



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FUNCIONES DE LOS DIFERENTES HOMÓLOGOS A ACIL- COENZIMA A SINTETASA ESPECÍFICA PARA ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA (FadD) EN *Sinorhizobium meliloti*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

IBQ ÁNGEL DE LA CRUZ PECH CANUL

TUTORA: DRA. ISABEL MARÍA LÓPEZ LARA.

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

CUERNAVACA, MOR.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



“In lak’ ech, a lak’ en”

(Tú eres yo y yo soy tú)

Síntesis de la filosofía Maya que hay que llevar a cabo en la vida
y base para lograr las más caras realizaciones del ser humano

“Le kéen paal u k’aat kaanbal xook,
kex yóok’ol koot,
u kaanba”

(Cuando un niño desea aprender en la escuela;
aunque los pupitres sean piedras,
aprende)

A. Pech Tukuch

Agradecimientos.

A la UNAM por abrirme sus puertas y adoptarme como uno más de sus pequeños.

Al CONACyT por la beca otorgada, sin la cual no hubiese sido posible este trabajo.

A todo el personal del PDCB.

A los jefazos del grupo: **Isabel**, Otto, y Christian. Por darme la oportunidad y el espacio para aprender bajo su tutela.

A Mariano por su gran apoyo académico, y sobre todo moral.

A mis colegas cercanos del grupito: Miguel, Diana, Mario, Emilio, todos los egresados y todos los “genomaguitos” que han desfilado en el grupito.

A todos los compañeros del Lab II por su camaradería y por todo el tiempo que compartimos juntos: Esperanza, Julio, Mónica, Ivonne, Ernesto, Toño, Martha, Tania, Tabita, Arturo... y demás compañeros que han desfilado por ese laboratorio.

A Jesús (q.e.p.d.) por aquellas charlas en las jornadas nocturnas.

Al valioso apoyo de Don Martín, Araceli, Toña, Luci y Don Jorge (en su tiempo).

A mis dos grandes amigos de la vida: Pompeyo y Jairo, por su cálida camaradería y aquellas pláticas de ciencia y otras cosas.

A toda mi familia (desmesuradamente grande para enlistarla).

A Demiurgo por su compañía en este proyecto culminado.

Por ultimo, y por tanto la más importante;

A mi compañera de la vida, Rosa.

Contenido.

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
Summary.....	7
1. Introducción.....	9
1.1. Membranas bacterianas.....	9
1.2. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias y su transferencia a la membrana.....	11
1.3. Degradación de ácidos grasos en bacterias.....	14
1.4. Biosíntesis de los fosfolípidos de membrana.....	16
1.5. Lipopolisacáridos (LPS).....	20
1.6. Otras moléculas derivadas de los ácidos grasos.....	21
1.7. Respuesta de la membrana a diferentes estímulos ambientales.....	24
1.8. Motilidad bacteriana.....	27
2. Antecedentes.....	31
3. Objetivo general:.....	35
3.1. Objetivos particulares:.....	35
4. Resultados.....	37
4.1 Artículo publicado.....	37
4.2. Resultados adicionales.....	59
4.2.1. La cepa mutante en <i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i> produce dodecanal y 2-tridecanona.....	59
4.2.2. La 2-tridecanona provoca la motilidad de <i>S. meliloti</i> GR4.....	64
4.2.3. <i>S. meliloti</i> 1021FDC5 (<i>fadD</i> ⁻) no es más sensible que la cepa silvestre a la acción de agentes desestabilizantes de la membrana pero sí es más susceptible al crecimiento en alta osmolaridad.....	66
4.2.4. <i>S. meliloti</i> posee varios genes homólogos a <i>fadD</i> (<i>smc02162</i>).....	70
4.2.4.1. Las mutantes en <i>smc0150</i> o en <i>smc20650</i> no acumulan ácidos grasos durante la fase estacionaria de crecimiento ni presentan fenotipo de “swarming”.....	72
4.2.4.2. <i>smc0150</i> o <i>smc20650</i> no complementan a <i>S. meliloti</i> mutante en <i>smc02162</i>	74
4.2.5. El gen <i>fadD</i> de <i>E. coli</i> complementa parcialmente a la mutante <i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i>	77
4.2.6. La mutación de <i>smc02079</i> en <i>S. meliloti</i> no afecta el transporte de ácidos grasos.....	79
4.2.7. La mutación de <i>fadD</i> en <i>E. coli</i> afecta la supervivencia de las células durante la fase estacionaria de crecimiento.....	82
Discusión.....	85
Referencias bibliográficas.....	93
Apéndice.....	99
Protocolos y recetas.....	121

Abreviaturas.

aa: aminoácido

ACC: acetil-CoA carboxilasa.

ACP: proteína portadora de grupos acilo.

ADN: ácido desoxiribonucleico.

AG: ácidos grasos.

AHK: α -hidroxicetonas.

AHL: *N*-acilhomoserina lactona.

ATP: trifosfato de adenosina.

CDP: citidina difosfato.

CMP: citidina monofosfato.

CL: cardiolipina.

CoA: coenzima A.

COG: conjunto de grupos ortólogos.

DAG: diacilglicerol.

DGTS: *N,N,N*-trimetilhomoserina.

DMPE: dimetil-PE.

DO_{620nm}: densidad óptica a 620 nm.

DOC: desoxicolato de sodio.

FAS: sintasa de AG.

G3P: glicerol-3-fosfato.

GC/MS: cromatografía de gases acoplada
a espectrometría de masas.

LPA: ácidos lisofosfatídico.

LPS: lipopolisacáridos.

MDO: oligosacáridos derivados de
la membrana.

ME: membrana externa.

MI: membrana interna o citoplasmática.

MM: medio mínimo.

MMPE: monometil-PE.

OL: lípido de ornitina.

ORF: marco abierto de lectura.

PA: ácido fosfatídico.

pb: pares de bases.

PC: fosfatidilcolina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: fosfatidiletanolamina.

PG: fosfatidilglicerol.

PGP: fosfatidilglicerol fosfato.

PI: fosfatidilinositol.

PS: fosfatidilserina.

RT-PCR: PCR en tiempo real.

SAM: *S*-adenosilmetionina.

SD: desviación estándar.

SDS: dodecilsulfato sódico.

TLC: cromatografía de capa fina.

ua: unidades arbitrarias

UFC: unidades formadoras de colonias.

Resumen.

Los ácidos grasos (AG) están presentes en distintos aspectos de la vida celular, como son los de fungir como fuente de carbono y energía, precursores para la formación de la membrana celular o biosurfactantes, entre otras. En bacterias, la síntesis de AG se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de elongación por condensación, las cuales son catalizadas por un conjunto de proteínas altamente conservadas que en conjunto se le denomina sintasa de AG tipo II (FAS II). El gen *fadD* codifica para una acil-CoA sintetasa específica para AG de cadena larga (FadD). Esta enzima funciona en el primer paso de activación de los AG libres, para que éstos puedan ser dirigidos a la degradación. *Sinorhizobium meliloti* es una bacteria de vida libre que habita en el suelo y es conocida por su habilidad para inducir la formación de nódulos en las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). En *S. meliloti* se ha descrito que la mutación en el gen *fadD* provoca el fenotipo de nado en enjambre o “swarming”. Además, la cepa mutante en *fadD* presenta un defecto en el establecimiento de simbiosis con su planta hospedadora de alfalfa y una regulación distinta a la cepa silvestre en la expresión de los genes de nodulación, de quimiotaxis y de motilidad. Además de *smc02162* (*fadD*), el genoma de *S. meliloti* revela la existencia de varios genes cuyo producto codifica para posibles FadDs. Entre ellos, las proteínas codificadas por *sma0150* y *smb20650* presentan el mayor porcentaje de identidad y similitud a FadD. SMA0150 y SMB20650 no han sido caracterizadas previamente. En este trabajo se encontró que la ausencia de *fadD* en *S. meliloti*, además de los fenotipos descritos anteriormente, provoca la acumulación de AG libres de cadena larga. La composición de éstos, así como los resultados obtenidos al marcar específicamente los AG esterificados con una $\Delta 5$ -desaturasa, demostraron que los AG acumulados provenían de los lípidos de membrana. Un fenómeno similar se encontró en una mutante en *fadD* de *Escherichia coli*; y con ayuda de este microorganismo modelo, se determinó que la acumulación de AG es producto de un probable remodelado de los lípidos de la membrana y no de la lisis celular. Los análisis de expresión por microarreglos en *S. meliloti* revelan que se requiere un FadD funcional para la activación de los genes involucrados en la degradación de AG. Además, los análisis de la expresión sugieren que en la cepa silvestre los AG liberados se degradan por β -oxidación en fase estacionaria.

En la cepa mutante en *fadD* *S. meliloti* QS77, además de los AG acumulados se detectó la presencia de dodecanal y 2-tridecanona. Ninguna de estas dos moléculas ni los AG examinados es capaz de promover el fenotipo de “swarming” en la cepa silvestre. Sin embargo, la 2-tridecanona es capaz de inducir la motilidad independiente de flagelos de la cepa silvestre. La mutación individual de *sma0150* o de *smb20650* no promueve el fenotipo de “swarming” ni la acumulación de AG libres. Además, tanto SMA0150 como SMB20650 no son capaces de suplir la función *in vivo* de FadD. Por lo tanto estas proteínas deben tener una función distinta a la de FadD.

Summary.

Fatty acid metabolism pervades large areas of cellular life. Fatty acids can be used as carbon source and energy source, as precursors for cell membrane biosynthesis or as biosurfactants, among others. In bacteria, fatty acid synthesis is achieved through a series of elongations by condensation reactions which are catalyzed by a highly conserved set of proteins which together are known as type II fatty acid synthase (FAS II). The *fadD* gene encodes a long chain acyl-CoA synthetase (FadD). This enzyme activates long chain fatty acids with CoA, so that they can be targeted to degradation. *Sinorhizobium meliloti* is a nitrogen-fixing bacterium able to induce the formation of nodules in alfalfa (*Medicago sativa*). A *fadD* mutant of *S. meliloti* shows swarming phenotype and a defective plant-host interaction. The genome of *S. meliloti* reveals the existence of several ORFs with homology to *fadD*. Among them, the proteins encoded by *sma0150* and *smb20650* have the highest degree of identity and similarity to FadD. Additionally, such proteins have not been characterized previously. In this work we found that, in addition to the phenotypes described above, the absence of *fadD* in *S. meliloti* leads to an accumulation of long chain free fatty acids. The fatty acid composition, as well as the results obtained by tagging specifically esterified fatty acids with a $\Delta 5$ -desaturase, identified membrane lipids as the main source of the long chain fatty acids accumulated. A similar phenomenon was found in a *fadD* mutant of *Escherichia coli*, and with the help of this model organism, it was determined that fatty acid accumulation is due to a probable membrane lipid remodeling process, and cell lysis was discarded as the main source of fatty acid accumulation. Furthermore, expression analysis performed with *S. meliloti* revealed that a functional FadD is required for the upregulation of genes involved in fatty acid degradation and suggested that in the wild-type strain, the fatty acids released from membrane lipids are degraded by β -oxidation in the stationary phase of growth.

In addition, we found that the *fadD* mutant *S. meliloti* QS77 produces dodecanal and 2-tridecanone. Neither of these two molecules nor the fatty acids tested can promote swarming motility of the wild type strain. However, 2-tridecanone is able to induce flagella-independent motility in the wild type strain. Mutation in *sma0150* or *smb20650* in *S. meliloti* does not promote swarming motility or fatty acid accumulation. Furthermore, neither Sma0150 nor Smb20650 are able to replace FadD *in vivo*. Therefore, these proteins might have a function different to that of FadD.

1. Introducción.

1.1. Membranas bacterianas.

En todas las células vivas el interior está separado del medio externo por un límite denominado membrana celular o membrana plasmática. La membrana celular separa el contenido celular del exterior y funciona también como una barrera selectiva para la entrada o salida de sustancias. Más aún, las membranas no son simples límites estáticos que separan unas regiones de otras. Por el contrario se tratan de sistemas bioquímicos dinámicos encargados de muchas funciones, como producir ATP, transportar sustancias de modo selectivo al interior o al exterior de la célula, entre otras. No todas las membranas son idénticas ni homogéneas, de modo que los ejemplos de las funciones mencionados se observan en diferentes tipos de membrana.

Las bacterias se pueden dividir en dos grupos principales, las Gram positivas y las Gram negativas. La distinción entre ellas se basa en la tinción de Gram, una técnica de tinción diferencial. Las bacterias Gram positivas tienen muchas capas de peptidoglucano, las cuales a su vez, sostienen moléculas de ácido teicoico (**Figura 1**). El ácido teicoico reacciona con el cristal violeta y el yodo utilizado en este proceso de tinción. Como la pared celular de las células Gram positivas retiene estos compuestos, es más fácil decolorar una célula Gram negativa que una Gram positiva. Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste, normalmente un colorante rojo. Después de la tinción de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules (Madigan *et al.*, 2006). En la **Figura 1** se muestra una representación esquemática de los dos tipos de pared celular. La pared celular de las bacterias Gram negativas presenta una estructura multicapa y compleja, mientras que la de las Gram positivas consiste en una gruesa capa de peptidoglicanos. En las bacterias Gram positivas más del 90% de la pared celular consiste de peptidoglicanos; no obstante el ácido teicoico, otro tipo de constituyente, está presente comúnmente en pequeñas cantidades. Aunque algunas bacterias tienen sólo una simple capa de peptidoglicanos envolviendo la célula; muchas bacterias, especialmente las Gram positivas contienen varias capas de peptidoglicanos (más de 25) (Madigan *et al.*, 2006).

Los fosfolípidos en *Escherichia coli* y en otras bacterias Gram negativas son empleados para la construcción de las membranas interna y externa. Los fosfolípidos además de su función estructural, también están involucrados en diversos procesos como: transporte de solutos, iniciación de la replicación de DNA, división celular, entre otros (Zhang & Rock, 2008a). La membrana interna o citoplasmática (MI) además de los fosfolípidos está compuesta también de proteínas periféricas e integrales; es impermeable a solutos salvo si existen sistemas de transporte específicos. En estas bacterias sólo cerca del 10 % de la pared celular son peptidoglicanos. Además de los peptidoglicanos,

éstas contienen una capa adicional de lipopolisacáridos (LPS). Esta capa es efectivamente una segunda bicapa lipídica denominada membrana externa (ME). Su composición es distinta de la MI, ya que no está construida únicamente de fosfolípidos. La ME contiene poros que permiten el paso de moléculas con una masa molecular menor de 600 Da, y su estructura es rica en LPS y proteínas involucradas en el transporte de compuestos con masa molecular elevada. La capa externa de la ME está compuesta principalmente de LPS complejos, mientras que su capa interna consta de fosfolípidos.

Entre las MI y ME existe un espacio osmóticamente activo denominado espacio periplasmático. En este espacio se encuentran diversos compuestos como son los peptidoglicanos, proteínas involucradas en el transporte de metabolitos, oligosacáridos derivados de la membrana (MDO), entre otros (Rock, 2008).

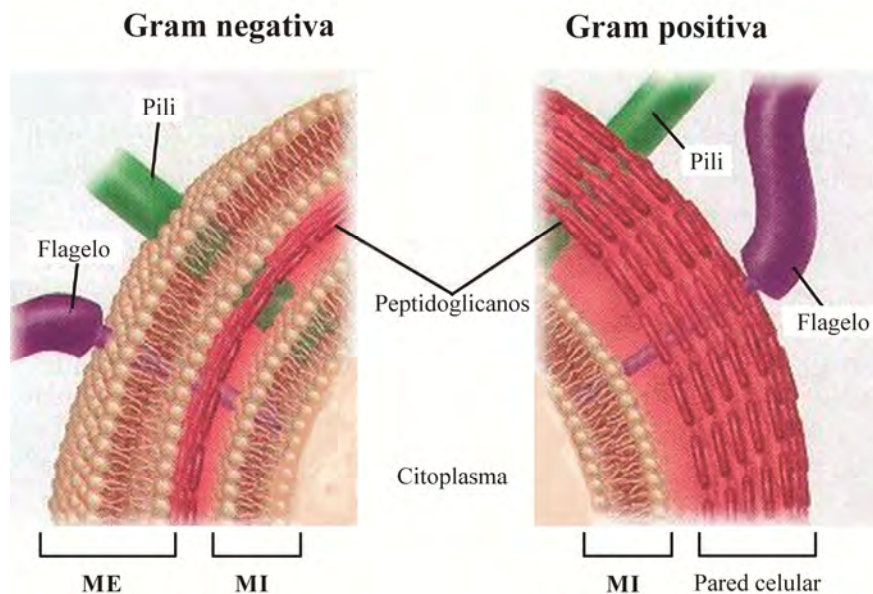


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de las Gram negativas y de las Gram positivas. Las bacterias Gram negativas presentan las siguientes características: la membrana citoplasmática o membrana interna (MI) compuesta principalmente de fosfolípidos, una capa delgada de peptidoglicanos (que es mucho más delgada que en las bacterias Gram positivas), la membrana externa (ME) que contiene lipopolisacáridos (LPS) sobre la capa de peptidoglicano. Entre la MI y la ME existe un espacio denominado espacio periplásmico. Los pili y los flagelos, sí están presentes, sus estructuras se encuentran embebidas a las dos membranas. El ácido teicoico y el ácido lipoteicoico no están presentes en las bacterias Gram negativas. Por otro lado, las bacterias Gram positivas generalmente presentan las siguientes características: la MI, una capa gruesa de peptidoglicanos, pili y flagelos (sólo en algunas especies). Las moléculas de peptidoglicanos individuales se entrecruzan por medio de cadenas de pentaglicina por una enzima DD-transpeptidasa. La presencia del ácido teicoico en la pared celular es una característica única de las bacterias Gram positivas. Los ácidos lipoteicoicos tienen un componente lipídico y pueden funcionar para el anclaje de los peptidoglicanos, ya que su componente lipídico se inserta a la MI. Figura tomada y modificada de <http://www.biologycorner.com>.

1.2. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias y su transferencia a la membrana.

Los ácidos grasos (AG) están presentes en distintos aspectos de la vida celular, pueden servir como fuente de carbono y energía, como precursores para la formación de la membrana celular o como biosurfactantes, entre otras funciones. En bacterias, la síntesis de AG se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de elongación por condensación, las cuales son catalizadas por un conjunto de proteínas altamente conservadas que en conjunto se les denomina sintasa de AG tipo II (FAS II, del inglés, *fatty acid synthase type II*).

Existen dos tipos de sistemas de FAS, el FAS I y el FAS II. El sistema FAS II consta de proteínas monofuncionales, donde cada proteína realiza una reacción específica y cada una de ellas está codificada por genes independientes. Estas proteínas se encuentran en bacterias y en plantas; en las últimas la síntesis de AG se lleva a cabo en los cloroplastos. En este sistema los grupos acilo están tioesterificados a una proteína pequeña denominada proteína portadora de grupos acilos (ACP: del inglés *acyl carrier protein*). La ACP porta los grupos acilo durante las reacciones de elongación e interactúa específicamente y de forma transitoria con las otras enzimas de la vía (Rock, 2008).

En contraste con lo anterior, en el sistema FAS I la actividad enzimática está confinada en una sola proteína con diferentes dominios catalíticos, donde cada uno lleva a cabo una reacción específica. La ACP en este sistema es un dominio de la proteína. Este sistema se encuentra generalmente en hongos y animales, en donde el complejo se localiza en el citosol. En el sistema FAS I, el dominio ACP presenta una gran flexibilidad estructural, lo que le permite la reactividad del grupo acilo que acarrea con los otros dominios catalíticos del sistema (Byers & Gong, 2007). Esta característica, a diferencia del sistema FAS II, le resta versatilidad al sistema, ya que el paso final del sistema FAS I es la liberación del grupo acilo como AG libre (Smith *et al.*, 2003) o la transferencia del grupo acilo del dominio ACP a coenzima A (CoA) como en el sistema FAS I de *Saccharomyces cerevisiae* (Scharnewski *et al.*, 2008)

La biosíntesis de AG en bacterias se ha caracterizado extensamente en el organismo modelo *Escherichia coli*. En la **Figura 2** se esquematiza el proceso global de la biosíntesis: la iniciación (**2a**) y la elongación (**2b**) de las cadenas del AG. Adicionalmente, el esquema presenta el destino principal de los AG formados: la transferencia al glicerol-3-fosfato, precursor de los lípidos de membrana (**2c**).

Para iniciar el ciclo de la biosíntesis de AG la acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la formación de malonil-CoA. Los grupos malonil son las unidades de extensión del ciclo de elongación y son transferidos a ACP por malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD). La β -cetoacil-ACP sintasa III (FabH) cataliza la condensación inicial de un acil-CoA con malonil-ACP para iniciar un nuevo ácido graso

(Figura 2a). La elongación de la cadena es un proceso iterativo compuesto de 4 reacciones: condensación, 1ª reducción, deshidratación y 2ª reducción. En cada ciclo se utiliza como sustrato el malonil-ACP para la elongación de 2 unidades de carbono. El intermediario de β -cetoacil-ACP formado al inicio del ciclo es reducido por la β -cetoacilreductasa (FabG), y el β -hidroxiacil-ACP formado se deshidrata a enoil-ACP (FabA o FabZ). El ciclo es finalizado por la enoil-ACP reductasa (FabI o FabK). Los nuevos ciclos de elongación son iniciados por enzimas de condensación FabF o FabB. FabF es una isoforma expresada universalmente, pero algunas bacterias también expresan FabB, una enzima de condensación que tiene una función específica en la formación de ácidos grasos insaturados.

En *E. coli*, la biosíntesis de AG se completa cuando la longitud de la cadena alcanza los 16-18 carbonos. Los acil-ACP formados son sustrato para la biosíntesis de los diversos lípidos que componen la membrana celular. La transferencia de los grupos acilo al glicerol-3-fosfato (G3P) (Figura 2c) produce el ácido fosfatídico (PA), el intermediario clave en la síntesis de todos los glicerolípidos de membrana. En *E. coli* se han reportado dos vías para la biosíntesis del G3P, una de ellas lo produce directamente de glicerol por la actividad de una glicerol cinasa (GlpK), mientras que la otra vía es a través de la reducción de dihidroxiacetona fosfato, catalizada por la G3P deshidrogenasa (GpsA) (Rock & Cronan, 1996). Para la transferencia de los grupos acilo a la posición 1 del G3P se requiere de las aciltransferasas: PlsX/PlsY o PlsB. El sistema más ubicuo en bacterias es la vía PlsX/PlsY. PlsX, una proteína periférica de membrana, cataliza la formación de un acilfosfato (acil-P) a partir del acil-ACP y PlsY utiliza este intermediario para acilar al G3P y formar 1-acil-G3P, también conocido como ácido liso-fosfatídico (LPA). Una segunda vía para la formación de LPA es catalizada por PlsB, la cual acila al G3P con acil-ACP o acil-CoA como donador del grupo acilo. PlsB no está presente en todas las bacterias, ya que algunas de ellas poseen solamente la vía PlsX/PlsY para la síntesis de LPA (Zhang & Rock, 2008b).

Después de la formación de LPA, la proteína integral de membrana PlsC transfiere un grupo acilo a la posición 2 del LPA para formar el ácido fosfatídico (PA) (Figura 2c). PlsC se expresa universalmente en las bacterias. PlsC de *E. coli* puede emplear acil-ACP o acil-CoA como donador del grupo acilo, por lo que esta bacteria puede incorporar directamente a sus lípidos los AG exógenos soslayando así el costo energético alto que implica la biosíntesis *de novo* (Zhang & Rock, 2008b).

Sin embargo, PlsC de *Bacillus subtilis* y de *Streptococcus pneumoniae* solo emplea acil-ACP. Esto indica que las bacterias Gram positivas poseen aciltransferasas que no aceptan acil-CoA como sustrato (Zhang & Rock, 2008b). En el caso de *S. pneumoniae* esta propiedad se correlaciona con la ausencia de enzimas reconocibles para la β -oxidación así como de acil-CoA sintetetasas (FadDs). Por otra parte, *B.*

subtilis posee 2 homólogos a FadD y la vía de la β -oxidación; a pesar de esto sus aciltransferasas no reconocen las acil-CoA como donadores del grupo acilo. Por tanto, el destino principal de los AG exógenos es la β -oxidación y la capacidad de las aciltransferasas de emplear acil-CoA o acil-ACP quedaría potencialmente restringida a γ -proteobacterias (Zhang & Rock, 2008b).

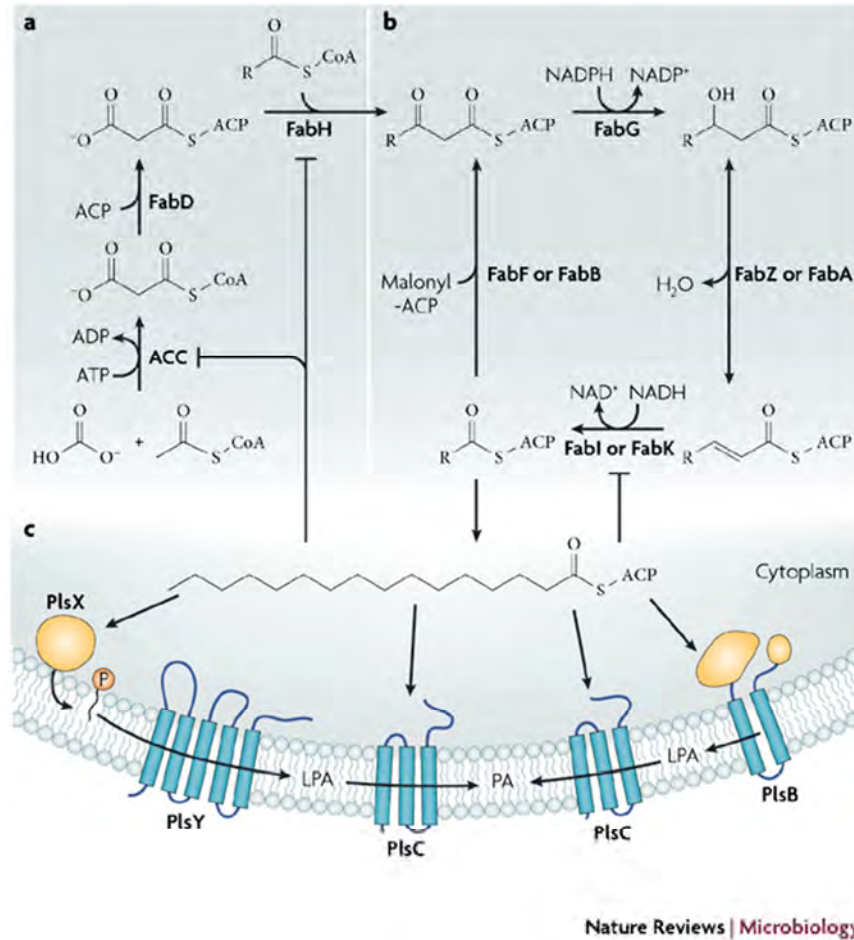


Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos y del ácido fosfatídico en bacterias. (a) Fase de iniciación. Tras la formación de la unidad de malonil-ACP catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD); β -cetoacil-ACP sintasa III (FabH) cataliza la condensación de acil-CoA con malonil-ACP para formar β -hidroxiacil-ACP. (b) Fase de elongación de la cadena del ácido graso. El β -hidroxiacil-ACP es reducido posteriormente por la β -cetoacil-ACP reductasa (FabG) y deshidratado por la β -hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabA o FabZ) para formar enoil-ACP. La reducción del último por la enoil-ACP reductasa (FabI o FabK) es el paso previo para el próximo ciclo de elongación. Las condensaciones posteriores son catalizadas por FabB, que es esencial para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, o por FabF, una isoforma expresada universalmente en bacterias. (c) Transferencia de los ácidos grasos al glicerol-3-fosfato. Los grupos acilo de la acil-ACP son transferidos por las aciltransferasas al glicerol-3-fosfato. PlsX cataliza la formación un acil-fosfato (acil-P) y PlsY lo utiliza para acilar al glicerol-3-fosfato y formar 1-acil-glicerol-3-fosfato (LPA). Otra vía para la formación de LPA es PlsB, ésta acila el glicerol-3-fosfato con acil-ACP o acil-CoA como donador del grupo acilo. PlsC transfiere otro grupo acilo a la posición 2 del LPA para formar ácido fosfatídico (PA). Figura tomada de Zhang & Rock, 2008a.

1.3. Degradación de ácidos grasos en bacterias.

En *E. coli* los ácidos grasos (AG) exógenos pueden ser usados en distintas vías. Estos pueden ser incorporados a los fosfolípidos por medio del sistema de aciltransferasas PlsB/PlsC; no así por el sistema PlsX/PlsY. La segunda vía de incorporación al metabolismo es por medio de la degradación para su uso como fuente de carbono y energía. Para que los AG puedan usarse como sustrato en ambas vías se requiere de la formación del tioéster de CoA (Rock, 2008). Sin embargo, otra vía de incorporación de AG exógenos independiente de CoA es por la acción de una 2-acil-glicerol-3-fosfoetanolamina (liso-PE) aciltransferasa / acil-ACP sintetasa (Aas) (Jackowski *et al.*, 1994). Aas tiene un dominio de aciltransferasa fusionado al de acil-ACP sintetasa y esterifica AG libres a ACP para posteriormente transferirlos al liso-PE y formar nuevamente PE. El liso-PE se forma por la transferencia de un grupo acilo de PE a lipoproteínas de la membrana externa o probablemente por la acción de fosfolipasas (Jackowski *et al.*, 1994). No obstante, cuando existe una mutación en el gen codificante de la acil-CoA sintetasa (*fadD*), sólo una limitada cantidad (cerca del 2%) de los AG exógenos se incorpora con esta vía (DiRusso *et al.*, 1999).

Para el transporte de AG con una longitud de cadena mayor de 10 carbonos al interior de la célula se requiere de FadL, una proteína transmembranal de transporte. Los AG de cadena más corta no requieren de FadL para su transporte ya que éstos pueden atravesar la membrana por difusión pasiva. Aunque FadL parezca realizar un transporte activo de AG, este transporte no está acoplado a la hidrólisis de ATP. El transporte de AG parece estar acoplado a la formación de acil-CoA dado que en la célula se detectan bajos niveles de AG libres. La formación de acil-CoA es catalizada por la acil-CoA sintetasa (FadD), una proteína parcialmente asociada a la membrana interna. La formación del acil-CoA atrapa el AG y permite su colecta al interior de la célula (Rock, 2008).

La degradación de AG en bacterias se lleva a cabo por una serie de enzimas inducibles que catalizan la β -oxidación (**Figura 3**). Este proceso consta de una serie de reacciones reiterativas que son esencialmente el proceso inverso de la biosíntesis *de novo*. Sin embargo existen 3 diferencias clave que distinguen a las dos rutas: (1) la β -oxidación emplea grupos acilo esterificados a CoA y no a ACP, (2) la estereoquímica de los β -hidroxi-intermediarios son opuestas (L en la β -oxidación y D en la síntesis) y (3) las enzimas de la β -oxidación no comparten homología alguna con las de la biosíntesis (Rock, 2008).

Una vez que el AG es incorporado por FadL y esterificado a CoA por FadD (**Figura 3**) el primer paso de la degradación por β -oxidación es la deshidrogenación de acil-CoA por la acil-CoA deshidrogenasa (FadE). El enoil-CoA producido es hidratado y consecutivamente oxidado por la acción de la enoil-CoA hidratasa y la β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, respectivamente (ambas actividades son

catalizadas por FadB). Por último, la β -cetoacil tiolasa libera acetil-CoA del β -cetoacil-CoA y un acil-CoA con 2 átomos de carbono menos que al inicio del ciclo. El ciclo se repite hasta que, tras varios ciclos, el AG es finalmente oxidado a unidades de acetil-CoA (Rock, 2008).

Los AG poliinsaturados también pueden ser oxidados por esta vía. La actividad isomerasa de FadB cataliza la conversión de los enlaces *cis*-3 a *trans*-2. Por otra parte, la proteína FadH cataliza la reducción en la posición 4 de los AG poliinsaturados. Inclusive FadB posee la actividad de epimerasa que permite la utilización de los ácidos grasos D- β -hidroxilados, catalizando la conversión del enantiómero D al L (Rock, 2008).

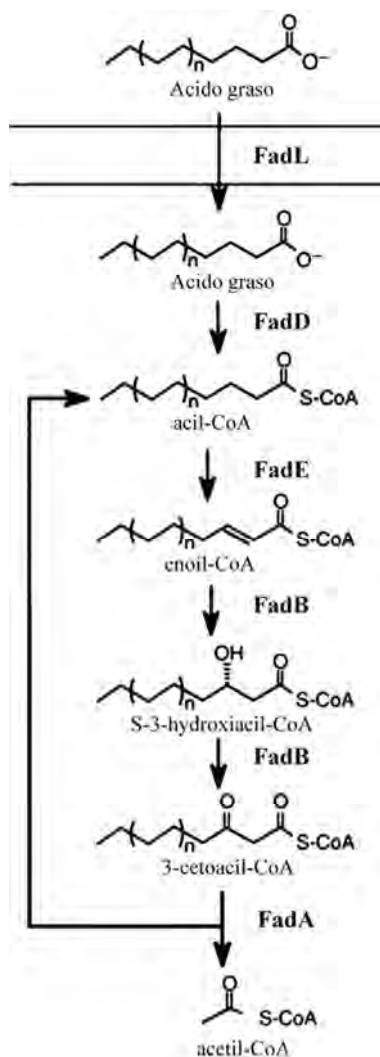


Figura 3. Esquema de la degradación de ácidos grasos por β -oxidación. FadL es un transportador de membrana de los ácidos grasos de cadena larga. FadD se asocia con la membrana plasmática y se cree que extrae los ácidos grasos de la membrana con la formación simultánea de tioésteres de CoA. La β -oxidación implica la actividad de cuatro enzimas: la acil-CoA deshidrogenasa (FadE), la 2-enoil-CoA hidratasa, la β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (ambas catalizadas por FadB) y la β -cetoacil-CoA tiolasa (FadA). El ciclo se repite hasta que el ácido graso es metabolizado completamente. Figura tomada y modificada de Zhang *et al.* (2006).

1.4. Biosíntesis de los fosfolípidos de membrana.

Los fosfolípidos son moléculas con características anfifílicas. La parte hidrofóbica está formada por dos ácidos grasos (AG) unidos mediante enlaces éster a una molécula de glicerol, en las posiciones C-1 y C-2. La parte hidrofílica (o polar) está unida por un enlace fosfodiéster en la posición C-3 del glicerol. Los AG de los fosfolípidos, pueden ser saturados, insaturados o ramificados. La longitud de la cadena, así como la posición y el número de insaturaciones de los AG son variables, dependiendo del organismo. Además, éstos pueden sufrir modificaciones posteriores, las más conocidas son la isomerización *cis-trans* y la formación de AG con un anillo de ciclopropano en la cadena acilada (López-Lara & Geiger, 2010). En *E. coli* los fosfolípidos poseen AG saturados: ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), así como AG insaturados como son el ácido miristoleico (C14:1^{Δ7}), ácido palmitoleico (C16:1^{Δ9}) y *cis*-vaccénico (C18:1^{Δ11}) (Cronan & Rock, 1996). Por otro lado, *S. meliloti* posee los AG: C16:0, C18:0, heptadecanoico (C17:0), C16:1^{Δ9}, C18:1^{Δ11}, C17:0 ciclopropano (C17:0cp), lactobacílico C19:0cp, así como AG hidroxilados (Saborido Basconcillo & McCarry, 2008). El grupo alcohol en la parte polar del fosfolípido se emplea para la clasificación de los diversos fosfolípidos y puede aportar una o más cargas a los mismos. Por ejemplo, serina y colina están presentes en fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC), respectivamente (Rock, 2008).

En la **Figura 4** se esquematiza la biosíntesis de los principales fosfolípidos de membrana de bacterias Gram-negativas. Una vez formado el ácido fosfatídico (PA) (**Figura 2**), la conversión de éste a CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) es catalizada por la CDP-diglicérido sintasa (CdsA) (**Figura 4**). En bacterias el CDP-DAG es el intermediario central para la biosíntesis de glicerofosfolípidos. Posteriormente, enzimas distintas y específicas pertenecientes a la familia CDP-alcohol fosfotransferasa condensan un grupo alcohol a CDP-DAG. Por ejemplo los grupos colina o serina se condensan a CDP-DAG formando PC o PS, respectivamente (**Figura 4**).

Para la biosíntesis de fosfatidiletanolamina (PE), CDP-DAG se condensa con serina para formar PS en una reacción catalizada por fosfatidilserina sintasa (Pss). A continuación PS es descarboxilada por la fosfatidilserina descarboxilasa (Psd) para producir PE (**Figura 4**). Por otro lado, una vía conocida para la formación de PC se produce por la triple metilación sucesiva de PE con *S*-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo. Esta reacción es catalizada por la fosfolípido *N*-metiltransferasa (PmtA). Muchas bacterias que contienen PC en sus membranas poseen una segunda vía para la formación de este lípido, la cual es catalizada por la fosfatidilcolina sintasa (Pcs). En esta vía la colina se condensa directamente al CDP-DAG formando PC y CMP. Esta vía parece ser exclusiva de las eubacterias (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

Para la biosíntesis de fosfatidilglicerol (PG) la fosfatidilglicerol fosfato sintasa (PgsA) transfiere el glicerol-3-fosfato a CDP-DAG con la liberación de CMP resultando en fosfatidilglicerol fosfato (PGP). Finalmente, PGP es desfosforilado por una fosfatidilglicerol fosfato fosfatasa resultando en la formación de PG. En *E. coli* hay al menos dos enzimas con actividad de PGP fosfatasa (PgpA y PgpB) (Rock, 2008). Para la síntesis de cardiolipina (CL) en *E. coli* y probablemente en la mayoría de bacterias, la cardiolipina sintasa (Cls) de origen procariota, cataliza la condensación de dos moléculas de PG, liberando glicerol en una reacción de trans-esterificación (**Figura 4**). En general se creía que las bacterias usan esta vía para formar CL, mientras que en las células eucariotas la síntesis de CL la realiza una Cls de la superfamilia de CDP-alcohol fosfatidiltransferasa que utiliza CDP-DAG como donante del grupo de fosfatidil, que se transfiere a una molécula de PG para formar CL. Sin embargo recientemente en el actinomiceto *Streptomyces coelicolor* se describió una Cls (Sco1389) similar a la de las eucariotas. La expresión de esta Cls en mutantes deficientes de CL de *Rhizobium etli* restaura la formación de CL. En un ensayo *in vitro* esta Cls cataliza la misma reacción que la Cls eucariota. Este reporte sugiere que la síntesis de CL catalizada por una Cls tipo eucariota es común en Actinobacterias (Sandoval-Calderón *et al.*, 2009).

Lisil-fosfatidilglicerol (lisil-PG) es un lípido de membrana común en muchas bacterias Gram positivas. MprF puede transferir lisina del lisil-RNAt cargado a PG formando lisil-PG. El patógeno *Clostridium perfringens* tiene dos parálogos a MprF filogenéticamente diferentes, uno encargado de la formación de lysyl-PG (MprF1) y el otro responsable de la síntesis de alanil-fosfatidilglicerol (MprF2) (Geiger *et al.*, 2010). Aunque para la lisinilación de CL es necesario un homólogo a MprF, no se sabe si lisil-CL está formado por la lisinilación de CL o por la condensación de lisil-PG con PG catalizada por Cls. *Mycobacterium tuberculosis* tiene fosfatidilinositol (PI) y derivados del mismo como componentes principales en su membrana. En *M. tuberculosis*, PI está formado por la condensación de mio-inositol y CDP-diacilglicerol en una reacción catalizada por PI sintasa (**Figura 4**) (Geiger *et al.*, 2010).

En *E. coli* los principales fosfolípidos de membrana son PE, PG y CL. Además de ellos, en diferentes bacterias se encuentran diversos lípidos formadores de membranas, que pueden ser componentes minoritarios o mayoritarios (Rock, 2008). Sin embargo, las cantidades relativas de PG y CL dependen de la fase de crecimiento de las bacterias. PG es más abundante durante la fase exponencial, mientras que CL se acumula en las células en fase estacionaria (Cronan & Rock, 1996).

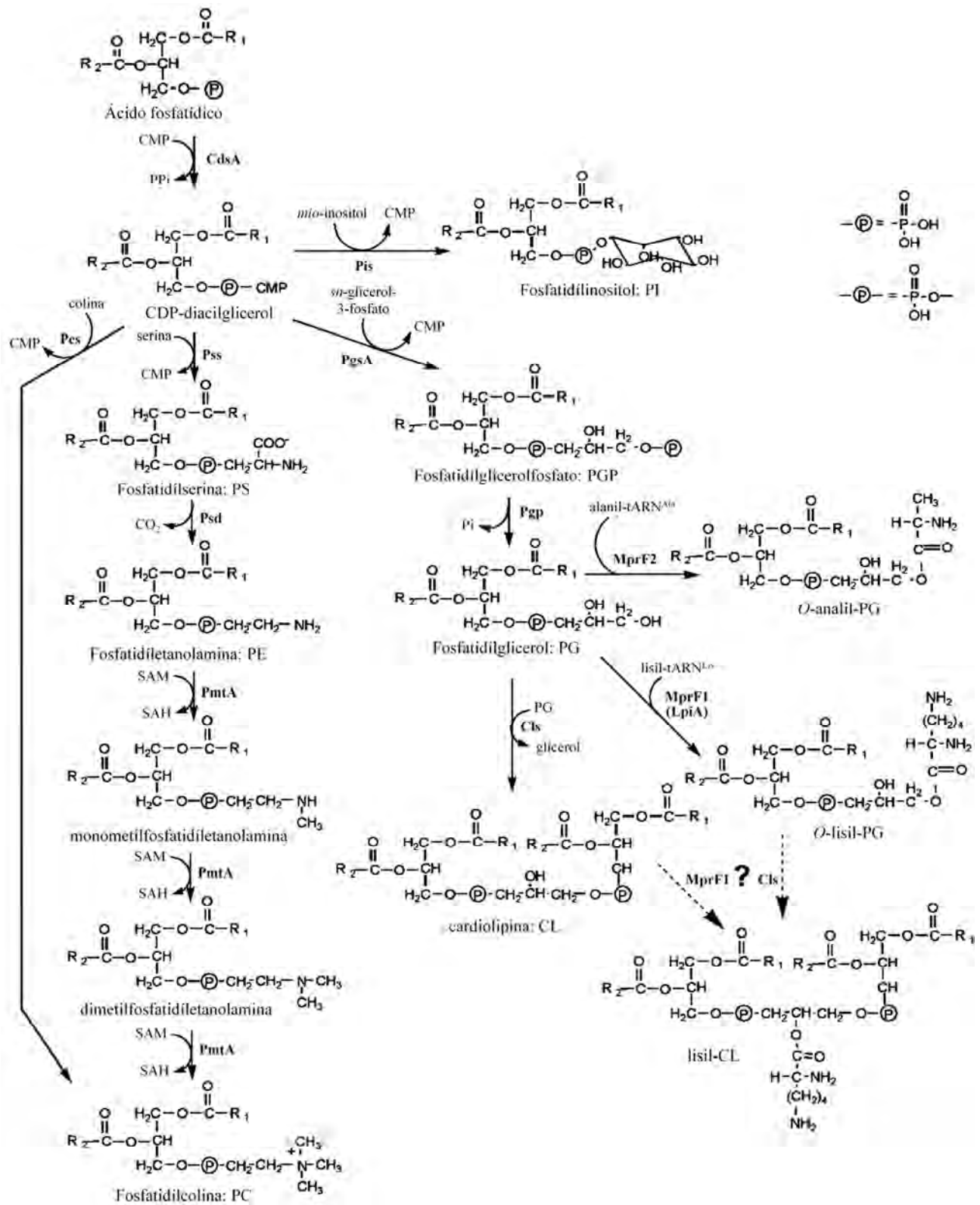


Figura 4. Conversión del ácido fosfatídico (PA) a CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) y la diversificación de los grupos polares de los fosfolípidos bacterianos. Figura tomada y modificada de Geiger *et al.* (2010).

Se especula que alrededor de un 10% de las bacterias pueden formar derivados metilados de PE como monometil-PE (MMPE), dimetil-PE (DMPE) o PC como componentes membranales (Sohlenkamp *et al.*, 2003). Además de los fosfolípidos mencionados, otras bacterias Gram negativas contienen esfingolípidos, glucolípidos, glucofosfolípidos, lípidos que contienen ornitina, lípidos de betaína, sulfolípidos o sulfonolípidos (Geiger *et al.*, 2010).

