



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**PROTEÍNA ACARREADORA DE GRUPOS ACILO
ESPECIALIZADA USADA POR
SERINA PALMITOILTRANSFERASA PARA
SINTETIZAR ESFINGOLÍPIDOS EN *Rhodobacteria***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JONATHAN PADILLA GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. OTTO GEIGER
(CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MIGUEL A. CEVALLOS
(CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS)

DR. SEBASTIAN POGGIO
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)

CUERNAVACA, MORELOS, MARZO 2023



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.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo de tesis de Doctorado dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), se realizó en el Grupo de Interacciones entre Pro- y Eucariotas en el Programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Otto Geiger.

El proyecto fue financiado con apoyos de beca de Doctorado (574038) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 410059258. También, el trabajo recibió apoyos de DGAPA/UNAM (IN201120 y IN202223), CONACyT/México (178359 y 253549 en Investigación Científica Básica además de 118 en Investigación en Fronteras de la Ciencia).

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, por su apoyo incondicional y enorme comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Otto Geiger por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y ayudarme a crecer académicamente. Sobre todo, por implantar en mí esa visión disciplinada y rigurosa de la ciencia, pero a la vez maravillosa. Le agradezco por enseñarme a hacer ciencia de calidad y darme la confianza e independencia para llevarlo a cabo.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Miguel Ángel Cevallos y el Dr. Sebastian Poggio, por sus indispensables evaluaciones y enseñanzas durante los tutorales, que me ayudaron a lograr los objetivos planteados en el proyecto.

A la Dra. Isabel López-Lara, por sus valiosas enseñanzas y motivación para llevar a cabo los experimentos y su análisis.

Al Dr. Sergio Encarnación, así como a Sandra Contreras y Orlando Morales por su valiosa contribución al análisis de muestras proteicas generadas en el proyecto.

Al Dr. Mauro Degli-Esposti, por su actitud siempre animada y colaborativa.

A la Dra. Diana Sahonero por su valiosas enseñanzas y ánimo para realizar los experimentos.

A la Dra. Daniela García por su aporte en preparación de muestras utilizadas en el proyecto, así como sentar las bases para el inicio del mismo.

A los técnicos del grupo, Lourdes Martínez, Ángeles Moreno y Dr. Miguel Ángel Vences, por sus imprescindibles sugerencias y apoyo durante la realización de los experimentos.

A los directores del CCG, el Dr. David Romero y el Dr. Christian Sohlenkamp, por promover en el centro un ambiente excelente para hacer investigación y ciencia en todos los aspectos.

A las coordinadoras del PDCB, la Dra. Susana Brom y la Dra. Eria Rebollar, por su excelente motivación para mantener la calidad del posgrado.

A los coordinadores de la LCG, la Dra. Esperanza Martínez y el Dr. Pablo Vinuesa, por crear un ambiente idóneo para que los nuevos estudiantes entren en este mundo científico.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología Genómica.

A mis vecinos y amigos de las 'casitas', por llegar a mi vida en el momento ideal y darme ánimos y ese empujón final para lograr culminar esta etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RECONOCIMIENTO	1
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Esfingolípidos – Estructura y función	11
1.2 Biosíntesis de esfingolípidos	12
1.3 Esfingolípidos en bacterias	13
1.3.1 Estructura y función de esfingolípidos bacterianos	13
1.3.2 Genes para biosíntesis de esfingolípidos en bacterias	15
1.4 Serina palmitoiltransferasa (SPT)	18
1.4.1 SPT, una α-oxoamina sintasa (AOS)	18
1.4.2 SPTs bacterianas son homodímeros	23
1.4.3 Cavidad hidrofóbica para la unión del sustrato acil-tioéster	25
1.5 Proteína acarreadora de grupos acilo (ACP)	26
1.5.1 Estructura y función	26
1.5.2 AcpP – Biosíntesis de ácidos grasos y glicerofosfolípidos	28
1.5.3 AcpP y AcpXL – Biosíntesis del lípido A del lipopolisacárido (LPS)	30
1.5.4 NodF – Biosíntesis de factores de nodulación (Nod)	32
2. HIPÓTESIS	34
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GENERAL	34
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Artículo publicado	35
4.2 Material suplementario	55

4.2.1	Figuras suplementarias.....	55
4.2.2	Tablas suplementarias.....	66
5.	RESULTADOS ADICIONALES.....	71
5.1	Similitudes y diferencias estructurales entre AcpR y AcpP.....	71
5.2	Interacción de AasRs con ACPs.....	72
5.3	Interacción de SPTs con ACPs.....	74
5.4	Diferencias en las cavidades de unión al sustrato acil-tioéster entre las SPTs de Rhodobacterias y no-Rhodobacterias.....	76
5.5	<i>In vitro</i>, la AasR de <i>C. crescentus</i> acila selectivamente la AcpR de <i>C. crescentus</i> y la Aas de <i>V. harveyi</i> es capaz de acilar ambas AcpP de <i>C. crescentus</i> y <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	80
5.6	Tres versiones diferentes de la AasR de <i>E. coli</i> BL21(DE3) son capaces de acilar la AcpR de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	81
5.7	El contexto genómico del par AcpR-AasR en δ-proteobacterias es diferente que en <i>Rhodobacterias</i>.....	83
5.8	Otros posibles pares ACP-Aas son encontrados en δ-proteobacterias y en <i>S. meliloti</i> 1021.....	85
6.	DISCUSIÓN.....	87
6.1	La capacidad de sintetizar esfingolípidos está ampliamente distribuida en bacterias.....	87
6.2	Acil-AcpRs como sustrato novedoso de las serina palmitoiltransferasas (SPT) de <i>Rhodobacteria</i>.....	88
6.3	Funciones diversas de esfingolípidos en bacterias.....	89
7.	CONCLUSIONES.....	91
8.	PERSPECTIVAS.....	92
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias estructurales entre esfingolípidos y glicerolípidos.....	11
Figura 2. Esquema general de la biosíntesis de esfingolípidos en eucariotas.....	12
Figura 3. Estructuras de esfingolípidos en bacterias.....	14
Figura 4. Organización genómica de los genes/operones para biosíntesis de esfingolípidos en bacterias	16
Figura 5. Modelo de biosíntesis de esfingolípidos en bacterias.....	17
Figura 6. Estructura de PLP y reacciones enzimáticas de las AOS.....	18
Figura 7. Árbol filogenético no enraizado de serina palmitoltransferasas (SPTs) bacterianas y eucariotas seleccionadas, así como otras α -oxoamina sintasas de bacterias.....	19
Figura 8. Alineamiento estructural de AOS bacterianas.....	20
Figura 9. Alineamiento estructural de SPTs bacterianas.....	22
Figura 10. Estructuras 3D de los homodímeros de SPTs de <i>C. crescentus</i> y <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	24
Figura 11. Estructura de superficie del dímero de SPT de <i>C. crescentus</i> mostrando cavidad potencial para la unión del sustrato acil-tioéster.....	26
Figura 12. Grupo prostético compartido entre ACPs y CoA.....	27
Figura 13. Vías de biosíntesis y degradación de ácidos grasos en <i>E. coli</i>	29
Figura 14. Ruta de biosíntesis del dominio Kdo ₂ -lípidos A en LPS.....	31
Figura 15. Ruta de biosíntesis de los factores de nodulación (Nod) de <i>S. meliloti</i>	33
Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias entre AcpRs especializadas para biosíntesis de esfingolípidos y AcpPs.....	71
Figura 17. Conservación de estructura 3D en las ACPs.....	72
Figura 18. Interacciones entre ACS y AasR con ácidos grasos.....	73
Figura 19. Interacciones entre AasRs y ACPs.....	74
Figura 20. Interacciones entre SPTs y ACPs.....	75
Figura 21. Vías de biosíntesis de 3-oxo-esfinganina en <i>C. crescentus</i>	76
Figura 22. Estructuras de superficie de los dímeros de SPTs de <i>S. wittichii</i> y <i>S. multivorum</i> mostrando cavidades potenciales para la unión de los sustratos acil-tioésteres.....	77
Figura 23. Alineamiento de secuencias de SPTs de Rhodobacterias y no-Rhodobacterias indicando residuos posiblemente clave para su especificidad.....	78
Figura 24. Estructuras de los monómeros de SPTs de <i>C. crescentus</i> y <i>S. multivorum</i> mostrando cavidad potencial para la unión del sustrato acil-tioéster.....	79

Figura 25. Actividades enzimáticas de acil-ACP sintetetasas: AasR de <i>C. crescentus</i> y Aas de <i>V. harveyi</i>	81
Figura 26. Funcionalidad de las 3 distintas versiones de la AasR de <i>E. coli</i> para la formación <i>in vivo</i> de 3-oxo-esfinganina.....	82
Figura 27. Alineamiento múltiple de secuencias entre AasR especializadas para biosíntesis de esfingolípidos.....	84
Figura 28. Contexto genómico del par <i>acpR-aasR</i> para biosíntesis de esfingolípidos en <i>C. crescentus</i> y en δ -proteobacterias.....	85
Figura 29. Vecindad genómica de posibles pares <i>acp-aas</i> en <i>S. meliloti</i> y δ -proteobacterias.....	86

ABREVIATURAS

3-KDS: 3-ceto-dihidroesfingosina	GlcA: ácido glucurónico
3-oxo: 3-oxo-esfinganina	GlcN: glucosamina
4'-PPT: 4'-fosfopanteteína	GlcNAc: <i>N</i> -acetilglucosamina
Aas: acil-ACP sintetasa	GSL: glicoesfingolípido
AasR: Aas especializada para biosíntesis de esfingolípidos en <i>Rhodobacteria</i>	Hex: hexosa
ACA: acil-CoA <i>N</i> -aciltransferasa	HexA: ácido hexurónico
Acil-CoA: acil-coenzima A	Ino: <i>myo</i> -inositol
ACP: proteína acarreadora de grupos acilo	KDSR: 3-oxo-esfinganina reductasa
AcpR: ACP especializada para biosíntesis de esfingolípidos en <i>Rhodobacteria</i>	LCB: base de cadena larga
AcpS: holo-ACP sintasa	LPS: lipopolisacárido
ACS: acil-CoA sintetasa	Man: manosa
aep-Cer: aminoetil fosfonil-ceramida	ORF: marco de lectura abierto
AOS: α -oxoamina sintasas	PA: ácido fosfatídico
CAMPs: péptidos catiónicos antimicrobianos	PDB: Protein DataBank
CFB: grupo de <i>Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides</i>	pe-DHC: dihidroceramida fosfoetanolamina
CoA: coenzima A	PE: fosfatidiletanolamina
CPG2: dihidroceramida difosfoglicerato	pg-DHC: dihidroceramida fosfoglicerol
DAG: diacilglicerol	pi-DHC: dihidroceramida fosfoinositol
DHCD: dihidroceramida desaturasa	PLP: piridoxal-5'-fosfato
DHCerS: dihidroceramida sintasas	Pls: sintasa de fosfolípidos
FAB: biosíntesis de ácidos grasos	pm-DHC: dihidroceramida fosfomanosa
FAD: degradación de ácidos grasos	RED: reductasa/epimerasa
FAS: sintasa de ácidos grasos	SPT: serina palmitoiltransferasa
Gal: galactosa	VLCFA: ácido graso de cadena muy larga
GalA: ácido galacturónico	

RESUMEN

La enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) es una α -oxoamina sintasa (AOS) que cataliza el primer paso de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos, al condensar L-serina y palmitoil-CoA formando 3-oxo-esfinganina. Mientras que la presencia de esfingolípidos es ubicua en eucariotas, solamente algunos grupos de bacterias han sido reportados capaces de sintetizar esfingolípidos, y sus genes *spt* solo han sido identificados y caracterizados en algunas de ellas. No obstante, genes para biosíntesis de dihidroceramida podrían estar más ampliamente distribuidos en bacterias del grupo CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) y en *Proteobacteria*. Particularmente, en un grupo llamado *Rhodobacteria* (α -, β -, γ -*Proteobacterias*), el gen *spt* se encuentra siempre adyacente y formando un operón con un gen *acp* para una putativa proteína acarreadora de grupos acilo (ACP). También, junto se encuentra un gen *acs* codificante para una predicha acil-CoA sintetasa (ACS). Estos 3 genes han sido reportados ser requeridos para la biosíntesis de 3-oxo-esfinganina en *Caulobacter crescentus*; sin embargo, la actividad funcional de estos genes no había sido demostrada. En este trabajo identificamos posibles homólogos de estos genes en *Escherichia coli* BL21(DE3) y mostramos que las putativas ACPs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) poseen el grupo prostético 4'-fosfopanteteína, y pueden ser aciladas por las putativas ACSs, demostrando que son ACPs especializadas (AcpRs) que participan en la biosíntesis de esfingolípidos en *Rhodobacteria*. La predicha ACS de *C. crescentus* es incapaz de acilar CoA o AcpP, y acila específicamente AcpR, por lo tanto, es una acil-ACP sintetasa especializada (AasR). Las SPTs de *C. crescentus* y *Sphingomonas wittichii*, junto con la predicha SPT de *E. coli* BL21(DE3), son capaces de utilizar acil-AcpR como sustrato tioéster para la biosíntesis *in vivo* de 3-oxo-esfinganina, demostrando que estas 3 enzimas son SPTs. Además, estas 3 SPTs usan preferencialmente acil-AcpR, sobre acil-AcpP e incluso acil-CoA, como sustrato tioéster para la síntesis *in vitro* de 3-oxo-esfinganina. Este es el primero reporte en que un sustrato acil-tioéster no canónico, acil-AcpR, es utilizado como sustrato de una SPT. Las AasR de *C. crescentus* y de *E. coli* BL21(DE3) mostraron diferentes especificidades por distintas AcpR, y sus SPTs poseen una especificidad laxa con respecto al sustrato acil-AcpR que pueden utilizar; sin embargo, el sistema tripartito AcpR-AasR-SPT de la misma bacteria es requerido para la formación eficiente de 3-oxo-esfinganina. A diferencia de *Rhodobacteria*, donde los genes *acpR* y *spt* están siempre juntos, en algunas δ -*Proteobacterias* el gen *acpR* forma un operón con el gen *aasR*, y ambos se encuentran en un contexto genómico diferente al gen *spt* y demás implicados en la biosíntesis de esfingolípidos. Esto sugiere que la relación AcpR-AasR es más antigua que la asociación AcpR-SPT y que en algún momento de la evolución, el producto acil-ACP se asoció con la biosíntesis de esfingolípidos en bacterias. Diferentes pares ACP-Aas pueden ser encontrados en diversas bacterias, indicando su implicación en distintas vías biosintéticas.

ABSTRACT

The enzyme serine palmitoyltransferase (SPT) is an α -oxoamine synthase (AOS) that catalyzes the first step in the *de novo* sphingolipid biosynthesis, condensating L-serine and palmitoyl-CoA to form 3-oxo-sphinganine. Whilst sphingolipids are ubiquitous in eukaryotes, their occurrence has only been reported in some bacteria, and their *spt* genes have been identified and characterized in just a few of them. Nevertheless, genes for dihydroceramide biosynthesis might be more widespread in different groups of bacteria, like CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) and *Proteobacteria*. In particular, in a group named *Rhodobacteria* (α -, β -, γ -*Proteobacteria*), the *spt* gene is frequently found adjacent and forming an operon with an *acp* gene for a putative acyl carrier protein (ACP). Also, at close distance there is an *acs* gene codifying for a predicted acyl-CoA synthetase (ACS). These 3 genes have been reported to be required for 3-oxo-sphinganine synthesis in *C. crescentus*; however, their functional activity had not been demonstrated. In this work, we identified possible homologues for these genes in *E. coli* BL21(DE3) and showed that the putative ACPs from *C. crescentus* and *E. coli* BL21(DE3) contain the prosthetic group 4'-phosphopantetheine, and can be acylated by the putative ACSs, demonstrating that they are indeed specialized ACPs (AcpRs) for sphingolipid biosynthesis in *Rhodobacteria*. The predicted ACS from *C. crescentus* is unable to acylate CoA or AcpP, but specifically acylates AcpR, and therefore is a specialized acyl-ACP synthetase (AasR). SPTs from *C. crescentus* and *S. wittichii*, together with the predicted SPT from *E. coli* BL21(DE3), were able to use acyl-AcpR as thioester substrate for *in vivo* 3-oxo-sphinganine biosynthesis, demonstrating that these 3 enzymes are SPTs. Furthermore, these 3 SPTs use preferentially acyl-AcpR, over acyl-AcpP and even acyl-CoA, as thioester substrate for 3-oxo-sphinganine *in vitro* synthesis. This is the first report in which a non-canonical acyl-thioester substrate, acyl-AcpR, is utilized as substrate by a SPT. AasRs from *C. crescentus* and *E. coli* BL21(DE3) showed different specificities for distinct AcpRs, whereas their SPTs possess a relaxed specificity regarding the acyl-AcpR substrate that they can use. However, the AcpR-AasR-SPT tripartite system from the same bacterium is required for efficient 3-oxo-sphinganine formation. Unlike *Rhodobacteria*, where *acpR* and *spt* genes are always adjacent, in some δ -*Proteobacteria*s the *acpR* gene is forming an operon with the *aasR* gene, and they are both located in a different genomic context than the *spt* gene or other sphingolipid biosynthesis genes. This finding suggests that the AcpR-AasR association is older than the AcpR-SPT association and that at some moment during evolution, the acyl-ACP product was linked to sphingolipid biosynthesis in bacteria. Different ACP-Aas pairs can be encountered in several bacteria, indicating their implication in diverse biosynthetic pathways.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Esfingolípidos – Estructura y función

El término “esfingo” fue escogido de manera brillante por Johann L. W. Thudichum en su tratado de 1884 “The Chemistry of the Brain” (Thudichum, 1884) para designar una molécula enigmática, la esfingosina. Esto lo hizo en referencia a la Gran Esfinge de Guiza, Egipto y “en conmemoración a los inmensos enigmas presentados al investigador” respecto a la estructura y función de esta molécula. Afortunadamente, muchos de los enigmas de los esfingolípidos (como se denominaron más tarde esta categoría de compuestos (Carter et al., 1947)) han sido resueltos mediante estudios elegantes de su estructura y metabolismo (Merrill et al., 1997).

Los esfingolípidos están caracterizados por una cadena “esfingoide” amino alcohol alifática llamada “base de cadena larga” (LCB; de long-chain base) (**Figura 1**). La LCB está unida a un ácido graso mediante enlace amida y a un grupo cabeza polar mediante enlace éster (An et al., 2011). Los esfingolípidos tienen una cabeza polar y dos colas apolares, pero a diferencia de los glicerolípidos estos no contienen glicerol (**Figura 1A**). Los carbonos C-1, C-2 y C-3 de LCB son análogos estructuralmente a los 3 carbonos del glicerol en los glicerolípidos (**Figura 1B**). Cuando un ácido graso está unido mediante enlace amida al -NH₂ del C-2 en LCB, el resultado es ceramida, que es estructuralmente análogo a diacilglicerol (Nelson et al., 2021). La ceramida puede ser considerada como la unidad básica para todos los esfingolípidos. Diferentes grupos cabeza pueden ser añadidos al -OH del C-1 de la ceramida, generando una amplia variedad de esfingolípidos complejos.

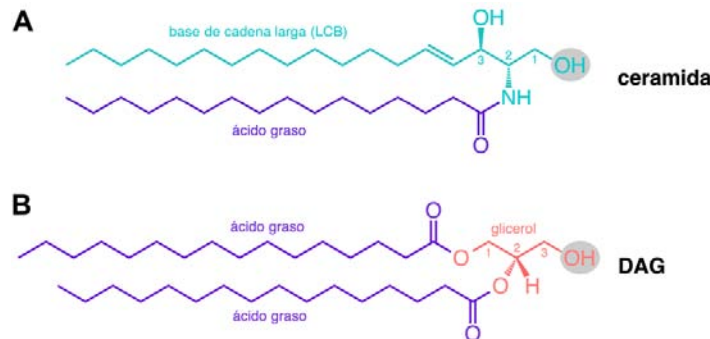


Figura 1. Diferencias estructurales entre esfingolípidos y glicerolípidos. (A) Los esfingolípidos están compuestos por una base de cadena larga (LCB; de long-chain base) (en cian) y un ácido graso (en morado) unido por enlace amida a LCB. El esfingolípidos mostrado aquí es ceramida (d18:1;C16:0). (B) Los glicerolípidos están formados por dos ácidos grasos (en morado) unidos por enlace éster a glicerol (en salmón). El glicerolípidos mostrado aquí es diacilglicerol (DAG) (C16:0;C16:0). La adición de grupos cabeza al -OH (ovalado gris) de ceramida o DAG genera esfingolípidos o glicerolípidos complejos, respectivamente.

Históricamente, las primeras clases de esfingolípidos fueron nombradas por los tejidos de los cuales fueron aislados (ej.: esfingomielinas, cerebrósidos, etc), dejando la falsa impresión de que estos compuestos eran únicos para tejidos neuronales. Sin embargo, los esfingolípidos se encuentran en todas las células eucariotas, donde son abundantes especialmente en la membrana plasmática, además de membranas del complejo de Golgi y de lisosomas (Merrill et al., 1997).

En eucariotas, los esfingolípidos son importantes componentes estructurales de membranas, y junto con el colesterol, forman microdominios llamados “balsas lipídicas” que regulan la distribución y función de proteínas membranales (Carreira et al., 2015; Coskun & Simons, 2010;

Nelson et al., 2021; Yard et al., 2007). Además, esfingolípidos como esfingosina, esfingosina-1-fosfato y ceramida tienen funciones bioactivas y son moduladores importantes de la señalización celular (Fyrst & Saba, 2010; Hannun & Obeid, 2008, 2018), participando en diversos eventos celulares como proliferación, diferenciación, senescencia, apoptosis y respuesta inmune (Hannun & Obeid, 2018; Marsolais & Rosen, 2009; Merrill et al., 1997; Rivera et al., 2008).

1.2 Biosíntesis de esfingolípidos

En eucariotas, los primeros pasos de la biosíntesis de esfingolípidos tienen lugar en la cara citosólica del retículo endoplásmico, mientras que la unión de los grupos cabeza del último paso tiene lugar en el complejo de Golgi (Futerman & Riezman, 2005). La biosíntesis ocurre en cinco etapas (Nelson et al., 2021) (**Figura 2**). Empieza con la condensación del amino ácido L-serina y acil-coenzima A (acil-CoA), formando 3-oxo-esfinganina (o 3-KDS; de 3-keto-dihydrosphingosine), CoA y CO₂ (etapa 1). Este paso es realizado por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT). Después, la 3-oxo-esfinganina reductasa (KDSR) (Futerman & Riezman, 2005; Sabourdy et al., 2008) reduce la 3-oxo-esfinganina a esfinganina, en una reacción dependiente de NAD(P)H (etapa 2). Posteriormente, una de varias dihidroceramida sintasas (DHCerS) (Lahiri & Futerman, 2007) cataliza la unión de un ácido graso, donado por un acil-CoA, en enlace amida al -NH₂ del C-2 de la esfinganina para formar *N*-acilesfinganina (dihidroceramida) (etapa 3). Luego, la dihidroceramida desaturasa (DHCD), en una reacción dependiente de NAD(P)H y O₂, genera un enlace doble entre los carbonos 4 y 5 de la esfinganina, formando *N*-acilesfingosina (ceramida) (Michel et al., 1997). Finalmente, en la etapa 5 la ceramida es modificada mediante la adición de grupos cabeza al -OH del C-1, generando un vasto reservorio de esfingolípidos complejos. El perfil de esfingolípidos (esfingolipidoma) de los organismos varía entre géneros y de hecho entre especies (Harrison et al., 2018).

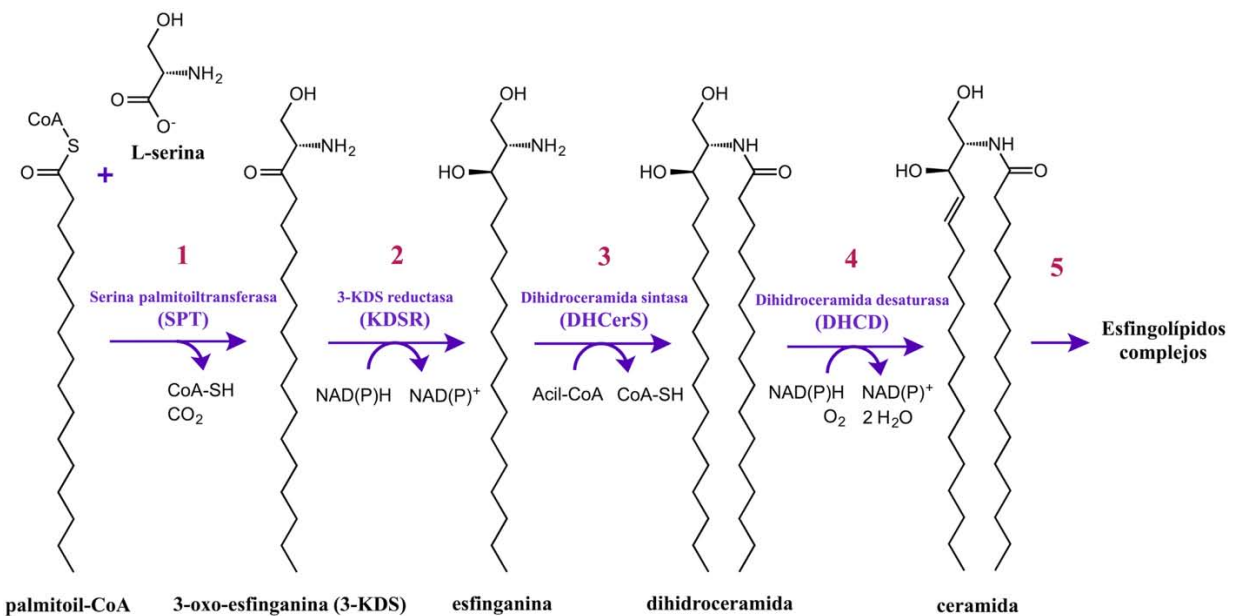


Figura 2. Esquema general de la biosíntesis de esfingolípidos en eucariotas. Los esfingolípidos de eucariotas son sintetizados en 5 etapas, catalizadas por Serina palmitoiltransferasa (SPT; 1), 3-KDS-reductasa (KDSR; 2), Dihidroceramida sintasa (DHCerS; 3), y Dihidroceramida desaturasa (DHCD; 4). En el último paso (5), la ceramida es modificada con diversos grupos cabeza para producir la amplia variedad de esfingolípidos complejos.

1.3 Esfingolípidos en bacterias

1.3.1 Estructura y función de esfingolípidos bacterianos

Los primeros reportes de esfingolípidos encontrados en bacterias fueron en *mycobacterias* (Asselineau, 1966), *Bacteroides melaninogenicus* (ahora *Prevotella melaninogenica*) (LaBach & White, 1969), y *Flavobacterium devorans* (Yamamoto et al., 1978). *F. devorans* fue reclasificado como *Pseudomonas paucimobilis* (Holmes et al., 1977), y posteriormente renombrado como *Sphingomonas paucimobilis* (Yabuuchi et al., 1990), como propuesta a que la amplia ocurrencia de esfingolípidos en estas especies debería ser un criterio importante para determinar su clasificación taxonómica. Sorprendentemente, se descubrió que *S. paucimobilis* carece de lipopolisacárido (LPS) en su membrana externa y tiene en su lugar glicoesfingolípidos como reemplazo funcional (Kawahara et al., 1991). *S. paucimobilis* contiene dos glicoesfingolípidos, uno (GLS-1) con ácido glucurónico (GlcA) y otro (GSL-4A) con el tetrasacárido manosa-galactosa-glucosamina-ácido glucurónico (Man-Gal-GlcN-GlcA) como grupo cabeza y diferentes LCB (Kawahara et al., 1991) (**Figura 3**). Estos glicoesfingolípidos en *S. paucimobilis* fueron encontrados en la membrana externa, con los residuos de azúcares expuestos hacia el exterior, sugiriendo que son componentes de la capa externa de la membrana externa (Kawasaki et al., 1994).

De manera similar, *Sphingomonas capsulata* que también carece de LPS, contiene dos glicoesfingolípidos (GSL-1 y GSL-3) que difieren en el azúcar de su grupo cabeza y en el LCB (Kawahara et al., 2000). GSL-1 de *S. capsulata* fue encontrado idéntico a GSL-1 de *S. paucimobilis*, y GSL-3 contiene el trisacárido galactosa-glucosamina-ácido glucurónico (Gal-GlcN-GlcA) como grupo cabeza (**Figura 3**). Por otro lado, *Sphingomonas wittichii* contiene dos glicoesfingolípidos (GSL-1 y GSL-1') (Kawahara et al., 2002). GSL-1 de *S. wittichii* es idéntico a GSL-1 de *S. paucimobilis* y *S. capsulata*, mientras que GSL-1' contiene ácido galacturónico (α -GalA) como grupo cabeza (**Figura 3**). Además, GSL-1 y GSL-1' pueden tener variaciones en el ácido graso amidificado (miristato [C14:0] o 2-hidroxi-miristato [C14:0(2-OH)]) y en el LCB (2-amino-1,3-octadecanediol [d18:0] o 2-amino-*cis*-13,14-metileno-1,3-eicosanediol [d20:1]) (Kawahara et al., 2002).

La variabilidad de los glicoesfingolípidos en la membrana externa de bacterias *Sphingomonadaceae* es considerable (Kinjo et al., 2008), y solo algunos de estos glicoesfingolípidos, como GSL-1, son reconocidos por las células T asesinas naturales (NKT) que proveen respuesta inmune innata contra bacterias que contienen glicoesfingolípidos (Kinjo et al., 2008; Wu et al., 2006).

En bacterias del filo *Bacteroidetes*, se han encontrado distintos tipos de fosfoesfingolípidos. Por ejemplo, en la bacteria comensal del intestino humano *Bacteroides thetaiotaomicron*, se reportaron dihidroceramida fosfoglicerol (pg-DHC) y dihidroceramida fosfoetanolamina (pe-DHC) (Kato et al., 1995), además de dihidroceramida fosfoinositol (pi-DHC) (Heaver et al., 2022) (**Figura 3**). También, en patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* se identificaron pe-DHC y pg-DHC (Kato et al., 1995). Además, en bacterias de vida libre y raramente patógenas oportunistas como *Sphingobacterium spiritivorum* y *Sphingobacterium multivorum*, es común encontrar fosfoesfingolípidos como pe-DHC, pi-DHC y dihidroceramida fosfomanosa (pm-DHC) (Naka et al., 2003).

Por otro lado, fosfoesfingolípidos pi-DHC y pe-DHC también han sido encontrados en las δ -proteobacterias *Myxococcus xanthus* y *Myxococcus stipitatus* (Lorenzen et al., 2014). pe-DHC, glucosil-ceramida, y aminoetil fosfonil-ceramida (aep-Cer) han sido reportados en *Sorangium cellulosum* (Keck et al., 2011). Además, *Bacteriovorax* (antes *Bdellovibrio*) *stolpii*, que vive como parásito en el espacio periplásmico de bacterias Gram-negativas grandes, contiene un amplio espectro de fosfoesfingolípidos como aep-Cer (Jayasimhulu et al., 2007).

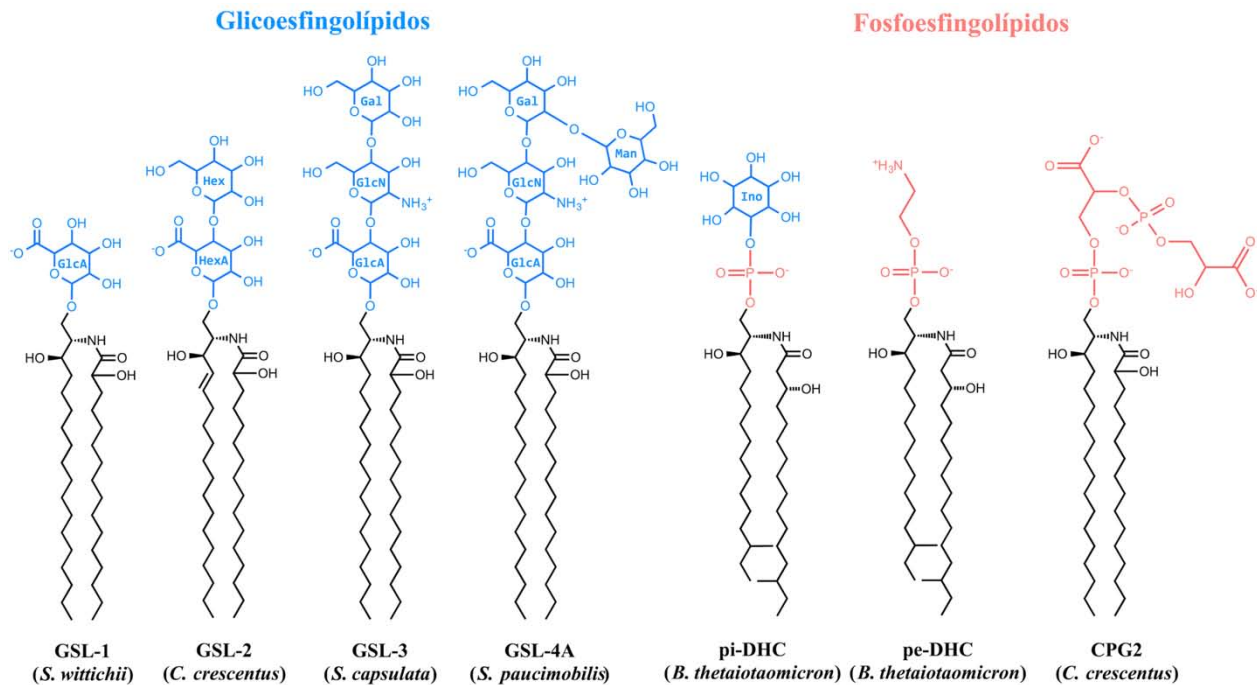


Figura 3. Estructuras de esfingolípidos en bacterias. Se muestran ejemplos de algunos glicosfingolípidos y fosfoesfingolípidos bacterianos. Los glicosfingolípidos contienen distintos azúcares como grupos cabeza (en azul): Glicosfingolípidio 1 (GSL-1) de *Sphingomonas wittichii*, Glicosfingolípidio 2 (GSL-2) de *Caulobacter crescentus*, Glicosfingolípidio 3 (GSL-3) de *Sphingomonas capsulata*, Glicosfingolípidio 4A (GSL-4A) de *Sphingomonas paucimobilis*. Los fosfoesfingolípidos contienen distintos grupos fosforilados como grupo cabeza (en salmón): dihidrocaramida fosfoinositol (pi-DHC) y dihidrocaramida fosfoetanolamina (pe-DHC) de *Bacteroides thetaiotaomicron*, y dihidrocaramida difosfoglicerato (CPG2) de *C. crescentus*. Abreviaturas de los azúcares: Gal: galactosa; GlcA: ácido glucurónico; GlcN: glucosamina; Hex: hexosa; HexA: ácido hexurónico; Ino: *myo*-inositol; Man: manosa. El esquema estructural representado de GSL-2 es para fines ilustrativos; la orientación de algunos grupos hidroxilos no ha sido determinada. En todas las estructuras, el esqueleto de dihidrocaramida (en negro) puede tener variaciones tanto en el LCB como en el ácido graso amidificado.

Otras bacterias, por ejemplo del género *Acetobacter*, que son productoras de vinagre, contienen tanto LPS como esfingolípidos en su membrana externa. En *Acetobacter malorum*, se incrementa el contenido del esfingolípidio dihidrocaramida al crecer la bacteria en condiciones de pH ácido o temperaturas altas (Ogawa et al., 2010), similar a lo observado para el eucariota unicelular *Saccharomyces cerevisiae* (Dickson et al., 1997; Patton et al., 1992; Wells et al., 1998). Esto sugiere que la síntesis de esfingolípidos podría estar involucrada en la tolerancia a distintos tipos de estrés en bacterias, en las cuales el LPS es parcialmente reemplazado por esfingolípidos. Por otra parte, en la bacteria productora de etanol *Zymomonas mobilis*, la síntesis del glicosfingolípidio GSL-1 podría estar implicada en la tolerancia a altas concentraciones de etanol (Tahara & Kawazu, 1994).

En la α -proteobacteria *Caulobacter crescentus*, el glicoesfingolípido hexosil-hexuronosil-ceramida (HexHexA-Cer o GSL-2) se sintetiza en limitación de fosfato (Stankeviciute et al., 2019) y el fosfoesfingolípido dihidroceramida difosfoglicerato (CPG2), reemplaza al LPS, ante la sensibilidad a péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) (Zik et al., 2022) (**Figura 3**).

1.3.2 Genes para biosíntesis de esfingolípidos en bacterias

Análisis bioinformáticos de genomas de bacterias mostraron que varias de ellas poseen posibles genes homólogos para la biosíntesis de esfingolípidos (**Figura 4**). Tanto en α -, β -, γ -, y δ -*Proteobacterias*, como en bacterias del grupo de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), se encontraron tres genes homólogos a los que catalizan los primeros tres pasos de la biosíntesis de esfingolípidos en eucariotes (**Figuras 2 y 4**). Estos genes codifican para predichas serina palmitoiltransferasa (SPT), reductasa/epimerasa (RED), y acil-CoA *N*-aciltransferasa (ACA). Además, dos genes, que codifican putativas proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) y acil-CoA sintetasa (ACS) se encuentran en todas ellas. No obstante, homólogos de estas ACP y ACS no han sido encontrados en bacterias del grupo CFB. Interesantemente, en el subgrupo de bacterias llamadas *Rhodobacteria*, un subfilum de las bacterias Gram-negativas que incluye α -, β -, y γ -*Proteobacterias*, este gen *acp* se encuentra adyacente a su gen *spt* (Geiger et al., 2010; Raman et al., 2010) (**Figura 4**). Por otro lado, en δ -*Proteobacterias*, este gen *acp* se encuentra junto al gen *acs*; sin embargo, ambos localizados en una región diferente al contexto de biosíntesis de esfingolípidos (**Figura 4**).

La habilidad para sintetizar esfingolípidos en bacterias podría estar más extendida en miembros de dos fila principales, los *Bacteroidetes* y las *Proteobacteria*, que lo pensado previamente (Geiger et al., 2019). En eucariotes, el primer paso en la biosíntesis de esfingolípidos es catalizado por la SPT y consiste en la formación de 3-oxo-esfinganina, mediante la condensación descarboxilativa de L-serina y acil-CoA. Sin embargo, en bacterias, estos pasos iniciales en la biosíntesis del intermediario 3-oxo-esfinganina podrían ser diferentes. En nuestro modelo (**Figura 5**), la predicha acil-CoA sintetasa (ACS) sería en realidad una acil-ACP sintetasa (Aas) que activaría ácidos grasos libres uniéndolos en enlace tioéster a la putativa proteína acarreadora de grupos acilo (ACP), en una reacción dependiente de ATP. Posteriormente, la serina palmitoiltransferasa (SPT) catalizaría la condensación descarboxilativa del aminoácido L-serina y el acil-ACP, formando el intermediario 3-oxo-esfinganina. La reductasa (RED) dependiente de NAD(P)H reduciría el grupo oxo del C-3 de la 3-oxo-esfinganina a hidroxilo, formando esfinganina. La *N*-acil transferasa (ACA) catalizaría la transferencia de un ácido graso, utilizando como donador acil-CoA, en enlace amida a esfinganina, formando el esqueleto de dihidroceramida (Olea-Ozuna et al., 2021). Alternativamente, la ACA transferiría el ácido graso directamente a 3-oxo-esfinganina, formando ceramida oxidada (oxiceramida), la cual sería posteriormente reducida por la RED a dihidroceramida (Stankeviciute et al., 2022). Finalmente, la dihidroceramida sería modificada por diversas enzimas, añadiendo distintos grupos cabeza, para generar la amplia variedad de esfingolípidos complejos encontrados en bacterias (**Figuras 3 y 5**).

Estudios de la biosíntesis de esfingolípidos en *C. crescentus* identificaron el gen codificante para SPT (Stankeviciute et al., 2019), y para sus predichas ACP, ACS, RED y ACA (Olea-Ozuna et al., 2021). Estos 5 genes son requeridos para la formación de dihidroceramida (Olea-Ozuna et al., 2021; Stankeviciute et al., 2022) y la expresión combinada de SPT, ACP y ACS es requerida para la formación del intermediario 3-oxo-esfinganina en *E. coli* (Olea-Ozuna et al., 2021).

Además, estos 5 genes estructurales son requeridos para la aptitud (fitness) (Christen et al., 2011), la supervivencia y la resistencia a detergentes por *C. crescentus* (Olea-Ozuna et al., 2021).

Sorprendentemente, homólogos a estos 5 genes codificantes para SPT, ACP, ACS, RED y ACA, requeridos para la formación de dihidroceramida, son encontrados en el genoma de la γ -proteobacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) (Figura 4), una cepa utilizada comúnmente para expresión heteróloga de proteínas (Jeong et al., 2015). Aunque un buen homólogo de SPT en *E. coli* BL21(DE3) ya ha sido reportado (Geiger et al., 2019), no se han identificado esfingolípidos en esta bacteria, y los genes involucrados no han sido estudiados.

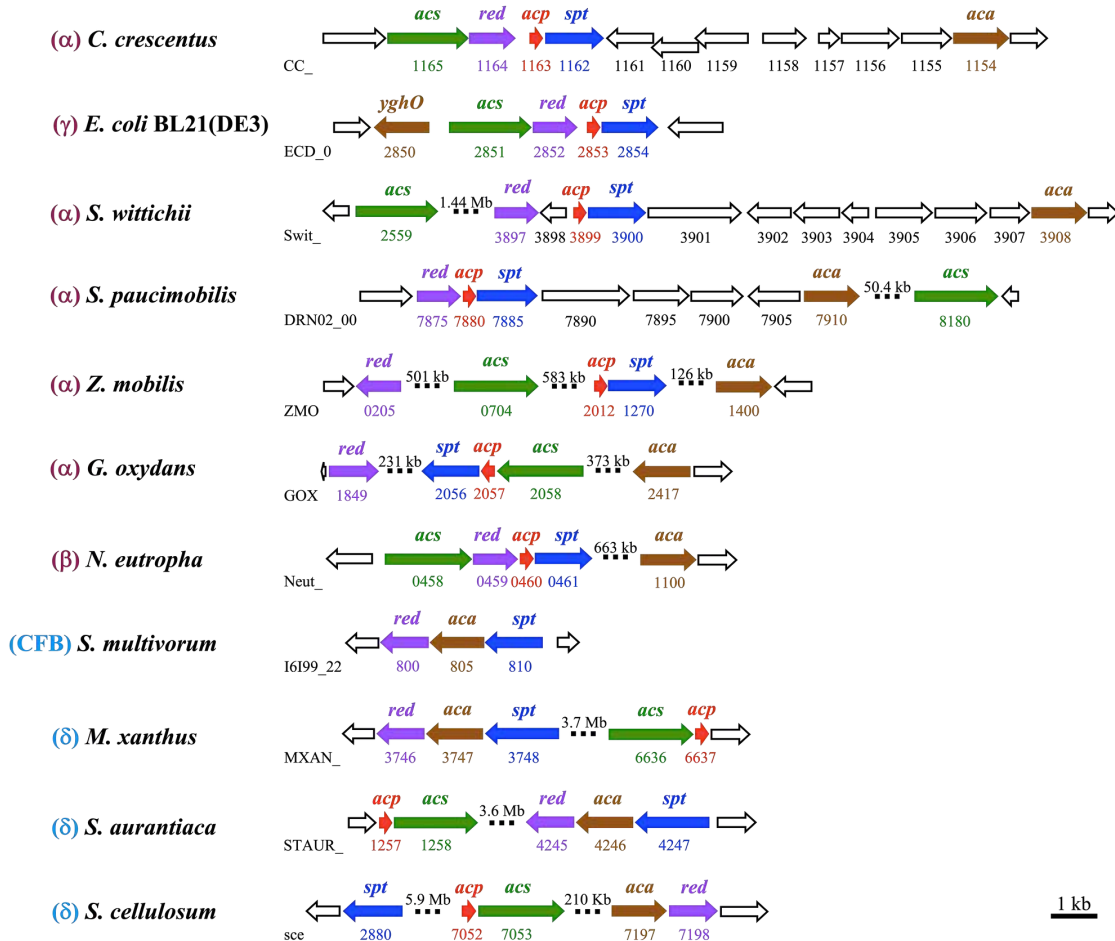


Figura 4. Organización genómica de los genes/operones para biosíntesis de dihidroceramida en bacterias. Se muestran operones que contienen genes posiblemente implicados en la biosíntesis de esfingolípidos de *Rhodobacteria* (en rojo oscuro): *Caulobacter crescentus* CB15 (α), *Escherichia coli* BL21(DE3) (γ), *Sphingomonas wittichii* RW1 (α), *Sphingomonas paucimobilis* AIMST S2 (α), *Zymomonas mobilis* ZM4 (α), *Gluconobacter oxydans* 621H (α), y *Nitrosomonas eutropha* C91 (β); de δ -proteobacterias (en azul claro): *Myxococcus xanthus* DK 1622, *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, y *Sorangium cellulosum* So ce56, y del Bacteroidete (grupo CFB) (*Sphingobacterium multivorum* FDAARGOS_1142). Tres genes (*acp*: proteína acarreadora de grupos acilo; *acs*: acil-CoA sintetasa; y *spt*: serina palmitoiltransferasa) requeridos para la biosíntesis del precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfingánina, están resaltados en rojo, verde, y azul, respectivamente. Además, dos genes (*red*: predicha reductasa/epimerasa; y *aca*: acil-CoA N-aciltransferasa) requeridos para la síntesis de dihidroceramida están resaltados en lila y café, respectivamente. Distancias genómicas grandes están indicadas con barras interrumpidas y se indica la distancia respectiva. (Figura modificada de (Padilla-Gómez et al., 2022)).

Aunque se ha demostrado que palmitoil-CoA puede servir como sustrato para la SPT de *S. paucimobilis* (Raman et al., 2009), *S. wittichii* (Raman et al., 2010), y *C. crescentus* (Stankeviciute et al., 2022), es posible que la forma acilada de la ACP encontrada adyacente a SPT en el genoma de *Rhodobacteria* sea el sustrato tioéster preferido de la SPT. Si este es el caso, se trataría de una ACP especializada en la biosíntesis de esfingolípidos en *Rhodobacteria*, por lo que hemos propuesto llamarle AcpR. Asimismo, a la acil-ACP sintetasa encargada de acilar esta AcpR proponemos llamarle AasR. Este par AcpR/AasR junto con SPT son requeridos para la formación de 3-oxo-esfinganina en *C. crescentus* (Olea-Ozuna et al., 2021). Esta forma intrincada de síntesis de 3-oxo-esfinganina parece ser común en miembros de las *Rhodobacteria* y el gen estructural *aasR* está localizado en la vecindad cercana del operón *acpR-spt*. Sin embargo, en las *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*, *Zymomonas*), *aasR* está esparcido en distintas partes de sus genomas. Por otro lado, los cinco genes estructurales para la biosíntesis de dihidroceramida en *Rhodobacteria* están agrupados cercanamente sólo en los genomas de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) (**Figura 4**).

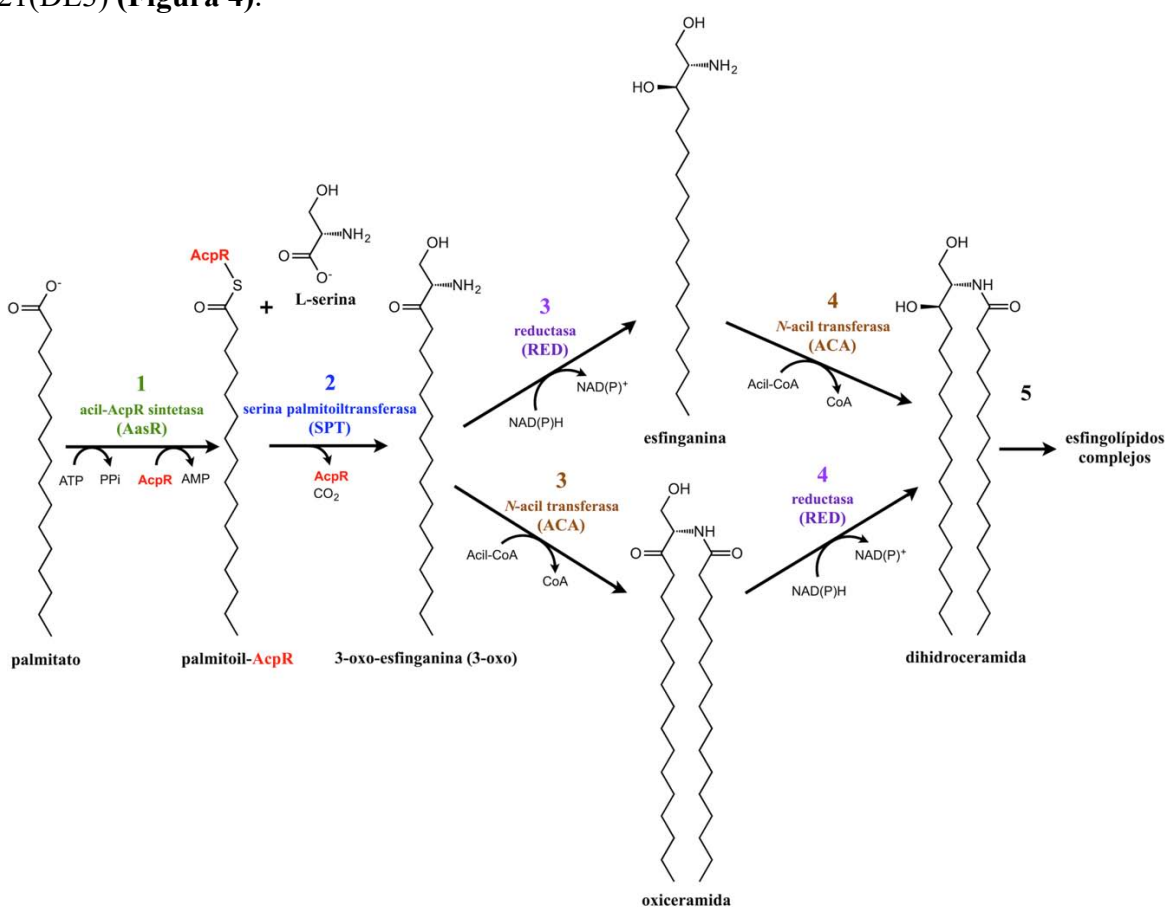


Figura 5. Modelo de biosíntesis de esfingolípidos en bacterias. La predicha acil-CoA sintetasa (ACS) es en realidad una acil-ACP sintetasa ([1]AasR; en verde) que esterifica un ácido graso en la putativa proteína acarreadora de grupos acilo (AcpR; en rojo). La serina palmitoiltransferasa ([2]SPT; en azul) utiliza este acil-ACP junto con el aminoácido L-serina para formar el intermediario en la biosíntesis de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina. Posteriormente, la reductasa ([3]RED; en lila) reduciría 3-oxo-esfinganina a esfinganina, y la *N*-acil transferasa ([4]ACA; en café) transferiría un ácido graso a esfinganina, en enlace amida, formando dihidroceramida. Alternativamente, la *N*-acil transferasa ([3]ACA; en café) transferiría un ácido graso directamente a 3-oxo-esfinganina, en enlace amida, formando oxiceramida. A su vez, la reductasa ([4]RED; en lila) reduciría oxiceramida a dihidroceramida. En el paso final [5], el esqueleto de dihidroceramida es modificado por diversos grupos cabeza, generando la amplia variedad de esfingolípidos complejos.

1.4 Serina palmitoiltransferasa (SPT)

1.4.1 SPT, una α -oxoamina sintasa (AOS)

La enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) cataliza el primer paso en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos. La reacción consiste en una condensación descarboxilativa tipo Claisen del amino ácido L-serina y una acil-Coenzima A (acil-CoA) formando el primer intermediario en la biosíntesis de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina, una α -oxoamina (Kerbarh et al., 2006). La SPT es un miembro de la familia de enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) conocidas como α -oxoamina sintasas (AOS) (**Figura 6**). Las AOS pertenecen a la subfamilia tipo-1 de la superfamilia de enzimas dependientes de PLP (**Figura 6A**). Otras AOS son 8-amino-7-oxononanoato sintasa (BioF), que cataliza la formación de 8-amino-7-oxononanoato a partir de 6-carboxihexanoil-CoA y L-alanina durante la biosíntesis de biotina (Webster et al., 2000), 5-aminolevulinato sintasa (HemA) que cataliza la formación de 5-aminolevulinato a partir de succinil-CoA y glicina durante la biosíntesis de tetrapirrol y grupo hemo en α -proteobacterias (Astner et al., 2005), y 2-amino-3-oxobutirato coenzima A ligasa (Kbl) que rompe 2-amino-3-oxobutirato en acetil-CoA y glicina durante la degradación de treonina (Kerbarh et al., 2006) (**Figura 6B**).

