



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**“CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DEL
SULFOLÍPIDO SULFOQUINOVOSA DIACILGLICEROL EN
Sinorhizobium meliloti”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

JESSICA YAMILETH CUEVAS RIVAS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ISABEL MARÍA LÓPEZ LARA (CCG)

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ UTRILLA CARRERI (CCG)

DRA. CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LÓPEZ (IBT)

CUERNAVACA, MORELOS. MARZO DEL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

Tesis Doctoral:

“CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DEL SULFOLÍPIDO SULFOQUINOVOSA DIACILGLICEROL EN *Sinorhizobium meliloti*”

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:
L. en F. Jessica Yamileth Cuevas Rivas

Esta tesis doctoral se realizó bajo la tutoría de la Dra. Isabel María López Lara, del programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas/UNAM.

El comité tutorial que evaluó el presente trabajo de tesis estuvo integrado por la Dra. Isabel María López Lara, el Dr. José Utrilla Carreri y la Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López.

El Jurado de la réplica oral de este trabajo de investigación se integró por:

Presidente: Dr. Michael Frederick Dunn
Secretario: Dra. Isabel Maria López Lara
Vocal: Dr. Miguel Cocotl Yañez
Vocal: Dra. Clarita Olvera Carranza
Vocal: Dr. Daniel Genaro Segura González

CONTENIDO

I. Reconocimientos	5
II. Agradecimientos	6
III. Dedicatoria	7
IV. Abreviaturas	8
V. Índice de figuras	9
VI. Resumen	10
VII. Abstract	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Lípidos de membrana.....	14
2. Formación de lípidos de membrana sin fósforo en <i>S. meliloti</i>	15
3. Sulfoquinovosil diacilglicerol, estructura y descubrimiento.	17
4. Distribución del SQDG y su abundancia en plantas, algas y bacterias.....	18
5. Biosíntesis del SQDG.....	19
5.1. Genes para la biosíntesis de SQDG.....	20
5.2. Funciones de los genes para la biosíntesis de SQDG.....	21
6. Distribución de los genes sqdB/SQD1.....	23
7. Papel biológico del SQDG.....	25
7.1. Función esencial del SQDG en condiciones deficientes de fosfato.....	25
7.2. Función esencial del SQDG en condiciones deficientes de azufre.....	26
7.3. Función esencial del SQDG en la fotosíntesis.....	27
8. Degradación de SQDG, SQGro y sulfoquinovosa.....	28
8.1 Vía de desulfuración oxidativa, una nueva vía sulfoglicolítica descrita.....	30
9. SQDG como potencial agente terapéutico y antiviral, un reto en la biotecnología.....	30
10. <i>Sinorhizobium melilot</i> 1021.....	31
ANTECEDENTES	35
1. Identificación del operón <i>sqdBDC</i> en <i>S. meliloti</i> y participación de <i>sqdB</i> en la formación de SQDG.....	35
2. Búsqueda de un homólogo a <i>sqdA</i> en <i>S. meliloti</i>	36
3. Co-existencia de <i>smc02490</i> con el operón <i>sqdBDC</i>	38
RELEVANCIA E IMPACTO	39

HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	42
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN GENERAL	95
CONCLUSIONES	105
PERSPECTIVAS	106
CEPAS Y PLÁSMIDOS Y SUS CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

I. RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio 2 del Departamento de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Isabel María López Lara con los siguientes apoyos:

Jessica Yamileth Cuevas Rivas recibió durante el Doctorado el apoyo de una Beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) para estudiantes nacionales de posgrado número 596234.

Durante el desarrollo del mismo contó con otros apoyos gracias al Programa UNAM-PAPIIT (IN202616 y IN200819). También contó con apoyo inicial del proyecto 153998 del fondo SEP-CONACyT.

II. AGRADECIMIENTOS

A Dios, por enseñarme un camino de nuevas oportunidades cuando mas lo necesitaba.

A mi esposo, Marcos Poot, quien nunca dudo de mi y me motivo para iniciar este gran reto profesional aun cuando yo creia no estar lista, por apoyarme en cada etapa dificil de este proceso, por detener incluso sueños y metas propias para impulsarme a cumplir las mías, gracias, mi amor, TE AMO.

A mi hijo Adriel, que siendo solo un bebé recién nacido, tuvo que quedarse en casa esperando a su madre que estaba luchando por un mejor futuro para ellos, que me dio la dicha de ser madre y me enseñó a ser un mujer mas fuerte y madura.

A mi segundo bebé que ahora es un angel en el cielo, por estar conmigo 4 meses, y darme una sobredosis de alegría que hizo mi estancia en el laboratorio mas placentera.

A mis padres, Irma y Raymundo, por nunca dudar de mí y apoyarme en cada decisión que he tomado, son el pilar mas fuerte de mi vida, por ser unos excelentes abuelos.

A la Dra. Isabel López, a quien conozco desde el 2014, por darme la oportunidad de poner en mis manos uno de sus proyectos, por darme un espacio en su equipo de trabajo y ser siempre tan profesional, de verdad gracias por su paciencia y por enseñarme tanto.

Al Dr. Otto Geiger por el interés mostrado en el desarrollo de mi proyecto, por sus aportaciones y sus enseñanzas.

A mis amigos del laboratorio de ecología genómica del grupo de interacciones entre pro y eucariotes y que ahora sé, seran mis amigos para toda la vida, Migue y Jonhy Olea, porque gracias a su compañía y amistad mi estancia en el laboratorio fue también divertida, gracias amigos por sus consejos y enseñanzas, los admiro mucho. A mi amiga América, Jhony Padilla, Pepe, Gustavo, Julio, por compartir grandes momentos juntos. Y a las técnicas del laboratorio, Ángeles y Lulú que siempre estuvieron dispuestas a enseñarme todo cuanto supieran y por su ayuda constante.

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”.
Carl Sagan

A mi hijo y a mi esposa
¡lo logramos!

IV. ABREVIATURAS

2D: dos dimensiones

ACP: proteína acarreadora de grupos acilo

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

C: carbono

CL: cardiolipina

DAG: diacilglicerol

DHA: dihidroxiacetona

DGDG: digalactosil diacilglicerol

DGTS: diacilgliceriltrimetilhomoserina

DMPE: dimetilfosfatidiletanolamina

LO: lípido de ornitina

MGDG: monogalactosil diacilglicerol

MMPE: monometilfosfatidiletanolamina

N: nitrógeno

ORF: marco abierto de lectura

P: fósforo

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PG: fosfatidilglicerol

PSII: fotosistema II

S: azufre

SQ: sulfoquinovosa

SQDG: sulfoquinovosil diacilglicerol

SQGro: sulfoquinovosil glicerol

SQDHA: sulfoquinovosil dihidroxiacetona

SQMG: sulfoquinovosil monoacilglicerol

TLC: cromatografía en capa fina

UDP: uridina difosfato

UDP-SQ: UDP-sulfoquinovosa

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias.....	14
Figura 2. Modelo de funcionamiento del sistema de dos componentes PhoB-PhoR.	16
Figura 3. Estructura general del sulfolípidos SQDG	17
Figura 4. Vías para la biosíntesis de SQDG	22
Figura 5. Árbol enraizado que muestra a relación de las secuencias seleccionadas de las proteínas SQD1/SqdB.....	23
Figura 6. Comparación directa de las transformaciones bioquímicas de la vía glucolítica sulfo-ED y la vía clásica ED.....	29
Figura 7. Formación, recambio y reciclaje de lípidos de membrana en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	33
Figura 8. Una mutante de <i>S. meliloti</i> en el gen <i>sqdB</i> no produce SQDG.....	34
Figura 9. Asociación del gen <i>smc02490</i> con otros genes de <i>S. meliloti</i>	37

VI. RESUMEN

Sinorhizobium meliloti 1021 es una bacteria Gram-negativa del suelo de la clase Alphaproteobacteria que puede formar nódulos fijadores de nitrógeno en simbiosis con leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*.

En medios de laboratorio con suficiente fosfato, las membranas de *S. meliloti* están formadas mayoritariamente por glicerofosfolípidos. Sin embargo, en bajas concentraciones de fosfato, y tal como sucede en otras bacterias del suelo, la mayoría de los glicerofosfolípidos son reemplazados por lípidos de membrana que no contienen fósforo.

El sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) es uno de los 3 lípidos de membrana sin fósforo que sintetiza *S. meliloti*. Este lípido azufrado junto con el lípido de ornitina y el diacilgliceril *N,N,N*-trimetilhomoserina que también son lípidos que no contienen fósforo en su estructura, reemplazan mayoritariamente a los fosfolípidos bajo esta condición limitante de fosfato.

En la bacteria *Rhodobacter sphaeroides* se han descrito cuatro genes estructurales, *sqdA*, *sqdB*, *sqdC* y *sqdD*, para la biosíntesis de SQDG. El producto del gen *sqdB* genera la UDP-sulfoquinovosa (UDP-SQ), a partir de UDP-glucosa y sulfito, mientras que la función de los genes *sqdA*, *sqdC* y *sqdD* sigue siendo poco comprendida hasta el momento.

En el presente trabajo, se identificó a SMc02490 como ortólogo de *SqdA* en *S. meliloti* 1021. SMc02490 presenta un 39% de identidad respecto a *SqdA* y una mutación en *smc02490* resultó en la ausencia de sulfolípidos en *S. meliloti*.

En *S. meliloti* se identificó el operón *sqdBDC* involucrado en la formación de sulfolípidos. La expresión del operón *sqdBDC* en *Escherichia coli* da como resultado la formación de sulfoquinovosil glicerol (SQGro), mientras que la coexpresión de este operón junto con el gen *smc02490* (*sqdA*), resulta en la formación de SQDG en cantidades significativas, de hasta el 15% del total de lípidos.

Además, la adición de SQGro a un cultivo de *E. coli* que expresa *sqdA* conduce a la formación de SQDG. La adición de SQGro a cultivos de *S. meliloti* también resulta en la formación de SQDG. Derivado de estos resultados proponemos que la

presencia de SqdA en bacterias podría permitirles utilizar SQGro ambiental para la biosíntesis del lípido de membrana SQDG.

Por primera vez, hemos desarrollado un ensayo enzimático *in vitro* para la aciltransferasa SqdA. Los extractos crudos sin células de *E. coli* que expresan *sqdA* pueden convertir eficazmente [³⁵S]-sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG) en SQDG utilizando a la proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) como donante del ácido graso. Los análisis bioinformáticos revelan que esta vía de acilación de SQGro para la biosíntesis de SQDG está delimitada a los órdenes *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) y *Rhodobacterales* de la clase Alphaproteobacterias.

VII. ABSTRACT

Sinorhizobium meliloti 1021 is a Gram-negative soil alphaproteobacterium that can form nitrogen-fixing nodules in symbiosis with legumes of the genera *Medicago*, *Melilotus*, and *Trigonella*.

In laboratory media with sufficient phosphate, *S. meliloti* membranes are mainly formed by glycerophospholipids. However, under phosphate limitation concentrations, as occurs in other soil bacteria, glycerophospholipids are partially replaced by membrane lipids that do not contain phosphorus.

Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) is one of the 3 phosphorus-free membrane lipids synthesized by *S. meliloti*. This sulfur-containing lipid together with ornithine lipid and diacylglyceryl *N,N,N*-trimethylhomoserine, which are also lipids that do not contain phosphorus in their structure, mostly replace phospholipids under this phosphate-limiting condition.

In *Rhodobacter sphaeroides*, four structural genes have been described, *sqdA*, *sqdB*, *sqdC* and *sqdD*, for SQDG biosynthesis. The *sqdB* gene product generates UDP-sulfoquinovose (UDP-SQ), from UDP-glucose and sulfite, while the function of the *sqdA*, *sqdC*, and *sqdD* genes remains poorly understood.

In the present work, SMC02490 was identified as an orthologue of SqdA in *S. meliloti* 1021. SMC02490 has 39% identity with respect to SqdA and a mutation in this gene results in the absence of sulfolipids in *S. meliloti*.

In *S. meliloti*, the *sqdBDC* operon, involved in the formation of sulfolipids, was identified. Expression of the *sqdBDC* operon in *Escherichia coli* results in sulfoquinovosyl glycerol formation (SQGro), while co-expression of this operon with *smc02490* (*sqdA*) gene results in the formation of SQDG in significant amounts, up to about 15% of the total lipids.

Furthermore, the addition of SQGro to a culture of *E. coli* expressing *sqdA* leads to the formation of SQDG. The addition of SQGro to *S. meliloti* cultures also results in the formation of SQDG. Derived from these results, we propose that the presence of SqdA in bacteria could allow them to use environmental SQGro for the biosynthesis of the membrane lipid SQDG.

For the first time, we have developed an *in vitro* enzyme assay for SqaA acyltransferase. Crude cell-free extracts of *E. coli* expressing *sqaA* can efficiently convert [³⁵S]-sulfoquinovosyl monoacylglycerol to SQDG using acyl carrier protein (ACP) as the fatty acid donor. Bioinformatic analysis reveal that this SQGro acylation pathway for SQDG biosynthesis is confined to the *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) and *Rhodobacterales* orders of the class Alphaproteobacteria.

INTRODUCCIÓN

1. Lípidos de membrana

El papel principal de los lípidos de membrana es el de formar la bicapa lipídica, la cual funge como barrera semipermeable en las células. En la mayoría de las bacterias los lípidos de membrana son los glicerofosfolípidos, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidiletanolamina (PE). Algunas bacterias contienen además los derivados metilados de PE, monometilPE, dimetilPE y fosfatidilcolina (PC) (Gill, 1975, Shukla *et al.*, 1980). La función estructural de los lípidos de membrana es esencial para los organismos. Estos lípidos son anfifílicos y consisten de dos cadenas hidrofóbicas largas de acilo o alquilo y un grupo cabeza hidrofílico (Fig. 1) (Dowhan *et al.*, 2008).

