonas bacterianas. Ciertas quinoproteínas deshidrogenasas están involucradas en la oxidación incompleta (por ejemplo, producción de vinagre y ácido glucónico), mientras otras funcionan en una cadena respiratoria alterna proveyendo al organismo de un sistema auxiliar de energía⁴.

Uno de los trabajos más importantes sobre la estructura del PQQ fue obtenido por Resonancia Magnética Nuclear (NMR); cuando *Hyphomicrobium X* y *Methylobacterium extorquens AM1* se cultivaron con sustratos marcados, donde se observó que el PQQ producido se deriva de residuos de glutamato y tirosina y que ambos aminoácidos son incorporados de manera intacta en la formación del PQQ^{5,6}. La cadena tirosil es la que aporta los seis átomos de carbono del anillo de la *ortho*-quinona del PQQ, y la consecuente formación de los carboxi-pirroles está dada por la ciclización interna del aminoácido de tirosina; los cinco carbonos restantes son aportados por el glutamato (Fig. 2).

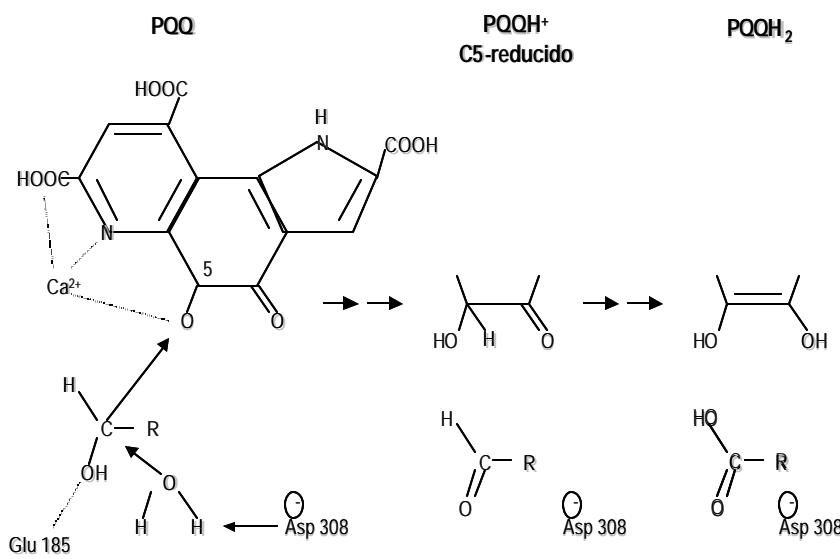


Figura 1. Estructura de PQQ, PQQH⁺ y PQQH₂.

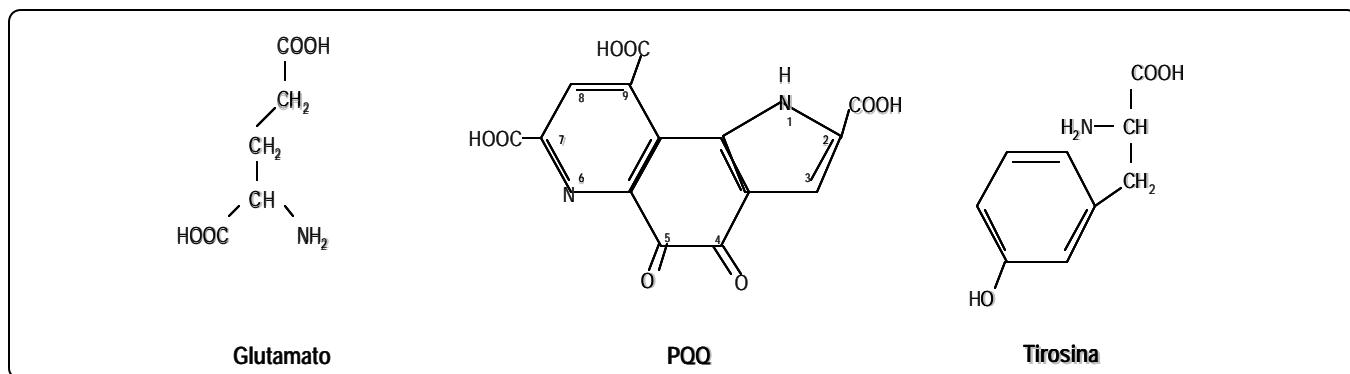


Figura 2. Origen de los átomos de carbono del PQQ.

En cuanto a la biosíntesis del PQQ se han encontrado seis genes asociados a la biosíntesis del grupo prostético PQQ en diversas bacterias, incluyendo *Acinetobacter calcoaceticus*, *Methylobacterium extorquens* AM1 y *Klebsiella pneumoniae*, los cuales han sido designados como *pqqABCDEF*⁷. Para cada gen se ha propuesto una función; por ejemplo, *pqqA* sirve como precursor de la biosíntesis del PQQ; *pqqB* se le ha asociado una función de transporte; *pqqC* funciona como una oxigenasa; *pqqD*, con función desconocida; *pqqE*, sintetiza el metal que contiene el cofactor, *pqqF* con función de peptidasa⁷. Una característica importante del PQQ y que sólo ha sido apreciada recientemente es la habilidad de formar complejos con Ca²⁺ o Mg²⁺ en solución. Ésta fue presentada originalmente por Mutzel y Gorish⁸ y explicada por Itoh y colaboradores⁹ en su modelo químico sistemático, en el cual el complejo Ca²⁺-PQQ es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes en solventes orgánicos. Todas las deshidrogenasas que contienen PQQ requieren calcio para su actividad, excepto la glucosa deshidrogenasa membranal (mGDH), la cual requiere Mg²⁺¹⁰. A pesar de que es claro que metales divalentes activan a las PQQ deshidrogenasas, el mecanismo de activación no es del todo claro¹¹.

DISTRIBUCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS PQQ-ALCOHOL DESHIDROGENASAS

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) dependientes de PQQ se encuentran solamente en la fracción periplasmática de un amplio rango de especies de bacterias como; α , β y γ -proteobacterias. Algunas de estas enzimas son solubles en el periplasma y otras se unen a la superficie de la membrana citoplasmática. Las ADHs quinoproteínas y quino(hemo)proteínas deshidrogenasas forman por así llamarlo “El sistema oxidativo de alcoholes en el periplasma”. Todas ellas funcionan como deshidrogenasas primarias, las cuales transfieren los equivalentes reducidos directamente a la cadena respiratoria bacteriana aeróbica en el periplasma.

Las ADHs dependientes de PQQ forman uno de los grupos más grandes en la familia de quinoproteínas, con 18 diferentes enzimas (Tabla I)¹²⁻³¹ y se clasifican en tres tipos. Las ADHs tipo I se han encontrado en un limitado número de proteobacterias

y son muy similares a la quinoproteína metanol deshidrogenasa (MDH) que contienen sólo PQQ. Las ADHs tipo II; son enzimas solubles en el periplasma y se distribuyen ampliamente entre diversas proteobacterias. Las ADHs tipo III están unidas a membrana y trabajan en la superficie periplásmica y son características de las bacterias ácido acéticas³².

I. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo I

a) Quinoproteína-metanol-deshidrogenasa (QMDH): La alcohol deshidrogenasa mejor caracterizada es la metanol deshidrogenasa de bacterias metilotrópicas. Se ha descrito una enzima metanol deshidrogenasa en *Methylobacterium extorquens* y es una enzima periplasmática soluble que tiene una estructura tetramérica $\alpha_2\beta_2$; cada subunidad α (66 kDa) contiene una molécula de PQQ y un ión Ca²⁺, los cuales están coordinados. La subunidad β es muy pequeña (8.5 kDa) y su función se desconoce. La estructura de esta enzima tiene características importantes, incluyendo ocho triptófanos en forma de muelle que mantienen la estructura de la subunidad α . Los genes que codifican para la subunidad α y β (*mxaF* y *mxaI*) se encuentran localizados en un operón de 12 genes que codifican a las proteínas responsables de la oxidación del metanol (*mxaFGIR(S)ACKLDB*)³³. *MxaG* es un citocromo ζ , que es el aceptor de electrones para la deshidrogenasa.

La metanol deshidrogenasa oxida metanol a formaldehído, preferentemente cuando el metanol es la única fuente de carbono³⁴. También tiene capacidad de oxidar una amplia variedad de alcoholes primarios, presentando una alta afinidad para estos sustratos (la K_m para metanol es de 5-20 μ M). En contraste los alcoholes secundarios son raramente oxidados. Esta enzima requiere amonio como activador, y su actividad puede medirse espectroscópicamente con metasulfato de fenazina o azul de Wurster, pero no con ferricianiano.

b) Quinoproteínas alcohol deshidrogenasas: Como se presenta en la Tabla I, cuatro diferentes quinoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo I han sido identificadas en dos especies, tres de ellas en *Pseudomonas* y una en *Stenotrophomonas*. Una etanol deshidrogenasa (qEDH) similar a la metanol

Enzima	Localización	Organismo
Quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes		
Metano deshidrogenasa	S	Methylotrophs (12)
ADH Tipo I (PQQ)		
Etanol deshidrogenasa (qEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (13)
Alcohol deshidrogenasa (ADH I)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
1-Butanol deshidrogenasa (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
Polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (16)
Otras quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes (PQQ)		
Sorbosa/Sorbosona deshidrogenasa	S	Especies de <i>Gluconobacter</i> (17)
Glicerol deshidrogenasa	M	<i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i> (18) Especies de <i>Gluconobacter</i> (19)
Quinohemoproteínas capaces de oxidar alcoholes		
ADH Tipo II (PQQ/hemos C)		
Polietilén glicol deshidrogenasa (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (20)
Etanol deshidrogenasa (qhEDH)	S	<i>Comamonas testosteroni</i> (21)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Polivinil alcohol deshidrogenasa (PVADH)	S	<i>Pseudomonas</i> sp. (22)
Tetrahidrofurfuril alcohol deshidrogenasa (THF ADH)	S	<i>Ralstonia eutrophla</i> (23)
1-Butanol deshidrogenasa (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
ADH Tipo III (PQQ/hemo c3 hemo C)		
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter aceti</i> (24)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (25)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconoacetobacter polyoxogenes</i> (26)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acidomonas methanolicus</i> (27)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i> (28)
Otras quinohemoproteínas		
Lupamina hidroxilasa (PQQ/hemo C)	S	<i>Pseudomonas</i> sp. (29)
Amina deshidrogenasa (CTQ/hemo C)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (30) <i>Paraccoccus denitrificans</i> (31)

S: soluble; **M:**membranal.