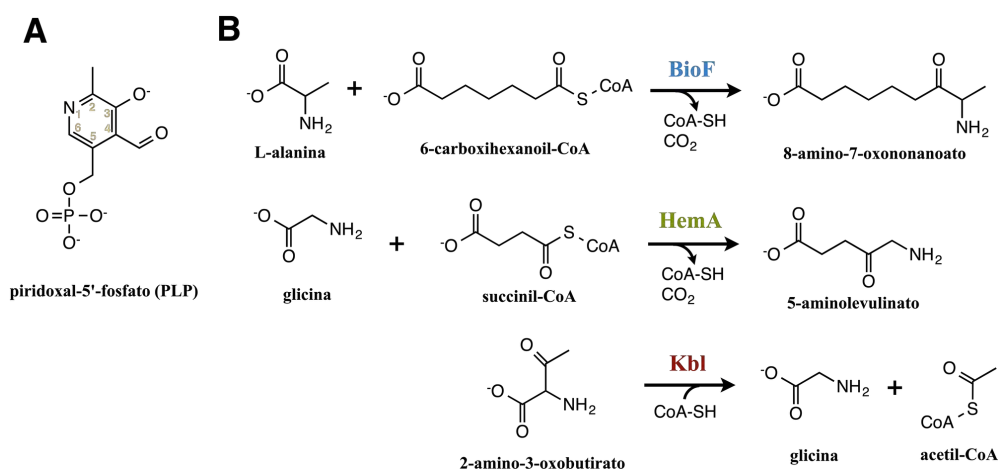


Figura 6. Estructura de PLP y reacciones enzimáticas de AOS. Se muestra la estructura de piridoxal-5'-fosfato (PLP) (**A**) y las reacciones enzimáticas catalizadas por las α -oxoamina sintasas (AOS) (**B**): 8-amino-7-oxononanoato sintasa (BioF), 5-aminolevulinato sintasa (HemA), y 2-amino-3-oxobutirato coenzima A ligasa (Kbl).

Un análisis filogenético de AOS bacterianas muestra que las SPTs bacterianas forman un grupo distinto a las demás AOS (**Figura 7**). Además, las SPTs bacterianas divergen claramente de las SPTs de eucariotas, que forman un grupo diferente. Aunque en un estudio se sugirió que las SPTs homodiméricas del protozooario parásito eucariota *Toxoplasma gondii* agrupan más cercano a las SPTs de bacterias que con ortólogos de animales, plantas y fungi (Mina et al., 2017), nuestro árbol filogenético no soporta esta idea (Geiger et al., 2019) (**Figura 7**). Por otro lado, posiblemente existen al menos dos subgrupos distintos de SPTs bacterianas (Geiger et al., 2019). Un subgrupo incluye SPTs del grupo CFB (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Sphingobacterium multivorum*, *Porphyromonas gingivalis*) y las δ -Proteobacteria (*Bacteriovorax stolpii*, *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Sorangium cellulosum*), mientras que el otro subgrupo incluye miembros de las Rhodobacteria (α -, β -, y γ -Proteobacterias). Por ejemplo, este último subgrupo de SPTs ocurre en las α -Proteobacteria *Caulobacter crescentus*, *Gluconobacter oxydans*, *Sphingomonas*

wittichii, *Sphingomonas paucimobilis*, y *Zymomonas mobilis*, en la β -Proteobacterium *Nitrosomonas eutropha*, y en la γ -Proteobacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). Las SPTs de *Rhodobacteria* claramente agrupan juntas en árboles filogenéticos (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2019), y sus genes estructurales están precedidos usualmente por un gen que codifica para una ACP putativa (Geiger et al., 2010; Raman et al., 2010) (Figura 7). Dentro de los filos bacterianos conocidos, genes para SPT sólo han sido encontrados en miembros de las *Proteobacterias* (α , β , γ , δ) y los *Bacteroidetes*, lo cual coincide bastante bien con ocurrencia reportada de esfingolípidos en estos fila.

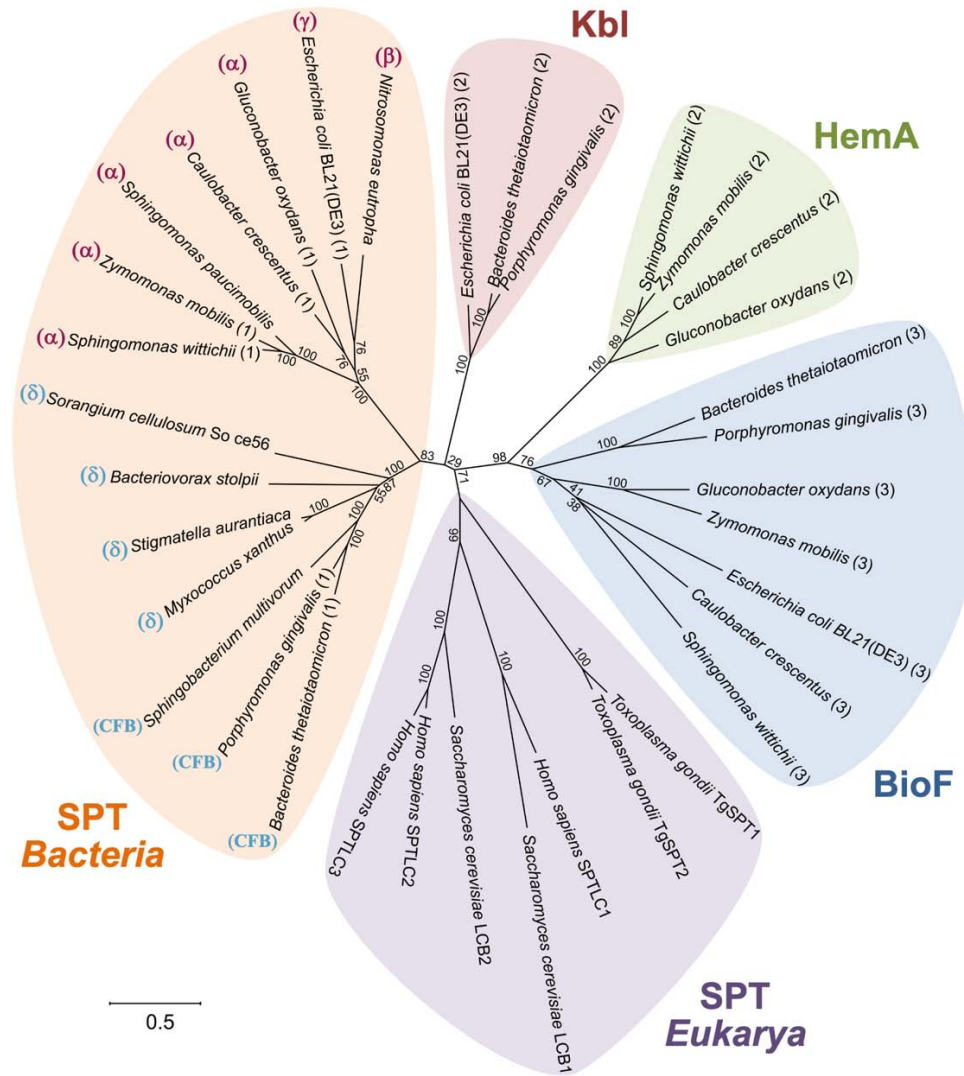


Figura 7. Árbol filogenético no enraizado de serina palmitoiltransferasas (SPTs) bacterianas y eucariotas seleccionadas, así como otras α -oxoamina sintasas de bacterias. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas usando el programa CLUSTALX (<http://www.expasy.ch/>). Los parámetros de apertura y extensión de gaps se ajustaron a 10 y 0.1, respectivamente. El árbol fue construido utilizando el programa MEGA X (<http://www.megasoftware.net/>), utilizando el método de máxima verosimilitud. Las distancias entre las secuencias están expresadas como 0.5 cambios por residuo de aminoácido. El número en cada nodo representa el valor de bootstrap como porcentaje de 100 réplicas. Se muestran los subgrupos de las distintas AOS son: SPT *Bacteria*, SPT *Eukarya*, BioF, HemA, y Kbl. Para las SPTs, se indica el grupo al que pertenecen las bacterias: *Rhodobacteria* (α -, β -, y γ -*Proteobacterias*; en rojo), y δ -*Proteobacteria* y CFB (en azul) (Figura modificada de (Geiger et al., 2019)).

Además de compartir similitudes en secuencia de amino ácidos, las AOS poseen plegamientos estructurales 3D y mecanismos enzimáticos similares (**Figura 8**). Sin embargo, el mecanismo catalítico específico para cada AOS está altamente influenciado por la manera en que la enzima une al cofactor PLP y a los sustratos dentro del plegamiento catalítico. Alineamiento de las estructuras cristalográficas de la SPT de *Sphingomonas paucimobilis* (PDB: 2JG2; 1.3 Å), HemaA de *Rhodobacter capsulatus* (PDB: 2BWN; 2.1 Å), y Kbl (PDB: 1FC4; 2.0 Å) y BioF de *Escherichia coli* (PDB: 1DJE; 1.71 Å) muestran la topología general conservada entre las AOS (**Figura 8A**). El plegamiento de las AOS se parece a una mano formando un puño con el pulgar hacia arriba (**Figura 8A**).

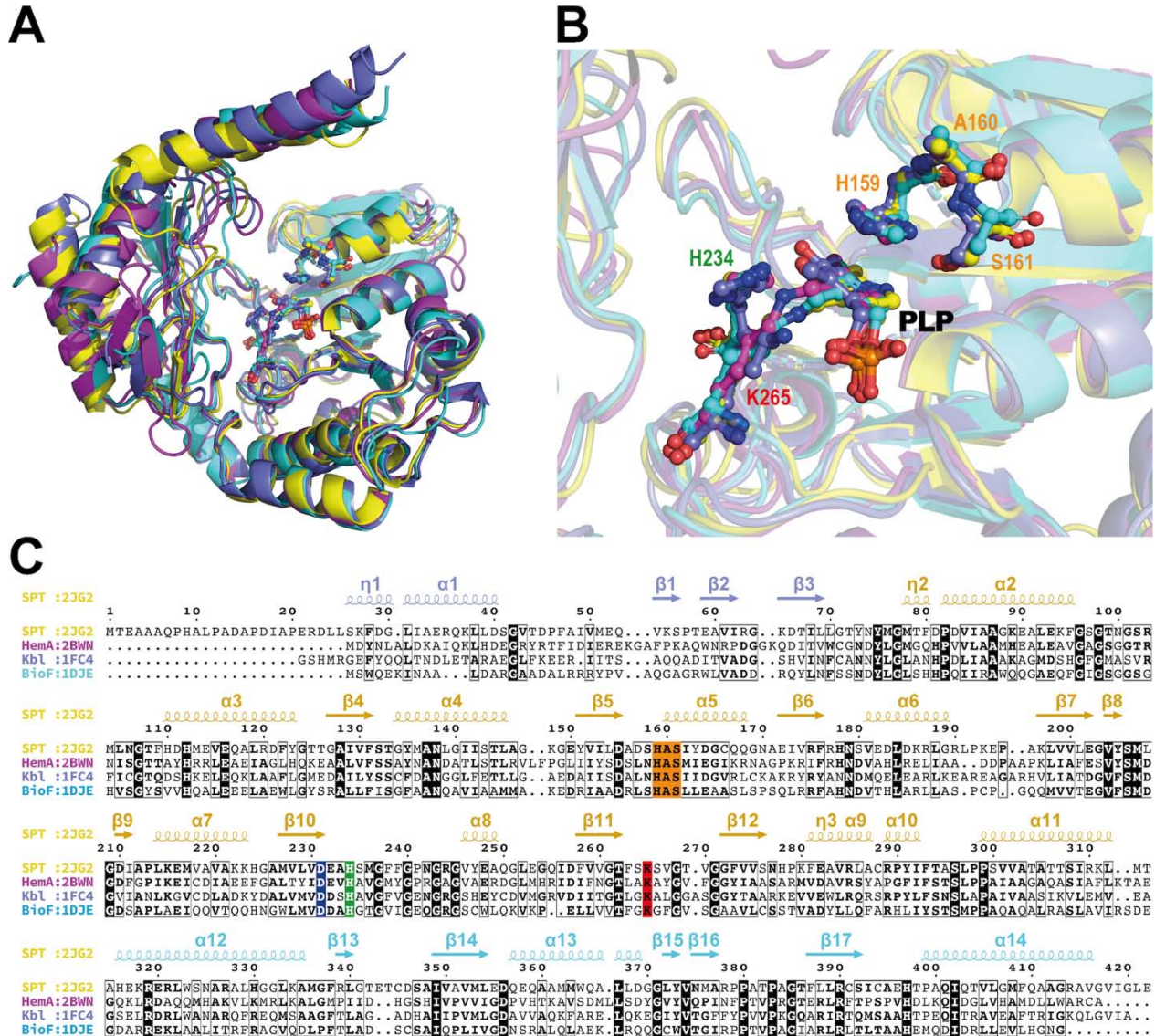


Figura 8. Alineamiento estructural de AOS bacterianas. (A) Alineamiento general de los monómeros de las AOS. La estructura de SPT (2JG2) está mostrada en amarillo, de HemaA (2BWN) en magenta, de Kbl (1FC4) en azul, y de BioF (1DJE) en cian. (B) Residuos de aminoácidos clave para la unión del cofactor PLP: His159, Ala160, Ser161, His234, and Lys265 (numeración de SPT) están mostrados en forma balls & sticks, y coloreados por átomo y acorde con la estructura de la enzima correspondiente (mismo esquema de coloración que en (A)). La nomenclatura de los

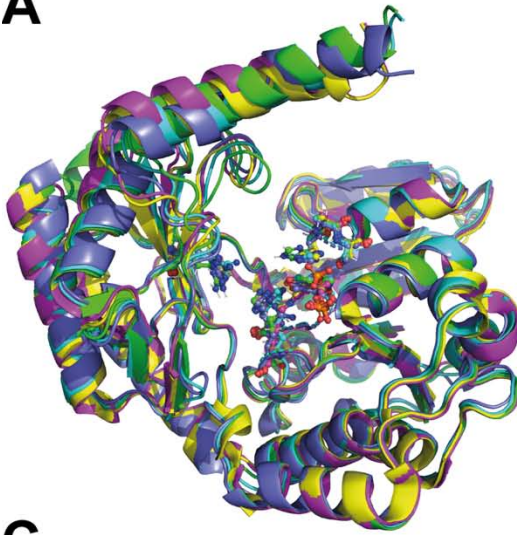
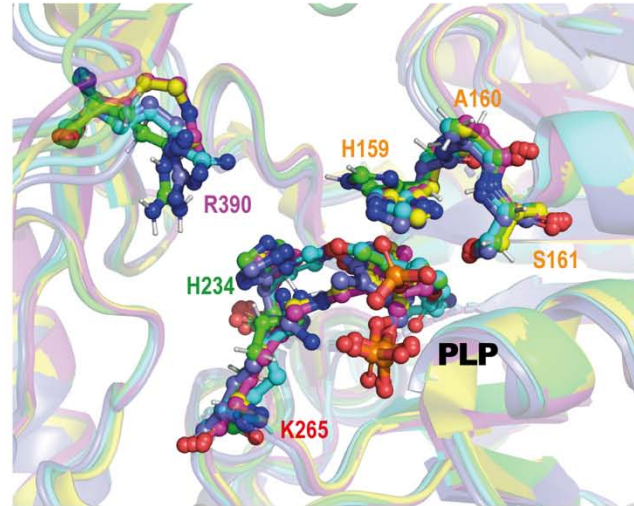
residuos de aminoácidos está mostrada en código de una letra. (C) Alineamiento de secuencias basado en estructuras de las cuatro enzimas AOS. El motivo (His, Ala, Ser) conservado está mostrado en naranja, el residuo Asp231 conservado que interactúa con N1 de PLP está en azul, la His234 conservada e implicada en la unión de PLP está resaltada en verde, y el residuo del sitio activo Lys265 conservado está mostrado en rojo. Elementos estructurales secundarios (basado en la estructura de SPT) están mostrados en la parte superior del alineamiento y coloreados de acuerdo al dominio al que pertenecen: N-terminal (en lila), catalítico central (en beige) y C-terminal (en cian).

En la estructura de las AOS, el cofactor PLP está unido covalentemente a una lisina conservada (Lys265 en la SPT de *S. paucimobilis*) como una aldimina interna/base Schiff, y el sitio activo está compuesto de residuos de aminoácidos conservados entre las distintas AOS (**Figura 8B**). En la SPT, el PLP hace contacto con las cadenas laterales de los residuos Asn138, Asp231, His234 y Thr262, y con las cadenas principales de Gly34 y Tyr135. Además, la His159 se posiciona arriba de una cara del anillo de piridina del PLP. Este residuo está localizado al inicio del motivo His159, Ala160, y Ser161, el cual está conservado estrictamente entre las AOS (**Figura 8C**). El plegamiento estructural de las AOS consiste en 3 dominios conservados (N-terminal, catalítico central, y C-terminal) (Harrison et al., 2018).

Aunque el mecanismo catalítico es similar entre las AOS, usando datos mecanísticos de miembros de la familia se propuso un mecanismo catalítico para SPT. Evidencias para estas propuestas han sido obtenidas por los recientes estudios estructurales y mecanísticos de distintas SPTs bacterianas. La primera SPT bacteriana que se purificó hasta la homogeneidad fue la SPT de *Sphingomonas paucimobilis* (Ikushiro et al., 2001). Esta SPT tiene 30% de identidad con otros miembros de las AOS y contiene el residuo de lisina (Lys265) conservado para la unión del cofactor PLP. Esta SPT recombinante fue aislada de *E. coli* como un homodímero soluble y une una molécula de PLP por subunidad (Ikushiro et al., 2001). La primera estructura cristalográfica de una SPT fue la de *S. multivorum* con el cofactor PLP unido (Ikushiro et al., 2006). La primera estructura de una SPT asociada al Protein DataBank (PDB) detallando las coordenadas de rayos-X fue la SPT de *S. paucimobilis* (Yard et al., 2007). A partir de entonces se han reportado varias estructuras cristalográficas de SPTs de distintas *Sphingomonas* como *Sphingobacterium multivorum* (PDB: 3A2B) (Ikushiro et al., 2009) y *Sphingomonas wittichii* (PDB: 2X8U) (Raman et al., 2010).

Un alineamiento de las estructuras cristalográficas reportadas en el PDB de la SPT de *Sphingomonas paucimobilis* (PDB: 2JG2; 1.3 Å), *Sphingomonas wittichii* (PDB: 2X8U; 2.1 Å), y *Sphingobacterium multivorum* (PDB: 3A2B; 2.3 Å), junto con predicciones de estructuras 3D, obtenidas con i-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), de las SPT de la α -*Proteobacterium Caulobacter crescentus* y de la γ -*Proteobacterium Escherichia coli* BL21(DE3) muestra la topología general conservada entre las SPTs (**Figura 9**). El plegamiento que asimila a una mano formando un puño con el pulgar hacia arriba está conservado entre las distintas SPTs (**Figura 9A**).

En la estructura de las SPTs, el cofactor PLP está unido covalentemente a una lisina conservada (Lys265 en la SPT de *S. paucimobilis*) como una aldimina interna/base Schiff, y el sitio activo está compuesto de residuos de aminoácidos conservados entre las distintas SPTs (**Figura 9B**). El motivo His159, Ala160, Ser161, con la His159 mayormente implicada en el reconocimiento de sustratos y catálisis de la SPT, los residuos Asp231 y His234 implicados en la interacción con PLP, y el residuo catalítico Arg390 están todos conservados entre las distintas SPTs (**Figura 9B**).

A**B****C**

S. paucimobilis

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90

$\eta 1$ $\alpha 1$ $\beta 1$ $\beta 2$ $\beta 3$ $\eta 2$ $\alpha 2$

S. paucimobilisMTEAAQPHAL.....PADAPDIAAPERDLRSLRFDGLIAERQKLLDSGVTFDPAIVMEQVKSPTFAVIRGKDTLILGYNVCMGFPPDDVIAAGKALEKFF

S. wittichiiMADLLSKFDPLIAERALLATGVRDPYAVIMKVLSPTEAMINGRRTKTIILGYNVCMGFPPDDVIAAGKALEKFF

S. multivorumMSKGLGKIKISQFKIVEE..LRAKGLYAFRFIQSKQ..DTEVKKIDGRRVLMFSGNSVYLGLTDTDRRIKAAQDALEKYG

C. crescentusMGLFDKHLAYRDAYKAIQD..VGNANPKVRFDAVHSPTGVVDRPTILLGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

E. coli BL21(DE3)MGLYDKYARLAGERLQF..SDNGLTPPGTCIDEVYSATEGRIGNKVVILAGTNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

N. eutrophaMNLLEKIDAAAAARKA..QLPEGLAAGFIPIDESYSATEARIGERRVLMGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

G. oxydansMTDFAKGQLREATEGLTAASRNPFVVIERTISASVIGIEGREFLLGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

Z. mobilisNQVTLDFSKFDPLIAIRKEMLSHGGRDPPAVVMEKVLSPTEAKIKKGGYNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

P. gingivalisMGLLQDLKLAQYTPQK..AAQAGIYVYFRKIESDQ..DTEVVIDGRRVLMFSGNSVYLGLTDTDRRIKAAQDALEKYG

B. thetaiotaomicronMKHNLQDNLQGEQMANNSNGGKPFSDAKIIERANL..LRDNDLYFFRAIEETE..ASTVIVKGGKQIMIGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

B. stoptiiMKHNLQDNLQGEQMANNSNGGKPFSDAKIIERANL..LRDNDLYFFRAIEETE..ASTVIVKGGKQIMIGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

S. aurantiacaMHAAPPWCSRLDRAAHRPLQT..APGSPNDRR..TMSDVFDDKCRSWKDYRI..AKAAGIYVYFRSIEASHGATEVEIEGRRVIMVGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

M. xanthusMSDVFDDKCRSWKDYRI..AKAAGIYVYFRSIEASHGATEVEIEGRRVIMVGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

$\alpha 3$ $\beta 4$ $\alpha 4$ $\beta 5$ $\beta 6$ $\alpha 5$ $\alpha 6$ $\beta 7$ $\beta 8$

S. paucimobilis SCNNGSRNLNGTTHDHEVQALRDFYGTGTAIVVFSPCQMANLGMISTLAGKGGYVILDADSHASIVDGCQGNABIVFRFHSVEDDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

S. paucimobilis SCNNGSRNLNGTTHDHEVQALRDFYGTGTAIVVFSPCQMANLGMISTLAGKGGYVILDADSHASIVDGCWLDGAEIVFRFHSVEDDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

S. wittichii SCNNGSRNLNGTTHDHEVQALRDFYGTGTAIVVFSPCQMANLGMISTLAGKGGYVILDADSHASIVDGCWLDGAEIVFRFHSVEDDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

S. multivorum TGCAGSRNLNGTLDHVELEKELSAVYVGEAAIILFSCGQSNLGLPSSCLMGRNDIILDERDASHASIVDGRSLFSKVIKYGHNNDPDRRAKLSRLPDE..SAKLICTGICFISM

C. crescentus TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

E. coli BL21(DE3) TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

N. eutropha TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

G. oxydans TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

Z. mobilis TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

P. gingivalis TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

B. thetaiotaomicron TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

B. stoptii TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

S. aurantiaca TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

M. xanthus TGTGTSRNLNGSFSHVLELQELAKFYGRKHAMVFTGQYANLGLVSLTLVGRGDIILDADSHASIVDGRSLRGLHAEVIRFRHNDPDKRRLGRIPKPEA..KLVVLEGGVYSM

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310

$\beta 9$ $\alpha 7$ $\beta 10$ $\alpha 8$ $\beta 11$ $\beta 12$ $\eta 3$ $\alpha 9$ $\alpha 10$ $\alpha 11$

S. paucimobilis LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

S. wittichii LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

S. multivorum ECDIYVNPELTSIANEFDAAVMVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

C. crescentus LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

E. coli BL21(DE3) LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

N. eutropha LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

G. oxydans LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

Z. mobilis LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

P. gingivalis LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

B. thetaiotaomicron LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

B. stoptii LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

S. aurantiaca LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

M. xanthus LGDIAPLQEMVAVAKKHGAMVLVDLDAISMGFRCPNCRGVYBAQCLEGQIDFVVGTFSSVCTVGGFCVSNHPKFEVRLVCRPYVFPASLPPSVVATATTSIRKLMHAQDKR

320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420

$\alpha 12$ $\beta 13$ $\beta 14$ $\alpha 13$ $\beta 15$ $\beta 16$ $\beta 17$ $\alpha 14$

S. paucimobilis ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

S. wittichii ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

S. multivorum ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

C. crescentus DRVNRNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

E. coli BL21(DE3) DRVNRNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

N. eutropha ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

G. oxydans ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

Z. mobilis ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

P. gingivalis ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

B. thetaiotaomicron ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

B. stoptii ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

S. aurantiaca ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

M. xanthus ERVWSNARLHGGKLCMFRKLGTECTCSATVAVMLLEDEQEQAMWQALLDGGGLVNRMPATPAGTFLDLSICQAEPTPAQTOTVLMGPOARGRAVGVIG.....

S. paucimobilisMTEAAQPHAL.....PADAPDIAAPERDLRSLRFDGLIAERQKLLDSGVTFDPAIVMEQVKSPTFAVIRGKDTLILGYNVCMGFPPDDVIAAGKALEKFF

S. wittichiiMADLLSKFDPLIAERALLATGVRDPYAVIMKVLSPTEAMINGRRTKTIILGYNVCMGFPPDDVIAAGKALEKFF

S. multivorumMSKGLGKIKISQFKIVEE..LRAKGLYAFRFIQSKQ..DTEVKKIDGRRVLMFSGNSVYLGLTDTDRRIKAAQDALEKYG

C. crescentusMGLFDKHLAYRDAYKAIQD..VGNANPKVRFDAVHSPTGVVDRPTILLGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

E. coli BL21(DE3)MGLYDKYARLAGERLQF..SDNGLTPPGTCIDEVYSATEGRIGNKVVILAGTNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

N. eutrophaMNLLEKIDAAAAARKA..QLPEGLAAGFIPIDESYSATEARIGERRVLMGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

G. oxydansMTDFAKGQLREATEGLTAASRNPFVVIERTISASVIGIEGREFLLGNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

Z. mobilisNQVTLDFSKFDPLIAIRKEMLSHGGRDPPAVVMEKVLSPTEAKIKKGGYNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

P. gingivalisMGLLQDLKLAQYTPQK..AAQAGIYVYFRKIESDQ..DTEVVIDGRRVLMFSGNSVYLGLTDTDRRIKAAQDALEKYG

B. thetaiotaomicronMKHNLQDNLQGEQMANNSNGGKPFSDAKIIERANL..LRDNDLYFFRAIEETE..ASTVIVKGGKQIMIGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

B. stoptiiMKHNLQDNLQGEQMANNSNGGKPFSDAKIIERANL..LRDNDLYFFRAIEETE..ASTVIVKGGKQIMIGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

S. aurantiacaMHAAPPWCSRLDRAAHRPLQT..APGSPNDRR..TMSDVFDDKCRSWKDYRI..AKAAGIYVYFRSIEASHGATEVEIEGRRVIMVGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

M. xanthusMSDVFDDKCRSWKDYRI..AKAAGIYVYFRSIEASHGATEVEIEGRRVIMVGSNNVYGLTFDEQAIASVKAQVQRG

Figura 9. Alineamiento estructural de SPTs bacterianas. (A) Alineamiento general de los monómeros de SPTs. La SPT de *S. paucimobilis* está mostrada en amarillo, de *S. wittichii* en magenta, de *S. multivorum* en azul, de *C. crescentus* en verde, y de *E. coli* BL21(DE3) en cian. (B) Residuos de aminoácidos clave para la unión del cofactor PLP: His159, Ala160, Ser161, His234, Lys265 y Arg390 (numeración de SPT de *S. paucimobilis*) están mostrados en forma balls & sticks, y coloreados por átomo y acorde con la estructura de la SPT correspondiente (mismo esquema de coloración que en (A)). (C) Alineamiento de secuencias basado en estructuras de las SPTs. El motivo (His, Ala, Ser) conservado está mostrado en naranja, el residuo Asp231 conservado que interactúa con N1 de PLP está en azul, la His234 conservada e implicada en la unión de PLP está resaltada en verde, y los residuos catalíticos Lys265 y Arg390 conservados están mostrados en rojo.

Un análisis estructural basado en estructuras secundarias, utilizando ESPript (Robert & Gouet, 2014), de las SPT de las α -Proteobacteria (*Caulobacter crescentus*, *Gluconobacter oxydans*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas wittichii* y *Zymomonas mobilis*), β -Proteobacterium *Nitrosomonas eutropha*, γ -Proteobacterium *Escherichia coli* BL21(DE3), δ -Proteobacteria (*Bacteriovorax (Bdellovibrio) stolpii*, *Myxococcus xanthus* y *Stigmatella aurantiaca*), y *Bacteroidetes* (*Bacteroides thetaiotaomicron* y *Porphyromonas gingivalis* y *Sphingobacterium multivorum*) muestra que los residuos de aminoácidos clave del sitio activo así como los tres dominios de las SPT (N-terminal, catalítico central y C-terminal) están conservados entre todas las SPTs bacterianas (Figura 9C). Notablemente, las SPTs de las δ -Proteobacteria *Myxococcus xanthus* y *Stigmatella aurantiaca* presentan un dominio C-terminal más extenso comparado con el de las SPTs de α -, β -, γ -Proteobacteria y *Bacteroidetes* (Figura 9C). No obstante, las SPTs de otras δ -Proteobacteria como *Bacteriovorax stolpii* no contienen esta extensión C-terminal. Estas diferencias estructurales de algunas SPTs, aunado al hecho de que las SPTs de δ -Proteobacterias y de *Rhodobacterias* forman dos subgrupos distintos en el árbol filogenético (Figura 7), sugiere que existen distintos tipos de SPTs bacterianas.

1.4.2 SPTs bacterianas son homodímeros

Aunque las SPTs de *Sphingomonas* parecen ser citosólicas, existe evidencia de que, *in vivo*, las SPTs del *Bacteroidete S. multivorum* y de la δ -Proteobacterium *B. stolpii* están asociadas periféricamente con el lado citoplasmático de la membrana interna (Ikushiro et al., 2007), sugiriendo que estas enzimas podrían liberar el producto 3-oxo-esfinganina directamente hacia la membrana. No obstante, citosólicas o asociadas a la membrana, las estructuras cristalográficas de las SPT de *S. paucimobilis*, *S. wittichii*, y *S. multivorum* muestran que las enzimas son homodímeros simétricos.

Análisis de acoplamiento molecular, utilizando ClusPro (Desta et al., 2020), de las estructuras 3D predichas de los monómeros SPT de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) revelan que estas SPTs bacterianas también podrían ser complejos homodiméricos (Figura 10). Cada monómero de SPT consiste de tres dominios: N-terminal, catalítico central, y C-terminal, los tres implicados en la dimerización de SPT. El dominio N-terminal es corto, de solo 80 amino ácidos que forman una α -hélice y una β -lámina antiparalela. El dominio catalítico central es dominado por una estructura de siete β -láminas atadas, que son características de enzimas dependientes de PLP tipo-1. La lisina catalítica, Lys244 en ambas SPT de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3), está localizada en este dominio. Finalmente, el dominio C-terminal contiene aproximadamente 100 amino ácidos y consiste mayormente de α -hélices (Figura 10).

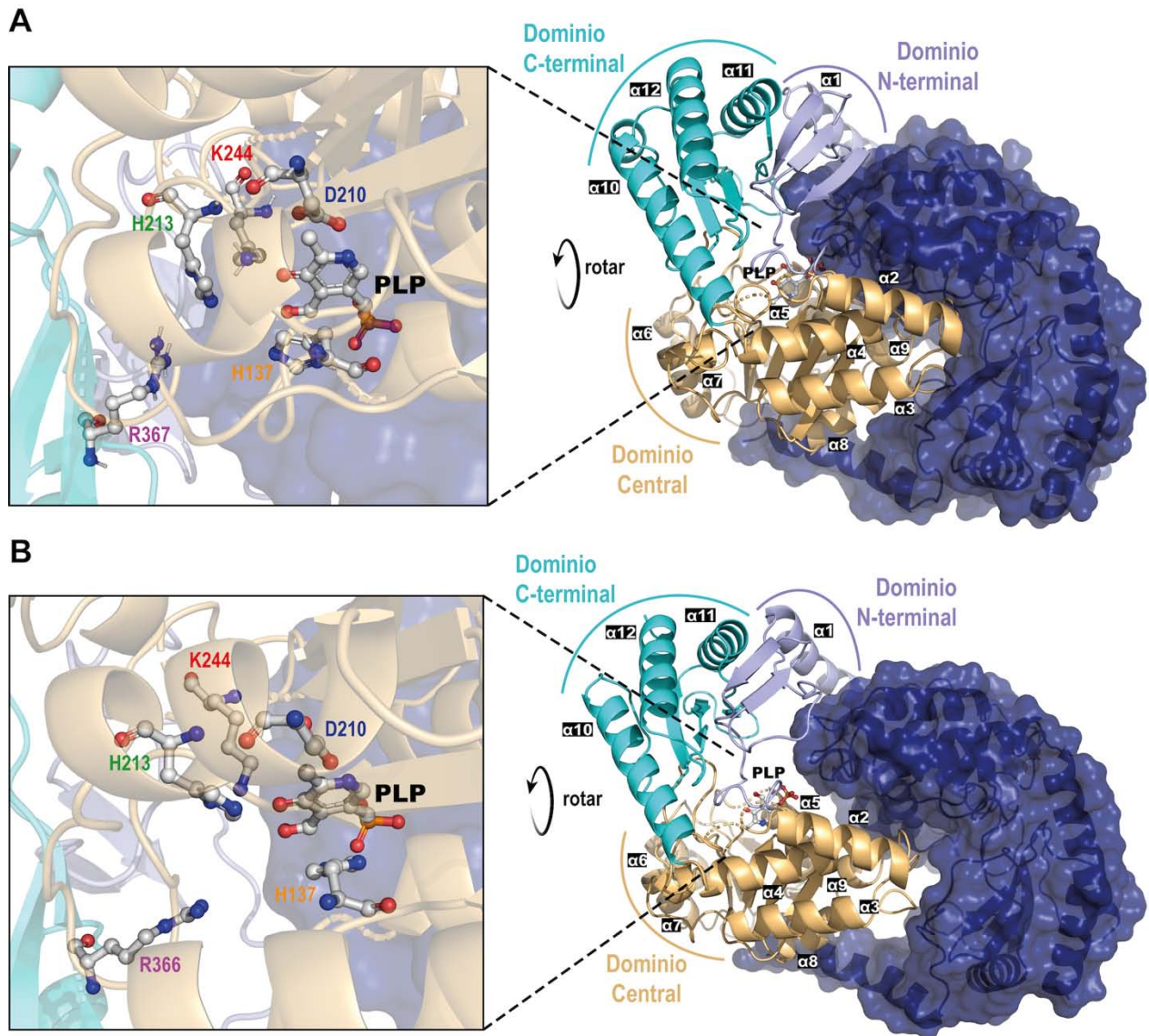


Figura 10. Estructuras 3D de los homodímeros de SPTs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3). Sitios activos resaltando residuos clave, mostrados en forma balls & sticks y coloreados por átomo, implicados en la unión del cofactor PLP y de los sustratos de las SPTs de *C. crescentus* (A) y SPT de *E. coli* BL21(DE3) (B). Para resaltar la naturaleza dimerica de las SPTs bacterianas, uno de los monómeros está mostrado en forma ribbon mientras que el otro está mostrado en representación ribbon/superficie transparente (azul marino). Para uno de los monómeros de SPT, los tres dominios están indicados: N-terminal (en lila), catalítico central (en beige), y C-terminal (en cian).

El sitio activo de las SPTs está formado en la interface del dímero y contiene la lisina catalítica (Lys244) al que se une el cofactor PLP como aldimina interna (**Figura 10**). Residuos de amino ácidos de ambas subunidades forman el sitio activo, y dado que las SPTs bacterianas son un complejo homodimérico hay una estequiometría 1:1 entre el número de subunidades y el número de sitios activos (dos sitios activos y dos PLP por dímero).

Análogamente a lo observado para la SPT de *S. paucimobilis* en forma aldimina interna (con PLP unido; PDB: 2JG2) y externa (PLP:L-serina; PDB:2W8J) (Harrison et al., 2018), en la interface del dímero de las SPT de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) hay una enorme red de

puentes de hidrógeno entre el cofactor PLP y los residuos del sitio activo (**Figura 10**). En particular, la His213 forma puentes de hidrógeno con el hidroxilo del PLP, y la Asp210 forma puentes de hidrógeno con el nitrógeno protonado de la piridina del PLP. El fosfato del PLP forma puentes de hidrógeno con ambas subunidades (Beattie et al., 2013; Yard et al., 2007).

Por otra parte, la His137 forma una interacción de apilamiento π - π sobre una de las caras del anillo de piridina del PLP y es requerida para la unión del PLP, reconocimiento de sustratos y catálisis de la SPT (Shiraiwa et al., 2009). Este residuo de histidina es el primero de tres residuos consecutivos (His137-Ala138-Ser139) que están estrictamente conservados entre los miembros de las AOS. Se propone que la His137 ayuda en el reconocimiento de L-serina formando un puente de hidrógeno con su grupo carboxilato, cuya perpendicularidad al plano del nitrógeno piridoxal de la aldimina externa PLP:L-serina asegura la catálisis (Dunathan, 1966; Ikushiro & Hayashi, 2011).

Posteriormente, la unión de palmitoil-CoA rompe el puente de hidrógeno de la His137 con el carboxilato de la L-serina, lo cual resulta en la rotación de la L-serina, permitiendo que el carboxilato forme una interacción con la Arg367/Arg366 (de las SPTs de *C. crescentus* o *E. coli*, respectivamente) y que la reacción continúe. El grupo hidroxilo de la L-serina forma puentes de hidrógeno con la Lys244 y con el grupo fosfato del PLP. Esta interacción es requerida para la actividad óptima de las SPTs (Harrison et al., 2018).

1.4.3 Cavidad hidrofóbica para la unión del sustrato acil-tioéster

Los monómeros de SPT entrelazados quedan estrechamente empaquetados al formar el homodímero (**Figura 11**). La hélice $\alpha 1$ (el pulgar) del dominio N-terminal está torcida, lo que le permite colocarse sobre la superficie del compacto núcleo “de dedos” del otro monómero del dímero. La entrada al sitio activo para la unión del sustrato acil-tioéster está situada en la parte superior de la superficie del dímero de SPT.

Un alineamiento de las SPTs de *C. crescentus*, *S. wittichii* y *E. coli* con la estructura de la AOS CqsA de *Vibrio cholerae* (Jahan et al., 2009), en forma aldimina externa del producto final de la condensación de L-treonina y decanoil-CoA atrapado en el sitio activo (PDB: 2WKA), coloca el sitio de unión a acil-CoA en un largo canal hidrofóbico formado en la interface de los dos monómeros de SPT. Para el dímero de la SPT de *C. crescentus*, el canal está delineado por los residuos Tyr10, Tyr14, Ala16-Pro24, Iso338, Leu355-Pro357 del monómero A y Iso82, Ala83, Val265, y Met271 del monómero B. Dos residuos (Gly21 y Iso338 de cada monómero) delimitan el final de cada canal (**Figura 11**).

Estos canales hidrofóbicos conducen hacia la lisina catalítica (Lys244) de cada monómero. En las SPTs bacterianas, estos canales han sido propuestos que actúan como un hueco de unión para el sustrato palmitoil-CoA (Ikushiro et al., 2009; Yard et al., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estructuras cristalográficas de SPTs con palmitoil-CoA unido. Además, este tipo de cavidades hidrofóbicas creadas por residuos cargados positivamente es característica de enzimas que unen ACPs (White et al., 2005), lo cual sugiere la unión de sustratos acil-tioéster más grandes, como acil-ACP, en lugar de acil-CoA. Posiblemente, estos canales hidrofóbicos delimiten la longitud de cadena de los sustratos acil-tioéster que cada SPT bacteriana puede utilizar; sin embargo, los detalles exactos de esta especificidad aún no se conocen.

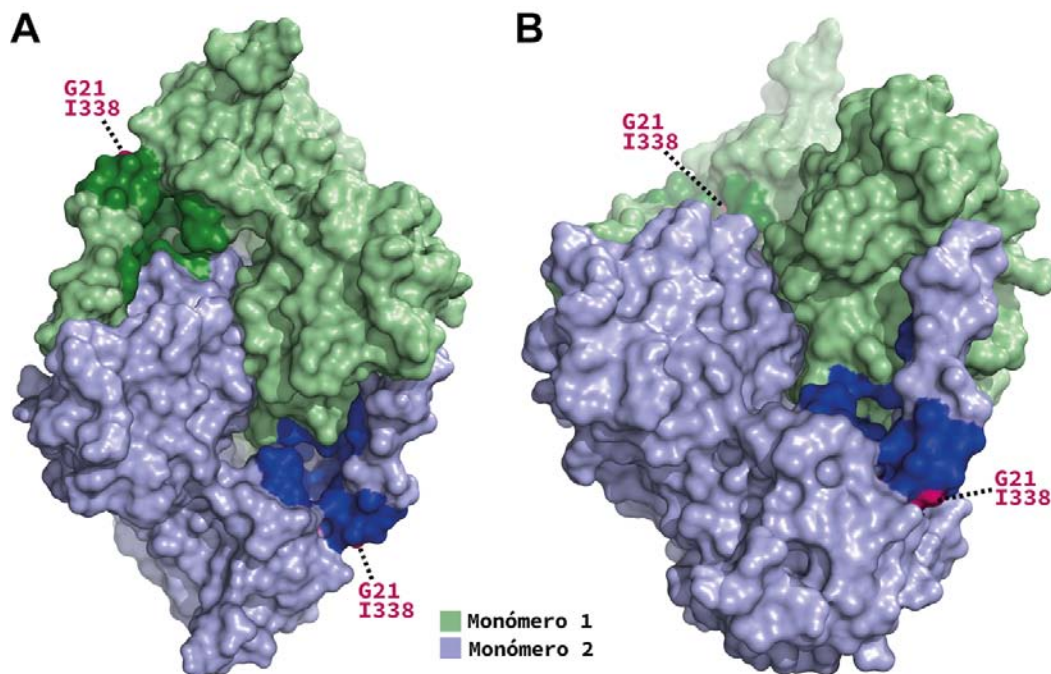


Figura 11. Estructura de superficie del dímero de SPT de *C. crescentus* mostrando cavidad potencial para la unión del sustrato acil-tioéster. (A) Vista desde arriba. (B) Vista desde arriba/lado. El monómero 1 está mostrado en verde y el monómero 2 está mostrado en azul. Las dos cavidades hidrofóbicas están coloreadas en verde oscuro y azul oscuro, respectivamente. El final de cada canal hidrofóbico está delimitado por dos residuos (Gly21 y Iso338) mostrados en magenta.

1.5 Proteína acarreadora de grupos acilo (ACP)

1.5.1 Estructura y función

En todos los organismos, la biosíntesis de ácidos grasos (FAB; de fatty acid biosynthesis) se lleva a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas en las que una cadena acilo es extendida por 2 carbonos en cada ciclo. En mamíferos y otros eucariotas complejos, estas reacciones son catalizadas por un gran complejo proteico multifuncional, conocido como sintasa de ácidos grasos (FAS; de fatty acid synthase) tipo I (Campbell & Cronan, 2001; Rock & Cronan, 1996). En contraste, las bacterias contienen un complejo FAS tipo II, en el cual cada reacción es catalizada por enzimas discretas y los intermediarios son acarreados de enzima a enzima a través del citosol unidos como tioesters a una proteína pequeña (~9 kDa), acídica y altamente soluble. Esta proteína es conocida como proteína acarreadora de grupos acilo (ACP; de acyl carrier protein) (**Figura 12**) (Campbell & Cronan, 2001; Rock & Jackowski, 2002) y es una de las proteínas más abundantes en *E. coli*, constituyendo cerca del 0.25% del total de proteínas solubles (~6×10⁴ moléculas/célula) (Lu et al., 2007). La ACP es expresada en su forma inactiva (apo-ACP), que es citotóxica en *E. coli* (Keating et al., 1995). La apo-ACP es convertida a su forma funcional (holo-ACP) (**Figura 12A**) mediante una modificación postraduccional. Esta reacción es catalizada por la holo-ACP sintasa (AcpS) (Flugel et al., 2000; Lambalot et al., 1996) que transfiere el grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PPT) de coenzima A (CoA) (**Figura 12B**), el otro transportador de grupos acilo, a una serina conservada (Ser36 en *E. coli*) en la ACP.

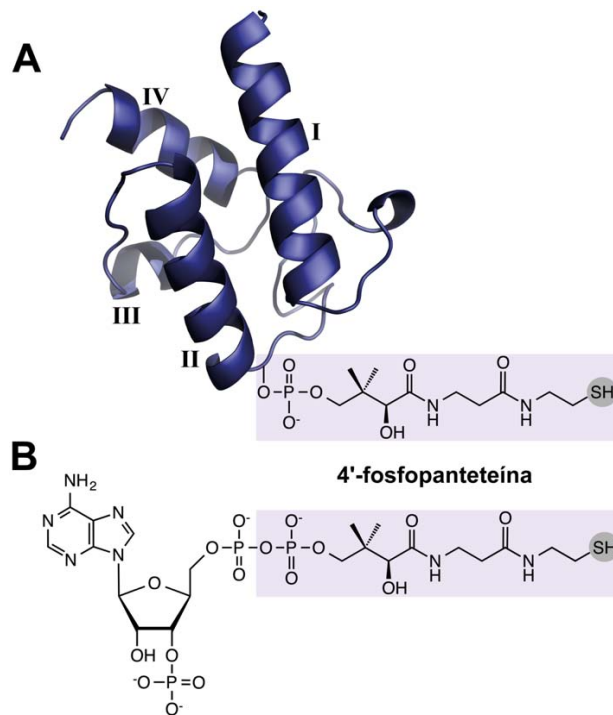


Figura 12. Grupo prostético compartido entre ACPs y CoA. Los acarreadores/donadores de grupos acilo, holo-ACP (**A**) y Coenzima A (CoA) (**B**), comparten el grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PPT; rectángulo lila). 4'-PPT está ligado a un residuo de serina conservado en la ACP. 4'-PPTs en holo-ACP o CoA poseen un tiol terminal (círculo gris) al cual los grupos acilo son unidos mediante enlace tioéster. La estructura de la ACP está mostrada en forma ribbon.

Los intermediarios acilo de la biosíntesis de ácidos grasos están unidos a la ACP a través de un enlace tioéster al grupo tiol terminal del grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PPT) de la ACP (**Figura 12A**). La estructura terciaria de las ACPs parece estar conservada y consiste en 3 o 4 hélices y típicamente consiste de 3 α -hélices principales (hélices I, II, y IV) y un segmento α -helicoidal corto (hélice III) que conecta las hélices II y IV (Byers & Gong, 2007) (**Figura 12A**).

Las ACPs secuestran las cadenas acilo crecientes en el interior de un hueco hidrofóbico formado en el núcleo de α -hélices, el cual se expande dependiendo de la longitud de la cadena acilo (Roujeinikova et al., 2007). Se ha propuesto que esta internalización de la cadena acilo cambia la forma de la ACP para interacciones subsecuentes con otras proteínas, define la longitud de sustratos, y/o protege al frágil enlace tioéster de la hidrólisis (Evans et al., 2008; Zornetzer et al., 2010).

La ACP es una de las proteínas más interactivas en la fisiología bacteriana (Butland et al., 2005) y tiene que interactuar específicamente y transitoriamente con todas las enzimas del FASII. La hélice II de las ACPs parece tener una función importante en esto y ha sido denominada “hélice de reconocimiento” (Zhang et al., 2003). Residuos expuestos cargados negativamente en la parte C-terminal de la hélice II de la ACP interactúan con algunos residuos positivos en la superficie de las enzimas *fab* (White et al., 2005).

1.5.2 AcpP – Biosíntesis de ácidos grasos y glicerofosfolípidos

En la biosíntesis de ácidos grasos y lípidos de membrana (**Figura 13**), el acarreador/donador clave del grupo acilo es una ACP expresada constitutivamente conocida como AcpP, la cual es necesaria para mantener funciones básicas esenciales (housekeeping) (Byers & Gong, 2007). Los genes estructurales para AcpPs (*acpP*) se encuentran usualmente en la vecindad genómica de otros genes para biosíntesis de ácido grasos, por ejemplo, *fabH*, *fabD*, *fabG*, y *fabF* en *E. coli* (Zhang & Cronan, 1996) o *fabD*, *fabG*, y *fabF* en *C. crescentus* (Nierman et al., 2001).

La biosíntesis de ácidos grasos (FAB) en el sistema FAS II (**Figura 13A**) es iniciada por el complejo acetil-CoA carboxilasa (AccABCD). Este cataliza la carboxilación dependiente de ATP de biotina con bicarbonato para formar carboxibiotina; posteriormente transfiere el grupo carboxilo de carboxibiotina a acetil-CoA, formando malonil-CoA. Por otra parte, la holo-ACP sintasa (AcpS) transfiere el grupo prostético 4'-PPT de CoA a la apo-ACP inactiva, convirtiéndola a su forma holo-ACP funcional. Posteriormente, la malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD) transfiere el grupo malonil de malonil-CoA a la holo-ACP, formando malonil-ACP. En el inicio del ciclo de elongación, la β -cetoacil-ACP-sintasa III (FabH) cataliza una condensación Claisen descarboxilativa entre malonil-ACP y acetil-CoA, formando acetoacil-ACP. El β -cetoacil-ACP es reducido a β -hidroxiacil-ACP por una β -cetoacil-ACP reductasa (FabG) en una reacción dependiente de NAD(P)H. La deshidratación de β -hidroxiacil-ACP a su forma enoil es realizada por β -hidroxi-ACP deshidratasa (FabZ o FabA). La deshidratasa (FabZ) está ampliamente distribuida y cataliza la deshidratación de β -hidroxiacil-ACPs de todas las longitudes de cadena saturadas o insaturadas (Mohan et al., 1994). Por otra parte, la actividad de FabA está restringida a sustratos de 10 carbonos, y no solo cataliza la deshidratación de β -hidroxiacil-ACP, sino que también isomeriza *trans*-2-decenoil-ACP en *cis*-3-decenoil-ACP, el cual es el precursor hacia la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (Bloch, 1971). El último paso en cada ronda de elongación de ácidos grasos es catalizado por la enoil-ACP reductasa (FabI) dependiente de NAD(P)H, y consiste en la reducción de 2-enoil-ACP a acil-ACP. En las rondas subsecuentes de elongación, las β -cetoacil-ACP sintasas I (FabB) y/o II (FabF), utilizan el acil-ACP generado y malonil-ACP para alargar el β -cetoacil-ACP dos carbonos más que en la ronda previa.

Una vez que el ciclo FAB es terminado, los acil-ACPs son directamente utilizados por el sistema PlsX/Y/C, distribuido en la mayoría de bacterias, como sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos (Lu et al., 2006) (**Figura 13A**). Primero, PlsX convierte acil-ACP en un intermediario acilo activado, acil-fosfato. Luego, la glicerol-fosfato aciltransferasa específica para acil-fosfato (PlsY) transfiere el ácido graso a la posición *sn*-1 de glicerol-3-fosfato para formar ácido lisofosfatídico (liso-PA) (**Figura 13A**). Subsecuentemente, la acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (PlsC) acila, con un ácido graso preferentemente insaturado, la posición *sn*-2 de liso-PA para formar ácido fosfatídico (PA) (**Figura 13A**). Por otro lado, *E. coli* utiliza el sistema PlsB/C (Rock & Jackowski, 1982), donde PlsB acila la posición *sn*-1 de glicerol-3-fosfato para formar liso-PA (Green et al., 1981). Estas enzimas unidas a la membrana también pueden utilizar acil-CoA tioésteres derivados de la activación de ácidos grasos por la acil-CoA sintetasa (FadD) (Green et al., 1981). Sin embargo, la esterificación de ácidos grasos en CoA por FadD es generalmente una señal para ser degradados (**Figura 13B**).

La degradación de ácidos grasos (FAD; de *fatty acid degradation*) se lleva a cabo mediante una vía llamada β -oxidación. Esencialmente, la vía FAD es la vía FAB al revés, excepto que se utilizan distintas enzimas y los intermediarios son transportados dentro de la célula como tioésteres de CoA. El primer paso en el ciclo de β -oxidación implica la conversión de acil-CoA a enoil-CoA por medio de la acil-CoA dehidrogenasa (FadE). Posteriormente, enoil-CoA es hidratado a β -hidroxiacil-CoA y subsecuentemente oxidado a β -cetoacil-CoA por la enoil-CoA hidratasa/ β -hidroxiacil-CoA dehidrogenasa (FadB). El paso final en cada ciclo FAD es la eliminación de un grupo acetilo del β -cetoacil-CoA, catalizado por la β -cetoacil-CoA tiasa (FadA) (**Figura 13B**).

