



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

**LA FOSFOLIPASA C PlcP (SMc00171) DE
Sinorhizobium meliloti
DEGRADA SUS FOSFOLÍPIDOS BAJO
LIMITACION DE FÓSFORO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARITZA ZA VALETA PASTOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. OTTO GEIGER

CUERNAVACA, MOR

2011



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

Tesis Doctoral:

“La fosfolipasa C PlcP (SMc00171) de *Sinorhizobium meliloti* degrada sus fosfolípidos bajo limitación de fósforo”

que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

Maritza Zavaleta Pastor

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Otto Geiger, del programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas/UNAM.

El comité tutorial que evaluó el avance del presente proyecto de investigación estuvo integrado por el Dr. Otto Geiger, la Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo y la Dra. María Isabel López Lara.

El Jurado de la réplica oral de este trabajo de investigación se integró por la Dra. Marina Gavilanes Ruiz, el Dr. Federico Sánchez Rodríguez, el Dr. Mario Soberon Chávez, el Dr. Otto Geiger y el Dr. Dimitris Georgellis.

El trabajo experimental de esta tesis ha sido financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico/UNAM (200806), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT 42578/A-1 y 82614) y Howard Hughes Medical Institute (HHMI-55003675).

Durante la realización de esta tesis Maritza Zavaleta Pastor recibió una beca de doctorado otorgada por CONACyT del periodo de Febrero de 2004 a Enero de 2008. Beca complemento otorgada por la DGEP del periodo de Febrero de 2004 a Enero de 2008. Ajuste de vigencia de beca de doctorado otorgada por CONACyT del periodo de Febrero de 2008 a Enero de 2009. Beca con cargo a proyecto de investigación CONACyT (nivel maestría) del periodo de Febrero de 2009 a Julio de 2009.

Dedicatoria

El trabajo realizado durante este proyecto de doctorado es dedicado a las personas más importantes en mi vida: mi familia- mi esposo Oswaldo-nuestra hija Valentina y el bebé que viene en camino. Gracias por apoyarme, por alentarme, por comprender haberles robado todas las horas valiosas a su lado, sin su amor incondicional esto no sería posible. Sobre todo por que juntos concluimos esta etapa y tenemos la oportunidad de seguir construyendo nuestra familia.

Agradecimientos

A mis padres por todo lo aprendido a su lado, sobretodo por que sin ustedes no estaría aquí. A mi madre, por tu apoyo en todos los sentidos, te amo y te admiro mamá. Nada me daría más orgullo que llegar a ser una mujer ejemplar como tu. A Jenny, Huichó y Kaz, por seguir creyendo en mí y enseñarme con lecciones de vida, que no todo es vanidad en este mundo. A Aby, por que me diste la felicidad de ser tu tía durante este trayecto. A mis abuelos, por su comprensión y a mi abuelita Juanita † por todo el tiempo que ya no pude dedicarle en esta larga etapa.

Oswaldo, gracias por todo tu amor y coraje, honestamente no creo haber podido lograrlo sin tí, mi niño. Valentina, mi niña hermosa, te amo mucho. Gracias por enseñarme tanto y por todo lo que has traído a mi vida. Mi niña, nunca te dejes influenciar negativamente por nadie y sigue siendo igual de maravillosa, sorprendente y con esa magia que irradas por donde vas. A tí bebé, que vienes en camino y te toca la última parte de esto y esperemos el inicio de una nueva etapa.

A mis amigos: Lucy, don Martín, Oswaldo, Jose, Rafa, Jerson, Lucía, Yaya, Aurora, Ramón, Edaena y Tere, por que aunque me desaparezco siempre están ahí. Ivonne † siempre admiraré tu valor y fortaleza.

A mis compañeros de laboratorio y del CCG por compartir espacio, tiempo y buenos recuerdos: Yadira Dávila, Nicolás Gómez, Ramón Cervantes, Quina Nogales, Ana Laura Ramos, Christian Sohlenkamp, Isabel López, Miguelito Vences, Daniela Medeot, Esperanza Martínez, Otto Geiger, Alhondra Solares, Sandra Beltrán, Brenda Tadeo, Don Juanito, Napoleón González, Toño Rangel, Aline López, Martha Guerreo, Ernesto Ormeño, don Martín, don Jorge, Diana Sahonero, Aurora Gámez, Jose Espiritu, Sra. Carmen, Gladys Aviles, Lola Cuellar, Iván Briceño, Chivis Trujillo, don Rudy, Lulú Lloret, Janette Onofre, Guadalupe Paredes, Lulú Martínez, Lucy Lulo, Rocío Castro, Rosita Solís y Angel Pech.

A Otto, por darme la oportunidad de aprender de ciencia contigo. Por ser consecuente y paciente en todos los aspectos. Mi más sincero agradecimiento a las Dras. Isabel María López Lara y Guadalupe Espín, por ser miembros de mi comité tutorial, semestre a semestre. Dr. CS, gracias por tus enseñanzas, apoyo y regaños, sin duda todo ayudó para llegar a este punto.

A los integrantes del jurado, por haberse dado a la tarea de leer y ayudar a enriquecer esta tesis. Dra. Marina Gavilanes Ruiz, Dr. Federico Sánchez Rodríguez, Dr. Mario Soberon Chávez, Dr. Dimitris Georgellis.

Especialmente, a todas, todas las personas que a la distancia hicieron posible iniciar con los trámites de titulación! No los nombro por que son muchos y tendría que incluir hasta los de mensajería inmediata.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	2
ABSTRACT (Resumen en Inglés)	4
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	8
1. Simbiosis entre rizobios y leguminosas.....	8
2. Membranas celulares de bacterias Gram-negativas.....	9
3. Fosfolípidos membranales de bacterias Gram-negativas.....	11
4. Papel señalizador de los fosfolípidos membranales.....	13
5. Biosíntesis de fosfolípidos de bacterias Gram-negativas.....	15
6. Biosíntesis de lípidos de membrana sin fósforo en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	19
<i>i</i>) Biosíntesis de lípidos de ornitina.....	20
<i>ii</i>) Biosíntesis de sulfolípidos.....	21
<i>iii</i>) Biosíntesis de lípidos de betaína.....	23
7. Respuestas bacterianas ante la limitación de fósforo.....	25
ANTECEDENTES	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
RESULTADOS	33
a) Artículo publicado: “ <i>Sinorhizobium meliloti</i> phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation”.....	34
b) Resultados adicionales: La degradación de fosfolípidos de <i>S. meliloti</i> bajo limitación de fósforo depende de PhoB, pero no de BtaA.....	48
Estandarización de la actividad fosfolipasa C de SMc00171.....	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMEN

La bacteria *Sinorhizobium meliloti* es capaz de fijar nitrógeno en simbiosis con plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* o *Trigonella*. En condiciones de crecimiento con concentraciones elevadas de fósforo, los principales fosfolípidos de membrana de *S. meliloti* son: fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC). Si las condiciones de la disposición de nutrientes se tornan restrictivas, los lípidos de las membranas pueden llegar a alterar su composición o estructura. Tal es el caso de *S. meliloti*, que en condiciones limitantes de fosfato inorgánico (Pi), reemplaza sus fosfolípidos por lípidos de membrana sin fósforo como son: el sulfolípidosulfoquinovosil diacilglicerol, lípidos que contienen el aminoácido ornitina y diacilgliceril *N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS). En el modelo propuesto para la biosíntesis de DGTS en *Rhodobacter sphaeroides* se requieren dos genes estructurales (*btaAB*). BtaA está implicada en condensar la parte homoseril del sustrato *S*-adenosil metionina (SAM) a diacilglicerol (DAG) generando diacilglicerilhomoserina (DGHS), posteriormente el producto de *btaB* es requerido para la triple metilación de DGHS hasta formar DGTS. En los estudios realizados con BtaAB no hay actividades enzimáticas que demuestren la fuente de DAG en la biosíntesis de DGTS. En *Escherichia coli*, altas concentraciones de DAG en sus membranas resultan tóxicas para esta bacteria. Por lo anterior, investigamos si otros lípidos como los fosfolípidos podrían funcionar como precursores en la biosíntesis de lípidos sin fósforo. Con ese propósito, se hicieron experimentos de pulso y caza, en los cuales, se observó que los fosfolípidos de *S. meliloti* marcados radioactivamente con [¹⁴C]acetato, son degradados activamente durante el crecimiento en bajo fosfato. La pérdida de radioactividad de los fosfolípidos fue detectada como incremento de radioactividad en DGTS, sugiriendo que los fosfolípidos de membrana actúan como precursores en la biosíntesis de DGTS. Por ello nos enfocamos en indagar cómo son degradados los fosfolípidos de *S. meliloti* bajo limitación de fósforo. La degradación de fosfolípidos es independiente de la actividad de BtaA mientras que depende del regulador transcripcional PhoB, el cual responde ante limitación de fósforo. En este trabajo identificamos y caracterizamos la actividad de fosfolipasa C de SMC00171 que degrada sus principales fosfolípidos de membrana y genera DAG como uno de los productos de hidrólisis. La mutante PHO00171 deficiente en el gen *smc00171* fue incapaz de degradar PC en condiciones de limitación de Pi y su capacidad de formación de DGTS se vio afectada drásticamente al compararse con la

cepa silvestre. La actividad de fosfolipasa C de SMc00171 se demostró al detectar la formación de DAG y fosfocolina, después de incubar PC con extractos crudos de *E. coli* BL21 pLysS que sobreprodujeron SMc00171. La actividad de PlcP (SMc00171) degrada fosfolípidos con residuos de ácidos grasos saturados, mono-insaturados o ciclopropanos que contienen cadenas hidrocarbonadas de C16, C17 o C18, pero no fosfolípidos que llevan un residuo de ácido arachidónico (C20:4). Aparentemente, la fosfolipasa C PlcP (SMc00171) reconoce específicamente fosfolípidos bacterianos como sustratos. Observamos que DAG es el lípido a partir del cual se inicia la biosíntesis de DGTS. Suponemos que el fosfato inorgánico puede ser liberado de fosfocolina mediante la actividad de una fosfatasa. Lo anterior sugiere, que en condiciones limitantes de fósforo, los fosfolípidos de la membrana de *S. meliloti* proveen una fuente adicional de Pi metabolizable, el cual puede ser utilizado para la biosíntesis de moléculas como los ácidos nucleicos.

ABSTRACT

The soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* is able to form a nitrogen-fixing root nodule symbiosis with legumes of the genera *Medicago*, *Melilotus*, and *Trigonella*. When *S. meliloti* is cultivated on common culture media that contains relatively high concentrations of inorganic phosphate (Pi), its membrane is composed as lipidic molecules predominantly the phospholipids phosphatidylglycerol, cardiolipin, phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylcholine (PC). Bacteria have developed diversified mechanisms to respond to nutrient-limiting conditions. For example, some bacteria drastically alter their membrane lipid composition and structure under phosphorus-limiting conditions of growth and membrane phospholipids in *S. meliloti* are largely replaced by lipids that do not contain any phosphorus such as the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol, an ornithine-containing lipid, and diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine (DGTS). Studies on DGTS biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* suggest that two structural genes (*btaAB*) are required and that BtaA is involved in condensing the homoseryl part of *S*-adenosyl methionine (SAM) to diacylglycerol, thereby forming diacylglycerylhomoserine (DGHS). Subsequently, BtaB would be required for the triple methylation of DGHS in order to obtain DGTS. Diacylglycerol (DAG) is thought to be toxic when present in higher amounts in membranes of *Escherichia coli* and therefore we investigated whether other lipid pools might function as precursors for DGTS biosynthesis. In pulse/chase experiments, membrane phospholipids of *S. meliloti* were pulse-labeled with [¹⁴C]acetate and radioactivity was followed during a chase period. When the chase was performed at high concentrations of Pi, the radioactivity in sinorhizobial phospholipids was maintained over time, suggesting that under such conditions phospholipids are metabolically stable. In contrast, when the chase was performed at low concentrations of Pi, phospholipids continuously lose radiolabel and the amount of radiolabel lost from phospholipids occurs in DGTS. These data suggest that phospholipids function as biosynthetic precursors of DGTS. This degradation of phospholipids under low Pi conditions is independent of BtaA but requires a functional PhoB transcriptional regulator, known to be required for many stress responses upon phosphorus limitation in *S. meliloti*. Here, we report a phospholipase C activity in *S. meliloti* which degrades its own membrane phospholipids and releases DAG. A sinorhizobial mutant deficient in the predicted phosphatase *smc00171* was unable to degrade PC or to form DGTS in a

similar way as the wild type. Cell-free extracts of *Escherichia coli*, in which SMc00171 had been expressed, convert PC to phosphocholine and DAG demonstrating that SMc00171 acts as a phospholipase C. The phospholipase C PlcP (SMc00171) degrades phospholipids which contain saturated fatty acids, mono-unsaturated, or cyclo-propane-containing, fatty acids with chain lengths of C16, C17, or C18 but not phospholipids that harbor an arachidonic acyl (C20:4) residue. Apparently, bacterial phospholipids are preferentially degraded by phospholipase C PlcP (SMc00171) rather than eukaryotic phospholipids. DAG in turn is the lipid anchor from which biosynthesis initiates during the formation of the phosphorus-free membrane lipid DGTS. Inorganic phosphate can be liberated from phosphocholine by a phosphatase. These data suggest that in *S. meliloti* under phosphate-limiting conditions, membrane phospholipids provide an additional pool for metabolizable Pi, which in turn can be used for the synthesis of essential phosphorus-containing biomolecules such as nucleic acids.

ABREVIATURAS

CL:	Cardiolipina (Inglés: cardiolipin)
DMPE:	Dimetil fosfatidiletanolamina (Inglés: Dimethyl phosphatidylethanolamine)
DGTS:	Diacilgliceril trimetilhomoserina (Inglés: Diacylglyceryl <i>N,N,N</i> -trimethylhomoserine)
DGHS:	Diacilgliceril homoserina (Inglés: Diacylglyceryl homoserine)
DAG:	Diacilglicerol (Inglés: Diacylglycerol)
CDP:	Difosfato de citidina (Inglés: Cytidine diphosphate)
CDP-DAG:	Difosfato de citidina-diacilglicerol (Inglés: Cytidine diphosphate-diacylglycerol)
CMP:	Monofosfato de citidina (Inglés: Cytidine monophosphate)
EPS:	Exopolisacárido (Inglés: Exopolysaccharide)
BNF:	Fijación Biológica de Nitrógeno (Inglés: Biological nitrogen fixation)
G3P:	Glicerol-3-fosfato (Inglés: <i>sn</i> -Glycerol-3-phosphate)
IM:	Membrana interna (Inglés: Inner membrane)
LPS:	Lipopolisacárido (Inglés: Lipopolysaccharide)
MDO:	Oligosacáridos derivados de la membrana (Inglés: Membrane-derived oligosaccharide)
MMPE:	Monometil fosfatidiletanolamina (Inglés: Monomethyl phosphatidylethanolamine)
OL:	Lípido de ornitina (Inglés: Ornithine lipid)
OM:	Membrana externa (Inglés: Outer membrane)
OMPLA:	Fosfolipasa A de membrana externa (Inglés: outer membrane phospholipase A)
PA:	Acido fosfatídico (Inglés: Phosphatidic acid)
PC:	Fosfatidilcolina (Inglés: Phosphatidylcholine)
Pcs:	Fosfatidilcolina sintasa (Inglés: Phosphatidylcholine synthase)
PE:	Fosfatidiletanolamina (Inglés: Phosphatidylethanolamine)
PG:	Fosfatidilglicerol (Inglés: Phosphatidylglycerol)
PGP:	Fosfatidilglicerol fosfato (Inglés: Phosphatidylglycerol phosphate)
PI:	Fosfatidilinositol (Inglés: Phosphatidylinositol)
P:	Fósforo (Inglés: Phosphorus)

Pi:	Fosfato inorgánico (Inorganic phosphate)
PS:	Fosfatidilserina (Inglés: Phosphatidylserine)
PLA:	Fosfolipasa A (Inglés: Phospholipase A)
PLC:	Fosfolipasa C (Inglés: Phospholipase C)
PLD:	Fosfolipasa D (Inglés: Phospholipase D)
PmtA:	Fosfolípido <i>N</i> -metil-transferasa (Inglés: Phospholipid <i>N</i> -methyltransferase)
PoliP:	Polifosfatos (Inglés: Polyphosphates)
SAM:	<i>S</i> -adenosil- <i>L</i> -metionina (Inglés: <i>S</i> -adenosyl- <i>L</i> -methionine)
SL:	Sulfolípido (Inglés: Sulpholipid)
SM:	Esfingomielina (Inglés: Sphingomyelin)
UFA:	Ácido graso insaturado (Inglés: Unsaturated fatty acid)

INTRODUCCIÓN

1. Simbiosis entre rizobios y leguminosas.

El grupo “rizobia” comprende a bacterias Gram-negativas de la división Proteobacteria que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de vida libre o en asociaciones simbióticas con leguminosas (van Berkum *et al.*, 1999). Dentro de las subdivisiones α - y β -Proteobacteria se encuentran simbioses de los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium*, así como *Burkholderia* (Vandamme *et al.*, 2002) y *Wautersia* (anteriormente llamado *Ralstonia*) (Vanechoutte *et al.*, 2004). Los rizobios tienen diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen a organismos aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, como células individuales o en filamentos, en vida libre y en simbiosis (Raymond *et al.*, 2004).

Durante la simbiosis entre bacterias y plantas leguminosas se lleva a cabo un intercambio de señales que permite establecer y mantener esta asociación simbiótica. Al inicio de la simbiosis, las leguminosas excretan diversos compuestos como flavonoides, azúcares fenólicos, ácidos dicarboxílicos y aminoácidos, los cuales son percibidos por los rizobios (Brenner y Winans, 2005). Los flavonoides liberados por la planta inducen la expresión de genes bacterianos que causan la biosíntesis de los factores de nodulación (Nod o lipoquitos-oligosacáridos). Además de los factores Nod, el simbionte bacteriano produce glucanos cíclicos, exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), y polisacáridos capsulares tipo K, esenciales para el proceso de simbiosis (Jones *et al.*, 2007). Los rizobios colonizan la rizosfera y el intercambio de señales entre los simbioses causan que la planta forme estructuras de invasión para la bacteria. El diálogo molecular entre los simbioses continúa para dar lugar a la formación de nódulos, en las raíces o raramente en el tallo de las leguminosas. Los nódulos, son estructuras especializadas que ofrecen a la bacteria un ambiente propicio para que se lleve a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (BNF) (Fauvert y Michiels, 2008).

Durante la interacción planta-bacteria, las membranas de ambos simbioses juegan un papel fundamental, puesto que en ellas se localizan una variedad de receptores, entre

ellos los de los factores Nod (Fauvart y Michiels, 2008). Al respecto, se ha observado que los niveles adecuados de algunos lípidos de membrana bacterianos, como fosfatidilcolina (PC) son necesarios para el establecimiento de una simbiosis funcional entre la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* y su planta hospedera (Minder *et al.*, 2001). Se ha reportado que una mutante de *Sinorhizobium meliloti* que no forma PC (de Rudder *et al.*, 2000), no es capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno con alfalfa (*Medicago sativa*), su planta hospedera (Sohlenkamp *et al.*, 2003). En contraste, se ha reportado que en condiciones limitantes de fósforo (P), los sulfolípidos (SL), lípidos de ornitina (OL) y diacilglicerol trimetilhomoserina (DGTS), los cuales son los principales lípidos de membrana en *S. meliloti* en estas condiciones nutricionales (Geiger *et al.*, 1999), no son esenciales para una simbiosis exitosa (López-Lara *et al.*, 2005). Estos antecedentes han sido la base para estudiar con más profundidad el papel que juegan los lípidos de las membranas celulares bacterianas que se desarrollan en vida libre, así como en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas.

2. Membranas celulares de bacterias Gram-negativas

Las membranas celulares son estructuras dinámicas que permiten a los organismos no solo delimitar el interior celular, sino también interactuar y comunicarse con el medio extracelular. Las membranas celulares poseen características propias en todos los organismos. Por ejemplo, en bacterias Gram-negativas, se ha reportado que los lipopolisacáridos (LPS) pueden presentar diferentes modificaciones inclusive entre especies (Raetz *et al.*, 2007). Por ejemplo, la composición del lípido A de la bacteria *E. coli* está fosforilado mientras que el de *S. meliloti* carece de grupos fosfato en su estructura (Raetz *et al.*, 2007). En general, la organización de las membranas celulares de bacterias Gram-negativas es compleja, ya que está constituida por dos membranas, las cuales a su vez están separadas por el periplasma (Cronan y Rock, 1996).

En la Figura 1 se muestra la membrana interna (IM) o membrana citoplasmática, la cual está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, así como por proteínas periféricas e integrales. En contraste, la membrana externa (OM) tiene una configuración diferente, compuesta por una doble capa que contiene fosfolípidos en la cara interna y lipopolisacáridos (LPS) en la cara externa. Los fosfolípidos de la membrana externa se

localizan únicamente en la monocapa interna. En *E. coli* se cree que la monocapa interna esta constituida principalmente de fosfatidiletanolamina. (Cronan y Rock, 1996).

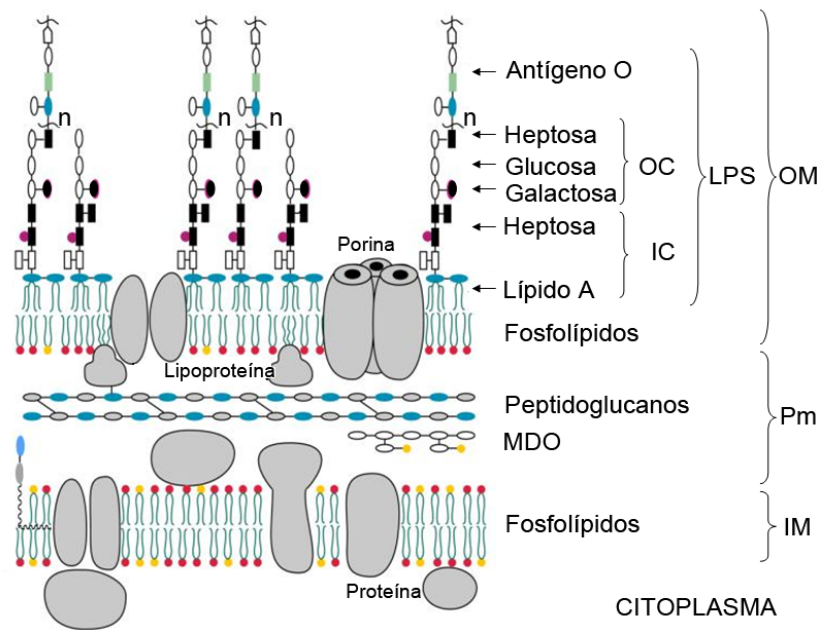


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la envoltura celular de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. IM: membrana interna, Pm: periplasma, OM: membrana externa, MDO: oligosacáridos derivados de la membrana; OC oligosacáridos núcleo externo; IC: oligosacáridos núcleo interno; LPS: lipopolisacáridos. Los fosfolípidos en rojo y amarillo representan fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, respectivamente. Tomado de Raetz *et al.*, 2007.

