



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FUNCIÓN DE LA NUEVA PROTEÍNA PORTADORA DE  
GRUPOS ACILO SMc01553 DE *Sinorhizobium meliloti***

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
PRESENTA:  
**YADIRA DÁVILA MARTÍNEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ISABEL MARÍA LÓPEZ LARA**

CUERNAVACA, MORELOS 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Isabel López Lara, por permitirme llevar a cabo este proyecto de investigación, por transmitirme su ánimo y destreza en el laboratorio, por su paciencia y todas sus enseñanzas. ¡Muchas gracias!

Hago extensiva mi gratitud al Dr. Otto Geiger por su ayuda desinteresada, por compartirnos parte de su vasta experiencia, por sus sugerencias y todo el tiempo que siempre nos dedica.

Así mismo, quiero agradecer al Dr. Christian Sohlenkamp por su amistad, por su ayuda y aportaciones en mi trabajo, y por compartir su filosofía de la ciencia conmigo.

Agradezco de forma muy especial a Miguel Angel Ramírez por su apoyo en todo lo que hago y porque hace que la vida académica sea divertida y llena de aportaciones.

Agradezco a los doctores Jorge Luis Folch, Juan Miranda y Luis Servín por haber realizado una cuidadosa revisión a este trabajo, por sus valiosas aportaciones y por recordarme que siempre hay algo por aprender.

También les doy las gracias a los doctores Miguel Lara, Bruno Contreras y Quina Nogales por su ayuda y por su gran disposición a escucharme.

Muy especialmente quiero agradecer a Cinthia, Gama, Orlando, Juanchito, América, Ana Yanci, Viole, Maritza, Ari, Miguel, Napo, Rosa, Angel, Dani, Diana, Mario y Martín por su amistad, por compartir conmigo muchos momentos de trabajo y por hacer del laboratorio un lugar agradable y lleno de alegrías.

Agradezco a José Espíritu su amistad y toda su ayuda.

Mi sincero agradecimiento a Lucy, Ara y Gladys, por toda su ayuda en incontables trámites.

Agradezco inmensamente a la UNAM y al CCG por haberme permitido mejorar mi vida en todos aspectos.

## **DEDICATORIAS**

**A mis Miguelitos quienes son mi más inmensa alegría. Con todo mi cariño para ustedes.**

**A mi papá y a mi mamá, quienes son mi refugio. Reciban este trabajo como una pequeña parte de su esfuerzo.**

**A mis hermanos Javier y Brenda, por toda su bondad y cariño. Los quiero mis niños.**

**A la familia Ramírez Romero por todos los momentos compartidos.**

**A mis amigos Pili, Dani, Paola, Cacau, Tania, Lu, Bruno, Fer, Edu, Quina y Raúl con quienes hemos formado una familia que no conoce distancias ni fronteras.**

**A mis amigos Cinthia, Gama, Orlando y Juanchito, porque mi vida es mucho más alegre cuando la comparto con ustedes**

**A mi querida UNAM**

**El presente trabajo se desarrolló en el programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Isabel María López Lara.**

**Para el desarrollo de este trabajo se contó con becas de manutención otorgadas por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).**

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>TABLA DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>INTRODUCCION</b> .....	6
1. Organización estructural de los sistemas de FAS.....	6
2. Organización estructural de los sistemas de PKS.....	8
3. Organización estructural de los sistemas de NRPS.....	9
4. Proteínas portadoras de acilos en FAS, PKS y NRPS.....	11
5. Estructura de las ACPs.....	13
6. Proteínas que interaccionan con ACPs.....	14
6.1. Fosfopanteteinil transferasas.....	14
7. Síntesis de ácidos grasos.....	15
7.1. Reacciones de Inicio.....	16
7.1.1. Acetil CoA carboxilasa (ACC).....	16
7.1.2. Malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD).....	17
7.1.3. 3-Cetoacil ACP sintasa III (FabH). Primera condensación.....	17
7.2. Ciclos de elongación.....	18
7.2.1. 3-cetoacil-ACP sintasas I y II (FabB y FabF). Condensación....	18
7.2.2. 3-cetoacil-ACP-reductasa (FabG). Primera reducción.....	19
7.2.3. 3-hidroxiacil-ACP-deshidratasa (FabA). Deshidratación.....	20
7.2.4. Enoil-ACP-reductasa (FabI). Segunda reducción.....	20
8. Aciltransferasas.....	21
9. Síntesis de policétidos.....	24
9.1. Unidades extensoras en síntesis de PKSs.....	25
9.1.1. Unidades extensoras de PKSs unidas a CoA.....	25
9.1.2. Unidades extensoras de PKSs unidas a ACP.....	27
10. ACPs en rizobias.....	29
10.1. AcpP.....	30
10.2. NodF.....	30
10.3. AcpXL.....	32
10.4. RkpF-RkpA.....	34
10.5. SMb20651.....	36
<b>ANTECEDENTES</b> .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>RESULTADOS ADICIONALES</b> .....	53
<b>DISCUSION</b> .....	60
<b>REFERENCIAS</b> .....	66

## RESUMEN

Las proteínas portadoras de grupos acilo, ACPs de sus siglas en inglés “acyl carrier proteins”, son requeridas para la transferencia de grupos acilo durante la síntesis de ácidos grasos y policétidos. Los acilos intermediarios se unen al sulfidrilo del grupo prostético de la ACP, la 4'-fosfopanteteína. Ésta se encuentra unida al grupo hidroxilo de una serina conservada de la ACP, y existe una secuencia consenso alrededor de este sitio de unión, lo que en conjunto se ha denominado como motivo de unión a fosfopanteteína. La transferencia de la 4'-fosfopanteteína de la coenzima A a la ACP se lleva a cabo por la holo-ACP-sintasa (AcpS). En rhizobia se han descrito 5 diferentes ACPs: AcpP, NodF, Dominio ACP de RkpA, AcpXL y SMb20651. La secuencia del genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 revela la existencia de un ORF que probablemente codifica para una nueva ACP, ya que cumple con las características descritas para éstas, siendo proteínas pequeñas, con puntos isoeléctricos ácidos y teniendo el motivo de unión a 4'-fosfopanteteína. El ORF es *smc01553* y está localizado en el cromosoma. El gen *smc01553* forma parte de una región de ADN de 6.6 kb que se encuentra duplicada en el pSymB, donde hay una copia de la nueva ACP que es codificada por *smb22007*. La única diferencia entre ambas proteínas es una glutamina (Q) adicional codificada en el extremo carboxilo del ORF *smb22007*. Con la finalidad de establecer si SMC01553 es una ACP, se hizo un marcaje *in vivo* con [<sup>3</sup>H]β-alanina, la cual es un bloque biosintético de la 4'-fosfopanteteína. Se utilizó una cepa de *E. coli* que sobreexpresa SMC01553 y se comprobó que SMC01553 incorporó eficientemente [<sup>3</sup>H]β-alanina. His-SMC01553 y SMC01553 se sobreproducen en *E. coli* mayoritariamente como cuerpos de inclusión. Después de estandarizar un proceso para solubilizar y renaturalizar las proteínas a partir de los cuerpos de inclusión, se purificaron ambas proteínas, y se modificaron covalentemente *in vitro*, usando His-AcpS de *S. meliloti*. Se analizaron en geles nativos las formas apo y holo de las proteínas, descubriendo que las formas holo, tanto de SMC01553 como de His-SMC01553, migran significativamente más rápido que sus respectivas formas apo. Esto indica que la conversión de ambas proteínas trae consigo un cambio conformacional haciendo su estructura más compacta cuando están sustituidas con su grupo prostético. El análisis por espectrometría de masas de la proteína SMC01553 tratada con His-AcpS mostró un incremento de masa acorde con la incorporación del grupo

prostético 4'-fosfopanteteína. En experimentos *in vitro*, se comprobó que SMc01553 no se carga con el grupo malonil, cuando está en presencia de FabD<sub>Sm</sub> y malonil-CoA, mientras que en esas mismas condiciones las otras ACPs de *S. meliloti* sí se malonilan. Utilizando RT-PCR se comprobó que el gen *smc01553* y la copia ubicada en el pSymB *smb22007* se expresan durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos de *S. meliloti*. Al construir mutantes de ambas regiones duplicadas, no se encontraron diferencias en fenotipo con respecto a la cepa silvestre, tanto en condiciones de vida libre, como simbióticas.



## ABSTRACT

Acyl carrier proteins (ACPs) are required for the transfer of acyl intermediates during fatty acid and polyketide syntheses. In *Sinorhizobium meliloti* 1021 there are 5 known ACPs: AcpP, NodF, AcpXL, the ACP domain in RkpA and SMb20651. The genome sequence of *S. meliloti* 1021 also reveals the ORF *smc01553* annotated as putative ACP. Gene *smc01553* is part of a 6.6 kb DNA region that is duplicated in the chromosome and in the pSymb plasmid which is probably the result of a recent duplication event. SMc01553 overexpressed in *E. coli* was labelled in vivo with [<sup>3</sup>H]β-alanine, a biosynthetic building block of the 4'-phosphopantetheine prosthetic group of ACPs. The purified SMc01553 was modified with 4'-phosphopantetheine in the presence of *S. meliloti* holo-ACP synthase and this modification resulted in a major conformational change of the protein structure, since the holo-form runs faster in native PAGE than the apo-form. SMc01553 could not be loaded with a malonyl group by malonyl CoA-ACP transacylase from *S. meliloti* (FabD<sub>Sm</sub>). Using RT-PCR we could show the presence of mRNA for SMc01553 and of the duplicated ORF SMb22007 in cultures of *S. meliloti*. However, a mutant in which the two duplicated regions were deleted did not show any different phenotype with respect to the wild type in the free-living or symbiotic life style.

## TABLA DE ABREVIATURAS

- ACP**: acycl carrier protein (proteína portadora de grupos acilo)
- AcpS**: acycl carrier protein synthase (ACP sintasa)
- AHLs**: acyl homoserine lactones (acil homoserina lactonas)
- AT**: aciltransferasa
- CoA**: coenzima A
- DH**: dehidratasa
- DOC**: sodium deoxycholate (deoxicolato de sodio)
- FAS**: fatty acid synthase (sintasa de ácidos grasos)
- KPS**: capsular polysaccharide (polisacárido capsular tipo K)
- KS**: ketosynthase (cetosintasa)
- LPS**: lipopolysaccharide (lipopolisacárido)
- MBOAT**: membrane-bound O-acyltransferase (aciltransferasa unida a membrana)
- NRPS**: non ribosomal peptide synthetases (sintetasas de péptidos no ribosomales)
- PCP**: peptidyl carrier protein (proteína portadora de péptidos)
- 4'-PP**: 4'-phosphopantetheine (4'-fosfopanteteína)
- PPT**: phosphopantetheinyl transferase (fosfopanteteinil transferasa)
- PKS**: polyketide synthase (policétido sintasa)
- RD**: reductasa

## INTRODUCCIÓN

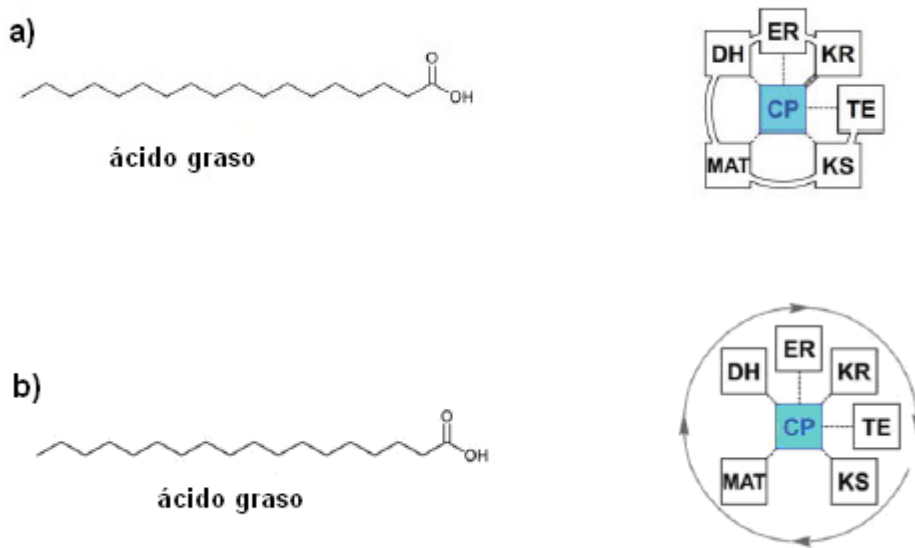
Las proteínas portadoras de grupos acilo participan en la síntesis de ácidos grasos, acarreando al compuesto acilo que está siendo sintetizado, por lo tanto, se sabe que interaccionan con las enzimas que sintetizan ácidos grasos (Mercer & Burkart, 2007). Las proteínas portadoras de acilo son proteínas pequeñas, que sufren modificación post-traducciona al incorporar en su estructura al grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4'-PP). El grupo 4'-PP las hace funcionales para establecer un enlace tioéster con los compuestos que serán iniciadores y/o intermediarios en la biosíntesis de diversos compuestos. Se ha descrito que la 4'-PP sirve como un "brazo" al que se unen los grupos acilo y facilita su transferencia (Mercer & Burkart, 2007).

Las ACPs también participan en la síntesis de policétidos y péptidos no ribosomales, en este caso se llaman PCPs (proteína acarreadora de péptidos). La policétido sintasa (PKS del inglés polyketide synthase) y la sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés non ribosomal peptide synthetase), son sistemas análogos a las síntasas de ácidos grasos (FAS del inglés fatty acid synthase). La diferencia entre PKS y FAS radica en que en el sistema PKS no siempre los grupos funcionales acetato son totalmente reducidos, de ahí la gran variedad de compuestos que se generan. En la síntesis de péptidos no ribosomales se utilizan aminoácidos como bloques biosintéticos. El papel de las ACPs es interaccionar con las diferentes enzimas que participan en la síntesis de un compuesto. Las ACPs para llevar a cabo su función requieren estar modificadas con el grupo prostético 4'-PP que será el encargado de portar el compuesto sujeto a síntesis (Mercer & Burkart, 2007).

### 1. Organización estructural de los sistemas FAS

Los ácidos grasos cumplen diversas funciones en la célula, por ejemplo, son estructurales y señalizadores. La supervivencia de las bacterias depende de la homeostasis de sus lípidos de membrana, ya que su habilidad de ajustar su composición lipídica adapta a la bacteria ante diferentes ambientes (Zhang & Rock, 2008a). La síntesis de ácidos grasos es un proceso esencial para todas las células, excepto en las Arqueas. En la naturaleza existen dos tipos básicos de FAS, las síntasas de tipo I (FAS I) son proteínas multifuncionales con diferentes dominios

catalíticos, donde cada dominio lleva a cabo una reacción específica (Fig.1a). Las FAS I se encuentran en mamíferos y hongos y su localización intracelular es el citosol (Rock, 2008). Las sintasas tipo II (FAS II) consisten en un sistema de proteínas disociadas, en donde cada componente es codificado independientemente. Cada proteína lleva a cabo un paso de la vía de síntesis (Fig. 1b). El sistema FAS II se encuentra en bacterias, mitocondrias, cloroplastos y apicoplastos (López-Lara & Geiger, 2010).



**Fig. 1.** Organización estructural de FAS I y FAS II. **(a)** Las FAS I son proteínas multifuncionales con diferentes dominios catalíticos, donde cada dominio lleva a cabo una reacción específica. La ACP interactúa iterativamente con cada dominio del polipéptido, hasta que se sintetiza el ácido graso del número de carbonos requerido. **(b)** Las FAS II consiste en un sistema de proteínas disociadas, en donde cada componente es codificado independientemente. Cada una de las enzimas interactúa con la ACP para sintetizar el ácido graso. Donde KR es cetoreductasa, ER es enoil reductasa, DH es deshidratasa, MAT es malonil aciltransferasa, KS es cetosintasa, TE es tioesterasa y CP es proteína portadora de grupos acilo (Mercer & Burkart, 2007).

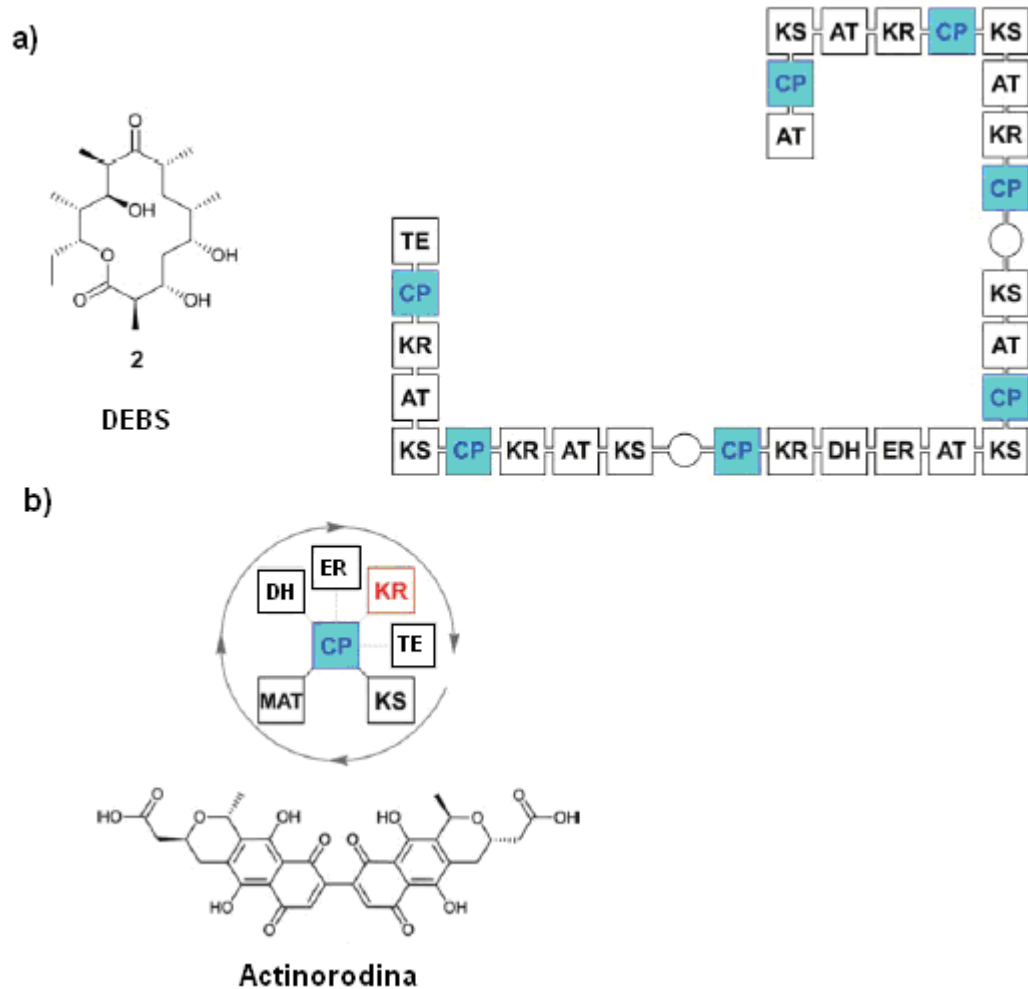
El sistema FAS II funciona en el citosol de las bacterias y en el cloroplasto de las plantas. Este sistema también se ha encontrado en plástidos de Apicomplexos (apicoplastos), que son parásitos unicelulares, entre los que se encuentran los causantes de enfermedades como la malaria, la toxoplasmosis y la criptosporidiosis (Sonda & Hehl, 2006). El apicoplasto es similar a los cloroplastos y se cree que se originan a partir de algas rojas endosimbiontes (Mazmudar & Striepen, 2007). Existen casos atípicos, por ejemplo, el género *Mycobacterium* posee una FAS I para sintetizar ácidos micólicos de 70 a 80 carbonos, y luego los modifica o continúa su elongación con una FAS II (Rock, 2008). En ambas sintasas se requiere que el

grupo acilo se encuentre activado como acil-tioéster, por lo tanto, se encuentran unidos a una proteína pequeña o dominio llamada proteína portadora de acilos. Las ACPs portan a los residuos acilo durante las reacciones catalizadas por las sintasas de ácidos grasos. En el sistema FAS I, la ACP es un dominio del polipéptido y presenta una gran plasticidad estructural, que le permite la reactividad del acilo que acarrea con los otros dominios de la sintasa de ácidos grasos (Byers & Gong, 2007). En el sistema FAS II, la ACP es una proteína independiente, cuya estructura le permite interactuar con las enzimas que llevan a cabo las diferentes reacciones de síntesis y modificaciones del ácido graso (Rock, 2008).

## 2. Organización estructural de los sistemas PKS

Los policétidos son un grupo estructuralmente diverso de compuestos, muchos exhiben propiedades farmacológicas. Se han caracterizado policétidos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, anticancerígenas e inmunosupresoras (Chan *et al*, 2009). La síntesis de policétidos consiste en rondas sucesivas de condensaciones decarboxilativas, entre una variedad de compuestos y un aciltioéster. Las proteínas que llevan a cabo dichas condensaciones se denominan PKS que son sistemas análogos a las sintasas de ácidos grasos. Al igual que las sintasas de ácidos grasos, las policétido sintasas pueden ser del tipo I (multifuncionales) o del tipo II (monofuncionales) (Fig 2). Otro tipo de PKS pertenece a las policétido sintasas de tipo III que son proteínas homodiméricas simples que sintetizan policétidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias (Miyanga *et al*, 2007). Las policétido sintasas consisten de tres unidades básicas (Fig. 2), una acil transferasa (AT del inglés acyltransferase), que se encarga de activar el producto de inicio o elongación, una ACP y una cetosintasa (KS del inglés ketosynthase), que es la que cataliza la condensación decarboxilativa entre un acil-ACP que será la unidad de elongación y otro grupo acilo ya unido a la PKS. Adicionalmente, se pueden encontrar otras actividades enzimáticas como keto reductasa (KR del inglés ketoreductase), deshidratasa (DH del inglés dehydratase) y enoil reductasa (ER del inglés enoylreductase) (Fíg. 2). De forma interesante estas proteínas, a diferencia de las sintasas de ácidos grasos, usan como unidades de inicio y elongación, no sólo al malonil-CoA, también a otras moléculas como metilmalonil-CoA, etilmalonil-CoA, cloroetilmalonil-CoA, hidroximalonil-CoA, aminomalónil-CoA, propionil-CoA o benzoil-CoA (Chan *et al*, 2009, Fischbach & Walsh, 2006). También pueden usarse

como unidades de extensión compuestos unidos a ACP, tales como metoximalonil-ACP, hidroximalonil-ACP, aminomaloni-ACP y gliceril-ACP (Chan *et al*, 2009). Como en el caso de las sintasas de ácidos grasos, la unidad de carga es transtiolada a una proteína acarreadora de acilos.

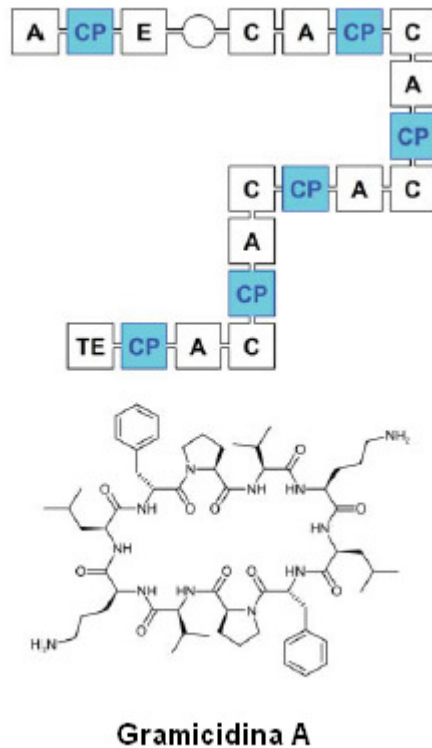


**Fig. 2.** Esquema que representa una PKS tipo I y una PKS II. **a)** En la PKS I cada unidad del policétido es sintetizada en un módulo y cada módulo tiene los dominios necesarios para su producción. La sintasa de DEBS (6-deoxieritronolido B que es precursor en la síntesis de eritromicina) está compuesta de 3 polipéptidos con 2 módulos cada uno. La CP portará tanto a las cadenas en crecimiento como a las unidades de elongación durante la síntesis del policétido. **b)** La actinorodina es sintetizada en una PKS II donde cada actividad es codificada por separado, y la proteína portadora interaccionara con la proteína en turno. Donde AT es acil transferasa, KS es cetosintasa, KR es cetoreductasa, CP es proteína portadora de grupos acilo, DH es deshidratasa, ER es enoil reductasa y TE es tioesterasa. Los círculos representan las interacciones entre las proteínas (Mercer & Burkart, 2007).

### 3. Organización estructural de los sistemas NRPS

Las NRPSs son proteínas que participan en la síntesis de productos ensamblados a partir de aminoácidos. Estas sintetisas funcionan con la misma lógica que las policétido sintasas. Las NRPSs básicas consisten en un dominio de adenilación, una

PCP (PCP del inglés *peptidyl carrier protein*), que es análoga a las ACPs, y un dominio de condensación. En este sistema, como en el de las PKSs, las unidades monoméricas son incorporadas en un oligómero lineal por reacciones químicas iterativas (Fig. 3). Los monómeros que serán incorporados para el caso de las sintetisas de péptidos no ribosomales son aminoácidos. En esta vía, además de poderse incorporar los 20 aminoácidos proteínogénicos, se pueden incorporar toda una variedad de aminoácidos no proteínogénicos y aril-ácidos (Walsh, 2003). Antes de ser incorporados, los aminoácidos son activados por el dominio de adenilación como aminoacil-AMP y posteriormente son unidos al tioéster de la holo-PCP. El dominio de condensación catalizará la formación de un enlace peptídico entre el péptido unido al peptidil-PCP donador y la unidad de elongación. Adicionalmente, se han encontrado sistemas híbridos de policétido sintasas-sintetisas de péptidos no ribosomales (PKSs-NRPSs). Existe gran interés tanto en la estructura como en la función de las proteínas de estos sistemas, ya que éstas pueden ser manipuladas y combinadas para la formación de productos diseñados.



**Fig. 3.** Esquema que representa una NRPS. La sintetasa Grs es la responsable de la producción de gramicidina A. El producto es un dímero sintetizado en 2 rondas sucesivas de la actividad de la sintetasa. Donde A es el dominio de adenilación, CP es la proteína acarreadora de péptidos, C es el dominio de condensación y TE es el dominio de tioesterasa (Mercer & Burkart, 2007).