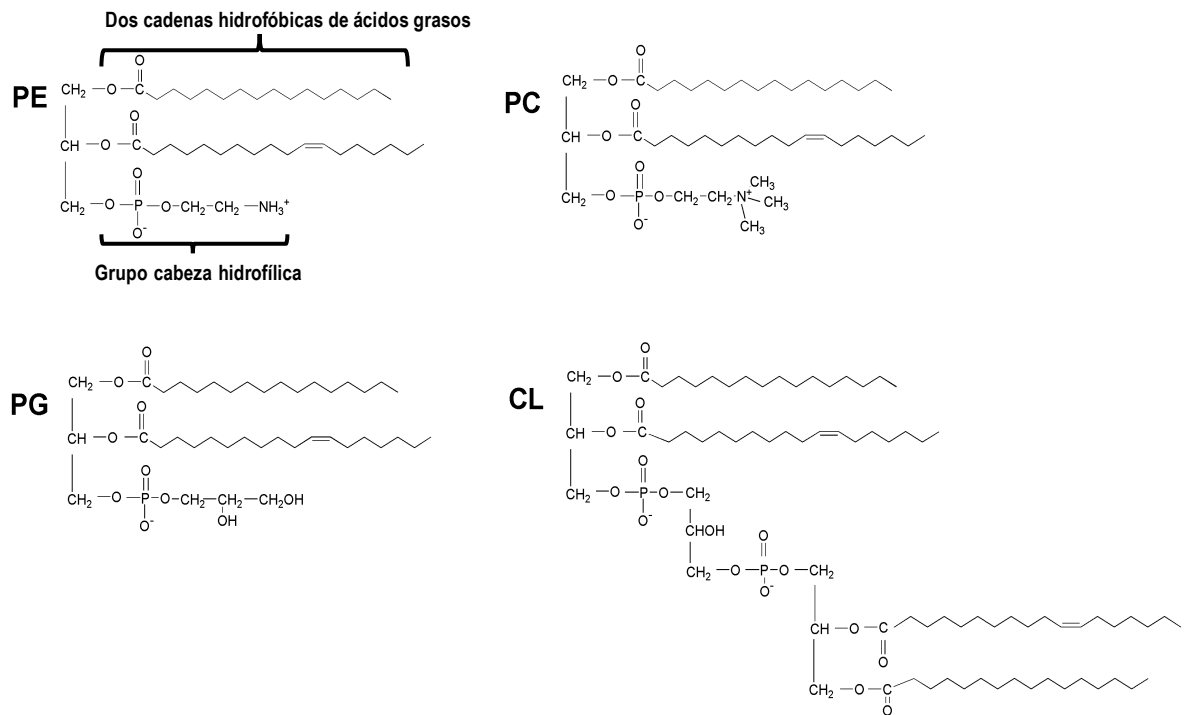


Figura 1. Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias. Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC). En el caso de la PE la parte hidrofóbica y la parte hidrofílica del fosfolípido están señaladas.

2. Formación de lípidos de membrana sin fósforo en *Sinorhizobium meliloti*.

El fósforo (P) en forma de fosfato inorgánico participa en la transferencia de energía, así como en el metabolismo de nitrógeno y del carbono. Sin embargo, este elemento tan esencial se encuentra en baja disponibilidad en los suelos, debido a su baja solubilidad y alta adsorción en el suelo (Bielecki, 1973).

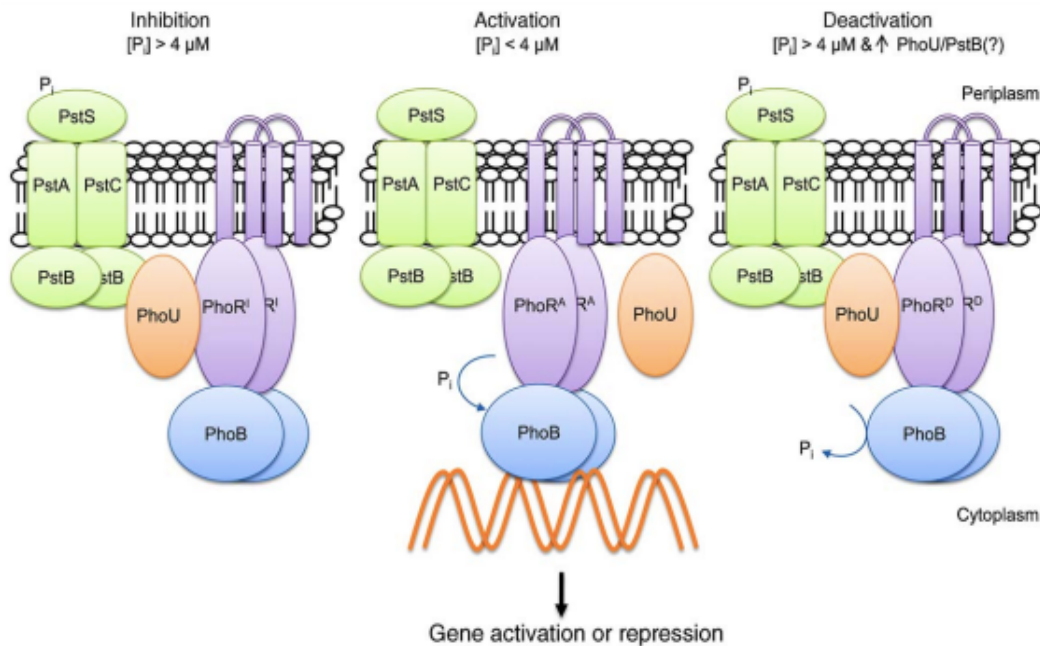


Figura 2. Modelo del funcionamiento del sistema de dos componentes PhoB-PhoR. Los procesos de señalización de inhibición, activación y desactivación corresponden a diferentes estados de PhoR: un estado de inhibición (PhoR^I), un estado de activación (PhoR^A), y un estado de desactivación (PhoR^D). La proteína de unión a P_i PstS está completamente saturado cuando P_i está en exceso. En estas condiciones, se propaga una señal a PhoR que conduce a la formación de PhoR^I, que interfiere con la fosforilación de PhoB. No existe tal señal en condiciones de limitación de P_i (o ausencia de un componente Pst), lo que lleva a un estado PhoR^A que actúa como un fosfo-donante para la autofosforilación de PhoB. Después de un período de limitación de P_i , PhoR^D promueve la desfosforilación de fosfo-PhoB. La formación de PhoR^D requiere una mayor cantidad de PhoU o PstB además del exceso de P_i (Tomado de Hsieh & Wanner, 2010).

La respuesta bacteriana bajo limitación de fosfato más estudiada es la del sistema de dos componentes PhoR y PhoB. La señalización por fosfato inorgánico ambiental (Pi) implica tres procesos distintos, que corresponden a diferentes estados de la histidina quinasa sensora PhoR: un estado de inhibición, un estado de activación y un estado de desactivación (Hsieh & Wanner, 2010) (Fig. 2).

El regulador de respuesta PhoB reconoce las cajas *pho* en la región promotora de los genes regulados por la limitación de fosfato.

Uno de los procesos celulares inducidos en estas condiciones es la remodelación en la membrana. Se ha propuesto la degradación de los fosfolípidos de la membrana para obtener el P de estas moléculas y poder ocuparlo en otros procesos vitales para la célula como la síntesis de los ácidos nucleicos.

Cuando *S. meliloti* 1021 se cultiva en medios con concentraciones suficientes de fosfato, los principales lípidos de membrana sintetizados son PG, CL, PE y PC. En contraste, cuando se cultiva en medios con concentraciones limitantes de fosfato, la mayor parte de sus fosfolípidos son reemplazados por lípidos de membrana sin fósforo como el sulfolípido sulfoquinovosil diacilglicerol, los diacilgliceril *N,N,N*-trimetilhomoserina y los lípidos de ornitina (Geiger *et al.*, 1999).

En *S. meliloti*, la fosfolipasa PlcP se induce en condiciones de limitación de fosfato, degrada a fosfolípidos y el diacilglicerol (DAG) formado sirve como sustrato para la biosíntesis del lípido de membrana sin fósforo DGTS (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010).

Por otra parte, en la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, en condiciones de crecimiento limitantes de fosfato se ha propuesto que, las funciones del PG pueden ser reemplazadas por el SQDG, las funciones de PC por los DGTS, y las de PE por los LO (Benning *et al.*, 1995).

3. Sulfoquinovosil diacilglicerol, estructura y descubrimiento.

El SQDG es un glicoglicerolípido caracterizado por tener en su estructura el grupo cabeza 6-desoxi-6-sulfoquinovosa en la posición *sn*-3 del esqueleto del glicerol y 2 ácidos grasos unidos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 (Fig. 3).

Los SQDG fueron aislados y descritos por primera vez por Benson y colaboradores en 1959. En este estudio se cultivaron microorganismos fotosintéticos como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Rhodospirillum rubrum* y plantas superiores como cebada, trébol, cloroplastos de espinaca de Nueva Zelanda, cebollín y secciones verdes de cóleos en presencia de $^{35}\text{SO}_4$. Los lípidos polares solubles en etanol/cloroformo fueron extraídos y separados por cromatografía de capa fina de dos dimensiones (TLC 2D) (Benson *et al.*, 1959).

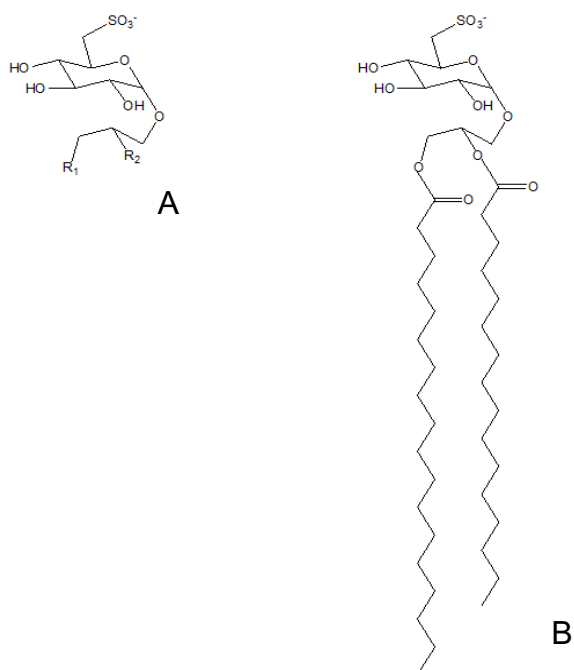


Figura 3. Estructura general del sulfolípid SQDG (R_1 y R_2 corresponden a grupos acilo) (A) y estructura desarrollada de un SQDG (B).

Se identificó al SQDG como un compuesto que podía escindirse mediante la β -galactosidasa de *E. coli* y en un principio se propuso que fuera un 6-desoxi-6-sulfo- β -D-galactósido (Benson *et al.*, 1959). Posteriormente, la estructura del

sulfolípido se definió como un 6-desoxi-6-sulfo- α -D-glucósido (un α -sulfoquinovósido) unido a diacilglicerol (DAG) como se describe en Daniel *et al.*, (1961). De manera independiente, Miyano y Benson (1962) sintetizaron sulfoquinovosil glicerol (SQGro) por oxidación con permanganato del alil- α -sulfoquinovósido. En esta oxidación se formó una mezcla de dos diastereoisómeros; uno de ellos fue cristalizado, permitiendo su purificación. Este resultó ser idéntico a la forma natural. Poco después, la asignación estructural basada en estas observaciones colectivas se confirmó mediante un análisis cristalográfico de rayos X de la sal de rubidio del SQGro, obtenida por deacilación de una muestra de SQDG derivada de plantas (Okaya, 1964). Shibuya y colaboradores (1963) analizaron compuestos solubles en agua marcados con azufre radiactivo, e identificaron tentativamente a la sulfoquinovosa (SQ) en extractos de *Chlorella*. En ese mismo año, A.A. Benson propuso correctamente que la SQ es el grupo cabeza donante para la biosíntesis de sulfolípidos (Benson, 1963). Por otra parte, G.A. Barber fue el primero en sugerir que la SQ podría estar formada por una 4-ceto-6-desoxi- α -D-glucosa (Barber, 1963). Años después la estructura del SQDG fue confirmada por análisis de espectrometría de masas (Budzikiewicz *et al.*, 1973; Gage *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997).

4. Distribución del SQDG y su abundancia en plantas, algas y bacterias

El azufre (S) es un nutriente requerido por plantas y animales para realizar diversas funciones. Este compuesto está presente en prácticamente todas las proteínas y de esta manera es un elemento absolutamente esencial para todos los seres vivos.

La mayoría del S presente en los organismos vivos se encuentra en plantas, pero también podemos encontrar S en pequeñas cantidades contenidas en microorganismos y en animales. Aproximadamente la mitad de este S en la biosfera está presente dentro de los sulfolípidos, y la otra mitad está contenida en las proteínas. Se estima que la síntesis anual total de sulfolípidos es del orden de 10^{13} kg por año (Harwood & Nicholls, 1979).

Se ha estimado que el SQDG es una de las especies más abundantes de los compuestos que contienen S en la biosfera en una escala comparable con los aminoácidos

comunes cisteína y metionina, y por lo tanto, desempeña un papel importante en el ciclo biogeoquímico mundial del S (Goddard-Borger & Williams, 2017).

La cantidad de SQDG varía según el organismo que lo sintetice. A. Radunz (1969) separó SQDG de distintos organismos por TLC y determinó que en las hojas de la planta *Antirrhinum* hay un 5.2%, en sus cloroplastos 4.7%, en *Dryopteris* 4%, mientras que en el alga *Fucus* 18.3%, en el alga roja *Batrachospermum* 14.9%, en la cianobacteria *Oscillatoria* 13.9% y en la alfaproteobacteria *Rhodopseudomonas* 2.6% respecto a los lípidos totales, por citar algunos ejemplos. Sin embargo, existen organismos como la cianobacteria *Prochlorococcus* que sintetiza hasta el 70% de SQDG o *Synechococcus* que sintetiza el 50% respecto a los lípidos totales (Van Mooy *et al.*, 2006).

El SQDG se encuentra en las membranas de bacterias fotosintéticas y en las membranas tilacoidales de los cloroplastos por lo que se le ha asociado con la fotosíntesis (Gounaris *et al.*, 1986). Sin embargo, existen organismos que sintetizan SQDG pero no son fotosintéticos, por ejemplo, *S. meliloti* (Weissenmayer *et al.*, 2000), *Aureimonas endophytica* (Li *et al.*, 2017) diferentes especies de *Caulobacter* y *Brevundimonas* (Abraham *et al.*, 1997), e incluso bacterias Gram-positivas (Langworthy *et al.*, 1976; Alcaraz *et al.*, 2008) y en la diatomea no fotosintética *Nitzschia alba* (Anderson *et al.*, 1978).

5. Biosíntesis del SQDG

Durante la primera fase de investigación, tratando de resolver la vía biosintética para el SQDG en plantas, se aislaron cloroplastos que sirvieron como un modelo fácil y fueron empleados en numerosos estudios (Haas *et al.*, 1980; Joyard *et al.*, 1986; Kleppinger-Sparace & Mudd, 1987; Pugh *et al.*, 1995; Roy & Harwood 1999). Resultados de estos experimentos condujeron a la formación de SQDG en los cloroplastos. Por tanto, estos organelos deben contener la maquinaria biosintética para proporcionar S y carbono (C) a los precursores de la biosíntesis de SQDG.

Por otra parte, Heinz y colaboradores sintetizaron UDP-SQ, el donante del grupo principal para la biosíntesis del SQDG propuesto, de esta manera, pudieron analizar la SQDG sintasa en ensayos con cloroplastos (Heinz *et al.*, 1989). Este ensayo se utilizó para caracterizar la SQDG sintasa y determinar su localización en el interior de la membrana de la envoltura interna de cloroplastos (Seifert & Heinz,

1992; Tietje & Heinz, 1998). 13 años después Yu y colaboradores describieron la función de esta sintasa de SQDG (Yu *et al.*, 2002).