Tabla I. Quinoproteínas y quinohemoproteínas alcohol deshidrogenasas.

deshidrogenasa descrita arriba (QMDH) ha sido encontrada en *Pseudomonas aureginosa* y *Pseudomonas putida*¹³⁻¹⁴. Al igual que la metanol deshidrogenasa, estas enzimas tienen un pH óptimo relativamente alto (pH 7.7), requieren amonio como activador, y el ferricianuro no funciona como acceptor artificial de electrones; son capaces de oxidar una gran variedad de alcoholes como sustratos, incluyendo alcoholes secundarios. Sus espectros de absorción son muy similares al de la metanol deshidrogenasa, pero presentan una baja afinidad por el metanol; la *Km* para etanol es de 15 mM y para el metanol es casi 1000 veces más alta. La enzima alcohol deshidrogenasa tipo I de *P. aureginosa* se caracterizó inicialmente como un monómero, con dos moléculas de PQQ (101 kDa cada una)¹³; sin embargo, se ha visto que esta enzima presenta la misma estructura que la metanol deshidrogenasa (tetramero $\alpha_2\beta_2$). La enzima es inhibida por EDTA, el cual induce la salida de PQQ, dando lugar a la formación de una apoenzima. Todas las enzimas antes

mencionadas son solubles y trabajan en el espacio periplásmico. De todas ellas, la polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH)¹⁶ es excepcional en términos de su especificidad por sustratos debido a que no oxida alcoholes. Otras dos enzimas solubles como sorbosa/sorbosona deshidrogenasa¹⁷ y la glicerol deshidrogenasa membranal (GLDH)¹⁹ también son clasificadas como deshidrogenasas tipo I.

II. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo II

Este grupo está formado por enzimas solubles como la quinohemoproteína etanol deshidrogenasa (qhEDH). Se han identificado y caracterizado un total de siete diferentes quinohemoproteínas en diversas proteobacterias como *Rhodopseudomonas acidophila*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutrophla* y *Comamonas testosteroni* (Tabla I). Dos tipos de ADH (ADH IIB y ADH IIG) son producidas en la misma cepa de *Pseudomonas putida* HK5, junto con otra alcohol

deshidrogenasa tipo I, y la expresión de cada una de las enzimas depende de la naturaleza del sustrato adicionado al medio de cultivo como fuente de carbono y energía¹⁴.

Una quinohemoproteína etanol deshidrogenasa periplásica (qhEDH) ha sido descrita en *Comamonas testosteroni*. La enzima es un monómero (71 kDa), que contiene dos grupos prostéticos; una molécula de PQQ y un solo hemo C²¹. En ensayos de diaforasa donde se sigue la reducción del diclorofenolindolfenol el pH óptimo es de 7.7 y no requiere de amonio como activador. Se ha postulado que la transferencia de electrones es del PQQ al hemo C de la misma subunidad. Dicha actividad puede seguirse espectroscópicamente por la reducción de ferricianuro. La enzima tiene un amplio rango de actividad específica para alcoholes primarios, secundarios y para aldehídos, pero no oxida metanol. La reconstitución de la holoenzima activa requiere una molécula de PQQ e iones calcio, indicando que la estructura y función del sitio activo debe de ser muy similar al de metanol deshidrogenasa. Por estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR) se ha demostrado la presencia de una semiquinona formada por el PQQ en el sitio activo. El hemo tipo C también ha sido detectado por EPR y por espectroscopía visible, estos estudios indican que el fierro hémico es similar a los otros citocromos de tipo c de bajo potencial, los cuales están coordinados por histidina y metionina²¹.

En la Tabla I, también se encuentran incluidas dos quinohemoproteínas adicionales, la lupamina hidroxilasa y la amina deshidrogenasa, encontradas en las especies de *Pseudomonas* y *Paracoccus*; ninguna de las dos tiene la capacidad de oxidar alcoholes. Lupamina hidroxilasa contiene una molécula de PQQ y un hemo C; y su secuencia de aminoácidos presenta un alto grado de similitud con las ADHs tipo II.

Estudios con NMR han demostrado que el enlace del PQQ produce un cambio conformacional de la proteína; debido a una reorientación de la metionina unida al hemo C; así como, un incremento en la densidad electrónica en uno de los anillos de pirrolina, y un incremento en el potencial redox del hemo. A pesar que existe evidencia que el PQQ afecta las propiedades del hemo; es incierto si la interacción entre estos dos grupos es directa o indirecta³⁵. Todas las evidencias indican que la transferencia de electrones se lleva a cabo desde la forma reducida del PQQ a los hemo C (potencial redox 140 mV) y de ahí a un acceptor de electrones endógeno (*in vivo*) o externo (*in vitro*).

III. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo III

Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo III se encuentran asociadas a la membrana. Cinco ADHs tipo III han sido descritas y caracterizadas en bacterias ácido acéticas en especies de *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Acidomonas* y *Gluconobacter* (Tabla I)²⁴⁻²⁷.

Junto con la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) que

también se encuentra unida a la membrana, la ADH tipo III es responsable de la oxidación de alcoholes hasta ácido acético en la producción de vinagre. No requieren amonio como activador y tiene un pH óptimo entre 4.0 y 6.0. La especificidad por sustratos es relativamente restringida comparada con otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas, ya que, oxidan preferentemente alcoholes primarios (cadenas de C2 a C6), pero no oxidan metanol ni alcoholes secundarios y presentan actividad con formaldehído y acetaldehído.

