



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

SMb20651 ES UNA PROTEÍNA  
ACARREADORA DE ACILOS DE  
*Sinorhizobium meliloti*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS  
PRESENTA  
ANA LAURA RAMOS VEGA

TUTORA: DRA. ISABEL MARÍA LÓPEZ LARA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **ACADÉMICOS**

-A Isabel López Lara, por todas sus enseñanzas. Por su gran paciencia y sus atinados regaños.

-A Otto Geiger, que con sus comentarios, cuestionamientos y sugerencias, contribuyó en mi fortalecimiento académico. Por todo su apoyo y sus buenos consejos.

-A Federico Sánchez, por su valiosa ayuda, ideas y consejos en los tutorales. Por decirme siempre las cosas claras y directas.

-A Christian Sohlenkamp, por todas sus aportaciones, cuestionamientos e ideas, por ser siempre honesto y además por ser tan buen amigo.

-A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo: Luis Servín, David Romero, Michael Dunn y Guadalupe Espín.

-A todos investigadores del Centro de Ciencias Genómicas que me han ayudado y aportado: David Romero, Susi Brom, Miguel Angel Cevallos, Pablo Vinuesa, Jesús Caballero, Miguel Lara, Esperanza Martínez, Jaime Martínez, Alejandro García, entre otros.

-A todos los integrantes del grupo de Otto-Isabel-Christian, por su ayuda en los seminarios, aportaciones, consejos y apoyo.

-A todos los integrantes del programa de Ecología Genómica.

-Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por los apoyos económicos para asistir a congresos.

-A CONACYT y a la DGEP por las becas otorgadas.

## PERSONALES

- A mi Mamá, por TODO su amor, ayuda , apapachos y enseñanzas.
- A mis hermanas Norma y Antonieta, por crecer conmigo, por su gran compañía.
- A Edgardo, mi mejor amigo y mi compañero de vida.
- A mis Abuelos: Anita, Toño, Manuela y Rubén.
- A mi Papá, por su compañía.
- A todos mis tíos y primos, por compartir tanto conmigo.
- A la familia Sepúlveda: Yoyis, Alfred y Agus y a la familia Ojeda: Claudia, Daniel, Oscar y Regina. Gracias por toda su ayuda, apoyo y cariño.
- A toda la familia Sánchez Hidalgo.
- A Germán, que desde el principio ha sido mi gran amigo, por todas sus terapias, desveladas, por su ayuda y consejos. A Fred por llegar con todo su cariño, por las pláticas, el apoyo y los vinitos con animalitos para celebrar.
- A Azucena, por todos los años, cafecitos, pláticas y sueños compartidos.
- A mis queridísimas niñas: Ari, Mil, Sandra, Lore y Cris, por tantas cosas que vivimos juntas: noches, chelas, fiestas y desveladas. Por escucharme, cuidarme y quererme tanto.
- A David y Susi, que siempre me apoyaron y apapacharon. Por las largas pláticas, los valiosos consejos y las amenas caminatas en el bosque.
- A todos mis amigos y compañeros de la UNAM. Del CCG: Ramón, Mario, Iván (de IBt), Laura, Martha, Diana, Brenda, Alhondra, Sandra, Paco, Nico, Paulina, Miguelito, Lucía, Maritza, Oswaldo, Gaby, Pablo, Agustin, Osam, Ciro, Toño, Aline, Augusto, Emmanuel y Ernesto. De la Fac. de Ciencias: Brian, Ixchel, Ana Elena, Rodrigo, Marysol, Erick y Laura.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>TABLA DE ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
Síntesis de Ácidos Grasos en Bacterias	7
Proteínas Acarreadoras de Ácidos	8
Transferencia de la 4'-fosfopanteteína	9
Reacciones de la Síntesis de Ácidos Grasos	12
ACPs en Otras Vías Metabólicas	23
Proteínas Acarreadoras de Ácidos en la Síntesis de Policétidos y Péptidos no Ribosomales	25
ACPs en Rhizobiales	29
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>37</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>41</b>
Objetivos Particulares	41
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
Ramos-Vega <i>et al.</i>	43
<b>RESULTADOS ADICIONALES</b>	<b>56</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>71</b>

## RESUMEN

Las proteínas acarreadoras de acilo (ACPs) son proteínas pequeñas, ácidas y tienen el grupo prostético de 4'-fosfopanteteína. La 4'-fosfopanteteína es transferida desde la coenzima A por la enzima ACP sintasa (AcpS). Las ACPs portan a los residuos acilo en las reacciones de elongación y transferencia de la síntesis de ácidos grasos. Además, funcionan en la síntesis de metabolitos secundarios como los policétidos o los péptidos no ribosomales y en otras vías biosintéticas. En *E. coli* K12 sólo existe AcpP que es una proteína constitutiva y esencial. Otras bacterias tienen, además de AcpP, otras ACPs especializadas que funcionan en la síntesis de diversas moléculas. En las Rhizobiales, se han descrito a AcpP y otras tres ACPs especializadas: NodF, AcpXL y RkpF. El genoma completo de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* 1021 revela la presencia de dos nuevas ACPs. Una de ellas es SMb20651. El gen *smb20651* se encuentra en plásmido B y forma parte de un operón con los genes *asnB*, *smb20650* y *nadE1*. El gen *asnB* codifica para una propuesta asparagina sintetasa, *smb20650* codifica para una propuesta CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga y *nadE1* codifica para una propuesta NAD sintetasa dependiente de amonio. En este trabajo se presenta la caracterización de la proteína SMb20651. SMb20651, al ser expresada en *E. coli* incorpora a la  $\beta$ -alanina, un bloque biosintético de la 4'-fosfopanteteína. Curiosamente se encontró que para detectar holo-SMb20651 se necesitan copias extras de AcpS, ya sea de *S. meliloti* o *E. coli*. La proteína purificada SMb20651 incorpora *in vitro* a la 4'-fosfopanteteína en presencia de AcpS de *S. meliloti*. Adicionalmente, la holo-SMb20651 es modificada *in vitro* con malonil proveniente de malonil-CoA en presencia de la

enzima malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD). Cuando SMb20651 es coexpresada en *E. coli* con otras proteínas como AcpS de *S. meliloti* y SMb20650 se detectan formas aciladas de SMb20651. En esta bacteria, se han a los ácidos grasos C12:0 y C18:0 asociados a la presencia de acil-SMb20651, lo que sugiere que esta proteína participa en la síntesis o transferencia de ácidos grasos. Se detectó en *S. meliloti* a la proteína SMb20651 como holo-SMb20651 y acil-SMb20651. Este resultado sugiere que en *S. meliloti*, SMb20651 es metabólicamente activa.

## ABSTRACT

Acyl carrier proteins (ACPs) are small acidic proteins that carry growing acyl chains during fatty acid or polyketide synthesis. In rhizobia, there are four different and well-characterized ACPs: AcpP, NodF, AcpXL and RkpF. The genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* 1021 reveals two additional ORFs which possibly code for additional ACPs. One of these, *smb20651*, is located on the plasmid pSymB as part of an operon. The genes of the operon encode a putative asparagine synthetase (AsnB), the predicted ACP (SMb20651), a putative long-chain fatty acyl CoA ligase (SMb20650) and a putative ammonium-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase (NadE1). When SMb20651 was overexpressed in *E. coli*, [<sup>3</sup>H]β-alanine, a biosynthetic building block of 4'-phosphopantetheine, was incorporated into the protein *in vivo*. The purified SMb20651 was modified with 4'-phosphopantetheine in the presence of *S. meliloti* AcpS. Also, holo-SMb20651 was modified *in vitro* with a malonyl group by malonyl CoA-ACP transacylase. In *E. coli*, coexpression of SMb20651 together with other proteins such as holo-ACP synthase and SMb20650 led to the formation of additional forms of SMb20651. In this bacterium, acylation of SMb20651 with 12:0 or 18:0 fatty acids was detected, demonstrating that this protein is involved in fatty acid biosynthesis or transfer. Expression of SMb20651 was detected in *S. meliloti* as holo-SMb20651 and acyl-SMb20651.



## TABLA DE ABREVIATURAS

- Aas**: acyl ACP synthetase (acil ACP sintetasa)
- ACC**: acetyl CoA carboxylase (acetil coenzima A carboxilasa)
- ACP**: acyl carrier protein (proteína acarreadora de acilos).
- AcpS**: acyl carrier protein synthase (ACP sintasa)
- AHLs**: acyl homoserine lactones (acil homoserina lactonas)
- AT**: acyltranserase (aciltransferasa)
- BCCP**: biotin carboxyl carrier protein (biotin carboxil carrier protein)
- CL**: cardiolipin (cardiolipina)
- CoA**: coenzima A
- FAS**: fatty acid synthesis (síntesis de ácidos grasos)
- HlyA**: hemolysin (hemolisina)
- KS**: ketosynthase (cetosintasa)
- KPS**: kapsular polysaccharide (polisacárido capsular)
- LPS**: lipopolysaccaride (lipopolisacárido)
- LTA**: lipoteichoic acid (ácido lipoteicóico)
- MDO**: membrane derived oligosaccharides (oligosacáridos de membrana)
- NRPS**: non ribosomal peptide synthethases (sintetasas de péptidos no ribosomales).
- PC**: phosphatidylcholine (fosfatidilcolina)
- PE**: phosphatidylethanolamine (fosfatidiletanolamina)
- PG**: phosphatidyl glycerol (fosfatidil glicerol)
- PKS**: polyketide synthase (policétido sintasa)
- PPT**: phosphopantetheinyl transferase (fosfopanteteinil transferasa)
- RTX**: repeats of toxins (repeticiones de toxinas)

**-UDP-Glc-Nac:** UDP-N-acetylglucosamine (UDP-N-acetilglucosamina)

**-UDP-2,3,-diacil-GlcN:**UDP-2,3-diacylglucosamine(UDP-2,3-diacilglucosamina)

## INTRODUCCIÓN

### 1. Síntesis de ácidos grasos en bacterias

La síntesis de ácidos grasos es un proceso de vital importancia para la formación de lípidos de membrana y de otras moléculas necesarias para el metabolismo de la bacteria, como señalizadores, lipoproteínas y lípidos de reserva. En esta vía, las cadenas de acilo en crecimiento están activadas como acil-tioéster y unidas a una proteína pequeña llamada proteína acarreadora de acilos (ACP: Acy Carrier Protein). Las ACPs portan a los residuos acilo durante las reacciones catalizadas por las sintasas de ácidos grasos (FAS, del inglés, fatty acid synthase). Existen dos tipos de sintasas de ácidos grasos, las de tipo I y las de tipo II. Las sintasas de tipo I (FAS I) son proteínas multifuncionales con diferentes dominios catalíticos, donde cada dominio lleva a cabo una reacción específica. En este sistema, la ACP es un dominio de una proteína más grande. Las FAS I se encuentran generalmente en hongos y animales, estas proteínas están localizadas en el citosol. En las FAS I, el dominio ACP presenta una gran plasticidad estructural, que le permite la reactividad del acilo que acarrea con los otros dominios de la sintasa de ácidos grasos (Byers y Gong, 2007). El sistema de sintasas de ácidos grasos de tipo II (FAS II o disociadas) consta de proteínas monofuncionales, donde cada proteína lleva a cabo una reacción específica y es sintetizada a partir de un gen independiente (Rock, 2008). Estas proteínas se encuentran en bacterias y en plantas; en estas últimas, la síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en los cloroplastos. Este sistema también se ha encontrado en plástidos de apicomplexos, que son parásitos unicelulares, entre los que se encuentran los causantes de enfermedades como la

malaria, la toxoplasmosis y la criptosporidiosis (Sonda y Hehl, 2006). En los apicomplexos la síntesis de ácidos grasos sucede en un organelo llamado apicoplasto. El apicoplasto es similar a los cloroplastos y se cree que su origen es a partir de algas rojas endosimbiontes (Mazmudar y Striepen, 2008).

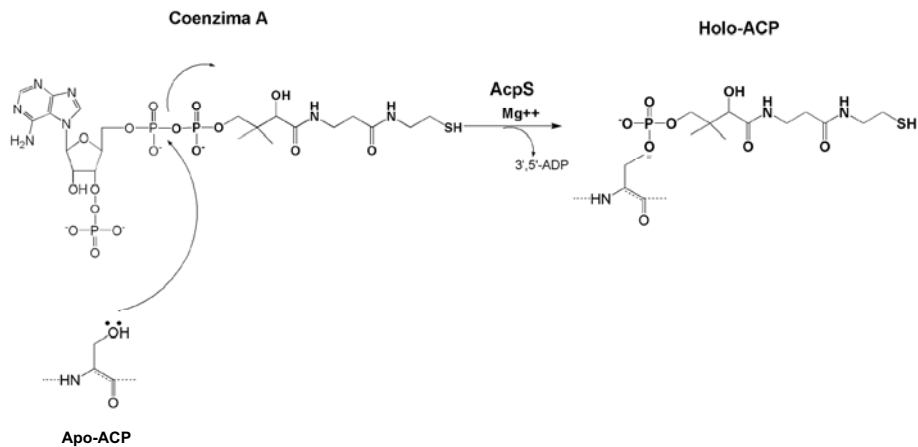
## **2. Proteínas acarreadoras de acilos (Acyl carrier proteins)**

Como ya se mencionó, las ACPs juegan un papel central durante la síntesis de ácidos grasos. Las ACPs pertenecen a una gran familia de proteínas acarreadoras (carrier proteins) que son cofactores indispensables en vías de síntesis de metabolitos, tanto de primarios como secundarios (Byers and Gong, 2007). Las ACPs son proteínas solubles y termoestables que proveen de un ambiente hidrofílico a los ácidos grasos en crecimiento. Las ACPs se caracterizan por ser pequeñas (su tamaño es menor a 100 aminoácidos) y ácidas (su punto isoeléctrico es aproximadamente de 4). Todas las ACPs poseen el grupo prostético de la 4'-fosfopanteteína, al cual se unen todos los residuos intermediarios en crecimiento. El grupo sulfhidrilo de la 4'-fosfopanteteína es el único grupo tiol en la mayoría de las ACPs, la 4'-fosfopanteteína está unida por medio de un enlace fosfodiéster a una serina conservada de las ACPs (Rock, 2008). Se ha hipotetizado que la interacción entre las ACPs con la fosfopanteteinil transferasa (la enzima que transfiere a la 4'-fosfopanteteína) se debe principalmente a interacciones electrostáticas entre la hélice 2 de la ACP con una región hidrofóbica cercana al sitio activo de la enzima (Byers and Gong, 2007). La ACP más estudiada es la AcpP de *Escherichia coli*. Esta proteína tiene 78 aminoácidos (8.86 kDa) y un punto

isoelectrico de 3.98. Funciona durante la síntesis de ácidos grasos generales (C16:0 y C18:0), donde interactúa con todas las enzimas de esta vía excepto la ACC (acetil-CoA-carboxilasa). La AcpP es una proteína muy abundante, en *E. coli* constituye aproximadamente el 0.25% del total de proteínas solubles (Rock, 2008). La AcpP no sólo funciona en la síntesis de ácidos grasos, esta proteína también funciona en otras vías.

### 3. Transferencia de la 4'-fosfopanteteína

Para ser funcionales, las ACPs deben ser modificadas postraduccionalmente desde su forma inactiva (apo-ACP) a su forma activa (holo-ACP) por la transferencia del grupo prostético de 4'-fosfopanteteína (Byers y Gong, 2007) (Fig.1). Este residuo es transferido desde la coenzima A (CoA) a una serina conservada que forma parte de un dominio consenso de las ACPs que es: [DEQGSTALMKRH]-[LIVMFYSTAC]-[GNQ]-[LIVMFYAG]-[DNEKHS]-**S**-[LIVMST]-{PCFY}-[STAGCPQLIVMF]-[LIVMATN]-[DENQGTAKRHLM]-[LIVMWSTA]-[LIVGSTACR]-{LPIY}-{VY}-[LIVMFA] (<http://www.expasy.org/prosite/PDOC00012>). Esta reacción es catalizada por enzimas de la familia de las fosfopanteteinil transferasas (PPT), la 4'-fosfopanteteína queda unida a la ACP a través de un enlace fosfodiéster. Tanto las ACPs como la CoA portan grupos acilo a través de la 4'-fosfopanteteína. En general, los residuos unidos a la CoA están destinados a degradación mientras que los residuos unidos a las ACPs están destinados a síntesis (Geiger y López-Lara, 2002, Byers y Gong, 2007).



**Fig. 1.** Transferencia de la 4'-fosfopanteteína desde la CoA a la ACP. En esta reacción, la 4'-fosfopanteteína es transferida a una serina conservada de las ACPs y es catalizada por la enzima holo-ACP-sintasa (AcpS).

### 3.1. Fosfopanteteinil transferasas

De acuerdo a su identidad en secuencia y su especificidad de sustrato, las fosfopanteteinil transferasas se dividen en dos grupos parálogos. El primer grupo es el de las *acyl carrier protein synthases* (AcpS), éstas reciben su nombre debido a la primer fosfopanteteinil transferasa que fue caracterizada, la enzima AcpS de *E. coli* (Lambalot y Walsh, 1995). La estructura de estas enzimas es en la mayoría de los casos dimérica (en bacterias gram negativas y en bacterias atípicas como *Myxoplasma*), donde cada monómero es de aproximadamente 120 aminoácidos. Sin embargo se ha encontrado que su estructura puede ser trimérica como en el caso de la bacteria gram positiva *Streptococcus pneumoniae* (Mc Allister *et al*, 2006). El rango de sustratos de estas enzimas también varía entre organismos, se ha encontrado que además de reconocer CoA, las AcpSs pueden reconocer CoA acilados; en este último caso, la 4'-fosfopanteteína y el acilo unido a ésta son directamente transferidas a las ACPs (Mootz *et al*, 2001). En dicha reacción, los acil-CoA de cadena larga son preferidos por las bacterias gram positivas y

las bacterias atípicas, mientras que los acil-CoA de cadena corta son los preferentes en las bacterias gram negativas. En cuanto a su especificidad de sustrato por proteínas acarreadoras, estas enzimas reconocen a ACPs que funcionan tanto en la síntesis de ácidos grasos como a la DCP (D-alanyl carrier protein) para la síntesis de ácido lipoteicoico (Mootz *et al*, 2001). Estas vías pertenecen al metabolismo primario y también reconocen a ACPs que participan en vías de metabolismo secundario, por ejemplo, la síntesis de policétidos.

El segundo grupo pertenece a las enzimas de tipo Sfp. Se les ha denominado de esta forma ya que su prototipo es la enzima Sfp, requerida para activar proteínas acarreadoras que forman parte de la vía biosintética para la formación del lipopéptido cíclico surfactina en *Bacillus subtilis* (Quadri *et al*, 1998). Estas enzimas son más grandes que las de tipo AcpS, tienen alrededor de 240 aminoácidos, se asocian usualmente a proteínas que funcionan durante la síntesis de policétidos o péptidos no ribosomales (metabolismo secundario). También incluyen a las fosfopanteteinil transferasas requeridas para la diferenciación a heterocisto en Cianobacterias y para la conjugación de  $\beta$ -alanina (Copp y Neilan, 2006). Una característica de estas proteínas es que tienen un espectro de sustratos aún más amplio que las del tipo AcpS, ya que se ha demostrado que pueden reconocer ACPs para síntesis de ácidos grasos y policétidos como peptidyl carrier proteins (PCPs) para la síntesis de péptidos no ribosomales. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se demostró que Sfp es capaz de modificar a todas sus proteínas acarreadoras, independientemente de la vía metabólica de la que formen parte. Por tal razón se ha propuesto que en este organismo

y otros que presentan más de una PPT, Sfp es capaz de complementar la actividad de AcpS en metabolismo primario (Mootz *et al*, 2001). En *E. coli*, se ha identificado a la proteína EntD, una proteína que funciona durante la síntesis del sideróforo enterobactina, como PPT de tipo Sfp (Lambalot *et al*, 2006).

#### **4. Reacciones de la síntesis de ácidos grasos**

La síntesis de ácidos grasos consta de tres etapas: la de inicio, ciclos de elongación y la de transferencia. En la etapa de inicio se sintetizan los productos malonil-CoA a partir de la acetil-CoA (Fig. 2) y posteriormente, malonil-ACP a partir del malonil-CoA (Fig. 3); estas moléculas funcionarán como unidades de inicio y elongación. Adicionalmente, en esta etapa se presenta la primera reacción de condensación del producto malonil-ACP con acetil-CoA (Fig. 4). El producto de tal reacción es la acetoacetil-ACP que es el sustrato para la siguiente etapa de la síntesis de ácidos grasos, la elongación.

En los ciclos de elongación (Fig. 5), el acil-ACP será sustrato de repetidas reacciones de condensación, reducción, deshidratación y segunda reducción. El producto acil-ACP formado después de la segunda reducción será condensado con malonil-ACP para un nuevo ciclo de elongación de la cadena de acilo. Después de ésta etapa se formarán generalmente, cadenas de acilo de número par.

La tercera etapa es la de transferencia. El producto acil-ACP será sustrato de diferentes acil transferasas para la transferencia del acilo a

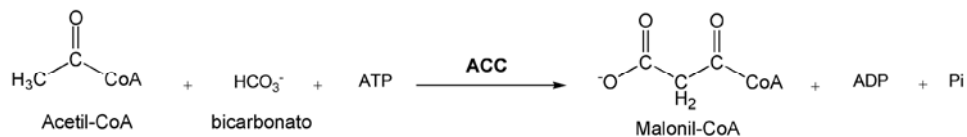


otras vías, por ejemplo, la síntesis de fosfolípidos, lípido A o lipoproteínas. Estas vías se revisarán posteriormente.

#### 4. 1. Reacciones de Inicio

##### 4.1.1. Acetil CoA carboxilasa

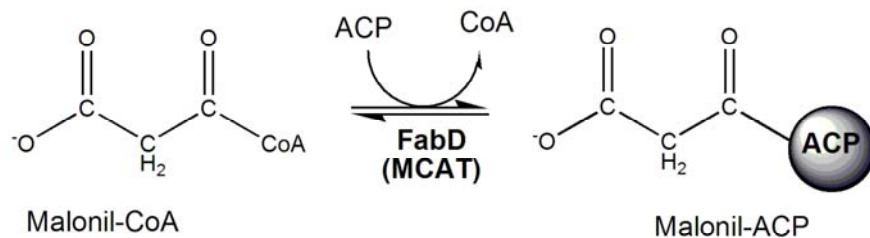
La primera reacción es la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA (Fig. 2) (Cronan y Waldrop, 2002, White *et al*, 2005). Esta reacción es catalizada por la acción coordinada de los productos de cuatro genes: *accA*, *accB*, *accC* y *accD* (que codifican para la acetil CoA carboxilasa, ACC) y sucede en dos etapas. En la primera etapa, la biotina, que se encuentra covalentemente unida a la BCCP (del inglés biotin carboxyl carrier protein, es el producto del gen *accB*) es carboxilada con bicarbonato por la subunidad carboxilasa (el producto del gen *accC*), el producto formado es carboxibiotina. La segunda etapa es la transferencia del grupo carboxil desde la carboxibiotina a la acetil-CoA. Ésta es catalizada por la transcarboxilasa heterodimérica (producto de *accA* y *accD*). El producto formado es malonil-CoA (Fig. 2).