Los fosfolípidos de membrana pueden ser degradados por diferentes tipos de fosfolipasas. Estas se dividen en diferentes grupos (A₁, A₂, B, C o D) dependiendo del sitio de hidrólisis de los enlaces éster en el fosfolípido. Las fosfolipasas A pueden escindir el enlace éster del grupo acilo en cualquiera de las posiciones *sn*-1 (fosfolipasa A₁) o *sn*-2 (fosfolipasa A₂); produciendo un ácido graso libre y un lisofosfolípido (LPL). Las fosfolipasas B hidrolizan el enlace éster del grupo acilo tanto en la posición *sn*-1 como en la *sn*-2. Las enzimas agrupadas como fosfolipasas C hidrolizan el enlace glicerofosfato, mientras que las fosfolipasas D hidrolizan el grupo polar del fosfolípido. (Lehninger *et al.*, 2008)

En *E. coli* se han descrito varias actividades enzimáticas que degradan fosfolípidos, intermediarios de la biosíntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles. Aunque su papel fisiológico aún permanece desconocido (Rock, 2008). Recientemente se demostró que una fosfolipasa C de *S. meliloti* degrada los fosfolípidos zwitteriónicos de su propia membrana bajo condiciones de limitación de fosfato (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010) (ver más en **Sección 1.7**). En el genoma secuenciado de *S. meliloti* no se ha encontrado ninguna fosfolipasa A. No obstante; se encuentra anotado un homólogo a una lisofosfolipasa de *E. coli* denominada PldB (SMc04041), así como dos fosfolipasas de la familia “patatin-like” (PLP) potenciales (SMc01003 y SMc00930). Sin embargo sus características aún no han sido descritas.



1.5. Lipopolisacáridos (LPS).

Los LPS son glucolípidos complejos con características anfífilas, su estructura se puede dividir en tres partes: el lípido A, el oligosacárido núcleo y el antígeno O (**Figura 5**). El lípido A está constituido por un disacárido al que está unido AG, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. En *E. coli* el lípido A se compone por un disacárido de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces β -(1',6), esterificado en cuatro posiciones con AG y sustituido por dos grupos fosfato en las posiciones 1 y 4'. Los LPS de enterobacterias han sido extensamente estudiados y por este motivo constituyen el arquetipo contra el que se comparan todos los demás. Sin embargo, los LPS suelen presentar diferentes modificaciones inclusive entre especies; tal es el caso del lípido A de *E. coli*, el cual está fosforilado, mientras que el de *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* no posee grupos fosfato en su estructura (Raetz *et al.*, 2007).

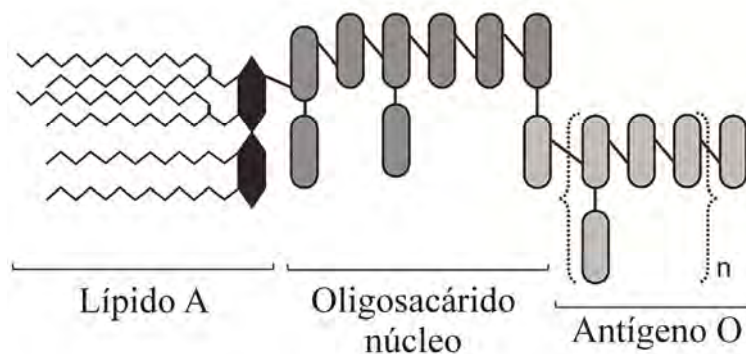


Figura 5. Representación esquemática de la estructura característica de una molécula de lipopolisacárido mostrando sus tres dominios estructurales. En el lípido A, las líneas zigzagueantes representan a los ácidos grasos y los hexágonos representan al disacárido. Los óvalos en gris oscuro representan los azúcares componentes del oligosacárido núcleo y los óvalos en gris claro, los azúcares del antígeno O. Los óvalos entre corchetes representan la unidad repetida del antígeno O. Figura tomada de Ormeño-Orrillo (2005).

Particularmente el lípido A de los rizobios presenta una serie de diferencias notables respecto al de enterobacterias. Independientemente de las variaciones significativas de la estructura del lípido A dentro de la familia de los rizobios, la presencia del ácido 27-hidroxi octacosanoico (27-OH-C28:0) es una característica común que distingue a su lípido A del de las enterobacterias. Este AG se detectó en varios miembros de esta familia, incluyendo las especies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Agrobacterium* (Sharypova *et al.*, 2003). Los LPS de las bacterias son importantes por su interacción con el ambiente o con organismos eucariontes hospedadores (Raetz *et al.*, 2007). Scheidle y colaboradores (2005) han sugerido que los LPS rizobiales podrían tener dos funciones en el establecimiento de la simbiosis: una temprana, muy factiblemente durante la infección de los pelos radicales, que permite la supresión de la “explosión oxidativa” del hospedador y otra tardía, involucrada en la captación endocítica de los rizobios en las células de los nódulos infectados.

1.6. Otras moléculas derivadas de los ácidos grasos.

Además de ser parte fundamental de los lípidos de membrana, los ácidos grasos (AG) son precursores de otras moléculas de importancia biológica. El FAS II, como se mencionó anteriormente, presenta una mayor versatilidad que el FAS I; ya que al estar disponibles los intermediarios de la biosíntesis de AG éstos pueden ser tomados por otras vías para la producción de otro tipo de moléculas (**Figura 6**).

El censado de quórum es un comportamiento derivado de la habilidad de los microorganismos de percibir y responder a la densidad poblacional (Fuqua & Greenberg, 2002). Las acil-ACP se encuentran involucradas en la biosíntesis de las *N*-acilhomoserina lactonas (AHLs) que en las bacterias Gram negativas son moléculas señalizadoras responsables del fenómeno (**Figura 6A**). Para llevar a cabo el censado de quórum las bacterias sintetizan las AHLs que se acumulan en el ambiente externo y actúan como autoinductores que desencadenan una cascada de señales. La biosíntesis de estas moléculas se describió por primera vez en *Vibrio harveyi*. En este microorganismo las AHLs se requieren para la inducción de la bioluminiscencia. LuxR es un activador transcripcional que se une al autoinductor y promueve la transcripción del operón de la luciferasa (*luxCDABE*). LuxI, otra de las proteínas transcritas, cataliza la unión del grupo acilo desde una acil-ACP a la *S*-adenosilmetionina. La metionina es lactonizada finalmente formando la AHL (Fuqua & Greenberg, 2002).

El uso de AHLs para el censado de quórum se detectó en diversos organismos, en los cuales se regula la expresión de genes distintos a la bioluminiscencia. Como ejemplos se pueden citar: la síntesis de 3-oxo-hexanoilhomoserinalactona (3-oxo-C6-HSL) por *Pseudomonas aeruginosa* que regula la expresión de genes de virulencia y la formación de biopelículas; o la síntesis del 3-oxo-C8-HSL por *Agrobacterium tumefaciens* que regula la transferencia conjugativa y el número de copias del plásmido Ti (Fuqua & Greenberg, 2002; Pappas, 2008).

En el fenómeno de la bioluminiscencia, la producción de una forma de luz es originada por una reacción química que involucra sustratos derivados de AG. La luciferasa bacteriana (un heterodímero codificado por *luxAB*) produce bioluminiscencia en presencia de mononucleótido de flavina reducida (FMNH₂), oxígeno y aldehídos de cadena larga. La luciferasa funciona bien con aldehídos de ocho carbonos de cadena o más largos (**Figura 6B**). Sin embargo, se cree que el tetradecanal es el aldehído natural utilizado *in vivo* por las bacterias luminiscentes (Lin & Meighen, 2009). Los aldehídos de cadena larga son sintetizados por un complejo enzimático codificado por tres genes diferentes (*luxCDE*) presentes en todas las bacterias bioluminiscentes. El complejo enzimático es un heterodímero compuesto de 4 unidades de cada una de las 3 proteínas, éstas son una reductasa (LuxC), una sintetasa (LuxD) y una transferasa (LuxE). Los sustratos requeridos para la formación de los aldehídos se derivan del FAS II. Los aldehídos son oxidados al AG correspondiente y pueden ser reciclados después de cada reacción. Las cepas que expresan tanto *luxAB* y *luxCDE* son bioluminiscentes de forma autónoma (Meighen, 1991).

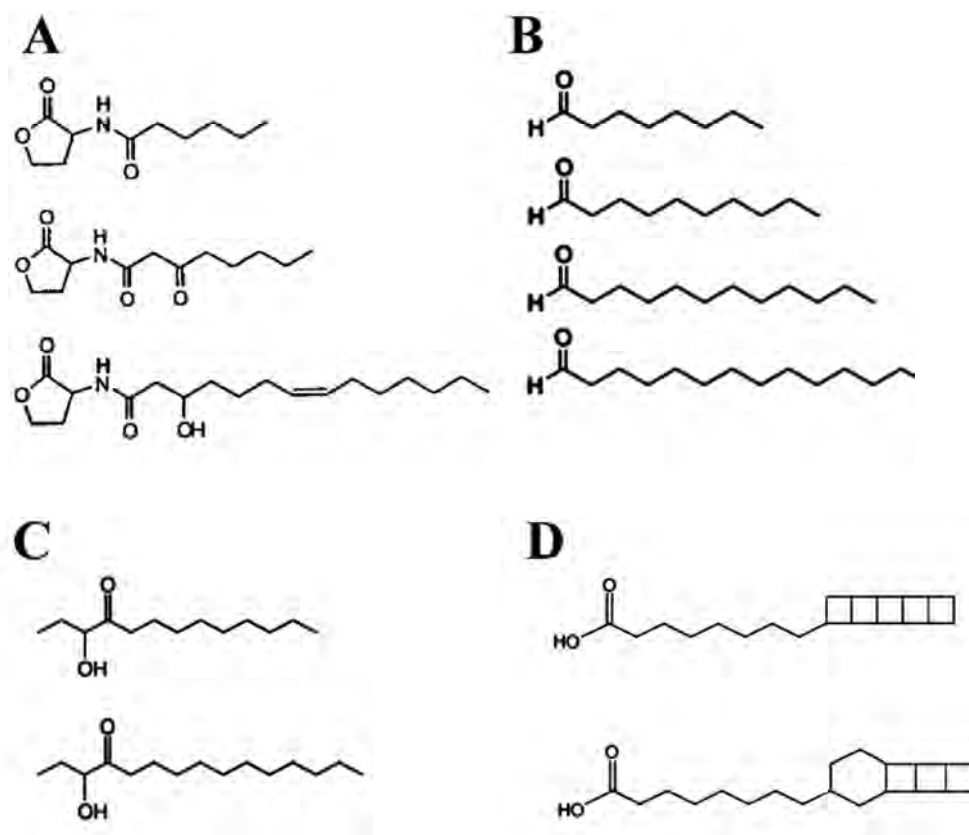


Figura 6. Algunos ejemplos de moléculas derivadas de ácidos grasos en bacterias. En (A) ejemplos de acilhomoserinalactonas: de arriba abajo *N*-hexanoil-*L*-homoserinalactona, *N*-(3-oxo-octanoil)-*L*-homoserinalactona y *N*-(3*R*-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoil)-*L*-homoserinalactona (tomado de Daniels *et al.*, 2004). En (B) ejemplos de aldehídos utilizados como sustrato por la luciferasa bacteriana; octanal, decanal, dodecanal y tetradecanal. En (C) se presentan un par de autoinductores de la familia de las α -hidroxicetonas (AHK): la 3-hidroxitridecan-4-ona (CAI-1) y la 3-hidroxipentadecan-4-ona (LAI-1) de *Vibrio cholerae* y de *Legionella pneumophila*, respectivamente (tomado de Tiaden *et al.*, 2010). En (D) se ejemplifica los ácidos grasos producidos por bacterias “anammox”, el ácido pentacicloanammóxico y el ácido ciclopentacicloanammóxico (tomado de Rattray *et al.*, 2009)

Recientemente se describió en los patógenos facultativos *Legionella pneumophila* y *Vibrio cholerae* la presencia de α -hidroxicetonas (AHK) una nueva familia de autoinductores (Tiaden *et al.*, 2010). En la biosíntesis de estas AHKs también se encuentran involucrados AG. El grupo de genes *lqs* de *L. pneumophila* y *cqs* de *V. cholerae* sintetizan y detectan las AHK 3-hidroxipentadecan-4-ona (LAI-1) o 3-hidroxitridecan-4-ona (CAI-1), respectivamente (**Figura 6C**). Este sistema de señalización regula las interacciones celulares patógeno-hospedador. Los grupos de genes tipo *lqs/cqs* están presentes en

varias bacterias del medio ambiente, lo que sugiere que las AHK son ampliamente utilizadas para el censado de quórum (Tiaden *et al.*, 2010).

En bacterias “anammox” (capaces de metabolizar amoníaco) del fondo marino se identificó el ácido pentacicloanammóxico, este AG posee en su parte hidrofóbica hidrocarburos policíclicos que constan de unidades de ciclobutano repetidas (en inglés a este tipo de molécula se le denomina “ladderane” porque se asemejan a escaleras) (**Figura 6D**). Este AG de 20 carbonos se describió por primera vez por Sinninghe Damsté y colaboradores (2002), y proporciona una rigidez extraordinaria a la bicapa lipídica de las membranas celulares de estas bacterias. Adicionalmente se cree que la presencia de AG “ladderanes” en las membranas les protege de sus propios subproductos metabólicos tóxicos ya que las bacterias “anammox” son capaces de metabolizar el amoníaco para producir energía y producen hidracina (N_2H_2) e hidroxilamina (NH_2OH) como desecho en vez de N_2 y H_2O (Sinninghe Damsté *et al.*, 2002). Por medio de comparaciones *in silico* de la maquinaria genética necesaria para la síntesis de lípidos entre las bacterias aerobias y las “anammox”; se llegó a la conclusión de que la mayoría de las pruebas enzimáticas apoyan la síntesis de los AG “ladderanes” posterior a la biosíntesis *de novo* del AG. En un AG saturado formado se producen varias insaturaciones en la parte distal de la cadena, después del cual procede la ciclación radical del AG poliinsaturado. A pesar de esto, no se descarta que los anillos podrían ser sintetizados en un proceso separado, aún desconocido, y posteriormente reclutados por el FAS II (Ratray *et al.*, 2009).



1.7. Respuesta de la membrana a diferentes estímulos ambientales.

Las bacterias siempre están sujetas a los cambios en su medio ambiente. Éstas no pueden instalarse en su entorno sin estar subyugadas a las fluctuaciones ambientales y para poder prevalecer ajustan su fisiología. La membrana, como se mencionó anteriormente, es la barrera que delimita a la célula del exterior y es una entidad dinámica. La célula bacteriana posee varios mecanismos que modifican la estructura de la membrana para adaptarse a los cambios ambientales. A continuación se describen algunos de los mecanismos descritos en la literatura.

La fluidez es uno de los parámetros más importantes de la membrana, pues permite mantener la homeostasis de la célula. La fluidez de la membrana es difícil de definir debido a que la capa lipídica de la membrana es un tipo especial de líquido cristalino. En condiciones fisiológicas normales, la mayoría de los fosfolípidos en la membrana bacteriana forman bicapas. A medida que aumenta la temperatura, los fosfolípidos se funden y la rotación de los grupos acilo alrededor de los enlaces carbono-carbono son capaces de propagarse libremente hacia arriba y abajo en la cadena de acilo. Los grupos acilo se separan y tienen una forma más cónica. Lo anterior provoca un mayor espacio entre los grupos polares debido a un mayor espacio entre los grupo acilo. Cuando la temperatura desciende, los grupos acilo adoptan una conformación que es más ordenada. Los fosfolípidos se vuelven más cilíndricos y la membrana adquiere una estructura parecida al gel (Mrozik *et al.*, 2004).

Para regular la fluidez de la membrana las bacterias son capaces de cambiar la proporción de AG insaturados o la de los AG ramificados. Estos últimos, al igual que los AG insaturados, poseen la capacidad de alterar el empaquetamiento de los grupos acilo y reducir la temperatura de la transición de fase esencial para la función normal de la membrana. A pesar de que los AG ramificados en *Bacillus subtilis* mantienen la fluidez de la membrana necesaria para el crecimiento, no son suficientes para la sobrevivencia de las bacterias en la fase estacionaria de crecimiento. Por tanto, los AG insaturados son necesarios para optimizar la función de la membrana para la viabilidad durante la fase estacionaria. (Aguilar *et al.*, 1998). La $\Delta 5$ -desaturasa ($\Delta 5$ -Des) de *B. subtilis* es una enzima cuya transcripción es inducida por la disminución de la temperatura (choque por frío) e introduce una insaturación entre los carbonos 5-6 de AG que se encuentran esterificados a los lípidos de la membrana. Este mecanismo difiere con el de *E. coli*, el cual incrementa la producción *de novo* de AG insaturados, y le permite una respuesta más rápida al descenso de temperatura (Aguilar *et al.*, 1998; Altabe *et al.*, 2003).

Las bacterias también pueden modificar las proporciones de sus AG saturados y *trans*-insaturados de sus membranas en respuesta a compuestos tóxicos. Este mecanismo de tolerancia reduce eficazmente la acumulación de compuestos tóxicos en la membrana. En *E. coli* o *Pseudomonas putida* el nivel de saturación de los AG solo puede ser modificado al crecerlos en presencia de compuestos fenólicos.

Estas bacterias aumentan las proporciones de los AG saturados sintetizados *de novo* y los incorporan a los fosfolípidos. En algunas bacterias existe una forma alternativa de regulación de la fluidez de la membrana. La conversión de *cis* a *trans* de los AG insaturados tiene como consecuencia la disminución de la fluidez de la membrana. Este mecanismo contrasta con el anterior porqué la modificación se realiza posterior a la síntesis y es independiente de la biosíntesis de lípidos; y por lo tanto del crecimiento de las células. El comportamiento estérico de los AG *trans*-insaturados en la membrana no difiere en gran medida del de los AG saturados, los cuales poseen una conformación extendida y un pequeño volumen molar. Ambos mecanismos, la síntesis *de novo* de diversos AG saturados y la isomerización *cis* a *trans* de los AG insaturados, se observaron en cepas de *P. putida* y de *Vibrio cholerae*. Para las células que no están en crecimiento la modificación de la fluidez de la membrana por la isomerización del doble enlace parece ser una manera conveniente y energéticamente factible comparado con el mecanismo basado en la síntesis *de novo* de AG (Mrozik *et al.*, 2004).

La formación de AG con un anillo de ciclopropano en su cadena acilada también se conoce como una modificación posterior a la síntesis de AG *cis*-insaturados. Este tipo de AG se sintetizan en la fase estacionaria tardía de crecimiento sobre AG monoinsaturados que se encuentran esterificados a los fosfolípidos de la membrana. La enzima que cataliza esta conversión es la ciclopropano sintasa de AG (CFA sintasa) la cual está codificada en el gen *cfa*. Este gen se encuentra ampliamente distribuido tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. El gen *cfa* y la actividad enzimática se regulan dependiendo de la fase de crecimiento, en parte debido a la estabilidad de la enzima y en parte debido a la síntesis de un promotor dependiente de RpoS. Este factor es requerido para la transcripción de genes expresados durante el inicio de la fase estacionaria de crecimiento en enterobacterias. Sin embargo, esta conversión no cambia significativamente las propiedades fisiológicas de la membrana y su función fisiológica aún permanece desconocida (Grogan & Cronan, 1997).

La aminoacilación de PG es empleada por las bacterias para disminuir la carga negativa de la envoltura celular, disminuyendo su afinidad por moléculas cargadas y permitiendo la adaptación a cambios ambientales. La lisil-PG sintasa transfiere la lisina a PG y es esencial para la virulencia de ciertos patógenos. Lisil-PG proporciona resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos de bacterias competidoras o a antibióticos terapéuticos. Por ejemplo, la presencia de lisil-PG en las membranas de *Staphylococcus aureus* permite la evasión de los neutrófilos e incrementa su virulencia durante la infección en ratones (Staubitz *et al.*, 2004). La actividad de alanil-PG sintasa también se ha descrito, pero poco se sabe sobre las posibles actividades de otros miembros de la familia de las aminoacil-PG sintasas (aa-PGS). Recientemente se describió que la aa-PGS de *Enterococcus faecium* utiliza un amplio repertorio de aminoácidos para modificar PG, ya sea con alanina, arginina o lisina. Al

reexaminar la lisil-PG sintasa de *Bacillus subtilis* se demostró que también cataliza la síntesis de alanil-PG. Se especula que las bajas especificidades para el sustrato de estas aaPGS permiten una mayor diversidad en la remodelación de los lípidos de membrana, la cual podría proporcionar a estas bacterias resistencia a un amplio espectro de antibióticos y estreses ambientales (Roy & Ibba, 2009).

Cuando las condiciones en la disposición de nutrientes llegan a ser restrictivas, los lípidos de las membranas pueden llegar a alterar su composición o estructura. *Sinorhizobium meliloti* es capaz de modificar su membrana en condiciones limitantes de fosfato inorgánico (Pi). Bajo condiciones de crecimiento con concentraciones suficientes de fósforo, los principales fosfolípidos de membrana de *S. meliloti* son: fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC). Sin embargo, bajo condiciones limitantes de Pi (< 0.02 mM) los fosfolípidos son remplazados por lípidos de membrana sin fósforo como son: el sulfolípidosulfoquinovosil diacilglicerol, lípidos que contienen el aminoácido ornitina y diacilgliceril *N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS). Recientemente se describió el mecanismo empleado por *S. meliloti* para modificar la composición de sus lípidos de membrana. Este mecanismo consiste en una fosfolipasa C endógena la cual degrada los fosfolípidos de *S. meliloti* para la obtención de sustratos necesarios para la biosíntesis de otros componentes, como los lípidos sin fósforo. Esto sugiere que, en condiciones limitantes de fósforo, los fosfolípidos de la membrana de *S. meliloti* proporcionan una fuente adicional de Pi útil, el cual puede ser utilizado para la biosíntesis de moléculas como los ácidos nucleicos. Esta fue la primera vez que se describió una fosfolipasa C intracelular en un sistema bacteriano. No obstante, la capacidad de degradar fosfolípidos endógenos para utilizarlos como una fuente de fósforo, podría ser una propiedad general de las bacterias Gram-negativas del suelo (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010).



1.8. Motilidad bacteriana.

La motilidad es esencial para la supervivencia de las bacterias, a través de ésta se pueden obtener beneficios potenciales como la adquisición de nutrientes o la evasión de sustancias tóxicas. Las bacterias exhiben diversos tipos de desplazamiento sobre los medios de cultivo sólido o semisólido, lo que se pone en evidencia por la presencia de halos o películas de crecimiento en torno a las colonias. Un ejemplo de motilidad es el movimiento en enjambre o “swarming” observado en *Proteus* spp., en el cual las bacterias sufren una transformación importante convirtiéndose en formas filamentosas hiperflageladas. Sin embargo, existen otros tipos de desplazamiento denominados “swimming”, “twitching”, “gliding” y “sliding”, cuyas características más notorias se describen a continuación.

El desplazamiento por nado de las bacterias o “swimming”, se debe a un movimiento natatorio propio de bacilos flagelados y se realiza sobre la película de agua que queda sobre los medios de cultivo sólidos. Obviamente, para que se manifieste se requiere usar medios frescos, que además deben ser incubados bajo condiciones que evitan la desecación. En este tipo de desplazamiento las colonias parecen rodeadas de proyecciones digitiformes, cuya observación al microscopio de contraste de fases, pone en evidencia la presencia de bacterias que nadan individualmente alejándose de la colonia. (Buck & Kelly, 1981).

El movimiento de contracción o “twitching” se describió en *Acinetobacter calcoaceticus*, una bacteria no flagelada, cuyas colonias aparecían orladas por una película de crecimiento, como la que podría esperarse en bacterias móviles (Henrichsen, 1972). Este fenómeno es independiente de la acción flagelar y lo pueden presentar tanto bacterias flageladas como no flageladas; y consiste en la motilidad sobre una superficie impulsada por la extensión y retracción de los pili tipo IV. Este movimiento es lento, a menudo con una apariencia desigual o “crispada” (Kearns, 2010). Aunque también está asociado con la presencia de fimbrias polares, más largas que los otros tipos de fimbrias descritos y que usualmente se presentan con una distribución periférica. El fenómeno se ha descrito en *Pseudomonas* spp., *Moraxella lacunata*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Moraxella kingae*, *Moraxella osloensis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus sanguis* y en anaerobios como *Eikenella corrodens*, *Bacteroides ureolyticus* y *Bacteroides nodosus*. Este fenómeno no se ha encontrado en ningún miembro de la familia Enterobacteriaceae (Henrichsen, 1983).

El “gliding” es el desplazamiento de las bacterias por deslizamiento. La clasificación del manual de Bergey, incluye en la sección dos a un grupo de bacterias que carecen de flagelos y que presentan este movimiento deslizante, cuyo prototipo es *Myxococcus*, organismos que exhiben complejos arreglos multicelulares con cuerpos fructíferos, que incluso han dado pie para discutir si cabe el término de bacterias multicelulares (Shapiro, 1991). No obstante, otras bacterias también presentan este tipo de desplazamiento, cuya característica es la presencia de un rastro de polisacáridos, sobre el cual aparentemente se deslizó la bacteria. El borde de la colonia muestra un aspecto plumoso, dado por grupos de bacterias que se deslizan siguiendo su eje longitudinal. Se ha descrito en *Vitreoscilla* sp., *Chondrococcus* sp. y *Cytophaga* sp., entre otras bacterias (Henrichsen, 1983).

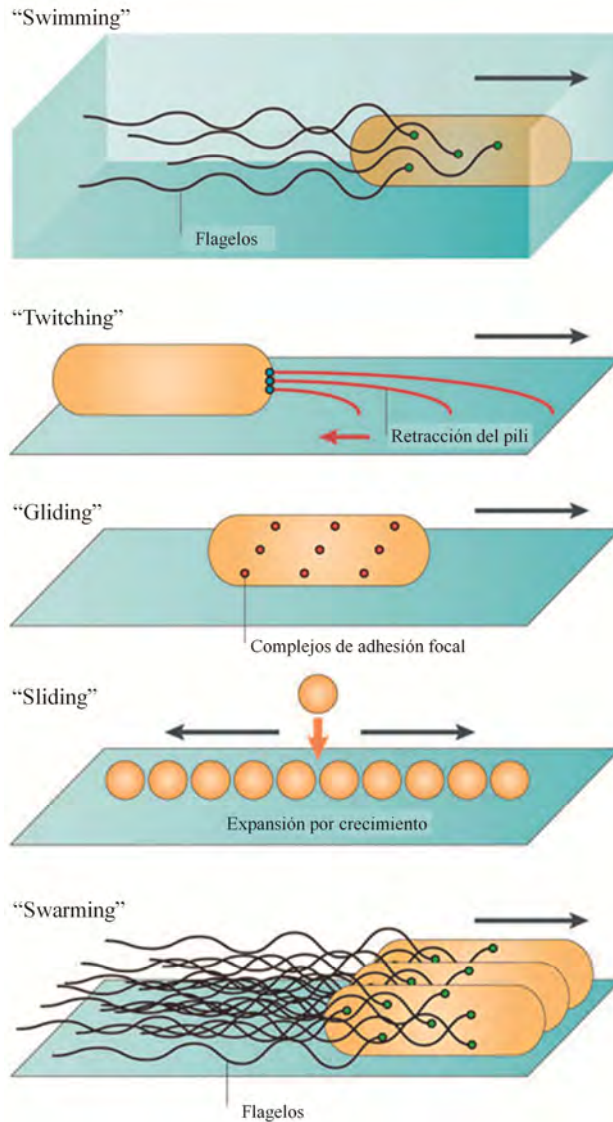


Figura 7. Mecanismos de motilidad de las bacterias. El nado o “swimming” es el movimiento individual de las bacterias en medio líquido, impulsados por la rotación de los flagelos. El movimiento de contracción o “twitching” es el movimiento de las bacterias en la superficie que se impulsa por la extensión de los pili, que luego se adhieren a la superficie y se retira posteriormente, tirando de la célula más cercana del sitio de unión. El deslizamiento o “gliding” es el movimiento por medio de una superficie activa, que no requiere flagelos o pili y consiste en la adhesión focal de complejos. Otro tipo de movimiento por deslizamiento es el “sliding”, el cual consiste en la translocación sobre una superficie y ocurre de manera pasiva impulsado por el crecimiento y facilitado por un agente tensoactivo. El movimiento en enjambre o “swarming” es el movimiento multicelular de bacterias a través de una superficie y es impulsado por la rotación helicoidal de los flagelos. La dirección del movimiento de las células está indicada por flechas en color negro, y los motores que accionan el movimiento se indican con círculos grises. Figura tomada y modificada de Kearns (2010).

El “sliding” es otro tipo de movimiento por deslizamiento. Al igual que el “gliding”, es un desplazamiento independiente de la acción flagelar. Sin embargo, a diferencia del “gliding”, este tipo de motilidad es debido a la fuerza expansiva que sufren las bacterias en la periferia de la colonia, y debido a una reducción en la fricción sobre el medio de cultivo. Este tipo de desplazamiento ha sido descrito en cepas de *Streptococcus*, *Alcaligenes odorans*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Acinetobacter*, *Moxarella* y *Corynebacterium* entre otros (Henrichsen, 1983).

El nado en enjambre o “swarming” es una forma de translocación bacteriana, generalmente dependiente de flagelos, que tiene lugar cuando la superficie de un fluido es relativamente delgada e involucra un complejo proceso de diferenciación celular acompañado de un movimiento rápido y coordinado de la población sobre la superficie de un cultivo semisólido (Fraser & Hughes, 1999). El término “swarming” hace alusión al movimiento coordinado en enjambre característico de las abejas. En los laboratorios microbiológicos este fenómeno se asocia con un comportamiento indeseable de *Proteus* spp., que le hace extenderse sobre las placas de agar sangre, formando una película de crecimiento que dificulta el aislamiento de cualquier otro tipo de microorganismo. El fenotipo de “swarming” no es exclusivo de *Proteus*, aunque éste es el que más se ha estudiado. Otras bacterias que lo presentan son: *Bacillus subtilis*, *Clostridium septicum*, *Azospirillum brasilense*, *Rhodospirillum centenum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *E. coli*, *Vibrio*, entre otros (Kearns, 2010). Actualmente se acepta que este fenómeno es regulado genéticamente, aunque antes se habían expuesto hipótesis referentes a un posible mecanismo quimiotáctico, según el cual la acumulación de metabolitos tóxicos en el centro de la colonia, estimulaba la migración de los bacilos de la periferia, buscando mejores territorios; esta hipótesis se descartó, pues cuando esos bacilos migrantes eran reinoculados en medios frescos, continuaban su ciclo de migración (Kearns, 2010).

Los desplazamientos sobre medios sólidos exhibidos por las bacterias *in vitro*, podrían tener su propia expresión en la naturaleza. Donde podrían actuar como un arma más en el arsenal de virulencia de las cepas patógenas. Esta posibilidad se ha evaluado, aunque muy someramente, en *Proteus* spp., en relación con infecciones del tracto urinario (Kearns, 2010). Sin embargo, con los otros tipos de desplazamiento no se han estudiado tales posibilidades.



2. Antecedentes.

Sinorhizobium meliloti es una bacteria de vida libre que habita en el suelo y es conocida por su habilidad de inducir la formación de nódulos en las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). En el interior de estos nódulos, bacterias diferenciadas conocidas como bacteroides fijan el nitrógeno atmosférico para beneficio de la planta. El establecimiento de esta simbiosis involucra un intercambio de señales entre el hospedador y la bacteria.

Las cepas de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* 1021 mutadas en el gen *fadD* presentan un fenotipo de “swarming” (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010). Además, la mutación en *fadD* provoca un defecto en el establecimiento de simbiosis con su planta hospedadora de alfalfa y una regulación distinta a la cepa silvestre en la expresión de los genes de nodulación y los de motilidad (Soto *et al.*, 2002). Aunque el fenotipo de “swarming” no se ha observado en la cepa silvestre *S. meliloti* GR4, las cepas silvestres *S. meliloti* 1021 y 2011 presentan una motilidad semejante a la de las mutantes en *fadD* en aproximadamente el 70% de los experimentos. No obstante, la mutación en *fadD* de las tres cepas silvestres promueve el fenotipo de “swarming”. Posteriormente se demostró que los genes involucrados en la biosíntesis del sideróforo rhizobactina 1021 son esenciales para la motilidad de las cepas silvestres, pero son dispensables en un fondo genético deficiente de *fadD* (Nogales *et al.*, 2010).

En diversas bacterias la mutación en *fadD* provoca fenotipos aparentemente sin relación con la función de FadD (enzima necesaria para la esterificación a CoA de AG de cadena larga). En *Xanthomonas campestris*, una bacteria fitopatógena, el gen *rpfB* (*fadD*) tiene una función importante en la regulación de la expresión de enzimas extracelulares y de virulencia. La mutación en *rpfB*, de manera similar a *S. meliloti*, provoca deficiencias en la interacción con su hospedero (Barber *et al.*, 1997). La cepa mutante en *fadDI* de *Streptomyces coelicolor* muestra deficiencia en la producción del antibiótico actinorodina (Atc), que parece estar relacionada con una expresión tardía de los genes para la biosíntesis *act* (Banchio & Gramajo, 2002). En *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, la mutación en *fadD* reprime la expresión de HilA, un activador de los genes de invasividad (Lucas *et al.*, 2000). Sugestivamente las cepas mutantes en *fadD* de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Vibrio cholerae* presentan un incremento en el fenotipo de swarming; adicionalmente la cepa mutante de *V. cholerae* presenta represión de los principales genes de virulencia (Kang *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2011)

Estas observaciones dejan entrever que, además de participar en la activación de AG libres para su degradación, FadD podría estar involucrada en otros aspectos del metabolismo de lípidos y en la motilidad de *S. meliloti*. Sin embargo, aún no se han descrito los mecanismos que rigen estas relaciones.

Por otra parte, la proteína FadD de *S. meliloti* GR4 corresponde con la SMc02162 de la cepa de *S. meliloti* 1021 cuyo genoma ha sido secuenciado (Galibert *et al.*, 2001). Además de SMc02162, el genoma de *S. meliloti* 1021 revela la existencia de varios marcos abiertos de lectura (ORFs) que presentan homología a FadD. Entre ellos los que presentan mayor identidad y similitud a FadD son SMA0150 y SMB20650. Inicialmente ambos ORFs estaban anotados como acil-CoA sintetasa específica para AG de cadena larga. SMA0150 y SMB20650 no han sido caracterizadas y se encuentran en los plásmidos simbióticos pSymA y pSymB respectivamente. La **Tabla 1** resume algunas características del FadD de *E. coli*, SMA0150 y SMB20650 con respecto a SMc02162.

Tabla 1. Comparación de FadD de *E. coli*, SMA0150 y SMB20650 respecto a SMc02162. Las secuencias, comparaciones y valores mostrados en la tabla se obtuvieron mediante la herramienta BLAST de la página del “National Center of Biotechnology Information” (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Proteína	Localización	Aminoácidos	Identidad (%) a SMc02162	Similitud (%) a SMc02162
SMc02162	Cromosoma	566	---	---
FadD_{E.coli}	Cromosoma	561	56	73
SMA0150	pSymA	508	31	48
SMB20650	pSymB	515	30	44

* Las claves de acceso para las secuencias de aminoácidos en el portal NCBI de FadD *E. coli* SMc02162, SMA0150 y SMB20650; son NP_416319.1, NP_384590.1, NP_435326.1 y NP_437898.1 respectivamente.

El alineamiento de SMc02162, SMA0150, SMB20650 y FadD de *E. coli* se presenta en la **Figura A1**. SMA0150 y SMB20650 contienen una secuencia similar al motivo consenso de unión a ATP-AMP (común en todos los miembros de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato) así como una secuencia de 25 aminoácidos semejante al motivo consenso de acil-CoA sintetasa específica para AG de cadena larga (FACS) que ha sido propuesto como parte del sitio de reconocimiento al ácido graso dentro de la enzima FadD (Black & DiRusso, 2003) (**Figura A1**).

En la **Figura 8** se presenta el alineamiento de los motivos consenso FACS de FadD *E. coli*, de *S. meliloti* y las FadDs putativas SMA0150 y SMB20650 de *S. meliloti*. SMc02162 comparte 13 de los 25 residuos de aminoácidos conservados en el motivo consenso FACS que incluyen las lisinas (K) en las posiciones 24 y 25; las cuales se sugiere contribuyen a la especificidad en la longitud de cadena del ácido graso (Black *et al.*, 1997). SMA0150 comparte 10 de los 25 residuos de aminoácidos del motivo consenso FACS entre los cuales no se incluyen los residuos importantes como la lisina (K) en la posición 24 y el ácido aspartico (D) en la posición 22. Por otra parte SMB20650 comparte sólo 9 de los residuos de aminoácidos del motivo consenso FACS, destacándose la ausencia de residuos importantes

como la glicina (G) y la lisina (K) en las posiciones 2 y 25 respectivamente, y el ácido aspartico (D) en la posición 22. Estos residuos de aminoácidos distintos al motivo consenso FACS en SMa0150 y SMb20650 son importantes para el reconocimiento del AG y de su longitud de cadena (Black *et al.*, 1997), por lo que estas proteínas podrían funcionar como FadD pero con afinidades por AG de diferentes longitudes de cadena.



Figura 8. Alineamiento de los motivos consenso de acil-CoA sintetasa (FACS) de *E. coli* (FadD), FadD de *S. meliloti* (SMc02162), FadDs putativas SMa0150 y SMb20650 de *S. meliloti*. La secuencia en la parte superior representa el motivo consenso FACS propuesto por Black y colaboradores (1997). Los residuos de aminoácidos idénticos se muestran en cajas negras, mientras que los similares se muestran en grises. Los aminoácidos conservados en el motivo consenso y en las 4 secuencias se denotan con asteriscos sobre la línea consenso.



3. Objetivo general:

Determinar la relación de FadD y sus proteínas homólogas (SMa0150 y SMb20650) en el metabolismo de lípidos y la motilidad de *S. meliloti*.

3.1. Objetivos particulares:

- A. Identificar y analizar las diferencias en el metabolismo de lípidos que se produzcan entre *S. meliloti* y la cepa mutante en *fadD*.
- B. Evaluar si alguno (o algunos) de los metabolitos diferenciales son capaces de desencadenar el fenotipo de “swarming”.
- C. Evaluar las funciones de SMa0150 y SMb20650.

4. Resultados.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la tesis se dividieron en dos secciones; la primera corresponde al artículo publicado y la segunda parte a los resultados aún sin publicar.

4.1 Artículo publicado.

Ángel Pech-Canul, Joaquina Nogales, Alfonso Miranda-Molina, Laura Álvarez, Otto Geiger, María José Soto, and Isabel M. López-Lara (2011) FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J. Bacteriol.* **193**: 6295-6304. doi:10.1128/JB.05450-11.

La proteína FadD es una acil-CoA sintetasa responsable de la activación de ácidos grasos exógenos de cadena larga. La mutación de *fadD* en *Sinorhizobium meliloti* provoca un fenotipo de motilidad de “swarming” y un defecto en el establecimiento de la simbiosis con su planta hospedadora *Medicago sativa*. Se encontró que la cepa mutante en *fadD* de *S. meliloti* acumula una mezcla de ácidos grasos libres de cadena larga (AGL) durante la fase estacionaria de crecimiento. La composición de estos AG así como los resultados obtenidos al marcar específicamente los ácidos grasos esterificados con una $\Delta 5$ -desaturasa muestran que los AG acumulados provienen de los lípidos de membrana. Las cepas mutadas en *fadD* de *Escherichia coli* también acumulan AG en la fase estacionaria de crecimiento. Este fenómeno no se observó en la cepa de *E. coli* mutante en el transportador de ácidos grasos FadL, lo cual sugiere que la acumulación de AG no es resultado de la lisis celular. Los resultados obtenidos revelan que, además de la activación de los AG exógenos, FadD tiene una función principal en la activación de los AG liberados de los lípidos de membrana. Adicionalmente, análisis de expresión en *S. meliloti* revelan que se requiere un FadD funcional para la activación de los genes involucrados en la degradación de AG y que en la cepa silvestre los AG liberados de los lípidos de membrana en la fase estacionaria de crecimiento se degradan por β -oxidación.

FadD Is Required for Utilization of Endogenous Fatty Acids Released from Membrane Lipids^{∇†}

Ángel Pech-Canul,¹ Joaquina Nogales,² Alfonso Miranda-Molina,³ Laura Álvarez,³
Otto Geiger,¹ María José Soto,² and Isabel M. López-Lara^{1*}

Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, Mexico¹; Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain²; and Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, Mexico³

Received 3 June 2011/Accepted 10 September 2011

FadD is an acyl coenzyme A (CoA) synthetase responsible for the activation of exogenous long-chain fatty acids (LCFA) into acyl-CoAs. Mutation of *fadD* in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti* promotes swarming motility and leads to defects in nodulation of alfalfa plants. In this study, we found that *S. meliloti fadD* mutants accumulated a mixture of free fatty acids during the stationary phase of growth. The composition of the free fatty acid pool and the results obtained after specific labeling of esterified fatty acids with a $\Delta 5$ -desaturase ($\Delta 5$ -Des) were in agreement with membrane phospholipids being the origin of the released fatty acids. *Escherichia coli fadD* mutants also accumulated free fatty acids released from membrane lipids in the stationary phase. This phenomenon did not occur in a mutant of *E. coli* with a deficient FadL fatty acid transporter, suggesting that the accumulation of fatty acids in *fadD* mutants occurs inside the cell. Our results indicate that, besides the activation of exogenous LCFA, in bacteria FadD plays a major role in the activation of endogenous fatty acids released from membrane lipids. Furthermore, expression analysis performed with *S. meliloti* revealed that a functional FadD is required for the upregulation of genes involved in fatty acid degradation and suggested that in the wild-type strain, the fatty acids released from membrane lipids are degraded by β -oxidation in the stationary phase of growth.

The model microorganism *Escherichia coli* can grow using long-chain fatty acids (LCFA) as the sole carbon source. LCFA (>10 carbons) are transported into the cell by the outer membrane protein FadL and subsequently converted into their coenzyme A (CoA) thioesters by acyl-CoA synthetase, encoded by *fadD* (41). Degradation of acyl-CoAs proceeds via an inducible set of enzymes that catalyze the β -oxidative cleavage of the acyl-CoA into acetyl-CoAs. The first step in the β -oxidation cycle involves the conversion of acyl-CoA to enoyl-CoA via FadE. The remaining steps of hydration, oxidation, and thiolitic cleavage in fatty acid degradation are performed by a tetrameric complex consisting of two copies each of FadA and FadB (reviewed in reference 41). Strains mutated in *fadD* cannot produce acyl-CoA and thus cannot grow on exogenous LCFA (41). Mutant strains with a deletion of the *fadL* gene cannot transport LCFA across the cell envelope and, therefore, cannot grow on LCFA, yet they retain the ability to β -oxidize LCFA *in vitro* (9).

Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with the combined deletion of *faa1* and *faa4*, encoding two acyl-CoA synthetases, secrete fatty acids (44). Cyanobacteria are able to incorporate

exogenous fatty acids, although they seem to be devoid of an acyl-CoA synthetase activity. Instead, they contain an acyl-acyl carrier protein synthetase (Aas) activity that catalyzes the ATP-dependent esterification of fatty acids to acyl carrier protein (24). Mutants of cyanobacteria in Aas are unable to utilize exogenous fatty acids and secrete endogenous fatty acids into the culture medium (24). In both cases, *S. cerevisiae* mutants defective in acyl-CoA synthetases and the cyanobacterial Aas mutants, it has been established that released fatty acids originate from membrane lipids (24, 44). It was proposed that the fatty acids are released as a consequence of lipid remodeling when fatty acid residues are exchanged (24, 44).

Recently we identified a different process of lipid remodeling in *Sinorhizobium meliloti* that involves the polar head group of membrane lipids instead of fatty acids (50). Under growth conditions of sufficient phosphate, 95% of the membrane lipids of *S. meliloti* are phospholipids consisting of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine (PE), monomethyl-PE, dimethyl-PE, phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin. However, under phosphorus-limiting conditions, *S. meliloti* 1021 is able to remodel existing phospholipids to convert most of them into phosphorus-free membrane lipids (50). The outer leaflet of the outer membrane in Gram-negative bacteria contains minor amounts of phospholipids but is mainly composed of lipopolysaccharides (LPS). LPS consist of three structural regions, where the lipid A region provides the hydrophobic part that anchors the LPS to the outer membrane. Remarkably, 3-hydroxy-fatty acids are part of the lipid A structure, while such fatty acids do not usually appear in phospholipids. Several

* Corresponding author. Mailing address: Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 565-A, Cuernavaca Morelos C.P. 62210, Mexico. Phone: 52-7773-3131697. Fax: 52-7773-175581. E-mail: isabel@ccg.unam.mx.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jba.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 16 September 2011.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5 α	<i>recA1</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15; cloning strain	22
S17-1	<i>thi pro recA hsd(r_K⁻ m_K⁺)</i> ; RP4 integrated in the chromosome; 2-Tc::Mu Km::Tn7 (Tp ^r /Sm ^r)	47
Y-Mel	Wild-type strain	39
K-27	<i>fadD</i> mutant derivative of Y-Mel	36
JW1794-1	BW25113 <i>fadD::kan</i>	4
JW2341-1	BW25113 <i>fadL::kan</i>	4
YfadD1	Y-Mel <i>fadD::kan</i>	This work
YfadL1	Y-Mel <i>fadL::kan</i>	This work
KfadL1	K27 <i>fadL::kan</i>	This work
<i>Sinorhizobium meliloti</i> strains		
GR4	Wild-type strain	12
QS77	<i>fadD::Tn5</i> insertion mutant derivative of GR4, Km ^r	48
1021	Sm ^r of SU47 wild type	20
1021FDC5	<i>fadD</i> mutant derivative of wild-type 1021, Sm ^r Km ^r	34
Plasmids		
pET17b	Expression vector, Cb ^r	Novagen
pBBR1MCS-3	Broad-host-range vector, Tc ^r	28
pBBRD4	pBBR1MCS-3 derivative harboring <i>fadD</i> of <i>S. meliloti</i> GR4, Tc ^r	48
pRK404	Broad-host-range vector, Tc ^r	15
pDM10	pHP13 derivative containing the Δ 5-Des gene of <i>B. subtilis</i>	1
pNG28	pET17b cloned in pRK404	This work
pECH9	Δ 5-Des gene of <i>B. subtilis</i> in pET17b	This work
pRCanul5	pECH9 cloned in pRK404	This work

^a Tc^r, Tp^r, Km^r, Sm^r, and Cb^r indicate tetracycline, trimethoprim, kanamycin, streptomycin, and carbenicillin resistance, respectively.

studies have shown the importance of LPS for *S. meliloti* (7, 18, 45).