Se ha demostrado claramente que las ADHs tipo III en las bacterias ácido acéticas están involucradas en la producción de ácido acético; mientras que, las ADHs-dependientes de NAD⁺ son usadas únicamente en la asimilación de etanol a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

El acceptor natural de electrones de las ADHs tipo III es la ubiquinona endógena de la membrana. Estas quinoproteínas están generalmente formadas por tres subunidades. La subunidad I (72–80 kDa) es una quinohemoproteína similar a la quinohemoproteína soluble tipo II; en donde se encuentra una sola molécula de PQQ y un solo hemo tipo C (Fig. 3). Los genes estructurales de diversas bacterias ácido acéticas han sido secuenciados. Se observó que los genes que codifican para las subunidades I y II están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura formando un operón³⁶. Las dos subunidades tienen en el amino terminal un péptido señal típico de proteínas de membrana, el cual es probablemente procesado para dar lugar a las subunidades maduras. La secuencia de aminoácidos de la subunidad I indica que es una proteína soluble, la primera parte tiene similitud con la secuencia de la metanol deshidrogenasa soluble; pero en el extremo carboxilo terminal tiene un sitio de unión para el hemo C³⁷. La secuencia de aminoácidos de la subunidad II (48–43 kDa)³⁸ indica que esta subunidad une a tres hemos C, los cuales están presentes en la proteína pura²⁸ (Fig. 3). En total, la enzima tiene cuatro hemos C (unidas a las subunidades I y II). La mayoría de las ADHs de las bacterias ácido acéticas tienen una tercera subunidad (subunidad III, 14–17 kDa), la cual está ausente en *Acetobacter polyoxogenes*²⁶. Los genes que codifican esta pequeña subunidad no están localizados a los genes que codifican las otras dos subunidades. La secuencia de aminoácidos deducida para la subunidad III indica que el tamaño del péptido señal es grande (alrededor de 20 kDa); y que la subunidad madura tiene una masa molecular aparente de 14 kDa en SDS-PAGE.

Así como para otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas, la actividad de estas enzimas puede seguirse con metasulfato de fenazina, el cual presumiblemente reacciona a nivel de PQQ. También puede usarse ferricianuro, que recibe los electrones de uno o más de los hemos tipo C de la subunidad I y II. La velocidad de reacción con ferricianuro es aproximadamente 10 veces más alta que lo observado con quinohemoproteínas solubles. Con base en esto, se ha sugerido que los citocromos de la subunidad

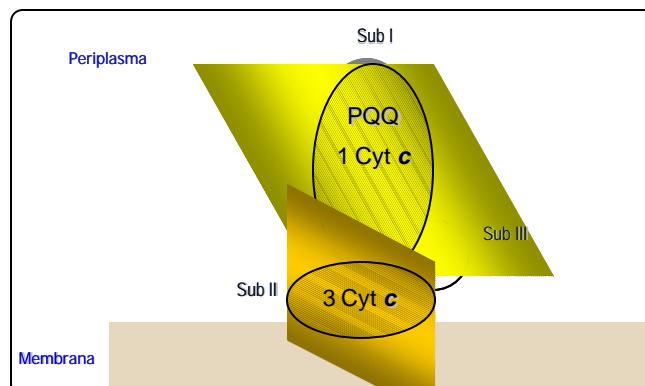


Figura 3. Esquema de localización de la PQQ-alcohol deshidrogenasa tipo III en las bacterias ácido acéticas.

II son necesarios para que la enzima presente esta alta velocidad de transporte de electrones. Las quinoproteínas de las bacterias ácido acéticas difieren de todas las otras alcohol deshidrogenasas en que pueden usar ubiqinonas de cadena corta (Q1 y Q2) como aceptores de electrones, además de las ubiqinonas endógenas (Q9 y Q10) cuando éstas son reconstituidas en vesículas membranales³⁹. Estas quinohemoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo III requieren detergente para su extracción de la membrana. Se ha observado que es una proteína extrínseca de membrana; debido a que ninguna de sus subunidades parece tener cruces transmembranales claramente definidos.

Recientemente se ha realizado la separación de la subunidad II (con tres citocromos *c*) de un subcomplejo que contiene las subunidades I y III en *Gluconobacter suboxydans*²⁸. El subcomplejo I+III presenta actividad en ensayos con diclorofenol indolfenol y metasulfato de fenazina; y poca actividad con ferricianuro (sólo a pH bajos), presumiblemente por la vía del hemo *C* de la subunidad I. Sin embargo, el subcomplejo no presentó actividad con la quinona análoga Q1. Dicha actividad fue restaurada con la adición de la subunidad II, concluyéndose que la transferencia de electrones hacia la quinona se lleva a cabo a través de los hemos *C* de las subunidades I y II. Como se esperaba, la subunidad II no presenta actividad catalítica por sí sola. Análisis cinéticos de la reducción del ferricianuro a varios pHs indica que sólo dos de los tres hemos en la subunidad II pueden estar involucrados en la transferencia de electrones del PQQ reducido a la ubiqinona.

Ánalisis de localización de las subunidades en *G. suboxydans* y *A. pasteurianus* sugiere que los citocromos de la subunidad II están embebidos en la membrana, que las subunidades I y III están fuertemente unidas a la subunidad II, y que esta unión ayuda a la subunidad I de la deshidrogenasa a acoplarse adecuadamente con los citocromos *c* de la subunidad II y guardar una conformación correcta³⁷. En algunas condiciones de crecimiento (alta aeración y bajo pH), la conformación de las subunidades parece estar alterada, dando lugar a una proteína inactiva; sin embargo, la restauración de las condiciones

adecuadas de crecimiento (baja aeración y pH neutro) permiten que se produzca de nuevo la forma activa⁴⁰.