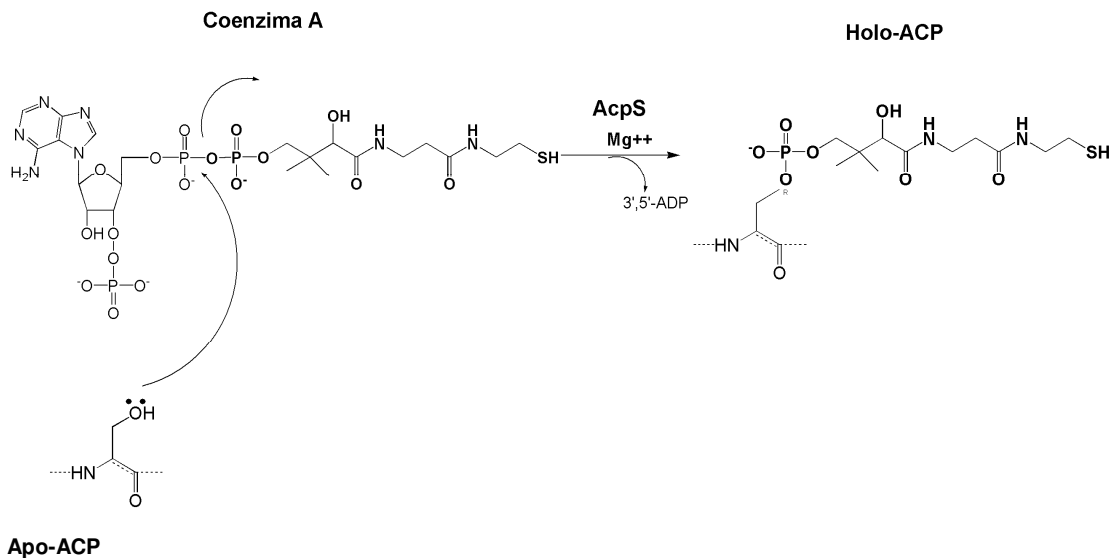
#### 4. Proteínas portadoras de acilos en FAS, PKS, NRPS y sistemas relacionados

Las ACPs son componentes de FAS, PKS y NRPS, y se han estudiado porque participan interaccionando con muchas enzimas durante la síntesis de ácidos grasos, policétidos y péptidos no ribosomales. Las ACPs pertenecen a una familia de proteínas acarreadoras que son cofactores indispensables en vías de síntesis de metabolitos, incluyendo la síntesis de ácidos grasos, endotoxinas, glicolípidos, cofactores metabólicos y moléculas señalizadoras (Byers & Gong, 2007). Las ACPs son proteínas solubles y termoestables que proveen de un ambiente hidrofílico a los ácidos grasos en crecimiento. Las ACPs se caracterizan por ser pequeñas (su tamaño es menor a 100 aminoácidos) y ácidas (su punto isoeléctrico es aproximadamente 4). Todas las ACPs poseen el grupo prostético de la 4'-PP, al cual se unen todos los residuos intermediarios en crecimiento. El grupo prostético es parte estructural de la coenzima A (CoA), y existe una enzima encargada de transferir el grupo prostético de la CoA a la ACP, dicha enzima es una fosfopanteteinil transferasa (PPT) (Fig. 4). La 4'-PP se une por medio de un enlace fosfodiéster a una serina conservada de las ACPs (Rock, 2008). Se ha hipotetizado que la interacción entre las ACPs con la PPT se debe principalmente a interacciones electrostáticas entre la hélice 2 de la ACP con una región hidrofóbica cercana al sitio activo de la enzima (Byers & Gong, 2007). La ACP más estudiada es la AcpP de *Escherichia coli*. Esta proteína tiene 77 aminoácidos (8.85 kDa) y un punto isoeléctrico de 4.1. Esta proteína está compuesta por  $\alpha$ -hélices, y se ha visto que después de ser sujeta a desnaturalización por calor o pH puede volver a su conformación nativa *in vitro*. La AcpP es una proteína muy abundante, en *E. coli* constituye aproximadamente el 0.25% del total de proteínas solubles (Rock, 2008).

En bacterias Gram-positivas, la proteína portadora de D-alanina (Dcp) es una PCP que contribuye a la formación de D-alanil-ácido lipoteicoico. La superficie de las bacterias Gram-positivas está compuesta por una membrana interna y por una pared celular en su superficie las cuales están compuestas por diferentes estructuras, por ejemplo, los glicopolímeros, entre los que se encuentran los ácidos teicoicos de pared celular y el ácido lipoteicoico (LTA). Estas estructuras pueden presentar diferentes modificaciones que permiten su adaptación a condiciones de estrés. Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus* la modificación del ácido lipoteicoico con D-alanina le permite a la bacteria defenderse de péptidos antimicrobianos producidos por las células del hospedero (Weidenmaier & Peschel, 2008). La D-alanilación es



una modificación que permite a los organismos modular la carga de las membranas, regular la unión de ligandos y el control de las propiedades de la pared celular. Para la síntesis del D-alanil-ácido-lipoteicoico es necesaria la presencia de los genes *dltA*, *dltC*, *dltB* y *dltD*. Los genes *dltA* y *dltC* son necesarios para la síntesis de la ligasa portadora de D-alanina (Dcl) y de la Dcp, respectivamente. Adicionalmente, los genes *dltB* y *dltD* codifican para una proteína transportadora y una proteína que facilita la unión entre la Dcp y Dcl (Kiriukhin & Neuhaus, 2001). La Dcp es una proteína de 81 aminoácidos que, como las ACPs, necesita ser modificada con la 4'-PP para ser activa. La D-alanina es activada como D-alanil-AMP por la enzima Dcl y posteriormente transferida a la holo-Dcp (Neuhaus & Baddiley, 2003). La Dcp, además de acarrear a la D-alanina, es necesaria para su translocación al LTA (Kiriukhin & Neuhaus, 2001).



**Fig. 4.** Transferencia de la 4'-fosfopanteteína desde la Coenzima A a la ACP. En esta reacción la fosfopanteteinil transferasa (AcpS) cataliza la transferencia de la 4'-fosfopanteteína a una serina conservada de las ACPs (Ramos-Vega, 2009).

Las ACPs tienen básicamente la misma función en FAS, PKS y NRPS. Sin embargo, están sujetas a diferentes interacciones en cada sistema. En los sistemas tipo I, las interacciones dominio-ACP se dan en cada paso de la biosíntesis, pero a lo largo de un polipéptido, por ello las interacciones son reducidas. En el sistema tipo II, la ACP tiene que interactuar con cada proteína por separado, en la secuencia correcta y múltiples veces, haciendo que la interacción sea un paso muy importante en la síntesis (Mercer & Burkart, 2007). A pesar de las diferencias en los sistemas

de síntesis en los que participa, y de los productos que se generan, las ACPs mantienen una gran similitud estructural.

## 5. Estructura de las ACPs

Las ACPs son proteínas flexibles, pequeñas, cuya estructura permite la adición de 4'-PP y su subsecuente acilación. Debido a su inherente flexibilidad, presentan ciertas dificultades para obtener datos estructurales de cristales con rayos X. La mayoría de las estructuras disponibles sobre ACPs se han generado con resonancia magnética nuclear (RMN), entre ellas, una PCP del tercer módulo de la sintetasa de tirocidina de *Bacillus brevis*, la ACP de *Bacillus subtilis*, la ACP de *Mycobacterium tuberculosis* y OctACP de *Streptomyces risosus*. Existen dos estructuras de cristales de butiral-ACP de *E. coli* y un cocrystal de ACP con AcpS de *E. coli* (Mercer & Burkart, 2007). Al conjuntar la información estructural existente de las ACPs se logró una visión más clara de cómo puede ser su interacción con AcpS para adquirir el grupo prostético de 4'-PP (Fig. 4). Estos estudios estructurales muestran una proteína que adopta un plegamiento básicamente de  $\alpha$ -hélices: contiene tres hélices principales y, a menudo, una pequeña cuarta hélice. Se puede ver que hay un 'lazo' que conecta las hélices I y II donde se encuentra el sitio activo de la serina (Mercer & Burkart, 2007). El grupo prostético de 4'-PP es transferido desde la CoA a esta serina conservada que forma parte de un dominio consenso de las ACPs que es: [DEQGSTALMKRH]-[LIVMFYSTAC]-[GNQ]-[LIVMFYAG]-[DNEKHS]-**S**-[LIVMST]-{PCFY}-[STAGCPQLIVMF]-[LIVMATN]-[DENQGTAKRHLM]-[LIVMWSTA]-[LIVGSTACR]-{LPIY}-{VY}-[LIVMFA] (<http://www.expasy.org/prosite/PDOC00012>). La secuenciación de cientos de genomas bacterianos revela el grado de conservación entre ortólogos de ACPs de FAS II. La similitud es más acentuada justo en el motivo de unión a 4'-PP. Además, la conservación es más aparente en la estructura tridimensional, donde la gran mayoría de ACPs muestran de 3 a 4  $\alpha$ -hélices (Byers & Gong, 2007). También es importante la flexibilidad que muestran las ACPs al interactuar con diferentes proteínas, dependiendo del grupo acilo que acarrean. Uno de los posibles modelos es que la unión con cada intermediario acilo altera la estructura de la ACP y esto es reconocido selectivamente por una proteína blanco (Wu *et al*, 2009). Un ejemplo de este fenómeno fue confirmado con la determinación de la estructura cristalina de la butiril-AcpP de *E. coli* (Wu *et al*, 2009). Aunque todavía falta incursionar en más estudios al respecto, los análisis

estructurales han sugerido un mecanismo por el cual las enzimas pueden seleccionar su correspondiente sustrato acil-ACP a través de reconocimiento de superficie-carga (Roujeinikova *et al*, 2007).

## **6. Proteínas que interactúan con ACPs**

Una característica remarcable de las ACPs de cualquier sistema es la especificidad con la que interactúa con otras proteínas. Estudios recientes de proteómica mostraron que la ACP de *E. coli* es una proteína 'promiscua', ya que interactúa con más de 3 docenas de proteínas (Butland *et al*, 2005). Un tercio de estas proteínas fueron identificadas como participantes de FAS o metabolismo de lípidos.

A pesar de que las ACPs de los sistemas tipo I están confinadas a largos polipéptidos, mantienen su habilidad para interactuar con otros dominios, además de mantener disponible su 'brazo' de 4'-PP para continuar con la síntesis de sus productos. Las ACPs de tipo II tienen que interactuar con varias enzimas en el orden apropiado y en múltiples ocasiones. En cualquier caso, la ACP siempre requiere estar modificada con el grupo 4'-PP para ser funcional y portar un compuesto durante su biosíntesis. Por tanto, interactúa en primera instancia con fosfopanteteinil transferasas (PPTs) para ser activa. Luego podrá interactuar con aciltransferasas, cetoreductasas, enoilreductasas, cetosintasas o tioesterasas, etc; dependiendo del sistema, estas reacciones pueden ser únicas o repetidas, hasta obtener el producto deseado (Mercer & Burkart, 2007).

### **6.1. Fosfopanteteinil transferasas**

Las fosfopanteteinil transferasas representan un grupo importante de enzimas que modifican proteínas postraduccionalmente (Fig 4), que son activas en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios, incluyendo ácidos grasos, policétidos y péptidos no ribosomales (Lambalot *et al*, 1996). Basado en su homología, en su estructura y en sus blancos, se han clasificado en 3 grupos (Finking *et al*, 2002). El primer grupo es el de las ACP sintasas (AcpS), éstas reciben su nombre debido a la primer fosfopanteteinil transferasa que se ha caracterizado, la enzima AcpS de *E. coli* (Lambalot & Walsh, 1995). Cuenta con 120 residuos de amino ácidos y puede participar en la modificación tanto de ACPs de FAS como de PKS. Las estructuras cristalinas de algunos de los miembros de este grupo ha revelado que el ensamble de la enzima con su sustrato se lleva a cabo uniendo dos monómeros de AcpS que

rodean a la ACP (Sunbul *et al*, 2009). Cabe mencionar que se ha descrito una enzima que retira el grupo prostético de la 4'-PP de la holo-ACP, generando apo-ACP y 4'-PP, la cual es llamada ACP fosfodiesterasa (Thomas & Cronan, 2005).

El segundo grupo de fosfopanteteinil transferasas es el del tipo Sfp, pues el prototipo fue caracterizado en *Bacillus subtilis*, y participa en la síntesis de un péptido antimicrobiano denominado surfactina producto de una NRPS (Mootz *et al*, 2001). Los miembros de este grupo son del doble de tamaño de las AcpS y tienen un amplio rango de blancos, modificando ACPs de PKS, FAS así como PCPs de NRPS (Mofid *et al*, 2002; 2004). El tercer tipo corresponde a proteínas similares a las fosfopanteteinil transferasas que se encuentran en los dominios carboxilos de las FAS tipo I (Stuible *et al*, 1997).

Muchos organismos están equipados con múltiples fosfopanteteinil transferasas (PPTasas), por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se encuentran AcpS y Sfp (Mootz *et al*, 2001). En *E. coli* se han identificado AcpS, EntD y AcpT. La proteína EntD es una PPT tipo Sfp, y funciona durante la síntesis del sideróforo enterobactina (Lambalot *et al*, 1996). La proteína AcpT participa en la modificación de dos proteínas acarreadoras en una cepa patógena de *E. coli* (De Lay & Cronan, 2006a, Sunbul *et al*, 2009).

## 7. Síntesis de ácidos grasos

Las ACPs se describieron primero por su participación en el proceso esencial de síntesis de ácidos grasos. A continuación se describen las reacciones de síntesis de ácidos grasos, utilizando como modelo el sistema FAS II.

La síntesis de ácidos grasos consta de dos etapas: la de inicio y la de elongación. En la etapa de inicio se sintetiza malonil-CoA a partir de la acetil-CoA (Fig. 5), y posteriormente, malonil-ACP a partir del malonil-CoA (Fig. 6). Acetil-CoA y malonil-ACP funcionan como unidades de inicio y elongación, respectivamente. Adicionalmente, en la etapa de inicio se presenta la primera reacción de condensación del producto malonil-ACP con acetil-CoA (Fig. 7). El producto de tal reacción es la acetoacetil-ACP que es el sustrato para la siguiente etapa de la síntesis de ácidos grasos, la elongación.

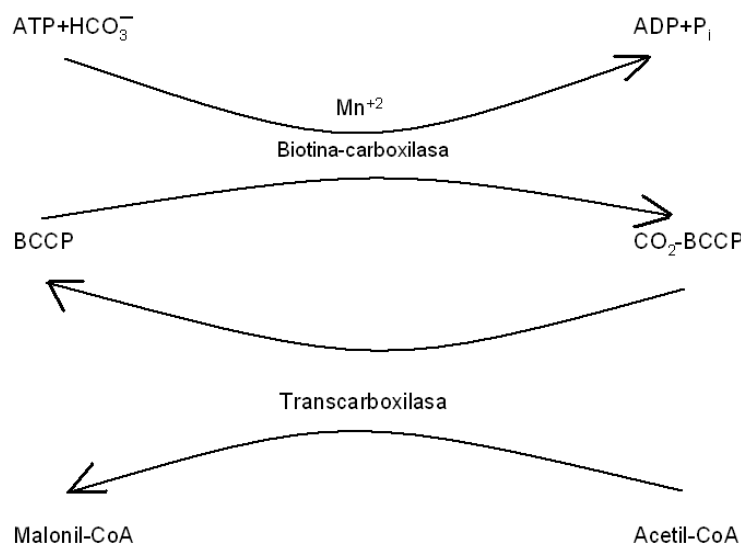
En los ciclos de elongación (Fig. 8), el acil-ACP será sustrato de repetidas reacciones de condensación, primera reducción, deshidratación y segunda reducción. Después de la segunda reacción de reducción, el producto acil-ACP

completamente reducido será condensado con malonil-ACP para un nuevo ciclo de elongación de la cadena de acilo. Después de esta etapa se formarán generalmente cadenas de acilo de número par. Finalmente, el producto acil-ACP será sustrato de diferentes acil transferasas para la transferencia del acilo a otras vías, por ejemplo, la síntesis de fosfolípidos, lípido A, lipoproteínas o moléculas señal (López-Lara & Geiger, 2010).

## 7. 1. Reacciones de inicio

### 7.1.1. Acetil CoA carboxilasa

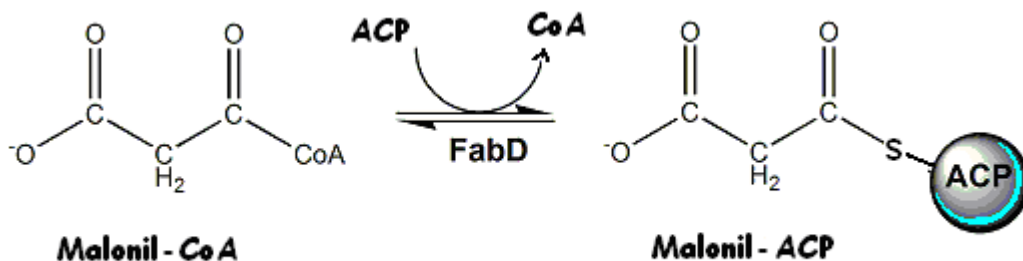
La acetil CoA carboxilasa (ACC) cataliza la primera reacción en FAS, que es la carboxilación dependiente de biotina de acetil-CoA para generar malonil-CoA. Dicha reacción se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa, la biotina, que se encuentra covalentemente unida a la BCCP (del inglés *biotin carboxyl carrier protein*, producto del gen *accB*) es carboxilada con bicarbonato por la subunidad carboxilasa (el producto del gen *accC*), el producto formado es carboxibiotina (Fig. 5). En la segunda etapa se lleva a cabo la transferencia del grupo carboxil desde la carboxibiotina a la acetil-CoA. Ésta es catalizada por la transcarboxilasa heterodimérica (producto de *accA* y *accD*). El producto formado es malonil-CoA (Fig. 5) (Cronan & Waldrop, 2002; Rock, 2008).



**Fig. 5.** Reacción de inicio en la biosíntesis de ácidos grasos. La síntesis de ácidos grasos inicia con la carboxilación del acetil-CoA para formar malonil-CoA. Donde BCCP es proteína portadora de carboxil biotina (Rock, 2008).

### 7.1.2. Malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD)

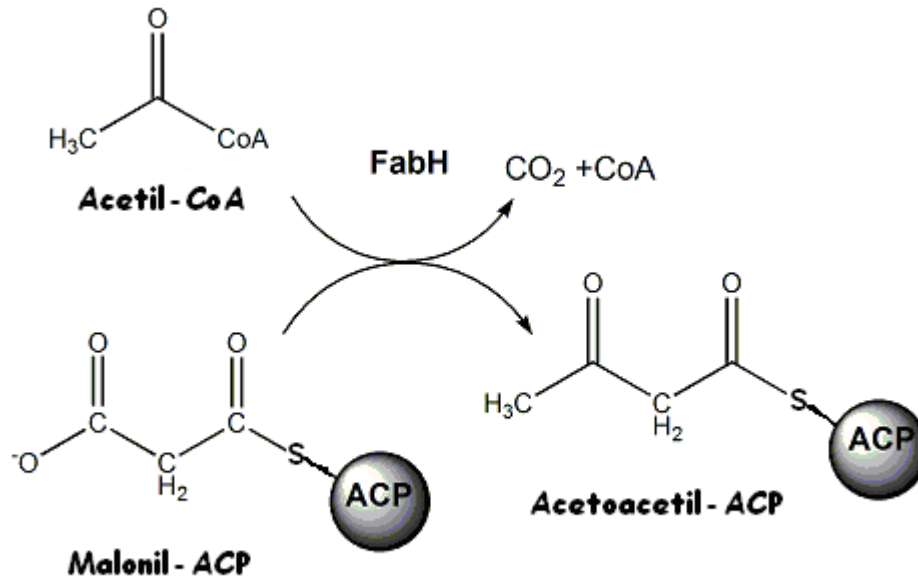
La enzima malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD) transfiere el grupo malonato desde el malonil-CoA a la ACP, formando malonil-ACP (Fig. 6). En dicha reacción, el grupo malonil se transfiere primero a una serina conservada de la FabD, donde el CoA es liberado; posteriormente se une la ACP y el malonil es transferido al -SH terminal de la 4'-fosfopanteteína en una reacción reversible (Florova *et al*, 2002). Esta reacción sucede tanto en la síntesis de ácidos grasos como en la síntesis de policétidos (Florova *et al*, 2002). Se conoce que FabD es de naturaleza monomérica y mutantes termosensibles revelaron que es esencial para la FASII (Rock, 2008).



**Fig. 6.** La enzima malonil-CoA:ACP-transacilasa (FabD) lleva a cabo la transferencia del grupo malonil de la CoA a la ACP para formar malonil-ACP.

### 7.1.3. 3-Cetoacil ACP sintasa III (FabH). Primera condensación

La enzima cetoacil-ACP sintasa III (FabH) lleva a cabo la tercera reacción durante la FAS II, que corresponde a la condensación descarboxilativa del malonil-ACP con acetil-CoA para formar acetoacil-ACP (Fig. 7). La FabH es una proteína esencial. Se dice que FabH tiene dos funciones, la de iniciar el ciclo de elongación, siendo la enzima que determina el número de ácidos grasos que se producirán y la de determinar el tipo de ácidos grasos que serán utilizados en la membrana del organismo (Rock, 2008). Experimentos *in vivo* e *in vitro* con FabH de *Streptomyces glauscescens* han demostrado que esta 3-cetoacil-ACP sintasa tiene afinidad sólo por las ACPs para la síntesis de ácidos grasos y no por las ACPs para la síntesis de policétidos (Florova *et al*, 2002).



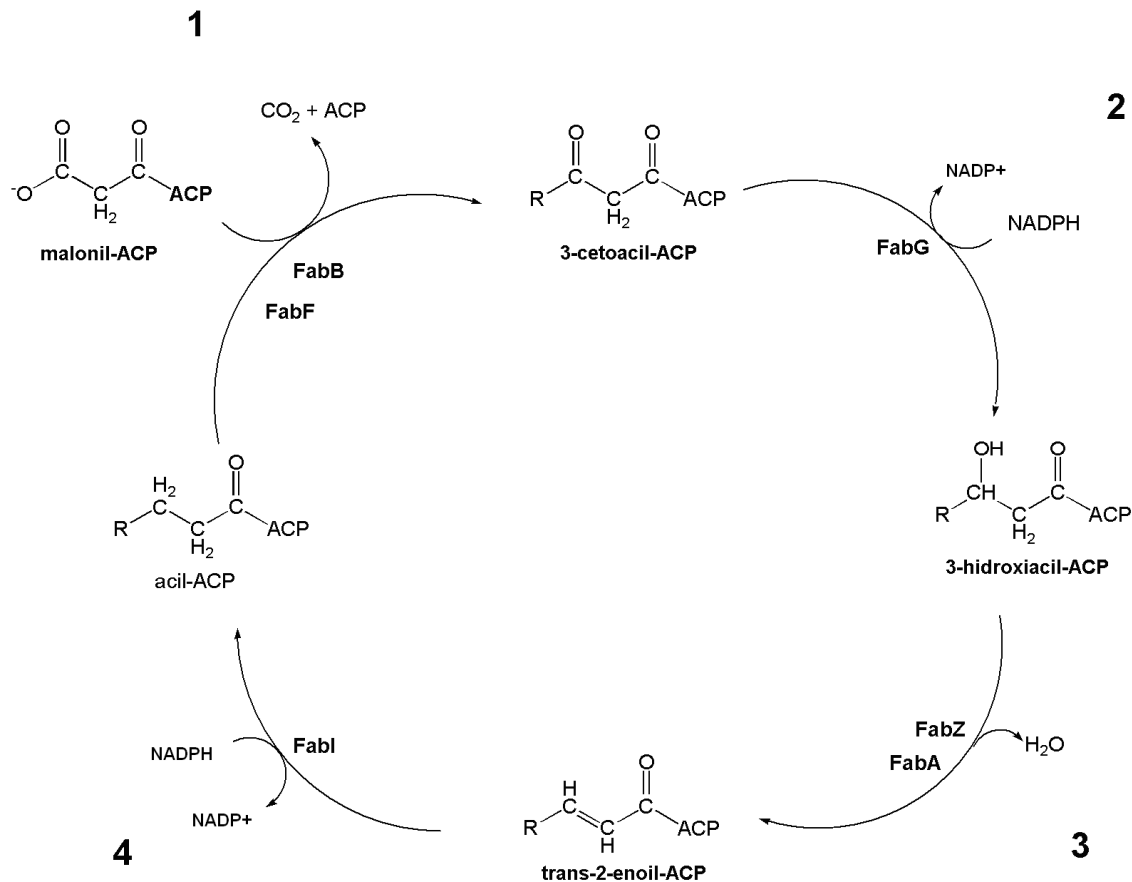
**Fig. 7.** Condensación decarboxilativa del malonil-ACP con acetil-CoA. La reacción es catalizada por la enzima 3-cetoacil-ACP-sintasa III (FabH). El producto formado es acetoacetyl-ACP.

## 7. 2. Ciclos de elongación

Cuatro enzimas participan en cada ciclo iterativo de elongación, utilizando el compuesto malonil-ACP en cada ciclo de la síntesis del ácido graso. Las reacciones durante los ciclos de elongación son: condensación, primera reducción, deshidratación y segunda reducción (Fig. 8). El producto formado, acil-ACP, será sustrato para la condensación con malonil-ACP catalizada por la enzima FabB o FabF.

### 7.2.1. 3-cetoacil-ACP sintasas I y II (FabB y FabF). Condensación

Las enzimas FabB o FabF catalizan la condensación decarboxilativa entre el acil-ACP con malonil-ACP para la elongación de la cadena (Fig. 8). Esta reacción sucede en dos pasos. En el primero, el grupo acilo es unido a la cisteína del sitio activo de la enzima formándose el intermediario acil-enzima. En el segundo, el intermediario acil-enzima es condensado con el malonil para la formación del 3-cetoacil-ACP, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y enzima libre (Rock, 2008).



**Fig. 8.** Ciclos de elongación durante la síntesis de ácidos grasos en *E. coli*. Las reacciones son 1) condensación, catalizada por las enzimas FabB o FabF, 2) primera reducción, catalizada por FabG, 3) deshidratación, catalizada por FabA o FabZ, 4) segunda reducción, catalizada por FabI. El producto acilo reducido será condensado con malonil-ACP para la elongación de la cadena. Esta condensación es catalizada por las enzimas FabB o FabF (Ramos-Vega, 2009).

### 7.2.2. 3-cetoacil-ACP-reductasa (FabG). Primera reducción

La enzima 3-cetoacil-ACP reductasa (FabG) lleva a cabo la primera reacción de reducción del ciclo de elongación, siendo su sustrato 3-cetoacil-ACP. El producto formado es 3-hidroxiacil-ACP (Fig. 8). Esta enzima es esencial y opera en conjunción con el cofactor NADPH. FabG cataliza la reducción del grupo carbonilo en la posición C3 a un hidroxilo por la adición de dos átomos de hidrógeno. Las enzimas reductasas son enzimas tetraméricas que forman parte de la superfamilia dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR, del inglés short chain dehydrogenase-reductase superfamily) (White *et al*, 2005).



### **7.2.3. 3-hidroxiacil-ACP-deshidratasa (FabA). Deshidratación**

En el tercer paso del ciclo de elongación ocurre la deshidratación de 3-hidroxiacil-ACP, generándose trans-2-enoil-ACP (Fig. 8). Existen dos isoenzimas que pueden llevar a cabo la reacción de deshidratación: FabA y FabZ. La deshidratasa FabA, además de llevar a cabo la reacción de deshidratación, tiene la habilidad de isomerizar el trans-2- a cis-3-decenoil-ACP, que resulta un paso importante en la formación de ácidos grasos insaturados en *E. coli*. La distribución de FabA se encuentra limitada a FAS II de bacterias Gram-negativas. FabA siempre se ha encontrada asociada a FabB (Rock, 2008; White *et al*, 2005). Se ha encontrado que FabA procesa más eficientemente ácidos grasos de 10 carbonos. Tal especificidad se debe a la presencia de una histidina conservada, que forma parte de un túnel estructural que actúa como “regla molecular” que discrimina a ácidos grasos de otras longitudes (Rock, 2008; White *et al*, 2005).

La segunda deshidratasa, FabZ, se encuentra en casi todas las bacterias y no tiene actividad de isomerasa. FabZ funciona tanto en la síntesis de ácidos grasos saturados como insaturados y reconoce como substrato a acilos de diferentes longitudes (White *et al*, 2005). Entre FabA y FabZ existe muy poca homología (28% de identidad, 50% de similitud). Curiosamente, se ha encontrado que las bacterias Gram-positivas carecen de FabA y, sin embargo, tienen ácidos grasos insaturados. En estas bacterias, la enzima que substituye a FabA en sus actividades de isomerasa y reductasa es una enzima más parecida a FabZ (Rock, 2008).

### **7.2.4. Enoil-ACP-reductasa (FabI). Segunda reducción**

La enoil-ACP-reductasa (FabI) cataliza la segunda reducción de los ciclos iterativos en la síntesis de ácidos grasos (Fig. 8). Esta enzima utiliza como cofactor el NADH y reduce el doble enlace entre el C2 y C3 generado durante la reacción de deshidratación. El acil-ACP formado será substrato para un nuevo ciclo de elongación (White *et al*, 2005). FabI ha sido ampliamente estudiada debido a que es blanco de muchos agentes terapéuticos, como la isoniazida y el triclosan. Adicionalmente, FabI es regulador del grado de elongación de ácidos grasos. FabI juega un papel determinante en la terminación de los ciclos de elongación de la síntesis de ácidos grasos (Heath & Rock, 1995).