5.1. Genes para la biosíntesis de SQDG

Después de casi más de 30 años de haber sido descubierto y elucidado estructuralmente el SQDG por Benson y colaboradores, los genes para la biosíntesis de SQDG en *Rhodobacter sphaeroides* fueron descubiertos. Las mutantes en la biosíntesis de SQDG se identificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) a partir de células mutagenizadas químicamente con nitrosoguanidina. Después de la complementación genética mediante la introducción de cósmidos, se identificó el gen *sqdA* (Benning y Somerville, 1992a), así como dos genes que formaban parte de un operón de tres genes en el orden *sqdB*, ORF2, *sqdC* (Benning & Somerville, 1992b). Se identificó un cuarto gen para la biosíntesis de SQDG (*sqdD*) mediante la inactivación por inserción del ORF2 flanqueado por los genes *sqdB* y *sqdC* (Rossak *et al.*, 1995).

Por otra parte, en 1996, Güler y colaboradores identificaron al ortólogo de SqdB de *R. sphaeroides* en cianobacterias. También identificaron un ORF que codifica para una glicosiltransferasa que es esencial para la biosíntesis del SQDG al que denominaron SqdX pero que no tiene ninguna homología con los productos de los genes *sqdA*, *sqdC* o *sqdD* de *R. sphaeroides*. En plantas, el ortólogo de SqdB, fue identificado y anotado como SQD1 en 1998 por Essigman y colaboradores, mientras que, en el año 2002, Yu y colaboradores describieron que el ortólogo de SqdX, anotado como SQD2 en plantas, transfiere sulfoquinovosa al anclaje lipídico de diacilglicerol (DAG). Parece que el sistema para la síntesis de SQDG en las cianobacterias, se ha conservado a través de la evolución de las cianobacterias en cloroplastos y por lo tanto comparte el mismo sistema con las plantas (Ver figura 4).

SqdB (llamada SQD1 en plantas) parece ser el único componente de la biosíntesis de SQDG que tiene ortólogos en todos los organismos que forman sulfolípidos (Benning *et al.*, 2008).

5.2. Funciones de los genes para la biosíntesis de SQDG

Sanda *et al.* (2001) propusieron que la formación de UDP-sulfoquinovosa, a partir de UDP-glucosa y un donante de S era catalizada por las proteínas bacterianas SqdB o las proteínas ortólogas de la planta SQD1. Para investigar el mecanismo enzimático subyacente y dilucidar la *síntesis de novo* de ácidos sulfónicos en los sistemas biológicos, se desarrolló un ensayo *in vitro* para la proteína SQD1 recombinante de *Arabidopsis thaliana* sintetizada en *E. coli*. Entre los diferentes posibles donantes de azufre probados, el sulfito condujo a la formación de UDP-sulfoquinovosa (UDP-SQ) en presencia de UDP-glucosa y SQD1 (Fig. 4).

El SQDG que se encuentra en las membranas de los organismos fotosintéticos, se sintetiza a través de dos reacciones sucesivas. Primero, UDP-SQ se sintetiza a partir de UDP-glucosa y sulfito por la UDP- sintasa, que está codificada por los genes *sqdB* o su ortólogo *SQD1* (Sanda *et al.*, 2001). Luego, la SQ se transfiere de UDP-SQ a DAG por la glicosiltransferasa SQDG sintasa, que está codificada por los genes *sqdX* o su ortólogo *SQD2* (Yu *et al.*, 2002; Fig. 4).

Para demostrar directamente que *SQD2* codifica la SQDG sintasa y probar si las dos proteínas *SQD1* y *SQD2* de *Arabidopsis thaliana* representaban la maquinaria biosintética específica de la biosíntesis de sulfolípidos en plantas, estos dos genes se coexpresaron en *E. coli*. Esta bacteria no contiene SQDG, sin embargo, al expresar e inducir estos genes, *E. coli* fue capaz de sintetizarlo (Yu *et al.*, 2002).

La ruta de biosíntesis del SQDG en *R. sphaeroides*, en las que se necesita de por lo menos 4 genes, debe ser diferente al sistema *sqdB-sqdX* de cianobacterias

o SQD1-SQD2 en plantas ya que suponemos que, mientras que plantas y cianobacterias sintetizan SQDG a partir del precursor lipídico DAG, *R. sphaeroides* empieza con las partes polares y añade residuos de ácidos grasos al final. Sin embargo, se conoce poco acerca de la reacción enzimática que catalizan las enzimas SqdA, SqdC y SqdD.

Análisis bioinformáticos predicen que SqdA, SqdC y SqdD son similares a una aciltransferasa, a una reductasa, y a una glicosiltransferasa respectivamente. Rossak *et al.* (1995) describen que la mutación en el gen *sqdD* en *R. sphaeroides* resulta en la acumulación UDP-SQ. Al eliminar el gen *sqdD*, queda funcional el gen *sqdB* en el operón *sqdBDC* y, por tanto, indica que SqdB sintetiza UDP-SQ tal como se demostró posteriormente (Sanda *et al.*, 2001).

Aunque no se conoce aún la función de los genes *sqdA*, *sqdC* y *sqdD* hay trabajos que nos dan pistas acerca de la posible función de *sqdD* en la vía de biosíntesis de este lípido. SqdD presenta homología a las glicosiltransferasas, pero no es una proteína homóloga a SQD2 o a SqdX ya que cada una pertenece a una familia diferente de glicosiltransferasas. SqdC está anotada como perteneciente a la familia de epimerasas/dehidratasas dependientes de NAD y su mutación en *R. sphaeroides* resultó en un decremento de la cantidad de SQDG sintetizado de un 90% y en la acumulación del intermediario acuoso sulfoquinovosil dihidroxiacetona detectado mediante TLC y analizado mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (Rossak *et al.*, 1997). Este resultado sugiere que la posible glicosiltransferasa SqdD transfiere la SQ de UDP-SQ a dihidroxiacetona (Fig. 4). Si esto es cierto, SqdC podría ser responsable de reducir sulfoquinovosil dihidroxiacetona a sulfoquinovosil glicerol (Fig. 4). Aparentemente, el producto del gen *sqdC* es necesario para una biosíntesis óptima de sulfolípidos, pero no cataliza ninguna reacción esencial en la vía o puede ser reemplazado funcionalmente en cierta medida por una proteína diferente.

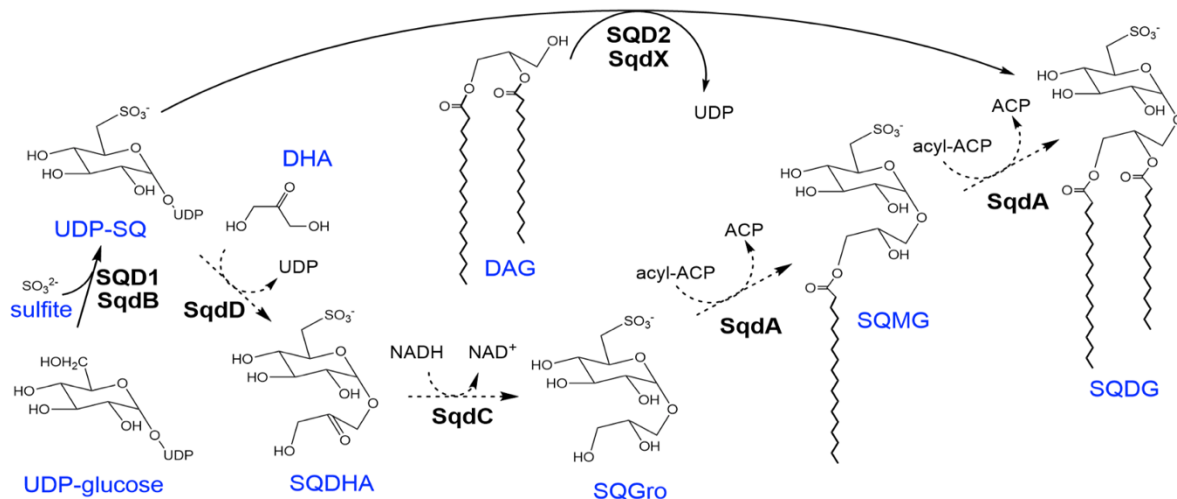


Figura 4. Vías para la biosíntesis de SQDG. En todos los organismos que producen SQDG, la biosíntesis comienza con el ensamblaje de UDP-sulfoquinovosa (UDP-SQ) a partir de UDP-glucosa y sulfite utilizando la enzima SqdB o su ortólogo SQD1. En cianobacterias y plantas, SqdX o SQD2 transfieren el grupo sulfoquinovosa de UDP-SQ a diacilglicerol (DAG), lo que lleva a la formación de sulfoquinovosa diacilglicerol (SQDG). La ruta propuesta para la biosíntesis de SQDG en *R. sphaeroides* después de la formación de UDP-SQ se indica con líneas discontinuas. SqdD transfiere sulfoquinovosa de UDP-SQ a dihidroxiacetona (DHA), lo que conduce a la formación de sulfoquinovosil dihidroxiacetona (SQDHA). SqdC reduce el grupo cetona en SQDHA para formar sulfoquinovosil glicerol (SQGro). SqdA tiene homología con las aciltransferasas y podría realizar una o dos de las acilaciones requeridas para formar SQDG a través de sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG). Fig. 1 de Cuevas-Rivas *et al.* (2022)

SqdA presenta homología a aciltransferasas y pudiera estar implicada en la acilación de uno o los dos grupos hidroxilo del SQGro. De manera análoga, en *Xanthomonas campestris* una aciltransferasa cataliza la transferencia de grupos acilo a la molécula de glicerofosfolina para formar fosfatidilcolina (Moser *et al.*, 2014). Con esta información se ha sugerido el posible papel que desempeñan estas enzimas en la vía de biosíntesis del SQDG en *Rhodobacter sphaeroides*. (Fig. 4).

6. Distribución de los genes *sqdB/SQD1*

Las secuencias que codifican para los genes *sqdB/SQD1* están presentes en una amplia gama de arqueas, bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-), plantas, algas y cianobacterias. Posiblemente no todos estos organismos producen SQDG, ya que en muchos organismos solo está presente este gen y no los demás genes esenciales para la biosíntesis de SQDG. También es posible que la UDP-SQ sirva como donador del grupo sulfoquinovosilo para la síntesis de compuestos

distintos al SQDG, por ejemplo, la presencia de sulfoquinovosa en *N*-glicanos de la arquea *Sulfolobus acidocaldarius* que son hexasacáridos altamente ramificados (Zähringer *et al.*, 2000; Goddard-Borger & Williams, 2017).

La figura 5 muestra la relación aproximada de secuencias de proteínas de tipo *sqdB*/SQD1 predichas en bacterias, arqueas, algas y plantas. Las UDP-SQ sintasas están estrechamente relacionadas con las UDP-glucosa epimerasas y son también similares a enzimas modificadoras de azúcares de nucleótidos. Por tanto, muchas de las presuntas UDP-SQ sintasas no se anotan correctamente en bases de datos públicas. Por otro lado, son necesarios análisis bioquímicos-que permitan determinar que la proteína sea una UDP-SQ sintasa (revisado en Benning *et al.*, 2008).

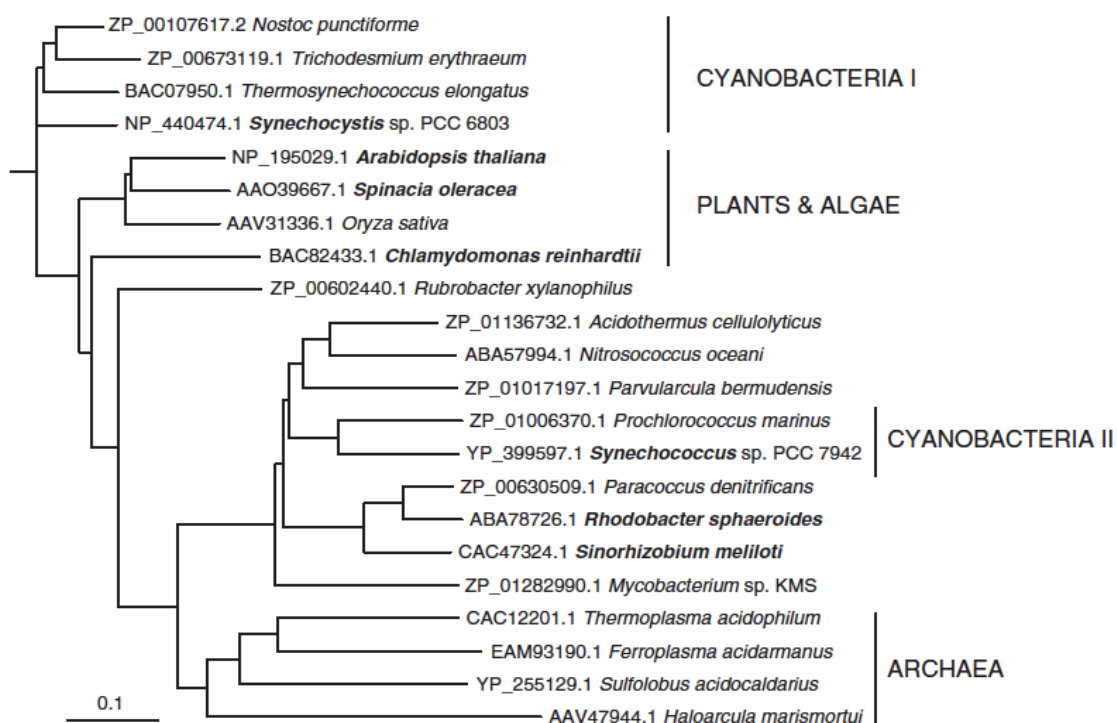


Figura 5. Árbol enraizado que muestra la relación de las secuencias seleccionadas de las proteínas SQD1/SqdB. Las secuencias se alinearon y el árbol fue construido utilizando el software Clustal W. Se indican los números de acceso de Genebank y los nombres de especies. Especies en las que la UDP-SQ sintasa respectiva se verificó experimentalmente se muestran en negrita (tomado de Benning *et al.*, 2008).