**Fig. 2.** Reacción de inicio en la biosíntesis de ácidos grasos de tipo II. La síntesis de ácidos grasos inicia con la carboxilación del acetil-CoA para la formación del malonil-CoA.

#### 4.1.2. Malonil-CoA-ACP transacilasa

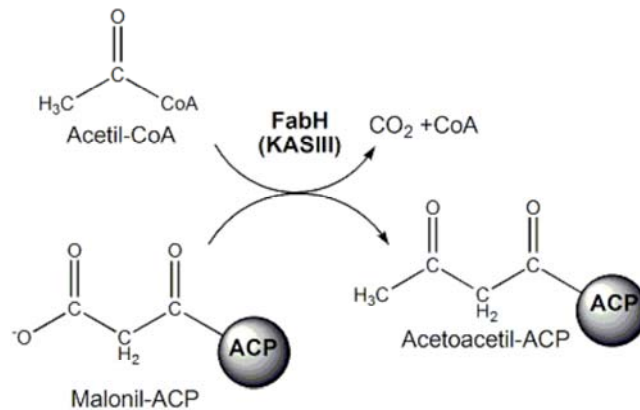
En la segunda reacción el grupo malonato es transferido desde el malonil-CoA a la ACP formando malonil-ACP (Fig. 3). Esta reacción es catalizada por la enzima malonil-CoA-ACP transacilasa que es el producto del gen *fabD*. En dicha reacción, el grupo malonil se transfiere primero a una serina conservada de la FabD, donde el CoA es liberado, posteriormente se une la ACP y el malonil es transferido al SH terminal de la 4'-fosfopanteteína (Florova *et al*, 2002). Esta reacción sucede tanto en la síntesis de ácidos grasos como en la síntesis de policétidos (Florova *et al*, 2002). Sin embargo, se ha encontrado que FabD en la síntesis de ácidos grasos, reconoce específicamente el malonil-CoA mientras que análogos de FabD durante la síntesis de policétidos, reconocen no solamente al malonil-CoA, sino que también pueden reconocer otros substratos, como metilmalonil-CoA, hidroximalonil-CoA o aminomalonil-CoA (Chan *et al*, 2006, Rock, 2008).



**Fig. 3.** Transferencia del grupo malonil desde el malonil-CoA a la ACP. Esta reacción es catalizada por la enzima malonil-CoA-ACP-transacilasa (FabD). El producto formado es el malonil-ACP.

#### 4.1.3. Condensación de inicio. 3-oxoacil ACP sintasa III (FabH)

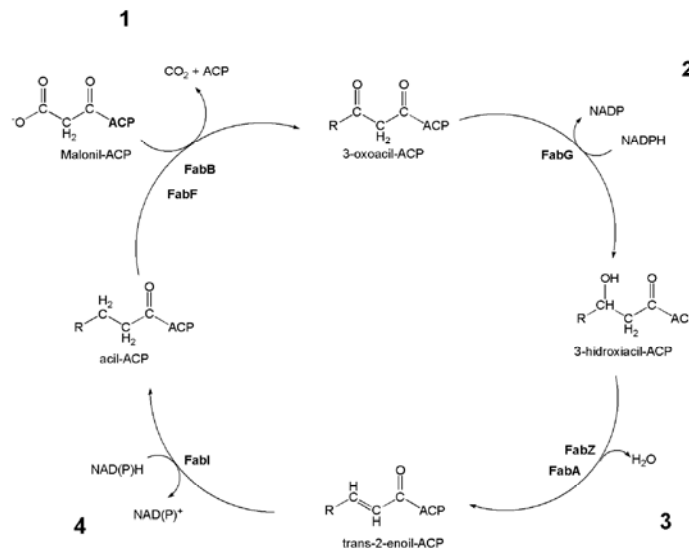
La tercera reacción es la condensación descarboxilativa del malonil-ACP con acetil-CoA. Esta reacción es catalizada por la enzima FabH (3-oxoacil-ACP sintasa III) (Fig. 4) y el producto formado es acetoacetyl-ACP. La FabH de *E. coli* es altamente selectiva por acetyl CoA, sin embargo, la FabH de otras bacterias como *Bacillus subtilis* prefiere acil CoA ramificados que son normalmente derivados del metabolismo de aminoácidos. Otras bacterias como *Mycobacterium* prefieren a acil-CoAs de cadena larga (White *et al*, 2005). Experimentos *in vivo* e *in vitro* con FabH de *Streptomyces glauscescens* han demostrado que esta 3-oxoacil-ACP sintasa tiene afinidad sólo por las ACPs para la síntesis de ácidos grasos y no por las ACPs para la síntesis de policétidos (Florova *et al*, 2002).



**Fig. 4.** Condensación descarboxilativa del malonil-ACP con acetyl-CoA. Esta reacción es catalizada por la enzima 3-oxoacil-ACP-sintasa III (FabH). El producto formado es acetoacetyl-ACP.

## 4. 2. Ciclos de elongación

Como ya se explicó anteriormente, el producto acetil-ACP será el sustrato para los ciclos de elongación. Las reacciones durante los ciclos de elongación son: condensación, primera reducción, deshidratación y segunda reducción (Fig. 5). El producto formado acil-ACP será sustrato para la condensación con malonil-ACP catalizada por la enzima FabB ó FabF.



**Fig. 5.** Ciclos de elongación. En estos ciclos, las reacciones son: condensación (1), catalizada por las enzimas FabB o FabF, primera reducción (2), catalizada por la enzima FabG, deshidratación (3), catalizada por las enzimas FabA o FabZ y segunda reducción (4), catalizada por la enzima FabI. El producto acilo reducido será condensado con malonil-ACP para la elongación de la cadena (1), esta reacción será catalizada por las enzimas FabB o FabF.

### 4.2.1. Condensación

En esta reacción, el acil-ACP es condensado con malonil-ACP para la elongación de la cadena (Fig. 5, apartado 1). Esta reacción está catalizada por las enzimas FabB o FabF y sucede en dos pasos. En el primero, el grupo acilo es unido a la cisteína del sitio activo de la enzima formándose el intermediario acil-enzima. En el segundo, el intermediario acil-enzima es

condensado con el malonil para la formación del 3-oxoacil-ACP,  $\text{HCO}_3^-$  y enzima libre (Rock, 2008).

#### **4.2.2. Primera reducción**

En esta reacción, el producto 3-oxoacil-ACP es sustrato de la enzima FabG (3-oxoacil-ACP reductasa). Esta enzima es esencial y funciona con el cofactor NADPH. FabG cataliza la reducción del grupo carbonilo en la posición C3 a un hidroxilo por la adición de dos átomos de hidrógeno. El producto formado es 3-hidroxiacil-ACP (Fig. 5, apartado 2).

Las enzimas reductasas son enzimas tetraméricas que forman parte de la superfamilia dehidrogenasa/reductasa de acilos de cadena corta (SDR, del inglés short chain D-R superfamily) (White *et al*, 2005).

#### **4.2.3. Deshidratación. Hidroxiacil-ACP-dehidratasa**

Existen dos enzimas que pueden llevar a cabo la reacción de deshidratación: FabA y FabZ. En la reacción de deshidratación se convierte el 3-hidroxi-acil-ACP a trans-2-enoil-ACP (Fig. 5, apartado 3). La dehidratasa FabA tiene una distribución limitada en las bacterias, presentándose sólo en bacterias gram negativas que producen ácidos grasos insaturados. FabA tiene actividad tanto de dehidratasa como de isomerasa y se encuentra siempre asociada a FabB (Rock, 2008; White *et al*, 2005). La reacción de isomerasa que cataliza FabA es la conversión de trans-2 a cis-3 decenoil-ACP y es esencial para la formación de ácidos grasos insaturados. Se ha encontrado que FabA procesa más eficientemente ácidos grasos de 10 carbonos. Tal especificidad se debe a la presencia de una histidina conservada, que forma parte de un túnel

estructural que actúa como “regla molecular” que discrimina a ácidos grasos de otras longitudes (White *et al*, 2005; Rock, 2008).

La segunda dehidratasa, FabZ, se encuentra en casi todas las bacterias, esta enzima carece de actividad de isomerasa. FabZ funciona tanto en la síntesis de ácidos grasos saturados como insaturados, y reconoce como substratos a acilos de diferentes longitudes (White *et al*, 2005). Entre FabA y FabZ existe muy poca semejanza (28% de identidad, 50% de similitud). Curiosamente, se ha encontrado que algunas bacterias gram positivas carecen de FabA y sin embargo tienen ácidos grasos insaturados. En estas bacterias, la enzima que substituye a FabA en sus actividades de isomerasa y reductasa es una enzima más parecida a FabZ (Rock, 2008).

#### **4.2.4. Segunda reducción**

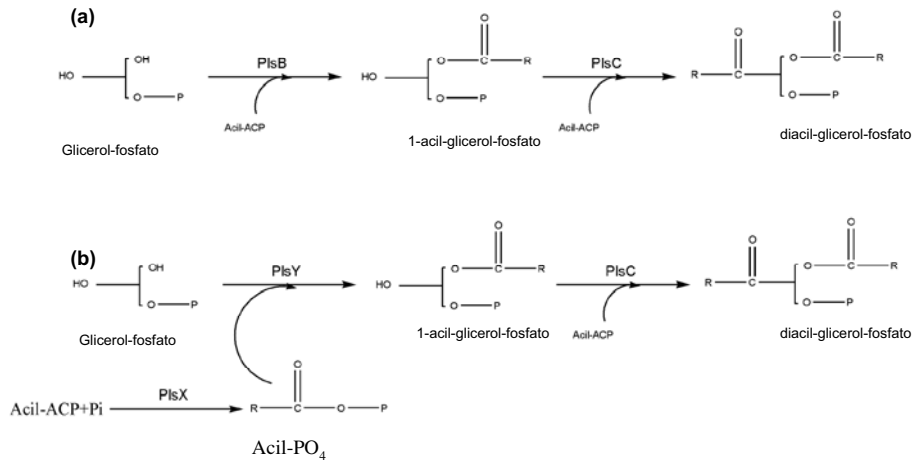
La segunda reducción es catalizada por la enzima FabI (enoil-ACP-reductasa) (Fig. 5, apartado 4). Ésta enzima utiliza como cofactor el NADH o el NADPH y reduce el doble enlace entre el C2 y C3 generado durante la reacción de deshidratación. El producto formado acil-ACP será sustrato para un nuevo ciclo de elongación (White *et al*, 2005). FabI ha sido ampliamente estudiada debido a que es blanco de muchos agentes terapéuticos, como la isoniazida y el triclosan. Adicionalmente, FabI es regulador de la tasa de elongación de ácidos grasos (Rock, 2008).

#### **4.3. Reacciones de transferencia**

En las reacciones de transferencia, las acil-ACPs formadas durante la síntesis de ácidos grasos son sustratos de otras enzimas, en su mayoría acil

transferasas que forman parte de diferentes vías metabólicas (Byers y Gong, 2007). Por ejemplo, la síntesis de fosfolípidos de membrana, de lípido A, *N*-acil-homoserina lactonas, durante el reciclaje de la PE o la síntesis de lípido de ornitina.

Las acil-ACPs, producto de la vía de síntesis de ácidos grasos, son transferidos a fosfolípidos de membrana. En esta vía, las acil-ACPs son sustrato de la acil transferasa PlsB, que transfiere el grupo acilo a la posición sn-1 del glicerol fosfato (Fig. 6a) formando 1-acil-glicerol-fosfato. Sin embargo, esta enzima sólo se encuentra en bacterias gram negativas. En Gram positivas, en lugar de PlsB, se encuentra el sistema PlsX/PlsY (Paoletti *et al*, 2008; Zhang y Rock, 2008). PlsX cataliza la formación de acil fosfato (acil-PO<sub>4</sub>), usando acil-ACP como sustrato. Después, PlsY cataliza la acilación en la posición sn-1 del glicerol fosfato para la formación de 1-acil-glicerol-fosfato. Posteriormente, en ambos sistemas, la enzima PlsC esterifica la posición sn-2 del acil-glicerol-fosfato (Fig. 6). PlsC es una enzima que se encuentra en todas las bacterias y se ha demostrado que en *E. coli* puede usar como sustratos tanto a acil-ACP como acil-CoA. Sin embargo en bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, sólo usa acil-ACP. PlsB tiene preferencia por ácidos grasos saturados mientras que PlsC tiene preferencia por ácidos grasos insaturados (Rock, 2008).



**Fig. 6.** Transferencia de ácidos grasos a los lípidos de membrana. Existen dos sistemas, en el primero, PlsB transfiere al acilo desde acil-ACP a la posición sn-1 del glicerol fosfato, formando 1-acil-glicerol-fosfato **(a)**. En el segundo sistema no existe PlsB, en su lugar PlsX cataliza la formación de acil-fosfato desde acil-ACP y después PlsY transfiere el grupo acilo desde acil-fosfato al sn-1 del glicerol fosfato, formando 1-cil-glicerol-fosfato **(b)**. Posteriormente en ambos sistemas, la enzima PlsC esterifica la posición sn-2 del acil-glicerol-fosfato.

En la síntesis del lípido A también se requiere de acil-ACPs como substratos. En esta vía, existen cuatro acil transferasas dependientes de ACPs: LpxA, LpxD, LpxM y LpxL. LpxA cataliza la primera reacción en la síntesis de lípido A, que es la acilación del sacárido UDP-GlcNAc: para éste paso en *E. coli* se requiere específicamente de la R-3-hidroximiristoil-ACP como substrato donador. Después de un paso de desacetilación catalizado por LpxC, LpxD cataliza la acilación con una segunda cadena de R-3-hidroximiristato. En este paso se forma la UDP-2,3-diacil-GlcN. LpxL y LpxM catalizan la adición de residuos secundarios de lauroil y miristoil a la unidad distal de glucosamina (Raetz *et al*, 2007).

Las acil-ACPs también funcionan durante la síntesis de *N*-acilhomoserinalactonas (AHLs, del inglés *N*-acylhomoserine lactones) que en bacterias gram negativas son moléculas señalizadoras responsables del fenómeno de quorum sensing. El quorum sensing es un comportamiento



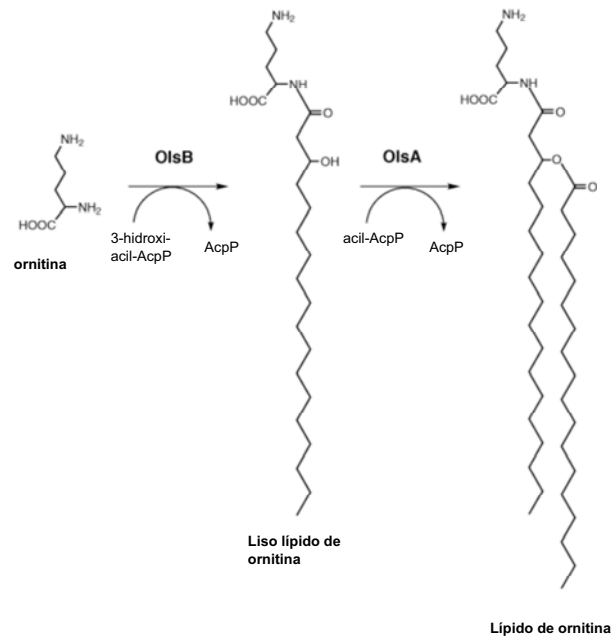
derivado de la habilidad de los microorganismos de percibir y responder a la densidad poblacional (Fuqua *et al*, 2001). Las bacterias producen las *N*-acil-homoserina lactonas que se acumulan en el ambiente externo y actúan como autoinductores, desencadenando una cascada de señales. La vía para la síntesis de estas moléculas se caracterizó inicialmente en la bacteria *Vibrio harveyi* donde las AHLs funcionan para la inducción de la bioluminiscencia. En esta vía, LuxR es un activador transcripcional que se une al autoinductor y promueve la transcripción del operón de la luciferasa. LuxI, es una de las proteínas que se transcriben y cataliza la unión del grupo acilo desde una acil-ACP a la S-adenosil-metionina. Posteriormente la metionina es lactonizada. En la bacteria *Vibrio fischeri* se ha encontrado que no es LuxI, más bien AinS la que funciona como aciltransferasa. AinS además de usar acil-ACP como sustrato puede usar acil-CoA pero con menos eficiencia (Byers y Gong, 2007, Fuqua y Greenberg, 2002).

La enzima Aas tiene las actividades de Acil-ACP-sintasa y 2-acil-glicerol-fosfatidiletanolamina aciltransferasa. Esta enzima incorpora ácidos grasos exógenos a fosfolípidos para la regeneración de la PE desde el 2-acil-glicerol-PE para el reciclaje de fosfolípidos (Jackowski *et al*, 1994). Esta enzima esterifica la posición 1 del 2-acil-glicerol-PE utilizando como sustrato la acil-ACP.

En condiciones de bajo fosfato, los fosfolípidos de membrana pueden ser reemplazados por lípidos que no contienen fósforo. Por ejemplo, en *S. meliloti* se han encontrado los lípidos sulfoquinovosil-diacil-glicerol, diacil-gliceril-trimetil-homoserina y lípido de ornitina (Geiger *et al*, 1999). El lípido de ornitina se ha detectado exclusivamente en las bacterias, se encuentra

anclado a la membrana externa y tiene interesantes actividades biológicas. Se ha encontrado que puede inducir la mitogenicidad en células B, así como la estimulación de macrófagos para la generación de interleucina E1 y prostaglandina E2. Este lípido funciona como coadyuvante, se ha observado que como el lípido A puede inducir respuesta inmune en células hospederas, sin embargo el lípido de ornitina no es tóxico. Al aplicarse en ratones antes que el lípido A, puede reducir el efecto tóxico de este último, ya que probablemente el lípido de ornitina tiene el mismo blanco que el lípido A en las células hospederas (Gao *et al*, 2004).

El lípido de ornitina contiene un 3-hidroxiácido graso amidificado, esterificado a través de su OH con otro residuo de ácido graso. La síntesis del lípido de ornitina sucede en dos pasos (Fig. 7). En el primero la aciltransferasa OlsB acila a la ornitina usando hidroxil-acil-AcpP como sustrato; los productos de esta reacción son lisólípido de ornitina y holo-AcpP. En el siguiente paso, una segunda aciltransferasa, OlsA, acila al lisólípido de ornitina a través del residuo OH del ácido graso. Esta enzima usa a acil-AcpP como sustrato y los productos formados son lípido de ornitina y holo-AcpP (Gao *et al*, 2004).



**Fig. 7.** Síntesis del lípido de ornitina. La acil transferasa OlsB acila a la ornitina usando acil-AcpP como sustrato y formando lisolípido de ornitina. Posteriormente, OlsA acila al lisolípido de ornitina en el residuo OH de su ácido graso, usando como sustrato acil-AcpP y formando lípido de ornitina.

## 5. ACPs en otras vías metabólicas.

Los oligosacáridos derivados de membrana (MDO) son glucanos solubles que se encuentran en el espacio periplásmico de *E. coli* y facilitan su mantenimiento en equilibrio osmótico en ambientes de baja osmolaridad. Para su síntesis es necesaria la AcpP, aunque su función aún no es del todo clara. La AcpP es necesaria como cofactor de la glucosil-transferasa MdoH (Therisod *et al*, 1986). Curiosamente se ha encontrado que en esta vía no es necesario que AcpP esté modificado con la 4'-fosfopanteteína (Therisod y Kennedy, 1987).

La *E. coli* enteropatogénica al colonizar a su huésped secreta una proteína tóxica llamada hemolisina. La hemolisina forma poros en las membranas de las células del sistema inmune del huésped. Esta toxina

pertenece a la familia de toxinas-RTX (repeats of toxins), que se caracterizan por la presencia de una secuencia de 9 aminoácidos rica en aspartato y glicina y que está involucrada en la unión dependiente de calcio de la toxina a los eritrocitos (Trent *et al*, 1998). La hemolisina es sintetizada como prohemolisina no tóxica (proHlyA). Para ser activa, necesita de la transferencia de un grupo acilo desde acil-AcpP como donador para la formación de HlyA (Issartel *et al*, 1991). Esta actividad es catalizada por la enzima HlyC, que unirá el ácido graso a la proteína a través de un enlace amido. Posteriormente, la HlyA es secretada por la acción de las proteínas HlyB y HlyD (Hardie *et al*, 1991).

La superficie de las bacterias Gram positivas está compuesta por una membrana interna y por una pared celular en su superficie. Éstas a su vez, están compuestas por diferentes estructuras, por ejemplo los glicopolímeros, entre los que se encuentran los ácidos teicóicos de pared celular y el ácido lipoteicóico (LTA). Estas estructuras pueden presentar diferentes modificaciones que permiten su adaptación a condiciones de estrés. Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus* la modificación del ácido lipoteicóico con D-alanina le permite a la bacteria defenderse de péptidos antimicrobianos producidos por las células del huésped (Weidenmaier y Peschel, 2008). La D-alanilación es una modificación que permite a los organismos modular la carga de las membranas, regular la unión de ligandos y el control de las propiedades estereoquímicas de la pared celular. Para la síntesis del D-alanil-ácido-lipoteicóico es necesaria la presencia de los genes *dltA*, *dltC*, *dltB* y *dltD*. Los genes *dltA* y *dltC* son necesarios para la síntesis de la D-alanil carrier protein ligasa (Dcl) y la D-alanil carrier protein (Dcp) respectivamente.

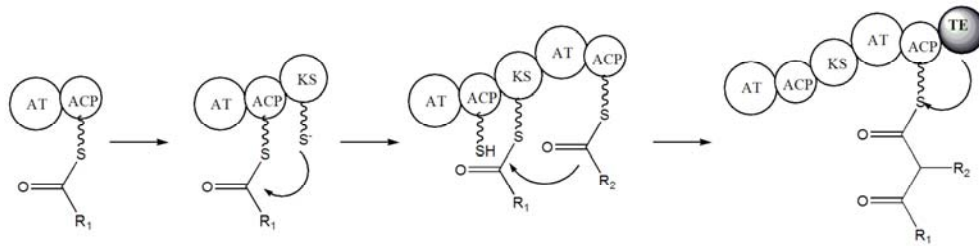
Adicionalmente los genes *dltB* y *dltD* codifican para una proteína transportadora y una proteína que facilita la unión entre la Dcp y Dcl (Kiriukhin y Neuhaus, 2001). La Dcp es una proteína de 81 aminoácidos que como las ACPs necesita ser modificada con la 4'-fosfopanteteína para ser activa. La D-alanina es activada como D-alanil-AMP por la enzima Dcl y posteriormente transferida a la holo-Dcp (Neuhaus y Baddiley, 2003). La Dcp, además de acarrear a la D-alanina es necesaria para su translocación al LTA (Kiriukhin y Neuhaus, 2001).