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos que pueden dividirse en tres regiones estructurales: lípido A, oligosacárido núcleo (ON) y antígeno O (Figura 1). El lípido A está constituido por un disacárido al que están unidos dos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. El lípido A de *E. coli* esta compuesto por un disacárido de glucosamina unidos por enlaces β -(1',6), esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos y sustituido por dos grupos fosfato en las posiciones 1 y 4'. Las acilaciones son en las posiciones 2, 2' y 3, 3' con ácidos grasos 3-hidroxiilados (ácido 3-hidroximirístico, 3-OH-14:0), mediante enlaces tipo amida (2, 2') y éster (3,3') (Raetz y Whitfield, 2002). En *Rhizobia* el lípido A carece de grupos fosfato, en su lugar, esta sustituido con un residuo de galactosa en la posición 4' y un residuo de gluconato en la posición 1. Los *Rhizobia* se caracterizan por presentar una variación en el patrón de acilaciones del lípido A, sin embargo es característico del

grupo la presencia de un ácido graso hidroxilado de 28 carbonos (27-OH C28:0) en la posición 2' y este a su vez acilado con un residuo β -hidroxibutirato (Ormeño-Orrillo, 2005). Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el ON. El ON de *E. coli* lo constituyen azúcares como el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Heptosa), hexosas, principalmente glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina (Raetz y Whitfield, 2002). En *Rhizobia* el ON posee Kdo, glucosa, galactosa, manosa, ácido glucorónico y ácido galacturónico (Ormeño-Orrillo, 2005). El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos. La longitud del antígeno O difiere aun en un mismo organismo, pudiendo variar desde 0 hasta 40 unidades repetitivas. Los monosacáridos que componen las unidades repetitivas son generalmente, azúcares neutros y ácidos, aminoazúcares, y raras veces azúcares inusuales, tales como 6- desoxihexosas ó 3,6-didesoxihexosas (Raetz y Whitfield, 2002). Los LPS son importantes por su interacción con el ambiente o con organismos hospederos eucariotas, revisado por Raetz y Whitfield (2002) y Raetz *et al.* (2007).

En el periplasma se encuentran la pared de peptidoglucanos y los glucanos periplasmáticos. Los peptidoglucanos están constituidos por polímeros lineales de β -(1,4)-N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos por pequeños péptidos (Vollmer y Bertsche, 2008). Los glucanos periplasmáticos como los oligosacáridos derivados de membrana (MDO) de *Escherichia coli*, están compuestos de seis a ocho residuos de glucosa unidos por enlaces β -(1-2) y β -(1-6). Los glucanos periplasmáticos pueden estar cargados con sustituyentes aniónicos como fosfoglicerol o residuos de ácido succínico, o bien con fosfoetanolamina (Figura 1). Los residuos fosfoglicerol o fosfoetanolamina podrían ser derivados directamente de fosfolípidos (Rumley *et al.*, 1992).

3. Fosfolípidos membranales de bacterias Gram-negativas

Los fosfolípidos son componentes de las membranas celulares que además de su función estructural, están involucrados en diversos procesos como: transporte de solutos, iniciación de la replicación de DNA, división celular, o mecanismos de señalización o transporte (Zhang y Rock, 2008; Dowhan y Bogdanov, 2009). Como los

LPS, los fosfolípidos son moléculas anfipáticas compuestas por una región hidrofílica que se orienta hacia la superficie externa y una región hidrofóbica que se localiza al interior de la membrana. En la región hidrofóbica, dos ácidos grasos están unidos mediante enlaces éster a una molécula de glicerol, en las posiciones C-1 y C-2. El grupo cabeza polar está unido por un enlace fosfodiéster en la posición C-3 del glicerol, característico de la región hidrofílica (Figura 2). La naturaleza del alcohol del grupo polar se utiliza para clasificar a los distintos fosfolípidos y puede aportar una o más cargas a los mismos. Por ejemplo, serina y colina están presentes en PS y PC, respectivamente (Rock, 2008).

Los ácidos grasos que conforman la región hidrofóbica de los fosfolípidos de bacterias, pueden ser saturados, insaturados o ramificados. La longitud, posición y el número de insaturaciones de los ácidos grasos son variables, lo cual depende del organismo. Adicionalmente, los ácidos grasos bacterianos sufren modificaciones postsintéticas, las más conocidas son la isomerización *cis-trans* y la formación de ácidos grasos ciclopropano ((Rock, 2008). Los fosfolípidos de las membranas de *E. coli* poseen los ácidos grasos saturados: ácido mirístico (tetradecanoico, C14:0), palmítico (hexadecanoico, C16:0), esteárico (octadecanoico, C18:0). Mientras que la composición de ácidos grasos insaturados son: ácido miristoleico (C14:1), ácido palmitoleico (C16:1) y *cis*-vacénico (C18:1). En *E. coli* la membrana interna es enriquecida con ácidos grasos insaturados (Cronan y Rock, 1996). La bacteria *S. meliloti* posee los ácidos grasos: palmítico, esteárico, heptadecanoico (C17:0), palmitoleico, *cis*-vacénico, C17:ciclopropano, C19:ciclopropano, así como ácidos grasos hidroxilados en la posición 3 (Saborido *et al.*, 2009)

En la Figura 2 se muestran los principales fosfolípidos de membrana de bacterias Gram-negativas, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina CL) y PC. En la bacteria modelo *E. coli* PE es el fosfolípido mayoritario mientras que PC es ausente. Sin embargo las cantidades relativas de PG y CL dependen de la fase de crecimiento de las bacterias. PG es más abundante durante la fase exponencial, mientras que CL se acumula en las células en fase estacionaria (Cronan y Rock, 1996).

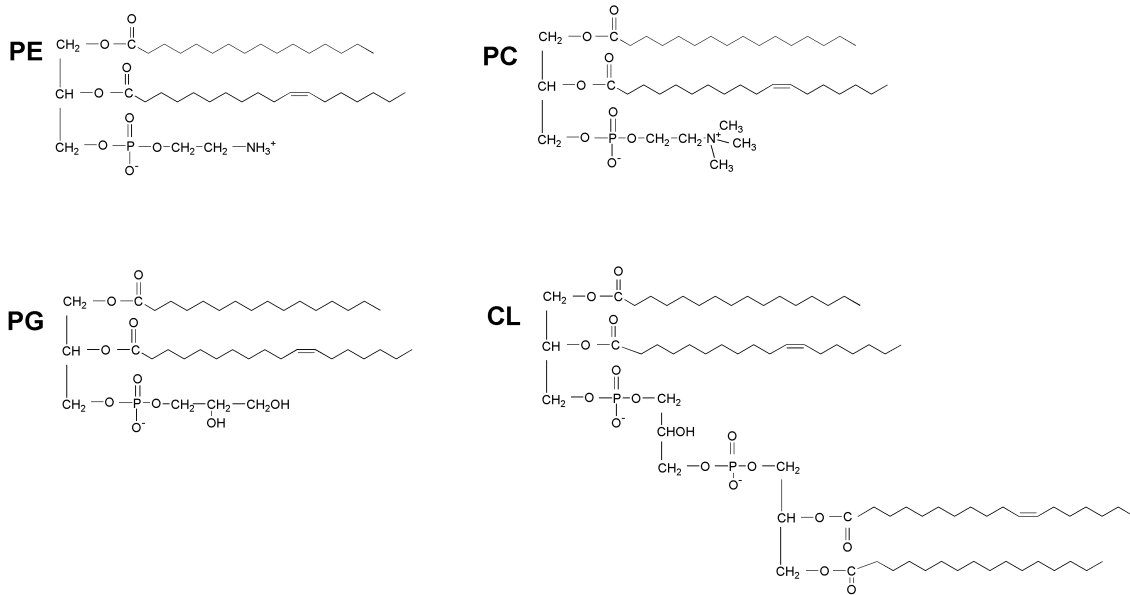


Figura 2. Estructura de algunos fosfolípidos membranales de bacterias Gram-negativas. Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC).

4. Papel señalizador de los fosfolípidos membranales

El papel que juegan los fosfolípidos en mecanismos de señalización ha sido ampliamente estudiado en células eucariontes. En estos organismos, la apertura de canales de calcio en el retículo endoplasmático y la activación de la proteína cinasa C (PKC), se da al transmitir señales inducidas desde la membrana plasmática a proteínas intracelulares. La PKC es una enzima que originalmente fue descrita como una proteína cinasa activada por calcio y dependiente de fosfolípidos. En la actualidad se piensa que sus isoformas pueden actuar independientemente de alguno de esos factores. Los principales mediadores de la actividad de la PKC son receptores acoplados a la activación de la fosfolipasa C (PLC). La función de la PLC esta íntimamente asociada con los mecanismos de la transducción de señal percibidos en la membrana, así como también con los fosfolípidos de la membrana que son sus substratos. La forma activa de la PLC hidroliza fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) a DAG e inositol trisfosfato (IP₃). El IP₃ liberado interactúa con receptores intracelulares de membrana que llevan a la apertura de canales de calcio en el retículo endoplasmático y la activación de proteínas cinasas en las membranas, para el caso del DAG. Este sistema de señalización está muy difundido y puede transducir distintas señales dependiendo de la célula y de la forma en

que se active este sistema, las respuestas pueden ser desde la transducción visual en invertebrados, la respuesta a hormonas o la comunicación neuronal (Nelson y Cox, 2004, Cocco *et al.*, 2006).

PC y PE son los fosfolípidos mayoritarios de las membranas eucariotas constituyendo el 40-60% de los fosfolípidos de estos organismos. En mamíferos la degradación de PC es activada por diversos efectores como, hormonas, factores como citocinesis, factores de crecimiento, mitógenos, sustancias quimiotácticas, así como iones calcio. La hidrólisis de PC ha sido involucrada en la transducción de señales intracelular como la regulación de metabolismo celular, crecimiento, diferenciación y la inducción de apoptosis. La transducción de señales en eucariontes implica el recambio de fosfolípidos. La degradación de PC mediada por fosfolipasas C libera DAG y fósfolina. Además, de los metabolitos de carácter lipídico derivados de PC por PLC son de suma importancia los liberados por PLD como ácido fosfatídico y colina (Nelson y Cox, 2004, Sohlenkamp *et al.*, 2003).

El fosfolípido zwitteriónico PE es el lípido mayoritario de las membranas de *E. coli*. En esta bacteria, se ha reportado que PE es determinante para la topología y actividad de la proteína de membrana LacY. La proteína LacY es responsable del transporte activo y facilitado de lactosa u otros galactósidos a través de la membrana. LacY posee una estructura politópica, constituida de 12 α -hélices transmembranales conectadas entre si mediante dominios hidrofílicos. Estudios *in vivo* indican que el fosfolípido PE es esencial en el plegamiento y actividad adecuados de la permeasa de lactosa, principalmente por que PE está involucrado en llegar a la conformación adecuada del dominio extramembranal P7 (Bogdanov y Heacock, 2002; Dowhan y Bogdanov, 2009). Recientemente, se ha reportado que PC puede reconstituir a LacY en células de *E. coli* que carecen completamente de PE. Esos datos demuestran que los fosfolípidos PC y PE pueden participar en el plegamiento adecuado del dominio P7 de LacY, el cual está involucrado en el transporte activo de lactosa (Bogdanov *et al.*, 2010).

El fosfolípido CL desempeña un papel fundamental en la organización de membranas bacterianas como de la membrana mitocondrial de eucariontes. En células eucariontes, la mitocondria participa en la regulación de la muerte celular, así como en diversos procesos metabólicos. Durante la cadena respiratoria, el citocromo C transfiere

electrones del complejo III al complejo IV. Al inicio de la señalización de apoptosis, las proteínas proapoptóticas Bcl-2, participan en la transición de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial y el citocromo C es liberado hacia el citosol. Posteriormente, se da la formación y activación de la cascada de caspasas, la cual desencadena la degradación de proteínas y daño celular. Se ha sugerido que la interacción del citocromo C con CL es un factor determinante en la cantidad de hemoproteína que es liberada durante la apoptosis. Además, existen evidencias de que las proteínas proapoptóticas Bcl-2 requieren CL para llevar a cabo la etapa de transición de permeabilidad de la mitocondria durante la apoptosis. Sin embargo, no se conoce a detalle el papel de CL en la liberación de la mitocondria durante la apoptosis (Ott *et al.*, 2007). En bacterias, el papel más conocido de CL asociado a señalización es durante el proceso de división celular. En *E. coli*, la división celular implica, la invaginación circunferencial de las tres capas de envoltura celular entre los cromosomas segregados. La división y la replicación son procesos celulares complejos, los cuales se encuentran bien coordinados. Durante la formación del septo se da la localización de la proteína FtsZ en la membrana, justo en la formación del septo. FtsZ se mueve desde el citoplasma a la superficie interna de la membrana, donde forma un anillo alrededor de la célula. Este anillo FtsZ se encoge mientras permanece asociado con el septo en crecimiento. La importancia de CL durante la división celular radica en que se han localizado dominios ricos de CL en el septo y en los polos de *E. coli* (Matsumoto *et al.*, 2006).

5. Biosíntesis de fosfolípidos en bacterias Gram-negativas

En la bacteria modelo *E. coli*, los principales fosfolípidos de membrana son PE, fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Además, de PE, PG y CL se encuentran diversos lípidos formadores de membranas, que pueden ser componentes minoritarios o mayoritarios (Rock, 2008). Por ejemplo, otras bacterias Gram-negativas tienen esfingolípidos, glucolípidos, glucofosfolípidos, lípidos que contienen ornitina, lípidos de betaína, sulfo- o sulfonolípidos (Geiger *et al.*, 2010). Se especula que alrededor de un 10% de las bacterias pueden formar derivados metilados de PE como monometil-PE (MMPE), dimetil-PE (DMPE), o PC, como componentes membranales, por ejemplo *S. meliloti* (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

En la Figura 3 se muestran las principales vías de biosíntesis de glicerofosfolípidos en eubacterias, en las que el ácido fosfatídico (PA) es considerado el intermediario universal en la biosíntesis de fosfolípidos membranales. En *E. coli* se han reportado dos vías para la biosíntesis de glicerol-3-fosfato (G3P), una de ellas lo produce directamente de glicerol por la actividad de una glicerol cinasa (GlpK), mientras que la otra vía es a través de la reducción de dihidroxiacetona fosfato, catalizada por la G3P deshidrogenasa (GpsA) (Cronan y Rock, 1996). La formación de PA es iniciada por la acilación, de G3P mediante la G3P aciltransferasa (PlsB) (Cronan y Rock, 1996). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en la gran mayoría de las bacterias, la acilación de G3P no es catalizada solo por PlsB, sino por la nueva vía PlsX/PlsY (Lu *et al.*, 2006). PlsX cataliza la conversión de la forma acilada de la proteína acarreadora de grupos acilo (acil-ACP) y fosfato inorgánico a ACP y acil-fosfato. En un segundo paso, PlsY transfiere el grupo acilo de acil-fosfato a G3P formando 1-acil-G3P (ácido lisofosfatídico). La segunda acilación para la biosíntesis de los fosfolípidos, catalizada por PlsC ocurre en todas las bacterias estudiadas hasta el momento (Cronan y Rock, 1996) (Figura 3). Sin embargo, en *Streptococcus pneumoniae*, el modelo estudiado por Lu *et al.* (2006), PlsC utiliza exclusivamente acil-ACP para formar PA. En el siguiente paso, PA es activado a CDP-diacilglicerol, considerado como el intermediario central activado en bacterias para la formación de los distintos fosfolípidos de la membrana. La conversión de PA a difosfato de citidina-diacilglicerol (CDP-DAG) es catalizada por la CDP-DAG sintasa (CdsA) (Figura 3) (Rock, 2008).

El fosfolípido aniónico PG, es sintetizado primero, por la transferencia de *sn*-glicerol-3-fosfato a CDP-DAG, mediante la fosfatidilglicerofosfato sintasa (PgsA), generando como productos fosfatidilglicerofosfato (PGP) y CMP. Finalmente, PGP es rápidamente defosforilado por una PGP fosfatasa para la formación de PG. Al respecto, en *E. coli* se han reportado dos familias de fosfatasas que pueden tener esa actividad (PgpA y PgpB) (Rock, 2008). En la síntesis de CL, la cardiolipina sintasa (Cls) de origen procariota, cataliza la condensación de dos moléculas de PG, liberando glicerol en una reacción de trans-esterificación.

La síntesis del fosfolípido zwitteriónico PE se da en dos pasos. En el primero ocurre la condensación de CDP-DAG con el aminoácido L-serina para formar fosfatidilserina (PS) y liberar CMP, catalizado por la PS sintasa (PssA). En *S. meliloti*, este paso está

catalizado por una PS sintasa del tipo II (Sohlenkamp *et al.*, 2004). En el segundo paso ocurre la descarboxilación de PS, catalizado por la PS descarboxilasa (Psd), dando como producto PE y CO₂ (Rock, 2008). En *S. meliloti*, la actividad de PS descarboxilasa es producto del gen *psd* (Vences-Guzmán *et al.*, 2008).

Se han reportado dos vías para la síntesis de PC, la de metilación y la de condensación directa de colina a CDP-DAG (fosfatidilcolina sintasa). En la vía de metilación, PC se sintetiza a través de tres metilaciones sucesivas a PE, utilizando el donador de grupos metilo *S*-adenosil-L-metionina (SAM) y la enzima fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa (PmtA). La actividad del PmtA sinorhizobial está codificada por el gen *pmtA* (de Rudder *et al.*, 2000) y metila sucesivamente a PE para formar monometil-PE, dimetil-PE y PC.

En la vía de fosfatidilcolina sintasa (Pcs) (de Rudder *et al.*, 1997; de Rudder *et al.*, 1999; Sohlenkamp *et al.*, 2000), el gen de *pcs* codifica para la Pcs (Sohlenkamp *et al.*, 2000), que cataliza la condensación de colina con CDP-DAG para formar CMP y PC (de Rudder *et al.*, 1999). La vía de Pcs parece ser una vía exclusiva dentro de las eubacterias (Sohlenkamp *et al.*, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Biosíntesis de glicerofosfolípidos en eubacterias. Los principales fosfolípidos de *E. coli* son PE, PG y CL. Además de los fosfolípidos que contiene *E. coli*, *S. meliloti* sintetiza PC. Tomado de López-Lara *et al.*, 2003.

6. Biosíntesis de lípidos de membrana sin fósforo en *Sinorhizobium meliloti*

El fósforo es un macronutriente esencial para todos los organismos, puesto que forma parte de biomoléculas como ATP, ácidos nucleicos y fosfolípidos. El fósforo participa en la transferencia de energía, así como en el metabolismo de nitrógeno y de carbono. Sin embargo, uno de los grandes problemas es la baja disponibilidad de Pi en los suelos, por su baja movilidad y su alta capacidad de absorción en el suelo (Bielecki, 1973).

Como otros organismos, las bacterias han desarrollado una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas para contender ante este estrés. Una respuesta consiste en cambiar la composición de lípidos de membrana. Se piensa que en condiciones de crecimiento limitantes de P en la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, el papel de PG puede ser reemplazado por SL, el de PC por el lípido de betaína DGTS y el de PE por OL. *R. sphaeroides* tiene un glucolípido, que tiene en su grupo cabeza glucosa o galactosa (Benning *et al.*, 1995). Así mismo, se ha observado tanto en *Pseudomonas fluorescens* (Minnikin y Abdolrahimzadeh, 1974) como en *Pseudomonas diminuta* (Minnikin *et al.*, 1974), que bajo esas condiciones de estrés, los fosfolípidos de membrana son parcialmente reemplazados por glucolípidos que no contienen fósforo y por lípidos que contienen el aminoácido ornitina.

Los glucolípidos se encuentran como componentes membranales de plantas, animales y bacterias Gram-positivas, pero con menor frecuencia en bacterias Gram-negativas. También se ha detectado la presencia del glucolípido 1,2-diacil-glicerol-3-*O*-(α -D-glucopiranosil-(1-3)-*O*- α -D-manopiranosil)-glicerol en *Rhizobium leguminosarum*. Hay evidencias de que la función de estos lípidos es el ahorro de P y de que además podrían activar segmentos del programa simbiótico de su planta hospedera, durante la etapa temprana de la simbiosis (Orgambide *et al.*, 1994). No obstante, es poco lo que se conoce acerca de la biosíntesis de glucolípidos en bacterias Gram-negativas. Se sabe que cuando *S. meliloti* se cultiva en medios con elevadas concentraciones de fosfato inorgánico, sus principales lípidos de membrana son PG, CL, PE y PC. En contraste,

cuando *S. meliloti* es cultivada en medios con concentraciones limitantes de P, reemplaza sus fosfolípidos por lípidos de membrana sin P como SL, OL o DGTS (Geiger *et al.*, 1999).

i) Biosíntesis de lípidos de ornitina

Los OLs se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas y han sido reportados en bacterias Gram-positivas como *Mycobacterium* y *Streptomyces* (López-Lara *et al.*, 2003). En la bacteria *S. meliloti*, la cantidad de OL depende de las condiciones de crecimiento, por ejemplo de la disponibilidad de P. Sin embargo, en otras bacterias, los OLs son componentes constitutivos de sus membranas como en *Flavobacterium*, aislados de *Burkholderia*, así como en especies patógenas de *Brucella* y *Bordetella*. Se ha encontrado que los OLs pueden inducir la mitogenicidad en células B, así como estimular a macrófagos para la generación de interleucina E1 y prostaglandina E2 (Geiger *et al.*, 2010). Este lípido funciona como coadyuvante y se ha observado que, al igual que el lípido A, puede inducir respuesta inmune en células hospederas. Sin embargo, a diferencia del lípido A, el OL no es tóxico (Kato y Goto, 1997).

El OL contiene un 3-hidroxiácido graso amidificado, esterificado a través de su OH con otro residuo de ácido graso. Como se observa en la Figura 4, la síntesis del OL se lleva a cabo en dos pasos. Primero, la *N*-aciltransferasa OlsB acila a la ornitina usando una hidroxí acil-ACP como sustrato y los productos de esta reacción son lisolípidos de ornitina y ACP (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-ACP como sustrato y los productos formados son lípidos de ornitina y ACP (Weissenmayer *et al.*, 2002).

Algunos géneros como *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Thiobacillus*, *Gluconobacter*, *Streptomyces* y algunas especies de *Ralstonia* o *Rhizobium tropici* poseen un OL que difiere de la versión clásica por la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono de la posición 2 (2-OH) de un residuo acilo. Los residuos 2-OH del acilo esterificado al OL no son formados durante la vía de biosíntesis de ácidos grasos normales y requieren una actividad enzimática adicional que introduzca la hidroxilación en esa posición. En

Salmonella typhimurium se ha reportado que la hidroxilasa LpxO realiza la 2-OH en los residuos de miristato del lípido A. Una dioxigenasa similar (OlsC) podría ser la responsable de hidroxilar a los residuos esterificados de OL (Geiger *et al.*, 2010). En *S. meliloti* se sabe poco acerca de la función de OL, pues las mutantes de OlsB y OlsA no presentan una alteración macroscópica en su morfología (López-Lara *et al.*, 2005). La biosíntesis de OL es completamente diferente a los modelos propuestos para la biosíntesis de los otros lípidos sin fósforo como SL o DGTS.