7. Papel biológico del SQDG

Desde el descubrimiento del SQDG en 1959 por Benson *et al.* (1959) hasta la fecha, se han propuesto diversos papeles biológicos para este lípido azufrado, principalmente en organismos fotosintéticos, debido a la asociación del SQDG con la membrana tilacoide y varias proteínas fotosintéticas. Los tres principales papeles biológicos que se han considerado y estudiado son: (1) como un lípido esencial para el funcionamiento del fotosistema II (PS II), (2) como un sustituto del fosfolípido aniónico fosfatidilglicerol (PG) en condiciones deficientes de fósforo y (3) como reserva de azufre en condiciones limitantes de este compuesto (Benning, 1998; Mizusawa & Wada, 2012; Frentzen, 2004; Kobayashi, 2016; Jones, 2007; Sugimoto *et al.*, 2010). Si bien hay evidencia que respalda la participación del SQDG en todas estas funciones, en la mayoría de los organismos el requerimiento del SQDG no parece ser absoluto.

7.1. Función esencial del SQDG en condiciones deficientes de fosfato

Cuando *S. meliloti* 1021 se cultiva en medios con concentraciones normales de fosfato, se sintetizan fosfolípidos predominantemente en sus membranas. En contraste, cuando se cultiva en medios con concentraciones deficientes de fosfato, la mayor parte de sus fosfolípidos son reemplazados por lípidos de membrana sin fósforo como el sulfolípido SQDG, diacilgliceriltrimetilhomoserina (DGTS) y los lípidos de ornitina (LO) (Geiger *et al.*, 1999).

De manera similar se ha observado en la bacteria fotosintética *R. sphaeroides*, que en condiciones de crecimiento deficientes de fosfato, las cantidades de PG disminuyen mientras que las del SQDG aumentan, lo que indica que SQDG y PG pueden compensarse entre sí, presumiblemente para mantener el equilibrio adecuado de la carga aniónica en las bicapas lipídicas (Benning *et al.*, 1995).

Por otra parte, Endo *et al.* (2016) demostraron al analizar una mutante en el gen *sqdB* que el SQDG tiene un papel esencial en el crecimiento y la fotosíntesis

de *Thermosynechococcus elongatus*, que no puede complementarse con PG, en condiciones deficientes de fosfato.

De manera análoga, Yu *et al.* (2002) evaluaron un mutante en SQD2 de *Arabidopsis thaliana* y esta mostró un crecimiento reducido en condiciones deficientes de fosfato. Los resultados apoyan la hipótesis de que el SQDG puede funcionar como un sustituto de los fosfolípidos aniónicos bajo esta condición. Junto con el PG, el sulfolípidido contribuye a mantener una interfaz lípido-agua cargada negativamente, que presumiblemente se requiere para la función adecuada de las membranas fotosintéticas.

Tawaraya *et al.* (2018) demostraron las diferencias en la remodelación de los lípidos en los cultivares de arroz cultivados con o sin fosfato. Se recolectaron hojas superiores e inferiores y los lípidos se extrajeron y su composición se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los niveles de monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y SQDG fueron mayores en las hojas de arroz cultivadas en deficiencia de fosfato en comparación a las que se suplementó fosfato, mientras que los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, PG y fosfatidilinositol disminuyeron drásticamente. Estos resultados sugirieron que el reemplazo extensivo de fosfolípidos con glicolípidos sin fósforo es un mecanismo subyacente a la baja tolerancia a fosfato en los cultivares de arroz.

7.2. Función esencial del SQDG en condiciones deficientes de azufre

En las plantas, el S es un elemento macronutricional utilizado para la síntesis de proteínas y metabolitos que son críticos para su crecimiento (Rausch & Wachter, 2005). Tras la deficiencia de S y por tanto su inanición, *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga verde, y la planta *Arabidopsis thaliana*, aumentan la capacidad de absorción de sulfato y la asimilación primaria de S para la síntesis de aminoácidos que contienen S (Nikiforova *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2004).

Sugimoto *et al.* (2007) descubrieron que cuando *C. reinhardtii*, se expone a condiciones de privación de S, esta alga verde degrada el 85% de SQDG para redistribuir su S a los aminoácidos cisteína y metionina. En este estudio también se

demuestra que la degradación de SQDG está por encima a la de proteínas como la ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, que eran candidatas para la degradación y disponibilidad de las fuentes internas de S. De este modo, se demostró que el SQDG produce una importante fuente interna de S para la síntesis de proteínas durante la fase temprana del proceso de aclimatación debida a la falta de S.

Se sabe que la inducción de la degradación de SQDG en la inanición de S depende de los genes SAC1 y SAC3 en esta alga. También se ha demostrado que el nivel del ARNm de *SQD1* aumenta para aumentar la capacidad de síntesis de SQDG a través de un sistema de inducción diferente del de la degradación de SQDG cuando *C. reinhardtii* es expuesta a condiciones limitantes de S (Sugimoto *et al.*, 2010).

La utilización de SQDG como lípido de almacenamiento de S es razonable en *C. reinhardtii*, porque este lípido representa hasta el 13% del total de S en las células cultivadas en condiciones donde el S está biodisponible y es prescindible para su crecimiento (Sugimoto *et al.*, 2007).

7.3. Función esencial del SQDG en la fotosíntesis

La caracterización del aparato fotosintético en mutantes deficientes en la síntesis de SQDG ha revelado hasta ahora que SQDG contribuye a la integridad estructural y funcional del complejo del fotosistema II (PSII) en el alga verde *C. reinhardtii*, y en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sato *et al.*, 1995, 2003; Minoda *et al.*, 2002; Kobayashi, 2016).

Organismos mutantes en algunas de las vías del metabolismo de los lípidos han demostrado ser herramientas útiles para investigar *in vivo* las funciones específicas de los lípidos en la fotosíntesis. Un mutante de *Chlamydomonas reinhardtii*, que no sintetiza SQDG, llamada *hf-2*, mostró que la actividad del PSII fue \approx 40% menor que la actividad del PSII del alga silvestre, una mayor sensibilidad a 3-(3, 4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea, un inhibidor del transporte de electrones de Q_A a Q_B , y una tasa de crecimiento más baja (Sato *et al.*, 1995, 2003; Minoda *et al.*, 2002). Habiendo observado esto, se incubaron las membranas tilacoidales aisladas

de la mutante *hf-2 in vitro* con SQDG y como resultado se obtuvo que se revirtió la actividad reducida del PSII. Por lo tanto, se concluyó que el SQDG tiene la función específica de mantener las propiedades del PSII.

Sin embargo, hay estudios que demuestran que la falta de SQDG en algunos organismos que lo sintetizan no es requisito para el óptimo funcionamiento del PSII. Por ejemplo, Güler *et al.*, 1996 informaron que la falta de SQDG no afectó el crecimiento o la fotosíntesis de manera perjudicial en *Rhodobacter sphaeroides* o en *Synechococcus* sp. PCC7942. Aoki *et al.* (2004) estudiaron 2 cianobacterias mutantes deficientes en SQDG: *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus* sp. PCC7942 y encontraron que el mutante de *Synechococcus* mostró un nivel normal de actividad de PSII, sin importar la ausencia de SQDG a diferencia del mutante de *Synechocystis* donde la actividad del PSII si se vio afectada.

Por lo tanto, el papel biológico del SQDG en la fotosíntesis no es general para todos los organismos que sintetizan SQDG y esto puede ser debido a que el reemplazo de SQDG por otros lípidos como PG puede compensar parcialmente sus funciones (Nakajima *et al.*, 2018).

8. Degradación de SQDG, SQGro y sulfoquinovosa

Durante mucho tiempo se ha especulado que diferentes organismos podrían haber desarrollado mecanismos para utilizar este abundante sulfolípidos como fuente de C y S. De hecho, el descubrimiento y análisis de SQDG en sí proporcionó alguna indicación de que las bacterias eran capaces de utilizar sulfolípidos vegetales, ya que la SQ podría ser liberada de SQDG por la acción de la β -galactosidasa de *E. coli* "altamente pura".

Las primeras observaciones también identificaron el catabolismo de SQDG dentro de las algas verdes. Dentro de estos organismos, SQDG sirve como un depósito de azufre que se puede movilizar en las primeras etapas de la inanición de azufre, además de su papel normal en la fotosíntesis.

No está claro si esta estrategia de supervivencia se aplica en plantas más complejas, aunque los representantes de diversos filos de plantas son ciertamente capaces de catabolizar SQDG. Más recientemente, se han descubierto los detalles moleculares y genéticos del catabolismo de SQDG en bacterias, que, a su vez, han proporcionado evidencia genética de que algunos hongos, animales y protistas también pueden degradar SQDG.

Estos desarrollos recientes demuestran que existen múltiples estrategias catabólicas para la degradación de SQDG que comúnmente involucran a más de un organismo actuando en conjunto para lograr la mineralización de SQDG a sulfato, aunque determinados aislados bacterianos por sí solos pueden lograr una biomineralización completa. Estos procesos se pueden dividir en cuatro pasos: deslipidación, hidrólisis de glucósidos, degradación 'sulfoglicolítica' y mineralización de sulfonato (Revisado en Goddard-Borger & Williams, 2017, Fig. 6).

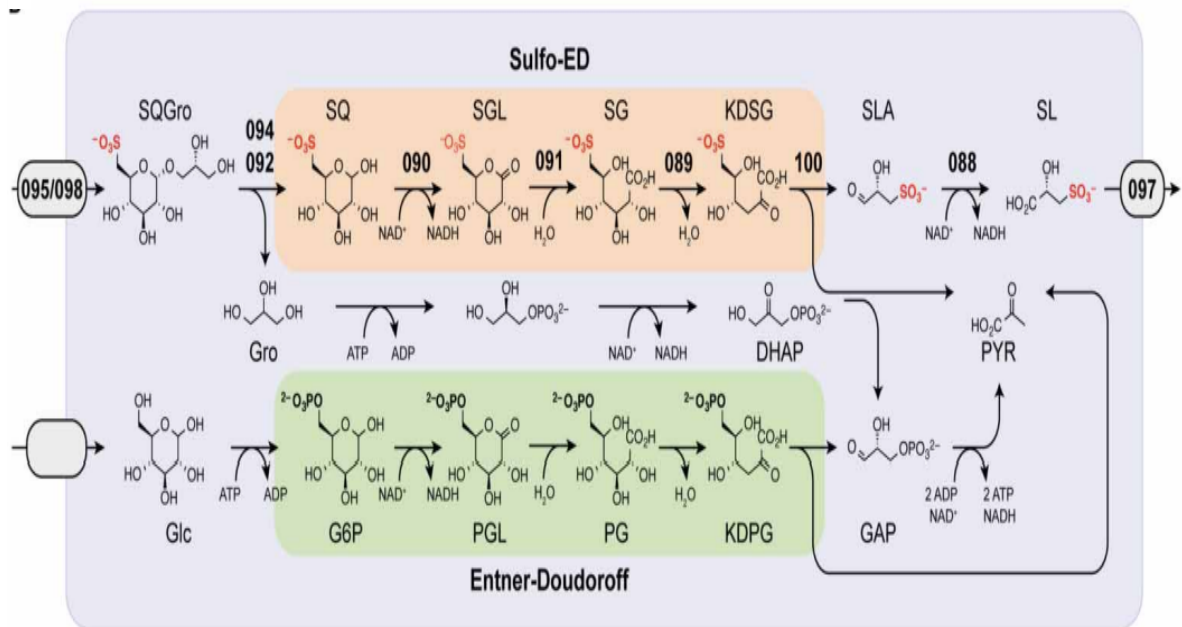


Figura 6. Comparación directa de las transformaciones bioquímicas de la vía glucolítica sulfo-ED y la vía clásica ED. Mientras que SQGro se representa para comparar sus similitudes catabólicas con la glucosa, la propia SQ también se importa y se alimenta directamente en la vía sulfo-ED (Tomado de Goddard-Borger & Williams, 2017).

8.1. Vía de desulfuración oxidativa, una nueva vía sulfoglicolítica descrita.

Recientemente, Sharma *et al.* (2022) describieron una vía para la degradación de SQ que involucra la desulfuración oxidativa para liberar sulfito y permitir la utilización de todo el esqueleto de carbono del azúcar para apoyar el crecimiento del patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens*. La SQ o su glucósido sulfoquinovosil glicerol son importados a la célula por un sistema transportador de cassette de unión a ATP con una proteína de unión a SQ asociada. Una sulfoquinovosidasa hidroliza el glucósido SQ y una sulfoquinovosa monooxigenasa dependiente del mononucleótido de flavina actúa sobre la SQ liberada, junto con una flavina reductasa dependiente de NADH, para liberar sulfito y 6-oxo-glucosa. Una oxidorreductasa dependiente de NAD(P)H reduce la 6-oxo-glucosa a glucosa, lo que permite la entrada en vías metabólicas primarias. Esta vía de la sulfoquinovosa monooxigenasa se distribuye a través de alfa y betaproteobacterias y es especialmente frecuente dentro del orden Rhizobiales (Sharma *et al.*, 2022).

9. SQDG como potencial agente terapéutico y antiviral, un reto en la biotecnología

La alta fuerza aniónica del azúcar sulfonado del grupo cabeza en el sulfolípidos hace de este lípido un detergente natural muy interesante para aplicaciones biotecnológicas (Benning *et al.*, 2008).

Quasney *et al.* (2001) examinaron los efectos biológicos del SQDG en la línea celular de cáncer gástrico humano SNU-1. Las células SNU-1 se cultivaron en ausencia y en presencia SQDG, se determinó la proliferación celular y la viabilidad. La proliferación de células SNU-1 se inhibió al 100%, en comparación con el número de células SNU-1 cultivadas en ausencia de SQDG. Además, la incubación de las células con SQDG causó la muerte celular necrótica.

Bergé *et al.* (2002) mencionan resultados interesantes de estudios con el SQDG de la microalga roja *Porphyridium cruentum* en donde se evaluó la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa. Los resultados demostraron que se inhibió

fuertemente el crecimiento de adenocarcinoma de colon humano DLD-1 y, en menor medida, el adenocarcinoma de mama humano MCF-7, el adenocarcinoma de próstata humano PC-3 y el melanoma maligno M4 Beu de líneas celulares humanas.

Plougerné *et al.* (2013) reportan que el SQDG aislado del alga *Sargassum vulgare* exhibe una fuerte actividad contra el virus del herpes simple tipo 1 y 2.

El Baz *et al.* (2013) investigaron las estructuras y actividades biológicas de los sulfolípidos de las macroalgas mediterráneas *Dilophus fasciola* y *Taonia atomaria*. Los autores destacaron las actividades antibacterianas y antivirales de los SQDG y SQMG (sulfoquinovosilmonoacilgliceroles) en células de carcinoma hepatocelular humano (Hep 62) y adenocarcinoma de mama MCF-7.

Bharitkar *et al.* (2014) evaluaron la actividad antibacteriana y antiviral del SQDG aislado de las hojas de *Azadirachta indica* comúnmente llamado neem. La actividad antimicrobiana se evaluó contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y virus del herpes simple. SQDG mostró una actividad inhibitoria significativa contra *Salmonella typhi* y dos aislados de *Shigella dysenteriae*, *E. coli* y *Vibrio cholerae*.