## 8. Aciltransferasas

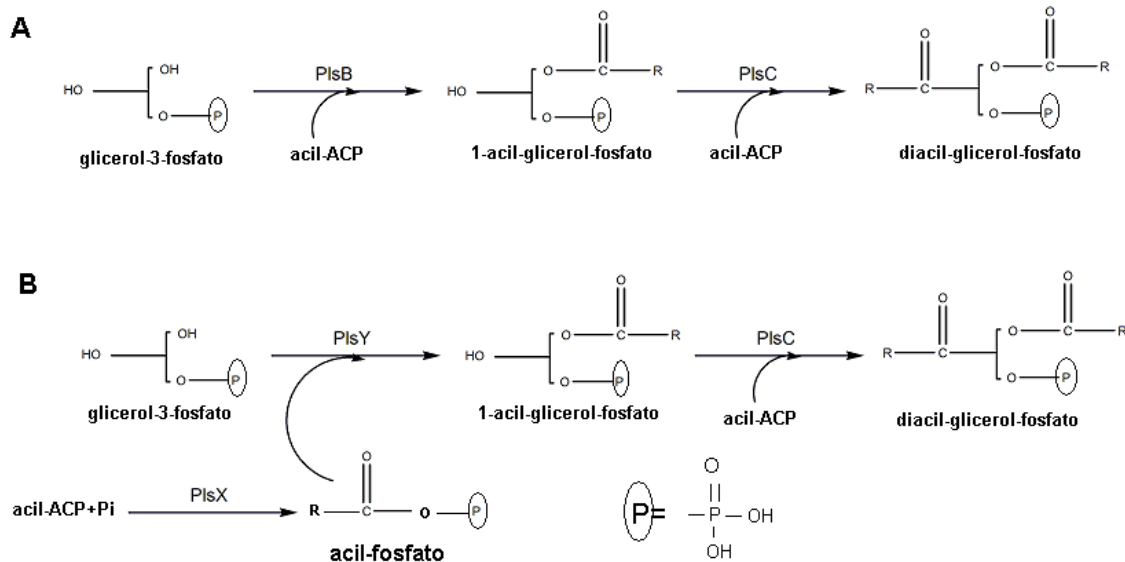
Las aciltransferasas comprenden un amplio grupo de enzimas que transacilan grupos acil-tioéster. Las aciltransferasas pueden transferir grupos acilos de 2 carbonos (reacciones de inicio de FAS y PKS) hasta compuestos de más de 20 carbonos (en la síntesis de lípidos). Los intermediarios acil-ACPs interactúan con una serie de enzimas que preponderantemente son aciltransferasas. De esta forma, la variedad de ácidos grasos sintetizados, ya sean de diferente número de C, o con diferentes grados y tipos de insaturaciones, son selectivamente transferidos a otros compuestos blanco (Byers & Gong, 2007).

A continuación se describen algunos ejemplos donde aciltransferasas llevan a cabo la transferencia de acilos hacia otros compuestos blanco.

Las bacterias Gram-negativas poseen un lipopolisacárido en su membrana externa que se compone de 3 estructuras básicas, el lípido A, un núcleo y el antígeno O. El lípido A a su vez se compone de un disacárido de *N*-acetilglucosamina, al que se le unen varios ácidos grasos. En *E. coli* se han caracterizado 4 aciltransferasas (LpxA, LpxD, LpxM y LpxL) dependientes de ACP, que transfieren 6 ácidos grasos al lípido A (Raetz *et al*, 2007; Byers & Gong, 2007). LpxA cataliza la primera reacción en la síntesis del lípido A, que es la acilación del monosacárido UDP-*N*-acetilglucosamina, en el que se requiere específicamente de *R*-3-hidroxiiristoil-ACP como sustrato donador. Después de un paso de deacetilación, catalizado por LpxC, LpxD cataliza la acilación con una segunda cadena de *R*-3-hidroxiiristato. En este paso se forma la UDP-2,3-diacilglucosamina. LpxL y LpxM catalizan la adición de residuos secundarios de lauroil y miristoil a la unidad distal de glucosamina (Raetz *et al*, 2007).

Los grupos acilos producto de la vía de síntesis de ácidos grasos, son transferidos a fosfolípidos de membrana. En esta vía, los acil ACPs son sustrato de la acil transferasa PlsB, que transfiere el grupo acilo a la posición *sn*-1 del glicerol 3-fosfato (Fig. 9A), formando 1-acil-glicerol-fosfato. Sin embargo, esta enzima sólo se encuentra en algunas bacterias Gram-negativas. En la mayoría de las bacterias, en lugar de PlsB, se encuentra el sistema PlsX/PlsY (Paoletti *et al*, 2007; Zhang & Rock, 2008b). PlsX cataliza la formación de acil fosfato (acil-PO<sub>4</sub>), usando acil-ACP como sustrato. Después, PlsY cataliza la acilación en la posición *sn*-1 del glicerol fosfato para la formación de 1-acil-glicerol-fosfato (Fig. 9B). Posteriormente, en ambos sistemas, la enzima PlsC esterifica la posición *sn*-2 del 1-acil-glicerol-fosfato

(Fig. 9). La proteína PlsC es una enzima que se encuentra en todas las bacterias y puede usar como sustratos tanto a acil-ACP como acil-CoA en *E. coli*. Sin embargo, en bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, sólo usa acil-ACP. PlsB tiene preferencia por ácidos grasos saturados mientras que PlsC tiene preferencia por ácidos grasos insaturados (Rock, 2008).

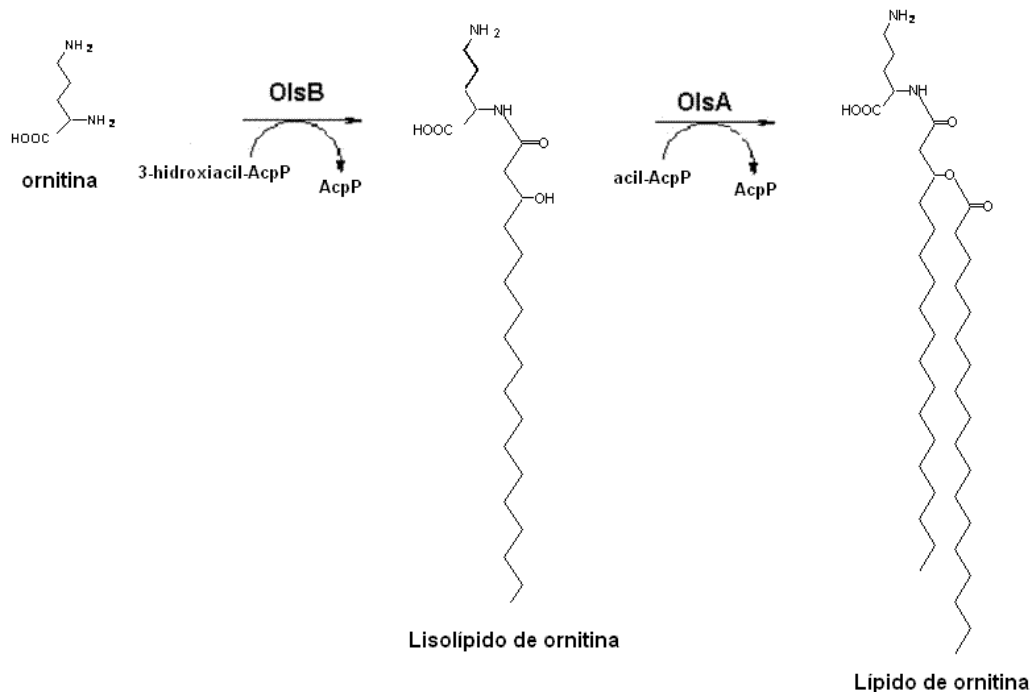


**Fig. 9.** Transferencia de ácidos grasos a los lípidos de membrana. Existen dos sistemas, en el primero, PlsB transfiere el acilo desde el acil-ACP a la posición *sn*-1 del glicerol fosfato, formando 1-acil-glicerol-fosfato (**A**). En el segundo sistema no existe PlsB, en su lugar PlsX cataliza la formación de acil-fosfato desde acil-ACP y después PlsY transfiere el grupo acilo desde el acil-fosfato al *sn*-1 del glicerol fosfato, formando 1-acil-glicerol-fosfato (**B**). Posteriormente, en ambos sistemas la enzima PlsC esterifica la posición *sn*-2 del 1-acil-glicerol-fosfato (Ramos-Vega, 2009).

El “quórum sensing” es un comportamiento derivado de la habilidad de los microorganismos de percibir y responder a la densidad poblacional. Los acil-ACPs también funcionan durante la síntesis de *N*-acil homoserina lactonas (AHLs, del inglés *N*-acylhomoserine lactones) que en bacterias Gram-negativas son moléculas señaladoras responsables del fenómeno de quórum sensing (Fuqua *et al*, 2001). Las bacterias producen las *N*-acil homoserina lactonas que se acumulan en el ambiente externo y que actúan como autoinductores, desencadenando una cascada de señales. La vía para la síntesis de estas moléculas se caracterizó inicialmente en la bacteria marina *Vibrio harveyi* donde las AHLs funcionan para la inducción de la bioluminiscencia. En esta vía, LuxR es un activador transcripcional que se une al autoinductor y promueve la transcripción del operón de la luciferasa. LuxI es una de las proteínas que se transcriben y cataliza la unión del grupo acilo desde un acil-

ACP a la metionina donada por S-adenosil-metionina. Posteriormente, la metionina es lactonizada. En la bacteria *Vibrio fischeri* se ha encontrado que no es LuxI, más bien es AinS la que funciona como acil transferasa. AinS además de usar acil-ACP como sustrato puede usar acil-CoA pero con menor eficiencia (Byers & Gong, 2007; Fuqua & Greenberg, 2002).

Se ha reportado que en condiciones de bajo fósforo, los fosfolípidos de membrana pueden ser reemplazados por lípidos que no contienen fósforo. Por ejemplo, en *S. meliloti* se han encontrado los lípidos sulfoquinovosil-diacil-glicerol, diacil-gliceril-trimetil-homoserina y lípido de ornitina (Geiger *et al*, 1999). El lípido de ornitina consiste en un ácido graso 3-hidroxilado amidificado a ornitina y esterificado a su vez con otro residuo de ácido graso. La síntesis del lípido de ornitina sucede en dos pasos (Fig. 10). En el primero, la aciltransferasa OlsB acila a la ornitina usando 3-hidroxiacil-AcpP como sustrato. Los productos de esta reacción son lisolípidos de ornitina y holo-AcpP (Gao *et al*, 2004). En el siguiente paso, una segunda aciltransferasa, OlsA, acila al lisolípidos de ornitina a través del residuo OH del ácido graso. Esta enzima usa a acil-AcpP como sustrato y los productos formados son lípidos de ornitina y holo-AcpP (Weissenmayer *et al*, 2002).



**Fig. 10.** Síntesis de lípidos de ornitina. La aciltransferasa OlsB acila a la ornitina utilizando acil-AcpP como sustrato y formando lisolípidos de ornitina. OlsA acila al lisolípidos de ornitina en el residuo OH de su ácido graso, utilizando como sustrato acil-AcpP y formando lípidos de ornitina (Geiger *et al*, 2010).

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

Existen acil-ACPs que están implicados en la acilación de toxinas proteicas en bacterias. Tal es el caso de la pre-hemolisina, que es secretada por bacterias Gram-negativas (Issartel *et al*, 1991). La *E. coli* enteropatogénica al colonizar a su hospedero secreta una proteína tóxica llamada hemolisina. La hemolisina forma poros en las membranas de las células del sistema inmune del hospedero. En esta vía, una aciltransferasa denominada HlyC usa acil-ACPs de diferentes longitudes (C14 a C17), para modificar postraduccionalmente la pre-hemolisina. La hemolisina es sintetizada como prohemolisina no tóxica (proHlyA). Para ser activa, necesita de la transferencia de un grupo acilo desde acil-AcpP como donador para la formación de HlyA (Issartel *et al*, 1991). Esta actividad es catalizada por HlyC, que unirá el ácido graso a la proteína a través de un enlace amido. Posteriormente, la HlyA es secretada por la acción de las proteínas HlyB y HlyD (Hardie *et al*, 1991).

## 9. Síntesis de policétidos

Muchos procariontes tienen codificada en su genoma una sola ACP, básicamente responsable de la síntesis de ácidos grasos. La era post-genómica ha dejado al descubierto que muchas especies tienen docenas de homólogos de proteínas acarreadoras involucradas en la producción de metabolitos secundarios, como policétidos y péptidos no ribosomales. Por ejemplo, *Streptomyces avermitilis* tiene más de 85 ACPs (Ikeda *et al*, 2003). El sistema PKS se encuentra en bacterias filamentosas, de suelo y marinas, así como hongos y plantas, y es responsable de la síntesis de un amplio tipo de compuestos.

El módulo mínimo de PKS I consiste en 3 dominios en el siguiente orden: KS, AT y ACP. El dominio AT cataliza la transferencia del primer monómero al dominio ACP, usualmente metilmalonil-CoA o malonil-CoA. El dominio KS irá añadiendo carbonos al compuesto sintetizado mediante una condensación decarboxilativa. Existen dominios llamados auxiliares como KR, DH y ER, que están presentes en

algunos módulos, y por tanto, proveen diversidad a los policétidos sintetizados (Chan *et al*, 2009).

### **9.1. Unidades extensoras en síntesis de PKSs**

La enorme diversidad estructural que se observa en los policétidos, en parte, es resultado de la gran variedad de unidades de iniciación, unidades extensoras incorporadas, las modificaciones en los estados de oxidación de los grupos 3-ceto, la hidrolización y las posibilidades de ciclización de las cadenas sintetizadas (Chan *et al*, 2009). En cuanto a las unidades de extensión utilizadas, existen dos grandes grupos, las que se encuentran unidas a CoA y las unidas a ACP (Fig. 11).

#### **9.1.1. Unidades extensoras de PKSs unidas a CoA**

La CoA es un acarreador de acilos, es esencial tanto en el metabolismo primario como en el secundario. En la biosíntesis de policétidos, la CoA sirve de sustrato para la modificación postraduccional de las ACPs, que las convierte en formas activas de apo a holo ACPs, al adquirir el grupo prostético 4'-fosfopanteteína presente en la CoA. Una segunda función de la CoA es ser acarreadora de ácidos carboxílicos, que serán unidades extensoras en la síntesis de PKS (Chan *et al*, 2009).

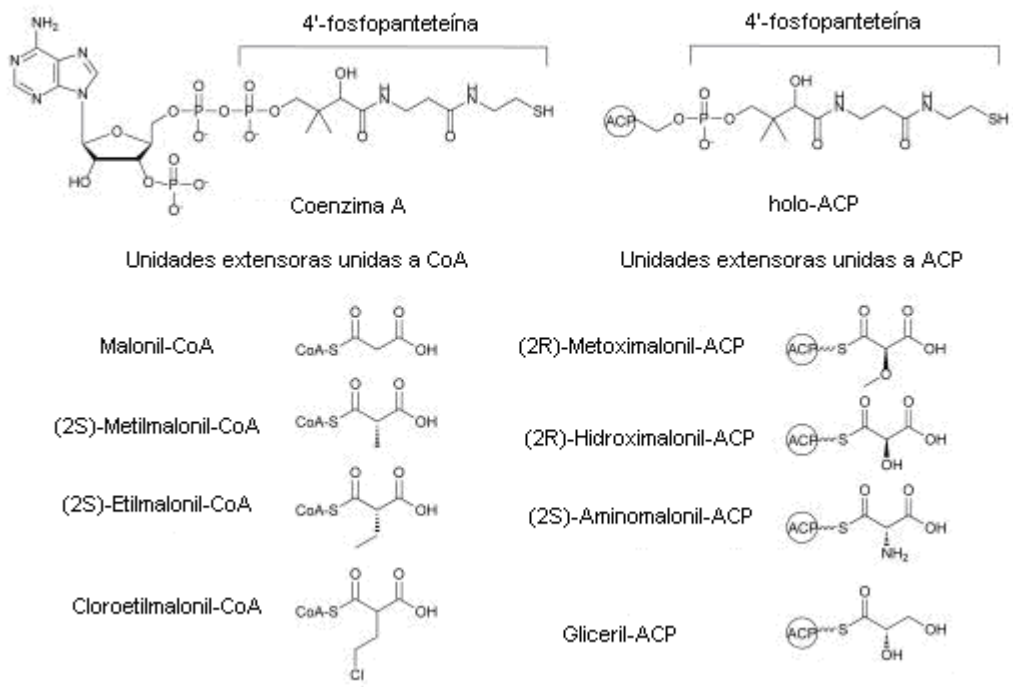
La unidad extensora utilizada con mayor frecuencia es malonil-CoA. Existen dos vías de síntesis de malonil-CoA, una de ellas involucra la carboxilación de acetil-CoA llevada a cabo por la acetil-CoA carboxilasa. La otra vía involucra la conversión directa de malonato en malonil-CoA que realiza la malonil-CoA sintetasa (Chan *et al*, 2009). El malonil-CoA es usado por todos los tipos de PKSs y en FAS, y en todos los casos su incorporación procede vía una condensación descarboxilativa Claisen, que se lleva a cabo entre el grupo carboxil del tioéster y el ión enolato generado por la descarboxilación del malonil-CoA. El resultado es la adición de un grupo acetil al policétido o ácido graso que está siendo sintetizado.

El (2S)-metilmalonil-CoA es el segundo grupo más comúnmente usado como unidad de extensión en las PKSs. Su incorporación en la síntesis de policétidos genera un grupo propionil en el policétido. El (2S)-metilmalonil-CoA puede ser sintetizado por diferentes vías, dependiendo de las condiciones de crecimiento y de las capacidades metabólicas del organismo. Como por ejemplo la carboxilación de

propionil-CoA, el rearrreglo y epimerización del succinil-CoA, el catabolismo de valina y la conversión de acetoacetil-ACP a (2S)-metilmalonil-CoA en varios pasos (Chan *et al*, 2009).

El (2S)-etilmalonil-CoA es otra unidad de extensión usada principalmente en PKS I y recientemente se ha encontrado en PKS III. El grupo butiril de algunos policétidos se ha atribuido como producto del uso de (2S)-etilmalonil-CoA como unidad extensora, lo que ha sido comprobado con experimentos de marcaje. Se ha descrito que la fuente directa de (2S)-etilmalonil-CoA es la carboxilación de butiril-CoA llevada a cabo por una carboxilasa que no se ha identificado aún. Sin embargo, pueden existir otras vías de síntesis para (2S)-etilmalonil-CoA (Chan *et al*, 2009).

La cloroetilmalonil-CoA es una unidad extensora utilizada con menor frecuencia en la síntesis de policétidos, de hecho, fue descubierta al estudiar el potencial metabólico de actinomicetos marinos, y actualmente sólo se ha descrito su uso con precisión por *Salinospora tropica* CNB-440 en la síntesis de salinosporamida A (Feling *et al*, 2003). La incorporación de cloroetilmalonil-CoA en salinosporamida A, es controlada por una megasintasa mixta de PKS/NRPS (Chan *et al*, 2009).



**Fig. 11.** Principales unidades extensoras utilizadas en síntesis de PKSs. De forma general se dividen en dos grupos, aquellas unidas a CoA y las que están unidas a ACP (Chan *et al*, 2009).

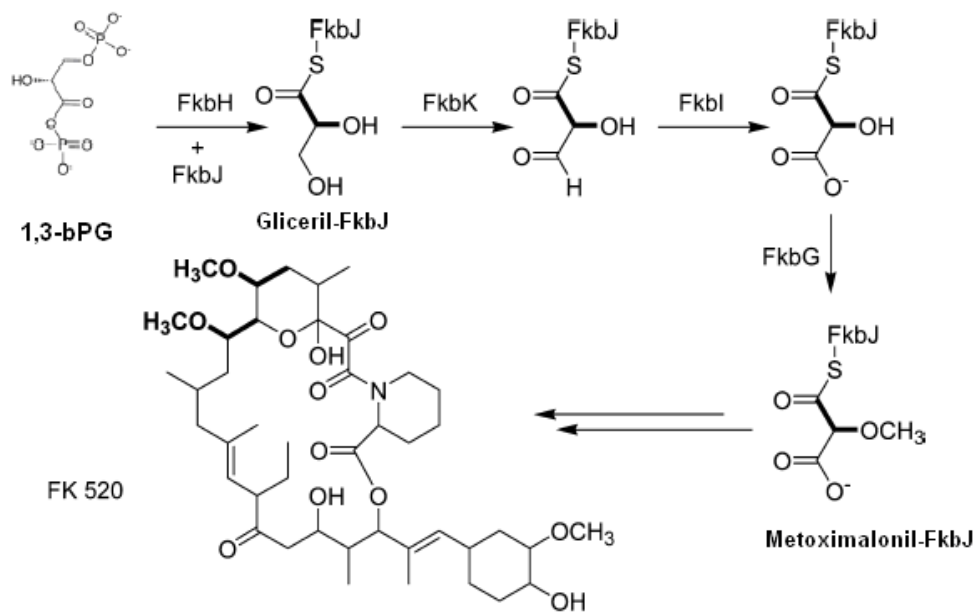
### 9.1.2. Unidades extensoras de PKSs unidas a ACP

Recientemente se ha descrito la existencia de unidades extensoras unidas covalentemente a la 4'-PP de una holo-ACP y son usadas únicamente para la síntesis de policétidos. Los genes que codifican para la biosíntesis de las unidades extensoras unidas a ACP se han encontrado flanqueando o entre el 'cluster' de genes que codifica para el policétido (Chan *et al*, 2009).

La (2*R*)-metoximalonil-ACP fue la primera unidad extensora unida a ACP reportada. Su incorporación dentro del policétido genera un grupo metoxiacetil. Datos bioquímicos generados de experimentos *in vivo* e *in vitro* indican que el compuesto 1,3-bifosfoglicerato (1,3-bPG) es el precursor de (2*R*)-metoximalonil-ACP (Chan *et al*, 2006; Chan & Thomas, 2009).

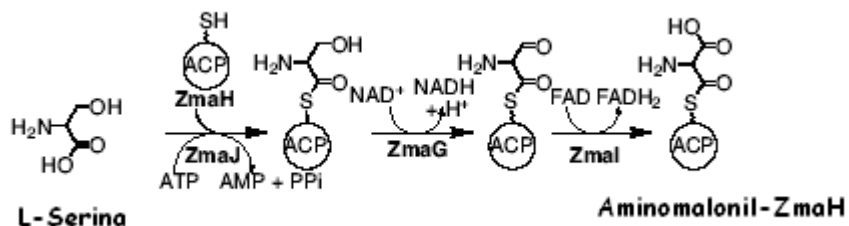
La (2*R*)-hidroximalonil-ACP es un precursor propuesto en la síntesis de (2*R*)-metoximalonil-ACP y por lo tanto, se forma a partir de 1,3-bPG. De igual forma, son unidades extensoras poco usuales, pero ya se han descrito las vías de síntesis de compuestos policétidos que usan dichas unidades de extensión, como son la zwittermicina A y el FK520 (Chan *et al*, 2009). Se ha demostrado que un grupo de cinco proteínas son responsables de la formación de metoximalonil-ACP, que es utilizado en la síntesis del macrólido FK520. La secuencia de síntesis es: 1) FkbH se une a un intermediario glicolítico y lo defosforila, luego lo transfiere a una ACP (FkbJ), formando gliceril-ACP. 2) FkbK cataliza la oxidación de gliceril-ACP a 2-hidroxi-3-oxopropionil-ACP. 3) Fkbl convierte el producto de FkbK en hidroximalonil-ACP, y 4) FkbG cataliza la *O*-metilación para formar metoximalonil-ACP (Fig. 12) (Chan *et al*, 2006, Walton *et al*, 2006).





**Fig. 12.** Secuencia de síntesis que muestra la formación de metoximalonil-ACP, utilizado en la síntesis del macrólido FK520. FkbH se une a un intermediario glicolítico, que en este caso sería 1,3-bifosfoglicerato, lo defosforila, luego lo transfiere a una ACP (FkbJ), por lo que FkbH tiene dos funciones, la de fosfatasa y aciltransferasa. Posteriormente, la recién formada gliceril-ACP es oxidada por FkbK a 2-hidroxi-3-oxopropionil-ACP. Fkbl convierte el producto de FkbK en hidroximalonil-ACP, el cual es *O*-metilado por FkbG para formar metoximalonil-ACP (Chan *et al*, 2006).

La incorporación de (2*S*)-aminomalonil-ACP en el policétido genera un grupo de etanolamina en la síntesis de la zwittermicina A, donde ZmaJ, un homólogo de los dominios de adenilación de NRPSs se propone que reconoce a una L-Ser y la transfiere a un homólogo de una ACP, ZmaH. Subsecuentemente, el grupo seril es oxidado en dos pasos para formar aminomalonil-ACP (Fig. 13) (Chan *et al*, 2006; Chan & Thomas, 2009).



**Fig. 13.** Secuencia de síntesis propuesta para aminomalonil-ACP durante la síntesis de Zwittermicina A. La serina es activada por ZmaJ, que la transfiere a una ACP (ZmaH), así la seril-ACP es oxidada por ZmaG y Zmal hasta obtener aminomalonil-ACP (Chan *et al*, 2006).

El gliceril-ACP se ha definido como un precursor en la síntesis de otras unidades de extensión de policétidos, pero estructuralmente adiciona una ramificación de 3 carbonos a la cadena que se está sintetizando. El gliceril-ACP es precursor en la síntesis de algunos ácidos aciltetrónicos que son policétidos de origen natural. Algunos de estos policétidos tienen actividades de antibióticos, antivirales y antitumorales. Muchos de ellos muestran en su estructura un anillo de cinco miembros tipo tetronato (4-hidroxi-[5H]furan-2-ona). La secuenciación y análisis del grupo de genes que participa en la síntesis de algunos de ellos, como la clorotricina, muestra la presencia de genes que codifican para homólogos de FkbH y FkbJ (Fig. 12), lo que indicaba la posible incorporación de un precursor unido a ACP. Para la síntesis de la tetronomicina se reconstituyó *in vitro* parte de su ruta de síntesis, precisamente donde se forma gliceril-ACP. Esta incorporación de gliceril-ACP sucede porque utiliza hidroximalonil-ACP o metoximalonil-ACP como unidades de extensión. En la síntesis de gliceril-ACP para la formación de FK520 está involucrada la enzima FkbH, y sus homólogos se han agrupado como una familia de enzimas que contienen dominios de fosfatasas. En la síntesis de oxazolomicina, la enzima OzmB, semejante a FkbH fue purificada y se demostró que utiliza 1,3-bPG, lo defosforila y lo transfiere a una ACP (Sun *et al*, 2008; Chan & Thomas, 2009). Sin embargo, el descubrimiento de gliceril-ACP como unidad extensora en la síntesis de diferentes policétidos es reciente, por lo que se requiere seguir estudiando el mecanismo de incorporación del mismo (Chan *et al*, 2009).

## 10. ACPs en rizobias

Cuando el nitrógeno es limitado, muchas plantas de leguminosas establecen una relación simbiótica con un grupo de bacterias de suelo denominadas rizobia. Las rizobias son capaces de provocar la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno atmosférico se convierte a amonio y en esa forma puede ser asimilado por las plantas. Las rizobias comprenden a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium* que son  $\alpha$ -proteobacterias (López-Lara, 2004).

El proceso mediante el cual se establece la simbiosis entre rizobia y las leguminosas requiere de un intercambio molecular de señales entre la planta y la bacteria. Las plantas secretan moléculas del tipo de los flavonoides, las isoflavonas y las betaínas en el suelo que rodea a sus raíces. Estos compuestos inducen la

transcripción de los genes *nod* dentro de la bacteria, los cuales son responsables de la síntesis de los factores Nod, que inducen respuestas múltiples en la planta, tales como la dediferenciación y división de las células corticales, lo que conduce a la formación del nódulo. Finalmente, las bacterias invaden a la planta a través de los hilos de infección, que son túbulos llenos de bacterias que penetran el tejido cortical de la planta y liberan a las bacterias en sus células blanco. En el córtex, las bacterias son internalizadas en compartimentos que maduran en estructuras llamadas simbiosomas. En los simbiosomas, las bacterias internalizadas se diferencian en bacteroides y ahí reducen dinitrogeno molecular para la planta (Mason-Boivin *et al*, 2009; Jones *et al*, 2007)

Se ha demostrado que para que se lleve a cabo la simbiosis efectiva entre leguminosa-rizobio, además de los factores Nod, se requiere de otros compuestos que se encuentran en la superficie de la bacteria, como son lipopolisacáridos, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares. Durante la síntesis de estas moléculas participan diferentes ACPs. En las rizobia, además de AcpP, se han caracterizado cuatro ACPs especializadas: NodF, AcpXL, RkpF y SMb20651 (Geiger & López-Lara, 2002; Ramos-Vega *et al*, 2009).