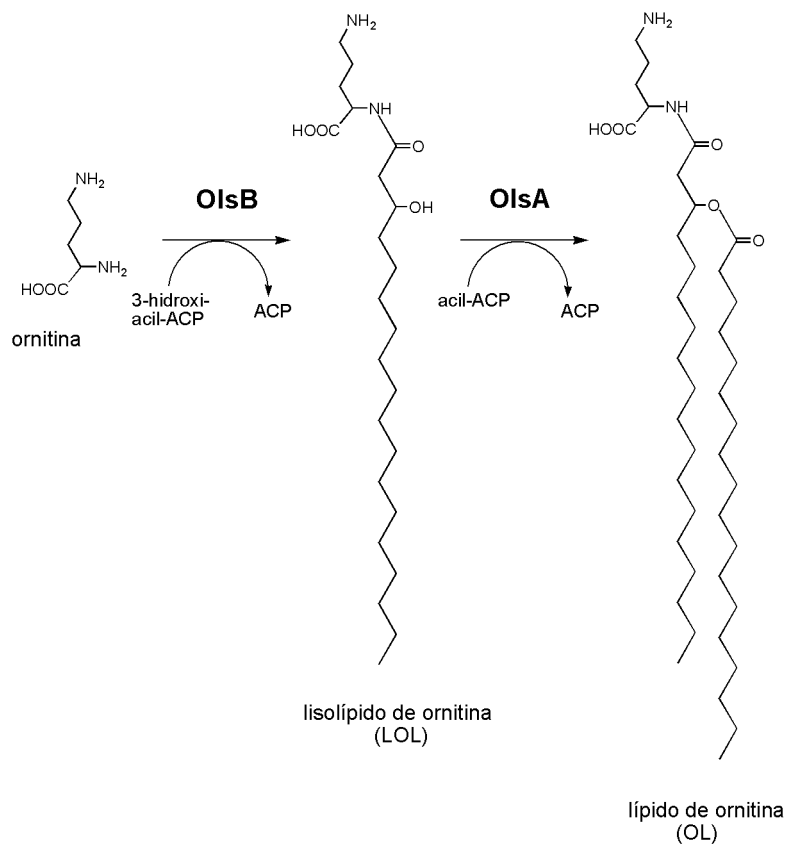


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de lípidos de ornitina en *S. meliloti*. Tomado de Gao *et al.*, 2004.

ii) Biosíntesis de sulfolípidos

El sulfolípidosulfoquinovosil-diacilglicerol se encuentra ampliamente distribuido en organismos fotosintéticos, desde bacterias hasta plantas (Benning *et al.*, 1993). Este lípido usualmente está asociado a membranas de organismos fotosintéticos. Los SL no son esenciales para la fotosíntesis, pero se ha observado que son necesarios para el

crecimiento de *R. sphaeroides* y cianobacterias en condiciones limitantes de fósforo. En *R. sphaeroides* se observa una correlación inversa entre la cantidad de fosfolípidos y sulfolípidos en condiciones limitantes de P. Ésto ha sugerido que el SL, 6-sulfo- α -D-quinovosil-diacilglicerol sustituye a PG en condiciones limitantes de P (Benning *et al.*, 1993).

En *R. sphaeroides* se requieren cuatro genes estructurales para la biosíntesis de sulfolípidos (*sqdA*, *sqdB*, *sqdC* y *sqdD*). El gen *sqdB* es altamente conservado en bacterias y tiene un ortólogo en plantas, SQD1, que codifica para una enzima implicada en la biosíntesis de UDP-sulfoquinovosa desde UDP-glucosa y sulfito como donador de azufre (Sanda *et al.*, 2001). Aunque *sqdA* codifica para una aciltransferasa, su función bioquímica no se conoce en detalle (Benning, 2007). Finalmente, se piensa que los productos de *sqdC* y *sqdD* catalizan la transferencia de sulfoquinovosa de UDP-sulfoquinovosa a DAG, sin embargo sigue sin definirse bien el mecanismo (Figura 5) (Benning, 2007).

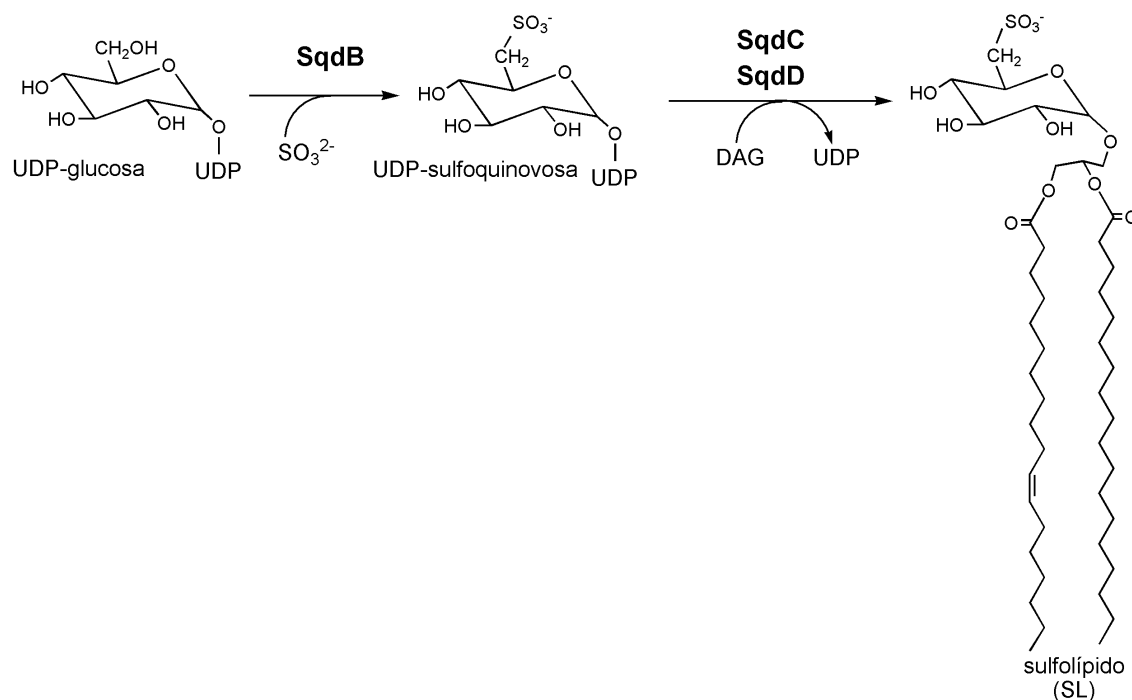


Figura 5. Modelo propuesto para la biosíntesis de sulfoquinovosil-diacilglicerol en bacterias. DAG: diacilglicerol; UDP:uridil difosfato. Tomado de López-Lara *et al.*, 2003.

Además de la presencia de SL en bacterias fotosintéticas, se ha detectado sulfoquinovosil diacilglicerol en algunos miembros de rizobias, entre ellos *S. meliloti*,

Rhizobium leguminosarum y *Rhizobium* NGR234. Una mutante de *S. meliloti* deficiente de *sqdB* todavía forma nódulos fijadores de nitrógeno con su planta hospedera alfalfa (Weissenmayer *et al.*, 2000). Debido a la poca presencia de homólogos sinorhizobiales (*sqdB*) en los genomas bacterianos, se especula que la presencia del *sqdB* es limitada en bacterias. Se han reportado homólogos en organismos que se sabe tienen la capacidad de sintetizar SL, como *R. sphaeroides*, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus*, *Prochlorococcus marinus* y en *Arabidopsis thaliana*. Los genomas de algunas archeas (*Thermoplasma* y *Sulfolobus*) también tienen homólogos de *SqdB* (López-Lara *et al.*, 2003), aunque la presencia de SL en archeas no se ha reportado. En *S. meliloti* se desconoce la función de los SLs, pero es claro que su biosíntesis depende las condiciones de crecimiento limitantes de P (López-Lara *et al.*, 2005).

iii) Biosíntesis de lípidos de betaína

El lípido de betaína diacilgliceril-*N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS) constituye parte de la membranas de organismos eucariotas inferiores como algas verdes, musgos y helechos (Künzler y Eichenberger, 1997), así como de cromofitas, hongos y amibas (Furlong *et al.*, 1986). En el grupo α -proteobacteria se ha identificado a DGTS como un lípido sin P que reemplaza a PC en condiciones limitantes de P (Benning *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1999). Existe una aparente correlación inversa entre el contenido de PC y el de DGTS, la cual sugiere que DGTS y PC son zwitteriónicos a pH fisiológico y que pueden ser intercambiables para funciones esenciales en esas bacterias. *R. sphaeroides* fue la primera α -proteobacteria, en la que se estudió la formación de DGTS (Benning *et al.*, 1995). En la Figura 6 se muestra la vía de biosíntesis de DGTS, en la cual se requieren los productos de los genes estructurales *btaAB* (Klug y Benning, 2001). En esta vía, DAG es convertido a diacilgliceril-homoserina (DGHS) por BtaA, una *S*-adenosilmetionina/diacilglicerol 3-amino-3-carboxipropil transferasa. Durante la formación del enlace éter, SAM funciona como un donador del grupo homoserina. Posteriormente, la *S*-adenosilmetionina:diacilglicerol-homoserina-*N*-metiltransferasa (BtaB) cataliza la triple metilación de DGHS para formar DGTS (Figura 6). En *S. meliloti* se han identificado los ortólogos de BtaA y BtaB y se sabe que una mutante deficiente de BtaA no produce DGTS (López-Lara *et al.*, 2005). La sintasa del lípido de betaína DGTS BTA1_{Cr} del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es una proteína bifuncional que lleva a cabo la modificación del grupo homoserina como la triple

metilación de DGHS (Riekhof *et al.*, 2005). La expresión heteróloga de BTA1_{Cr} en *E. coli* permite la acumulación de DGTS (Riekhof *et al.*, 2005).

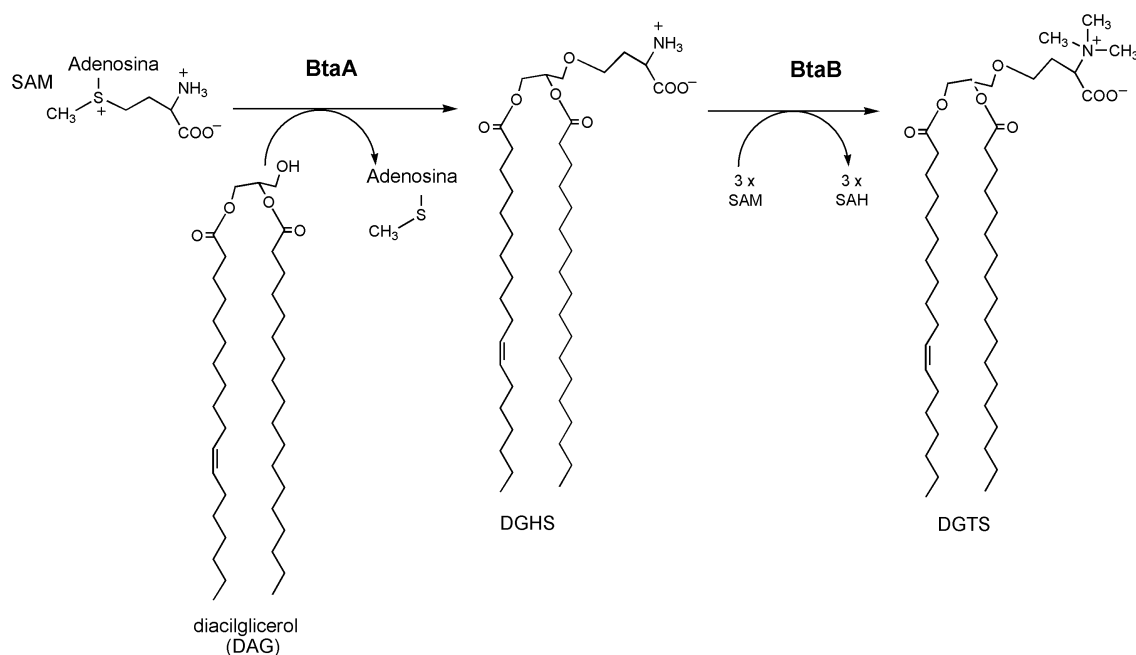


Figura 6. Biosíntesis de DGTS, el cual puede sustituir a PC en condiciones limitantes de P en algunas bacterias. DAG: diacilglicerol; SAM: S-adenosil L-metionina; SAH: S-adenosina homocisteína; DGHS: diacilgliceril homoserina. Tomado de López-Lara *et al.*, 2003.

Se estima que la presencia de lípidos de betaína tipo DGTS es limitada en bacterias. Se encuentran homólogos de BtaA y BtaB en algunos órdenes de α -proteobacterias como en el orden *Rhodobacterales*, los géneros *Rhodobacter*, *Roseobacter*, *Sagittula* y *Stappia*, en Esfíngomonadales, los órdenes *Sphingomonas* y *Erythrobacter* y en Rhizobiales, los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Mesorhizobium*, *Beijerinckia*, *Rhodopseudomonas* y algunos miembros de Planctomycetes como *Planctomyces*, *Blastopirellula* y *Rhodopirellula* (Geiger *et al.*, 2010). Se ha especulado la idea de que los lípidos que no contienen fósforo como DGTS puedan ayudar a la sobrevivencia de las bacterias en condiciones limitantes de fósforo (López-Lara *et al.*, 2005). Esta idea es soportada por el hecho de que patógenos intracelulares del género *Brucella* aparentemente carecen de genes para la biosíntesis de DGTS, en contraste con el patógeno oportunista *Ochrobacter anthropi* que sí los tiene y normalmente es de vida libre (Geiger *et al.*, 2010).

7. Respuestas bacterianas ante la limitación de fósforo

Los sistemas de dos componentes constituyen el principal mecanismo mediante el cual las bacterias detectan fluctuaciones extracelulares, lo cual les permite modificar su expresión génica y responder ante situaciones de estrés (Ulrich *et al.*, 2005). Los sistemas de dos componentes regulan una gama de respuestas en bacterias como: virulencia; producción de toxinas, (Calva y Oropeza, 2005); así como en la adquisición de nutrientes como: nitrógeno, carbono y fósforo (Stock *et al.*, 2000; Wu y Bauer, 2008).

En bacterias Gram-negativas, el regulón Pho modula la expresión de genes que responden a concentraciones externas de fósforo. Se piensa que en *E. coli* el sistema de incorporación de P (PstSCAB2), una proteína transmembranal, percibe los niveles de P extracelular y los comunica a la proteína de membrana periférica PhoU (Figura 7). Por un mecanismo no comprendido, probablemente como chaperona, PhoU (Hsieh y Wanner, 2010), regula negativamente al regulón Pho a través del sistema de dos componentes específico de fosfato PhoR/PhoB (Wanner, 1996). PhoR es una proteína transmembranal que se activa (PhoR^A) cuando el fosfato es un factor limitante del crecimiento o se inhibe en exceso del mismo (PhoR^I). La actividad histidina-cinasa de PhoR^A transfosforila al activador transcripcional PhoB (Figura 7). Una vez que PhoB es fosforilado, reconoce específicamente a secuencias de DNA llamadas “cajas Pho” (un consenso de 18 nucleótidos). En *E. coli*, la caja Pho es parte de la región promotora de al menos 30 genes que responden ante ese estrés. Dentro de los miembros del regulón Pho destacan genes de los sistemas de incorporación de fosfato inorgánico, el gen *phoA* que codifica para una fosfatasa alcalina periplasmática, los genes *phnKMN* y *phnB* que intervienen en el metabolismo de fosfonato, *ugpAE* para la incorporación de glicerol-3-fosfato, así como genes para la acumulación de polifosfatos (poliP) (Spira y Yagil, 1998; Wanner, 1993; Hsieh y Wanner, 2010).

En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o solubles. También existen pequeñas cantidades de poliP en membranas plasmáticas, en complejo con poli-β-hidroxibutirato y calcio. Los poliP son polímeros lineares de residuos ortofosfato, unidos por enlaces fosfoanhidrido considerados de alta energía. El tamaño de los polímeros puede variar de tres a mil residuos de fosfato

(Kornberg *et al.*, 1999). La enzima polifosfato cinasa (PPK) utiliza el fosfato γ del ATP para hacer los polímeros. Los polifosfatos pueden ser hidrolizados a P_i por exopolifosfatasas (PPX) o por endopolifosfatasas (PPN) (Brown y Kornberg, 2004). En *S. meliloti* no se han reportado genes para la degradación de polifosfatos. Sin embargo, se encuentra un homólogo de *ppk* (SMc00618) regulado por PhoB (Yuan *et al.*, 2006b).

En *S. meliloti* las funciones reguladas por PhoB incluyen, actividad de la catalasa KatA (Yuan *et al.*, 2005), activación de sistemas de transporte de alta afinidad PstSCAB (Voegelé *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2006a), la biosíntesis de EPS II (Rüberg *et al.*, 1999), así como la biosíntesis de lípidos de membrana que no contienen P_i como el OL, SL y DGTS (Geiger *et al.*, 1999).

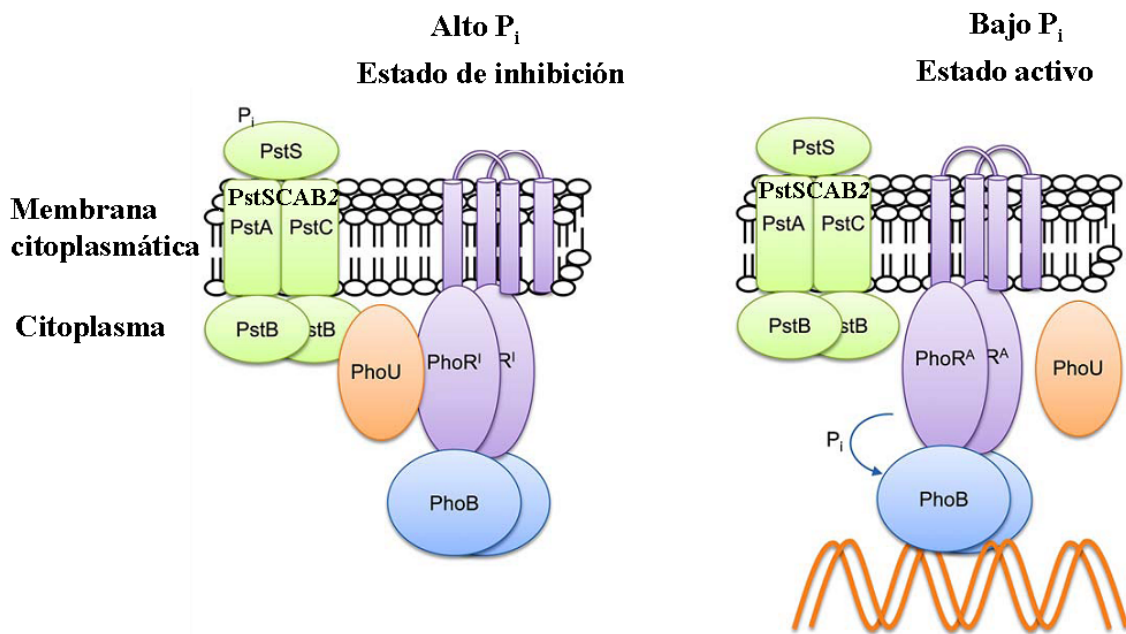


Figura 7. Modelo de respuestas de *Escherichia coli* bajo limitación de P. Los procesos de activación e inhibición son propuestos para los estados de PhoR: estado de inhibición (PhoR^I) y estado activo (PhoR^A). En altas concentraciones de P_i el sistema de transporte PstSCBA2 se satura, bajo esas condiciones, la señal de PhoR se propaga para formar PhoR^I y el regulador transcripcional PhoB permanece inactivo. En bajas concentraciones de P_i PhoR^A actúa como un donador de P para fosforilar PhoB. Tomado de Hsieh y Wanner (2010).

ANTECEDENTES

Se sabe que los lípidos de membrana sin P sintetizados en *S. meliloti* en condiciones de crecimiento limitantes de P (< 0.02 mM Pi) SL, OL y DGTS, muestran una correlación inversa con los niveles de los principales fosfolípidos (Geiger *et al.*, 1999). La biosíntesis de OL ha sido bien caracterizada (Gao *et al.*, 2004; Weissenmayer *et al.*, 2002). En el caso de SL existe la propuesta para su biosíntesis, aunque se desconoce la función precisa de todos los genes involucrados (Benning, 2007). Respecto al lípido de betaína DGTS, en *R. sphaeroides* y *S. meliloti* se identificaron los genes estructurales *btaAB* (Klug y Benning, 2001; López-Lara *et al.*, 2005). Se ha estudiado la caracterización de las actividades enzimáticas de BtaAB en *R. sphaeroides* (Klug y Benning, 2001), sin embargo, no era clara la fuente de DAG para el primer paso en la biosíntesis de DGTS. En *E. coli*, la acumulación de DAG puede resultar tóxica para esta bacteria (Raetz y Newman, 1979), por lo tanto, es de esperar que en *S. meliloti* una acumulación de DAG tuviera un efecto similar. Con base en lo anterior, especulamos que si DAG es sustrato de BtaA en *S. meliloti* en condiciones limitantes de P, éste debe ser parte del reciclamiento de lípidos. En bacterias, se conocen pocos ciclos de reciclamiento de lípidos y sus papeles fisiológicos no son bien comprendidos.

En condiciones de baja osmolaridad, muchas bacterias Gram-negativas forman glucanos periplasmáticos sustituidos con residuos de fosfoalcoholes, los cuales son derivados de los grupos cabeza de los fosfolípidos membranales. Durante esas reacciones de transferencia, DAG es formado como producto lipídico. Después de ser refosforilado por DAG cinasa (Dgk) a PA, el lípido puede entrar *de novo* en la biosíntesis de los fosfolípidos. Dicha degradación de fosfolípidos a DAG y su reuso para formar fosfolípidos *de novo* se conoce como el reciclamiento de DAG (Rock, 2008). Durante la formación de glucanos periplasmáticos en *E. coli*, la fosfogliceril transferasa MdoB puede transferir el grupo fosfoglicerol de fosfatidilglicerol (PG) al β -(1,2)-glucano, formando como segundo producto DAG (Bohin, 2000). No se han descrito transferasas análogas para fosfoetanolamina de fosfatidiletanolamina (PE) al β -(1,2)-glucano y para fosfocolina de fosfatidilcolina (PC) al β -(1,2)-glucano. En el genoma de *S. meliloti* existen dos homólogos (SMc02270 y SMc04438) al MdoB de *E. coli*. SMc02270 es RkpI y parece estar involucrado en la producción de los polisacáridos capsulares en *S. meliloti* (Kiss *et al.*, 1997), mientras que SMc04438 es la

fosfoglicerol transferasa CgmB en *S. meliloti* y se piensa que cataliza una reacción análoga a MdoB (Wang *et al.*, 1999) y la producción de DAG. DAG puede ser también fosforilado a PA, mediante una DAG cinasa e incorporarse a la biosíntesis de fosfolípidos. Una fuente adicional de DAG podría provenir de la degradación de fosfolípidos, la cual puede ocurrir por la ruptura de sus enlaces éster.

En la Figura 8 se observa que si los grupos esterificados de los fosfolípidos son transferidos por enzimas a agua, se trata de hidrólisis o degradación por fosfolipasas, mientras que cuando son transferidos a un grupo hidroxilo OH de un alcohol, a un grupo amino primario, a un grupo sulfidril, o a un grupo fosfato, se trata de transferasas. Las fosfatasa alcalinas (AP) son las esterasas mejor conocidas, tienen la propiedad de hidrolizar fosfomonoésteres liberando como productos alcohol y fósforo inorgánico (Figura 8). Las fosfolipasas constituyen un grupo ubicuo y diverso de enzimas lipolíticas y se clasifican de acuerdo al sitio de acción de hidrólisis del enlace éster A1, A2, C y D (Nelson y Cox, 2004). Las fosfolipasas también se han agrupado en función del sustrato por el que tienen preferencia, lo cual ha servido para determinar grupos que tienen una afinidad de sustrato muy específica, como las bien conocidas fosfolipasas específicas de PC (Stonehouse *et al.*, 2002) o de PI (Griffith y Ryan, 1999). No obstante, la mayoría de las fosfolipasas bacterianas no tienen afinidad por un solo sustrato, sino que pueden hidrolizar distintos fosfolípidos. Además de las propiedades enzimáticas de las fosfolipasas, se estima que se agrupan mejor con base en sus homologías estructurales (Titball, 1993; Titball, 1999).

Las fosfolipasas secretadas por bacterias como factores de patogenicidad constituyen el área más estudiada dentro de las mismas fosfolipasas. La virulencia de las fosfolipasas secretadas y algunas proteínas integrales de membrana externa (OMPLA), se basa en su capacidad de hidrolizar fosfolípidos de la membrana del hospedero eucarionte, lo cual facilita la infección del huésped (Songer, 1997; Tannaes *et al.*, 2001).