In several bacteria, a mutation in *fadD* provokes phenotypes apparently unrelated to the function of FadD as an enzyme required for growth on LCFA (5, 32, 48). A mutant of *Streptomyces coelicolor* in *fadD1* shows a severe deficiency in the production of the antibiotic actinorhodin (Atc), which seems to be related to a delayed expression of the *act* biosynthetic genes (5). In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, a mutation in *fadD* represses the expression of HilA, an activator of invasion genes (32). The lack of *fadD* in *Sinorhizobium meliloti* GR4 results in multicellular swarming behavior and defects in the establishment of its symbiosis with alfalfa (48). Swarming is a type of bacterial motility characterized by a rapid and coordinated population migration across a surface and involves a complex process of differentiation in which cells usually become hyperflagellated and elongated (19). Interestingly, *fadD1* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* also showed an increased swarming motility (25), and *fadD* mutants of *Vibrio cholerae* showed a repression of the major virulence genes as well as an increase in motility (38).

Although the wild-type strain of *S. meliloti* GR4 never shows swarming motility, the *S. meliloti* wild-type strains 1021 and 2011 presented a surface movement resembling that of the *fadD* mutants in approximately 70% of experiments (34). In all three *S. meliloti* strains, a mutation in *fadD* promoted swarming motility (34). Furthermore, it was demonstrated that genes required for the biosynthesis of the siderophore rhizobactin 1021 are essential for swarming in the wild-type strains, but they are dispensable in a *fadD* mutant background (34). Given the function of FadD in fatty acid metabolism, we investigated

the lipidic composition of *S. meliloti* wild-type and *fadD* mutant strains. We found that the *fadD* mutant of *S. meliloti* accumulated significant amounts of free fatty acids in the stationary phase of growth. Several lines of evidence support that the fatty acids accumulated in the *fadD* mutant are derived from complex membrane lipids. We propose that a major function of FadD is the utilization of endogenous free fatty acids that could have been released as a result of lipid remodeling.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristics are listed in Table 1. Mutations of the *fadD* or *fadL* gene in *E. coli* Y-Mel or in K27(pBBR1MCS-3) were transduced from strains in the Keio Collection (4) by P1_{vir} transduction (49). Correct transfer of the *fadL* mutation in strains YfadL1 and KfadL1 was corroborated using K2 oligonucleotide (4) and an oligonucleotide that matched the last 21 nucleotides of the *fadL* gene (data not shown) by using PCR and amplification of a fragment of the expected size. *E. coli* strains were grown at 30°C either in Luria-Bertani (LB) broth (43) or in M9 minimal medium (33). *S. meliloti* strains were grown at 30°C either in complex tryptone yeast (TY) broth supplemented with 4.5 mM CaCl₂ (8) or in the minimal medium Sherwood (46), with succinate (8.3 mM) replacing mannitol as the carbon source, or Robertsen (40). Antibiotics were added, when required, to the following final concentrations (in μ g ml⁻¹): carbenicillin (100) and tetracycline (20) for *E. coli*; streptomycin (200), kanamycin (200), and tetracycline (8) for *S. meliloti*.

DNA manipulations. Recombinant DNA techniques were carried out using standard procedures (43). The Δ 5-desaturase (Δ 5-Des) gene was amplified from plasmid pDM10 (1) using the specific oligonucleotides 5'-AGGAATACATATGACTGAACAACCATTGCAC-3' and 5'-AAAGGATCCTCAGGCATTCTCCGCAGC-3'. The forward primer incorporated an NdeI restriction site (underlined) overlapping the start codon of the gene, and the reverse primer incorporated a BamHI restriction site (underlined) after the stop codon. After digestion of the amplified fragment with NdeI and BamHI, it was cloned into pET17b that had been digested with the same enzymes, resulting in plasmid pECH9. Plasmid pECH9 was linearized with BamHI and cloned into pRK404

TABLE 2. Sequences of oligonucleotides used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>smc03224</i> (16S rRNA)	TCTACGGAATAACGCAGG	GTGTCTCAGTCCCAATGT
<i>smc02227</i> (<i>fadB</i>)	TCGATGAACGTCTTCACC	CGGAGAAGGAGGATTTCG
<i>smc02229</i>	GACATCCTCAGTCTGATG	CGTGCTCTTCGATATAGC

previously digested with BamHI, resulting in plasmid pRCanu5. As a control, pET17b was linearized with BamHI and cloned into pRK404 previously digested with the same enzyme, resulting in plasmid pNG28. pRCanu5 and pNG28 were mobilized into *S. meliloti* 1021FDC5 by biparental mating using the *E. coli* S17-1 donor strain as described previously (47).

In vivo labeling of *S. meliloti* and *E. coli* with [¹⁴C]acetate and analysis of lipid extracts by TLC. The lipid compositions of the different *S. meliloti* and *E. coli* strains were determined following labeling with [¹⁴C]acetate. Cultures (1 ml) were inoculated at an initial optical density at 620 nm (OD₆₂₀) of 0.1 from precultures grown in the same medium. After the addition of 2 μCi [¹⁴C]acetate (60 mCi mmol⁻¹) to each culture, they were incubated to distinct time points in different growth phases. The cells were harvested by centrifugation, washed with 500 μl of water, and resuspended in 100 μl of water. The lipids were extracted according to the method of Bligh and Dyer (10). The chloroform phase was used for lipid analysis by one-dimensional thin-layer chromatography (TLC) using high-performance TLC silica gel 60 plates (Merck) and mobile-phase ethyl acetate-hexane-acetic acid (60:40:5 [vol/vol/vol]). Two-dimensional TLC was performed as described previously (14). Radioactivity was detected using a Storm 820 PhosphorImager (Amersham Biosciences). Image analysis and signal quantification were carried out using ImageQuant TL (Amersham Biosciences).

Fatty acid analysis. For fatty acid analysis, 20-ml cultures were grown until early stationary phase for *S. meliloti* or until late stationary phase for *E. coli*. Cells and culture media were separated by centrifugation at 6,000 × g for 15 min. Cell pellets were resuspended in 1 ml of water and extracted according to the methods described by Bligh and Dyer (10). To distinguish between free and esterified fatty acids in cellular lipid extracts, samples were split into two equivalent parts and treated with two different reagents that resulted in either specific methylation of free fatty acids or in transmethylation of esterified fatty acids (44). Fatty acids from spent supernatants were extracted twice with equal volumes of acidified ethyl acetate (0.1-ml liter⁻¹ glacial acetic acid), and they were subsequently converted to methyl esters as described previously (44). Ten micrograms of tridecanoic acid (C_{13:0}) was added as an internal standard. The methyl esters were extracted twice with 1 ml of hexane each time followed by centrifugation. The upper hexane phases were pooled into a new glass vial and dried under a nitrogen stream.

For quantitative analysis, fatty acid methyl esters were dissolved in 600 μl hexane (high-performance liquid chromatography/spectrophotometric grade), and 1 μl was used for analysis by gas chromatography (GC; model 6890; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) coupled to a mass spectrometric detector (quadrupole MSD HP 5973; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Samples were separated in a 5% phenyl, 95% methylpolysiloxane capillary column (HP-5MS; 25-m by 0.200-mm with 0.33-μm film thickness; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The oven was set at 100°C for 2 min, and the following gradient was used: 100°C to 244°C at 5°C min⁻¹ and then holding at 244°C for 10 min. Helium was used as the carrier gas, with a flow rate of 40 cm s⁻¹ at 100°C. The molecules were ionized by electron impact at 70 eV. Fatty acid species were identified using retention times and mass spectral information by comparison with the bacterial acid methyl esters mix standard (BAME 47080-U; Sigma-Aldrich). The relative amounts of fatty acid methyl esters were determined by comparing the areas under the peaks on the chromatogram to the area under the peak of the internal fatty acid standard (C_{13:0}).

RNA isolation and synthesis of labeled DNA. For RNA isolation, preinocula of 1021 and 1021FDC5 cells were grown at 30°C in 3 ml of TY broth to late exponential phase (OD₆₂₀, 1.0 to 1.1). After incubation, 1 ml of each culture was pelleted, washed twice in Robertsen minimal medium, and resuspended in the same volume of the latter medium. Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 30 ml of liquid Robertsen medium were inoculated with 0.3 ml of the rhizobial suspension and incubated at 30°C with continuous shaking (190 rpm) until reaching either an OD₆₂₀ of 0.7 to 0.8 (mid-exponential phase of growth) or an OD₆₂₀ of 1.1 to 1.2 (beginning of stationary phase of growth). Cells were harvested by centrifugation and washed with 0.1% Sarkosyl, and the cell pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until RNA isolation.

For microarray hybridization and reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR), RNA was isolated using the Qiagen RNeasy RNA purification kit following the manufacturer's instructions. Residual DNA was removed with the RNase-free DNase I set (Roche). The quality of the RNA was checked by 1.4% agarose gel electrophoresis.

Cy3- and Cy5-labeled cDNAs were prepared according to the methods of DeRisi et al. (13) from 15 μg of total RNA. Three slide hybridizations were performed using the labeled cDNA synthesized from each of the RNA preparations from three independent bacterial cultures.

Microarray hybridization, image acquisition, and data analysis. Sm6koligo microarrays were purchased from A. Becker (University of Bielefeld, Bielefeld, Germany). Hybridizations were performed as described previously (16). For image acquisition, a GenePix 4100A scanner (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA) was used. Quantifications of mean signal intensities for each spot were determined using the GenePix Pro 5.0 software (Axon Instruments, Inc.). Normalization and *t* statistic determinations were carried out using the EMMA 2.6 microarray data analysis software developed at the Bioinformatics Resource Facility Center for Biotechnology, Bielefeld University (<http://www.genetik.uni-bielefeld.de/EMMA/>) (17). Three independent biological replicates were performed for each experiment. Genes were regarded as differentially expressed if they showed a *P* value of ≤0.05, *A* of ≥7, and *M* of ≥1 or ≤(-1) (where *A* is the average signal-to-noise ratio and *M* is the log₂[experiment/control] ratio).

RT-qPCR. Total RNA (1 μg) treated with an RNase-free DNase I set (Roche) was reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Roche) as primers. Quantitative real-time PCR was performed on an iCycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA). Each 25-μl reaction mixture contained either 1 μl of the cDNA or a dilution (1:10,000 for amplification of the 16S rRNA gene), 200 nM each primer, and iQ SYBR green supermix (Bio-Rad). Control PCRs of the RNA samples not treated with reverse transcriptase were also performed to confirm the absence of contaminating genomic DNA. Samples were initially denatured by heating at 95°C for 3 min, followed by a 35-cycle amplification and quantification program (95°C for 30 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s). A melting curve was conducted to ensure amplification of a single product. The oligonucleotide sequences for qPCR are listed in Table 2. The efficiency for each primer pair (*E*) was determined by running 10-fold serial dilutions (4 dilution series) of 1021 genomic DNA as template and generating a standard curve by plotting the log of the dilution factor against the cycle threshold (*C_T*) value during amplification of each dilution. Amplification efficiency (*E*) was calculated using the formula $E = [10^{(1/a)} - 1] \times 100$, where *a* is the slope of the standard curve.

The relative expression level of each gene was normalized to that of 16S rRNA, and the analysis of results was done using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta C_T$) method (37).

Microarray accession number. Detailed protocols and raw data resulting from the microarray experiments have been deposited in the ArrayExpress database with the accession number E-MEXP-2651.

RESULTS

***Sinorhizobium meliloti fadD* mutants accumulate free fatty acids in the stationary phase of growth.** The gene *fadD* encodes a long-chain fatty acyl-CoA synthetase, and in order to follow fatty acid metabolism in *S. meliloti* wild type and a *fadD* mutant, we grew cultures of them in the presence of [¹⁴C]acetate. Lipid extracts obtained from cultures grown until different time points in the distinct growth phases were first analyzed by one-dimensional TLC, with a mobile phase consisting of ethyl acetate-hexane-acetic acid (60:40:5) to allow separation of the more hydrophobic compounds. Lipid extracts from cul-

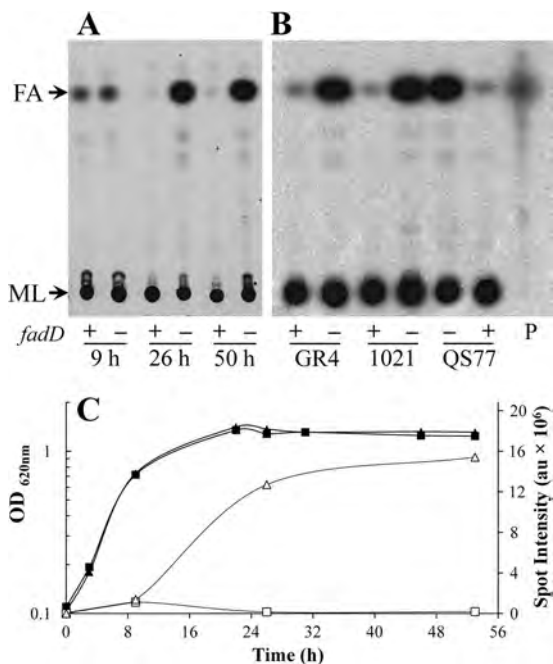


FIG. 1. *S. meliloti fadD* mutants accumulate fatty acids in the stationary phase of growth. (A) Cellular lipid extracts obtained either from wild-type *S. meliloti* GR4 (*fadD*⁺) or from its *fadD*-deficient mutant QS77 were grown until exponential phase (OD₆₂₀, 0.7; 9 h of growth), until early stationary phase (OD₆₂₀, 1.2; 26 h of growth), or until late stationary phase (50 h of growth). (B) Lipid extracts of cultures grown until the early stationary phase (OD₆₂₀, 1.2) of the *S. meliloti* strains GR4 (*fadD*⁺) and its *fadD*-deficient mutant derivative QS77; 1021 (*fadD*⁺) and its mutant *fadD*-deficient derivative 1021FDC5; QS77 carrying the empty vector pBBR1MCS-3 or carrying *fadD*-containing plasmid pBBRD4 (*fadD*⁺). P, [¹⁴C]palmitic acid. Membrane lipids (ML) did not migrate from the origin, and the spot for fatty acids (FA) is indicated. (C) Growth curves of strains GR4 (■) and QS77 (▲) and quantification of their fatty acids (GR4 [□] and QS77 [△]), corresponding with the TLC plate shown in panel A. Quantification of the intensity of the spot for fatty acids is given in arbitrary units (au). Cultures were grown on Sherwood minimal medium. Similar results were obtained with cultures grown on Robertsen minimal medium.

tures of *S. meliloti* GR4 and its *fadD*-deficient mutant QS77 grown to exponential phase showed similar levels of a spot that appeared to run as fatty acids (Fig. 1A and C). However, the extract of cultures grown to early or late stationary phases showed a significant increase in the spot for fatty acids in strain QS77, while this spot was barely detected in lipid extracts from the wild-type GR4 (Fig. 1A and C). Also, the accumulation of a compound migrating like fatty acids was observed in lipid extracts obtained from the *S. meliloti fadD* mutant strain derived from the sequenced *S. meliloti* 1021 strain grown to the early stationary phase of growth (Fig. 1B). Furthermore, complementation of QS77 with the *fadD*-bearing plasmid pBBRD4 abolished the accumulation of fatty acids, while QS77 carrying an empty plasmid (pBBR1MCS-3) still accumulated fatty acids (Fig. 1B). Therefore, the accumulation of fatty acids in the stationary phase of growth is directly related to the absence of *fadD*.

In Fig. 1C, the growth behaviors of strain GR4 and its *fadD* mutant are shown in relation to the content of fatty acids.

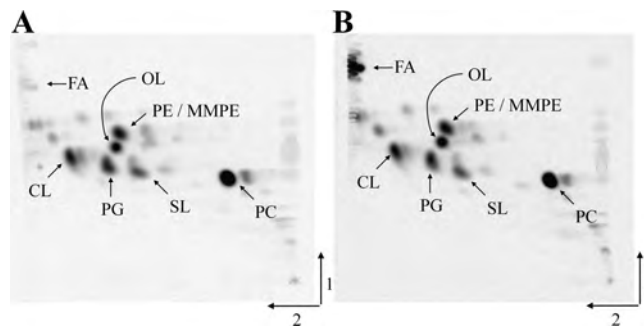


FIG. 2. Separation of [¹⁴C]acetate-labeled lipids of wild-type *S. meliloti* 1021 (A) and the *fadD*-deficient mutant 1021FDC5 (B) by two-dimensional thin-layer chromatography. Cultures were grown until early stationary phase (final OD₆₂₀, 1.2) in Sherwood minimal medium. Fatty acids (FA) and the membrane lipids phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), monomethyl-PE (MMPE), sulfolipid (SL), ornithine lipid (OL), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL) are indicated.

Similar results were obtained with wild-type strain 1021 and its *fadD*-deficient mutant, 1021FDC5 (data not shown). A two-dimensional TLC analysis of lipid extracts from 1021 and its *fadD*-deficient mutant, 1021FDC5, grown until early stationary phase, showed no difference with respect to major membrane lipids but revealed clearly the accumulation of fatty acids in the mutant (Fig. 2).

The compound accumulated in the *fadD* mutants comigrated in different separation systems as free fatty acids (Fig. 1 and 2). Therefore, we proceeded to analyze the content of free fatty acids on lipid extracts from wild-type 1021 and its *fadD*-deficient derivative, 1021FDC5, that had been grown on minimal medium to the early stationary phase. The concentrations of free fatty acids in lipid extracts obtained from cell pellets were significantly higher in the mutant than in the wild type. The lipid extract of the *fadD*-deficient mutant contained relative concentrations of total free fatty acids corresponding to 102.6 (standard deviation [SD], 36.7) nmol ml of culture⁻¹, while samples of the wild-type strain contained only 0.75 (SD, 0.24) nmol ml⁻¹ (see Table S1 of the supplemental material). Clearly, the mutation in *fadD* resulted in a significant accumulation of cell-associated free fatty acids. The most abundant fatty acid accumulated in the *fadD* mutant was *cis*-vaccenic acid (C_{18:1} Δ11), comprising more than 60% of the total fatty acids. Following in abundance were palmitic acid (C_{16:0}; 26.4%), stearic acid (C_{18:0}; 5.8%), and lactobacillic acid (C_{19:0cp}; 5.0%) (Fig. 3A; see also Table S1). These are the same fatty acids found typically esterified to membrane lipids of *S. meliloti* (6). We quantified the esterified fatty acids in the cellular lipid extracts of 1021 and its *fadD* mutant and found that the patterns of esterified fatty acids present in both strains were similar (Fig. 3B; see also Table S1). Furthermore, the composition of free fatty acids that accumulated in 1021FDC5 reflected the composition of fatty acids esterified to membrane lipids (Fig. 3A and B). Also, a modest accumulation of free fatty acids was observed in supernatants of cultures of the *fadD* mutant. A total of 3.15 (SD, 0.55) nmol of fatty acids ml⁻¹ was present in the culture medium of the mutant versus 0.31 (SD, 0.06) nmol ml⁻¹ present in that of the wild type (see also Table S1). Besides the detection of fatty acids usually known to be

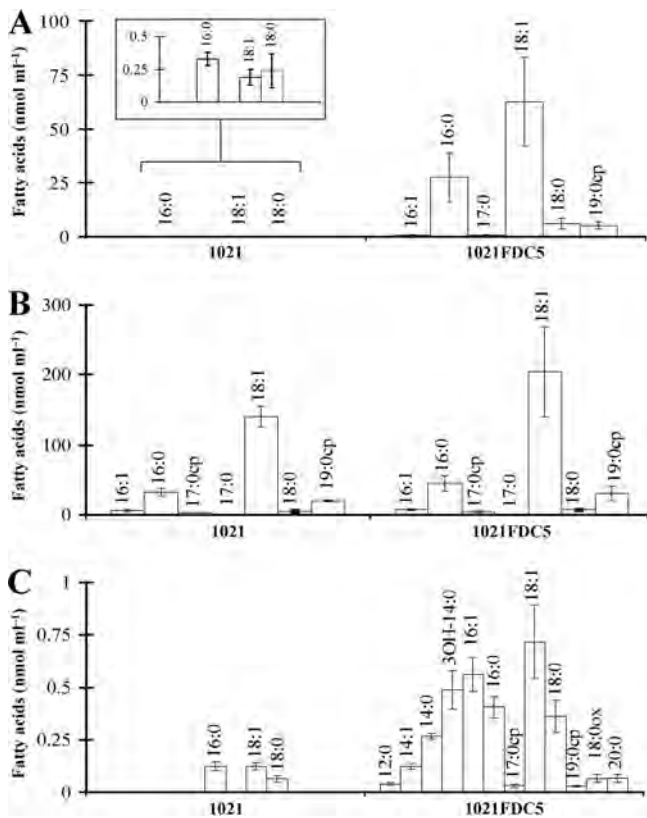


FIG. 3. Fatty acid profiles of lipid extracts from cells and spent culture medium of wild-type *S. meliloti* 1021 and *fadD* mutant 1021FDC5. (A) Free fatty acids in cell lipid extracts. (B) Esterified fatty acids in cell lipid extracts. (C) Free fatty acids in the culture medium. Concentrations are given in nmol/ml of culture. The inset in panel A depicts magnified columns. For each strain, three independent cultures were analyzed. The error bars represent the SD.

esterified to membrane phospholipids, the supernatant of the mutant strain contained significant amounts of myristic (C_{14:0}) and 3-hydroxymyristic (3-OH-C_{14:0}) acids (Fig. 3C; see also Table S1). In particular, 3-OH-C_{14:0} amounted to 15.5% of the total free fatty acids present in the spent culture medium. This is remarkable, as 3-OH-C_{14:0} is the most abundant fatty acid in lipid A of *S. meliloti* (18, 45), and it might be found in the medium due to release from lipid A. Less abundant, each one comprising from 1 to 3.8% of the total, were the fatty acids C_{12:0}, C_{14:1}, C_{20:0}, and C_{18:0} epoxide.

The accumulated free fatty acids derive from complex membrane lipids. The free fatty acids identified in cellular lipid extracts from the *fadD* mutant reflected the composition of the fatty acids usually esterified to membrane lipids (Fig. 3; see also Table S1 in the supplemental material). The detection of cyclopropane fatty acids (C_{17:0cp} and C_{19:0cp}) in the free fatty acid fraction was remarkable, as cyclopropanation in fatty acids is introduced by cyclopropane fatty acid synthases on fatty acyl residues that are esterified to membrane lipids (21). The presence of the cyclopropane fatty acids in the culture medium and in the cell lipid extracts strongly suggested that these fatty acids had been released from complex membrane lipids.

With the aim to obtain additional proof about the metabolic origin of the free fatty acids, we followed a similar strategy to

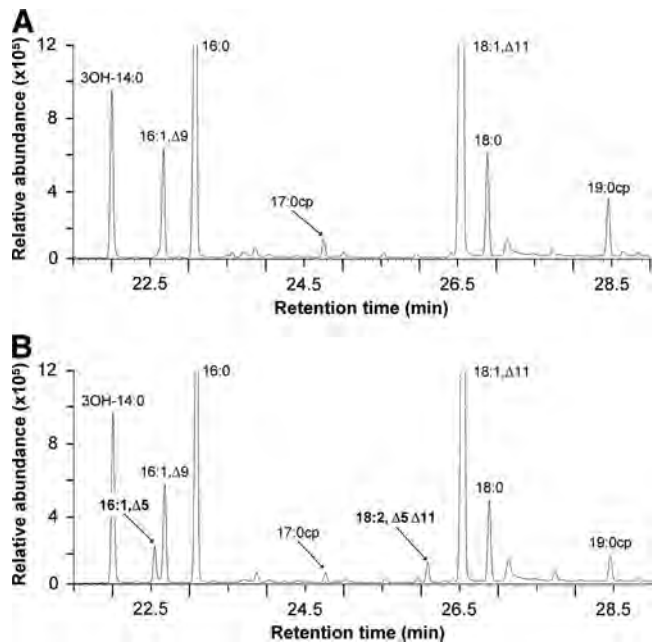


FIG. 4. Expression of the $\Delta 5$ -Des gene in *S. meliloti* 1021FDC5 leads to formation of $\Delta 5$ -unsaturated free fatty acids. Partial gas chromatograms of methyl esters obtained from fatty acids in the spent culture medium of 1021FDC5 carrying an empty vector (A) or expressing the $\Delta 5$ -Des gene (B) are shown. The different fatty acids in panel A were confirmed by comigration and by comparison of their mass spectra with authentic standards. The $\Delta 5$ -modified fatty acids were identified by comparison with reported spectra (see Fig. S1 and S2 in the supplemental material).

that described for yeast by Scharniewski and coworkers (44). This strategy consists of introducing a fatty acid modification that occurs only when fatty acids are substituents of membrane phospholipids. We introduced the gene coding for $\Delta 5$ -Des lipid desaturase from *Bacillus subtilis* into the *fadD* mutant 1021FDC5. $\Delta 5$ -Des is a membrane-bound acyl desaturase that introduces a *cis*-double bond between the 5 and 6 positions of fatty acyl residues attached to membrane lipids (2). The analysis by gas chromatography of methyl esters obtained from free fatty acids in the spent culture medium of 1021FDC5 cells expressing the $\Delta 5$ -Des gene showed the presence of two additional peaks that were not present in the same fraction of 1021FDC5 carrying an empty vector (Fig. 4). The new peaks were identified as C_{16:1} $\Delta 5$ and C_{18:2} $\Delta 5$ $\Delta 11$, based on comparison of the mass spectra we obtained with those reported for the methyl ester of C_{16:1} $\Delta 5$ (35) and for the methyl ester of C_{18:2} $\Delta 5$ $\Delta 11$ (11) (see Fig. S1 and S2 in the supplemental material, respectively). The capacity of $\Delta 5$ -Des to produce C_{18:2} $\Delta 5$ $\Delta 11$ was demonstrated previously after overexpression of the enzyme in *E. coli* (11). Expression of the $\Delta 5$ -Des gene in the *S. meliloti* *fadD* mutant strain resulted in an abundance of 5.5% of $\Delta 5$ -modified fatty acids in the pool of esterified fatty acids, indicating successful expression of the $\Delta 5$ -desaturase (data not shown). More interestingly, 1.5% of the free fatty acids of the cell lipid extract (data not shown) and 3% of free fatty acids in the culture medium (Fig. 4) contained $\Delta 5$ -modified fatty acids. These findings indicate a release of the modified lipid-bound fatty acyl residues into the pool of free fatty

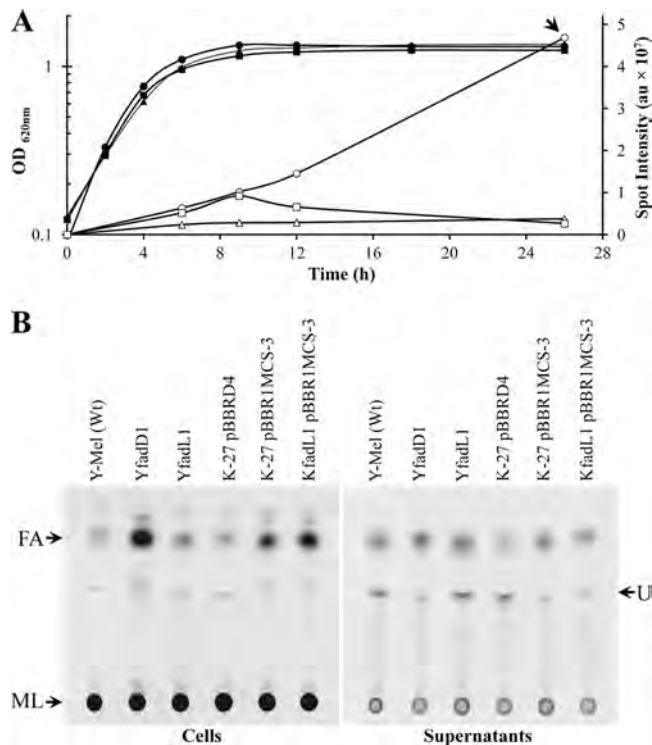


FIG. 5. *fadD* mutants of *E. coli* accumulate free fatty acids in the late stationary phase of growth. (A) Growth curves of strains Y-Mel (■), K-27(pBBRD4) (▲), and K-27(pBBR1MCS-3) (●) and quantification of fatty acids for Y-Mel (□), K-27(pBBRD4) (△), and K-27(pBBR1MCS-3) (○). Quantifications of the intensities of the spots for fatty acids are given in arbitrary units (au). (B) Lipid extracts from cells or supernatants of *E. coli* strains Y-Mel (Wt), YfadD1 (*fadD* deficient), YfadL1 (*fadL* deficient), K-27(pBBRD4) (*fadD* deficient) complemented with *fadD* from *S. meliloti*, K-27(pBBR1MCS-3) (*fadD* deficient), and KfadL1(pBBR1MCS-3) (*fadD* and *fadL* deficient). Lipid extracts were obtained from cultures grown until late stationary phase (26 h). FA, fatty acids; ML, membrane lipids (did not migrate from the origin); U, unidentified lipid. Cultures were grown on M9 minimal medium. The arrow in panel A indicates when samples shown in panel B were taken.

acids and suggest that the accumulation of free fatty acids is the result of the release of fatty acyl residues from membrane lipids.

Fatty acid release also occurs in *Escherichia coli*. *E. coli* is the model organism in which bacterial fatty acid metabolism has been studied most extensively. Since mutants in *fadD* of *E. coli* were available, we wanted to explore if the phenomenon of release of fatty acids from membrane lipids also occurred in this organism. We first analyzed lipid extracts after labeling of *E. coli* cultures in minimal medium. As observed for *S. meliloti*, there was no difference with respect to the accumulation of free fatty acids during the exponential phase of growth (Fig. 5A). Also, no significant accumulation of fatty acids could be observed in an *E. coli fadD* mutant in the early stationary phase of growth (OD, 1.2; 9 h of growth) (Fig. 5A). However, at 26 h of growth (15 h after entering the stationary phase), significant amounts of free fatty acids were detected in lipid extracts of the *fadD* mutants (Fig. 5). In contrast to the *fadD* mutant, lipid extracts of the late stationary phase of the *E. coli* wild type or the *fadD* mutant complemented with *fadD* from *S. meliloti* did

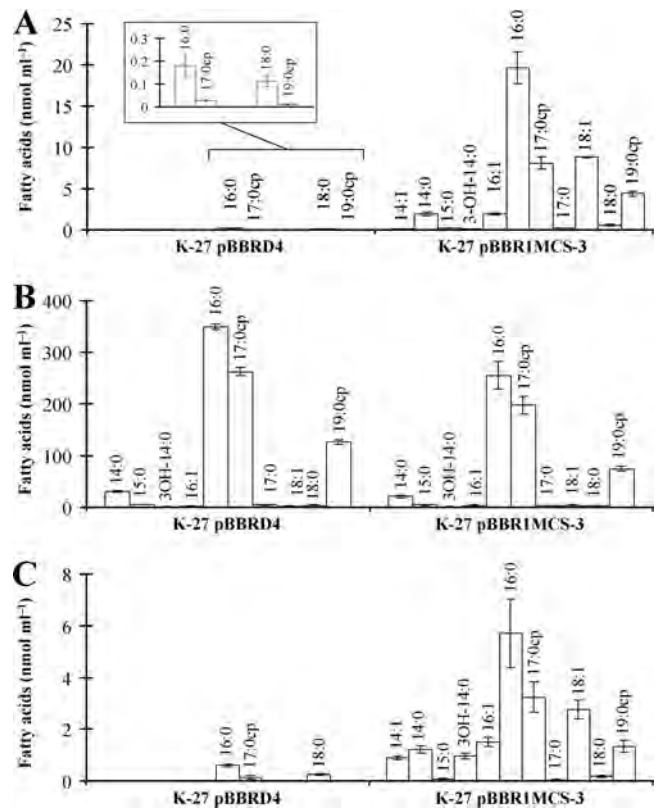


FIG. 6. Fatty acid profiles of lipid extracts from cells and spent culture media of *E. coli* K-27 (*fadD* deficient) carrying *S. meliloti fadD*-containing plasmid pBBRD4 and K-27 carrying empty vector pBBR1MCS-3. (A) Free fatty acids in cell lipid extracts. (B) Esterified fatty acids in cell lipid extracts. (C) Free fatty acids in the culture medium. The inset in panel A depicts magnifications of the columns. For each strain two independent cultures were analyzed.

not show fatty acid accumulation (Fig. 5). We next quantified free fatty acids and esterified fatty acids in the *E. coli fadD* mutant carrying a vector or carrying the same vector with *fadD* of *S. meliloti* from cultures grown in minimal medium until late stationary phase. The cellular lipid extract of the *fadD* mutant contained a total of 46.2 (SD, 3.4) nmol of free fatty acids ml of culture⁻¹, while the lipid extract of the complemented strain contained only a total of 0.33 (SD, 0.08) nmol ml of culture⁻¹ (see Table S2 in the supplemental material). Remarkably, *cis*-vaccenic acid (C_{18:1} Δ11) amounted to 19% of the total in the free fatty acid pool, which is in stark contrast to its presence at less than 1% in the pool of esterified fatty acids (Fig. 6A and B). The other free fatty acids of the lipid extract reflected the composition of the esterified fatty acids (Fig. 6A and B; see also Table S2). The free fatty acids present in the culture medium of the *E. coli fadD* mutant were similar to the free fatty acids present in the cellular lipid extract, with the major difference being that 3-hydroxymyristic acid (3-OH-C_{14:0}) was 5% of the free fatty acids in the culture medium and was only 0.1% in the cell-associated lipid extract (Fig. 6; see also Table S2). The sum of cyclopropane fatty acids (C_{17:0cp} and C_{19:0cp}) in both fractions of free fatty acids consisted of about 25% of the total fatty acids (Fig. 6A and C; see also Table S2). The presence of these cyclopropane fatty acids in the free form

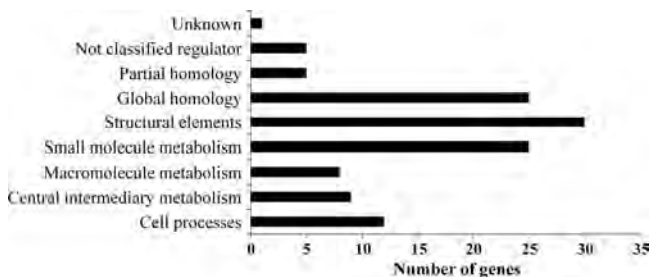


FIG. 7. Distribution in functional categories of downregulated genes in the *S. meliloti fadD* mutant compared to the wild-type strain. Functional categories were assigned according to the *S. meliloti* Genome Project (<http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>).

strongly suggests that they were released from membrane phospholipids, since the cyclopropane fatty acid synthase of *E. coli* only modifies monounsaturated fatty acids that are lipid bound (21). The spectrum of free fatty acids found in the *E. coli fadD* mutant was similar to the spectrum of esterified fatty acids, but it was not identical. This can be explained by the fact that esterified fatty acids continue to be modified, but not the free fatty acids that have been released from the membrane lipids during the distinct growth phases. Since cultures of *E. coli* were collected in late stationary phase, most of the monounsaturated fatty acids in the lipid-bound fraction had been converted to their cyclopropane forms.

The accumulation of free fatty acids observed in both *E. coli* and *S. meliloti fadD* mutants could be explained as a result of lysis of some cells during the stationary phase of growth. However, comparison of OD and CFU values of wild-type and mutant strains at the point where fatty acids were measured does not support this hypothesis (data not shown). Moreover, if fatty acids accumulating in the *fadD* mutant were from an extracellular origin, i.e., from cellular lysis, the accumulation of fatty acids should also be observed in an *E. coli fadL* mutant, which is unable to incorporate exogenously supplied LCFA. To test this hypothesis, *E. coli fadD*, *fadL*, and *fadD fadL* mutants were constructed by transduction. These mutants, in contrast to wild-type *E. coli*, were unable to grow in oleate as a sole carbon source. Furthermore, the incorporation of [¹⁴C] palmitic acid in the mutant strains was as expected for strains with deficiencies in *fadD* or *fadL* (42). Also in our hands, the *fadD* mutant incorporated fatty acids only into phosphatidylethanolamine (data not shown). In contrast, due to the impaired uptake of palmitic acid, we hardly observed any incorporation of fatty acids into the phospholipids of the *fadL* mutant (data not shown). Whereas free fatty acids accumulated in a *fadD* mutant, a *fadL* mutant did not show such an accumulation of fatty acids in cells or in spent medium (Fig. 5B). The fact that fatty acids do not accumulate and must therefore be consumed in a *fadL* mutant strongly suggests that fatty acids that accumulate in the *fadD* mutant are of intracellular origin. The consumption of fatty acids in a *fadL* mutant is in agreement with its reported capability of performing β -oxidation *in vitro* (9). Furthermore, a *fadD fadL* double mutant also accumulated fatty acids in the cell-associated fraction (Fig. 5B), indicating again the intracellular nature of the accumulated fatty acids, because in this strain transport of fatty acids from the outside is impaired.

FadD is required for the upregulation of *S. meliloti* fatty acid degradation (*fad*) genes in the stationary phase of growth.

The differences observed in accumulation of fatty acids between the *fadD* mutant and wild-type strains prompted us to compare the transcriptomes of these two strains in cultures grown in liquid minimal medium at the beginning of the stationary phase. A total of 128 genes appeared to be differentially expressed under these conditions, with the majority of them (120 genes) showing downregulation in the *fadD* mutant compared to the wild-type strain (see Table S3 in the supplemental material). Numbers of downregulated genes in each functional category are presented as a histogram in Fig. 7. Many of the downregulated genes (26%) have unknown functions or display partial or global homology to genes deposited in databases (Fig. 7). Moreover, we found downregulation of a significant number of genes involved in different metabolic activities (Fig. 7; see also Table S3), suggesting a lower metabolic rate in the *fadD* mutant compared to the wild-type strain. Thus, we found downregulation of genes involved in protein metabolism (up to 29 genes coding for ribosomal proteins, 3 elongation factors, and 3 chaperone genes), elements of different respiratory chains and associated functions (11 genes), the active methyl cycle (4 genes), and fatty acid degradation (3 genes). The lower expression of the genes belonging to the operon *smc02229-fadA-fadB* and of genes encoding elements of different respiratory chains in the *fadD* mutant than in the wild-type strain during the stationary phase could indicate a lower level of fatty acid degradation in the mutant and explain the higher accumulation of fatty acids observed in this strain under these conditions. SMC02229 has been annotated as a putative acyl-CoA dehydrogenase, which could catalyze the conversion of acyl-CoA to enoyl-CoA, the first step in the β -oxidation cycle, whereas FadB and FadA participate in the remaining steps of hydration, oxidation, and thiolytic cleavage in fatty acid degradation. Therefore, we decided to analyze the expression of *smc02229* and *fadB* by performing RT-qPCR in 1021 and 1021FDC5 cultures in the exponential and stationary phases of growth (Table 3). The results obtained indicated that at the

TABLE 3. Relative expression of fatty acid degradation genes in *S. meliloti* cultures of two strains at exponential and stationary phases of growth

Gene	Relative expression ratio, 1021 vs. 1021FDC5 ^a		
	Microarrays (OD, 1.2) ^b	RT-qPCR (OD, 1.2) ^c	RT-qPCR (OD, 0.8) ^c
<i>smc02229</i>	11.96	80.64 ± 28.93	-1.65 ± 0.22
<i>fadA</i>	3.5	ND	ND
<i>fadB</i>	2.8	11.68 ± 4.9	1.18 ± 0.1

^a Data correspond to results obtained from cultures of the two strains grown in Robertsen medium. Similar results were obtained from cultures grown in Sherwood medium (data not shown). Cultures in stationary phase (OD, 1.2) were used for the microarray experiments; cultures in either the stationary or exponential (OD, 0.8) growth phase were used in the RT-qPCRs. ND, not determined.

^b Fold changes in gene expression obtained in the microarray experiments were calculated as 2^M (see text).

^c Fold changes in gene expression obtained from RT-qPCR were calculated from C_T values obtained from real-time PCR experiments using the comparative $\Delta\Delta C_T$ method (37). The *smc03224* gene coding for 16S rRNA was used as an internal control. Data are averages from two independent biological experiments with three technical replicates. The minus sign indicates a decreased fold change in 1021. The standard errors of the means from the RT-qPCRs are shown.

beginning of the stationary phase of growth (OD_{620} , 1.2), both genes showed higher expression in the wild-type strain than the *fadD* mutant, thereby confirming the microarray data. On the other hand, when the analyses were performed in cultures of the wild-type and mutant strains in the exponential phase of growth (OD_{620} , 0.8), similar expression levels were observed for the two genes (Table 3). These results are in agreement with the observed pattern of accumulation of fatty acids (Fig. 1), which showed a similar level in wild-type and mutant strains during the exponential phase but which were consumed in the wild type during the stationary phase. The RT-qPCR data were also used to obtain the relative expression levels of the *fad* genes in the stationary phase versus exponential phase of growth in each of the two genetic backgrounds. These analyses revealed that in the wild-type strain the expression levels of *smc02229* and *fadB* were higher in the stationary than in the exponential phase of growth (33.8 ± 10.7 and 3.4 ± 1 , respectively). In contrast, in the *fadD* mutant decreased expression of these genes was observed in stationary phase (-3.88 ± 0.43 and -2.31 ± 0.29 , respectively), which may have been due to the lower metabolic rate shown by this strain after entering the stationary phase of growth. These results suggest that, in *S. meliloti*, FadD is required for the upregulation of *fad* genes at the beginning of the stationary phase of growth, which in turn allows for the utilization of endogenous free fatty acids released from membrane lipids.

Among the nonclassified regulators that appeared downregulated in the microarray study was *smc01260* (see Table S3 in the supplemental material). Interestingly, Kazakov et al. (26), using a comparative genomic approach, identified SMC01260 as the candidate transcriptional factor that might control the fatty acid utilization pathway in *S. meliloti* 1021. The *smc01260* regulon proposed by Kazakov et al. (26) comprises 9 operons: *smc02162* (*fadD*), *smc02229-smc02228* (*fadA*)-*smc02227* (*fadB*), *smc00977-smc00976*, *smc00041*, *smc02377* (*etf*), *smc00729* (*etfB1*)-*smc00728* (*etfA1*)-*smc00727* (*hbdA*), *smc02479* (*mdh*)-*smc02480* (*sucC*)-*smc02481* (*sucD*)-*smc02482* (*sucA*)-*smc02483* (*sucB*)-*smc02484*-*smc02485*-*smc02486*-*smc02487* (*lpdA2*), *smc02391*, and *smc02150*. Genes in four of these operons, underlined in the previous list, appeared downregulated in the *S. meliloti* *fadD* mutant (see Table S3). The operons belonging to this regulon are preceded by a common palindromic 18-bp DNA motif named the ILV box, which is supposed to be the binding site for the transcriptional regulator SMC01260 (26). Upstream of *smc01260*, we also identified an 18-bp sequence that differed by only 1 nucleotide from the consensus of the ILV box (see Fig. S3 in the supplemental material), suggesting autoregulation. Our experimental data are in agreement with the computationally identified regulatory network for fatty acid degradation in *S. meliloti*.

DISCUSSION

We have determined that mutation of *fadD* in *S. meliloti* or in *E. coli* provokes the accumulation of a mixture of free fatty acids in the stationary phase of growth. The composition of the free fatty acid pool found in the experiments concerning expression of a lipid-specific $\Delta 5$ -desaturase is in agreement with membrane phospholipids being the origin of the released fatty acids. Radiolabeling experiments indicated that fatty acids are released from both the wild type and mutant (Fig. 1, 9 h of

growth). However, the accumulation observed in the stationary phase of growth occurred in *fadD* mutants, due to their inability to activate and consume the released fatty acids. Furthermore, we found that a *fadL* mutant of *E. coli* did not accumulate fatty acids, while a *fadD fadL* double mutant still accumulated them. These results demonstrate that released fatty acids are of intracellular origin and that their subsequent consumption does not require uptake. So far, the reason for this fatty acid release is not known.

The higher expression of the *fad* genes observed in wild-type *S. meliloti* than in the *fadD* mutant suggests that released fatty acids are directed to fatty acid degradation. The utilization of these fatty acids by the wild type could provide an extra carbon source when other sources are depleted. Alternatively, acyl-CoAs could be converted into storage compounds in the stationary phase of growth. For example, *Streptomyces coelicolor* forms triacylglycerols as storage compounds, and long-chain acyl-CoAs are used as acyl donors in triacylglycerol biosynthesis (3); however, formation of triacylglycerols has not been reported in *S. meliloti*. In either case, the wild type should have a metabolic advantage over a *fadD* mutant in the stationary phase. Although survival rates of the wild-type strain and *fadD* mutants were very similar at entry (for *S. meliloti*) or 15 h after entering into the stationary phase (for *E. coli*), in the case of *E. coli* we found a significant reduction (66%) in the survival rate of the *fadD* mutant compared to that of the wild type after extended times in stationary phase (41 h after entering the stationary phase).