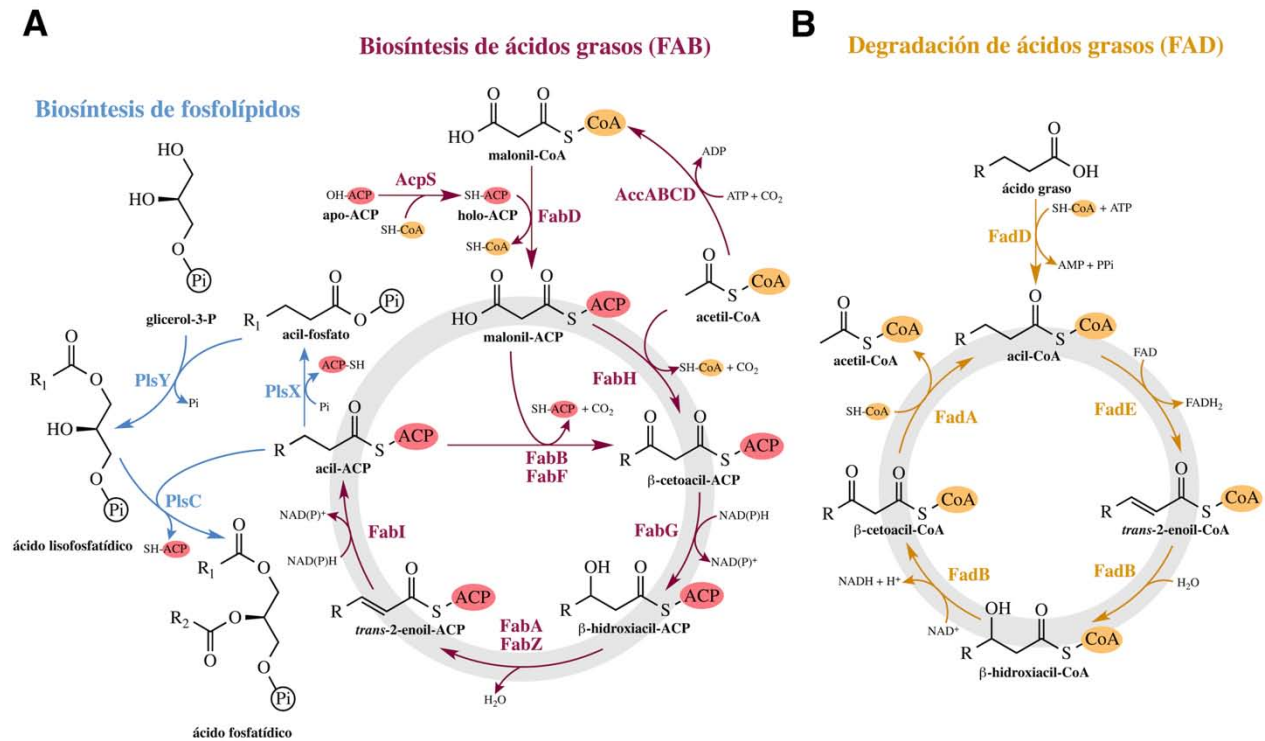


Figura 13. Vías de biosíntesis y degradación de ácidos grasos en bacterias. **(A)** El sistema FASII de biosíntesis de ácidos grasos (FAB) es iniciado por la producción de malonil-CoA a través de una carboxilación, dependiente de ATP, de acetil-CoA catalizada por el complejo acetil-CoA carboxilasa (AccABCD). Proteína acarreadora de grupos acilo (ACP; mostrada en óvalos rojos) es el donador clave de ácidos grasos en la vía FAB. La ACP usada en el sistema FASII es la AcpP, expresada constitutivamente. La holo-ACP sintasa (AcpS) convierte apo-ACP a su forma funcional holo-ACP, transfiriendo el grupo prostético 4'-PPT de CoA a la apo-ACP. La malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD) transfiere el grupo malonil a la holo-ACP. En la reacción de condensación inicial, 3-cetoacil-ACP-sintasa III (FabH) condensa acetil-CoA con malonil-ACP para formar acetoacil-ACP. β -cetoacil-ACP reductasa (FabG) forma β -hidroxiacil-ACP, que a su vez es deshidratado por deshidratasa (FabZ) o deshidratasa/isomerasa (FabA). El paso final del ciclo es catalizado por la enoil-ACP reductasa (FabI). El acil-ACP resultante puede ser aún más alargado por β -cetoacil-ACP sintasas I (FabB) y/o II (FabF), produciendo β -cetoacil-ACP dos carbonos más largo que en la ronda previa. Los acil-ACPs son utilizados como sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos. PlsX convierte acil-ACP en acil-fosfato y la glicerol-fosfato aciltransferasa (PlsY) transfiere el ácido graso a la posición *sn*-1 de glicerol-3-fosfato formando ácido lisofosfatídico, que es subsecuentemente acilado en la posición *sn*-2 por la acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (PlsC) formando ácido fosfatídico. Estas enzimas también pueden utilizar acil-CoAs como sustratos. **(B)** La vía de degradación de ácidos grasos (FAD; o β -oxidación) es esencialmente la vía FAB al revés. Coenzima A (CoA; mostrada en óvalos naranjas) es el donador clave de ácidos grasos en la vía FAD. Para iniciar el ciclo, los ácidos grasos son instalados en CoA por una acil-CoA sintetasa (FadD). Acil-CoA dehidrogenasa (FadE) convierte acil-CoA a enoil-CoA. Enoil-CoA hidratasa/ β -hidroxiacil-CoA dehidrogenasa (FadB) convierte enoil-CoA a β -hidroxiacil-CoA. Finalmente, β -cetoacil-CoA tiasa (FadA) convierte β -hidroxiacil-CoA a acil-CoA, completando el ciclo.

CoA a β -cetoacil-CoA mediante hidratación y oxidación. El último paso es catalizado por la β -cetoacil-CoA tiolasa (FadA) que rompe β -cetoacil-CoA en acetil-CoA y un acil-CoA dos carbonos mas corto que en la ronda previa.

Aparte de sus funciones en la biosíntesis de ácidos grasos y glicerofosfolípidos, las AcpPs participan en la síntesis del lípido A, *N*-acilhomoserina lactonas, hemolisinas formadoras de poros, y oligosacáridos derivados de membrana (Byers & Gong, 2007). Además, algunas bacterias con metabolismos complejos, a menudo tienen ACPs especializadas adicionales, implicadas en la síntesis de ciertas especies de lípido A por AcpXL (Brozek et al., 1996), factores que provocan la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de leguminosas por NodF (Ritsemá et al., 1998), polisacáridos capsulares por RkpF (Epple et al., 1998), metabolitos secundarios tales como policétidos o péptidos no ribosomales (Geiger & López-Lara, 2002; Lai et al., 2006).

1.5.3 AcpP y AcpXL – Biosíntesis del lípido A del LPS

El lipopolisacárido (LPS) es uno de los componentes principales de la cara externa de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. En las enterobacterias, el LPS está anclado dentro de la membrana externa por un liposacárido basado en glucosamina llamado lípido A. El núcleo de oligosacárido (OS) y el polisacárido específico O (O-PS) están ligados al lípido A por medio de un azúcar de 8 carbonos llamado ácido 3-deoxi-*D*-manno-oct-2-ulosónico (Kdo).

En *E. coli*, se requieren nueve pasos enzimáticos para sintetizar Kdo₂-lípido A, un disacárido de glucosamina *bis*-fosforilado, que está hexa-acilado y glucosilado con dos residuos de Kdo (**Figura 14**). La mayoría de bacterias Gram-negativas poseen la habilidad de sintetizar un lípido similar al Kdo₂-lípido A de *E. coli* por medio de una vía altamente conservada nombrada en honor a Christian R. H. Raetz, como vía de Raetz (Trent, 2009).

En *E. coli*, LpxA cataliza el primer paso de la vía al transferir ácido 3-hidroxitetradecanoico (β -hidroximiristato; C14:0(3-OH)) a uridina difosfato-(UDP)-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (Galloway & Raetz, 1990), un precursor tanto de peptidoglicano como de lípido A. El segundo paso es catalizado por la zinc metaloenzima LpxC (Jackman et al., 1999; Young et al., 1995), y consiste en la hidrólisis irreversible del enlace amida en la posición 2 del esqueleto de glucosamina al remover un grupo acetilo. En el tercer paso, LpxD añade un segundo ácido graso (C14:0(3-OH)) en enlace amida a las glucosaminas desacetiladas formando UDP-2,3-diacilglucosamina (Kelly et al., 1993). Tanto LpxA como LpxD utilizan acil-ACPs (AcpP) como donadora de grupos acilo (**Figura 14**) (Galloway & Raetz, 1990; Kelly et al., 1993). A diferencia de la aciltransferasas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos, estas enzimas usualmente tienen un alto grado de especificidad por su donador de grupo acilo con respecto a la longitud y grado de saturación del ácido graso (Williams & Raetz, 2007). LpxH cataliza el cuarto paso al romper el enlace pirofosfato de UDP-2,3-diacilglucosamina formando 2,3-diacilglucosamina 1-fosfato (lípido X) y liberando uridina monofosfato (UMP) (Babinski et al., 2002). El quinto paso es catalizado por LpxB, que condensa una molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina con una molécula de lípido X y libera UDP, formando el enlace glicosídico $\beta(1'-6)$ característico del lípido A (Crowell et al., 1986). En el sexto paso, la quinasa específica LpxK, cataliza la fosforilación del grupo 4'-OH del intermediario tetraacildisacárido-1-fosfato (DS-1-P) produciendo lípido IV_A, un precursor clave del lípido A (Garrett et al., 1997). En *E. coli*, el séptimo paso es catalizado por la glicosiltransferasa bifuncional KdtA (WaaA), y consiste en la transferencia de dos residuos de Kdo en la posición 6' del disacárido utilizando CMP-Kdo como el donador nucleótido-azúcar (Clementz

& Raetz, 1991). En *E. coli*, los últimos pasos en la vía de biosíntesis de Kdo₂-lípid A implican la adición de dos cadenas acilo secundarias. En el octavo paso, LpxL (HtrB) transfiere un ácido dodecanoico (laurato; C12:0) a la posición 2' (Clementz et al., 1996). El noveno paso es catalizado por LpxM (MsbB), que transfiere un ácido tetradecanoico (miristato; C14:0) a la posición 3' (Clementz et al., 1997). Estas dos enzimas también utilizan acil-ACPs (AcpP) como sustrato (**Figura 14**), y al igual que LpxA y LpxD, poseen una alta selectividad con respecto a la longitud y el grado de saturación del ácido graso (Clementz et al., 1996; Clementz et al., 1997; Vorachek-Warren et al., 2002).

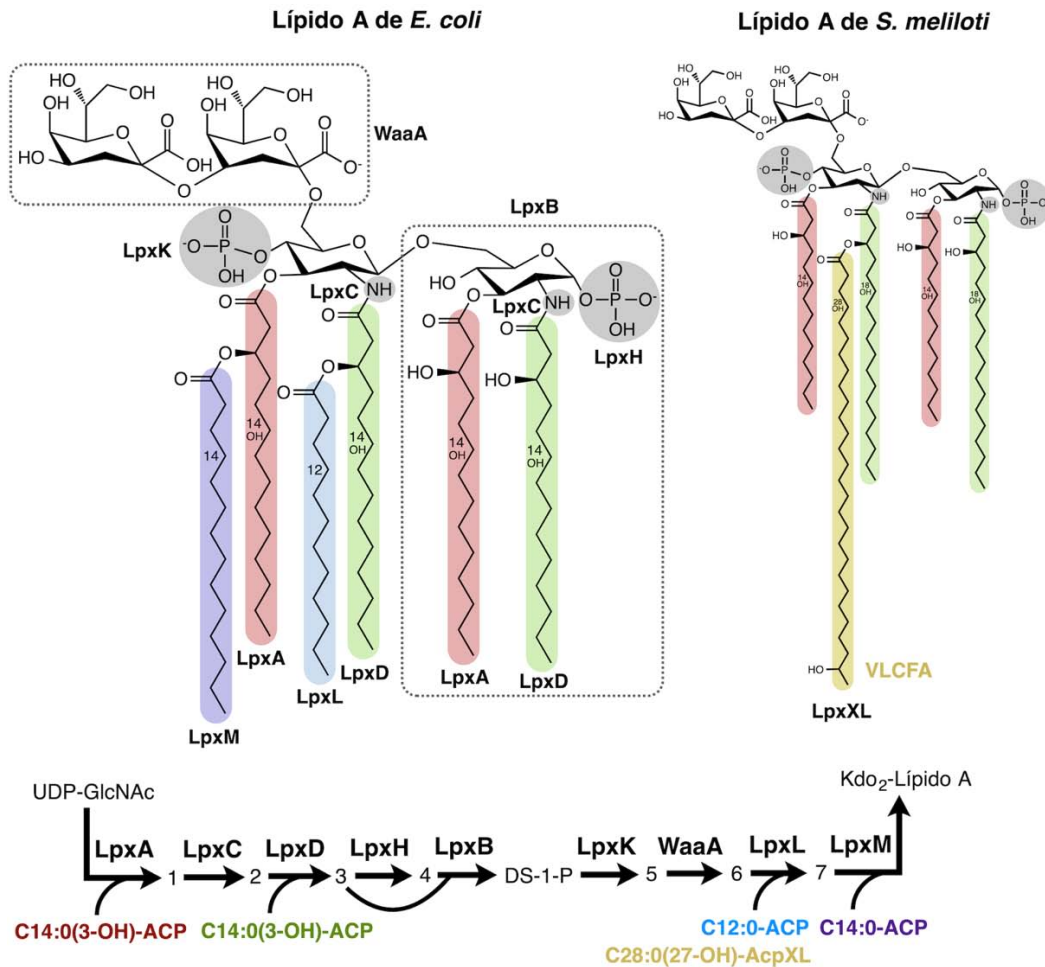


Figura 14. Ruta de biosíntesis del dominio Kdo₂-lípid A en LPS. Estructuras del dominio Kdo₂-lípid A del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* K12 y *Sinorhizobium meliloti* 1021. Las partes ensambladas por cada enzima están indicadas con contorno gris, diferentes colores, o punteado. La ruta biosintética está representada en la parte inferior. Proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) es el donador clave de ácidos grasos para las distintas aciltransferasas. Para cada sustrato acil-ACP, el ácido graso está indicado y su transferencia a cada parte de las estructuras del lípido A está representada por diferentes colores. La ACP usada en esta vía es la AcpP expresada constitutivamente. En el caso de LpxXL de *S. meliloti*, una ACP especializada (AcpXL) es utilizada para el acarreador de un ácido graso de cadena extra larga (VLCFA; de very long-chain fatty acid: C28:0(27-OH)). Abreviaciones de las enzimas: UDP-*N*-acetilglucosamina aciltransferasa (LpxA), UDP-3-*O*-(3-hidroxiiristoil) *N*-acetilglucosamina deacetilasa (LpxC), UDP-3-*O*-(3-hidroxiiristoil) glucosamina *N*-aciltransferasa (LpxD), UDP-2,3-diacilglucosamina pirofosfatasa (LpxH), lípido-A-disacárido sintasa (LpxB), lípido A 4'-cinasa (LpxK), 3-deoxi-*D*-manno-octulosonato-lípido A transferasa (o Kdo-lípido A transferasa) (WaaA), Kdo₂-lípid A lauroil-ACP aciltransferasa (LpxL), Kdo₂-lípid A 27-hidroxiocacosanoil-ACP aciltransferasa (LpxXL en *S. meliloti*), Kdo₂-lauroil-lípido IVA-miristoil-ACP

aciltransferasa (LpxM). Abreviaciones de los sustratos: UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-3-*O*-(3-hidroxitetradecanoil)-*N*-acetilglucosamina (1), UDP-3-*O*-(3-hidroxitetradecanoil)-glucosamina (2), UDP-2,3-*bis*-(3-hidroxitetradecanoil)-glucosamina (3), 2,3-*bis*-(3-hidroxitetradecanoil)- β -D-glucosaminil-1-fosfato (4), tetraacildisacárido-1-fosfato (DS-1-P), tetraacildisacárido-1,4'-*bis*-fosfato (lípidos IVA) (5), Kdo₂-lípidos IV_A (6), y Kdo₂-(lauroil)-lípidos IV_A (7).

Las estructuras de lípidos A varían ampliamente entre las diferentes especies bacterianas, y en algunos miembros de las *Rhizobiaceae*, como *Sinorhizobium meliloti*, este contiene un ácido 27-hidroxiocetacosanoico (C28:0(27-OH)) en su estructura (**Figura 14**). Este ácido graso extra largo (XL) es transferido a la posición 2' del (Kdo)₂-lípidos IV_A por una aciltransferasa especial, LpxXL. El donador clave de este ácido graso de cadena muy larga (VLCFA; de very long chain fatty acid) es una ACP especializada llamada AcpXL (**Figura 14**). En algunos casos, AcpXL también puede ser acilado con otros residuos de ácidos grasos (ω -1)-hidroxilados (C18-C26) (Brozek et al., 1996).

Los lípidos A del LPS de *E. coli* y *S. meliloti* están acilados “asimétricamente”, ya que cada monosacárido de glucosamina contiene esterificados un número diferente de cadenas acilo. Por ejemplo, el lípidos A de *E. coli* tiene 4 cadenas acilo en su glucosamina 1, y 2 cadenas acilo en su glucosamina 2. Por otro lado, el lípidos A de *S. meliloti* tiene 3 cadenas acilo en su glucosamina 1, y 2 cadenas acilo en su glucosamina 2 (**Figura 14**). Las llamadas cadenas acilo “primarias” están esterificadas o amidificadas a los monosacáridos mientras que las cadenas acilo “secundarias” forman enlaces éster con los grupos hidroxilo de las cadenas acilo primarias. Lípidos A acilados “simétricamente” significa que cada residuo de glucosamina porta el mismo número de cadenas acilo. Las diferencias en las cadenas acilo secundarias del lípidos A son críticas para la endotoxicidad de la molécula (Golenbock et al., 1991; Nichols et al., 1997; Somerville et al., 1996) y son de relevante importancia biológica.

1.5.4 NodF – Biosíntesis de factores de nodulación (Nod)

Durante las etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre las *Rhizobia* y plantas leguminosas, se lleva a cabo un diálogo molecular. La planta exuda flavonoides o betaínas en la rizosfera, y las rhizobias responden secretando factores de nodulación (Nod). Los factores Nod son lipo-quitooligosacáridos (LCOs) requeridos para el desarrollo de nódulos y la infección intracelular en las raíces de las plantas (Spaink, 2000). Las enzimas responsables de la biosíntesis de los factores Nod son codificadas por los genes *nod*, que están localizados en plásmidos simbióticos o en islas genómicas (González et al., 2010).

Las enzimas NodC, NodB y NodA están presentes en todas las rhizobias y están implicadas en los primeros pasos de la biosíntesis de factores Nod (Barney & Downie, 1993) (**Figura 15**). NodC es una *N*-acetilglucosaminiltransferasa localizada en la membrana interna, que cataliza la formación de enlaces glicosídicos β 1-4 entre los residuos de *N*-acetil glucosamina (GlcNAc) del extremo no reductor de la cadena creciente de quitina (Geremia et al., 1994; Mergaert et al., 1995). NodC también está implicado en la oligomerización de quitooligómeros (COs) y lipo-quitooligómeros (LCOs) (Kamst et al., 1997). NodB es una quitina *N*-deacetilasa que remueve el grupo acetilo del único GlcNAc terminal no-reductor (John et al., 1993). NodA es una *N*-aciltransferasa que transfiere un ácido graso de una acil-ACP al GlcNAc terminal no-reductor del LCO (Geiger & López-Lara, 2002; Ritsema et al., 1997). El donador clave de este ácido graso es

una acil-ACP especializada llamada NodF (Shearman et al., 1986). En la rhizobia *S. meliloti*, este ácido graso es generalmente un palmitato α,β -insaturado (C16:2). La 3-oxoacil sintasa NodE participa en la síntesis de este ácido graso (Geiger et al., 1994). Los factores Nod confieren a las rhizobias especificidad de huésped, y en el caso de *S. meliloti*, la *O*-acetiltransferasa NodL y la sulfotransferasa NodH decoran la estructura de lipo-quitto oligosacárido (LCD) con un residuo acetilo y sulfato, respectivamente (Schultze & Kondorosi, 1996) (**Figura 15**).

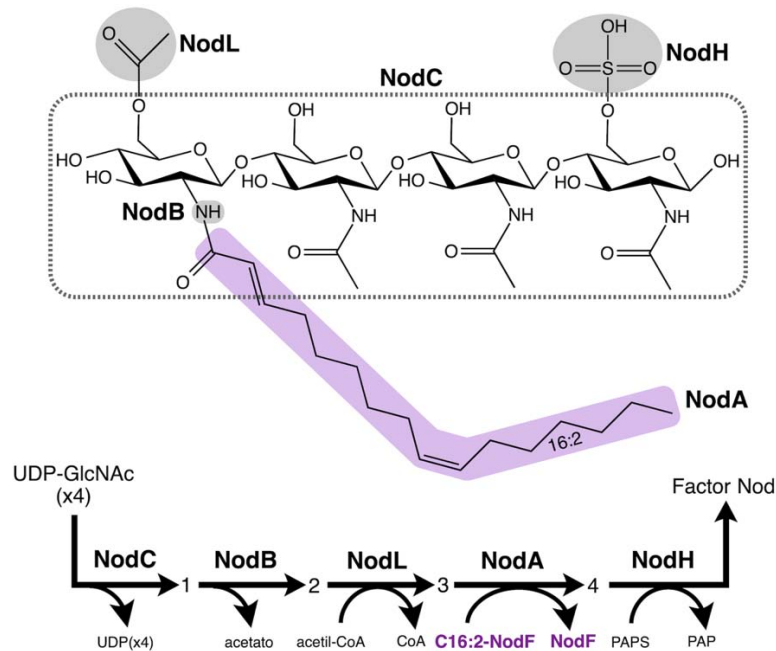


Figura 15. Ruta de biosíntesis de los factores de nodulación (Nod) de *S. meliloti*. Una estructura representativa de factor de nodulación de *Sinorhizobium meliloti* está mostrada. Las partes ensambladas por cada enzima están indicadas con contorno gris, morado, o punteado. La ruta biosintética está representada en la parte inferior. La reacción catalizada por NodA (en morado) utiliza una ACP especializada (NodF) como donador del grupo acilo (C16:2). Abreviaciones de las enzimas: *N*-acetilglucosaminiltransferasa (NodC), quitina *N*-deacetilasa (NodB), *O*-acetiltransferasa (NodA), y sulfotransferasa (NodH). Abreviaciones de los sustratos y productos: UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), uridina difosfato (UDP), *N*-acetilglucosamina-tetrasacárido (1), glucosamina, *N*-acetilglucosamina-trisacárido (2), coenzima A (CoA), *O*-acetil-glucosamina, *N*-acetilglucosamina-trisacárido (3), *N*-acil-*O*-acetil-glucosamina, *N*-acetilglucosamina-trisacárido (4), *N*-acil-*O*-acetil-glucosamina, *O*-sulfo-*N*-acetilglucosamina, *N*-acetilglucosamina-disacárido (Factor Nod), 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), and 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP).

Es evidente que, en contraste con intermediarios acil-CoAs, que son usualmente degradados y solamente utilizados por algunas enzimas para algunas vías biosintéticas, acil-ACPs son ampliamente utilizadas como sustratos en diferentes vías de biosíntesis. Algunas acil-ACPs como acil-AcpP son sustratos de una gran variedad de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, y lípido A. Por otro lado, distintas ACPs especializadas, como AcpXL y NodF, son acarreadoras de grupos acilo específicos en la biosíntesis de algunos lípidos A y factores de nodulación. Hasta la fecha, en la biosíntesis de esfingolípidos tanto de eucariotas como de bacterias, las SPTs han sido reportadas capaces de utilizar acil-CoAs como sustratos tioéster para la formación del precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina. Sin embargo, acil-ACPs especializadas podrían ser sustratos tioéster de las SPTs de *Rhodobacteria* para la biosíntesis de esfingolípidos.

2 HIPÓTESIS

En la biosíntesis de esfingolípidos en bacterias del filo *Rhodobacteria*, la serina palmitoiltransferasa utiliza una acil-ACP especializada como sustrato tioéster preferido para formar el primer intermediario en la biosíntesis de esfingolípidos 3-oxo-esfingina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar la función bioquímica de los productos de los tres genes (*acpR*, *aasR*, *spt*) implicados en la biosíntesis de 3-oxo-esfingina en *Caulobacter crescentus* y en *Escherichia coli* BL21(DE3).

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar que las putativas ACPs especializadas (AcpR) en la biosíntesis de esfingolípidos en *Rhodobacterias* son en realidad ACPs.
- 2.- Caracterizar la especificidad de sustrato de la posible acil-ACP sintetasa especializada (AasR) en la biosíntesis de esfingolípidos de *C. crescentus*.
- 3.- Demostrar que las serina palmitoiltransferasas (SPT) de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) utilizan una acil-AcpR como sustrato tioéster preferido para la biosíntesis del precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfingina.

4 RESULTADOS

4.1 Artículo publicado

4.2 Material suplementario

4.2.1 Figuras suplementarias

4.2.2 Tablas suplementarias



OPEN ACCESS

EDITED BY
Kylie Allen,
Virginia Tech, United States

REVIEWED BY
Chelsey M. VanDrise,
California Institute of Technology,
United States
Joaquín J. Salas,
Institute for Fats, Spanish National
Research Council (CSIC), Spain

*CORRESPONDENCE
Otto Geiger
otto@ccg.unam.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 03 June 2022
ACCEPTED 11 July 2022
PUBLISHED 04 August 2022

CITATION
Padilla-Gómez J, Olea-Ozuna RJ,
Contreras-Martínez S,
Morales-Tarré O, García-Soriano DA,
Sahonero-Canavesi DX, Poggio S,
Encarnación-Guevara S, López-Lara IM
and Geiger O (2022) Specialized acyl
carrier protein used by serine
palmitoyltransferase to synthesize
sphingolipids in *Rhodobacteria*.
Front. Microbiol. 13:961041.
doi: 10.3389/fmicb.2022.961041

COPYRIGHT
© 2022 Padilla-Gómez, Olea-Ozuna,
Contreras-Martínez, Morales-Tarré,
García-Soriano, Sahonero-Canavesi,
Poggio, Encarnación-Guevara,
López-Lara and Geiger. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Specialized acyl carrier protein used by serine palmitoyltransferase to synthesize sphingolipids in *Rhodobacteria*

Jonathan Padilla-Gómez¹, Roberto Jhonatan Olea-Ozuna¹, Sandra Contreras-Martínez¹, Orlando Morales-Tarré¹, Daniela A. García-Soriano¹, Diana X. Sahonero-Canavesi¹, Sebastian Poggio², Sergio Encarnación-Guevara¹, Isabel M. López-Lara¹ and Otto Geiger^{1*}

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Serine palmitoyltransferase (SPT) catalyzes the first and committed step in sphingolipid biosynthesis condensating L-serine and acyl-CoA to form 3-oxo-sphinganine. Whenever the structural gene for SPT is present in genomes of *Rhodobacteria* (α -, β -, and γ -*Proteobacteria*), it co-occurs with genes coding for a putative acyl carrier protein (ACP) and a putative acyl-CoA synthetase (ACS). In the α -proteobacterium *Caulobacter crescentus*, CC_1162 encodes an SPT, whereas CC_1163 and CC_1165 encode the putative ACP and ACS, respectively, and all three genes are known to be required for the formation of the sphingolipid intermediate 3-oxo-sphinganine. Here we show that the putative ACP possesses a 4'-phosphopantetheine prosthetic group, is selectively acylated by the putative ACS and therefore is a specialized ACP (AcpR) required for sphingolipid biosynthesis in *Rhodobacteria*. The putative ACS is unable to acylate coenzyme A or housekeeping ACPs, but acylates specifically AcpR. Therefore, it is a specialized acyl-ACP synthetase (AasR). SPTs from *C. crescentus*, *Escherichia coli* B, or *Sphingomonas wittichii* use preferentially acyl-AcpR as thioester substrate for 3-oxo-sphinganine synthesis. Whereas acyl-AcpR from *C. crescentus* is a good substrate for SPTs from distinct *Rhodobacteria*, acylation of a specific AcpR is achieved by the cognate AasR from the same bacterium. *Rhodobacteria* might use this more complex way of 3-oxo-sphinganine formation in order to direct free fatty acids toward sphingolipid biosynthesis.

KEYWORDS

ACP, acyl-ACP synthetase, fatty acid metabolism, serine palmitoyltransferase, 3-oxo-sphinganine, sphingolipid, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli* BL21(DE3)

Introduction

Sphingolipids are essential structural components of eukaryotic membranes, where they play crucial roles in cell signaling and organization of lipid rafts (Nelson and Cox, 2017). They have been implicated in a wide variety of different cellular processes such as cell differentiation, pathogenesis and apoptosis (Hannun and Obeid, 2018). Although sphingolipids are not commonly found in bacteria, they have been identified in *Sphingomonas* (Kawahara et al., 1991; Kawahara et al., 2002) and *Bacteroides* (Kato et al., 1995) species.

The first committed step of the *de novo* biosynthesis of sphingolipids is catalyzed by serine palmitoyltransferase (SPT) and consists in a decarboxylative, Claisen-like condensation of the amino acid L-serine with fatty acyl-coenzyme A (fatty acyl-CoA) in order to obtain 3-oxo-sphinganine, the first intermediate in sphingolipid biosynthesis of eukaryotes (Kerbarh et al., 2006) and bacteria (Brown et al., 2019; Olea-Ozuna et al., 2021). SPT is a member of the α -oxoamine synthase family, which includes enzymes involved in heme and biotin synthesis and requires pyridoxal phosphate. Phylogenetic analysis of this family suggested that the ability to synthesize sphingolipids might be more widespread than previously thought in members of two major phyla of *Bacteria*, the *Bacteroidetes* and the *Proteobacteria* (Geiger et al., 2019). At least two distinct subgroups of bacterial SPTs exist (Geiger et al., 2019). One subgroup includes SPTs of the *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Sphingobacterium*, and *Porphyromonas*) and the δ -*Proteobacteria* (*Bacteriovorax stolpii*, *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, and *Sorangium cellulosum*), whereas the other subgroup includes members of the *Rhodobacteria*, a subphylum of Gram-negative bacteria, that includes α -, β -, and γ -*Proteobacteria*. For example, this latter subgroup of SPTs occurs in the α -*Proteobacteria* *Caulobacter crescentus*, *Gluconobacter oxydans*, *Sphingomonas wittichii*, *Sphingomonas paucimobilis*, and *Zymomonas mobilis*, in the β -*Proteobacterium* *Nitrosomonas eutropha*, and in the γ -*Proteobacterium* *Escherichia coli* B [i.e., in the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) B7A and in the protein expression host *E. coli* BL21(DE3) (Jeong et al., 2015)]. SPTs of the *Rhodobacteria* clearly group together in phylogenetic trees (Geiger et al., 2010, 2019), and their structural genes are usually preceded by a gene predicted to code for an acyl carrier protein (ACP) (Geiger et al., 2010; Raman et al., 2010). *Rhodobacteria* genomes also harbor a well-conserved structural gene for a predicted acyl-CoA synthetase (ACS), frequently in close proximity to the *spt* and the potential *acp* gene.

Acyl carrier proteins (ACPs) are small proteins (<10 kDa) with acidic isoelectric points (pI), carrying a 4'-phosphopantetheine (4'-PPT) prosthetic group to which acyl chains are linked as thioesters during fatty acid or polyketide biosynthesis and transfer. All bacteria possess a constitutively expressed ACP (AcpP), which is needed for

essential housekeeping functions and acts as acyl group carrier and donor during fatty acid and membrane lipid biosynthesis (Byers and Gong, 2007). Structural genes for AcpPs (*acpP*) are usually encountered in the genomic neighborhood of other fatty acid biosynthesis (*fab*) genes, i.e., *fabH*, *fabD*, *fabG*, and *fabF* in *E. coli* (Zhang and Cronan, 1996) or *fabD*, *fabG*, and *fabF* in *C. crescentus* (Nierman et al., 2001). Besides their roles in fatty acid, glycerophospholipid, and lipid A biosynthesis, housekeeping AcpPs participate in the synthesis of *N*-acylhomoserine lactone signals for quorum sensing, pore-forming hemolysins, and membrane-derived oligosaccharides (Byers and Gong, 2007). However, some bacteria with complex metabolisms have additional specialized ACPs for the synthesis of secondary metabolites such as polyketides or non-ribosomal peptides (Geiger and López-Lara, 2002; Lai et al., 2006), factors that provoke formation of nitrogen-fixing root nodules on legume host plants by NodF (Ritsemma et al., 1998), certain lipid A species by AcpXL (Brozek et al., 1996), and capsular polysaccharides by RkpF (Epple et al., 1998). Although the protein part of ACPs is encoded by their respective structural genes, a post-translational modification is required to convert apo-ACPs into functional holo-ACPs. This reaction is catalyzed by holo-ACP synthase (AcpS) (Lambalot et al., 1996; Flugel et al., 2000) that transfers the 4'-PPT residue from coenzyme A (CoA) to a conserved serine of an ACP.

Fatty acyl-CoA synthetase belongs to the superfamily of adenylate-forming enzymes and plays a central role in intermediary metabolism by catalyzing the formation of fatty acyl-CoA. In *E. coli* this enzyme is encoded by the *fadD* gene and is required for the coupled import and activation of exogenous or endogenous long-chain fatty acids. Fatty acyl-CoAs can then be catabolized by β -oxidation or be reutilized for membrane lipid formation (Sahonero-Canavesi et al., 2019).

Another member of the adenylate-forming enzyme family is acyl-ACP synthetase (Aas). Aas acts on ACPs instead of CoA esterifying fatty acids to the 4'-PPT prosthetic group of holo-ACP coupled to the hydrolysis of ATP. Although Aas was first discovered in *E. coli* (Ray and Cronan, 1976), its use for generating acylated versions of ACPs is limited due to a relatively narrow substrate specificity. Instead, Aas from *Vibrio harveyi* has been developed as an acylating tool, because it has a relatively broad substrate specificity for the type of fatty acids or the type of ACPs (Beld et al., 2014) employed.

Studies on sphingolipid biosynthesis in *C. crescentus* revealed that besides *spt* (Stankeviciute et al., 2019), at least four other genes are required for dihydroceramide formation and they were predicted to code for an ACP (CC_1163), a ACS (CC_1165), an epimerase/dehydrogenase (CC_1164), and an acyl-CoA transferase (CC_1154) (Olea-Ozuna et al., 2021). All five of these structural genes are required for fitness (Christen et al., 2011), survival and detergent resistance of *C. crescentus* (Olea-Ozuna et al., 2021). Notably, for the formation of the biosynthetic intermediate 3-oxo-sphinganine in *E. coli*, the

combined expression of SPT, the putative ACP, and the putative ACS was required (Olea-Ozuna et al., 2021) and here we propose a biochemical model for 3-oxo-sphinganine synthesis in *C. crescentus* and other *Rhodobacteria* (Figure 1).

Using a combination of labeling experiments and mass spectrometry analyses, we now show that the putative ACP contains a 4'-PPT prosthetic group, can be acylated, and is therefore an ACP. The putative ACS acylates the specialized ACP, but not CoA or the *C. crescentus* housekeeping AcpP, and so constitutes a specialized and selective acyl-ACP synthetase. Furthermore, the acylated specialized ACP is the preferred thioester substrate for SPTs of the *Rhodobacteria* group.

Results and discussion

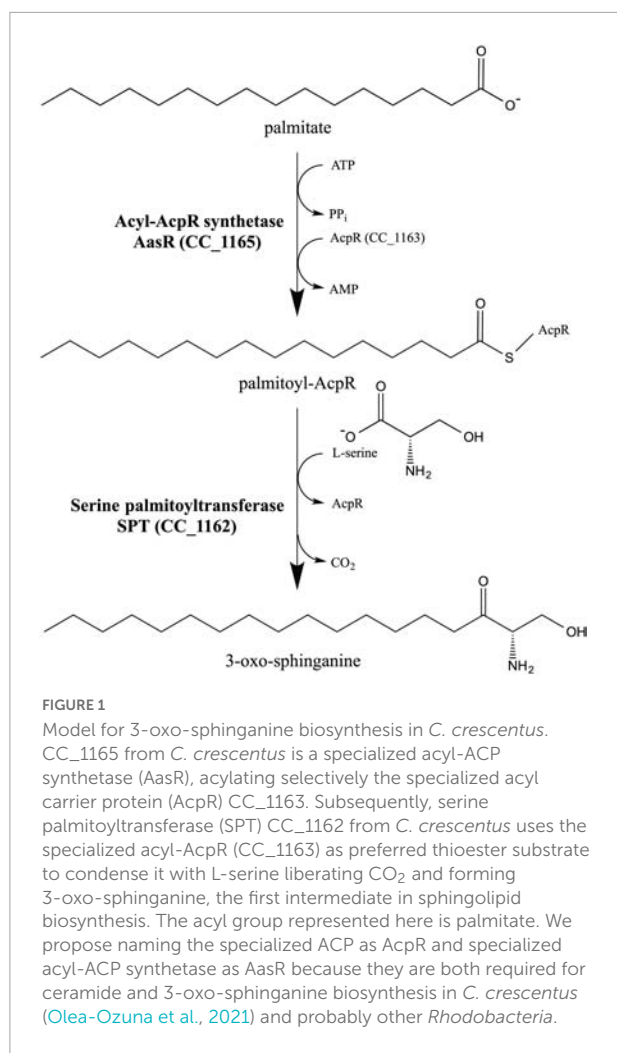
Acyl carrier proteins from *Caulobacter crescentus* and from *Escherichia coli* BL21(DE3) required for sphingolipid biosynthesis contain a 4'-phosphopantetheine prosthetic group

Besides the housekeeping AcpP proteins (CC_1677 in *C. crescentus* and ECD_01090 in *E. coli* BL21(DE3)), both bacteria possess a structural gene for putative ACPs (CC_1163 and ECD_02853, respectively), located just upstream of their respective *spt* genes. These four structural *acp* genes were cloned and overexpressed in *E. coli*. Separation of cell-free protein extracts by 20% native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and subsequent staining with Coomassie blue (Figure 2A) indicates that ACPs and putative ACPs were readily expressed from all cloned genes (lanes 2–8) and showed characteristic migration behavior. In parallel, *in vivo* labeling experiments with radioactive β -alanine, the biosynthetic precursor of 4'-PPT, were performed with the same strains and after separating cell-free extracts by PAGE, radioactive bands were visualized (Figure 2B). For 4 known ACPs (ECD_01090 = AcpP_{Ec}, lane 3; NodF, lane 6; AcpXL, lane 7; RkpF, lane 8), radiolabeled bands with similar relative mobility as the overexpressed proteins were detected. Also, the putative ACPs (ECD_02853 = AcpR_{Cc}, lane 2; CC_1677 = AcpP_{Cc}, lane 4; CC_1163 = AcpR_{Cc}, lane 5) displayed radiolabeled bands that had similar relative mobility as the overexpressed protein bands (Figure 2), suggesting that in addition to the housekeeping AcpP_{Cc} from *C. crescentus*, the specialized predicted ACPs AcpR_{Ec} from *E. coli* and AcpR_{Cc} from *C. crescentus* also contained β -alanine, the building block of the 4'-PPT prosthetic group characteristic for ACPs. The autoradiogram also reveals that the housekeeping AcpP_{Ec} from *E. coli*, which is present in all samples, including the *E. coli* strain harboring the empty vector pET9a, migrates close to the front and incorporated β -alanine

(Figure 2B). In an attempt to obtain a better separation of the distinct ACPs, the same samples analyzed for Figure 1 were also subjected to a SDS-Tricine PAGE (Supplementary Figure 1). Although the housekeeping AcpP_{Ec} from *E. coli* is known to migrate much slower than expected from its molecular weight in SDS-containing gel systems (Rock and Cronan, 1979) and although it is well separated from other ACPs in an SDS-Tricine PAGE (Supplementary Figure 1), all other ACPs migrated similarly, to each other and according to molecular weights of about 10 kDa (Supplementary Figure 1).

Specialized acyl carrier protein for sphingolipid synthesis from *Caulobacter crescentus* is selectively acylated by specialized acyl-ACP synthetase

To obtain acylated versions of ACPs from *C. crescentus* and *E. coli*, the four distinct ACPs AcpP_{Cc} (CC_1677), AcpR_{Cc} (CC_1163), AcpP_{Ec} (ECD_01090), and AcpR_{Ec} (ECD_02853) were expressed in *E. coli* BL21(DE3) \times pLysS and purified (Supplementary Figure 2). Purified ACP preparations contained mixtures of apo- and holo-forms and treatment with the tool of a holo-ACP synthase, as previously described (Ramos-Vega et al., 2009), converted these mixtures into the holo-forms of the respective ACPs (Supplementary Figure 3). Acyl-ACP synthetase (Aas) from *Vibrio harveyi* (Aas_{Vh}) is known for its broad substrate tolerance for many fatty acids and distinct ACPs (Beld et al., 2014). The distinct holo-ACPs were incubated with ATP, fatty acids of various chain lengths and homogenous Aas_{Vh} (Supplementary Figure 4A) and at the end of the assay, potentially acylated versions of the ACPs were separated in a conformationally sensitive PAGE system and visualized by Coomassie blue staining (Supplementary Figure 5). The housekeeping AcpP_{Ec} from *E. coli* (ECD_01090) maintains a more compact structure when acylated with fatty acids and so migrates faster when analyzed by conformationally sensitive PAGE (Beld et al., 2014). When unacylated, AcpP_{Ec} has a less compact structure under the electrophoretic conditions employed and migrates slowly. Acylation with fatty acids of increasing chain lengths causes more compact structures of the acylated AcpP and more rapid migration (Supplementary Figure 5A). Similarly, acylated forms of the housekeeping AcpP from *C. crescentus* (CC_1677) migrate more rapidly in conformationally sensitive PAGE suggesting a more compact form (Supplementary Figure 5B). In the case of specialized AcpR_{Cc}, potentially acylated forms of AcpR_{Cc} might migrate slightly faster than the apo-form and slightly slower than the holo-form (Supplementary Figure 5C). However, as no major change in migration was observed, there is no evidence that AcpR_{Cc} can be acylated by Aas_{Vh}. The potentially different forms of specialized AcpR_{Ec} all migrate in a similar



way (Supplementary Figure 5D) and therefore this type of analysis does not permit us to evaluate whether acylation of AcpR_{Cc} or AcpR_{Ec} occurred when Aas_{Vh} was employed as acylating enzyme.

To explore which thiol substrates could be acylated by which acylating enzymes, homogeneous preparations of Aas from *V. harveyi* (Aas_{Vh}) (Supplementary Figure 4A), predicted ACS AasR_{Cc} (CC_1165) from *C. crescentus* (Supplementary Figure 4B), and acyl-CoA synthetase from *Sinorhizobium meliloti* (FadD_{Sm}) (Supplementary Figure 4C), were obtained. Each of the homogeneous enzymes was incubated with different potential thiol substrates (CoA, housekeeping AcpP_{Cc}, or specialized AcpR_{Cc}), ATP, and [³H]palmitate and at different time points, aliquots were analyzed for radioactivity linked to protein, in the cases of AcpP_{Cc} and AcpR_{Cc}, or to CoA. From the time course for acyl-thioester formation, it is evident that putative ACS AasR_{Cc} from *C. crescentus* caused an increase in the amount of acyl-AcpR_{Cc} whereas no acyl-thioesters were formed when AcpP_{Cc} or CoA were used as substrates (Figure 3A). When different potential thiol substrates were

incubated with ATP, [³H]palmitate and Aas_{Vh}, an increase in the amount of acyl-AcpP_{Cc} was detected, whereas only very minor increases might have occurred when AcpR_{Cc} or CoA were used as substrates (Figure 3B). Using FadD_{Sm} in the acylation assay resulted in an increase in the amount of acyl-CoA whereas no acyl-thioesters were formed when AcpP_{Cc} or AcpR_{Cc} were used as substrates (Figure 3C). These results clearly show that acyl-CoA synthetase FadD is able to form acyl-CoA but cannot acylate the housekeeping AcpP or specialized ACP AcpR from *C. crescentus*, that the acyl-ACP synthetase Aas from *V. harveyi* is able to acylate the housekeeping AcpP from *C. crescentus*, and that the putative ACS is a specialized acyl-ACP synthetase (AasR) that selectively acylates the specialized AcpR_{Cc} but not CoA or the housekeeping AcpP_{Cc}.

In order to confirm that acyl residues are covalently linked to the respective ACPs from *C. crescentus*, acylation assays with elevated enzyme concentrations of AasR_{Cc}, Aas_{Vh}, or FadD_{Sm} were employed to achieve near complete conversion of holo-ACPs to acyl-ACPs. Potentially acylated ACP preparations were separated by conformation-sensitive 5 M urea-PAGE. Gels containing samples obtained with non-radioactive palmitate were stained with Coomassie blue (Figure 4A). Potential acyl-ACP samples generated by using [³H]palmitate were separated by 5 M urea-PAGE and autoradiograms were obtained (Figure 4B).

In acylation assays involving non-radioactive palmitate, both ACPs AcpR_{Cc} and AcpP_{Cc} changed their migration in the conformation-sensitive urea-PAGE. Acyl-AcpR_{Cc} migrated slightly slower than the holo-form (between the apo- and the holo-forms) after being incubated with the AasR_{Cc} from *C. crescentus* (Figure 4A), which corresponds to the band that had incorporated [³H]palmitate in the radiolabel assay (Figure 4B). When holo-AcpR_{Cc} was treated with Aas from *V. harveyi* or with FadD from *S. meliloti* the slight shift in migration of AcpR_{Cc} did not occur (Figure 4A) nor was any radioactive palmitate attached to AcpR_{Cc} (Figure 4B). This result confirms that the putative ACS is really an acyl-ACP synthetase that can covalently link a fatty acyl residue to the specialized AcpR_{Cc} for sphingolipid biosynthesis in *C. crescentus*. Incubation of AcpP_{Cc} with Aas from *V. harveyi* led to the formation of a protein band that migrated as expected for an acyl-AcpP_{Cc} and much faster than the unacylated AcpP_{Cc} (Figure 4A). Also, the fast-migrating band had incorporated radiolabeled palmitate (Figure 4B), confirming that this substance is acyl-AcpP_{Cc}. However, when AcpP_{Cc} was treated with AasR_{Cc} from *C. crescentus* or with FadD from *S. meliloti*, the strong shift in migration of AcpP_{Cc} did not occur (Figure 4A) nor was any palmitate attached to AcpP_{Cc} in radiolabel assays (Figure 4B). These results show that Aas from *V. harveyi* is an efficient acylation tool for AcpP, but not for AcpR.

Mass spectrometric analyses of caulobacterial ACPs revealed an average mass of 9,020.3 ± 0.4 Da for AcpR (Figure 5A),

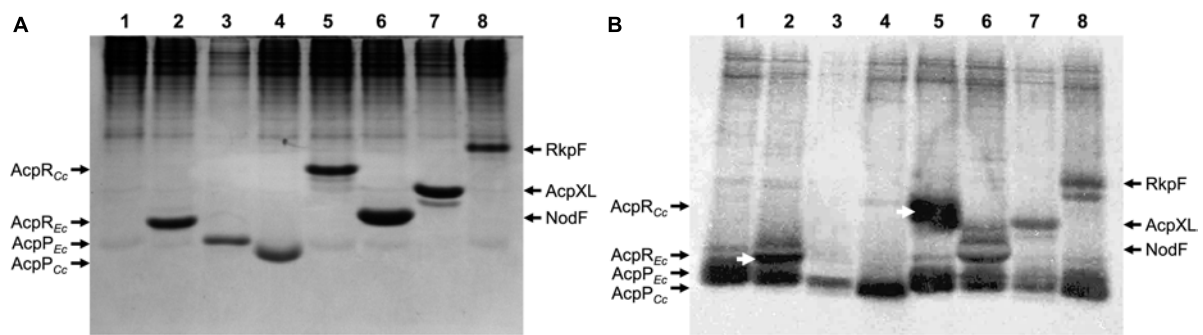


FIGURE 2

In vivo labeling of ACPs with β - ^{35}S alanine. Proteins of cell-free extracts from *E. coli* OG7001 \times pLysS strains overproducing different ACPs from pET9a-derived plasmids (Table 1) were separated in a 20% native PAGE. (A) Proteins stained with Coomassie blue and (B) autoradiogram visualized after labeling with β - ^{35}S alanine. In (A,B), extracts of *E. coli* carrying the pET9a vector (lane 1), AcpR_{Ec} (ECD_02853)-expressing pJPG12 (lane 2), AcpP_{Ec} (ECD_01090)-expressing pTB5079 (lane 3), AcpP_{Cc} (CC_1677)-expressing pPEG01 (lane 4), AcpR_{Cc} (CC_1163)-expressing pDG01 (lane 5), NodF-expressing pMP2301 (lane 6), AcpXL-expressing pAL07 (lane 7) or RkpF-expressing pTB1003 (lane 8) were analyzed. White arrows (B) highlight radiolabeled specialized ACPs AcpR_{Ec} (ECD_02853) and AcpP_{Cc} (CC_1163) from *E. coli* and *C. crescentus*, respectively.

which is close to the theoretical molecular weight of 9,022.4 Da calculated from the amino acid sequence for the apo-form of AcpR using the ExPASy – SIB Bioinformatics Resource Portal.¹ Similarly, an average mass of $8,599.1 \pm 0.3$ Da was determined for the purified AcpP preparation (Figure 5B). However, the theoretical molecular weight calculated from the complete amino acid sequence amounted to 8,732.4 Da. In proteins where the second amino acid residue is a serine, the N-terminal methionine residue is usually removed by methionine aminopeptidase (Frottin et al., 2006) to generate mature proteins. This post-translational methionine removal is frequently found for housekeeping AcpPs (Platt et al., 1990). An apo-AcpP that lacks the N-terminal methionine (mass 131.2 Da) would have a theoretical mass of 8,601.7 Da, which is in close agreement with the determined average mass of $8,599.1 \pm 0.3$ Da (Figure 5B). Treatment of apo-ACPs with holo-ACP synthase AcpS leads to species with an average mass of $9,360.8 \pm 0.8$ Da in the case of AcpR (Figure 5C) or of $8,939.8 \pm 0.9$ in the case of AcpP (Figure 5D), corresponding to mass increases of 340.5 or 340.7, respectively, when compared to the apo-forms, and as would be expected for the addition of a 4'-PPT group (mass 339). Treatment of holo-AcpR with AasR in the presence of palmitate and ATP led to a species with an average mass of $9,601.2 \pm 1.3$ Da (Figure 5E) and the observed mass increase of 240.4 is in agreement with the attachment of a palmitoyl residue (+238) to the 4'-PPT arm of AcpR. When holo-AcpP was treated with AasR_{VH} in the presence of palmitate and ATP a species with an average mass of $9,180.3 \pm 1.3$ Da was formed (Figure 5F) and the observed mass increase of 240.5 is in agreement with an attachment of a palmitoyl residue to the 4'-PPT arm of AcpP. However, in this latter case, conversion of holo-AcpP to

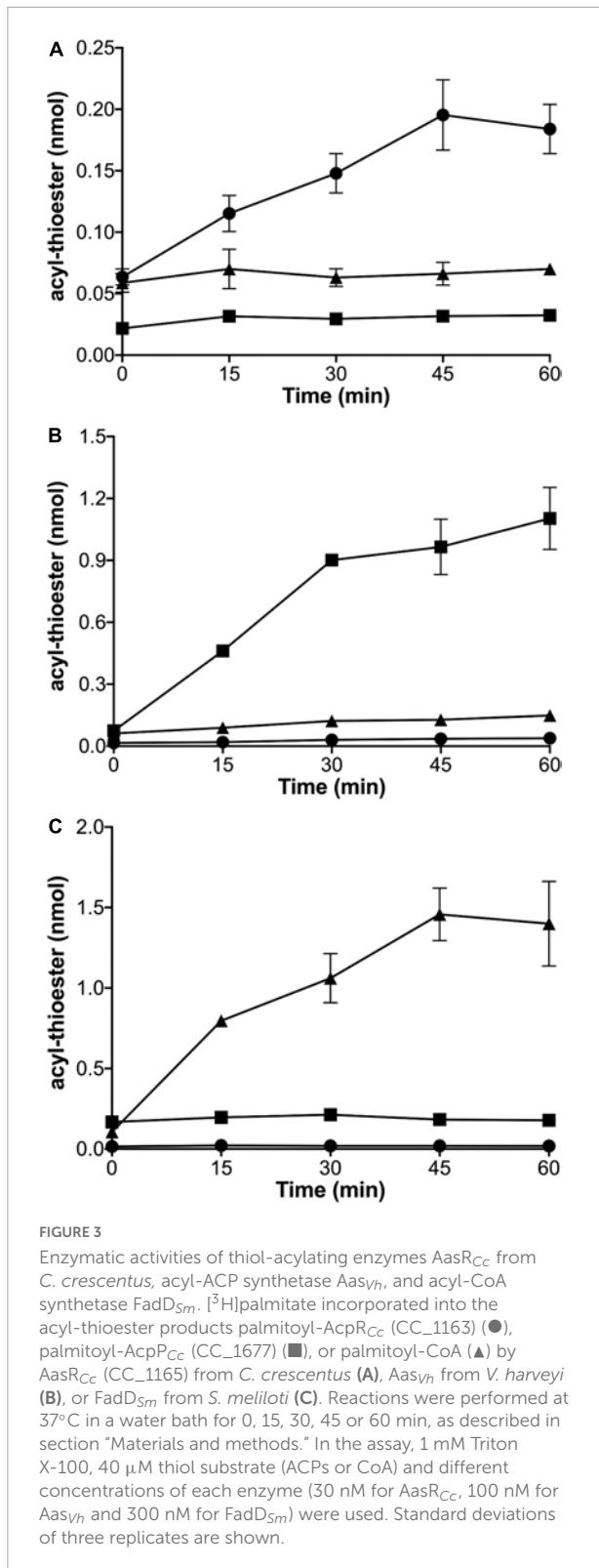
palmitoyl-AcpP was not complete (Figure 5F), probably due to the fact that the acylation reaction was performed in the absence of Triton X-100 to avoid serious contaminations of the mass spectrometer. Theoretical and measured masses as well as the relative errors are given for the distinct caulobacterial ACP versions (Supplementary Table 1). In summary, only acyl-ACP synthetase from *V. harveyi* is able to acylate the housekeeping AcpP and only AasR can efficiently acylate the specialized AcpR from *C. crescentus*.