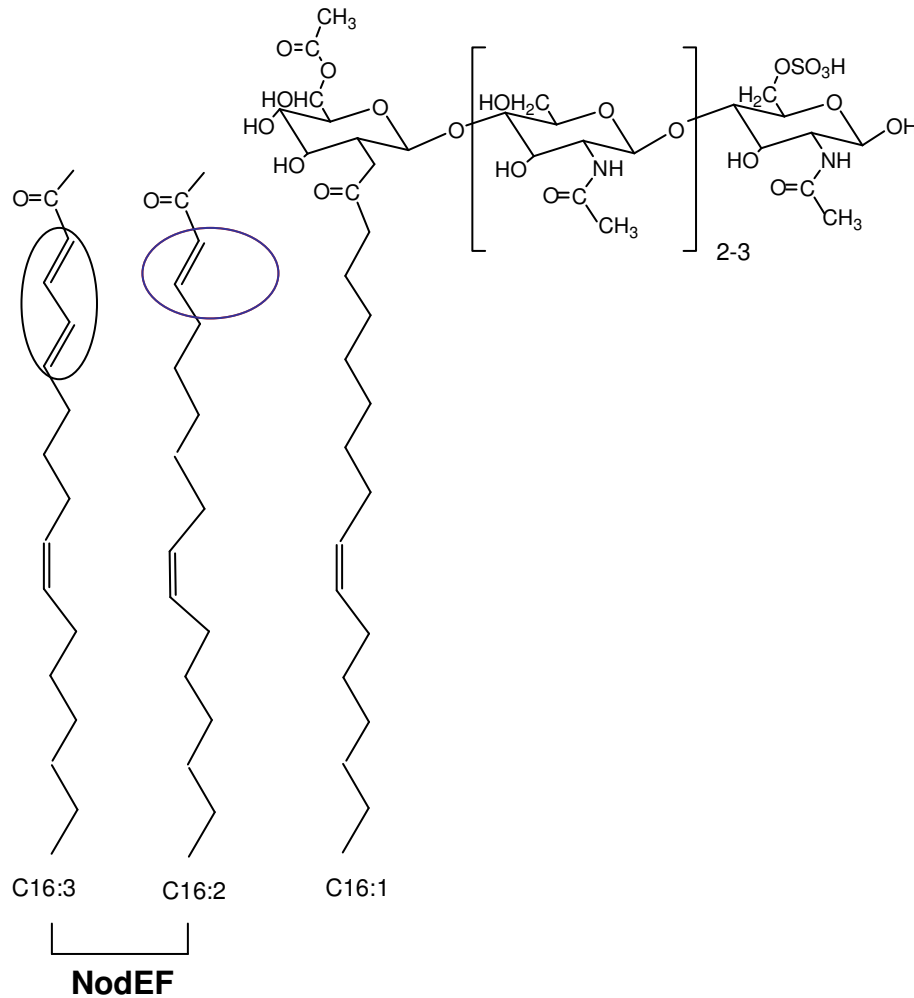
### **10.1. AcpP**

La AcpP es una proteína constitutiva y esencial que funciona durante la síntesis de ácidos grasos generales (Fig. 10). En *S. meliloti* la proteína equivalente a AcpP de *E. coli* se encuentra codificada en cromosoma (SMc00573), formando parte de un grupo de genes que codifican para proteínas necesarias en la síntesis de ácidos grasos tales como FabG, FabD y FabF. AcpP ha sido caracterizada tanto en *S. meliloti* 1021 (Platt *et al*, 1990) como en *R. leguminosarum* (López-Lara & Geiger, 2000). Estas proteínas presentan un alto porcentaje de identidad (59%) con la AcpP de *E. coli*.

### **10.2. NodF**

Los genes *nod* codifican para proteínas destinadas a la síntesis de factores de nodulación (Jones *et al*, 2007). En esta vía, las proteínas NodABC están involucradas en la síntesis del lipoquitin oligosacárido básico (Fig. 14a). NodC se encarga de la oligomerización de residuos de *N*-acetilglucosamina, NodB de la *N*-deacetilación del oligosacárido formado en la unidad de *N*-acetilglucosamina del

extremo no reductor y NodA se encarga de la transferencia de un residuo acilo al amino libre del oligosacárido. En esta vía existen además genes específicos como *nodE* y *nodF*, esenciales para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, caracterizados por la presencia de insaturaciones en la posición  $\alpha\beta$ , que serán incorporados a los factores de nodulación (Geiger & López-Lara, 2002) (Fig. 14b). Se ha descrito que estas insaturaciones son específicas de bacterias que nodulan al grupo Galegoide de leguminosas (Debellé *et al*, 2001). Actualmente, la función de estas insaturaciones en la especificidad de hospedero aún no es clara.



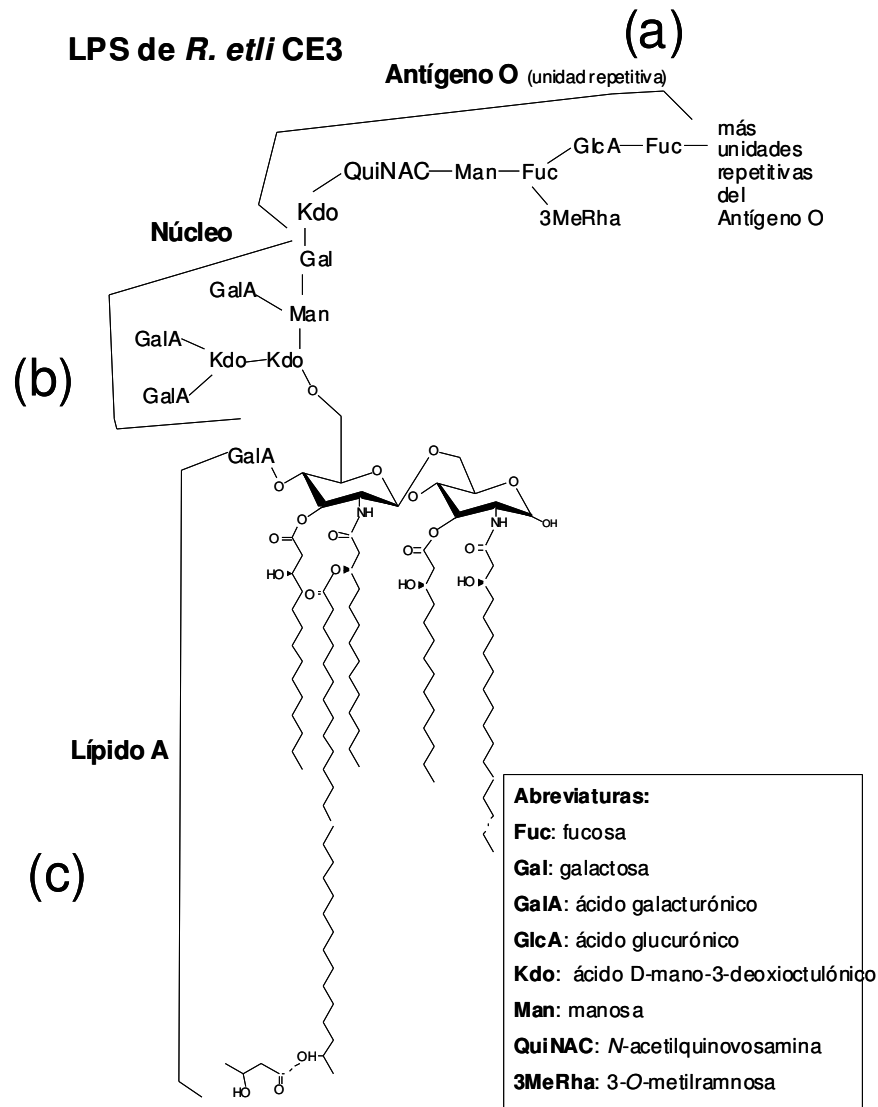
**Fig. 14.** Factores de nodulación en *Sinorhizobium meliloti*. (a) Lipoquitin oligosacárido básico. (b) ácidos grasos poliinsaturados. Para la síntesis de C16:3 y C:16:2 se requieren las proteínas NodE y NodF. Las insaturaciones específicas están rodeadas por un óvalo.

NodF es una ACP (Geiger *et al*, 1991) necesaria para la síntesis de estos ácidos grasos poliinsaturados y su transferencia a los factores de nodulación (Demont *et al*, 1993). Las mutantes de *S. meliloti* en *nodF* aún son capaces de inducir encorvamiento de los pelos radiculares y producen un número muy bajo de hilos de infección. Sin embargo, éstos crecen como ramificaciones en el cortex radicular y son capaces de formar nódulos que fijan nitrógeno. Estas mutantes también producen menos nódulos que la cepa silvestre (Ardourel *et al*, 1994). NodF funciona en conjunción con la proteína NodE. NodE es homóloga a las 3-cetoacil-sintasas y también es esencial para la síntesis de ácidos grasos  $\alpha\beta$ -insaturados. NodE adicionalmente es un factor determinante de la longitud y el nivel de insaturación de la cadena (Bloemberg *et al*, 1995).

### 10.3. AcpXL

Esta ACP fue descrita por Brozek *et al* (1996), quienes encontraron que acarrea un ácido graso extralargo, el 27-hidroxiocacosanóico que es transferido al lípido A durante la síntesis de lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos (LPSs) son el componente primario de la cara externa de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Está compuesto por tres partes: un polisacárido distal o antígeno-O (Fig. 15a), un núcleo de oligosacáridos (Fig. 15b) y un dominio hidrofóbico que es el lípido A (Fig. 15c) (Raetz & Whitfield, 2002).

El lípido A de las rizobia presenta variaciones estructurales con respecto al de *E. coli*. En algunas rizobia carece de los grupos fosfato en las posiciones 1 y 4', en su lugar está modificado en su extremo proximal con aminogluconato y además con 3-hidroxiobutirato y ácido galacturónico. La acilación en la posición 2' con ácido 27-hidroxiocacosanóico (27OHC28:0) es otra de las modificaciones específicas que se encuentran en rizobia (Raetz & Whitfield, 2002). Este ácido graso extralargo también se encuentra en el lípido A de bacterias patógenas como *Brucella abortus*, *Bartonella henselae* y *Legionella pneumophila* (Manterola *et al*, 2005; Vedam *et al*, 2003).



**Fig. 15.** Estructura de los lipopolisacáridos de *Rhizobium etli* CE3. En las rizobias el lípido A se caracteriza por la presencia del ácido graso extra largo 27-hidroxiocetacosanoico. **(a)** Polisacárido distal o antígeno O. **(b)** Núcleo de oligosacáridos. **(c)** Dominio hidrofóbico: Lípido A (López-Lara, 2004).

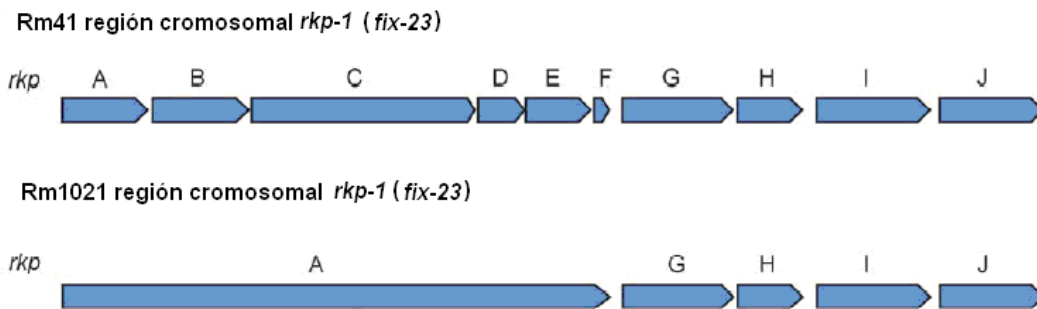
El ácido 27OHC28:0 es transferido al lípido A por la enzima LpxXL y, tanto en su biosíntesis como en su transferencia al lípido A, es portado por AcpXL. La función del ácido 27OHC28:0 y de AcpXL durante la simbiosis de rizobias con la planta aún no es clara. Se ha discutido que el ácido graso extralargo es necesario para incrementar la estabilidad de la membrana durante la colonización de las bacterias a su planta hospedadora (Vedam *et al*, 2006). Actualmente se han descrito mutantes en AcpXL de *Rhizobium leguminosarum* (Vedam *et al*, 2003) y en *Sinorhizobium meliloti* (Sharypova *et al*, 2003). La mutante de *R. leguminosarum*, además de carecer del ácido 27OHC28:0 en sus membranas, es sensible a las condiciones típicas del nódulo, como cambios de osmolaridad (no crece con concentraciones de

NaCl de 0.5%) y acidez (pH 5.0). Sin embargo, el fenotipo de nodulación no es tan evidente ya que las bacterias, a pesar de formar nódulos tardíos con respecto a la cepa silvestre, eventualmente son capaces de formar nódulos con morfología normal y que fijan nitrógeno, indicando que las mutantes finalmente se adaptan al ambiente dentro del nódulo. En *S. meliloti* se ha observado un fenotipo similar donde las mutantes en AcpXL carecen de ácido 27OHC28:0 en su lípido A y la estructura de sus lipopolisacáridos se encuentra modificada (Sharipova *et al*, 2003). Estas mutantes también están retardadas en nodulación y son menos competitivas que la cepa silvestre. Sin embargo, sus nódulos presentan una morfología normal y fijan nitrógeno. Recientemente se ha detectado la presencia de ácido 27OHC28:0 en bacteroides de mutantes en AcpXL de *R. leguminosarum* (Vedam *et al*, 2006). Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo alternativo de adaptación dentro del nódulo en el cual, la función de AcpXL podría ser reemplazada por otra ACP y pone de manifiesto que la presencia de este ácido graso 27OHC28:0 es importante en el desarrollo de la simbiosis (Vedam *et al*, 2006). También se encontró que mutantes en AcpXL y LpxXL en *S. meliloti* presentan lípido A pentaacilado con ácidos grasos de longitud menor a C18:0 (Ferguson *et al*, 2005). Además, recientemente se demostró que LpxXL y AcpXL juegan un papel importante en el desarrollo de los bacteroides (Haag *et al*, 2009). Cepas mutantes de *R. leguminosarum* biovar *viciae* 3841 que no tienen la capacidad de incorporar el ácido graso 27OHC28:0 al lípido A mostraron mayor sensibilidad al estrés osmótico y a la tolerancia a la desecación, además de presentar alteraciones en la formación de biofilm y en su motilidad (Vanderlinde *et al*, 2009).

#### **10.4. RkpF-RkpA**

Los polisacáridos capsulares (KPSs, capsular polysaccharides type k) son estructuras que se encuentran en la superficie de las rizobia y que muestran analogía estructural con el grupo II de los antígenos K de *E. coli*. En las rizobia, los antígenos K son unidades diméricas repetitivas de hexosa que pueden ser sustituidas de forma diversa y por el azúcar KDO (ácido-3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) o un azúcar relacionado. Estas estructuras son muy diversas e incluso definen la variación antigénica entre diferentes cepas de rizobia (Becker *et al*, 2005). Los genes para la síntesis de los polisacáridos capsulares fueron identificados como los loci de complementación capaces de restaurar mutantes deficientes en

exopolisacáridos de superficie de la cepa de *S. meliloti* Rm41. En la cepa Rm41 estos genes se encuentran clasificados en tres grupos. El primero, *rkp-1* (anteriormente conocido como región *fix-23*), está codificado en cromosoma y probablemente funciona en la síntesis de un acarreador lipídico necesario para la síntesis de KPSs (Fig. 16). El segundo, *rkp-2*, está codificado en cromosoma y está involucrado en el metabolismo de azúcares bifosfato. El tercero, *rkp-3*, está codificado en pSymB y tiene 10 genes, de los cuáles 6 funcionan en la síntesis de precursores de azúcar especie específicos (Becker *et al*, 2005). En el grupo *rkp-1* se encuentran 6 genes: *rkpABCDEF*, que inicialmente fueron anotados como una probable sintasa de ácidos grasos. Posteriormente se encontró que son similares a dominios de policétido sintasas. De estos 6 ORFs, el último corresponde a *rkpF*. La proteína RkpF ha sido caracterizada como una ACP en *S. meliloti* AK631 al demostrar que porta el grupo prostético de 4'-fosfopanteteína. Además se mostró que holo-RkpF migra más rápido que apo-RkpF en geles nativos de poliacrilamida (Epple *et al*, 1998). En *S. meliloti* 1021 estos genes están fusionados como un solo ORF llamado *rkpA*. RkpA es una proteína multifuncional en la cual su último dominio corresponde a la ACP (Fig. 16).



**Fig. 16.** Organización de la región *rkp-1* de genes para la síntesis de polisacáridos capsulares. En esta región se encuentran los genes *rkpABCDEF*, que en *S. meliloti* Rm41 son 6 genes independientes, mientras en *S. meliloti* 1021 están fusionados en un solo ORF denominado *rkpA* (Becker *et al*, 2005).

En *E. coli*, los KPSs funcionan formando una matriz hidratada que los protege del ambiente externo. Se ha hipotetizado que en rizobia funcionan de la misma forma. Adicionalmente podrían proteger al rizobio contra los productos de defensa de las leguminosas y también en la señalización temprana durante el proceso de colonización en las raíces de la planta (Becker *et al*, 2005). Hasta el momento no se



ha definido cuál es el producto que la ACP RkpF acarrea. Se ha propuesto que durante la síntesis de KPSs, el producto formado por RkpABCDEF podría ser necesario para su anclaje a la membrana (Geiger & López-Lara, 2002). Además, los análisis estructurales de los KPSs no han demostrado la existencia de algún lípido en su estructura.

### **10.5. SMb20651**

En *S. meliloti* el gen *smb20651* se encuentra en el pSymB y forma parte de un operón junto con los genes *asnB*, *smb20650* y *nadE1*. Se propone que el gen *asnB* codifica para una asparagina sintetasa, *smb20650* codifica para una putativa CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga y *nadE1* codifica para una propuesta NAD-sintetasa dependiente de amonio. Este operón se encuentra en otros genomas de rizobias, como *Sinorhizobium medicae* y *Mesorhizobium loti*, así como en bacterias no relacionadas filogenéticamente tales como *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941, *Geobacter bemidjiensis* y *Methanosarcina barkeri*, entre otras (Ramos-Vega *et al*, 2009).

SMb20651 al ser expresada en *E. coli* incorpora a la  $\beta$ -alanina, un bloque biosintético de la 4'-fosfopanteteína. Se encontró que para detectar holo-SMb20651 se requieren copias extras de AcpS, ya sea de *S. meliloti* o de *E. coli*. La proteína purificada SMb20651 incorpora *in vitro* a la 4'-PP en presencia de AcpS de *S. meliloti*. Adicionalmente, holo-SMb20651 se modifica *in vitro* con el grupo malonil, proveniente de malonil-CoA, que es transferido por una malonil CoA:ACP transacilasa (FabD) de *S. meliloti*. Cuando *smb20651* es expresada en *E. coli* junto con *acpS* y *smb20650*, se detectan formas aciladas de SMb20651. Se encontraron ácidos grasos C12:0 y C18:0 asociados a la presencia de estas formas aciladas expresadas en *E. coli*, lo que sugiere que SMb20651 se encuentra involucrada en la síntesis o transferencia de ácidos grasos (Ramos-Vega *et al*, 2009).

## ANTECEDENTES

### **Nueva ACP en *Sinorhizobium meliloti***

*Sinorhizobium meliloti* es una  $\alpha$ -proteobacteria Gram-negativa que fija nitrógeno en plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Debido a su importancia agronómica y a que es uno de los modelos de estudio de la fijación de nitrógeno más usados, el genoma de la cepa *S. meliloti* 1021 fue secuenciado (Galibert *et al*, 2001). Su genoma está compuesto por tres replicones: un cromosoma (3.65 Mb) y dos megaplásmidos, el plásmido A (pSymA, 1.35 Mb) y plásmido B (pSymB, 1.68 Mb). En el genoma de esta bacteria están codificadas cinco ACPs de rizobias que ya han sido caracterizadas (López-Lara & Geiger, 2000, Ramos-Vega *et al*, 2009). Además en el genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al*, 2001) se encontraron dos proteínas prácticamente idénticas, que presentan las características de ACPs. Una de las proteínas está localizada en el cromosoma, SMc01553, y la otra está localizada en el pSymb SMb22007. Esta última tiene una glutamina adicional en el extremo carboxilo. *smc01553* pertenece a un segmento de ADN de 6.6 kb, que es producto de un evento reciente de transferencia horizontal. Dicho segmento de ADN parece haberse duplicado en el plásmido pSymb (Galibert *et al*, 2001), generando dos copias de la probable ACP y de sus genes vecinos. La región de ADN duplicada se esquematiza en la Fig. 1a en Dávila-Martínez *et al* (2010). SMc01553 está asignada en el genoma como una ACP putativa, y presenta todas las características de las ACPs, tiene un tamaño pequeño (82 aminoácidos), un pI ácido (4.6), y el motivo de unión al grupo prostético 4'-PP.

Entre las proteínas que se encuentran codificadas en la región duplicada están SMc01550 y su parólogo SMb21013 las cuales fueron anotadas como proteínas hipotéticas. Cada una tiene 155 aminoácidos y son 95% idénticas entre ellas. Las proteínas SMc01551 y SMb20843 tienen homología con *O*-aciltransferasas unidas a membrana (MBOATs). Los miembros caracterizados de la superfamilia MBOAT, codifican para enzimas que transfieren ácidos orgánicos, típicamente ácidos grasos, hacia los grupos hidroxilo de blancos embebidos en la membrana (Hofman, 2000). Algunos ejemplos incluyen DltB (involucrada en la incorporación de D-alanina en ácidos lipoteicóicos) y AlgI (participa en la *O*-acetilación de alginato). SMc01551 ha sido nombrada como AlgI y experimentos de diseño genómico, indican que en *S. meliloti* es un sitio de cointegración entre los

replicones pSymA-pSymB y el cromosoma, como resultado de genes *algI* reiterados (Guo *et al*, 2003).

SMc01552 y SMb20842 son proteínas transmembranales hipotéticas, de 383 y 409 aminoácidos, respectivamente y 94% idénticas entre si. SMc01554 es una proteína de 651 aminoácidos que muestra homología en su región carboxilo terminal con FkbH de *Streptomyces hygroscopicus*. SMc01554, FkbH y proteínas “FkbH-like” son miembros de la subfamilia IIIC de (HAD)-fosfatasa haloácidas dehalogenasas. FkbH está involucrada en la biosíntesis del macrólido FK520 donde se ha demostrado que participa en una reacción novedosa en la cual un intermediario de la vía glicolítica de 3 carbonos es transferido a su correspondiente ACP para formar gliceril-ACP (Wu *et al*, 2000). Homólogos a FkbH como son Tmn16, ChlDI y RkE, así como SMc01554, tienen una extensión en su región amino terminal (aproximadamente de 260 aminoácidos), aunque sólo mantienen una identidad del 30% de su secuencia de aminoácidos con respecto a SMc01554 (Fíg.17).

Recientemente se demostró *in vitro* que Tmn16, ChlDI, OzmB y RkE utilizan como sustrato al 1,3-bifosfoglicerato, lo defosforilan y transfieren el grupo gliceril formado a una ACP, resultando en gliceril-ACP (Sun *et al*, 2008; Sun *et al*, 2010). En el plásmido pSymb, el ORF que codificaría para *smc01554*, se encuentra dividido en dos por varios codones de paro, lo que presumiblemente daría lugar a pseudogenes.

Sólo en unas pocas bacterias filogenéticamente no relacionadas se encuentran homólogos de SMc01553 y SMc01554 (Fig. 1b en Dávila-Martínez *et al*, 2010). La distribución de esta región particular de ADN en organismos poco relacionados (Verrumicrobia, Acidobacteria y Actinobacteria), indica que este fragmento de ADN se adquirió probablemente por transferencia horizontal.

Tomando en cuenta estos antecedentes, hemos propuesto que la proteína SMc01553 es una ACP, debido a sus características de proteína pequeña, ácida y a que presenta el motivo conservado para la unión del grupo prostético de 4'-PP. Es probable que SMc01554 transfiera el grupo gliceril a SMc01553 formando gliceril-SMc01553, el cual podría participar en la biosíntesis de algún compuesto aún no conocido.

SMc01554 1 MNTFFPWRPPLEENW..AARVAEIEAIAAGGEMPDYAATRSVANQQLGPRQQLRIERIGK  
OzmB 1 .....  
FkbH 1 .....  
Con4\* 1 .....  
RkE 1 MTTITANASSAGGSWQDPEALRTLRDLYAAGRLEAEYPSVRPLLARLPERQLPAAGQLLA  
ChlD2 1 MTDSSSTST.....PAEPTLLELHRAGRQAQDYPRLPALLTGLDDAELTRAGQLLA  
Tmn16 1 MSAAPAPP.....PTAPDPVAELHRSGSVAEYPRLPALLRELGENERQRAGRLLS  
consensus 1 . . . . .

SMc01554 59 RLGK...IKGNGFTRIEGLGLLENRTLSYLCDPLGAAGLARGLLVSAHEAPYDG.VAGFA  
OzmB 1 .....  
FkbH 1 .....  
Con4\* 1 .....  
RkE 61 RLDRDDVVRHHADVFPVVTVAVTGQSTVAPLVAPLTAELARHGLLIDPVVSPYGSYLADLL  
ChlD2 51 RLDPDDVLALHPATPTVTVAVTCHGTLAPLRAPLTAELARHGLLLRPHFGDFDSYVFDLA  
Tmn16 52 RLSPDEVLAAHPGIPTVSVAVTCHGTVAGLVPPIMELARHGMLLRPHVADFEGWVFDLA  
consensus 61 . . . . .

SMc01554 114 FSAKNCFERGLDAVLAFLDESTLQGERPLLDRAAEDEAVQEAERIASAIAEAARSKTGCP  
OzmB 1 ..MKRVTEARPTLTKCL.....  
FkbH 1 .....MTLVKCL.....  
Con4\* 1 .MSDKTGADAPALVKCL.....  
RkE 121 GPAGAEQDRRPTLTLCLLDAHTVFEVPLPWRVEVVEAAARSRLALISRAVRAHQDGGRG  
ChlD2 111 DPGSALYRAEPDLVLCVLDPMVLDLLEVPWDCDEVERVARARTETAAGLAATFAETSKA  
Tmn16 112 DPASEVYAAGTDLVCLPAAGIFDEVFRPWRPEVVEVLTEKVHLLGKLAATHGTSGSG  
consensus 121 . . . . .

SMc01554 174 AIATLPCIQILTSADITATPGSIAR...FRLRVNMLGDGAAEGRWLMWDQAAIASRIG  
OzmB 15 .....VW.....  
FkbH 8 .....VW.....  
Con4\* 17 .....VW.....  
RkE 181 PLVINTVPLLRHARQLVDLRSRARLGVVREFNSGLLALAAEHPGLTVVLDLPLIA..Q  
ChlD2 171 TLVINTLPLPRRYTSQVLDHRSRARLGVVRAANTRLLRLAAEHPNVVVIDLPLIG..E  
Tmn16 172 TLVYTTMLPREFTSQVLDHRSRARLGAVWREGNARLLGLMDEHPGLVVIDLPLVLS..G  
consensus 181 . . . . .