Remarkably, the phenotype of fatty acid accumulation that we observed in *fadD* mutants of *S. meliloti* and of *E. coli* was also reported for mutants of *S. cerevisiae* and of cyanobacteria that are also deficient in their respective systems of fatty acid activation (24, 44). In both cases, release of fatty acids from membrane lipids was postulated to be due to a process of lipid remodeling consisting of an exchange of fatty acyl residues (24, 44). So far, little is known about this type of lipid remodeling in the phospholipids of bacteria. Direct evidence for phospholipid remodeling by fatty acyl exchange in *E. coli* was obtained by Kol and coworkers (27). They demonstrated that exogenously added short-chain PE to a PE-deficient mutant resulted in the typical PE-fatty acyl profile of the wild-type strain. Similar experiments were carried out in *Synechocystis* PCC6803. Exogenously added dioleoylphosphatidylglycerol to a PG-deficient mutant led to the formation of new retailored PG species according to the functional needs of the cyanobacterium (29). Release of fatty acids from phospholipids involves the activity of phospholipases type A. A future challenge will be to assign the corresponding open reading frames (ORFs) that are responsible for such activities. While there is no ORF assigned for phospholipase A in the genome of *S. meliloti*, in *E. coli* two different phospholipase A activities have been described, but their biological roles remain unknown (41).

The present study and previous ones showed that a major role of fatty acid activation is the utilization of endogenous fatty acids in organisms as diverse as *S. cerevisiae*, cyanobacteria, *S. meliloti*, and *E. coli*. Probably, this mechanism is conserved in most organisms, as suggested by Kaczmarzyk and Fulda (24). FadD has been studied mainly as an activity required for degradation of exogenous LCFA, and addition of exogenous fatty acids to the wild-type *S. meliloti* increases the

expression of the *fadD* gene (data not shown). However, the important role of FadD in utilization of endogenous free fatty acids was not recognized previously in bacteria.

Fatty acids may act as environmental cues that control swarming motility in different bacteria. In *Proteus mirabilis*, oleic acid (C_{18:1} Δ9) enhances swarming, whereas some saturated fatty acids inhibit this type of surface motility (31). Also, in *Serratia marcescens*, saturated fatty acids negatively regulate swarming (30). Interestingly, in this bacterium a relationship between cellular fatty acid composition and swarming phenotypes has been observed, leading to the hypothesis that modulation of cellular fatty acid composition and hence homeostasis of membrane fluidity may play a crucial role in controlling swarming motility. Seemingly contradictory to the previous results, swarming of *Pseudomonas aeruginosa* was not altered by the saturated fatty acids palmitic (C_{16:0}) or stearic acid (C_{18:0}), while oleic and vaccenic (C_{18:1} Δ11) acids inhibited swarming (23). In the case of *S. meliloti*, none of the fatty acids tested (palmitic acid, stearic acid, or oleic acid at a concentration of 5 μg ml⁻¹) was able to induce swarming of the GR4 strain (data not shown). While the addition of palmitic or stearic acid did not interfere with the swarming phenotype of strain QS77, oleic acid inhibited its swarming phenotype (data not shown). However, we still cannot rule out a function of fatty acids in swarming of *S. meliloti*, since the wild type is able to metabolize fatty acids while the *fadD* mutant cannot use them. Further analysis of the lipidic composition presented under swarming-inducing conditions by different *S. meliloti* strains will reveal whether membrane fluidity is involved in swarming, as postulated by Lai et al. (30).

In *E. coli*, acyl-CoAs resulting from FadD activity on long-chain fatty acids are able to bind to FadR, a repressor of the GntR family, which controls the expression of the fatty acid degradation genes. Binding of the acyl-CoAs to FadR causes release of the regulatory protein from the operator and thus derepression of the *fad* genes (41). Our data indicate that formation of acyl-CoAs is also required for activation of the *fad* regulon in *S. meliloti*, although the regulator probably involved, SMC01260, belongs to the MerR family. Our experimental data are in agreement with the computationally identified regulatory network for fatty acid degradation in *S. meliloti* as well as with Kazakov's proposal (26), in which an acyl-CoA intermediate of the fatty acid degradation pathway might be the physiological effector controlling the expression of the *smc01260* regulon.

ACKNOWLEDGMENTS

Plasmid pDM10 was kindly provided by Diego de Mendoza (Universidad de Rosario, Rosario, Argentina). *Escherichia coli* mutant strains JW1794-1 and JW2341-1 were generously provided by José Adolfo Escalante (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico). P1 bacteriophage and oligonucleotide K2 were kindly provided by Francisco Bolívar and Héctor Castañeda (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico). We thank Maria Gregoria Medina (Centro de Investigaciones Químicas) for excellent technical assistance and Pieter van Dillewijn (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) for sharing data concerning *fadD* gene expression.

This work was supported by grants from CONACyT/Mexico (49738-Q and 82614), from the Spanish MICINN (BIO2007-62988), and from Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía; CVI 03541) to M.J.S. and from Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (2006-C01-56431) to L.A. J.N. was

supported by a postdoctoral contract from Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). A.P.-C. was supported during a Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico).

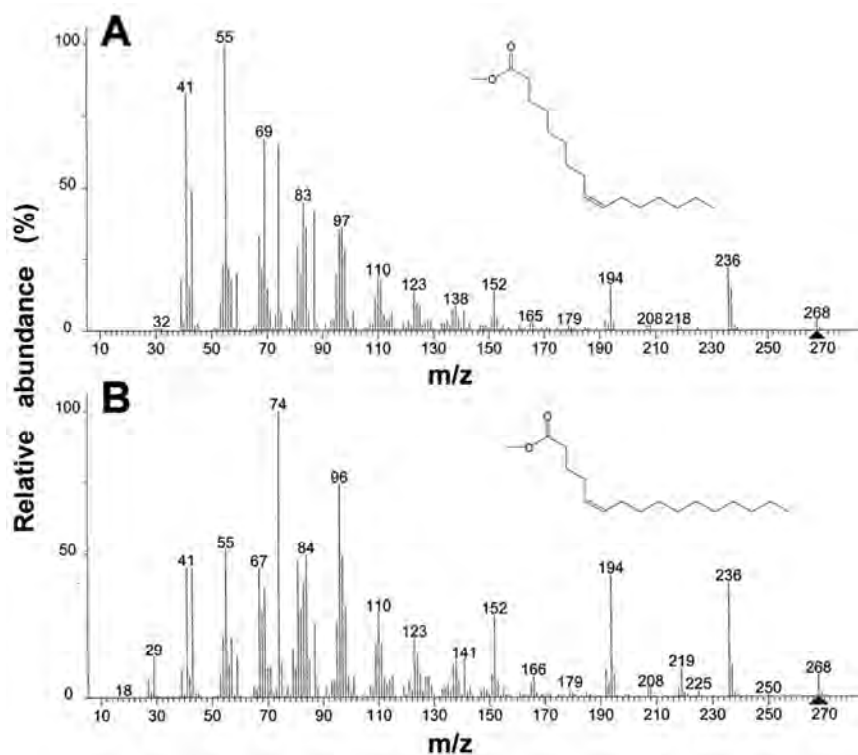
REFERENCES

1. Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr., and D. de Mendoza. 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* **180**:2194–2200.
2. Altabe, S. G., P. Aguilar, G. M. Caballero, and D. de Mendoza. 2003. The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a Δ5 desaturase. *J. Bacteriol.* **185**:3228–3231.
3. Arabolaza, A., E. Rodriguez, S. Altabe, H. Alvarez, and H. Gramajo. 2008. Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2573–2582.
4. Baba, T., et al. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio Collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008.
5. Banchio, C., and H. Gramajo. 2002. A stationary-phase acyl-coenzyme A synthetase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is necessary for the normal onset of antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4240–4246.
6. Basconillo, L. S., and B. E. McCarry. 2008. Comparison of three GC/MS methodologies for the analysis of fatty acids in *Sinorhizobium meliloti*: development of a micro-scale, one-vial method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **871**:22–31.
7. Becker, A., N. Frayse, and L. Sharypova. 2005. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**:899–905.
8. Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188–198.
9. Black, P. N., and C. C. DiRusso. 2003. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:454–472.
10. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911–917.
11. Bonamore, A., A. Macone, G. Colotti, R. M. Matarese, and A. Boffi. 2006. The desaturase from *Bacillus subtilis*, a promising tool for the selective olefination of phospholipids. *J. Biotechnol.* **121**:49–53.
12. Casadesús, J., and J. Olivares. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **174**:203–209.
13. DeRisi, J. L., V. R. Iyer, and P. O. Brown. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**:680–686.
14. de Rudder, K. E. E., J. E. Thomas-Oates, and O. Geiger. 1997. *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid N-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. *J. Bacteriol.* **179**:6921–6928.
15. Ditta, G., et al. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**:149–153.
16. Domínguez-Ferreras, A., et al. 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:7617–7625.
17. Dondrup, M., et al. 2003. EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* **106**:135–146.
18. Ferguson, G. P., A. Datta, R. W. Carlson, and G. C. Walker. 2005. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **56**:68–80.
19. Fraser, G. M., and C. Hughes. 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:630–635.
20. Galibert, F., et al. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668–672.
21. Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:429–441.
22. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
23. Inoue, T., R. Shingaki, and K. Fukui. 2008. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**:81–86.
24. Kaczmarzyk, D., and M. Fulda. 2010. Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. *Plant Physiol.* **152**:1598–1610.
25. Kang, Y., J. Zarzycki-Siek, C. B. Walton, M. H. Norris, and T. T. Hoang. 2010. Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **5**:e13557.
26. Kazakov, A. E., et al. 2009. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J. Bacteriol.* **191**:52–64.
27. Kol, M. A., et al. 2004. Uptake and remodeling of exogenous phosphatidylethanolamine in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1636**:205–212.
28. Kovach, M. E., et al. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range

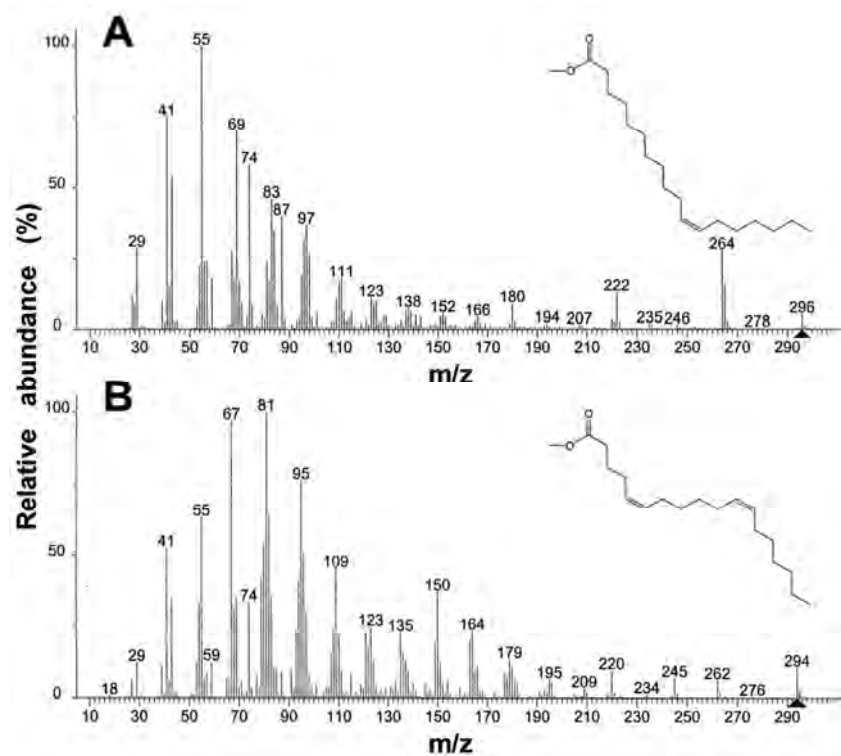
- cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
29. **Laczko-Dobos, H., et al.** 2010. Remodeling of phosphatidylglycerol in *Synechocystis* PCC6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**:163–170.
 30. **Lai, H. C., et al.** 2005. The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J. Bacteriol.* **187**:3407–3414.
 31. **Liaw, S. J., H. C. Lai, and W. B. Wang.** 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **72**:6836–6845.
 32. **Lucas, R. L., et al.** 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**:1872–1882.
 33. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 34. **Nogales, J., et al.** 2010. Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* *fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* **11**:157.
 35. **Olagbemiro, T. O., M. A. Birkett, A. J. Mordue, and J. A. Pickett.** 1999. Production of (5*R*,6*S*)-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the mosquito oviposition pheromone, from the seed oil of the summer cypress plant, *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae). *J. Agric. Food Chem.* **47**:3411–3415.
 36. **Overath, P., G. Pauli, and H. U. Schairer.** 1969. Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur. J. Biochem.* **7**:559–574.
 37. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
 38. **Ray, S., E. Chatterjee, A. Chatterjee, K. Paul, and R. Chowdhury.** 2011. A *fadD* mutant of *Vibrio cholerae* is impaired in the production of virulence factors and membrane localization of the virulence regulatory protein TcpP. *Infect. Immun.* **79**:258–266.
 39. **Rickenberg, H. V., and G. Lester.** 1955. The preferential synthesis of beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **13**:279–284.
 40. **Robertson, B. K., P. Aman, A. G. Darvill, M. McNeil, and P. Albersheim.** 1981. Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* **67**:389–400.
 41. **Rock, C. O.** 2008. Fatty acids and phospholipids metabolism in prokaryotes, p. 59–96. In D. E. Vance and J. E. Vance (ed.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 5th ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
 42. **Rock, C. O., and S. Jackowski.** 1985. Pathways for the incorporation of exogenous fatty acids into phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**:12720–12724.
 43. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 44. **Scharnewski, M., P. Pongdontri, G. Mora, M. Hoppert, and M. Fulda.** 2008. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA synthetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling. *FEBS J.* **275**:2765–2778.
 45. **Sharypova, L. A., K. Niehaus, H. Scheidle, O. Holst, and A. Becker.** 2003. *Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **278**:12946–12954.
 46. **Sherwood, M. T.** 1970. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**:708–713.
 47. **Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* **1**:784–791.
 48. **Soto, M. J., M. Fernández-Pascual, J. Sanjuán, and J. Olivares.** 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.
 49. **Thomason, L. C., N. Costantino, and D. L. Court.** 2007. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr. Prot. Mol. Biol.* **79**:1.17.1–1.17.8.
 50. **Zavaleta-Pastor, M., et al.** 2010. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:302–307.

FadD Is Required for Utilization of Endogenous Fatty Acids Released from Membrane Lipids (2011) *J. Bacteriol.* Pech-Canul *et al.* 193: 6295

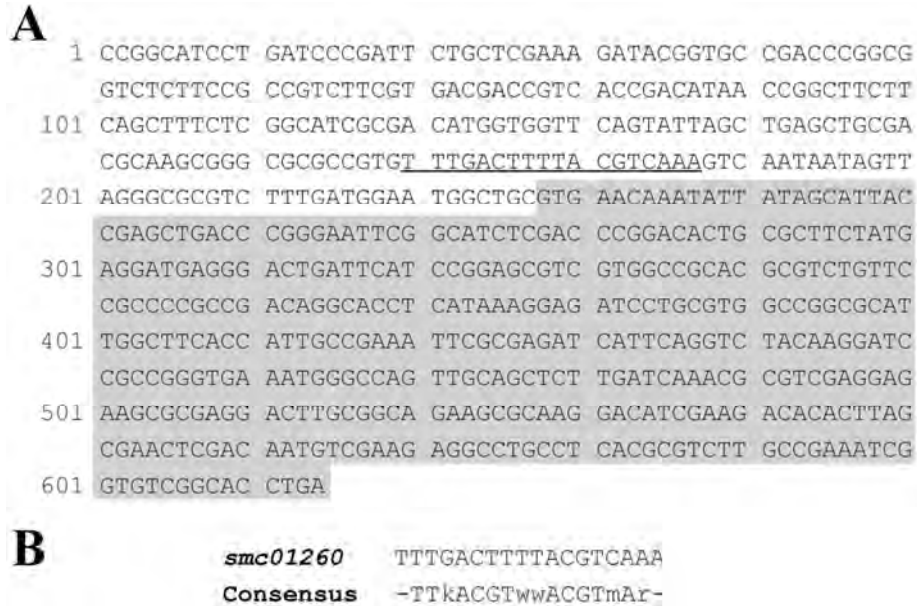
Supplemental material.



Supplementary FIG. S1. Identification of C16:1, Δ5. Mass spectra of methyl ester derivatives of C16:1, Δ9 (A) and of C16:1, Δ5 (B).



Supplementary FIG. S2. Identification of C18:2, Δ5, Δ11. Mass spectra of methyl ester derivatives of C18:1, Δ11 (A) and of C18:2, Δ5, Δ11 (B).



Supplementary FIG. S3. Candidate transcriptional factor SMc01260 and putative DNA motif involved in fatty acid degradation in *S. meliloti*. A) DNA region corresponding to *smc01260* (grey) and upstream sequence containing the palindromic 18-bp DNA (underlined). B) Comparison of the upstream palindromic sequence to the consensus ILV box described for α -proteobacteria as a putative MerR binding site (Kazakov *et al.* 2009) where “k” is “G or T”, “w” is “A or T”, “m” is “A or C” and “r” is “A or G”.

Table S1. Fatty acid content (nmol ml⁻¹ culture) of *S. meliloti* 1021 and its *fadD*-deficient mutant 1021FDC5 present in the fractions of cell-associated free fatty acids, esterified fatty acids or as free fatty acid in the spent culture supernatant.^a

Fatty acid	Fatty acid composition (nmol ml ⁻¹ culture)					
	Cell-associated				Supernatant	
	free fatty acids		esterified fatty acids		free fatty acids ^b	
	1021	1021FDC5	1021	1021FDC5	1021	1021FDC5
14:0	-- ^c	--	--	--	--	0.27 ± 0.02
3-OH-14:0	--	--	--	--	--	0.49 ± 0.09
16:1	--	0.65 ± 0.18	6.0 ± 1.7	7.3 ± 1.5	--	0.56 ± 0.09
16:0	0.33 ± 0.05	27.5 ± 11.5	33.1 ± 5.4	45.1 ± 11.2	0.12 ± 0.02	0.41 ± 0.05
17:0cp	--	--	3.3 ± 0.4	4.7 ± 1.4	--	0.03 ± 0.01
17:0	--	0.69 ± 0.35	0.82 ± 0.15	1.2 ± 0.3	--	--
18:1	0.19 ± 0.06	62.6 ± 20.6	140.3 ± 14.1	204.1 ± 64.1	0.12 ± 0.02	0.71 ± 0.18
18:0	0.23 ± 0.13	6.02 ± 2.59	5.3 ± 1.7	7.1 ± 1.8	0.06 ± 0.02	0.36 ± 0.08
19:0cp	--	5.10 ± 1.76	20.0 ± 0.9	30.8 ± 11.1	--	0.03 ± 0.00
Total	0.75 ± 0.24	102.6 ± 36.7	208.8 ± 22.6	300.3 ± 90.8	0.31 ± 0.06	3.15 ± 0.55

^a Mean ± SD.

^b Additionally, in supernatants of 1021FDC5 the fatty acids 12:0, 14:1, 18:0 epoxide and 20:0 were detected as 0.1 nmol ml⁻¹ or less.

^c --: not detected.

Table S2. Fatty acid content (nmol ml⁻¹ culture) of *E. coli* K-27 carrying *S. meliloti fadD* bearing plasmid pBBRD4 or the empty vector pBBR1MCS-3 present in the fractions of cell-associated free fatty acids, esterified fatty acids or as free fatty acid in the spent culture supernatant.^a

Fatty acid	Fatty acid composition (nmol ml ⁻¹ culture)					
	Cell-associated				Supernatant	
	free fatty acids		esterified fatty acids		free fatty acids	
	K-27	K-27	K-27	K-27	K-27	K-27
	pBBRD4	pBBR1MCS-3	pBBRD4	pBBR1MCS-3	pBBRD4	pBBR1MCS-3
14:1	-- ^b	0.13 ± 0.02	--	--	--	0.90 ± 0.07
14:0	--	1.9 ± 0.2	30.9 ± 1.5	21.1 ± 2.6	--	1.2 ± 0.1
15:0	--	0.23 ± 0.01	5.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2	--	0.08 ± 0.02
3-OH-14:0	--	0.06 ± 0.01	0.69 ± 0.07	0.44 ± 0.06	--	1.0 ± 0.1
16:1	--	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.3	3.2 ± 1.4	--	1.5 ± 0.2
16:0	0.18 ± 0.04 ^a	19.6 ± 1.9	348.9 ± 6.0	254.8 ± 26.6	0.61 ± 0.05	5.7 ± 1.3
17:0cp	0.03 ± 0.00	8.1 ± 0.7	262.6 ± 8.7	197.5 ± 17.7	0.15 ± 0.09	3.2 ± 0.6
17:0	--	0.27 ± 0.01	4.6 ± 0.2	3.3 ± 0.3	--	0.05 ± 0.01
18:1	--	8.8 ± 0.1	2.6 ± 1.1	4.0 ± 0.8	--	2.8 ± 0.4
18:0	0.11 ± 0.02	0.59 ± 0.09	3.7 ± 0.2	3.1 ± 0.4	0.24 ± 0.04	0.19 ± 0.03
19:0cp	0.01 ± 0.00	4.4 ± 0.3	126.8 ± 4.8	75.3 ± 4.0	--	1.3 ± 0.2
Total	0.33 ± 0.08	46.2 ± 3.4	789.0 ± 20.9	567.5 ± 53.4	1.0 ± 0.18	18.0 ± 3.1

^aMean ± SD.

^b--; not detected.

Table S3. Genes differentially expressed in *S. meliloti* 1021FDC5 vs. Rm1021 in MM at the beginning of the stationary phase of growth. Only M values above 1 or below -1 with $p \leq 0.05$ are shown. The MerR-type regulator SMc01260 as well as genes predicted to belong to the SMc01260 regulon for fatty acid degradation (Kazakov *et al.* 2009) are shown in gray.

Down-regulated genes			
Gene ID	Description	M-value	Classification
SMc02229	Putative acyl-CoA dehydrogenase	-3.57917051	Small molecule metabolism
SMb20704	glgA2 Putative glycogen synthase	-2.55110878	Macromolecule metabolism
SMc00885	Hypothetical transmembrane signal peptide protein	-2.46055605	Partial homology
SMc00796	Hypothetical transmembrane protein	-2.36512716	Global homology
SMc00371	Conserved hypothetical protein	-2.27504709	Global homology
SMc01109	metK Probable S-adenosylmethionine synthetase	-2.11927796	Central intermediary metabolism
SMc02255	qxtA Putative quinol oxidase subunit I transmembrane protein	-2.09117265	Small molecule metabolism
SMb20302	Conserved hypothetical protein	-2.03906977	Global homology
SMc01842	Probable transcriptional regulator	-1.96160097	Not classified regulator
SMc01260	Putative transcription regulator	-1.93058026	Not classified regulator
SMb21481	Conserved hypothetical protein	-1.89489594	Global homology
SMA0134	conserved hypothetical protein	-1.87963966	Global homology
SMc00041	Conserved hypothetical protein	-1.8710781	Global homology
SMc00641	serA Putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1.8668014	Small molecule metabolism
SMc02050	tig Probable trigger factor	-1.84704184	Cell processes
SMc01312	fusA1 Probable elongation factor G	-1.82683803	Macromolecule metabolism
SMc01295	rpsH Probable 30S ribosomal protein S8	-1.81062191	Structural elements
SMc00567	rpsR Putative 30S ribosomal protein S18	-1.80135954	Structural elements
SMc01311	tufA Probable elongation factor TU protein	-1.78767303	Macromolecule metabolism
SMc02228	fadA Putative acetyl-CoA acyltransferase	-1.74526041	Small molecule metabolism
SMc01308	rpID Probable 50S ribosomal protein L4	-1.74319245	Structural elements
SMc02254	qxtB Putative quinol oxidase subunit II transmembrane protein	-1.74134586	Small molecule metabolism
SMc01294	rpIF Probable 50S ribosomal protein L6	-1.73128645	Structural elements

Down-regulated genes. Continued			
Gene ID	Description	M-value	Classification
SMc00800	Hypothetical transmembrane protein	-1.70291641	Partial homology
SMc01152	rpsT 30S ribosomal protein S20	-1.69525282	Structural elements
SMc00367	Conserved hypothetical protein	-1.67957895	Global homology
SMc02499	atpA Probable ATP synthase subunit alpha	-1.67716311	Small molecule metabolism
SMc01326	tufB Probable elongation factor TU protein	-1.67342254	Macromolecule metabolism
SMb20228	ndiA 2 Putative nutrient deprivation-induced protein	-1.6553055	Cell processes
SMb21441	Conserved hypothetical protein	-1.64924889	Central intermediary metabolism
SMc01489	Conserved hypothetical signal peptide protein containing calcium-binding EF-hand regions	-1.64642216	Global homology
SMc02500	atpG Probable ATP synthase gamma chain	-1.64058373	Small molecule metabolism
SMa1225	FixK1 transcriptional regulator	-1.63105362	Small molecule metabolism
SMc01297	rpIE Probable 50S ribosomal protein L5	-1.62379801	Structural elements
SMc00485	rpsD Probable 30S ribosomal subunit protein S4	-1.61485561	Structural elements
SMc00640	serC Putative phosphoserine aminotransferase	-1.61373121	Small molecule metabolism
SMc01309	rpIC Probable 50S ribosomal protein L3	-1.61255363	Structural elements
SMc01313	rpsG Probable 30S ribosomal protein S7	-1.60904586	Structural elements
SMc01319	rpIJ Probable 50S ribosomal protein L10 (L8)	-1.60453716	Structural elements
SMc01967	speB2 Putative agmatinase	-1.58050425	Central intermediary metabolism
SMc02755	ahcY Probable adenosylhomocysteinase	-1.57258878	Central intermediary metabolism
SMc01310	rpsJ Probable 30S ribosomal protein S10	-1.55285187	Structural elements
SMc01299	rpIN Probable 50S ribosomal protein L14	-1.53048193	Structural elements
SMa0744	groEL2 groEL2 chaperonin	-1.52299307	Cell processes
SMc01296	rpsN Probable 30S ribosomal protein S14	-1.51859732	Structural elements
SMc02227	fadB Putative fatty oxidation complex alpha subunit includes: enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase transmembrane protein	-1.50759345	Small molecule metabolism
SMc00147	Conserved hypothetical protein	-1.5066171	Global homology
SMc02124	cysI Putative sulfite reductase	-1.49763093	Central intermediary metabolism
SMc01410	Putative lipoprotein transmembrane	-1.49226264	Structural elements
SMc01298	rpIX Probable 50S ribosomal protein L24	-1.47952782	Structural elements

Down-regulated genes. Continued			
Gene ID	Description	M-value	Classification
SMa2353	oxidoreductase	-1.46132625	Small molecule metabolism
SMc01292	rpsE Probable 30S ribosomal protein S5	-1.46130805	Structural elements
SMc02382	Conserved hypothetical protein	-1.44714901	Global homology
SMb20198	cbbL Putative ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	-1.43530222	Central intermediary metabolism
SMb21484	rpoE5 Putative RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24) protein	-1.42451527	Small molecule metabolism
SMc01307	rplW Probable 50S ribosomal protein L23	-1.39435065	Structural elements
SMa1223	FixM flavoprotein oxidoreductase	-1.39431461	Small molecule metabolism
SMc00335	rpsA 30S ribosomal protein S1	-1.3834706	Structural elements
SMc01306	rplB Probable 50S ribosomal protein L2	-1.38017336	Structural elements
SMc02498	atpH Putative ATP synthase delta chain	-1.36673962	Small molecule metabolism
SMc02150	Conserved hypothetical protein	-1.36603257	Global homology
SMc01508	Hypothetical transmembrane protein	-1.35412171	Partial homology
SMc01314	rpsL Probable 30S ribosomal protein S12	-1.3521489	Structural elements
SMc01287	rpsM Probable 30S ribosomal protein S13	-1.34670877	Structural elements
SMc03112	metH Probable 5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase (methionine synthase, vitamin-B12 dependent isozyme) protein	-1.34228879	Small molecule metabolism
SMb21480	Conserved hypothetical protein	-1.33927971	Global homology
SMc00869	atpF2 Probable ATP synthase subunit B' transmembrane protein	-1.33674148	Small molecule metabolism
SMa0762	FixK2 transcriptional regulator	-1.3327474	Small molecule metabolism
SMb21357	Hypothetical membrane protein	-1.32877481	Global homology
SMc01259	Hypothetical transmembrane protein	-1.32086009	Global homology
SMc01843	metF Probable 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase oxidoreductase	-1.32079376	Central intermediary metabolism
SMc01305	rpsS Probable 30S ribosomal protein S19	-1.31284298	Structural elements
SMc00521	Conserved hypothetical protein	-1.3050978	Global homology
SMc00913	groEL1 60 KD chaperonin A	-1.27254213	Cell processes
SMc00063	Conserved hypothetical protein	-1.27116112	Global homology
SMc04434	rpmH Probable 50S ribosomal protein L34	-1.26593378	Structural elements
SMa1683	Arylsulfatase	-1.26418496	Small molecule metabolism
SMc00660	Hypothetical signal peptide protein	-1.26405417	Global homology
SMb21446	glgX2 Isoamylase	-1.2676824	Macromolecule metabolism

Down-regulated genes. Continued			
Gene ID	Description	M-value	Classification
SMc01290	rplO Probable 50S ribosomal protein L15	-1.23391963	Structural elements
SMc00792	Hypothetical transmembrane protein	-1.21780857	Global homology
SMA0113	Sensor histidine kinase	-1.21294773	Not classified regulator
SMb21295	Putative small heat shock protein, hsp20 family	-1.20022505	Cell processes
SMc00728	etfA1 Putative electron transfer flavoprotein alpha-subunit alpha-ETF flavoprotein	-1.18642861	Small molecule metabolism
SMb20200	cbbT Putative transketolase	-1.18337995	Central intermediary metabolism
SMA0114	Two-component response regulator	-1.1815887	Not classified regulator
SMc01803	rpsI Probable 30S ribosomal protein S9	-1.17144563	Structural elements
SMc00323	rpsO Probable 30S ribosomal protein S15	-1.1658824	Structural elements
SMc01467	Conserved hypothetical protein, signal peptide	-1.16164464	Global homology
SMA2071	Hypothetical protein	-1.15445751	Unknown
SMc02472	Putative transport system permease ABC transporter	-1.13653795	Cell processes
SMc01318	rplL Probable 50S ribosomal protein L7/L12 (L8)	-1.12707174	Structural elements
SMc01304	rplV Probable 50S ribosomal protein L22	-1.11714586	Structural elements
SMc00324	pnp Probable polyribonucleotide nucleotidyltransferase	-1.10969079	Macromolecule metabolism
SMA1672	conserved hypothetical protein	-1.09888924	Partial homology
SMc00704	rpmB Probable 50S ribosomal protein L28	-1.0911328	Structural elements
SMc03038	flaB Flagellin B	-1.08949899	Cell processes
SMc01966	Putative spermidine/putrescine-binding periplasmic ABC transporter	-1.08768598	Cell processes
SMc01266	Conserved hypothetical protein	-1.0829151	Global homology
SMc01291	rpmD Probable 50S ribosomal protein L30	-1.08273153	Structural elements
SMc02911	Conserved hypothetical protein	-1.08139903	Global homology
SMb20605	ABC transporter, periplasmic solute-binding protein	-1.07751737	Cell processes
SMA1391	etfB2 EtfB2 electron transport flavoprotein, beta subunit	-1.06495076	Small molecule metabolism
SMc03802	Putative peptidase	-1.05799366	Macromolecule metabolism
SMb20933	exsG Putative two-component sensor histidine kinase	-1.05668845	Small molecule metabolism
SMA1389	etfA2 EtfA2 electron-transport flavoprotein, alpha-subunit	-1.05472853	Small molecule metabolism
SMA2063	Sensor histidine kinase	-1.05259765	Not classified regulator

Down-regulated genes. Continued			
Gene ID	Description	M-value	Classification
SMc03110	Conserved hypothetical protein	-1.05738655	Global homology
SMc04009	Conserved hypothetical protein	-1.0478243	Global homology
SMb21473	Conserved hypothetical protein	-1.04500378	Global homology
SMb21198	oppC ABC transporter of tetrapeptides and some tripeptides, permease component	-1.04477407	Cell processes
SMb21197	oppB ABC transporter of tetrapeptides and some tripeptides, permease component	-1.03782123	Cell processes
SMb20966	lacZ2 Putative beta-galactosidase putative beta galactosidase protein Oligonucleotide 15140978...	-1.03744276	Small molecule metabolism
SMb20194	Conserved hypothetical protein	-1.03464019	Global homology
SMc03111	pmi Mannose-6-phosphate isomerase	-1.03044053	Small molecule metabolism
SMc00729	etfB1 Putative electron transfer flavoprotein beta-subunit beta-ETF flavoprotein small subunit	-1.02587681	Small molecule metabolism
SMb20227	ndiA 1 Putative nutrient deprivation-induced protein	-1.02287498	Cell processes
SMc02467	mrsA2 Probable peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 2	-1.0139935	Macromolecule metabolism
SMb21333	Hypothetical protein	-1.00787562	Partial homology
SMc02123	Sulfate or sulfite assimilation protein	-1.0077925	Central intermediary metabolism
Up-regulated genes			
Gene ID	Description	M-value	Classification
nptII	Oligonucleotide nptII...	6.77351857	
SMb20473	Hypothetical protein	1.76218645	Global homology
SMc01660	Conserved hypothetical protein	1.15545557	Global homology
SMb20513	Hypothetical protein	1.14094699	Global homology
SMc03776	proB1 Probable glutamate 5-kinase	1.10488464	Small molecule metabolism
SMA0520	Transcriptional regulator, RpiR family	1.06137078	Not classified regulator
SMA1354	Isomerase	1.03653894	Small molecule metabolism
SMc03168	Multidrug resistance efflux system	1.0143509	Cell processes

4.2. Resultados adicionales.

Los resultados que se presentan a continuación no se han publicado. La metodología empleada en los experimentos, se realizó tal y como se describe en Pech-Canul *et al.* (2011) a menos que se indique lo contrario. Las cepas empleadas así como sus características relevantes se enlistan en la **Tabla A1**. Los oligonucleótidos utilizados así como detalles referentes a los plásmidos se describen en la **Tabla A2**. En la **Tabla A3** se describen las claves empleadas para las moléculas identificadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Los detalles referentes a los resultados que se obtuvieron por GC/MS se presentan en la **Tabla A4** a la **Tabla A10**.

4.2.1. La cepa mutante en *fadD* de *S. meliloti* produce dodecanal y 2-tridecanona.

Al analizar los extractos de lípidos obtenidos de cultivos en fase estacionaria de la cepa silvestre *S. meliloti* GR4 y de la cepa mutante en *fadD* *S. meliloti* QS77, se identificó la acumulación de compuestos hidrofóbicos en el sobrenadante y en el extracto celular de la cepa *S. meliloti* QS77, los cuales están ausentes o en menor cantidad en los extractos de *S. meliloti* GR4. Con el fin de identificar la composición de esta acumulación, los extractos de lípidos se separaron por cromatografía en columna y las fracciones obtenidas se analizaron por GC/MS.

Las cepas de *S. meliloti* GR4y *S. meliloti* QS77 se recuperaron del stock de glicerol (-80°C) en placas de PY_{Ca} con 4.5 mM CaCl₂ y se incubaron a 30°C por 72 horas. De cada cepa se inocularon 25 mL de medio mínimo de Sherwood (MM) y se incubaron a 30 °C en agitación (275 rpm) por toda la noche. Este cultivo se utilizó para inocular 200 mL de MM. Cuando este último alcanzó una DO_{620nm} de aproximadamente 1.0, se empleó como inóculo para 1 L de MM ajustando la DO_{620nm} a 0.1. Los cultivos se incubaron por 26 horas (DO_{620nm} = 1.2) a 30°C. Los sobrenadantes y la masa celular del cultivo se separaron por centrifugación (6,000 g por 15 min). Las células se lavaron una vez con 1 L de MM.

Los lípidos de cada litro de sobrenadante se extrajeron dos veces con 400 mL de acetato de etilo acidificado (ácido acético 0.1 mL L⁻¹) por cada extracción. Los lípidos de las células se extrajeron por el método de Bligh & Dyer (1959). Los extractos obtenidos se concentraron hasta sequedad por medio de un rotavapor Büchi con un baño de agua a 45 °C. El sedimento se recuperó con 1 mL de cloroformo:metanol (1:1).

Los extractos de lípidos de los sobrenadantes y de la masa celular se separaron por cromatografía en columna, empleando una columna de vidrio (diámetro interno 1.5 mm). Como fase estacionaria se usaron 5 g de sílica gel 60 (MERCK) y como fase móvil acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5). Se empleó una columna para cada extracto. De cada extracto se recuperaron 20 fracciones de

2 mL cada una. Estas fracciones se concentraron hasta sequedad con una corriente de nitrógeno comprimido y se disolvieron en 500 μL de cloroformo:metanol (1:1). Una alícuota (50 μL) de cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina (TLC) con acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5) como fase móvil. La placa se reveló con yodo sublimado (**Figura 9**). Las fracciones colectadas se combinaron en base a sus similitudes observadas en la placa de TLC (**Tablas A4 y A5**) y concentradas hasta sequedad con una corriente de nitrógeno comprimido.

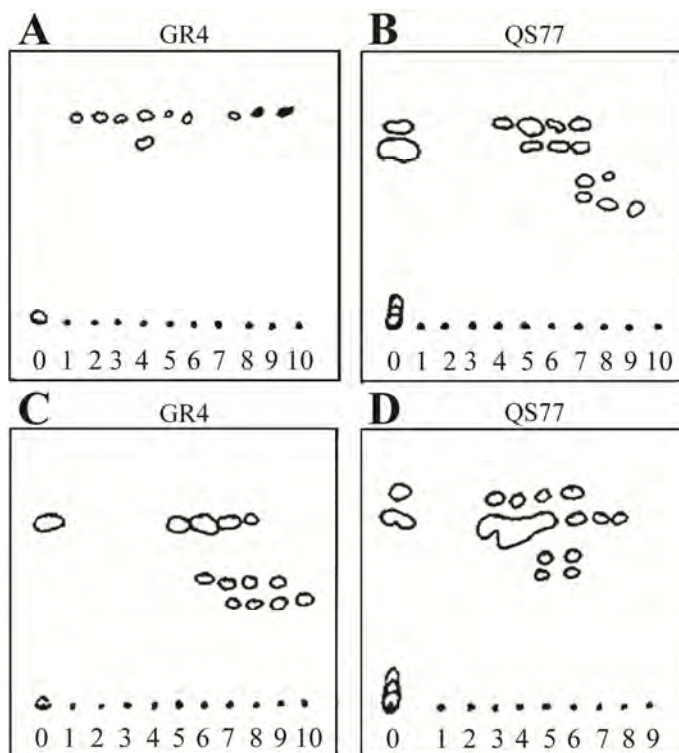


Figura 9. Análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna. Los dibujos representan la calca del revelado de las placas con yodo sublimado. (A) Fracciones de los sobrenadantes de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. (B) Fracciones del extracto celular de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. Los números corresponden al orden en que las fracciones se eluyeron de la columna. C: alícuota del extracto crudo. Las fracciones restantes (>10) correspondientes a cada extracto no se revelaron con el yodo sublimado.

Para el análisis, las muestras se disolvieron en 600 μL de cloroformo:metanol (1:1) y 1 μL se empleó para el análisis por cromatografía de gases (6890 Agilent Technologies) con detección por espectrometría de masas (cuadrupolo MSD HP 5973). Las muestras se separaron en una columna capilar HP-5MS (Agilent Technologies, 25 m x 0.20 mm x 0.33 μm de espesor de película). El horno se fijó a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min y se empleó el siguiente gradiente: desde 40 $^{\circ}\text{C}$ hasta 269 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y se mantuvo a 269 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Como gas portador se utilizó helio con un caudal de 40 cm s^{-1} a 100 $^{\circ}\text{C}$. Las moléculas se ionizaron por impacto de electrones a 70 eV y se identificaron con base en la comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos NIST versión 1.7a.

La composición de las fracciones analizadas por GC/MS de los sobrenadantes y las de la masa celular se presenta en las **Tablas A4 y A5**, respectivamente. En las fracciones analizadas de ambas cepas se detectó la presencia de alcanos y de AG de cadena larga en forma libre y esterificada. En la **Tabla A6** se resume la composición total de los sobrenadantes y de la masa celular.

En los sobrenadantes de la cepa silvestre se detectó una mayor abundancia relativa de alcanos de cadena larga (de 11 a 36 carbonos) con respecto a la cepa QS77 (5:1 aprox.) (**Tabla A6**). Por otra parte, en la cepa mutante la abundancia de AG totales detectados es aproximadamente 21 veces mayor que en la cepa silvestre. Además, en la cepa mutante se detectó una mayor variedad de AG. El ácido tetradecanoico (C14:0) tetradecenoico (C14:1) y el 3-hidroxitetradecanoico (C14-3OH) encontrados en la cepa QS77 no se detectaron en la cepa GR4 (**Tabla A6**).

La masa celular de la cepa mutante también presentó una abundancia relativa de AG mayor que la cepa silvestre (6:1 aprox) (**Tabla A6**). En la masa celular de la cepa silvestre también se detectó la presencia de alcanos, en tanto que en la cepa mutante no se detectaron. Es probable que esta diferencia se deba a que los picos correspondientes a los AG enmascaran la presencia de los alcanos en la cepa mutante.

Los AG mayoritarios detectados en la cepa mutante (C16:1, C18:0, C18:1) son similares a los AG mayoritarios reportados previamente para los AG esterificados a los lípidos de membrana de *S. meliloti* (Saborido Basconcillo & McCarry, 2008). Este resultado también es similar al reportado en Pech-Canul *et al.* (2011) para *S. meliloti* 1021 y su mutante en *fadD*, aunque cabe aclarar que para el presente experimento no se empleó ningún método de derivatización previo al análisis por GC/MS.

Además de los alcanos y de los AG detectados en los sobrenadantes de *S. meliloti* QS77, también se detectaron dos moléculas hidrofóbicas. Éstas se identificaron como dodecanal (**Figura 10**) y 2-tridecanona (**Figura 11**). Sus identidades se confirmaron posteriormente mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus espectros de masas con los de estándares auténticos (D222003 y 172839 respectivamente, Sigma-Aldrich). Ninguna de estas moléculas se detectaron en los extractos de lípidos de *S. meliloti* GR4.

Se obtuvieron resultados similares a los presentados anteriormente en un experimento independiente en el que se empleó la misma metodología (**Figura A2, Tablas A7, A8 y A9**).

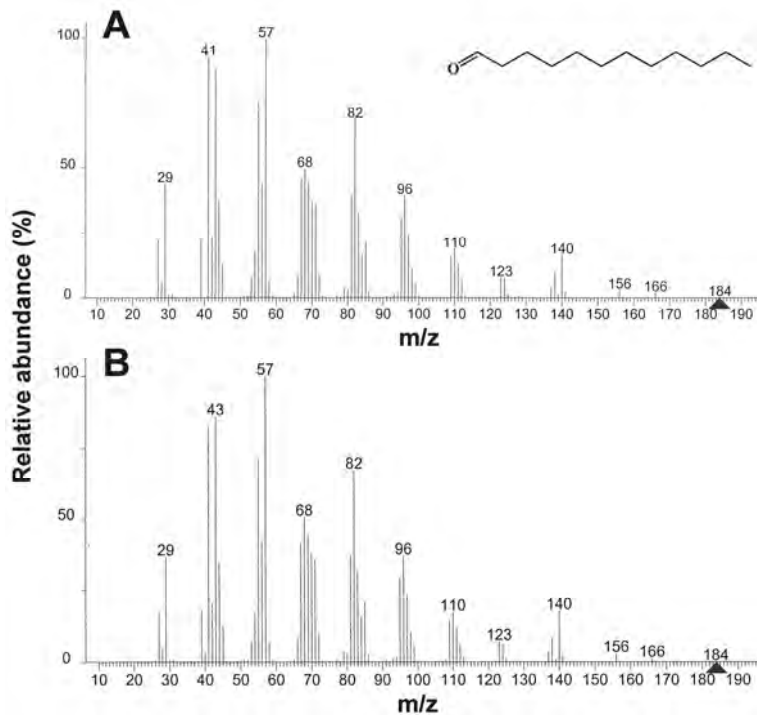


Figura 10. Identificación del dodecanal. En la imagen se muestran los espectros de masas derivados de (A) el dodecanal estándar (D222003 Sigma-Aldrich) y (B) el dodecanal identificado en los sobrenadantes de *S. meliloti* QS77. Las puntas de flecha indican el fragmento correspondiente al ion molecular (184 m/z).