Enzymological properties of acyl-ACP synthetase AasR

In order to measure AasR activity in a reproducible way, we investigated the influence of some components on the enzyme assay. The effect of the non-ionic detergent Triton X-100 concentration on the standard AasR assay was studied (Supplementary Figure 6), demonstrating that under these conditions there was a strong detergent dependence for the AasR activity with a maximal activity at 1 mM (0.06% w/v) Triton X-100. At higher concentrations, Triton X-100 quickly became inhibitory, indicating that substrate dilution kinetics was followed (Eaton and Dennis, 1976).

Also, the effect of the AcpR substrate concentration on AasR activity was studied (Figure 6). Clearly, the initial velocity V_0 for the AasR-catalyzed reaction does not follow a Michaelis-Menten-like hyperbolic dependence on AcpR substrate concentration. In contrast, AasR exhibited a sigmoidal AcpR activation curve, with a measured maximum velocity ($V_{\max} = 12$ pmol/min) at 40 μM of AcpR. The constant, where half of V_{\max} is obtained ($K_{0.5} = 24$ μM), indicates a high affinity of AasR for its AcpR substrate. A Hill coefficient of $n_H = 1.98$

¹ <https://www.expasy.org/>



indicates positive cooperativity for AcpR binding to the AasR. Surprisingly, higher concentrations of AcpR (>40 μM) inhibit the AasR-catalyzed reaction (Figure 6).

Rhodobacterial SPTs require specialized AcpRs for *in vivo* 3-oxo-sphinganine formation

The lipid profiles of *E. coli* strains expressing individual genes or combinations of genes required for 3-oxo-sphinganine synthesis were analyzed by TLC. If the combination of AcpR_{Cc} and AasR_{Cc} or individual SPTs (SPT_{Cc}, SPT_{Ec}, or SPT_{Sw}) were expressed, the lipid profile of those samples was similar to the profile obtained from an *E. coli* strain harboring empty vectors pET9a and pCDFDuet-1 (Figure 7A). We had previously shown that the combined expression of AcpR_{Cc}, AasR_{Cc} and SPT_{Cc} in *E. coli* led to the formation of a compound that migrated like 3-oxo-sphinganine in TLC analyses and high resolution mass spectrometry analysis of such lipid extracts indicated the presence of a compound with $m/z = 300.28953$ expected for C18-3-oxo-sphinganine (Olea-Ozuna et al., 2021). We now demonstrate that the combined expression of AcpR_{Cc}/AasR_{Cc}, together with any of the three SPTs (SPT_{Cc}, SPT_{Ec}, or SPT_{Sw}) studied, led to abundant formation of compounds that migrated like the 3-oxo-sphinganine standard (Figure 7A). Also, in the cases of all three SPTs, compounds that migrated like sphinganine or ceramide were formed, possibly by intrinsic enzymes of *E. coli* BL21(DE3) (Supplementary Figure 7). The gene ECD_02852 might encode a keto-sphinganine reductase and convert 3-oxo-sphinganine to sphinganine and the gene product of ECD_02850 might be an *N*-acyltransferase that converts sphinganine to (dihydro)ceramide. Surprisingly, all newly formed compounds were more intense when the previously characterized SPT from *S. wittichii* (Raman et al., 2010) was employed (Figure 7A). These results suggest that the acylated AcpR_{Cc} serves as an excellent substrate for each of the three SPTs investigated.

Intrinsic AcpR and AasR are needed for efficient 3-oxo-sphinganine formation in *Caulobacter*

To further clarify the requirement of ACPs for 3-oxo-sphinganine formation, housekeeping and specialized ACPs from *C. crescentus* and *E. coli* BL21, respectively, were coexpressed with acyl-ACP synthetase (AasR_{Cc}) and serine palmitoyltransferase (SPT_{Cc}) from *C. crescentus*. 3-oxo-sphinganine formation was observed when AcpR_{Cc} was coexpressed (Supplementary Figure 8A), but not upon coexpression of any of the housekeeping ACPs (AcpP_{Cc} or AcpP_{Ec}). When AcpR_{Ec} from *E. coli* was coexpressed, a compound migrating like 3-oxo-sphinganine was also formed, but to a lesser extent than upon expression of AcpR_{Cc} (Supplementary Figure 8A). Therefore, AasR_{Cc} can acylate both, its native AcpR_{Cc} and to a lesser extent AcpR_{Ec} from

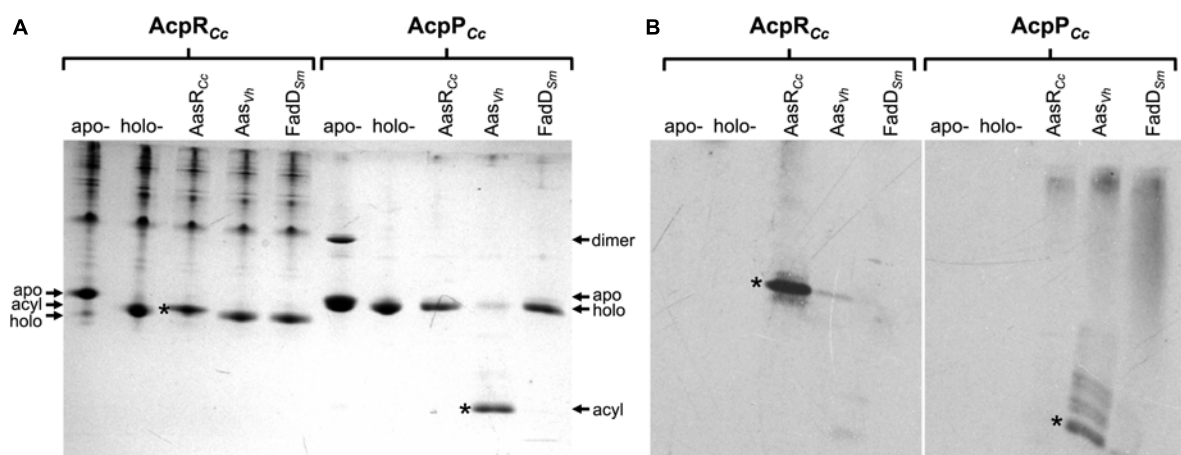


FIGURE 4

Acylation of specialized AcpR_{Cc} and housekeeping AcpP_{Cc} from *C. crescentus* with [³H]palmitate. Palmitate incorporated into palmitoyl-AcpR_{Cc} (CC_1163) or palmitoyl-AcpP_{Cc} (CC_1677) products after incubation with AasR_{Cc} (CC_1165) from *C. crescentus*, Aas from *V. harveyi* (Aas_{Vh}), or FadD from *S. meliloti* 1021 (FadD_{Sm}). After acylation with non-radioactive palmitate, proteins were separated by conformation-sensitive 5 M urea-PAGE and stained with Coomassie blue (A), whereas proteins acylated with radioactive [³H]palmitate were separated by 5 M urea-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, treated with EN³HANCE liquid autoradiography enhancer (Perkin Elmer), and the autoradiogram was developed (B). Reactions were performed at 37°C in a water bath for 60 min, as described in section “Materials and methods.” In the assay, 1 mM Triton X-100, 40 μM holo-ACP (holo-ACP CC_1163 or holo-ACP CC_1677) and 300 nM of each enzyme (AasR_{Cc}, Aas_{Vh}, or FadD_{Sm}) were used. Different isoforms of the ACPs are apo-, holo-, acyl-ACP and ACP dimers. Asterisks indicate bands corresponding to acyl-ACPs, after acylation with non-radioactive palmitate (A) or [³H]palmitate (B). A typical experiment of three replicates is shown.

E. coli. Therefore, in this tripartite system (AasR_{Cc} AcpR_{Cc} SPT_{Cc}) the specific AcpR_{Cc} from *C. crescentus* is required for efficient 3-oxo-sphinganine formation. Also, when we studied coexpression of distinct acyl-CoA/acyl-ACP synthetases (AasR_{Cc} Aas_{Vh} FadD_{Sm}) with the specialized ACP (AcpR_{Cc}) and serine palmitoyltransferase (SPT_{Cc}) from *C. crescentus*, 3-oxo-sphinganine was only formed when the specific acyl-ACP synthetase (AasR_{Cc}) from *C. crescentus* was coexpressed (Supplementary Figure 8B), but not upon coexpression of an acyl-ACP synthetase (Aas_{Vh}) from *V. harveyi* or coexpression of an acyl-CoA synthetase (FadD_{Sm}) from *S. meliloti*.

AasRs require their intrinsic AcpRs for efficient 3-oxo-sphinganine formation *in vivo*

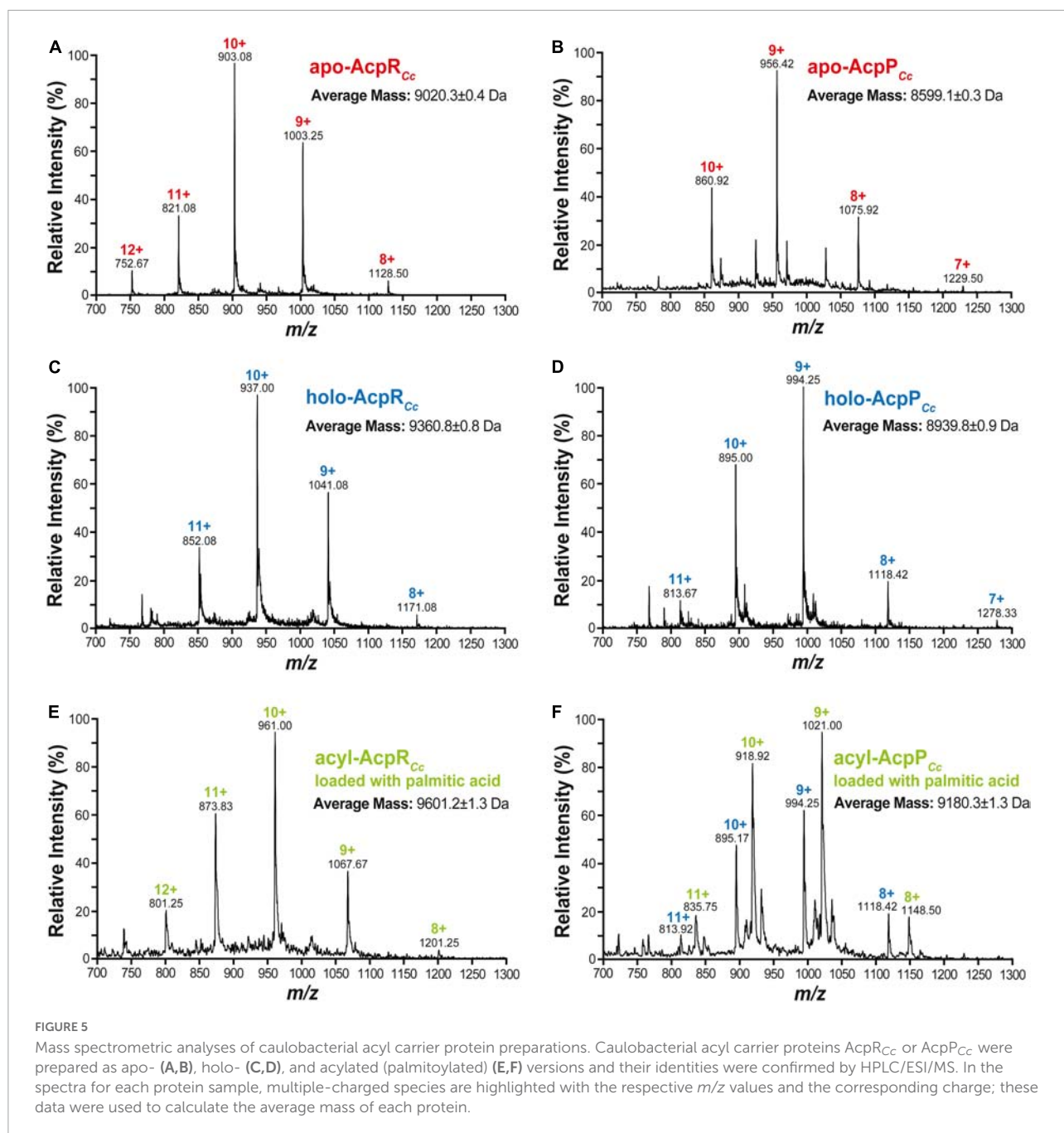
Finally, upon coexpression of cognate acyl-ACP synthetase (AasR_{Ec}), serine palmitoyltransferase (SPT_{Ec}), and specialized ACP (AcpR_{Ec}) from *E. coli*, formation of 3-oxo-sphinganine was observed (Figure 7B). This did not occur when AcpR_{Cc} and SPT_{Cc} from *C. crescentus* were coexpressed with AasR_{Ec} from *E. coli*. However, when AcpR_{Ec} and SPT_{Ec} from *E. coli* were coexpressed with AasR_{Cc} from *C. crescentus* a compound migrating like 3-oxo-sphinganine was formed. These data suggest that AasR_{Cc} from *C. crescentus* can acylate its native AcpR_{Cc} and to a lesser extent AcpR_{Ec} from *E. coli*. In contrast, AasR_{Ec} from *E. coli* can acylate AcpR_{Ec} from *E. coli*, but not

AcpR_{Cc} from *C. crescentus*. Therefore, the specific interaction between AasR and AcpR from the same organism seems crucial for acyl-AcpR and efficient 3-oxo-sphinganine formation.

Serine palmitoyltransferases from *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli* BL21(DE3) and *Sphingomonas wittichii* prefer acyl-AcpR as thioester substrate

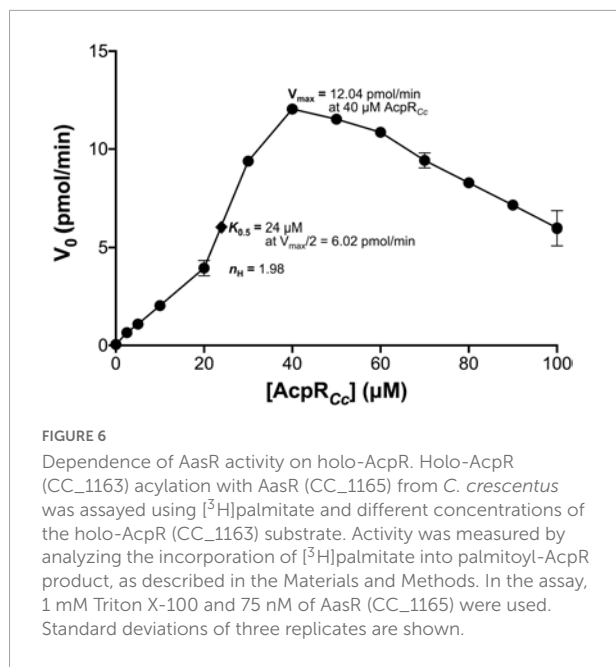
To determine which potential thioester substrates (acyl-CoA, acyl-AcpR_{Cc} or acyl-AcpP_{Cc}) were preferred by each SPT, enzymatic assays were performed similar to those described by Ikushiro et al. (2001). Cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3) × pLysS, in which SPT from *C. crescentus*, *E. coli* BL21(DE3) or *S. wittichii* (Raman et al., 2010) had been overexpressed, were used to study 3-oxo-sphinganine formation in the presence of L-[¹⁴C]serine and one of the potential thioester substrates.

The *in vitro* formation of a minor compound migrating like 3-oxo-sphinganine in TLC was observed when using the SPTs from *C. crescentus*, *E. coli* BL21(DE3) or *S. wittichii*, and palmitoyl-CoA as thioester substrate (Figure 8). However, no formation of 3-oxo-sphinganine was observed when using cell-free *E. coli* extracts harboring the empty plasmid pET9a. When palmitoyl-AcpR_{Cc} was employed as thioester substrate, several lipidic compounds, including a major compound migrating like 3-oxo-sphinganine were formed by SPTs from



C. crescentus, *E. coli* BL21(DE3), or *S. wittichii* but none in the absence of any SPT (EV) (Figure 8). Presently, we do not know the chemical nature of the other compounds formed in an SPT-dependent way. However, as 3-oxo-sphinganine possesses both functional groups, a primary amine and an oxo group, required for abiotic, chemical imine (Schiff base) formation, it is likely that 3-oxo-sphinganine undergoes condensations by Schiff reactions with itself and other compounds carrying oxo- or primary amine groups. In fact, the fastest migrating compound in Figure 8 is also formed

from a 3-oxo-sphinganine standard when incubated with buffer only. When palmitoyl-AcpP was used as thioester substrate, only minor amounts of a compound that migrated like 3-oxo-sphinganine were formed by all three SPTs, suggesting that palmitoyl-AcpP_{Cc} is not a good substrate for any of these three rhodobacterial SPTs (Figure 8). Therefore, for all three SPTs from the *Rhodobacteria* assayed [*C. crescentus*, *E. coli* BL21(DE3), and *S. wittichii*], palmitoyl-AcpR_{Cc} was much preferred as thioester substrate over the acylated AcpP_{Cc} or acyl-CoA derivatives.



Relaxed substrate specificity of serine palmitoyltransferases from *Rhodobacteria*

Kinetic studies with purified SPTs from *S. paucimobilis* and *S. wittichii* suggest that the affinities for the substrates serine (K_m 1 mM) and palmitoyl-CoA (K_m 30 μ M) are similar for both enzymes (Raman et al., 2010). However, turnover numbers and catalytic efficiencies of the *S. paucimobilis* SPT were found to be at least one order of magnitude higher than those for the *S. wittichii* SPT (Raman et al., 2010). Based on these results, the authors suggested that a specialized acyl-AcpR might be a better substrate for *S. wittichii* SPT than acyl-CoA and that this might not be the case for the well-characterized *S. paucimobilis* SPT. Our results (Figure 8) show that even the acyl-AcpR from *C. crescentus* is a better substrate for SPT from *S. wittichii* than acyl-CoA. However, we cannot confirm the assumption that *S. paucimobilis* SPT is not accompanied by a cognate AcpR (Raman et al., 2010) encoded in its genome. Our data base analysis of available *S. wittichii* and *S. paucimobilis* genomes (Supplementary Table 2) suggests that essentially all of them possess structural genes for AcpR and AasR and that therefore an AasR/AcpR-dependent SPT-catalyzed reaction occurs in the *Sphingomonas* genus.

In this work, we demonstrated that the specialized AcpR for sphingolipid biosynthesis from *C. crescentus* was the preferred thioester substrate (acyl-AcpR) for the SPTs from *C. crescentus* CB15, *E. coli* BL21(DE3), and *S. wittichii* to form the sphingolipid precursor, 3-oxo-sphinganine (Figure 7). SPTs from these bacteria were also able to use acyl-CoA or the housekeeping acyl-AcpP from *C. crescentus* as thioester

substrate, however, to a much lesser extent. Therefore, although all three SPTs from *Rhodobacteria* showed a relaxed thioester substrate specificity, they clearly preferred the specialized ACP AcpR for initiating sphingolipid biosynthesis.

Genomic organization of rhodobacterial sphingolipid biosynthesis genes

In eukaryotes the first committed step of sphingolipid biosynthesis is catalyzed by SPT and consists in the decarboxylative condensation of serine with an acyl-CoA, resulting in the formation of 3-oxo-sphinganine. Although palmitoyl-CoA can serve as a substrate for SPT from *C. crescentus* (Stankeviciute et al., 2022), we have now demonstrated for *C. crescentus* that a fatty acyl residue is linked to the specialized ACP AcpR by the specialized acyl-ACP synthetase AasR, and that subsequently acyl-AcpR is used as the preferred acyl-thioester substrate in the SPT-catalyzed reaction (Figure 1). Also, our *in vivo* experiments indicate that AcpR/AasR pairs from the same organism together with SPT are required for efficient 3-oxo-sphinganine formation (Figure 7 and Supplementary Figure 8). Therefore, the biological significance of the AcpR/AasR proteins might consist of sequestering acyl pools and specifically directing them toward sphingolipid synthesis. This intricate formation of 3-oxo-sphinganine seems to be common in members of the *Rhodobacteria* as their structural gene for SPT is preceded by a structural gene for the specialized AcpR, both forming an operon (Figure 9 and Supplementary Table 2). Also, a structural gene for the specialized acyl-ACP synthetase (*aasR*) is found in genomes of other sphingolipid-producing *Rhodobacteria* (Figure 9 and Supplementary Table 2). Whereas in most *Rhodobacteria* *aasR* is located in the close neighborhood of the *acpR-spt* operon, in the *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*, *Zymomonas*) *aasR* is encountered in distant parts of the genome (Figure 9 and Supplementary Table 2). It is thought that also in bacteria keto-sphinganine reductase would convert oxo-sphinganine to sphinganine which would subsequently be acylated by an acyl-CoA *N*-acyltransferase during dihydroceramide biosynthesis (Olea-Ozuna et al., 2021). Recently, an alternative pathway for ceramide biosynthesis in *C. crescentus* was proposed in which *N*-acylation would precede reduction (Stankeviciute et al., 2022). Good homologs are encountered for the presumptive keto-sphinganine reductase (*epi*) and acyl-CoA *N*-acyltransferase (*aca*) (Olea-Ozuna et al., 2021) as well in other SPT-containing *Rhodobacteria* (Figure 9 and Supplementary Table 2). These five structural genes for dihydroceramide synthesis in *Rhodobacteria* are clustered together only in the genomes of *C. crescentus* and *E. coli* BL21 (Figure 9 and Supplementary Table 2).

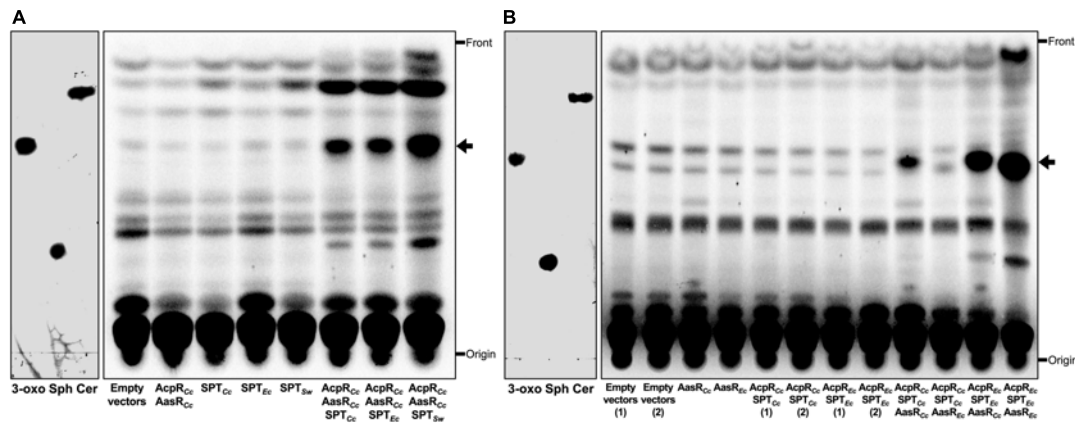


FIGURE 7

Substrate specificities in the *Rhodobacteria* tripartite protein system for 3-oxo-sphinganine formation. Expression of the structural genes for AcpR_{CC} and AasR_{CC} from *C. crescentus* in combination with any of three structural genes for SPT, from *C. crescentus* (SPT_{CC}), *E. coli* BL21(DE3) (SPT_{EC}), or *S. wittichii* (SPT_{SW}) in *E. coli* leads to the formation of a compound that migrates like 3-oxo-sphinganine in TLC (A) and AasR_{CC} from *C. crescentus* displays a broader substrate specificity than AasR_{EC} from *E. coli* BL21(DE3) (B). Radiolabeling with ¹⁴C-acetate was performed on complex medium at 30°C for 4 h (transition of exponential to stationary phase of growth) after induction with IPTG at an OD₆₀₀ = 0.3 with *E. coli* BL21(DE3) × pLysS expressing different sphingolipid biosynthesis genes, essentially as described previously (Olea-Ozuna et al., 2021). Strains of *E. coli* BL21(DE3) × pLysS employed harbored (A) the empty vectors pCDFDuet-1 and pET9a (Empty vectors), pJPG14 and pET9a (AcpR_{CC} AasR_{CC}), pCDFDuet-1 and pJPG08 (SPT_{CC}), pCDFDuet-1 and pJPG01 (SPT_{EC}), pCDFDuet-1 and pJPG02 (SPT_{SW}), pJPG14 and pJPG08 (AcpR_{CC} AasR_{CC} SPT_{CC}), pJPG14 and pJPG01 (AcpR_{CC} AasR_{CC} SPT_{EC}), and pJPG14 and pJPG02 (AcpR_{CC} AasR_{CC} SPT_{SW}). In panel (B) *E. coli* BL21(DE3) × pLysS harbored the empty vectors pCDFDuet-1 and pET16b [Empty vectors (1)], the empty vectors pCDFDuet-1 and pET17b [Empty vectors (2)], pCDFDuet-1 and pDG10 (AasR_{CC}), pCDFDuet-1 and pJPG17 (AasR_{EC}), pJPG16 and pET16b [AcpR_{CC} SPT_{CC} (1)], pJPG16 and pET17b [AcpR_{CC} SPT_{CC} (2)], pJPG20 and pET16b [AcpR_{EC} SPT_{EC} (1)], pJPG20 and pET17b [AcpR_{EC} SPT_{EC} (2)], pJPG16 and pDG10 (AcpR_{CC} SPT_{CC} AasR_{CC}), pJPG16 and pJPG17 (AcpR_{CC} SPT_{CC} AasR_{EC}), pJPG20 and pDG10 (AcpR_{EC} SPT_{EC} AasR_{CC}), and pJPG20 and pJPG17 (AcpR_{EC} SPT_{EC} AasR_{EC}). At the end of the labeling period, cells were harvested, lipids were extracted, separated by TLC and developed chromatograms were subjected to autoradiography as previously described (Olea-Ozuna et al., 2021). The arrow indicates a compound migrating like 3-oxo-sphinganine. Reference compounds 3-oxo-sphinganine (3-oxo), sphinganine (Sph), and *N*-palmitoyl-D-sphingosine (Cer) were developed in the same TLC and visualized by iodine staining.

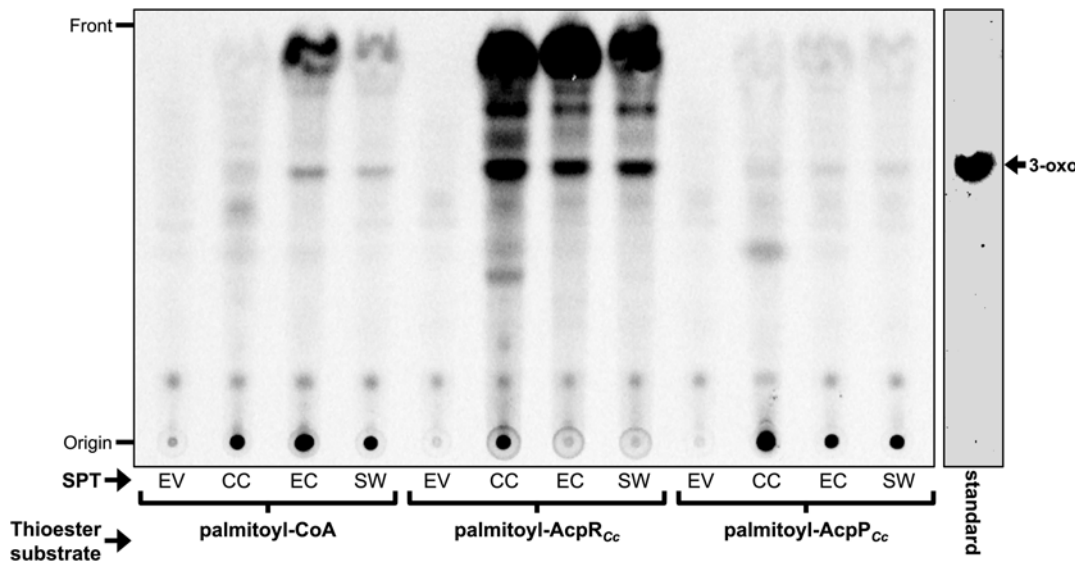


FIGURE 8

Dependence of serine palmitoyltransferases (SPTs) from different *Rhodobacteria* on distinct acyl-thioester substrates. Analysis of the incorporated radioactivity (L-[¹⁴C]serine) in lipid products after enzymatic assays using CE of *E. coli* BL21(DE3) × pLysS with empty vector pET9a (EV), CE with SPT (CC_1162) of *C. crescentus* (CC), SPT (ECD_02854) of *E. coli* (EC), or SPT (Swit_3900) of *S. wittichii* (SW). The respective thioester substrates [palmitoyl-CoA, palmitoyl-AcpR_{CC} (CC_1163) and palmitoyl-AcpP_{CC} (CC_1677)] used in the reaction are indicated. Iodine stained 3-oxo-sphinganine (3-oxo) standard (Matreya LLC) is shown.

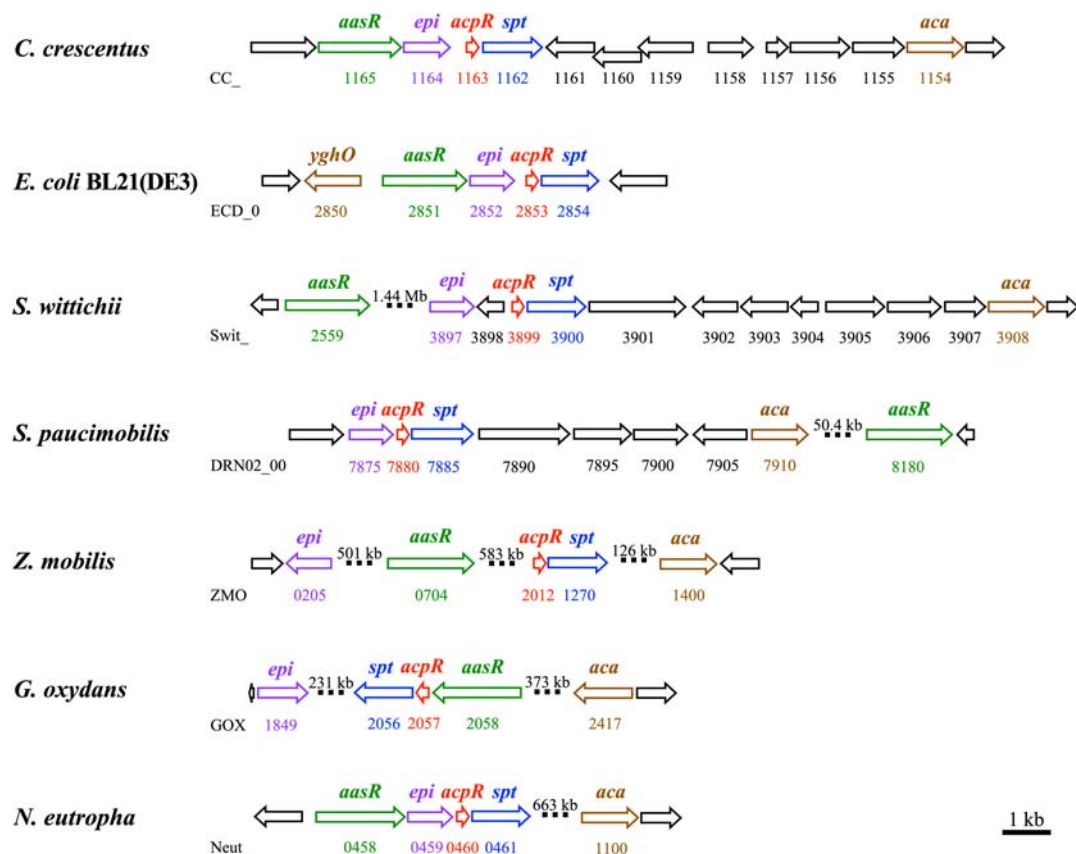


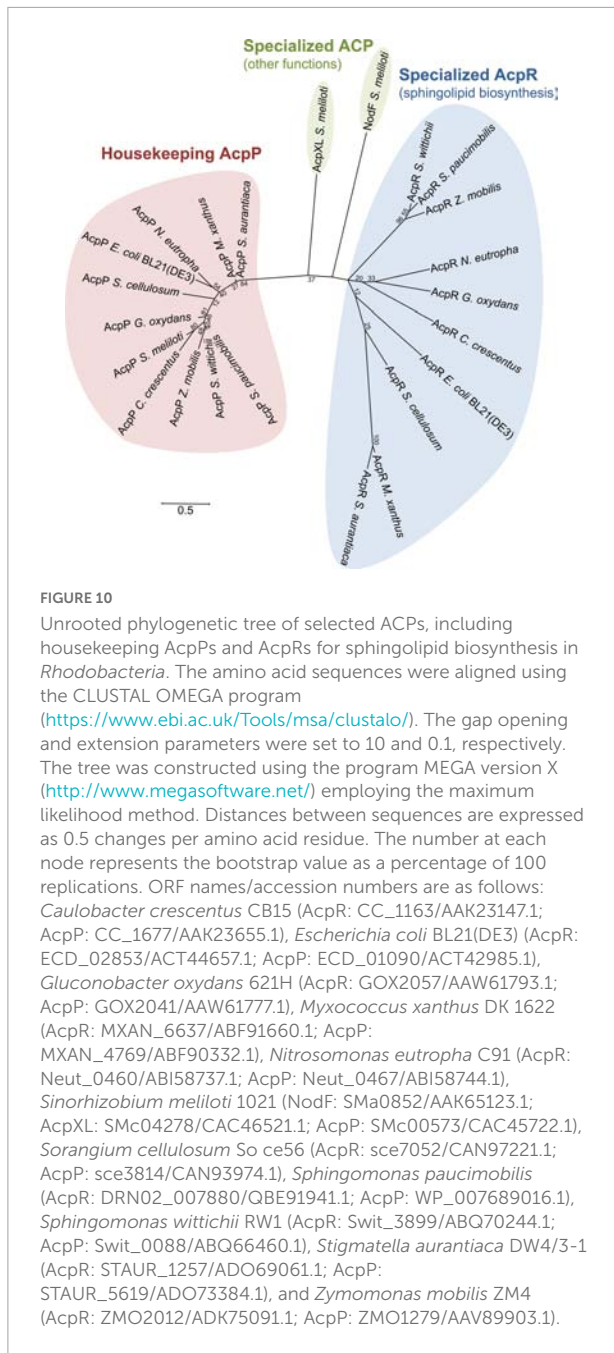
FIGURE 9

Genomic organization of genes/operons for sphingolipid biosynthesis in *Rhodobacteria*. Operons containing genes involved in the biosynthesis of sphingolipids from *Caulobacter crescentus* CB15, *Escherichia coli* BL21(DE3), *Sphingomonas wittichii* RW1, *Sphingomonas paucimobilis* strain AIMST S2, *Zymomonas mobilis* ZM4, *Gluconobacter oxydans* 621H, and *Nitrosomonas eutropha* C91 are shown. Three genes (*aasR*: CC_1165, ECD_02851, Swit_2559, DRN02_008180, ZMO0704, GOX2058, and Neut_0458; *acpR*: CC_1163, ECD_02853, Swit_3899, DRN02_007880, ZMO2012, GOX2056, and Neut_0461) from each strain, respectively, and required for the biosynthesis of the sphingolipid precursor, 3-oxo-sphinganine, are highlighted. Also, two genes (*epi*: CC_1164, ECD_02852, Swit_3897, DRN02_007875, ZMO0205, GOX1849, and Neut_0459; and *aca*: CC_1154, *yghO* ECD_02850, Swit_3908, DRN02_007910, ZMO1400, GOX2417, and Neut_1100) from each strain, respectively, and required for dihydroceramide biosynthesis are shown. Structural genes for specialized acyl-ACP synthetase (*aasR*), specialized acyl carrier protein (*acpR*), serine palmitoyltransferase (*spt*), predicted dehydrogenase/epimerase (*epi*), and acyl-CoA *N*-acyltransferase (*aca*) are highlighted with colors (green, red, blue, violet, and brown, respectively). Large genomic distances are indicated by interrupted bars and indication of the respective distance is shown. Accession numbers for the genes mentioned above are listed in the legend of [Supplementary Table 2](#).

Specialized acyl carrier proteins as substrates for rhodobacterial SPTs

All bacteria possess an essential housekeeping ACP, which is expressed constitutively from the *acpP* gene (Rawlings and Cronan, 1992). Phylogenetic analysis of amino acid sequences from housekeeping (AcpP) and specialized acyl carrier proteins showed that they cluster separately (Figure 10). Housekeeping AcpPs from α - (*C. crescentus*, *S. wittichii*, *S. paucimobilis*, *Z. mobilis*, *G. oxydans*, and *S. meliloti*), β - (*N. eutropha*), γ - [*E. coli* BL21(DE3)], and δ - (*S. cellululosum*, *M. xanthus*, and *S. aurantiaca*) *Proteobacteria* group together. Also, specialized ACPs for sphingolipid biosynthesis (AcpRs) cluster together but clearly form a distinct subgroup of ACPs.

Notably, besides the housekeeping AcpP, distant AcpR homologs are also encoded in genomes of the δ -proteobacteria *Sorangium cellulosum*, *Myxococcus xanthus*, and *Stigmatella aurantiaca*. Other specialized ACPs with other functions, i.e., NodF or AcpXL from *S. meliloti*, group separately from both the AcpP and AcpR clusters. It is remarkable that the housekeeping AcpPs cluster more closely together than the specialized AcpRs (Figure 10). The tertiary structure of ACPs seems to be conserved consisting of a 3- or 4-helix bundle comprised of three major α -helices (helices I, II, and IV) and a short α -helical segment (helix III) connecting helices II and IV (Byers and Gong, 2007). For interaction with most enzymes, helix II of AcpP seems to play a dominant role and has been termed “recognition helix” (Zhang et al., 2003). It



is noteworthy that most of the acidic amino acyl residues of the C-terminal part of helix II, which are essential for the interaction of AcpP with enzymes, are conserved in AcpRs as well (Supplementary Figure 9).

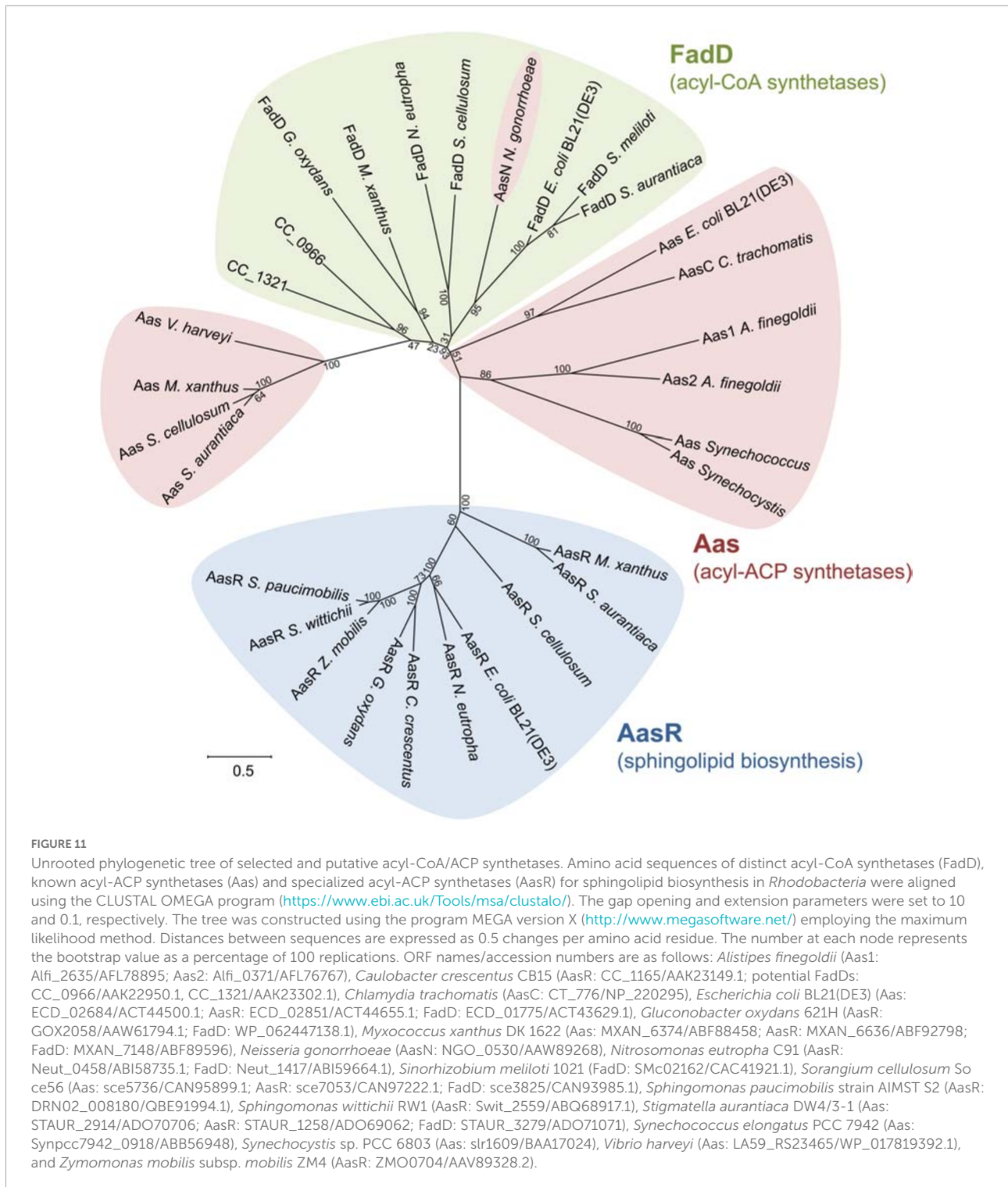
Acyl-CoA and acyl-ACP synthetases

Phylogenetic analysis of selected fatty acyl AMP ligases clarifies that at least three subgroup clusters exist (Figure 11) consisting of FadD-like acyl-CoA synthetases, acyl-AcpP synthetases employing the housekeeping AcpP as thiol substrate,

and AasR-like acyl-AcpR synthetases required for sphingolipid biosynthesis in *Rhodobacteria*. Although there is experimental evidence for acyl-CoA synthetase activity for the annotated ORFs in *S. meliloti* (Soto et al., 2002) and *E. coli*, FadD candidates for *G. oxydans* and *N. europaea* are assigned based on similarity to the *E. coli* and *S. meliloti* FadD (Supplementary Table 3). *C. crescentus* can grow on oleate as sole carbon source, possesses acyl-CoA synthetase activity and degrades oleate by β -oxidation (O’Connell et al., 1986). P-BLAST searches with FadD from *E. coli* or *S. meliloti* identify 11 candidates for acyl-CoA synthetases/fatty-acid CoA ligases in the *C. crescentus* genome and the two best candidates for acyl-CoA synthetase, CC_0966 and CC_1321 (Supplementary Table 3), are included in Figure 11. However, if free fatty acids are activated to their CoA derivatives, one might expect that they are catabolized by β -oxidation. In contrast, if free fatty acids are converted to acyl-AcpR derivatives, also at the energetic cost of 2 ATP molecules (Figure 1), they are redirected to sphingolipid biosynthesis.

Although the biological significance of acyl-ACP synthetases is not always clear yet, acyl-ACP synthetase of *E. coli* together with 1-acylglycerol phosphate acyltransferase PlsC is a key player in reacylating lysophospholipids, for example in the lyso-phosphatidylethanolamine cycle (Sahonero-Canavesi et al., 2019). Similarly, a major function of acyl-ACP synthetases in the cyanobacteria *Synechocystis* and *Synechococcus* seems to consist in the recycling of endogenous fatty acids (Kaczmarzyk and Fulda, 2010). In contrast, the intracellular parasite *Chlamydia trachomatis* (Yao et al., 2015), pathogenic *Neisseria* (Yao et al., 2016), or the Bacteroidete *Alistipes* (Radka et al., 2020) from the human gut microbiome use their acyl-ACP synthetases to scavenge host fatty acids in order to incorporate them into their membrane lipids. Acyl-ACP synthetases acylating the housekeeping AcpP form at least two subgroups, one containing Aas from *E. coli* and another containing Aas from *V. harveyi*, which are distinct from acyl-CoA synthetases. In addition, the acyl-ACP synthetase of *Neisseria* clusters together with acyl-CoA synthetases, suggesting that acyl-ACP synthetases acylating housekeeping AcpPs might have evolved on several occasions from acyl-CoA synthetases.

Members of a third cluster involving possible specialized Aas for sphingolipid biosynthesis in *Rhodobacteria* (AasR), i.e., from the α - (*C. crescentus*, *S. wittichii*, *S. paucimobilis*, *G. oxydans*, and *Z. mobilis*), β - (*N. europaea*), and γ - [*E. coli* BL21(DE3)] *Proteobacteria* group together, although they seem to form two subgroups (Figure 11). In one subgroup, AasRs from *S. wittichii*, *S. paucimobilis*, and *Z. mobilis* cluster closely together. In the other subgroup, AasRs from *C. crescentus*, *G. oxydans*, *N. europaea*, and *E. coli* BL21(DE3) are more distant. Specialized AcpRs from these same bacteria cluster in a similar fashion, forming these same two subgroups (Figure 10). The observed clustering profiles of AcpRs and AasRs are complementary and might indicate a high specificity of these acyl-AcpR synthetases to acylate the specialized AcpRs for sphingolipid biosynthesis in these *Rhodobacteria*. Our own



studies (Figure 7) confirm that AcpRs are acylated exclusively or at least preferentially by the AasR from the same organism. Phylogenetic trees of the *Proteobacteria* suggest that early during their diversification, the δ -*Proteobacteria* separated from the others (Madigan et al., 2018). In this context it is remarkable that in addition to homologs of FadD_{Ec} and

Aas_{Vh}, the δ -proteobacteria *M. xanthus*, *S. aurantiaca*, and *S. cellulosum* possess good and distinct homologs of AasR_{Cc} (Supplementary Table 4) encoded in their enormous genomes and that these homologs branch off at the base of the AasR-like cluster (Figure 11). Also, *M. xanthus*, *S. aurantiaca*, and *S. cellulosum* have genes coding for AcpR homologs in addition

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, host used for cloning	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	Host used for protein expression	Studier et al., 1990
OG7001	<i>panD</i> mutant of BL21(DE3), β -alanine auxotroph	Epple et al., 1998
<i>Caulobacter crescentus</i>		
CB15	Wild type strain; ATCC 19089	Poindexter, 1964
<i>Sphingomonas wittichii</i>		
RW1	Wild type	DSMZ 6014
Plasmids		
pET9a	Expression vector, Kn ^R	Studier et al., 1990
pET28a	Expression vector, Kn ^R	Novagen
pET16b	Expression vector, Cb ^R	Novagen
pET17b	Expression vector, Cb ^R	Novagen
pLysS	Causes repression of T7 polymerase, Cm ^R	Studier et al., 1990
pCDFDuet-1	Vector for coexpression, Sp ^R	Novagen
pBAD24	Arabinose-regulated expression vector, Cb ^R	Guzman et al., 1995
pAL07	pET9a carrying <i>acpXL_{Sm}</i>	Dávila-Martínez et al., 2010
pMP2301	pET9a carrying <i>nodF_{Rl}</i>	Ritsema et al., 1998
pTB1003	pET9a carrying <i>rkpF_{Sm}</i> of Rm41	Epple et al., 1998
pTB5079	pET9a carrying <i>acpP</i> from <i>E. coli</i> DH5 α , identical nucleotide sequence as <i>acpP</i> ECD_01090 _{Ec} from <i>E. coli</i> BL21(DE3)	López-Lara and Geiger, 2000
pSBA01	pET16b carrying <i>acpS_{Sm}</i>	Ramos-Vega et al., 2009
pECH6	pET17b carrying <i>fadD smc02162_{Sm}</i>	Pech-Canul et al., 2020
pDG01	pET9a carrying CC_1163 (<i>acpR_{Cc}</i>)	Olea-Ozuna et al., 2021
pJPG08	pET9a carrying CC_1162 (<i>spt_{Cc}</i>)	Olea-Ozuna et al., 2021
pRJ03	pET9a carrying CC_1163/ CC_1162 (<i>acpR_{Cc}/spt_{Cc}</i>)	Olea-Ozuna et al., 2021
pECH3	pET28a carrying <i>fadD smc02162_{Sm}</i>	This study
pDG04	pET17b carrying CC_1165 (<i>aasR_{Cc}</i>)	This study
pDG10	pET16b carrying CC_1165 (<i>aasR_{Cc}</i>)	This study
pPEG01	pET9a carrying CC_1677 (<i>acpP_{Cc}</i>)	This study
pJPG01	pET9a carrying ECD_02854 (<i>spt_{Ec}</i>)	This study
pJPG02	pET9a carrying Swit_3900 (<i>spt_{Sw}</i>)	This study
pJPG05	pBAD24 carrying CC_1162 (<i>spt_{Cc}</i>)	This study
pJPG06	pBAD24 carrying ECD_02854 (<i>spt_{Ec}</i>)	This study
pJPG07	pBAD24 carrying Swit_3900 (<i>spt_{Sw}</i>)	This study
pJPG10	pET16b carrying <i>aasS</i> from <i>V. harveyi</i>	This study
pJPG12	pET9a carrying ECD_02853 (<i>acpR_{Ec}</i>)	This study
pJPG13	pCDFDuet-1 carrying CC_1165 (<i>aasR_{Cc}</i>) in MCS-1	This study
pJPG14	pCDFDuet-1 carrying CC_1165 (<i>aasR_{Cc}</i>) in MCS-1 and CC_1163 (<i>acpR_{Cc}</i>) in MCS-2	This study
pJPG15	pCDFDuet-1 carrying CC_1165 (<i>aasR_{Cc}</i>) in MCS-1 and CC_1162 (<i>spt_{Cc}</i>) in MCS-2	This study
pJPG16	pCDFDuet-1 carrying CC_1163/CC_1162 (<i>acpR_{Cc}/spt_{Cc}</i>) in MCS-2	This study
pJPG17	pET17b carrying ECD_02851 (<i>aasR_{Ec}</i>)	This study
pJPG20	pCDFDuet-1 carrying ECD_02853/ECD_02854 (<i>acpR_{Ec}/spt_{Ec}</i>) in MCS-2	This study

Kn^R, Cb^R, Cm^R, Sp^R: kanamycin, carbenicillin, chloramphenicol, spectinomycin resistance, respectively.

Subscripts *Cc*, *Ec*, *Rl*, *Sm* and *Sw* denote genes from *C. crescentus* CB15, *E. coli* BL21(DE3), *R. leguminosarum*, *S. meliloti* 1021 and *S. wittichii* RW1, respectively.

DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen strain collection.

to the structural genes for housekeeping AcpPs (Supplementary Table 4). Notably, *acpR* and *aasR* homologs form an operon in the δ -proteobacteria *M. xanthus*, *S. aurantiaca*, and *S. cellulosum* but are situated in different genomic contexts as they are in the *Rhodobacteria*.