SMc01554 230 IERWFDPFIAYHSAKVFPFNVELCPLAADNIASLLAAMTKSARAVLDLNTLWGGVIGDD  
OzmB 17 .....DLNNTLWRGTLVED  
FkbH 10 .....DLNNTLWRGTLVED  
Con4\* 19 .....DLNNTLWGGTLVED  
RkE 239 GTPAYEERTGLYAKARLAEGLLASAYARDVCHLVTGLLGRTRKCLVLDLDTLWGGVLGED  
ChlD2 229 GSAVSEPRLSQYTKAHLAALLTRYAREVGHARLRAGHAKKVLAVDLDTLWGGVLAED  
Tmn16 230 PAALAEPRLETYAGTPFAAELTAAVAREVAHLARGRSGRAKKVLAVDLNNTLWGGVIGDD  
consensus 241 . . . . .\*

SMc01554 290 GLACTRIGQNSAECEAFIAFQNFVLGRKRGVVLAVCSKNTDAVAREPFRHPDMLLKEE  
OzmB 31 G..EVVLH.EGLRE.....VIVELDSRGITQATASRNDHDHAWALLEK...LGIAE  
FkbH 24 D..EVVLT.DEIRE.....VITTLDDRGITQAVASKNDHDLAWERLER...LGVAE  
Con4\* 33 A..EVRLP.DAIRA.....AVVELDARGITQSVCSRNDHDLAWARLEE...LGVAE  
RkE 299 GVDGMELG.SGFRGEAFAEFORVVAQLGSGVLLAVSSKNDDAKVAEALREHPSMLLRED  
ChlD2 289 GPDGIEAA.GSYRGEAHRARFORVVRQLGAQGVLLTAVSKNDPEPVRQVLRDHPDMLLGED  
Tmn16 290 GPEGIEVA.DGRTCRAFQRMORVVKOLASRGVLAASVSKNDLEPVRVLEHREHQMILLRED  
consensus 301 . . . . .

SMc01554 350 HIAVFOANWDDKATNIRATAEKLGLGLESLAYVDDNPAERERVRRELPLVSTIEVGEDPS  
OzmB 76 YFVLPRIINWGAKSASVRAIADELNFAPSTIAFIDDOPAERAFAFHLPVRCYPAEFALG  
FkbH 69 YFVLPARIGWPKSQSVREIATELNFAPTIAFIDDOPAERAFAFHLPVRCYPAEQAAT  
Con4\* 78 YFVLPKIGWPKSDAVRRIAEGLNFARHTIAFIDDOPAERAFAVYHLPVRCYPAEFAST  
RkE 358 DFVRVNAVNSAKHDNLRDIAERVGTGLDSFVFDVDDSTFECCGLVREQLPQAVVVRVDEEPA  
ChlD2 348 DFVRVIANWRPKHDNLAELAAASLVNGVDSFVFDVDDSPYECGLVRHELPGVAVVPVNDPEPA  
Tmn16 349 DFVRVNAVWAPKHDNLRALAEELNVGLDSFVFAADDSPYECGLVASELPEVTVLHLDGDEPA  
consensus 361 . . . . .

SMc01554 410 FFIDRVAGSGLFDHPLNCDLLARANSYGRAAVAEIIRARV.CNYYEYLKSLERMTTISE  
OzmB 136 LPG...LAE...FPAAVTGDARRRQMYQGVVREAEERTEHVGTDEEFLRSLGELRIER  
FkbH 129 LLS...LPE...FSPPVSTVDSRRRRLMYQAGFARDQAREAYSQPEDEFRLSLDLSMTIAE  
Con4\* 138 LTG...LPE...FSPAVSTVDSRRRREMYYQGFRRETERSAYEGPEEFLRSLDLMRIGR  
RkE 418 LHPAALLADGWFDLPVLTDEDRETRAGRVRTAARQEFFREDT.GSYQDYLDGLGIEVTVRE  
ChlD2 408 LHIEALLRDGWFDLTELTRDVTVAQVRDELVRKDFLDSF.DSLEEYLRLQVVRVREPE  
Tmn16 409 LHAERLLADGWFDVRDLTDDVRRPERYREELVRKDFLDSF.SSLDDYLRELDRVRELSA  
consensus 421 . . . . .

```

SMc01554 469 FDEVGRPRIVOLINKSNQFNLTTRRYNDEIVRRMQADPNFIGWQIRLDDKFAOCHGTIGVV
OzmB 191 AGDEAISRVEELTLRTSQMNATGVHYSRDLRGLVADEEHEVLVASLVDRFGPHGAIGVT
FkbH 184 AGEELS RVEELTLRTSQMNATGVHYSADLRACFTDPAHEVLVVTMGDRFGPHGAVGLI
Con4* 193 ATDEEITRVEELTLRTSQMNATGVHYSRDLRGLSADPGHEVLVITLADRFGPHGAVGVT
RkE 477 PEPAELSRVSQLTLRTNQFHLAPERLQLPQVREWAERFDRGVLAVRARDFGDHGLVGAV
ChlD2 467 ASAQDVARVSQLTLRTNQFNQTTWRLOPAEVTALMADPAARVLVI GAADRFGDNGVVGAV
Tmn16 468 AAADVPRVAQLTQRINQFNLTTRRLOQDEVASLACSEGNMVLATRCGDRFGDNGLVGAV
consensus 481 . . . . . * . . . . .

SMc01554 529 IVIKKKGSEWEIDTWLQSCRVLERGVEQCLMNSLIEEAVSAGVVSIRGRYIPTERNAMVSD
OzmB 251 LIEERPRSWHIKLLATSCRVVSEFCVGAALLRWLSDEAARAGVLITAGFRRTERNRMVEV
FkbH 244 LLEKPKSTWHIKLLATSCRVVSEFCAGATLINWLTQCARAGAHLVADFRRTDRNRMEI
Con4* 253 LVEKHPAVWHIKLLATSCRVVSEFCAGSVLLNWLVDQAAAAGVH.LVADFRRTDRNRMEV
RkE 537 FWRDAEDLHIDNYVLSCRVFSRCIESACLAAVLEHAASGAHGALARHRPTRNAAFAS
ChlD2 527 FTHDGTTLHLDNELLSCRVFSRCIEQTALAAVVRQAHRDGLREARAEVRATAKNGKVKD
Tmn16 528 FVRTDGPVWHVDNELLSCRVFARCI EQGCLAALEHARAEGAEVAARVVPSTKNGKVRD
consensus 541 . . . . . * . . . . .

SMc01554 589 FYPRLGF.....GLAGT..NGNGSVDFVCVTSQYEPHEV...SMNITLSNDAA
OzmB 310 AYRFAGF.....REHTEGAAEEGGVQTLAMEPVRQDAPA...HLA.VLAPRLF
FkbH 303 AYRFAGFADSDCP.....CVSEVAGASAGVVERHLEPSARPAET...TLT...LTAA
Con4* 312 AYRFAGFDEEPCPCRDVAVRTAQAAEEQETAEVERHLVAAPRSAST...TVQ.LIAPDLT
RkE 597 FYIDHGF.....VPTGVAPDDPATVVERHALRDITPAFA...HLR.....
ChlD2 587 FYPRNGF.....TTFVDDGTATVVRHDLTDLTGLPFPDPDHVRLIESDDFG
Tmn16 588 FYPRNGF.....DAHGQ..SEDTADFRHELEIGAVVFG...HLD.....
consensus 601 .. . . . . .

SMc01554 632 ASCPGLPFAEGECAAEPRDG
OzmB 354 DASECLVEVAHAE.....
FkbH 350 DIAPVTVSAAG.....
Con4* 368 ERPAADPSVVAPA.....
RkE 634 ....LHTAEEEN.....
ChlD2 632 HTGSEARVRLTERDHDGDDNA
Tmn16 623 ....LTVRVEQEGTR.....
consensus 661 . . .

```

**Fig. 17.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre SMc01554 y proteínas FkbH-like cuya función ha sido demostrada. Los residuos de aminoácidos conservados entre todas las proteínas se muestran en color gris, los residuos idénticos se muestran en negro, y señalados con asterisco están señaladas un residuo de aspartato (D) y una cisteína (C) que se propone participan en la unión del fosfogliceril y su desforilación, respectivamente. Donde OzmB, oxazolomicina; FkbH, FK520; Con4\*, concanamicina; RkE, Rk-682; ChlD2, clorotricina; Tmn16, tetronomicina. Alineamiento realizado en Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/wsl/WSMuscle.wsl>), y figura creada con BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

## **OBJETIVO**

Caracterizar a SMc01553 como una proteína portadora de acilos.

### **Objetivos particulares**

- Determinar si SMc01553 incorpora al grupo prostético de 4'-fosfopanteteína.
- Observar el patrón de expresión de SMc01553 en *S. meliloti*.
- Construir mutantes deficientes en la región que contiene *smc01553* y en la región que contiene *smb22007*, caracterizar su fenotipo en vida libre y en simbiosis.
- Determinar si SMc01553 es sustrato de enzimas esenciales para la síntesis de ácidos grasos y analizar los productos formados.

## RESULTADOS

**Dávila-Martínez Y, Ramos-Vega AL, Contreras-Martínez S, Encarnación S, Geiger O, López-Lara IM. (2010).**

**SMc01553 is the sixth acyl carrier protein in *Sinorhizobium meliloti* 1021.**

***Microbiology*, 156: 230-239**

En este trabajo se caracterizó a SMc01553 como una proteína portadora de acilos. Se demostró que SMc01553 se modifica con el grupo prostético de 4'-fosfopanteteína y que la holo-SMc01553 no se modifica con el grupo malonil desde malonil-CoA, en presencia de la enzima malonil CoA:ACP transacilasa (FabD<sub>Sm</sub>). Por medio de RT-PCR se demostró la presencia del ARNm de los genes *smc01553* y *smb22007* en cultivos de *S. meliloti* 1021. Las mutantes sencillas y dobles de las regiones de DNA que codifican para la proteína SMc01553 no mostraron diferencias con la cepa silvestre, ni en simbiosis ni en vida libre.

## SMc01553 is the sixth acyl carrier protein in *Sinorhizobium meliloti* 1021

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

### Correspondence

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

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

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

Acyl carrier proteins (ACPs) are required for the transfer of acyl intermediates during fatty acid and polyketide syntheses. In *Sinorhizobium meliloti* 1021 there are five known ACPs: AcpP, NodF, AcpXL, the ACP domain in RkpA and SMb20651. The genome sequence of *S. meliloti* 1021 also reveals the ORF SMc01553, annotated as a putative ACP. *smc01553* is part of a 6.6 kb DNA region that is duplicated in the chromosome and in the pSymb plasmid, the result of a recent duplication event. SMc01553 overexpressed in *Escherichia coli* was labelled *in vivo* with [<sup>3</sup>H]β-alanine, a biosynthetic building block of the 4'-phosphopantetheine prosthetic group of ACPs. The purified SMc01553 was modified with 4'-phosphopantetheine in the presence of *S. meliloti* holo-ACP synthase, and this modification resulted in a major conformational change of the protein structure, since the holo-form runs faster in native PAGE than the apo-form. SMc01553 could not be loaded with a malonyl group by malonyl-CoA-ACP transacylase from *S. meliloti*. Using RT-PCR we could show the presence of mRNA for SMc01553 and of the duplicated ORF SMb22007 in cultures of *S. meliloti*. However, a mutant in which the two duplicated regions were deleted did not show any different phenotype with respect to the wild-type in the free-living or symbiotic lifestyle.

Received 7 August 2009

Revised 29 September 2009

Accepted 30 September 2009

## INTRODUCTION

Acyl carrier proteins (ACPs) are small acidic proteins containing the 4'-phosphopantetheine prosthetic group, to which fatty acyl chains are linked as thioesters during fatty acid and polyketide syntheses. ACPs act as carriers of acyl intermediates, which are shuttled from one enzyme to another. Apo-ACP is converted to the active protein by holo-ACP synthase (AcpS), which transfers the 4'-phosphopantetheine from coenzyme A (CoA) to apo-ACP (Flugel *et al.*, 2000; Lambalot *et al.*, 1996), thereby converting it to the functional holo-ACP. ACPs exist as a domain within large multifunctional fatty acid or polyketide synthase (PKS) proteins (type I), or as a small monomeric protein in the system for fatty acid biosynthesis in bacteria and plastids [type II fatty acid synthase (FAS)] and in the dissociated PKSs (type II PKS). Acyl-ACPs in bacteria appear to interact with a great diversity of enzymes to provide a broad array of products containing fatty acids,

such as phospholipids, lipid A, acylhomoserine lactones and nodulation factors (reviewed by Byers & Gong, 2007).

The fatty acyl chains in primary metabolism and the scaffolds of polyketide secondary metabolites are assembled by elongation of a small number of carboxylic acid building blocks. Malonyl-CoA is the extender unit in fatty acid biosynthesis. In the type II FAS, the enzyme malonyl-CoA:ACP transacylase (FabD) transfers the malonyl group from malonyl-CoA to holo-ACP, resulting in the formation of malonyl-ACP, which enters each elongation step (Rock, 2008). The FabD enzyme of *Streptomyces glaucescens*, which catalyses the conversion of malonyl-CoA to malonyl-ACP for fatty acid biosynthesis, has been shown to be also active with the ACPs of type II PKS (Florova *et al.*, 2002). Polyketides comprise a large class of structurally diverse natural products and, although malonyl-CoA is a common extender unit used by all types of PKSs, one important source of the structural diversity of polyketides is the variety of extender units used. These extender units can be divided into two classes depending upon whether they are linked to CoA or to an ACP (reviewed by Chan *et al.*, 2009). The set of genes required for the biosynthesis of the ACP-linked extender units are usually found within or

Abbreviations: ACP, acyl carrier protein; DOC, sodium deoxycholate; FAS, fatty acid synthase; KPS, K-antigen; MBOAT, membrane-bound O-acyltransferase; PKS, polyketide synthase.



flanking the associated biosynthetic gene clusters (Chan *et al.*, 2009).

In *Escherichia coli* K-12 there is a single and absolutely essential ACP, which is produced constitutively from the *acpP* gene (Rawlings & Cronan, 1992). In rhizobia, besides the constitutive acyl carrier protein (AcpP) involved in the biosynthesis and transfer of common fatty acids, there are at least three specialized ACPs: (1) the flavonoid-inducible nodulation protein NodF (Geiger *et al.*, 1991); (2) the RkpF protein, which is required for the biosynthesis of rhizobial capsular polysaccharides (Epple *et al.*, 1998); and (3) AcpXL, which transfers 27-hydroxyoctacosanoic acid to a sugar backbone during lipid A biosynthesis (Brozek *et al.*, 1996). RkpF was first identified as the sixth gene in the chromosomal region *rpk-1* (*rpkABCDEF*) in the strain *Sinorhizobium meliloti* Rm41. However, in the available genome of *S. meliloti* 1021, *rpkABCDEF* are fused into a single ORF, now named *rkpA*, and in this case RkpF corresponds to an ACP domain in a large multifunctional protein with homology to type I PKs (Geiger & López-Lara, 2002; Becker *et al.*, 2005). Furthermore, the genome sequence of *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) reveals the existence of two additional putative ACPs, SMb20651 and SMc01553 (Geiger & López-Lara, 2002). Recently, we have characterized SMb20651 as the fifth functional ACP in *S. meliloti* 1021. We showed that SMb20651 actively participates in an acyl-involving metabolic step in wild-type *S. meliloti*, but no phenotype was found in mutants with a deletion in *smb20651* (Ramos-Vega *et al.*, 2009). Mutants of *S. meliloti* in *nodF* produce Nod factors lacking  $\alpha,\beta$ -unsaturated fatty acids and exhibit a significantly reduced capacity to elicit infection thread formation in alfalfa, although they can form nitrogen-fixing nodules (Ardourel *et al.*, 1994). Mutants of *S. meliloti* in *acpXL* have increased sensitivity to a number of different stresses compared with the wild-type (Ferguson *et al.*, 2005). These mutants can still form a successful nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa, but are less competitive in symbiosis than the parent strain (Ferguson *et al.*, 2005; Sharypova *et al.*, 2003). Furthermore, *acpXL* mutants of *S. meliloti* are seriously affected in early and late stages of bacteroid development (Haag *et al.*, 2009).

The other ORF of *S. meliloti* 1021 that presumably encodes a novel ACP (SMc01553) is located on the chromosome. Interestingly, a very recent gene transfer event involving *smc01553* occurred in *S. meliloti* 1021, where a 6.6 kb segment of DNA, including *smc01553*, appears to have been duplicated between the chromosomal DNA and the pSymB megaplasmid, giving this organism two copies of the gene encoding the putative new ACP and its adjacent genes (Galibert *et al.*, 2001; Fig. 1a). SMc01553 is assigned in the genome project as a putative ACP, and presents all the typical characteristics of ACPs, such as small size (82 aa), acidic pI (4.6), and a phosphopantetheine-binding motif. In the pSymB fragment, the ORF encoding the ACP is SMb22007, which is 100% identical to SMc01553 but has an additional glutamine at the C terminus of the

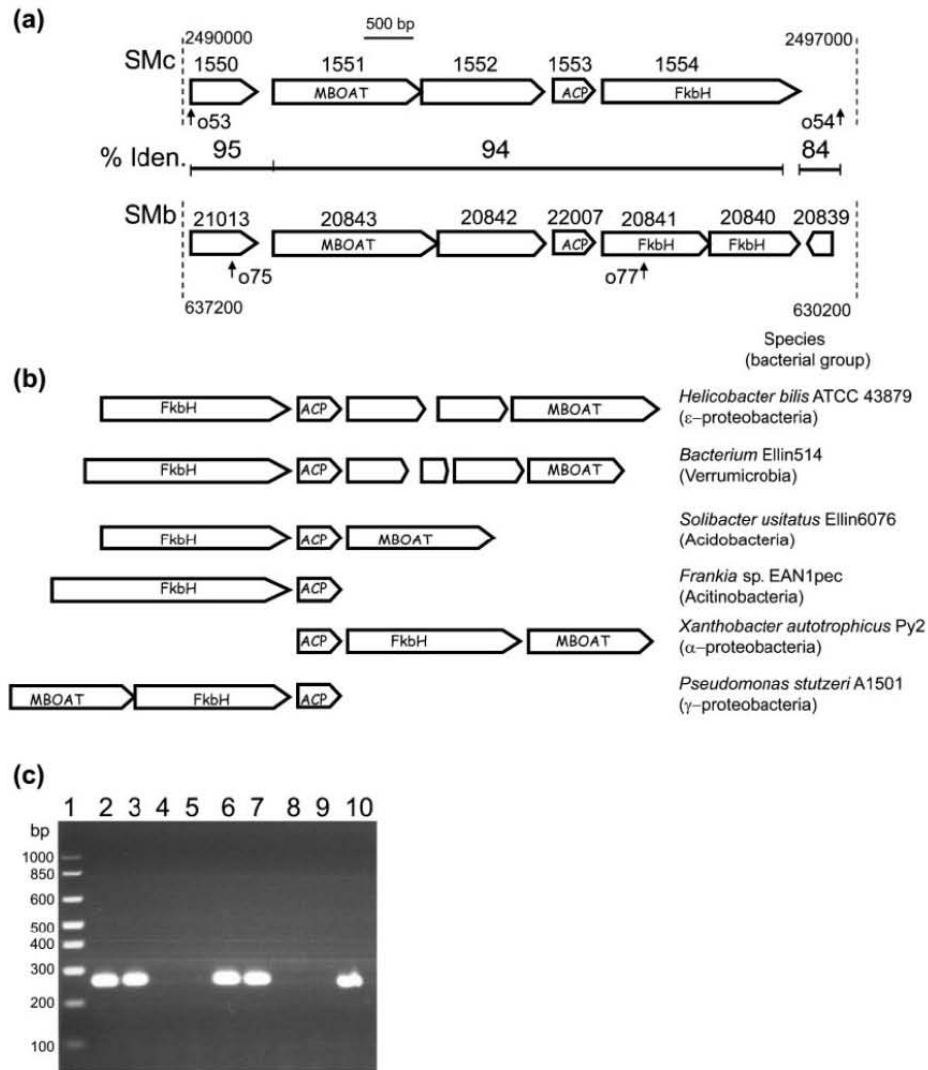
protein. The genes belonging to the duplicated DNA region are schematically represented in Fig. 1(a). SMc01550 and SMc01552, as well as the respective paralogous SMb21013 and SMb20842, are hypothetical proteins. SMc01551 and SMb20843 have homology to membrane-bound O-acyltransferases (MBOATs). All characterized members of the MBOAT superfamily encode enzymes that transfer organic acids, typically fatty acids, onto hydroxyl groups of membrane-embedded targets (Hofmann, 2000). SMc01551 has been named in the genome as *AlgI*, and in experiments on natural genomic design carried out in *S. meliloti* it has been found that the site of cointegration of the pSymA-pSymB replicon to the chromosome corresponds to the reiterated *algI* genes (Guo *et al.*, 2003). SMc01554 is a protein of 651 aa that shows homology along the whole amino acid sequence to the unusually long FkbH homologues Tmn16 and Chd1. Recently, it has been shown *in vitro* that Tmn16 and Chd1 covalently tether the substrate 1,3-bisphosphoglycerate to a dedicated ACP and dephosphorylate it, forming the corresponding glyceryl-ACP (Sun *et al.*, 2008). In the pSymB plasmid, the DNA with homology to *smc01554* encodes two ORFs that are probably pseudogenes (Fig. 1a).

In only a few phylogenetically unrelated bacteria have ORFs that encode homologues to SMc01553 and SMc01554 been found and, except for the case of *Frankia* sp. EAN1pec, a gene encoding an MBOAT is situated in the vicinity (Fig. 1b). The scattered distribution of the region in only certain species of the proteobacteria, verrucomicrobia, acidobacteria and actinobacteria (Fig. 1b) indicates that in most of these cases the DNA fragment was acquired by horizontal gene transfer.

Here, we present the characterization of the protein SMc01553 as an ACP. SMc01553 was overproduced as insoluble inclusion bodies and the renatured recombinant protein can be converted to the holo-form. SMc01553 could not be loaded with the usual extender unit malonyl-CoA using the enzyme FabD of *S. meliloti*. A mutant was created in which both duplicated regions were deleted, but no phenotype was found in relation to the wild-type in the free-living conditions tested or in symbiosis with alfalfa.

## METHODS

**Bacteria and growth conditions.** Table 1 lists the bacterial strains and plasmids used in this work. *E. coli* was grown at 30 °C in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook & Russell, 2001), or in M9 minimal broth (Miller, 1972) in the case of [<sup>3</sup>H]β-alanine labelling assays. *S. meliloti* strains were grown at 30 °C either in complex tryptone yeast (TY) broth supplemented with 4.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Beringer, 1974) or in the following minimal media: M9 supplemented with 2 μg biotin ml<sup>-1</sup> and with succinate (10 mM) replacing glucose as the carbon source, Sherwood medium (Sherwood, 1970) with succinate (8.3 mM) replacing mannitol as the carbon source, or Robertsen medium (Robertsen *et al.* 1981). Antibiotics were added, when required, at the following final concentrations (μg ml<sup>-1</sup>): carbenicillin, 100; chloramphenicol, 20; kanamycin, 50; gentamicin, 20; spectinomycin, 200; tetracycline, 20 for *E. coli*, and neomycin, 200;



**Fig. 1.** Genetic organization around the gene encoding SMC01553 and selected SMC01553 homologues in different organisms. (a) Duplicated DNA regions in *S. meliloti* 1021. Coordinates of the fragments in the *S. meliloti* genome are indicated with dashed lines and percentages of identity (% Iden.) at the DNA level are indicated on the line between the two fragments. The DNA region located between oligonucleotides o53 and o54 was deleted in mutant YD101, the region located between oligonucleotides o75 and o77 was deleted in mutant YD102, and both regions were deleted in mutant YD103. (b) Representative homologues in the bacterial species indicated on the right. Nomenclature used in (a) and (b): ACP, acyl carrier protein; FkbH, FkbH-like protein; MBOAT, membrane bound O-acyltransferase. (c) RT-PCR expression of *smc01553* and *smb22007* analysed in a 2% agarose gel. Lanes: 1, 100 bp molecular mass marker; 2 and 6, DNA from *S. meliloti* 1021; 3, RT-PCR using RNA isolated from YD101 mutant; 4, RT-PCR using RNA isolated from YD103 (double mutant); 5, RNA from *S. meliloti* 1021 (negative control); 7, RT-PCR using RNA isolated from YD102; 8, RNA from YD101; 9, RNA from YD103; 10, RT-PCR using RNA from *S. meliloti* 1021. The oligonucleotide primers used were *smc01553F* and *smc01553R* (Table 2).

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

Sm<sup>R</sup>, Kn<sup>R</sup>, Cb<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup> and Spc<sup>R</sup>: streptomycin, kanamycin, carbenicillin, chloramphenicol, gentamicin and spectinomycin resistance, respectively. Subscript *Sm* denotes genes from *S. meliloti* 1021. Plasmids used and made for construction of mutants are specified in Methods.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
DH5 $\alpha$	Host used for cloning	Bethesda Research Laboratory
BL21(DE3)	Host used for protein expression	Studier <i>et al.</i> (1990)
OG7001	<i>panD</i> mutant of BL21(DE3), $\beta$ -alanine auxotroph	Epple <i>et al.</i> (1998)
<i>S. meliloti</i> strains		
1021	Sm <sup>R</sup> of SU47 wild-type	Galibert <i>et al.</i> (2001)
YD101	Deletion of 6.6 kb chromosomal region, Spc <sup>R</sup>	This study
YD102	Deletion of 4 kb in pSymb, Gm <sup>R</sup>	This study
YD103	Double mutant, having deletions of both YD101 and YD102, Spc <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	This study
Plasmids		
pET9a	Expression vector, Kn <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pET16b	Expression vector, Cb <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pLysS	Causes repression of T7 polymerase, Cm <sup>R</sup>	Studier <i>et al.</i> (1990)
pBluescript SK+	Cloning vector, Cb <sup>R</sup>	Stratagene
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide vector, Kn <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pTB5035	<i>acpP<sub>Sm</sub></i> in pET9a	López-Lara & Geiger (2000)
pTB1003	<i>rkpF</i> of Rm41 in pET9a	Epple <i>et al.</i> (1998)
pAL20651	<i>smb20651</i> in pET9a	Ramos-Vega <i>et al.</i> (2009)
pCSF07	<i>nodF<sub>Sm</sub></i> in pET9a	Ramos-Vega <i>et al.</i> (2009)
pAL01553	<i>smc01553</i> in pET9a, Kn <sup>R</sup>	This study
pAL07	<i>acpXL<sub>Sm</sub></i> in pET9a, Kn <sup>R</sup>	This study
pYDM13	<i>smb22007</i> in pET9a, Kn <sup>R</sup>	This study
pYDM29	<i>smc01553</i> in pET16b, Cb <sup>R</sup>	This study
pYDM19	<i>acp</i> domain of <i>rpka<sub>Sm</sub></i> in pET9a, Kn <sup>R</sup>	This study

spectinomycin, 400; gentamicin, 70; streptomycin, 500; tetracycline, 4 for *S. meliloti*.

pK18*mobsacB* derivatives were mobilized into *S. meliloti* strains by diparental mating using the *E. coli* S17-1 donor strain as described by Simon *et al.* (1983).

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

**Construction of expression plasmids.** All genes were amplified from *S. meliloti* 1021 genomic DNA. Using specific oligonucleotides (Table 2), the genes *smc01553*, *smb22007* and *acpXL* (*smc04277*) and the fragment encoding the ACP domain in RkpA were amplified and, after restriction with *NdeI* and *BamHI*, fragments were cloned into pET9a or pET16b (Studier *et al.*, 1990) that had been digested with *NdeI* and *BamHI*. Names given to the respective expression plasmids are indicated in Table 1.

**Construction of sinorhizobial mutants lacking SMc01553-type ACPs.** First, the duplicated region of 6.6 kb present in the chromosome (coordinates 2 490 073 to 2 496 674) was exchanged with a spectinomycin resistance cassette (Fig. 1a). The oligonucleotide primers o52 and o53 (Table 2) were used in a PCR to amplify 1496 bp

of genomic DNA upstream of this region, introducing *BamHI* and *HindIII* sites (underlined in the table) into the PCR product. Similarly, the primers o54 and o55 (Table 2) were used to amplify 1594 bp of genomic DNA downstream of the region, introducing *HindIII* and *XhoI* sites (underlined in the table) into this PCR product. After digestion with the respective enzymes, the 1496 bp fragment was cloned into plasmid pBluescript SK+ that had been digested with *BamHI* and *HindIII*, yielding the plasmid pYDM02. Then, the 1594 bp fragment was cloned as *HindIII/XhoI* into plasmid pYDM02 that had been digested with *HindIII* and *XhoI*, yielding the plasmid pYDM03. A resistance cassette obtained as a *HindIII* fragment from plasmid pHY109 (Osteras *et al.*, 1998) was inserted into pYDM03 that had been digested with *HindIII* to yield pYDM04. Plasmid pYDM04 was digested with *BamHI* and *XhoI* to reclone the regions usually flanking the 6.6 kb region, as well as the spectinomycin resistance gene located in between, as a *BamHI/XhoI* fragment into the suicide vector pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) that had been digested with *BamHI* and *SalI*, yielding pYDM06. Plasmid pYDM06 was introduced into wild-type strain *S. meliloti* 1021, and double recombinants in which the spectinomycin resistance cassette replaced the 6.6 kb chromosomal region were obtained following the procedure described previously (Sohlenkamp *et al.*, 2004). The mutant strain was named YD101.