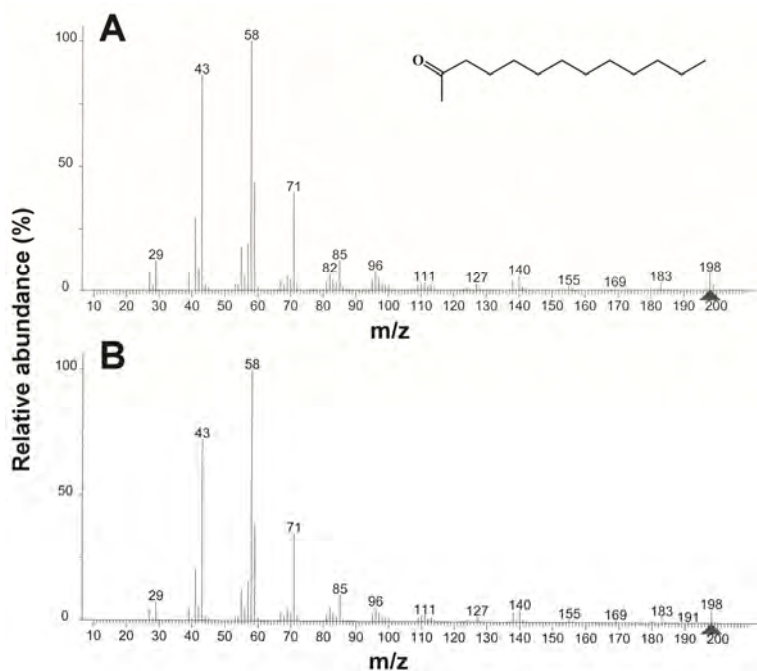


Figura 11. Identificación de la 2-tridecanona. En imagen se muestran los espectros de masas derivados de (A) la 2-tridecanona estándar (172839 Sigma-Aldrich) y (B) la 2-tridecanona identificado en los sobrenadantes de *S. meliloti* QS77. Las puntas de flecha indican el fragmento correspondiente al ion molecular (198 m/z).

La acumulación de los AG en las cepas mutantes en *fadD* de *S. meliloti* es suprimido por la expresión en *trans* del gen *fadD* (Pech-Canul *et al.*, 2011). Consecuentemente, se verificó si el dodecanal y la 2-tridecanona se encontraba presente en los extractos de los lípidos de *S. meliloti* QS77 (pBBR1MCS-3) (*fadD*⁻) y ausente en los de *S. meliloti* QS77 (pBBRD4) (*fadD*⁺). Se obtuvieron extractos de lípidos de los sobrenadantes y de la masa celular de estas cepas como se describió anteriormente y se resolvieron por cromatografía en capa fina preparativa de una dimensión (Sílica gel 60, MERCK). Como fase móvil se empleó una mezcla de acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5). De las placas obtenidas se raspó las áreas correspondientes a los factores de retención (rf) de 0.8 (± 0.05) y 0.6 (± 0.5). A la sílica obtenida se le extrajo los lípidos 3 veces con el método de Bligh & Dyer (1959). Las muestras se concentraron hasta sequedad con una corriente de nitrógeno comprimido.

Al analizar esas muestras por medio de GC/MS con los parámetros descritos anteriormente, el dodecanal y la 2-tridecanona se detectó únicamente en los sobrenadantes de *S. meliloti* QS77 (pBBR1MCC-3) (Tabla A10). Por tanto, la presencia de estas moléculas está directamente vinculada a la ausencia del gen *fadD*.



4.2.2. La 2-tridecanona provoca la motilidad de *S. meliloti* GR4.

Con el fin de verificar si alguna de las moléculas presentes de modo diferencial en QS77 es capaz de inducir el fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* GR4, éstas se agregaron al medio de crecimiento bajo condiciones en las que la mutante presenta fenotipo de “swarming”. Para ello, se empleó el protocolo descrito por Soto y colaboradores (2002). Para ensayar el efecto de los AG, el dodecanal y la 2-tridecanona, se prepararon soluciones stock de cada uno de ellos a una concentración de 10 mg mL⁻¹ en etanol al 100%. Justo antes de verter las placas, las soluciones stock se incorporaron de manera individual al medio semisólido a una concentración final de 1, 2 o 5 µg mL⁻¹.

El ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1^{Δ9}) no provocan la inducción del “swarming” en la cepa silvestre (**Figura 12**). Sin embargo, el C14:0 es capaz de reducir significativamente el fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* QS77 a una concentración final de 5 µg mL⁻¹, mientras que el C18:1^{Δ9} provoca la inhibición desde 1 µg mL⁻¹ (**Figura 12**).

El dodecanal no fue capaz de inducir el fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* GR4 y provocó la reducción del “swarming” de *S. meliloti* QS77 a una concentración final de 5 µg mL⁻¹ (**Figura 12**).

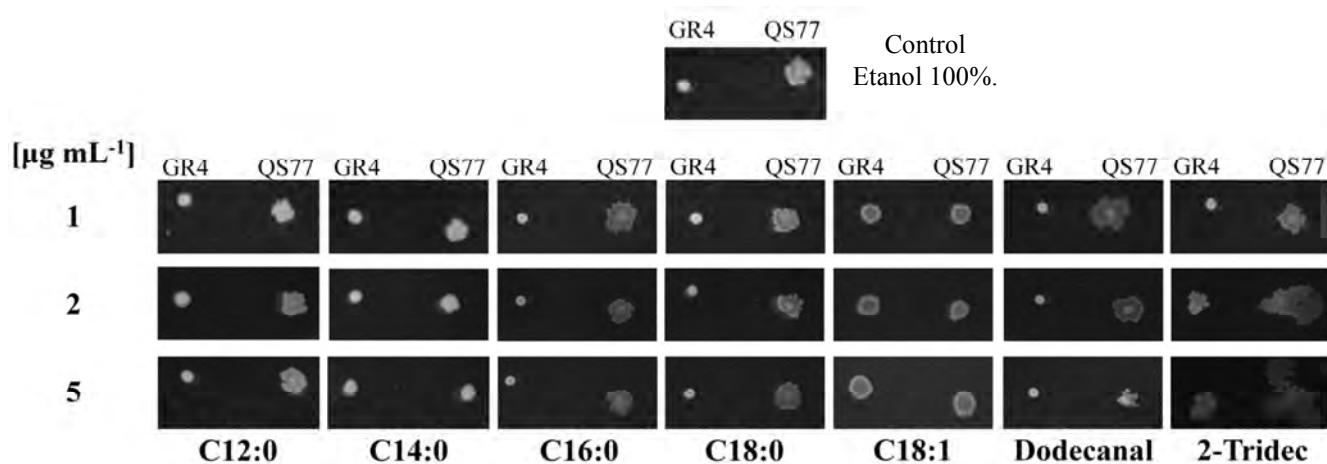


Figura 12. Efecto de los ácidos grasos, el dodecanal y la 2-tridecanona en la motilidad de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. Se emplearon placas semisólidas (0.7% de agar) de Medio Mínimo de Robertsen (Soto *et al.*, 2002). Los inóculos empleados de cada cepa fueron de aproximadamente 2×10^7 células cada uno. Los ácidos grasos ensayados son el ácido dodecanoico (C12:0), tetradecanoico (C14:0), hexadecanoico (C16:0), octadecanoico (C18:0) y oleico (C18:1^{Δ9}), así mismo se ensayó el efecto del dodecanal y de la 2-tridecanona. Las moléculas se agregaron al medio a una concentración final de 1, 2 o 5 µg mL⁻¹. En la parte superior se muestra el control de ambas cepas a las que se les añadió etanol al 100%. Las imágenes representan los resultados observados en al menos dos repeticiones biológicas.

Por otra parte, la 2-tridecanona presenta una influencia en la motilidad de la cepa silvestre y un incremento en el fenotipo de “swarming” en la cepa mutante a una concentración final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 12). Este efecto es dependiente de la dosis, a mayor concentración de la 2-tridecanona mayor expresión del fenotipo. En consecuencia, se ensayó el efecto de un gradiente de la 2-tridecanona (Figura 13). Se prepararon placas para el ensayo de “swarming” (Soto *et al.*, 2002), se colocó un disco de papel filtro (6 mm de diámetro) en uno de los extremos de la placa y se le agregó 125 o 250 μg de la 2-tridecanona disuelta en etanol al 100%. Los inóculos, de aproximadamente 2×10^7 células, se agregaron a diferentes distancias del disco.

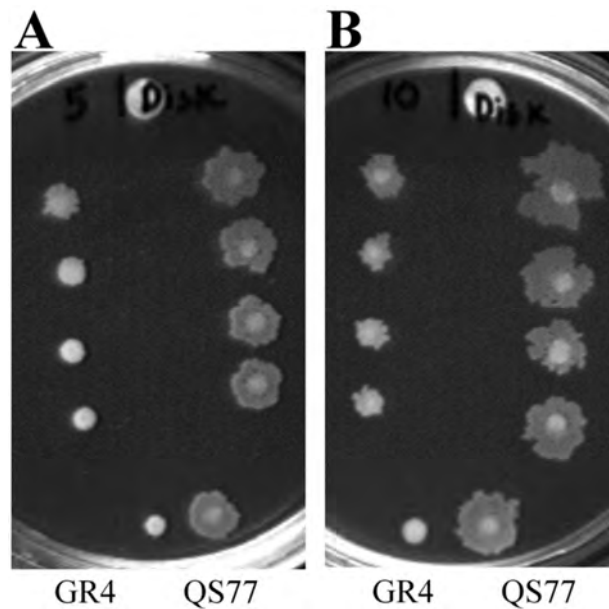


Figura 13. Efecto de un gradiente de 2-tridecanona en la motilidad de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. A placas semisólidas (0.7% de agar) de Medio Mínimo de Robertsen (Soto *et al.*, 2002) se les agregó a un disco con 125 μg (A) o 250 μg (B) de 2-tridecanona disuelta en etanol al 100%. Los inóculos, de aproximadamente 2×10^7 células cada uno, se colocaron a diferentes distancias de disco. Las imágenes representan los resultados observados en al menos dos repeticiones biológicas.

En la Figura 13 los inóculos de GR4 más cercanos al disco presentan motilidad, en tanto los de la cepa mutante muestran un incremento en el fenotipo de “swarming”. Este efecto es más acentuado con 250 μg que con 125 μg . Sin embargo, cuando se observaron bajo el microscopio electrónico células de *S. meliloti* GR4 que se encontraban en contacto con la 2-tridecanona, éstas fueron alargadas pero sin flagelos, mientras que las células de *S. meliloti* QS77 no mostraron diferencia con respecto a los controles sin la 2-tridecanona.

4.2.3. *S. meliloti* 1021FDC5 (*fadD*⁻) no es más sensible que la cepa silvestre a la acción de agentes desestabilizantes de la membrana pero sí es más susceptible al crecimiento en alta osmolaridad.

Las cepas mutantes en *fadD* de *S. meliloti* acumulan una cantidad significativa de AG (102.6 nmol mL⁻¹, SD 36.7) en el interior de la células con respecto a la cepa silvestre (0.75 nmol mL⁻¹, SD 0.24) (Pech-Canul *et al.*, 2011). La alta concentración de AG presentes en estas células de la cepa mutante podría causar la inestabilidad de sus membranas, ya que los AG libres de cadena larga poseen propiedades de detergente. Con el fin de verificar esta hipótesis, se probó la resistencia de *S. meliloti* 1021FDC5 a agentes desestabilizantes de la membrana celular mediante ensayos de inhibición en placa. Para ello, se empleó el protocolo descrito previamente (Ferguson *et al.*, 2002) con algunas modificaciones: en vez de utilizar el medio LB_{M/C} se empleó MM de Robertsen con agar purificado de Pronadisa al 1.5%. El agar suave fue preparado al 0.4% en vez de 0.65% y mantenido a 41 °C (±1°C) para la inoculación. El inóculo (100 µL) se creció en MM de Robertsen líquido hasta fase estacionaria temprana (DO_{620nm} de 1.2). En el centro de cada disco (6 mm de diametro) se aplicaron de manera individual 5 µL del stock de los siguientes agentes destestabilizantes: 70 mg mL⁻¹ gentamicina, 10% Brij 58, 10% CTAB, 10% Triton X-100, 10% SDS, 2% desoxicolato de sodio (DOC), 1% Nonidet NP-40 y 4 mg mL⁻¹ de cristal violeta, adicionalmente se empleó polimixina B (discos de ensayo Oxoid, 300 ui por disco). Las placas se incubaron a 30 °C por 48 horas y se midieron los halos.

El Brij 58, el Tritón X-100, el DOC y el Nonidet NP-40 no tuvieron efecto inhibitorio del crecimiento ni en la cepa mutante ni en la silvestre (**Figura 14**). Al medir y comparar los halos de inhibición de *S. meliloti* 1021 y de *S. meliloti* 1021FDC5 provocados por polimixina B, gentamicina, CTAB, SDS y el cristal violeta (**Figura 14**) no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Esto indica que la membrana de la cepa mutante no se afecta de forma diferente a la cepa silvestre por la acción de los detergentes. Por lo tanto, los AG libres podrían no provocar la desestabilización de la membrana como se había planteado. Aunque hay que hacer notar que bajo condiciones de crecimiento en medio sólido no se ha determinado la concentración de AG.

Otra de las características fenotípicas en las que podría verse afectada la membrana de la cepa mutante por la alta concentración de AG es la capacidad de crecer en medios con alta osmolaridad. Para verificar lo anterior, las cepas de *S. meliloti* 1021 y de *S. meliloti* 1021FDC5 se crecieron en MM de Robertsen estándar (860 µM NaCl) o adicionando NaCl a un concentración final de 100, 250, 500 o 700 mM.

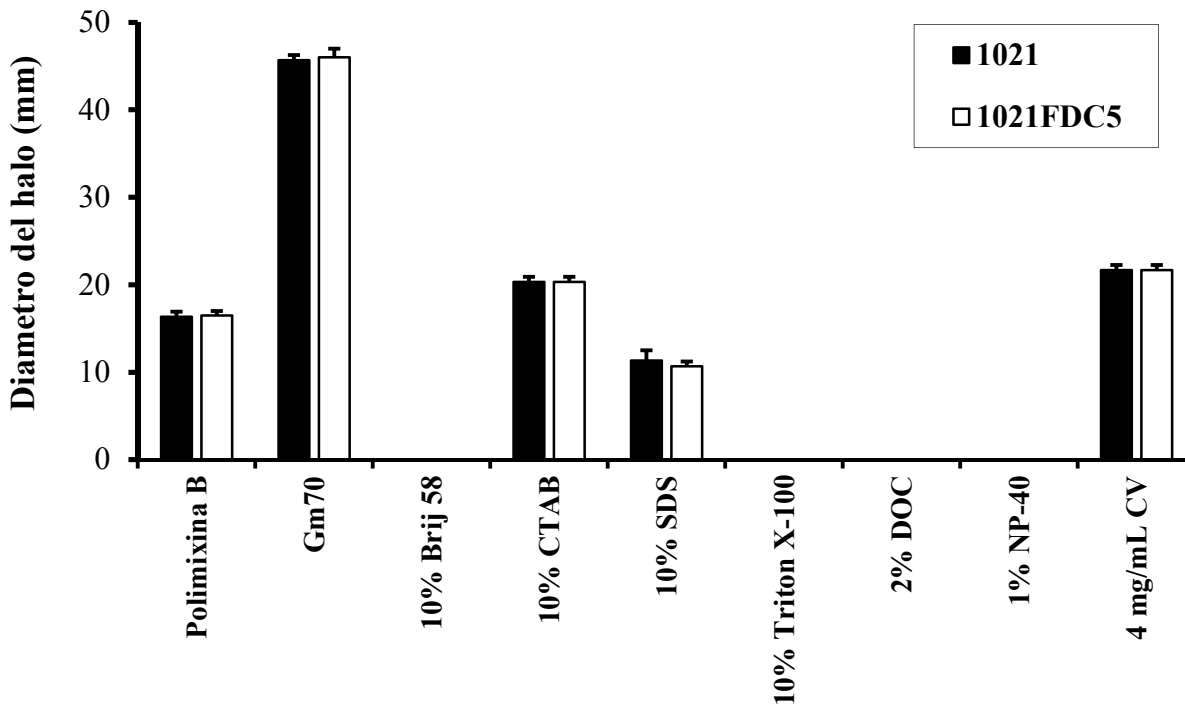


Figura 14. Pruebas de inhibición con agentes desestabilizantes de la membrana en *S. meliloti* 1021 y en *S. meliloti* 1021FDC5. Se usaron 5 μ L de cada solución de agente desestabilizante de la membrana: polimixina B (discos de ensayo Oxoid, 300ui por disco), 70mg mL⁻¹ gentamicina, 10% Brij 58, 10% CTAB, 10% Triton X-100, 10% SDS, 2%. desoxicolato de sodio (DOC), 1%, Nonidet (NP-40) 1% y 4 mg mL⁻¹ cristal violeta (CV). Las placas se incubaron a 30 °C por 48 horas y los halos se midieron. Las barras de error representan las desviaciones estándares correspondientes a 3 repeticiones de cada cepa con cada uno de los agentes.

A una concentración final de 100 mM NaCl en el MM, tanto *S. meliloti* 1021 como *S. meliloti* 1021FDC5 no se ven afectadas en su crecimiento con respecto al MM estándar (periodo de duplicación aprox. 7.5 horas) (**Figura 15A y 15B**). A 250, 500 y 700 mM NaCl en el MM, la cepa mutante mostró una disminución en su periodo de duplicación mayor que la cepa silvestre, pasando de 8 a 9 horas (**Figura 15C**), de 14 a 19 horas (**Figura 15D**) y de 26 a 29.5 horas (**Figura 15E**) respectivamente. Esto deja notar que la cepa mutante muestra más sensibilidad al crecimiento en MM con alta osmolaridad que la cepa silvestre.

Cuando se ensayó la sensibilidad al crecimiento en medio complejo (PY suplementado con 4.5 mM CaCl₂) con alta osmolaridad de manera similar al que se realizó en MM, no se observaron diferencias significativas entre el patrón de crecimiento de ambas cepas a 100, 250 y 500 mM de NaCl con respecto al medio estándar (**Figura A3**). A 700 mM de NaCl se observa una diferencia en el crecimiento de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* 1021FDC5 (**Figura A3**). Sin embargo, a esa concentración de NaCl el crecimiento de ambas cepas se ve severamente afectado con respecto a las otras concentraciones de NaCl.

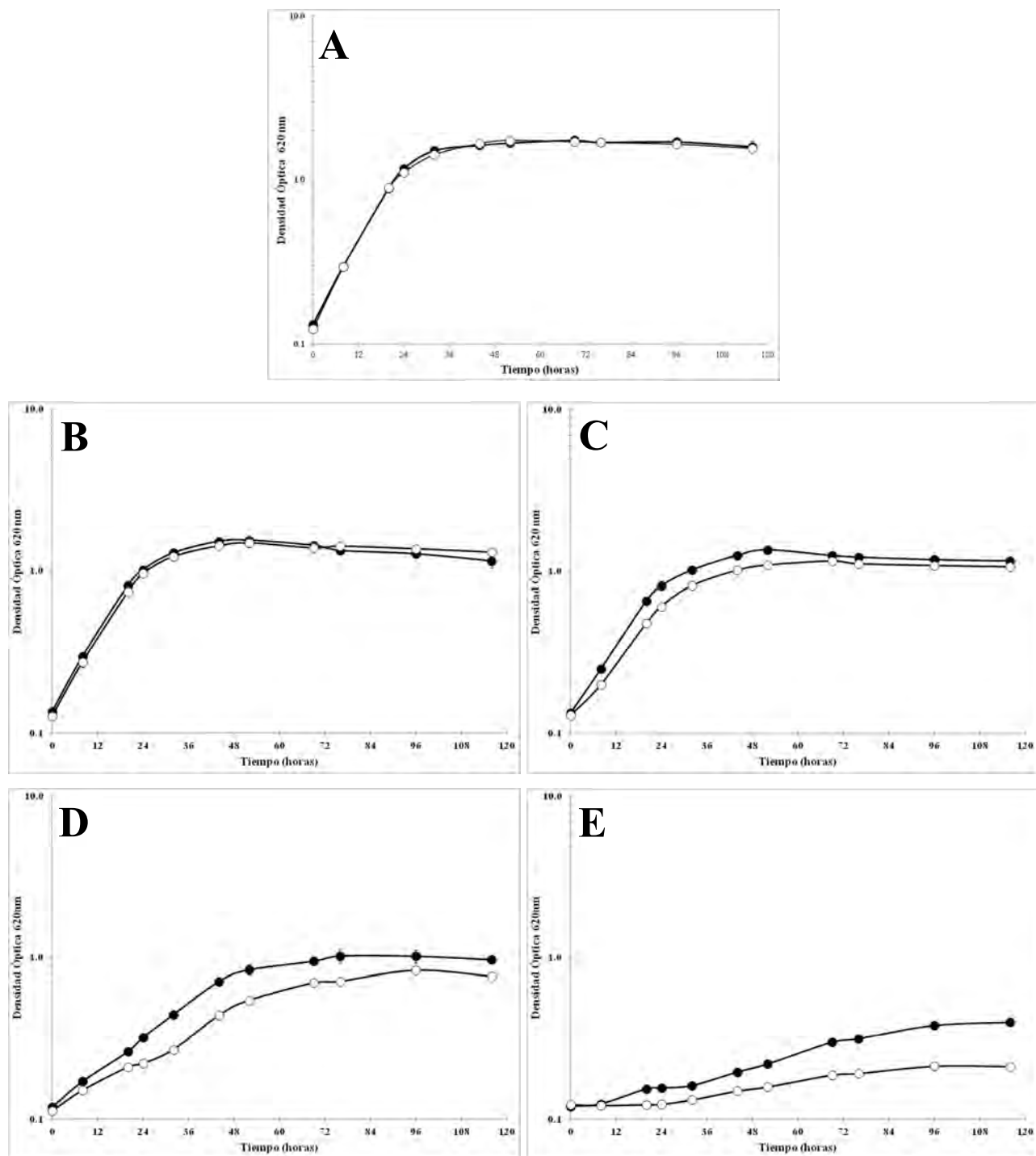


Figura 15. Comparación de las curvas de crecimiento de (●) *S. meliloti* 1021 y de (○) *S. meliloti* 1021FDC5 en MM de Robertsen con distintas concentraciones de NaCl. Se creció un preinóculo de cada cepa en MM de Robertsen estándar con el cual se inocularon los medios con las diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación (275 rpm). Curvas de crecimiento correspondientes a (A) MM estándar, (B) MM con 100 mM NaCl, (C) MM con 250 mM NaCl, (D) MM con 500 mM NaCl y (E) MM con 700 mM NaCl. Las barras de error representan las desviaciones estándares correspondientes a 3 replicas de cada cepa.

La sensibilidad al crecimiento en MM con alta osmolaridad se ensayó posteriormente en la cepa mutante en *fadD* complementada en *trans* con un vector que lleva el gen *fadD* o con una mutante en *fadD* que lleva solo el vector vacío. Aún cuando *S. meliloti* 1021FDC5 (pBBRD4) (*fadD*⁺) no recuperó completamente el patrón de crecimiento de la cepa silvestre (**Figura A4**), se observó una diferencia en su crecimiento con respecto a *S. meliloti* 1021FDC5 (pBBR1MCS-3) (*fadD*⁻). Esta diferencia en el crecimiento se asemeja a la observada para *S. meliloti* 1021 (*fadD*⁺) y *S. meliloti* 1021FDC5 (*fadD*⁻) (**Figura A4**). Este resultado demuestra que la sensibilidad al crecimiento en MM con alta osmolaridad de *S. meliloti* 1021FDC5 está vinculada con la ausencia de *fadD*.



4.2.4. *S. meliloti* posee varios genes homólogos a *fadD* (*smc02162*).

Además de la *SMc02162* (*FadD*), el genoma de *S. meliloti* 1021 revela la existencia de varios genes cuyos productos presentan homología a *FadD*. Entre los ORFs homólogos con mayor identidad y similitud a *FadD* se encuentran *SMA0150* y *SMB20650*. Inicialmente sólo éstos estaban anotados como *FadDs* putativos. Las proteínas *SMA0150* y *SMB20650* no habían sido caracterizadas y se encuentran en los plásmidos simbióticos *pSymA* y *pSymB*, respectivamente.

El alineamiento de *SMc02162*, *SMA0150*, *SMB20650* y *FadD* de *E. coli* se presenta en la **Figura A1**. *SMA0150* y *SMB20650* contienen una secuencia similar al motivo consenso de unión a ATP-AMP (común en todos los miembros de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato) así como una secuencia semejante al motivo consenso de acil-CoA sintetasa (FACS) de 25 aminoácidos que ha sido propuesto como parte del sitio de reconocimiento al ácido graso dentro de la enzima *FadD* (Black & DiRusso, 2003) (**Figura A1**).

SMA0150 y *SMB20650* además de anotarse como *FadD* putativas también pertenecen al conjunto de grupos ortólogos (COG) 0318 acil-CoA sintetasas (Tatusov *et al.* 2003). Sin embargo, el producto de *sma0150* recientemente se ha reanotado como malonil-CoA sintetasa, por su similitud con otras malonil-CoA sintetasas descritas previamente. Esta nueva denominación parece coincidir con el contexto genómico en el que se encuentra *sma0150* (**Figura 16**).

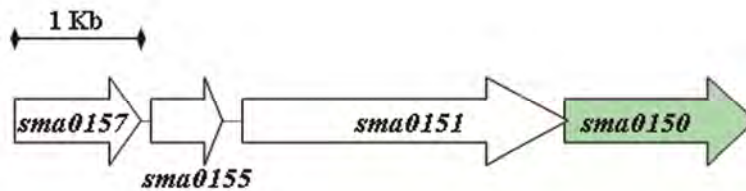


Figura 16. Contexto genómico en el que se encuentra el gen *sma0150*. *sma0157*: proteína transportadora de ácido malónico tipo TRAP, *sma0155*: proteína del sistema de transporte tipo TRAP para ácido malónico, *sma0151*: proteína del sistema de transporte tipo TRAP para ácido malónico con una subunidad descarboxilasa, *sma0150*: malonil-CoA sintetasa. Las anotaciones fueron tomadas de la base de datos del “Centre National de la Recherche Scientifique” (<http://iant.toulouse.inra.fr/S.meliloti>).

El operón *matABC* de *Rhizobiúm leguminosarum* bv. *trifolii* codifica para 3 proteínas involucradas en el metabolismo del ácido malónico (An & Kim, 1998). Al realizar una comparación de ellos con el proteoma de *S. meliloti* 1021 se encontró que *MatB* (malonil-CoA sintetasa) posee una identidad del 63% y una similitud del 74% con respecto a *SMA0150*, mientras que *MatA* (malonil-CoA descarboxilasa) posee una identidad del 75% y una similitud del 84% respecto a *SMA0151*. Sin embargo, no se encontró ningún gen parecido a *MatC* (proteína portadora de grupos dicarboxílicos).

MatB de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que es una malonil-CoA sintetasa (An & Kim, 1998) y que además presenta una tolerancia remarcable para convertir una amplia variedad de derivados de ácido malónico en el respectivo tioéster de CoA (Pohl *et al.*, 2001). En un trabajo previo se describió que el grupo de genes *sma0150-sma0157* (**Figura 16**) es inducido por el ácido malónico (Mauchline *et al.*, 2006). Recientemente se demostró que en *S. meliloti* el sistema de transporte tipo TRAP *matPQMAB* (*sma0150-sma0157*) se requiere para el transporte y la utilización de malonato (Chen *et al.*, 2010). El sistema de transporte de ácido malónico de *S. meliloti* presenta similitud al sistema de transporte periplasmático tripartito independiente de ATP (TRAP, del inglés *tripartite ATP-independent periplasmatic transporter*) que ha sido reportado en algunas bacterias (Kelly & Thomas, 2001) Sin embargo, a diferencia de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* la mutante en el operón *matPQMAB* de *S. meliloti* es capaz de producir nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa. (Chen *et al.*, 2010). A pesar de lo anterior, aún no se ha demostrado mediante reacciones *in vitro* que SMA0150 esterifica el ácido malónico a CoA.

El gen que codifica para SMb20650 forma parte de un operón de 4 proteínas y el gen anterior a *smb20650* codifica para una proteína portadora de grupos acilo (ACP_{SMb20651}) (Ramos-Vega *et al.*, 2009) (**Figura 17**). La expresión *in vivo* en *E. coli* de SMb20650 y la ACP_{SMb20651} sugiere que SMb20650 es responsable de la esterificación de un ácido graso de cadena larga a la ACP_{SMb20651} (Ramos-Vega *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no se han realizado ensayos *in vitro* que demuestren si SMb20650 es capaz de acilar a ACP_{SMb20651} o a CoA.

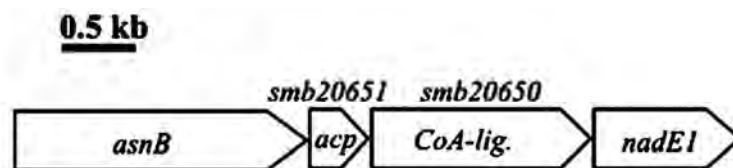


Figura 17. Contexto genómico en el que se encuentra la proteína SMb20650. *acp*, proteína portadora de grupos acilo (SMb20651); *CoA-lig.*: FadD putativa (SMb20650); *asnB*, asparagina sintetasa putativa; *nadE1*, NAD sintetasa putativa; (Imagen tomada de Ramos-Vega *et al.*, 2009).

Se debe tomar en consideración que las comparaciones mencionadas anteriormente para ambos genes son producto de análisis bioinformáticos y que las funciones enzimáticas de SMA0150 y SMb20650 no han sido demostradas experimentalmente. Además, la comparación de SMA0150 y SMb20650 con el FadD de *E. coli* y el de *S. meliloti* (**Figura A1** y **Figura 8**) sugiere que éstas podrían suplir la función de SMc02162.

4.2.4.1. Las mutantes en *sma0150* o en *smb20650* no acumulan ácidos grasos durante la fase estacionaria de crecimiento ni presentan fenotipo de “swarming”.

Para conocer el efecto de la mutación de los genes *sma0150* y *smb20650* en el perfil de ácidos grasos y en la motilidad de *S. meliloti*, se construyeron las mutantes individuales por intercambio alélico, mediante una estrategia similar a la empleada para la mutación de *smc02162* (Nogales *et al.*, 2010). Con ésta se obtuvieron las cepas mutantes *S. meliloti* MAL101 (*sma0150*⁻) y *S. meliloti* IML20650 (*smb202650*⁻) ambas derivadas de *S. meliloti* 1021. La organización genética requerida para las mutantes se corroboró por medio de hibridación tipo Southern. Las cepas y sus características relevantes se enlistan en la **Tabla A1**.

Con la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 y las cepas mutantes *S. meliloti* 1021FDC5 (*smc02162*⁻), *S. meliloti* MAL101 (*sma0150*⁻) y *S. meliloti* IML20650 (*smb202650*⁻) se realizó un marcaje de los lípidos con acetato (¹⁴C) y se analizaron por cromatografía en capa fina de manera similar a lo reportado en Pech-Canul *et al.* (2011).

S. meliloti 1021FDC5 presenta acumulación de AG durante la fase estacionaria de crecimiento (26 y 50 hrs de crecimiento) tanto en la masa celular como en los sobrenadantes (**Figura 18**). Por otra parte, el perfil de los AG de *S. meliloti* MAL101 (*sma0150*⁻) y el de *S. meliloti* IML20650 (*smb202650*⁻) es similar al de la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 (**Figura 18**). Por lo tanto, la ausencia de *sma0150* o de *smb20650* no contribuye a la acumulación de ácidos grasos.

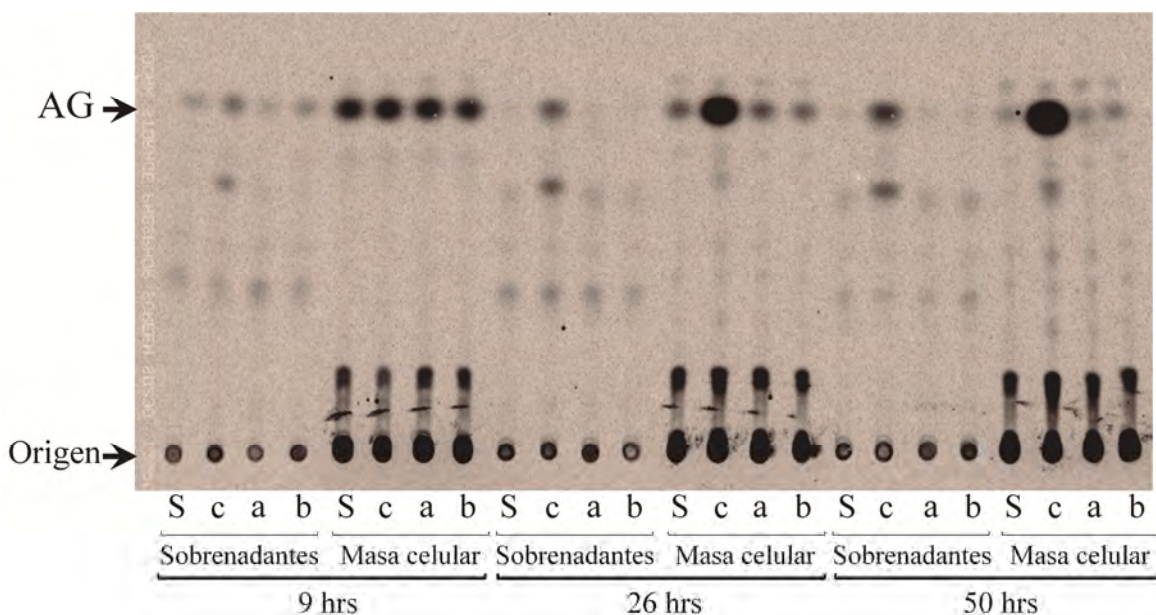


Figura 18. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos de lípidos de los sobrenadantes y de la masa celular de *S. meliloti* 1021 (S), *S. meliloti* 1021FDC5 (*smc02162*⁻) (c), *S. meliloti* MAL101 (*sma0150*⁻) (a) y *S. meliloti* IML20650 (*smb202650*⁻) (b). Las cepas se crecieron en cultivos líquidos de MM de Sherwood. Se realizó un marcaje de los lípidos con acetato-[1-¹⁴C]. Las muestras se tomaron en fase logarítmica (DO_{620nm} = 0.4, 9 hrs de crecimiento), fase estacionaria temprana (DO_{620nm} = 1.5, 26 hrs de

crecimiento) y fase estacionaria tardía (50 hrs de crecimiento). AG: ácidos grasos. En los extractos de lípidos de la masa celular, los lípidos de membrana permanecen en el punto de aplicación (Origen). Fase estacionaria: sílica gel 60 (MERCCK), fase móvil: acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5).

Para evaluar si la ausencia de *sma0150* o *smb20650* contribuiría al fenotipo de “swarming”, se realizaron ensayos del fenotipo de “swarming” como se ha reportado anteriormente (Soto *et al.*, 2002). Para este experimento se hizo uso de la estrategia descrita al inicio de la sección para construir las mutantes individuales en *sma0150* y en *smb20650* derivadas de la cepa silvestre *S. meliloti* GR4; resultando en *S. meliloti* GRMAL-2 (*sma0150*⁻) y *S. meliloti* IMLGR650 (*smb20650*⁻). La organización genética requerida para las mutantes también se corroboró por medio de hibridación tipo Southern (ver **Tabla A1**). Se eligió este conjunto de cepas ya que, a diferencia de *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* GR4 nunca presenta fenotipo de “swarming” (Nogales *et al.*, 2010).

S. meliloti QS77 (*fadD*⁻) presenta el fenotipo de “swarming” esperado bajo las condiciones ensayadas, por otro lado, el fenotipo de “swarming” no se observó en *S. meliloti* MAL101 ni en *S. meliloti* IML20650 (**Figura 19**). Este resultado demuestra que a diferencia de *smc02162*, la ausencia de *sma0150* o de *smb20650* no provoca el fenotipo de “swarming”.

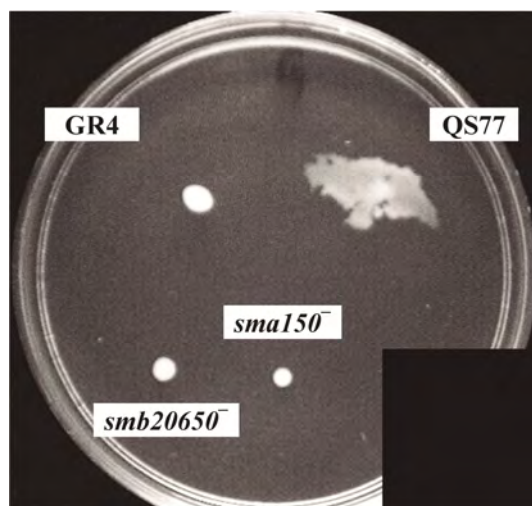


Figura 19. Ensayo del fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* GR4 (silvestre), *S. meliloti* QS77 (*fadD*⁻), *S. meliloti* GRMAL2 (*sma0150*⁻) y *S. meliloti* IMLGR650 (*smb20650*⁻). Se emplearon placas semisólidas (0.7% de agar) de Medio Mínimo de Robertsen (Soto *et al.*, 2002). Los inóculos empleados para cada cepa fueron de aproximadamente 2×10^7 células cada uno. Se obtuvieron resultados similares en al menos dos repeticiones biológicas.

4.2.4.2. *sma0150* o *smb20650* no complementan a *S. meliloti* mutante en *smc02162*.

Dada la similitud de *Sma0150* y *Smb20650* con *FadD*, se evaluó si estas proteínas son capaces de suplir la función de *FadD* mediante la complementación en *trans* de *S. meliloti* 1021FDC5 (*fadD*⁻) con *sma0150* o *smb20650*. Para ello, *smc02162* o *sma0150* se amplificaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos para cada caso y ADN genómico de la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 como molde. Los fragmentos obtenidos se clonaron en los vectores de expresión pET17b y pET16b respectivamente y las construcciones resultantes se denominaron pECH6 y pECH1 respectivamente. El gen *smb20650* se digirió de pAL55 (Ramos-Vega *et al.*, 2009) y se clonó en pET17b, la construcción se denominó pECH7. La secuencia de ADN de los genes amplificados se corroboró por secuenciación comercial (Eurofins Medigenomix; Martinsried, Alemania). Los genes clonados quedan bajo el control del promotor T7 de los vectores pET. Posteriormente pECH6, pECH1 y pECH7 se digirieron y se clonaron en vectores pRK404, resultando en pRCanul2, pRCanul1 y pRCanul3, respectivamente. Estas construcciones se movilizaron a *S. meliloti* 1021FDC5 por conjugación biparental usando la cepa donadora *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983). Las cepas empleadas y sus características relevantes se resumen en la **Tabla A1**. Los oligonucleótidos utilizados así como detalles referentes a los plásmidos se describen en la **Tabla A2**.

Con las cepas obtenidas de la conjugación se realizó nuevamente la comparación del perfil de AG como se describió en la sección 4.2.4.1. En la **Figura 20** se observa como la expresión de *smc02162* en *S. meliloti* 1021FDC5 provoca la disminución de la señal de los AG tanto en los sobrenadantes como en la masa celular respecto a *S. meliloti* 1021FDC5 que porta el vector vacío. Al cuantificar la intensidad de la señal de los AG se observa una disminución del 95 % en los sobrenadantes y del 78% en la masa celular de *S. meliloti* 1021FDC5 que expresa *smc02162* respecto a *S. meliloti* 1021FDC5 que porta el vector vacío (**Tabla 2**).

La cuantificación también muestra que ni *sma0150* ni *smb20650* son capaces de disminuir la mancha de los AG de los sobrenadantes ni de la masa celular, ya que ambas cepas presentaba un perfil de lípidos similar a los de *S. meliloti* 1021FDC5 que porta el vector vacío (pNG34) (**Figura 20**). Cuando se expresa *smb20650* se observa una reducción de 3.3 a $1.2 \text{ ua} \times 10^7$ (63% aprox) con respecto al vector vacío (**Tabla 2**). Sin embargo, en la masa celular se nota un aumento de la señal de 7.08 a $9.4 \text{ ua} \times 10^7$ (33% aprox) respecto al vector vacío (**Tabla 2**). Pese a estas diferencias, la disminución de la señal de los AG no es tan acusada como la expresión de *smc02162*. Es probable que estas diferencias sean producto de la variación intrínseca del experimento, por lo que será necesario repetir estos experimentos para confirmar los resultados observados.

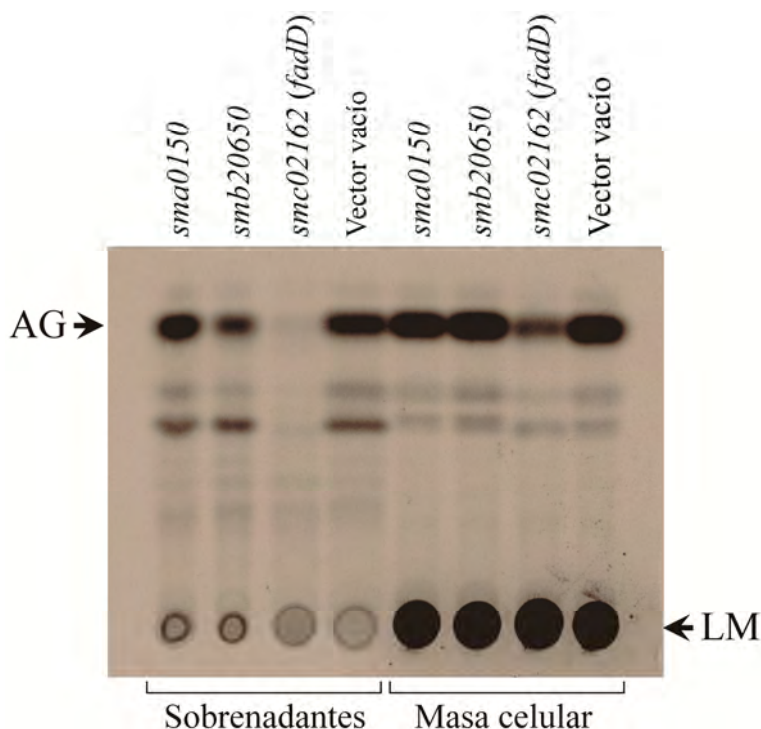


Figura 20. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos de lípidos de los sobrenadantes y de la masa celular de *S. meliloti* 1021FDC5 (*smc02162*⁻) cuando porta las construcciones pRCanul1 (*sma0150*), pRCanul3 (*smb20650*), pRCanul2 (*smc02162*) o pNG34 (vector vacío). Las cepas se crecieron en cultivos líquidos de MM de Robertsen. Se realizó un marcaje de los lípidos con acetato-[1-¹⁴C]. Las muestras se tomaron en fase estacionaria (30 hrs de crecimiento). AG: ácidos grasos. En los extractos de lípidos de la masa celular, los lípidos de membrana (LM) permanecen en el punto de aplicación. Fase estacionaria: sílica gel 60 (MERCK), fase móvil: acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5).

Tabla 2. Cuantificación de la intensidad de la mancha de los ácidos grasos (AG) de la **Figura 20**.

<i>S. meliloti</i> 1021FDC5	Sobrenadantes		Masa celular	
	AG ^a (ua × 10 ⁷)	% Relativo ^b	AG (ua × 10 ⁷)	% Relativo
pRCanul1 (<i>sma0150</i> ⁺)	3.46	105.0	6.30	89.0
pRCanul3 (<i>smb20650</i> ⁺)	1.22	37.0	9.40	132.8
pRCanul2 (<i>smc02162</i> ⁺)	0.18	5.3	1.58	22.3
pNG34 (vector vacío)	3.30	100.0	7.08	100.0

a. La intensidad de la mancha se expresa en unidades arbitrarias (ua).

b. % Relativo: porcentaje de los AG relativo a los AG de *S. meliloti* 1021FDC5 (pNG34).

De manera similar a la sección 4.2.4.1, también se ensayó el fenotipo de “swarming”. pRCanul1, pRCanul3, pRCanul2 o pNG34 se movilizaron a la cepa mutante *S. meliloti* QS77, con el fin de verificar si la expresión de *sma0150* o *smb20650* es capaz de suprimir el fenotipo de “swarming”.

En la **Figura 21**, la cepa de *S. meliloti* QS77 muestra el fenotipo de “swarming” bajo las condiciones ensayadas y un fenotipo similar se observó en *S. meliloti* QS77 (pNG28), lo cual indica que el fenotipo de “swarming” no es afectado por el vector vacío. Cuando se expresa *smc02162* en *S. meliloti* QS77 se observó un fenotipo similar al de la cepa silvestre. Por otra parte, cuando se expresa *sma0150* o *smb20650* en el fondo *fadD*⁻, las cepas lucen como *S. meliloti* QS77 (pNG28) (**Figura 14**). Consecuentemente, ni *sma0150* ni *smb20650* son capaces de restaurar el fenotipo silvestre de *S. meliloti* QS77.