Hielscher-Michael *et al.* (2016) reportaron que los SQDG's de algas son potentes inhibidores de la enzima glutaminil ciclasa asociada con la enfermedad de Alzheimer.

Con toda esta información reportada en numerosas publicaciones, el SQDG podría ser usado como un fármaco fitoterapéutico para controlar las infecciones microbianas o enfermedades oncológicas ya que la mayoría de los consumidores tienen una mejor aceptación de las fitomedicinas que de los fármacos sintéticos.

10. *Sinorhizobium meliloti*

S. meliloti 1021 es una α - proteobacteria Gram-negativa del suelo que puede formar nódulos fijadores de nitrógeno en simbiosis con leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*.

En esta especie son comunes dos megaplásmidos: megaplásmido 1 (plásmido Sym) y megaplásmido 2 (plásmido Exo), con respectivos pesos moleculares de 1354 y 1683 kb. En varios laboratorios se obtuvieron las secuencias completas del cromosoma y los megaplásmidos (Galibert *et al.*, 2001).

S. meliloti suele sintetizar PG, CL, PE, MMPE y PC como sus principales lípidos de membrana cuando se cultiva en medios de cultivo ricos en fosfato. Por el contrario, en condiciones limitantes de fósforo, *S. meliloti* reemplaza la mayoría de sus fosfolípidos por lípidos de membranas que no contienen fósforo, como sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG), lípidos de ornitina (LO) y diacilgliceril *N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS). Estos lípidos de membrana libres de fósforo no son importantes para el estilo de vida simbiótico de *S. meliloti*, pero son necesarios para un crecimiento óptimo en condiciones de limitación de fósforo (López-Lara *et al.*, 2005).

Tras la limitación de fósforo, en *S. meliloti* PC y PE se degradan por una fosfolipasa C (PlcP) que convierte la PC en fosfocolina y diacilglicerol (DAG) (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010; Fig. 7). DAG, a su vez, es el ancla lipídica de biosíntesis de DGTS (Klug & Benning, 2001).

Durante la adaptación a condiciones hipo-osmóticas, *S. meliloti* sintetiza su versión de los glucanos periplásmicos osmoregulados denominados “glucanos cíclicos β -1,2”, que pueden contener residuos de fosfoglicerol derivado de PG. La fosfoglicerol transferasa CgmB de *S. meliloti* cataliza una reacción similar a la del fosfoglicerol transferasa MdoB de *E. coli*, ya que convierte los glucanos cíclicos neutros en glucanos cíclicos aniónicos produciendo DAG como segundo producto.

Uno de los genes inducidos en la simbiosis temprana es *dgkA*, lo que sugiere que en condiciones simbióticas, DAG se fosforila a ácido fosfatídico (PA), reingresando a la ruta de biosíntesis de fosfolípidos (Fig. 7). Bacterias como *S. meliloti*, tienen al menos dos estilos de vida totalmente diferentes, uno como bacteria del suelo expuesta a estrés por limitación de fósforo y otra como una bacteria simbiótica en asociación con la planta huésped leguminosa donde, al menos para la bacteria, los aportes de fósforo son abundantes.

Entre los dos estilos de vida diferentes de *S. meliloti*, la composición de lípidos de membrana es claramente diferente. En condiciones simbióticas, la membrana está compuesta por fosfolípidos mientras que, en limitación de fósforo, los fosfolípidos son reemplazados en gran medida por lípidos de membrana que no contienen fósforo en su estructura.

El recambio de lípidos de la membrana en *S. meliloti* no se limita solo al grupo cabeza, sino que también involucra cambios en cadenas de grupos acilo. En *E. coli*, así como en *S. meliloti*, los mutantes deficientes en *fadD* [acil-coenzima A (CoA) sintetasa] no pueden consumir ácidos grasos libres y, por lo tanto, se acumulan durante la fase estacionaria de crecimiento. En particular, estos ácidos grasos libres parecen derivarse de los lípidos de la membrana bacteriana (Pech-Canul *et al.*, 2011). Una actividad importante que contribuye a la liberación de estos ácidos grasos libres es la predicha fosfolipasa A tipo patatin-like SMc01003. Sorprendentemente, SMc01003 no es una fosfolipasa A sino una lipasa DAG que puede degradar DAG a monoacilglicerol (MAG) y un ácido graso y luego MAG a otro ácido graso y glicerol (Sahonero-Canavesi *et al.*, 2015).

ANTECEDENTES

1. Identificación del operón *sqdBDC* en *S. meliloti* y participación de *sqdB* en la formación de SQDG.

En estudios anteriores de la bacteria *S. meliloti* 1021 se identificó el operón *sqdBDC* (Weissenmayer *et al.*, 2000) análogo al descrito para la bacteria fotosintética *R. sphaeroides* (Benning & Somerville, 1992b). En ese mismo estudio se obtuvo una mutante en *sqdB* por inserción de un cassette de resistencia a neomicina dentro del ORF que codifica para SqdB, a la que se denominó SLD11. Después del análisis del perfil lipídico de la cepa SLD11, se confirmó que esta mutante no formaba SQDG (Fig. 8). Posteriormente, esta mutante se complementó con *sqdB* y al observar nuevamente la formación de SQDG se confirmó que *sqdB* es esencial para la biosíntesis de sulfolípidos (Weissenmayer *et al.*, 2000).



Figura 8. Una mutante de *S. meliloti* en el gen *sqdB* no produce SQDG. Cromatografía en capa fina de extractos lipídicos de una cepa silvestre de *S. meliloti* (WT) y de una cepa derivada mutada en *sqdB* (SDL11) crecidos en presencia de [³⁵S]- sulfato. Se indican las diluciones de los extractos (1:3 o 1:10). Los lípidos se visualizaron por exposición a película de rayos X (Figura tomada de Weissenmayer *et al.*, 2000).

Además del operón *sqdBDC*, en *R. sphaeroides* se requiere del gen *sqdA* para la biosíntesis de SQDG ya que al generarse una mutante en este gen y evaluar su perfil lipídico mediante cromatografía de capa fina se observó la falta de SQDG y al complementar esta mutante con *sqdA* reaparece este lípido de membrana sin fósforo (Benning & Somerville, 1992a). A pesar de no haberse caracterizado la función del gen *sqdA*, sí se pudo observar que juega un papel importante en la biosíntesis del SQDG.

2. Búsqueda de un homólogo a SqdA en *S. meliloti*

En el genoma de *S. meliloti* 1021 no hay un ORF anotado como SqdA, y si bien se conoce que en esta bacteria está presente el operón *sqdBDC*, no se ha identificado aún a *sqdA*. Es aquí el punto de partida para el inicio de nuestro trabajo por buscar un homólogo de este gen y comprobar su papel como gen esencial para la biosíntesis de SQDG en *S. meliloti*.

Al realizar un BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool Protein, por sus siglas en inglés) con la secuencia de aminoácidos de SqdA de *R. sphaeroides* (Benning *et al.*, 1992a) en el proteoma de *S. meliloti* (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>) se encontró homología con la proteína SMc02490. SMc02490 y SqdA presentan un porcentaje de identidad del 39% y un valor $e = 1.2 \times 10^{-53}$ con una cobertura del 88% de la secuencia de ambas proteínas. SqdA consta de 294 aminoácidos y SMc02490 de 307 aminoácidos.

La secuencia de SMc02490 es similar a la secuencia de algunos miembros de la super familia de aciltransferasas. Los miembros de esta super familia catalizan la transferencia de un grupo acilo a otro sustrato. Con esta información se podría predecir que SMc02490 podría estar implicado en la acilación de un sustrato para formar el sulfolípidos SQDG.

Se ha reportado que en medio mínimo limitado en fosfato se incrementa la transcripción del gen *smc02490* como también lo hacen otros genes involucrados en la biosíntesis de lípidos de membrana sin fósforo en cepas de *S. meliloti* (Krol & Becker, 2004).

En proteobacterias, los genes cuya expresión se modula por la concentración externa de fosfato inorgánico están normalmente regulados por la proteína PhoB. Esta proteína se une a un motivo conservado de ADN (llamado caja *pho*) que se encuentra en la región promotora de los genes. Geiger *et al.* (1999) demostraron que la formación de *novo* del lípido DGTS y el aumento de la cantidad de los LO y SQDG en condiciones de limitación de fosfato es controlada por PhoB. Así en un análisis global de transcripción de genes de *S. meliloti* bajo condiciones de limitación de fosfato y dependientes de PhoB se encontraron un total de 86 genes inducidos significativamente (Krol & Becker, 2004). Entre ellos se encontraban al menos cuatro genes necesarios para la biosíntesis de lípidos de membrana libres de fósforo: 1) *smc01847* (*btaA*) y *smc01848* (*btaB*), necesarios para la biosíntesis de DGTS (López-Lara *et al.*, 2005), 2) *smc01127* (*olsB*), necesario para la biosíntesis de LO (Gao *et al.*, 2004), y 3) *smc03961* (*sqdB*), necesario para la biosíntesis de SQDG (Weissenmayer *et al.*, 2000). Entre los genes inducidos también se encontraba a *smc02490*, anotado como proteína hipotética conservada (Krol & Becker, 2004). Posteriormente, Yuan *et al* (2006) identificaron la presencia de una caja *pho* situada a 41 pares de bases del codón de inicio del gen *smc02490*. Estos datos indican que la expresión de *smc02490* está bajo control del regulador PhoB y que su expresión aumenta significativamente en condiciones de limitación de fosfato.

3. Co-existencia de *smc02490* con el operón *sqdBDC*

El análisis con el programa STRING versión 11.5 mostró como el gen *smc02490* y el operón *sqdBDC* presentan co-existencia en diferentes bacterias (Fig. 9).

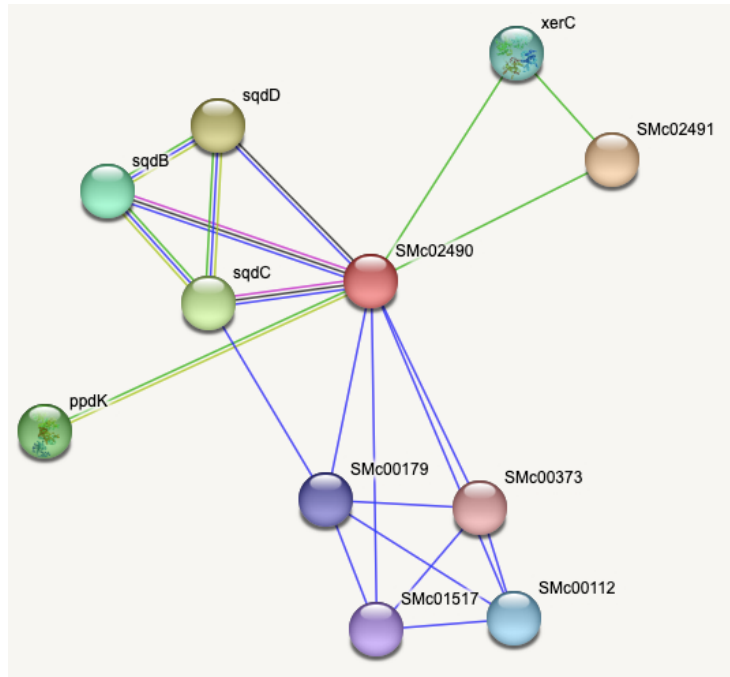


Figura 9. Asociación del gen *smc02490* con otros genes de *S. meliloti*. Las líneas azules indican la co-existencia entre el gen *smc02490* y el operón *sqdBDC*, así como con los genes *smc00179*, *smc00373*, *smc01517* y *smc00112* en diferentes genomas, las líneas verdes indican que el gen *smc02490* se encuentra en la misma vecindad que el gen *xerC*, el gen *smc02491* y el gen *ppdk*. Los genes *sqdB*, *sqdC* y *sqdD* están relacionados entre sí por co-existencia en diferentes organismos (línea azul), vecindad en los genes (líneas verdes oscuras), presencia en una misma publicación (líneas verdes claras). Imagen obtenida de String 11.5 (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bSZPuurifhTB&sessionId=bvRi324jNoLz>).

RELEVANCIA E IMPACTO

Desde hace más de 60 años con el descubrimiento del SQDG comenzó la investigación acerca de la biosíntesis y la función de este lípido de membrana.

Con base en análisis genéticos y bioquímicos se sabe que en plantas, algas y cianobacterias dos proteínas, SQD1 y SQD2 o SqdB y SqdX, son cruciales para la biosíntesis de SQDG. Además, se conoce con precisión las funciones específicas de cada una de estas 2 enzimas.

A pesar de que los primeros genes para la biosíntesis de SQDG se identificaron en la bacteria púrpura *R. sphaeroides* hace 30 años, sus funciones exactas no son conocidas. Es interesante saber como es que el sulfolípidos se ensambla en esta vía de biosíntesis. Una de las primeras estrategias para responder esta interrogante podría ser expresando en *E. coli* los genes *sqdB*, *sqdBD*, *sqdBDC*, *sqdBDCA* en el orden como se cree que suceden las reacciones de biosíntesis de SQDG y analizar los compuestos intermediarios acumulados para comprobar la ruta de biosíntesis del SQDG propuesta en *R. sphaeroides*.

Hacen falta más estudios para concretar la función del sulfolípidos *in vivo*, y que sea ubicua de todos los organismos que formen SQDG, ya que por ejemplo, se ha reportado que este lípido ayuda a dar estructura y funcionalidad al PSII, sin embargo en organismos donde no se produce fotosíntesis como *S. meliloti* aún no es muy claro su papel biológico.

Los SQDGs son compuestos con potencial biotecnológico e interés ecológico. Se necesitan más estudios para ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de estas moléculas. El crear una cepa de *E. coli* super productora de SQDG traería grandes beneficios a la industria, debido a que cultivar esta cepa resulta más fácil y menos costoso en comparación con cultivos vegetales y así perseguir el desarrollo de aplicaciones prácticas.

Los SQDGs presentan una alta fuerza aniónica del azúcar sulfonado del grupo cabeza, lo que hace de este lípido un detergente natural muy interesante para aplicaciones biotecnológicas. Así, los SQDGs exhiben una actividad antiviral remarcable, especialmente contra el virus de la inmunodeficiencia humana. Estos lípidos y sus derivados pueden funcionar como antitumorales, inmunosupresores, fármacos preventivos y antiinflamatorios.