ESTRUCTURA Y SITIOS ACTIVOS DE LAS QUINOPROTEÍNAS ALCOHOL DESHIDROGENASAS

Todas las quinohemoproteínas que contienen PQQ presentan una estructura común que es la de “plegamiento de propela”, formando un superbarril que consiste de ocho hojas β-plegadas (4 antiparalelas) y que están rearregladas con una simetría radial a cada lado de la propela (Fig. 4). Las hojas antiparalelas β-plegadas tiene forma de una letra “W” y por lo cual son llamadas “Motivo W”. Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de los motivos W entre las ADHs tipo I y las del tipo III, se observa que hay 11 aminoácidos conservados en cada una de las hojas β-plegadas los cuales son: Ala (A) en la primera posición, Asp (D) en la tercera posición, Gly (G) en la séptima, Lys o Glu (K o E) en la octava y Trp (W) en la última posición. Esta secuencia consenso AxDxxxGK(E)xxW es muy conservada en las regiones β-plegadas W1, W2, W3, W4, W6 y W7, pero no en W5 y W8.

Análisis cristalográficos han demostrado que esta secuencia consenso (AxDxxxGK(E)xxW) es importante para estabilizar las



Figura 4. Modelo cristalográfico del superbarril de la metanol deshidrogenasa de *Methylobacterium extorquens*. La enzima está formada por ocho hojas β plegadas representada en cintas. El grupo PQQ se encuentra en el centro de la cavidad hidrofóbica del superbarril. W1 - W8 son los ocho motivos W que conforman el modelo de superbarril. Las cadenas A-C están localizadas cerca del amino terminal (n) y la cadena D está localizada cerca del carboxilo terminal (c).

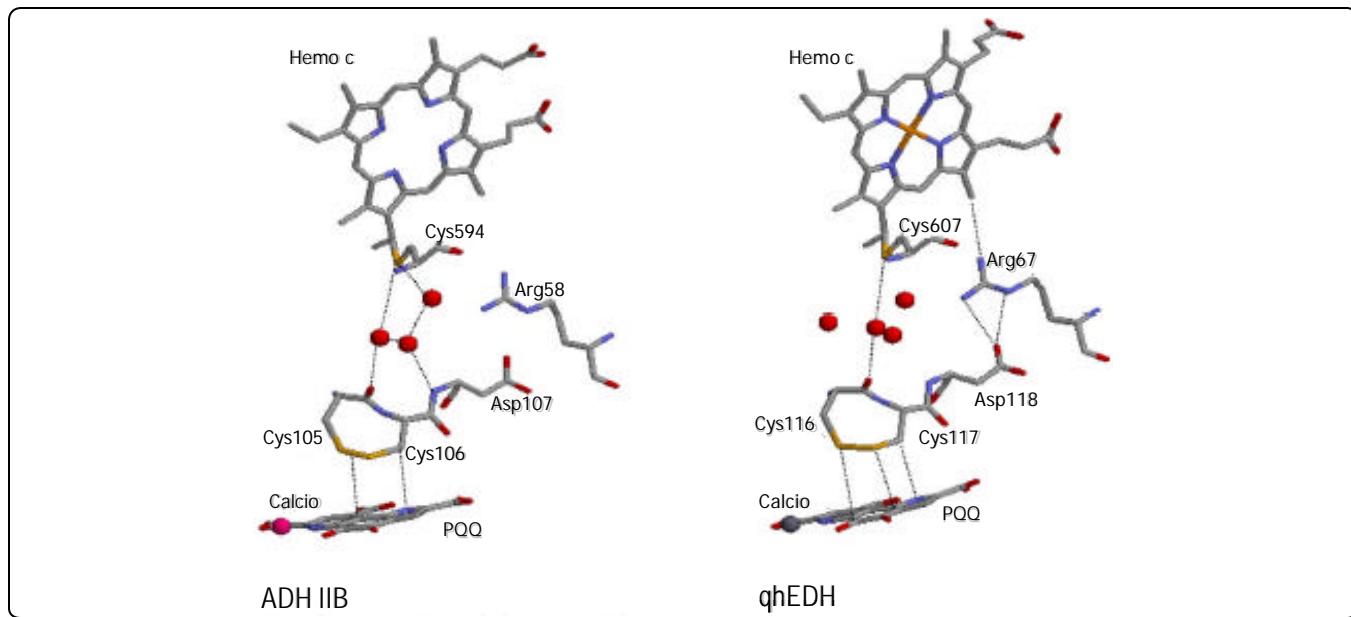


Figura 5. Ruta posible de transferencia de electrones del PQQ al hemo C en ADH IIB y qhEDH. Se representa en este modelo al PQQ, hemo C y aminoácidos que pueden estar involucrados en el proceso de transferencia de electrones. Las moléculas de agua además de estabilizar la estructura del cristal pueden estar involucradas en la transferencia de electrones; y se representan en esferas. La ruta óptima de transferencia de electrones está representada en líneas punteadas.

hojas antiparalelas β-plegadas de cada motivo W⁴¹. Además del motivo W, diversas porciones de secuencia también están conservadas entre los diferentes tipos de ADHs; dentro de los cuales se incluyen residuos importantes para la unión del PQQ y para la catálisis (Fig. 5). Cerca de 100 aminoácidos localizados entre las secuencias consenso de las hojas β-plegadas W5 y W6 presentan un bajo grado de similitud; estos segmentos parecen ser responsables de las diferencias estructurales que existen entre las ADHs tipo I y las tipo II⁴².