## **6. Proteínas acarreadoras en la síntesis de policétidos y péptidos no ribosomales**

Se ha encontrado una correlación entre el número de ACPs en el genoma de una bacteria con respecto a su diversidad metabólica. *E. coli* K12, sólo tiene a AcpP que funciona en la síntesis de ácidos grasos generales. Mientras que las bacterias con mayor diversidad metabólica, como el caso de *Streptomyces*, generalmente tienen diferentes ACPs. Estas ACPs, además de poderse encontrar en vías metabólicas como las ya descritas, se pueden encontrar asociadas a la síntesis de policétidos (polyketides, PK) y péptidos no ribosomales (non ribosomal peptides, NRP). Estos productos son de gran importancia comercial, ya que tienen actividad biológica como antibióticos, inmunosupresores, antitumorales, etc., por lo que de estos se ha obtenido una cantidad importante de drogas como la eritromicina o tetraciclina (ejemplos de policétidos) y antibióticos de las familias de las penicilinas o cefalosporinas (ejemplos de péptidos no ribosomales).

Los policétidos son metabolitos secundarios sintetizados por bacterias, hongos, algunas plantas y animales como artrópodos, moluscos o esponjas

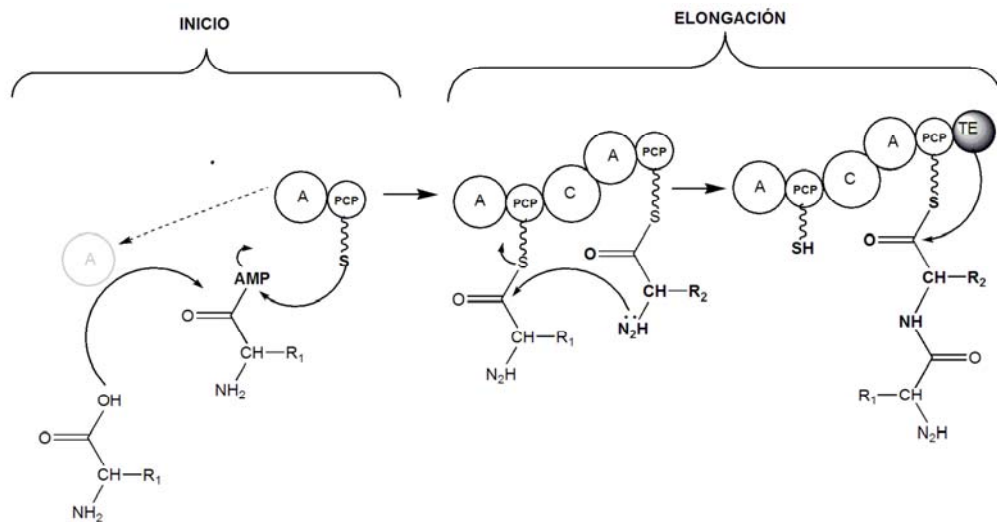
(Gokhale *et al*, 2007). En su síntesis intervienen enzimas denominadas policétido sintasas (PKSs) que son sistemas análogos a las sintasas de ácidos grasos. Al igual que las sintasas de ácidos grasos, las policétido sintasas pueden ser de tipo I (multifuncionales) o de tipo II (monofuncionales). Otro tipo de PKSs pertenece a las policétido sintasas de tipo III que son proteínas homodiméricas simples que sintetizan policétidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias (Austin y Noel, 2003, Miyanga *et al*, 2007). Las policétido sintasas consisten de tres unidades básicas (Fig. 8), una acil transferasa (AT), que se encarga de activar el producto de inicio o elongación, una ACP y una cetosintasa (del inglés KS), que es la que cataliza la condensación decarboxilativa entre un acil ACP que será la unidad de elongación y otro grupo acilo ya unido a la PKS. Adicionalmente se pueden encontrar otras actividades enzimáticas como cetoreductasa (del inglés KR), dehidratasa (DH) y enoil reductasa (ER). Interesantemente, estas proteínas, a diferencia de las sintasas de ácidos grasos, usan como unidades de inicio y elongación, no sólo al malonil-CoA, también a otras moléculas como metilmalonil-CoA, hidroximalonil-CoA, aminomalónil-CoA, propionil-CoA o benzoil-CoA (Chan *et al*, 2006, Fischbach y Walsh, 2006). Como en el caso de las sintasas de ácidos grasos, la unidad de carga es transferida a una proteína acarreadora de acilos (Fig. 8).



**Fig. 8.** Esquema que representa algunos pasos de la síntesis de policétidos. La ACP portará tanto a las cadenas en crecimiento como a las unidades de elongación durante la síntesis de policétidos. La acil transferasa (AT) acila a la ACP. Durante la condensación, la cetosintasa (KS) ataca nucleofílicamente por medio de una serina conservada al acil-ACP, formándose el intermediario acil-KS. Posteriormente sucede la condensación decarboxilativa entre el acilo unido a la KS la unidad de elongación unida a la ACP. Las policétido sintetas pueden presentar otros dominios, por ejemplo de reducción, deshidratación, ciclización, etc. El producto final es liberado por la enzima tioesterasa (TE) que rompe el enlace tioéster entre el cétido y la ACP.

Las sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPSs) son proteínas que participan en la síntesis de productos ensamblados a partir de aminoácidos. Estas sintetetas funcionan con la misma lógica que las policétido sintetas. Las sintetetas básicas consisten en un dominio de adenilación, una proteína acarreadora de péptidos (del inglés *peptidyl carrier protein*, PCP, que es análoga a las ACPs) y uno de condensación. En este sistema, como en el de las PKSs, las unidades monoméricas son incorporadas en un oligómero lineal por reacciones químicas iterativas (Fig. 9). Los monómeros que serán incorporados para el caso de las sintetetas de péptidos no ribosomales son aminoácidos. En esta vía, además de poderse incorporar los 20 aminoácidos proteínogénicos, se pueden incorporar toda una variedad de aminoácidos no proteínogénicos y aril-ácidos (Walsh, 2003). Antes de ser incorporados, los aminoácidos son activados por el dominio de adenilación como aminoacil-AMP y posteriormente son unidos al tioéster de la holo-PCP. El dominio de condensación catalizará la formación de un enlace peptídico entre el péptido unido al peptidil-PCP donador y la unidad de

elongación. Adicionalmente, se han encontrado sistemas híbridos de policétido sintetas-sintetas de péptidos no ribosomales (PKSs-NRPSs). Existe gran interés tanto en la estructura como en la función de las proteínas de éstos sistemas, ya que éstas pueden ser manipuladas y combinadas para la formación de productos diseñados.



**Fig. 9.** Síntesis de péptidos no ribosomales. Esquema que representa a las líneas de ensamblaje básicas para la síntesis de péptidos no ribosomales. Durante la reacción de inicio, el dominio de adenilación (A) activa al péptido que servirá como unidad de carga como aminoacil-AMP para posteriormente ligarlo a la proteína acarreadora de péptidos (PCP) para la formación de aminoacil-PCP. Durante la condensación, el residuo aminoacil unido a la PCP río abajo, ataca nucleofílicamente al residuo aminoacil unido a la PCP río arriba para la formación de un enlace amido catalizado por el dominio de condensación (C). Las peptido sintetas también pueden tener dominios de epimerización, reducción, metilación, deshidratación, etc. El producto formado es liberado por la Tioesterasa (TE), que rompe el enlace tioéster entre el péptido y la PCP.



## 7. ACPs en Rhizobiales

El nitrógeno, a pesar de ser muy abundante en la atmósfera, no puede ser asimilado por las plantas en su forma elemental. La fijación biológica del nitrógeno es el proceso mediante el cual los microorganismos que poseen la enzima nitrogenasa, convierten el nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado. Las Rhizobiales son bacterias que interactúan con las plantas leguminosas e inducen en sus raíces la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, dentro de los cuáles el nitrógeno es asimilado por las plantas y es convertido a amonio. Las Rhizobiales son  $\alpha$ -proteobacterias y comprenden a los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Interesantemente se ha encontrado que las  $\beta$ -proteobacterias del género *Burkholderia* también fijan nitrógeno en plantas leguminosas, así como la actinobacteria *Frankia*, que fija nitrógeno en plantas actinorrícicas.

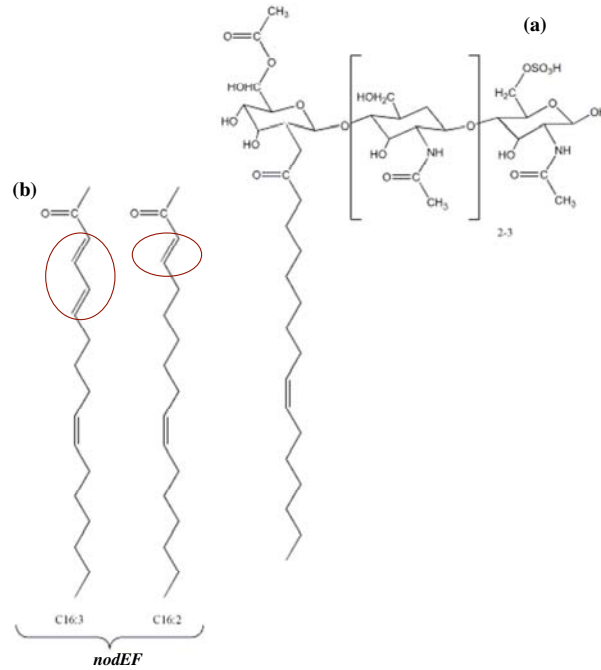
El proceso de nodulación inicia con el reconocimiento por parte de la planta y de la bacteria y la adhesión de las bacterias a los pelos radicales de la planta. Los pelos radicales son invadidos e inicia la formación del hilo de infección. Los hilos de infección son túbulos llenos de bacterias que penetran el tejido cortical de la planta y liberan a las bacterias a sus células blanco. En el cortex, las bacterias son internalizadas en compartimentos que maduran en estructuras llamadas simbiosomas. En los simbiosomas, las bacterias internalizadas se diferencian en bacteroides. Éstos a su vez, se encuentran rodeados por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. Los bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico a amonio (Jones *et al*, 2007, López-Lara *et al*, 2005).

Durante la colonización de la bacteria a la planta, se induce una serie de mecanismos complejos de intercambio de señales. Para este intercambio de señales, la bacteria cuenta con estructuras especializadas que se encuentran en su superficie; por ejemplo, los factores de nodulación, lipopolisacáridos, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares. Durante la síntesis de estas moléculas participan diferentes ACPs. En las Rhizobiales, además de AcpP, se han caracterizado tres proteínas especializadas: NodF, AcpXL y RkpF. A continuación se explicará con más detalle la función de estas proteínas.

### 7.1. NodF

Durante la colonización de las Rhizobiales a la planta, la planta exuda compuestos aromáticos llamados como flavonoides. Estos compuestos al unirse a la proteína reguladora NodD inducen en Rhizobiales la transcripción de los genes *nod*. Estos genes codifican para proteínas destinadas a la síntesis de factores de nodulación (Wang *et al*, 2004, Jones *et al*, 2007). En ésta vía, las proteínas NodABC están involucradas en la síntesis del lipoquitinolisacárido básico (Fig. 10a), donde NodC se encarga de la oligomerización de residuos de *N*-acetilglucosamina, NodB de la *N*-deacetilación del oligosacárido formado en la unidad de *N*-acetilglucosamina del extremo no reductor y NodA que se encarga de la transferencia de un residuo acilo al amino libre del oligosacárido. En esta vía existen además genes específicos como *nodE* y *nodF*, esenciales para la síntesis de ácidos grasos  $\alpha\beta$ -insaturados que serán incorporados a los factores de nodulación (Geiger y López-Lara, 2002) (Fig. 10b). Se ha descrito que estas

insaturaciones son específicas de bacterias que nodulan al grupo Galegoide de leguminosas (Debellé *et al*, 2001). Actualmente, la función de estas insaturaciones en la especificidad de hospedero aún no es clara.



**Fig. 10.** Factores de nodulación en *Sinorhizobium meliloti*. (a) Lipoquitin oligosacárido básico. (b) ácidos grasos poliinsaturados. Para la síntesis de C16:3 y C16:2 se requieren a las proteínas NodE y NodF. Las insaturaciones específicas están rodeadas por un óvalo.

NodF es una ACP (Geiger *et al*, 1991). Esta proteína funciona durante la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados y su transferencia a los factores de nodulación (Demont *et al*, 1993). Mutantes de *S. meliloti* en *nodF*, aún son capaces de inducir encorvamiento de los pelos radiculares y producen un número muy bajo de hilos de infección. Sin embargo estos crecen como ramificaciones en el cortex radicular y son capaces de formar nódulos que fijan nitrógeno. Estas mutantes también producen menos nódulos que la cepa silvestre (Ardourel *et al*, 1994). NodF funciona en conjunción con la proteína NodE. NodE es homóloga a 3-oxoacil-sintasas y también es esencial para la

síntesis de ácidos grasos  $\alpha\beta$ -insaturados. NodE adicionalmente es un factor determinante de la longitud y el nivel de insaturación de la cadena (Geiger y López-Lara, 2002).

## **7.2. AcpP**

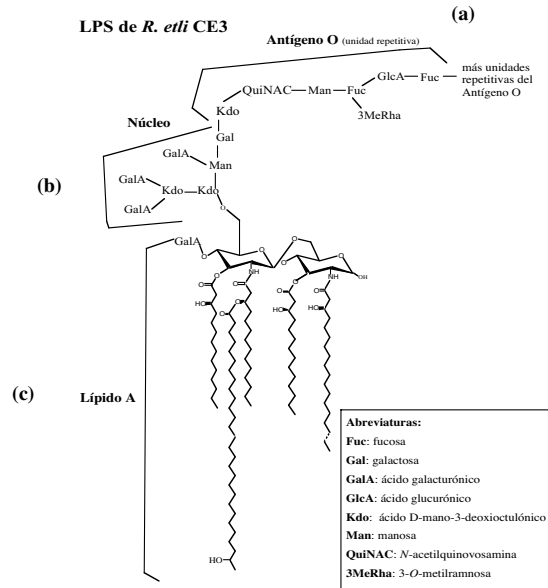
La AcpP es una proteína constitutiva y esencial que funciona durante la síntesis de ácidos grasos generales (Fig. 2, Fig. 5). En *S. meliloti* la proteína equivalente a AcpP de *E. coli* se encuentra codificada en cromosoma (SMc00573) formando parte de un grupo de genes que codifican para proteínas necesarias en la síntesis de ácidos grasos, tales como FabG, FabD y FabF. AcpP ha sido caracterizada tanto en *S. meliloti* 1021 (Platt *et al*, 1990) como en *R. leguminosarum* (López-Lara y Geiger, 2000). Estas proteínas presentan un alto porcentaje de identidad (59%) con la AcpP de *E. coli*.

## **7.3. AcpXL**

Esta ACP fue descrita por Brozek *et al* (1996), quienes encontraron que acarrea un ácido graso extralargo, el 27-hidroxi octacosanoico que es transferido al lípido A durante la síntesis de lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos (LPSs) son el componente primario de la cara externa de la membrana de bacterias gram negativas. Están compuestos por tres partes: un polisacárido distal o antígeno-O (Fig. 11a), un núcleo de oligosacáridos (Fig. 11b) y un dominio hidrofóbico que es el lípido A (Fig. 11c) (Raetz y Whitfield, 2002). El lípido A de las *Rhizobia* presenta variaciones

estructurales con respecto al de *E. coli*: algunas carecen de los grupos fosfato en las posiciones 1' y 4', en su lugar está modificado en su extremo proximal con aminogluconato y además con 3-hidroxi butirato y ácido 4'-galacturónico. La acilación en la posición 2' con ácido 27-hidroxi octacosanoico (27OHC28:0) es otra de las modificaciones específicas que se encuentran en Rhizobia (Raetz y Whitfield, 2002, Brozek *et al*, 1996). Este ácido graso extralargo también se encuentra en el lípido A de bacterias patógenas como *Brucella abortus*, *Bartonella henselae* y *Legionella pneumophila* (Manterola *et al*, 2005, Vedam *et al*, 2003). El ácido 27OHC28:0 es transferido por la enzima LpxXL y tanto en su biosíntesis como en su transferencia al lípido A es portado por AcpXL. La función del ácido 27OHC28:0 y de AcpXL durante la simbiosis de Rhizobia con la planta aún no es clara. Se ha discutido que el ácido graso extralargo es necesario para incrementar la estabilidad de la membrana durante la colonización de las bacterias a su huésped (Vedam *et al*, 2006). Actualmente se han descrito mutantes en AcpXL de *Rhizobium leguminosarum* (Vedam *et al*, 2003) y en *Sinorhizobium meliloti* (Sharypova *et al*, 2003). La mutante de *R. leguminosarum*, además de carecer del ácido 27OHC28:0 en sus membranas, es sensible a las condiciones típicas del nódulo, como cambios de osmolaridad (no crece con concentraciones de NaCl de 0.5%) y acidez (pH 5.0). Sin embargo, el fenotipo en nodulación no es tan evidente ya que las bacterias, a pesar de formar nódulos tardíos con respecto a la cepa silvestre, eventualmente son capaces de formar nódulos con morfología normal y que fijan nitrógeno, indicando que las mutantes finalmente se adaptan al ambiente dentro del nódulo. En *S. meliloti* (Sharipova *et al*, 2003)

se ha observado un fenotipo similar, donde las mutantes en AcpXL carecen de ácido 27-OH-C28:0 en su lípido A y la estructura de sus lipopolisacáridos se encuentra modificada. Estas mutantes también están retardadas en nodulación y son menos competitivas que la cepa silvestre. Sin embargo, sus nódulos presentan una morfología normal y fijan nitrógeno. Recientemente se ha detectado la presencia de ácido 27OHC28:0 en bacteroides de mutantes en AcpXL de *R. leguminosarum* (Vedam *et al*, 2006). También se encontró que mutantes en AcpXL y LpxXL en *S. meliloti* presentan lípido A pentaacilado con ácidos grasos de longitud menor a C18:0 (Ferguson *et al*, 2005). Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo alternativo de adaptación dentro del nódulo en el cual, la función de AcpXL podría ser reemplazada por otra ACP (Vedam *et al*, 2006).

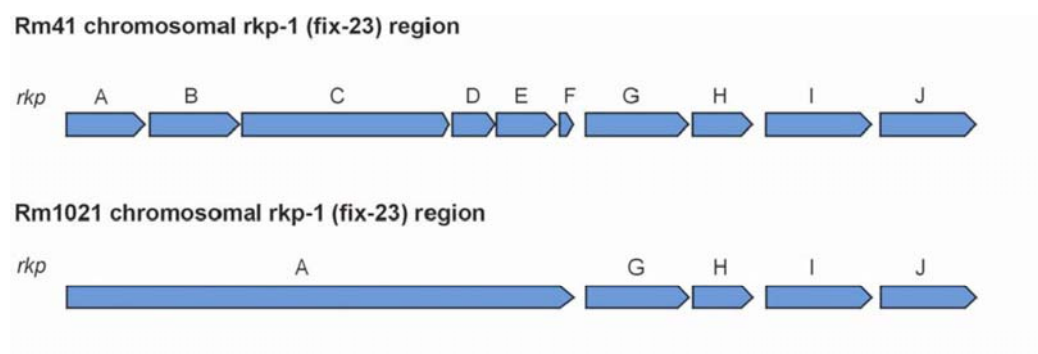


**Fig. 11.** Ejemplo de estructura de los lipopolisacáridos en *Rhizobium etli*. En las Rhizobia, el lípido A se caracteriza por la presencia del ácido graso extralargo 27-hidroxióctacosanóico. (a) Polisacárido distal o antígeno O. (b) Núcleo de oligosacáridos. (c) Dominio hidrofóbico: Lípido A.

#### 7.4. RkpF-RkpA

Los polisacáridos capsulares (KPSs, kapsular polysaccharides) son estructuras que se encuentran en la superficie de las Rhizobiales y que muestran analogía estructural con el grupo II de los antígenos-K de *E. coli*. En las Rhizobiales, los antígenos K son unidades diméricas repetitivas de hexosa y el azúcar KDO (ácido-3-deoxi-D-mano-2-octolusónico) o un azúcar relacionada. Estas estructuras son muy diversas e incluso definen la variación antigénica entre diferentes cepas de rhizobiales (Becker *et al*, 2005). Los genes para la síntesis de los polisacáridos capsulares fueron identificados como los loci de complementación capaces de restaurar mutantes deficientes en exopolisacáridos de superficie de la cepa de *S. meliloti* Rm 41. En esta cepa, estos genes se encuentran distribuidos en tres grupos. El primero, *rkp-1* (anteriormente conocido como región *fix-23*) está

codificado en cromosoma y se cree que funciona en la síntesis de un acarreador lipídico necesario para la síntesis de KPSs (Fig. 12). El segundo, *rkp-2* está codificado en cromosoma y está involucrado en el metabolismo de azúcares bifosfato. El tercero, *rkp-3* está codificado en pSymB y tiene 10 genes, de los cuales 6 funcionan en la síntesis de precursores de azúcar especie específicos (Becker *et al*, 2005). En el grupo *rkp-1* se encuentran 6 genes: *rkpABCDEF*, éstos inicialmente fueron anotados como probable sintasa de ácidos grasos. Posteriormente se encontró que son similares a dominios de policétido sintasas. La proteína RkpF ha sido caracterizada como una ACP en *S. meliloti* Rm41 al demostrar que porta el grupo prostético de 4'-fosfopanteteína y que la holo-RkpF migra más rápido que la apo-RkpF (Epple *et al*, 1998). En *S. meliloti* 1021, estos genes están fusionados como un solo ORF, llamado *rkpA*. RkpA es una proteína multifuncional en la cual su último dominio corresponde a la ACP (Fig. 12).



**Fig. 12.** Organización de la región *rkp-1* de genes para la síntesis de polisacáridos capsulares. En esta región se encuentran los genes *rkpABCDEF*, que en *S. meliloti* Rm41 son 6 genes independientes, mientras en *S. meliloti* 1021 están fusionados en un solo ORF denominado *rkpA* (Becker *et al*, 2005).



En *E. coli*, los KPSs funcionan formando una matriz hidratada que los protege de ambiente externo. Se ha hipotetizado que en Rhizobiales funcionan de la misma forma, adicionalmente podrían proteger contra los productos de defensa de las leguminosas y también en la señalización temprana durante su colonización por la bacteria (Becker *et al*, 2005). Hasta el momento no se ha definido cuál es el producto que acarrea la ACP RkpF. Se ha propuesto que durante la síntesis de KPSs, el acil-RkpF es necesario para su anclaje a la membrana (Geiger y López-Lara, 2002). Sin embargo, los análisis estructurales de los KPSs no han demostrado la existencia de algún lípido en su estructura.