El grupo mejor conocido de fosfolipasas secretadas, son las PLC de los patógenos *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella pneumophila* (Songer, 1997). La α -toxina de *C. perfringens* es la fosfolipasa C más letal que ha sido caracterizada, la cual hidroliza PC y esfingomielina (SM). La α -toxina es esencial para el establecimiento de la gangrena gaseosa, enfermedad que produce *C. perfringens* en

una gran variedad de mamíferos incluido el hombre. La α -toxina es una metaloenzima zinc-dependiente que consiste de dos dominios: un dominio amino-terminal que contiene el sitio enzimáticamente activo y un dominio carboxilo terminal, el cual se postula como necesario para la interacción con lípidos (Songer, 1997). La fosfolipasa D de *Corynebacterium pseudotuberculosis* hidroliza SM y lisofosfatidilcolina. *C. pseudotuberculosis* el agente causal de la linfadenitis gaseosa en ovino y caprino. La actividad de PLD parece ser un factor de virulencia esencial en la patogénesis de *C. pseudotuberculosis*.

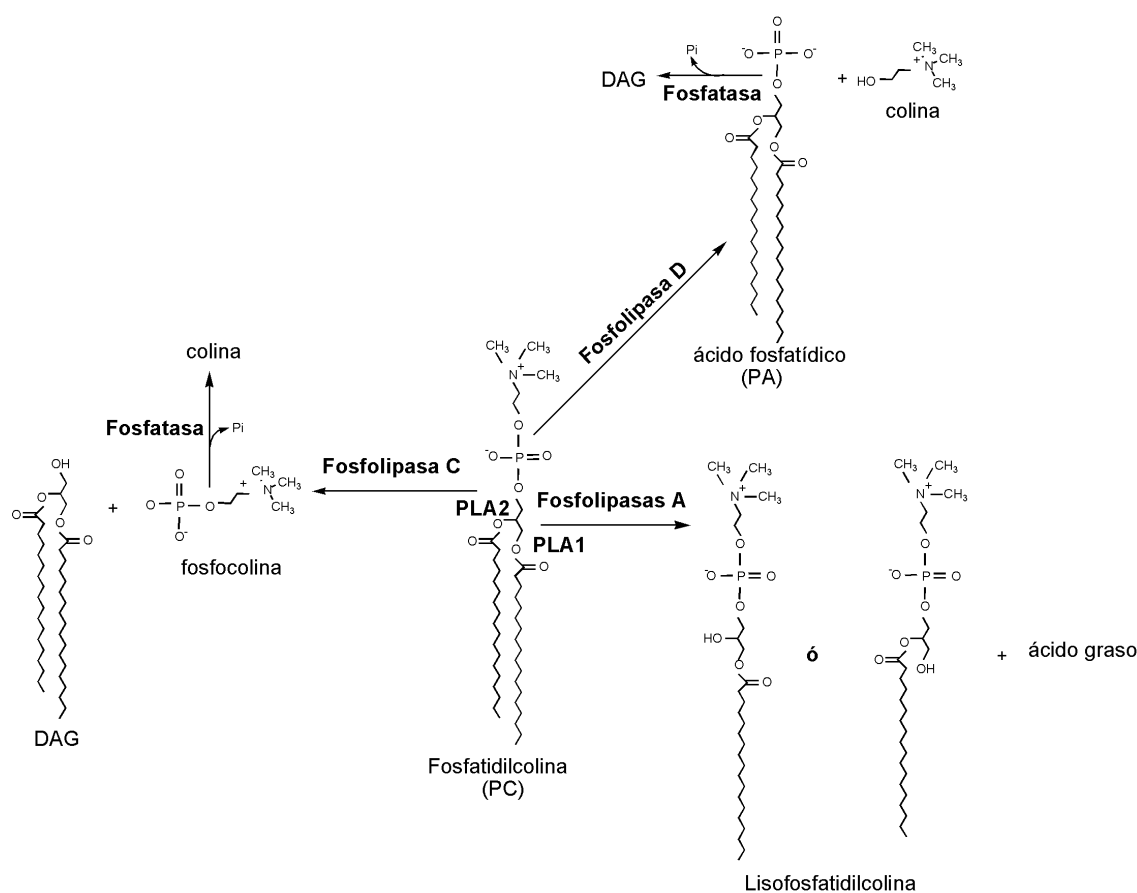


Figura 8. Posibilidades de hidrólisis de PC mediante fosfolipasas y fosfatasas. Las fosfolipasas A generalmente liberan como producto uno de los ácidos grasos de los fosfolípidos y ácido lisofosfatídico. La fosfolipasa A1 hidroliza el enlace éster en la posición *sn*-1, mientras que la fosfolipasa A2 remueve el acilo en la posición *sn*-2 del glicerol. Las fosfolipasas B hidrolizan los acilos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol. La hidrólisis de fosfolípidos mediante una fosfolipasa D (PLD), genera PA y colina, PA puede ser también defosforilado por una fosfatasa. Una fosfolipasa C (PLC) tiene como productos DAG y fosfocolina, este último también puede ser defosforilado.

La OMPLA, también denominada PldA o fosfolipasa resistente a detergente, es una de las pocas enzimas presentes en la membrana externa. PldA es una enzima bien

estudiada en *E. coli*, que en condiciones de estrés es activada por dimerización e hidroliza fosfolípidos a liso-fosfolípidos y ácidos grasos (Dekker, 2000). En el patógeno *Helicobacter pylori*, la actividad de PldA facilita la invasión del huésped, así como su adaptación al medio ácido estomacal (Tannaes *et al.*, 2001). Existe información extensa acerca de las propiedades bioquímicas y tóxicas de fosfolipasas en bacterias. Sin embargo, no hay reportes de fosfolipasas bacterianas que degraden los fosfolípidos de sus membranas en alguna condición estudiada o en limitación de nutrientes, como P.

Las plantas, del mismo modo que las bacterias, han desarrollado diversas estrategias que les permiten responder y adaptarse a la deficiencia de P. Las plantas tienen adaptaciones morfológicas y bioquímicas como la modificación de la estructura radicular y la exudación de compuestos que incrementan la disponibilidad de Pi en el suelo (Valdés-López y Hernández-Delgado, 2008). Si bien el reemplazo de fosfolípidos por lípidos que no contienen fósforo fue descrito primero en bacterias, recientemente en plantas el estudio de este fenómeno ha tenido mayor auge. En deficiencia de fósforo los fosfolípidos de membranas en plantas son reemplazados por lípidos que no contienen P, como galactolípidos o sulfolípidos. Los fosfolípidos pueden ser hidrolizados por fosfolipasas: fosfolipasa C4 (NPC4) (Andersson *et al.*, 2005) y C5 (NPC5) (Gaude *et al.*, 2008), fosfolipasa DZ1 (PLD ζ 1) (Li *et al.*, 2006) y DZ2 (PLD ζ 2) (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006) y/o fosfatasa: fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP) (Tjellström *et al.*, 2008). Estas enzimas tienen actividad específica en órganos como raíces, tallos y hojas; a nivel subcelular se han detectado en membrana plasmática, mitocondria, tonoplasto, membranas de cloroplasto (Tjellström *et al.*, 2008). DAG es uno de los productos liberados de la actividad de fosfolipasas y sirve como sustrato en la biosíntesis de los lípidos que no contienen P. Es importante destacar que en el genoma de *S. meliloti*, no se encuentran homólogos a alguna de las fosfolipasas y/o fosfatasa descritas en plantas que responden ante deficiencia de P.

Por trabajos recientes sobre las respuestas transcripcionales ante la limitación de P en *S. meliloti*, podemos tener un panorama global de las estrategias empleadas por esta bacteria para contender con el estrés por deficiencia exógena de P. En este tipo de estudios, se han reportado 96 genes que son inducidos en limitación de fósforo y dependientes de PhoB. Entre los 96 genes destacan cuatro hipotéticas fosfatasa (SMc00171, SMc01907, SMc02634 y SMc00620) inducidas en limitación de P (Krol y

Becker, 2004; Yuan *et al.*, 2006b), las cuales podrían desempeñar una actividad de fosfatasa o fosfolipasa en *S. meliloti*. Adicional a las fosfatasas dependientes de PhoB, en el genoma de *S. meliloti* se pueden encontrar anotadas dos hipotéticas fosfolipasas D SMc20094 y SMc04448, que no son inducidas en condiciones limitantes de P. Con base en lo anterior, proponemos un modelo en el cual los fosfolípidos de *S. meliloti* son degradados por una fosfolipasa o una fosfatasa en condiciones de crecimiento limitantes de P. Los posibles productos de hidrólisis (Figura 8) como DAG o PA pueden fungir como sustrato que participa en la reacción catalizada por BtaA (Figura 6).

HIPÓTESIS

Los fosfolípidos de *S. meliloti* en condiciones de limitación de fósforo podrían ser degradados por fosfolipasa (s) que genera (n) producto (s) como DAG, el cual sirve para la biosíntesis de lípidos sin fósforo como DGTS.

OBJETIVO

Caracterizar el gen y la enzima involucrada en la degradación de fosfolípidos, como paso inicial que se requiere para la biosíntesis de lípidos libres de fósforo que contienen diacilglicerol.

Objetivos Particulares

- Identificar el gen involucrado en la degradación de los fosfolípidos.
- Inactivar el gen identificado como responsable de la degradación de fosfolípidos, así como caracterizar los fenotipos de la mutante.
- Establecer propuestas para la regulación del gen responsable de la degradación de fosfolípidos.
- Caracterizar la función enzimática del producto del gen que participa en la degradación de fosfolípidos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral son detallados en a) artículo publicado y en b) resultados adicionales. En b) se muestran los resultados que permitieron estandarizar la actividad de SMc00171 como una fosfolipasa C. Adicionalmente, el artículo contiene una discusión de los resultados, la cual es complementada en la discusión de esta tesis.

En este trabajo se identificó y caracterizó la actividad fosfolipasa C de SMc00171 de la bacteria *S. meliloti* en condiciones limitantes de fósforo. Con el propósito de identificar el gen responsable de la degradación de fosfolípidos en condiciones limitantes de fósforo en *S. meliloti*, se inactivaron 4 hipotéticas fosfatasas y dos hipotéticas fosfolipasas D. Solo la mutante PHO00171 deficiente en el gen *smc00171* fue incapaz de degradar PC en condiciones de limitación de P y su capacidad de formación de DGTS se vió disminuida al compararse con la cepa silvestre. Para evaluar la actividad hidrolítica de SMc00171 se incubaron los sustratos: Bis-pNPP y PC con extractos crudos de *E. coli* BL21 pLysS que sobreprodujeron SMc00171. La actividad de fosfolipasa C de SMc00171 se demostró al detectar la formación de DAG y fosfocolina, al utilizar PC como sustrato.

a) Artículo Publicado

Zavaleta-Pastor M, Sohlenkamp C, Gao JL, Guan Z, Zaheer R, Finan TM, Raetz CR, López-Lara IM, Geiger O (2010) *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:302-307.

b) Resultados adicionales

- La degradación de fosfolípidos de *S. meliloti* bajo limitación de fósforo es dependiente de PhoB pero no de BtaA.
- Estandarización de la actividad fosfolipasa C de SMc00171.

Sinorhizobium meliloti phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation

Maritza Zavaleta-Pastor^a, Christian Sohlenkamp^a, Jun-Lian Gao^{a,1}, Ziqiang Guan^b, Rahat Zaheer^c, Turlough M. Finan^c, Christian R. H. Raetz^{b,2}, Isabel M. López-Lara^a, and Otto Geiger^{a,2}

^aCentro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62251, Mexico; ^bDepartment of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710; and ^cCenter for Environmental Genomics, Department of Biology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada L8S 4K1

Contributed by Christian R. H. Raetz, November 14, 2009 (sent for review August 30, 2009)

Rhizobia are Gram-negative soil bacteria able to establish nitrogen-fixing root nodules with their respective legume host plants. Besides phosphatidylglycerol, cardiolipin, and phosphatidylethanolamine, rhizobial membranes contain phosphatidylcholine (PC) as a major membrane lipid. Under phosphate-limiting conditions of growth, some bacteria replace their membrane phospholipids with lipids lacking phosphorus. In *Sinorhizobium meliloti*, these phosphorus-free lipids are sulfoquinovosyl diacylglycerol, ornithine-containing lipid, and diacylglyceryl trimethylhomoserine (DGTS). Pulse-chase experiments suggest that the zwitterionic phospholipids phosphatidylethanolamine and PC act as biosynthetic precursors of DGTS under phosphorus-limiting conditions. A *S. meliloti* mutant, deficient in the predicted phosphatase SMC00171 was unable to degrade PC or to form DGTS in a similar way as the wild type. Cell-free extracts of *Escherichia coli*, in which SMC00171 had been expressed, convert PC to phosphocholine and diacylglycerol, showing that SMC00171 functions as a phospholipase C. Diacylglycerol, in turn, is the lipid anchor from which biosynthesis is initiated during the formation of the phosphorus-free membrane lipid DGTS. Inorganic phosphate can be liberated from phosphocholine. These data suggest that, in *S. meliloti* under phosphate-limiting conditions, membrane phospholipids provide a pool for metabolizable inorganic phosphate, which can be used for the synthesis of other essential phosphorus-containing biomolecules. This is an example of an intracellular phospholipase C in a bacterial system; however, the ability to degrade endogenous preexisting membrane phospholipids as a source of phosphorus may be a general property of Gram-negative soil bacteria.

bacterial cell envelope | diacylglycerol | diacylglyceryl trimethylhomoserine | phospholipid turnover | phosphatidylcholine

Animal cells have access to relatively abundant sources of phosphorus for the formation of biomolecules such as membrane phospholipids and nucleic acids. The characteristic lipid composition for a particular animal cell membrane is thought to result from a steady state between formation and turnover of the lipids. In contrast, plants and many environmental microbes often live in environments where available phosphorus is a growth-limiting factor. The strategies employed by organisms to deal with phosphorus limitation include: (i) increased solubilization of phosphorus-containing compounds; (ii) more efficient uptake into cells; and (iii) less phosphorus use when synthesizing their biomolecules (1). The replacement of phospholipids by galacto- and sulfolipids in plant membranes constitutes an important adaptive process for growth on phosphate-limited soils. In *Arabidopsis thaliana*, several phospholipases D and C (2–5) are induced under phosphate-limiting conditions, and they degrade membrane phospholipids to phosphatidic acid or diacylglycerol (DAG), respectively. DAG then serves as the initial substrate for the formation of galacto- and sulfolipids, which lack phosphorus.

In some bacteria, the membrane phospholipids are partially replaced during phosphate limitation by phosphorus-free lipids,

including *Bacillus subtilis* (6), *Pseudomonas diminuta* (7), *Pseudomonas fluorescens* (8), and *Rhodobacter sphaeroides* (9). *Sinorhizobium meliloti* is a soil bacterium that can form a symbiosis with legumes such as alfalfa. In the symbiotic state, *S. meliloti* fixes molecular nitrogen in nodules on the roots of the legume plant. *S. meliloti* usually synthesizes phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), phosphatidylethanolamine (PE), monomethyl-PE (MMPE), and phosphatidylcholine (PC) as its major membrane lipids (10). However, under phosphorus-limiting conditions, *S. meliloti* replaces most of its phospholipids with membrane-forming lipids that do not contain phosphorus, such as the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol (SL), an ornithine-containing lipid (OL), or diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine (DGTS) (11). These phosphorus-free membrane lipids are not important for the symbiotic lifestyle of *S. meliloti*, but they are required for optimal growth under phosphorus-limiting conditions (12).

The expression of many genes of the phosphorus-limitation stress response in *S. meliloti* is regulated at the transcriptional level by the two-component PhoR-PhoB signal transduction system in which phosphorylated PhoB modulates gene expression by binding to specific Pho boxes (13, 14). The main membrane lipid formed under phosphorus limitation in *S. meliloti* is DGTS. Two structural genes (*btaAB*) required for DGTS biosynthesis were first described in *Rhodobacter sphaeroides* (15) and later in *S. meliloti* (12). BtaA converts DAG into diacylglyceryl-homoserine (DGHS), and BtaB catalyzes the 3-fold methylation of DGHS to yield DGTS (15, 16). Expression of BtaA and BtaB requires induction by the PhoB regulator. Another minor DAG-containing, phosphorus-free membrane lipid in *S. meliloti* is SL, and *sqdB* is required for its formation (17). At least four structural genes (*sqdA*, *sqdB*, *sqdC*, and *sqdD*) are involved in SL biosynthesis in *R. sphaeroides*, but the detailed overall mechanism for sulfolipid assembly in bacteria still needs to be defined (18).

Before the present study, it was not clear how the DAG needed for DGTS biosynthesis was formed. Here, we show that preexisting phospholipids are metabolic precursors of DAG-containing, phosphorus-free membrane lipids in *S. meliloti*. The PhoB-controlled gene *smc00171* encodes a phospholipase C that degrades zwitterionic phospholipids to DAG and the respective phosphocholine. DAG is then used for the formation of the phosphorus-free membrane lipids.

Author contributions: T.M.F., I.M.L.-L., and O.G. designed research; M.Z.-P., C.S., J.-L.G., Z.G., and R.Z. performed research; M.Z.-P., C.S., T.M.F., C.R.H.R., I.M.L.-L., and O.G. analyzed data; and M.Z.-P., T.M.F., C.R.H.R., and O.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹Present address: Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Ban Jing Shu Guang Hua Yuan Middle Road, Haidian District, Beijing 100097, People's Republic of China.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: raetz@biochem.duke.edu or otto@ccg.unam.mx.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0912930107/DCSupplemental.

Results

Membrane Phospholipids of *S. meliloti* Are Degraded Under Phosphorus-Limiting Conditions. Under phosphate-limiting conditions of growth, *S. meliloti* replaces its membrane phospholipids by lipids not containing phosphorus (11) such as SL, OL, and DGTS. To understand whether or not sinorhizobial phospholipids might act as biosynthetic precursors for membrane lipids lacking phosphorus, we performed pulse-chase experiments, labeling with radioactive acetate in high-phosphate conditions during the pulse period. When the chase was performed at high-medium concentrations of inorganic phosphate (Pi), the radioactivity incorporated into the individual sinorhizobial phospholipids was maintained over time, suggesting that under such conditions, phospholipids are metabolically stable in this organism. In contrast, when the chase was performed at low concentrations of Pi, some phospholipids continuously lost radiolabel; in particular, the relative amounts of the zwitterionic PC, PE, and MMPE (Fig. 1 and Table S1) were continuously reduced (PC from 60% to 12% and PE + MMPE from 25% to 3%). Little or no degradation was observed for the anionic phospholipids PG and CL (Fig. 1 and Table S1) at low concentrations of Pi. As noted previously (11) and observed again here (Fig. 1 and Table S1), the amount of SL increased slightly under conditions of phosphorus limitation, whereas the amount of OL strongly increased. DGTS becomes the predominant membrane lipid in *S. meliloti* (11) (Fig. 1 and Table S1), and its relative amount increases from 0% to 63%. Remarkably, most of the radiolabel lost from the zwitterionic phospholipids PC, PE, and MMPE appeared in the DGTS (Fig. 1 and Table S1), suggesting that PC, PE, and MMPE are metabolic precursors of DGTS.

To understand whether or not DGTS formation was required for the degradation of zwitterionic phospholipids, similar pulse-chase experiments were performed with the *btaA*-deficient mutant DGTS1 that is unable to catalyze the first step of DGTS biosynthesis (12). Under phosphorus-limiting conditions, the *btaA*-deficient mutant degraded PC, PE, and MMPE to a similar degree as the wild-type, which shows that biosynthesis of DGTS is not a requirement for the degradation of zwitterionic phospholipids. Many processes induced under phosphorus-limiting conditions are controlled by the regulator PhoB. In pulse-chase experiments, we, therefore, analyzed whether or not the *phoB*-deficient mutant H838 (11) degraded phospholipids in a similar way as the wild-type. Under phosphorus-limiting conditions, the *phoB*-deficient

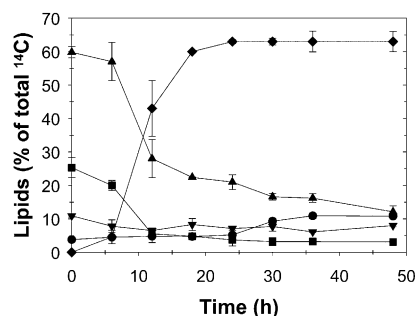


Fig. 1. Pulse-chase experiment suggesting that zwitterionic phospholipids function as biosynthetic precursors of phosphorus-free membrane lipids in *S. meliloti*. After labeling *S. meliloti* with [^{14}C]-labeled acetate during growth on minimal medium in the presence of 1.3 mM Pi, cells were washed and resuspended in minimal medium containing 0.02 mM Pi. During the chase period, aliquots were taken at different time points and lipids were quantified. Percentages of individual lipid classes are shown for the different time points of chase: \blacktriangle , PC, phosphatidylcholine; \blacksquare , PE, phosphatidylethanolamine; \blacklozenge , DGTS, diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine; \blacktriangle , PG, phosphatidylglycerol; \blacklozenge , CL, cardiolipin; \bullet , OL, ornithine-containing lipid; and \blacktriangledown , SL, sulfolipid. The data represent mean values \pm SD of three independent experiments.

mutant was unable to degrade PC, PE, and MMPE, suggesting that the hypothetical structural genes encoding the phospholipid-degrading activity should require active PhoB for their induction.

***smc00171*-Deficient Mutant of *S. meliloti* Is Unable to Degrade Phosphatidylcholine Under Phosphate Limitation.** If membrane phospholipids are biosynthetic precursors of DGTS, we expected that they should be degraded by a phospholipase D to phosphatidic acid and subsequently, by a phosphatase to DAG or alternatively, by a phospholipase C directly to DAG. We, therefore, hypothesized that potential phospholipases C or D or phosphatases controlled by PhoB might be responsible for the degradation of zwitterionic phospholipids under phosphorus-limiting conditions. *S. meliloti* has two genes that encode for putative phospholipases D, *smb20094*, and *smc04448*. Also, four genes (*smc00620*, *smc02634*, *smc01907*, and *smc00171*) encoding putative phosphatases are strongly induced under Pi limitation in a PhoB-dependent manner (13, 14). Mutants deficient in each of the six potential phospholipase or phosphatase genes were constructed and analyzed in pulse-chase experiments. Mutants PLD20094, PLD04448, PHO00620, or PHO02634 (deficient in *smb20094*, *smc04448*, *smc00620*, or *smc02634*, respectively) degraded zwitterionic phospholipids similarly to the wild-type and formed DGTS (Fig. 2, lanes 1–3, 5, 6). SMC02634 was recently shown to be a PhoX alkaline phosphatase (19), which is found in many bacteria but is distinct from the well-characterized PhoA family. Mutant PHO01907, deficient in *smc01907*, also degraded zwitterionic phospholipids and formed DGTS (Fig. 2, lane 4); however, the rate of PC degradation in this mutant was slower than in the wild-type. Remarkably, mutant PHO00171, deficient in *smc00171*, did not degrade PC or PE + MMPE (Fig. 2, lane 7) under phosphorus-limiting conditions. The formation of DGTS was much reduced (Fig. 2, lane 7) compared with the wild-type (Fig. 2, lane 1), suggesting that the gene encoded by *smc00171* is required for the degradation of the zwitterionic membrane phospholipids.