HIPÓTESIS

Mientras que plantas, algas y cianobacterias sintetizan sulfolípidos a partir del compuesto acilado diacilglicerol, *S. meliloti* sintetiza el compuesto polar sulfoquinovosil glicerol, al que posteriormente añade residuos de ácidos grasos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Elucidar la vía de biosíntesis del sulfolípidosulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) en *S. meliloti*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar intermediarios de la ruta de biosíntesis de SQDG.
2. Demostrar la función de la enzima SqdA mediante ensayos enzimáticos.
3. Estudiar la posible función biológica de la nueva ruta para la biosíntesis de SQDG en *S. meliloti*.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente proyecto de doctorado corresponden al siguiente artículo publicado en bioRxiv preprint. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.18.504050>

Formation of sulfoquinovosyl diacylglycerol by acylation of sulfoquinovosyl glycerol

Jessica Y. Cuevas-Rivas¹, Diego Rodríguez-Terrones¹, Napoleón González-Silva¹, Ángeles Moreno-Ocampo¹, Gabriela Guerrero¹, Ed Bergström², Jane E. Thomas-Oates², Otto Geiger¹ and Isabel M. López-Lara^{1*}

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, Mexico.

²Department of Chemistry and Centre of Excellence in Mass Spectrometry, University of York, York, UK.

Short title: Novel pathway for SQDG biosynthesis

*Corresponding author: Isabel M. López-Lara. E-mail: isabel@ccg.unam.mx; Telephone: +52-7773291703

Keywords: sulfoquinovosyl monoacylglycerol, SqdA, acyltransferase, *Sinorhizobium meliloti*, *Cereibacter (Rhodobacter) sphaeroides*.

ABSTRACT

Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) is a membrane-forming lipid present in photosynthetic organisms as well as in distinct bacteria growing in phosphate-limited environments. Four genes for SQDG biosynthesis were previously identified in *Rhodobacter sphaeroides*, the operon *sqdBDC* and *sqdA*. In this work, we found that SMC02490 of *Sinorhizobium meliloti* is an SqdA orthologue. Expression of the *S. meliloti sqdBDC* operon in *Escherichia coli* results in formation of sulfoquinovosyl glycerol (SQGro), while co-expression of this operon together with *smc02490 (sqdA)* results in formation of SQDG. Furthermore, SqdA allows for incorporation of exogenous SQGro into SQDG in *S. meliloti* and in *E. coli* cultures, suggesting that presence of SqdA in bacteria permit them to use environmental SQGro for the biosynthesis of the membrane lipid SQDG. An *in vitro* enzymatic assay for the acyltransferase SqdA was developed. Cell-free crude extracts of *E. coli* expressing *sqdA* can efficiently convert [³⁵S]-sulfoquinovosyl monoacylglycerol into SQDG using as acyl donor

acyl carrier protein. Bioinformatic analyses reveal that this sulfoquinovose acylation pathway for SQDG biosynthesis is delimited to the *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) and *Rhodobacterales* orders of Alphaproteobacteria.

Introduction

Sulfoquinovosyl diacylglycerols (SQDGs) are ubiquitous anionic glycolipids which are among the most abundant sulfur-containing bioorganic compounds. It is estimated that half of the sulfur in the biosphere is present within SQDG, on a scale similar to the amino acids cysteine and methionine (Goddard-Borger and Williams, 2017 and references therein). SQDGs are found in the membranes of all photosynthetic organisms, including higher plants, ferns, mosses, algae, dinoflagellates, diatoms and most photosynthetic bacteria (reviewed in Goddard-Borger and Williams, 2017). However, SQDG is also present in the membranes of some non-photosynthetic bacteria such as members of the *Rhizobiaceae* family (Cedergren and Hollingsworth, 1994), some Caulobacteria (Abraham *et al.*, 1997) as well as in some Gram-positive bacteria (Sprott *et al.*, 2006, Alcaraz *et al.*, 2008). Because they are present in thylakoid membranes, SQDGs were thought to be essential for photosynthesis. However, requirement of SQDG for photosynthesis and growth varies across species (Kobayashi, 2016). Clearly, SQDG has a role as surrogate for phospholipids when their producers grow under phosphate limitation. Substitution of phosphatidylglycerol (PG) by SQDG has been described for different organisms such as *Synechococcus*, *Chlamydomonas* or *Arabidopsis* (Frentzen, 2004). Furthermore, some microorganisms living in oligotrophic environments such as the cyanobacterium *Prochlorococcus*, and the Gram-positive bacteria *Marinococcus*, *Salinicoccus*, and *Bacillus coahuilensis* contain SQDG as the major membrane lipid (Alcaraz *et al.*, 2008; Sprott *et al.*, 2006; Van Mooy *et al.*, 2006). Although only demonstrated for the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, SQDG has been proposed as a sulfur source for protein synthesis during sulfur limitation (Sugimoto *et al.*, 2007).

The first genes for SQDG biosynthesis were discovered 30 years ago in *Rhodobacter sphaeroides*. Mutants in SQDG biosynthesis were identified by thin layer chromatography (TLC) from chemically mutagenized cells. After genetic complementation by introducing wild type cosmids, the *sqdA* gene was identified (Benning and Somerville, 1992a) as well as two genes that were part of a three gene operon in the order *sqdB*, ORF2, *sqdC* (Benning and Somerville, 1992b). A fourth gene for SQDG biosynthesis (*sqdD*) was identified by insertional inactivation of the ORF2 flanked by the *sqdB* and *sqdC* genes (Rossak *et al.*, 1995). The *sqdB* gene from *R.*

sphaeroides was used to identify the first cyanobacterial *sqdB* gene in *Synechococcus* (Güler *et al.*, 1996) while the cyanobacterial *sqdB* gene was used to identify the orthologous gene in *Arabidopsis* which was named SQD1 (Essigman *et al.*, 1998). The *sqdB* gene of *Synechococcus* was found in an operon with another gene required for SQDG biosynthesis that was named *sqdX* (Güler *et al.*, 2000). The protein encoded by *sqdX* has similarities to lipid glycosyltransferases but has no homology with the proteins encoded by *sqdA*, *sqdD* or *sqdC* genes identified in *R. sphaeroides*. Using the cyanobacterial *sqdX* gene was possible to isolate the plant orthologue SQD2 (Yu *et al.*, 2000).

Genetic data show that the protein SqdB (SQD1 in plants) is the only one that has orthologues in all SQDG producing organisms (Benning *et al.*, 2008). The recombinant SQD1 protein from *Arabidopsis* was shown to convert *in vitro* UDP-glucose and sulfite to UDP-sulfoquinovose (Sanda *et al.*, 2001), thereby defining the initial step for SQDG biosynthesis (Fig. 1). In cyanobacteria and plants, SqdX/SQD2 transfer the sulfoquinovose moiety from UDP-sulfoquinovose to diacylglycerol (DAG) resulting in the formation of SQDG (Yu *et al.*, 2002) (Fig. 1). Much less is known of the biochemical functions of the other SqdA, SqdD and SqdC proteins of *R. sphaeroides*. In agreement with the function of SqdB, the specific inactivation of *sqdD* led to the accumulation of UDP-sulfoquinovose (Rossak *et al.*, 1995). SqdD shows homology with glycogenin, an autoglycosylating glycosyltransferase, and has no homology with the lipid glycosyltransferases SqdX or SQD2. Inactivation of *sqdC* led to the accumulation of sulfoquinovosyl-1-O-dihydroacetone (Rossak *et al.*, 1997). This result suggests that SqdD transfers sulfoquinovose from UDP-sulfoquinovose to the possible acceptor dihydroxyacetone or dihydroxyacetone phosphate (Fig. 1). SqdC shows homology to small molecule reductases and could reduce the ketone group of the dihydroxyacetone residue to glycerol leading to the formation of sulfoquinovose glycerol (SQGro) as shown in Fig. 1. SqdA has homology to bacterial acyltransferases and could be involved in acylation of one or both hydroxyl groups of SQGro (Fig. 1). Such a pathway was proposed by Tamot and Benning (2009) but, so far, remains speculative. In any case, the previous results show that SQDG is assembled in *R. sphaeroides* by a route different from that known from plants and cyanobacteria (Fig. 1).

The α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* was found to contain an *sqdBDC* operon and the encoded proteins had high similarity to the proteins encoded by the *sqdBDC* operon of *R. sphaeroides* with percentages of identity of 79, 62 and 47 % for SqdB, SqdD and SqdC, respectively (Weissenmayer *et al.*, 2000). However, an orthologue for SqdA in *S. meliloti* was not known. In this work we have identified SMc02490 as the orthologue of SqdA which is required for SQDG biosynthesis. Expression of the sinorhizobial genes *sqdBDC* and *sqdA* in *Escherichia coli*, a bacterium not forming SQDG, led to the formation of significant amounts of SQDG while expression of only the three gene operon led to the formation of SQGro. Furthermore, we show that presence of *sqdA* only in *S. meliloti* or *E. coli* is sufficient to convert exogenous SQGro into SQDG. Finally, using *in vitro* assays, we show that the acyltransferase SqdA uses acyl carrier protein (AcpP) as fatty acyl donor to acylate the lyso-form of SQDG, sulfoquinovosyl monoacylglycerol (SQMG). We propose to name this second route for SQDG biosynthesis as SQGro acylation pathway and it is limited to members of the families *Rhizobacteriaceae* and *Rhodobacteraceae*.

Results and discussion

smc02490* is required for sulfoquinovosyl diacylglycerol biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti

The operon *sqdBDC* involved in SQDG formation was previously identified in *S. meliloti* (Weissenmayer *et al.*, 2000). However, there is no ORF annotated as coding for SqdA in the genome of this organism (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>). Employing as query the SqdA sequence from *Rhodobacter sphaeroides* (Benning and Somerville, 1992a) against the *S. meliloti* proteome we identified SMc02490 that showed 39.3 % identity to SqdA in an overlap of 88 % of the amino acids of both proteins (E value of 1.25×10^{-53}). SMc02490 is annotated as conserved hypothetical protein, but previous microarray data have shown that expression of *smc02490* is induced under phosphate limitation via the transcriptional factor PhoB (Krol and Becker, 2004). In agreement with this result, a *pho*

box was identified 41 bp upstream from the annotated translational start codon of *smc02490* (Yuan *et al.*, 2006). Analysis with the STRING software (<http://string.embl.de>) showed the highest level of cooccurrence of *smc02490* with the genes of the operon *sqdBDC*. Importantly, mutants of *S. meliloti* in *smc02490* showed a high cofitness value to each of the mutants in genes of the *sqdBDC* operon (values of 0.92, 0.89 and 0.85 for mutants in *sqdD*, *sqdB* and *sqdC*, respectively). This means that the mutants behaved in a very similar way in diverse growth experiments and suggests that they are probably involved in a same pathway (Price *et al.*, 2018). All of these data support that SMC02490 is the sinorhizobial SqaA orthologue involved in SQDG biosynthesis and are in agreement with data indicating that SQDG formation in *S. meliloti* is increased in response to phosphate limitation controlled through the PhoB regulator (Geiger *et al.*, 1999). A deletion mutant (NG8) was generated in which most of the ORF coding for SMC02490 had been replaced by a cassette conferring chloramphenicol resistance. Thin-layer chromatographic (TLC) analysis of radiolabeled polar lipids obtained from phosphate-limited cultures of different *S. meliloti* strains reveals that the slowest migrating spot present in the wild type strain 1021 is absent in the strain lacking *smc02490*. This same spot is missing in an *sqdB* mutant making it possible to be assigned to SQDG (Fig. 2). Expression of *smc02490* in *trans* in the mutant NG8 restores formation of SQDG while introduction of the empty vector does not (Fig. 2). The lipid profile of strain OD1 which is deficient in formation of DGTS and of OL, but still forms SQDG (López-Lara *et al.*, 2005), was also analyzed in parallel in order to identify the migration of phosphorous-free membrane lipids (Fig. 2).

In a wild type strain grown under phosphate-limiting conditions, PG comprises 8 % and SQDG another 8 % of the total polar lipids while in an *smc02490* deficient mutant PG amounts to 16 % of the total lipids (Table 1). In different strains lacking SQDG, the amount of PG is increased while in the strain where SQDG is overproduced by expression of *smc02490* from plasmid pDRT007, the amount of PG is decreased. Except for the special case of mutant OD1, the total amount of PG plus SQDG is maintained in a similar range being between 13 and 20 % of the total polar lipids (Table 1). Therefore, quantification of polar lipids shows that in the absence of SQDG formation, the anionic

lipid PG is compensating for it. Both PG and SQDG are anionic glycerolipids and this mutual compensation has also been described in different photosynthetic organisms such as *Synechococcus*, *Chlamydomonas* or *Arabidopsis*. Therefore, under different conditions, the combined PG and SQDG content remains largely constant (reviewed in Frentzen, 2004).

To demonstrate the chemical identity of the SQDGs, lipids were isolated from the mutant deficient in *smc02490* carrying the empty vector pBBR1MCS-2 and from the mutant strain complemented *in trans* with the broad-host plasmid pBBR1MCS-2 carrying *smc02490* (plasmid pDRT007). Using matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometry in negative ion mode, a total of nine m/z values consistent with SQDG species were observed in the spectrum of the lipid extract from the complemented mutant strain (Table 2), while these were not detected in the spectra of extracts obtained from the mutant carrying the empty vector. The accurate m/z signals provided using FT-ICR mass spectrometry are clearly consistent with elemental compositions of SQDGs (all m/z errors are well below 0.5 ppm). The two most intense signals were observed at nominal m/z values of 819 and 833; on high mass accuracy collision induced dissociation (CID) product ion analyses, ions were formed consistent with SQDG species carrying C16:0 with C18:1 for m/z 819 and C16:0 with C19:1 for m/z 833, on the basis of product ions formed by elimination of each of the fatty acids (Table 2). Taken together with the results of similar product ion analyses of the remaining seven signals the data showed that the full range of SQDG species identified (Table 2) is similar to those SQDGs identified in other studies using samples of *S. meliloti* grown under phosphate limitation (Geiger *et al.*, 1999; Basconcillo *et al.*, 2009a).

All data presented in this section demonstrate that SMC02490 is required for SQDG biosynthesis in *S. meliloti* and that it is homologous to the SqdA ORF originally identified in *Rhodobacter sphaeroides* (Benning and Somerville, 1992a). Therefore, we propose SMC02490 be renamed as SqdA.

Expression of sqdA and sqdBDC from plasmids in S. meliloti significantly increases SQDG formation under conditions of sufficient phosphate

The *S. meliloti* mutant NG8 carrying *in trans* the gene *sqdA* significantly increases the amount of SQDG formed with respect to the amount formed by the wild type strain under conditions of phosphate limitation (14.8 ± 5.9 vs 7.9 ± 3.2 , Table 1), indicating a dose effect due to the augmented level of *sqdA* provided by the plasmid. To study the effect provided by extra copies of the *sqdBDC* operon in an *S. meliloti* background, we constructed a pRK404-derived plasmid carrying the *sqdBDC* genes (see material and methods). Under conditions of phosphate limitation, the presence of pRK404 carrying *sqdBDC* did not significantly increase the formation of SQDG (Fig. 3A, Table S1). However, at the same growth conditions, the strain carrying pBBR1MCS-2 with *sqdA* doubled the amount of SQDG formed with respect to the strain carrying two empty vectors (Fig. 3A, Table S1). This could be due to the fact that the pBBR1-derived plasmids are of higher copy number than the low copy number IncP-plasmid pRK404 (Kovach *et al.*, 1995). Coexpression of *sqdA* and *sqdBDC* from both broad host range plasmids (pDRT007 and pDRT008) in the wild type *S. meliloti* under phosphate limiting conditions did not lead to a significant increase of SQDG formation with respect to a wild type strain carrying only extra copies of *sqdA* (Fig. 3A, supplementary Table S1, Fig. S2).