## **ANTECEDENTES**

### **-Nuevas ACPs en *Sinorhizobium meliloti***

*Sinorhizobium meliloti* es una  $\alpha$ -proteobacteria gram negativa que fija nitrógeno en plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Debido a su importancia agronómica y a que es uno de los modelos más usados para el estudio de la fijación de nitrógeno, el genoma de la cepa *S. meliloti* 1021 fue secuenciado (Galibert *et al*, 2001). Su genoma está compuesto por tres replicones: un cromosoma (3.65 Mb) y dos megaplásmidos, el plásmido A (pSymA, 1.35 Mb) y plásmido B (pSymB, 1.68 Mb). En el genoma de esta bacteria están codificadas las cuatro ACPs de Rhizobiales que ya han sido caracterizadas (López-Lara y Geiger, 2000), aunque en esta bacteria RkpF corresponde un dominio de la proteína multifuncional RkpA. Al completarse la

secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al*, 2001) se encontraron dos proteínas adicionales que presentan las características de ACPs. La primera, SMc01553 está codificada en cromosoma. El gen *smc01553* forma parte de un posible operón con los genes *smc01551*, *smc01552* y *smc01554*. El gen *smc01551* codifica para una proteína con homología parcial a AlgI, una acetil transferasa que funciona en otras bacterias, como *Pseudomonas*, durante la síntesis de alginato (Franklin y Ohman, 1996). El gen *smc01552* codifica para una proteína que presenta el motivo típico de proteínas dependientes de Ton-B. Ton-B es una proteína que interactúa con proteínas receptoras de membrana externa encargadas de la internalización de substratos al espacio periplásmico (Koebnik, 2005). El gen *smc01554* codifica para una proteína con homología parcial a FkbH. Actualmente se ha demostrado que FkbH de *Streptomyces* lleva a cabo una reacción en la cual un grupo gliceril es transferido directamente a la ACP para la formación de gliceril-ACP (Sun *et al*, 2008). Curiosamente, un gen 100% idéntico a *smc01553* se ha localizado en el pSymB. La organización de este gen es similar al del *smc01553*, encontrándose en un operón idéntico al ya mencionado.

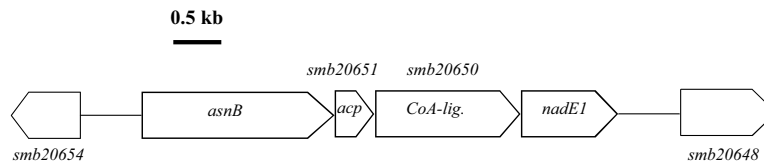
La segunda nueva ACP se encuentra codificada en pSymB, esta proteína está codificada por el gen *smb20651*. La proteína SMb20651 estuvo inicialmente anotada en el genoma como una proteína hipotética, sin embargo presenta las características típicas de una ACP. Es pequeña (88 aminoácidos), ácida (pI 3.8) y presenta el motivo conservado para el sitio de unión a 4'-fosfopanteteína (Fig. 13). El gen para SMb20651 forma parte de un supuesto operón de 4 genes (Fig. 14). El primero es *asnB*, que codifica para

una supuesta asparagina sintetasa. El segundo codifica para la supuesta ACP, el tercero, *smb20650* codifica para una propuesta acil coenzima A (CoA) ligasa específica para ácidos grasos de cadena larga, el cuarto, *nadE1*, codifica para una propuesta NAD sintetasa dependiente de amonio.

```

AcpP E.coli 1 -MSTTEERVKKIICEQL--GVKQEEVTNNSPFVDELGADSLDTVELVMALEEEFDTEIPDEEA--EKITTVQAIDYINGHQA-----
Smb20651 1  MTTQAIKDRVKAFVIENFLPGDSAYELADDASLIENDIIDSSTGVLELVAFIEEDDFGIVMADADIVPQNLDSLARISAPTEAKAAVPSA
  
```

**Fig. 13.** Alineamiento entre la proteína AcpP de *E. coli* K12 y Smb20651 de *S. meliloti* 1021. El corchete muestra la secuencia consenso alrededor del sitio de unión a fosfopanteteína. La flecha muestra la serina conservada a la que se une la 4'-fosfopanteteína.



**Fig. 14.** Representación gráfica del operón en el que se encuentra *smb20651* en *Sinorhizobium meliloti*. Los genes que forman parte de este operón son: *asnB*: propuesta asparagina sintetasa, *smb20651*: propuesta nueva ACP; *smb20650*: propuesta Co-A ligasa de ácidos grasos de cadena larga; *nadE1*: propuesta NAD sintetasa dependiente de amonio.

AsnB está predicha como la única asparagina sintetasa en el genoma de *S. meliloti* ya que para la segunda, AsnO, se ha demostrado que funciona como un regulador (Berguès *et al*, 2001). Smb20650 es una de las dos proteínas predichas como CoA-ligasas de ácidos grasos de cadena larga de *S. meliloti*. La función de las acil CoA-ligasas es la de importar ácidos grasos de cadena larga y la de activar ácidos grasos con CoA antes del primer paso

de la  $\beta$ -oxidación o antes de ser incorporados a fosfolípidos (Rock, 2008). De las dos proteínas codificadas en el genoma de *S. meliloti*, sólo se ha demostrado la función de la proteína cromosomal FadD (SMc02162) como acil CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga (Soto *et al*, 2002). La segunda es SMb20650 y está codificada en pSymB. NadE1 es una de las dos NAD sintetasas predichas en el genoma de *S. meliloti*. La segunda, NadE2 (SMc00161), se encuentra codificada en el cromosoma. Para ninguna de las dos proteínas se ha demostrado su función. Curiosamente, este operón no sólo se encuentra en *S. meliloti*, se encuentra además en otros genomas de Rhizobiales como *Sinorhizobium medicae* y *Mesorhizobium loti*. Además, se ha encontrado que genes similares a los del operón de *S. meliloti* están también formando un probable operón en genomas de bacterias tan diversas como *Agrobacterium*, *Geobacter*, *Roseiflexus*, *Rhodopseudomonas* y en los genomas de archaeas, como *Methanosarcina acetivorans* y *M. mazei*.

Tomando en cuenta estos antecedentes, hemos propuesto que la proteína SMb20651 es una ACP, debido a sus características de proteína pequeña, ácida y a que presenta el motivo conservado para la unión del grupo prostético de 4'-fosfopanteteína. El hecho de que *smb20651* forme parte de un probable operón conservado en diferentes bacterias indica que los genes del operón y su producto forman parte de una misma vía biosintética. Adicionalmente, que estas proteínas están involucradas en la síntesis de un ácido graso o cétido aún desconocido.

## **OBJETIVO**

Caracterizar a SMb20651 como una proteína acarreadora de acilos.

### **Objetivos particulares**

- Determinar si SMb20651 incorpora al grupo prostético de 4'-fosfopanteteína.
- Observar el patrón de expresión de SMb20651 en *S. meliloti*.
- Construir mutantes deficientes en el gen *smb20651* y caracterizar su fenotipo en vida libre y en simbiosis.
- Sobreexpresar y purificar a SMb20651 para el análisis de las formas aciladas.
- Determinar si SMb20651 es sustrato de enzimas esenciales para la síntesis de ácidos grasos y analizar los productos formados.

## RESULTADOS

Ramos-Vega, A. L., Dávila-Martínez, Y., Sohlenkamp, C., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O. y López-Lara, I. M. (2009)

**SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*.**

*Microbiology*, 155: 257-267

En este trabajo se caracterizó a SMb20651 como una proteína acarreadora de acilos. Se demostró que SMb20651 es modificada con el grupo prostético de 4'-fosfopanteteína y que la holo-SMb20651 es modificada con el grupo malonil proveniente del malonil-CoA. Se demostró que SMb20651 es acilada cuando se expresa en su forma activa en *Escherichia coli*. Adicionalmente, se detectó a la proteína SMb20651 como holo-SM20651 y acil-SMb20651 en *Sinorhizobium meliloti*, indicando que en esta bacteria, SMb20651 es metabólicamente activa.

## SMB20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*

Ana Laura Ramos-Vega,<sup>1</sup> Yadira Dávila-Martínez,<sup>1</sup> Christian Sohlenkamp,<sup>1</sup> Sandra Contreras-Martínez,<sup>2</sup> Sergio Encarnación,<sup>2</sup> Otto Geiger<sup>1</sup> and Isabel M. López-Lara<sup>1</sup>

### Correspondence

Isabel M. López-Lara  
isabel@ccg.unam.mx

<sup>1</sup>Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos C. P. 62251, Mexico

<sup>2</sup>Programa de Genómica Funcional de Procariontes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos C. P. 62251, Mexico

Acyl carrier proteins (ACPs) are small acidic proteins that carry growing acyl chains during fatty acid or polyketide synthesis. In rhizobia, there are four different and well-characterized ACPs: AcpP, NodF, AcpXL and RkpF. The genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* 1021 reveals two additional ORFs that possibly encode additional ACPs. One of these, *smb20651*, is located on the plasmid pSymB as part of an operon. The genes of the operon encode a putative asparagine synthetase (AsnB), the predicted ACP (SMB20651), a putative long-chain fatty acyl-CoA ligase (SMb20650) and a putative ammonium-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase (NadE1). When SMB20651 was overexpressed in *Escherichia coli*, [<sup>3</sup>H]β-alanine, a biosynthetic building block of 4'-phosphopantetheine, was incorporated into the protein *in vivo*. The purified SMB20651 was modified with 4'-phosphopantetheine in the presence of *S. meliloti* holo-ACP synthase (AcpS). Also, holo-SMB20651 was modified *in vitro* with a malonyl group by malonyl CoA-ACP transacylase. In *E. coli*, coexpression of SMB20651 together with other proteins such as AcpS and SMb20650 led to the formation of additional forms of SMB20651. In this bacterium, acylation of SMB20651 with C12:0 or C18:0 fatty acids was detected, demonstrating that this protein is involved in fatty acid biosynthesis or transfer. Expression of SMB20651 was detected in *S. meliloti* as holo-SMB20651 and acyl-SMB20651.

Received 9 July 2008

Revised 19 September 2008

Accepted 2 October 2008

## INTRODUCTION

Acyl carrier proteins (ACPs) are small acidic proteins that are key cofactors in fatty acid and polyketide syntheses. Acyl intermediates are covalently bound to an ACP, which shuttles them from one enzyme to another. The linkage between fatty acyl groups and ACP is achieved by a thioester bond in which the thiol of the ACP 4'-phosphopantetheine prosthetic group is condensed with the carboxy group of fatty acids. Apo-ACP is converted to the active protein by holo-ACP synthase (AcpS), which transfers the 4'-phosphopantetheine from coenzyme A (CoA) to apo-ACP (Flügel *et al.*, 2000; Lambalot *et al.*, 1996), thereby converting it to the functional holo-ACP.

**Abbreviations:** ACP, acyl carrier protein; AcpS, holo-ACP synthase; CTAB, cetyltrimethylammoniumbromide; DOC, sodium deoxycholate.

Two supplementary figures, showing results of RT-PCR analysis demonstrating that *asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1* are encoded in an operon, the scheme of *asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1* arrangement, and a multiple sequence alignment of the *S. meliloti* acyl carrier proteins and selected SMB20651 homologues, are available with the online version of this paper.

In *Escherichia coli* K-12, the only ACP is AcpP. This essential and constitutive protein is involved not only in the synthesis of fatty acyl chains but also in their transfer during phospholipid, lipid A or haemolysin synthesis (reviewed by Byers & Gong, 2007). Acyl-ACP also functions as acyl donor during the synthesis of *N*-acylhomoserine lactones in Gram-negative bacteria (Fuqua & Greenberg, 2002) and of γ-butyrolactones in *Streptomyces* (Kato *et al.*, 2007). Bacteria with complex metabolism often have specialized ACPs and ACP homologues that are involved in the synthesis of secondary metabolites such as polyketides or non-ribosomal peptides (Geiger & López-Lara, 2002; Lai *et al.*, 2006), or in the synthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Rhizobia have four well-characterized ACPs (Geiger & López-Lara, 2002): AcpP for general fatty acid synthesis (Platt *et al.*, 1990; López-Lara & Geiger, 2000), NodF for the synthesis of polyunsaturated fatty acids and for their transfer to nodulation factors (Ritsemá *et al.*, 1998), AcpXL for the synthesis and transfer of the 27-hydroxyoctacosanoic acid during rhizobial lipid A synthesis (Brozek *et al.*,

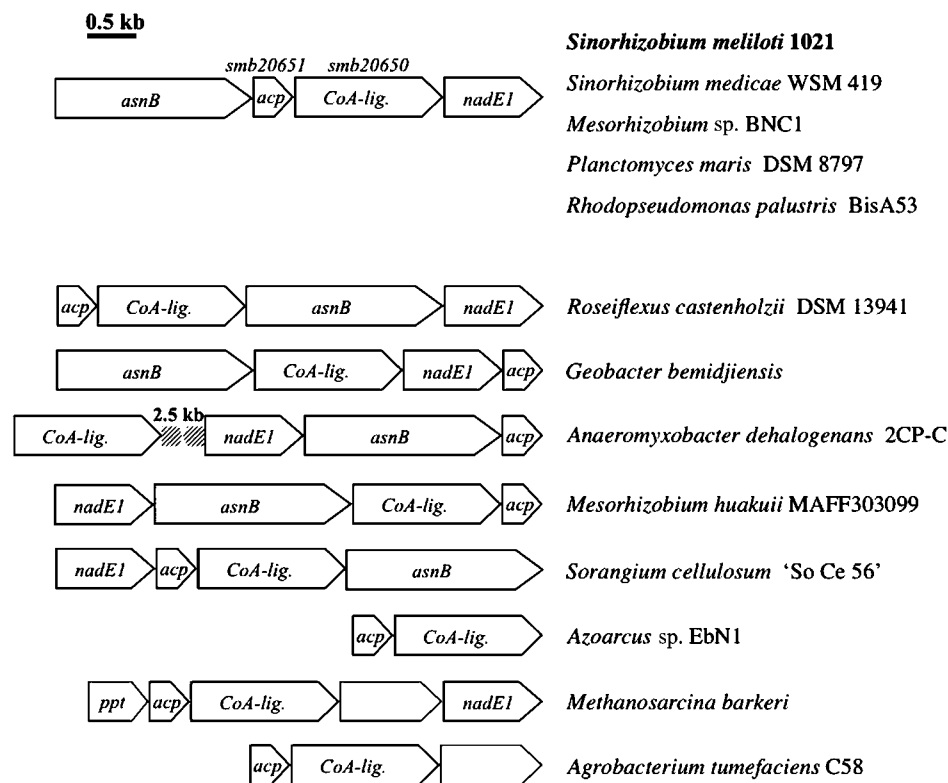
1996), and RkpF, which participates in the synthesis of rhizobial capsular polysaccharides (Epple *et al.*, 1998). The genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) reveals the existence of two additional putative ACPs (Geiger & López-Lara, 2002). One of these is encoded by the gene *smb20651* and is located in the plasmid pSymB, forming part of a possible operon of four genes (Fig. 1). The SMB20651 protein was assigned in the genome project as a hypothetical protein. However, it has all the characteristics of an ACP. SMB20651 is small (88 aa) and acidic (isoelectric point 3.8), and has a predicted 4'-phosphopantetheine binding motif. The genes of the operon code for a putative asparagine synthetase (*AsnB*), the predicted ACP (*Smb20651*), a putative long-chain (C12–C18) fatty acyl CoA ligase (*Smb20650*) and a putative ammonium-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase (*NadE1*).

Here, we present the characterization of the protein SMB20651 as an ACP; SMB20651 incorporates the 4'-phosphopantetheine prosthetic group, can be modified with a malonyl group and can carry C12:0 and C18:0 fatty acyl chains. Although no phenotype was associated with the absence of SMB20651 in *S. meliloti*, different modified forms of SMB20651 could be detected in the wild-type

strain, indicating that the protein is actively participating in an acyl-involving metabolic pathway.

## METHODS

**Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristics are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown at 30 °C either in Luria–Bertani (LB) broth (Sambrook & Russell, 2001) or in M9 minimal broth (Miller, 1972), for [<sup>3</sup>H]β-alanine labelling assays. *S. meliloti* strains were grown at 30 °C either in complex tryptone yeast (TY) broth supplemented with 4.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Beringer, 1974) or in one of the following minimal media: M9 supplemented with 2 μg biotin ml<sup>-1</sup> and succinate (10 mM) replacing glucose as the carbon source, Sherwood (1970) medium with succinate (8.3 mM) replacing mannitol as the carbon source, or Robertsen *et al.* (1981) medium. In experiments designed to evaluate the influence of the nitrogen source on growth, glutamate in Robertsen medium was replaced by NH<sub>4</sub>Cl. In other experiments, glutamate and succinate were replaced by glutamine or asparagine as carbon and nitrogen sources, respectively. To study salt tolerance, cultures were grown in complex TY medium supplemented with 0.1, 0.25, 0.5 or 0.7 M NaCl. Antibiotics were added, when required, to the following final concentrations (μg ml<sup>-1</sup>): carbenicillin, 100; chloramphenicol, 20; kanamycin, 50; gentamicin, 20; spectinomycin, 200; and tetracycline, 20 for *E. coli*; and neomycin, 200; spectinomycin, 400; streptomycin, 500; and tetracycline, 4 for *S. meliloti*.



**Fig. 1.** Genetic organization around the gene encoding SMB20651 and around selected SMB20651 homologues in different organisms. Nomenclature used for comparison: *acp*, acyl carrier protein homologous to SMB20651; *CoA-lig.*, long-chain CoA-ligase homologous to SMB20650; *asinB*, putative asparagine synthetase; *nadE1*, putative NAD synthetase; *ppt*, phosphopantetheinyl transferase.



**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Kn<sup>R</sup>, Cb<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup>, Spc<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup>, kanamycin, carbenicillin, chloramphenicol, gentamicin, spectinomycin and tetracycline resistance, respectively. Sm and Ec denote genes from *S. meliloti* 1021 and *E. coli*, respectively. Plasmids pAL03 to pAL06 are described in Methods, Construction of *smb20651* mutants.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
DH5 $\alpha$	Host used for cloning	Bethesda Research Laboratory
BL21(DE3)	Host used for protein expression	Studier <i>et al.</i> (1990)
OG7001	<i>panD</i> mutant of BL21(DE3), $\beta$ -alanine auxotroph	Epple <i>et al.</i> (1998)
<b><i>S. meliloti</i> strains</b>		
1021	Sm <sup>R</sup> of SU47 wild-type	Galibert <i>et al.</i> (2001)
ALR30B1	<i>smb20651</i> deletion mutant of <i>S. meliloti</i> 1021, Spc <sup>R</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pET9a	Expression vector, Kn <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pET16b	Expression vector, Cb <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pLysS	Causes repression of T7 polymerase, Cm <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pBBR1MCS-5	Broad-host-range vector, Gm <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pRK404	Broad-host-range vector, Tc <sup>R</sup>	Ditta <i>et al.</i> (1985)
pBluescript SK	Cloning vector, Cb <sup>R</sup>	Stratagene
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide vector, Kn <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pTB5035	<i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pET9a	López-Lara & Geiger (2000)
pRJC005	<i>acpS<sub>Ec</sub></i> in pBluescript SK	Cox <i>et al.</i> (1997)
pTB1003	<i>rkpF</i> of Rm41 in pET9a	Epple <i>et al.</i> (1998)
pTB5086	6 kb <i>Bam</i> HI fragment carrying <i>S. meliloti</i> 1021 <i>fab</i> cluster, Cb <sup>R</sup>	López-Lara & Geiger (2001)
pHY109	Broad-host-range vector containing Spc <sup>R</sup> cassette	Østeras <i>et al.</i> (1998)
pAL20651	<i>smb20651</i> in pET9a	This study
pAL02	<i>smb20651</i> in pET16b	This study
pSBA01	<i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pET16b	This study
pAL20	<i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pET9a	This study
pAL41	<i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pBBR1MCS-5	This study
pAL22	<i>smb20651</i> and <i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pET9a	This study
pAL24	<i>smb20651</i> and <i>acpS<sub>Ec</sub></i> in pET9a	This study
pTB5001	<i>rkpF</i> and <i>acpS<sub>Ec</sub></i> in pET9a	This study
pAL26	<i>rkpF</i> and <i>acpS<sub>Sm</sub></i> in pET9a	This study
pAL30	<i>smb20651</i> (S40A) in pET9a	This study
pAL52	<i>smb20650</i> in pET16b	This study
pAL55	<i>smb20650</i> in pBBR1MCS-5	This study
pCSF07	<i>nodF<sub>Sm</sub></i> in pET9a	This study
pSBD02	<i>fabD<sub>Sm</sub></i> in pET16b	This study

Plasmids pRK404, pBBR1MCS-5 and pK18*mobsacB* and their derivatives were mobilized into *S. meliloti* strains by triparental mating using the mobilizing plasmid pRK2013, as described elsewhere (Figurski & Helsinki, 1979).

**DNA manipulations and RT-PCR analysis.** Recombinant DNA techniques were carried out using standard procedures (Sambrook & Russell, 2001). Commercial sequencing of amplified genes by Eurofins Medigenomix (Martinsried, Germany) corroborated the correct DNA sequence. DNA and derived protein sequences were analysed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST network centre (Altschul *et al.*, 1997). RNA was isolated from 2 ml of culture using TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Fermentas) as indicated by the manufacturers. cDNA was synthesized using a RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas) as specified by the manufacturer.

**Construction of expression plasmids.** All genes were amplified from *S. meliloti* 1021 genomic DNA, with the exception of *smc00571* (*fabD*),

which was amplified from plasmid pTB5086 (López-Lara & Geiger, 2001). Using specific oligonucleotides (Table 2), the genes *smb20651*, *smb20650*, *fabD*, *nodF* (*sma0852*) and *acpS* (*smc02654*) were amplified and, after restriction with *Nde*I and *Bam*HI (or *Nde*I and *Bgl*II in the case of *smb20650*), the fragments were cloned into pET9a and/or pET16b (Studier *et al.*, 1990) that had been digested with *Nde*I and *Bam*HI. Names given to the respective expression plasmids are given in Table 1. Plasmid pAL20 was digested with *Bam*HI and *Bgl*II to reclone the *acpS* gene region into the *Bam*HI-digested broad-host-range vector pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) to yield plasmid pAL41.

For coexpression of Smb20651 with AcpS from *S. meliloti*, plasmid pAL20 was digested with *Bam*HI and *Bgl*II and the 420 bp fragment carrying *S. meliloti acpS* was cloned into plasmid pAL20651 that had been digested with *Bam*HI, to yield pAL22. Similarly, the *E. coli acpS* gene (*acpS<sub>Ec</sub>*) was obtained after digesting the plasmid pRJC005 (Cox *et al.*, 1997) with *Bgl*II and then cloning the fragment into *Bam*HI-digested pAL20651 to yield pAL24. Plasmids for coexpression of the protein RkpF from *S. meliloti* Rm41 with *S. meliloti* AcpS or *E. coli*

**Table 2.** Oligonucleotide primers used in this study

For construction of expression plasmids, the forward primers incorporated an *NdeI* restriction site (underlined) overlapping the start codon of the respective genes. The reverse primers incorporated a *BamHI* (or *BglII* in the case of *smb20650*) restriction site (underlined) after the stop codon.