SMC00171 Restores Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Degradation in a *smc00171*-Deficient Mutant. A quantitative comparison of the membrane lipid compositions of mutant PHO00171 and wild-type under phosphorus-limiting conditions (Fig. S1 and Table S2) confirms that the reduced amounts of PC and PE + MMPE, as well as the increased amounts of DGTS detected in the wild-type depend on an intact *smc00171* gene. When the gene encoded by *smc00171* and its upstream regulatory region was introduced in a

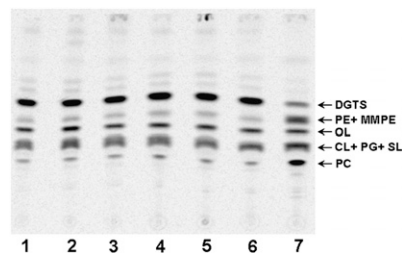


Fig. 2. Mutant deficiency in *smc00171* degrades less zwitterionic phospholipids (PC, PE, and MMPE) and forms less DGTS under phosphorus limitation. Different strains were pulse-labeled on minimal medium and chased at low phosphate concentrations as described in *Materials and Methods*. After 24 h of chase, [^{14}C]-acetate-labeled lipids were extracted and separated by 1D-TLC. Lipids included *S. meliloti* wild type (lane 1), the *smb20094*-deficient knock-out mutant PLD20094 (lane 2), the *smc04448*-deficient knock-out mutant PLD04448 (lane 3), the *smc01907*-deficient knock-out mutant PHO01907 (lane 4), the *smc02634*-deficient knock-out mutant PHO02634 (lane 5), the *smc00620*-deficient knock-out mutant PHO00620 (lane 6), and the *smc00171*-deficient knock-out mutant PHO00171 (lane 7). The lipids PC, PE, MMPE, PG, CL, OL, SL, and DGTS are indicated.

broad host-range vector (pCP00171) into the PHO00171 mutant background, PHO00171 \times pCP00171 again showed reduced amounts of PC and PE + MMPE as well as increased amounts of DGTS. Therefore, in this complemented mutant, the membrane lipid composition is similar to that displayed by wild-type (Figs. S1 and S2 and Table S2). In mutant PHO00171 containing an empty broad host-range plasmid (PHO00171 \times pRK404), the membrane lipid composition remained mutant-like (Figs. S1 and S2 and Table S2).

SMc00171 Is a Phospholipase C. To prove our hypothesis that SMc00171 has phospholipase activity, we developed an enzymatic assay for the SMc00171 activity. Different *Escherichia coli* cell-free extracts were incubated with phosphatidylcholine, and potential products were analyzed. When [14 C]PC was incubated with a cell-free extract of *E. coli* harboring SMc00171-expressing pC00171, the formation of two compounds was observed (Fig. 3A, lane 1), which migrated like the two DAG isomers 1,2-DAG and 1,3-DAG. When [14 C]PC was incubated with a cell-free extract of *E. coli* harboring the empty pET9a plasmid, only a small amount of a DAG-like compound was formed (Fig. 3A, lane 2), whereas incubation with buffer only did not cause degradation of PC (Fig. 3A, lane 3). Mass spectrometry (see *SI Materials and Methods*) of lipid extracts showed that a cell-free extract of *E. coli* that expressed SMc00171 converted the added artificial deuterated substrate 1,2-dipalmitoyl-D62-*sn*-glycero-3-phosphocholine to the corresponding DAG 1,2-dipalmitoyl-D62-*sn*-glycerol (Fig. 3B), whereas such a conversion did not occur in *E. coli* extracts lacking SMc00171. Incubation of [32 P]-labeled PC with a known phospholipase C from *Clostridium perfringens* leads to the formation of phosphocholine and a small amount of Pi (Fig. 3C). Incubation of [32 P]PC with a cell-free extract of *E. coli* expressing SMc00171 led to the formation of several water-soluble products, among them phosphocholine as the major product and some Pi (Fig. 3C). Although incubation with an extract from *E. coli* lacking SMc00171 also caused the formation of several water-soluble products, the main product was Pi; no phosphocholine formation was observed (Fig. 3C). The for-

mation of the products DAG and phosphocholine is linear with time, and extracts of *E. coli* expressing SMc00171 showed a specific activity of phosphocholine formation of 1.36 ± 0.30 pmol/min per mg protein.

Discussion

S. meliloti assembles its membranes mainly with the phospholipids PG, CL, PE, MMPE, and PC when grown in phosphate-rich culture media. On growth of *S. meliloti* under phosphorus-limiting conditions, most of the phospholipids are replaced by membrane lipids that do not contain phosphorus (i.e., OL, SL, and DGTS) (11). Our pulse-chase experiments suggest that PC, PE, and MMPE are remodeled to be the biosynthetic precursors of DGTS. A *btaA*-deficient mutant of *S. meliloti*, unable to perform the first step in DGTS biosynthesis (Fig. 4), is still able to degrade zwitterionic phospholipids under phosphorus limitation, showing that the phospholipid disappearance does not require formation of DGTS. In contrast, phospholipids are not degraded during phosphorus limitation in a *phoB*-deficient mutant, suggesting that the gene required for phospholipid degradation is controlled by the PhoB regulator.

Analysis of different mutants deficient in distinct predicted phospholipases or in PhoB-controlled predicted phosphatases showed that a mutant lacking the predicted phosphatase SMc00171 was unable to degrade PC, PE, or MMPE or synthesize DGTS during phosphate limitation. Complementation of the *smc00171*-deficient mutant with the intact gene *in trans* restored the ability to degrade PC, PE, and MMPE and synthesize DGTS. Therefore, *smc00171* seemed to encode a function that was responsible for the degradation of zwitterionic membrane phospholipids under phosphorus-limiting conditions.

Cell-free extracts of *E. coli* expressing SMc00171 specifically cleave PC into DAG and phosphocholine, whereas vector-control extracts do not. Therefore, SMc00171 seems to be a sinorhizobial phospholipase C that degrades endogenous zwitterionic phospholipids when appropriate, liberating the phosphoalcohol and DAG (Fig. 4). Because no other phospholipase C is known to date from *S. meliloti*, we have renamed this gene *plcP* to highlight its

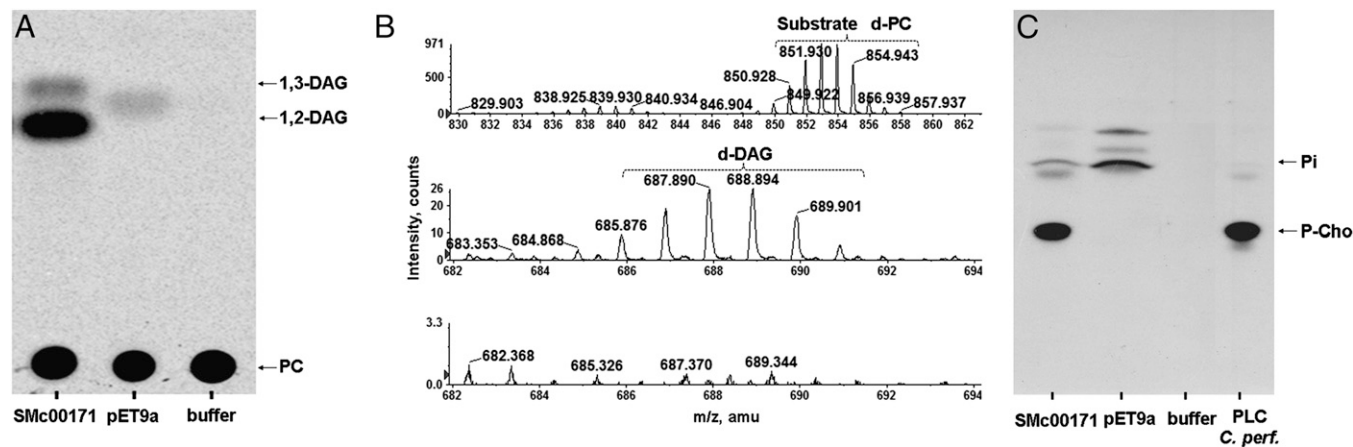


Fig. 3. Cell-free extracts of SMc00171-expressing *E. coli* convert PC to DAG and phosphocholine. Cell-free extracts of *E. coli* BL21 (DE3) \times pLysS \times pC00171 expressing SMc00171 or of BL21 (DE3) \times pLysS containing the empty pET9a vector were incubated with 89.3 nmol [14 C]PC (112 mCi/mmol) for 2 h (A) or with 1,2-dipalmitoyl-D62-*sn*-glycero-3-phosphocholine (d-PC) for 16 h (B). After extraction, radiolabeled lipids were analyzed by TLC using n-hexane:diethyl ether:acetic acid (30:70:1, vol/vol) as a solvent system and detected by autoradiography (A), whereas deuterated lipids were analyzed by mass spectrometry (B). Mass spectrometric analysis (B) of d-PC substrate (Top), lipids formed by incubation with cell-free extracts of *E. coli* BL21 (DE3) \times pLysS \times pC00171 expressing SMc00171 (Middle), and BL21 (DE3) \times pLysS containing the empty pET9a vector (Bottom) are shown. Both d-PC and d-DAG were detected as their acetate adduct [M+Ac] $^{-}$ ions in the negative ion mode. 1,2-DAG, 1,2-diacylglycerol; 1,3-DAG, 1,3-diacylglycerol; d-DAG, 1,2-dipalmitoyl-D62-*sn*-glycerol. Cell-free extracts of SMc00171-expressing *E. coli* convert PC to phosphocholine (C). Cell-free extracts of *E. coli* BL21 (DE3) \times pLysS \times pC00171 expressing SMc00171 (lane 1) and of BL21 (DE3) \times pLysS containing the empty pET9a vector (lane 2), buffer (lane 3), or phospholipase C from *C. perfringens* (lane 4) were incubated with 75 pmol [32 P] PC (100 000 cpm/75 pmol), respectively. After lipid extraction, the aqueous phase was concentrated and separated by TLC using water:ethanol:ammonium hydroxide (91:95:6, vol/vol) as a solvent system. Phosphocholine (P-Cho) and Pi are indicated.

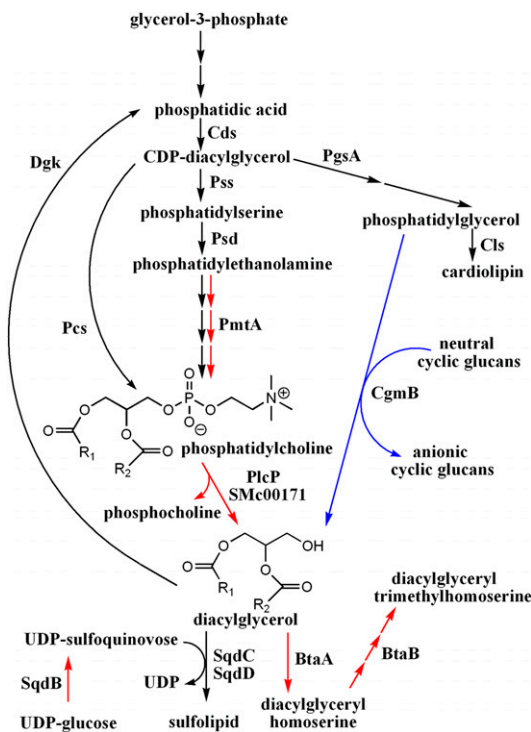


Fig. 4. Membrane lipid formation, turnover, and recycling in *Sinorhizobium meliloti* are shown. The major membrane phospholipids of *S. meliloti*, PE, PC, PG, and CL, are formed by well-known pathways. Under phosphorus-limiting conditions, zwitterionic phospholipids are degraded to DAG, whereas during low osmolarity conditions, phosphoglycerol head groups of PG are transferred to form anionic cyclic glucans and DAG. DAG can be recycled to phosphatidic acid or serve as lipid anchor during the formation of DAG-based phosphorus-free membrane lipids such as sulfolipid or DGTS. Cds, CDP-DAG synthase (SMc02096); Pcs, phosphatidylcholine synthase (SMc00247); Pss, phosphatidylserine synthase (SMc00552); Psd, phosphatidylserine decarboxylase (SMc00551); PmtA, phospholipid *N*-methyltransferase (SMc00414); PgsA, PG-phosphate synthase (SMc00601); Cls, cardiolipin synthase (SMc02076); Dgk, DAG kinase (SMc04213); SqdB, UDP-sulfoquinovose synthase (SMc03961); BtaA, *S*-adenosylmethionine: DAG 3-amino-3-carboxypropyl transferase (SMc01848); BtaB, diacylglycerol homoserine *N*-methyltransferase (SMc01849); CgmB, cyclic glucan-modifying phosphoglycerol transferase (SMc04438); PlcP, phospholipase C (SMc00171). Steps increased under phosphorus limitation (red) or at low osmolarity (blue) are highlighted.

induction during phosphorus starvation. Phospholipases D or C that degrade phospholipids under phosphorus limitation are known from plants (2–5), but none of them show homology to PlcP (SMc00171). Although numerous extracellular bacterial phospholipases C have been reported (20), PlcP (SMc00171) is an example of a bacterial phospholipase C that degrades endogenous phospholipids. PlcP (SMc00171) belongs to the PfamPF00149 protein family of phosphoesterases (21), the members of which hydrolyze a wide variety of protein and nucleotide substrates. The four motifs (DxH, GD, GNHD, and GHxH) of the calcineurin-like phosphoesterase superfamily (22) are present in PlcP (SMc00171) (Fig. S3). PlcP also shows weak similarities to LpxH of *E. coli*, which hydrolyzes uridine diphosphate-2,3-diacylglucosamine to uridine monophosphate and lipid X and is required for lipid A biosynthesis. It was noticed previously that at least two LpxH subfamilies exist in many β - and γ -proteobacteria, LpxH1 and LpxH2 (23). *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia solanacearum* have good homologs for both. Whereas LpxH1 from *P. aeruginosa* can complement a *lpxH*-deficient mutant of *E. coli*, LpxH2 cannot do so (23). LpxH2 from *P. aeruginosa* is a close homolog of PlcP (SMc00171) from *S. meliloti* (Fig. S4). We, therefore, suggest that

LpxH2 homologs are, in fact, phospholipases C that degrade the bacteria's own phospholipids under phosphorus-limiting conditions. Good homologs of sinorhizobial PlcP are also encountered in most α -proteobacteria but are notably absent in *Bartonella*, *Brucella*, and the Rickettsiales, which are human or animal pathogens that are usually not confronted with low phosphorus conditions.

PlcP is regulated by PhoB (13, 14), and on phosphorus limitation, the *plcP* (*smc00171*) transcript is increased about 20-fold (13). The genes encoding for PlcP/SMc00171/LpxH2 homologs from *Agrobacterium tumefaciens* (Atu1649), *Bradyrhizobium japonicum* (BLL5904), *Caulobacter crescentus* (CC_3344), *Mesorhizobium loti* (MLL0806), and *Pseudomonas putida* (PP4510) (14), as well as *P. aeruginosa* (PA3219), all contain predicted PhoB binding sites in their upstream regions (Fig. S4 and Table S3), suggesting that they also might be induced under phosphorus-limiting conditions. In *Rhodospseudomonas palustris*, *plcP* (RPE_1465) seems to be the second gene in a PhoB-regulated operon in which phospholipid *N*-methyltransferase (RPE_1464) is encoded by the first gene and a putative glycosyltransferase (RPE_1466) is encoded by the third gene. This sequence in genes might reflect the biochemical events occurring in *R. palustris* on phosphorus limitation, which is initiated by an increased de novo biosynthesis of PC, continues with its degradation to DAG, and ends with the conversion of the latter into a phosphorus-free glycolipid. Remarkably, also *pmtA* (*smc00414*) (24) of *S. meliloti* is induced about fourfold (13) under phosphorus-limiting conditions. Similarly, genes encoding for enzymes of the initial steps of SL and DGTS biosynthesis (Fig. 4), SqdB (SMc03961) and BtaA (SMc01848), respectively, are preceded by a Pho box that mediates PhoB-controlled expression under phosphorus limitation (13).

Phosphorus limitation is encountered by many organisms in different environments. For example, many soils and lakes have limited phosphorus (1), and plants as well as microbes have to cope with phosphorus-limitation stress. Although phosphorus scarcity in the Sargasso Sea provokes phytoplankton of the ocean to use nonphosphorus lipids in response, a similar response has not been observed with marine heterotrophic *Pelagibacter* bacteria of that location (25). However, in other natural phosphorus-poor environments, such as the Cuatro Ciénegas Basin in Mexico, *Bacillus coahuilensis* is a major endemic species of the location and replaces most of its phospholipids by phosphorus-free sulfolipids (26). PlcP (SMc00171) from *S. meliloti* degrades zwitterionic phospholipids of its own membrane to DAG and phosphoalcohol (Fig. 4). Liberation of Pi from phosphoalcohols, such as phosphocholine (27), is a well-known process. The sinorhizobial phospholipid membrane, therefore, constitutes a phosphorus reservoir from which Pi can be mobilized under phosphorus-limiting conditions, and the liberated Pi can be used for the synthesis of essential phosphorus-containing biomolecules such as nucleic acids. We suggest that the mechanism of using endogenous membrane phospholipids as a phosphorus pool is widespread among Gram-negative environmental bacteria. Polyphosphate is another major reserve for phosphorus and energy in all living organisms (28). The relative importance of these two phosphorus pools in *S. meliloti* is not clear and needs further investigation.

The fact that DAG kinase-deficient mutants of *E. coli* show reduced growth when DAG accumulates to >10% of the total lipid (29) has led to the idea that larger amounts of DAG might inhibit bacterial growth by causing bilayer instability. In eukaryotes, DAG functions as an important phospholipase C-generated second messenger that modulates several proteins, among them members of the protein kinase C family (30). However, little is known about potential functions of DAG in bacteria, although several DAG-generating cycles are known. During adaptation to hypoosmotic conditions, *S. meliloti* synthesizes periplasmic cyclic β -1,2-glucans, which can be substituted with *sn*-1-phosphoglycerol moieties derived from PG (31). The phosphoglycerol transferase CgmB

(SMC04438) of *S. meliloti* (32) is thought to catalyze a reaction similar to the *sn*-1-phosphoglycerol transferase MdoB from *E. coli*, and produce DAG as a byproduct. Given the multiple sources of DAG in bacteria, including the SMC00171-encoded phospholipase C PlcP reported herein, it will be of great interest to determine whether or not DAG or DAG-derived molecules function as stress signals in bacteria.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions. The bacterial strains and plasmids used and their relevant characteristics are shown in Table S4. The construction of sinorhizobial mutants deficient in putative phospholipases or phosphatases is described in Table S5. *S. meliloti* strains were grown either in complex tryptone/yeast extract (TY) medium that contained 4.5 mM CaCl₂ (33) or in minimal medium (34) with succinate (8.3 mM) replacing mannitol as the carbon source at 30°C on a gyratory shaker. For determination of growth rates, strains were first grown on TY plates. Then, cells were resuspended at cell densities of 9×10^7 cells/mL in minimal medium and grown for 20 h during such a first growth cycle. During a second subcultivation in minimal medium, again inoculating with 9×10^7 cells/mL, growth rates of *S. meliloti* wild type and SMC00171-deficient mutant PHO00171 were determined. No differences in growth rates or final optical densities were observed between *S. meliloti* wild type and mutant PHO00171 when cultivated in minimal medium under high (1.3 mM) or low (0.02 mM) concentrations of Pi.

E. coli strains were cultured on Luria-Bertani (LB) medium (35) at 37°C or 30°C when the SMC00171 protein was expressed. Antibiotics were added to media in the following concentrations when required: in the case of *S. meliloti*, spectinomycin = 300 µg/mL, gentamicin = 70 µg/mL, nalidixic acid = 40 µg/mL, tetracycline = 10 µg/mL, neomycin = 50 µg/mL, and chloramphenicol = 60 µg/mL, and in the case of *E. coli*, spectinomycin = 200 µg/mL, carbenicillin = 100 µg/mL, tetracycline = 20 µg/mL, gentamicin = 70 µg/mL, kanamycin = 50 µg/mL, and chloramphenicol = 20 µg/mL. Plasmids were mobilized into *S. meliloti* strains by diparental mating.

In Vivo Labeling of Bacterial Strains with [¹⁴C]acetate. The lipid composition of *S. meliloti* strains was determined as described previously (12). In pulse-chase experiments, 1-mL cultures of *S. meliloti* with an initial cell density of 2×10^8 cells/mL were labeled during a 24-h period of pulse with 10 µCi [¹⁴C]acetate (60 mCi/mmol) in minimal medium containing high (1.3 mM) concentrations of Pi. After this pulse period, cultures were split in equal volumes, and the respective 0.5-mL cell suspensions were washed two times with 1-mL portions of minimal medium containing either high (1.3 mM) or low (0.02 mM) concentrations of Pi before being resuspended in 10 mL of the respective fresh me-

diu. During the chase period, 1-mL aliquots were taken from the cultures at different time points, and the radioactivity of individual membrane lipids was quantified after separation by two-dimensional thin-layer chromatography.

Preparation of Cell-Free Extracts for Analysis of the SMC00171 Phospholipase.

Cultures (0.5 L) of exponentially growing *E. coli* BL21(DE3) pLysS, also harboring pET9a or pC00171, were induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside at a density of 4×10^8 cells/mL and incubated for another 3 h at 30°C. After harvesting cells by low speed centrifugation at 4°C, each cell pellet was resuspended in 5 mL of 50 mM Tris/HCl buffer with a pH of 8.0. Cell suspensions were passed three times through a cold French pressure cell at 20,000 lb/in². Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at $4,000 \times g$ for 10 min at 4°C to obtain cell-free extracts as supernatants. Protein concentrations were determined by the method of Dullea and Grieve (36).

Phospholipase Assays. To determine the activity of phospholipase SMC00171 in various extracts, assays were generally performed at 30°C. The standard reaction mixture contained 50 mM diethanolamine/HCl, (pH 9.8), 40 mM NaCl, 3 mM MnCl₂, 0.02% Triton X-100, PC (10 nCi 1,2-di[¹⁴C]palmitoyl-L-3-PC with a specific radioactivity of 112 mCi/mmol [Amersham], 1,2-dipalmitoyl-D62-*sn*-glycero-3-phosphocholine [Avanti Polar Lipids], or [³²P]-labeled PC; see *SI Materials and Methods*), and 100 µg of protein in a final volume of 100 µL. After a certain time, the reaction was stopped by the addition of 250 µL of methanol and 125 µL of chloroform, and the lipid fraction was extracted as described previously (37). For analysis of the DAG formed, the lipid-containing chloroform phase was separated with *n*-hexane:diethyl ether:glacial acetic acid (30:70:1, vol/vol) by thin-layer chromatography (TLC). Analysis of the aqueous phase by TLC after extraction according to Bligh and Dyer (37) was performed using water:ethanol:ammonium hydroxide (91:95:6, vol/vol) as a mobile system. For phospholipase C from *Clostridium perfringens* (Sigma), the described assay (38) was modified using 10 mM CaCl₂. Standard *sn*-1,2-diolein, *sn*-1,3-diolein and phosphocholine (phosphorylcholine) were obtained from Sigma.

ACKNOWLEDGMENTS. M.Z.-P. was supported during the Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) and the Dirección General de Estudios de Posgrado (Universidad Nacional Autónoma de México). This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico/UNAM (200806), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT 42578/A-1 and 82614), and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI 55003675). This research was also supported by the National Institutes of Health Grant GM-51310 (to C.R.H.R.) and by the LIPID MAPS Large Scale Collaborative Grant GM-069338.

- Bielecki RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24:225–252.
- Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E, Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase D22 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6765–6770.
- Li M, Welti R, Wang X (2006) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D 1 and D 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol* 142:750–761.
- Nakamura Y, et al. (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280:7469–7476.
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible WR, Ohta H, Dörmann P (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant J* 56:28–39.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H, Baddiley J (1972) Variation of polar lipid composition of *Bacillus subtilis* (Marburg) with different growth conditions. *FEBS Lett* 27:16–18.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H, Baddiley J (1974) Replacement of acidic phosphates by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature* 249:268–269.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H (1974) The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett* 43:257–260.
- Benning C, Huang ZH, Gage DA (1995) Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodospirillum rubrum* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* 317:103–111.
- Sohlenkamp C, López-Lara IM, Geiger O (2003) Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* 42:115–162.
- Geiger O, Röhrs V, Weissenmayer B, Finan TM, Thomas-Oates JE (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Mol Microbiol* 32:63–73.
- López-Lara IM, et al. (2005) Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant Microbe Interact* 18:973–982.
- Krol E, Becker A (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics* 272:1–17.
- Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, Finan TM (2006) Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 34:2686–2697.
- Klug RM, Benning C (2001) Two enzymes of diacylglycerol-O-4'-(*N,N,N*-trimethyl) homoserine biosynthesis are encoded by *btaA* and *btaB* in the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5910–5915.
- Riekhof WR, Andre C, Benning C (2005) Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 441:96–105.
- Weissenmayer B, Geiger O, Benning C (2000) Disruption of a gene essential for sulfoquinovosyldiacylglycerol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* has no detectable effect on root nodule symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 13:666–672.
- Benning C (2007) Questions remaining in sulfolipid biosynthesis: A historical perspective. *Photosynth Res* 92:199–203.
- Zaheer R, Morton R, Proudfoot M, Yakunin A, Finan TM (2009) Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria. *Environ Microbiol* 11:1572–1587.
- Barker AP, et al. (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 53:1089–1098.
- Bateman A, et al. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 30:276–280.
- Aravind L, Koonin EV (1998) Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res* 26:3746–3752.
- Babinski KJ, Kanjilal SJ, Raetz CRH (2002) Accumulation of the lipid A precursor UDP-2,3-diacylglycosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the *lpxH* gene. *J Biol Chem* 277:25947–25956.