TLC analyses showed that the wild type strain *S. meliloti* carrying *in trans* extra copies of *sqdA* or of *sqdBDC* grown on PYCa^{++} complex medium produced similar amounts of SQDG as the wild type carrying two empty vectors. However, the wild type strain *S. meliloti* 1021 carrying plasmids with *sqdA* and with *sqdBDC* grown on PYCa^{++} complex medium produced a significantly higher amount of SQDG (8.5 ± 2.9 % of the total lipids) than strains containing only extra copies of *sqdA* or *sqdBDC* (Fig. 3B, Table S1). Again, these results showed that *sqdA* works together with *sqdBDC* for SQDG formation.

Expression of sinorhizobial sqdA and sqdBDC in Escherichia coli results in SQDG formation.

Biosynthesis of SQDG in *Arabidopsis* proceeds in two steps (Fig. 1) and expression of SQD1 and SQD2 in *E. coli* led to SQDG formation in this bacterium (Yu *et al.*, 2002). Since homologous expression of *sqdA* and the operon *sqdBDC* led to SQDG formation in *S. meliloti* when grown in complex medium, we explored whether heterologous expression of the four genes in *E. coli* would lead to SQDG formation. As expected, expression of only *sqdA* in *E. coli* did not lead to formation of a compound with a mobility similar to SQDG. However, expression of *sqdA* and *sqdBDC* in *E. coli* led to a prominent spot that shows similar mobility to SQDG formed in *S. meliloti* (Fig. 4A). We used two compatible vectors, a pET vector and pRK404, and we studied the lipid profile obtained from different combinations of plasmids in the *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain. No new bands with similar mobility to SQDG were visible in lipid extracts from *E. coli* cells containing two empty vectors, or strains that were carrying *sqdA* or the *sqdBDC* operon in combination with empty vectors. However, when *E. coli* cells contained constructs carrying *sqdA* (pDRT005) and *sqdBDC* (pDRT008) a new compound appeared, which shows similar mobility to SQDG in the lipid extract of *S. meliloti* (Fig. 4A and B).

Lipids for mass spectrometric analysis were isolated from each of the four *E. coli* strains containing either the empty vectors pET17b and pRK404, pRK404 and pDRT005 (*sqdA*), pET17b and pDRT008 (*sqdBDC*) or pDRT005 and pDRT008 (*sqdA* + *sqdBDC*). Using MALDI FT-ICR mass spectrometry in negative ion mode, a total of eight *m/z* values consistent with SQDG species were observed only in the spectrum of the lipid extract from the *E. coli* strain carrying plasmids with *sqdA* and *sqdBDC* (Fig. 4C, Table 2), while these were not detected in the spectra of extracts obtained from any of the other three *E. coli* strains carrying either two empty vectors or combinations of vectors with only *sqdA* or the *sqdBDC* operon. The most intense signal, with a nominal *m/z* of 819 observed in the spectra of *E. coli* extracts was also one of the most intense signals observed in the spectra of extracts of *S. meliloti* (Table 2). The accurate *m/z* signals provided using FT-ICR mass spectrometry are clearly consistent with elemental compositions of SQDGs (*m/z* errors are well under 0.5 ppm). High mass accuracy CID product ion analysis of this species was consistent with SQDG carrying C16:0 and C18:1, on the basis of product ions formed by elimination of each of the fatty acids (Fig.

4D). Similar analyses of the remaining SQDG signals showed that the range of SQDG species identified in lipid extracts of *E. coli* carrying *sqdA* and *sqdBDC* is different from the range of SQDG species observed in extract of *S. meliloti* (Table 2). We detected SQDG species with C14:0 fatty acids in *E. coli* extracts which were not detected in those of *S. meliloti*. Notably, in *E. coli* extracts, SQDG species with the C19:1 fatty acid were not detected, while they are encountered in abundance in SQDG species from *S. meliloti*. Probably, the C19:1 fatty acid corresponds to lactobacillic acid, which is formed by cyclopropanation of C18:1. (Basconcello *et al.*, 2009b). Interestingly, expression of the plant genes SQD1 and SQD2 in *E. coli* also led to production of SQDG species with *m/z* values of 791 and 819 (Yu *et al.*, 2002) which are the most abundant species detected in the strain carrying the sinorhizobial genes (Fig. 4C and Table 2). These results indicate that the SQDG species formed depend more on the host than on the pathway used. In the *E. coli* strain carrying *sqdA* and *sqdBDC* grown on LB medium for 18 h after IPTG induction, the SQDG formed amounts to 15.5 ± 1.5 % of the total lipids, measured after ^{14}C -acetate labeling. Therefore, we used this construct to obtain SQDG for further studies. This SQDG-producing *E. coli* strain could also be used to obtain SQDG or derivatives thereof for future biotechnological applications (Benning *et al.*, 2008).

Sulfoquinovosyl glycerol (SQGro) is an intermediary in the sinorhizobial pathway for SQDG biosynthesis.

A significant amount of SQDG is formed after expression of *sqdA* and *sqdBDC* in *E. coli* (Fig. 4), indicating that the sinorhizobial enzymes for SQDG biosynthesis are functional in *E. coli*. Sulfoquinovose glycerol (SQGro) is proposed to be formed by action of the enzymes SqdB, SqdD and SqdC encoded by the *sqdBDC* operon (Fig. 1). SQGro can be easily obtained from SQDG since carboxylic acid ester linkages of glycerolipids are especially sensitive to treatment with mild alkali. As specified in materials and methods, non-labeled SQDG obtained from the overproducing *E. coli* strain, was treated with mild alkali and the putative SQGro was purified. Analysis of this sample by both MALDI and electrospray (ESI) FT-ICR mass spectrometry in negative ion mode resulted in detection of a signal consistent with SQGro. In the MALDI spectrum, this signal was of low

intensity, at m/z 317.05490, an m/z accuracy for the elemental composition of SQGro of 0.3 ppm, while in the ESI spectrum, the equivalent signal was the base peak, at m/z 317.05481, an m/z accuracy of 0.07 ppm. Furthermore, the accurate m/z ESI product ion spectrum showed signals for the loss of the elements of glycerol (product ion at m/z 225.00742), the elements of glycerol and of water (ion at m/z 206.99686) and a further ion arising by cross ring cleavage of the sulfoquinovose monosaccharide, a typical carbohydrate fragmentation, arising by loss of the ring oxygen, and carbons 1 and 2 and their substituents (loss of $C_5H_{12}O_5$, product ion at m/z 164.98630). After demonstrating that mild alkali hydrolysis of SQDG indeed led to SQGro formation, a control of this compound was prepared following the same procedure but from a culture grown in the presence of [^{35}S]-sulfate. We made different plasmid constructs to be able to express genes in the order of the proposed biosynthetic pathway. ^{35}S -labeled water-soluble compounds of the *E. coli* strain expressing *sqdB* contains a prominent spot not present in extracts of the *E. coli* strain carrying an empty vector (Fig. 5, Fig. S3). Based on its chromatographic behaviour and the known function of SqdB, we identified this compound as UDP-sulfoquinovose. Expression of *sdqBD* led to the accumulation of a faster migrating spot (Fig. 5). Rossak *et al.* (1997) found that an *R. sphaeroides* mutated in *sqdC*, but with intact *sqdBD*, accumulated sulfoquinovosyl-1-*O*-dihydroxyacetone. Furthermore, the faster migrating compound from the *E. coli* strain expressing *sqdBD* showed a similar R_f as shown previously for sulfoquinovosyl dihydroxyacetone in an analogous TLC system analysis (Fig. 3 in Rossak *et al.*, 1997). Expression in *E. coli* of plasmids carrying the genes *sqdBDC* led to the formation of a spot with identical migration to the prepared control SQGro (Fig. 5, Fig. S3). Also, the strain producing SQDG presents a spot with the same migration as SQGro (Fig. 5, Fig S3). We show here for the first time that SQGro is likely the product formed by the *sqdBDC* operon and reinforce the idea of SQGro as an intermediary in SQDG biosynthesis (Fig. 1).

***SqdA* allows SQDG formation from exogenous SQGro**

To further confirm SQGro as an intermediary of SQDG biosynthesis, we added ^{35}S -SQGro to different *S. meliloti* strains. Addition of SQGro to *S. meliloti* wild type results in

the detection of a labeled compound that migrated like the SQDG control (Fig. 6A). Interestingly, SQDG is also formed after addition of SQGro to the *sqdB* *S. meliloti* mutant which, otherwise, is unable to form SQDG (Weissenmayer *et al.*, 2000; Fig. 2). This result indicates that SQGro replaces the function of the *sqdBDC* operon and further supports that SQGro is the product formed by the action of the operon. To convert SQGro to SQDG two acylations are required by at least one acyltransferase (Fig. 1). SqaA is the candidate enzyme to perform at least one of these acylations. Indeed, addition of SQGro to the *S. meliloti* mutant lacking the gene for SqaA did not result in SQDG formation while complementation of such mutant with the *sqdA* gene in *trans* restored formation of SQDG (Fig. 6A). Therefore, SqaA is required to convert exogenous SQGro into the lipid membrane SQDG.

Furthermore, addition of SQGro to *E. coli* strains carrying *sqdA* in a pET16b or in a pCDFDuet plasmid leads to SQDG formation while strains carrying the empty plasmid do not form any lipidic ³⁵S-labeled compound (Fig. 6B). The formation of SQDG is time dependent and can be observed after 2 hours of induction with IPTG in a *E. coli* strain carrying *sqdA* (Fig. 6C). These results indicate that either SqaA can perform both acylations and converts SQGro into SQDG or enzymes from *E. coli* do the missing acylation reaction.

This route of SQDG biosynthesis from SQGro follows the same scheme as the so called glycerophosphocholine (GPC) acylation pathway first described in bacteria in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* (Moser *et al.*, 2014) and, later, in Gram-positive human pathogens of the streptococci mitis group (Joyce *et al.*, 2019). In the GPC acylation pathway, exogenous GPC or lyso-phosphatidylcholine are acylated to form phosphatidylcholine (PC). It was demonstrated that pathogenic streptococci can use the abundant human metabolites GPC and lyso-PC to synthesize the membrane lipid PC (Joyce *et al.*, 2019).

SQDGs are very abundant lipids and promiscuous acyl hydrolases convert them sequentially to the metabolites lyso-SQDG and SQGro (Goddard-Borger and Williams, 2017). Recently, different pathways for degradation of sulfoquinovose and SQGro have been described (Sharma *et al.*, 2022) that allow to use these compounds as carbon and

sulfur source. According to our results, environmental SQGro can also be used as a building block for the synthesis of the membrane lipid SQDG, in an analogous way as human GPC is used as building block for synthesis of PC (Joyce *et al.*, 2019).

SqdA is required for the enzymatic acyl-acyl carrier protein-dependent acylation of lyso-SQDG

Addition of labeled SQGro to an *E. coli* culture carrying *sqdA* led to SQDG formation (Fig. 6), but these *in vivo* experiments did not clarify the specific reaction carried out by SqdA. Previously, we have shown that *S. meliloti* acyltransferases OlsA and OlsB required for ornithine lipid synthesis preferentially use acyl carrier protein (AcpP) as the donor of acyl groups in the respective reactions (Weissenmayer *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004). When cell-free extracts of an *E. coli* strain carrying an empty vector were incubated with ³⁵S-SQGro and palmitoyl-AcpP, no labeled compounds were detected in the lipidic or in the subsequent *n*-butanol extraction of the aqueous phase of the reaction. However, when the reaction was performed with *E. coli* cell-free extracts that had expressed SqdA, the formation of SQDG as well as SQMG were detected in the lipidic and *n*-butanol phase, respectively (Fig. 7A). When ³⁵S-SQMG was used as substrate, the crude extract of an *E. coli* carrying an empty vector could form some SQDG. However, when the *E. coli* extract containing SqdA was used, the amount of SQDG formed was significantly increased (5x). These results clearly show a direct role of SqdA in the acylation of SQMG to form SQDG, and we conclude that SqdA performs the second acylation in SQDG biosynthesis.

Formation of SQDG from SQGro required the presence of crude extract from *sqdA*-containing strain and palmitoyl-AcpP, while no product was detected when palmitoyl-CoA was used instead of palmitoyl-AcpP (Fig. 7B). For the second acylation step from SQMG to SQDG, some SQDG was formed by SqdA in the absence of acyl donor (Fig. 7C, lane 3), that was not increased when palmitoyl-CoA was added to the reaction (Fig. 7C, lane 5). Therefore, SqdA requires acyl-AcpP as donor of the fatty acyl group for the acyltransferase reaction.

The SQGro acylation pathway appears to be restricted to some members of the Hyphomicrobiales (Rhizobiales) and Rhodobacterales orders of Alphaproteobacteria

Initial BLASTP searches with the sequences SqdA and SqdD, which are specific for the SQGro acylation pathway (Fig. 1), retrieved only sequences from Alphaproteobacteria. To ascertain how widespread this pathway for SQDG biosynthesis might be, we searched in a collection of 16,076 complete proteobacterial genomes, those carrying ORFs that showed $\geq 30\%$ protein sequence identity and $\geq 60\%$ coverage with respect to the *S. meliloti* ORFs. The search returned a total of 238 genomes that encoded the four Sqd proteins. All the genomes were from Alphaproteobacteria and 182 of them belong to the order *Hyphomicrobiales*, that was recently proposed to replace the order *Rhizobiales* (Hördt *et al.*, 2020). From those, a total of 160 belong to the family *Rhizobiaceae*, 9 to *Phyllobacteriaceae*, 9 to *Stappiaceae* and 4 to *Aurantimonadaceae*. The other 56 genomes belong to the order *Rhodobacterales* where 48 are from the family *Rhodobacteraceae* and 9 from the family *Roseobacteraceae* (Table S2). Thus, among proteobacteria, the occurrence of the four orthologues for SQDG biosynthesis in one organism occurs in less than 1.5 % of the genomes analyzed. However, since the total number of Alphaproteobacteria present in our collection was 1625, the prevalence of the SQDG acylation pathway in complete genomes amounts to 14.6 % within Alphaproteobacteria.