Primer	Sequence (5'–3')
<b>Primers used for construction of expression plasmids</b>	
smb20651F	AGGAATACATATGACCCAAGCGATTAAGGAC
smb20651R	AAAGGATCCTTACGCCGAGACCGGCACG
acpSF	AGGAATACATATGATCATCGGTATCGGCAG
acpSR	AAGGATCCCTAAACCGTTCCTCGGC
smb20650F	AGGAATACATATGCGGTTGAGCAATTCCTC
smb20650R	AAATAAGATCTCATTCTGCGGGCTCCAATG
fabDF	AGGAATACATATGAGCATCGCATTACGTTCC
fabDR	AAAGGATCCTCAGGCCAAGAGGACGGCAAG
nodFF	AGGAATACATATGGTAGATCAACTCGAAAG CGAAATC
nodFR	AAAGGATCCTCAAGCCCCCTTAGTGAGCAA GCCTCG
<b>Primers used for mutagenesis</b>	
oAL3	GCGCCCGGGACATCGCCAGGGACTTTCCC
oAL4	TAAGGATCCCCTTTTTTCCAAGGGTTTACGC
oAL5	GTCGGATCCGGCATCACCATCATGCGGTTCC
oAL6	CATCTAGACCGCGGTGTGGAGAGATAACG
oAL100	ACGACATCATCGATGCGACCGCGCTTCTG
oAL101	CAGAACGCGGTCGCATCGATGATGTC
<b>Other</b>	
pet16bup	AACTGCAGGGGAATTGTGAGCGGATAAC

AcpS, were constructed in an analogous way to that described for pAL22 and pAL24. The resulting plasmids were pAL26 and pTB5001. All coexpression plasmids had the genes for the ACP and for AcpS in the same orientation.

In order to clone *smb20650* into pBBR1MCS-5, the primers *smb20650R* and *pet16bup* (Table 2) were used to amplify the gene from pAL52. The PCR product was digested with *XbaI* and *BglII* and cloned into pBBR1MCS-5 that had been digested with *XbaI* and *BamHI*, resulting in plasmid pAL55.

**Site-directed mutagenesis of Smb20651.** The single-site mutant of Smb20651 S40A was generated by the PCR overlap extension method (Ho *et al.*, 1989). The oligonucleotide primers oAL3 and oAL101 (Table 2) were used to amplify 1112 bp of genomic DNA spanning from upstream of *smb20651* to 129 bp downstream of the *smb20651* start codon. Similarly, the oligonucleotide primers oAL100 and oAL6 (Table 2) were used to amplify 1003 bp of genomic DNA spanning from 101 bp downstream of the *smb20651* start codon to downstream of *smb20651*. The primers oAL101 and oAL100 overlap in their DNA binding region and introduce a point mutation (G to T) in nucleotide 118, causing a serine to alanine substitution in residue 40 of the Smb20651 protein. The two PCR products were used as a template for a new PCR and after heating them for 1 min at 92 °C, they were annealed by incubation for 4 min at 60 °C followed by 6 min at 72 °C. Then, the oligonucleotide primers *smb20651F* and *smb20651R* (Table 2) were added and the PCR was continued following standard procedures. After digestion with *NdeI* and *BamHI* enzymes, the 267 bp product was cloned into pET9a expression vector that had been digested with the same enzymes. The resulting plasmid was named pAL30.

**Construction of *smb20651* mutants.** The oligonucleotide primers oAL3 and oAL4 (Table 2) were used in a PCR to amplify 992 bp of genomic DNA upstream of the *smb20651* gene from *S. meliloti*, introducing *SmaI* and *BamHI* sites (underlined in the table) into the

PCR product. Similarly, the primers oAL5 and oAL6 (Table 2) were used to amplify 868 bp of genomic DNA downstream of *smb20651*, introducing *BamHI* and *XbaI* sites (underlined in the table) into this PCR product. After digestion with the respective enzymes, the 992 bp fragment was cloned into pBluescript SK plasmid that had been digested with *SmaI* and *BamHI*, yielding plasmid pAL03. Then, the 868 bp fragment was cloned as a *BamHI/XbaI* fragment into pAL03 plasmid that had been digested with *BamHI* and *XbaI*, yielding plasmid pAL04. A spectinomycin-resistance cassette obtained as a *BamHI* fragment from plasmid pPHY109 (Østeras *et al.*, 1998) was inserted into pAL04 that had been digested with *BamHI* to yield pAL05. Plasmid pAL05 was digested with *SmaI* and *XbaI* to reclone the regions usually flanking *smb20651* and the spectinomycin-resistance gene located between those regions as a *SmaI/XbaI* fragment into the suicide vector pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) that had been digested with *SmaI* and *XbaI* to yield pAL06. Plasmid pAL06 was introduced into wild-type *S. meliloti* 1021, and double recombinants in which the spectinomycin-resistance cassette replaced *smb20651* were obtained following a procedure described previously (Sohlenkamp *et al.*, 2004). The mutation was transduced back into *S. meliloti* 1021 using  $\phi$ M12 as described by Finan *et al.* (1984), and the mutant strain was named ALR30B1.

**Analysis of proteins.** Proteins were analysed by 20% native PAGE (Jackowski & Rock, 1983) or by conformation-sensitive gels (Post-Beittenmiller *et al.*, 1991) containing 16.8% polyacrylamide in the separation gel and 3.2 M urea in both the separation and stacking gel. Samples were mixed with application buffer to give final concentrations of 7.9% (v/v) glycerol before they were loaded onto polyacrylamide gels. Gels were stained with Coomassie blue. Protein concentrations were determined by the method of Dulley & Grieve (1975) using BSA (Sigma) as standard. For hydroxylamine treatment, proteins were incubated with 100 mM hydroxylamine hydrochloride, pH 6.5, in the presence of 50 mM DTT at 25 °C for 2 h.

**In vivo labelling of Smb20651 and RkpF with [ $^3\text{H}$ ] $\beta$ -alanine.** *In vivo* labelling of ACPs with [ $^3\text{H}$ ] $\beta$ -alanine, the biosynthetic precursor of 4'-phosphopantetheine, was carried out essentially as described previously using the  $\beta$ -alanine auxotroph OG7001 (Epple *et al.*, 1998; López-Lara & Geiger, 2000).

**Overexpression of proteins in *E. coli*.** The strains were grown at 30 °C in 500 ml LB medium supplemented with the appropriate antibiotics. At OD<sub>620</sub> 0.3, IPTG was added to a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Cells were harvested by centrifugation and cell pellets were resuspended either in ice-cold buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 6.8), or in ice-cold start buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) when used for subsequent chromatography on Ni<sup>2+</sup> agarose. The cells were broken by three passages through a French press at 138 MPa. Broken cell suspensions were centrifuged for 10 min at 15 550 g and the supernatants were recovered. His-AcpS was overproduced as inclusion bodies, in which case the pellet was recovered after centrifugation.

**Purification of Smb20651 and NodF.** Cold 2-propanol was added dropwise to the cell-free protein extracts until a final concentration of 50% (v/v) was reached. After incubation for 90 min, the precipitate was removed by centrifugation at 15 550 g for 20 min and the final 2-propanol concentration was adjusted to 10% with buffer A. The supernatant was then applied to a 5 ml DEAE-52 cellulose (Whatman) column, which had been equilibrated with buffer B (50 mM Bistris/HCl, pH 6.8). The column was washed with 25 ml buffer B and elution was performed with a step-wise gradient of 0.2, 0.5, 1 and 2 M NaCl in buffer B. Fractions (1 ml) were collected and aliquots were analysed by native or conformation-sensitive PAGE as required. The Smb20651, NodF and acylated Smb20651 proteins eluted with the addition of 0.5 M NaCl. Fractions containing the respective ACP were individually applied to a PrepCell (model 491, Bio-Rad) containing a cylindrical 20% native polyacrylamide gel in the case of Smb20651 and NodF, and a 16.8% polyacrylamide gel containing 3.2 M urea in the case of acylated Smb20651. Fractions (3 ml each) were collected and Smb20651- or NodF-containing fractions were concentrated by ultrafiltration at 4 °C. The buffer was changed to 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, for enzymic preparation of holo-Smb20651 and holo-NodF. Samples containing acylated Smb20651 were dried and analysed for fatty acid content at the Bacterial Identification & Fatty Acid Analysis Laboratory, Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville.

For large-scale Smb20651 enrichment from *S. meliloti*, 10 l cultures were grown on TY at 30 °C to OD<sub>620</sub> 0.7. Purification steps were as described above with the following differences: cold 2-propanol was added to 30% (v/v) final concentration and elution was performed with a linear gradient (0–2 M NaCl) from a DEAE-Sepharose column (Pharmacia Biotech). The fractions containing Smb20651 were pooled and passed through a YM-50 filter device with a molecular weight cutoff of 50 000 Da. Then, the filtrate was desalted and concentrated with a YM-3 filter device with a molecular weight cutoff of 3000 Da. A similar mock purification was carried out using *smb20651*-deficient-strain ALR30B1.

**Purification of His-tagged proteins.** The cell-free crude extract of the *E. coli* strain overproducing His-Smb20651 was first fractionated with 60% 2-propanol, and the 2-propanol was then eliminated by rotatory evaporation. The inclusion bodies consisting of His-AcpS protein were washed twice in start buffer, then dissolved in start buffer containing 6 M guanidine hydrochloride and centrifuged at 6300 g. The samples containing His-Smb20651 or AcpS prepared as described above or the cell-free extract of the strain overproducing His-FabD were applied to a 1 ml Ni<sup>2+</sup> agarose column (Hi Trap, Pharmacia Biotech). Ni<sup>2+</sup> chromatography was performed according to the manufacturer's instructions. In the case of His-AcpS all buffers

contained 6 M guanidine hydrochloride. The three proteins were eluted with 500 mM imidazole in start buffer. After concentration with Amicon devices (Millipore), aliquots of purified His-AcpS and His-FabD were kept in sodium phosphate buffer containing 14.3% (v/v) glycerol at –80 °C.

**Generation of polyclonal antiserum against the ACP Smb20651 and Western blot analysis.** Antiserum against purified His-Smb20651 was raised in a white New Zealand rabbit that had received four injections, each of a 1:1 mixture of Freud's complete or incomplete adjuvant (Roche) together with 150  $\mu\text{g}$  His-Smb20651 antigen protein in 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

For immunodetection of Smb20651, protein samples were separated by PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS (150 mM NaCl, sodium phosphate, pH 7.2) and then incubated with anti-His-Smb20651 serum diluted either 1:1000 or 1:100 for *E. coli*- or *S. meliloti*-derived protein samples, respectively. Anti-rabbit immunoglobulin antibodies (alkaline phosphatase conjugate) were used as secondary antibodies. Reaction results were visualized with Sigma Fast 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium tablets according to the manufacturer's recommendations.

**In vitro modification of apo-ACPs to holo-ACPs.** For preparation of holo-Smb20651 and holo-NodF, the purified proteins were incubated with CoA in the presence of *S. meliloti* His-AcpS. Reactions were performed in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, containing 10 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300  $\mu\text{M}$  CoA, 40.6  $\mu\text{M}$  ACP and 2.3  $\mu\text{M}$  His-AcpS in a final volume of 50  $\mu\text{l}$ . Reactions were incubated at 30 °C for 4 h. MALDI-TOF MS was performed using a Bruker Daltonics Autoflex mass spectrometer operated in the linear mode. Spectra were externally calibrated using a protein calibration standard (Bruker Daltonics 206295). Protein mixtures were desalted using a C18 ZipTip (Millipore) and analysed using a saturated solution of sinapinic acid in 50% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid.

**In vitro malonylation of holo-Smb20651 and holo-NodF.** Reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 17  $\mu\text{M}$  ACP, 6.2  $\mu\text{M}$  His-FabD and 1 mM malonyl-CoA in a final volume of 30  $\mu\text{l}$ . Reactions were incubated at 30 °C for 1 h. In assays involving radioactive malonyl-CoA, 6105 Bq [<sup>14</sup>C]malonyl-CoA (specific activity 4.07  $\times 10^8$  Bq mmol<sup>-1</sup>; American Radiolabelled Chemicals) were used per reaction in a final volume of 15  $\mu\text{l}$ . Malonyl-ACP samples were separated by conformation-sensitive PAGE. Radiolabelled samples were also transferred to a nitrocellulose membrane, and the incorporation of the malonyl group was demonstrated by autoradiography.

**Filter-disk assays.** Zones-of-inhibition assays were performed as described elsewhere (Ferguson *et al.*, 2002). A 5  $\mu\text{l}$  aliquot of the stock agents 10% SDS, 70 mg gentamicin ml<sup>-1</sup>, 2% sodium deoxycholate (DOC), 10% cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB), 10% Triton X-100 or 10% Brij 58 was applied to the disk. For the polymyxin B assays, commercial test disks (300 units per disc, Oxoid) were used. At least three repetitions were made for each agent tested. Zones of inhibition were measured after 2 days of growth at 30 °C.

**Plant assays.** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants were grown in a nitrogen-free medium as described elsewhere (Olivares *et al.*, 1980). Nitrogen fixation was determined by examining acetylene reduction using GC (Burriss, 1972).

## RESULTS

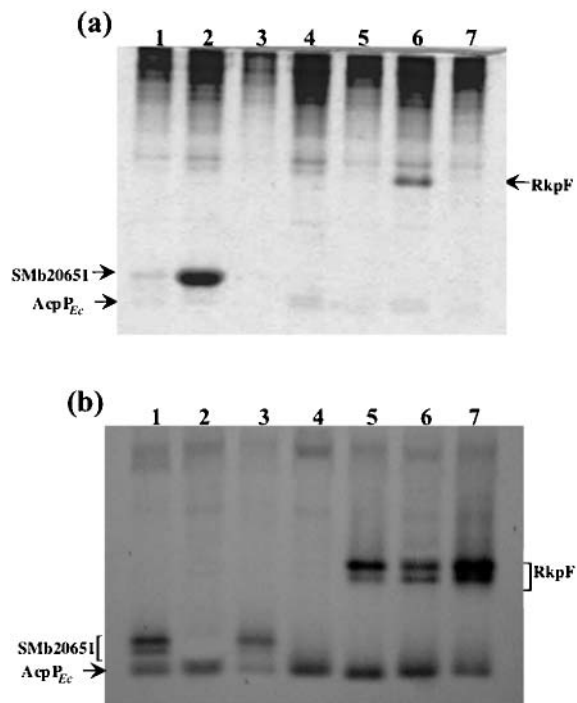
### *smb20651* is part of a four-gene operon

*smb20651* is located on plasmid pSymB as part of a possible operon of four genes (Fig. 1). We designed primers to amplify the intergenic regions of the adjacent genes, using RT-PCR. Three intergenic regions between adjacent genes (*asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1*) were amplified (Supplementary Fig. S1) from the RNA samples of *S. meliloti* 1021 cells grown on TY. These results indicate that the four genes (*asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1*) form an operon.

Interestingly, while the same operon is conserved in the genomes of the rhizobial species *Sinorhizobium medicae* WSM419, *Mesorhizobium* sp. BNC1 and *Mesorhizobium huakuii* MAFF 303099 (Fig. 1), it is absent in the genomes of rhizobia from the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium*. The four genes forming the operon are also present in the  $\alpha$ -proteobacterium *Rhodopseudomonas palustris* BisA53. Remarkably, the operon is also found in phylogenetically unrelated bacteria such as *Planctomyces*, *Roseiflexus* and *Geobacter*, and even in the archaeon *Methanosarcina* (Fig. 1). Parts of the operon are conserved in other species, and the most frequent association is between the genes encoding the putative ACP and a potential long-chain fatty acyl-CoA ligase (Fig. 1), suggesting that SMb20650 homologues could be involved in loading the respective putative SMb20651 ACPs with acyl chains.

### Efficient phosphopantetheinylation of SMb20651 occurs only in the presence of extra AcpS

ACPs are functional when substituted with the 4'-phosphopantetheine prosthetic group. Cell-free extracts of *E. coli* OG7001(pLysS) carrying either empty pET9a, or plasmids that allow overproduction of SMb20651 or RkpF that had been grown in the presence of [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine, a biosynthetic precursor of 4'-phosphopantetheine, were analysed by PAGE and subsequent autoradiography. Although the SMb20651 protein was highly overproduced (Fig. 2a, lane 2), incorporation of [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine was not detected (Fig. 2b, lane 2), indicating poor or lack of holo-SMb20651 production. In contrast, efficient production of holo-RkpF was detected (Fig. 2b, lane 6). ACPs are phosphopantetheinylated by enzymes of the phosphopantetheinyl transferase (PPT) family. To test whether SMb20651 requires *S. meliloti* PPT AcpS (SMc02654) for modification, we constructed plasmids that allow the coexpression *in cis* of SMb20651 together with either *E. coli* AcpS or *S. meliloti* AcpS. As controls, we made the same constructions with RkpF, which is an ACP from *S. meliloti* Rm41 (Epple *et al.*, 1998). Although under coexpression conditions we detected much less SMb20651 or RkpF protein (Fig. 2a, lanes 1, 3, 5 and 7), both proteins were efficiently labelled with [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine (Fig. 2b, lanes 1, 3, 5 and 7). Surprisingly, the over-

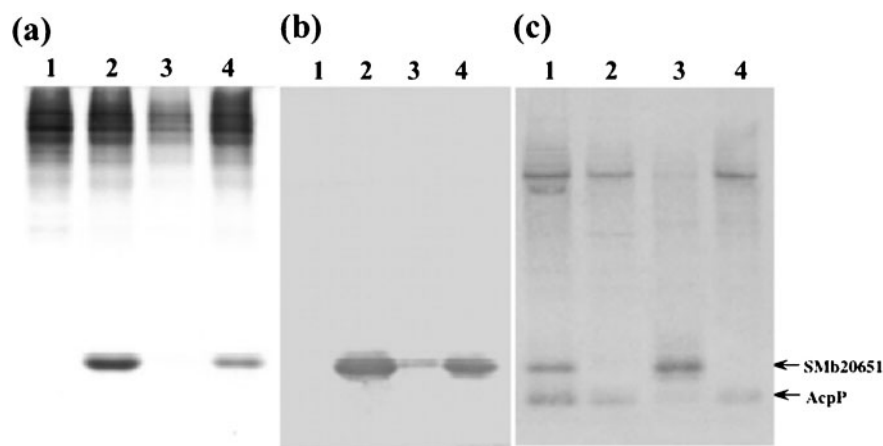


**Fig. 2.** Overproduction of *S. meliloti* ACPs in *E. coli* OG7001 (pLysS). Analysis of cell-free extracts from *E. coli* strains overproducing SMb20651 and RkpF. (a) Proteins separated by 20% native PAGE and stained with Coomassie blue. (b) Autoradiogram after labelling with [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine. (a, b) Cell-free extracts of *E. coli* overproducing: SMb20651 and AcpS<sub>Ec</sub> (lane 1), SMb20651 (lane 2), SMb20651 and AcpS<sub>Sm</sub> (lane 3), nothing (*E. coli* strain carrying pET9a) (lane 4), RkpF and AcpS<sub>Ec</sub> (lane 5), RkpF (lane 6), and RkpF and AcpS<sub>Sm</sub> (lane 7). The bands corresponding to SMb20651, RkpF and the *E. coli* AcpP are indicated.

expression of either AcpS of *S. meliloti* or AcpS of *E. coli* can modify SMb20651, indicating that the level of AcpS in wild-type *E. coli* is not enough to modify SMb20651, or that *E. coli* AcpS does not work efficiently with SMb20651. The latter could be due to the presence of the sequence motif DST (where S is the 4'-phosphopantetheine binding site) instead of the DSL sequence present in *E. coli* and other sinorhizobial ACPs (Supplementary Fig. S2).

### Serine 40 is necessary for 4'-phosphopantetheine binding to SMb20651

SMb20651 carrying the S40A change in the conserved serine of the predicted 4'-phosphopantetheine binding site was coexpressed *in trans* together with *S. meliloti* AcpS, and *in vivo* labelling with [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine was performed. The amount of SMb20651 (S40A) present in the crude extract was similar to that found when SMb20651 is overexpressed alone (Fig. 3a, b, lane 4) but it could no longer be labelled with [<sup>3</sup>H] $\beta$ -alanine (Fig. 3c, lane 4), indicating that serine 40 is necessary for 4'-phosphopantetheine binding. SMb20651 (S40A) migrates similarly in native PAGE to

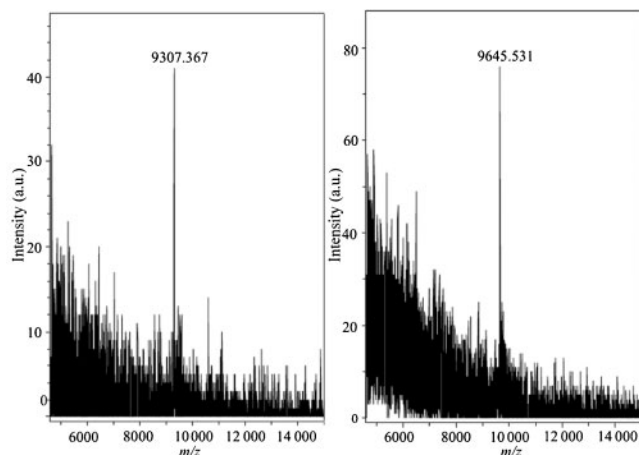


**Fig. 3.** Serine 40 is required for 4'-phosphopantetheinylation of SMb20651. (a) Analysis of cell-free extracts from *E. coli* strains overproducing SMb20651. Proteins were separated by 20% native PAGE and stained with Coomassie blue. (b) Western blot detection of SMb20651 using anti-His-SMb20651 antibodies. (c) Autoradiogram of cell-free extracts of *E. coli* strains overproducing SMb20651 after labelling with [ $^3$ H] $\beta$ -alanine. In (a), (b) and (c), cell-free extracts of *E. coli* are shown overproducing SMb20651 and AcpS<sub>Sm</sub> *in cis* (lane 1), SMb20651 (lane 2), SMb20651 and AcpS<sub>Sm</sub> *in trans* (lane 3), and SMb20651(S40A) and AcpS<sub>Sm</sub> *in trans* (lane 4). Overexpression *in trans* was achieved by expressing in *E. coli* derivatives of pET9a and pBBR1MCS-5 carrying *acpS*<sub>Sm</sub> (pAL41). The bands corresponding to SMb20651 and *E. coli* AcpP are indicated.

wild-type SMb20651, and therefore the exchange S to A probably does not affect the overall folding and conformation of this protein (Fig. 3, lane 4).

#### ***In vitro* 4'-phosphopantetheine transfer to SMb20651**

Analysis of purified SMb20651 by MALDI-TOF MS showed an *m/z* of 9307.3 and one of 9645.5 for

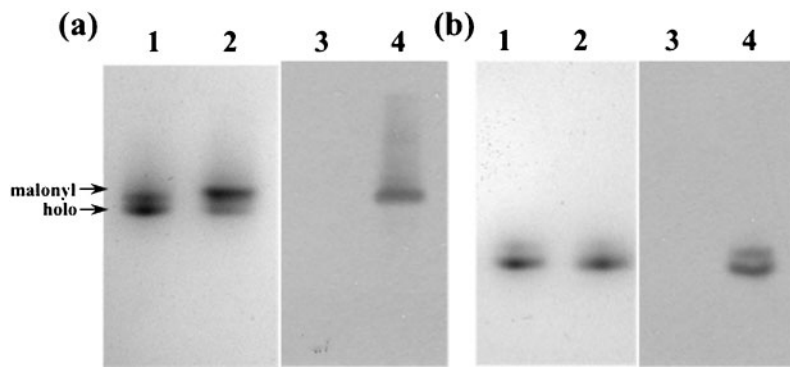


**Fig. 4.** *In vitro* 4'-phosphopantetheinylation of SMb20651 observed by MALDI-TOF MS. Spectra of SMb20651 incubated with CoA in the absence (a) or presence (b) of purified *S. meliloti* His-AcpS. Intensity is given in arbitrary units (a.u.).