24. de Rudder KE, López-Lara IM, Geiger O (2000) Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: Phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol Microbiol* 37:763–772.
25. Van Mooy BA, et al. (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458:69–72.
26. Souza V, Eguiarte LE, Siefert J, Elser JJ (2008) Microbial endemism: Does phosphorus limitation enhance speciation? *Nat Rev Microbiol* 6:559–564.
27. Massimelli MJ, et al. (2005) Identification, cloning, and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene. *Curr Microbiol* 50:251–256.
28. Brown MRW, Kornberg A (2008) The long and short of it—polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem Sci* 33:284–290.
29. Raetz CRH, Newman KF (1979) Diglyceride kinase mutants of *Escherichia coli*: Inner membrane association of 1,2-diglyceride and its relation to synthesis of membrane-derived oligosaccharides. *J Bacteriol* 137:860–868.
30. Carrasco S, Mérida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* 32:27–36.
31. Miller KJ, Gore RS, Benesi AJ (1988) Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J Bacteriol* 170:4569–4575.
32. Wang P, Ingram-Smith C, Hadley JA, Miller KJ (1999) Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. *J Bacteriol* 181:4576–4583.
33. Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84:188–198.
34. Sherwood MT (1970) Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* 33:708–713.
35. Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY).
36. Dullely JR, Grieve PA (1975) A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* 64:136–141.
37. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
38. Stonehouse MJ, et al. (2002) A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* 46:661–676.

Supporting Information

Zavaleta-Pastor et al. 10.1073/pnas.0912930107

SI Materials and Methods

DNA Manipulations. Recombinant DNA techniques were performed according to standard protocols (1). Commercial sequencing of amplified genes by Eurofins Medigenomix corroborated the correct DNA sequence. The DNA region containing *smc00171* was analyzed using the National Center for Biotechnology Information BLAST network server (2).

Cloning of the *smc00171* Gene. Using PCR and specific oligonucleotides (AGCTCATATGGCGGCGGCATCGGCACCCACAG and ACGTGGATCCTCAGGCGGCCTGCGGTGCGAACC), the gene suspected of coding for the phospholipase SMC00171 from *S. meliloti* was amplified from genomic DNA. Suitable restriction sites (underlined) for cloning of the gene were introduced by PCR with the oligonucleotides. After restriction with *Nde*I and *Bam*HI, the PCR-amplified DNA fragment was cloned into a pET9a vector (3) to obtain the expression plasmid pC00171 for use in *E. coli*. For complementation experiments in *S. meliloti*, the gene *smc00171* including one kilobase upstream was cloned. Using PCR and specific oligonucleotides (ACGTGGATCCCACCTCGTCCATCAGGGCCTCGCG and ACGTGGATCCTCAGGCGGCCTGCGGTGCGAACC), *smc00171* including one kilobase upstream was amplified from genomic DNA. Suitable restriction sites (underlined) for cloning of the gene were introduced by PCR with the oligonucleotides. After restriction with *Bam*HI, the PCR-amplified DNA fragment was cloned into a pUC19 vector to obtain the plasmid pUC00171. From pUC00171, the *smc00171*-containing *Bam*HI fragment was cloned into the broad host-range plasmid pRK404 to obtain pCP00171 for use in *S. meliloti*.

Preparation of [³²P]-Labeled Phosphatidylcholine. To obtain efficient labeling of phospholipids, *S. meliloti* 1021 was grown in minimal medium that contained reduced but not growth-limiting concentrations (0.2 mM) of Pi. To a 1-mL culture of *S. meliloti* 1021, 60 μCi [³²P] orthophosphate (specific radioactivity of 285.5 Ci/mg) was added at a cell density of 2×10^8 cells/mL and labeling was performed for 20 h. Extracted lipids were separated by 1D-TLC, and [³²P]-labeled PC (specific radioactivity of 300 mCi/mmol) was isolated as described previously (4).

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry (LC-ESI/MS) was performed using a Shimadzu LC system, which was comprised of a solvent degasser, two LC-10A pumps, and an SCL-10A system controller that were coupled with a QSTAR XL quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with an ESI source. Reverse-phase LC was performed at a flow rate of 200 μL/min with a linear gradient as follows: 100% mobile phase A was held isocratically for 2 min, then linearly increased to 100% mobile phase B over 14 min, and held at 100% B for 4 min. Mobile phase A consisted of methanol/ acetonitrile/aqueous 1 mM ammonium acetate (60:20:20, vol/vol). Mobile phase B consisted of 100% ethanol containing 1 mM ammonium acetate. A Zorbax SB-C8 reversed-phase column (5 μm; 2.1 × 50 mm) was obtained from Agilent. The postcolumn splitter introduced 10% of the LC flow into the ESI source of the mass spectrometer.

1. Sambrook J, MacCallum P, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), 3rd Ed.
2. Altschul SF, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
3. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60–89.
4. Geiger O, Röhrs V, Weissenmayer B, Finan TM, Thomas-Oates JE (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.
5. Aravind L, Koonin EV (1998) Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res* 26:3746–3752.
6. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
7. Zaheer R, Morton R, Proudfoot M, Yakunin A, Finan TM (2009) Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria. *Environ Microbiol* 11:1572–1587.
8. López-Lara IM, et al. (2005) Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant Microbe Interact* 18:973–982.
9. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580.
10. 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.
11. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119.
12. Ditta G, et al. (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149–153.
13. Schäfer A, et al. (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.
14. Schweizer HD (1993) Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechniques* 15:831–834.
15. Osterås M, Boncompagni E, Vincent N, Poggi MC, 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 USA* 95:11394–11399.
16. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16:800–802.
17. Sohlenkamp C, de Rudder KE, Geiger O (2004) Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *J Bacteriol* 186:1667–1677.

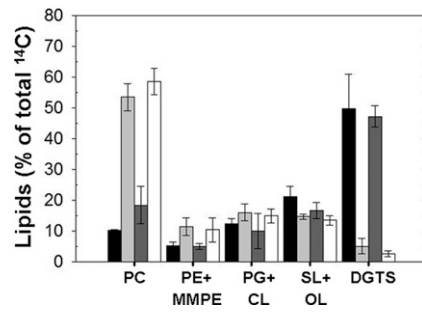


Fig. S1. The *smc00171* gene is required for phospholipid degradation under phosphorus-limiting conditions of growth. Different strains were pulse-labeled and chased at low phosphate concentrations as described in [Materials and Methods](#). After 24 h of chase, [¹⁴C]acetate-labeled lipids were extracted, separated by 2D-TLC, and quantified. The percentage of lipids PC, PE + MMPE, PG + CL, SL + OL, and DGTS are given for *S. meliloti* 1021 wild type (black bars), the *smc00171*-deficient knock-out mutant PHO00171 (light gray bars), mutant PHO00171 complemented with the *smc00171*-expressing pCP00171 plasmid (dark gray bars), and mutant PHO00171 containing the empty broad host-range vector pRK404 (white bars). The data represent mean values \pm SD of three independent experiments.

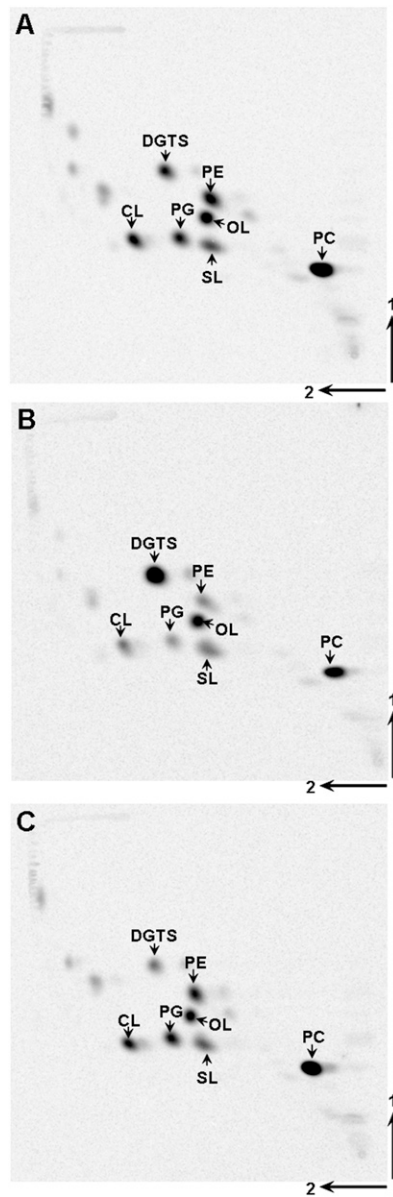


Fig. S2. Separation of [^{14}C]acetate-labeled lipids from the *S. meliloti smc00171*-deficient mutant PHO00171 (A), PHO00171 complemented with *smc00171*-expressing pCP00171 (B), and PHO00171 harboring the empty pRK404 vector (C) by 2D-TLC after pulse-chase experiments are shown. The lipids PC, PE, OL, SL, PG, CL, and DGTS are indicated.

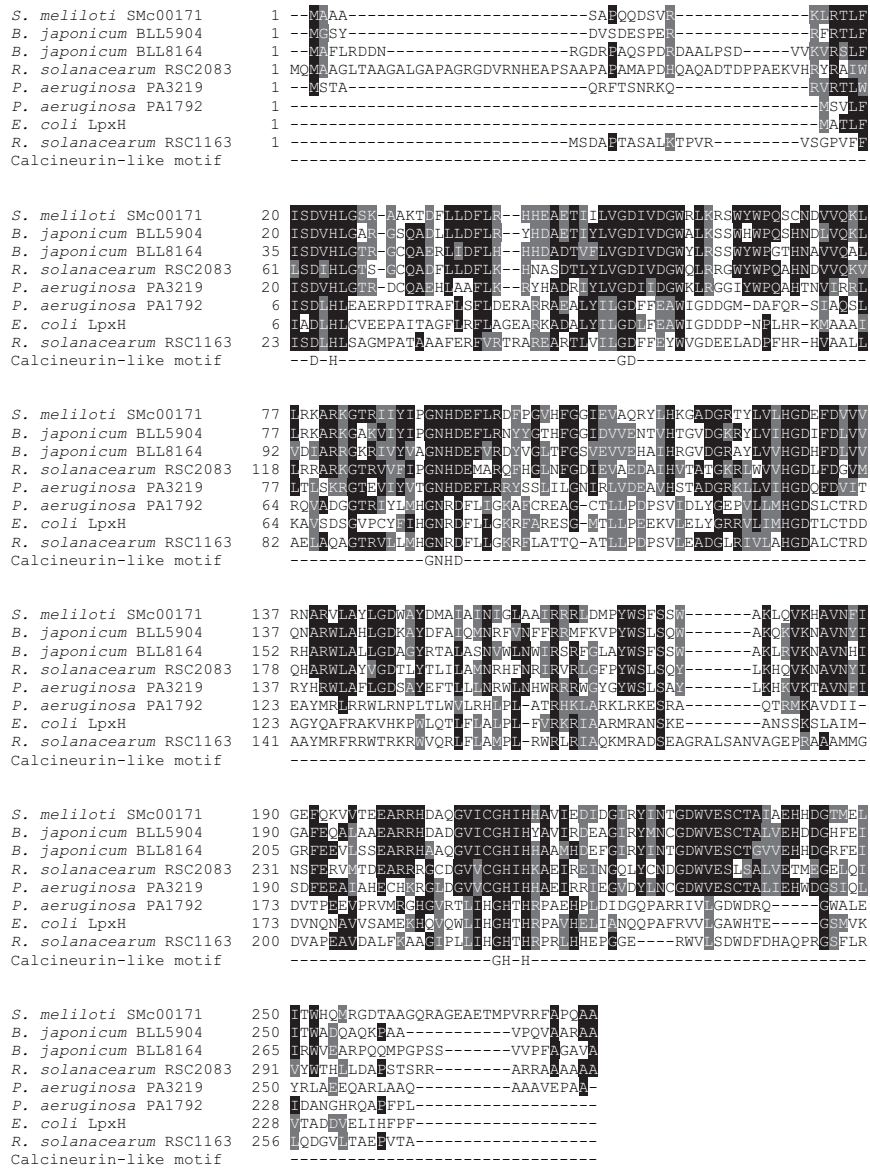


Fig. S3. Comparison of an SMc00171-derived amino acid sequence with sequences of proteins derived from SMc00171-like ORFs from different bacterial representatives is shown. The *S. meliloti* SMc00171 sequence was aligned with the sequences of two ORFs from *Bradyrhizobium japonicum* (BLL5904 and BLL8164), two ORFs from *Ralstonia solanacearum* (RSC2083 and RSC1163), LpxH1 and LpxH2 from *Pseudomonas aeruginosa* (PA1792 and PA3219), and LpxH from *E. coli*. Residues identical to SMc00171 (PlcP) are underlined in black and residues similar are shaded in gray. Residues thought to be characteristic for a calcineurin-like motif (5) are indicated by the correspondent letter at the bottom. All amino acid sequences were aligned using the program CLUSTAL W (6).

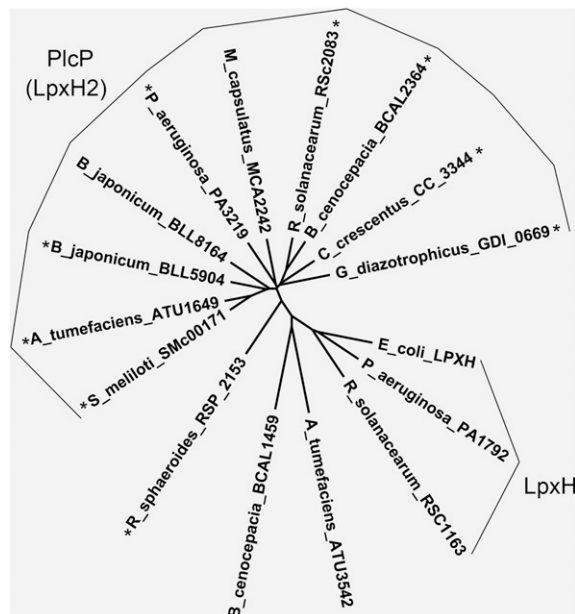


Fig. S4. Unrooted phylogenetic tree of SMC00171 (PlcP) and SMC00171-like ORFs is shown. The tree was constructed using the program CLUSTAL W (<http://www.expasy.ch/>) and visualized with FigTree version 1.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Accession numbers are as follows: *E. coli* LpxH (AP_001171), *S. meliloti* 1021 SMC00171 (NP_385942), *Bradyrhizobium japonicum* BLL5904 (NP_772544), *Bradyrhizobium japonicum* BLL8164 (NC_774804), *Pseudomonas aeruginosa* PA3219 (NP_251909), *Pseudomonas aeruginosa* PA1792 (NP_250483), *Ralstonia solanacearum* RSc1163 (NP_519284), *Ralstonia solanacearum* RSc2083 (NP_520204), *Agrobacterium tumefaciens* Atu1649 (NP_354640), *Agrobacterium tumefaciens* Atu3542 (NP_357071), *Caulobacter crescentus* CC_3344 (NP_422138), *Burkholderia cenocepacia* BCAL1459 (YP_002230590), *Burkholderia cenocepacia* BCAL2364 (YP_002231488), *Gluconobacter diazotrophicus* GDI_0669 (YP_001600952), *Methylobacterium capsulatus* MCA2242 (YP_114660), and *Rhodobacter sphaeroides* RSP_2153 (YP_352207). Asterisks indicate that a PhoB-binding region is predicted upstream of the encoding gene (see Table S3 for details), suggesting that transcription of that gene is induced under phosphorus-limiting conditions.

Table S1. Membrane lipid composition in *S. meliloti* wild type at different time points of chase under low phosphate conditions (see Fig. 1)

Lipid	Composition (percentage of total ^{14}C) at hours of chase							
	0	6	12	18	24	30	36	48
PG	7.8 ± 0.4	5.5 ± 0.3	4.3 ± 0.8	5.0 ± 1.4	4.2 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.0 ± 0.1	5.1 ± 0.3
CL	3.1 ± 0.1	2.3 ± 1.6	2.2 ± 0.0	3.3 ± 0.4	2.9 ± 0.4	3.2 ± 1.2	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
PE + MMPE	25.3 ± 3.0	20.0 ± 1.5	5.5 ± 0.2	4.8 ± 1.0	3.7 ± 1.8	3.2 ± 1.2	3.2 ± 0.5	3.1 ± 0.6
PC	59.8 ± 1.7	57.0 ± 5.7	28.0 ± 5.7	22.1 ± 0.1	21.0 ± 2.2	16.6 ± 1.0	16.2 ± 1.3	12.1 ± 1.8
SL	2.0 ± 0.4	2.4 ± 0.1	2.8 ± 1.7	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.5	2.6 ± 0.7	2.7 ± 0.1	5.6 ± 0.5
OL	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.4	3.1 ± 0.1	6.7 ± 0.2	8.2 ± 0.7	8.2 ± 0.1
DGTS	n.d.	4.6 ± 2.0	43.0 ± 8.3	60.0 ± 0.1	63.0 ± 0.6	63.0 ± 1.0	63.0 ± 3.1	63.0 ± 3.0

The values shown are mean values ± SD derived from three independent experiments. n.d., not detected.

Table S2. Membrane lipid composition in different *S. meliloti* strains

Lipid	Composition (percentage of total ^{14}C)			
	Wild type	PHO00171	PHO00171 × pCP00171	PHO00171 × pRK404
PG	7.4 ± 0.3	8.6 ± 2.1	4.8 ± 3.9	7.6 ± 1.3
CL	5.1 ± 1.2	7.4 ± 0.6	5.2 ± 1.8	7.4 ± 1.0
PE + MMPE	5.3 ± 1.0	11.5 ± 2.9	5.0 ± 0.9	10.4 ± 3.9
PC	10.2 ± 0.4	53.5 ± 4.4	18.4 ± 6.1	58.5 ± 4.3
SL	5.6 ± 0.5	4.4 ± 0.4	5.0 ± 1.8	4.6 ± 0.5
OL	15.6 ± 2.8	10.3 ± 0.4	11.6 ± 0.7	8.9 ± 1.2
DGTS	49.7 ± 11.2	5.2 ± 2.5	47.2 ± 3.4	2.6 ± 1.0

Membrane lipid composition of *S. meliloti* wild type, phospholipase-deficient mutant (PHO00171), PHO00171 mutant complemented with the *smc00171* gene (PHO00171 × pCP00171), and PHO00171 mutant containing an empty broad host-range vector (PHO00171 × pRK404) after growth on low (0.02 mM) phosphate-containing minimal medium. The values shown are mean values ± SD derived from three independent experiments.

Table S3. Homologs of PlcP/LpxH2/SMc00171 are transcribed from genes that have predicted PhoB-binding sequences (Pho box motifs) in their upstream regions

Genome	Gene product	Distance from ATG	Weight score	Pho box sequence
α-proteobacteria				
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SMc00171	-50	6.4	atgtcatcttctgaaacacga
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	Smed_1557	-48	6.5	gtgtcatcttctgaaacacga
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	blI5904	-21	6.7	cggatcatccccctgtcacggga
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	RL2664	-61	7.0	ttgtcatcttctgaaacacga
		-72	5.9	atttccccagctgtcatcttc
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	RHE_CH02352	-58	6.2	ttgtcatcttctgaaacacga
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Atu1649	-60	6.6	ctgtcatgttctgaaacacga
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	Oant_2104	-50	7.6	ccgtcatatgtctgtgacatga
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	MII0806	-74	6.3	ccgtcatcacggtgtgtcatga
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	RPE_1465*	-51	5.9	ctgtctgtgacctgctgactg
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	CC_3344	-113	7.6	gcttcatcaaaagcgacatgcaa
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	Nham_1311	-35	7.4	ctgtcatcgctgtcacgacg
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	GDI_0669	-58	5.9	atttcacgaaagatacataaaa
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_2153	-47	6.4	atgtcataggcggtgacggcg
		-58	6.6	gtgtcctcgccatgtcataggg
		-71	6.5	cggtcacaaaaccgtgtcctcg
		-82	7.6	ctgagaggcggtgacacaaaa
β-proteobacteria				
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Rsc2083	-161	7.1	gcgtcatgtgacggtcatgttt
		-128	6.3	cgttcacacagtggtggcgaaa
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	BP2376	-44	6.9	gcgtcacacacccgtcacggtt
		-55	6.3	cggggacataagcgtcacacag
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	BCAL2364	-43	5.8	ctgtcacggtcacagtcacgccc
		-54	5.8	acgtctctgtgactgtcacggca
<i>Methylobium petroleiphilum</i> PM1	Mpe_A3012	-43	6.9	cggtcatcgaacgtcatgctgc
γ-proteobacteria				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	PA3219	-40	7.5	ctgtcacagtcgtttaccggc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	PFL_1585	-59	6.1	ctgtcatcgactgcccattt
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	PP4510	-39	5.8	ttgcatggcgctgtcatgtgt
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	HCH_02241	-148	6.0	tggtcaccttagcgtcatatag

The Pho boxes are predicted based on the described matrix (7).

*Genes for RPE_1464 (PmtA), RPE_1465 (PlcP), and RPE_1466 (putative glycosyltransferase) form an operon, and in this case, the given distance of the predicted PhoB-binding sequence from ATG is that of the first gene (*pmtA*).