Seis estructuras tridimensionales han sido determinadas por cristalografía de rayos X, de las cuales tres son de QMDHs de metilotrofos, la quinoproteína etanol deshidrogenasa (qEDH) de *P. aeruginosa*⁴², la quinohemoproteína etanol deshidrogenasa (qhEDH) de *C. testosteroni*⁴³ y la ADH IIB de *P. putida* HK5⁴⁴. Los residuos de aminoácidos involucrados en la unión del PQQ y el ión calcio en el sitio activo están conservados. El tamaño de la cavidad del sitio activo donde el sustrato se une y reacciona fue calculado por cristalografía en las estructuras de MDH, qEDH y ADH IIB y presentan un diámetro de 18, 62 y 120 Å respectivamente. Se estima que el tamaño de la cavidad se correlacionan con la especificidad de las enzimas por sus sustratos.

Las estructuras tridimensionales de la ADH IIB y de la qhEDH fueron obtenidas por cristalografía de rayos X cuando el producto de la reacción se encontraba unido al sitio activo; por lo que, estas estructuras dan mucho mayor información acerca de la unión del sustrato y el mecanismo catalítico de las quinoproteínas.

TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN LAS QUINOPROTEÍNAS ALCOHOL DESHIDROGENASAS

La transferencia de electrones durante la catálisis es totalmente diferente entre los tres tipos de ADHs. Las ADHs tipo I como la MDH dona sus electrones directamente a un citocromo *c* soluble⁴¹. En la transferencia intramolecular de electrones en las ADHs tipo II parece estar involucrada una proteína soluble que contiene cobre, al menos en el caso de ADH IIB⁴⁵. Por otro lado, las ADHs tipo III unidas a membrana donan los electrones directamente a la poza de quinonas (UQ) de la membrana⁴⁵.

Para que ocurra la transferencia de electrones hacia la quinona membranal en las ADHs tipo II y III, los electrones tienen que viajar intramolecularmente como sigue: primero, del PQQ al hemo C que se encuentra unido de manera covalente en la subunidad I (esta reacción no ha sido caracterizada del todo). El potencial redox del hemo C de ADH IIB es de +188 mV, el cual es similar al de otras quinohemoproteínas como la lupamina hidroxilasa (+193 mV)²⁹. Los potenciales redox del PQQ en las ADHs tipo II no han sido determinados, se especula que son lo suficientemente bajos para que la transferencia a través de los hemos C se lleve a cabo. Para que la enzima catalice la oxidación de los sustratos debe de estar en su forma oxidada. Se cree que la unión del sustrato alcohol a la enzima debe liberar un par de electrones del alcohol y ser aceptados por el PQQ para generar PQQH₂, después uno de estos dos electrones deberá ser transferido al hemo C de la subunidad I, dejando al PQQ en su forma de semiquinona (PQQH⁺). En la ADH IIB y la ADH tipo III de las bacterias ácido acéticas se ha determinado espectrofotométricamente que sus citocromos se mantienen

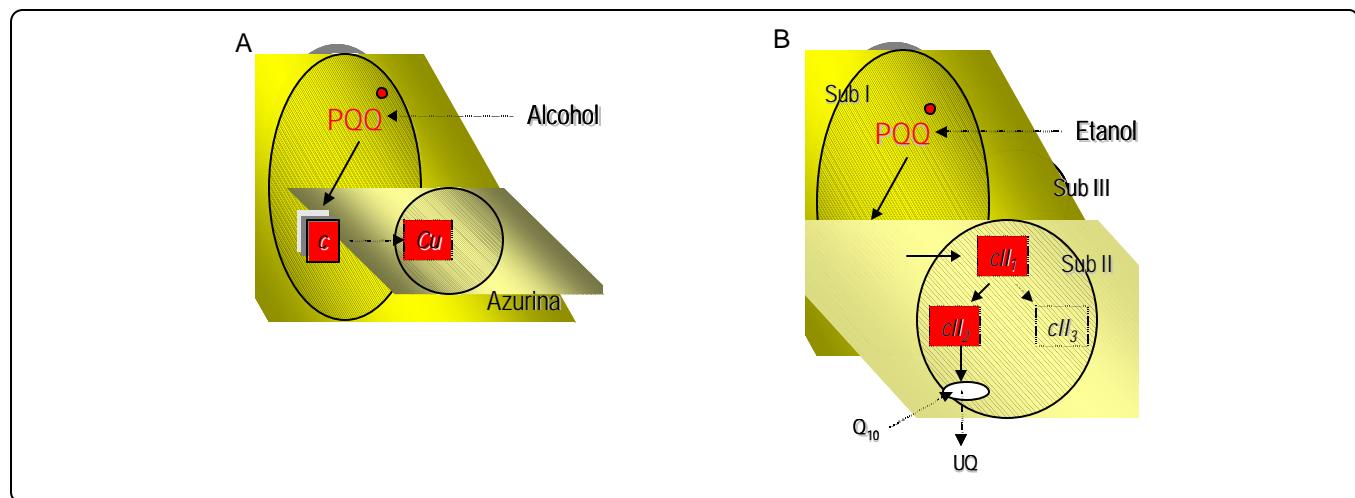


Figura 6. Modelo hipotético de la transferencia intramolecular de electrones en las ADHs tipo II y tipo III. La ruta propuesta para la transferencia intramolecular de electrones está representada en líneas sólidas, y la ruta intermolecular de electrones está representada en líneas punteadas en las ADH tipo II (A). En las ADHs tipo III los C_I, C_{II₁}, C_{II₂} y C_{II₃} corresponden a los 4 sitios de hemo C en cada una de las subunidades I y II. Q₁₀ es representado como el sitio de unión de quinona *in vivo* (B). En ambos casos inicialmente el PQQ está presente en la forma de semiquinona (PQQ[•]) y los hemo C están en su forma reducida.

reducidos a través de la purificación, y se ha propuesto que esto es debido a la presencia de cantidades trazas de alcohol en las soluciones amortiguadoras usadas durante la purificación.