SMb20651 that had been incubated with His-AcpS (Fig. 4). These values are in close agreement with the predicted masses for apo-SMb20651 (9305.51) and holo-SMb20651 (9644.51) lacking the initial methionine. The difference of 338.2 atomic mass units (a.m.u.) is consistent with the expected 339 a.m.u. for the 4'-phosphopantetheine addition, indicating that His-AcpS-treated SMb20651 is carrying the prosthetic group typical of ACPs. Therefore, AcpS attaches 4'-phosphopantetheine to SMb20651.

#### **SMb20651 is malonylated by FabD**

Malonyl CoA:ACP transacylase (FabD) is the enzyme responsible for the transfer of the malonyl group from malonyl-CoA to holo-ACP. The resulting product is an intermediate in the initiation and elongation steps during fatty acid and polyketide synthesis. We examined the *in vitro* transfer of the malonyl moiety from malonyl-CoA to SMb20651 by *S. meliloti* His-FabD. Conformation-sensitive electrophoresis of the reaction products shows a slower-migrating form of SMb20651 that appeared only when the protein was incubated with malonyl-CoA (Fig. 5a, lanes 1 and 2). It has been shown that NodF from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* can be malonylated *in vitro* using the enzyme FabD from *E. coli* (Ritsema *et al.*, 1998), and therefore we used *S. meliloti* NodF as a positive control in this study. Although no conformational change was observed when NodF<sub>Sm</sub> was incubated with malonyl-CoA and FabD<sub>Sm</sub> (Fig. 5b, lanes 1 and 2), the radioactive assays confirmed the incorporation of the malonyl group into both ACPs (Fig. 5, lanes 4).



**Fig. 5.** Malonylation of SMb20651 (a) or NodF (b) by FabD. Proteins were separated by conformation-sensitive PAGE. (a, b) Lanes 1 and 2, Coomassie blue-stained proteins; lanes 3 and 4, autoradiogram. (a, b) The proteins are: holo-ACP assayed without (lane 1) or with malonyl-CoA (lane 2), holo-ACP assayed without (lane 3) or with [ $^{14}$ C]malonyl-CoA (lane 4). The positions of malonyl-SMb20651 (malonyl) and holo-SMb20651 (holo) are indicated.

### SMb20651 is modified in *E. coli* when it is coexpressed with *S. meliloti* enzymes

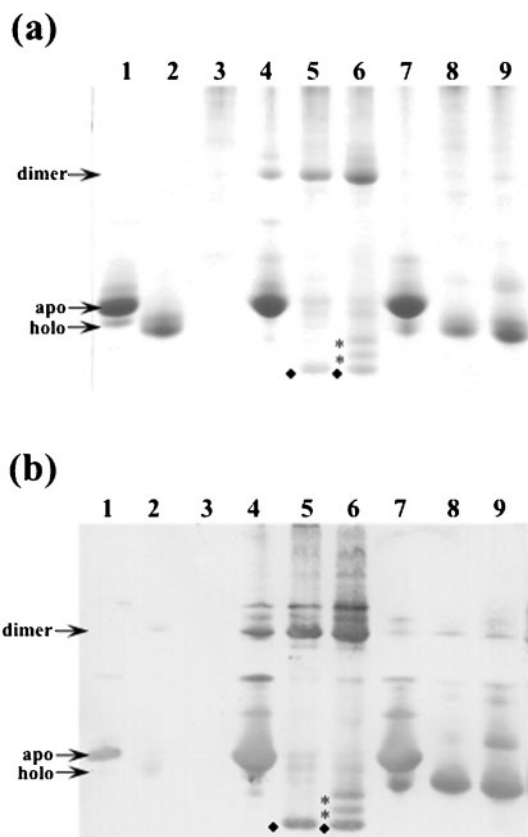
SMb20650 is a predicted long-chain fatty acyl-CoA ligase and its gene is cotranscribed with the gene for SMb20651. Although apo- and holo-SMb20651 show the same mobility in 20% native PAGE, they run significantly differently in conformation-sensitive gels (Fig. 6, lanes 1 and 2), and possible acylated forms are expected to have different mobilities in this type of gel (Post-Beittenmiller *et al.*, 1991). To test whether SMb20650 could be involved in the acylation of SMb20651, we coexpressed in *E. coli* the protein SMb20651 together with AcpS<sub>Sm</sub> and SMb20650 (by means of the plasmids pAL22 and pAL55). As controls, we expressed SMb20651 alone or together with AcpS<sub>Sm</sub> using plasmid pAL22. After DEAE-52 cellulose purification, the resulting proteins were analysed by conformation-sensitive PAGE. The *E. coli* strain carrying plasmid pAL20651 produces apo-SMb20651 (Fig. 6, lane 4). Surprisingly, besides the expected holo form (mainly migrating as a dimer), possible modified SMb20651 species were also detected when the protein was coexpressed with AcpS alone (Fig. 6, lane 5). When SMb20651 was coexpressed with AcpS and SMb20650, we detected two additional forms that are possibly acyl-SMb20651 (indicated by asterisks in Fig. 6, lane 6). The presence of the modification makes the proteins more compact so that they run significantly faster in these gels. After hydroxylamine treatment, which is known to cleave thioester linkages, all the possible modifications on SMb20651 disappeared, while holo-SMb20651 was increased (Fig. 6a, lanes 8 and 9), indicating that the hydroxylamine-sensitive forms of SMb20651 carry thioester-linked acylations. The identity of the proteins detected in *E. coli* as SMb20651 species was confirmed by Western blot analysis (Fig. 6b). These results suggest that *E. coli* enzymes can modify holo-SMb20651. GC analysis of CellPrep-purified SMb20651 obtained from *E. coli* BL21(DE3) (pLysS) (pAL22) (pAL55) revealed the presence of C12:0 and C18:0 fatty acids that were not detected in a similarly purified fraction obtained from the strain *E. coli* BL21(DE3) (pLysS) (pET9a) (data not shown).

### Different forms of SMb20651 are detected in *S. meliloti* 1021

SMb20651 is expressed in *S. meliloti* 1021 growing in complex TY and in minimal M9 medium in the exponential and stationary phases of growth (data not shown). SMb20651 was partially purified by DEAE-Sepharose chromatography from cell-free extracts obtained from *S. meliloti* 1021 cultures, and a similar mock purification was carried out from cell-free extracts of *S. meliloti* ALR30B1 as a control. When the *S. meliloti* SMb20651-enriched fractions were analysed by conformation-sensitive PAGE and tested with anti-His-SMb20651, five different SMb20651 forms were detected (Fig. 7b, lane 4). Presumably these forms could be holo- and modified species of holo-SMb20651. Two of these SMb20651 forms migrate slower than the possible holo-SMb20651; the other two migrate faster than the possible holo-SMb20651. No signal was detected in the mock purification of the control ALR30B1 (Fig. 7b, lanes 6 and 7). After hydroxylamine treatment, the possible modified proteins disappeared, while holo-SMb20651 was increased (Fig. 7b, lane 5). These results strongly indicate that SMb20651 is acylated in *S. meliloti*. Interestingly, the protein band indicated as X in lanes 4 and 5 (Fig. 7a) was obtained only in the enrichment procedure with *S. meliloti* 1021. This protein is not recognized by anti-His-SMb20651, is not sensitive to hydroxylamine treatment and is detected only in the presence of SMb20651. After hydroxylamine treatment of enriched samples of either wild-type or SMb20651 mutant, a fast doublet migrating band appeared (Fig. 7a, lanes 5 and 7). This band is probably the result of deacylation of different AcpP forms, since these doublets migrate similarly to purified holo-AcpP from *S. meliloti* 1021 (Fig. 7a, lane 8). From the results shown in lane 5 (Fig. 7a), it can be concluded that SMb20651 is far less abundant than AcpP, which is known to be one of the most abundant soluble proteins in the bacterial cell.

### Phenotypic characterization of SMb20651 mutants

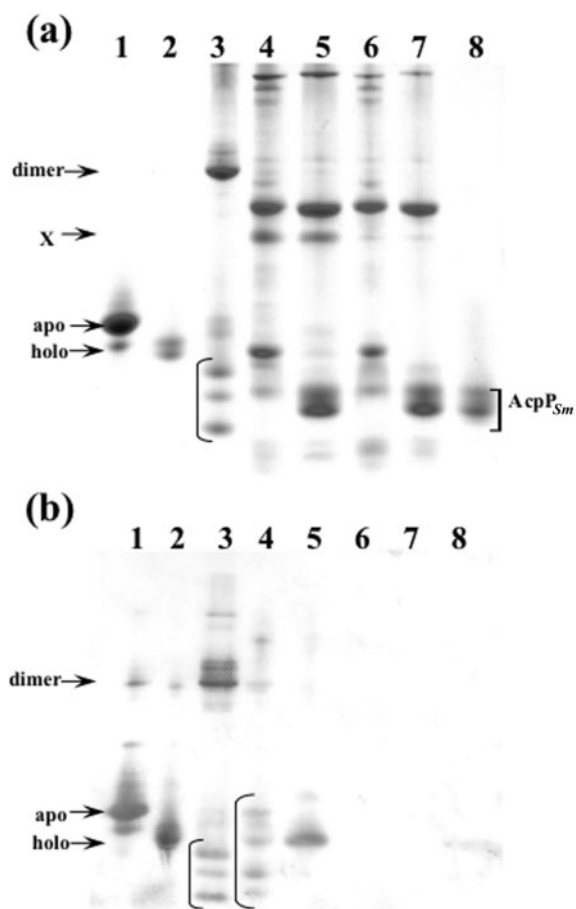
The mutant ALR30B1 presented no growth differences with respect to the wild-type 1021 when grown on TY



**Fig. 6.** Analysis of DE52-enriched SMB20651 proteins from different *E. coli* BL21(DE3) (pLysS) host strains. Proteins were partially purified by anion exchange on a DE52-cellulose column and separated by conformation-sensitive PAGE. (a) Coomassie blue staining of proteins. (b) Western blot detection using anti His-SMB20651 antibodies. The proteins analysed are: purified apo-SMB20651 (lane 1), purified holo-SMB20651 (lane 2); enrichment from *E. coli* BL21(DE3) (pLysS) overexpressing: nothing (empty pET9a plasmid) (lane 3), SMB20651 (lane 4), SMB20651 and AcpS<sub>Sm</sub> (lane 5), SMB20651, AcpS<sub>Sm</sub> and SMB20650 (lane 6); lanes 7, 8 and 9 contain the same samples as in lanes 4, 5 and 6, respectively, after hydroxylamine treatment. The two asterisks in lane 6 indicate the bands specifically formed after coexpression of the three proteins in *E. coli*, while the diamonds in lanes 5 and 6 indicate the band formed after coexpression of SMB20651 and AcpS. The positions of the dimer, apo and holo forms of SMB20651 are indicated.

medium or in any of the minimal media (M9, Robertsen or Sherwood). In addition, no differences were found when using different nitrogen sources for growth or TY medium with different concentrations of NaCl. Using filter-disk assays, no difference was found in sensitivity to the detergents SDS, DOC, CTAB, Triton X-100 and Brij 58, nor to the antibiotics gentamicin and polymyxin.

Alfalfa plants were inoculated with either ALR30B1 or the parental 1021 strain, and no significant differences in the number of nodules or in the course of nodule development



**Fig. 7.** Analysis of DEAE-enriched proteins from *S. meliloti* 1021 and ALR30B1. Proteins were separated by conformation-sensitive PAGE. (a) Coomassie blue staining of proteins. (b) Western blot detection using anti His-SMB20651 antibodies. The proteins analysed are: purified apo-SMB20651 (lane 1), purified holo-SMB20651 (lane 2), enrichment from *E. coli* BL21(DE3) pLysS overexpressing SMB20651, AcpS<sub>Sm</sub> and SMB20650 (lane 3), enrichment from *S. meliloti* 1021 (lane 4), enrichment from *S. meliloti* 1021 followed by hydroxylamine treatment (lane 5), enrichment from *S. meliloti* ALR30B1 (lane 6), enrichment from *S. meliloti* ALR30B1 followed by hydroxylamine treatment (lane 7), purified holo-AcpP<sub>Sm</sub> (lane 8). X indicates a protein band in lanes 4 and 5 that is present only in the enrichment from wild-type *S. meliloti*. The running positions of the dimer, apo and holo forms of SMB20651 as well as *S. meliloti* AcpP (AcpP<sub>Sm</sub>) are indicated. The brackets in lanes 3 and 4 enclose different forms of SMB20651 after overexpression of three proteins in *E. coli* and those observed in wild-type *S. meliloti*, respectively.

were observed. After 40 days, the nitrogen-fixing ability was measured and no significant differences were observed.

## DISCUSSION

*S. meliloti* has four well-characterized ACPs, one for the synthesis and transfer of essential fatty acids, and three

specialized ACPs whose functions are related to symbiotic interaction between rhizobia and their host plants (Geiger & López-Lara, 2002). Here, we present the characterization of SMb20651 as the fifth functional ACP of *S. meliloti*. Importantly, SMb20651 can be loaded with a malonyl residue, and the malonyl-ACP product is the building block in fatty acid synthesis and in the synthesis of some polyketides. In cultures of *S. meliloti*, holo and acylated forms of SMb20651 were detected, indicating that SMb20651 is metabolically active, probably in the formation and transfer of a fatty acid for which the function or final target molecule is not yet known. So far, the relevance of this pathway cannot be established, since we could not find any phenotype associated with the deletion of SMb20651, either in free-living bacteria or in symbiosis with alfalfa plants. In earlier expression profile experiments (Becker *et al.*, 2004), it has been found that both *smb20651* and *smb20650* are considerably repressed during symbiosis. Also, *nadE1*, *smb20650* and *smb20651* are repressed under iron-limiting conditions (Chao *et al.*, 2005). In another study, Domínguez-Ferreras *et al.* (2006) showed repression of *smb20651* and *smb20650* after osmotic shock with NaCl, although in RT-PCR experiments *smb20651* was induced twofold. While all these data confirm that *smb20651* and *smb20650* are part of an operon and that their products might function together, they offer no clue to the possible function of SMb20651. *smb20651* is part of an operon with *asnB* (encoding a putative asparagine synthetase) and *nadE1* (encoding a putative ammonium-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase). However, the operon is not essential for asparagine or NAD synthesis, since the mutant in *smb20651* can grow in minimal media.

The coexpression of SMb20651 with either *E. coli* AcpS or *S. meliloti* AcpS (SMc02654) leads to efficient *in vivo* labelling with [<sup>3</sup>H]β-alanine, but formation of holo-SMb20651 goes in parallel with reduced growth of the expressing strain and a remarkable reduction of the total amount of ACP present. The source of this seemingly toxic effect is probably the products formed by the coexpression, because expression of either SMb20651 alone or of AcpS together with SMb20651 (S40A), which cannot be phosphopantetheinylated, does not cause growth inhibition. Furthermore, we have observed that after coexpression of SMb20651 and AcpS in *E. coli*, a significant proportion of SMb20651 is modified not only to the holo form but also to acylated forms (Fig. 6). It is possible that by means of this modification the *E. coli* strain is being depleted of some essential substrates. The toxic effect is also observed after coexpression of RkpF and AcpS, and it would be interesting to study the molecular mechanism that causes this toxicity.

The overall amino acid sequence identity of SMb20651 to the other ACPs of *S. meliloti* ranges from 10 to 31 %, and a conserved amino acid region can only be observed around the phosphopantetheine binding site (Supplementary Fig. S2). With 31 % identity, AcpP is the most similar of the *S. meliloti* ACPs to SMb20651. However, among the ACP

homologues to SMb20651, regions of conserved amino acids are observed along the whole sequence of the proteins and cluster mainly in three regions (Supplementary Fig. S2). If SMb20651 is most similar to AcpP, it might replace AcpP in some of its functions.

SMb20650 is predicted to be a long-chain fatty acyl-CoA ligase (FadD), which activates acyl groups to acyl-CoAs. However, our results indicate that SMb20650 plays a role in the transfer of a specific product, presumably a long-chain fatty acid, to the ACP SMb20651. The soluble acyl-ACP synthetase (AasS) of *Vibrio harveyi* B392 links fatty acids to ACP and is a member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family (Jiang *et al.*, 2006). AasS of *V. harveyi* shows only 25 % identity to SMb20650 and therefore they are only distantly related.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to R. J. Cox, University of Bristol, for providing pRJC005. We thank Sandra L. Beltrán-Escobar for constructing plasmids pSBA01 and pSBD02. We are indebted to Miguel Angel Cevallos and Nicolás Gómez-Hernández for their invaluable help with the RT-PCR experiments. This work was supported by a grant from CONACyT/Mexico (49738-Q) with partial support from the Howard Hughes Medical Institute (HHMI 55003675). A.L.R.-V. was supported during the PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) and Dirección General de Estudios de Postgrado (UNAM).

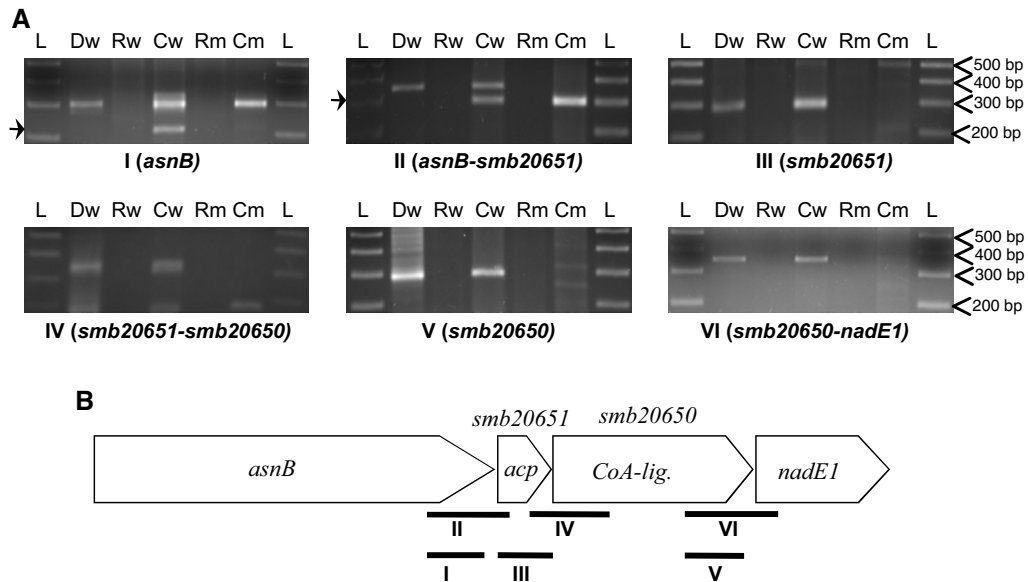
## REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäfer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F. & other authors (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 292–303.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188–198.
- Brozek, K. A., Carlson, R. W. & Raetz, C. R. (1996). A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J Biol Chem* **271**, 32126–32136.
- Burris, R. H. (1972). Nitrogen fixation assay-methods and techniques. *Methods Enzymol* **24**, 415–431.
- Byers, D. M. & Gong, H. (2007). Acyl carrier protein: structure–function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem Cell Biol* **85**, 649–662.
- Chao, T. C., Buhrmester, J., Hansmeier, N., Pühler, A. & Weidner, S. (2005). Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5969–5982.
- Cox, R. J., Hitchman, T. S., Byrom, K. J., Findlow, I. S., Tanner, J. A., Crosby, J. & Simpson, T. J. (1997). Post-translational modification of heterologously expressed *Streptomyces* type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *FEBS Lett* **405**, 267–272.

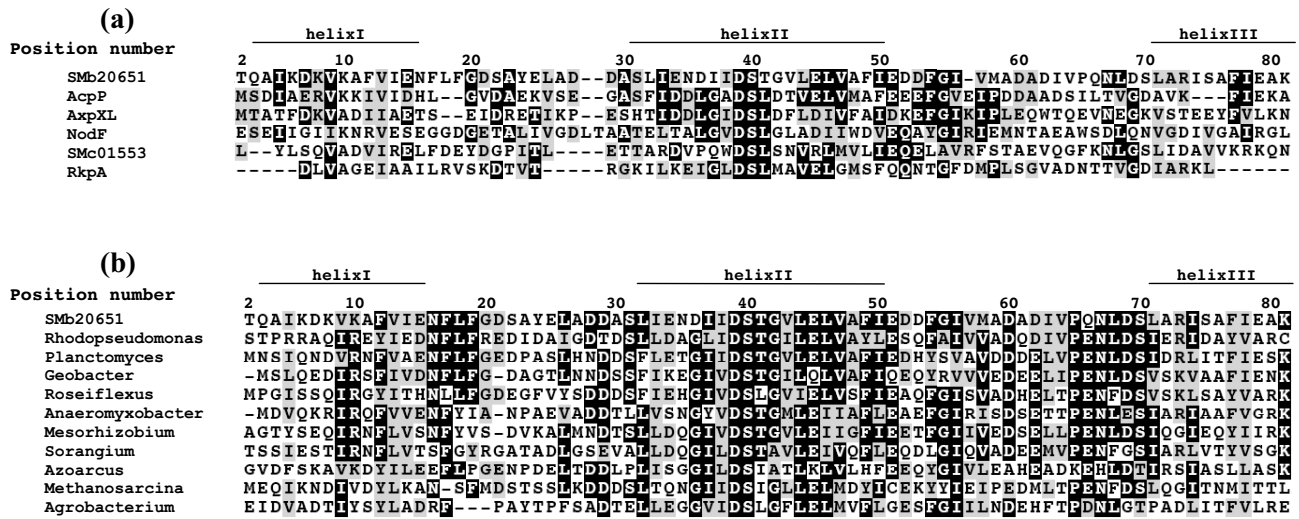


- Ditta, G., Schmidhauser, T., Jacobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R. & Helsinki, D. R. (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK29, useful for gene cloning and monitoring expression. *Plasmid* **13**, 149–153.
- Dominguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J. & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 7617–7625.
- Dulley, J. R. & Grieve, P. A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* **64**, 136–141.
- Epple, G., Van der Drift, K. M. G. M., Thomas-Oates, J. & Geiger, O. (1998). Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**, 4950–4954.
- Ferguson, G. P., Roop, R. M., II & Walker, G. C. (2002). Deficiency of *Sinorhizobium meliloti* *bacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with the alteration of cell envelope. *J Bacteriol* **184**, 5625–5632.
- Figurski, D. H. & Helsinki, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648–1652.
- Finan, T. M., Hartweg, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G. C. & Signer, E. (1984). General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **159**, 120–124.
- Flugel, R. S., Hwangbo, Y., Lambalot, R. H., Cronan, J. E. & Walsh, C. T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 959–978.
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 685–695.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A. & other authors (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668–672.
- Geiger, O. & López-Lara, I. M. (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol Lett* **208**, 153–162.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. (1989). Site directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1983). Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**, 15186–15191.
- Jiang, Y., Chan, C. H. & Cronan, J. E. (2006). The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry* **45**, 10008–10019.
- Kato, J. Y., Funa, N., Watanabe, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2007). Biosynthesis of  $\gamma$ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2378–2383.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., II & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host range vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Lai, J. R., Koglin, A. & Walsh, C. T. (2006). Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **45**, 14869–14879.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**, 923–936.
- López-Lara, I. M. & Geiger, O. (2000). Expression and purification of four different acyl carrier proteins. *Microbiology* **146**, 839–849.
- López-Lara, I. M. & Geiger, O. (2001). The nodulation protein NodG shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 349–357.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structure, and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 686–723.
- Olivares, J., Casadesus, J. & Bedmar, E. J. (1980). Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl Environ Microbiol* **39**, 967–970.
- Østeras, M., Boncopagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C. & Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* *bet* operon: choline-O-sulfate is metabolised into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11394–11399.
- Platt, M. W., Miller, K. J., Lane, W. S. & Kennedy, E. P. (1990). Isolation and characterization of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **172**, 5440–5444.
- Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J. G. & Ohlrogge, J. B. (1991). *In vivo* pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem* **266**, 1858–1865.
- Ritsema, T., Gehring, A. M., Stuitje, A. R., van der Drift, K. M., Dandal, I., Lambalot, R. H., Walsh, C. T., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. & Spaink, H. P. (1998). Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition. *Mol Gen Genet* **257**, 641–648.
- Robertsen, B. K., Aitman, P., Darvill, A. G., McNeil, M. & Alberstein, P. (1981). The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol* **67**, 389–400.
- Sambrook, J. & Russell, D. R. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Sherwood, M. T. (1970). Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* **33**, 708–713.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K. E. & Geiger, O. (2004). Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *J Bacteriol* **186**, 1667–1677.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of a T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60–89.