Table S5. Construction of different phospholipase/phosphatase knock-out mutants

<i>S. meliloti</i> -deficient mutant	Mutant characteristics and oligonucleotide primers used for construction	Restriction site	PCR product (kb)
PLD20094	<i>smb20094</i> replaced by gentamicin cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTGAATTC <u>CAAGCCGTCAGAACGGCGTCTCC</u> ACGTGGATCCATAGATCGCCGAAAGGCGATCAGAGC Primer pair for upstream downstream region: ACGTGGATCCGAGGACGAGATTAGAAGGTTCCGAG ACGTAAAGCTTCGACCTGTCTGCCCTGCGT	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>HindIII</i>	1.1 1.0
PLD04448	<i>smc04448</i> replaced by spectinomycin cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTGAATTCGCGGCAGCAAGCAGGGAGCGCATG ACGTGGATCCATAGATCGCCGAAAGGCGATCAGAGC Primer pair for upstream downstream region: ACGTGGATCCGCTTCTGCCGTTGGAGTCAC ACGTCTGCAGTACTCACCGTCCGGGCGGAGG	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>PstI</i>	1.0 1.1
PHO01907	<i>smc01907</i> replaced by spectinomycin cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTGAATTCACAGGCAGTGCAGATAGG ACGTGGATCCGTCGATGACAGCGAGG Primer pair for downstream downstream region: ACGTGGATCCGAAGCGAAGCTCAGAGCG ACGTCTAGAGCTTGAATGCGAGCAGCATCG	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>XbaI</i>	0.67 0.75
PHO02634	<i>smc02634</i> replaced by spectinomycin cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTGAATTCAGCGGTGTCAGGAGCGACGC ACGTGGATCCGAGACGATCGATCGCCCGT Primer pair for downstream downstream region: ACGTGGATCCAGCCAGACCAGGTCATTGAGC ACGTCTAGACGAGCCGCTGCAATTGCGCG	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>XbaI</i>	1.0 0.7
PHO00620	<i>smc00620</i> replaced by chloramphenicol cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTCCCGGGCCTCGCCGTCTACTTC ACGTGGATCCTCGTCATAACTTCACCTCGG Primer pair for downstream downstream region: ACGTGGATCCAAGTGGACGTGAGGTTGGG ACGTCTAGACGGACGACGTTCAAGCCGTG	<i>SmaI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>XbaI</i>	0.9 1.0
PHO00171	<i>smc00171</i> replaced by gentamicin cassette primer pair for upstream upstream region: ACGTCCCGGGCGAATAGGCGAGCGCCAGGTC ACGTGGATCCGCCAGCCTCATCTCGGTTTAG From the PCR fragment, 0.30 kb were cloned using <i>BamHI</i> and an <i>EcoRI</i> site within the fragment Primer pair for downstream downstream region: ACGTGGATCCCGGCTATCGTTCCGGTGGACAAG ACGTCTAGAGCGAGGGAACATCAGCACTTC	<i>SmaI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>BamHI</i> <i>XbaI</i>	0.35 1.0

For inactivation of a predicted phospholipase/phosphatase-encoding gene, the upstream and downstream regions were PCR-amplified (XL-PCR kit; Applied Biosystems) with a specific pair of oligonucleotide primers from genomic DNA of *S. meliloti*, introducing restriction sites (underlined). After subsequent cloning of upstream and downstream regions into pUC18, an appropriate resistance-conferring cassette was cloned between upstream and downstream regions. Either a gentamicin resistance-conferring cassette was obtained as a *BamHI* fragment from pACΩ-Gm (14), or a spectinomycin resistance-conferring cassette was obtained as a *BamHI* fragment from pHY109 (15) or a chloramphenicol resistance-conferring cassette, which had been amplified from pBBR1MCS (16) introducing *BamHI* sites, was obtained as a *BamHI* fragment. The regions usually flanking the sinorhizobial gene and the appropriate resistance-conferring cassette located in between those regions was cloned into the suicide vector pK18*mobsacB* (13), the construct was introduced into wild-type *S. meliloti* 1021, and double recombinants in which the appropriate resistance-conferring cassette had replaced the sinorhizobial gene were obtained following a procedure described previously (17). Mutations in which the original sinorhizobial gene was replaced by a resistance-conferring cassette were confirmed by Southern hybridization.

b) Resultados adicionales

• La degradación de fosfolípidos de *S. meliloti* bajo limitación de fósforo depende de PhoB, pero no de BtaA.

La bacteria *S. meliloti* reemplaza sus principales fosfolípidos de membrana como PC y PE por lípidos que no contienen fósforo como OL, SL y DGTS (Figura 9a; Geiger *et al.*, 1999). Se sabe que los productos de los genes *btaAB* participan en la biosíntesis de DGTS (Riekhof *et al.*, 2005; López-Lara *et al.*, 2005). Con el propósito de esclarecer si la formación de DGTS era necesaria para que se llevara a cabo la degradación de fosfolípidos, realizamos experimentos de pulso y caza con la mutante DGTS1 deficiente de *btaA* (López-Lara *et al.*, 2005). En condiciones limitantes de P, la mutante DGTS1 degrada los fosfolípidos PC, PE y MMPE (Figura 9b), lo cual sugiere que la biosíntesis de DGTS no es un requisito para el proceso de degradación de fosfolípidos. Analizamos si la degradación de fosfolípidos en limitación de P era dependiente de la regulación por PhoB. La mutante H838, deficiente de *phoB* (Geiger *et al.*, 1999), no degrada sus fosfolípidos PC, PE y MMPE en limitación de P (Figura 9c), lo cual sugiere que los genes estructurales involucrados en la degradación de fosfolípidos requiere la activación mediante PhoB.

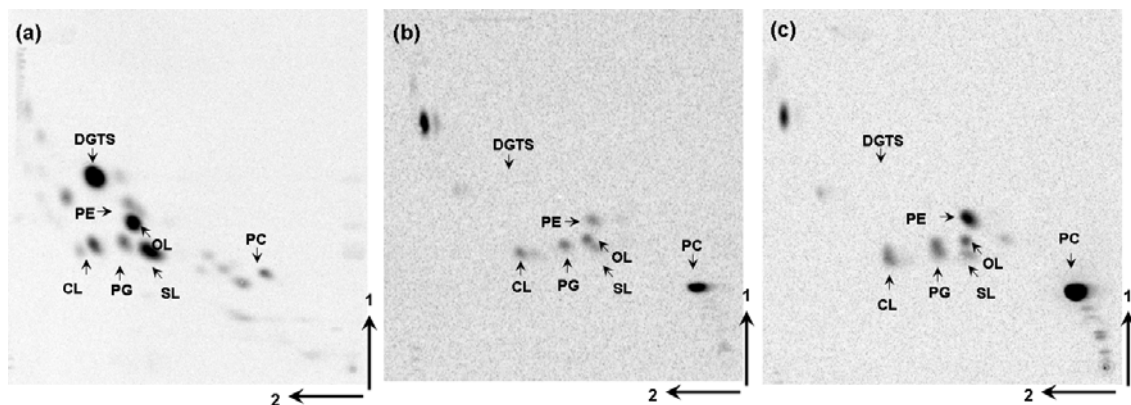


Figura 9. Perfil de lípidos de membrana de cepas de *S. meliloti* en limitación de P. Las células fueron marcadas con [^{14}C]acetato como se indica en los experimentos de limitación de P. Los lípidos fueron extraídos por el método de Bligh y Dyer y separados por una TLC de dos dimensiones. (a) Cepa silvestre 1021, (b) mutante DGTS1 deficiente de *btaA* y (c) mutante H838 deficiente de *phoB*.

• Estandarización de la actividad fosfolipasa C de SMc00171.

Inicialmente, la actividad enzimática de SMc00171 se determinó por su capacidad para convertir el sustrato cromógeno Bis (p-nitrofenil) fosfato (Bis-pNPP) en p-nitrofenol. Un extracto de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que lleva el vector vacío pET9a no es capaz de convertir Bis-pNPP a p-nitrofenol (datos no mostrados). En contraste, extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que sobreprodujeron SMc00171 forman p-nitrofenol (Figura 10). Sorprendentemente, la formación de p-nitrofenol no es proporcional al contenido protéico del extracto crudo utilizado. La actividad hidrolítica de SMc00171 se ve incrementada al adicionar el detergente Tritón X-100 en concentraciones de 2 mM a 20 mM o al adicionar extractos crudos libres de células que llevan pET9a (datos no mostrados). Esos datos sugieren que, además de SMc00171, los extractos crudos de *E. coli* contenían un factor adicional que era necesario para la actividad de hidrolizar Bis-pNPP a p-nitrofenol.

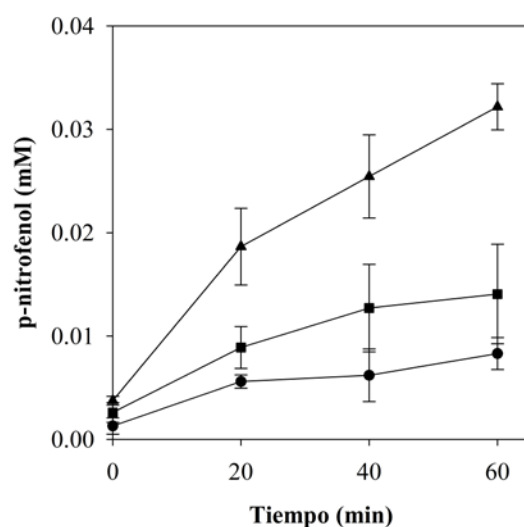


Figura 10. SMc00171 tiene actividad hidrolítica del sustrato artificial Bis-pNPP. Actividad hidrolasa de extractos crudos libres de células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que sobreproducen SMc00171 del plásmido pC00171. La mezcla de reacción (1 ml de volumen final) contenía concentraciones de 50 mM buffer dietanolamina/HCl (DEA), pH 9.8, 40 mM NaCl, 0.5 mM Bis-pNPP y tres diferentes concentraciones de proteína (● 10 mg/ml, ■ 15 mg/ml, ▲ 20 mg/ml), la reacción se incubó a 30°C. Finalmente, la reacción se detuvo a diferentes tiempos con 60 μ l de 5 M NaOH y la absorbancia fue registrada a 405 nm. Los datos mostrados son el resultado de tres réplicas independientes. Se utilizó el coeficiente de extinción molar (pNP) 18000 M⁻¹ cm⁻¹ (Rudolph *et al.*, 1999).

Las cinéticas de degradación de fosfolípidos marcados radiactivamente que ocurre en la membrana de *S. meliloti* (PG, CL, PE, PC) por SMc00171 (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 1) indicaban que los fosfolípidos eran los sustratos idóneos para esta enzima. Al utilizar fosfolípidos totales de *S. meliloti* como sustrato para SMc00171 se detectó la presencia de DAG como producto de hidrólisis (Figura 11).

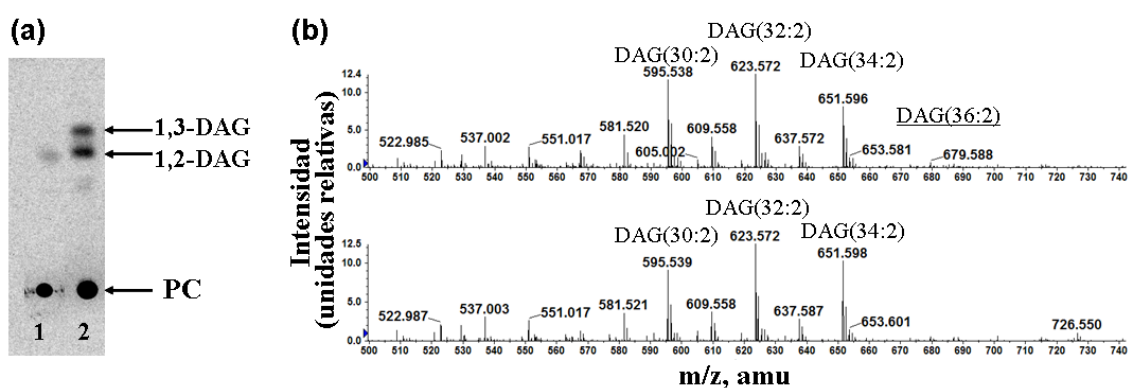


Figura 11. DAG es uno de los productos de hidrólisis de fosfolípidos totales de *S. meliloti* al ser incubados con SMc00171. La mezcla de reacción (0.1 ml de volumen final) contenía concentraciones de 50 mM buffer dietanolamina/HCl (DEA), pH 9.8, 40 mM NaCl, 0.050 mg/ml de concentración de proteína, fosfolípidos totales de *S. meliloti* solubilizados con 0.02% Triton X-100 marcados radiactivamente con [^{14}C] o fríos para el caso de análisis de espectrometría de masas. La reacción fue incubada dos horas a 30°C y se detuvo como ha sido descrita previamente para los ensayos lipídicos. La fracción lipídica fue separada mediante TLC con el sistema de solventes: n-hexano: di-etil éter: ácido acético (30:70:1, v/v). **(a)** Productos obtenidos después de tratar [^{14}C]PC con extractos crudos libres de células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que sobreproducen SMc00171 del plásmido pC00171 (carril 2) o que llevan y como control negativo el vector vacío pET9a (carril 1). **(b)**. Análisis de espectrometría de masas al incubar fosfolípidos totales de *S. meliloti* con extractos crudos libres de células de *E. coli* que sobreproducen SMc00171 **panel superior** o que llevan el vector vacío pET9a **panel inferior**.

La formación de DAG por SMc00171 a partir de fosfolípidos totales de *E. coli* fue confirmada también por espectrometría de masas. Las moléculas detectadas fueron, DAG (32:0), DAG (34:0), DAG (34:2), tanto con extractos crudos que sobreproducen SMc00171 (Figura 11b, panel superior) como con el vector vacío (Figure 11b, panel inferior). La única molécula diferente fue DAG (36:2) que sólo se detectó al incubar fosfolípidos totales de *S. meliloti* con SMc00171. Con la finalidad de especificar si SMc00171 podría hidrolizar fosfolípidos con una cadena diferente de C18 o más larga,

empleamos PC (18:0, 20:4) como sustrato. Como se observa en la Figura 12 (panel central), los resultados de espectrometría de masas revelan que SMc00171 no es capaz de degradar fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas de 18:0 y 20:4. Sin embargo, SMc00171 degrada fosfolípidos presentes en el extracto crudo de *E. coli* formando como productos DAG (32:1), DAG (34:1), DAG (36:2) (Figura 12, panel central). Dado que *E. coli* no contiene el fosfolípido PC como componente de sus membranas, esos datos sugieren que SMc00171 puede degradar no solamente PC sino otros fosfolípidos. Los productos de DAG formados por SMc00171 sobreproducida en *E. coli* sugieren que contienen residuos de ácidos grasos saturados, mono-insaturados o ciclopropanos que contienen cadenas de C16, C17 y C18 (Figuras 11 y 12). Sorprendentemente, fosfolípidos con un residuo de ácido araquidónico (C20:4) en la posición *sn*-2 no son utilizados como sustrato para SMc00171.

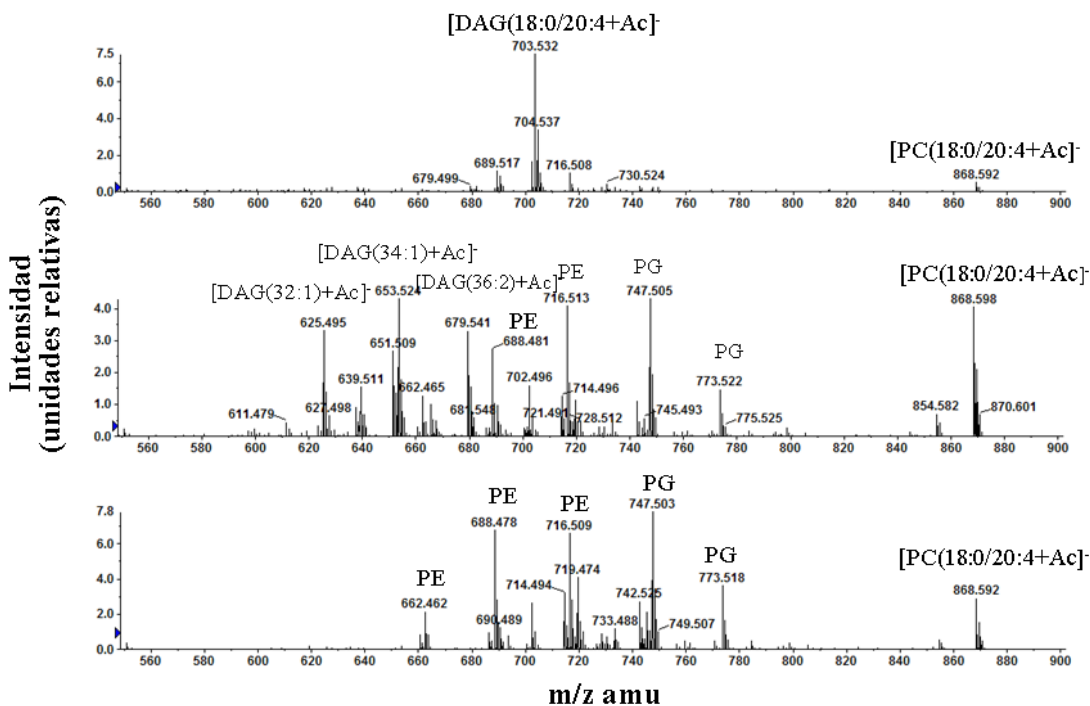


Figura 12. SMc00171 no degrada la fosfatidilcolina PC (18:0, 20:4). DAG formado a partir de PC (18:0, 20:4) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama) como sustrato por la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (**panel superior**). Productos de DAG formados al incubar PC (18:0, 20:4) con extractos crudos de *E. coli* que sobreproducen SMc00171 del plásmido pC00171 (**panel central**). PC (18:0, 20:4) incubado con extractos crudos de *E. coli* que llevan pET9a (**panel inferior**). Las condiciones del ensayo son similares a las descritas en la Figura 9.

Las condiciones óptimas para el ensayo enzimático de SMc00171 al utilizar como sustrato $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ se basaron principalmente en determinar las concentraciones adecuadas de Tritón X-100 empleadas para solubilizar $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ y la dependencia de iones de la enzima. La mayor formación de DAG al incubarse con extractos crudos que sobreproducen SMc00171 fue 0.02% de Tritón X-100 (Figura 13).

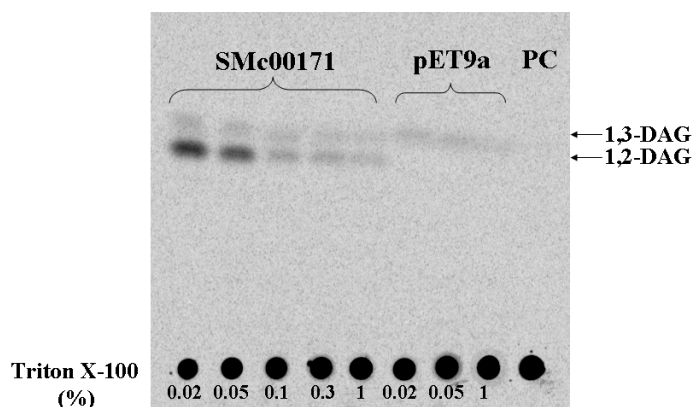


Figura 13. Ensayos de fosfolipasa C con $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ y extractos proteicos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que sobreprodujo SMc00171 del plásmido pC00171 o llevando el vector vacío pET9a con diferentes porcentajes de Tritón X-100. La mezcla de reacción (0.1 ml de volumen final) contenía concentraciones de 50 mM buffer dietanolamina/HCl (DEA), pH 9.8, 40 mM NaCl, $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ solubilizada con 0.02% Tritón X-100, ajustando el porcentaje de Tritón X-100 en cada caso. Las condiciones de ensayo fueron similares a las descritas en la Figura 9.

El determinar la concentración óptima de Tritón X-100 del ensayo, permitió explorar la posibilidad de incluir iones, dado que SMc00171 pertenece a una familia de metalo-fosfoesterasas. Las sales evaluadas fueron MgCl_2 , CoSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 y MnCl_2 . Solamente, MnCl_2 y posiblemente FeSO_4 estimularon la actividad de fosfolipasa C de SMc00171. Aparentemente, 1 mM MnCl_2 y 1mM FeSO_4 en conjunto podrían tener un efecto sinérgico en la actividad de SMc00171, sin embargo MnCl_2 mostró la mayor estimulación de la actividad fosfolipasa C en concentraciones de 3 mM (Figura 14).

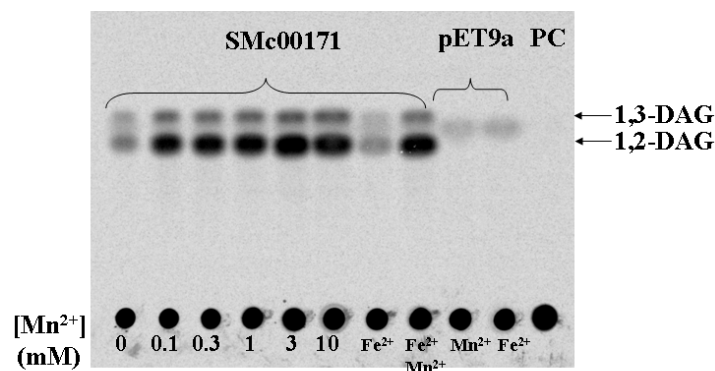


Figura 14. Ensayos de fosfolipasa C con [¹⁴C]PC y extractos proteicos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que sobreprodujo SMc00171 del plásmido pC00171 o llevando el vector vacío pET9a con diferentes concentraciones de Mn²⁺. La mezcla de reacción (0.1 ml de volumen final) contenía concentraciones de 50 mM buffer dietanolamina/HCl (DEA), pH 9.8, 40 mM NaCl, [¹⁴C]PC solubilizada con 0.02% Tritón X-100 ajustando la concentración de Mn²⁺ en cada caso y 1 mM de cada sal en donde no está indicado. Las condiciones de ensayo fueron similares a las descritas en la Figura 11.

DISCUSION

Las bacterias tienen la capacidad de reaccionar a cambios del medio externo modificando la composición de sus membranas celulares, lo cual les permite contener ante situaciones de estrés. La estrategia desarrollada por la bacteria *S. meliloti* ante condiciones limitantes de P es reemplazar sus principales fosfolípidos de membrana como PC y PE por lípidos que no contienen fósforo en su estructura como OL, SL y DGTS (Geiger *et al.*, 1999). Se sabe que los productos de los genes *btaAB* participan en la biosíntesis de DGTS (Riekhof *et al.*, 2005; López-Lara *et al.*, 2005). Sin embargo, en las bacterias se desconocía la fuente de DAG para la primera reacción, en la cual DAG es convertido a DGHS mediante BtaA. En este trabajo, se ha identificado a PlcP (SMc00171) como una fosfolipasa C. Se muestra, que en condiciones limitantes de P, PlcP (SMc00171) es responsable de degradar los principales fosfolípidos de las membranas sinorhizobiales, como PC, MMPE y PE. Uno de los productos generados por la actividad de PlcP es DAG, el cual podría servir como sustrato de la enzima BtaA.

Se ha demostrado que los fosfolípidos PC, PE y MMPE de *S. meliloti* son activamente degradados en condiciones limitantes de P (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 1). El decremento de PC, PE y MMPE es inversamente proporcional al incremento de lípidos sin P, previamente descrito (Geiger *et al.*, 1999). La mutante

DGTS1, deficiente en *btaA* (López-Lara *et al.*, 2005), todavía degrada sus fosfolípidos en limitación de P (Figura 9b). Esos datos, nos indicaban que la degradación de los fosfolípidos no depende de la biosíntesis de DGTS. La biosíntesis de DGTS es regulada por el sistema de dos componentes PhoR/PhoB (Geiger *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2006b). Interesantemente, se observó que la mutante H838 de *S. meliloti*, deficiente de *phoB*, no degrada sus fosfolípidos en limitación de P (Figura 9c). Lo anterior, sugiere que la degradación de fosfolípidos es dependiente de la regulación transcripcional por PhoB. Estos resultados revelan que la conversión directa de fosfolípidos a lípidos sin P como DGTS, requiere la acción directa de enzimas que degraden fosfolípidos y que sean reguladas por PhoB.

La estrategia genética de inactivación de genes homólogos a fosfolipasas y de cuatro fosfatasa hipotéticas inducidas en limitación de P, así como reguladas por PhoB permitió identificar el gen responsable de la degradación de fosfolípidos en *S. meliloti* bajo condiciones limitantes de P. La mutante PHO00171, deficiente del gen *smc00171*, no degrada PC, PE y MMPE en limitación de P, comparada con la cepa silvestre (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 2). Los resultados de complementación genética demostraron, que efectivamente *smc00171* restaura la capacidad de hidrólisis de fosfolípidos bajo las condiciones estudiadas (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figuras 2, S1, S2 y Tabla S2). Eso nos sugirió que en condiciones limitantes de P, SMC00171 degrada los fosfolípidos de *S. meliloti*, de manera dependiente de PhoB.