En las estructuras cristalográficas de la ADH IIB⁴⁴ y de la qhEDH⁴³ el dominio del hemo C está separado del dominio del PQQ, aunque ambos grupos prostéticos están lo suficientemente cercanos entre sí para que se efectúe la transferencia de electrones (Fig. 5). La distancia entre el PQQ y el hemo C es alrededor de 15 Å. Los electrones probablemente pasan del PQQ al hemo C a través de aminoácidos conservados entre ambos grupos prostéticos. Hay una secuencia conservada CCDxVNRG (situada entre las hojas β-plegadas W1 y W2), la cual pueda estar involucrada en la transferencia de electrones entre el PQQ y el hemo C.

La transferencia intramolecular de electrones en las ADHs tipo II (*in vivo*) donan los electrones a una proteína redox soluble tal como ocurre en enzimas ADH tipo I y MDH (Fig. 6A). Por ejemplo, la proteína azul de cobre (azurina) aislada de *P. putida* HK5 es un eficiente acceptor de electrones de la ADH IIB, con una constante de primer orden de 50 s⁻¹, determinada (*in vitro*) en análisis cinéticos en estado estacionario a 25°C⁴⁵.

En las ADHs tipo III la transferencia intramolecular de electrones es más complicada porque hay una subunidad adicional con tres hemos C involucrados en el mecanismo de reacción^{18,24}. El primer paso puede involucrar el mismo tipo de transferencia de electrones del PQQ al hemo C en la primera subunidad (quinoproteína), como en el caso de la ADH tipo II. En un segundo paso los electrones pueden ser transferidos a uno de los hemos C de la segunda subunidad y uno de los hemos C de la subunidad II puede estar involucrado en la transferencia de electrones para

reducir a la quinona endógena (Fig. 6B). En estudios cinéticos de la ADH nativa de *G. suboxydans* se reveló que existen cuatro sitios de hemo C que tienen diferentes propiedades de oxidación por el ferricianuro. Al menos uno de los sitios de hemo C en la subunidad II (cII₂ o cII₃) parece no estar involucrado en la transferencia de electrones hacia la quinona endógena (UQ10)¹⁸ como se presenta en la figura 6B.

CONCLUSIONES

Como ya se ha descrito, existen diversas alcohol deshidrogenasas que son capaces de oxidar una gran variedad de alcoholes xenobióticos como alcoholes de cadena larga y alcoholes heterocíclicos, alcoholes aromáticos, entre otros. La biogénesis de estas quinohemoproteínas ADHs puede estar controlada a nivel de expresión, dependiente de los sustratos de crecimiento. Algunas veces su presencia es reemplazada por las ADHs tipo I o las NAD-dependientes. Las alcohol deshidrogenasas pueden contener sólo PQQ o también pueden contener grupos hemo como segundo grupo prostético (quinohemoproteínas); pueden ser monoméricas o multiméricas, libremente solubles en el periplasma o unidas a la membrana; algunas están firmemente asociadas con otros componentes redox. Sus aceptores de electrones pueden ser los citocromos c, proteína azul de cobre o la ubiquinona de membrana. Puede medirse la actividad de estas quinoproteínas usando aceptores fisiológicos de electrones; por ejemplo, citocromos, proteína azul de cobre y análogos solubles de ubiquinona. También pueden utilizarse aceptores artificiales de electrones como metasulfato de fenazina o azul de Wurster (ensayos de diaforasa).

Sin embargo, aún falta mucho por conocer. La obtención de las estructuras cristalográficas de las alcohol deshidrogenasas membranales nos dará más información acerca de sus

interacciones con sus grupos prostéticos y sus sitios de unión con las quinonas endógenas.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Diego González Halphen por las correcciones acertadas a este manuscrito.