Conclusion

Sphingolipids are important structural components in membranes of *Eukarya* and participate in numerous cellular functions. In the *Bacteria* domain, sphingolipids occur in

members of the phyla *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. During the first step of sphingolipid biosynthesis serine palmitoyltransferase is known to condense acyl-coenzyme A with serine forming 3-oxo-sphinganine as sphingolipid biosynthesis intermediate. In *Rhodobacteria*, which comprise α -, β -, and γ -*Proteobacteria*, the structural gene for serine palmitoyltransferase (*spt*) is usually preceded by a gene predicted to code for an acyl carrier protein (ACP), and a gene predicted to encode an acyl-CoA synthetase. We show that in the α -proteobacterium *Caulobacter crescentus* a specialized acyl carrier protein, AcpR, is selectively acylated by a specialized acyl-ACP synthetase AasR and that acyl-AcpR is the preferred

acyl substrate for rhodobacterial serine palmitoyltransferases during 3-oxo-sphinganine formation. This more complex way of 3-oxo-sphinganine synthesis in *Rhodobacteria* might allow them to efficiently channel free fatty acids toward sphingolipid biosynthesis.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristics are listed in [Table 1](#). *E. coli* strains were grown at 30°C either in Luria-Bertani (LB) broth ([Sambrook et al., 2001](#)), or in M9 minimal medium ([Miller, 1972](#)) for β -[³H]alanine labeling assays. *C. crescentus* CB15 strain was cultivated at 30°C in PYE (peptone-yeast extract) complex medium (0.2% peptone, 0.1% yeast extract, 1 mM MgSO₄ and 0.5 mM CaCl₂) ([Hottes et al., 2004](#)). *S. wittichii* RW1 strain was grown at 30°C in nutrient medium (0.5% peptone and 0.3% meat extract) ([Halden et al., 2005](#)). Antibiotics were added to media, when required, at the following final concentrations (μ g/ml): carbenicillin 100, chloramphenicol 20, kanamycin 50, and spectinomycin 100, for *E. coli* strains.

DNA manipulations

Recombinant DNA techniques were carried out using standard procedures ([Sambrook et al., 2001](#)). Commercial sequencing of amplified genes by Eurofins Medigenomix (Martinsried, Germany) corroborated correct DNA sequences. DNA regions containing presumptive sphingolipid biosynthesis genes and derived protein sequences were analyzed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST network center ([Altschul et al., 1997](#)).

Construction of expression plasmids

Genes of interest were amplified by PCR from genomic DNA of *C. crescentus* CB15, *E. coli* BL21(DE3), or *S. wittichii* RW1, using specific oligonucleotides ([Supplementary Table 5](#)) and introducing suitable restriction sites for cloning. After restriction with the respective enzymes, PCR-amplified DNA fragments were cloned into a pET9a, pET16b, pET17b, pET28a, pBAD24, or a pCDFDuet-1 vector as detailed in [Supplementary Table 6](#).

SPT-encoding plasmids pJPG05, pJPG06 and pJPG07 ([Supplementary Table 6](#)) were each digested with *NdeI* and *BamHI*, and the *spt*-encoding fragments were recloned into pET9a, which had been digested with *NdeI* and *BamHI*, to yield the pET9a derivatives pJPG08, pJPG01 and pJPG02,

respectively. Recloning of the CC_1165 (*aasR*)-encoding *NdeI/BamHI* fragment from pDG04 ([Supplementary Table 6](#)) into a *NdeI/BamHI*-restricted pET16b vector yielded plasmid pDG10. The gene encoding acyl-ACP synthetase (*aasS*) from *V. harveyi* (LA59_RS23465) was synthesized by DNA2.0 from ATUM² and subsequently recloned as *NdeI/BamHI* fragment into *NdeI/BamHI*-digested pET16b, to yield plasmid pJPG10. Recloning of the CC_1165 (*aasR*)-encoding *NcoI/BamHI* fragment from pDG10 ([Table 1](#)) into a *NcoI/BamHI*-restricted pCDFDuet-1 (MCS-1) vector yielded plasmid pJPG13. Recloning of the CC_1163 (*acpR*)-encoding *NdeI/BamHI* fragment from pDG01 into a *NdeI/BglII*-restricted pJPG13 (MCS-2) vector yielded plasmid pJPG14. Recloning of the CC_1163/CC_1162 (*acpR/spt*)-encoding *NdeI/BamHI* fragment from pRJ03 ([Olea-Ozuna et al., 2021](#)) into a *NdeI/BglII*-restricted pCDFDuet-1 (MCS-2) vector yielded plasmid pJPG16. Recloning of the *smc02162* (*fadD*)-encoding *NdeI/HindIII* fragment from pECH6 ([Pech-Canul et al., 2020](#)) into a *NdeI/HindIII*-restricted pET28a vector yielded plasmid pECH3.

Polyacrylamide gel electrophoresis systems for protein analyses

Proteins were analyzed employing different PAGE systems (native PAGE, SDS-PAGE, urea-PAGE, or SDS-Tricine-PAGE) according to necessity. *In vitro* conversions from apo- to holo-ACPs, using the holo-ACP synthase (AcpS) from *S. meliloti* 1021 were analyzed by 20% native PAGE ([Jackowski and Rock, 1983](#)). *In vivo* β -[³H]alanine incorporation into the 4'-PPT prosthetic group of ACPs was analyzed by 20% native PAGE as well as by SDS-Tricine-PAGE ([Schägger and von Jagow, 1987](#)) containing 12% polyacrylamide. This latter system is frequently used for separating peptides and small proteins such as ACPs. Conformation-sensitive urea-PAGE ([Post-Beittenmiller et al., 1991](#)), containing 18.7% polyacrylamide, was employed to analyze the *in vitro* acylation of ACPs with fatty acids of different length, using AasR (CC_1165) from *C. crescentus*, and Aas from *V. harveyi*. Different concentrations of urea (up to 5 M) in both the separation and stacking gel were used to separate acyl-ACPs. Furthermore, overexpression and purification of His-tagged proteins was analyzed by denaturing SDS-PAGE ([Schägger et al., 1988](#)) containing 12% polyacrylamide.

In vivo labeling of ACPs with β -[³H]alanine

In vivo labeling of ACPs with β -[³H]alanine, the biosynthetic precursor of 4'-phosphopantetheine, was

² www.atum.bio

carried out essentially as described previously using the β -alanine auxotrophic strain OG7001 (Epple et al., 1998; López-Lara and Geiger, 2000).

Expression and purification of presumptive acyl carrier proteins

Strains of *E. coli* BL21(DE3) \times pLysS harboring plasmid pDG01 (with specialized *acpR* CC_1163), pPEG01 (with housekeeping *acpP* CC_1677), pJPG12 (with specialized *acpR* ECD_02853), or pTB5079 (with housekeeping *acpP* ECD_01090 of *E. coli*) were grown at 30°C in 1 L of LB medium and at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.4, isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.1 mM to induce protein expression. After induction for 4 h, cells were collected by centrifugation at 7,500 \times g for 30 min at 4°C, cell pellets were resuspended in 50 ml of buffer A (50 mM Tris/HCl, 0.1 M KCl, pH 6.8) and stored at -20°C. After thawing, the cells were broken by passing cell suspensions twice through a French pressure cell at 20,000 pounds per square inch (psi), the remaining unbroken cells and debris were removed by centrifugation at 7,000 \times g for 15 min at 4°C and supernatants were used as cell-free extracts (CE).

For the purification of all ACPs, the respective CE was slowly stirred at 4°C and cold 2-propanol was added dropwise to a given CE up to a final concentration of 50% (v/v). After incubation for 60 min at 4°C, the precipitate was removed by centrifugation at 7,000 \times g for 15 min at 4°C. The 2-propanol-containing supernatant was dialyzed overnight against 2 liter of buffer A. The dialysate was subjected to ion-exchange chromatography using DEAE-52 cellulose (Whatman). Each of the samples was applied to a 30 ml column, that had been equilibrated with two column volumes of buffer B (10 mM Bis-Tris/HCl, pH 6.0, 1 mM 3-cholamidopropyl dimethylammonio 1-propanesulfonate). Each column was washed with two column volumes of buffer B, and proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0.1–1 M) in buffer B in a total volume of 150 ml. Fractions (3 ml) were collected, and aliquots were analyzed in 20% native PAGE (Supplementary Figure 2). ACPs AcpP_{Cc} (CC_1677), AcpP_{Ec} (ECD_01090), and AcpR_{Ec} (ECD_02853) eluted in a range from 0.28 to 0.35 M NaCl, while the ACP AcpR_{Cc} (CC_1163) eluted in a range from 0.21 to 0.28 M NaCl. From each chromatographic separation, five ACP-containing fractions were combined and concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore). Washing steps with 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 in the centrifugal device ensured that the final concentration of NaCl was less than 20 mM. The respective ACPs were stored in a final volume of 1.5 ml at -20°C.

In vitro conversion of apo-ACPs to holo-ACPs

To convert purified apo-ACPs to functional holo-ACPs, AcpS_{Sm} obtained from *E. coli* containing plasmid pSBA01 was used as a tool for in *in vitro* reactions employing CoA as phosphopantetheine donor as previously described (Ramos-Vega et al., 2009).

Expression and purification of acyl-CoA and acyl-ACP synthetases

Strains of *E. coli* BL21(DE3) \times pLysS harboring plasmid pDG10 (with specialized *aasR* CC_1165 of *Caulobacter*), pJPG10 (with *aas* of *V. harveyi*), or pECH3 (with *fadD* of *Sinorhizobium*) were grown at 30°C in 25 ml of LB medium and at OD₆₀₀ of 0.4, IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM. After induction for 4 h, cells were collected by centrifugation at 7,500 \times g for 30 min at 4°C and cell pellets were resuspended in 2 ml of binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4). After passing cell suspensions twice through a French pressure cell at 20,000 psi, the remaining unbroken cells and debris were removed by centrifugation at 7,000 \times g for 15 min at 4°C and supernatants were used as CEs.

The His-tagged proteins were purified using the HiTrap IMAC HP systems (GE Life Sciences) with column bed volumes of 1 ml, respectively. CEs were diluted 1:2 with binding buffer and applied to a chromatography column previously equilibrated with 10 ml of binding buffer. Then columns were washed with 10 ml of binding buffer. Stepwise elution was performed with portions of 5 ml of binding buffer containing increased concentrations of imidazole (100, 250, 500, 750 mM). Fractions were collected and analyzed in 12% SDS-PAGE (Supplementary Figure 4). Fractions containing the respective His-tagged protein (His₁₀-tagged putative AasR CC_1165, His₁₀-tagged Aas from *V. harveyi* (Aas_{Vh}) and His₆-tagged FadD from *S. meliloti*) were near homogeneous and were dialyzed against Aas buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, and 0.002% Triton X-100), similarly, as described by Jiang et al. (2006). The protein content of homogeneous acyl-CoA and acyl-ACP synthetase preparations was determined using the method reported by Dullely and Grieve (1975).

Enzymatic assays for acyl-CoA and acyl-ACP synthetases

The enzymatic assays for acyl-CoA and acyl-ACP synthetases described here are essentially modified versions of

the assay reported by Jiang et al. (2006) for acylating ACPs with acyl-ACP synthetase from *V. harveyi*.

For each reaction, 10 nmol [9,10-³H]-palmitic acid (specific radioactivity: 743 mCi/mmol) in ethanolic solution and an equimolar amount of NaOH were combined with an aqueous solution containing 35 μg Triton X-100 in an Eppendorf tube and solvents were removed under vacuum. Aqueous Tris/HCl buffer, pH 8.0 was added, the tubes were vortexed three times for 30 s and sonicated for 30 min. In a total volume of 50 μl, the final assay contained 200 μM Na [³H]-palmitate (7.4 μCi), 1 mM Triton X-100, 100 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, 10 mM ATP, 10 mM MgSO₄, 5 mM dithiothreitol, 40 μM thiol substrate (ACPs or CoA) and different concentrations of each enzyme (30 nM for His₁₀-AasR_{Cc} (CC_1165), 100 nM for His₁₀-AasV_H, and 300 nM for His₆-FadD_{Sm}). The reactions were incubated for 0, 15, 30, 45 or 60 min at 37°C in a water bath. Holo-ACPs were quantified by detecting their single sulfhydryl group of 4'-phosphopantetheine using Ellman's method (Ellman, 1959).

When assaying for acyl-CoA synthetase activities, the reactions were stopped by adding 125 μl of isopropanol/n-heptane/1 M H₂SO₄ (40:10:1; v/v). Addition of 25 μl of distilled water and 125 μl n-heptane and thorough mixing led to the separation of the organic and aqueous phases. Subsequently, the organic phase (containing unbound [³H]palmitate) was removed and the aqueous phase (containing [³H]palmitoyl-CoA products) was washed 6 more times with 125 μl of n-heptane. Radioactivity associated with the aqueous phase ([³H]palmitoyl-CoA) was quantified in a scintillation counter.

When assaying for acyl-ACP synthetase activities, the reactions were stopped by freezing them rapidly at -80°C. Subsequently, defrosted samples were applied to Whatman 3MM cellulose filters, washed three times with methanol/chloroform/acetic acid (2:1:0.3; v/v) in a vacuum manifold. Filters were dried and filter-bound radioactivity was quantified in a scintillation counter, similarly, as described by Ray and Cronan (1976).

Kinetic analysis of acyl-AcpR synthetase AasR

In order to study the effect of the AcpR substrate concentration on AasR activity, initial velocities for holo-AcpR_{Cc} (CC_1163) acylation were determined at different AcpR_{Cc} concentrations (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM) employing His₁₀-AasR_{Cc} (CC_1165) and [³H]palmitate. Samples were incubated at 37°C in a water bath for 30 min, period for which product formation was linear for all AcpR concentrations employed. Subsequently, the initial velocities (V₀) were calculated measuring the slope (m) of the incorporation of [³H]palmitate into the product

[³H]palmitoyl-AcpR_{Cc} and plotted against the concentration of the holo-AcpR (CC_1163) substrate (Figure 6).

Expression of serine palmitoyltransferases

Strains of *E. coli* BL21(DE3) × pLysS harboring plasmid pJPG08 (with *spt* CC_1162 of *C. crescentus*), pJPG01 (with *spt* ECD_02854 of *E. coli* BL21(DE3)), pJPG02 (with *spt* Swit_3900 of *S. wittichii*), or the empty pET9a vector were grown at 30°C in 25 ml of LB medium and at OD₆₀₀ of 0.4, IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM. After induction for 4 h, cells were collected by centrifugation at 7,500 × g for 30 min at 4°C and cell pellets were resuspended in 2 ml of buffer containing 20 mM potassium phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM DTT (Raman et al., 2009). After passing cell suspensions twice through a French pressure cell at 20,000 psi, the remaining unbroken cells and debris were removed by centrifugation at 7,000 × g for 15 min at 4°C and supernatants were used as CEs.

Serine palmitoyltransferases enzymatic assays

Enzymatic assays for serine palmitoyltransferase were performed similarly, to those described by Ikushiro et al. (2001). Each assay contained in a final volume of 100 μl, 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5), 100 μM EDTA, 5 mM DTT, 10 μM pyridoxal phosphate, and 432 μM (0.2 μCi) of L-[¹⁴C(U)]serine (PerkinElmer; specific radioactivity: 46.4 mCi/mmol). Thioester substrates (palmitoyl-CoA, palmitoyl-AcpR_{Cc} or palmitoyl-AcpP_{Cc}) were added to a final concentration of 10 μM. For each 100 μl assay, 10 μg protein of CEs from *E. coli* BL21(DE3) × pLysS carrying the empty pET9a vector, or SPT-expressing plasmids were employed respectively. Enzyme assays were incubated at 30°C for 4 h in water bath and the reactions were stopped by adding 100 μl of NH₄OH. For each sample, separation of the organic and aqueous phases was carried out by adding 375 μl of chloroform/methanol (2:1; v/v) (Bligh and Dyer, 1959). After centrifugation at 16,000 × g for 5 min, the organic phases were transferred to fresh tubes and dried (Raman et al., 2009). The dried lipids were dissolved in 20 μl of chloroform/methanol (2:1; v/v) and spotted onto a thin layer chromatography (TLC) plate (Silica Gel 60, Merck). Separation in one dimension (1D) was carried out with a mobile phase of chloroform/methanol/2N ammonium hydroxide (40:10:1; v/v). The developed chromatogram was exposed to Phosphor Screens (GE Healthcare), and the autoradiograms were visualized with an optical scanner (Typhoon FLA 9500 from GE Healthcare Life Sciences).

Thin-layer chromatographic analyses of radioactive samples and sphingolipid intermediate standards

For all figures obtained using TLC (Figures 7, 8 and Supplementary Figure 8), relative mobilities of non-radioactive standard samples and radioactive experimental samples were compared after they had been separated on the same TLC plate. However, as the radioactive and non-radioactive samples needed to be detected by different methods, the aluminum-backed, developed silica plates were cut with scissors in order to visualize radioactive samples by autoradiography and non-radioactive samples by iodine staining, as indicated in the corresponding figure legends. Based on the reconstituted silica plates, the two image subparts can be clearly assembled. The subparts of the recomposed figures are surrounded by black squares.

Mass spectrometric analyses of acyl carrier proteins

Acylation reactions for mass spectrometric analyses were as previously described in “Enzymatic assays for acyl-CoA and acyl-ACP synthetases.” However, the acylations were performed in the absence of Triton X-100 and with 300 nM of each enzyme (Aas_{R_{Cc}}, or Aas_{V_H}).

ACP preparations were precipitated with acetone at -20°C and washed twice with cold acetone. After drying, ACP-containing samples were dissolved in water and of each sample 2.5 μg of protein were injected into a LCQ fleet ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Spray voltage was set to 5 kV, sheath gas flow rate at 20 units and the capillary temperature at 250°C .

Before injection into the mass spectrometer, acyl-(palmitoyl-) Acp_{P_{Cc}} was subjected to chromatographic separation in an Ultimex 3000 HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, United States) equipped with a Hypersil Gold C18 (100 \times 2.1 mm) analytical column (Thermo Fisher Scientific).

Spectra visualization was performed using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific) and MZmine 2.38 (Pluskal et al., 2010). Multiple charge states were observed for each of the major species of each protein. The mass of each protein was calculated using ESiprot (Winkler, 2010).

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Author contributions

JP-G, DS-C, SP, SE-G, IL-L, and OG designed the study. JP-G, RO-O, DG-S, SC-M, and IL-L carried out the experiments. JP-G, RO-O, SP, OM-T, IL-L, and OG carried out the data analysis and discussed the results. JP-G, SE-G, IL-L, and OG were involved in drafting the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

Funding

JP-G was a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 574038 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). This work was supported by grants from DGAPA/UNAM (IN201120), CONACyT/Mexico (178359 and 253549 in Investigación Científica Básica as well as 118 in Investigación en Fronteras de la Ciencia).

Acknowledgments

We thank Ángel de la Cruz Pech-Canul for the construction of plasmid pECH3 as well as Angeles Moreno, Lourdes Martínez-Aguilar, and Miguel Ángel Vences-Guzmán for their skillful technical assistance. We are also grateful to Michael F. Dunn for revising the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.961041/full#supplementary-material>

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Beld, J., Finzel, K., and Burkart, M. D. (2014). Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. *Chem. Biol.* 21, 1293–1299. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.08.015
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099
- Brown, E. M., Ke, X., Hitchcock, D., Jeanfavre, S., Avila-Pacheco, J., Nakata, T., et al. (2019). *Bacteroides*-derived Sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis. *Cell Host Microbe* 25, 668–680.e7. doi: 10.1016/j.chom.2019.04.002
- Brozek, K. A., Carlson, R. W., and Raetz, C. R. (1996). A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 271, 32126–32136. doi: 10.1074/jbc.271.50.32126
- Byers, D. M., and Gong, H. (2007). Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem. Cell Biol.* 85, 649–662. doi: 10.1139/o07-109
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., et al. (2011). The essential genome of a bacterium. *Mol. Syst. Biol.* 7:528. doi: 10.1038/msb.2011.58
- Dávila-Martínez, Y., Ramos-Vega, A. L., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O., and López-Lara, I. M. (2010). SMC01553 is the sixth acyl carrier protein in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology* 156, 230–239. doi: 10.1099/mic.0.033480-0
- Dulley, J. R., and Grieve, P. A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64, 136–141. doi: 10.1016/0003-2697(75)90415-7
- Eaton, B. R., and Dennis, E. A. (1976). Analysis of phospholipase C (*Bacillus cereus*) action toward mixed micelles of phospholipid and surfactant. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 604–609. doi: 10.1016/0003-9861(76)90204-6
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Epple, G., van der Drift, K. M., Thomas-Oates, J. E., and Geiger, O. (1998). Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180, 4950–4954. doi: 10.1128/JB.180.18.4950-4954.1998
- Flugel, R. S., Hwangbo, Y., Lambalot, R. H., Cronan, J. E. Jr., and Walsh, C. T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 959–968. doi: 10.1074/jbc.275.2.959
- Frottin, F., Martínez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R. C., Giglione, C., et al. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2336–2349. doi: 10.1074/mcp.M600225-MCP200
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M., and Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 49, 46–60. doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.002
- Geiger, O., and López-Lara, I. M. (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 153–162. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11075.x
- Geiger, O., Padilla-Gómez, J., and López-Lara, I. M. (2019). “Bacterial sphingolipids and sulfonolipids,” in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, ed. O. Geiger (Cham: Springer Nature Switzerland), 123–137. doi: 10.1007/978-3-319-50430-8_12
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130. doi: 10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995
- Halden, R. U., Colquhoun, D. R., and Wisniewski, E. S. (2005). Identification and phenotypic characterization of *Sphingomonas wittichii* strain RW1 by peptide mass fingerprinting using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2442–2451. doi: 10.1128/AEM.71.5.2442-2451.2005
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8
- Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 19, 175–191. doi: 10.1038/s41580-018-0046-6
- Hottes, A. K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H. H., et al. (2004). Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J. Bacteriol.* 186, 1448–1461. doi: 10.1128/jb.186.5.1448-1461.2004
- Ikushiro, H., Hayashi, H., and Kagamiyama, H. (2001). A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. Purification, characterization, cloning, and overproduction. *J. Biol. Chem.* 276, 18249–18256. doi: 10.1074/jbc.M101550200
- Jackowski, S., and Rock, C. O. (1983). Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258, 15186–15191. doi: 10.1016/S0021-9258(17)43791-4
- Jeong, H., Kim, H. J., and Lee, S. J. (2015). Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome Announc.* 3, e00134–e15. doi: 10.1128/genomeA.00134-15
- Jiang, Y., Chan, C. H., and Cronan, J. E. (2006). The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio Harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry* 45, 10008–10019. doi: 10.1021/bi060842w
- Kaczmarzyk, D., and Fulda, M. (2010). Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. *Plant Physiol.* 152, 1598–1610. doi: 10.1104/pp.109.148007
- Kato, M., Muto, Y., Tanaka-Bandoh, K., Watanabe, K., and Ueno, K. (1995). Sphingolipid composition in *Bacteroides* species. *Anaerobe* 1, 135–139. doi: 10.1006/anae.1995.1009
- Kawahara, K., Kubota, M., Sato, N., Tsuge, K., and Seto, Y. (2002). Occurrence of an alpha-galacturonosyl-ceramide in the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 289–294. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11361.x
- Kawahara, K., Seydel, U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietschel, E. T., and Zähringer, U. (1991). Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett.* 292, 107–110. doi: 10.1016/0014-5793(91)80845-t
- Kerbarh, O., Campopiano, D. J., and Baxter, R. L. (2006). Mechanism of alpha-oxoamine synthases: identification of the intermediate Claisen product in the 8-amino-7-oxononanoate synthase reaction. *Chem. Commun. (Camb)* 1, 60–62. doi: 10.1039/b511837a
- Lai, J. R., Koglin, A., and Walsh, C. T. (2006). Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* 45, 14869–14879. doi: 10.1021/bi061979p
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., et al. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3, 923–936. doi: 10.1016/s1074-5521(96)90181-7
- López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2000). Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins. *Microbiology* 146(Pt 4), 839–849. doi: 10.1099/00221287-146-4-839
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., and Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. New York, NY: Pearson.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2017). *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 7th Edn. New York, NY: W. H. Freeman and Company.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., et al. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4136–4141. doi: 10.1073/pnas.061029298
- O’Connell, M., Henry, S., and Shapiro, L. (1986). Fatty acid degradation in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 168, 49–54. doi: 10.1128/jb.168.1.49-54.1986
- Olea-Ozuna, R. J., Poggio, S., Edbergström, Quiroz-Rocha, E., García-Soriano, D. A., Sahonero-Canavesi, D. X., et al. (2021). Five structural genes required for ceramide synthesis in *Caulobacter* and for bacterial survival. *Environ. Microbiol.* 23, 143–159. doi: 10.1111/1462-2920.15280
- Pech-Canul, A. C., Rivera-Hernández, G., Nogales, J., Geiger, O., Soto, M. J., and López-Lara, I. M. (2020). Role of *Sinorhizobium meliloti* and *Escherichia coli* long-chain Acyl-CoA Synthetase FadD in long-term survival. *Microorganisms* 8:470. doi: 10.3390/microorganisms8040470
- Platt, M. W., Miller, K. J., Lane, W. S., and Kennedy, E. P. (1990). Isolation and characterization of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 172, 5440–5444. doi: 10.1128/jb.172.9.5440-5444.1990

- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., and Orešič, M. (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11:395. doi: 10.1186/1471-2105-11-395
- Poindexter, J. S. (1964). Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol. Rev.* 28, 231–295. doi: 10.1128/br.28.3.231-295.1964
- Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J. G., and Ohlrogge, J. B. (1991). In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 266, 1858–1865. doi: 10.1016/S0021-9258(18)52372-3
- Radka, C. D., Frank, M. W., Rock, C. O., and Yao, J. (2020). Fatty acid activation and utilization by *Alistipes finegoldii*, a representative bacteroidetes resident of the human gut microbiome. *Mol. Microbiol.* 113, 807–825. doi: 10.1111/mmi.14445
- Raman, M. C., Johnson, K. A., Clarke, D. J., Naismith, J. H., and Campopiano, D. J. (2010). The serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas wittichii* RW1: an interesting link to an unusual acyl carrier protein. *Biopolymers* 93, 811–822. doi: 10.1002/bip.21482
- Raman, M. C., Johnson, K. A., Yard, B. A., Lowther, J., Carter, L. G., Naismith, J. H., et al. (2009). The external aldimine form of serine palmitoyltransferase: structural, kinetic, and spectroscopic analysis of the wild-type enzyme and HSN1 mutant mimics. *J. Biol. Chem.* 284, 17328–17339. doi: 10.1074/jbc.M109.008680
- Ramos-Vega, A. L., Dávila-Martínez, Y., Sohlenkamp, C., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O., et al. (2009). SMB20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiol. Sgm* 155, 257–267. doi: 10.1099/mic.0.022079-0
- Rawlings, M., and Cronan, J. E. Jr. (1992). The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J. Biol. Chem.* 267, 5751–5754. doi: 10.1016/S0021-9258(18)42616-6
- Ray, T. K., and Cronan, J. E. Jr. (1976). Activation of long chain fatty acids with acyl carrier protein: demonstration of a new enzyme, acyl-acyl carrier protein synthetase, in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4374–4378. doi: 10.1073/pnas.73.12.4374
- Ritsema, T., Gehring, A. M., Stuitje, A. R., van der Drift, K. M., Dandal, I., Lambalot, R. H., et al. (1998). Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition. *Mol. Gen. Genet.* 257, 641–648. doi: 10.1007/s004380050692
- Rock, C. O., and Cronan, J. E. Jr. (1979). Re-evaluation of the solution structure of acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 254, 9778–9785. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83584-6
- Sahonero-Canavesi, D. X., López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2019). “Membrane lipid degradation and lipid cycles in microbes,” in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology; Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, ed. F. Rojo (Cham: Springer Nature Switzerland), 231–254. doi: 10.1007/978-3-319-50418-6_38
- Sambrook, J., MacCullum, P., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schägger, H., Aquila, H., and von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173, 201–205. doi: 10.1016/0003-2697(88)90179-0
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379. doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Soto, M. J., Fernández-Pascual, M., Sanjuan, J., and Olivares, J. (2002). A fadD mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol. Microbiol.* 43, 371–382. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02749.x
- Stankeviciute, G., Guan, Z., Goldfine, H., and Klein, E. A. (2019). *Caulobacter crescentus* adapts to phosphate starvation by synthesizing anionic glycolipids and a novel glycosphingolipid. *mBio* 10, e107–e119. doi: 10.1128/mBio.00107-19
- Stankeviciute, G., Tang, P., Ashley, B., Chamberlain, J. D., Hansen, M. E. B., Coleman, A., et al. (2022). Convergent evolution of bacterial ceramide synthesis. *Nat. Chem. Biol.* 18, 305–312. doi: 10.1038/s41589-021-00948-7
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89. doi: 10.1016/0076-6879(90)85008-c
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- Winkler, R. (2010). ESIprot: a universal tool for charge state determination and molecular weight calculation of proteins from electrospray ionization mass spectrometry data. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 285–294. doi: 10.1002/rcm.4384
- Yao, J., Bruhn, D. F., Frank, M. W., Lee, R. E., and Rock, C. O. (2016). Activation of exogenous fatty acids to acyl-acyl carrier Protein cannot bypass fabi inhibition in *Neisseria*. *J. Biol. Chem.* 291, 171–181. doi: 10.1074/jbc.M115.699462
- Yao, J., Dodson, V. J., Frank, M. W., and Rock, C. O. (2015). *Chlamydia trachomatis* scavenges host fatty acids for phospholipid synthesis via an acyl-acyl carrier protein synthetase. *J. Biol. Chem.* 290, 22163–22173. doi: 10.1074/jbc.M115.671008
- Zhang, Y., and Cronan, J. E. (1996). Polar allele duplication for transcriptional analysis of consecutive essential genes: application to a cluster of *Escherichia coli* fatty acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* 178, 3614–3620. doi: 10.1128/jb.178.12.3614-3620.1996
- Zhang, Y. M., Marrakchi, H., White, S. W., and Rock, C. O. (2003). The application of computational methods to explore the diversity and structure of bacterial fatty acid synthase. *J. Lipid Res.* 44, 1–10. doi: 10.1194/jlr.r200016-jlr200

Specialized acyl carrier protein used by serine palmitoyltransferase to synthesize sphingolipids in *Rhodobacteria*

Supplementary Figures

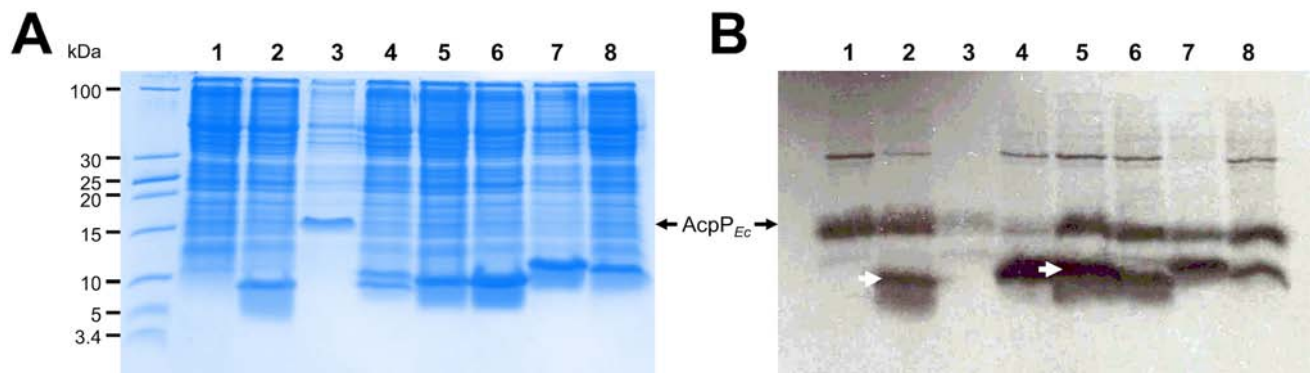


Figure S1. *In vivo* labeling of ACPs with β - ^3H alanine. Proteins of cell-free extracts from *E. coli* OG7001 x pLysS strains overproducing different ACPs from pET9a-derived plasmids were separated in a 12% SDS-Tricine PAGE. (A) Proteins stained with Coomassie blue and (B) autoradiogram visualized after labeling with β - ^3H alanine. In (A) and (B), extracts of *E. coli* carrying the pET9a vector (lane 1), AcpR_{Ec} (ECD_02853)-expressing pJPG12 (lane 2), AcpP_{Ec} (ECD_01090)-expressing pTB5079 (lane 3), AcpP_{Cc} (CC_1677)-expressing pPEG01 (lane 4), AcpR_{Cc} (CC_1163)-expressing pDG01 (lane 5), NodF-expressing pMP2301 (lane 6), AcpXL-expressing pAL07 (lane 7) or RkpF-expressing pTB1003 (lane 8) were analyzed. White arrows (B) highlight radiolabeled specialized ACPs AcpR_{Ec} and AcpR_{Cc} from *E. coli* and *C. crescentus*, respectively. PageRuler Low Range Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) is displayed (A).

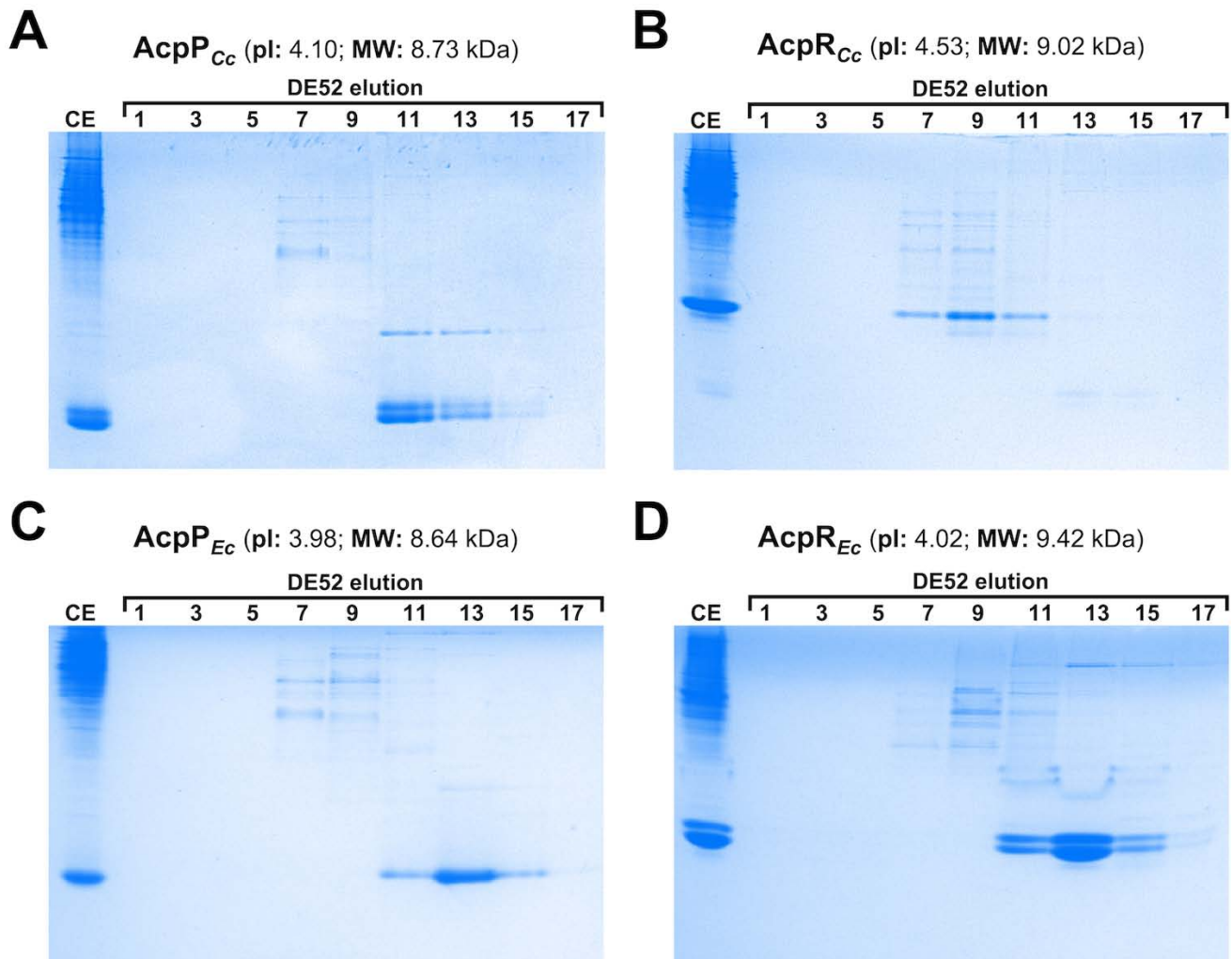


Figure S2. Purification of ACPs AcpP_{Cc}, AcpR_{Cc}, AcpP_{Ec} and AcpR_{Ec} by ion-exchange chromatography. Cell-free extracts (CE), containing overexpressed ACPs (AcpP_{Cc} from pPEG01 (A), AcpR_{Cc} from pDG01 (B), AcpP_{Ec} from pTB5079 (C) and AcpR_{Ec} from pJPG12 (D)), and selected fractions eluted during chromatographies on DE52-cellulose columns (fraction number 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, and 17) were separated in 20% native PAGE and stained with Coomassie blue. Isoelectric point (pI) and molecular weight (MW) are indicated for each ACP and were calculated using the ExpASy - SIB Bioinformatics Resource Portal (<https://www.expasy.org/>).

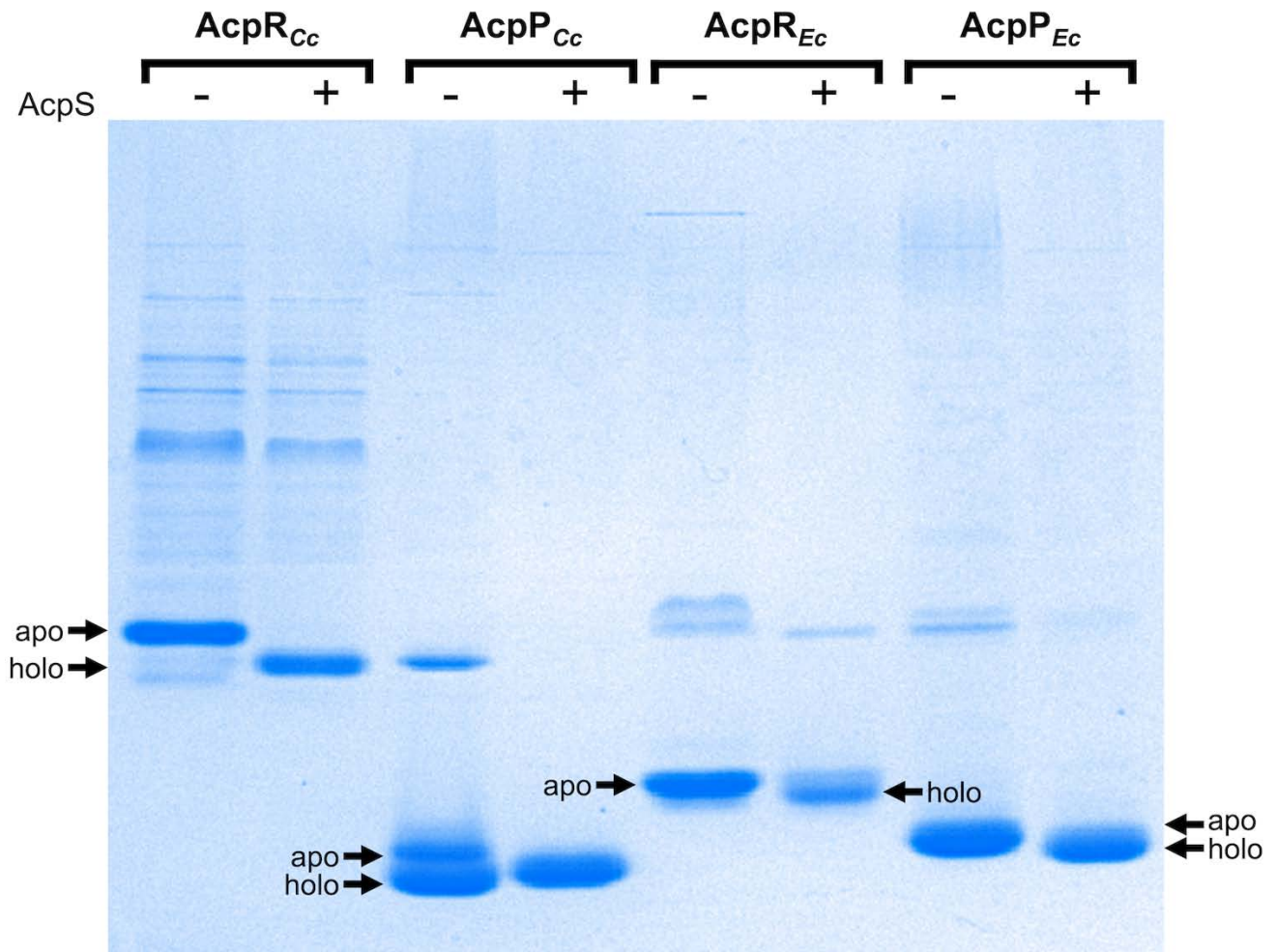


Figure S3. *In vitro* conversion of ACPs from apo- to holo-forms. Purified ACP preparations containing mixtures of apo- and holo-ACPs ($AcpR_{Cc}$ and $AcpP_{Cc}$ from *C. crescentus*; and $AcpR_{Ec}$ and $AcpP_{Ec}$ from *E. coli* BL21(DE3)) were incubated with CoA in the presence of holo-ACP synthase ($AcpS$) from *S. meliloti*. A Coomassie-blue stained gel of native 20% PAGE containing purified ACP preparations without (-) or with (+) $AcpS$ incubation is displayed. The positions of apo- and holo-forms for each ACP are indicated.

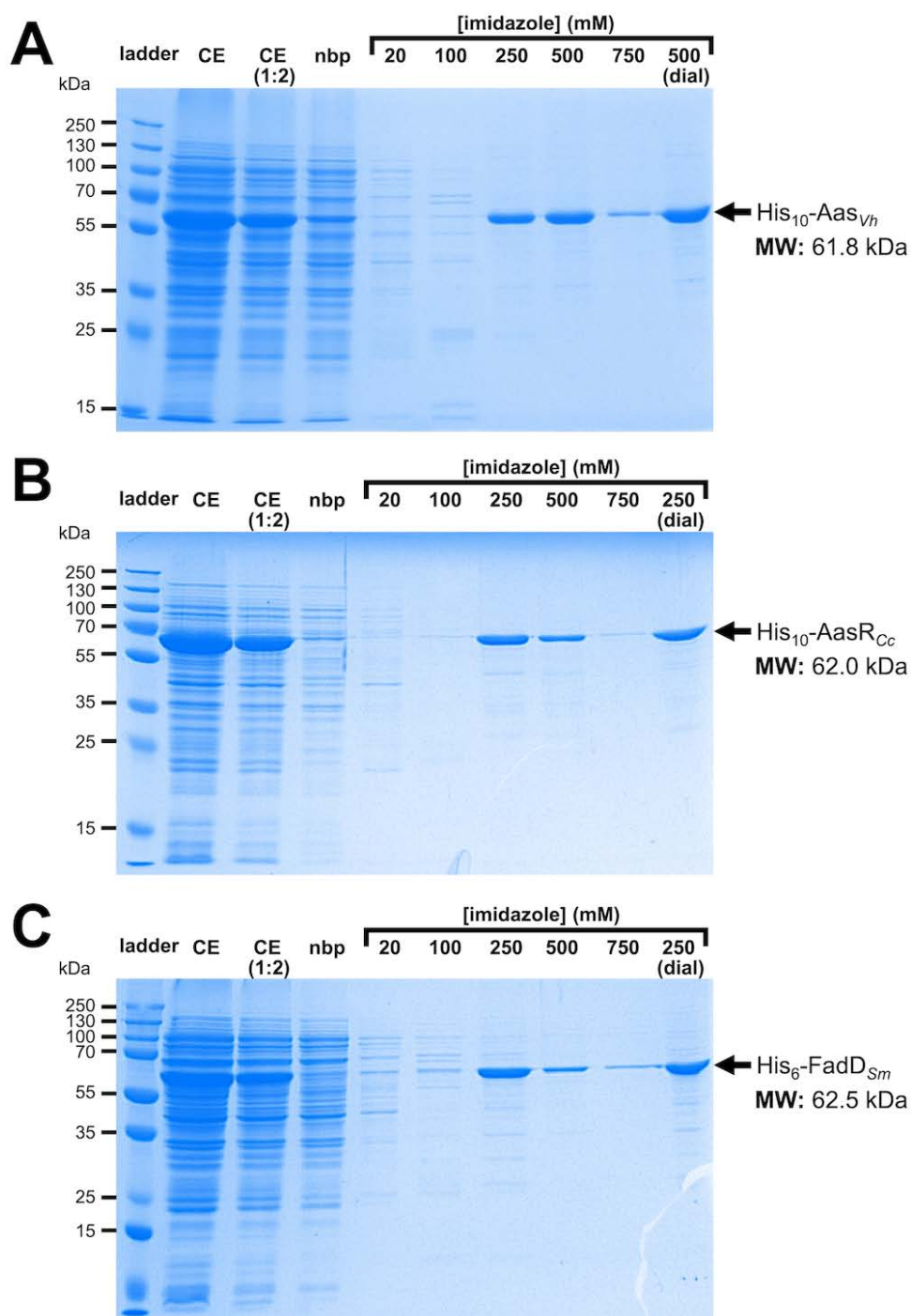


Figure S4. Purification of His-tagged acyl-CoA/ACP synthetases by affinity chromatography. Cell-free extracts, containing overexpressed His-tagged acyl-CoA/ACP synthetases, and fractions obtained by Ni-containing HiTrap column chromatography were separated in 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Fractions of chromatographic elutions of the Aas_{Vh} from *V. harveyi* (A), putative ACS AasR_{Cc} from *C. crescentus* (B) and FadD_{Sm} from *S. meliloti* (C) are shown. The samples included PageRuler Plus Prestained Protein ladder from Thermo Scientific (ladder), cell-free extract (CE), diluted CE (1:2), proteins not bound to HiTrap column (nbp), and elution fractions obtained with different concentrations (20, 100, 250, 500 and 750 mM) of imidazole. An eluted fraction after dialysis (dial) is shown for each protein. The molecular weight (MW) for each protein was calculated using the ExpASY - SIB Bioinformatics Resource Portal (<https://www.expasy.org/>).

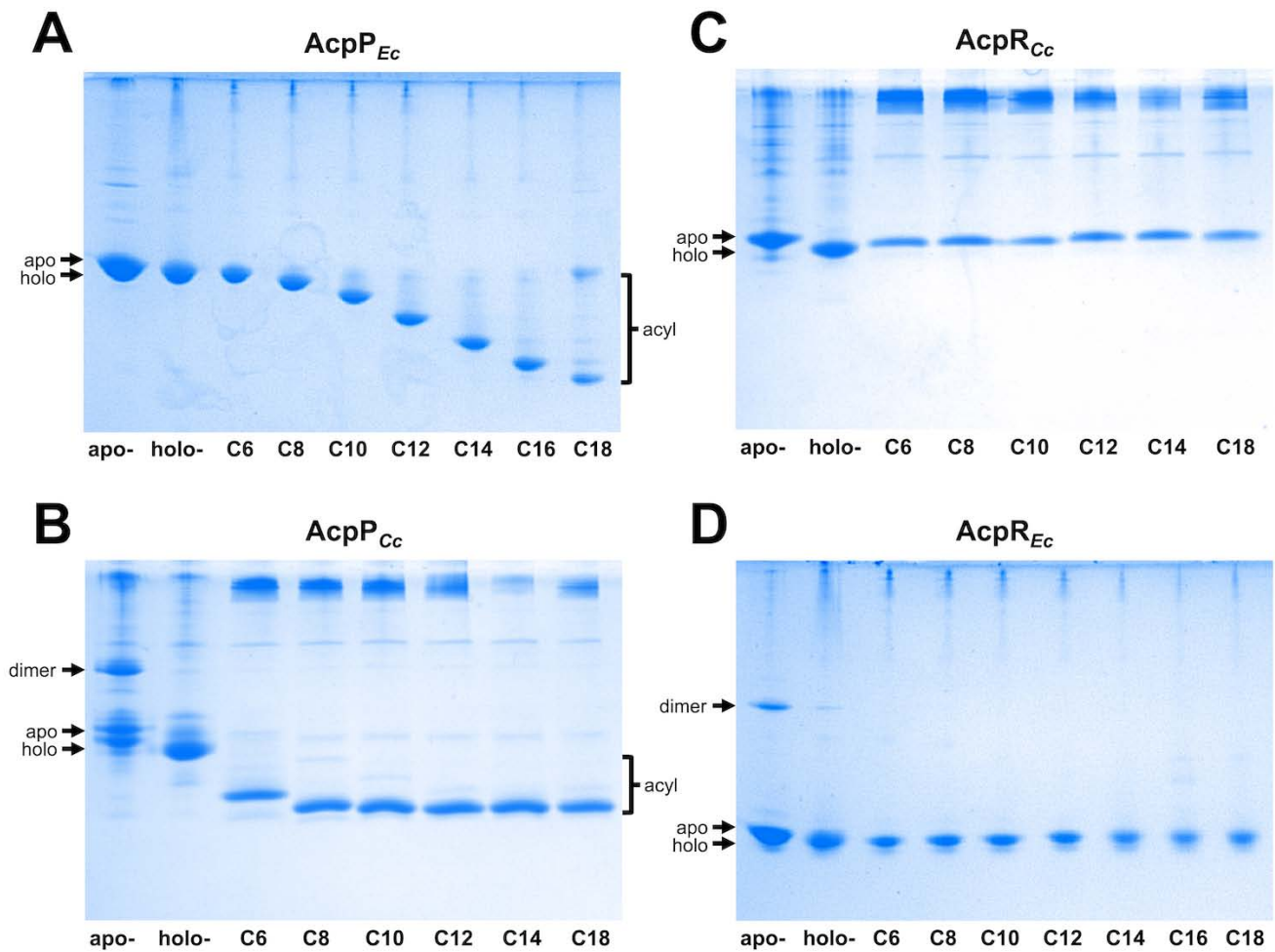


Figure S5. Acylation assays (with C6-C18 fatty acids) of different ACPs, using Aas from *V. harveyi*. ACP preparations of AcpP_{Ec} (A), AcpP_{Cc} (B), AcpR_{Cc} (C) and AcpR_{Ec} (D). Preparations after ion exchange chromatography (apo-ACP; apo-), after treatment with AcpS (holo-ACP; holo-), or after subsequent acylation treatment with Aas_{Vh} and selected fatty acids (hexanoic acid (C6), octanoic acid (C8), decanoic acid (C10), lauric acid (C12), myristic acid (C14), palmitic acid (C16), and stearic acid (C18)) were separated by conformation-sensitive urea-PAGE and stained with Coomassie blue. Samples in (A) and (D) were separated in 17.3% (5 M urea) PAGE, and samples in (B) and (C) in 18.7% (3.2 M urea) PAGE. Reactions were performed at 37°C in a water bath during 18 h. Different isoforms of the ACPs are shown: apo-, holo-, acyl-ACP, and dimers.