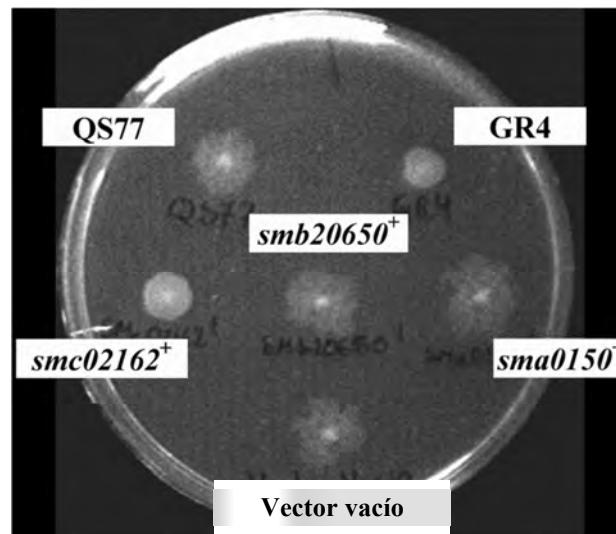


Figura 21. Ensayo del fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* GR4 (silvestre), *S. meliloti* QS77 (*fadD*⁻) y de *S. meliloti* QS77 (*fadD*⁻) cuando porta las construcciones pNG34 (vector vacío), pRCanul2 (*smc02162*⁺), pRCanul1 (*sma0150*⁺) o pRCanul3 (*smb20650*⁺). Se emplearon placas semisólidas (0.7% de agar) de MM de Robertsen (Soto *et al.*, 2002). Los inóculos empleados para cada cepa fueron de aproximadamente 2×10^7 células cada uno. Se obtuvieron los mismos resultados en al menos dos repeticiones biológicas.

4.2.5. El gen *fadD* de *E. coli* complementa parcialmente a la mutante *fadD* de *S. meliloti*.

La cepa mutante en *fadD* de *E. coli* (K-27) es complementada con el gen *fadD* de *S. meliloti* (*fadD_{S.meliloti}*), recuperando la capacidad de crecer en oleato como única fuente de carbono (Soto *et al.*, 2002) y evitando la acumulación de ácidos grasos endógenos en la fase estacionaria de crecimiento (Pech-Canul *et al.*, 2011). No obstante, aún no se han evaluado si el *fadD_{E.coli}* es capaz de complementar a la cepa mutante en *fadD* de *S. meliloti*. Con el fin de evaluar lo anterior se complementó a *S. meliloti* 1021FDC5 con el *fadD_{E.coli}*. Para ello, el *fadD_{E.coli}* se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos y ADN genómico de la cepa silvestre de *E. coli* K-12 como molde. El producto se clonó en un vector de expresión (pET17b) y se le denominó pECH8. La secuencia de ADN del gen amplificado se corroboró por secuenciación comercial (Eurofins Medigenomix; Martinsried, Alemania). pECH8 se digirió y se clonó al vector pRK404, la construcción resultante se le denominó pRCanul4 (Tabla A2).

La pRCanul4 y pRCanul2 tienen clonados el *fadD_{E.coli}* y el *fadD_{S.meliloti}*, respectivamente, bajo el control del promotor T7; el cual es activo en *S. meliloti* como se demostró previamente (Figura 21). La construcción pRCanul4 se movilizó a *S. meliloti* 1021FDC5 y a *S. meliloti* QS77. Con las cepas obtenidas se analizó el perfil de AG así como el fenotipo de “swarming”.

La expresión del *fadD_{E.coli}* en *S. meliloti* 1021FDC5 causa la disminución en un 84% la señal de los AG en los sobrenadantes y en un 58% en la masa celular con respecto a los de *S. meliloti* 1021FDC5 que porta el vector vacío (Figura 22 y Tabla 3). Estos valores presentan una tendencia similar a los que se obtiene con la expresión de *smc02162*; en los que la disminución de la señal en los sobrenadantes es del 90%, mientras que la disminución en la masa celular es del 76% con respecto a los de *S. meliloti* 1021FDC5 que porta el vector vacío (Figura 22 y Tabla 3).

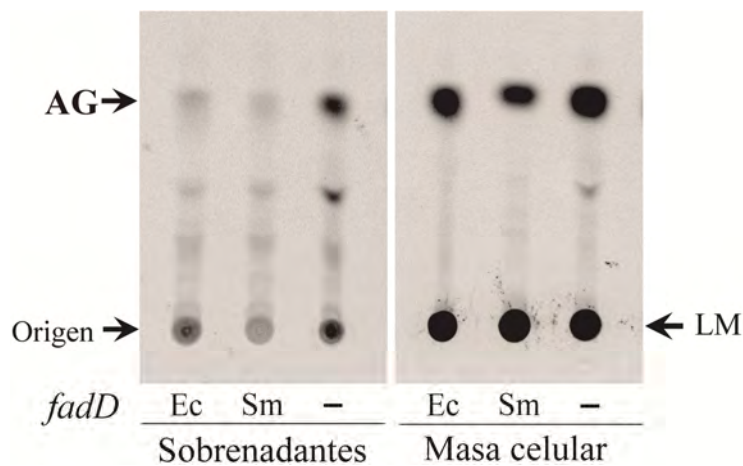


Figura 22. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos de lípidos de los sobrenadantes y de la masa celular de *S. meliloti* 1021FDC5 (*smc02162*⁻) cuando porta las construcciones (Ec) pRCanul4 (*fadD_{E.coli}*), (Sm) pRCanul2 (*smc02162*⁻) o (-) pNG28 (vector vacío). Las cepas se crecieron en cultivos líquidos de MM de Robertsen. Se realizó un marcaje de los lípidos con acetato-[1-¹⁴C]. Las muestras se tomaron en fase estacionaria (30 hrs de crecimiento). AG: ácidos grasos. En los extractos de lípidos de la

masa celular, los lípidos de membrana (LM) permanecen en el punto de aplicación (Origen). Fase estacionaria: sílica gel 60 (MERCK), fase móvil: acetato de etilo:hexanos:ácido acético (60:40:5).

Tabla 3. Cuantificación de la intensidad de la mancha de los ácidos grasos (AG) de la **Figura 15**.

<i>S. meliloti</i> 1021FDC5	Sobrenadantes		Masa celular	
	AG ^a (ua × 10 ⁵)	% Relativo ^b	AG (ua × 10 ⁶)	% Relativo
pRCanul4 (<i>fadD_{Ecoli}</i>)	4.89	15.9	11.45	41.6
pRCanul2 (<i>smc02162⁻</i>)	3.12	10.2	6.60	24.0
pNG28 (vector vacío)	30.73	100.0	27.53	100.0

- La intensidad de la mancha se expresa en unidades arbitrarias (ua).
- % Relativo: porcentaje de los AG relativo a los AG de *S. meliloti* 1021FDC5 (pNG28).

Para evaluar el efecto de la expresión de *fadD_{Ecoli}* en el fenotipo de “swarming”, se realizaron ensayos equivalentes a los reportado anteriormente (Soto *et al.*, 2002). La expresión de *fadD_{Ecoli}* en *S. meliloti* QS77 provocó una disminución del fenotipo de “swarming” con respecto a *S. meliloti* QS77 pNG28 (**Figura 23**). Sin embargo, cuando se expresa *smc02162* se observó una reducción más acentuada del fenotipo de “swarming” que con el *fadD_{Ecoli}* (**Figura 23**). La cepa de *S. meliloti* GR4, *S. meliloti* QS77 y *S. meliloti* QS77 (pNG28) (vector vacío) muestran el fenotipo esperado bajo las condiciones ensayadas.

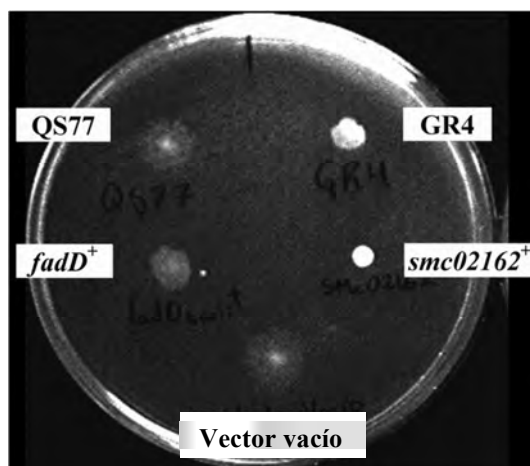


Figura 23. Ensayo del fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* GR4 (silvestre), *S. meliloti* QS77 (*fadD⁻*) y de *S. meliloti* QS77 (*fadD⁻*) cuando porta las construcciones pRCanul4 (*fadD_{Ecoli}⁺*), pRCanul2 (*smc02162⁺*) o pNG28 (vector vacío). Se emplearon placas semisólidas (0.7% de agar) de MM de Robertsen (Soto *et al.*, 2002). Los inóculos empleados para cada cepa fueron de aproximadamente 2×10^7 células cada uno. Se obtuvieron resultados similares en al menos dos repeticiones biológicas.

4.2.6. La mutación de *smc02079* en *S. meliloti* no afecta el transporte de ácidos grasos.

En *S. meliloti* no se ha descrito el mecanismo por el cual los AG exógenos son importados al interior de la célula; es probable que exista una proteína con función análoga a la FadL de *E. coli*. La proteína FadL posee una estructura terciaria de barril compuesto de 14 hojas beta antiparalelas (van den Berg, 2005). Para su actividad se han identificado 2 elementos importantes, una secuencia NPA (asparagina-prolina-alanina) cercana al extremo N-terminal (van den Berg, 2005) y una histidina en la posición 110 (H110) (Black & Zhang, 1995).

Mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos de FadL con el proteoma de *S. meliloti*, se identificó la proteína SMc02079. Esta proteína posee un 21 % de identidad y un 38% de similitud respecto a FadL de *E. coli* (Figura A5). En la secuencia de aa de SMc02079 se identifica una secuencia NPQ (asparagina-prolina-glutamina) y una histidina en la posición 122 (H122), sin embargo estos dos elementos de SMc01079 no son capaces de alinearse con los de la secuencia de FadL (Figura A5).

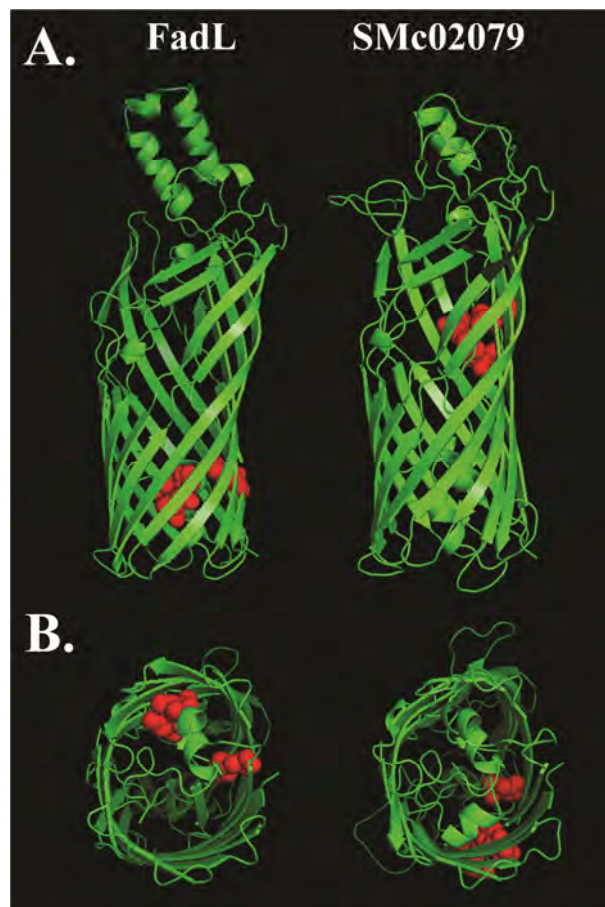


Figura 24. Modelo tridimensional de las proteínas FadL y SMc02079. (A) Vista frontal y (B) vista inferior. Para FadL la secuencia NPA y la H110 se muestran en esferas rojas. La secuencia NPQ y la H122 de SMc02079 se presentan también en esferas rojas. El modelo de FadL y la construcción del modelo de SMc02079 se obtuvieron del Portal de Recursos Bioinformáticos ExpASy (<http://swissmodel.expasy.org>).

Sin embargo, al realizarse un modelaje de SMC02079 se obtiene una estructura de barril similar al modelo obtenido del cristal de FadL de *E. coli* (**Figura 24**). El modelo de SMC02079 posee también 14 hojas beta antiparalelas (**Figura 24**). Atractivamente, NPQ y la H122 se orientan en el interior del barril, de manera similar a NPA y la H110 de FadL (**Figura 24**). Como se ha mencionado estos elementos juegan un papel crucial en la funcionalidad de FadL, ya que NPA funciona como un “tapón” que ocluye la estructura de barril (van den Berg, 2005) y la H110 interacciona con el grupo carboxílico del AG (Black & Zhang, 1995).

En vista de la información previa se realizó una mutación dirigida en *smc02079*. Se empleó la técnica de mutagénesis por integración de un vector suicida (Landeta *et al.*, 2011) usando como fondo la cepa silvestre de *S. meliloti* 1021. Para la mutagénesis se clonó un segmento intragénico (436 pb) de *smc02079* en un vector conjugativo que no es capaz de replicarse en *Sinorhizobium* (pK18mob). La construcción resultante se denominó pECH10 (**Tabla A2**). Tras verificar la clonación, pECH10 se transformó a *E. coli* S17-1. La cepa obtenida se empleó como donadora para la conjugación biparental con *S. meliloti* 1021 como cepa receptora. Cuando pECH10 se transfiere a *S. meliloti* se produce una recombinación sencilla en la cual se introduce el plásmido completo como un cointegrado en las regiones homólogas, lo cual resulta en la interrupción de *smc02079*. Las cepas transconjugantes se seleccionaron en placas de PY complementado con 4.5 mM CaCl₂, neomicina y ácido nalidíxico. Las candidatas a mutantes elegidas se verificaron mediante análisis por hibridación tipo Southern del genoma completo digerido con BglIII, utilizando como sonda el fragmento intragénico (436 pb) de *smc02079* (**Figura A6**). Tras verificar la organización genética requerida para la mutante, la cepa mutante elegida se le denominó *S. meliloti* smcfadL2.

S. meliloti smcfadL2, a diferencia de la cepa mutante en *fadL* *E. coli* (YfadL1), es capaz de crecer en MM de Robertsen con oleato como única fuente de carbono a un ritmo equivalente al de la cepa silvestre *S. meliloti* 1021.

Posteriormente, se analizó la incorporación de ácido (¹⁴C) palmítico a los fosfolípidos con un experimento similar a los que se describió anteriormente (Rock & Jackowski, 1985). En el trabajo mencionado se describió que la cepa de *E. coli* mutante en *fadL* incorpora deficientemente los AG exógenos con respecto a la cepa silvestre. El experimento mencionado se reprodujo bajo las condiciones en las que se observa la acumulación de AG en las cepas mutante de *fadD* de *E. coli* (**Figura A7**). De la misma forma se analizó la incorporación de ácido (¹⁴C) palmítico a los fosfolípidos de *S. meliloti* smcfadL2. El experimento también se realizó bajo las condiciones en las que se observa la acumulación de AG en las cepas mutantes en *fadD*.

S. meliloti smcfadL2 incorpora el ácido (^{14}C) palmítico de manera similar a la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 (Figura 25). La composición porcentual de los fosfolípidos marcados en *S. meliloti* smcfadL2 no presenta diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 (Figura 25B). La cepa mutante en *fadD* no fue capaz de incorporar el ácido (^{14}C) palmítico a los fosfolípidos (Figura 25A).

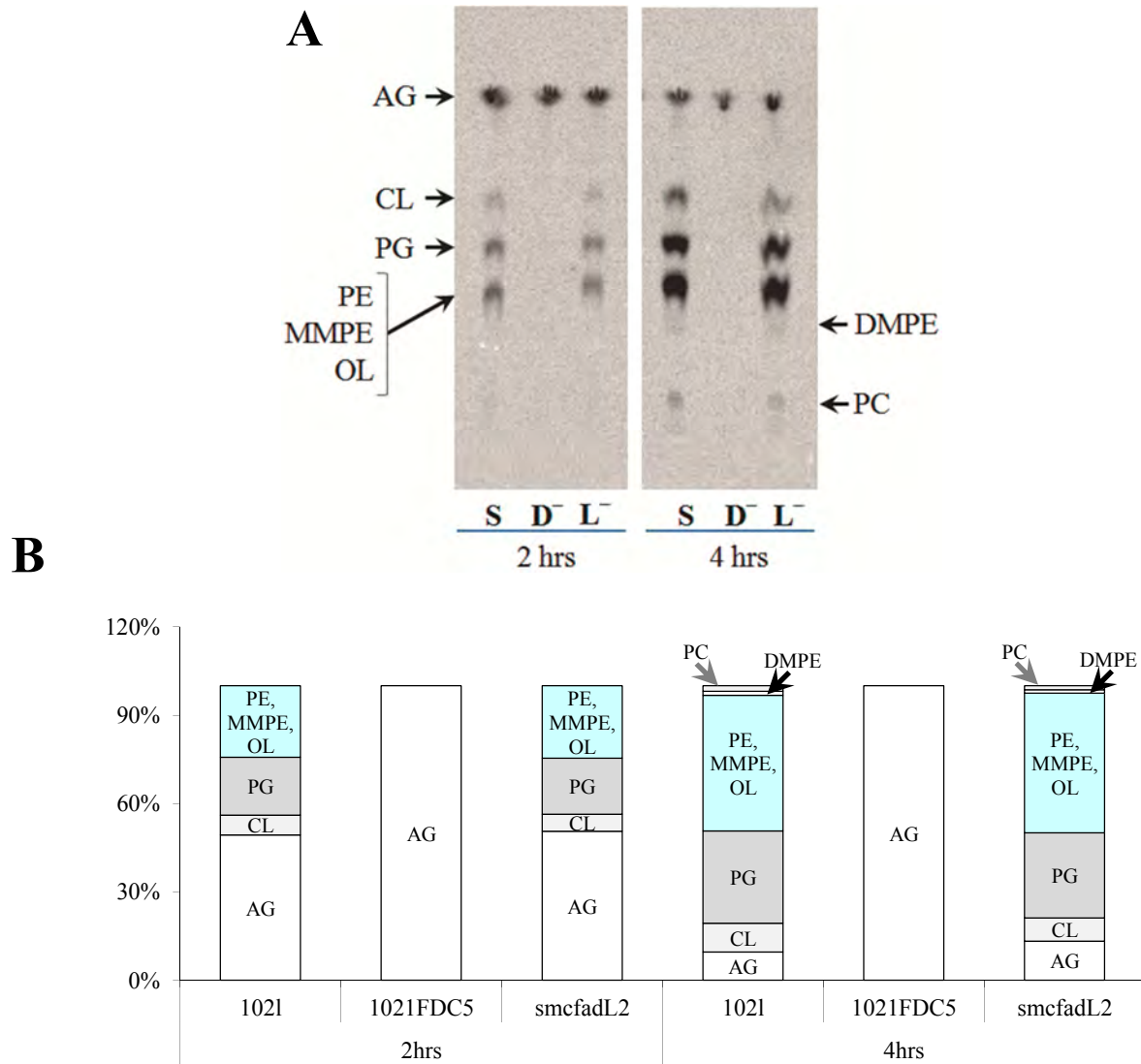


Figura 25. Incorporación de ácido [$1-^{14}\text{C}$] palmítico a los fosfolípidos de *S. meliloti* 1021 (S), *S. meliloti* 1021FDC5 (D^-) y *S. meliloti* smcfadL2 (L^-). Las cepas se crecieron en MM de Robertsen adicionado con Brij 58 (5 mg mL^{-1}) hasta fase estacionaria temprana ($\text{OD}_{620\text{nm}} = 1.2$; 26 h de crecimiento). Las células se lavaron una vez con medio fresco y se marcaron con ácido (^{14}C) palmítico ($1 \mu\text{Ci mL}^{-1}$) durante 2 o 4 hrs. Las células marcadas se lavaron dos veces con medio fresco para remover el ácido (^{14}C) palmítico no incorporado. Los lípidos de la masa celular se extrajeron por el método de Blight & Dyer (1959) y se analizaron por cromatografía en capa fina (A). Fase estacionaria: sílica gel 60 (MERCK), fase móvil: cloroformo:metanol:ácido acético glacial (13:5:2, vol/vol). (B) Gráfica porcentual de barras apiladas correspondiente a la intensidad de la señal de los lípidos marcados en la placa en A. AG: ácidos grasos; CL: cardiolipina; PG: fosfatidilglicerol; PE: fosfatidiletanolamina; MMPE: monometil-PE; OL: lípido de ornitina; DMPE: dimetil-PE; PC: fosfatidilcolina.

Sugestivamente, la aparición de la señal de incorporación del ácido [^{14}C] palmítico se observa inicialmente en PE, MMPE y PG, mientras que en CL la señal se encuentra tenue (2 hrs). Subsiguientemente, la señal se continúa intensificando en los fosfolípidos mencionados anteriormente y una señal tenue aparece en DMPE y PC (4 hrs) (**Figura 25A**). La condensación de dos moléculas de PG produce CL y glicerol libre en una reacción de transesterificación catalizada por la CL sintasa (codificada por *cls*) (Rock, 2008). Por otro lado, una de las rutas de biosíntesis de PC es la trimetilación sucesiva de PE por una fosfolípido metiltransferasa (codificada por *pmtA*) (Sohlenkamp *et al.*, 2003) con lo cual PE es convertido a MMPE, después a DMPE y finalmente a PC.

A pesar de la similitud con FadL de *E. coli*, la mutación de SMc02079 no provoca los fenotipos esperados para una mutante en el transporte de AG.



4.2.7. La mutación de *fadD* en *E. coli* afecta la supervivencia de las células durante la fase estacionaria de crecimiento.

La liberación de ácidos grasos (AG) durante la fase estacionaria de crecimiento concomitante con la expresión de *fadD* en la cepa silvestre de *S. meliloti* sugieren que éstos son empleados como fuente de carbono y energía. Por tanto, la mutación en *fadD* privaría de la ventaja de emplear los AG liberados afectando la supervivencia de las células en la fase estacionaria de crecimiento. Para verificar esta hipótesis se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de cultivos líquidos en MM de Robertsen de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* 1021FDC5 (*fadD*⁻); así como de cultivos líquidos en MM M9 de *E. coli* Y-Mel y su mutante en *fadD* *E. coli* YfadD1.

Durante la fase estacionaria de crecimiento, donde se determinó la concentración de los AG libres y esterificados en Pech-Canul *et al.* (2011), se tomó una alícuota (100 µL) del cultivo y se realizaron diluciones decimales, una porción de las diluciones (50 µL) se usó para inocular placas de medio PY_{Ca} para las cepas de *S. meliloti* y de LB para las de *E. coli*. Se realizaron 3 replicas de cada cepa con las que se determinó las UFC mL⁻¹ de los diferentes cultivos.

No se encontraron diferencias significativas entre las UFC mL⁻¹ de cultivo en la fase estacionaria temprana de crecimiento (D0620nm = 1.2, 26 hrs de cultivo) de *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* 1021FDC5 (1.26×10⁸ UFC mL⁻¹ en ambos cultivos). En las cepas de *E. coli* se obtuvo un resultado similar al analizar las UFC mL⁻¹ de cultivo, en este caso, 15 horas después de haber entrado a la fase estacionaria temprana de crecimiento, con 1.20×10⁹ UFC mL⁻¹ en la cepa silvestre y 1.12×10⁹ UFC mL⁻¹ en la mutante en *fadD*.

No obstante, al determinar las UFC mL⁻¹ de cultivos de *E. coli* a largos periodos de tiempo en la fase estacionaria de crecimiento, se encontró una diferencia substancial en el porcentaje de supervivencia de la cepa silvestre respecto su mutante en *fadD* (**Figura 26**). Al inicio del cultivo, a las 5.5, 12 y 26 horas de crecimiento no se observan diferencias significativas entre las UFC de la cepa silvestre y de la mutante. A las 36 horas de crecimiento (25 horas después de entrar en fase estacionaria) se encontró una disminución del 22 % de las UFC de la cepa mutante respecto a la cepa silvestre. Esta diferencia se ve acentuada (66%) a las 52 horas de crecimiento (41 horas después de entrar en fase estacionaria) (**Figura 26A**).

A

Tiempo (h)	UFC×10 ⁸ mL ⁻¹				
	■ Y-Mel		● YfadD1		Y-Mel - YfadD
	Promedio	DE	Promedio	DE	Y-Mel
0	1.39	0.02	1.31	0.12	5.8%
5.5	7.11	0.15	7.71	0.55	-8.4%
12	10.67	0.95	11.21	0.14	-5.1%
26	12.04	1.02	11.21	0.50	6.9%
36	10.77	0.61	8.41	0.78	21.9%
52	8.12	0.35	2.72	0.27	66.5%

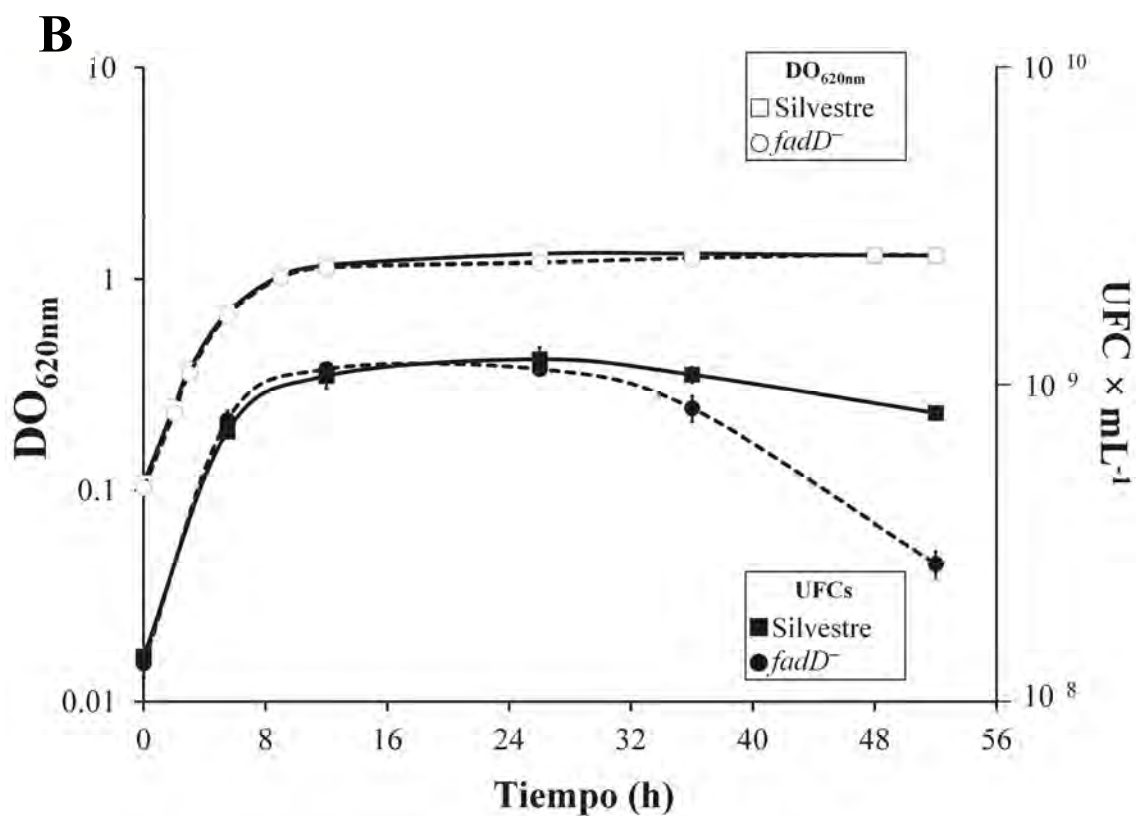


Figura 26. Comparación de las UFC mL⁻¹ de cultivo de la cepas silvestre de *E. coli* Y-Mel con respecto a su mutante en *E. coli* YfadD1 (*fadD*⁻). Las UFC mL⁻¹ se determinaron de cultivos líquidos de MM M9 en los intervalos de tiempo indicados. En (A) se presenta la tabla de valores de UFC mL⁻¹ de cultivo con respecto al tiempo. Los valores promedio se obtuvieron de 3 réplicas biológicas de cada cepa. DE: desviación estándar. (B) Gráfica de los valores en (A) con respecto a la DO_{620nm} de los cultivos líquidos.

Discusión.

La proteína FadD ha sido descrita como la encargada de activar los ácidos grasos (AG) exógenos con CoA para así poder incorporarse al metabolismo de la bacteria. Sin embargo, diversos trabajos han mostrado evidencia de efectos pleiotrópicos por la mutación de *fadD* (Barber *et al.*, 1997; Banchio & Gramajo, 2002; Kang *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2011), por lo que ésta podría estar involucrada en otras funciones además de la conocida. En *S. meliloti* la mutación en *fadD* provoca una regulación de la motilidad distinta a la cepa silvestre así como un defecto en el establecimiento de la simbiosis (Soto *et al.*, 2002).

La ausencia de *fadD* cambia el metabolismo de lípidos interrumpiendo la reutilización de ácidos grasos libres endógenos.

Al analizar y comparar los lípidos de membrana de cepas silvestres de *S. meliloti* y de sus mutantes en *fadD*, se encontró que estas últimas acumulan una gran cantidad de AG libres. Posteriormente se estableció que los AG acumulados son liberados de los lípidos de la membrana. Dado que *E. coli* ha sido uno de los principales modelos para el estudio del metabolismo de lípidos, se evaluó el efecto de la mutación de *fadD* y se encontró que el fenotipo de acumulación de AG es similar al de las mutantes de *S. meliloti*. Adicionalmente, la composición de los AG liberados fue similar a los esterificados a lípidos de membrana. En vista que la mutante en el transportador de AG, FadL, no acumula AG en el interior ni en el exterior de las células, se estableció que los AG acumulados no son productos de la lisis celular y de su incorporación al citosol, sino que ellos tienen un origen intracelular. Los análisis de expresión por microarreglos en *S. meliloti* revelan que se requiere un FadD funcional para la activación de los genes involucrados en la degradación de AG (*fad*). La mayor expresión de los genes *fad* en la cepa silvestre sugiere que en ésta los AG liberados de la membrana son dirigidos a la degradación (**Figura 27**).

La eliminación de la activación de AG libres en *Saccharomyces cerevisiae* (Scharnewski *et al.*, 2008) y en cianobacterias (Kaczmarzyk & Fulda, 2010) también provoca la acumulación de AG endógenos. En sendos trabajos se especula que los AG acumulados provienen del remodelado de los fosfolípidos de la membrana. Aunque en *S. cerevisiae* ya se ha descrito el mecanismo de remodelado de CL (por ejemplo; Rijken, 2009) por el cual se generan AG libres, el mecanismo preciso del remodelado de lípidos de membrana por intercambio del grupo acilo en bacterias aún permanece desconocido.

Para la liberación de AG de los fosfolípidos se requiere de fosfolipasas de tipo A. En *E. coli* se han descrito dos diferentes fosfolipasas A, pero sus funciones biológicas siguen siendo desconocidas (Rock, 2008). Aunque en el genoma de *S. meliloti* no hay ningún ORF asignado para fosfolipasas A,

recientemente se han identificado genes con potencial de fosfolipasas A (SMc00930 y SMc01003) y de lisofosfolipasa (SMc04041) que podrían ser los responsables de la liberación de AG (Sahonero-Canavesi *et al.*, 2011).

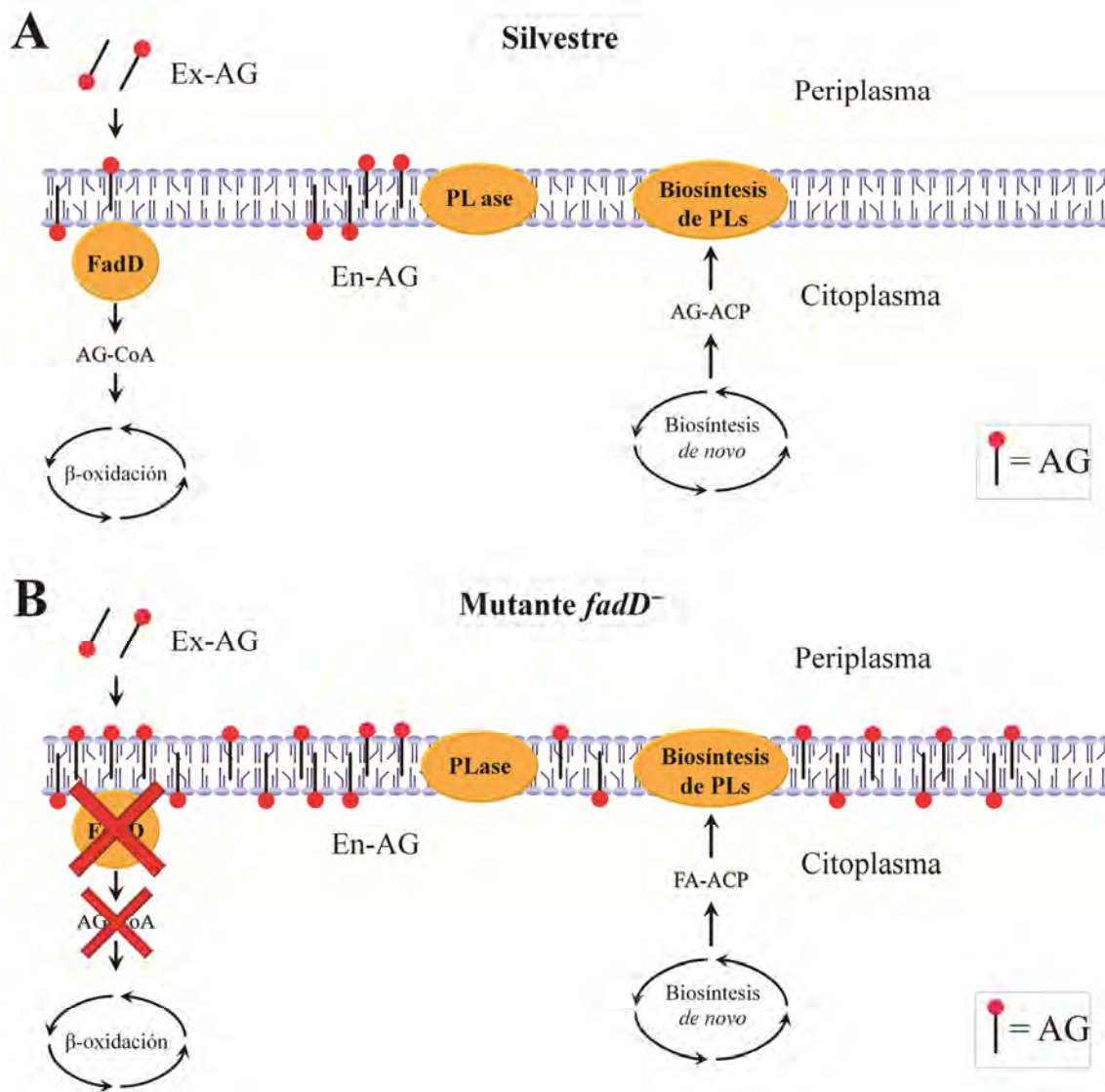


Figura 27. Modelo propuesto para la reutilización de los ácidos grasos en *Sinorhizobium meliloti*. En (A) la cepa silvestre de *S. meliloti* es capaz de incorporar ácidos grasos exógenos (Ex-AG). Durante el remodelado de los lípidos de membrana, las fosfolipasas (PLase) liberan ácidos grasos endógenos (En-AG). Ambos tipos de ácidos grasos libres (AG) son esterificados a coenzima A (AG-CoA) por FadD y así, pueden incorporarse al metabolismo a través de la β-oxidación. Por otra parte, la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos produce ácidos grasos esterificados a la proteína portadora de grupos acilo (AG-ACP). Éstos se utilizan generalmente como sustratos para la biosíntesis de lípidos de membrana (Biosíntesis de PLs). En (B) la cepa mutante en *fadD* de *S. meliloti* es incapaz de incorporar los ácidos grasos tanto exógenos como endógenos; en consecuencia los ácidos grasos libres se acumulan.

Al igual que Kaczmarzyk y Fulda (2010), los resultados obtenidos en *S. meliloti* y en *E. coli* sugieren que la liberación de AG de los lípidos de membrana (**Figura 27**) se trata de un fenómeno extendido y conservado en organismos filogenéticamente distantes. El remodelado de los lípidos de membrana bajo condiciones controladas de laboratorio, en principio, parece ser un proceso sin sentido por el cual se fuga energía de las células. Sin embargo, cuando la célula se encuentra en un entorno natural en el que las condiciones son variables y poco favorables, este fenómeno posiblemente tiene alguna relevancia (Kaczmarzyk & Fulda, 2010).

Para identificar la actividad responsable del transporte de AG en *S. meliloti*, se comparó la proteína FadL de *E. coli* con el proteoma de *S. meliloti* y se identificó a SMc02079. Esta última actualmente está anotada como una proteína putativa de la membrana exterior y su predicción de modelo tridimensional se asemeja a la de FadL. A pesar de las similitudes, la mutación de SMc02079 no produce los fenotipos esperados para una mutante en el transporte de AG ya que la mutante aún retiene la capacidad de incorporar AG a su metabolismo de lípidos de manera similar a la cepa silvestre. Dadas las similitudes de SMc02079 con FadL, si bien la primera no es responsable del transporte de AG, ésta podría tratarse de un transportador de otro tipo de moléculas hidrofóbicas.

El mecanismo de transporte de AG se ha elucidado en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Hearn *et al.*, 2009). La familia de transportadores FadL no está distribuida en todas las bacterias y parece ser que ésta se encuentra restringida a bacterias Gram negativas. No obstante, es probable que en *S. meliloti* el transporte de AG lo realice una proteína no relacionada a FadL. Por otra parte, el mecanismo de transporte de AG en bacterias Gram positivas aún permanece desconocido; puesto que en éstas no se han encontrado homólogos a FadL (Rock, 2008).

El experimento de incorporación del ácido (^{14}C) palmítico en *S. meliloti* (**Figura 25**) demuestra que el ácido graso no se incorpora por la cepa deficiente de FadD; por tanto es necesaria la formación del derivado de CoA para la incorporación del ácido graso al metabolismo. En *E. coli* la incorporación de los AG exógenos al metabolismo se lleva a cabo mayormente por la esterificación a CoA y en una pequeña proporción (2%) por la acción de la Aas (**Figura A7**). Esta última esterifica AG libres a ACP para posteriormente transferirlos al liso-PE y formar nuevamente PE (Jackowski *et al.*, 1994). El resultado obtenido en *S. meliloti* indica que éste no posee el mecanismo que incorpora directamente los AG exógenos a sus lípidos. Tampoco existen homólogos a Aas en el genoma de *S. meliloti*.

La especificidad para incorporar AG exógenos en *E. coli* solo se ha evaluado en PE, sin embargo en resultados previos (Rock & Jackowski, 1985) y en el presente (**Figura A7**) la incorporación del ácido graso exógeno sin la formación de acil-CoA (cepa *fadD*⁻), además de ocurrir mayoritariamente en PE, también se observa en los otros fosfolípidos. Sin embargo, tanto en *E. coli* como en *S. meliloti* no se

han descrito aciltransferasas que restituyan a los AG de los lisofosfolípidos formados tras la liberación del ácido graso.

Estas observaciones fortalecen la propuesta plasmada en Pech-Canul *et al.* (2011) que en *S. meliloti* los AG liberados de la membrana son dirigidos a la degradación y no pueden ser incorporados a los lisofosfolípidos como en *E. coli*. Es factible que en *S. meliloti* el ácido (¹⁴C) palmítico incorporado en la cepa silvestre es esterificado a CoA y degradado por medio de la β-oxidación (**Figura 3**). Los bloques de acetil-CoA producidos son sustrato para la biosíntesis de AG *de novo*, llevando así la señal radioactiva a la biosíntesis de los fosfolípidos de membrana (**Figura 2**). Son necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo por el cual los lípidos de membrana liberan los AG y más aún, el mecanismo por el cual los liso-lípidos formados son restablecidos nuevamente.

Efectos de la acumulación de ácidos grasos en la membrana.

Las cepas mutantes en *fadD* acumulan una cantidad significativa de AG libres en el interior de las células, lo que podría causar la inestabilidad de sus membranas. En trabajos reportados previamente en *Saccharomyces cerevisiae* (Scharnewski *et al.*, 2008) y en cianobacterias (Kaczmarzyk & Fulda, 2010), donde la eliminación de la activación de AG libres provoca la acumulación de AG endógenos, no se reportaron efectos negativos en la viabilidad de las células.

En el presente trabajo, la mutante en *fadD* de *S. meliloti*, en comparación con la cepa silvestre, no presenta efectos adversos ante agentes desestabilizantes de la membrana. No obstante, al crecer a la cepa mutante en *fadD* en alta osmolaridad se observó una afectación en su crecimiento. Si la presión osmótica de la célula es menor que la presión osmótica externa, el agua sale de la célula y el volumen del citoplasma decrece lo que provoca daño a la membrana. En las bacterias Gram negativas, la pared se retrae con la membrana lo que también daña la membrana citoplasmática. Es probable que los AG libres acumulados en el interior de las células de la mutante en *fadD* contribuyan a la fragilidad de su membrana debido a las propiedades de detergente de los AG. Lo cual se ve reflejado en el descenso de la DO de los cultivos al aumentar la osmolaridad (**Figura 15**). Al abatir los AG libres de la mutante mediante la expresión en *trans* del gen *fadD*, se observa una recuperación del crecimiento (**Figura A3**) lo que implica que la ausencia de *fadD* es la causante de la diferencia en el crecimiento.

Al comparar la viabilidad de cultivos líquidos de *S. meliloti* y su mutante en *fadD* al inicio de la fase estacionaria temprana, no se encontraron diferencias significativas en las UFCs. Un resultado similar se obtuvo con *E. coli* después de 15 hrs de entrar en fase estacionaria. A pesar de ésto, al determinar la viabilidad en fases más tardías, la supervivencia de la cepa mutante en *fadD* de *E. coli* se encuentra afectada (**Figura 26**). Esta afectación podría atribuirse a (1) que la mutación en *fadD* priva de la ventaja

de emplear los AG liberados o (2) que la acumulación de los últimos resulta tóxica para la célula entorpeciendo su fisiología, o una combinación de ambas.

Recientemente se reportó que las cepas modificadas de *E. coli* sobreproductoras de AG presentan una afectación de la funcionalidad de las células, lo que incluye una morfología celular alterada, reducción de la viabilidad y un gran aumento de la composición de AG insaturados (Lennen *et al.*, 2011). La supervivencia de las cepas productoras de AG desciende rápidamente durante la fase logarítmica (41 %) y se acentúa en la fase estacionaria temprana (alrededor del 15%) en comparación de las cepas no sobreproductoras (Lennen *et al.*, 2011). A diferencia de este resultado, en el presente trabajo se encontró un descenso menos pronunciado de la supervivencia de la cepa mutante que acumula AG con respecto al tiempo. Este hecho podría atribuirse a que la expresión de la tioesterasa en las cepas sobreproductoras compite con la biosíntesis de los lípidos de membrana por las acil-ACP y/o que la acumulación de los AG en las cepas sobreproductoras es más abrupta que la acumulación gradual producida por la mutación en *fadD* (Figura 5A de Pech-Canul *et al.*, 2011).

Los resultados anteriores sugieren que la disminución de la supervivencia de las células por la acumulación de los AG libres es consecuencia del daño fisiológico producido por ellos y no por la incapacidad de aprovecharlos como fuente de carbono y energía. Lo cual parece ser similar a la lisis de protoplastos de *Bacillus megaterium* inducida por la adición de AG de cadena larga (Galbraith & Miller, 1973).

***fadD* y la motilidad de *S. meliloti*.**

Entre los objetivos planteados en el presente trabajo está el de identificar el metabolito (o metabolitos) responsable del fenotipo del swarming de *S. meliloti* deficiente en *fadD*. Al analizar los compuestos hidrofóbicos acumulados por *S. meliloti* QS77 (*fadD*⁻) se encontró que, además de los AG acumulados, esta cepa produce dodecanal y 2-tridecanona. Este par de moléculas no se detectaron en la cepa silvestre y su presencia se vinculó a la ausencia de FadD.

Posteriormente se analizó si alguna de las moléculas identificadas es capaz de provocar el fenotipo de “swarming” en la cepa silvestre bajo condiciones en que *S. meliloti* QS77 presenta motilidad. Los AG ensayados (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1^{Δ9}) y el dodecanal no mostraron efecto alguno en la motilidad de la cepa silvestre. No obstante, el C14:0 y el dodecanal son capaces de reducir el fenotipo de “swarming” de la cepa mutante en *fadD*, mientras que el C18:1^{Δ9} causa su inhibición. Los efectos observados en el fenotipo de “swarming” de *S. meliloti* QS77 con el C14:0, C16:0, C18:0 y el C18:1^{Δ9} (**Figura 12**) son similares a los descritos en *Pseudomonas aeruginosa* (Inoue *et al.*, 2008). Sin embargo en *Serratia marcescens* y en *Proteus mirabilis* el fenotipo de “swarming” es afectado por los AG

saturados, mientras que el C18:1^{Δ9} reduce ligeramente el fenotipo de “swarming” de *S. marcescens* e incrementa el de *P. mirabilis* (Lai *et al.*, 2005; Liaw *et al.*, 2004).