A second mutant was created in which the gene *smb22007*, encoding the putative ACP in the pSymb plasmid, and surrounding areas were replaced by a gentamicin resistance cassette (Fig. 1a). A 4 kb DNA fragment was deleted comprising coordinates 633 000–637 000 in pSymb. The oligonucleotides o75 and o76 (Table 2) were used in a PCR to amplify 1610 bp of genomic DNA upstream of the 4 kb fragment, introducing *XbaI* and *HindIII* sites (underlined in the

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

For construction of expression plasmids, the forward primers incorporated an *Nde*I restriction site (underlined) overlapping the start codon of the respective gene. The reverse primers incorporated a *Bam*HI restriction site (underlined) after the stop codon. For amplification of *smb22007* the primers smc01553F and smc01553R were used.

Primer	Sequence (5'-3')
<b>Primers used for construction of expression plasmids</b>	
smc01553F	AGGAATACATATGTCGACCATCAACTTTATC
smc01553R	AAAGGATCCTCAGTTCTGCTTGCGCTTGAC
smb22007R	AAAGGATCCTATGGTTCTGCTTGCGCTTGAC
apXLF	AGGAATACATATGCGCGTGACAGCTACATTC
apXLR	AAAGGATCCTCAACCCGCTTTTGCGGCC
domainrkpAF	AGGAATACATATGATCGAAGGCAAATCGCC
domainrkpAR	AAAGGATCCTCATTGACTCAGTGCTTTTCC
<b>Primers used for mutagenesis</b>	
o52	AAAGGATCCGCCGGTTCCTTGAATGC
o53	ATAGTAAGCTTGAAGCAGGAGCGGCAAACG
o54	ATAGTAAGCTTGCCCTCTCGCGATCACTGG
o55	ATAGTCTCGAGTCACGCGCCACCGCCAGG
o75	AGCTCTAGACCCAATGACGGCGAGCGAGAC
o76	ACCCAAAGCTTGCGTGGCTCCCTGCTGCGTCC
o77	ACCCAAAGCTTGCCCGACTACGCGCCACCAG
o78	ACCGCTCGAGCGGGTGGTCAGGTTGAACTGG

table) into the PCR product. Similarly, the primers o77 and o78 (Table 2) were used to amplify 1382 bp of genomic DNA downstream of the selected region (Fig. 1a), introducing *Hind*III and *Xho*I sites (underlined in the table) into the PCR product. After digestion with the respective enzymes, the 1610 bp fragment was cloned into plasmid pBluescript SK+ that had been digested with *Xba*I and *Hind*III, yielding the plasmid pYDM39. Then, the 1382 bp fragment was cloned as *Hind*III/*Xho*I into plasmid pYDM39 that had been digested with *Hind*III and *Xho*I, yielding the plasmid pYDM49. A gentamicin resistance cassette obtained as a *Hind*III fragment from plasmid pAC $\Omega$ -Gm (Schweizer, 1993) was inserted into pYDM49 that had been digested with *Hind*III, yielding pYDM53. Plasmid pYDM53 was digested with *Xba*I and *Xho*I to reclon the regions usually flanking the deleted region and the gentamicin resistance gene located in between those regions as an *Xba*I/*Xho*I fragment into the suicide vector pK18mobsacB that had been digested with *Xba*II and *Sal*I, yielding pYDM55. Plasmid pYDM55 was introduced into wild-type strain *S. meliloti* 1021 and into mutant YD101 that lacks the chromosomal duplicated DNA region, and double recombinants in which the gentamicin resistance cassette replaced the selected region of pSymb were obtained following the procedure described previously (Sohlenkamp *et al.*, 2004). The single mutant was named YD102, and the double mutant YD103. The correct genetic organization of the three mutants obtained was corroborated by Southern blot analysis.

**Analysis of proteins.** Proteins were analysed by 20% native PAGE (Jackowski & Rock, 1983), by conformationally sensitive gels as previously described (Ramos-Vega *et al.*, 2009), or by denaturing SDS-PAGE according to Schägger and von Jagow (1987) using 16.8% acrylamide in the separating gel. Gels were stained with Coomassie blue. Protein concentrations were determined by the method of Duley & Grieve (1975) using BSA (Sigma) as standard.

**In vivo labelling with [ $^3$ H] $\beta$ -alanine.** *In vivo* labelling of ACPs with [ $^3$ H] $\beta$ -alanine, the biosynthetic precursor of 4'-phosphopantetheine, was carried out essentially as described previously using the  $\beta$ -

alanine auxotroph OG7001 (Epple *et al.*, 1998; López-Lara & Geiger, 2000).

**Overproduction of ACPs in *E. coli* cultures and purification of AcpP.** Cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3) pLysS overproducing the respective ACPs were obtained as previously described (Ramos-Vega *et al.*, 2009). Purified AcpP of *S. meliloti* was prepared as reported previously (López-Lara & Geiger, 2000), with the exception that in the last step, AcpP was purified using PrepCell (model 491, Bio-Rad) containing a cylindrical 20% native polyacrylamide gel rather than by electroelution from preparative gels. Fractions containing AcpP were combined and concentrated using a Centricon YM-3 centrifugal concentrator (Amicon, Millipore).

**Renaturation and purification of SMC01553.** SMC01553 and His-SMC01553 were overproduced in *E. coli* mainly as insoluble proteins. After cells were disrupted by French press, extracts were centrifuged and pellets were resuspended in 10 volumes of washing buffer (50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 100 mM KCl) and centrifuged for 10 min at 15 000 g at 4 °C. Solubilization of the inclusion body-containing pellet was achieved with 50 mM Tris/HCl, pH 8, 5 M guanidine HCl, 0.005% Tween 80, and the solution was maintained at 8 °C overnight. To remove insoluble material, the solution was spun at 19 000 g for 15 min. The supernatant was diluted to a final  $A_{280}$  of 0.1 in refolding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 M guanidine HCl, 0.005% Tween 80, 0.35 M L-arginine, 2 mM GSH, 0.02 mM GSSG) and kept at 8 °C for 50–60 h. After that, the Tween 80 concentration was adjusted to 0.05% and the resulting solution was dialysed against 50 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 0.05% Tween 80. After centrifugation of the solution to remove precipitates, SMC01553 protein was concentrated using a Centricon YM-3.

In the case of His-SMC01553, after adjusting the Tween concentration to 0.05%, the protein solution was dialysed against start buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) and afterwards further purified using a 1 ml Ni $^{2+}$  agarose column

(Hi Trap; Pharmacia Biotech) following the recommended standard method.

**Generation of polyclonal antiserum against the ACP SMc01553 and Western blot analysis.** Antiserum against the purified His-SMc01553 was raised in a white New Zealand rabbit that had been injected four times, each with a 1:1 mixture of Freund's complete or incomplete adjuvant (Roche) together with 150 µg His-SMc01553 antigen protein in 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Western blot analysis was performed as described previously (Ramos-Vega *et al.*, 2009), using anti-His-SMc01553 serum diluted 1000 times.

**Enzymatic assays and MS.** *In vitro* modification of apo-ACPs to holo-ACPs and *in vitro* malonylation of holo-ACPs were performed as previously described (Ramos-Vega *et al.*, 2009). Quantitative conversion of apo-SMc01553 to holo-SMc01553 was performed as reported previously (Epple *et al.*, 1998). MALDI-TOF MS was performed using a Bruker Daltonics Autoflex operated in the linear mode. Protein mixtures were prepared and spectra were obtained as described previously (Ramos-Vega *et al.*, 2009).

**Phenotypes of mutants.** Zones of inhibition, using the filter-disk assay with the detergents SDS and sodium deoxycholate (DOC), were measured as previously described (Ferguson *et al.*, 2002; Ramos-Vega *et al.*, 2009). The profile of rhizobial K-antigens (KPSs) was analysed by 18% DOC-PAGE following the procedure described by Reuhs *et al.* (1998). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants were grown in a nitrogen-free medium as described previously (Olivares *et al.*, 1980). Nitrogen fixation was determined by examining acetylene reduction using GC (Burris, 1972).

## RESULTS AND DISCUSSION

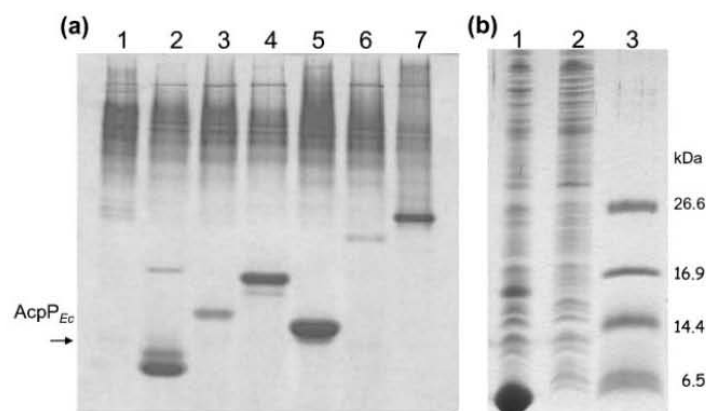
### Overproduction of the six different ACPs of *S. meliloti* 1021

In order to have the possibility of purifying all ACPs present in *S. meliloti* 1021, plasmids for the overproduction of AcpXL, the ACP domain of RkpA and SMc01553 were constructed in this study. Although all ACPs were predicted to be soluble proteins with similar characteristics, the total amount of the respective ACP present in cell

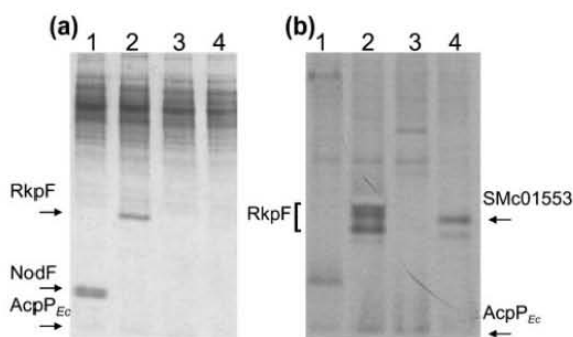
extracts varied greatly (Fig. 2a). In particular, little soluble SMc01553 was detected in cell extracts (Fig. 2a, lane 6). Cell extracts of *E. coli* overproducing SMc01553 were whitish, indicating that SMc01553 was overproduced as inclusion bodies. The analysis of pellets after low-speed centrifugation showed indeed that SMc01553 was mainly produced as inclusion bodies (Fig. 2b), and only a minor proportion of the protein was obtained as soluble protein (Fig. 2a, lane 6). Several parameters of the culture for overproduction of SMc01553 were varied, but in all cases the protein was mainly obtained as inclusion bodies (data not shown). Therefore, SMc01553 was purified from the inclusion bodies through a process of denaturation and renaturation. To our knowledge, this is the first bacterial ACP that, when overproduced, forms inclusion bodies. Although we observed that RkpF was also overproduced in part as inclusion bodies (results not shown), the amount of soluble protein obtained was enough for purification from the soluble fraction (Epple *et al.*, 1998). We have also amplified *smb22007*, which encodes a protein identical to SMc01553 with only the addition of the amino acid glutamine at the carboxy-terminus. However, as overproduced SMb22007 also formed mainly inclusion bodies (results not shown), the rest of the work was continued with SMc01553.

### SMc01553 is modified *in vivo* and *in vitro* with 4'-phosphopantetheine

ACPs are functional when substituted with the 4'-phosphopantetheine prosthetic group. Cell-free extracts of *E. coli* OG7001(pLysS), carrying either empty pET9a or plasmids that allowed overproduction of NodF, RkpF or SMc01553, which had been grown in the presence of [<sup>3</sup>H]β-alanine were analysed by PAGE and subsequent autoradiography. A Coomassie-stained gel showed bands in cell crude extracts corresponding to the overproduction in *E. coli* of NodF from *S. meliloti* 1021 and of RkpF from *S. meliloti* Rm41 (Fig. 3a, lanes 1 and 2) that efficiently incorporated [<sup>3</sup>H]β-alanine (Fig. 3b). Although SMc01553



**Fig. 2.** Overproduction of *S. meliloti* 1021 ACPs in *E. coli* (*Ec*). Analysis of cell-free extracts from *E. coli* separated by 20% native PAGE (a) or of insoluble inclusion bodies separated in a 16.8% SDS Schagger and von Jagow gel (b) stained with Coomassie blue. In (a) the overproduced ACPs were: lane 1, none (*E. coli* containing the pET9a vector); 2, AcpP; 3, NodF; 4, AcpXL; 5, SMB20651; 6, SMc01553; 7, ACP domain of RkpA. (b) Pellets after obtaining the crude extract from *E. coli* overproducing SMc01553 (lane 1) or from *E. coli* carrying the vector pET9a (lane 2); lane 3, molecular mass marker. In each lane the equivalent of ~0.25 ml culture was loaded.

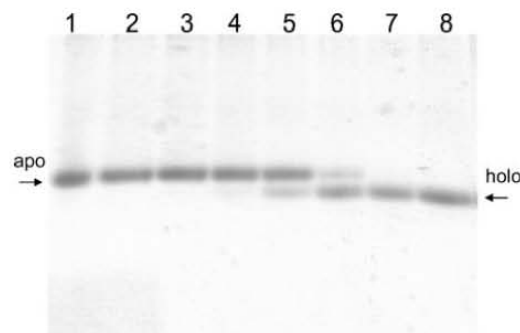


**Fig. 3.** Overproduction of *S. meliloti* ACPs in *E. coli* (*Ec*) OG7001 (pLysS). Analysis of cell extracts from *E. coli* strains overproducing NodF, RkpF and SMc01553. (a) Proteins separated by 20% native PAGE and stained with Coomassie blue. (b) Autoradiogram after labelling with [<sup>3</sup>H]β-alanine. In (a) and (b) gels were loaded with cell-free extracts of *E. coli* overproducing: NodF (lane 1), RkpF (lane 2), no ACPs (*E. coli* strain carrying pET9a) (lane 3) and SMc01553 (lane 4). Note that the amount of soluble SMc01553 is not enough to be seen in a Coomassie blue-stained gel [lane 4 in (a)] but the [<sup>3</sup>H]-labelled protein could be observed in a parallel protein sample treated in the same way (b). The bands corresponding to *E. coli* AcpP, NodF, RkpF and SMc01553 are indicated.

was poorly overproduced as a soluble protein, it was efficiently labelled with [<sup>3</sup>H]β-alanine (Fig. 3, lanes 4), indicating the formation of holo-SMc01553. An enzyme activity present in *E. coli*, presumably AcpS, can modify SMc01553 post-translationally by adding the prosthetic group.

In order to test whether we could quantitatively convert apo-SMc01553 to holo-SMc01553, we incubated the purified apo-SMc01553 protein, obtained after the process of denaturation and renaturation, in the presence of CoA and His-AcpS from *S. meliloti* (Ramos-Vega *et al.*, 2009). The time-course of a quantitative conversion of apo-SMc01553 into holo-SMc01553 could readily be followed (Fig. 4). If the AcpS activity is inhibited by the presence of the chelating agent EGTA, apo-SMc01553 is not converted to holo-SMc01553. During analysis with native PAGE, even apo-SMc01553 protein and holo-SMc01553 protein migrate differently. Holo-SMc01553 migrates faster on native 20% PAGE than apo-SMc01553 (Fig. 4), suggesting a more compact structure for holo-SMc01553 than for apo-SMc01553. In a similar manner, holo-RkpF migrates faster than apo-RkpF in 20% native PAGE (Epple *et al.*, 1998) and, as expected, the holo-form of the ACP domain of RkpA also ran faster than its apo-form in the same types of gels (results not shown).

Analysis of purified SMc01553 by MALDI-TOF MS showed a major peak at *m/z* 9221.19 and a second peak at *m/z* 9351.85 (Fig. 5a), in agreement with the expected

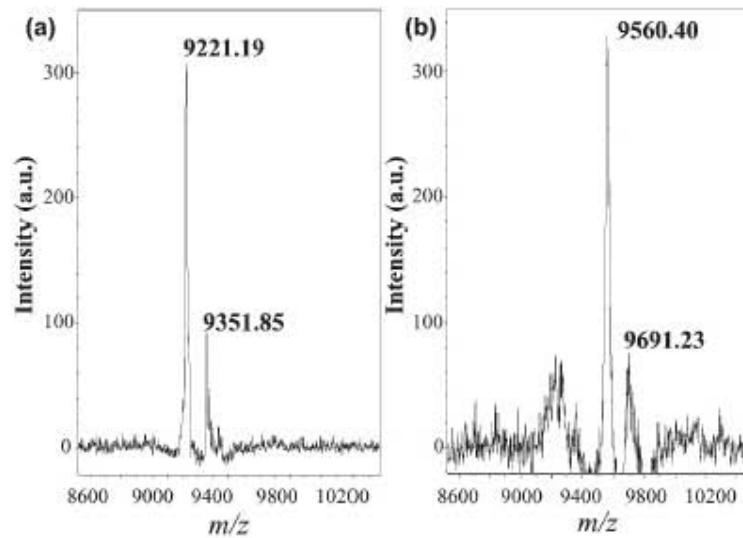


**Fig. 4.** Quantitative conversion of apo-SMc01553 into holo-SMc01553 protein. Apo-SMc01553 was incubated with CoA in the presence His-AcpS, and the reaction was stopped with EGTA after different incubation times. A Coomassie-stained gel after native 20% PAGE is shown. The various lanes show reaction mixture lacking His-AcpS (lane 1), reaction mixture in which EGTA was added before the incubation was started (incubation time, 128 min) (lane 2), 0 min incubation (lane 3), 8 min incubation (lane 4), 16 min incubation (lane 5), 32 min incubation (lane 6), 64 min incubation (lane 7) and 128 min incubation (lane 8). The positions of apo-SMc01553 (apo) and holo-SMc01553 (holo) are indicated.

masses for species of SMc01553 lacking (9221.41) or retaining the N terminal methionine (9352.60). SMc01553 that had been incubated with His-AcpS yielded masses of 9560.40 and 9691.23 (Fig. 5b), which correspond to increases of 339.21 and 339.38 atomic mass units (amu) with respect to the peaks observed in the untreated samples. These differences are consistent with the expected 339 amu for the 4'-phosphopantetheine addition, indicating that His-AcpS-treated SMc01553 is carrying the prosthetic group typical for ACPs. Preliminary data also detected an increase of about 339 amu in samples of NodF, AcpXL and the ACP domain of RkpA that had been treated with His-AcpS (data not shown). Therefore, AcpS of *S. meliloti* is able to modify all ACPs present in this strain.

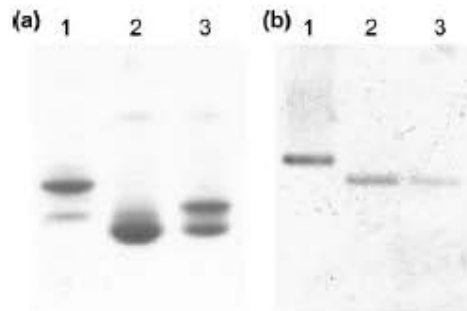
### SMc01553 is not malonylated by FabD

Malonyl-CoA:ACP transacylase (FabD) is the enzyme responsible for the transfer of the malonyl group from malonyl-CoA to holo-ACP, resulting in the formation of malonyl-ACP. Although the ACP SMB20651 is specifically modified by the enzyme SMB20650, it could also be loaded *in vitro* with a malonyl group using malonyl-CoA and His-FadD from *S. meliloti* (Ramos-Vega *et al.*, 2009). We tested whether SMc01553 could be modified with His-FabD. As a positive control, the AcpP of *S. meliloti* was used. Conformationally sensitive PAGE showed a slower-migrating form of AcpP that appeared only when the protein was incubated with malonyl-CoA and His-FabD (Fig. 6a). However, holo-SMc01553 that had been treated in the same way did not show any change in mobility in native



**Fig. 5.** *In vitro* 4'-phosphopantetheinylation of SMc01553 observed by MALDI-TOF MS. Spectra of SMc01553 incubated with CoA in the absence (a) or presence (b) of purified *S. meliloti* His-AcpS. Intensity is given in arbitrary units (a.u.).

PAGE (Fig. 6b) or in conformationally sensitive PAGE containing concentrations of urea ranging from 0.5 to 3.2 M. Analysis by MS of holo-SMc01553 that had been treated with His-FabD in the presence of malonyl-CoA did not show any difference from the spectra of non-treated holo-SMc01553, and a peak corresponding to malonyl-



**Fig. 6.** Malonylation assay of sinorhizobial AcpP or SMc01553. AcpP was separated by conformationally sensitive PAGE in gels containing 3.2 M urea (a), whereas SMc01553 was analysed by 20% native PAGE (b). Gels were visualized by staining with Coomassie blue. Proteins in (a): apo-AcpP (lane 1), holo-AcpP (lane 2) and holo-AcpP assay with malonyl-CoA in the presence of FadD (lane 3). Proteins in (b): apo-SMc01553 (lane 1), holo-SMc01553 (lane 2) and holo-SMc01553 assay with malonyl-CoA in the presence of FadD (lane 3).

SMc01553 could not be detected. In samples of holo-AcpP treated in parallel with His-FabD and malonyl-CoA, a clear peak was observed that corresponded to the expected increase of 86 amu for the addition of the malonyl group to holo-AcpP (results not shown). These results suggest that SMc01553 is not a substrate of FabD and probably cannot be loaded with the malonyl group. The genes *smc01553* and *smc01554* are predicted to form an operon. Also, in genomes that contain homologues for SMc01553, the gene encoding such a homologue is always located next to a gene encoding a homologue of SMc01554 (Fig. 1b). SMc01554 and the homologous proteins derived from genomes shown in Fig. 1(b) are members of the FkbH family of enzymes, and for some of those members it has been shown *in vitro* that they modify a dedicated ACP with an unusual extender unit (Sun *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2000). It is likely that SMc01553 is loaded by SMc01554 with a specific moiety, and experiments are under way to determine whether SMc01553 can be modified by SMc01554 *in vivo*.

#### Phenotypic characterization of sinorhizobial mutants lacking SMc01553-type ACPs

None of the three mutants constructed in this study displayed growth differences with respect to wild-type *S. meliloti* 1021 when grown on TY medium or in any of the minimal media (M9, Robertsen or Sherwood). Using filter disk assays, no difference of sensitivity was found to the detergents SDS or DOC. The DNA region deleted in pSymb is in between two paralogues of *rkpZ* and next to

the gene cluster 2 of *S. meliloti* 1021 involved in the biosynthesis of KPS (Becker *et al.*, 2005). Analysis by DOC-PAGE did not show any difference in the profiles of the different mutants in relation to the wild-type (results not shown). However, a small change in the structure of such a polysaccharide might not be detected by this technique.

With the polyclonal antibody raised against His-SMc01553, SMc01553 could not be detected in cell extracts of the wild-type strain grown in any of the media mentioned above. However, RT-PCR did reveal the presence of mRNA of *smc01553* or *smb22007* in the case of the wild-type and each of the single mutants, while such a transcript was not present in RNA extracted from the double mutant YD103 (Fig. 1c). The RT-PCR results obtained from the analysis of the single mutants YD101 and YD102 showed, respectively, the expression of *smb22007* and *smc01553* (Fig. 1c, lanes 3 and 7). An Affimetrix GeneChip containing the complete *S. meliloti* genome has shown that in TY-grown cells, *smc01553* and *smc01554* are among the two-thirds of putative coding regions that are expressed at above background levels (Barnett *et al.*, 2004), confirming that these two genes are expressed under such growth conditions. SMc01553 and SMc01554, and perhaps SMc01551, seem to be part of a pathway for the synthesis of a secondary metabolite, but from the genome of *S. meliloti* 1021 it is not clear which other genes could be involved in such a pathway. Since these genes are the result of a recent event of horizontal gene transfer (Galibert *et al.*, 2001), it is possible that only part of the genes required for the synthesis of such a metabolite were transferred.

Alfalfa plants were inoculated with either the parent strain 1021, each one of the mutants lacking either the chromosomal region or the region in pSymb, or the double mutant lacking both regions. No significant differences in the number of nodules or in the course of nodule development were observed (data not shown). After 40 days, the nitrogen-fixing ability was measured and no significant differences were observed (data not shown).

We have not found any phenotype in free-living or symbiotic conditions for the *S. meliloti* mutant lacking the DNA fragments encoding SMc01553 and Smb22007. Although more experiments need to be carried out to find possible functions encoded by these regions, it is possible that they contain only accessory DNA because these regions are the result of the duplication of DNA acquired by horizontal gene transfer. At this point it is not clear whether the products of the DNA of either region are responsible for the formation of a functional metabolite.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)/Mexico (49738-Q) with partial support from the Howard Hughes Medical Institute (HHMI 55003675). Y.D.-M. was supported during the PhD programme [Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad

Nacional Autónoma de México (UNAM)] by scholarships from CONACyT and Dirección General de Estudios de Postgrado (UNAM).

## REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäfer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Ardoürel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillat, F., de Billy, F., Promé, J. C., Dénarié, J. & Truchet, G. (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357–1374.
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F. & Long, S. R. (2004). A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote–host interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16636–16641.
- Becker, A., Fraysse, N. & Sharypova, L. (2005). Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 899–905.
- Berlinger, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188–198.
- Brozek, K. A., Carlson, R. W. & Raetz, C. R. (1996). A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J Biol Chem* **271**, 32126–32136.
- Burris, R. H. (1972). Nitrogen fixation assay—methods and techniques. *Methods Enzymol* **24**, 415–431.
- Byers, D. M. & Gong, H. (2007). Acyl carrier protein: structure–function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem Cell Biol* **85**, 649–662.
- Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M. & Thomas, M. G. (2009). Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Nat Prod Rep* **26**, 90–114.
- Dulley, J. R. & Grieve, P. A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* **64**, 136–141.
- Epple, G., van der Drift, K. M. G. M., Thomas-Oates, J. & Geiger, O. (1998). Characterization of a novel acyl carrier protein, RkpF, encoded by an operon involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**, 4950–4954.
- Ferguson, G. P., Roop, R. M., II & Walker, G. C. (2002). Deficiency of *Sinorhizobium meliloti* *hcaA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with the alteration of cell envelope. *J Bacteriol* **184**, 5625–5632.
- Ferguson, G. P., Datta, A., Carlson, R. W. & Walker, G. C. (2005). Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol Microbiol* **56**, 68–80.
- Florova, G., Kazanina, G. & Reynolds, K. A. (2002). Enzymes involved in fatty acid and polyketide biosynthesis in *Sarcomyces glaucus*. role of FabH and FabD and their acyl carrier protein specificity. *Biochemistry* **41**, 10462–10471.
- Flugel, R. S., Hwangbo, Y., Lambalot, R. H., Cronan, J. E. & Walsh, C. T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 959–978.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abols, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A. & other authors (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668–672.