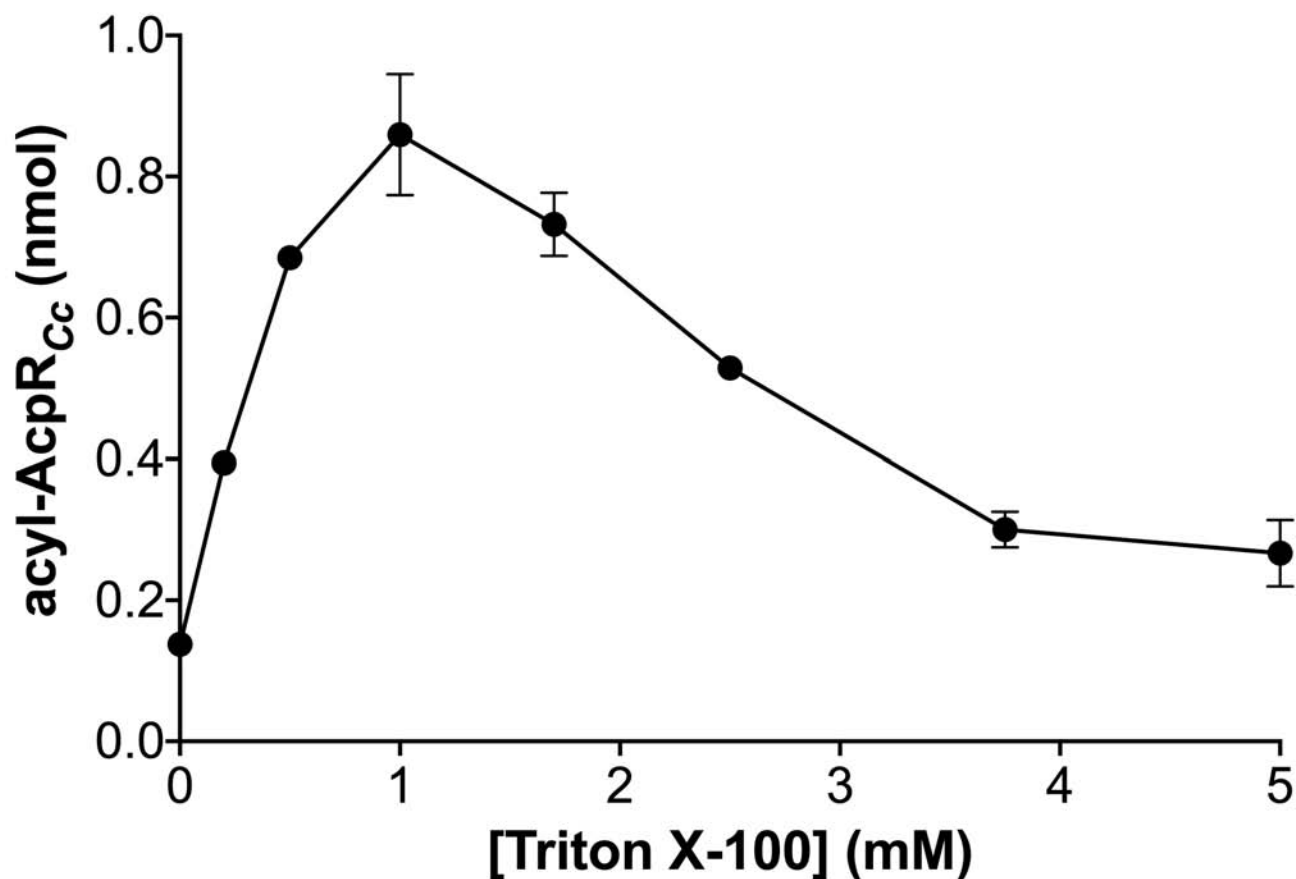


Figure S6. Dependence of AasR activity on Triton X-100 concentration. Holo-AcpR_{Cc} acylation with AasR_{Cc} from *C. crescentus* was assayed using [³H]palmitate and different concentrations (0, 0.2, 0.5, 1, 1.7, 2.5, 3.75, or 5 mM) of the nonionic detergent Triton X-100. Activity was measured by analyzing the incorporation of [³H]palmitate into the [³H]palmitoyl-AcpR_{Cc} product, as described in Materials and methods. Assays were performed at 37°C in a water bath during 30 minutes. Concentrations of 40 μM thiol substrate holo-AcpR_{Cc} and 30 nM of AasR_{Cc} were employed. Standard deviations of three replicates are shown.

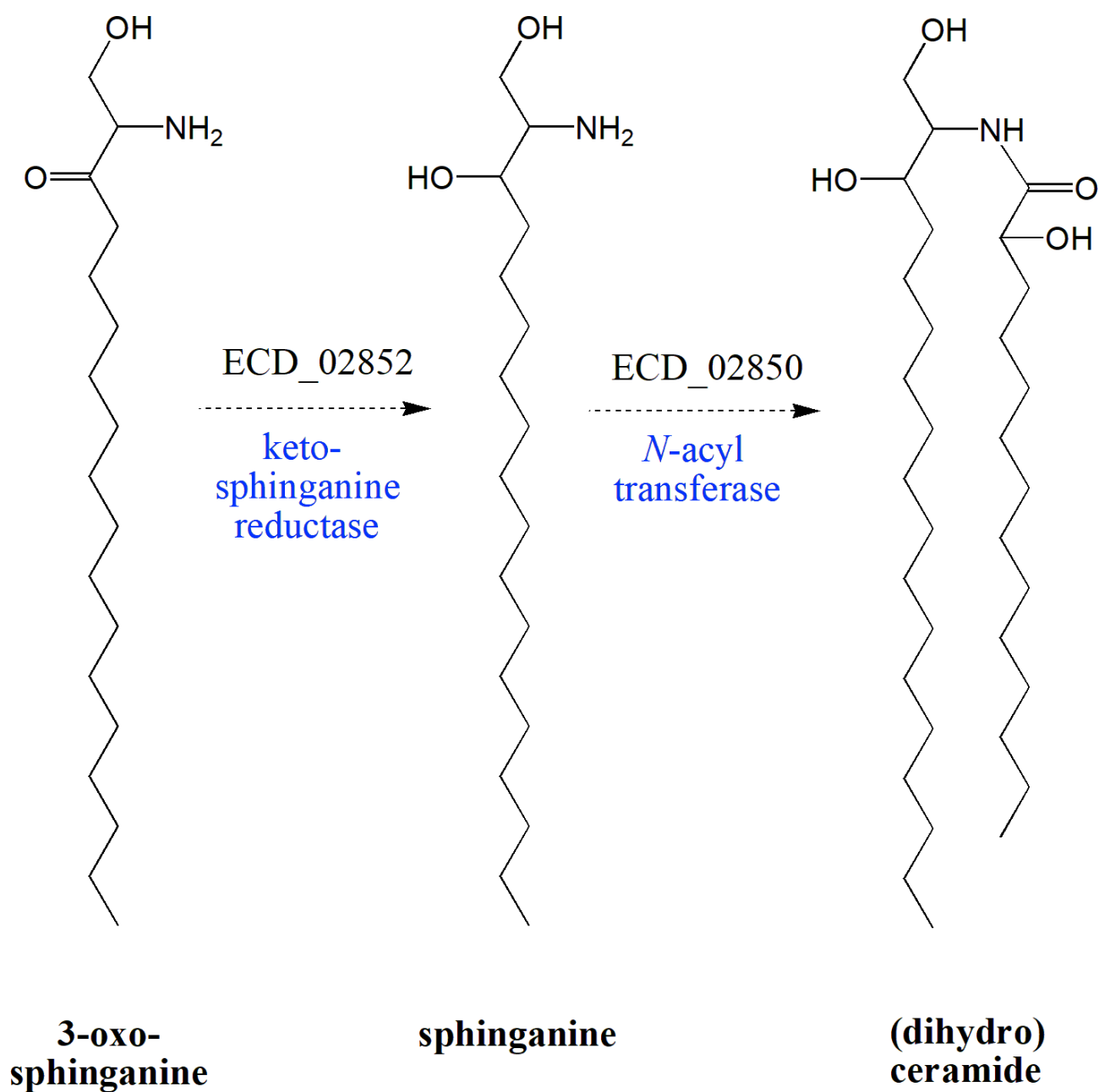


Figure S7. Proposed 3-oxo-sphinganine conversion in *E. coli*. 3-oxo-sphinganine formed in *E. coli* BL21(DE3) might be converted by intrinsic enzymes to sphinganine and (dihydro)ceramide.

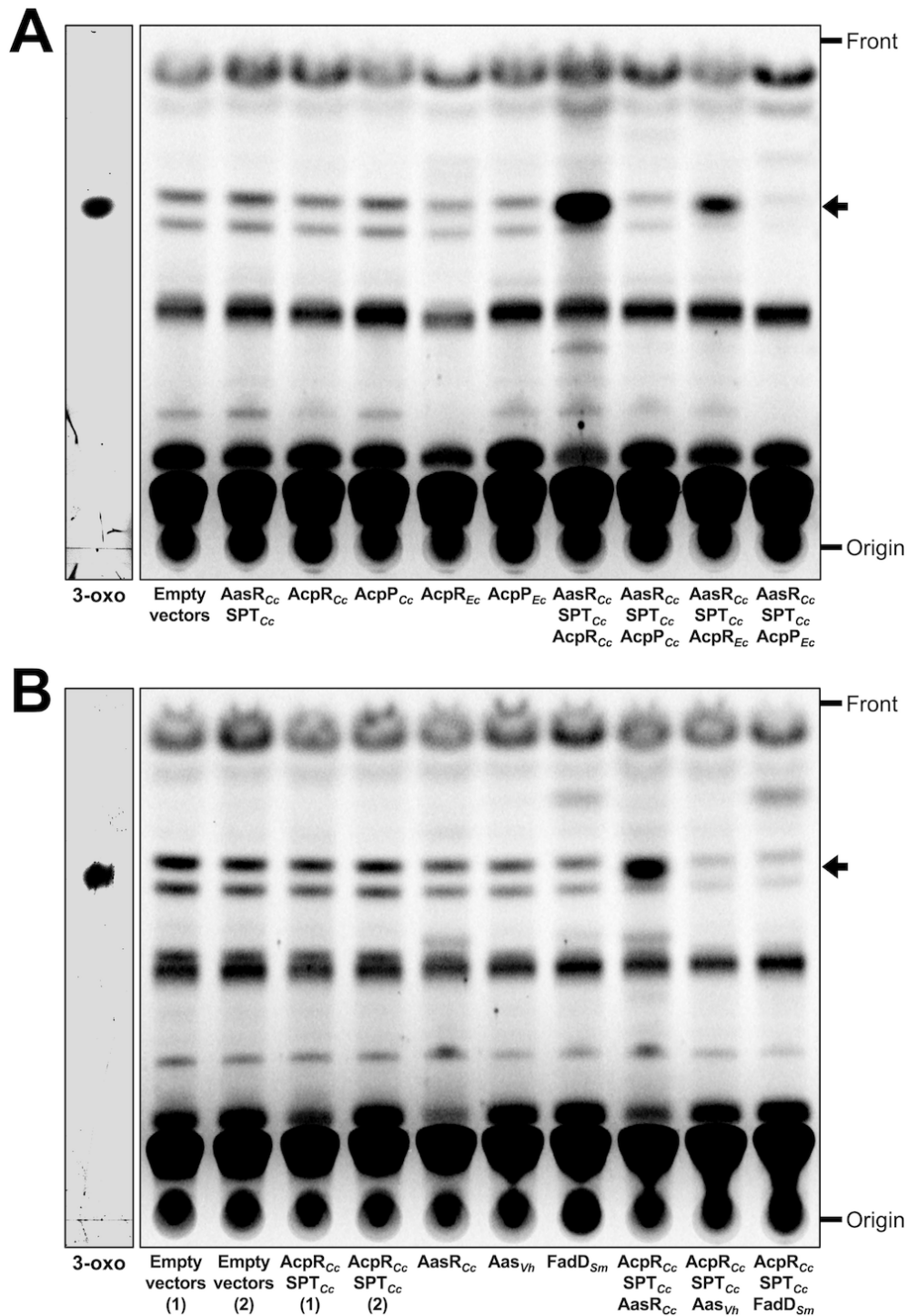


Figure S8. Specialized acyl-ACP synthetase AasR, specialized AcpR, and serine palmitoyltransferase from *C. crescentus* are required for efficient 3-oxo-sphinganine formation. Expression of the structural genes for SPT_{Cc} and AasR_{Cc} from *C. crescentus* in combination with any of the structural genes for the constitutive or specialized ACP from *C. crescentus* (AcpP_{Cc} AcpR_{Cc}) or *E. coli* BL21(DE3) (AcpP_{Ec} AcpR_{Ec}) leads to the strong formation of a compound that migrates like 3-oxo-sphinganine in TLC when specialized AcpR_{Cc} is employed and to reduced formation if AcpR_{Ec} is used instead. Radiolabeling with ¹⁴C-acetate was performed on complex medium at 30°C for 4 h (transition of exponential to stationary phase of growth) after induction with IPTG at an

OD₆₀₀ = 0.3 with *E. coli* BL21(DE3) x pLysS expressing different sphingolipid biosynthesis genes, as described previously ([Olea-Ozuna et al., 2021](#)). Strains of *E. coli* BL21(DE3) x pLysS employed harbored (A) the empty vectors pCDFDuet-1 and pET9a (Empty vectors), pJPG15 and pET9a (AasR_{Cc} SPT_{Cc}), pCDFDuet-1 and pDG01 (AcpR_{Cc}), pCDFDuet-1 and pPEG01 (AcpP_{Cc}), pCDFDuet-1 and pJPG12 (AcpR_{Ec}), pCDFDuet-1 and pTB5079 (AcpP_{Ec}), pJPG15 and pDG01 (AasR_{Cc} SPT_{Cc} AcpR_{Cc}), pJPG15 and pPEG01 (AasR_{Cc} SPT_{Cc} AcpP_{Cc}), pJPG15 and pJPG12 (AasR_{Cc} SPT_{Cc} AcpR_{Ec}), and pJPG15 and pTB5079 (AasR_{Cc} SPT_{Cc} AcpP_{Ec}). (B) Strains of *E. coli* BL21(DE3) x pLysS employed harbored the empty vectors pCDFDuet-1 and pET16b (Empty vectors (1)), pCDFDuet-1 and pET28a (Empty vectors (2)), pJPG16 and pET16b (AcpR_{Cc} SPT_{Cc} (1)), pJPG16 and pET28a (AcpR_{Cc} SPT_{Cc} (2)), pCDFDuet-1 and pDG10 (AasR_{Cc}), pCDFDuet-1 and pJPG10 (Aas_{Vh}), pCDFDuet-1 and pECH3 (FadD_{Sm}), pJPG16 and pDG10 (AcpR_{Cc} SPT_{Cc} AasR_{Cc}), pJPG16 and pJPG10 (AcpR_{Cc} SPT_{Cc} Aas_{Vh}), and pJPG16 and pECH3 (AcpR_{Cc} SPT_{Cc} FadD_{Sm}). At the end of the labeling period, cells were harvested, lipids were extracted, separated by TLC and developed chromatograms were subjected to autoradiography. The arrow indicates a compound migrating like 3-oxo-sphinganine. The reference compound 3-oxo-sphinganine (3-oxo), was developed in the same TLC and visualized by iodine staining.

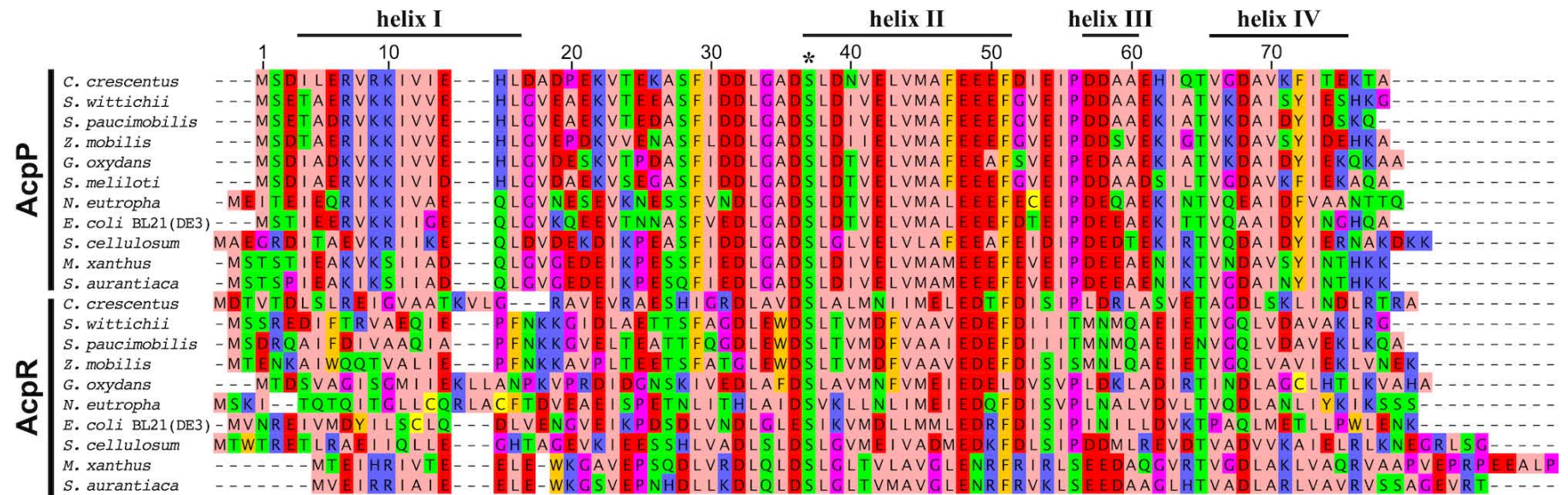


Figure S9. Multiple sequence alignments between housekeeping AcpPs and specialized AcpRs. Amino acid sequences of distinct ACPs (acyl carrier proteins) from Rhodobacteria and δ -Proteobacteria were aligned using the CLUSTAL OMEGA program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and shaded using Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Conserved residues are shown in equal colors. The 4 α -helices and position numbers corresponding to the sequence of *C. crescentus* AcpP are indicated. The asterisk (*) highlights the attachment site (S37) of the 4'-PPT prosthetic group. ORF names/accession numbers are mentioned in Fig. 10.

References for Supplementary Figures

Olea-Ozuna, R. J., Poggio, S., EdBergström, Quiroz-Rocha, E., García-Soriano, D. A., Sahonero-Canavesi, D. X., Padilla-Gómez, J., Martínez-Aguilar, L., López-Lara, I. M., Thomas-Oates, J., and Geiger, O. (2021). Five structural genes required for ceramide synthesis in *Caulobacter* and for bacterial survival. *Environ Microbiol*, 23, 143-159. doi: 10.1111/1462-2920.15280

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25, 1189-91. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033

Specialized acyl carrier protein used by serine palmitoyltransferase to synthesize sphingolipids in *Rhodobacteria*

Supplementary Tables

Table S1. Theoretical and measured masses of acyl carrier proteins AcpR_{Cc} and AcpP_{Cc}

Protein species	AcpR _{Cc}			AcpP _{Cc}		
	Detected mass (Da)	Theoret. mass* (Da)	Error (ppm)	Detected mass (Da)	Theoret. mass* (Da)	Error (ppm)
Apo	9020.3	9022.4	232	8599.1	8601.7	302
Holo	9360.8	9361.4	64	8939.8	8940.7	101
Palmitoyl	9601.2	9599.8	-145	9180.3	9179.1	-130

*The theoretical masses were determined using <https://www.expasy.org> and in the case of AcpP_{Cc} without the N-terminal methionine.

Table S2. Orthologues for sphingolipid biosynthesis proteins in the *Rhodobacteria C. crescentus*, *E. coli* B21(DE3), *S. wittichii*, *S. paucimobilis*, *Z. mobilis*, *G. oxydans*, and *N. eutropha*.

ORF (Query)	ORF (Subject)	E Value	identity (%)	similarity (%)	coverage (%)
CC_1154 _{Cc} (Aca)	ECD_02850 _{Ec}	1e ⁻¹⁰⁷	44	61	98
CC_1154 _{Cc} (Aca)	Swit_3908 _{Sw}	1e ⁻¹⁰⁴	45	58	97
CC_1154 _{Cc} (Aca)	DRN02_007910 _{Sp}	3e ⁻⁹¹	41	59	97
CC_1154 _{Cc} (Aca)	ZMO1400 _{Zm}	7e ⁻⁹³	40	57	98
CC_1154 _{Cc} (Aca)	GOX2417 _{Go}	9e ⁻⁶²	34	50	97
CC_1154 _{Cc} (Aca)	Neut_1100 _{Ne}	2e ⁻¹⁰⁰	41	58	100
CC_1162 _{Cc} (Spt)	ECD_02854 _{Ec}	4e ⁻¹⁴⁴	53	68	96
CC_1162 _{Cc} (Spt)	Swit_3900 _{Sw}	1e ⁻¹⁵²	53	73	97
CC_1162 _{Cc} (Spt)	DRN02_007885 _{Sp}	2e ⁻¹⁴⁷	53	70	97
CC_1162 _{Cc} (Spt)	ZMO1270 _{Zm}	3e ⁻¹⁵¹	52	72	97
CC_1162 _{Cc} (Spt)	GOX2056 _{Go}	1e ⁻¹⁵⁹	55	72	97
CC_1162 _{Cc} (Spt)	Neut_0461 _{Ne}	1e ⁻¹³³	51	66	97
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	ECD_02853 _{Ec}	3e ⁻⁰⁸	41	68	61
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	Swit_3899 _{Sw}	6e ⁻¹⁰	32	54	71
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	DRN02_007880 _{Sp}	1e ⁻⁰⁹	32	52	71
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	ZMO2012 _{Zm}	5e ⁻¹²	38	57	68
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	GOX2057 _{Go}	1e ⁻¹²	46	69	67
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	Neut_0460 _{Ne}	8e ⁻¹³	44	71	71
CC_1164 _{Cc} (Epi)	ECD_02852 _{Ec}	7e ⁻³⁸	34	49	94
CC_1164 _{Cc} (Epi)	Swit_3897 _{Sw}	2e ⁻⁴⁷	40	47	95
CC_1164 _{Cc} (Epi)	DRN02_007875 _{Sp}	7e ⁻³⁷	35	48	95
CC_1164 _{Cc} (Epi)	ZMO0205 _{Zm}	1e ⁻³⁸	31	48	96
CC_1164 _{Cc} (Epi)	GOX1849 _{Go}	2e ⁻¹⁸	32	47	73
CC_1164 _{Cc} (Epi)	Neut_0459 _{Ne}	1e ⁻⁴⁷	38	52	85
CC_1165 _{Cc} (AasR)	ECD_02851 _{Ec}	1e ⁻¹⁵⁵	42	60	97
CC_1165 _{Cc} (AasR)	Swit_2559 _{Sw}	1e ⁻¹⁶³	46	63	98
CC_1165 _{Cc} (AasR)	DRN02_008180 _{Sp}	7e ⁻¹⁶³	46	62	98
CC_1165 _{Cc} (AasR)	ZMO0704 _{Zm}	3e ⁻¹⁶⁴	45	63	98
CC_1165 _{Cc} (AasR)	GOX2058 _{Go}	0	54	69	99
CC_1165 _{Cc} (AasR)	Neut_0458 _{Ne}	6e ⁻¹⁵²	43	60	99

Pairwise protein sequence alignments between *C. crescentus* (*Cc*) ORFs codifying proteins for dihydroceramide biosynthesis: putative acyl-CoA *N*-acyltransferase (Aca), serine palmitoyltransferase (Spt), acyl carrier protein (AcpR), predicted dehydrogenase/epimerase (Epi), and acyl-ACP synthetase (AasR); compared to the *E. coli* BL21(DE3) (*Ec*), *S. wittichii* (*Sw*), *S. paucimobilis* (*Sp*), *Z. mobilis* (*Zm*), *G. oxydans* (*Go*), and *N. eutropha* (*Ne*) homologues. Homologous ORFs are shown in equal colors. ORF names/accession numbers are as follows: *Caulobacter crescentus* CB15 (Aca: CC_1154/AAK23138.1; Spt: CC_1162/AAK23146.1; AcpR: CC_1163/AAK23147.1; Epi: CC_1164/AAK23148.1; AasR: CC_1165/AAK23149.1), *Escherichia coli* BL21(DE3) (Aca: ECD_02850/ACT44654.1; Spt: ECD_02854/ACT44658.1; AcpR: ECD_02853/ACT44657.1; Epi: ECD_02852/ACT44656.1; AasR: ECD_02851/ACT44655.1), *Sphingomonas wittichii* RW1 (Aca: Swit_3908/ABQ70253.1; Spt: Swit_3900/ABQ70245.1; AcpR: Swit_3899/ABQ70244.1; Epi: Swit_3897/ABQ70242.1; AasR: Swit_2559/ABQ68917.1), *Sphingomonas paucimobilis* strain AIMST S-2 (Aca: DRN02_007910/QBE91945.1; Spt:

DRN02_007885/QBE91942.1; AcpR: DRN02_007880/QBE91941.1; Epi: DRN02_007875/QBE91940.1; AasR: DRN02_008180/QBE91994.1), *Zymomonas mobilis* ZM4 (Aca: ZMO1400/AAV90024.1; Spt: ZMO1270/AAV89894.1; AcpR: ZMO2012/ADK75091.1; Epi: ZMO0205/AAV88829.1; AasR: ZMO0704/AAV89328.2), *Gluconobacter oxydans* 621H (Aca: GOX2417/AAW62148.1; Spt: GOX2056/AAW61792.1; AcpR: GOX2057/AAW61793.1; Epi: GOX1849/AAW61587.1; AasR: GOX2058/AAW61794.1) and *Nitrosomonas eutropha* C91 (Aca: Neut_1100/ABI59355.1; Spt: Neut_0461/ABI58738.1; AcpR: Neut_0460/ABI58737.1; Epi: Neut_0459/ABI58736.1; AasR: Neut_0458/ABI58735.1).

Table S3. Possible orthologues for FadD in *G. oxydans*, *N. eutropha* and *C. crescentus*.

ORF (Query)	ORF (Subject)	E Value	identity (%)	similarity (%)	coverage (%)
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	AD932_04675 _{Go}	1e ⁻⁴⁴	28	45	85
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	Neut_1417 _{Ne}	5e ⁻⁶⁰	29	46	93
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	CC_1321 _{Cc}	1e ⁻⁶⁵	31	48	91
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	CC_0966 _{Cc}	3e ⁻⁵⁸	28	45	95
SMc02162 _{Sm} (FadD)	AD932_04675 _{Go}	3e ⁻⁴²	28	44	93
SMc02162 _{Sm} (FadD)	Neut_1417 _{Ne}	5e ⁻³⁸	27	42	89
SMc02162 _{Sm} (FadD)	CC_0966 _{Cc}	3e ⁻⁶⁰	29	48	90
SMc02162 _{Sm} (FadD)	CC_1321 _{Cc}	8e ⁻⁵⁶	31	49	87

Pairwise protein sequence alignments between ORFs codifying for acyl-CoA synthetase (FadD) from *E. coli* (*Ec*) and *S. meliloti* (*Sm*); compared to *G. oxydans* (*Go*), *N. eutropha* (*Ne*) and *C. crescentus* (*Cc*) proteins. Possible homologous ORFs are shown in equal colors. ORF names/accession numbers are as follows: *Caulobacter crescentus* CB15 (CC_1321/AAK23302.1; CC_0966/AAK22950.1), *Escherichia coli* BL21(DE3) (ECD_01775/ACT43629.1), *Gluconobacter oxydans* 621H (AD932_04675/KXV13177), *Nitrosomonas eutropha* C91 (Neut_1417/ABI59664.1) and *Sinorhizobium meliloti* 1021 (SMc02162/CAC41921.1).

Table S4. Possible orthologues for AcpR, AcpP, AasR, FadD and Aas proteins in *B. thetaiotaomicron*, *B. stolpii*, *M. xanthus*, *P. gingivalis*, *S. multivorum*, *S. aurantiaca* and *S. cellulosum*.

ORF (Query)	ORF (Subject)	E Value	identity (%)	similarity (%)	coverage (%)
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	BT_3359 _{Bt}	9e ⁻¹¹	41	51	65
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	C0V70_14770 _{Bs}	7e ⁻⁰⁷	29	60	57
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	MXAN_6637 _{Mx}	1e ⁻⁰³	42	60	51
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	PGN_1705 _{Pg}	2e ⁻¹⁰	38	56	60
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	NCTC11343_01004 _{Sm}	5e ⁻¹⁰	39	58	55
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	STAUR_1257 _{Sa}	7e ⁻⁰²	33	60	51
CC_1163 _{Cc} (AcpR)	sce7052 _{Sc}	1e ⁻⁰⁹	44	66	65
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	BT_3359 _{Bt}	5e ⁻²⁶	59	74	96
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	C0V70_14770 _{Bs}	3e ⁻¹⁴	42	67	93
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	MXAN_4769 _{Mx}	4e ⁻²¹	53	75	93
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	PGN_1705 _{Pg}	2e ⁻²³	52	79	93
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	NCTC11343_01004 _{Sm}	2e ⁻²⁵	58	75	93
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	STAUR_5619 _{Sa}	8e ⁻²¹	51	75	93
CC_1677 _{Cc} (AcpP)	sce3814 _{Sc}	2e ⁻²⁰	56	74	91
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	BT_3359 _{Bt}	6e ⁻²⁷	62	73	97
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	C0V70_14770 _{Bs}	2e ⁻¹⁴	40	65	96
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	MXAN_4769 _{Mx}	6e ⁻³¹	66	80	97
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	PGN_1705 _{Pg}	1e ⁻²²	55	75	93
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	NCTC11343_01004 _{Sm}	3e ⁻²⁴	62	72	93
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	STAUR_5619 _{Sa}	5e ⁻²⁹	63	78	97
ECD_01090 _{Ec} (AcpP)	sce3814 _{Sc}	1e ⁻²²	62	78	84
CC_1165 _{Cc} (AasR)	BT_2782 _{Bt}	1e ⁻²³	27	45	68
CC_1165 _{Cc} (AasR)	C0V70_02865 _{Bs}	8e ⁻²⁰	24	40	68
CC_1165 _{Cc} (AasR)	MXAN_6636 _{Mx}	1e ⁻⁸⁷	36	52	91
CC_1165 _{Cc} (AasR)	CF001_1738 _{Pg}	4e ⁻¹⁷	24	40	79
CC_1165 _{Cc} (AasR)	NCTC11343_01971 _{Sm}	1e ⁻¹³	24	38	73
CC_1165 _{Cc} (AasR)	STAUR_1258 _{Sa}	3e ⁻⁹²	36	52	97
CC_1165 _{Cc} (AasR)	sce7053 _{ScI}	6e ⁻¹²²	39	56	96
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	BT_2782 _{Bt}	4e ⁻⁶³	30	50	89
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	C0V70_02865 _{Bs}	0	55	74	98
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	MXAN_7148 _{Mx}	6e ⁻⁷⁹	33	50	93
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	CF001_1738 _{Pg}	2e ⁻²⁹	25	42	80
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	NCTC11343_0197 _{Sm}	8e ⁻³⁷	28	45	74
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	STAUR_3279 _{Sa}	0	58	73	98
ECD_01775 _{Ec} (FadD)	sce3825 _{Sc}	5e ⁻⁵⁴	32	47	94
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	BT_2782 _{Bt}	7e ⁻³⁸	25	42	95
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	C0V70_10230 _{Bs}	2e ⁻⁴⁴	27	45	93
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	MXAN_6374 _{Mx}	4e ⁻¹¹⁵	36	55	97
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	CF001_1738 _{Pg}	1e ⁻¹⁵	22	40	75
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	NCTC11034_01400 _{Sm}	3e ⁻²⁸	23	42	79
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	STAUR_2914 _{Sa}	2e ⁻¹¹²	37	55	97
LA59_RS23465 _{Vh} (Aas)	sce5736 _{Sc}	1e ⁻¹⁰⁷	36	52	97

Pairwise protein sequence alignments between ORFs codifying for: acyl carrier protein (AcpR) and acyl-ACP synthetase (AasR) from *C. crescentus* CB15 (_{Cc}), acyl-CoA synthetase (FadD) from *E. coli* BL21(DE3) (_{Ec}), and acyl-ACP synthetase (Aas) from *V. harveyi* (_{Vh}); compared to the *B. thetaiotaomicron* (_{Bt}), *B. stolpii* (_{Bs}), *M. xanthus* (_{Mx}), *P. gingivalis* (_{Pg}), *S. multivorum* (_{Sm}), *S.*

aurantiaca (*sa*) and *S. cellulosum* (*sc*) proteins. Possible homologous ORFs are shown in equal colors. ORF names/accession numbers are as follows: *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (BT_3359/Q8A2E6.1; BT_2782/AAO77888), *Bacteriovorax stolpii* (C0V70_14770/AUN99345.1; C0V70_02865/AUN97064; C0V70_10230/AUN98475), *Myxococcus xanthus* DK 1622 (MXAN_6637/ABF91660.1; MXAN_4769/ABF90332.1; MXAN_6636/ABF92798; MXAN_7148/ABF89596; MXAN_6374/ABF88458), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (PGN_1705/B2RLH9.1; CF001_1738/AUR49213), *Sphingobacterium multivorum* (NCTC11343_01004/SPZ84464.1; NCTC11343_01971/SPZ85409; NCTC11034_01400/SUJ04263), *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (STAUR_1257/ADO69061.1; STAUR_5619/ADO73384.1; STAUR_1258/ADO69062; STAUR_3279/ADO71071; STAUR_2914/ADO70706) and *Sorangium cellulosum* So ce56 (sce7052/CAN97221.1; sce3814/CAN93974.1; sce7053/CAN97222.1; sce3825/CAN93985.1; sce5736/CAN95899.1)

Table S5. Oligonucleotides used for amplification of different sphingolipid biosynthesis genes. Sites for recognition by restriction enzymes are underlined.

Primers	Sequence (5'-3')
Primers for expression plasmids	
oLOP227	AGGAATAC <u>CATATG</u> ATCACGGCCACGGCGTC
oLOP228	AAAGGTACCTCAGTCGCCATAGGTTCCGGC
oLOP264	AGGAATAC <u>CATATG</u> TCCGACATTCTCGAGCG
oLOP265	AAAGGATCCTTAGGCGGTCTTTTCCGTG
oLOP423	ACTGGGTACCC <u>CATATG</u> GGGCTATTTGATAAGCACC
oLOP424	ACTGTCTAGAGGATCCTCAGGCGCGGGC
oLOP432	ACTGCATATGGTAAATCGTGAATAGTAATG
oLOP433	ACTGGGATCCTTATTTATTCTCCAGCCATG
oLOP434	ACTGACTGCCATGGC <u>CATATG</u> GGGCTATACGATAAATATGCGC
oLOP435	ACTGTCTAGAGGATCCTTACTGCTTCAGAGTAGCAAATGCCTGA
oLOP436	ACTGACTGCCATGGC <u>CATATG</u> GCCGACCTCCTCTCCAAG
oLOP437	ACTGTCTAGAGGATCCTCAGGGGATTACTCCCGTGGCG
oLOP438	ACTGGATATC <u>CATG</u> GGGCTATTTGATAAGCACCTGG
oLOP439	ACTGGGCCGGCCTCAGGCGCGGGCGCG
oLOP440	ACTGCATATGGTGTATATGTCTAATAAAAATC
oLOP443	ACTGCTCGAGT <u>CATG</u> CCAGGGATTCC

Table S6. Construction of different expression plasmids

For details see Materials and methods in main text.

Plasmid	ORFs cloned	oligonucleotides used	restricted with	cloned into plasmid restricted with ()
pDG04	CC_1165	oLOP227/oLOP228	<i>NdeI/KpnI</i>	pET17b (<i>NdeI/KpnI</i>)
pPEG01	CC_1677	oLOP264/oLOP265	<i>NdeI/BamHI</i>	pET9a (<i>NdeI/BamHI</i>)
pJPG05	CC_1162	oLOP423/oLOP424	<i>KpnI/XbaI</i>	pBAD24 (<i>KpnI/XbaI</i>)
pJPG06	ECD_02854	oLOP434/oLOP435	<i>NcoI/XbaI</i>	pBAD24 (<i>NcoI/XbaI</i>)
pJPG07	Swit_3900	oLOP436/oLOP437	<i>NcoI/XbaI</i>	pBAD24 (<i>NcoI/XbaI</i>)
pJPG12	ECD_02853	oLOP432/oLOP433	<i>NdeI/BamHI</i>	pET9a (<i>NdeI/BamHI</i>)
pJPG15	CC_1162	oLOP438/oLOP439	<i>EcoRV/FseI</i>	pJPG13 (MCS-2) (<i>EcoRV/FseI</i>)
pJPG17	ECD_02851	oLOP440/oLOP443	<i>NdeI/XhoI</i>	pET17b (<i>NdeI/XhoI</i>)
pJPG20	ECD_02853/ ECD_02854	oLOP432/oLOP435	<i>NdeI/BamHI</i>	pCDFDuet-1 (MCS-2) (<i>NdeI/BglII</i>)

5 RESULTADOS ADICIONALES

5.1 Similitudes y diferencias estructurales entre AcpR y AcpP

A pesar de participar en distintas vías biosintéticas, interactuar con muchas enzimas distintas y tener baja similitud de secuencia primaria general, las ACPs parecen conservar sus estructuras secundarias y plegamiento 3D. Un análisis estructural basado en estructuras secundarias, utilizando ESPript (Robert & Gouet, 2014), de las AcpR y AcpP de distintas proteobacterias, muestra que todas conservan las 3 α -hélices principales (hélices I, II, y IV) y un segmento α -helicoidal corto (hélice III) que conecta las hélices II y IV (**Figura 16**). Notablemente, la mayoría de los residuos de amino ácidos de la parte C-terminal de la hélice II (hélice de reconocimiento), la cual es esencial para la interacción de AcpP con diversas enzimas, también están conservados en AcpRs (**Figura 16**). Además, tanto AcpRs como AcpPs conservan el residuo de serina (Ser40 en AcpR de *C. crescentus*) al cual se espera la unión del grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PPT) (**Figura 16**). La Ser40 se encuentra dentro del motivo (DSL) de unión a 4'-PPT, el cual está conservado en AcpRs y AcpPs, excepto en AcpR de *E. coli* BL21(DE3) (que es ESI) y en *N. eutropha* (que es DSV) (**Figure 16**).

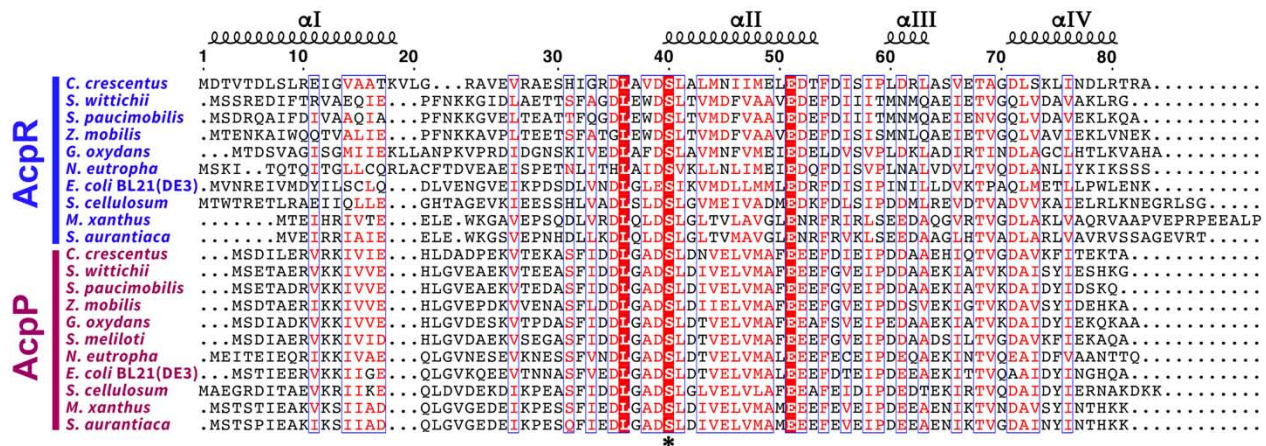


Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias entre AcpRs especializadas para biosíntesis de esfingolípidos y AcpPs. Secuencias de amino ácidos de distintas ACPs de *Rhodobacteria* y δ -*Proteobacteria* fueron alineadas usando el programa CLUSTAL OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y la estructura secundaria fue obtenida utilizando el programa ESPript (<https://esprript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>). Residuos conservados están mostrados en rojo. Las 4 α -hélices y los números de posición correspondientes a la secuencia de la AcpR de *C. crescentus* están indicados. El asterisco (*) resalta el sitio de unión (S40) del grupo prostético 4'-PPT.

Un alineamiento de la estructura cristalográfica reportada en el PDB de la AcpP de *V. harveyi* (PDB: 2L0Q) junto con predicciones de estructuras 3D, obtenidas con i-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), de las AcpRs y AcpPs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3), muestra el plegamiento estructural 3D general conservado entre las distintas ACPs (**Figura 17**). La posición de las 4 α -hélices (I-IV), así como la serina conservada (Ser40 en AcpR de *C. crescentus*) para unión del 4'-PPT, están conservadas entre las distintas ACPs (**Figura 17**). Asimismo, un sitio de unión a 4'-PPT está predicho para las diferentes ACPs. Interesantemente, esta posición predicha del 4'-PPT parece ser distinto entre AcpRs y AcpPs, lo que a su vez provoca

que la posición del tiol terminal de la 4'-PPT, al cual son esterificados los ácidos grasos por acil-ACP sintetetas, también tenga una posición diferente entre AcpRs y AcpPs (**Figura 17**). Esto podría indicar una diferencia clave responsable de que las AcpRs solamente puedan ser aciladas por acil-ACP sintetetas especializadas.

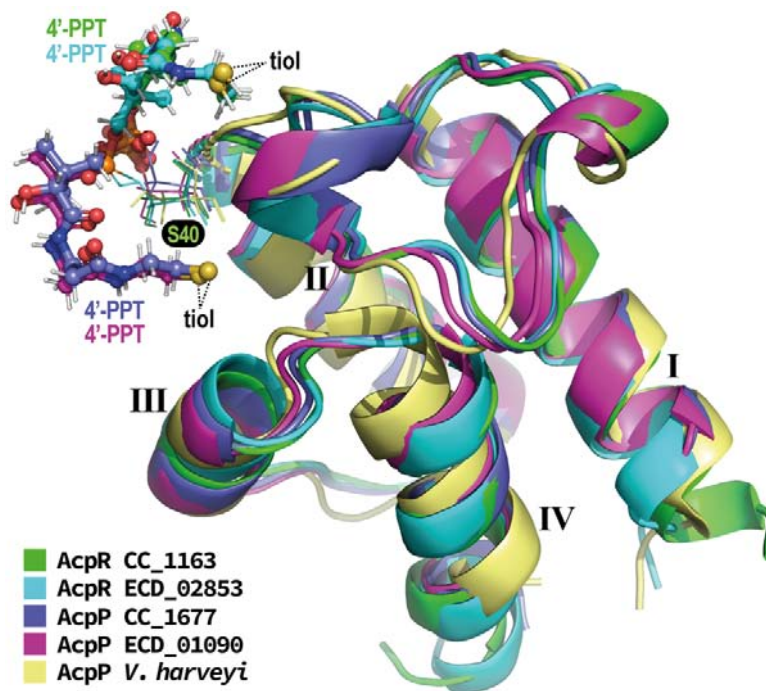


Figura 17. Conservación de estructura 3D en las ACPs. Modelos 3D de AcpR (CC_1163; en verde) y AcpP (CC_1677; en azul) de *C. crescentus*, y AcpR (ECD_02853; en cian) y AcpP (ECD_01090; en magenta) de *E. coli* BL21(DE3) fueron superpuestos a la estructura de AcpP (PDB: 2L0Q; en amarillo) de *V. harveyi*. Las cuatro α -hélices conservadas en las estructuras de ACPs están indicadas. En cada modelo, los grupos prostéticos 4'-PPT están mostrados en forma balls & sticks y coloreados por átomo y de acuerdo a cada estructura de ACP. El tiol terminal de la 4'-PPT está indicado. Una serina conservada (Ser40 en la AcpR de *C. crescentus*) para la unión de la 4'-PPT está mostrada en forma wire.

5.2 Interacción de AasRs con ACPs

Las acil-CoA sintetetas (ACS) catalizan la formación de acil-CoA mediante un proceso de dos pasos, implicando la formación de un intermediario acil-fosfato entre el grupo carboxilo del ácido graso y el α -fosfato del ATP. Subsecuentemente, el ácido graso es transferido al grupo thiol terminal de la 4'-PPT del CoA, liberando AMP. Esta unión secuencial de los sustratos (primero el ácido graso y ATP, y luego CoA) a la enzima, es propia de un mecanismo Bi Uni Uni Bi Ping Pong (Li et al., 2007). En general, se piensa que las ACS y las acil-ACP sintetetas (Aas) siguen cinéticas Michaelis-Menten y no muestran comportamiento cooperativo. Sin embargo, las acil-ACP sintetetas especializadas (AasRs) para biosíntesis de esfingolípidos muestran una dependencia sigmoideal sobre la concentración de AcpR (**Figura 6** en el artículo publicado). Esta cooperatividad sería posible si la AasR fuera un dímero, y la unión de AcpR cambiara la conformación de ambos monómeros, incrementando la afinidad del segundo monómero para la unión del siguiente AcpR.

Con el fin de estudiar la interacción de las AasRs, con los sustratos ácido graso y AcpR, primero se realizó un análisis estructural de otras acil-ACP sintetasas (Aas) reportadas con ácido graso unido. El modelo de la Aas de *V. harveyi* (Aas_{vh}), fue obtenido usando i-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), utilizando como base modelo de la acil-CoA sintetasa (ACS) de *Thermus thermophilus* (PDB: ULT; 2.55 Å). Estos dos modelos, aunque de una ACS y una Aas, resultaron ser muy parecidos (**Figura 18**). Por lo tanto, se utilizó el modelo de la Aas_{vh} para realizar un empalme con el modelo de la ACS de *T. thermophilus* con el sustrato ácido graso (ácido mirístico, C14:0) y AMP unidos (PDB: 1V26; 2.50 Å). Interesantemente, se observa un gran movimiento de una porción de la proteína (parte inferior izquierda en **Figura 18A**) al unirse el ácido graso y el AMP. Esto indica un posible cambio conformacional en la estructura de la Aas después de la unión del sustrato ácido graso.

Por otro lado, al empalmar la estructura de la ACS de *T. thermophilus*, con miristato y AMP unidos, con la estructura predicha de la AasR CC_1165 de *C. crescentus*, se observa el posicionamiento del sustrato ácido graso dentro de una hendidura hidrofóbica (**Figura 18B**). Sorprendentemente, diversos residuos cargados positivamente crean una cavidad hidrofóbica lo suficientemente grande para introducir sustratos mas grandes que ácidos grasos o CoA (**Figura 18B**). Además, este tipo de superficies hidrofóbicas es característica de enzimas que unen ACPs (White et al., 2005). Esto sugiere que el posible sitio de unión de las AcpRs en las AasRs podría estar ubicado en esta cavidad (**Figura 18B**).

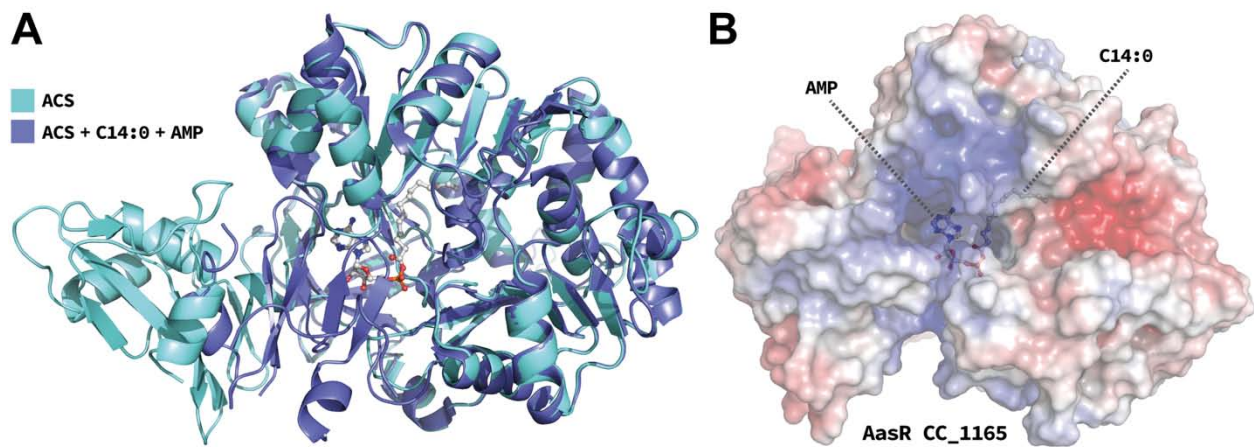


Figura 18. Interacciones entre ACS y AasR con ácidos grasos. (A) La estructura 3D predicha de las Aas de *V. harveyi* (Aas_{vh}) fue construída, usando i-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), en base al modelo de la acil-CoA sintetasa (ACS) de *Thermus thermophilus* (PDB: ULT; 2.55 Å). El RMSD (de root-mean-square distance) entre el modelo de la Aas_{vh} y 1ULT es 0.065 Å. El modelo de la Aas_{vh} (ACS) fue empalmado con el modelo de 1ULT con ácido mirístico (C14:0) y AMP unidos (PDB: 1V26; 2.50 Å). (B) La estructura 3D predicha de las AasR de *C. crescentus* (CC_1165) fue alineada con el modelo 1V26, situando el ácido mirístico y AMP dentro de una hendidura electropositiva en el sitio activo. La visualización de superficie electrostática está mostrada de -5 kT/e (rojo) a +5 kT/e (azul).

Análisis de acoplamiento molecular, utilizando ClusPro (Desta et al., 2020), de las estructuras 3D predichas de las AasRs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) contra las estructuras 3D predichas de las AcpRs y AcpPs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) muestra el posible sitio de unión para las distintas ACPs (**Figura 19**). Interesantemente, el sitio de unión de estas ACPs

con las distintas AasRs se coloca en la cavidad hidrofóbica predicha (**Figura 18B**), y la interacción es similar a la reportada para la Aas de *V. harveyi* con su AcpP propia (Beld et al., 2014). Las distintas ACPs, tanto AcpRs como AcpPs, se acoplaron en el sitio activo de la AasR de *C. crescentus* (**Figura 19**). Sin embargo, la AcpR de *C. crescentus* no tuvo un buen acoplamiento dentro de la hendidura hidrofóbica de la AasR de *E. coli* (**Figura 19**). Esto podría sugerir mayor promiscuidad en la AasR de *C. crescentus* para usar ambas AcpRs como sustrato, y a su vez, mayor selectividad de la AasR de *E. coli* para acilar únicamente su AcpR propia. Esto concuerda con nuestros propios estudios (**Figura 7B** en artículo publicado) que confirman que las AcpRs son aciladas exclusivamente o al menos preferencialmente por la AasR del mismo organismo (Padilla-Gómez et al., 2022).

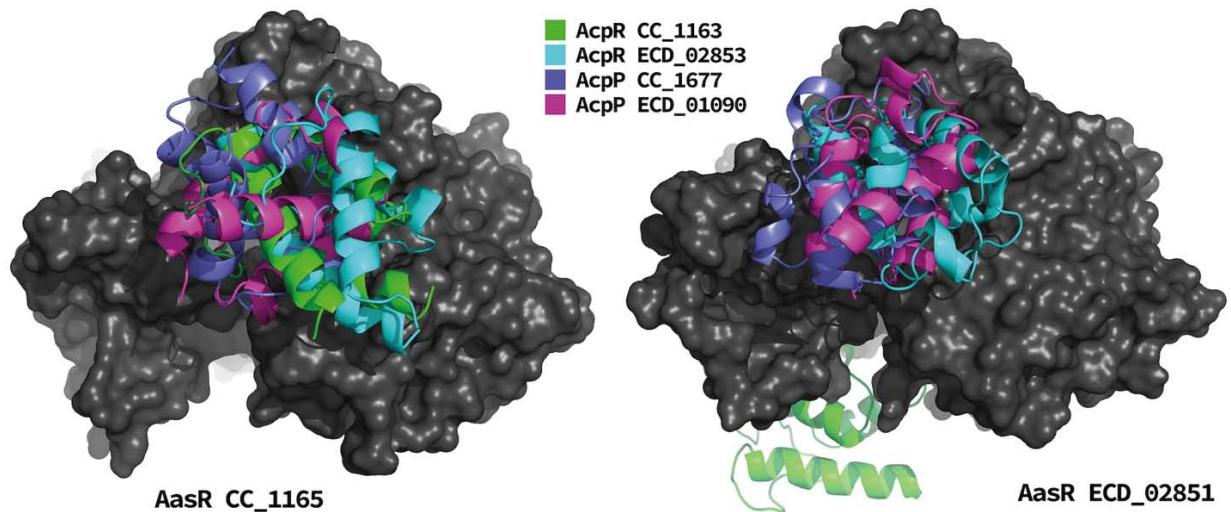


Figura 19. Interacciones entre AasRs y ACPs. Modelos de estructura 3D de ACPs fueron acoplados usando Cluspro, con el modelo 3D de AasR CC_1165 de *C. crescentus* o AasR ECD_02851 de *E. coli* BL21(DE3). Las estructuras de ACPs están mostradas en forma ribbon y coloreadas de la siguiente manera: AcpR (CC_1163; en verde) y AcpP (CC_1677; en azul) de *C. crescentus*, y AcpR (ECD_02853; en cian) y AcpP (ECD_01090; en magenta) de *E. coli* BL21(DE3). Las AasRs están mostradas en representación de superficie (color negro), visualizando la interfaz de unión de las ACPs.