Estos datos dejan notar que debe existir un vínculo entre la composición de AG intracelulares y la motilidad de esas cepas, lo cual lleva a conjeturar que la composición de AG y por lo tanto la homeostasis de la fluidez de la membrana desempeñan un papel importante en el control de la motilidad, ya que es bien sabido que las membranas son muy sensibles a estímulos ambientales (sección 1.7). Pese a esto, cabe señalar que, a diferencia de *S. meliloti*, estas cepas son silvestres y presentan el fenotipo de “swarming” en condiciones distintas a las de *S. meliloti* (Kearns, 2010). Por lo tanto, para el caso de *S. meliloti* es probable que no se pueda establecer una conexión directa entre los AG agregados a la cepa silvestre de *S. meliloti* y su motilidad porque ésta es capaz de degradarlos y no la cepa mutante en *fadD*.

En contraste con lo anterior, la 2-tridecanona mostró una influencia en la motilidad de la cepa silvestre y un incremento en la motilidad de la cepa deficiente en FadD. Sin embargo, la motilidad que exhibe la cepa silvestre con la 2-tridecanona difiere del fenotipo de “swarming” por la ausencia de flagelos. Esta motilidad independiente de flagelos se asemeja a la descrita por Huang & Wong (2007) en una cepa mutante de *Stenotrophomonas maltophilia*. En este microorganismo, a diferencia de *S. meliloti*, el fenotipo de “swarming” no se presenta en la mutante en *rpfB* (un ortólogo a *fadD*) o en la cepa silvestre. No obstante, la mutación de *rpfB* o la sobreexpresión de *rpfF* (una enoil-CoA hidrogenasa) provocan la motilidad independiente de flagelos y la producción de varios compuestos hidrofóbicos. De ellos, el ácido 11-metil-2-dodecenoico (11-metil-C12:1^{Δ2}) o el ácido 11-metildodecanoico (11-metil-C12:0) son capaces de provocar la motilidad de la cepa silvestre. Al igual que la 2-tridecanona en *S. meliloti*, este par de AG también mostró un efecto dependiente de la dosis en *S. maltophilia*. El 11-metil-C12:1^{Δ2} también causa la motilidad de *Xhantomonas campestris*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y de *Listeria monocytogenes*. En este trabajo se propuso que las propiedades biosurfactantes del 11-metil-C12:1^{Δ2} y del 11-metil-C12:0 son los responsables de la motilidad, ya que restan más estudios para establecer si estos AG insaturados funcionan como señal para la motilidad (Huang & Wong, 2007).

Es probable que la 2-tridecanona sea el biosurfactante que produce la cepa mutante durante el desarrollo del fenotipo de “swarming”. Sin embargo, todavía es intrigante el por qué la biosíntesis del flagelo se ve afectada en la cepa silvestre en presencia de la 2-tridecanona, por lo que no se descarta que la producción de esta molécula esté involucrado en un sistema de motilidad distinta al “swarming”. Por lo tanto, restan más estudios para poder establecer el papel fisiológico que desempeña la 2-tridecanona en *S. meliloti*.

Sería interesante determinar cuál es la vía de síntesis de la 2-tridecanona y en qué estadios del crecimiento se produce, además de sus propiedades biosurfactantes. Respecto a la ruta de biosíntesis; la 2-tridecanona posee una estructura similar a las α -hidroxi cetonas (AHK) (Sección 1.6). Los grupos de genes *lqs* de *L. pneumophila* y *cqs* de *V. cholerae* sintetizan y detectan las AHK 3-hidroxi pentadecan-4-ona (LAI-1) o 3-hidroxitridecan-4-ona (CAI-1), respectivamente (Tiaden *et al.*, 2010). En *S. meliloti*, no se identificó algún grupo de genes similares a éstos. Pero sí se comparan las sintasas LqsA o CqsA con el proteoma de *S. meliloti* se obtienen las SMc03104 y SMc01565. Estas proteínas no han sido caracterizadas previamente y ambas presentan una identidad del 30% con respecto a LqsA y del 25% con respecto a CqsA.

Por otra parte, en las hojas de varias especies de tomate se ha identificado la presencia de 2-tridecanona. Las metil cetonas (MK) de longitud media (C7-C15) son muy eficaces en la protección de las plantas a numerosas plagas. En *Lycopersicon hirsutum f glabratum* se identificó una enzima responsable de la síntesis de MK de longitudes de cadena impar (C11-C15) entre ellas la 2-tridecanona, siendo esta última la MK mayoritaria presente en tricomas de hojas jóvenes y maduras (Fridman *et al.*, 2005). Es interesante que esta MK sintasa es dirigida a los cloroplastos en donde puede usar como sustratos los intermediarios de la FAS II. En *S. meliloti* SMc03960 tiene un 25% de identidad y 40% de similitud respecto a la MK sintasa descrita en tomate. Con esta información, podrían vislumbrarse los experimentos pertinentes para establecer la ruta biosintética para la formación de la 2-tridecanona.

SMa0150 o SMb20650 no pueden suplir *in vivo* la función de SMc02162 (FadD).

La presencia de varios FadDs funcionales con una amplia capacidad de conversión de sustrato y la superposición de las preferencias de longitud de la cadena, brindan a los microorganismos la capacidad de metabolizar de manera óptima AG de diferentes longitudes de cadena, lo cual es probable que le ayude a competir en diferentes nichos biológicos.

En *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito la presencia de varios homólogos a FadD, y se ha demostrado la funcionalidad de 2 de ellos (Kang *et al.*, 2010). El análisis del crecimiento, los estudios de inducción y la determinación de parámetros cinéticos sugieren que FadD1 tiene una preferencia por AG de cadena larga, mientras que FadD2 prefiere AG de cadena más corta. Notablemente, la mutante *fadD2* mostró una disminución de la producción de lipasa, proteasa, ramnolípido y fosfolipasa, y el retraso de los fenotipos de “swimming” y de “swarming”. Curiosamente la mutante FadD1 mostró un aumento en el fenotipo de “swarming” (Kang *et al.*, 2010). En este mismo trabajo también se menciona la presencia de varios FadDs putativos en diversos organismos. En *Pseudomonas putida* se ha encontrado la expresión de dos FadDs, de ellos la FadD1 presenta un papel dominante en el

metabolismo de AG. Curiosamente, la actividad de FadD2 se expresa cuando FadD1 es mutado (Kang *et al.*, 2010).

S. meliloti también posee varias ORFs homólogos a FadD. Sin embargo, únicamente ha sido demostrada la función de SMc02162 (Soto *et al.*, 2002). En el trabajo citado se mencionó la similitud de los ORFs SMA0150 y SMB20650 con SMc02162, y se planteó su posible papel como FadDs. Tanto SMA0150 como SMB20650 contienen una secuencia similar al motivo consenso de unión a ATP-AMP, así como una secuencia semejante al motivo consenso de acil-CoA sintetasa (FACS) importante para el reconocimiento del AG.

Pese a estas similitudes, en el presente trabajo se encontró que la mutación individual en estos genes no promueve el fenotipo de “swarming” ni la acumulación de AG libres (**Figuras 18 y 19**). Así mismo, tanto SMA0150 como SMB20650 no son capaces de suplir la función *in vivo* de SMc02162, ya que su expresión no restaura el perfil de lípidos de la cepa silvestre ni el de la motilidad (**Figuras 20 y 21**). Por lo tanto, estas proteínas deben tener una función diferente a la de SMc02162 (FadD).

SMA0150 se reanotó como malonil-CoA sintetasa, por su similitud con otras malonil-CoA sintetasas identificadas y los trabajos previos (Mauchline *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010) parecen apoyar esta denominación. Pese a esto, aún no se ha demostrado mediante reacciones *in vitro* que SMA0150 esterifica el ácido malónico a CoA, por lo que sería interesante llevar a cabo estos experimentos para confirmar la función de SMA0150.

El gen que codifica para SMB20650 forma parte de un operón, justo al lado de *smb20650* se encuentra un gen que codifica para una proteína portadora de grupos acilo (ACP_{SMB20651}) (Ramos-Vega *et al.*, 2009). Según nuestros resultados, SMB20650 no sería capaz de esterificar AG de cadena larga a CoA, ya que su expresión en la cepa mutante en *fadD* no abate la acumulación de AG (**Figura 18**). En vista de que SMB20650 y la ACP_{SMB20651} se expresan en un operón, es probable que funcionen conjuntamente (Ramos-Vega *et al.*, 2009). El ensayo *in vitro* propuesto para saber si SMB20650 es capaz de acilar directamente a ACP_{SMB20651} dejaría establecida su función como una acil-ACP_{SMB20650} sintetasa (Ramos-Vega, 2009), pero su función fisiológica aún permanecería desconocida.



Referencias bibliográficas.

- Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr., and D. de Mendoza.** 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* **180**:2194-200.
- Altabe, S. G., P. Aguilar, G. M. Caballero, and D. de Mendoza.** 2003. The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a $\Delta 5$ desaturase. *J. Bacteriol.* **185**:3228-31.
- An, J. H., and Y. S. Kim.** 1998. A gene cluster encoding malonyl-CoA decarboxylase (MatA), malonyl-CoA synthetase (MatB) and a putative dicarboxylate carrier protein (MatC) in *Rhizobium trifolii*--cloning, sequencing, and expression of the enzymes in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **257**:395-402.
- Banchio, C., and H. Gramajo.** 2002. A stationary-phase acyl-coenzyme A synthetase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is necessary for the normal onset of antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4240-6.
- Barber, C. E., J. L. Tang, J. X. Feng, M. Q. Pan, T. J. Wilson, H. Slater, J. M. Dow, P. Williams, and M. J. Daniels.** 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* **24**:555-66.
- Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188-98.
- Bishop, R. E., H. S. Gibbons, T. Guina, M. S. Trent, S. I. Miller, and C. R. Raetz.** 2000. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *EMBO J.* **19**:5071-80.
- Black, P. N., and C. C. DiRusso.** 2003. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:454-72.
- Black, P. N., and Q. Zhang.** 1995. Evidence that His110 of the protein FadL in the outer membrane of *Escherichia coli* is involved in the binding and uptake of long-chain fatty acids: possible role of this residue in carboxylate binding. *Biochem. J.* **310 (Pt 2)**:389-94.
- Black, P. N., Q. Zhang, J. D. Weimar, and C. C. DiRusso.** 1997. Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **272**:4896-903.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-7.
- Buck, G. E., and M. T. Kelly.** 1981. Effect of moisture content of the medium on colony morphology of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **14**:585-6.
- Byers, D. M., and H. Gong.** 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem. Cell. Biol.* **85**:649-62.
- Casadesús, J., and J. Olivares.** 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **174**:203-9.
- Chen, A. M., Y. B. Wang, S. Jie, A. Y. Yu, L. Luo, G. Q. Yu, J. B. Zhu, and Y. Z. Wang.** 2010. Identification of a TRAP transporter for malonate transport and its expression regulated by GtrA from *Sinorhizobium meliloti*. *Res. Microbiol.* **161**:556-64.
- Cronan, J. E., Jr, and Rock, C.O.** 1996. Biosynthesis of membrane lipids, pp. 612-636. *En F. C. Neidhardt and R. Curtiss (ed.), Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Cronan, J. E., Jr.** 1997. In vivo evidence that acyl coenzyme A regulates DNA binding by the *Escherichia coli* FadR global transcription factor. *J. Bacteriol.* **179**:1819-23.
- Daniels, R., J. Vanderleyden, and J. Michiels.** 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **28**:261-89.
- DiRusso, C. C., P. N. Black, and J. D. Weimar.** 1999. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog. Lipid. Res.* **38**:129-97.

- Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, and D. R. Helinski.** 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**:149-53.
- Ferguson, G. P., R. M. Roop, 2nd, and G. C. Walker.** 2002. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* BacA mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *J Bacteriol* **184**:5625-32.
- Fraser, G. M., and C. Hughes.** 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:630-5.
- Fridman, E., J. Wang, Y. Iijima, J. E. Froehlich, D. R. Gang, J. Ohlrogge, and E. Pichersky.** 2005. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* **17**:1252-67.
- Fuqua, C., and E. P. Greenberg.** 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:685-95.
- Galbraith, H., and T. B. Miller.** 1973. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *J Appl Bacteriol* **36**:659-75.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, P. Abola, F. Ampé, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernández-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, and J. Batut.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668-72.
- Geiger, O., N. González-Silva, I. M. López-Lara, and C. Sohlenkamp.** 2010. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res* **49**:46-60.
- Gerson, T., and J. J. Patel.** 1975. Neutral Lipids and Phospholipids of Free-Living and Bacteroid Forms of Two Strains of *Rhizobium* Infective on *Lotus pedunculatus*. *Appl Microbiol* **30**:193-8.
- González-Silva, N., I. M. López-Lara, R. Reyes-Lamothe, A. M. Taylor, D. Sumpton, J. Thomas-Oates, and O. Geiger.** 2011. The dioxygenase-encoding *olsD* gene from *Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry* **50**:6396-408.
- Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr.** 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:429-41.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
- Hearn, E. M., D. R. Patel, B. W. Lepore, M. Indic, and B. van den Berg.** 2009. Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall. *Nature* **458**:367-70.
- Henrichsen, J.** 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**:478-503.
- Henrichsen, J.** 1983. Twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **37**:81-93.
- Huang, T. P., and A. C. Lee Wong.** 2007. Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Res Microbiol* **158**:702-11.
- Inoue, T., R. Shingaki, and K. Fukui.** 2008. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* **281**:81-6.
- Jackowski, S., P. D. Jackson, and C. O. Rock.** 1994. Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:2921-8.
- Kaczmarzyk, D., and M. Fulda.** 2010. Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. *Plant. Physiol.* **152**:1598-610.
- Kang, Y., J. Zarzycki-Siek, C. B. Walton, M. H. Norris, and T. T. Hoang.** 2010. Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **5**:e13557.

- Kearns, D. B.** 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:634-44.
- Kelly, D. J., and G. H. Thomas.** 2001. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **25**:405-24.
- Kol, M. A., D. W. Kuster, H. A. Boumann, H. de Cock, A. J. Heck, B. de Kruijff, and A. I. de Kroon.** 2004. Uptake and remodeling of exogenous phosphatidylethanolamine in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1636**:205-12.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-6.
- Laczko-Dobos, H., P. Fryčák, B. Ughy, I. Domonkos, H. Wada, L. Prokai, and Z. Gombos.** 2010. Remodeling of phosphatidylglycerol in *Synechocystis* PCC6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**:163-70.
- Lai, H. C., P. C. Soo, J. R. Wei, W. C. Yi, S. J. Liaw, Y. T. Horng, S. M. Lin, S. W. Ho, S. Swift, and P. Williams.** 2005. The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J Bacteriol* **187**:3407-14.
- Landeta, C., A. Dávalos, M. A. Cevallos, O. Geiger, S. Brom, and D. Romero.** 2011. Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J Bacteriol* **193**:1317-26.
- Lennen, R. M., M. A. Kruziki, K. Kumar, R. A. Zinkel, K. E. Burnum, M. S. Lipton, S. W. Hoover, D. R. Ranatunga, T. M. Wittkopp, W. D. Marner, 2nd, and B. F. Pflieger.** 2011. Membrane stresses induced by overproduction of free fatty acids in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **77**:8114-28.
- Liaw, S. J., H. C. Lai, and W. B. Wang.** 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* **72**:6836-45.
- Lin, L. Y.-C., and Meighen, E.A.** 2009. Bacterial Bioluminescence, p. <http://www.photobiology.info/Lin.html>. In K. C. Smith (ed.), *Biochemistry and Molecular Biology. Photobiological Sciences Online* American Society for Photobiology.
- López-Lara, I. M., and Geiger, O.** 2010. Formation of fatty acids, pp. 385–393. In K. N. Timmis (ed.), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin London.
- Lucas, R. L., C. P. Lostroh, C. C. DiRusso, M. P. Spector, B. L. Wanner, and C. A. Lee.** 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **182**:1872-82.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and T. D. Brock.** 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Mauchline, T. H., J. E. Fowler, A. K. East, A. L. Sartor, R. Zaheer, A. H. Hosie, P. S. Poole, and T. M. Finan.** 2006. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17933-8.
- Meighen, E. A.** 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* **55**:123-42.
- Mrozik, A., Z. Piotrowska-Seget, and S. Labuzek.** 2004. Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Pol J Environ Stud* **13**:487-494.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox.** 2008. *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman, New York.
- Nogales, J., A. Domínguez-Ferreras, C. V. Amaya-Gómez, P. van Dillewijn, V. Cuellar, J. Sanjuán, J. Olivares, and M. J. Soto.** 2010. Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* **11**:157.
- Ormeno-Orrillo, E.** 2005. Lipopolysaccharides of rhizobiaceae: structure and biosynthesis. *Rev Latinoam Microbiol* **47**:165-75.
- Pappas, K. M.** 2008. Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid* **60**:89-107.

- Pech-Canul, A., J. Nogales, A. Miranda-Molina, L. Álvarez, O. Geiger, M. J. Soto, and I. M. López-Lara.** 2011. FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J Bacteriol* **193**:6295-304.
- Pohl, N. L., M. Hans, H. Y. Lee, Y. S. Kim, D. E. Cane, and C. Khosla.** 2001. Remarkably broad substrate tolerance of malonyl-CoA synthetase, an enzyme capable of intracellular synthesis of polyketide precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **123**:5822-3.
- Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent, and R. E. Bishop.** 2007. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:295-329.
- Ramos-Vega, A. L.** 2009. Tesis Doctoral: SMb20651 es una proteína acarreadora de acilos de *Sinorhizobium meliloti*. Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.
- Ramos-Vega, A. L., Y. Dávila-Martínez, C. Sohlenkamp, S. Contreras-Martínez, S. Encarnación, O. Geiger, and I. M. López-Lara.** 2009. SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **155**:257-67.
- Rattray, J. E., M. Strous, H. J. Op den Camp, S. Schouten, M. S. Jetten, and J. S. Damste.** 2009. A comparative genomics study of genetic products potentially encoding ladderane lipid biosynthesis. *Biol Direct* **4**:8.
- Ray, S., E. Chatterjee, A. Chatterjee, K. Paul, and R. Chowdhury.** 2011. A *fadD* mutant of *Vibrio cholerae* is impaired in the production of virulence factors and membrane localization of the virulence regulatory protein TcpP. *Infect. Immun.* **79**:258-66.
- Rickenberg, H. V., and G. Lester.** 1955. The preferential synthesis of beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **13**:279-84.
- Rijken, P. J., R. H. Houtkooper, H. Akbari, J. F. Brouwers, M. C. Koorengevel, B. de Kruijff, M. Frentzen, F. M. Vaz, and A. I. de Kroon.** 2009. Cardiolipin molecular species with shorter acyl chains accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking the acyl coenzyme A-binding protein Acb1p: new insights into acyl chain remodeling of cardiolipin. *J Biol Chem* **284**:27609-19.
- Robertsen, B. K., P. Aman, A. G. Darvill, M. McNeil, and P. Albersheim.** 1981. Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifoli*. *Plant Physiol.* **67**:389-400.
- Rock, C. O.** 2008. Fatty acids and phospholipids metabolism in prokaryotes, p. 59-96. *In* D. E. Vance, and Vance, J.E (ed.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 5th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Rock, C. O., and S. Jackowski.** 1985. Pathways for the incorporation of exogenous fatty acids into phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**:12720-4.
- Roy, H., and M. Ibba.** 2009. Broad range amino acid specificity of RNA-dependent lipid remodeling by multiple peptide resistance factors. *J Biol Chem* **284**:29677-83.
- Saborido Basconillo, L., and McCarry, B. E.** 2008. Comparison of three GC/MS methodologies for the analysis of fatty acids in *Sinorhizobium meliloti*: development of a micro-scale, one-vial method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **871**:22-31.
- Sahonero-Canavesi, D. X., Sohlenkamp, C., López-Lara, I.M., and Geiger, O.** 2011. Membrane lipid turnover in *Sinorhizobium meliloti* by intrinsic phospholipase A and a lysophospholipase. Póster presentado en el II Congreso de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias de la Sociedad Mexicana de Bioquímica Del 7 al 11 de Noviembre del 2011. Huatusco, Veracruz México.
- Sandoval-Calderon, M., O. Geiger, Z. Guan, F. Barona-Gomez, and C. Sohlenkamp.** 2009. A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria. *J Biol Chem* **284**:17383-90.
- Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler.** 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.

- Scharnewski, M., P. Pongdontri, G. Mora, M. Hoppert, and M. Fulda.** 2008. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA synthetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling. *FEBS J.* **275**:2765-78.
- Scheidle, H., A. Gross, and K. Niehaus.** 2005. The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.* **165**:559-65.
- Shapiro, J. A.** 1991. Multicellular behavior of bacteria. *AMS news* **57**:247-253.
- Sharypova, L. A., K. Niehaus, H. Scheidle, O. Holst, and A. Becker.** 2003. *Sinorhizobium meliloti acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **278**:12946-54.
- Sherwood, M. T.** 1970. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**:708-13.
- Simon, R., U. Prierer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technology* **1**:784-791.
- Sinninghe Damsté, J. S., M. Strous, W. I. Rijpstra, E. C. Hopmans, J. A. Genevasen, A. C. van Duin, L. A. van Niftrik, and M. S. Jetten.** 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**:708-12.
- Smith, S., A. Witkowski, and A. K. Joshi.** 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* **42**:289-317.
- Sohlenkamp, C., I. M. López-Lara, and O. Geiger.** 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* **42**:115-62.
- Soto, M. J., M. Fernández-Pascual, J. Sanjuán, and J. Olivares.** 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.
- Staubitz, P., H. Neumann, T. Schneider, I. Wiedemann, and A. Peschel.** 2004. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol Lett* **231**:67-71.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**:60-89.
- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin, and D. A. Natale.** 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**:41.
- Tiaden, A., T. Spirig, and H. Hilbi.** 2010. Bacterial gene regulation by alpha-hydroxyketone signaling. *Trends Microbiol* **18**:288-97.
- van den Berg, B.** 2005. The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr Opin Struct Biol* **15**:401-7.
- Zavaleta-Pastor, M., C. Sohlenkamp, J. L. Gao, Z. Guan, R. Zaheer, T. M. Finan, C. R. Raetz, I. M. López-Lara, and O. Geiger.** 2010. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:302-7.
- Zhang, Y. M., and C. O. Rock.** 2008a. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**:222-33.
- Zhang, Y. M., and C. O. Rock.** 2008b. Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res* **49**:1867-74.

Apéndice


```

FadD      1  -----MKKVVILNRYPADVPTTEINPDRYQSLVDMFEQSVARYADQPAFVNMGEV
SMc02162  1  MAEASTQQAGSSTAKIWLGSYPPGVPAEIGPLTYRSIGEFFDHAVAQYSWRPAFTCMGKA
Sma0150   1  -----MSNHLFDAIRRAARPDSAFIIITADGRV
Smb20650  1  -----MRFEQFLIRNAANGAKTALVITDRRR
consenso  *                               *                               ::

FadD      49  MTFERKLEERSRAFAAYLQOGLGLKKGDRVALMMPNLLQYPVALFGILRAGMIVVNVNPLY
SMc02162  61  LTFSDLNTHSAKIGAWL-OSLGLAKGDRVAVMMPNLLQNPVIVYVILRAGFTVVNVNPLY
Sma0150   28  WTYGDMLEHSGRIASVL-DALGVRPGDRVAVQVEKSPEALMLYLACLRTGAVYLPINTAY
Smb20650  27  LGYAEIDDLSTRLAFAF-AENGVRKNDRVLVFMDNCWEAAAAIFAILKAGATFSPINAST
consenso  *           *           ***           *           *           *

FadD      109  TPRELEHQLNDSGASAVIVSNAFHTLEKVVDKTAVQHVILTRMGDQLSTAKGTVVNVFVV
SMc02162  120  TPRELEHQLVDAGAKAIFVLENFAHTVEQVLARTEVVKHVVASMGDMIG-AKGAIVNLVV
Sma0150   87  TLAELDYFFGDAEPRLLIVCAPGAKEGIAKHAADCGAEVETLDERG-----
Smb20650  86  KADKLAYIVADCEAAAILTQAKLMPVVAEALALAPGHAPFVASTA-----
consenso  *           *           *

MCU-AMP1
FadD      169  KYIKRLVPKYHLPD-AISFRSALHNGYRMQYVKPELVPEDLAFLOYTGGTTGVAKGAMLT
SMc02162  179  RRVKRLVPAWSIPG-HLSFKTVLAKGATLGFKRPNVAPGDVAFLOYTGGTTGVSKGATLT
Sma0150   132  -----GGSLID-----LARGKAPDFPDADRGPDLLAAILLYTSGTTGRSKGAMLT
Smb20650  131  -----APGGRIIPDGAASFEECT--AAPAPVRHGGIDVDLGMILTYTSGSTGRPKGVMMT
consenso  *                               *                               * * * * *

FadD      228  HRNMLANLEQV----NATYGPLLEPGKELVVTALPLYHIFALTINCLLFIELGONLLIT
SMc02162  238  HANLLSNMAQOMELWNTAFLRKRPEESLTFMCALPLYHIFALTVNSIMGLATGGNNILIP
Sma0150   176  HDNLLSNATTREYWRFT-----ADDRLIHALPIETHHGLFVASNVILLAGASMFFIIP
Smb20650  183  HRNDAASESITTYLRNT-----PDDIILNVLPLAFDYGLY-QLLMAIRLGATLVLEK
consenso  * *                               *           *           *

FadD      284  NPRDIPGLVKELAKYVPTAITGVNTLFNALLNKEFQQLDFSSLHLSAGGGMPVQVVAE
SMc02162  298  NPRDIPAFVKELGRYRTNIFPGLNLFNALMNSERKLDFFSSLILTFGGGMVQRFVAE
Sma0150   229  KF-DANEVLRRLMPQS--TSMGVPITFYVRLVQNPGLTHEATAGMRLFVSGSAPLLAETHR
Smb20650  235  SFAPQAIQFDRIRTERVTGFPLVPTMAAMILQMRDLEPGFLPSLRYLSNTAAALPPAHIA
consenso  *

MCU-AMP2
FadD      344  RWVKL-TGQYILEGYGLTECAPLVSVPYDIDYHSGSIGLPVPSTEAKLVDDDDNE-VPP
SMc02162  358  RWLEL-TGCPHEGYGLSETSPVATANRLDTDFTGTIGIPLPSTEVEIRDEPGR-LPV
Sma0150   286  TFAQM-TGHAILERYGMTETN-MNTSNPYDGERIAGTVGFPPLPGVSLRVADPESGRPLPK
Smb20650  295  RLRELTFPGARLYSMYGLTECKRCTYLPPEELDRFPGSVGIATPNTAEFVVDDEGNR-VPP
consenso  * * * * * * * * * * * * * * * * *

MC-FACS
FadD      402  GQPGELCVKGPQVMLGYWQRPDATDEIIK-----NGWLHTGDIAMVDEEGFLRIVDRKK
SMc02162  416  GEIGETCIRGPQVMAGYWQRPPEETARAISP-----DGFRTGDVGFMAEGLTKIVDRKK
Sma0150   344  GETGMIEVKGNVFKGYWRMPEKQGEFRA-----DGFITGDLGRIIDERYVHIVGRCK
Smb20650  354  GVPGELVIRGPHVMQGYWRNDAATERMLRPGPNPWEKVLHTGDLFRTDEEGFLYFVGRKD
consenso  * * * * * * * * * * * * * * * * *

FadD      456  DMILVSGFNVPNEIEDVVMQHPGVQEVAAVGVPSGSSGEAVKIFVVKK-DPSSLTEESLV
SMc02162  471  DMILVSGFNVPNEIEEVAATHPGILECAAIGVADPHSGEAVKIFVVRK-DPSSLTEEEVK
Sma0150   399  DLVISGGYNIYKPEVETEIDQMPGVVETAVIGLPHPDFGEGVTAVVVRKPGAATDERAIL
Smb20650  414  DIIKTRGEKVAPKEVETVLHAHPGLAEAVVIGVDPVLLGAAIGALVVLS-DPSSLTEKDII
consenso  * * * * * * * * * * * * * * * *

FadD      515  TFCRRQLTGKVPKLVFRDELPKSNVGKILRELRDEAR---GKVDNKA
SMc02162  530  RHCAASLTNYKRPRYVFRTELKSNVGKILRKDLR-----G
Sma0150   459  DGLEGRIARYKQPKRVIFVDDLPRNTMGKVQKNVLRRETYARLYAGAEARV
Smb20650  473  RHCSRHLEDFMVPKIVFRTELKTDTKGVSRRLLAAET-----LEPAE
consenso  * * * * * * * * * * * * *

```

Figura A1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de FadD de *E. coli* (FadD), FadD de *S. meliloti* (SMc02162), FadDs putativas SMA0150 y Smb20650 de *S. meliloti*. Las secuencias enmarcadas corresponden al motivo consenso de unión a ATP-AMP (MCU-AMP 1 y 2) y al motivo consenso de acil-CoA sintetasa (MC-FACS) propuesto por Black y colaboradores (1997). Los residuos de aminoácidos idénticos se muestran en cajas negras, mientras que los similares se muestran en cajas grises y los que son comunes en las 4 secuencias se denotan con asteriscos en la línea consenso. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MAFFT version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

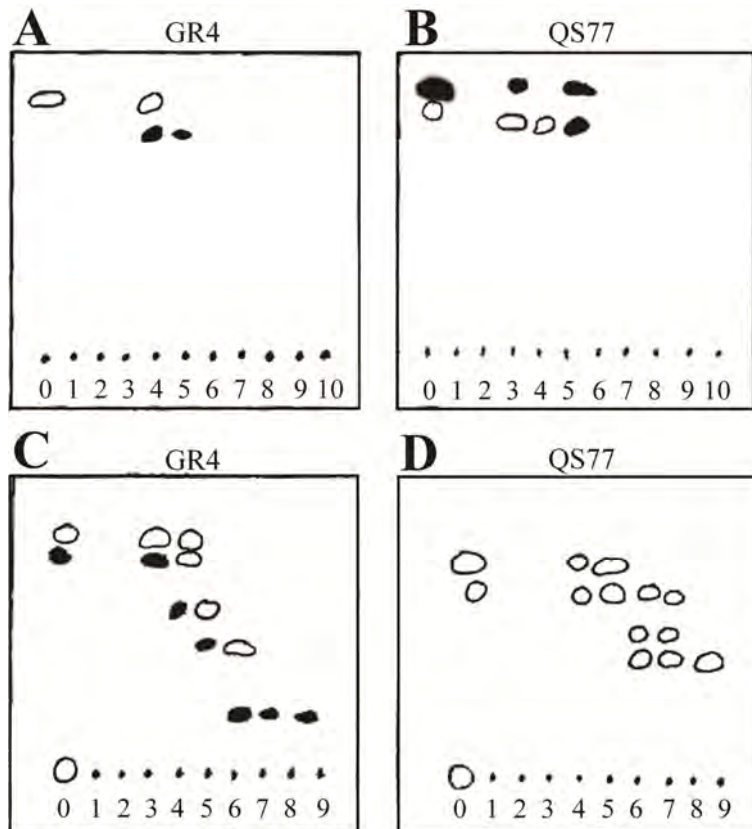


Figura A2. Análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna. Los dibujos representan la calca del revelado de las placas con yodo sublimado. (A) Fracciones de los sobrenadantes de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. (B) Fracciones del extracto celular de *S. meliloti* GR4 y de *S. meliloti* QS77. Los números corresponden al orden en que las fracciones se eluyeron de la columna. C: alícuota del extracto crudo. Las fracciones restantes (>10) correspondientes a cada extracto no se revelaron con el yodo sublimado, se combinaron y se analizaron por GC/MS

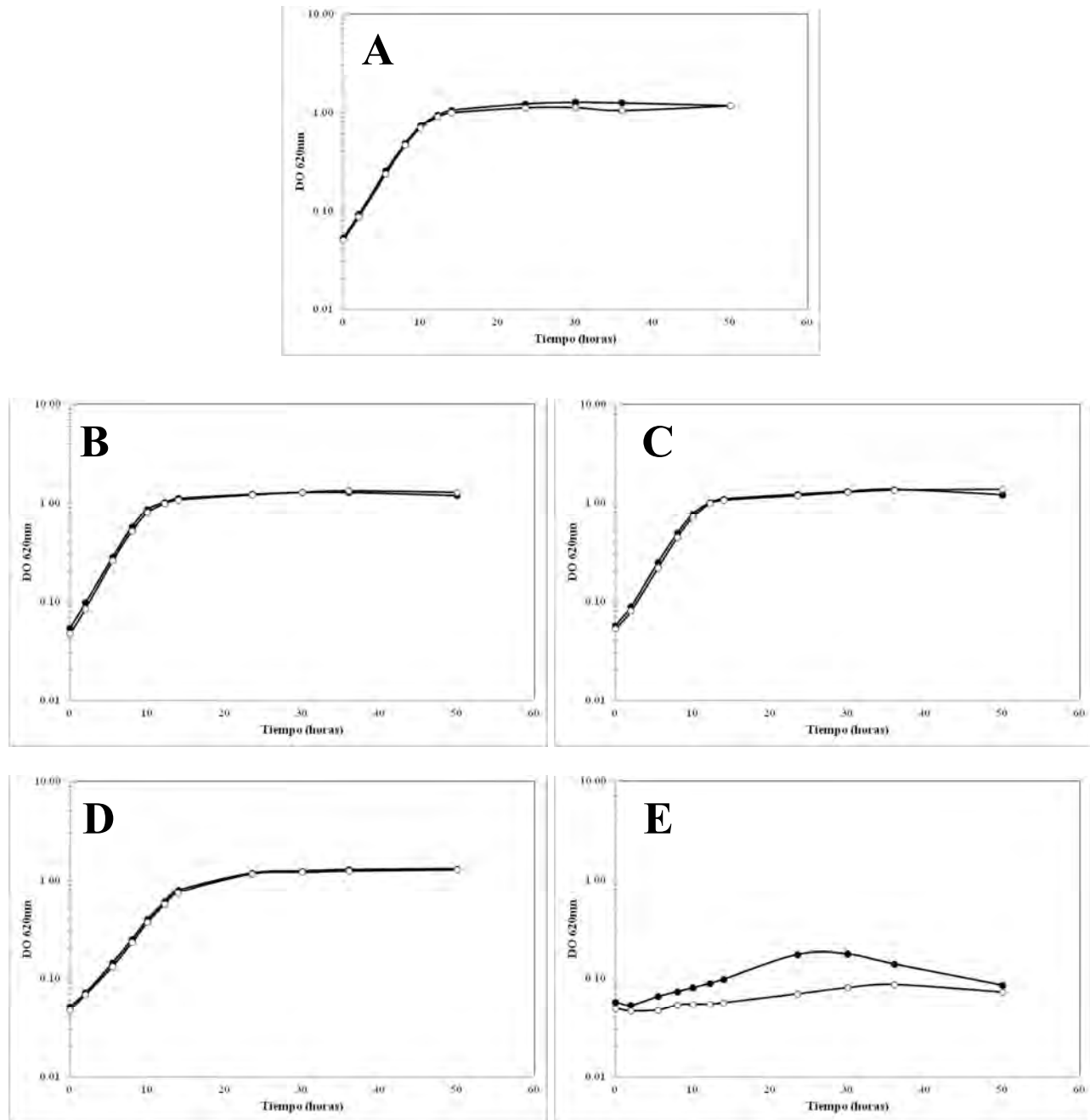


Figura A3. Comparación de las curvas de crecimiento de (●) *S. meliloti* 1021 y de (○) *S. meliloti* 1021FDC5 en medio PY^{Ca++} con distintas concentraciones de NaCl. Se creció un preinóculo de cada cepa en PY^{Ca++} estándar con el cual se inocularon los cultivos de PY con las diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación (275 rpm). Curvas de crecimiento correspondientes a (A) PY^{Ca++} estándar, (B) PY^{Ca++} 100 mM NaCl, (C) PY^{Ca++} 250 mM NaCl, (D) PY^{Ca++} 500 mM NaCl y (E) PY^{Ca++} 700 mM NaCl.

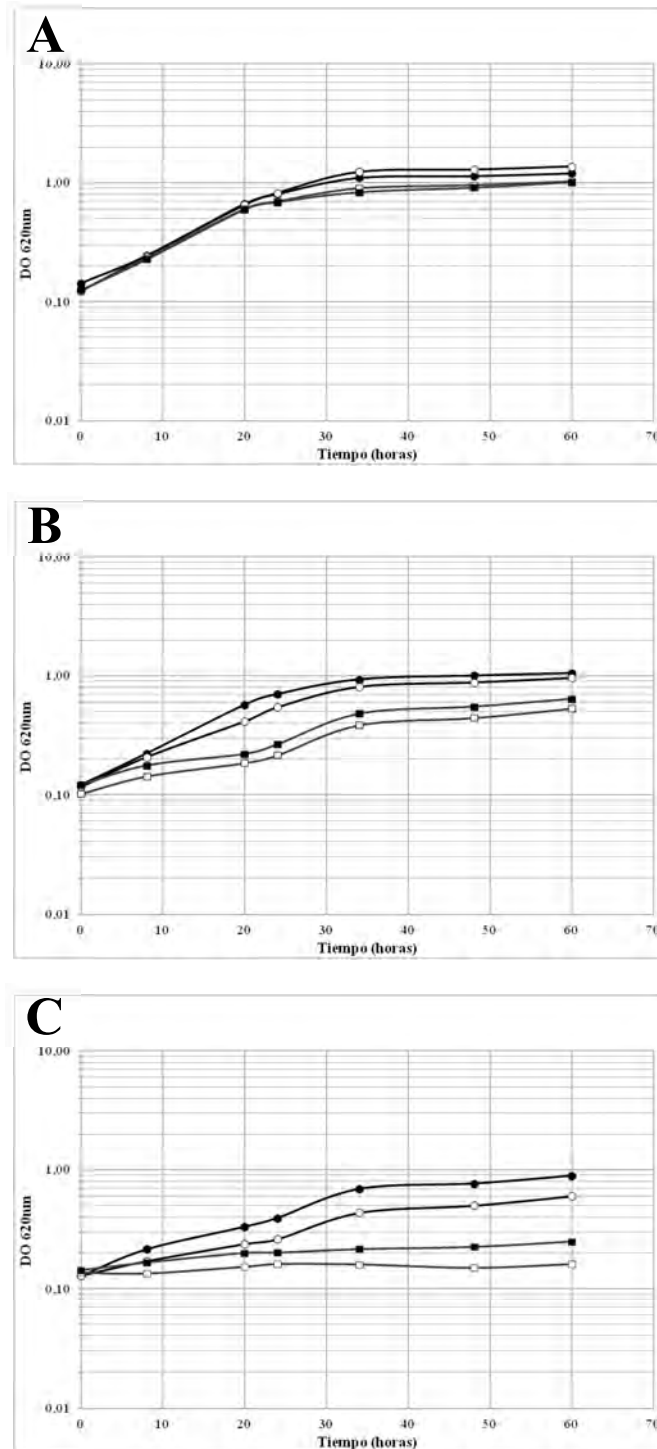


Figura A4. Comparación de las curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 (●), *S. meliloti* 1021FDC5 (○), *S. meliloti* 1021FDC5 (pBBR1MCS-3) (□) y de *S. meliloti* 1021FDC5 (pBBRD4) (■) en medio mínimo (MM) de Robertsen con distintas concentraciones de NaCl. Curvas de crecimiento correspondientes a (A) MM estándar, (B) MM con 250 mM NaCl y (C) MM con 500 mM NaCl. Se creció un preinóculo de cada cepa en MM de Robertsen estándar con el cual se inocularon los cultivos con las diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación (275 rpm).

A**>FadL**

MVMSQKTLFTKSALAVAVALISTQAWSAGFQLNEFSSSGLGRAYSGEGAIADDAGNVR**NPAL**ITMFDPRPTFSAGAVYIDPDVNIS
 GTSPSGRSLKADNIAPTAWVPM**HF**VAPINDQFGWGASITSNYGLATEFNNTYAGGSVGGTTDLETMNLNLSGAYRLNNAWSFGLG
 FNAVYARAKIERFAGDLGQLVAGQIMQSPAGQTQQGQALAATANGIDSNTKIA**HL**NGNQWGFQWGNAGILYELDKNNRYALTYRSEV
 KIDFKGNYSSDLNRAFNNYGLPIPTATGGATQSGYLTLNLPMEWEVSGYNRVD**PQ**WAI**HY**SLAYTSWSQFQQLKATSTSGDTL**FQ**K
HEGFKDAYRIALGTTYYYDDNWTFRGTGIAFDDSPVPAQNR**SIS**IPDQDRFWLSAGT**TY**AFNKDASVDVGVSY**MHG**QSVKINEGPYQ
 FESEGKAWLFGT**FN**NYAF

>SMc02079

MARIGLKQGILAAVAGMLVASAAQAGGLERSGYNIDLLFDPSDYAAEATATYV**NPQ**RKLNVEDTDTADTDILGGTFGGGNLNYRP
 STADDTESYWAPRIGIKAALGDSIDCMADYSQPWGA**HT**NPGKNWAGANNNIETKVESDNYAATCSYKWQMGPGYFRVIGGGFYQEV
 GGFKERLVQDYTFAPFPFSTFSGVGRLELEDSDGWGWRGTGVAYEIPYAMRASLVYNSAVDLDLDSGFIDLRLQAFPNPFPVGPVVI
 TGTKYDVQGSASMPDSLELKVQSGIAPGWLAFGSIKWTDWSQLQVVTFCPATISPTTCTSLDLLYRDGWTVTGGIG**HK**FN**DQ**WSG
 AVSLTWRGRTSQGYGAQTD**TW**LTGLTGVSYTP**TEN**VEIRLAGVVGILTSGSSGPVDFEGQTIGGDVSYDFGNDFVGA**IST**SLK**VRF**

B

FadL	1	MV---	MSQKTLFTKSALAVAVALISTQAWSAGFQLNEFSSSGLGRAYSGEGAIADDAGNV
SMc02079	1	MARIGLKQGIL----	AAVAGMLV-----ASAAQAGGL
Consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	58	S NPAL ITMFDPRPT---	FSAGAVYIDP-----D VNIS CTSPSGRSLK----
SMc02079	29	ERSGY NI DL LF DP SD YAAEATATY NPQ RKLNVEDTDTADTDILGGTFGGGNLNYRPST	
Consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	97	ADNIAPTAWVPM HF VAPINDQFGWGASITSNYGLATEFNNTYAGGSVGGTTDLETMNLN	
SMc02079	89	ADDTE-SYWAPRIGIKAALGDSIDCMADYSQPWGA HT NPGKNWAGANNNIETKVESDNYA	
Consenso		**	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	157	LSGAYRLNNAWSFGLCFNAVYARAKIERFAGDLGQLVAGQIMQSPAGQTQQGQALAATAN	
SMc02079	148	ATCSYK----WQMG PC YFRVIGGGFYQEVGGFKERLVQDYTFAPFPFSTFSG-----	
Consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	217	GIDSNTKIAHLNGNQWGFQWGNAGILYEL-DKNNRYALTYRSEVKIDFKGNYSSDLNRAFN	
SMc02079	196	-----VGRLELEDSDGWGWRGTGVAYEIPYAMRASLVYNSAVDLDLDSGFIDLRLQAFN	
Consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	276	NYGLPIPTATGGATQSGYLTLNLPMEWEVSGYNRVD PQ WAI HY SLAYTSWSQFQQL----	
SMc02079	249	NPPFVGPV RVIT CTKYDVQGSASMPDSLELKVQSGIAPGWLAFGSIKWTDWSQLQVVTFCP	
consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	332	-----KATSTSGDT L FQKHGFKDAYRIALGTTYYYDDNWTFRGTGIAFDDSPVPAQNR S I	
SMc02079	309	ATISPTTCTSLD L -----YRDGWTVTGGIG HK FN DQ WSGAVSLT W -----RGTS Q	
consenso		**	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	387	SIPD Q DRFWLSAGT TY AFNKDASVDVGVSY MHG QSVKINEGPY Q FESE----GKAWLFGT	
SMc02079	357	GYGA Q TD TW - TL GTGVSYTP TEN VEIRLAGVVGILTSGSSGPVDFEGQTIGGDVSYDFGN	
consenso		*	* * * * * * * * * * * * * * *
FadL	443	FN Y A----- F	
SMc02079	416	DFVGA I STSLK VRF	
consenso		*	* * *

Figura A5. Comparación de FadL de *E. coli* y SMc02079. En (A) secuencia de aminoácidos de FadL y SMc02079, se resaltan en negritas y subrayadas las secuencias NPA y NPQ respectivamente, así como los residuos de histidinas presentes. En (B) alineamiento de las secuencias de FadL y SMc02079. En el alineamiento NPA y NPQ no se alinean (subrayadas y encuadradas). Por otra parte, ninguno de los residuos de histidinas de SMc02079 es capaz de alinearse con la histidina 110 de FadL que es crucial para la actividad (Black & Zhang, 1995) (en negritas e indicadas con puntas de flecha). Los residuos de aminoácidos idénticos se muestran en cajas negras, mientras que los similares se muestran en cajas grises y los que son comunes en las 2 secuencias se denotan con asteriscos en la línea consenso. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MAFFT version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

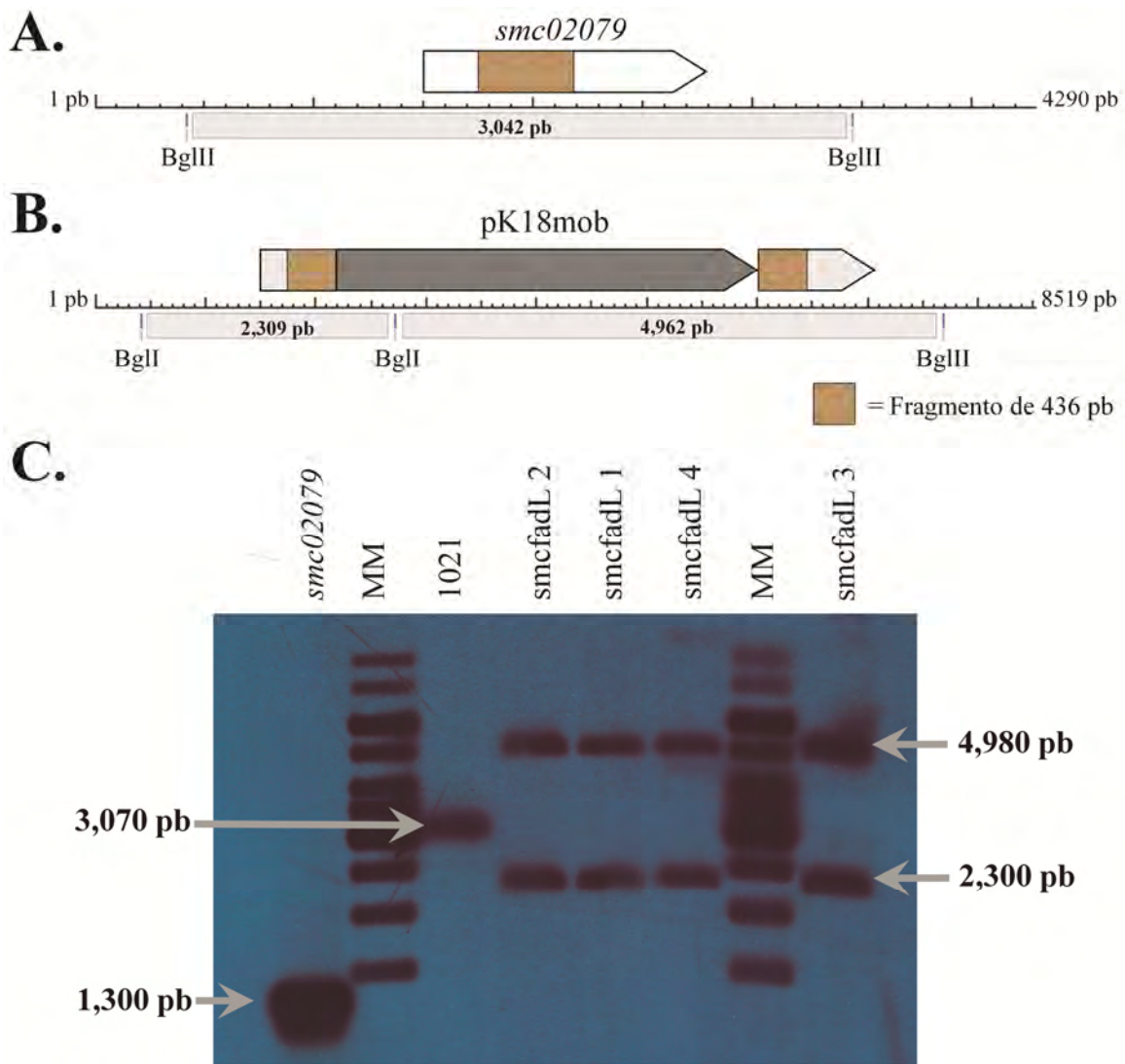


Figura A6. Verificación de la mutación de *smc02079* en *S. meliloti* por hibridación tipo Southern. En (A) se presenta una sección de la cepa silvestre de 4,290 pb (*smc02079* ± 1500 pb) y su restricción con **BglIII** con la que se obtiene un fragmento de 3,042 pb. En (B) se presenta la misma sección con la integración del vector pK18mob y la duplicación del fragmento de 436 pb en las mutantes. La restricción de esa sección con **BglIII** genera 2 fragmentos de 2,309 y 4962 pb. (C) Perfil de hibridación de *S. meliloti* 1021 y las candidatas a mutantes smcfadL 1, 2, 3 y 4. El fragmento intragénico de 436 pb se empleó como sonda. Como control positivo se empleó el gen *smc02079*. MM: marcador molecular de 1 kpb (FERMENTAS) compatible con el sistema DIG de ROCHE. Los valores asignados a los fragmentos indicados se calcularon con base al MM.