La fosfolipasa C PlcP (SMc00171) tiene afinidad por fosfolípidos bacterianos como sustratos en lugar de fosfolípidos de eucariontes. La actividad enzimática de SMC00171 ha mostrado ser una fosfolipasa C, al hidrolizar PC a DAG y fosfocolina (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 3). Adicionalmente, SMC00171 presenta actividad hidrolítica del sustrato cromógeno Bis-pNPP (Figura 10) y requiere de algún factor extra para su actividad óptima. Esto último se especula, porque al adicionar extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, que lleva el vector vacío pET9a, se incrementa la actividad de SMC00171 con Bis-pNPP (datos no mostrados). Resulta interesante que SMC00171 pertenece a una familia de metalo-fosfoesterasas que hidrolizan una gran variedad de sustratos. En este punto se determinó que solubilizando los fosfolípidos con 0.02% de Tritón X-100 (Figura 13) y adicionando 3 mM MnCl₂ (Figura 14), se observaba una mayor actividad de PlcP (SMc00171) al utilizar fosfolípidos como sustrato. Un aspecto

interesante de la actividad fosfolipasa C de SMc00171 son los residuos de ácidos grasos de los fosfolípidos que hidroliza. Los resultados muestran que PlcP (SMc00171) no hidroliza una PC que posee acilos de 18:0 y 20:4 (Figura 12, panel central), la cual es hidrolizada por la fosfolipasa C de *C. perfringens* (Figura 12, panel superior). Sin embargo, es evidente que PlcP (SMc00171) hidroliza fosfolípidos con residuos de ácidos grasos saturados, mono-insaturados o ciclopropanos que contienen cadenas de C16, C17 y C18 (Figuras 11 y 12). Es claro, que la fosfolipasa C PlcP actúa sobre fosfolípidos que contienen cadenas de ácidos grasos de C16, C17 y C18, los cuales están presentes en bacterias. La fosfolipasa C PlcP no reconoce como sustrato un fosfolípido que lleva ácido araquidónico en la posición *sn*-2, típico de eucariontes, pero que no existe en las membranas de *S. meliloti* o de *E. coli*. Por otra parte, se ha demostrado que la actividad PlcP (SMc00171) *in vitro* no sólo hidroliza PC como sustrato, sino que es capaz de hidrolizar también PE (Comunicación personal, Daniela B. Medeot). Nuestros resultados establecen por primera vez la actividad de una fosfolipasa C bacteriana que hidroliza los fosfolípidos de sus propias membranas en condiciones limitantes de P. Aparentemente, *S. meliloti* utiliza este mecanismo bioquímico para contender a la limitación de P, activando el reciclaje de Pi al hidrolizarlo de los fosfolípidos de sus membranas.

La fosfolipasa C de *S. meliloti* que degrada sus fosfolípidos en limitación de P, pertenece a la familia de fosfoesterasas PfamPF00149. En la sección de Discusión en Zavaleta-Pastor *et al.*, (2010) se presenta, la distribución de homólogos a SMc00171 con base en la secuencia de proteína (Figuras S3, S4 y Tabla 3). Adicionalmente, resulta interesante que la fosfolipasa PC-PLC (NPC4) de *Arabidopsis thaliana* fue identificada al buscar genes homólogos a fosfolipasas bacterianas, entre ellos de *Ralstonia solanacearum* y *Mycobacterium tuberculosis* (Nakamura *et al.*, 2005).

La composición lipídica de la membrana de *S. meliloti* se adecua al estilo de vida de la bacteria. La fosfolipasa PlcP (SMc00171) es inducida en condiciones limitantes de P y regulada a nivel transcripcional por PhoB (Krol y Becker, 2004; Yuan *et al.*, 2006b). Además de la activación de la fosfolipasa C PlcP (SMc00171) en limitación de P, se activan diversos genes entre ellos *sqdB* y *btaAB*, los cuales codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de sulfolípidos y DGTS (Geiger *et al.*, 1999; López-Lara *et al.*, 2005). Las bacterias son dependientes de las condiciones de su hábitat,

especialmente en situaciones de estrés donde es necesario conservar P y energía (Brown y Kornberg, 2008). Si la bacteria cambia de un ambiente limitante de P a uno de condiciones abundantes del mismo, se espera que la transcripción de los genes regulados por PhoB termine y que se detenga la biosíntesis *de novo* de DAG, SL, y DGTS. Actualmente, no se sabe si al cambiar de un ambiente limitante de P a uno abundante de P, los lípidos membranales sin fósforo se mantienen o si también son remodelados para ser reconvertidos en fosfolípidos. En algún momento nos surgió esta incógnita y con un solo experimento, sin usar Pi marcado, observamos que hay una cierta reversibilidad de DGTS a PC. Al adicionar una fuente adicional de Pi a cultivos de *S. meliloti* que habían sido crecidos en limitación de P, se observó una reducción de DGTS y un incremento de PC (datos no mostrados). Sin embargo, el experimento adecuado sería utilizando Pi marcado radioactivamente y seguir su incorporación específica en los fosfolípidos. Esta idea está apoyada con lo observado en plantas, en las que el reemplazo de fosfolípidos por digalactosil diacilglicerol en deficiencia de P es reversible y la reversibilidad a nivel bioquímico en el caso de los lípidos es un proceso lento (Tjellström *et al.*, 2008).

El papel de DAG en *S. meliloti* en condiciones limitantes de P, es un aspecto interesante a investigar. DAG puede ser fosforilado a PA por una DAG cinasa (Dgk), el gen que codifica para esa actividad en *S. meliloti* es el *smc04213*. Aparentemente, el gen estructural de *dgk* posee una caja Pho, sin embargo en condiciones limitantes de P su expresión no se ve alterada (Yuan *et al.*, 2006b). Además, el PA formado por Dgk es capaz de reincorporarse a la biosíntesis de fosfolípidos nuevamente (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 4). Se ha reportado, que el gen *dgk* de *S. meliloti* se induce en la fase temprana de la simbiosis (Zhang y Cheng, 2006) y el reciclaje de DAG a PA sugiere que en simbiosis sea importante para formar fosfolípidos en lugar de lípidos membranales que no tienen fósforo. Por otra parte, observamos que generar una mutante deficiente de *dgk* fue un proceso difícil, de hecho sólo se obtuvo una colonia positiva durante la construcción de la mutante de dicho gen (datos no mostrados). La mutante DGK deficiente de *dgk* presentó un fenotipo de crecimiento lento comparado con la cepa silvestre *S. meliloti* 1021, el cual sólo fue reestablecido al adicionar casamino ácidos al medio de cultivo (datos no mostrados).

En este trabajo no se encontró un fenotipo diferente al lipídico, asociado a la ausencia de SMC00171 en vida libre. En cuanto a la simbiosis de *S. meliloti* con alfalfa, se sabe que las mutantes que no producen OL, SL y DGTS no presentan un fenotipo simbiótico (López-Lara *et al.*, 2005). Estudios preliminares de la mutante PHO00171 revelan que al igual que las mutantes de OL, SL y DGTS, esta mutante no muestra un fenotipo simbiótico bajo las mismas condiciones estudiadas (Comunicación personal, Diana Sahonero).

La fosfocolina derivada de la actividad de SMC00171 puede servir como una fuente de fósforo, de carbono y de nitrógeno para *S. meliloti* en limitación de P. La fosfolipasa PlcP (SMC00171) degrada PC a DAG y fosfocolina (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010, Figura 3). La hidrólisis de Pi a partir de fosfoalcoholes como fosfocolina (Massimelli *et al.*, 2005), es un proceso bien conocido que llevan a cabo la actividad de fosfatasa. En *S. meliloti*, el operón *betICBA* codifica enzimas involucradas en la biosíntesis de glicina betaína a partir de colina (Østeras *et al.*, 1998). La glicina betaína es un soluto compatible u osmoprotector que se acumula en la célula en respuesta a un elevado estrés osmótico externo provocado por el ambiente. En *S. meliloti* se tiene evidencia que BetC actúa como una fosfatasa de fosfocolina (Comunicación personal, Daniela B. Medeot), lo cual concuerda con lo especulado por Østeras *et al.*, (1998). Tanto colina como fosfocolina inducen el operón *betICBA* cuando están presentes en el medio de cultivo de *S. meliloti* (Mandagon *et al.*, 2003). Por lo tanto, en condiciones limitantes de P es de esperar que la fosfocolina liberada por PlcP sea hidrolizada por la fosfatasa BetC a colina y Pi y que subsecuentemente, la colina sea oxidada por BetBA a glicina betaína. Hasta la fecha no se conoce si glicina betaína se acumula en *S. meliloti* en condiciones limitantes de P, algo que usualmente ocurre en condiciones de alta osmolaridad. La fosfolipasas C *plcH* y *plcN* de la bacteria *P. aeruginosa*, son inducidas en condiciones limitantes de P o bien en presencia de PC o de compuestos osmoprotectores como: fosfocolina, colina o glicina betaína. La inducción de *plcN* por compuestos osmoprotectores requiere la regulación estricta de PhoB y condiciones limitantes de P. Por su parte, *plcH* puede ser inducida de forma independiente de esas dos condiciones (Shortridge *et al.*, 1992). El papel preciso de las fosfolipasas C de *P. aeruginosa* en la patogénesis no es claro, sin embargo se ha reportado que tienen diversos efectos adversos en sistemas eucariontes (Sage y Vasil, 1997). Se ha especulado que en un ambiente rico de PC como los pulmones de enfermos de fibrosis cística, la actividad de

sus fosfolipasas hidrolizan PC a DAG y fosfocolina. La subsecuente degradación de fosfocolina a glicina betaína, le permite sobrevivir en esos ambientes hiperosmóticos (Sage *et al.*, 1997). Tanto *S. meliloti* como *P. aeruginosa* poseen una fosfolipasa C (PlcP) que puede degradar PC de la propia bacteria a fosfocolina y DAG y en el caso de *P. aeruginosa*, esta PlcP es idéntica a PA3219 (Comunicación personal, Daniela B. Medeot). En contraste con *S. meliloti*, la bacteria *P. aeruginosa* puede degradar también PC externa (p. ej. del huésped) en condiciones limitantes de P, ambas bacterias continúan con la degradación de fosfocolina a glicina betaína. De esa forma, es claro que en condiciones limitantes de P, las fosfolipasas secretadas por *P. aeruginosa*, puedan ser inducidas por fosfocolina, colina o glicina betaína.

Los fosfolípidos membranales de *S. meliloti* constituyen una reserva de fósforo adicional a la de poliP. El fósforo liberado durante la hidrólisis de fosfolípidos puede ser utilizado en la síntesis de biomoléculas esenciales como ácidos nucleicos. Los poliP constituyen la principal reserva de fósforo de las células, además bioenergéticamente son una molécula flexible que sirve como una fuente de energía durante su hidrólisis (Brown y Kornberg, 2008). La hipotética poliP cinasa tipo 1 (SMc00618), podría ser responsable de la síntesis de poliP en *S. meliloti*. SMc00618 posee una caja Pho y es regulada por PhoB (Yuan *et al.*, 2006b). Ésto sugiere que en condiciones limitantes de fósforo también se da el proceso de síntesis de poliP. La utilización de reservas de poliP puede ocurrir al menos por alguna de las poliP cinasas tipo 2 SMc02148, SMA0172 y SMA0670 (Nocek *et al.*, 2008), las cuales podrían estar involucradas en la degradación de poliP. Sin embargo, en *S. meliloti* se desconoce la importancia de las diferentes fuentes de fósforo, tanto de los poliP como de fosfolípidos zwitteriónicos, lo cual resulta un área interesante de estudio.

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se identificó y caracterizó a SMc00171 como una fosfolipasa C, que degrada los principales fosfolípidos de *S. meliloti* en condiciones limitantes de P. Los resultados presentados nos permiten concluir:

1. La bacteria *S. meliloti* degrada sus fosfolípidos membranales PC, MMPE y PE en condiciones limitantes de P.
2. El gen *smc00171* está involucrado en la degradación de fosfolípidos de *S. meliloti* bajo limitación de P. La mutante PHO00171 deficiente de SMc00171 no degrada sus fosfolípidos en condiciones limitantes de P en comparación con la cepa silvestre.
3. La degradación de fosfolípidos de *S. meliloti* en condiciones limitantes de P es regulada a nivel transcripcional por PhoB.
4. SMc00171 tiene actividad de fosfolipasa C y como productos de hidrólisis de PC forma DAG y fosfocolina.
5. DAG como producto de la actividad de SMc00171 es incorporado en la biosíntesis de lípidos sin P como DGTS.

PERSPECTIVAS

Los resultados y conclusiones generados en esta tesis doctoral permiten profundizar aspectos como:

- Conocer y entender la degradación de fosfolípidos y el reciclaje de los lípidos hidrolizados de la bacteria *S. meliloti*, tanto en condiciones limitantes de P, así como durante la simbiosis o en vida libre.
- Realizar la caracterización bioquímica de la fosfolipasa C PlcP (SMc00171) que permita entender mejor como actúa esta fosfolipasa sinorhizobial.
- Indagar el papel del fósforo liberado como producto de la actividad de SMc00171 en condiciones limitantes de P.
- Evaluar el posible papel de DAG como molécula señalizadora en la bacteria *S. meliloti*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson MS, Larsson KE, Tjellström H, Liljenberg C, Sandelius AS (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280:27578-27586.
- Benning C, Beatty JT, Prince RC, Somerville CR (1993) The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1561-1565.
- Benning C, Huang ZH, Gage DA (1995) Accumulation of a novel glyco- and betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate-limitation. *Arch Biochem Biophys* 317:103-111.
- Benning C (2007) Questions remaining in sulfolipid biosynthesis: a historical perspective. *Photosynth Res* 92:199-203.
- Bialeski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24:225-252.
- Brencic A, Winans SC (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:155-194.
- Brown MR, Kornberg A (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16085-16087.
- Bohin JP (2000) Osmoregulated periplasmic glucans in proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186:11-19.
- Bogdanov M, Heacock P, Guan Z, Dowhan W (2010) Plasticity of lipid-protein interactions in the function and topogenesis of the membrane protein lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15057-15062.
- Bogdanov M, Heacock (2002) A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J* 21:2107-2116.
- Calva E, Oropeza R (2006) Two-component signal transduction system, environmental signals, and virulence. *Microb Ecol* 51:166-176.
- Cocco L, Martelli AM, Fiume R, Faenza I, Billi AN, Manzoli FA (2006) Signal transduction within the nucleus: Revisiting phosphoinositide inositide-specific phospholipase C β_1 . *Adv Enzyme Regul* 46:2-11.
- Cronan JE Jr, Rock CO (1996) Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology (2nd edn), eds Neidhardt FC, Curtiss R, Gross CA, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (ASM Press, Washington DC) pp 612-636.
- Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E, Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase D ζ_2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6765-6770.
- Dekker N (2000) Outer membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol Microbiol* 35:711-717.
- Dowhan W, Bogdanov M (2009) Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annu Rev Biochem* 78:515-540.

- Fauvart M, Michiels J (2008) Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 285:1- 9.
- Furlong ST, Leary JA, Costello CE, Dawidowicz EA (1986) Isolation and identification of 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-0-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine from the soil amoeba, *Acanthamoeba castellanii*. *J Lipid Res* 27:1182-1189.
- Gao J-L, Weissenmayer B, Taylor A, Thomas-Oates J, López-Lara IM, Geiger O (2004) Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol Microbiol* 53:1757-1770.
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible W-R, Ohta H, Dörmann P (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant J* 56:28-39.
- Geiger O, Röhrs V, Weissenmayer B, Finan TM, Thomas-Oates JE (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* 32:63-73.
- Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, Sohlenkamp C (2010) Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res* 49:46-60.
- Griffith OH, Ryan M (1999) Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1441:237-254.
- Hsieh YJ, Wanner BL (2010) Global regulation by the seven-component P_i signaling system. *Curr Opin Microbiol* 13:198-203.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5:619-633.
- Kato H, Goto N (1997) Adjuvanticity of an ornithine-containing lipid of *Flavobacterium meningosepticum* as a candidate vaccine adjuvant. *Micobiol Immunol* 41:101-106.
- Kiss E, Reuhs BL, Kim JS, Kereszt A, Petrovics G, Putnoky P, Dusha I, Carlson RW, Kondorosi A (1997) The *rkpGHI* and *-J* genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 179:2132-2140.
- Klug RM, Benning C (2001) Two enzymes of diacylglyceryl-O-4'-(N,N,N,-trimethyl)-homoserine biosynthesis are encoded by *btaA* and *btaB* in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5910-5915.
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D (1999) Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* 68: 89-125.
- Krol E, Becker A (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Gen Genomics* 272:1-17.
- Künzler K, Eichenberger W (1997) Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* 46:883-892.
- Li M, Welti R, Wang X (2006) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol* 142:750-761.

- López-Lara IM, Sohlenkamp C, Geiger O (2003) Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:567-579.
- López-Lara IM, Gao J-L, Soto MJ, Solarez-Pérez A, Weissenmayer B, Sohlenkamp C, Verroios GP, Thomas-Oates J, Geiger O (2005) Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:973-982.
- Lu Y-J, Zhang Y-M, Grimes KD, Qi J, Lee RE, Rock CO (2006) Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. *Mol Cell* 23:765-772.
- Mandon K, Østeras M, Boncompagni E, Trinchant JC, Spennato G, Poggi MC, Le Rudulier D (2003) The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betICBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:709-719.
- Massimelli MJ, Beassoni PR, Forrellad MA, Barra JL, Garrido MN, Domenech CE, Lisa AT (2005) Identification, cloning, and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene. *Curr Microbiol* 50:251-256.
- Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H (2006) Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol* 61: 1110–1117.
- Minder AC, de Rudder KEE, Narberhaus F, Fischer HM, Hennecke H, Geiger O (2001) Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol Microbiol* 39:1186-1198.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H (1974) The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and minor phosphorus-free lipids in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett* 43:257-260.
- Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H, Baddiley J (1974) Replacement of acidic phosphates by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature* 249:268–269.
- Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya KI, Ohta H (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280:7469-7476.
- Nelson DL, Cox MM (2004) Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, Brown G, Evdokimova E, Osipiuk J, Edwards AM, Savchenko A, Joachimiak A, Yakunin AF (2008) Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17730-17735.
- Orgambide GG, Philip-Hollingsworth S, Hollingsworth RI, Dazzo FB (1994) Flavone-enhanced accumulation and symbiosis-related biological activity of a diglycosyl diacylglycerol membrane glycolipid from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *J Bacteriol* 176:4338-4347.
- Ormeño-Orrillo E (2005) Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. *Rev Lat Microbiol* 47:165-175.

- Østerås M, Boncompagni E, Vincent N, Poggi MC, 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 USA* 95:11394-11399.
- Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S (2007) Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differ* 14: 1243–1247.
- Raetz CRH, Newman KF (1979) Diglyceride kinase mutants of *Escherichia coli*: inner membrane association of 1,2-diglyceride and its relation to synthesis of membrane-derived oligosaccharides. *J Bacteriol* 137:860-868.
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.
- Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007) Lipid modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76:295-329.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* 21:541-554.
- Riekhof WR, Andre C, Benning C (2005) Two Enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 441:96-105.
- Rock C (2008) Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (5th Edn.)*. New Comprehensive Biochemistry, eds Vance DE, Vance JE (Elsevier Amsterdam, The Netherlands) pp 59-96.
- Rüberg S, Pühlerg A, Becker A (1999) Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* 145:603-611.
- de Rudder KEE, Thomas-Oates J, Geiger O (1997) *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid *N*-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. *J Bacteriol* 179:6921-6928.
- de Rudder KEE, Sohlenkamp C, Geiger O (1999) Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem* 274:20011-20016.
- de Rudder KEE, López-Lara IM, Geiger O (2000) Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: Phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol Microbiol* 37:763-772.
- Rudolph AE, Stucke JA, Zhao Y, Matthews HR, Patton WA, Moss J, Dixon JE (1999) Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member. *J Biol Chem* 274: 11824-11831.
- Rumley MK, Therisod H, Weissborn AC, Kennedy EG (1992) Mechanism of regulation of biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267:11806-11810.
- Saborido LB, Zaheer R, Finan T, McCarry BE (2010) A shotgun lipidomics approach in *Sinorhizobium meliloti* as a tool in functional genomics. *Prog Lipid Res* 50:1120-1132.
- Sage AE, Vasil ML (1997) Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 179:4874-4881.

- Sage AE, Vasil AI, Vasil ML (1997) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipases C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 23:46-53.
- Sanda S, Leustek T, Theisen MJ, Garavito RM, Benning C (2001) Recombinant Arabidopsis SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose *in vitro*. *J Biol Chem* 276:3941-3946.
- Shortridge VD, Lazdunski A, Vasil ML (1992) Osmoprotectants and phosphate regulation expression of phospholipases C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 6:863-871.
- Sohlenkamp C, de Rudder KEE, Röhrs V, López-Lara IM Geiger O (2000) Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem* 275:18919-18925.
- Sohlenkamp C, López-Lara IM, Geiger O (2003) Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* 42:115-162.
- Sohlenkamp C, de Rudder KEE, Geiger O (2004) Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *J Bacteriol* 186:1667-1677.
- Songer JG (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 5:156-161.
- Spira B, Yagil E (1998) The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257:469-477.
- Stock AM, Robinson BL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction in bacteria. *Annu Rev Biochem* 69:183-215.
- Stonehouse MJ, Cota-Gomez A, Parker SK, Martin WE, Hankin JA, Murphy RC, Chen W, Lim KB, Hackett M, Vasil AI, Vasil ML (2002) A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* 46:661-676.
- Tannaes T, Dekker N, Bukholm G, Bijlsma JJE, Appelmelk BJ (2001) Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infect Immun* 69:7334-7340.
- Titball RW (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 57: 347-366.
- Titball RW (1999) Membrane-damaging and cytotoxic phospholipases. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins eds Alouf JE, Freer JH (Academic Press, London, UK), pp 310-329.
- Tjellström H, Andersson MX, Larsson KE, Sandelius AS (2008) Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Env* 31:1388-1398.
- Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13:52-56.
- Vandamme P, Goris J, Chen W-M, de Vos P, Willems A (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol* 25:507-512.
- van Berkum P, Ruihua F, Campbell TA, Eardly D (1999) Some issues of relevance in the taxonomy of rhizobia. In: Highlights of Nitrogen Fixation Research, eds Martínez E, Hernández G (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York), pp. 267-269
- Vanechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including

- Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:317-327.
- Valdés-López O, Hernández-Delgado G (2008) Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: What about legumes? *J Integr Plant Biol* 50:1213-1222.
 - Vences-Guzman MA, Geiger O, Sohlenkamp C (2008) *Sinorhizobium meliloti* mutants deficient in phosphatidylserine decarboxylase accumulate phosphatidylserine and are strongly affected during symbiosis with alfalfa. *J Bacteriol* 190:6846-6856.
 - Voegelé RT, Bardin S, Finan TM (1997) Characterization of the *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* high- and low-affinity phosphate uptake systems. *J Bacteriol* 179:7226-7232.
 - Vollmer W, Bertsche U (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1778:1714-1734.
 - Wang P, Ingram-Smith C, Hadley JA, Miller KJ (1999) Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. *J Bacteriol* 181:4576-4583.
 - Wanner BL (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51: 47-54.
 - Wanner BL (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology (2nd edn), eds Neidhardt FC, Curtiss R, Gross CA, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (ASM Press, Washington DC) pp1357-1381.
 - Weissenmayer B, Geiger O, Benning C (2000) Disruption of a gene essential for sulfoquinovosyldiacylglycerol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* has no detectable effect on root nodule symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* 13:666-672.
 - Weissenmayer B, Gao JL, López-Lara IM, Geiger O (2002) Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Mol Microbiol* 45:721-733.
 - Wu J, Bauer CE (2008) RegB/RegA a global redox-responding two-component system. *Adv Exp Med Biol* 631:131-148.
 - Yuan ZC, Zaheer R, Finan T.M. (2005) Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* 58:877–894.
 - Yuan ZC, Zaheer R, Finan TM (2006a) Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity, phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188:1089-1102.
 - Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, Finan T (2006b) Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 34:2686-2697.
 - Zavaleta-Pastor M, Sohlenkamp C, Gao JL, Guan Z, Zaheer R, Finan TM, Raetz CR, López-Lara IM, Geiger O (2010) *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:302-307.
 - Zhang XC, Cheng HP (2006) Identification of *Sinorhizobium meliloti* early symbiotic genes by use of a positive functional screen. *Appl Env Microbiol* 76:2738-2748.
 - Zhang YM, Rock C (2008) Membrane lipid homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 6:222-233.