5.3 Interacción de SPTs con ACPs

Análisis de acoplamiento molecular, utilizando ClusPro (Desta et al., 2020), de las estructuras 3D predichas de los monómeros de las SPTs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) contra las estructuras 3D predichas de las AcpRs y AcpPs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) muestra el posible sitio de unión para las distintas ACPs (**Figura 20**). Tanto las AcpRs como las AcpPs parecen interactuar de manera similar en el sitio activo de las SPTs, el cual se encuentra en el canal hidrofóbico predicho para la unión del sustrato acil-tioéster (**Figura 11**). Sin embargo, las AcpRs parecen interactuar con la hélice α I y las AcpPs con la hélice α II con el cofactor PLP de la SPT de *C. crescentus*. Por otro lado, para la SPT de *E. coli*, las ACPs parecen interactuar de manera distinta con el cofactor PLP. Por un lado, la AcpR CC_1163 interactúa con la hélice α I, la AcpR ECD_02853 y AcpP CC_1677 con la hélice α IV, y la AcpP ECD_01090 con la hélice

α II. Posiblemente, estas diferencias en la interacción de las distintas ACPs con el sitio activo de las SPTs sea clave para definir su preferencia de sustratos acil-tioésteres.

Las SPTs de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3) utilizan acil-AcpR como sustrato tioéster preferido, por sobre acil-AcpP e incluso acil-CoA, para la formación de 3-oxo-esfinganina (**Figura 8 en artículo publicado**). Aunque palmitoil-CoA puede servir como sustrato para la SPT de *C. crescentus* (Stankeviciute et al., 2022), la AcpR especializada es el sustrato acil-tioéster preferencial para su SPT (**Figura 21**). La AasR CC_1165 es la encargada de esterificar ácidos grasos específicamente a la AcpR CC_1163, y posteriormente estos son utilizados preferencialmente, sobre acil-CoA, como sustratos tioéster de la SPT CC_1162 para la formación de 3-oxo-esfinganina (**Figura 21**). En *C. crescentus*, se ha demostrado que el par AcpR/AasR junto con SPT son requeridos para la formación de 3-oxo-esfinganina y ceramida (Olea-Ozuna et al., 2021; Stankeviciute et al., 2022). Este sistema tripartito parece estar conservado en *Rhodobacterias* (α , β , y γ -Proteobacterias), lo que sugiere que esta manera más compleja de formación de 3-oxo-esfinganina podría permitirles a estas bacterias dirigir sus ácidos grasos específicamente hacia la síntesis de esfingolípidos.

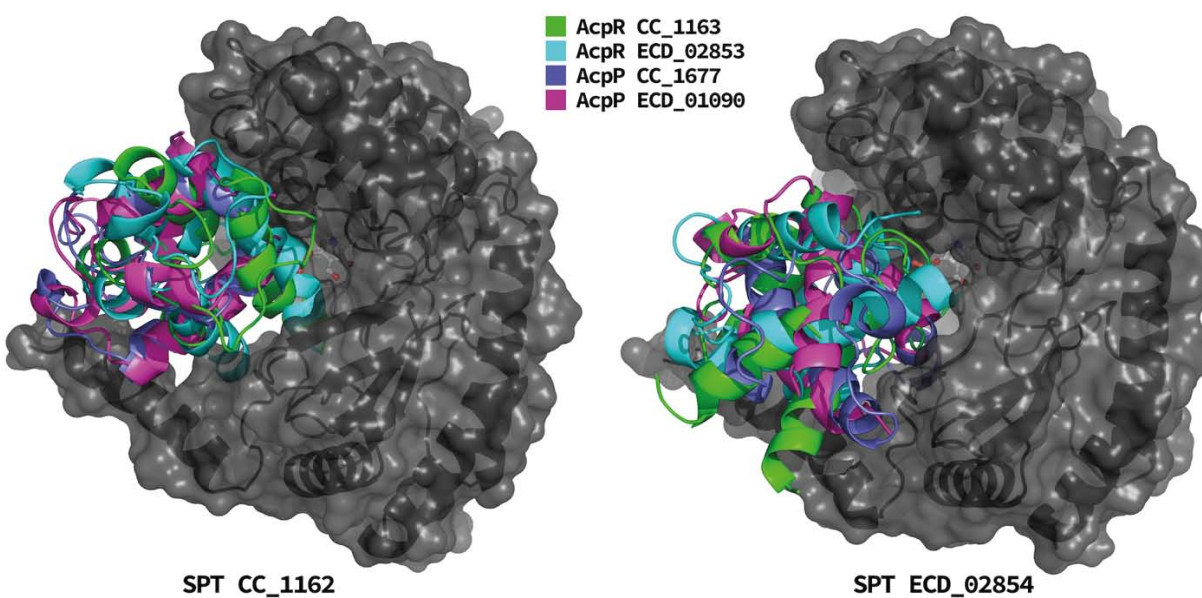


Figura 20. Interacciones entre SPTs y ACPs. Modelos de estructura 3D de ACPs fueron acoplados usando Cluspro, con el modelo 3D de SPT CC_1162 de *C. crescentus* o SPT ECD_02854 de *E. coli* BL21(DE3). Las estructuras de ACPs están mostradas en forma ribbon y coloreadas de la siguiente manera: AcpR (CC_1163; en verde) y AcpP (CC_1677; en azul) de *C. crescentus*, y AcpR (ECD_02853; en cian) y AcpP (ECD_01090; en magenta) de *E. coli* BL21(DE3). Los monómeros de SPT están mostrados en ribbon/representación de superficie transparente (color negro), visualizando la interfaz de unión de las ACPs. Además, el cofactor PLP está mostrado en forma balls & sticks y coloreado por átomo.

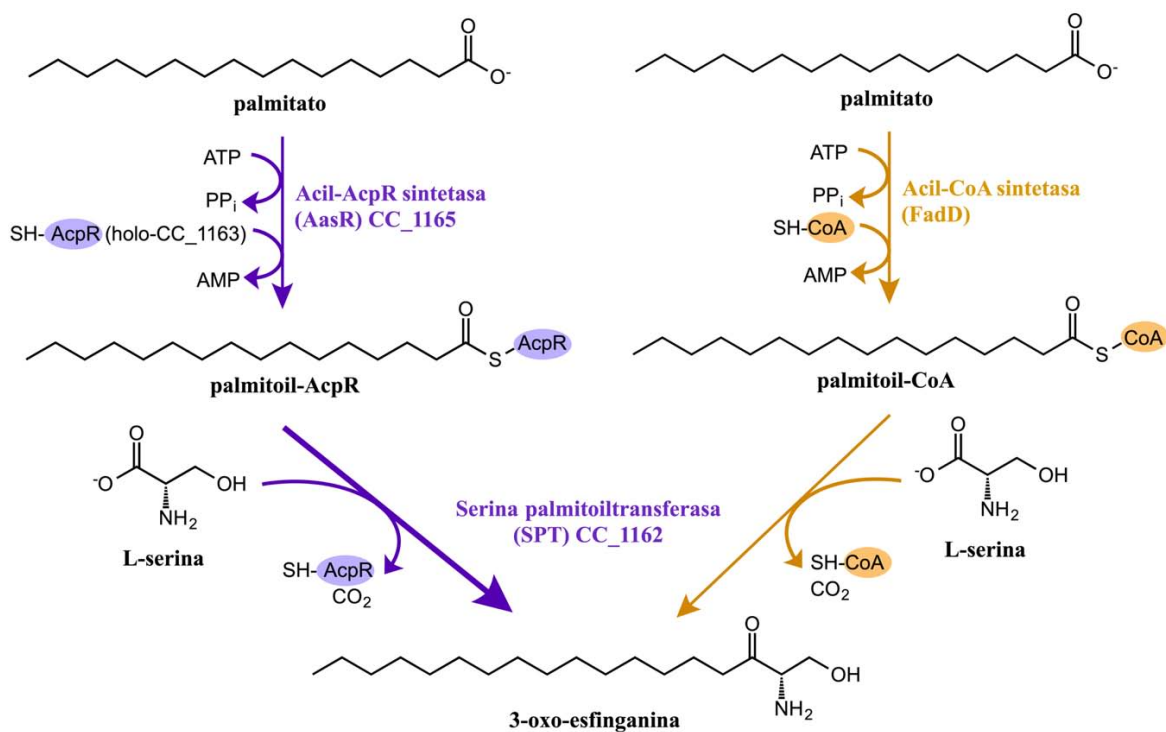


Figura 21. Vías de biosíntesis de 3-oxo-esfinganina en *C. crescentus*. CC_1165 es una acil-AcpR especializada (AasR) que acila selectivamente a la proteína acarreadora de grupos acilo especializada (AcpR) CC_1163. Serina palmitoiltransferasa (SPT) CC_1162 usa acil-AcpR CC_1163 como sustrato tioéster preferido, junto con L-serina para formar el precursor de esfingolípidos, 3-oxo-esfinganina. Acil-CoA formado mediante la instalación de un ácido graso a CoA por la acil-CoA sintetasa FadD, puede ser utilizado como sustrato tioéster no preferido por la SPT CC_1162. El grupo acilo mostrado aquí es palmitato (C16:0).

5.4 Diferencias en las cavidades de unión al sustrato acil-tioéster entre las SPTs de Rhodobacterias y no-Rhodobacterias

Un análisis de las estructuras 3D reportadas de los homodímeros de la SPT de *Sphingomonas wittichii* (Rhodobacteria) (PDB: 2X8U; 2.1 Å), y de la SPT de *Sphingobacterium multivorum* (no-Rhodobacteria) (PDB: 3A2B; 2.3 Å) muestra diferencias en sus cavidades hidrofóbicas; posiblemente involucradas en la unión del sustrato acil-tioéster (acil-AcpR para Rhodobacterias y acil-CoA para no-Rhodobacterias) (**Figura 22**). La cavidad del dímero SPT de *S. multivorum* parece estar formado de una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos (**Figura 22B**), comparado con el dímero SPT de *S. wittichii* (**Figura 22A**). Sin embargo, diversos residuos (Y27, F28, F83, R146, F149, P353, y P357) de la SPT de *S. multivorum*, que no están presentes en la SPT de *S. wittichii*, están localizados en la cavidad hidrofóbica y podrían suponer un impedimento estérico para la unión de sustratos acil-tioésteres más grandes que acil-CoA, como acil-ACP (**Figura 22A**). En contraste, solo algunos residuos (Y143, P270, y W344) de la SPT de *S. wittichii*, que no están presentes en la SPT de *S. multivorum*, están localizados en la hendidura hidrofóbica (**Figura 22B**).

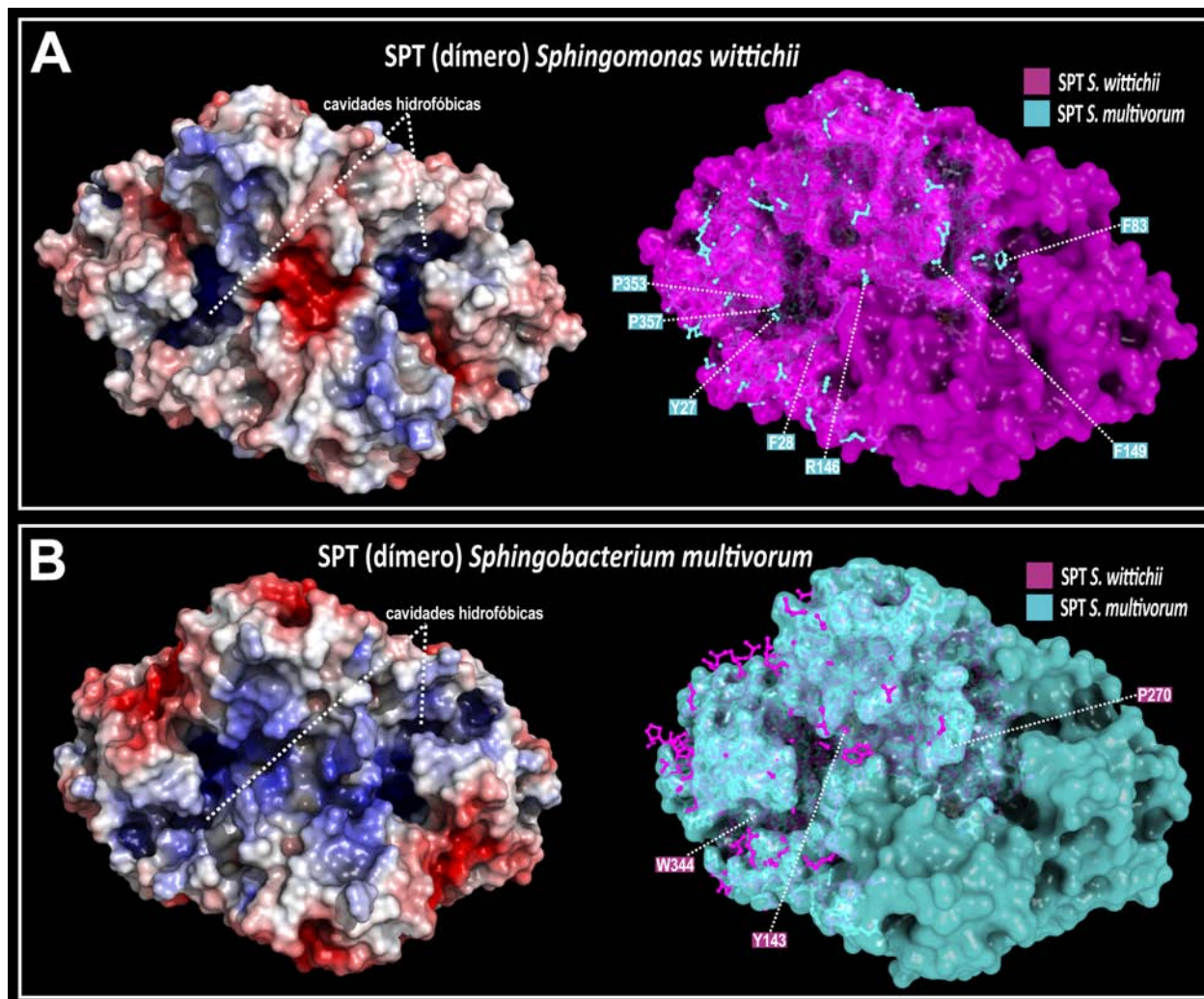


Figura 22. Estructuras de superficie de los dímeros de SPTs de *S. wittichii* y *S. multivorum* mostrando cavidades potenciales para la unión de los sustratos acil-tioésteres. Estructuras 3D de los homodímeros de la SPT de *Spingomonas wittichii* (Rhodobacteria) (PDB: 2X8U; 2.1 Å) (**A**), y de la SPT de *Spingobacterium multivorum* (no-Rhodobacteria) (PDB: 3A2B; 2.3 Å) (**B**), mostrando las cavidades hidrofóbicas potenciales para la unión de los sustratos acil-tioésteres. En (**A**) y (**B**), del lado izquierdo se muestra las hendiduras electropositivas (azul) en los sitios activos. La visualización de superficie electrostática está mostrada de -5 kT/e (rojo) a $+5$ kT/e (azul). En (**A**) y (**B**), del lado derecho, la estructura de superficie de la SPT de *S. wittichii* está mostrada en magenta y de la SPT de *S. multivorum* está mostrada en cian. Residuos sobresalientes están mostrados en forma balls & sticks y coloreados acorde con la estructura de la SPT correspondiente. Aquellos residuos conservados diferencialmente en todas o la mayoría de las SPTs de Rhodobacterias (magenta) o no Rhodobacterias (cian), y que posiblemente estén involucrados en la especificidad para la unión de los diferentes sustratos acil-tioésteres, están señalados.

Un alineamiento de diversas SPTs de Rhodobacterias y no-Rhodobacterias muestra que estos residuos diferenciales localizados en las cavidades hidrofóbicas están conservados en todas o la mayoría de cada tipo de SPT (**Figura 23**). Además, existen otros residuos diferenciales conservados en todas o la mayoría de SPTs de cada tipo, pero estos localizan en partes exteriores a la cavidad hidrofóbica (**Figura 23**).



Figura 23. Alineamiento de secuencias de SPTs de Rhodobacterias y no-Rhodobacterias indicando residuos posiblemente clave para su especificidad. Las secuencias de amino ácidos de las distintas SPTs de Rhodobacterias (magenta) o no-Rhodobacterias (cian) fueron alineadas usando el programa CLUSTAL OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y coloreadas usando Jalview (Waterhouse et al., 2009). La estructura secundaria fue obtenida utilizando el programa ESPript (<https://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>). Elementos estructurales secundarios (basado en la estructura de la SPT de *S. wittichii*) están mostrados en la parte superior del alineamiento y los números de posición correspondientes están indicados. Residuos con propiedades fisicoquímicas similares están mostrados en colores iguales. Residuos conservados localizados en las cavidades hidrofóbicas y posiblemente involucrados en la especificidad para la unión de los diferentes sustratos acil-tioésteres, están señalados con círculos, y otros residuos conservados localizados fuera de las cavidades hidrofóbicas están señalados con asteriscos (magenta para Rhodobacterias [por encima del alineamiento] y cian para no-Rhodobacterias [por debajo del alineamiento]).

Una comparación del modelo 3D de la estructura del monómero SPT de *C. crescentus* (Rhodobacteria) obtenido con i-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), con la estructura 3D reportada del monómero SPT de *S. multivorum* (no-Rhodobacteria) (PDB: 3A2B; 2.3 Å), muestra en la SPT de *C. crescentus* una cavidad hidrofóbica de mayor tamaño comparada con la de la SPT de *S. multivorum* (**Figura 24**). La cavidad hidrofóbica en la SPT de *S. multivorum* (**Figura 24B**) contiene una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos que la SPT de *C. crescentus* (**Figura 24A**). Sin embargo, la hendidura para el sitio de unión del sustrato acil-tioéster (cerca del cofactor PLP) parece ser más grande en la SPT de *C. crescentus* que en la SPT de *S. multivorum*.

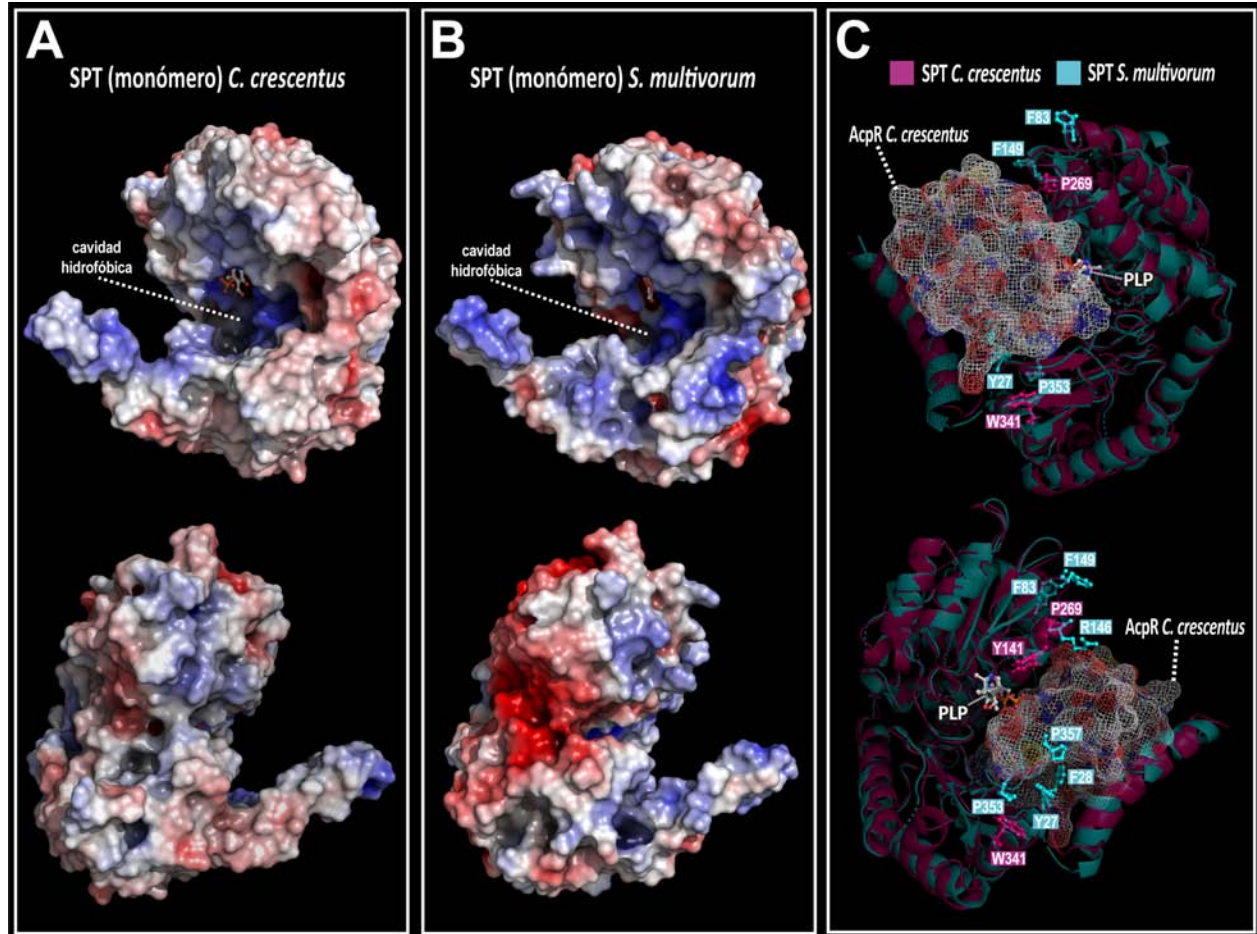


Figura 24. Estructuras de los monómeros de SPTs de *C. crescentus* y *S. multivorum* mostrando cavidad potencial para la unión del sustrato acil-tioéster. Estructuras 3D de los monómeros de la SPT de *C. crescentus* (**A**), y de *S. multivorum* (**B**), mostrando la cavidad hidrofóbica potencial para la unión del sustrato acil-tioéster. Se muestran las hendiduras electropositivas (azul) en los sitios activos. La visualización de superficie electrostática está mostrada de -5 kT/e (rojo) a $+5$ kT/e (azul). (**C**) Alineamiento de los monómeros de la SPT de *C. crescentus* (en magenta) y la SPT de *S. multivorum* (en cian), mostrados en representación ribbon. El modelo de la estructura 3D de la AcpR de *C. crescentus* fue acoplado usando Cluspro, con el modelo 3D de la SPT de *C. crescentus*. La superficie de la AcpR de *C. crescentus* está mostrada en representación de malla y coloreada por átomo. Residuos localizados en las cavidades hidrofóbicas de las SPTs, y posiblemente involucrados en la especificidad para la unión de los diferentes sustratos acil-tioésteres, están mostrados en forma balls & sticks y coloreados acorde con la estructura de la SPT correspondiente. El cofactor PLP está mostrado en forma balls & sticks y coloreado por átomo. En (**A**), (**B**) y (**C**), se muestra la vista lateral derecha (arriba) e izquierda (abajo) de cada monómero de SPT.

Después de realizar un acoplamiento molecular, utilizando ClusPro (Desta et al. 2012), de la estructura 3D de la AcpR de *C. crescentus* contra la estructura 3D del monómero SPT de *C. crescentus*, y alinear las estructuras de la SPT de *C. crescentus* y la SPT de *S. multivorum*, se observó la interacción entre la AcpR y las distintas SPTs (**Figura 24C**). El sitio de unión de la AcpR se observó localizado en la cavidad hidrofóbica predicha, interaccionando con el cofactor PLP (**Figura 24C**). Por un lado, los residuos Y141, P269, y W341 (análogos a los residuos Y143, P270, y W344 de la SPT de *S. wittichii*) de la SPT de *C. crescentus*, conservados en todas o la mayoría de SPTs de Rhodobacterias (**Figura 23**), quedan localizados de tal forma que proporcionan suficiente espacio para la unión de la AcpR a la cavidad hidrofóbica en la SPT de *C. crescentus* (**Figura 24C**). Por otro lado, los residuos (Y27, F28, F83, R146, F149, P353, y P357) de la SPT de *S. multivorum*, conservados en todas o la mayoría de SPTs de no-Rhodobacterias (**Figura 23**), parecen interaccionar estrechamente con la AcpR, y dado que varios de ellos contienen cadenas aromáticas de gran tamaño, podrían suponer un impedimento estérico para la unión de la AcpR a SPTs de no-Rhodobacterias (**Figura 24C**). En el presente trabajo (**Figura 8 en artículo publicado**), se demostró que las SPTs de las Rhodobacterias *C. crescentus*, *S. wittichii* y *E. coli* BL21(DE3), son capaces de utilizar como sustrato tioéster preferido acil-AcpR sobre acil-CoA. Por lo tanto, la ausencia de estos residuos aromáticos de gran tamaño localizados en la cavidad hidrofóbica, la cual es posiblemente el sitio de unión para el sustrato acil-tioéster, de las SPTs de Rhodobacterias podría sugerir un mecanismo mediante el cual este tipo de SPTs son capaces de unir sustratos acil-tioésteres más grandes que acil-CoAs, como acil-ACPs. Sin embargo, una estructura cristalográfica del complejo de interacción acil-ACP con SPT aún no está reportada, y será objetivo de estudios futuros.

5.5 *In vitro*, la AasR de *C. crescentus* acila selectivamente la AcpR de *C. crescentus* y la Aas de *V. harveyi* es capaz de acilar ambas AcpP de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3).

Con el fin de caracterizar más a detalle la capacidad *in vitro* de la AasR_{Cc} y AasV_h para acilar distintas ACPs, se realizaron ensayos enzimáticos. Cada enzima purificada (AasR_{Cc}, AasV_h) se incubó con cada una de las diferentes ACPs (AcpR_{Cc}, AcpP_{Cc}, AcpR_{Ec}, AcpP_{Ec}), ATP, y [³H]palmitato, y a diferentes tiempos, se analizó la radiactividad unida a las proteínas (**Figura 25**). A partir de la formación de los productos acil-ACPs, es evidente que la AasR_{Cc} causó un incremento en la cantidad de acil-AcpR_{Cc} mientras que no se formaron acil-ACPs cuando se utilizaron las demás ACPs como sustratos (**Figura 25A**). Por otro lado, AasV_h provocó un incremento de las dos acil-AcpPs, tanto acil-AcpP_{Cc} como acil-AcpP_{Ec}, pero de ninguna acil-AcpR (**Figura 25B**). Además, parece existir diferencia de especificidad entre la AasR_{Cc} y la AasR_{Ec} con respecto a su capacidad para acilar distintas ACPs. Mediante el análisis de la producción *in vivo* de 3-oxo-esfinganina, al combinar la coexpresión de AcpRs junto con SPTs y las AasRs de *C. crescentus* y *E. coli*, la AasR_{Cc} es capaz de acilar tanto la AcpR de *C. crescentus* (AcpR_{Cc}) como de *E. coli* (AcpR_{Ec}), y la AasR_{Ec} solamente puede acilar la AcpR_{Ec} pero no la AcpR_{Cc} (**Figura 7 en el artículo publicado**). Por otro lado, *in vitro*, la AasR_{Cc} solamente es capaz de acilar la AcpR_{Cc} pero no la AcpP de *C. crescentus* (AcpP_{Cc}). A su vez, la Aas de *V. harveyi* (AasV_h) solamente es capaz de acilar la AcpP_{Cc}, pero no la AcpR_{Cc} (**Figura 3 en el artículo publicado**). Estos resultados muestran que, *in vitro*, la habilidad de la Aas de *V. harveyi* parece residir más en la acilación de AcpPs constitutivas con funciones housekeeping, posiblemente utilizadas como sustratos tioéster en la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos membranales. En cambio, la AasR de *C. crescentus* parece acilar, al menos *in vitro*, selectivamente su AcpR propia, lo cual indica una mayor

especificidad de este tipo de acil-ACP sintetasas sobre sustratos, cuyos productos acilados serán utilizados por SPTs para la biosíntesis de esfingolípidos.

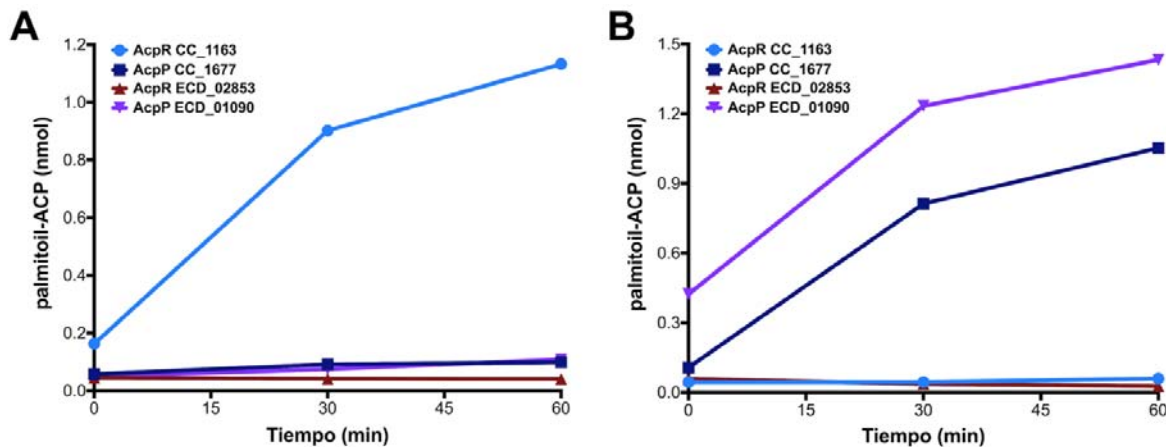


Figura 25. Actividades enzimáticas de acil-ACP sintetasas: AasR de *C. crescentus* y Aas de *V. harveyi*. [³H]Palmitato incorporado en los productos acil-tioésteres: palmitoil-AcpR CC_1163, palmitoil-AcpP CC_1677, palmitoil-AcpR ECD_02853, palmitoil-AcpP ECD_01090, por la AasR CC_1165 de *C. crescentus* (AasR_{Cc}) (A) o la Aas de *V. harveyi* (Aas_{Vh}) (B). Las reacciones fueron realizadas como se describe en ‘Materials and Methods’ en el artículo publicado. En cada ensayo, se utilizó 1 mM de Tritón, 100 μM de cada sustrato tiol (ACP) y diferentes concentraciones de cada enzima (30 nM de AasR_{Cc}, o 100 nM de Aas_{Vh}).

5.6 Tres versiones diferentes de la AasR de *E. coli* BL21(DE3) son capaces de acilar la AcpR de *E. coli* BL21(DE3).

El ORF ECD_02851 correspondiente al gen *aasR* de *E. coli* BL21(DE3) está asignado a comenzar en un codón de inicio no canónico (GTG; M1) (**Figura 26**). Sin embargo, río abajo de M1 se encuentran dos codones de inicio canónicos ATG (M4 y M15), que podrían ser el sitio de inicio real del ORF codificante para la AasR de *E. coli*. Con el propósito de analizar la funcionalidad de esta enzima, se generaron 3 versiones de esta proteína comenzando con cada uno de estos 3 inicios posibles de la traducción (M1, M4, o M15) (**Figura 26A**). Posteriormente, se analizaron los perfiles lipídicos de cepas de *E. coli* que coexpresan cada una de estas 3 versiones de la AasR (AasR_{Ec}) de *E. coli*, junto con tanto la AcpR (AcpR_{Ec}) como la SPT (SPT_{Ec}) de *E. coli* (**Figura 26B**). Si la combinación de AcpR_{Ec} y SPT_{Ec}, o genes AasR_{Ec} individuales, son expresados, los perfiles lipídicos son similares a los obtenidos con una cepa de *E. coli* que tiene los plásmidos vacíos pCDFDuet-1 y pET17b (PV) (**Figura 26B**). Por otro lado, cuando cada una de las 3 versiones de AasR_{Ec} (1, 2, 3) se coexpresa con AcpR_{Ec} y SPT_{Ec}, se observa la abundante formación de 3-oxo-esfingánina (**Figura 26B**). Esto indica que las 3 versiones de AasR_{Ec} son funcionales, y que el producto AcpR_{Ec} acilado sirve como excelente sustrato para la SPT_{Ec}.

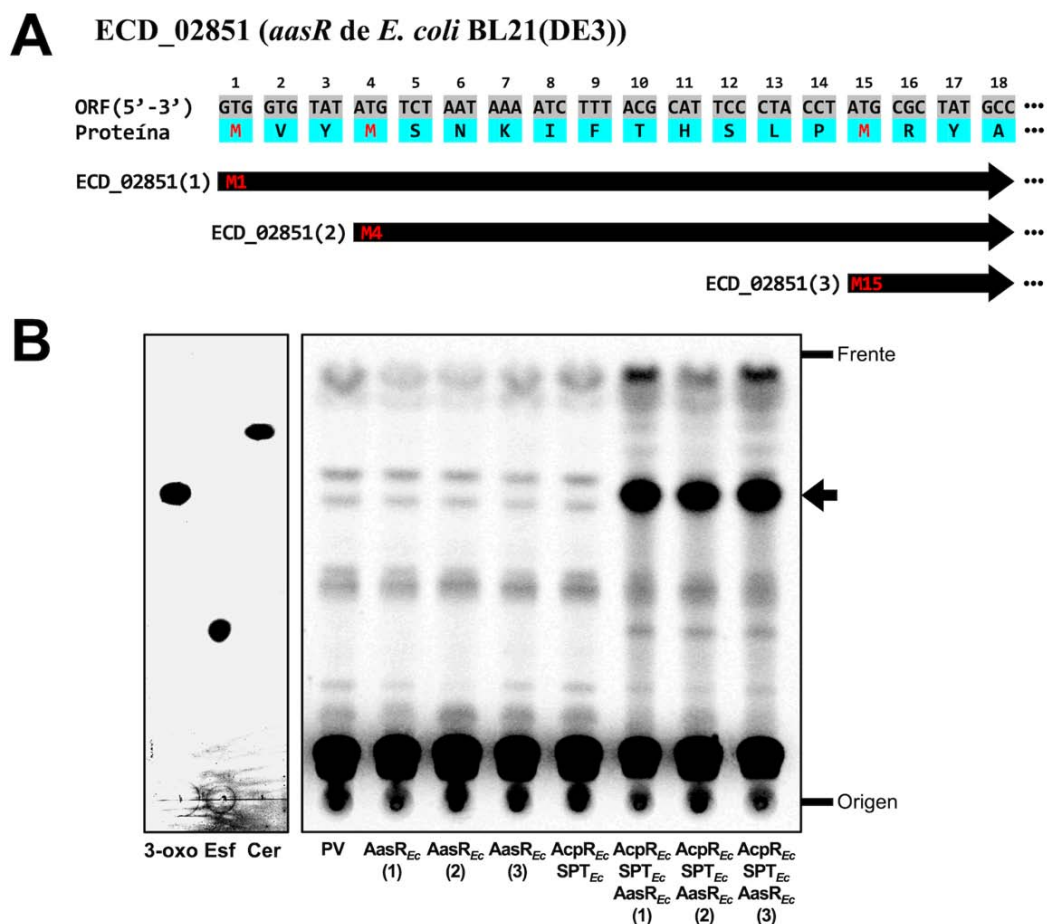


Figura 26. Funcionalidad de las 3 distintas versiones de la AasR de *E. coli* para la formación *in vivo* de 3-oxo-esfingarina. Análisis funcional de 3 versiones diferentes de la AasR_{Ec} (ECD_02851) de *E. coli* BL21(DE3), tomando distintos posibles codones de inicio (M1, M4 y M15) del ORF (A). Expresión de los genes estructurales para AcpR_{Ec} y SPT_{Ec} de *E. coli* BL21(DE3) junto una de 3 versiones distintas de la AasR_{Ec} en *E. coli* provoca la formación de 3-oxo-esfingarina (B). El marcaje de lípidos con [¹⁴C]acetato como se describe en ‘Materials and Methods’ en el artículo publicado. Cepas de *E. coli* BL21(DE3) x pLysS conteniendo los siguientes plásmidos: plásmidos vacíos pCDFDuet-1 y pET17b (PV), pJPG17 (AasR_{Ec} [1]), pJPG18 (AasR_{Ec} [2]), pJPG19 (AasR_{Ec} [3]), pJPG20 y pET17b (AcpR_{Ec} SPT_{Ec}), pJPG20 y pJPG17 (AcpR_{Ec} SPT_{Ec} AasR_{Ec} [1]), pJPG20 y pJPG18 (AcpR_{Ec} SPT_{Ec} AasR_{Ec} [2]), y pJPG20 y pJPG19 (AcpR_{Ec} SPT_{Ec} AasR_{Ec} [3]). La flecha indica un compuesto migrando como 3-oxo-esfingarina. Los compuestos de referencia 3-oxo-esfingarina (3-oxo), esfingarina (Esf), y *N*-palmitoil-D-esfingosina (Cer) fueron desarrollados en la misma TLC y visualizados por tinción con yodo. Las 3 versiones distintas de la *aasR* ECD_02851 de *E. coli* BL21(DE3) (*aasR*_{Ec}) fueron amplificadas de ADN genómico de *E. coli* BL21(DE3) utilizando diferentes oligonucleótidos (Tabla 1) y clonados en pET17b con distintas enzimas de restricción (Tabla 2).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *aasR* ECD_02851. Los sitios reconocidos por enzimas de restricción están subrayados.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
oLOP440	ACTGCATATGGTGTATATGTCTAATAAAAATC
oLOP441	ACTGCATATGTCTAATAAAAATCTTTACGCATTC
oLOP442	ACTGCATATGCGCTATGCCGATTTTCC
oLOP443	ACTGCTCGAGTCATGCCAGGGATTCC

Tabla 2. Construcción de los plásmidos de expresión de AasR ECD_02821.

Plásmido	Versión <i>aasR_{Ec}</i>	Oligonucleótidos	Enzimas de restricción	Clonado en plásmido digerido con ()
pJPG17	ECD_02851 (1)	oLOP440/oLOP443	<i>NdeI/XhoI</i>	pET17b (<i>NdeI/XhoI</i>)
pJPG18	ECD_02851 (2)	oLOP441/oLOP443	<i>NdeI/XhoI</i>	pET17b (<i>NdeI/XhoI</i>)
pJPG19	ECD_02851 (3)	oLOP442/oLOP443	<i>NdeI/XhoI</i>	pET17b (<i>NdeI/XhoI</i>)

Un análisis estructural basado en estructuras secundarias, utilizando ESPript (Robert & Gouet, 2014), de AasRs de distintas *Rhodobacteria* y δ -*Proteobacteria*, muestra el alineamiento entre la AasR ECD_02851 de *E. coli* BL21(DE3) y las demás AasRs (**Figura 27**). Interesantemente, de los 3 inicios posibles (M1, M4, o M15) de la AasR de *E. coli* BL21(DE3), la M1 coincide con el inicio de la AasR de *S. wittichii* y *S. aurantiaca*, la M4 alinea cerca del inicio de la AasR de *C. crescentus*, y la M15 alinea cerca al inicio de la AasR de *S. cellulosum* (**Figura 27**). Sin embargo, el inicio de las AasR de *S. paucimobilis*, *Z. mobilis*, *G. oxydans*, *N. eutropha*, y *M. xanthus* se posiciona antes, con respecto al inicio predicho (M1) de la AasR de *E. coli* BL21(DE3). En el artículo publicado se utilizó la versión 1 (comenzando en el codón GTG; M1) del ORF ECD_02851 AasR de *E. coli* BL21(DE3). La posición real del inicio de la transcripción del gen *aasR* de *E. coli* podría ser identificada mediante análisis de extensión de oligonucleótidos a partir del mRNA del ORF ECD_02851. Por otra parte, análisis de acoplamiento molecular similar a la (**Figura 19**), de la versión 3 (mas corta) de la AasR de *E. coli* BL21(DE3) muestra una interacción similar con las distintas ACPs (datos no mostrados).

5.7 El contexto genómico del par AcpR-AasR en δ -proteobacterias es diferente que en *Rhodobacterias*.

A diferencia de *Rhodobacterias*, como *Caulobacter crescentus*, donde el gen *acpR* se encuentra siempre adyacente al gen *spt*, en δ -proteobacterias con genomas grandes el gen *acpR* se encuentra adyacente al gen *aasR* y en un contexto genómico diferente al gen *spt* (**Figura 28**). Aunque en las δ -proteobacterias *Myxococcus xanthus* y *Stigmatella aurantiaca* el gen *spt* se encuentra en la misma vecindad génica que los genes para las posibles reductasa (*red*) y acil-CoA *N*-acil transferasa (*aca*), implicados en la biosíntesis de dihidroceramida, en *Sorangium cellulosum* el gen *spt* está incluso separado de *red* y *aca*. No obstante, el par *acpR-aasR* está siempre conservado y en una vecindad genómica similar en todas ellas (**Figura 28**). Esto sugiere que, posiblemente la relación entre estas ACPs y las acil-ACP sintetasas encargadas de acilarlas específicamente ya existía en un punto más temprano en la evolución. Posiblemente, el producto acil-ACP de estos dos genes era utilizado en alguna vía biosintética distinta, y con el paso de tiempo, este se vinculó con SPTs y la biosíntesis de esfingolípidos.

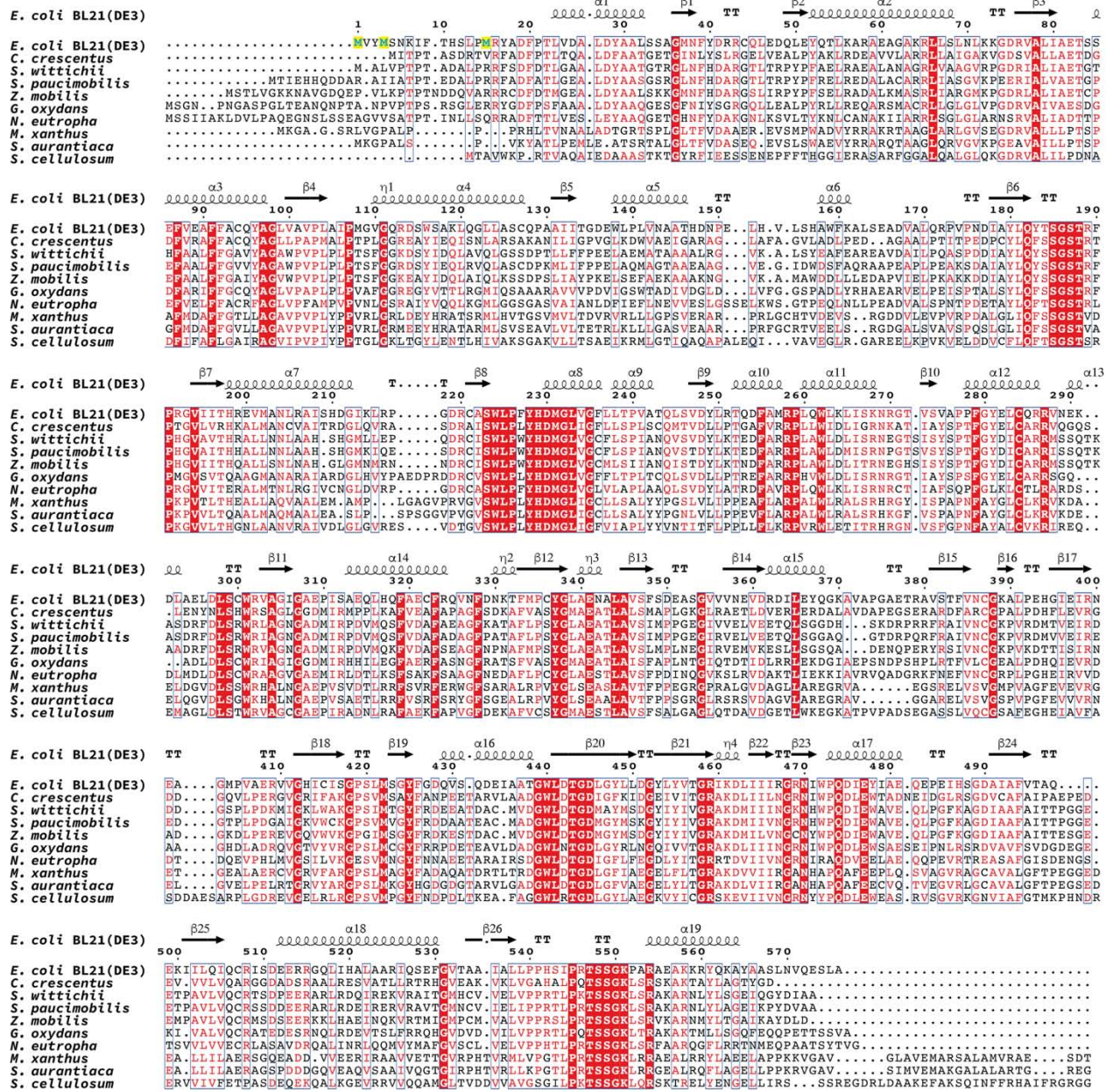


Figura 27. Alineamiento múltiple de secuencias entre AasR especializadas para biosíntesis de esfingolípidos. Secuencias de amino ácidos de distintas AasRs de *Rhodobacteria* y δ -*Proteobacteria* fueron alineadas usando el programa CLUSTAL OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y la estructura secundaria fue obtenida utilizando el programa ESPrpt (<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/index.php>). Elementos estructurales secundarios (basado en la estructura de la AasR de *E. coli* BL21(DE3)) están mostrados en la parte superior del alineamiento y los números de posición correspondientes están indicados. Residuos conservados están mostrados en rojo y los tres posibles codones de inicio (M1, M4 y M15) del ORF ECD_02851 (*aasR* de *E. coli* BL21(DE3)) están mostrados en letras azules con fondo amarillo.

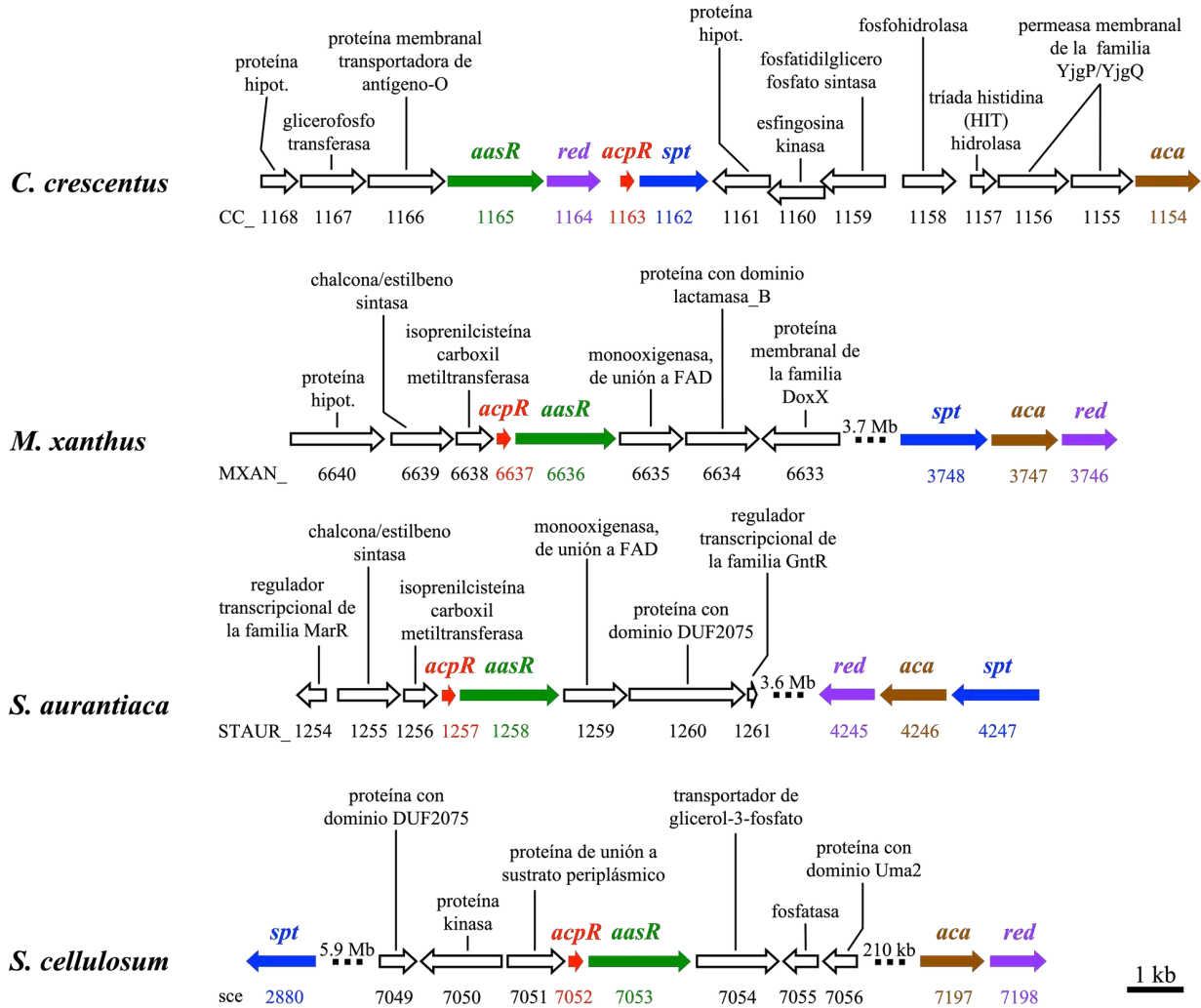


Figura 28. Contexto genómico del par *acpR-aasR* para biosíntesis de esfingolípidos en *C. crescentus* y en δ -proteobacterias. Se muestran las vecindades génicas del par de genes *acpR-aasR* posiblemente implicados en la biosíntesis de esfingolípidos de las δ -proteobacterias: *Myxococcus xanthus* DK 1622, *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, y *Sorangium cellulosum* So ce56, comparadas con la de la α -proteobacteria (*Rhodobacteria*) *Caulobacter crescentus* CB15. Estos dos genes (*acpR*: proteína acarreadora de grupos acilo especializada (en rojo); y *aasR*: acil-ACP sintetasa especializada (en verde)) junto con *spt*: serina palmitoiltransferasa (en azul), son requeridos para la biosíntesis del precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina. Además, dos genes (*red*: predicha reductasa/epimerasa (en lila); y *aca*: acil-CoA *N*-aciltransferasa (en café)) son requeridos para la síntesis de dihidroceramida. Distancias genómicas grandes están indicadas con barras interrumpidas y se indica la distancia respectiva.

5.8 Otros posibles pares ACP-Aas son encontrados en δ -proteobacterias y en *S. meliloti* 1021.

En la rhizobia *Sinorhizobium meliloti* 1021 existen seis ACPs conocidas: AcpP (López-Lara & Geiger, 2000; Platt et al., 1990), NodF (Ritsema et al., 1998), AcpXL (Brozek et al., 1996), RkpF (Geiger & López-Lara, 2002), SMc01553 (Dávila-Martínez et al., 2010) y SMb20651 (Ramos-Vega et al., 2009). El gen *acp* SMb20651 está localizado en el plásmido simbiótico pSymB, formando parte de un posible operón de cuatro genes (Ramos-Vega et al., 2009). Además

de la ACP, estos genes del operón codifican para putativas acil-CoA ligasa (CoA-lig; SMb20651), asparagina sintetasa (AsnB; SMb20652), y sintetasa de NAD⁺ dependiente de amonio (NadE; SMb2049) (**Figura 29**). SMb20650 es una predicha acil-CoA ligasa (FadD), que ligaría ácidos grasos a CoA, cuyo gen es cotranscrito con el gen para la ACP SMb20651 de *S. meliloti* (Ramos-Vega et al., 2009). Sin embargo, cuando estos dos genes son expresados junto con la holo-ACP sintasa (AcpS) de *S. meliloti*, posibles formas aciladas, con ácidos grasos de cadena larga (C12:0 y C18:0), de la ACP SMb20651 son encontradas (Ramos-Vega et al., 2009). Esto sugiere que SMb20650 podría ser en realidad una acil-ACP sintetasa (Aas).

Interesantemente, este operón conteniendo estos mismos genes también está presente en algunas δ -proteobacterias como *Geobacter* y *Sorangium cellulosum* y sus vecindades genómicas parecen ser similares (**Figura 29**). Además, en *S. cellulosum*, dos genes, *pyrR* y *pyrB*, implicados posiblemente en el metabolismo de pirimidina, son encontrados. Notablemente, en todas ellas, el par *acp-aas* parece estar conservado, sugiriendo una posible relación biosintética entre sus proteínas codificadas. Posiblemente estas putativas acil-CoA ligasas sean en realidad Aas encargadas de acilar, tal vez selectivamente, la ACP adyacente a ellas. A su vez, estas acil-ACPs serían utilizadas en vías biosintéticas de asparagina, o pirimidinas, u otras. Cabe mencionar que estas posibles ACP y Aas de *S. cellulosum* son distintas a sus posibles AcpR y AasR (**Figura 28**), indicando que distintos pares ACP-Aas son requeridos para distintas vías biosintéticas.