- Geiger, O. & López-Lara, I. M. (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol Lett* **208**, 153–162.
- Geiger, O., Spalink, H. P. & Kennedy, E. P. (1991). Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group. *J Bacteriol* **173**, 2872–2878.
- Guo, X., Flores, M., Mavingui, P., Fuentes, S. I., Hernández, G., Dávila, G. & Palacios, R. (2003). Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Res* **13**, 1810–1817.
- Hæg, A. F., Wehmeier, S., Beck, S., Marlow, V. L., Fletcher, V., James, E. K. & Ferguson, G. P. (2009). The *Sinorhizobium meliloti* LptXL and AcpXL proteins play important roles in bacteroid development within alfalfa. *J Bacteriol* **191**, 4681–4686.
- Hofmann, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* **25**, 111–112.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1983). Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**, 15186–15191.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**, 923–936.
- López-Lara, I. M. & Geiger, O. (2000). Expression and purification of four different acyl carrier proteins. *Microbiology* **146**, 839–849.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Olivares, J., Casadesus, J. & Bedmar, E. J. (1980). Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl Environ Microbiol* **39**, 967–970.
- Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C. & Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11394–11399.
- 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* **155**, 257–267.
- Rawlings, M. & Cronan, J. E. (1992). The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J Biol Chem* **267**, 5751–5754.
- Reuhs, B. L., Geller, D. P., Kim, J. S., Fox, J. E., Koll, V. S. & Pueppke, S. G. (1998). *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4930–4938.
- Robertsen, B. K., Aman, P., Davill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1981). Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol* **67**, 389–400.
- Rock, C. O. (2008). Fatty acids and phospholipids metabolism in prokaryotes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th edn, pp 59–96. Edited by D. E. Vance & J. E. Vance. Amsterdam: Elsevier.
- Sambrook, J. & Russell, D. R. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Schägger, H. & 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.
- Schweizer, H. D. (1993). Small broad-host-range gentamicin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechnology* **15**, 831–834.
- Sharypova, L. A., Niehaus, K., Scheidte, H., Holst, O. & Becker, A. (2003). *Sinorhizobium meliloti* acpXL mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **278**, 12946–12954.
- Sherwood, M. T. (1970). Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* **33**, 708–713.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *BioTechnology* **1**, 784–791.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K. E. & Geiger, O. (2004). Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *J Bacteriol* **186**, 1667–1677.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of a T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60–89.
- Sun, Y., Hong, H., Gillies, F., Spencer, J. B. & Leadlay, P. F. (2008). Glycerol S acyl carrier protein as an intermediate in the biosynthesis of tetrionate antibiotics. *ChemBioChem* **9**, 150–156.
- Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L. & Reeves, C. D. (2000). The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* **251**, 81–90.

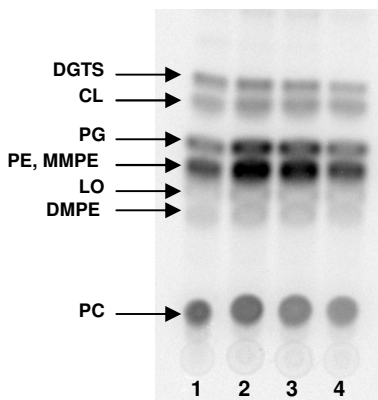
Edited by: H.-M. Fischer

## RESULTADOS ADICIONALES

### I. Búsqueda de cambios en los lípidos de membrana de bacterias que carecen de SMc01553 y/o SMb22007.

Los resultados mostrados en el artículo, revelan que SMc01553 es una ACP, con la capacidad estructural de acarrear compuestos, sin embargo, no se sabe qué tipo de compuesto. Con la finalidad de evaluar si existe alguna relación entre las mutantes y la formación de los lípidos de membrana de *S. meliloti*, se evaluó su perfil de lípidos.

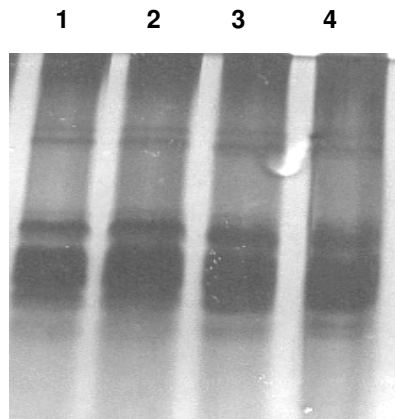
La composición de los lípidos de membrana se analizó mediante un marcaje *in vivo* con [1-<sup>14</sup>C]-acetato. Las bacterias se crecieron en medio completo PY con CaCl<sub>2</sub> o en medio mínimo M9 hasta una OD<sub>620nm</sub> de 0.6. Posteriormente, los lípidos se extrajeron con el método de Bligh & Dyer (1959) y fueron separados por una cromatografía de capa fina en una y dos dimensiones como se describió anteriormente (de Rudder *et al*, 1997). Como se puede observar, no se detectan diferencias en el perfil de lípidos entre la cepa silvestre y las mutantes YD101, YD102 y YD103 (Fig. 18).



**Fig. 18.** Perfil de lípidos de membrana de las cepas *S. meliloti* 1021, YD101, YD102 y YD103 crecidas en medio M9. Las células fueron marcadas con [1-<sup>14</sup>C]-acetato, los lípidos fueron extraídos con el método de Bligh & Dyer, y separados por TLC de una dimensión. Perfiles de lípidos de: **1)** *S. meliloti* 1021, **2)** YD101, **3)** YD102 y **4)** YD103. Se indican los lípidos; **DGTS:** 1,2-diaciglicerol-3-O- 4'-(N,N,N-trimetil) - homoserina, **CL:** cardiolipina, **PG:** fosfatidilglicerol, **PE:** fosfatidiletanolamina, **MMPE:** monometil-fosfatidiletanolamina, **LO:** lípido de ornitina, **DMPE:** dimetil-fosfatidiletanolamina y **PC:** fosfatidilcolina. Tampoco se observan diferencias al analizar estas muestras por TLC de dos dimensiones (datos no mostrados).

## II. Perfil de KPSs de las cepas que carecen de *smc01553* y/o *smb22007*.

Por otra parte se observó que la ACP Smb22007 se encuentra codificada dentro de una región del pSymB denominada *kps3*. En esa zona del pSymB existen varios genes que son utilizados para la síntesis de polisacáridos capsulares (Becker *et al*, 2005; Finan *et al*, 2001). Debido a la cercanía con estos genes, quisimos analizar si las mutantes YD101, YD102 y YD103; presentaban algún cambio en el perfil de KPSs. Para ello se evaluó el perfil de KPSs utilizando un gel de poliacrilamida al 18% que contiene el detergente deoxicolato (DOC) siguiendo la técnica descrita por Reuhs *et al* (1998). Como se puede apreciar en la Fig. 19, no se detectan cambios en los perfiles de KPSs en las mutantes YD101, YD102 y YD103 con respecto a la cepa silvestre. El perfil de KPSs corresponde a lo reportado anteriormente (Sharypova *et al*, 2006). Sin embargo, esta técnica no permite observar cambios pequeños en los KPSs.



**Fig. 19.** Análisis de KPSs en *S. meliloti* 1021 y cepas derivadas. Gel de poliacrilamida al 18% con deoxicolato teñido con “Alcian Blue” para observar KPSs. En los diferentes carriles se ven los polisacáridos extraídos de 1) *S. meliloti* YD102, 2) *S. meliloti* 1021, 3) *S. meliloti* YD101 y 4) *S. meliloti* YD103.

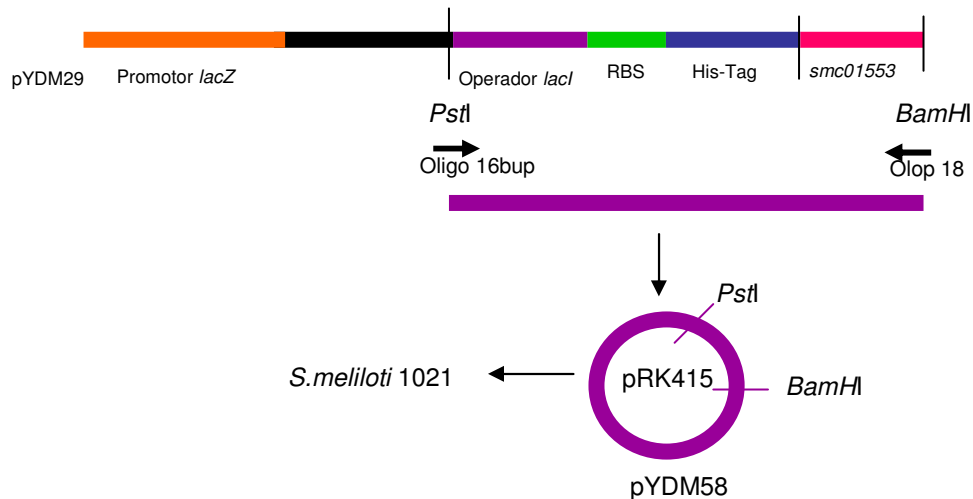
## III. Búsqueda de condiciones de expresión de los posibles operones que contienen *smc01553* y *smb22007* con fusiones transcripcionales.

Como *smc01553* y *smb22007* se encuentran muy cercanos a otros 3 ORFs, probablemente podrían ser parte de un operón y en conjunto participar en una vía de biosíntesis común. Una manera de buscar un producto sintetizado por las proteínas codificadas en este grupo de genes, sería extraer la ACP en una condición donde se exprese de forma habitual y analizar el o los posibles substituyentes acilos. Con la finalidad de encontrar una condición de expresión de los probables operones, se

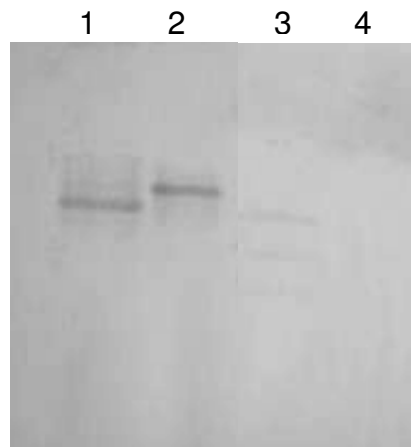
realizaron fusiones transcripcionales de las dos regiones curso arriba del primer ORF de ambos operones con el gen reportero *uidA* (que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa) y de la región promotora del gen *lacZ* usando el plásmido pBBRMCS53 (Corvera *et al*, 1999). La región del cromosoma que se clonó constó de 470 pb y la del pSymB fue de 535 pb. Las fusiones fueron introducidas a *S. meliloti* 1021. Las condiciones donde se buscó la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa fueron el medio mínimo Sherwood, el medio mínimo MOPS con bajo fosfato y el medio complejo PY. En ninguna de las condiciones probadas se encontró expresión del gen reportero.

#### **IV. Búsqueda del producto que acarrea SMc01553 por espectrometría de masas, al expresar constitutivamente HisSMc01553 en *S. meliloti*.**

Con los anticuerpos policlonales para SMc01553 se buscó la presencia de la ACP en diferentes condiciones y etapas de crecimiento de *S. meliloti* 1021. Al no detectarse la proteína en ninguna de las condiciones ensayadas se construyó un vector que expresara constitutivamente a la proteína SMc01553, esto con la finalidad de tener una cepa de *S. meliloti* que tuviera la capacidad de sintetizar la ACP, y de esta manera, poderla extraer y tratar de identificar el producto que acarrea. La estrategia que se siguió es la esquematizada en la Fig. 20. Como ya se tenía clonado el gen *smc01553* en pET16b (pYDM29), se utilizaron oligonucleótidos que amplificaron desde la región operadora *lacI* hasta el codon de paro de *smc01553*, que incluye la parte que codifica para la región de histidinas. Dicha región se clonó en el vector de amplio rango de hospedero pRK415 (Keen *et al*, 1988), generándose el plásmido pYDM58. Utilizando los anticuerpos policlonales contra SMc01553 se detectó la presencia de la ACP en cultivos de *S. meliloti* 1021 que lleva el plásmido pYDM58 a través de 'Western-blot' (Fig. 21). De los cultivos donde se detectó la presencia de His-SMc01553, se purificó la proteína utilizando el método estandarizado de columna de níquel y se hicieron análisis por espectrometría de masas para tratar de identificar el compuesto que acarrea SMc01553. Sin embargo, no se obtuvieron resultados reproducibles y que tuvieran una interpretación clara.



**Fig. 20.** Esquema que muestra la estrategia seguida para obtener la clonación de *his-smc01553* en pRK415. Se amplificó el fragmento de ADN del plásmido pYDM29 (*smc01553* en pET16b), que comprende desde el operador *lacI* hasta el codón de paro de *his-smc01553*, introduciendo los sitios *PstI* y *BamHI*. La secuencia del oligo 1 es AAC TGC AGG GGG AAT TGT GAG CGG ATA AC, el sitio *PstI* está subrayado, el oligo Olop 18 fue reportado en Dávila-Martínez *et al* (2010). El fragmento se clonó en el vector pRK415, generando la construcción denominada pYDM58, la cual se transfirió a *S. meliloti*.

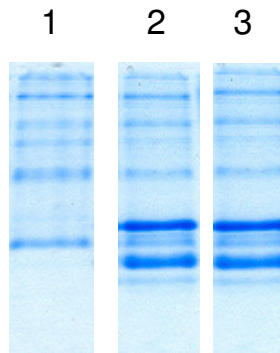


**Fig. 21.** Western-blot que muestra la detección de **1)** Holo-HisSMc01553 purificada, **2)** Apo-HisSMc01553 purificada, **3)** Fracción soluble de extractos crudos de cultivos de *S. meliloti* 1021 conteniendo el plásmido pYDM58, fase exponencial, **4)** Fracción soluble de extractos crudos de cultivos de *S. meliloti* 1021 conteniendo el plásmido pRK415. Dilución de anti-HisSMc01553 1: 10 000.

## V. Búsqueda de la formación de gliceril-SMc01553 al expresar de forma conjunta y heteróloga *smc01553*, *smc01554* y *acpS*.

Con la información reciente que demostró la transferencia de un grupo gliceril a una ACP por parte de homólogos a FkbH (Sun *et al*, 2008), se generó en este proyecto la hipótesis de si SMc01554 (que tiene homología con FkbH) podría “cargar” a SMc01553 con el grupo gliceril. Para ello se generaron nuevas construcciones con la

intención de expresar de forma heteróloga y conjunta SMc01554 y Holo-SMc01553 y analizar posibles cambios conformacionales de SMc01553. Se clonaron en el mismo vector pET9a *acpS* de *S. meliloti* y *smc01553* (pYDM63). En el plásmido pBBRMCS-5 se clonó a *smc01554* (pYDM61). Ambos plásmidos se introdujeron en una cepa de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS. Se produjeron cultivos y se analizaron las fracciones solubles de los extractos crudos. Los resultados se muestran en la Fig. 22.



**Fig. 22.** Análisis de proteínas purificadas por DEAE-Sepharosa a partir de extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS que sobreproduce 1) SMc01553, 2) SMc01553 y AcpS<sub>Sm</sub> y 3) SMc01553, AcpS<sub>Sm</sub> y SMc01554. Gel nativo de poliacrilamida al 20%.

En este tipo de geles de poliacrilamida no encontramos diferencias que nos puedan indicar que holoSMc01553 pueda estar cargada con el residuo gliceril, transferido por SMc01554. Sin embargo, esta posibilidad se puede seguir explorando y evaluando con otras metodologías.

## **VI. Reacciones de malonización *in vitro* con las 6 ACPs de *S. meliloti***

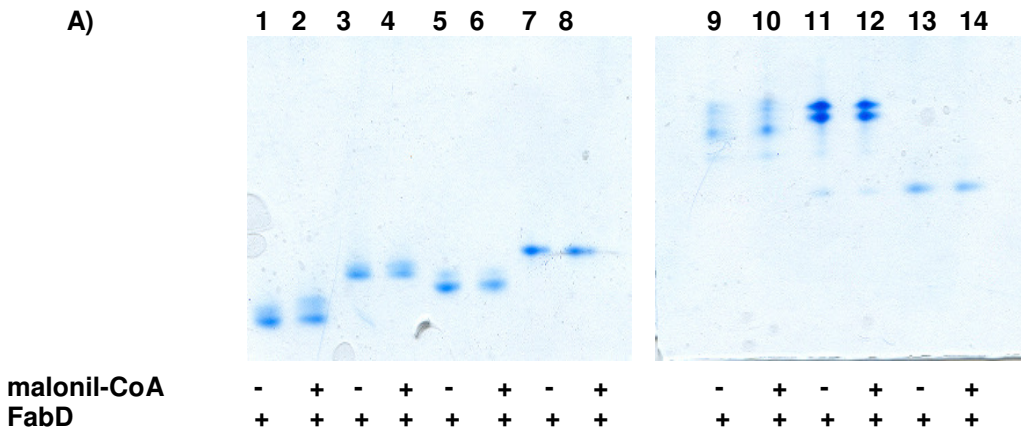
En cada reacción de elongación durante la síntesis de ácidos grasos se utiliza malonil-ACP, mientras que para la síntesis de policétidos las unidades de elongación que se utilizan con más frecuencia son malonil-CoA o metil-malonil-CoA. Continuando con la caracterización de SMc01553 se pretendía comprobar si se forma malonil-SMc01553. El resultado de este experimento nos proporcionaría información valiosa acerca de qué tipo de compuesto se está sintetizando. Para las reacciones de carga se utilizó holo-SMc01553 y malonil-CoA en presencia de la enzima His-FabD de *S. meliloti*. Para la misma reacción de malonilación se utilizaron las otras ACPs de *S. meliloti*, de forma que pudiera compararse el resultado de la malonilación con todas ellas: AcpP, AcpXL, NodF, Dominio ACP de RkpA, RkpF y SMb20651. En primera instancia todas las ACPs fueron convertidas en su forma

holo como se describió en Ramos-Vega *et al* (2009) y Dávila-Martínez *et al* (2010). Una vez obtenidas las formas holo de todas las ACPs, el resultado fue comprobado por espectrometría de masas (Tabla 1).

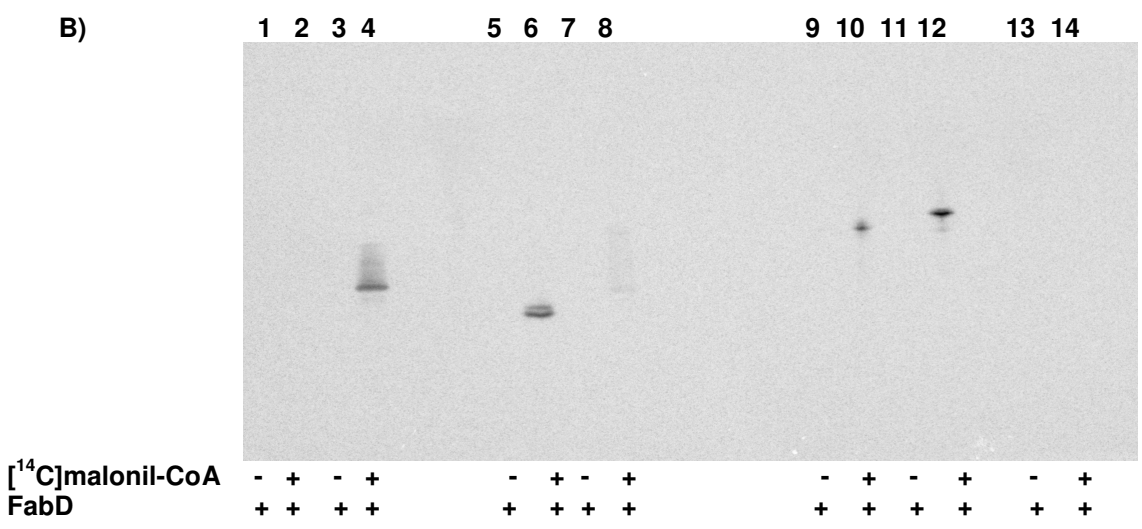
Proteína	Masas teóricas	Masas experimentales obtenidas
Apo-AcpP	8340 (+M), <b>8209 (-M)</b>	8209.68
Holo-AcpP	8679 (+M), <b>8548 (-M)</b>	8547.32
Apo-SMc01553	<b>9352 (+M), 9221 (-M)</b>	9351.85, 9221.19
Holo-SMc01553	<b>9691 (+M), 9560 (-M)</b>	9691.23, 9560.40
Apo- Dominio ACP de RkpA	<b>13368 (+M), 13237 (-M)</b>	13367.63
Holo- Dominio ACP de RkpA	<b>13707 (+M), 13576 (-M)</b>	13706.60, 13572.51
Apo-AcpXL	<b>10703 (+M), 10572 (-M)</b>	10702.08
Holo-AcpXL	<b>11042 (+M), 10911 (-M)</b>	11045.96
Apo-NodF	<b>9771 (+M), 9640 (-M)</b>	9640.62, 9770.10
Holo-NodF	<b>10110 (+M), 9979 (-M)</b>	10110.90
Apo-RkpF	<b>9587 (+M), 9456 (-M)</b>	9587.71
Holo-RkpF	<b>9926 (+M), 9795 (-M)</b>	9926.04
Apo-SMb20651	<b>9305 (+M), 9174 (-M)</b>	9307.36
Holo-SMb20651	<b>9644 (+M), 9513 (-M)</b>	9645.53

**Tabla 1.** Masas teóricas y experimentales de las ACPs de *S. meliloti* sometidas a la conversión *in vitro* a sus formas holo utilizando His-AcpS de *S. meliloti*. Donde +M significa más la metionina inicial, y -M significa menos la metionina inicial. Se indica en negrita la forma que se observó.

Las ACPs de *S. meliloti* en su forma holo fueron sustrato *in vitro* para FabD, en presencia de malonil-CoA marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ , como se describe en Ramos-Vega *et al* (2009). Para analizar si se habían convertido en malonil-ACP, las muestras de ACPs sometidas al ensayo *in vitro* fueron separadas en geles sensibles a conformación y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Para observar cuáles ACPs habían incorporado el grupo malonil se hizo la correspondiente autorradiografía de la membrana (Fig. 23). Todas las ACPs de *S. meliloti* fueron maloniladas, excepto SMc01553 y AcpP. Sin embargo, en experimentos *in vitro* de malonilación, la AcpP se maloniló con éxito y fue corroborado el incremento de 86 uma correspondiente a la masa de el grupo malonil, por espectrometría de masas (Dávila-Martínez *et al*, 2010).



Gel nativo al 17% con 3.2 M urea



Autoradiografía

**Fig. 23.** Ensayo de malonilación con las diferentes ACPs de *S. meliloti*. Gel nativo 17% acrilamida y 3.2 M de urea (**A**), y autoradiografía (**B**) que muestra el ensayo de malonilación sin [<sup>14</sup>C]malonil-CoA en la primera línea de cada ACP, y con [<sup>14</sup>C]malonil-CoA en la segunda línea. En todas las reacciones se agregó His-FabD<sub>Sm</sub>. Donde 1 y 2 indican AcpP, 3 y 4 SMb20651, 5 y 6 NodF, 7 y 8 AcpXL, 9 y 10 RkpF, 11 y 12 dominio ACP de RkpA y 13 y 14 SMC01553.



## DISCUSIÓN

*S. meliloti* 1021 tiene 5 ACPs caracterizadas, una de ellas es esencial para la síntesis y transferencia de ácidos grasos, tres son especializadas en cuanto al tipo de compuesto que acarrean durante su biosíntesis, además de que sus funciones están relacionadas a la interacción simbiótica entre la bacteria y su planta hospedera (Geiger & López-Lara, 2002). Finalmente SMb20651 se caracterizó recientemente, confirmando que puede ser cargada con el grupo malonil, generándose malonil-SMb20651, lo que puede ser usado en FAS o en PKS (Ramos-Vega *et al*, 2009). En el presente trabajo caracterizamos la sexta ACP anotada en el genoma de *S. meliloti* 1021, SMc01553.

Se demostró que SMc01553 incorpora al grupo prostético de 4'-fosfopanteteína, lo que indica que es una proteína con la capacidad funcional de acarrear acilos o aminoácidos (Lambalot *et al*, 1996). En este caso, SMc01553 al incorporar el grupo prostético, y convertirse en holo-SMc01553 cambia de conformación, y en geles nativos, migra más rápido que su forma apo. La modificación con la 4'-PP va acompañada de un incremento en el peso molecular de la proteína y de cambios conformacionales que son detectados al ser separada en geles nativos. Estos cambios normalmente indican que la estructura de la proteína se torna más compacta, como se había descrito para AcpP y RkpF (Epple *et al*, 1998). En ambos casos, la ACP migra más rápido porque al estar modificada con la 4'-PP presenta una estructura más compacta. En los geles sensibles a conformación (con urea), se ha encontrado que diferentes acil-ACPs de cadena corta migran más lento mientras que las acil-ACPs de cadena larga migran más rápido (Post-Beittenmiller *et al*, 1991; Schütt *et al*, 1998). Esto se debe a que el grupo acilo protege a la ACP de la desnaturalización por urea y por el pH alto del sistema de electroforesis y, por lo tanto, las acil-ACPs de cadena larga presentan una estructura más compacta.

SMc01553 adquirió el grupo prostético 4'-PP tanto *in vivo*, como *in vitro*, confirmándose su funcionalidad como ACP. Algo interesante es que en las condiciones *in vivo*, no requirió que se sobreexpresara a AcpS de *S. meliloti*. En otras ACPs se ha visto que se requiere la AcpS del organismo de donde proviene la ACP, o bien, copias extras de la AcpS del organismo donde se está expresando. Tal es el caso de SMb20651, que fue el primer caso reportado en rhizobiaceas en el que

son necesarias copias extras de *acpS* para la incorporación efectiva de 4'-PP (Ramos-Vega *et al*, 2009). Para conseguir mayor expresión en *E. coli* de ACPs involucradas en la síntesis de los policétidos oxitetraciclina y griseusina de *Streptomyces* en su forma activa es necesaria la coexpresión y sobreexpresión de *AcpS* de *E. coli* (Cox *et al*, 1997). Algunas ACPs requieren la presencia de una fosfopanteteinil transferasa específica para poder ser activas por ejemplo, el caso de EntF que funciona en la síntesis del sideróforo enterobactina en *E. coli*. Cepas mutantes en la fosfopanteteinil transferasa EntD no pueden crecer en ambientes deficientes de hierro (Coderre & Earhart, 1989). En ensayos *in vitro*, se encontró que la apo-EntF no puede ser modificada a holo por la enzima *AcpS* de *E. coli* y que es necesaria la presencia de EntD para la formación de holo-EntF (Lambalot *et al*, 1996). En nuestro caso no se encontró que SMc01553 necesite específicamente de *AcpS* de *S. meliloti*, ya que puede ser modificada *in vivo* por alguna actividad de *E. coli*, posiblemente la *AcpS*.

En el genoma de *S. meliloti*, hasta el momento, sólo se ha encontrado a la PPT (SMc02654). Por medio de análisis bioinformáticos, no se han detectado homólogos de otra fosfopanteteinil transferasa, ya sea de tipo Sfp o del tercer tipo de PPTs. Actualmente ya se han realizado ensayos *in vitro* de transferencia de la 4'-fosfopanteteína a las 5 ACPs de *S. meliloti* (*AcpP*, *NodF*, *AcpXL*, SMb20651 y SMc01553) y al dominio ACP de *RkpA*, usando a la enzima *AcpS* de *S. meliloti*. Se demostró que todas las ACPs son convertidas a su forma activa por la actividad de *AcpS* de *S. meliloti* (Dávila-Martínez *et al*, 2008).

Recientemente se anotó en el genoma de *S. meliloti* otra probable ACP: SMb22009. Las 7 ACPs contenidas en el genoma de *S. meliloti* tienen del 20-30% de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos, y todas poseen la serina conservada del motivo de unión a 4'-PP (Fig. 24A).

En ensayos *in vitro* la holo-SMc01553 no pudo ser modificada con el grupo malonil. La importancia de este resultado radica en que el malonil-ACP es una unidad de inicio y de extensión en las reacciones de condensación tanto para la síntesis de ácidos grasos como para la síntesis de policétidos. Esto indica que SMc01553 parece no participar en la síntesis de ácidos grasos, pero puede estar involucrada en síntesis de policétidos u otro compuesto desconocido.

### A

```

SMc01553      1 .....MSDHQLYLSQVADVIREL..FDEYDGPITL.....LETTARDVPQWDSLSNV
NodF          1 .....MVDQLESEIIIGIINKRVESEGGDGETALIVGDLTAATELTAALGVDSISGLA
SMb20651     1 .....MTQAIKDKVKKAFVIEENFLFGDSAYETA.....DDASLIENDIIDSITGVL
ACP-domaininRkpA 1 .MIEGKSPQEAEDILFDLVAEETAAI..LRVSKDVTI.....RCKILKEITGLDLSIMAV
AcpXL        1 .....MRVTATFDKVDITIAET..SEIDRETIK.....PESHTIDDLGIDSLDFL
AcpP         1 .....MSDIAERVKKIIVIDH..LGVDAEKVS.....EGASFIDDLGADSLDTV
SMb22009     1 MCSRSGHRMENSKAATRVRAIIIEQ..LGVDFPARAT.....DDASIVDDLGDLSLEVA
                                                    *

SMc01553      45 RLMVLEQELAVRFST...AEVQGFKNLGSII...DAVVKRKQNQ.....
NodF          51 DIIVDWVQAYGIRIEMNTAEAWSDLQNVGDIVGAIRGLLTKGA.....
SMb20651     45 ELVAFLEDDFGIVMA...DADIVPONLDSLARISAFTEAKAAVPVSA.....
ACP-domaininRkpA 51 ELGMSFQONTQEDMPL...SCVADNTVGDITARKLHEKVSIRDQGNENENEAGDDKLVTE
AcpXL        44 DIVFALDKFEGIKIPL...EQWTQEVNEGKIVSTEEYFVLKNLCAKIDELRAAKAG....
AcpP         42 ELVMAFEEFEGVEIPD...DADSILTVGDV...KFTTEKAQA.....
SMb22009     53 QIVMMLEDEFNIEISD...ESADAVVTVGDAI...YVVVASKTKS.....