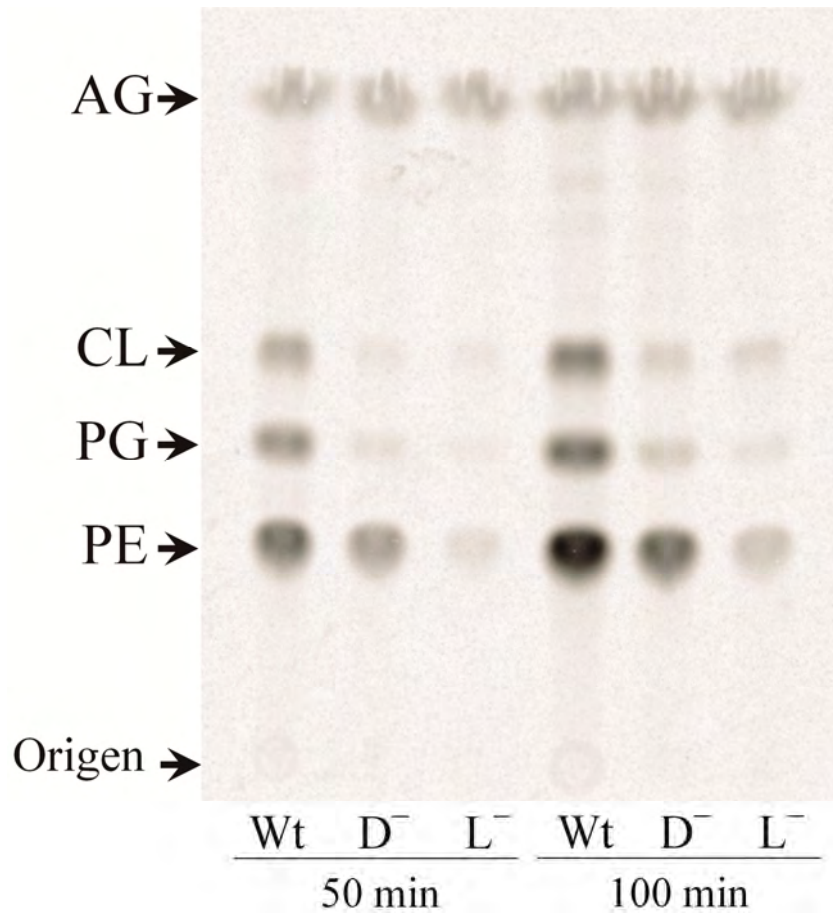


Figura A7. Incorporación de ácido [^{14}C] palmítico a los fosfolípidos de *E. coli* Y-mel (Wt), *E. coli* YfadD1 (D^-) y *E. coli* YfadL1 (L^-). Las cepas se crecieron en MM M9 adicionado con Brij 58 (5 mg mL^{-1}) hasta fase estacionaria temprana ($\text{OD}_{620\text{nm}} = 1.2$; 9 h de crecimiento). Las células se lavaron una vez con medio fresco y se marcaron con ácido [^{14}C] palmítico ($1 \mu\text{Ci mL}^{-1}$) durante 50 ó 100 minutos. Las células marcadas se lavaron dos veces con medio fresco para remover el ácido [^{14}C] palmítico no incorporado. Los lípidos de la masa celular se extrajeron por el método de Blight & Dyer (1959) y se analizaron por cromatografía en capa fina. Fase estacionaria: sílica gel 60 (MERCK), fase móvil: cloroformo:metanol:ácido acético glacial (13:5:2, vol/vol). AG, ácidos grasos; CL: cardiolipina; PG: fosfatidilglicerol; PE: fosfatidiletanolamina.

Tabla A1. Cepas empleadas y sus características relevantes.

Cepas	Características relevantes ^a	Referencia o procedencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	Cepa de clonación	Hanahan, 1983
S17-1	Cepa donadora, Tp ^R , Sm ^R	Simon <i>et al.</i> , 1983
Y-Mel	Cepa silvestre	Rickenberg & Lester, 1955
YfadD1	Y-Mel <i>fadD::kan</i>	Pech-Canul <i>et al.</i> , 2011
YfadL1	Y-Mel <i>fadL::kan</i>	Pech-Canul <i>et al.</i> , 2011
<i>S. meliloti</i>		
1021	Cepa silvestre derivada de SU47, Sm ^K	Galibert <i>et al.</i> , 2001.
GR4	Cepa silvestre	Casadesús & Olivares, 1979.
QS77	<i>fadD:tn5</i> derivada de GR4, Kn ^R	Soto <i>et al.</i> , 2002.
1021DFC5	<i>smc02162:Nm</i> derivada de 1021, Kn ^R	Nogales <i>et al.</i> , 2010.
MAL101	<i>sma0150:Gm</i> derivada de 1021, Gm ^R	María J. Soto
IML20650	<i>smb20650:ΩSp</i> derivada de 1021, Sp ^R	Isabel Ma. López Lara
GR4FDC-2	<i>fadD:Nm</i> derivada de GR4, Kn ^R	María J. Soto
GRMAL2	<i>sma0150:Gm</i> derivada de GR4, Gm ^R	María J. Soto
IMLGR650	<i>smb20650:ΩSp</i> derivada de GR4, Sp ^R	Isabel Ma. López Lara
smcfadL2	Mutante <i>smc02079</i> derivada de 1021, Sm ^R Kn ^R	Este trabajo

a. Sm^R resistencia a estreptomicina, Gm^R resistencia a gentamicina, Kn^R resistencia a kanamicina, Sp^R resistencia a espectinomicina, Tp^R resistencia a trimetropina.

Tabla A2. Plásmidos y oligonucleótidos empleados y sus características relevantes.

Plásmidos	Características relevantes ^a	Oligonucleótidos empleados o referencia ^c .
pAL55	<i>smb20650</i> clonado en pBBR1MCS-5 (NdeI–BamHI) ^b , Gm ^R	Ramos-Vega <i>et al.</i> , 2009
pBBR1MCS-3	Vector de amplio rango de hospedero, Tc ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBRD4	<i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i> GR4 clonado en pBBR1MCS-3	Soto <i>et al.</i> , 2002
pECH1	<i>sma0150</i> clonado en pET16b (NcoI–BamHI), Cb ^R	<ul style="list-style-type: none"> • oLOP 113: ACC TTA TCC <u>ATg</u> ggC AAC CAT CTg TTC gAC g • oLOP 114: AAA <u>ggA TCC</u> CTA CAC ACg CgC TTC ggC TC • oLOP 115: Agg AAT <u>CAT ATg</u> gCg gAA gCA AgC ACg C • oLOP 116: CCC <u>AAg CTT</u> CTA TCC gCg CAg gTC CTT g
pECH6	<i>smc02162</i> clonado en pET17b (NdeI–HindIII), Cb ^R	Este trabajo
pECH7	<i>smb20650</i> clonado en el pET17b (NdeI–EcoRI), Cb ^R	<ul style="list-style-type: none"> • oLOP 184: AAA TTC <u>ACC ATg</u> gTA ACg gCA TgT ATA TCA TTT g • oLOP 185: ACA <u>ggA TCC</u> TCA ggC TTT ATT gTC CAC TTT gC • oLOP 229: AAT TAT <u>gAA TTC</u> gTC CAA gCA CCg Cgg ACg AC • oLOP 230: AAA TTA <u>gAA TTC</u> AgC TCg CCC gCA TCg CAT AT • oLOP 231: Agg AAT <u>ACA TAT</u> ggC TCg AAT Tgg ATT gAA gC • oLOP 232: AAA <u>ggA TCC</u> TCA gAA CCT gAC CTT CAg AgA Ag
pECH10	Fragmento interno de 436 pb de <i>smc02079</i> clonado en pK18mob (<i>EcoRI-EcoRI</i>), Kn ^R	Este trabajo
pECH14	<i>smc02079</i> clonado en pET17b (NdeI–BamHI), Cb ^R	Este trabajo
pET16b	Vector de expresión, Cb ^R	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET17b	Vector de expresión, Cb ^R	NOVAGEN
pK18mob	Vector suicida, Kn ^R	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pNG28	pET17b clonado en pRK404 (BamHI–BamHI) Cb ^R , Tc ^R	González-Silva <i>et al.</i> , 2011
pNG34	pET17b clonado en pRK404 (BglII–BamHI) Cb ^R , Tc ^R	Este trabajo
pRCanul1	pECH1 clonado en pRK404 (BamHI–BamHI) Cb ^R , Tc ^R	Este trabajo
pRCanul2	pECH6 clonado en pRK404 (HindIII–HindIII) Cb ^R , Tc ^R	Este trabajo
pRCanul3	pECH7 clonado en pRK404 (BglII–BamHI) Cb ^R , Tc ^R	Este trabajo
pRCanul4	pECH8 clonado en pRK404 (BamHI–BamHI) Cb ^R , Tc ^R	Este trabajo
pRK404	Vector de amplio rango de hospedero, Tc ^R	Ditta <i>et al.</i> , 1985

a. Cb^R resistencia a carbenicilina, Gm^R resistencia a gentamicina, Kn^R resistencia a kanamicina, Tc^R resistencia a tetraciclina.

b. Entre paréntesis se indican las enzimas de restricción empleadas para la clonación.

c. En los oligonucleótidos se subrayan los sitios de restricción añadidos en los mismos.

Notas sobre las tablas de los resultados obtenidos por GC/MS:

- Las moléculas presentes en las muestras se identificaron con base en la comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos NIST versión 1.7a.
- Con esta técnica no se puede distinguir la posición del doble enlace en el AG, por lo que los diferentes isómeros se agruparon y se representaron de la siguiente manera:
C14:1 = C14:1^{Δ7}, C14:1^{Δ9} y C14:1^{Δ11}.
C18:1 = C18:1^{Δ7}, C18:1^{Δ9} y C18:1^{Δ11}.
C18:0cp = C18:0-9cp y C18:0-11cp.
- Los ésteres de metilo de los AG han sido previamente reportado como lípidos de origen natural en rizobias (por ejemplo, Gerson & Patel, 1975). No obstante, siempre ha habido una duda sobre la validez de esos informes, ya que los ésteres metílicos se puede formar en pequeñas cantidades, como los artefactos producidos durante la extracción con cloroformo-metanol. En el presente trabajo se consideró que la presencia de ésteres de metilo es artefacto de la técnica de análisis. Por lo tanto, en las **Tablas A6** y **A9** los ésteres de metilo se agruparon con el respectivo AG en forma libre.
- La **Tabla A10** no presenta las abundancias relativas de las moléculas ya que solo se examinaba la composición cualitativa de esas muestras.

Tabla A3. Claves empleadas para las moléculas identificadas por GC/MS. Las moléculas se agruparon de acuerdo a sus características químicas.

Nombre de las claves		
Clasificación	Clave	Nombre de la molécula
Aldehídos y cetonas	12C–nal	Dodecanal
	13C–ona	2-Tridecanona
	Ciclo–15C–ona	Ciclopentadecanona
Hidrocarburos	12C+3M	2,6,10–trimetil–dodecano
	16C+4M	2,6,11,15–tetrametil–hexadecano
	17C+1M	2,metil–heptadecano
	11C	Undecano
	20C	Eicosano
	23C	Tricosano
	24C	Tetracosano
	25C	Pentacosano
	26C	Hexacosano
	27C	Heptacosano
	28C	Octacosano
	29C	Nonacosano
	31C	Hentriacontano
	32C	Dotriacontano
36C	Hexatriacontano	
Ácidos grasos	C14:0	Tetradecanoico
	C14:1	Tetradecenoico
	C14:0–3OH	3–hidroxi–tetradecanoico
	C16:0	hexadecanoico
	C16:1	hexadecenoico
	C18:0	octanoico
	C18:1	hexadecenoico
	C18:0cp	lactobacílico
	C18:0epox	(cis–3–octil–oxiranyl)octanoico o (9,10 epoxi) octadecanoico
	C22:1	docosanoico
	-ME	metil éster del ácido graso
-EE	etil éster del ácido graso	

Tabla A4. Identificación por GC/MS de la composición de las fracciones que se obtuvieron de la cromatografía por columna de los sobrenadantes de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77.

Sobrenadantes						
GR4			QS77			
Muestra ^a	Molécula ^b	Abundancia ($\times 10^5$)	Muestra	Molécula	Abundancia ($\times 10^5$)	
AP-193 (F1 → F3)	11C	2.40	AP-198 (F1 y F2)	11C	1.80	
	C18:0	20.00		C16:0-ME	0.90	
	28C	4.80		12C+3M	0.80	
	28C	4.60		16C+4M	0.90	
	31C	6.40		17C+1M	1.20	
	26C	4.00		C18:1-ME	1.60	
	27C	3.40		AP-199 (F3)	C14:1	18.00
	32C	3.60			C14:0	8.50
		C18:1	84.00			
AP-194 (F4)	11C	1.60	AP-200 (F4)	11C	1.50	
	23C	6.40		12C-nal	7.50	
	24C	5.60		13C-ona	6.00	
	25C	5.60		C14:1	54.00	
	26C	4.80		C16:1	22.00	
AP-195 (F5)	11C	1.70		C16:0	84.00	
	C16:0-ME	1.70		C18:1	148.00	
	C18:1	5.20		C18:0	75.00	
AP-196 (F6)	11C	1.68		C18:0cp	27.00	
	C18:1	2.36	AP-201 (F5)	11C	1.60	
	31C	3.36		12C-nal	7.60	
	32C	2.00		13C-ona	5.60	
		C14:1		7.60		
		C14:0		3.60		
		C18:0epoxi-ME		14.80		
		C16:0		13.60		
		C18:1		40.40		
		C18:0	11.20			
AP-197 (F7 → F10)	11C	2.20	AP-202 (F6)	11C	1.56	
				12C-nal	4.36	
				13C-ona	4.56	
				Ciclo-15C-ona	1.92	
				C16:0-ME	1.32	
AP-203 (F7 → F12)	11C	2.20	AP-203 (F7 → F12)	20C	1.20	
				12C-nal	1.40	
				13C-ona	1.90	
				17C+1M	1.60	
				16C+4M	1.90	
				C16:0-ME	1.60	
				31C	1.90	
				C18:0-ME	2.30	

- a. Entre paréntesis se indica la fracción o fracciones que contiene cada muestra.
b. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A5. Identificación por GC/MS de la composición de fracciones obtenidas de la cromatografía por columna de los extractos de la masa celular de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77.

Masa celular						
GR4			QS77			
Muestra ^a	Molécula ^b	Abundancia ($\times 10^3$)	Muestra	Molécula	Abundancia ($\times 10^3$)	
AP-204 (F1 y F2)	11C	1.68	AP-211 (F1→F3)	11C	1.64	
	C16:0-ME	1.44		C16:0-ME	9.60	
	C18:0-ME	2.28	AP-212 (F4 y F5)	C14:0	18.00	
AP-205 (F3)	11C	1.50		C16:0	148.00	
	C14:1-ME	1.60		C18:1-ME	56.00	
	C16:0-ME	4.00		C18:1	211.40	
	C18:0-ME	12.10		C18:0	160.00	
	23C	7.40		C18:0cp	71.00	
	24C	8.10		AP-213 (F6 y F7)	11C	2.00
	36C	9.00			12C-nal	2.40
	26C	9.10	13C-ona		2.40	
27C	9.65	C14:0-3OH-ME	6.00			
28C	9.00	C16:0	22.00			
29C	7.80	C18:1	65.80			
AP-206 (F4)	11C	1.60	C18:0		16.00	
	C14:0-3OH-ME	12.20	C22:1		40.28	
	C16:0-ME	5.10	AP-214 (F8)	11C	1.50	
	C16:0	15.40		C16:0-ME	1.00	
	C18:1-ME	16.40		C18:1	1.50	
	C18:1	17.20	AP-215 (F9 y F10)	11C	1.40	
	C18:0cp-ME	10.30		C16:0-ME	2.10	
	28C	8.00		C18:1	10.60	
	24C	7.80		C18:0cp-ME	10.40	
	25C	8.10				
	27C	8.00				
	28C	7.60				
	29C	6.80				
AP-207 (F5)	11C	1.60				
	C14:0-3OH-ME	2.65				
	C16:0-ME	2.30				
	C18:1-ME	11.10				
	C18:0cp-ME	4.00				
AP-208 (F6)	C11	1.66				
	C16:0-ME	1.06				
	C18:1-ME	2.96				
AP-209 (F7)	C11	1.80				
	C16:0-ME	2.20				
	C18:0-ME	1.70				
	C18:1-ME	2.70				
AP-210 (F8 → F10)	11C	1.55				
	C16:0-ME	1.80				
	C18:0-ME	7.75				
	C18:0cp	2.75				

- a. Entre paréntesis se indica la fracción o fracciones que contiene cada muestra.
b. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A6. Composición total de los extractos de los sobrenadantes y de la masa celular de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77.

Molécula ^a		Abundancia ($\times 10^5$)			
		Sobrenadantes		Masa celular	
		GR4	QS77	GR4	QS77
Aldehídos y cetonas	12C-nal	---	20.86	---	2.40
	13C-ona	---	18.06	---	2.40
	Ciclo-15C-ona	---	1.92	---	---
	Total	---	40.84	---	4.80
Hidrocarburos	12C+3M	---	0.80	---	---
	16C+4M	---	2.80	---	---
	17C+1M	---	2.80	---	---
	20C	---	1.20	---	---
	23C	6.40	---	7.40	---
	24C	5.60	---	15.90	---
	25C	5.60	---	8.10	---
	26C	8.80	---	9.10	---
	27C	3.40	---	17.65	---
	28C	9.40	---	24.60	---
	29C	---	---	14.60	---
	31C	9.76	1.90	---	---
	32C	5.60	---	---	---
	36C	---	---	9.00	---
	Total	54.56	9.50	106.35	---
Ácidos grasos	C14:0	---	12.10	---	18.00
	C14:1	---	79.60	1.60	---
	C14-3OH	---	---	14.85	6.00
	C16:0	1.70	101.42	33.30	182.70
	C16:1	---	22.00	---	---
	C18:0	---	88.50	16.08	176.00
	C18:1	27.56	274.00	58.11	345.30
	C18:0cp	---	27.00	17.05	81.40
	C18:0-epoxi	---	14.80	---	---
	C22:1	---	---	---	40.28
	Total	29.26	619.42	140.99	849.68

a. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A7. Identificación por GC/MS de la composición de las fracciones obtenidas de la cromatografía por columna de los sobrenadantes de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77 (**Figura A2**).

Sobrenadantes						
GR4			QS77			
Muestra ^a	Molécula ^b	Abundancia ($\times 10^5$)	Muestra	Molécula	Abundancia ($\times 10^5$)	
AP-238 (F1→F3)	C16:0-ME	1.40	AP-249 (F1→F4)	C14:0-ME	6.75	
	AP-239 (F4)	C16:0-ME		2.40	C14:0	5.55
AP-240 (F5→F10)	C18:0-ME	1.60		C16:0-ME	9.90	
	C16:0-ME	4.30		C16:0	17.80	
	C16:0	1.08		C18:1-ME	2.50	
AP-241 (F11→F20)	C18:0-ME	2.75		C18:0-ME	2.45	
	C16:0-ME	7.15		AP-250 (F5)	C14:0-ME	5.65
	C16:0	33.00			C14:1	8.00
C18:0-ME	2.60	C14:0			13.10	
AP-251 (F6)	AP-250 (F5)	C16:0-ME			10.70	
		C16:0	35.50			
		C18:1-ME	5.80			
		C14:1	20.00			
		C14:0	5.50			
		C16:0-ME	4.00			
		C16:0	32.00			
AP-252 (F7 y F8)	AP-250 (F5)	C18:1-ME	6.40			
		C18:1	40.00			
		C18:0	11.10			
		12-nal	5.80			
		13-ona	5.30			
		C14:1	7.80			
		C14:0	3.45			
AP-253 (F9)	AP-250 (F5)	C16:0-ME	5.80			
		C16:0	37.50			
		C18:0-ME	6.36			
		C18:1	1.86			
		12-nal	12.00			
		13-ona	13.20			
		C14:0-ME	13.80			
AP-254 (F10)	AP-250 (F5)	C16:0-ME	40.20			
		C16:0	47.50			
		C18:1-ME	46.50			
		C18:1	22.00			
		C18:0cp-ME	30.00			
		C14:0-ME	1.15			
AP-255 (F11-F20)	AP-250 (F5)	C16:0-ME	3.55			
		C16:0	2.15			
		C18:1-ME	4.70			
		C18:0-ME	1.85			
AP-255 (F11-F20)	AP-250 (F5)	C18:0cp-ME	3.57			
		C16:0-ME	7.83			
		C16:0	64.30			
AP-255 (F11-F20)	AP-250 (F5)	C18:1-ME	3.60			
		C18:0-ME	3.74			

- a. Entre paréntesis se indica la fracción o fracciones que contiene cada muestra.
b. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A8. Identificación por GC/MS de la composición de las fracciones obtenidas de la cromatografía por columna de los extractos de la masa celular de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77 (**Figura A2**).

Masa celular					
GR4			QS77		
Muestra ^a	Molécula ^b	Abundancia ($\times 10^{+5}$)	Muestra	Molécula	Abundancia ($\times 10^{+5}$)
AP-242 (F1→F3)	C16:0-ME	7.03	AP-256 (F1→F3)	C16:0-ME	7.30
	C16:0	13.50		C16:0	24.50
	C18:0-ME	1.80		C18:1-ME	2.77
AP-243 (F4)	C16:0-ME	7.00	AP-257 (F4 y F5)	C18:0-ME	2.30
	C16:0	5.00		C16:0-ME	12.70
	C18:0-ME	1.40		C16:0	125.00
AP-244 (F5 y F6)	C14:1-ME	2.10	AP-258 (F6 y F7)	C18:1-ME	47.80
	C16:0-ME	12.50		C18:1	22.00
	C16:0	35.00		C18:0	118.00
	C18:1-ME	25.00		C18:0cp	115.00
	C18:0cp-ME	13.20		C16:0-ME	6.17
	23C	4.40		C16:0	73.70
	24C	4.40		C18:1-ME	78.40
	26C	3.90		C18:1	118.50
27C	3.37	C18:0	35.10		
28C	4.32	C18:0cp	38.00		
AP-245 (F7)	C16:0-ME	5.85	AP-259 (F8 y F9)	C16:0-ME	4.62
	C16:0	5.67		C16:0	26.70
	C18:1-ME	5.50		C18:1-ME	9.13
	C18:0-ME	5.13		C18:1	18.00
	C18:0cp-ME	4.00		C18:0cp-ME	5.83
AP-246 (F8)	C14:0-ME	14.00	AP-260 (F10 y F20)	C18:0cp	5.32
	C14:0	28.00		C16:0-ME	12.10
	C16:0-ME	5.60		C16:0	68.85
	C16:0	3.60		C18:1-ME	12.00
	C18:1-ME	2.50		C18:1	7.36
	C18:0-ME	2.20		C18:0cp-ME	7.02
AP-247 (F9)	C14:0-ME	14.00			
	C14:0	23.20			
	C16:0-ME	9.40			
	C16:0	7.30			
	C18:0-ME	6.50			
AP-248 (F10→F20)	C14:0-ME	8.72			
	C14:0	10.25			
	C16:0-ME	13.00			
	C16:0	32.80			
	C18:1-ME	6.72			
	C18:0-ME	3.70			
	C18:0cp-ME	3.20			

- a. Entre paréntesis se indica la fracción o fracciones que contiene cada muestra.
b. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A9. Composición total de los extractos de los sobrenadantes y los de la masa celular de *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* QS77 (**Figura A2**).

Moléculas ^a		Abundancia ($\times 10^5$)			
		Sobrenadantes		Pellets	
		GR4	QS77	GR4	QS77
Aldehídos y cetonas	12C-nal	---	17.80	---	---
	13C-ona	---	18.50	---	---
	Total	---	36.30	---	---
Hidrocarburos	23C	---	---	4.40	---
	24C	---	---	4.40	---
	26C	---	---	3.90	---
	27C	---	---	3.37	---
	28C	---	---	4.32	---
	Total	---	---	20.39	---
Ácidos grasos	C14:0	---	54.95	98.17	---
	C14:1	---	35.80	2.10	---
	C16:0	49.33	318.73	163.25	361.64
	C18:0	6.95	19.14	20.73	155.40
	C18:1	---	82.72	60.12	328.81
	C18:0cp	---	---	---	158.32
	Total	56.28	511.34	344.37	1,004.17

a. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Tabla A10. Identificación por GC/MS de la composición de las fracciones obtenidas de la cromatografía de capa fina de los extractos de los sobrenadantes y los de la masa celular de *S. meliloti* QS77 (pBBR1MCS-3) y *S. meliloti* QS77 (pBBRD4).

QS77 (pBBR1MCS-3)		QS77 (pBBRD4)	
Sobrenadantes	Extracto celular	Sobrenadantes	Extracto celular
12C-nal ^a	C18:0	12C	20C
13C-ona	C18:1-Me	C16:0-Me	21C
16C		C18:0-Me	22C
18C		C18:1-Me	24C
19C			25C
32C			26C
C10:1-Me			27C
C16			28C
C18			29C
C18:1-Me			30C
C18:1-Ee			C16:0-Me
C18:0cp-Me			C18:1-Me
C18:0-epox-Me			

a. Las abreviaturas empleadas se describen en la **Tabla A3**.

Protocolos y recetas

Indice de Protocolos y recetas.

➤ Extracción de lípidos de sobrenadantes con acetato de etilo	123
➤ Extracción de lípidos de la masa celular por el método de Bligh-Dyer	124
➤ Obtención de células competentes (CaCl ₂)	125
➤ Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina	126
➤ Transducción con el fago P1	127
➤ Propagación del fago P1	128
➤ Medio Mínimo de Sherwood	129
➤ Medio Mínimo de Robertsen	130
➤ Medio Mínimo M9	131

Extracción de lípidos de sobrenadantes con acetato de etilo.

1. Agregar 400 mL de acetato de etilo acidificado con ácido acético (0.1mL/L) a 1 Litro de sobrenadante en un matraz Erlenmeyer de 2 Litros. Cubrir la boca del matraz con una hoja de papel.
2. Agitar por 15 minutos y reposar 10 min. Repetir 4 veces.
3. Dejar reposar por toda la noche (aprox. 16 horas) para separar las fases.
4. Recuperar la fase superior y la interfase en tubos de vidrio para centrifuga de 50mL
5. Centrifugar a 2,000 rpm por 20 min a 4°C.
6. Recuperar solamente la fase superior de los tubos en un matraz balón de evaporación y verter la fase inferior restante en el matraz con el sobrenadante (fase inferior).
7. Conservar el matraz balón a -20°C sobre una base (para evitar derrames) cubriendo la boca con una hoja de papel.
8. Repetir la extracción al sobrenadante (**del paso 1 al 5**)
9. Recuperar solamente la fase superior de los tubos en el mismo matraz balón de evaporación y verter nuevamente la fase inferior restante en el matraz con el sobrenadante*.
10. Concentrar en el rotavapor con vacío en un baño de agua a 45°C.
11. Recupera el extracto en un tubo de vidrio con 4 mL de metanol:cloroformo (1:1) dos veces.
12. Concentrar el extracto (8 mL) con una corriente de nitrógeno comprimido y recuperar el extracto con 0.5 mL de metanol:cloroformo (1:1) (dos veces) en un vial ABC Wheaton de 1.8mL con tapa de teflón.
13. Conservar el extracto a -20°C.

* **NOTA:** El matraz con los residuos de la extracción contienen todavía residuos de acetato de etilo, estos residuos se mantienen en una campana de extracción de 48 a 72 horas para evaporar las trazas del solvente y después la fase acuosa se desecha.

Debe evitarse en todo momento que los solventes empleados en la extracción tengan contacto con plástico.

Todos los utensilios de vidrio empleados se lavan con metanol:cloroformo (1:1) antes de emplearlos en la extracción.

- Adaptado de **Teplitski, M., A. Eberhard, M. R. Gronquist, M. Gao, J. B. Robinson, and W. D. Bauer.** 2003. Chemical identification of N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. Arch Microbiol **180**:494-7.

Extracción de lípidos de la masa celular por el método de Bligh-Dyer.

1. Agregar con una pipeta de vidrio 45.0 mL de metanol:cloroformo (2:1) a 12.0 mL de celúlas resuspendidas en un bote de vidrio para centrifuga de 250 mL.
2. Agitar lentamente por 60 minutos con la ayuda de un agitador magnético con cubierta de teflón, dejando la tapa del bote semiabierta.
3. Centrifugar a 3,000 rpm a 4°C por 60 min (Sla 3000; Sorvall).
4. Decantar el sobrenadante en otro bote de vidrio para centrifuga.
5. Agregar 15.0 mL de cloroformo y agitar 5 min.
6. Agregar 15.0 mL de agua tridestilada y agitar 5 min.
7. Dejar reposar en hielo por 30 min.
8. Centrifugar a 3,000 rpm a 4°C por 30 min.
9. Recuperar la fase de cloroformo (fase inferior) en un matraz balón de evaporación.
10. Agregar 12 mL a la fase acuosa (fase superior) y centrifugar nuevamente (3,000 rpm a 4°C por 30 min).
11. Recuperar nuevamente la fase de cloroformo en el mismo matraz balón. Desechar la fase acuosa.
**
12. Concentrar en el rotavapor con vacío en un baño de agua a 40°C.
13. Recupera el extracto en un tubo de vidrio con 4 mL de metanol:cloroformo (1:1) dos veces.
14. Concentrar el extracto (8 mL) con una corriente de nitrógeno comprimido y recuperar el extracto con 0.5 mL de metanol:cloroformo (1:1) (dos veces) en un vial ABC Wheaton de 1.8 mL con septa de teflón.
15. Conservar el extracto a -20°C.

** Los botes de vidrio con los residuos acuosos de la extracción contienen todavía residuos de cloroformo y metanol, estos residuos se depositan en los contenedores de desecho para esta mezcla.

Debe evitarse en todo momento que los solventes empleados en la extracción tengan contacto con plástico.

Todos los utensilios de vidrio empleados se lavan con metanol:cloroformo (1:1) antes de emplearlos en la extracción.

- Adaptado de **Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol **37**:911-7..

Obtención de células competentes (CaCl₂).

- Recuperar del glicerol la cepa *E. coli* de interés en LB sólido con los antibióticos apropiados.
- Inocular una colonia aislada en 10 mL de LB, incubar con agitación toda la noche (16 h aprox.)
- Subcultivar en 1 L de LB, incubar hasta fase logarítmica tardía (alrededor de 0.5 DO_{620nm})
- Incubar el cultivo en hielo por 20 min.
- **NOTA:** Incubar también todas las soluciones a emplear en hielo.
- Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender con suavidad en 250 mL de 0.1 M de MgCl₂.
- Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender con suavidad en 250 mL de 0.1 M de CaCl₂. Incubar en hielo por 20 min.
- Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender con suavidad en 50 mL de 0.1 M de CaCl₂ + 15% glicerol (vol/vol).
- Alicuotar (100 µL) en tubos eppendorf estériles enfriados previamente y depositados en hielo.
- Almacenar a -80°C.

NOTAS:

- Todos los pasos deben realizarse entre 0-4°C.
- Cuidar que el manejo de las células sea en área estéril.

Otras proporciones (en mL)									
	Cultivo inicial	1000	500	250	100	50	40	20	10
1er lavado	MgCl ₂ (0.1 M)	250	125	62.5	25	12.5	10	5	2.5
2do lavado	CaCl ₂ (0.1 M)	250	125	62.5	25	12.5	10	5	2.5
Volumen final	CaCl ₂ (0.1 M) + 15% glicerol (v/v)	50	25	12.5	5	2.5	2	1	0.5
No. de alícuotas	100 uL c/u	500	250	125	50	25	20	10	5

- **Morrison D. A.** (1977) Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. J Bacteriol **132** (1):349-351.

Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina.

- Hacer cultivos líquidos en 5 mL de medio de cultivo (con el antibiótico adecuado). Incubar con agitación por 16 horas.
- Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 200 μ L de la **Solución I** fría estéril y mezclar vigorosamente.
- Agregar 200 μ L de la **Solución II** (preparada recientemente) y mezclar por inversión de 2 a 3 veces.
- Agregar 150 μ L de la **Solución III** fría estéril y 150 μ L de **Cloroformo**, mezclar por inversión de 2 a 3 veces.
- Incubar la preparación por 5 minutos en hielo. Centrifugar por 5 min. a 13,000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y mezclar con 2 volúmenes de **Etanol absoluto** invirtiendo de 2 a 3 veces.
- Incubar a temperatura ambiente por 2 min. Centrifugar por 5 min. a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- Agregar 500 μ L de **Etanol al 70%** al pellet y mezclar suavemente. Centrifugar por 2 min. a 13,000 rpm. Desechar nuevamente el sobrenadante.
- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente con el tubo invertido sobre papel absorbente.
- Disolver el pellet en 20 μ L de buffer TE (1/10) e incubar por 5 min. a 65°C.

Composición de las soluciones.

Solución I: 50 mM Glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl [pH 8].

Solución II: 0.2 M NaOH, 1% SDS.

Solución III: 3 M Acetato de potasio, 11.5% Ácido acético glacial.

- Protocolo tomado y modificado de **Miller, J.** (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Transducción con el fago P1.

Preparar un cultivo de toda la noche (O/N) de la cepa **donadora** (3 mL en LB, con el antibiótico respectivo).

Día 1

- A. Centrifugar 1.5 mL por 1 min.
- B. Resuspender las células en 750 μL de una solución de MgSO_4 [10 mM] + CaCl_2 [5 mM].
- C. Preparar la siguiente serie de tubos:

Tubo #	Vol. cultivo (μL)	Vol. fago P1 (μL)
1	100	---
2	100	10
3	100	50
4	100	100
5	---*	10

* Adicionar 100 μL de solución MgSO_4 + CaCl_2
Agitar muy suavemente, **no vortex**.

- D. Incubar 30 min a temperatura ambiente (TA)
- E. Para cada tubo, preparar en un baño de agua (50°C aprox.) un tubo de cultivo de 19 x 150 mm con:
 - i. 5 mL de agar suave
 - ii. 40 μL MgSO_4 [1M]
 - iii. 20 μL CaCl_2 [1M]
 - iv. El contenido de cada tubo
- F. Verter en placas de LB sin antibiótico (una placa por tubo). Incubar a 37°C O/N.
- G. Preparar un cultivo O/N de la cepa **receptora**.

Día 2.

- A. Raspar el agar suave, pasar el contenido de las placas (2-4) a un tubo cónico de 50 mL.
- B. Agregar 200 μL de cloroformo. Agitar con el *vortex*.
- C. Centrifugar 6,000 rpm por 15 min a 4°C.
- D. Tomar el sobrenadante y filtrar con membrana de 0.45 μM . Alicuotar los fagos (1 mL) y almacenar a 4°C con 200 μL de cloroformo por cada vial.
- E. Repetir **Día 1** de **A** a **D** usando el cultivo de la cepa **receptora** y los fagos de la cepa **donadora**.
Después de la incubación de 30 min a TA, agregar 100 μL de citrato de sodio [1 M].
Agitar suavemente. No *vortex*.
- F. Verter todo en una placa de LB con el antibiótico apropiado. Incubar a 37°C O/N.
- G. Seleccionar colonias aisladas.
- H. Limpiar 3 veces.

Reactivos:

- MgSO_4 [10 mM] + CaCl_2 [5 mM]
- MgSO_4 [1M]
- CaCl_2 [1M]
- Citrato de Sodio [1M]

Propagación del fago P1.

Preparar un cultivo de toda la noche (O/N) de una cepa silvestre (3 mL en LB, con el antibiótico respectivo).

Día 1

- A. Centrifugar 1.5 mL por 1 min.
- B. Resuspender las células en 750 μL de una solución de MgSO_4 [10 mM] + CaCl_2 [5 mM].
- C. Preparar la siguiente serie de tubos:

Tubo #	Vol. cultivo (μL)	Vol. fago P1 (μL)
1	100	---
2	100	10
3	100	50
4	100	100
5	---*	10

* Adicionar 100 μL de solución MgSO_4 + CaCl_2
Agitar muy suavemente, **no vortex**.

- D. Incubar hasta 45 min a temperatura ambiente (TA)
- E. Para cada tubo, preparar en un baño de agua (50°C aprox.) un tubo de cultivo de 19 x 150 mm con:
 - i. 5 mL de agar suave
 - ii. 40 μL MgSO_4 [1M]
 - iii. 20 μL CaCl_2 [1M]
 - iv. El contenido de cada tubo
- F. Verter en placas de LB sin antibiótico (una placa por tubo). Incubar a 37°C O/N.

Día 2.

- I. Raspar el agar suave, pasar el contenido de las placas (2-4) a un tubo cónico de 50 mL.
- J. Agregar 200 μL de cloroformo. Agitar con el *vortex*.
- K. Centrifugar 6,000 rpm por 15 min a 4°C.
- L. Tomar el sobrenadante y filtrar con membrana de 0.45 μM .
- M. Alicuotar los fagos (1 mL) y almacenar a 4°C con 200 μL de cloroformo por cada vial.

➤ Protocolos proporcionados en el laboratorio del Dr. Adelfo Escalante (IBT-UNAM) (Febrero-2011).

Medio Mínimo de Sherwood.

Agregar a 600 mL de agua destilada estéril:

- 8.50 mL Succinato disódico [1M]
- 100 mL Glutamato monosódico [1.26%]
- 400 μ L MgSO₄ [1M]
- 2 mL Tiamina [1 mg/mL]
- 4 mL Biotina [0.1 mg/mL]
- 800 μ L CaCl₂ [0.45M]
- 500 μ L FeCl₃ *6H₂O [2% en 0.1M HCl]
- 1.30 mL Buffer de fosfatos [1M] pH 7

Aforar a 1000 mL y verter en un frasco estéril.

* Seguir las mismas indicaciones para otras proporciones:

Volumen final	500 mL	250mL	100mL	50mL	25mL
Succinato disódico	4.25 mL	2.125 mL	850 μ L	425 μ L	212.5 μ L
MgSO ₄	200 μ L	100 μ L	40 μ L	20 μ L	10 μ L
Glutamato monosódico	50 mL	25 mL	10 mL	5 mL	2.5 mL
Tiamina	1.00 mL	500 μ L	200 μ L	100 μ L	50 μ L
Biotina	2 mL	1 mL	400 μ L	200 μ L	100 μ L
CaCl ₂	400 μ L	200 μ L	80 μ L	40 μ L	20 μ L
FeCl ₃ *6H ₂ O	250 μ L	125 μ L	50 μ L	25 μ L	12.5 μ L
Buffer de fosfatos	650 μ L	325 μ L	130 μ L	65 μ L	32.5 μ L

➤ **Sherwood, M. T.** 1970. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. J Appl Bacteriol **33**:708-13.

Medio Mínimo de Robertsen

Agregar a 600 mL de agua destilada:

10 g Manitol

1.1g Glutamato monosódico

10 mL de cada una de las siguientes soluciones:

Solución 1: 30 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$

30 g/L KH_2PO_4

Solución 2: 15 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Solución 3: 5.0 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

5.0 g/L NaCl

0.6 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

Ajustar el pH a 7.5 con KOH [6N] y aforar a **1000 mL**.

Esterilizar inmediatamente en autoclave a 120°C por 20 min.

Justo antes de emplear, agregar **1mL/L** de stock de vitaminas 1000x {0.2 g/L Biotina, 0.1 g/L Pantotenato, 0.1 g/L Tiamina}

* Seguir las mismas indicaciones para otras proporciones:

Volumen final	500 mL	250mL	100mL	50mL	25mL
Manitol	5 g	2.5 g	1 g	0.5 g	0.25 g
Glutamato monosódico	0.55 g	0.275 g	0.11 g	0.055 g	0.0275 g
Cada solución stock	5 mL	2.5 mL	1 mL	500 µL	250 µL
Stock de vitaminas	500 µL	250 µL	100 µL	50 µL	25 µL

➤ **Robertsen, B. K., P. Aman, A. G. Darvill, M. McNeil, and P. Albersheim.** 1981. Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifoli*. Plant Physiol **67**:389-400..

Medio Mínimo M9.

Agregar a 750 mL de agua destilada estéril:

200 mL Stock de sales M9 (5x)

2 mL MgSO₄ [1M]

20 mL Glucosa (20%) (Esterilizada por filtración)

1 mL Tiamina (1mg/mL ó 0.1%)

1 mL CaCl₂ [0.1 M]

Aforar a 980 mL y verter en un frasco estéril.

- **Stock de sales M9 (5x):**

6.40 g Na₂HPO₄*7H₂O

1.50 g KH₂PO₄

0.25 g NaCl

0.50 g NH₄Cl

Aforar a 100 mL y esterilizar por autoclave.

* Seguir las mismas indicaciones para otras proporciones:

Volumen final	500 mL	250mL	100mL	50mL
Stock de sales M9 (5x)	100 mL	50 mL	20 mL	10 mL
MgSO ₄ [1M]	1 mL	500 µL	200 µL	100 µL
Glucosa [20%]	10 mL	5 mL	2 mL	1 mL
Tiamina (1mg/mL ó 0.1%)	500 µL	250 µL	100 µL	50 µL
CaCl ₂ [0.1M]	500 µL	250 µL	100 µL	50 µL

- Miller, J. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.





U xuul.