Edited by: M. F. Hynes



**Fig. S1.** RT-PCR analysis shows that genes *asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1* are encoded in an operon. **A)** Agarose gels of the RT-PCR amplification products. For each amplification product, five lanes are shown: Dw, positive control using DNA templates obtained from *S. meliloti* 1021; Rw, negative control (RNA without RT) to assess DNA contamination in RNA preparations (purified from *S. meliloti* 1021); Cw, RT-PCR using as template RNA isolated from *S. meliloti* 1021; Rm, negative control (RNA purified from *S. meliloti* ALR30B1, See Table 1 and Results); Cm, RT-PCR using as template RNA isolated from *S. meliloti* ALR30B1. L, 100 bp molecular weight marker. **B)** Scheme of *asnB*, *smb20651*, *smb20650* and *nadE1* arrangement. The thick-black lines below the physical map indicate the regions amplified by the primer pairs. Fragment I (260 bp) was amplified using primers *asnB1F* (tctagacatatgACGAAGCAGCCCTATCGC) and *asnB3R* (TTACGCGCCTCAGCCTT); Fragment II (357 bp) was amplified using primers *asnB1F* and *acp1R* (CTGTCCGCGAAGAGAAAGTTCT); Fragment III (267 bp) was amplified using primers *smb20651F* and *smb20651R* (See Table 2); Fragment IV (334 bp) was obtained using primers *acp2F* (tctagacatatgACAGCGCATACGAACTCGC) and *lig2R* (ATCGTGGAGTTCGTCGATTTT); Fragment V (273 bp) was amplified using primers *lig3F* (tctagacatatgAAGGAGGTCGAGACCGTG) and *smb20650R* (See Table 2); Fragment VI (343 bp) was obtained using primers *lig3F* and *nadE3R* (CTCCGCAGCTTCGTCGATTTT). Fragments II, IV and VI are amplifications of the intergenic regions between adjacent genes. The arrows in the gels for amplification of regions I and II denote non specific fragments.



**Fig. S2.** Multiple sequence alignment of the *S. meliloti* acyl carrier proteins (a) and selected Smb20651 homologues (b). Protein sequences were aligned using Multialign [Corpet, F. (1998). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 16, 10881-10890; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>] and shaded using BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Identical and conserved residues are shaded black and grey, respectively. The three  $\alpha$  helices and position numbers corresponding to the sequence of Smb20651 are indicated. Secondary structure prediction of Smb20651 was performed using APSSP2: Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server [Raghava, G. P. S. (2002). APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5* A-132; <http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/>].

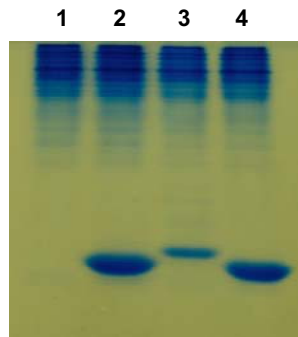
## RESULTADOS ADICIONALES.

### I. La serina 70 también es necesaria para la unión de la 4'-fosfopanteteína a la SMb20651.

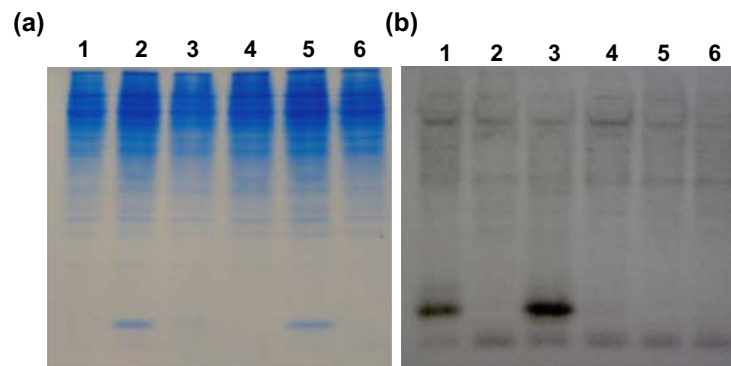
La serina 70 se encuentra altamente conservada entre los homólogos a SMb20651 y curiosamente está rodeada de los aminoácidos ácido aspártico (D) y leucina (L) (Fig. S2). Se construyó una mutante puntual en la que la S70 fue cambiada por alanina. La mutante puntual se generó por el método de "PCR overlap extension" (Ho *et al*, 1989). Los oligonucleótidos oAL3 (ver tabla 2 en manuscrito) y oAL(SA)R (5'-CGA AAT CCG CGC GAG CGC GTC GAG ATT TTG CGG GAC GAT GTC GGC-3') se usaron para amplificar 1209 pb de DNA desde la región que precede a *smb20651* (abarcando una parte del gen *asnB*) hasta 225 pb a partir del codón de inicio de *smb20651*. De la misma forma, los oligonucleótidos oAL(SA)F (5'-GCC GAC ATC GTC CCG CAA AAT CTC GAC GCG CTC GCG CGG ATT TCG-3') y oAL6 (ver tabla 2 en manuscrito) se usaron para amplificar 970 pb de DNA genómico desde 180 pb después del codón de inicio de *smb20651* hasta la región río abajo de *smb20651* (abarcando parte del gen *smb20650*). Los oligonucleótidos oAL(SA)F y oAL(SA)R introducen una mutación puntual (G a T) en el nucleótido 206, causando una sustitución del residuo serina 70 por alanina. Los productos de PCR se usaron como templado para una nueva PCR, donde el gen *smb20651* fue amplificado como se indica en el apartado "site directed mutagenesis" del manuscrito (Ramos-Vega *et al*, 2009).

Cuando la SMb20651 (S70A) es expresada en *E. coli*, se detecta una menor cantidad con respecto a la SMb20651 (Fig. 15, carriles 2 y 3). Esta

proteína tampoco puede ser modificada con 4'-fosfopanteteína (Fig. 16b, carril 4). Curiosamente, la movilidad de SMb20651 (S70A) es diferente a la SMb20651 en geles nativos, lo que indica un cambio en la conformación nativa de la proteína, que probablemente altera su reconocimiento por la AcpS (Fig. 15, carril 3).



**Fig. 15. La mutación S70A afecta la conformación nativa de SMb20651.** Análisis de los extractos crudos de *E. coli* OG7001 pLysS que sobreproducen a SMb20651 o a mutantes puntuales (S-A) de SMb20651. Las proteínas fueron separadas en un gel nativo al 20%. *E. coli* que sobreproduce: Nada, vector vacío pET9a (carril 1), SMb20651 (carril 2), SMb20651 S70A (carril 3) y SMb20651 S40A (carril 4).

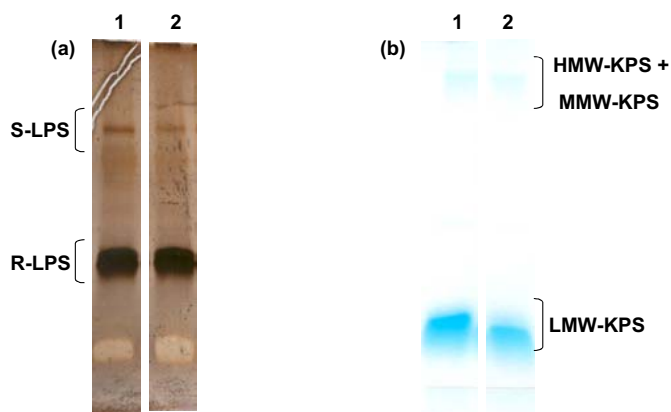


**Fig. 16. La serina 70 es necesaria para modificación de SMb20651 con 4'-fosfopanteteína.** Análisis de los extractos crudos de *E. coli* OG7001 pLysS que sobreproducen a diferentes SMb20651. **(a)** La proteínas fueron separadas en un gel nativo al 20% y teñidas con azul de Coomassie. **(b)** Autoradiografía después del marcaje con [ $^3$ H] $\beta$ -alanina. En **(a)** y **(b)**, los extractos crudos de *E. coli* que sobreproducen: SMb20651 y AcpS *in cis* (carril 1), SMb20651 (carril 2), SMb20651 y AcpS *in trans* (carril 3), SMb20651 (S70A) y AcpS *in trans* (carril 4), SMb20651 (S40A) y AcpS *in trans* (carril 5), AcpS (pET9a y pAL40) (carril 6).

## **II. No se detectan cambios en la membrana de las bacterias que carecen de SMB20651 que han sido crecidas en vida libre.**

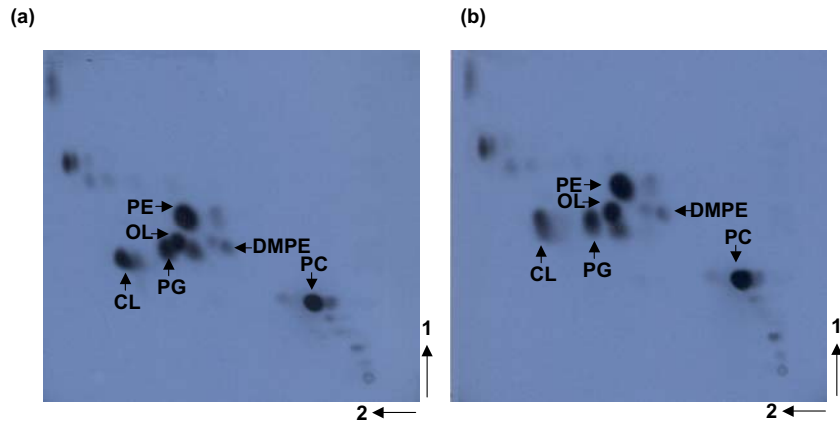
Por una parte se observó el perfil de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares de las cepas *S. meliloti* 1021 y ALR30B1 crecidas en vida libre. Para la extracción de lipopolisacáridos, las células se crecieron en medio PY con  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 4.5 mM hasta alcanzar una  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  de 0.6. Posteriormente los LPSs se extrajeron como se indica en Campbell *et al*, 2003. Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la extracción y los LPSs fueron separados en un gel de SDS al 16.5% (Schägger y von Jagow, 1987). Finalmente los geles fueron teñidos con plata como se indica (Campbell *et al*, 2003). La extracción y el análisis de KPSs fue por el método de TEA-EDTA, como se indica en Sharypova *et al* (2006).

Como se puede apreciar en la Fig. 17, no se detectan cambios en los perfiles de los LPSs ni de KPSs en la cepa ALR30B1 con respecto a la cepa silvestre. Para el caso de los LPSs, se pueden detectar tanto el LPS liso como el LPS rugoso (Fig. 17a). El perfil de LPSs observado es congruente con lo reportado anteriormente (Campbell *et al*, 2003). Para el caso de los KPSs, es posible detectar KPS de bajo peso molecular y en menor medida, KPS de alto peso molecular (Fig. 17b). El perfil de KPSs corresponde a lo reportado anteriormente (Sharypova *et al*, 2006).



**Fig. 17. Perfil de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares de *S. meliloti* 1021 y *Sm* ALR30B1.** Los lipopolisacáridos (a) fueron extraídos por el método mencionado en el texto, separados en un gel de acrilamida al 16.5% con SDS y Tricina y teñidos con nitrato de plata. Los polisacáridos capsulares (b) fueron extraídos como se menciona en el texto, separados en un gel de SDS y teñidos con la técnica de alcian blue. En (a) se observan: LPSs de *S. meliloti* 1021 (carril 1), LPSs de *Sm* ALR30B1 (carril 2). En la figura se pueden observar al LPS-liso (S-LPS) y LPS-rugoso (R-LPS). En (b) se muestra: KPSs de *S. meliloti* 1021 (carril 1), KPSs de *Sm* ALR30B1 (carril 2). En la figura se pueden observar a los polisacáridos de alto y medio peso molecular (HMW-KPS y MMW-KPS) y los polisacáridos de bajo peso molecular (LMW-KPS).

Adicionalmente, se analizó la composición de los fosfolípidos de membrana haciendo un marcaje *in vivo* con [1-<sup>14</sup>C]-acetato. Las bacterias se crecieron en medio PY o en medio mínimo M9 hasta una DO<sub>620nm</sub> de 0.6. Posteriormente, los lípidos se extrajeron con el método de Bligh y Dyer (1959) y se separaron por una cromatografía de capa fina en dos dimensiones como se indica (de Rudder *et al*, 1997). Los resultados muestran el perfil de lípidos de las cepas 1021 y ALR30B1 crecidos en M9, como se puede observar, no se detectan diferencias notables entre la cepa silvestre y la mutante (Fig. 18).



**Fig. 18. Perfil de lípidos de membrana de las cepas *Sm* 1021 y *Sm* ALR30B1 crecidas en medio M9.** La células fueron marcadas con [1-<sup>14</sup>C]-acetato como se indica en el texto, los lípidos fueron extraídos por el método de Bligh Dyer y separados por una TLC de dos dimensiones. **(a)** Perfil de *Sm* 1021, **(b)** Perfil de ALR30B1. Los lípidos marcados en (a) y (b) son: PE (fosfatidiletanolamina), CL (cardiolipina), PG (fosfatidilglicerol), OL (lípidos de ornitina), DMPE (dimetil-fosfatidiletanolamina) y PC (fosfatidil colina).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta la caracterización de la proteína SMb20651, una nueva ACP codificada en el genoma de *Sinorhizobium meliloti*. Hasta el momento se habían caracterizado cuatro ACPs de Rhizobia (López-Lara y Geiger, 2000), de las cuales una funciona durante la síntesis de ácidos grasos generales y tres funcionan en la síntesis de moléculas involucradas en la interacción de la bacteria con leguminosas.

Se ha demostrado que SMb20651 acarrea al grupo prostético de 4'-fosfopanteteína. En los experimentos de marcaje *in vivo* con [<sup>3</sup>H]β-alanina se encontró que la expresión endógena de AcpS del sistema heterólogo (*E. coli*) no es suficiente para detectar a SMb20651 en su forma activa holo-SMb20651. Se requieren copias extras de AcpS de *E. coli* o de AcpS de *S. meliloti*. Cuando se han expresado en *E. coli* a las cuatro ACPs de Rhizobia



AcpP, NodF, AcpXL y RkpF, estas se expresan mayoritariamente en su forma apo (es decir, no portan la 4'-fosfopanteteína). Sin embargo, en experimentos de marcaje *in vivo* con [<sup>3</sup>H]β-alanina, siempre es posible detectar la incorporación de la 4'-fosfopanteteína a las ACPs. Tal modificación se da por una actividad enzimática presente en *E. coli*, presumiblemente AcpS (López-Lara y Geiger, 2000). Éste es el primer caso descrito en el que una ACP de *Rhizobia* requiere de la coexpresión en *E. coli* de copias extra de alguna AcpS para ser detectada en su forma activa. Existen casos similares para ACPs de otras bacterias. Por ejemplo, para detectar mayor cantidad en *E. coli* de holo-ACP involucradas en la síntesis de los policétidos oxitetraciclina y griseusina de *Streptomyces* en su forma activa, es necesaria la coexpresión de copias extra de AcpS de *E. coli* (Cox *et al*, 1997). Algunas ACPs requieren la presencia de una fosfopanteteinil transferasa específica para ser activas. Un ejemplo de ello es EntF, que funciona para la síntesis del sideróforo enterobactina en *E. coli*. Cepas mutantes en la fosfopanteteinil transferasa (EntD) no pueden crecer en ambientes deficientes de hierro (Coderre y Earhart, 1989). En ensayos *in vitro*, se encontró que la apo-EntF no puede ser modificada a holo EntF por la enzima AcpS de *E. coli*, siendo necesaria la presencia de EntD para la formación de holo-EntF (Lambalot *et al*, 1996). En nuestro caso, se encontró que SMb20651 no necesita específicamente de AcpS de *S. meliloti*.

En el genoma de *S. meliloti* hasta el momento sólo se ha encontrado a la fosfopanteteinil transferasa AcpS (SMc02654). Por medio de análisis bioinformáticos, no se han detectado homólogos de otra fosfopanteteinil transferasa, ya sea de tipo Sfp o del tercer tipo de PPTs. Actualmente ya se

han realizado ensayos *in vitro* de transferencia de la 4'-fosfopanteteína a las 5 ACPs de *S. meliloti* (AcpP, NodF, AcpXL, SMb20651 y SMC01553) y al dominio ACP de RkpA. En estos ensayos se ha usado la enzima AcpS de *S. meliloti*. Se demostró que todas las ACPs son convertidas a su forma activa por la actividad de AcpS de *S. meliloti* (Dávila-Martínez *et al*, 2008).

Hay que notar que en SMb20651 el consenso alrededor del sitio predicho como sitio de unión a 4'-fosfopanteteína es diferente con respecto a las demás ACPs de *S. meliloti*, en éstas es DSL mientras que para SMb20651 es DST (Fig. S2). Sería interesante demostrar si esta treonina está involucrada en la afinidad de la ACP hacia la AcpS de *S. meliloti* o en el reconocimiento específico de SMb20651 por otra enzima que funcione en la síntesis de algún ácido graso o cétido en *S. meliloti*.

Adicionalmente, la proteína SMb20651 tiene otra serina en la posición 70 rodeada por ácido aspártico y leucina. Sin embargo, la mutante puntual S40A no es modificada con la 4'-fosfopanteteína, a pesar de que la S70 esté intacta. Curiosamente, en una mutante puntual en SMb20651 en la que la serina 70 fué cambiada por alanina tampoco se detecta modificación *in vivo* al ser coexpresada con AcpS de *S. meliloti* (Fig. 16). Además, esta mutante S70A muestra cambios conformacionales que son detectados en geles nativos (Fig. 15). Tanto la serina 70, como los aminoácidos alrededor de ella, están altamente conservados entre todos los homólogos a SMb20651 formando parte de un motivo aparente (Fig. S2). Probablemente este motivo está involucrado en el reconocimiento específico de la SMb20651 por la AcpS o también puede ser un sitio importante para la conformación nativa adecuada de la SMb20651.

La modificación con la 4'-fosfopanteteína además de incrementar el peso molecular de la proteína, va acompañada de cambios conformacionales. Estos cambios normalmente sugieren que la estructura de la proteína se torna más compacta y ya se habían descrito para proteínas como AcpP y RkpF (Epple *et al*, 1998). En ambos casos, la holo-ACP migra más rápido que la apo-ACP. En los geles con urea sensibles a conformación, se ha encontrado que diferentes acil-ACPs de cadena corta migran más lento, mientras que las acil-ACPs de cadena larga migran más rápido (Post-Beittenmiller *et al*, 1991, Schütt *et al*, 1998). Ésto se debe a que el grupo acilo protege a la ACP de la desnaturalización por urea y por el pH alto del sistema de electroforesis y por lo tanto, las acil-ACPs de cadena larga presentan una estructura más compacta. Es probable que las acil-SMb20651 que nosotros detectamos y que migran más rápido son acil-ACPs de cadena larga.

Se demostró *in vitro* que la holo-SMb20651 es modificada con el grupo malonil. La importancia de este resultado radica en que el malonil-ACP es una unidad de inicio y de extensión en las reacciones de condensación tanto para la síntesis de ácidos grasos como para la síntesis de policétidos. Esto indica que SMb20651 podría estar funcionando en cualquiera de las dos vías. En estos ensayos se observa que la malonil-SMb20651 migra más lento que la holo-SMb20651 en geles sensibles a conformación. Adicionalmente se utilizó a NodF de *S. meliloti* como control positivo, donde se observó que esta proteína también es convertida *in vitro* a malonil-NodF. Sin embargo, en nuestro sistema de geles sensibles a conformación, la malonil-NodF migra similar a la holo-NodF. Para NodF de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ya se había observado que la conversión de holo-NodF a malonil-NodF no está

acompañada de un cambio conformacional, sin embargo estas proteínas fueron separadas en geles nativos (Ritsema *et al*, 1998) y no en geles de urea. Adicionalmente Ritsema *et al* (2008) demostraron que la malonil-NodF no puede ser posteriormente convertida a acetoacetil-NodF al añadir acetil-CoA y FabH, por lo que se ha sugerido que esta proteína no participa en los pasos de inicio de la síntesis de ácidos grasos para factores de nodulación y que más bien participa durante los últimos pasos de la elongación del ácido graso. Tomando en cuenta estos resultados, sería interesante conocer si la malonil-SMb0651 posteriormente es sustrato de la enzima FabH de *S. meliloti*. De esta forma se podría obtener información sobre si esta ACP funciona en los primeros pasos de la síntesis de ácidos grasos. Adicionalmente, este experimento sería interesante ya que se ha demostrado que la actividad de FabH parece ser exclusiva para la síntesis de ácidos grasos. Por tal razón se denomina a esta reacción como un “branch point” que determina si la ACP funciona en la síntesis de ácidos grasos o a síntesis de policétidos (Florova *et al*, 2002). Actualmente se están llevando a cabo experimentos *in vitro* para ver si las malonil-ACPs de *Sinorhizobium meliloti* son sustrato de FabH para la formación de acetoacetil-ACP.