```

### B

```

SMc01553      1 .MSDHQLYLSQVADVIREL..FDEYDGPITL..ETTARDVPQWDSLSNVRMLVLEQELAVRF
bact          1 ..MNAQDI..AKLQTI..FDVLLDPA..VLTPTATKDVPEWDSLTHISLMVIVEKEEFSVRF
Frank         1 .....MVQERLAQVREIFSDDDLVVTDATTAADVPGWDSLAVNLIYAVENEFAVQIP
Xant          1 MTLLEHPDVYERLTDVFRDVEQDDIVLFFPMTAADVDGWDSLANIRLILAVETAFTSRLS
Psed         1 ..MNEKEII..QALTVFHDVFDLDDVLTAEETADDIDGWDSCAHVLLIVAAEQRFGIKFR
Heli         1 ..MTKEAIIHSKVDIFRDIEFDEETLNITEQTHSEDLIEEWDLSHINLVAAIEKEFCVKFA
Soli         1 ..MTEIDI..HNVOEILRDVLOQPD..LITRESSAASVKGWDSLAVNDLILWVVEQERSVREA
                                                    *

SMc01553      60 TAEVQGFKNLGSIIIDAVVKRKQN..
bact          58 VCEVENARNVGELEADLILKRMKEA.
Frank         55 DERLGSFANVGELE..RVCIIEELSDVG
Xant          61 AAQAASLAKLGDVNLIASKIQQKK
Psed         59 TAELESLKNVGHFVQLIQSKLGGGR.
Heli         59 LCELQELKNVGDMLNLIKKRV...
Soli         59 LGEVQELKNVGNLVDLLERKIAANR

```

### C

```

SMc01553      1 MSDHQLYLSQVADVIREL..FDEYDGPITL..TTARDVPQ...WDSLSNVRMLVLEQELA
FkbJ          1 ...MTAPV..KDDPVAAHLVAFLEKTKTRSDWPVDRDLFABGGLTSLFAMELVVYLEKTFD
OzmE          1 MSEHTTTPPLSAEHVRETELKRFLEERTKTWAADTDLFATGGVSSLFAMELVVHVEKTEG
orf2ConA     1 ..MNVMTMP..SEGTVEKELLDLFLHVRTKTWVEEDTDLFAAGGLSSLFAMELVVHLEKSYG
RkF           1 ...MTATAIA..DAAFCALLEDLGLRLAPE..DLDRFLDEVAEWDSVHLLRLVTVVENVTG
ChlD2        1 .....MK..TIDDFLVLLQDDLGLPVVTH..DIGAGLDQVPGWDSVHLLSLLTLERATG
Tmn7a        1 .....MT..TIDDLVVLIRDELGLFPVSV..DADRFLDEIAGWDSVHLLWLTAAERTG
                                                    *

SMc01553      56 VRFSTAE...VQGFKNLGSIIIDAVVKRKQN.....
FkbJ          56 VTIAGPD..LQANFRITVESVVALVHRLRAVDA....
OzmE          61 IAVEGPD..LRIDNFRITVDAMTALVRLAEAGSGE..
orf2ConA     58 IAIRGAD..LRIDNFRITVTGMAALVRLRAAAGDGGE
RkF           57 RRVPVADLLEAVTFQOMYEVVRA.....
ChlD2        52 RSLPLADALEADSLEDIYRLAVTA.....
Tmn7a        52 RSVSLPDLLEAGSLNGIHKAAVAA.....

```

**Fig. 24.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre SMc01553 y distintas ACPs. Los residuos de aminoácidos conservados entre todas las proteínas se muestran en color gris, los residuos idénticos se muestran en negro, y señalada con asterisco está la serina (S) que sirve para unir al grupo prostético de la 4'-PP. **A)** Alineamiento entre SMc01553 y las ACPs de *S. meliloti* 1021. Se omitieron 18 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo del dominio ACP de RkpA. **B)** Alineamiento entre SMc01553 y ACPs homólogas que tienen vecindad con FkbH y MBOAT; donde bact es *Bacterium* Ellin514, Frank es *Frankia* sp. EAN1pec, Xant es *Xanthobacter autotrophicus* Py2, Psed es *Pseudomonas stutzeri* A1501, Heli es *Helicobacter bilis* ATCC 43879 y Soli es *Solibacter usitatus* Ellin6076. **C)** Alineamiento entre SMc01553 y ACPs que participan junto con proteínas FkbH-like en la síntesis de gliceril-ACP, donde FkbJ está en síntesis de tetronomicina, OzmE de oxazolomicina, orf2ConA de concanamicina, RkF de RK-682, ChlD2 de clortromicina y Tmn7a de tetronomicina. Alineamiento realizado en Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/wsl/WSMuscle.wsl>), y figura creada con BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

La coexpresión de SMc01553 con AcpS de *S. meliloti* resultó en un aumento en la producción de SMc01553 en forma soluble. De hecho, en los geles nativos de poliacrilamida se notan diferentes conformaciones de holo-SMc01553. Además de que el crecimiento de la cepa parece no estar afectado, como sucede con otras ACPs como SMb20651 y AcpP, cuando se sobreexpresan conjuntamente con AcpS (Ramos-Vega, comunicación personal). En el caso de SMc01553 el hecho de que su crecimiento no se vea dramáticamente afectado, puede indicar que su modificación no utiliza sustratos esenciales, o que no es metabólicamente activa en esas condiciones.

Actualmente no se ha encontrado ningún fenotipo asociado a la ausencia de SMc01553 y/o SMb22007 en vida libre o en simbiosis. En cuanto a fenotipo simbiótico, se siguieron cinéticas de nodulación y se midió la fijación de nitrógeno. Sin embargo, aún no se conoce el comportamiento de las mutantes durante la colonización a la planta, por lo que sería interesante hacer un seguimiento de las bacterias usando algún marcador fluorescente. Además de los experimentos mencionados en el manuscrito, se han analizado los perfiles de KPSs y de lípidos de membrana de las cepas mutantes en *smc01553* y/o *smb22007*, en vida libre, crecidas en medio completo. Como se muestra en los resultados, no se han encontrado diferencias asociadas a la ausencia de la ACP. Para estos experimentos se han ensayado las condiciones de crecimiento en medio completo y en fase logarítmica de crecimiento, ya que en estas condiciones se ha detectado la expresión de *smc01553* con RT-PCR. Sin embargo, aún se podrían analizar estos perfiles en otras condiciones, por ejemplo, después de haber crecido en bajo oxígeno o en pH ácido, que son condiciones que se asemejan al ambiente del nódulo.

Existe la posibilidad de que la función de SMc01553 sea complementada por otra ACP. Aunque, como ya se ha observado, la identidad entre SMc01553 y otras ACPs es muy baja (Fig. 24A). Sin embargo, sería interesante hacer mutantes dobles de diferentes ACPs. Ya que, como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo de las mutantes en algunas ACPs de *Rhizobia* como AcpXL aún no es claro. En *R. leguminosarum* se encontró que mutantes que no sintetizan AcpXL producen en vida libre LPSs que no contienen ácido 27-OH-C28:0 (Vedam *et al*, 2003). En simbiosis, estas mutantes tienen un fenotipo de nodulación retrasada con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, eventualmente nodula y fija nitrógeno casi igual que la cepa

silvestre. Curiosamente, al ser analizados los LPSs de los bacteroides de la cepa mutante por espectrometría de masas de MALDI-TOF, se encontró la presencia de ácido 27-OH-C28:0, por tal razón se ha propuesto que en nódulo se induce un mecanismo alternativo que reemplaza funcionalmente a AcpXL en la síntesis del ácido graso extralargo (Vedam *et al*, 2006). Debido a que existen mutantes condicionales en AcpP de *E. coli* (De Lay & Cronan, 2006b), sería interesante probar si SMc01553 puede complementar la función de AcpP como ya se ha hecho para otras ACPs (De Lay & Cronan, 2007).

La organización genética alrededor de homólogos de SMc01553 indica que también pueden estar homólogos de los genes que codifican para FkbH y MBOAT de forma muy cercana a la ACP (Fig. 1b en Dávila-Martínez *et al*, 2010), aunque se trata de organismos no relacionados filogenéticamente, puede ser indicativo de que tienen los genes necesarios para sintetizar un compuesto determinado. Un alineamiento de los homólogos de SMc01553 se muestra en la Fig. 24B observándose similitud (40-50%) a lo largo de toda la secuencia y por supuesto que poseen la serina conservada del motivo de unión a 4'-PP.

La cercanía de *smc01553* y *smc01554*, aunada a la información reciente acerca de la formación de gliceril-ACP como unidad de extensión para ciertos PKSs (Sun *et al*, 2008), puede ser una indicación de que sintetizan dicho compuesto. Para algunos homólogos de FkbH, ya se ha demostrado que participan en la formación de gliceril-ACP y todos forman parte de la superfamilia dehalogenasas haloácidas (HAD del inglés haloacid dehalogenase), un grupo de enzimas que tienen identidad con fosfatasas (Sun *et al*, 2008). Algunas proteínas FkbH-like tienen un tamaño aproximado de 650 aminoácidos y otras tienen 260 aminoácidos menos en la región amino terminal, es decir, tienen un tamaño menor, aproximadamente de 400 aminoácidos. Sin embargo, todas tienen conservados un residuo de cisteína y uno de aspártico (Fig. 17), que se propone que participan en el mecanismo de reacción de la enzima. La región amino terminal que no está presente en todas las proteínas "FkbH-like" parece importante para la interacción con la ACP a la que le transferirá el grupo gliceril (Sun *et al*, 2008).

Durante la formación de gliceril-ACP en la síntesis de algunos policétidos, como en el caso de FK520, se han identificado a los genes que participan en la formación de gliceril-ACP como FkbH (fosfatasa y acil transferasa) y FkbJ (ACP). FkbH transfiere un grupo gliceril proveniente de la defosforilación de 1,3-BG, a una

FkbJ. SMc01554 tiene homología con FkbH, como se muestra en el alineamiento de la Fig. 17. También tiene homología con otras proteínas “FkbH-like”, como es el caso de Tmn16 (que participa en síntesis de la tetronomicina), OzmB (que participa en la síntesis de la oxozalomicina), Con4\* (que participa en la síntesis de la concanamicina), ChlD2 (que participa en la síntesis de la clorotricina) y RkE (que participa en la síntesis de Rk-682). Todas estas proteínas “FkbH-like” han sido sujetas a estudios *in vitro*, donde se demuestra que pueden formar gliceril-ACP (Sun *et al*, 2008; Sun *et al*, 2010). SMc01553 también muestra similitud del 30-40% en secuencia de aminoácidos con las ACPs que reciben el grupo gliceril de las proteínas FkbH-like (Fig. 24C), y todas cuentan con la serina conservada para adquirir el grupo 4'-PP.

La expresión heteróloga y conjunta de *smc01553* y *smc01554* puede llevarnos a conocer si se forma gliceril-SMc01553, lo que nos indicaría la posibilidad de que en *S. meliloti* se pueda llevar a cabo la síntesis de un compuesto especializado, como los policétidos (Chan *et al*, 2009; Sun *et al*, 2008).

También es cierto, que *smc01553* se encuentra en una región de ADN que se reporta se originó en un evento de transferencia horizontal y de duplicación reciente (Galibert *et al*, 2001), en donde sólo pudieron haberse transferido parte de los genes necesarios para sintetizar un compuesto determinado. En experimentos de dinámica del genoma, parte de esta región de ADN, más específicamente donde se encuentra el ORF que codifica para MBOAT, es una zona de cointegración de replicones y cromosoma (Guo *et al*, 2003). Es necesario continuar explorando la función específica de SMc01553 y/o SMb22007, tanto *in vivo* como *in vitro*, de tal forma que se establezca claramente su función en la fisiología de *S. meliloti* 1021.

## REFERENCIAS

- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarie, J. and Truchet, G. (1994). ***Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses.** *Plant Cell* 6: 1357-1374.
- Becker, A., Fraysse, N. and Sharypova, L. (2005). **Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides.** *Mol Plant Microbe Interact* 18: 899-905.
- Bligh, E. G. and Dyer, J. W. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Bloemberg, G.V., Kamst, E., Harteveld M., van der Drift K. M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J. and Spalink H.P. (1995). **A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors.** *Mol Microbiology* 16:1123-1136.
- Brozek, K., Carlson, R. W. and Raetz, C. R. H. (1996). **A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*.** *J Biol Chem* 271: 32126-32136.
- Byers, D. and Gong, H. (2007). **Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family.** *Biochem Cell Biol* 85: 649-662.
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. and Emili, A. (2005). **Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*.** *Nature* 433: 531-537.
- Chan, Y. A., Boyne, M. T., Podevels, A. M., Klimowicz, A. K., Handelsman, J., Kelleher, N. L. and Thomas, M. G. (2006). **Hydroxymalonyl-acyl carrier protein (ACP) and aminomalonyl-ACP are two additional type I polyketide synthase extender units.** *PNAS* 39: 14349-14354.
- Chan, Y. A., Podevels, A., M., Kevany, B., M., and Thomas, M., G. (2009). **Biosynthesis of polyketide synthase extender units.** *Nat Prod Rep* 26: 90-114.
- Chan, Y. A. and Thomas, M.G.(2009). **Formation and characterization of acyl carrier protein-linked polyketide synthase extender units.** *Methods Enzymol* 459:143-163.

- Coderre, P. E. and Earhart, E., F. (1989). **The *entD* gene for *Escherichia coli* K12 enterobactin gene cluster.** *J Gen Microbiology* 135: 3043-3055.
- Corvera, A., Promé, D., Promé, J. C., Martínez-Romero, E. and Romero, D. (1999). **The *noIL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor.** *Mol Plant Microbe Interact* 12: 236-246.
- Cox, R., J., Hitchman, T. S., Byrom, K. J., Findlow, I. S., Tanner, J. A., Crosby, J. and Simpson, T. J. (1997). **Post-translational modification of heterologously expressed *Streptomyces* type II polyketide synthase acyl carrier proteins.** *FEBS Lett* 405: 267-272.
- Cronan, Jr. J. and Waldrop, G. L. (2002). **Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases.** *Prog Lipid Res* 41: 407-435.
- Dávila-Martínez, Y., Ramos-Vega, A. L., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O. and López-Lara, I. **Characterization of a novel acyl carrier protein SMc01553 from *Sinorhizobium meliloti*.** Poster presentado en *8th European Nitrogen Fixation Conference*. 30 August to 3 September 2008, Ghent, Belgium.
- Dávila-Martínez, Y., Ramos-Vega A. L., Contreras-Martínez S., Encarnación S., Geiger O. and López-Lara IM. (2010). **SMc01553 is the sixth acyl carrier protein in *Sinorhizobium meliloti* 1021.** *Microbiology* 156: 230-239.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Denarié and Boivin, C. (2001). ***nod* genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis.** *Acta Biochim Pol* 48: 359-365.
- De Lay, N. R. and Cronan J. E. (2006a). **A genome rearrangement has orphaned the *Escherichia coli* K-12 AcpT phosphopantetheinyl transferase from its cognate *Escherichia coli* O157:H7 substrates.** *Mol Microbiology* 61: 232-42.
- De Lay, N. R. and Cronan, J. E. (2006b). **Gene-specific random mutagenesis of *Escherichia coli* *in vivo*: Isolation of temperature-sensitive mutations in the acyl carrier protein of fatty acid synthesis.** *J Bacteriol* 188: 287-296.
- De Lay, N. R. and Cronan, J. E. (2007). ***In vivo* functional analyses of the type II acyl carrier proteins of fatty acid biosynthesis.** *J Biol Chem* 282: 20319-20328.
- Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Dénarie, J. and Promé, J. C. (1993). **Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors.** *J Biol Chem* 268: 20134-20142.



-de Rudder, K. E. E., Thomas-Oates, J. E. and Geiger, O. (1997). ***Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid N-methyltransferase still contain phosphatidylcholine.** *J Bacteriol* 179: 6921-6928.

-Epple, G., van der Drift, K. M., Thomas-Oates, J. 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.

-Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. (2003). **Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *salinospira*.** *Angew Chem Int Ed Engl* 42:355-357.

-Ferguson, G. P., Datta, A., Carlson, R. W. and Walker, G. (2005). **Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis.** *Mol Microbiol* 56: 68-80.

-Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester J., Chain, P., Vorhölter, F.J., Hernandez-Lucas, .I, Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. and Pühler, A. (2001). **The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*.** *PNAS* 98: 9889-9894.

-Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schober,t M., Schafer, A., Jahn, D. and Marahiel, M. A. (2002). **Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Biol Chem* 277:50293-50302.

-Fischbach, M. A. and Walsh, C. (2006). **Assembly line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms.** *Chem Rev* 106: 3468-3496.

-Florova, G., Kazanina, G. and Reynolds, K. A. (2002). **Enzymes involved in fatty acid and polyketide biosynthesis in *Streptomyces glaucenscens*: Role of FabH and FabD and their acyl carrier protein specificity.** *Biochem* 41: 10462-10471.

-Fuqua, C., Parsek, M. and Greenberg, P. (2001). **Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing.** *Annu Rev Genet* 35: 439-468.

-Fuqua, C. and Greenberg, E. P. (2002). **Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 685-695.

-Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Bowtry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D.,

Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R., W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycky, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. and Batut, J. (2001). **The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti***. *Science* 293: 668-672.

-Gao, J., Weissenmayer, B., Taylor, A. M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I. M. and Geiger, O. (2004). **Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids**. *Mol Microbiology* 53: 1757-1770.

-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.

-Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M. and Thomas-Oates, J. E. (1999). **The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti***. *Mol Microbiol* 32: 63-73.

-Geiger, O., Sohlenkamp, C. and López-Lara, I. M. (2010). **Formation of bacterial membrane lipids: pathways, enzymes, reactions**. Timmis, K. N. (Ed.). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 396-407

-Geiger, O., Spaink, G. and Kennedy, E. P. (1991). **Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group**. *J Bacteriol* 173: 2872-2878.

-Guo, X., Flores, M., Mavingui, P., Fuentes, S.I., Hernández, G., Dávila, G. and Palacios, R. (2003). **Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures**. *Genome Res* 13: 1810-1817.

-Haag, A. F., Wehmeier, S., Beck, S., Marlow, V. L., Fletcher, V., James, E. K. and Ferguson, G.P. (2009). **The *Sinorhizobium meliloti* LpxXL and AcpXL proteins play important roles in bacteroid development within alfalfa**. *J Bacteriol* 191: 4681-4686.

-Hardie, K. R., Issartel, J. P., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (1991). ***In vitro* activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide**. *Mol Microbiol* 5: 1669-1679.

-Heath, R.J. and Rock, C. O. (1995). **Enoyl-acyl carrier protein reductase (*fabI*) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 270:26538-26542.

-Hofmann K. (2000). **A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling.** *Trends Biochem Sci* 25: 111-112.

-Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakak,i Y., Hattori, M. and Omura, S. (2003). **Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*.** *Nat Biotechnol* 21: 526-531.

-Issartel, J-P., Koronakis, V. and Hughes, C. (1991). **Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation.** *Nature* 351: 759-761.

-Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W. Taga, M. E. and Walker, G. (2007). **How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model.** *Nature Rev Microbiol* 705: 619-633.

-Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. (1988). **Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria.** *Gene* 70:191-197.

-Kiriukhin, M. Y. and Neuhaus, F. (2001). **D-Alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation.** *J Bacteriol* 183: 2051-2058.

-Lambalot, R. H. and Walsh, C. T. (1995). **Cloning, overproduction and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase.** *J Biol Chem* 270: 24658-25661.

-Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., La Celle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C. T. (1996). **A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases.** *Chem Biol* 3: 923-936.

-López-Lara, I. M. and Geiger, O. (2000). **Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins.** *Microbiology* 146: 839-849.

-López-Lara, I. M. (2004). ***Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas.** Martínez-Romero E. and Martínez-Romero, J. C. (Eds.). Microbios en línea (<http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/>).

-López-Lara, I. M. and Geiger, O. (2010). **Formation of fatty acids.** Timmis, K. N. (Ed.). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp: 386-393.

- Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H., Howe, J., Brandenburg, K. and López-Goñi, I. (2005). **The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides.** *J Bacteriol* 187: 5631-5639.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. and Batut, J. (2009). **Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes?** *Trends Microbiol* 17: 458-66.
- Mazmudar, J. and Striepen, B. (2007). **Made it or take it: fatty acid metabolism of apicomplexan parasites.** *Euk Cell* 6: 1727-1735.
- Mercer, A. C. and Burkart, M. D. (2007). **The ubiquitous carrier protein a window to metabolite biosynthesis.** *Nat Prod Rep* 24: 750-773.
- Miyanga, A., Funa, N., Awakawa, T. and Horinouchi, S. (2007). **Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis.** *PNAS* 105: 871-876.
- Mofid, M.R., Finking, R. and Marahiel, M. A. (2002). **Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp.** *J Biol Chem* 277: 17023-17031.
- Mofid, M.R., Finking, R., Essen, L.O. and Marahiel, M.A. (2004). **Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism.** *Biochem* 43: 4128-4136.
- Mootz, H., Finking, R. and Marahiel, M. (2001). **4'-Phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*.** *J Biol Chem* 276: 37289-37298.
- Neuhaus, F. C. and Baddiley, J. (2003). **A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 686-723.
- Paoletti, L., Lu, Y.-J., Schujman, G. E., de Mendoza, D. and Rock, C., (2007). **Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 189: 5816-5824.
- Platt, M. W., Miller, K. J., Lane, W. S. and Kennedy, E. (1990). **Isolation and characterization of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*.** *J Bacteriol* 172: 5440-5444.
- Post-Beittenmiller D. P., Jaworski J. G. and Ohlrogge, J. B. (1991). **In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach.** *J Biol Chem* 266: 1858-1865.

- Raetz, C. and Whitfield, C. (2002). **Lipopolysaccharide endotoxins**. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.
- Raetz, C., Reynolds, M., Trent, M. S. and Bishop, R. (2007). **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria**. *Annu Rev Biochem* 76: 295-329.
- Ramos-Vega, A. L. (2009). **Smb20651 es una proteína acarreadora de grupos acilo de *Sinorhizobium meliloti***. Tesis doctoral. UNAM.
- Ramos-Vega, A. L., Dávila-Martínez, Y., Sohlenkamp, C., Contreras-Martínez, S., Encarnación, S., Geiger, O. and López-Lara, I. M. (2009). **Smb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti***. *Microbiology* 155: 257-267.
- Reuhs, B. L., Geller, D.P., Kim, J.S., Fox, J.E., Kolli, V. S. and Pueppke, S. G. (1998). ***Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens**. *Appl Environ Microbiol* 64: 4930-4938.
- Rock, C. (2008). **Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes**. D. E. Vance and J. E. Vance (Eds.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (5th Edn.)*. New Comprehensive Biochemistry. Elsevier. The Netherlands, pp: 59-96.
- Roujeinikova, A., Simon, W. J., Gilroy, J., Rice, D.W., Rafferty, J.B. and 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.
- Schütt, B. S., Brummel, M., Schuch, R. and Spener, F. (1998). **The role of acyl carrier protein isoforms from *Cuphea lanceolata* seeds in *de-novo* biosynthesis of medium-chain fatty acids**. *Planta* 205: 263-268.
- Sharypova, L. Niehaus, K., Scheidle, H., Holst, O. and Becker, A. (2003). ***Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow-migrating form of LPS**. *J Biol Chem* 278:12946-12954.
- Sharypova, L. A., Chataigné, G., Fraysse, N., Becker, A. and Poinso, V. (2006). **Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide form *Sinorhizobium meliloti* Rm 1021**. *Glycobiology* 16: 1181-1193.
- Sonda, S. and Hehl, A. (2006). **Lipid biology of apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for *Toxoplasma gondii***. *Trends Parasitol* 22: 41-47.

- Stuible, H. P., Meier, S. and Schwizer, E. (1997). **Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine: protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*.** *Eur J Biochem* 248: 481-487.
- Sun, Y., Hong, H., Gillies, F., Spencer, J. and Leadlay, P. (2008). **Glyceryl-S-Acyl carrier protein as an intermediate in the biosynthesis of tetrionate antibiotics.** *Chembiochem* 9: 150-156.
- Sun, Y., Hahn, F., Demydchuk, Y., Chettle, J., Tosin, M., Osada, H. and Leadlay, P. F. (2010). ***In vitro* reconstruction of tetrionate RK-682 biosynthesis.** *Nat Chem Biol* 6: 99-101.
- Sunbul, M., Zhang, K., Yin, J. (2009). **Chapter 10: Using phosphopantetheinyl transferases for enzyme posttranslational activation, site specific protein labeling and identification of natural product biosynthetic gene clusters from bacterial genomes.** *Methods Enzymol* 458: 255-275.
- Therisod, H., Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P. (1986). **An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*.** *PNAS* 83: 7236-7240.
- Therisod, H. and Kennedy, E. P. (1987). **The function of acyl carrier protein in the synthesis of membrane-derived oligosaccharides does not require its phosphopantetheine prosthetic group.** *PNAS* 84: 8235-8238.
- Thomas J. and Cronan JE. (2005). **The enigmatic acyl carrier protein phosphodiesterase of *Escherichia coli*: genetic and enzymological characterization.** *J Biol Chem* 280: 34675-34683.
- Vanderlinde, E. M., Muszynski, A., Harrison, J. J., Koval, S. F., Foreman, D. L., Ceri, H., Kannenberg, E. L., Carlson, R. W. and Yost, C. K. (2009). ***Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility.** *Microbiology* 155: 3055-3069.
- Vedam, V., Kannenberg, E. L., Haynes, J., Sherrier, D. J., Datta, A. and Carlson, R. W. (2003). **A *Rhizobium leguminosarum* AcpXL mutant produces lipopolysaccharide lacking 27-hydroxyoctacosanoic acid.** *J Bacteriol* 185: 1841-1850.
- Vedam, V., Kannenberg, E., Datta, A., Brown, D., Haynes-Gann, J. G., Sherrier, D. J., and Carlson, R. W. (2006). **The pea nodule environment restores the ability of a *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide *acpXL* mutant to add 27-hydroxyoctacosanoic acid to its lipid A.** *J Bacteriol* 188: 2126-2133.
- Walsh, C. (2003). **Antibiotics. Actions, origins and resistance.** *ASM Press*. Washington, D. C. pp 175-218.

- Walton, L. J., Corre, C. and Challis, G. L. (2006). **Mechanisms for incorporation of glycerol-derived precursors into polyketide metabolites.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:105-120.
- Weidenmeier, C. and Peschel, A. (2008). **Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions.** *Nature Rev Microbiol* 861: 276-287.
- Weissenmayer, B., Gao, J. L., López-Lara, I. M. and Geiger, O. (2002). **Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids.** *Mol Microbiol* 45: 721-733.
- White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y-M. and Rock, C. (2005). **The structural biology of type II fatty acid biosynthesis.** *Annu Rev Biochem* 74: 791-831.
- Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L. and Reeves, C. D. (2000). **The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units.** *Gene* 251: 81-90.
- Wu, B. N., Zhang, Y.M., Rock, C.O. and Zheng, J. J. (2009). **Structural modification of acyl carrier protein by butyryl group.** *Protein Sci* 18: 240-246.
- Zhang, Y-M. and Rock, C. (2008a). **Membrane lipid homeostasis in bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 6: 222-233.
- Zhang, Y-M. and Rock, C. (2008b). **Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis.** *J Lip Res* 49: 1867-1874.