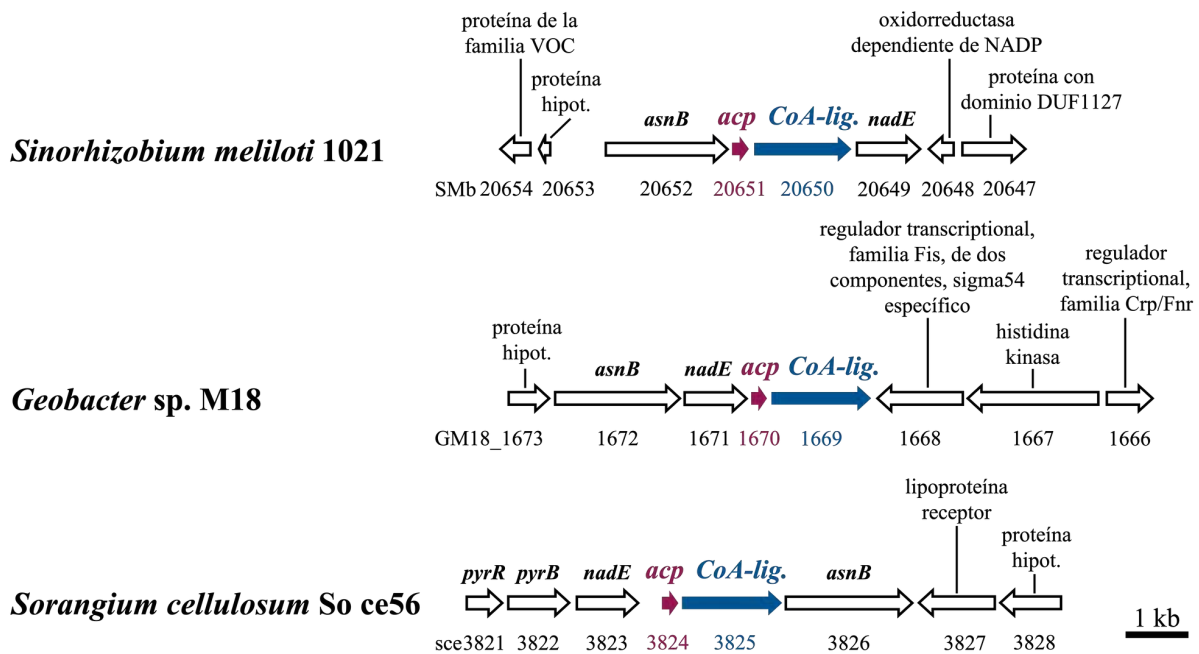


Figura 29. Vecindad genómica de posibles pares *acp-aas* en *S. meliloti* y δ -proteobacterias. Se muestran las vecindades génicas de posibles pares génicos *acp-aas* en las δ -proteobacterias *Geobacter* sp. M18 y *Sorangium cellulosum* So ce56, comparadas con la de la rizobia *Sinorhizobium meliloti* 1021. Nomenclatura de los genes: proteína acarreadora de grupos acilo (*acp*), acil-CoA ligasa (*CoA-lig*), asparagina sintetasa (*asnB*), sintetasa de NAD⁺ dependiente de amonio (*nadE*), uracil fosforribosiltransferasa (*pyrR*), y aspartato carbamoiltransferasa (*pyrB*).

6 DISCUSIÓN

6.1 La capacidad de sintetizar esfingolípidos está ampliamente distribuida en bacterias

Inicialmente, la existencia de esfingolípidos se pensaba única en bacterias de los grupos *Sphingomonadaceae* y CFB (*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*) (Olsen & Jantzen, 2001), y genes codificantes para serina palmitoiltransferasa (SPT), que cataliza el primer paso en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos, habían sido identificados y estudiados sólo en un puñado de estas (Harrison et al., 2018). Sin embargo, la capacidad de sintetizar esfingolípidos parecía estar distribuida en un mayor número de bacterias que las reportadas previamente (Geiger et al., 2019).

En un estudio sobre la biosíntesis de esfingolípidos en *C. crescentus*, se logró determinar funcionalmente la SPT (Stankeviciute et al., 2019). Posteriormente, la SPT y otros cuatro genes codificantes para putativas proteína acarreadora de grupos acilo (ACP), acil-ACP sintetasa (Aas), 3-oxo-esfinganina reductasa (RED) y acil-CoA *N*-aciltransferasa (ACA) fueron demostrados requeridos para sintetizar el esfingolípido dihidroceramida y una vía biosintética fue propuesta (Olea-Ozuna et al., 2021) (**Figura 5**). Luego, una vía alternativa, difiriendo en el orden y la actividad enzimática de los últimos dos pasos fue reportada (Stankeviciute et al., 2022). En esta vía, la ceramida sintasa bacteriana (bCerS) de *C. crescentus*, añade un ácido graso directamente a 3-oxo-esfinganina, utilizando acil-CoA como donador, generando ceramida oxidada (oxiceramida). Después, la ceramida reductasa (CerR) de *C. crescentus*, reduce la oxiceramida generando dihidroceramida (Stankeviciute et al., 2022) (**Figura 5**).

Debido a que bCerS añadiría un ácido graso directamente a 3-oxo-esfinganina formando oxiceramida, el intermediario esfinganina no debería ser encontrado en *C. crescentus* (Stankeviciute et al., 2022). Sin embargo, un compuesto de masa 302.30534 ($C_{18}H_{40}NO_2$) correspondiente a esfinganina (C18:0) fue identificado en *C. crescentus* (Olea-Ozuna et al., 2021). Asimismo, en otras bacterias como *Bacteroides thetaiotaomicron*, distintas estructuras de esfinganina han sido encontradas (Brown et al., 2019) y recientemente el gen estructural (BT_0972) responsable de esta actividad de 3-oxo-esfinganina reductasa ha sido identificado (Lee et al., 2022). El posible homólogo a BT_0972 en *C. crescentus* es CC_2966, y ensayos enzimáticos para demostrar la actividad de esta enzima, así como de las predichas reductasa/epimerasa (CC_1164) y acil-CoA *N*-aciltransferasa (CC_1154) de *C. crescentus* son necesarios para validar la secuencia de reacciones de los últimos dos pasos de la síntesis de dihidroceramida en bacterias.

Mientras que el paso catalizado por la SPT está conservado en bacterias y eucariotas, bCerS y CerR sólo han sido encontrados en bacterias. Esto sugiere que la síntesis de ceramida en bacterias evolucionó convergentemente e independientemente de la vía eucariota. Los homólogos eucariotas más cercanos a la CerR es la subunidad 9 del subcomplejo NADH dehidrogenasa 1A (NDUF9A), que es un componente del Complejo I de la vía de fosforilación oxidativa mitocondrial. Por otro lado, bCerS es parte de una gran familia de *N*-aciltransferasas relacionadas a Gcn5 (GNAT), que están relacionadas cercanamente con las aciltransferasas Gcn5 eucariotas (Stankeviciute et al., 2022).

Los genes *spt*, *bcerS*, y *cerR* son generalmente encontrados en operón en distintos clados de bacterias Gram-negativas que incluyen *Proteobacterias* (α , β , γ , y δ), y otros clados como *Balneolia*, *Calditrichae*, *Chitinophagia*, *Chlorobia*, *Cytophagia*, *Ignavibacteria*, *Nitrospira*,

Oligoflexia, *Rubrobacteria*, *Sphingobacteria*, y *Thermoanaerobaculia* (Stankeviciute et al., 2022). Sin embargo, en *Bacteroides*, estos tres genes son comúnmente encontrados esparcidos por el genoma, lo cual es consistente con el alto grado de plasticidad cromosomal y rearreglos cromosómicos asociados con estos organismos. No obstante, en algunos *Bacteroides* como *Sphingobacterium multivorum*, estos genes son encontrados juntos (**Figura 4**). Remarcablemente, homólogos de estos tres genes fueron encontrados en varias bacterias Gram-positivas, particularmente en Actinobacterias de los géneros *Streptomyces*, *Nonomuraea*, y *Kitasatospora* (Stankeviciute et al., 2022). Análisis filogenéticos de estos tres genes en Actinobacterias reveló que estos agrupan junto a los homólogos de δ -Proteobacterias como *Myxococcus* y *Stigmatella*, sugiriendo que las Actinobacterias adquirieron estos genes mediante transferencia horizontal de las δ -Proteobacterias (Stankeviciute et al., 2022).

6.2 Acil-AcpRs como sustrato novedoso de las serina palmitoiltransferasas (SPT) de *Rhodobacteria*

Interesantemente, en un subgrupo de bacterias llamadas *Rhodobacteria*, que incluye α , β , y γ -Proteobacterias, el gen *spt* se encuentra siempre adyacente y formando un operón con un gen *acp* codificante para una ACP, diferente a la ACP constitutiva (AcpP) que las bacterias utilizan normalmente para biosíntesis de ácidos grasos y fosfoglicerolípidos. Esta interesante relación entre una ACP y la biosíntesis de esfingolípidos había sido notada tanto en la α -proteobacteria *Caulobacter crescentus* (Geiger et al., 2010; Raman et al., 2010) como en la γ -proteobacteria *Escherichia coli* (Geiger et al., 2019), y su implicación en la vía de biosíntesis de esfingolípidos en *C. crescentus* había sido propuesta (Olea-Ozuna et al., 2021; Stankeviciute et al., 2022). No obstante, este vínculo entre la SPT y la predicha ACP no había sido demostrado.

En el presente trabajo, se demostró que las putativas ACPs de *C. crescentus* y *E. coli* son realmente ACPs, ya que ambas incorporaron β -[³H]alanina, revelando que contienen el grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PPT) característico de las ACPs. Además, su capacidad de ser aciladas por distintas acil-ACP sintetasas (Aas) fue determinada por modificación covalente con [³H]palmitato y por espectrometría de masas. Asimismo, se logró determinar que estas ACP son selectivamente aciladas por Aas especializadas, y ya que ambas participarían en la biosíntesis de esfingolípidos en *Rhodobacteria*, se nombraron AcpR y AasR, respectivamente. Las AasR de *C. crescentus* y *E. coli* mostraron grados de especificidad distintos; sin embargo, en ambas, el par AcpR-AasR de la misma bacteria fue requerido para la síntesis *in vivo* eficiente del precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina (Padilla-Gómez et al., 2022).

Por otro lado, análisis de la formación *in vivo* de 3-oxo-esfinganina, al co-expresar el par AcpR-AasR de *C. crescentus*, junto con las SPTs ya reportadas de *C. crescentus* y *Sphingomonas wittichii*, permitió demostrar que la predicha SPT de *E. coli* BL21(DE3) es en realidad una SPT. Además, este fue el primer indicio de que una acil-ACP estaba siendo utilizada como sustrato de estas tres SPTs. Por otra parte, también se determinó que las SPT de *C. crescentus* y *E. coli* tenían una especificidad laxa sobre la AcpR que pueden ocupar como sustrato acil-tioéster. Sin embargo, el sistema tripartito AcpR-AasR-SPT de la misma bacteria fue requerido para la formación eficiente de 3-oxo-esfinganina (Padilla-Gómez et al., 2022).

Se demostró que las SPTs de distintas *Rhodobacteria* (*C. crescentus*, *E. coli*, y *S. wittichii*) no solo son capaces de usar acil-AcpR como sustrato tioéster, sino que además es su sustrato

preferido, sobre acil-AcpP e incluso sobre acil-CoA. Esto es de gran relevancia ya que, aunque se había mostrado que las SPTs de *S. paucimobilis* (Raman et al., 2009), *S. wittichii* (Raman et al., 2010), y *C. crescentus* (Stankeviciute et al., 2022) podían utilizar palmitoil-CoA como sustrato tioéster para la biosíntesis de 3-oxo-esfinganina, esto sugiere el sustrato preferencial de todas ellas podría ser su respectiva acil-AcpR. El hecho de que un sustrato no canónico, acil-ACP, pueda ser ocupado por las SPTs de *Rhodobacteria*, promueve la búsqueda no solo de AcpRs sino también de las AasRs encargadas de acilarlas, en otras bacterias. Por ejemplo, y sorprendentemente, notamos que en diversas δ -Proteobacterias, los genes *acpR* y *aasR*, se encuentran juntos y en un contexto genómico diferente a los genes *spt* y demás para biosíntesis de esfingolípidos. Esto sugiere que el producto, acil-AcpR, de estos dos genes, posiblemente era utilizado por estas bacterias en alguna vía biosintética diferente, y en algún momento de la evolución se vinculó con la SPT y la biosíntesis de esfingolípidos.

Por lo tanto, es importante concebir a este sistema tripartito AcpR-AasR-SPT de manera independiente, en el cual, diversos tipos de ACPs especializadas, junto con sus Aas encargadas de acilarlas selectivamente, estarían en estrecha relación. Nuestros análisis filogenéticos propios, soportan esta idea, y muestran además, que las AcpRs y Aas son distintas a otras ACPs o Aas, respectivamente. Además, otros pares de ACP-Aas aún sin caracterizar, han sido encontrados en los enormes genomas de algunas δ -Proteobacterias, así como también en la rizobia *Sinorhizobium melioli*. Esto indicaría el uso de distintas ACPs especializadas para distintos fines, como un tipo sistema de código de barras, en el que cada una estaría destinada a una vía biosintética particular, interaccionando de manera específica con enzimas selectas. Este tipo de especificidad solamente se puede lograr gracias a la naturaleza proteica de las ACPs, en la que la combinatoria de diversos aminoácidos, junto con sus modificaciones postraduccionales, es clave para generar una superficie de interacción diferente con cada enzima. Este mecanismo de evolución de vías metabólicas es logrado mediante la duplicación génica y la modificación de especificidad de sustratos para las distintas enzimas involucradas.

6.3 Funciones diversas de esfingolípidos en bacterias

La amplia diversidad de estructuras de esfingolípidos encontrados en bacterias, es un reflejo de las múltiples funciones de estos lípidos. Diferentes glicoesfingolípidos (GSLs) proveen integridad a la membrana externa de *Sphingomonas* (Kawasaki et al., 1994), además de permitirles evadir la respuesta inmune innata (Kinjo et al., 2008). En bacterias como *Acetobacter malorum* y *Zymomonas mobilis*, distintos esfingolípidos podrían estar implicados en la tolerancia a distintos tipos de estrés, como pH ácido o temperaturas altas (Ogawa et al., 2010) y a altas concentraciones de etanol (Tahara & Kawazu, 1994).

Algunos esfingolípidos, como dihidroceramida inositol, de *Bacteroides* que habitan el intestino de mamíferos, tienen un papel importante en mantener la simbiosis y homeostasis en el intestino (Brown et al., 2019). Además, han sido implicados en la interacción patógeno-huésped (Gräve et al., 2019). Por otra parte, funcionan como elementos estructurales de los polisacáridos capsulares de *Bacteroides* y *Mycobacteria* (Angala et al., 2018). La síntesis de esfingolípidos con inositol está ampliamente distribuida en *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella* y *Parabacteroides* spp.), uno de los fila mas abundantes en el intestino humano (Heaver et al., 2022).

Caulobacter crescentus se adapta a la limitación de fofato elongando su cuerpo celular y su prosteca, además de sintetizando el glicoesfingolípido hexosil-hexuronosil-ceramida (HexHexA-Cer o GSL-2) (Stankeviciute et al., 2019). Además, la ceramida le provee resistencia contra bacteriófagos (Stankeviciute et al., 2019), y está implicada en la supervivencia y resistencia a detergentes por *C. crescentus* (Olea-Ozuna et al., 2021).

El lipopolisacárido (LPS) es uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y uno de sus componentes, el lípido A, es esencial para la viabilidad (Whitfield & Trent, 2014). Debido a que *Sphingomonas* spp. producen glicoesfingolípidos aniónicos (GSLs) como reemplazo funcional del LPS en la membrana externa (Kawasaki et al., 1994), se hipotetizó que *Caulobacter* respondería a la ausencia de lípido A mediante la sobreproducción de GSLs. Sin embargo, no hubo sobreexpresión de las glicosiltransferasas Sgt1 y Sgt2 (de sphingolipid glycosyltransferases), encargadas de la síntesis del glicoesfingolípido Hex-HexA-Cer (Stankeviciute et al., 2019). En su lugar, dos esfingolípidos aniónicos: ceramida fosfoglicerato (CPG) y ceramida difosfoglicerato (CPG2) fueron producidos en ausencia de lípido A para garantizar la viabilidad de *Caulobacter* (Zik et al., 2022).

Los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) han sido demostrados capaces de matar bacterias Gram-negativas al interactuar con grupos cargados negativamente en la superficie expuesta del LPS. Los fosfatos en las posiciones 1 y 4' del lípido A son particularmente importantes para esta interacción, y muchas bacterias poseen mecanismos para modificarlos y reducir así la carga negativa y la susceptibilidad a CAMPs (Moffatt et al., 2019; Velkov et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que el lípido A de *Caulobacter* carece de grupos fosfatos, ya que están reemplazados por residuos de ácido galactopirranurónico (GalpA) (Smit et al., 2008), es altamente sensible al CAMP colistina. Notablemente, los responsables de esta susceptibilidad a colistina en *Caulobacter* podrían ser los esfingolípidos aniónicos CPG y CPG2 (Zik et al., 2022).

La identificación de nuevos tipos de esfingolípidos en bacterias, así como sus vías de biosíntesis y funciones diversas, es de enorme relevancia para lograr entender este tipo de lípidos, que aunque enigmáticos en un principio, el esfuerzo puesto en su estudio ha permitido conocerlos mejor.

7 CONCLUSIONES

1. Las putativas ACPs CC_1163 de *C. crescentus* y ECD_02853 de *E. coli* BL21(DE3) incorporaron β -[³H]alanina *in vivo*, lo que demuestra que contienen el grupo prostético 4'-fosfopanteteína característico de las ACPs.
2. Las ACPs CC_1163 y CC_1677 de *C. crescentus* fueron modificadas covalentemente con [³H]palmitato; específicamente por la predicha acil-CoA sintetasa (ACS; CC_1165) y la acil-ACP sintetasa (Aas) de *V. harveyi*, respectivamente.
3. La predicha ACS CC_1165 de *C. crescentus* es incapaz de acilar CoA ni AcpP, por lo que no es una ACS. Además, es capaz de acilar *in vitro* específicamente la AcpR CC_1163 de *C. crescentus*, lo que indica que en realidad es una acil-ACP sintetasa especializada (AasR).
4. *In vivo*, la AasR CC_1165 de *C. crescentus* es capaz de acilar la AcpR CC_1163 de *C. crescentus* y en menor medida la AcpR ECD_02853 de *E. coli* BL21(DE3).
5. *In vivo*, la AasR ECD_02851 de *C. crescentus* únicamente es capaz de acilar la AcpR ECD_02853 de *E. coli* BL21(DE3), y no la AcpR CC_1163 de *C. crescentus*.
6. La Aas de *V. harveyi* es capaz de acilar únicamente AcpPs, tanto la de *C. crescentus* (CC_1677) como la de *E. coli* (ECD_01090), y no puede acilar AcpR ni de *C. crescentus* ni de *E. coli*.
7. Las serina palmitoiltransferasas (SPTs) CC_1162 de *C. crescentus* y Swit_3900 de *S. wittichii* junto con la predicha SPT ECD_02854 de *E. coli* BL21(DE3) fueron capaces de sintetizar *in vivo* e *in vitro* el precursor de esfingolípidos 3-oxo-esfinganina, lo que indica que las tres son SPTs. El sustrato tioéster preferido de las tres SPTs es una acil-AcpR (CC_1163), sobre acil-CoA y acil-AcpP (CC_1677).
8. Tanto la SPT de *C. crescentus* como la de *E. coli* BL21(DE3) son capaces de utilizar las acil-AcpR de ambas bacterias para la biosíntesis *in vivo* de 3-oxo-esfinganina, lo que indica una especificidad laxa de estas dos SPTs.
9. Genes (*acpR*, *aasR*, *spt*, *red*, y *aca*) para biosíntesis de 3-oxo-esfinganina y dihidroceramida son encontrados en un amplio grupo de bacterias, mayormente del grupo CFB y Proteobacterias, lo que indica una más extendida capacidad de sintetizar esfingolípidos en bacterias.
10. En *Rhodobacterias* (α -, β -, y γ -Proteobacterias), el gen *acpR* y el gen *spt* se encuentran siempre adyacentes. En contraste, en δ -Proteobacterias, el gen *acpR* se encuentra adyacente al gen *aasR*, y lejos del gen *spt*, lo que indica que la relación AcpR-AasR podría ser más antigua, y posteriormente el producto de estos dos genes, acil-AcpR, se asoció a la biosíntesis de esfingolípidos.
11. Otros pares ACP-Aas pueden ser encontrados en δ -Proteobacterias y en la rizobia *S. meliloti*, indicando posiblemente que distintos pares ACP-Aas son requeridos en distintas vías biosintéticas.

8 PERSPECTIVAS

1. Demostrar que la AcpR ECD_02853 de *E. coli* BL21(DE3) es acilada selectivamente por la AasR ECD_02851 de *E. coli* BL21(DE3), en ensayos enzimáticos *in vitro*, utilizando ambas proteínas purificadas. Detectar los productos acil-AcpR con [³H]palmitato o por espectrometría de masas.
2. Caracterizar la actividad enzimática de la AasR ECD_02851 de *E. coli* BL21(DE3), variando la concentración de AcpR ECD_02851, del detergente tritón y la longitud de ácidos grasos.
3. Realizar ensayos enzimáticos *in vitro* con las SPTs de *C. crescentus*, *E. coli*, y *S. wittichii* purificadas, utilizando como sustratos tioéster acil-AcpR, acil-AcpP o acil-CoA, y caracterizar sus preferencias mediante constantes cinéticas (K_m , k_{cat}) para formar 3-oxo-esfinganina.
4. Estudiar la especificidad de las SPTs utilizando sustratos acil-tioéster (acil-ACP o acil-CoA) con ácidos grasos de distintas longitudes e insaturaciones.
5. Lograr la purificación y cristalización del complejo SPT con acil-AcpR unido, con el fin de obtener su estructura cristalográfica y analizar el mecanismo de acción de las SPTs de *Rhodobacteria*, y definir sus diferencias con respecto las SPTs de no-Rhodobacterias.
6. Estudiar la importancia de sistema tripartito AcpR-AasR-SPT en redirigir los ácidos grasos libres hacia la biosíntesis de esfingolípidos.
7. Determinar la función enzimática de las posibles 3-oxo-esfinganina reductasa (CC_1164, ECD_02852) y acil-CoA *N*-aciltransferasa (CC_1154, ECD_02850) en la biosíntesis de esfingolípidos de *C. crescentus* y *E. coli* BL21(DE3).
8. Identificar los genes involucrados en la biosíntesis de esfingolípidos complejos en *C. crescentus* y caracterizar su función enzimática.
9. Analizar la presencia de esfingolípidos en *E. coli* BL21(DE3), determinar las condiciones en las que se sobreproducen y estudiar su función.
10. Estudiar la biosíntesis de esfingolípidos en bacterias diferentes a *Rhodobacteria*, como δ -Proteobacterias, y caracterizar la función enzimática del par AcpR-AasR.
11. Caracterizar la importancia de otros pares ACP-Aas en distintas vías biosintéticas de diversas bacterias.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, D.D., Na, C.Z., Bielawski, J., Hannun, Y.A., & Kasper, D.L. (2011). Membrane sphingolipids as essential molecular signals for *Bacteroides* survival in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4666-4671. **doi:** 10.1073/pnas.1001501107
- Angala, S.K., Palčeková, Z., Belardinelli, J.M., & Jackson, M. (2018). Covalent modifications of polysaccharides in mycobacteria. *Nat. Chem. Biol.* 14, 193-198. **doi:** 10.1038/nchembio.2571
- Asselineau, J. (1966). The bacterial lipids. In *Chemistry of natural products* (San Francisco: Holden-Day, Inc.), pp. 203-226.
- Astner, I., Schulze, J.O., van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W.D., & Heinz, D.W. (2005). Crystal structure of 5-aminolevulinic synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *EMBO J.* 24, 3166-3177. **doi:** 10.1038/sj.emboj.7600792
- Babinski, K.J., Ribeiro, A.A., & Raetz, C.R.H. (2002). The *Escherichia coli* gene encoding the UDP-2,3-diacylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 25937-25946. **doi:** 10.1074/jbc.M204067200
- Barny, M.A., & Downie, J.A. (1993). Identification of the NodC protein in the inner but not the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 669-672. **doi:** 10.1094/Mpmi-6-669
- Beattie, A.E., Clarke, D.J., Wadsworth, J.M., Lowther, J., Sin, H.L., & Campopiano, D.J. (2013). Reconstitution of the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) dependent enzyme serine palmitoyltransferase (SPT) with pyridoxal reveals a crucial role for the phosphate during catalysis. 49, 7058-7060. **doi:** 10.1039/c3cc43001d
- Beld, J., Finzel, K., & Burkart, M.D. (2014). Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. *Chem. Biol.* 21, 1293-1299. **doi:** 10.1016/j.chembiol.2014.08.015
- Bloch, K. (1971). β -Hydroxythioester dehydrase. In *The Enzymes*. P.D. Boyer, ed. (New York: Academic Press), pp. 441-464.
- Brown, E.M., Ke, X., Hitchcock, D., Jeanfavre, S., Avila-Pacheco, J., Nakata, T., Arthur, T.D., Fornelos, N., Heim, C., Franzosa, E.A., et al. (2019). *Bacteroides*-derived sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis. *Cell Host Microbe* 25, 668-680 e667. **doi:** 10.1016/j.chom.2019.04.002
- Brozek, K.A., Carlson, R.W., & Raetz, C.R.H. (1996). A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 271, 32126-32136. **doi:** 10.1074/jbc.271.50.32126
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W.H., Yang, X.C., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., et al. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433, 531-537. **doi:** 10.1038/nature03239
- Byers, D.M., & Gong, H.S. (2007). Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem. Cell Biol.* 85, 649-662. **doi:** 10.1139/O07-109
- Campbell, J.W., & Cronan, J.E. (2001). Bacterial fatty acid biosynthesis: Targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 305-332. **doi:** 10.1146/annurev.micro.55.1.305
- Carreira, A.C., Ventura, A.E., Varela, A.R.P., & Silva, L.C. (2015). Tackling the biophysical properties of sphingolipids to decipher their biological roles. *Biol. Chem.* 396, 597-609. **doi:** 10.1515/hsz-2014-0283

- Carter, H.E., Haines, W.J., Ledyard, W.E., & Norris, W.P. (1947). Biochemistry of the sphingolipides . I. Preparation of sphingolipides from beef brain and spinal cord. *J. Biol. Chem.* 169, 77-82. **doi:** 10.1016/S0021-9258(17)35063-9
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J.M., Kalogeraki, V.S., Passarelli, B., Coller, J.A., Fero, M.J., McAdams, H.H., & Shapiro, L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Mol. Syst. Biol.* 7, 1-7. **doi:** 10.1038/msb.2011.58
- Clementz, T., Bednarski, J.J., & Raetz, C.R.H. (1996). Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A - HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J. Biol. Chem.* 271, 12095-12102. **doi:** 10.1074/jbc.271.20.12095
- Clementz, T., & Raetz, C.R.H. (1991). A gene coding for 3-Deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in *Escherichia coli* - Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* 266, 9687-9696. **doi:** 10.1016/S0021-9258(18)92875-9
- Clementz, T., Zhou, Z.M., & Raetz, C.R.H. (1997). Function of the *Escherichia coli msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A - Acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. *J. Biol. Chem.* 272, 10353-10360. **doi:** 10.1074/jbc.272.16.10353
- Coskun, U., & Simons, K. (2010). Membrane rafting: from apical sorting to phase segregation. *FEBS Lett.* 584, 1685-1693. **doi:** 10.1016/j.febslet.2009.12.043
- Crowell, D.N., Anderson, M.S., & Raetz, C.R.H. (1986). Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168, 152-159. **doi:** 10.1128/jb.168.1.152-159.1986
- Dávila-Martínez, Y., Ramos-Vega, A.L., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O., & López-Lara, I.M. (2010). SMc01553 is the sixth acyl carrier protein in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology-(UK)* 156, 230-239. **doi:** 10.1099/mic.0.033480-0
- Desta, I.T., Porter, K.A., Xia, B., Kozakov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. *Structure* 28, 1071-1081. **doi:** 10.1016/j.str.2020.06.006
- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G.B., & Lester, R.L. (1997). Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* 272, 30196-30200. **doi:** 10.1074/jbc.272.48.30196
- Dunathan, H.C. (1966). Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 712-716. **doi:** 10.1073/pnas.55.4.712
- Epple, G., van der Drift, K.M.G.M., Thomas-Oates, J.E., & Geiger, O. (1998). Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180, 4950-4954. **doi:** 10.1128/Jb.180.18.4950-4954.1998
- Evans, S.E., Williams, C., Arthur, C.J., Burston, S.G., Simpson, T.J., Crosby, J., & Crump, M.P. (2008). An ACP structural switch: Conformational differences between the apo and holo forms of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein. *Chembiochem* 9, 2424-2432. **doi:** 10.1002/cbic.200800180
- Flugel, R.S., Hwangbo, Y., Lambalot, R.H., Cronan, J.E., & Walsh, C.T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 959-968. **doi:** 10.1074/jbc.275.2.959
- Futerman, A.H., & Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15, 312-318. **doi:** 10.1016/j.tcb.2005.04.006
- Fyrst, H., & Saba, J.D. (2010). An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat. Chem. Biol.* 6, 689-689. **doi:** 10.1038/nchembio0910-689a

- Galloway, S.M., & Raetz, C.R.H. (1990). A mutant of *Escherichia coli* defective in the 1st step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 265, 6394-6402. **doi:** 10.1016/S0021-9258(19)39339-1
- Garrett, T.A., Kadrmas, J.L., & Raetz, C.R.H. (1997). Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase - Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.* 272, 21855-21864. **doi:** 10.1074/jbc.272.35.21855
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I.M., & Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 49, 46-60. **doi:** 10.1016/j.plipres.2009.08.002
- Geiger, O., & López-Lara, I.M. (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 153-162. **doi:** 10.1016/S0378-1097(02)00478-0
- Geiger, O., Padilla-Gómez, J., & López-Lara, I.M. (2019). Bacterial sphingolipids and sulfonolipids. In *Biogenesis of fatty acids, lipids and membranes. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. O. Geiger, ed. (Springer, Switzerland), pp. 123-137. **doi:** 10.1007/978-3-319-50430-8_12
- Geiger, O., Thomasoates, J.E., Glushka, J., Spaink, H.P., & Lugtenberg, B.J.J. (1994). Phospholipids of *Rhizobium* contain *nodE*-determined highly unsaturated fatty-acid moieties. *J. Biol. Chem.* 269, 11090-11097. **doi:** 10.1016/S0021-9258(19)78095-8
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Vanmontagu, M., & Holsters, M. (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2669-2673. **doi:** 10.1073/pnas.91.7.2669
- Golenbock, D.T., Hampton, R.Y., Qureshi, N., Takayama, K., & Raetz, C.R.H. (1991). Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 19490-19498. **doi:** 10.1016/S0021-9258(18)55023-7
- González, V., Acosta, J.L., Santamaría, R.I., Bustos, P., Fernández, J.L., Hernández-González, I.L., Díaz, R., Flores, M., Palacios, R., Mora, J., et al. (2010). Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1604-1614. **doi:** 10.1128/Aem.02039-09
- Gräve, K., Bennett, M.D., & Högbom, M. (2019). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* phosphatidylinositol phosphate synthase reveals mechanism of substrate binding and metal catalysis. *Commun. Biol.* 2, 175. **doi:** 10.1038/s42003-019-0427-1
- Green, P.R., Merrill, A.H., & Bell, R.M. (1981). Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli* - Purification, reconstitution, and characterization of *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 256, 1151-1159. **doi:** 10.1016/S0021-9258(19)68570-4
- Hannun, Y.A., & Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139-150. **doi:** 10.1038/nrm2329
- Hannun, Y.A., & Obeid, L.M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 673-673. **doi:** 10.1038/s41580-018-0046-6
- Harrison, P.J., Dunn, T.M., & Campopiano, D.J. (2018). Sphingolipid biosynthesis in man and microbes. *Nat. Prod. Rep.* 35, 921-954. **doi:** 10.1039/c8np00019k
- Heaver, S.L., Le, H.H., Tang, P.J., Baslé, A., Barone, C.M., Vu, D.L., Waters, J.L., Marles-Wright, J., Johnson, E.L., Campopiano, D.J., et al. (2022). Characterization of inositol lipid metabolism in gut-associated *Bacteroidetes*. *Nat. Microbiol.* 7, 986-1000. **doi:** 10.1038/s41564-022-01152-6

- Holmes, B., Owen, R.J., Evans, A., Malnick, H., & Willcox, W.R. (1977). *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, hospital environment, and other sources. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 133-146. **doi:** 10.1099/00207713-27-2-133
- Ikushiro, H., & Hayashi, H. (2011). Mechanistic enzymology of serine palmitoyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 1474-1480. **doi:** 10.1016/j.bbapap.2011.02.005
- Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2001). A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. Purification, characterization, cloning, and overproduction. *J. Biol. Chem.* 276, 18249-18256. **doi:** 10.1074/jbc.M101550200
- Ikushiro, H., Islam, M.M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., & Hayashi, H. (2009). Structural insights into the enzymatic mechanism of serine palmitoyltransferase from *Sphingobacterium multivorum*. *J. Biochem.* 146, 549-562. **doi:** 10.1093/jb/mvp100
- Ikushiro, H., Islam, M.M., Tojo, H., & Hayashi, H. (2007). Molecular characterization of membrane-associated soluble serine palmitoyltransferases from *Sphingobacterium multivorum* and *Bdellovibrio stolpii*. *J. Bacteriol.* 189, 5749-5761. **doi:** 10.1128/JB.00194-07
- Ikushiro, H., Okamoto, A., & Hayashi, H. (2006). Structural Biology of Sphingolipid Synthesis. In *Sphingolipid Biology*. Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, & A.H. Merrill, eds. (Springer, Tokyo), pp. 483-492. **doi:** 10.1007/4-431-34200-1_38
- Jackman, J.E., Raetz, C.R.H., & Fierke, C.A. (1999). UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 38, 1902-1911. **doi:** 10.1021/bi982339s
- Jahan, N., Potter, J.A., Sheikh, M.A., Botting, C.H., Shirran, S.L., Westwood, N.J., & Taylor, G.L. (2009). Insights into the biosynthesis of the *Vibrio cholera* major autoinducer CAI-1 from the crystal structure of the PLP-dependent enzyme CqsA. *J. Mol. Biol.* 392, 763-773. **doi:** 10.1016/j.jmb.2009.07.042
- Jayasimhulu, K., Hunt, S.M., Kaneshiro, E.S., Watanabe, Y., & Giner, J.L. (2007). Detection and identification of *Bacteriovorax stolpii* UKi2 sphingophosphonolipid molecular species. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 394-403. **doi:** 10.1016/j.jasms.2006.10.014
- Jeong, H., Kim, H.J., & Lee, S.J. (2015). Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome Announc.* 3. **doi:** 10.1128/genomeA.00134-15
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., & Schell, J. (1993). *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 625-629. **doi:** 10.1073/pnas.90.2.625
- Kamst, E., Pilling, J., Raamsdonk, L.M., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. (1997). *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179, 2103-2108. **doi:** 10.1128/jb.179.7.2103-2108.1997
- Kato, M., Muto, Y., Tanaka-Bandoh, K., Watanabe, K., & Ueno, K. (1995). Sphingolipid composition in *Bacteroides* species. *Anaerobe* 1, 135-139. **doi:** 10.1006/anae.1995.1009
- Kawahara, K., Kubota, M., Sato, N., Tsuge, K., & Seto, Y. (2002). Occurrence of an α -galacturonosyl-ceramide in the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 289-294. **doi:** 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11361.x
- Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y.A., Seydel, U., & Zähringer, U. (2000). Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 1837-1846. **doi:** 10.1046/j.1432-1327.2000.01189.x

- Kawahara, K., Seydel, U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietschel, E.T., & Zähringer, U. (1991). Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett.* 292, 107-110. **doi:** 10.1016/0014-5793(91)80845-T
- Kawasaki, S., Moriguchi, R., Sekiya, K., Nakai, T., Ono, E., Kume, K., & Kawahara, K. (1994). The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking Gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 176, 284-290. **doi:** 10.1128/Jb.176.2.284-290.1994
- Keating, D.H., Carey, M.R., & Cronan, J.E. (1995). The unmodified (apo) form of *Escherichia coli* acyl carrier protein is a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* 270, 22229-22235. **doi:** 10.1074/jbc.270.38.22229
- Keck, M., Gisch, N., Moll, H., Vorhölter, F.J., Gerth, K., Kahmann, U., Lissel, M., Lindner, B., Niehaus, K., & Holst, O. (2011). Unusual outer membrane lipid composition of the Gram-negative, lipopolysaccharide-lacking Myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biol. Chem.* 286, 12850-12859. **doi:** 10.1074/jbc.M110.194209
- Kelly, T.M., Stachula, S.A., Raetz, C.R.H., & Anderson, M.S. (1993). The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase - The third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 19866-19874. **doi:** 10.1016/S0021-9258(19)36593-7
- Kerbarh, O., Campopiano, D.J., & Baxter, R.L. (2006). Mechanism of α -oxoamine synthases: identification of the intermediate Claisen product in the 8-amino-7-oxononanoate synthase reaction. *Chem. Commun.*, 60-62. **doi:** 10.1039/b511837a
- Kinjo, Y., Pei, B., Bufali, S., Raju, R., Richardson, S.K., Imamura, M., Fujio, M., Wu, D., Khurana, A., Kawahara, K., et al. (2008). Natural *Sphingomonas* glycolipids vary greatly in their ability to activate natural killer T cells. *Chem. Biol.* 15, 654-664. **doi:** 10.1016/j.chembiol.2008.05.012
- LaBach, J.P., & White, D.C. (1969). Identification of ceramide phosphorylethanolamine and ceramide phosphorylglycerol in the lipids of an anaerobic bacterium. *J. Lipid Res.* 10, 528-534. **doi:** 10.1016/S0022-2275(20)43045-7
- Lahiri, S., & Futerman, A.H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2270-2284. **doi:** 10.1007/s00018-007-7076-0
- Lai, J.R., Koglin, A., & Walsh, C.T. (2006). Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* 45, 14869-14879. **doi:** 10.1021/bi061979p
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C.T. (1996). A new enzyme superfamily - The phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3, 923-936. **doi:** 10.1016/S1074-5521(96)90181-7
- Lee, M.T., Le, H.H., Besler, K.R., & Johnson, E.L. (2022). Identification and characterization of 3-ketosphinganine reductase activity encoded at the *BT_0972* locus in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Lipid Res.* 63, 100236. **doi:** 10.1016/j.jlr.2022.100236
- Li, H., Melton, E.M., Quackenbush, S., DiRusso, C.C., & Black, P.N. (2007). Mechanistic studies of the long chain acyl-CoA synthetase Faa1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1246-1253. **doi:** 10.1016/j.bbailip.2007.05.009
- López-Lara, I.M., & Geiger, O. (2000). Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins. *Microbiology-(UK)* 146, 839-849. **doi:** 10.1099/00221287-146-4-839
- Lorenzen, W., Bozhüyük, K.A.J., Cortina, N.S., & Bode, H.B. (2014). A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *J. Lipid Res.* 55, 2620-2633. **doi:** 10.1194/jlr.M054593

- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X., & Marcotte, E.M. (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat. Biotechnol.* 25, 117-124. **doi:** 10.1038/nbt1270
- Lu, Y.J., Zhang, Y.M., Grimes, K.D., Qi, J., Lee, R.E., & Rock, C.O. (2006). Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. *Mol. Cell* 23, 765-772. **doi:** 10.1016/j.molcel.2006.06.030
- Marsolais, D., & Rosen, H. (2009). Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 297-307. **doi:** 10.1038/nrd2356
- Mergaert, P., D'Haese, W., Geelen, D., Promé, D., Vanmontagu, M., Geremia, R., Promé, J.C., & Holsters, M. (1995). Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod Factors - Study of the activity of the NodABCS proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 29217-29223. **doi:** 10.1074/jbc.270.49.29217
- Merrill, A.H., Jr., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., & Wang, E. (1997). Sphingolipids - The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 208-225. **doi:** 10.1006/taap.1996.8029
- Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., & Merrill, A.H., Jr. (1997). Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* 272, 22432-22437. **doi:** 10.1074/jbc.272.36.22432
- Mina, J.G., Thye, J.K., Alqaisi, A.Q.I., Bird, L.E., Dods, R.H., Grøftehaug, M.K., Mosely, J.A., Pratt, S., Shams-Eldin, H., Schwarz, R.T., et al. (2017). Functional and phylogenetic evidence of a bacterial origin for the first enzyme in sphingolipid biosynthesis in a phylum of eukaryotic protozoan parasites. *J. Biol. Chem.* 292, 12208-12219. **doi:** 10.1074/jbc.M117.792374
- Moffatt, J.H., Harper, M., & Boyce, J.D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1145, 55-71. **doi:** 10.1007/978-3-030-16373-0_5
- Mohan, S., Kelly, T.M., Eveland, S.S., Raetz, C.R.H., & Anderson, M.S. (1994). An *Escherichia coli* gene (*fabZ*) encoding (3*R*)-hydroxymyristoyl acyl carrier protein dehydrase - Relation to *fabA* and suppression of mutations in lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 32896-32903. **doi:** 10.1016/S0021-9258(20)30075-2
- Naka, T., Fujiwara, N., Yano, I., Maeda, S., Doe, M., Minamino, M., Ikeda, N., Kato, Y., Watabe, K., Kumazawa, Y., et al. (2003). Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1635, 83-92. **doi:** 10.1016/j.bbalip.2003.10.010
- Nelson, D.L., Cox, M.M., & Hoskins, A.A. (2021). Lehninger principles of biochemistry. (Austin: W. H. Freeman, USA).
- Nichols, W.A., Raetz, C.R.H., Clementz, T., Smith, A.L., Hanson, J.A., Ketterer, M.R., Sunshine, M., & Apicella, M.A. (1997). *htrB* of *Haemophilus influenzae*: determination of biochemical activity and effects on virulence and lipooligosaccharide toxicity. *J. Endoxtin Res.* 4, 163-172. **doi:** 10.1177/096805199700400301
- Nierman, W.C., Feldblyum, T.V., Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J., Heidelberg, J.F., Alley, M.R.K., Ohta, N., Maddock, J.R., et al. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4136-4141. **doi:** 10.1073/pnas.061029298

- Ogawa, S., Tachimoto, H., & Kaga, T. (2010). Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 32-36. **doi:** 10.1016/j.jbiosc.2009.07.007
- Olea-Ozuna, R.J., Poggio, S., EdBergstrom, Quiroz-Rocha, E., Garcia-Soriano, D.A., Sahonero-Canavesi, D.X., Padilla-Gomez, J., Martinez-Aguilar, L., Lopez-Lara, I.M., Thomas-Oates, J., et al. (2021). Five structural genes required for ceramide synthesis in *Caulobacter* and for bacterial survival. *Environ Microbiol* 23, 143-159. **doi:** 10.1111/1462-2920.15280
- Olsen, I., & Jantzen, E. (2001). Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe* 7, 103-112. **doi:** 10.1006/anae.2001.0376
- Padilla-Gómez, J., Olea-Ozuna, R.J., Contreras-Martínez, S., Morales-Tarré, O., García-Soriano, D.A., Sahonero-Canavesi, D.X., Poggio, S., Encarnación-Guevara, S., López-Lara, I.M., & Geiger, O. (2022). Specialized acyl carrier protein used by serine palmitoyltransferase to synthesize sphingolipids in *Rhodobacteria*. *Front. Microbiol.* 13, 961041. **doi:** 10.3389/fmicb.2022.961041
- Patton, J.L., Srinivasan, B., Dickson, R.C., & Lester, R.L. (1992). Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174, 7180-7184. **doi:** 10.1128/jb.174.22.7180-7184.1992
- Platt, M.W., Miller, K.J., Lane, W.S., & Kennedy, E.P. (1990). Isolation and characterization of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 172, 5440-5444. **doi:** 10.1128/jb.172.9.5440-5444.1990
- Raman, M.C.C., Johnson, K.A., Clarke, D.J., Naismith, J.H., & Campopiano, D.J. (2010). The serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas wittichii* RW1: An interesting link to an unusual acyl carrier protein. *Biopolymers* 93, 811-822. **doi:** 10.1002/bip.21482
- Raman, M.C.C., Johnson, K.A., Yard, B.A., Lowther, J., Carter, L.G., Naismith, J.H., & Campopiano, D.J. (2009). The external aldimine form of serine palmitoyltransferase: Structural, kinetic, and spectroscopic analysis of the wild-type enzyme and HSAN1 mutant mimics. *J. Biol. Chem.* 284, 17328-17339. **doi:** 10.1074/jbc.M109.008680
- Ramos-Vega, A.L., Dávila-Martínez, Y., Sohlenkamp, C., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O., & López-Lara, I.M. (2009). SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology-(UK)* 155, 257-267. **doi:** 10.1099/mic.0.022079-0
- Ritsema, T., Gehring, A.M., Stuitje, A.R., van der Drift, K.M.G.M., Dandal, I., Lambalot, R.H., Walsh, C.T., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. (1998). Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition. *Mol. Gen. Genet.* 257, 641-648. **doi:** 10.1007/s004380050692
- Ritsema, T., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. (1997). Acyl-acyl carrier protein is a donor of fatty acids in the NodA-dependent step in biosynthesis of lipochitin oligosaccharides by Rhizobia. *J. Bacteriol.* 179, 4053-4055. **doi:** 10.1128/jb.179.12.4053-4055.1997
- Rivera, J., Proia, R.L., & Olivera, A. (2008). The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 753-763. **doi:** 10.1038/nri2400
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320-W324. **doi:** 10.1093/nar/gku316
- Rock, C.O., & Cronan, J.E. (1996). *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 1302, 1-16. **doi:** 10.1016/0005-2760(96)00056-2
- Rock, C.O., & Jackowski, S. (1982). Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli* - Composition of the acyl-acyl carrier protein pool *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 257, 10759-10765. **doi:** 10.1016/S0021-9258(18)33888-2

- Rock, C.O., & Jackowski, S. (2002). Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1155-1166. **doi:** 10.1006/bbrc.2001.2022
- Roujeinikova, A., Simon, W.J., Gilroy, J., Rice, D.W., Rafferty, J.B., & Slabas, A.R. (2007). Structural studies of fatty acyl-(acyl carrier protein) thioesters reveal a hydrophobic binding cavity that can expand to fit longer substrates. *J. Mol. Biol.* 365, 135-145. **doi:** 10.1016/j.jmb.2006.09.049
- Sabourdy, F., Kedjouar, B., Sorli, S.C., Colié, S., Milhas, D., Salma, Y., & Levade, T. (2008). Functions of sphingolipid metabolism in mammals - Lessons from genetic defects. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 145-183. **doi:** 10.1016/j.bbalip.2008.01.004
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1996). The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 137-149. **doi:** 10.1007/BF00364678
- Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B., & Downie, J.A. (1986). The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. *Embo J.* 5, 647-652. **doi:** 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04262.x
- Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., & Hayashi, H. (2009). Multifunctional role of His159 in the catalytic reaction of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 284, 15487-15495. **doi:** 10.1074/jbc.M808916200
- Smit, J., Kaltashov, I.A., Cotter, R.J., Vinogradov, E., Perry, M.B., Haider, H., & Qureshi, N. (2008). Structure of a novel lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Caulobacter crescentus*. *Innate Immun.* 14, 25-37. **doi:** 10.1177/1753425907087588
- Somerville, J.E., Cassiano, L., Bainbridge, B., Cunningham, M.D., & Darveau, R.P. (1996). A novel *Escherichia coli* lipid a mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 97, 359-365. **doi:** 10.1172/Jci118423
- Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 257-288. **doi:** 10.1146/annurev.micro.54.1.257
- Stankeviciute, G., Guan, Z.Q., Goldfine, H., & Klein, E.A. (2019). *Caulobacter crescentus* adapts to phosphate starvation by synthesizing anionic glycosphingolipids and a novel glycosphingolipid. *Mbio* 10, 1-13. **doi:** 10.1128/mBio.00107-19
- Stankeviciute, G., Tang, P., Ashley, B., Chamberlain, J.D., Hansen, M.E.B., Coleman, A., D'Emilia, R., Fu, L., Mohan, E.C., Nguyen, H., et al. (2022). Convergent evolution of bacterial ceramide synthesis. *Nat. Chem. Biol.* 18, 305-312. **doi:** 10.1038/s41589-021-00948-7
- Tahara, Y., & Kawazu, M. (1994). Isolation of glucuronic acid-containing glycosphingolipid from *Zymomonas mobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 586-587. **doi:** 10.1271/bbb.58.586
- Thudichum, J.L.W. (1884). A treatise on the chemical constitution of the brain. (Hamden, Conn.,: Archon Books).
- Trent, M.S. (2009). Biosynthesis and membrane assembly of lipid A. In *Microbial glycobiology: Structures, relevance and applications*. O. Holst, P.J. Brennan, & M. von Itzstein, eds. (Academic Press), pp. 305-318. **doi:** 10.1016/B978-0-12-374546-0.X0001-6
- Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., & Li, J. (2010). Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *J. Med. Chem.* 53, 1898-1916. **doi:** 10.1021/jm900999h
- Vorachek-Warren, M.K., Ramirez, S., Cotter, R.J., & Raetz, C.R.H. (2002). A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J. Biol. Chem.* 277, 14194-14205. **doi:** 10.1074/jbc.M200409200

- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., & Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. 25, 1189-1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- Webster, S.P., Alexeev, D., Campopiano, D.J., Watt, R.M., Alexeeva, M., Sawyer, L., & Baxter, R.L. (2000). Mechanism of 8-amino-7-oxononanoate synthase: Spectroscopic, kinetic, and crystallographic studies. *Biochemistry* 39, 516-528. doi: 10.1021/bi991620j
- Wells, G.B., Dickson, R.C., & Lester, R.L. (1998). Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via *de novo* synthesis. *J. Biol. Chem.* 273, 7235-7243. doi: 10.1074/jbc.273.13.7235
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.M., & Rock (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791-831. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524
- Whitfield, C., & Trent, M.S. (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 99-128. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035600
- Williams, A.H., & Raetz, C.R.H. (2007). Structural basis for the acyl chain selectivity and mechanism of UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13543-13550. doi: 10.1073/pnas.0705833104
- Wu, D., Zajonc, D.M., Fujio, M., Sullivan, B.A., Kinjo, Y., Kronenberg, M., Wilson, I.A., & Wong, C.H. (2006). Design of natural killer T cell activators: Structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3972-3977. doi: 10.1073/pnas.0600285103
- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Yamamoto, H. (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* 34, 99-119. doi: 10.1111/j.1348-0421.1990.tb00996.x
- Yamamoto, A., Yano, I., Masui, M., & Yabuuchi, E. (1978). Isolation of a novel sphingoglycolipid containing glucuronic acid and 2-hydroxy fatty acid from *Flavobacterium devorans* ATCC 10829. *J. Biochem.* 83, 1213-1216. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132015
- Yard, B.A., Carter, L.G., Johnson, K.A., Overton, I.M., Dorward, M., Liu, H.T., McMahon, S.A., Oke, M., Puech, D., Barton, G.J., et al. (2007). The structure of serine palmitoyltransferase; Gateway to sphingolipid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 370, 870-886. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.086
- Young, K., Silver, L.L., Bramhill, D., Cameron, P., Eveland, S.S., Raetz, C.R.H., Hyland, S.A., & Anderson, M.S. (1995). The *envA* permeability cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis - UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.* 270, 30384-30391. doi: 10.1074/jbc.270.51.30384
- Zhang, Y., & Cronan, J.E. (1996). Polar allele duplication for transcriptional analysis of consecutive essential genes: Application to a cluster of *Escherichia coli* fatty acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* 178, 3614-3620. doi: 10.1128/jb.178.12.3614-3620.1996
- Zhang, Y.M., Wu, B.N., Zheng, J., & Rock, C.O. (2003). Key residues responsible for acyl carrier protein and β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction. *J. Biol. Chem.* 278, 52935-52943. doi: 10.1074/jbc.M309874200
- Zik, J.J., Yoon, S.H., Guan, Z.Q., Skidmore, G.S., Gudoor, R.R., Davies, K.M., Deutschbauer, A.M., Goodlett, D.R., Klein, E.A., & Ryan, K.R. (2022). *Caulobacter* lipid A is conditionally

dispensable in the absence of *fur* and in the presence of anionic sphingolipids. *Cell Rep* 39, 1-18. **doi:** 10.1016/j.celrep.2022.110888

Zornetzer, G.A., Tanem, J., Fox, B.G., & Markley, J.L. (2010). The length of the bound fatty acid influences the dynamics of the acyl carrier protein and the stability of the thioester bond. *Biochemistry* 49, 470-477. **doi:** 10.1021/bi9014659