REFERENCIAS

- Jornvall, H., Person, B. & Jeffery, J. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **167**: 195-201 (1987).
- Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W. & Osumi, M. Degradation and turnover in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch. Microbiol.* **134(3)**: 193-203 (1983).
- Anthony, C. & Zatman, L.J. The microbial oxidation of methanol: The prosthetic group of alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **304**: 665-674 (1967).
- Duine, J.A. & Jongejan, J.A. Pyrroloquinoline quinone: a novel cofactor. *Vitam Horm.* **45**: 223-262 (1989).
- Houck, D.R., Hanners, J.L. & Unkefer, C.J. Biosynthesis of pyrroloquinoline quinone. Identification of biosynthetic precursors using ¹³C and NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 6920-6921 (1988).
- Houck, D.R., Hanners, J.L. & Unkefer, C.J. Biosynthesis of pyrroloquinoline quinone 2. Biosynthetic assembly from glutamate and tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**: 3162-3166 (1991).
- Meulenberg, J.J., Sellink, E., Riegman, N.H. & Postma, P.Q. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 284-294 (1992).
- Mutzel, A. & Gorisch, H. Quinoprotein ethanol dehydrogenase preparation of the apo-form and reconstitution with pyrroloquinoline quinone and Ca²⁺/Sr²⁺ ions. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1721-1726 (1991).
- Itoh, S., Kawakami, H. & Fukuzumi, A. Modeling of the chemistry of quinoprotein methanol dehydrogenase, oxidation of methanol by calcium complex of coenzyme PQQ via addition-elimination mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 439-440 (1997).
- Duine, J.A. Quinoproteins—enzyme containing the cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan quinone. *Eur. J. Biochem.* **200**, 271-284 (1991).
- Harris, T.K. & Davidson, V.L. Replacement of enzyme-bound calcium with strontium alters the kinetic properties of methanol dehydrogenase. *Biochem. J.* **350**, 917-923 (1994).
- Anthony, C. Principle and applications for quinoproteins, Marcel Dekker, New York. pp 50-68 (1993).
- Gorisch, H. & Rupp, M. Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*. In: PQQ and quinoproteins (Jongejan, J.A. & Duine, J.A. eds.) pp 23-34. Kluwer Academic Publishers, Dordreeth (1989).
- Toyama, H., et al. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenase are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* **177**, 2442-2450 (1995).
- Vangnai, A.S. & Arp, D.J. An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohemoprotein, is involved in the oxidation of butane by "Pseudomonas butanovora". *Microbiology* **147**, 745-756 (2001).
- Tachinaba, S., Kuba, N., Kawai, F., Duine, J. & Yasuda, M. Involvement of a quinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Letters*. **128**, 345-349 (2003).
- Asakura, A. & Hoshino, T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbosone dehydrogenase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 469-478 (1999).
- Shibata, T., et al. Purification and characterization of a quinoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoacetigenes* IFO 14464. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 524-531 (2001).
- Sugisawa, T. & Hoshino, T. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66(1)**, 57-64 (2002).
- Yamanaka, K. & Tsuyuki, Y. Purification and characterization of membrane-bound glycerol dehydrogenase (GLDH) of *Gluconobacter* species. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2173-2183 (1983).
- De Jong, G.A.H., et al. Quinohemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *Eur. J. Biochem.* **230**, 899-905 (1995).
- Shimao, M., Ninomiya, K., Kuno, O., Kato, N. & Sakazawa, C. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(2)**, 268-275 (1986).
- Zarnt, G., Schrader, T. & Andreesen, J.R. Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *J. Bacteriol.* **183(6)**, 1954-1960 (2001).
- Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Ameyama, M. Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* **42(12)**, 2331-2340 (1978).
- Kondo, K., Beppu, T. & Horinouchi, S. Cloning, sequencing, and the characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurians*. *J. Bacteriol.* **177**, 5048-5055 (1995).
- Tayama, H., Fukawa, M., Okumura, H., Kawamuri, Y. & Beppu, T. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 181-185 (1989).
- Matsushita, K., Takahashi, K., Takahashi, M., Ameyama, M. & Adachi, O. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **111(6)**, 739-747 (1992).
- Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H., Shinagawa, E. & Adachi, O. Function of multiple heme C moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* **271**, 4850-4857 (1996).
- Hopper, D.J. & Rogozinski, J. Redox potential of the haem group in the quinocytochrome, luponine hydroxilase, an enzyme located in the periplasm of a *Pseudomonas* sp. *Biochem. Biophys. Acta.* **1383**, 160-164 (1998).
- Adachi, O., et al. Characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 469-478 (1998).

31. Takagi, K., Torimura, M., Kawaguchi, K., Kano, K. & Ikeda, T. Biochemical and electrochemical characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **38**(21), 6935-6942 (1999).
32. Toyama, H., Mathews, F.S., Adachi, O. & Matsushita, K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys.* **428**(1), 10-21 (2004).
33. Amaralunga, K., Goodwing, P.M., O'Connor, D.C. & Anthony, C. The methanol oxidation genes *mxaFJGIR(S)ACKLD* in *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 31-38 (1997).
34. Anthony, C. The bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv Microbial Physiol.* **27**, 113-210 (1986).
35. De Jong, G.A.H., et al. Characterization of the interaction between PQQ and heme C in the quinohemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemistry* **34**, 9451-9458 (1995).
36. Kondo, K. & Horinouchi, S. Characterization of the genes encoding the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1131-1138 (1997).
37. Inoue, T., et al. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **171**, 3115-3122 (1989).
38. Inoue, T., et al. Nucleotide sequence of the gene encoding the 45-kilodalton subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 419-424 (1992).
39. Matsushita, K., Tataki, Y., Shinagawa, E., Ameyama, M. & Adachi, O. Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria-reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependt alcohol dehydrogenase purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 304-310 (1992).
40. Matsushita, K., et al. Soluble and membrane quinoprotein D-glucose dehydrogenase of *Acinetobacter calcoaceticus*: the binding process of PQQ to the apoenzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1548-1555 (1995).
41. Ghosh, M., Anthony, C., Harlo, K., Goodwing, M.G. & Blake, C.C.F. The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. *Structure* **3**, 177-187 (1995).
42. Keitel, T., et al. X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *J Mol Biol.* **297**(4), 961-974 (2000).
43. Oubrie, A., Rozeboom, H., Halk, H. & Huijzinga, G. Crystal structure of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *The Journal of Biological Biochemistry* **277**, 3727-3732 (2002).
44. Xia, Z.X., et al. X-ray structure of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* and molecular modeling of its interactions with cytochrome c-551i. *J Biol Inorg Chem.* **8**(8), 843-854 (2003).
45. Matsushita, K., Yamashita, T., Aoki, N., Toyama, H. & Adachi, O. Electron transfer from quinohemoprotein alcohol dehydrogenase to blue copper protein azurin in the alcohol oxidase respiratory chain of *Pseudomonas putida* HK5. *Biochemistry* **38**, 6111-6118 (1999).