Los experimentos de coexpresión de la SMb20651 con SMb20650 sugieren que SMb20650 está involucrada en la acilación de SMb20651. Esta proteína ha sido anotada como una CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga, sin embargo, dada su interacción con SMb20651, se propone que SMb20650 une un ácido graso a la ACP. Las diferentes acil-SMb20651 detectadas se analizaron por cromatografía de gases. Se han

detectado a los ácidos grasos C12:0 y C18:0 asociados a la presencia de acil-ACP.

Resulta interesante que la holo-SMb20651 expresada en *E. coli* pueda ser detectada como acil-SMb20651, lo que indica que esta ACP es sustrato de otras enzimas de *E. coli*. Una de ellas podría ser la FabD y su producto malonyl-SMb20651 podría ser posteriormente modificado para la formación de un ácido graso más largo. Además se encontraron modificaciones específicas cuando la holo-SMb20651 es coexpresada con SMb20650 lo que sugiere que esta enzima está de alguna manera implicada en la acilación de SMb20651. En este punto surge la pregunta acerca de cuál es la actividad de SMb20650. Esta proteína está anotada como una acil-CoA ligasa específica para ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, dados los resultados obtenidos, es posible que esté implicada en la unión de un ácido graso a la SMb20651 y no a la CoA. Ya se ha demostrado que proteínas de la familia de las acyl-CoA ligasas de *Mycobacterium tuberculosis* funcionan como acil-AMP ligasas para la activación de ácidos grasos como acil-adenilatos y su posterior transferencia al dominio ACP de las policétido sintetasas (Trivedi *et al*, 2004). También se ha demostrado que la acil-ACP sintetasa soluble (AasS) de *Vibrio harveyi*, una enzima que forma parte de la familia de las acil-CoA sintetetasas, tiene la actividad de ligar ácidos grasos a una ACP (Jiang *et al*, 2006). Ya que se detectó la presencia ácidos grasos C12:0 y C18:0 en *E. coli*, asociados a la expresión de las acil-SMb20651, sería interesante demostrar *in vitro* si la SMb20650 puede ligar estos ácidos grasos directamente a la ACP. Adicionalmente, un análisis más sensible, por ejemplo por espectrometría de masas de las acil-SMb20651 expresadas desde *E. coli*

(sola, con AcpS y con AcpS y SMb20650), nos darían una mejor idea acerca de las posibles vías en las que está involucrada esta ACP y el papel que juega SMb20650 en la modificación de esta proteína.

Por medio de RT-PCR, se demostró que el gen *smb20651* forma parte de un operón con los genes *asnB*, *smb20650* y *nadE1* (Fig. S1). Curiosamente este operón está conservado no sólo en algunas Rhizobiales, además se encuentra en organismos muy diversos y con diferentes estilos de vida, como el caso de las archaeas. Este resultado sugiere que las cuatro proteínas codificadas por el operón forman parte de la misma vía metabólica. Es probable que el producto formado no esté necesariamente involucrado en la simbiosis con la planta. Aún no se conoce cuál es la actividad de AsnB y NadE1 en esta probable vía. Actualmente se sabe que AsnB y NadE1 no son esenciales para *S. meliloti* 1021, ya que la mutante en SMb20651 no es auxótrofa ni de asparagina ni de NAD. En bacterias existe una vía alternativa para la síntesis de asparagina. Esta vía involucra la transferencia de un grupo amido desde la glutamina a un aspartil-tRNA ( $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$ ), catalizada por la aspartil-tRNA amidotransferasa ( $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$ -amidotransferasa) (Min *et al*, 2002). Esta enzima está codificada por los genes *gatCAB*. En *S. meliloti* se han encontrado estos genes codificados en cromosoma y son: *smc01353* (*gatC*), *smc01352* (*gatA*) y *smc01350* (*gatB*). Por otra parte, NadE1 no es la única NAD sintetasa en el genoma de *S. meliloti*, existe además NadE2 que está codificada en cromosoma por el gen *smc00161*. Con respecto a estas proteínas y tomando en cuenta que no son esenciales, es interesante conocer cuál es su actividad y si está está funcionando en la síntesis de algún producto con SMb20651 y SMb20650. Tanto AsnB como NadE1

tienen similitud con amido transferasas. Una buena aproximación podría ser dada de manera similar a la que se ha hecho con SMb20650, buscando la presencia de modificaciones específicas al coexpresar a holo-SMb20651 con AsnB o NadE1. Existe la posibilidad de que estas dos proteínas funcionen transfiriendo un grupo amido a algún compuesto que sea sintetizado por alguna vía en la que también participa la SMb20651. Se ha encontrado en *Mycobacterium smegmatis* que AsnB, la única asparagina sintetasa del genoma, está involucrada en la resistencia a los antibióticos rifampicina, eritromicina, novobiocina y ácido fusídico. Curiosamente, se demostró que esta AsnB no es necesaria para la síntesis de asparagina, ya que mutantes en *asnB* no son auxótrofos para este aminoácido. Debido a que la resistencia a estos antibióticos depende de la pared celular de *Mycobacterium*, se ha propuesto que AsnB cataliza la reacción amidotransferasa desde glutamina a algún componente de la pared celular (Ren y Liu, 2006). Algo similar se ha propuesto para la AsnB (codificada por el gen *ItsA*) de *Corynebacterium glutamicum*, ya que mutantes en este gen son sensibles a lisozima (Hirasawa *et al*, 2000). El porcentaje de identidad entre la AsnB de *E. coli* K12 (una de las Asn sintetisas más estudiadas) y *M. smegmatis* es muy bajo, apenas del 29%, mientras que la identidad entre AsnB de *M. smegmatis* y *C. glutamicum* es del 63%. Al comparar la secuencia de AsnB de *S. meliloti* con la AsnB de *E. coli* y de *M. smegmatis*, se encontró que el porcentaje de identidad entre la AsnB de *S. meliloti* con cada proteína es similar, alrededor del 30%. Hasta el momento no se ha encontrado ningún fenotipo asociado a la ausencia de SMb20651 en vida libre o en simbiosis. Para buscar el fenotipo simbiótico, se hicieron cinéticas

de nodulación, se midió la fijación de nitrógeno y se hicieron ensayos de competencia. Sin embargo aún no se conoce el comportamiento de las mutantes durante la colonización a la planta, por lo que sería interesante hacer un seguimiento de las bacterias usando algún marcador fluorescente. Además de los experimentos mencionados en el manuscrito, se han analizado los perfiles de LPSs, KPSs y fosfolípidos de la cepa mutante en SMb20651 en vida libre crecida en medio completo. Como se muestra en los Resultados, no se han encontrado diferencias asociadas a la ausencia de la ACP. Para estos experimentos se han ensayado las condiciones de crecimiento en medio completo y en fase logarítmica de crecimiento, ya que en estas condiciones se ha detectado a la SMb20651. Sin embargo, aún se podrían analizar estos perfiles en otras condiciones, por ejemplo, después de haber crecido en bajo oxígeno o en pH ácido, que son condiciones que se asemejan al ambiente del nódulo.

Existe la posibilidad de que la función de SMb20651 sea complementada por otra ACP. Aunque como ya se ha observado, la identidad entre SMb20651 y otras ACPs es muy baja (Fig. S2). Sin embargo, sería interesante hacer mutantes dobles de diferentes ACPs. Ya que, como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo de las mutantes en algunas ACPs de *Rhizobia* como AcpXL aun no es claro. En *R. leguminosarum* se encontró que mutantes que no sintetizan AcpXL producen en vida libre LPSs que carecen de ácido 27-OH-C28:0. En simbiosis, estas mutantes tienen un fenotipo de nodulación retrasada con respecto a la cepa silvestre, sin embargo eventualmente nodula y fija nitrógeno casi igual que la cepa silvestre. Curiosamente, al ser analizados los LPSs de los bacteroides de la cepa



mutante por espectrometría de masas de MALDI-TOF, se encontró la presencia de ácido 27-OH-C28:0, por tal razón se ha propuesto que en nódulo se induce un mecanismo alternativo que reemplaza funcionalmente a AcpXL en la síntesis del ácido graso extralargo (Vedam *et al*, 2006). Adicionalmente existen mutantes condicionales en AcpP de *E. coli* (De Lay y Cronan, 2006). Sería interesante probar si SMb20651 puede complementar la función de AcpP como ya se ha hecho para otras ACPs (De Lay y Cronan, 2007).

La proteína SMb20651 es detectada en cultivos de *S. meliloti* que han sido crecidos en medio completo. Interesantemente, encontramos que la mayor cantidad de la SMb20651 detectada se encuentra como acil-SMb20651, encontrándose diferentes modificaciones asociadas a esta proteína. Estos resultados indican que SMb20651 es metabólicamente activa, sin embargo, aún no se conocen los productos que ésta proteína está acarreado. De las diferentes acil-SMb20651 detectadas en *S. meliloti*, sólo una presenta la misma movilidad a una de las acil-SMb20651 detectadas en *E. coli*, lo que sugiere que se podría tratar de un ácido graso, ya sea C12:0 o C18:0. También se encontró que otra de las acil-SMb20651 detectadas en *S. meliloti* tiene la misma movilidad que el malonil-SMb20651. En este aspecto sería interesante estudiar qué diferentes formas de acil-SMb20651 pueden ser detectadas en *S. meliloti* a diferentes tiempos o en diferentes medios, ya que la presencia de algunas, como malonil-SMb20651 que es una unidad de inicio y elongación podría cambiar y verse disminuída conforme pasa el tiempo. A la vez que la cantidad de otras acilaciones aumenta. También se podría detectar la presencia de nuevas formas aciladas. Nuevamente, es

indispensable conocer la naturaleza de los productos que SMb20651 acarrea, tanto en *S. meliloti*, como al ser expresada en su forma activa en *E. coli*, ya que esto nos dará la mejor información acerca de la vía en la que SMb20651 está funcionando.

## REFERENCIAS

- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarie, J. y Truchet, G. (1994). **Rhizobium meliloti lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses.** *The Plant Cell* 6: 1357-1374
- Becker, A., Fraysse, N. y Sharypova, L. (2005). **Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides.** *Mol Plant-Microbe Interact.* 18: 899-905
- Bergès, H., Checroun, C., Guiral, S., Garnerone, A.-M., Boistard, P. y Batut, J. (2001). **A glutamine-amidotransferase-like protein modulates FixT anti-kinase activity in Sinorhizobium meliloti.** *BMC Microbiology* 1, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/6>.
- Bligh, E. G. y Dyer, J. W. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol.* 37: 911-917
- Brozek, K., Carlson, R. W. y Raetz, C. R. H. (1996). **A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in Rhizobium.** *J Biol Chem* 271: 32126-32136
- Byers, D. y Gong, H. (2007). **Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family.** *Biochem Cell Biol.* 85: 649-662
- Campbell, G. R. O., Sharypova, L. A., Scheidle, H., Jones, K., Niehaus, K., Becker, A. y Walker, G. (2003). **Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of Sinorhizobium meliloti mutants.** *J Bacteriol.* 185: 3853-3862
- Chan, Y., Boyne, M. T., Podevels, A. M., Klimowicz, A. K., Handelsman, J., Kelleher, N. L. y Thomas, M. G. (2006). **Hydroxymalonyl-acyl carrier protein (ACP) and aminomalonyl-ACP are two additional type I polyketide synthase extender units.** *Proc Natl Acad Sci.* 103: 14349-14354
- Coderre, P. E. y Earhart, E. F. (1989). **The entD gene for Escherichia coli K12 enterobactin gene cluster.** *J Gen Microbiol.* 135: 3043-3055
- Copp, J. N. y Neilan, B. A. (2006). **The phosphopantetheinyl transferase superfamily: phylogenetic analysis and functional implications in cyanobacteria.** *Appl Environ Microbiol.* 72: 2298-2305
- Cox, R., J., Hitchman, T. S., Byrom, K. J., Findlow, I. S., Tanner, J. A., Crosby, J. y Simpson, T. J. (1997). **Post-translational modification of heterologously expressed Streptomyces type II polyketide synthase acyl carrier proteins.** *FEBS Lett.* 405: 267-272
- Cronan, J. Jr. y Waldrop, G. L. (2002). **Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases.** *Prog Lipid Res.* 41: 407-435
- Dávila-Martínez, Y., Ramos-Vega, A. L., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O. y López-Lara, I. **Characterization of a novel acyl carrier protein SMc01553 from Sinorhizobium meliloti.** Poster presentado en *8th European Nitrogen Fixation Conference.* 30 August to 3 September 2008, Gante, Bélgica.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Denarié y Boivin, C. (2001). **nod genes and Nod signals and the evolution of the Rhizobium legume symbiosis.** *Acta Biochim Pol.* 48: 359-365
- De Lay, N. R. y Cronan, J. E. (2006). **Gene-specific random mutagenesis of Escherichia coli in vivo: Isolation of temperature-sensitive mutations in the acyl carrier protein of fatty acid synthesis.** *J Bacteriol.* 188: 287-296

- De Lay, N. R. y Cronan, J. E. (2007). **In vivo functional analyses of the type II acyl carrier proteins of fatty acid biosynthesis.** *J Biol Chem.* 282: 20319-20328
- de Rudder, K. E. E., Thomas-Oates, J. E. y Geiger, O. (1997). **Rhizobium meliloti mutants deficient in phospholipid N-methyltransferase still contain phosphatidylcholine.** *J Bacteriol.* 179: 6921-6928
- Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Dénarie, J. y Promé, J. C. (1993). **Role of the Rhizobium meliloti nodF and nodE genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors.** *J Biol Chem.* 268: 20134-20142
- Epple, G., van der Drift, K. M., Thomas-Oates, J. y Geiger, O. (1998). **Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in Sinorhizobium meliloti.** *J Bacteriol.* 180: 4950-4954
- Ferguson, G. P., Datta, A., Carlson, R. W. y Walker, G. (2005). **Importance of unusually modified lipid A in Sinorhizobium stress resistance and legume symbiosis.** *Mol Microbiol.* 68-80
- Fischbach, M. A. y Walsh, C. (2006). **Assembly line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms.** *Chem Rev.* 106: 3468-3496
- Florova, G., Kazanina, G. y Reynolds, K. A. (2002). **Enzymes involved in fatty acid and polyketide biosynthesis in Streptomyces glaucenscens: Role of FabH and FabD and their acyl carrier protein specificity.** *Biochemistry* 41: 10462-10471
- Franklin, M. y Ohman, D. (1996). **Identification of algI and algJ in the Pseudomonas aeruginosa alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O acetylation.** *J Bacteriol.* 178: 2186-2195
- Fuqua, C., Parsek, M. y Greenberg, P. (2001). **Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing.** *Annu Rev Genet.* 35: 439-468
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Bowtry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R., W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycky, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. y Batut, J. (2001). **The composite genome of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti.** *Science* 293, 668-672.
- Fuqua, C. y Greenberg, E. P. (2002). **Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 685-695
- Gao, J., Weissenmayer, B., Taylor, A. M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I. y Geiger, O. (2004). **Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids.** *Mol Microbiol.* 53: 1757-1770.
- Geiger, O., y López-Lara, I. M. (2002). **Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts.** *FEMS Microbiol Lett.* 208: 153-162

- Geiger, O., Spaink, G. y Kennedy, E. P. (1991). **Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group.** *J Bact.* 173: 2872-2878
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M. y Thomas-Oates, J. E. (1999). **The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*.** *Mol Microbiol.* 32: 63-73
- Gokhale, R., Sankaranarayanan, R. y Mohanty, D. (2007). **Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity.** *Curr Opin Struct Biol.* 17: 736-743
- Hardie, K. R., Issartel, J. P., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V. (1991). ***In vitro* activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide.** *Mol Microbiol.* 5: 1669-1679
- Hirasawa, T., Wachi, M. y Nagai, K. (2000). **A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ItsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production.** *J Bacteriol* 182: 2696-2701
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. y Pease, L. (1989). **Site directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction.** *Gene* 77: 51-59
- Issartel, J-P., Koronakis, V. y Hughes, C. (1991). **Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation.** *Nature* 351: 759-761
- Jackowski, S., Jackson, P. D. y Rock, C. (1994). **Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*.** *J Biol Chem.* 269: 2921-2928
- Jiang, Y., Chan, C. H. y Cronan, J. E. (2006). **The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harvey* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family.** *Biochemistry* 45: 10008-10019
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W. Taga, M. E. y Walker, G. (2007). **How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model.** *Nature Rev Microbiol.* 705: 619-633
- Kiriukhin, M. Y. y Neuhaus, F. (2001). **D-Alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation.** *J Bacteriol.* 183: 2051-2058
- Koebnik, R. (2005). **TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule?.** *Trends Microbiol.* 13: 343-347
- Lambalot, R. H. y Walsh, C. T. (1995). **Cloning, overproduction and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase.** *J Biol Chem.* 270: 24658-25661
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., La Celle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. y Walsh, C. T. (1996). **A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases.** *Chem Biol.* 3: 923-936
- López-Lara I. M. y Geiger, O. (2000). **Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins.** *Microbiology* 146: 839-849
- López-Lara, I. M., Gao, J., Soto, M. J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., Verroios, G. P., Thomas-Oates, J. y Geiger, O. (2005). **Phosphorous-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorous-limiting conditions of growth.** *Mol Plant-Microbe Interact.* 18: 973-982.

- Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H., Howe, J., Brandenburg, K. y López-Goñi, I. (2005). **The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides.** *J Bacteriol.* 187: 5631-5639
- Mazmudar, J. y Striepen, B. (2007). **Made it or take it: fatty acid metabolism of apicomplexan parasites.** *Euk Cell.* 6: 1727-1735
- Mc Allister, K., Peery, R. B. y Zhao, G. (2006). **Acyl carrier protein synthases from gram-negative, gram-positive and atypical bacterial species: Biochemical and structural properties and physiological implications.** *J Bacteriol.* 188: 4737-4748
- Min, B., Pelaschier, J. T., Graham, D., Tumbula-Hansen, D. y Söll, D. (2002). **Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: An essential route to asparagine formation.** *PNAS* 99: 2678-2683
- Mootz, H., Finking, R. y Marahiel, M. (2001). **4'-Phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*.** *J Biol Chem.* 276: 37289-37298
- Miyanga, A., Funa, N., Awakawa, T. y Horinouchi, S. (2007). **Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 871-876
- Neuhaus, F. C. y Baddiley, J. (2003). **A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 686-723
- Paoletti, L., Lu, Y.-J., Schujman, G. E., de Mendoza, D. y Rock, C., (2007). **Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol.* 189: 5816-5824
- Platt, M. W., Miller, K. J., Lane, W. S. y Kennedy, E. (1990). **Isolation and characterization of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*.** *J Bacteriol.* 172: 5440-5444
- Post-Beittenmiller, D. P., Jawoski, J. G. y Ohlrogg, J. B. (1991). **In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach.** *J Biol Chem.* 266: 1858-1865
- Quadri, L. E. N., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. y Walsh, C. T. (1998). **Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases.** *Biochemistry.* 37: 1585-1595
- Raetz, C. y Whitfield, C. (2002). **Lipopolisaccharide endotoxins.** *Annu Rev Biochem.* 71: 635-700
- Ramos-Vega, A.L., Dávila-Martínez, Y., Sohlenkamp, C., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O. and López-Lara, I. M. (2009). **Smb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*.** *Microbiology.* 155: 257-267
- Raetz, C., Reynolds, M., Trent, M.S. y Bishop, R. (2007). **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria.** *Annu Rev Biochem.* 76: 295-329
- Ren, H. y Liu, J. (2006). **AsnB is involved in natural resistance of *Mycobacterium smegmatis* to multiple drugs.** *Antimicrob Agents Chemother* 50: 250-255
- Ritsema, T., Gehring, A. M. Stuitje, A. R., van der Drift, K. M. G. M. Dandal, I., Lambalot, R. H., Walsh, C. T., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. (1998). **Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for portein recognition.** *Mol Gen Genet.* 257: 641-648

- Rock, C. (2008). **Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes**. D. E. Vance and J. E. Vance (Eds.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (5th Edn.)*. New Comprehensive Biochemistry. Elsevier. The Netherlands, pp: 59-96
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa**. *Anal Biochem.* 166: 368-379
- Schütt, B. S., Brummel, M., Schuch, R. y Spener, F. (1998). **The role of acyl carrier protein isoforms from *Cuphea lanceolata* seeds in de-novo biosynthesis of medium-chain fatty acids**. *Planta* 205: 263-268
- Sharypova, L. Niehaus, K., Scheidle, H., Holst, O. y Becker, A. (2003). ***Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow-migrating form of LPS**. *J Biol Chem.* 278: 12946-12954
- Sharypova, L. A., Chataigné, G., Fraysse, N., Becker, A. y Poinso, V. (2006). **Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide form *Sinorhizobium meliloti* Rm 1021**. *Glycobiology* 16: 1181-1193
- Sonda, S. y Hehl, A. (2006). **Lipid biology of apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii***. *Trends Parasitol.* 22: 41-47
- Soto, M. J., Fernández-Pascual, M., Sanjuan, J. y Olivares, J. (2002). **A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots**. *Mol Microbiol.* 43: 371-382
- Sun, Y., Hong, H., Gillies, F., Spencer, J. y Leadlay, P. (2008). **Glycerol-S-Acyl carrier protein as an intermediate in the biosynthesis of tetrone antibiotics**. *ChemBiochem* 9: 150-156
- Therisod, H., Weissborn, A. C. y Kennedy, E. P. (1986). **An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane derived oligosaccharides of *Escherichia coli***. *PNAS* 83: 7236-7240
- Therisod, H. y Kennedy, E. P. (1987). **The function of acyl carrier protein in the synthesis of membrane-derived oligosaccharides does not require its phosphopantetheine prosthetic group**. *PNAS* 84: 8235-8238
- Trent, M. S., Worsham, L. M.S. y Ernst-Fonberg, L. (1998). **The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase**. *Biochemistry* 37: 4644-4652
- Trivedi, O. A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D. y Gokhale, R. (2004). **Enzymatic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria**. *Nature* 428: 441-445
- Vedam, V., Kannenberg, E. L., Haynes, J., Sherrier, D. J., Datta, A. y Carlson, R. W. (2003). **A *Rhizobium leguminosarum* *AcpXL* mutant produces lipopolysaccharide lacking 27-hydroxyoctacosanoic acid**. *J Bact.* 185: 1841-1850
- Vedam, V., Kannenberg, E., Datta, A., Brown, D., Haynes-Gann, J. G., Sherrier, D. J., y Carlson, R. W. (2006). **The pea nodule environment restores the ability of a *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide *acpXL* mutant to add 27-hydroxyoctacosanoic acid to its lipid A**. *J Bact.* 188: 2126-2133
- Walsh, C. (2003). **Antibiotics. Actions, origins, resistance**. *ASM Press*. Washington , D. C.

-Weidenmeier, C. y Peschel, A. (2008). **Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions.** *Nature Rev Microbiol.* 861: 276-287

-White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y-M. y Rock, C. (2005). **The structural biology of type II fatty acid biosynthesis.** *Annu Rev Biochem* 74: 791-831

-Zhang, Y-M. y Rock, C. (2008). **Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis.** *J Lip Res.* 49: 1867-1874