Villanueva *et al.* (2014) constructed an extended phylogeny of SqdB proteins and one of the clusters they defined, *sqdB2B*, includes only Alphaproteobacteria of the *Hyphomicrobiales (Rhizobiales)* and *Rhodobacterales* orders, thus reflecting the distribution of the SQGro acylation pathway. Interestingly, they recovered abundant and diverse gene sequences of the *sqdB2B* cluster in marine microbial mats (Villanueva *et al.*, 2014), which might indicate an important prevalence of the SQGro acylation pathway in such an ecosystem.

Presence of only SqdA allows for incorporation of exogenous SQGro into membrane lipids (Fig. 6) and, therefore, we searched for genomes that do not contain SqdB, SqdD or SqdC, but that carried a possibly functional SqdA. We experimentally determined the

E value cut-off to be e^{-40} for a protein to possibly have the function of SqdA and we found 35 genomes that contain SqdA and not any of the other genes for SQDG biosynthesis (Table S3). Most of the genomes that contain an orphan SqdA were of the *Caulobacteraceae* (16) with 7 genomes being *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) and 7 genomes being *Rhodobacterales*. SqdA alone also appears in 3 genomes of the order *Hyphomonadales* and 1 genome of the order *Maricaulares* (Table S3). It seems that SqdA has a broader distribution across Alphaproteobacteria than the other genes required for the complete pathway as they are restricted to *Hyphomicrobiales* and *Rhodobacterales* (Table S2).

An evolutionary tree was constructed with representative SqdA sequences (Fig. 8). Sequences of the *Hyphomicrobiales* or the *Rhodobacterales* group among them. Interestingly, in both orders there are genomes that contains orphan SqdAs that show strong relationship to SqdA proteins with demonstrated function (Fig. 8). The prevalence of SqdA alone can provide the organism with the means to scavenge SQGro from the environment to form SQDG as we have proposed. SqdA alone from the order *Caulobacterales*, *Hyphomonadales* and *Maricaulares* appears together in a branch between SqdAs of *Hyphomicrobiales* and of *Rhodobacterales*.

SqdA groups with other lyso-lipid acyltransferases that present an HX₅D motif

Our BLASTP analysis showed a significant similarity between the *S. meliloti* SqdA sequence and the N-terminal domain of OlsF proteins (28 % identity and E value of $6e^{-27}$ in an overlap of 202 amino acids between SqdA_{Sm} and OlsF_{Sp}). OlsF contains two acyltransferase domains that are responsible for the two acylation steps required for ornithine lipid biosynthesis in the Gammaproteobacterium *Serratia proteomaculans* or in *Flavobacterium johnsoniae* (Vences-Gúzman *et al.*, 2015). The C-terminal domain in OlsF is distantly related to OlsB, an acyltransferase of *S. meliloti* responsible for N-acylation of ornithine to form lyso-ornithine lipid (Gao *et al.*, 2004). The second acylation of ornithine lipid in *S. meliloti* is carried out by the O-acyltransferase OlsA (Weissenmayer *et al.*, 2002). Curiously, the N-terminal domain of OlsF is unrelated to OlsA, although they both perform acylation of lyso-ornithine lipid (Vences-Guzmán *et al.*,

2015; Weissenmayer *et al.*, 2002). Heath and Rock (1998) described an HX₄D motif as indicative for acyltransferases. However, the *N*-terminal domain of OlsF displays an HX₅D motif (Vences-Guzmán *et al.*, 2015). During our alignment to construct the phylogenetic tree of SqdA proteins (Fig. 8) we also found an HX₅D motif that is strictly conserved in all SqdA sequences. Recently, another lyso-lipid acyltransferase, SalA, with a strictly conserved HX₅D motif was described. SalA is required for the second acylation step of a newly described sulfur-containing aminolipid (Smith *et al.*, 2021). Other well-characterized bacterial lyso-lipid acyltransferases are PlsC, responsible for the final step in the biosynthesis of the phospholipid phosphatidic acid, the aforementioned OlsA, and the lyso-PC acyltransferases XC_0238 and XC_0188 of *X. campestris* (Moser *et al.*, 2014). A phylogenetic tree constructed with different bacterial lyso-lipid acyltransferases clearly separates those having an HX₅D from those having the HX₄D motive (Fig. 9). Multiple sequence alignments with representative acyltransferases show the presence of two conserved sequence motifs (Fig. 10), representing the catalytic center (HX_{4/5}D) and the possible block III identified in acyltransferases as substrate binding site (Lewin *et al.*, 1999), respectively. The presence of the HX₅D motif in the proteins SqdA, SalA and OlsF deserves further mechanistic analyses.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this work, as well as their relevant characteristics, are listed in Table 3. Construction of the sinorhizobial mutant deficient in *smc02490* (*sqdA*) is described in Table S4. *Sinorhizobium meliloti* strains were cultivated at 30 °C, either in complex medium of yeast extract and peptone (PY) supplemented with 4.5 mM CaCl₂ (PYCa⁺⁺) (Beringer, 1974) or in Sherwood minimal medium with succinate (8.3 mM) replacing mannitol as the carbon source (Sherwood, 1970), on a gyratory shaker. For determination of lipid composition under phosphate limitation, three subcultivations were carried out in Sherwood

minimal medium containing 0.02 mM phosphate. *Escherichia coli* strains were grown at 30 °C in Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook and Russell, 2001). Antibiotics for *S. meliloti* were added, when required, at the following final concentrations (µg/ ml) in complex medium: neomycin 200, tetracycline 8, and in liquid media with phosphate limitation, the antibiotic concentrations (µg/ ml) were: neomycin 1 and tetracycline 2. For *E. coli*, antibiotic concentrations were: carbenicillin 100; chloramphenicol 10; tetracycline 10 and kanamycin 50. Plasmids were mobilized into *S. meliloti* by diparental mating using the *E. coli* S17-1 donor strain as previously described (Simon *et al.*, 1983).

DNA manipulations

Recombinant DNA techniques were performed according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 2001). Commercial sequencing of amplified genes by Eurofins Medigenomix (Martinsried, Germany) corroborated the correct DNA sequences. Oligonucleotide primer sequences are listed in supplementary Table S5.

Construction of expression plasmids

The 7.12 kb PstI fragment from pBW41 (Weisse-mayer *et al.*, 2000) carrying the sinorhizobial *sqdBDC* operon was re-cloned into the broad-host range plasmid pRK404 digested with PstI resulting in plasmid pDRT006, which harbor the *sqdBDC* operon in frame with the *lac* promoter of the vector. After partial digestion of pDRT006 with SphI and subsequent ligation, the plasmid pDRT008 was selected in which the internal 3363 bp SphI fragment of the 7.12 kb sinorhizobial fragment was excised. pDRT008 only contains *sqdBDC* as full ORFs of *S. meliloti*.

Suitable restriction sites for cloning of the respective genes were introduced by PCR in the oligonucleotides (Table S5). Using PCR and specific oligonucleotides oLOP161 and oLOP162, *smc02490* was amplified from *S. meliloti* 1021 genomic DNA. Subsequently, the obtained fragment was cloned into the expression vector pET16b digested with NcoI and BamHI resulting in plasmid pDRT005. The BgIII-BamHI fragment of pDRT005 containing *smc02490* was cloned into the BamHI site

of pBBR1MSC-2 leading to pDRT007. Using specific oligonucleotides oLOP357 and oLOP358, *sqdB* was amplified by PCR using as template pDRT008. The obtained fragment was cloned into pET17b digested with NdeI and BamHI resulting in plasmid pJCR003. Using the specific oligonucleotides oLOP359 and oLOP360, *sqdD* was amplified by PCR using pDRT008 as template and was cloned in pRSFDuet-1 digested with NcoI and BamHI. In the resulting plasmid, *sqdB* obtained from pJCR003 as NdeI-BamHI, was cloned into the second multiple site (mcs-2) of pRSFDuet-1 previously digested with NdeI and BglII. The resulting plasmid, containing *sqdB* in mcs-1 and *sqdC* in mcs-2, was named pJCR005. Similarly, *sqdDC* were amplified by PCR from pDRT008 using specific oligonucleotides oLOP359 and oLOP361 and the fragment containing both genes was cloned in pRSFDuet-1 digested with NcoI and BamHI. Afterwards *sqdB* was cloned from pJCR003 into mcs-2 of the pRSFDuet-1 plasmid containing *sqdDC* digested with NdeI and BglII resulting in plasmid pJCR006.

In vivo labelling of S. meliloti and E. coli with ¹⁴C-acetate or ³⁵S-sulfate and lipid analysis

The lipid compositions of the bacterial strains were determined after labeling with [1-¹⁴C] acetate (specific activity: 55 mCi/mmol; PerkinElmer) or [³⁵S] sulfate (specific activity: 1494 Ci/mmol; PerkinElmer). Cultures of *S. meliloti* (1 ml) were started from precultures grown in the same medium. They were labeled with 1 µCi of [1-¹⁴C]-acetate and were incubated for 24 h for the case of growth in PYCa⁺⁺ complex medium or for 48 h in case of growth in minimal medium with low phosphate (0.02 mM). For detection of SQDG and its intermediates after heterologous expression of the *smc02490*, *sqdB*, *sqdC* and *sqdD* genes in *E. coli*, derivatives of the BL21 (DE3) pLysS strain were grown in LB complex medium (1 ml). Cultures were induced at OD₆₂₀= 0.4 with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and labeled with 1 µCi of [1-¹⁴C] acetate or 2 µCi of [³⁵S] sulfate, the cultures were incubated for 18 h at 30 °C. To study incorporation of ³⁵S-SQGro in *S. meliloti* or *E. coli* cultures, they were grown in 1 ml cultures similarly as described above in the presence of 14000 cpm of

³⁵S-SQGro. Cells from bacterial cultures were harvested by centrifugation and resuspended in 100 µl of water. Lipids were extracted according to the method of Bligh and Dyer (1959) and the chloroform or water phases were separated by one-dimensional thin layer chromatography (1D-TLC) on high-performance TLC aluminum sheets (silica gel 60; Merck). For separation of lipids, chloroform: methanol: acetic acid: water (85: 15: 10: 3.5, v / v) was used as the mobile phase. For separation of water-soluble compounds, ethanol: water: acetic acid solvent system (20:10:1, v/v) was used as the mobile phase. ¹⁴C-Radiolabeled lipids were visualized using a Phosphor-Imager (Storm 820; Molecular Dynamics) and ³⁵S-radiolabeled products using a Typhoon FLA 9500. Quantification was performed using ImageQuant TL (Amersham Biosciences).

Preparation of samples and mass spectrometric analysis.

The two *S. meliloti* 1021 strains, the mutant in *smc02490* with an empty vector (NG8 x pBBR1MCS-2) and the mutant supplemented with *smc02490* (NG8 x pDRT007), were grown in 1 L of Sherwood minimal medium with low phosphate (0.02 mM) and corresponding antibiotics and harvested in the third pass after 48 hours of incubation at 30 °C. The strains of *E. coli* BL21 (DE3) pLysS x pET17b x pRK404, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS x pDRT005 x pRK404 (expressing *smc02490*), *E. coli* BL21 (DE3) pLysS x pET17b x pDRT008 (expressing *sqdBDC*) and *E. coli* BL21 (DE3) pLysS x pDRT005 x pDRT008 (expressing *smc02490* and *sqdBDC*) were each grown in 500 ml of LB medium with the corresponding antibiotics, induced with 0.1 mM IPTG at an OD₆₂₀ of 0.4 and harvested after 18 h of incubation at 30°C. Lipids from cell pellets were extracted by the Bligh and Dyer method (1959). After redissolving the samples in 200 µL dichloromethane, they were analyzed using MALDI or ESI FT-ICR mass spectrometry in negative mode, using a Bruker Daltonics 9.4 T solariX XR instrument.

Analysis of SQDGs from *S. meliloti* and *E. coli* systems: the samples were analysed using MALDI in a matrix of dihydroxybenzoic acid with the following settings: laser power for mass spectral acquisition of 43% (for product ion spectra 48%), 100 shots

per scan for mass spectral acquisition (1000 shots per scan for product ion spectra). Each saved spectrum was the sum of 8 scans acquired with 2M data points over an m/z range of 300-4000 resulting in a resolving power of ~ 200000 at m/z 800. External calibration was carried out using sodium trifluoroacetate cluster ions (generated at the same time as the MALDI ions, using the ESI source). Isolation in the quadrupole was with width 2 m/z units with fragmentation in the hexapole collision cell achieved using argon gas and a 'collision energy' setting of 35 V.

Identification of SQGro: MALDI spectra were generated in a matrix of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid under the following conditions: laser power 45%, 200 shots per scan, with each saved spectrum the sum of 16 scans. Spectra were acquired with 2M data points over an m/z range of 100-1500, resulting in a resolving power of ~ 160000 at m/z 300. The spectra were internally calibrated against matrix peaks. ESI mass spectra and product ion spectra were acquired using the following conditions: sample solution was infused at 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a spray voltage of 3500 V and 0.5 s ion accumulation time. Each saved spectrum was the sum of 16 scans acquired with 1M data points over an m/z range of 100-1500 resulting in resolving power of ~ 80000 at m/z 300. External calibration was carried out using sodium trifluoroacetate cluster ions and the spectra were then internally calibrated with peaks from fatty acid background ions.

SQGro and SQMG preparation

For preparation of ^{35}S -labeled SQGro, to a culture of *E. coli* BL21 x pDRT005 x pDRT008 (5 ml) grown in complex LB medium, 0.1mM IPTG and 2 μCi [^{35}S]-sulfate were added at an OD_{620} of 0.4 and growth was continued for 18 h. After the culture was collected by centrifugation, total lipids were extracted by the Bligh and Dyer (1959) method. A mild alkali treatment (0.3 M KOH at 37 ° C for 3 h) was applied to the dry lipids to completely cleave the ester bonds. Subsequently, the solution was neutralized with 0.3 M HCl, and hydrophilic components were recovered in the aqueous phase of a Bligh and Dyer (1959) extract. This aqueous extract was separated by one-dimensional TLC using ethanol: water: acetic acid (20:10:1, v/v)

as mobile phase. After development, the ^{35}S -sulfate labeled SQGro was scraped from the silica plate, extracted 3 times in the aqueous phase of the Bligh and Dyer (1959) solvent system. Non-radiolabeled SQGro was prepared in a similar way from a volume of 30 ml of culture and orcinol dye was used for detection in TLC. Samples were visualized by staining with 0.25 % orcinol in 5% H_2SO_4 in ethanol and incubation at 100°C . Glucose was used as standard for quantification of unlabeled SQGro.

The lyso-form of SQDG (SQMG) was preferentially obtained into the water phase of a Bligh and Dyer extract, and we designed a protocol to obtain purified SQMG that was not containing SQGro or SQDG. ^{35}S -labeled-lipids were obtained by Bligh and Dyer extraction from *E. coli* BL21(DE3) pLysS pDRT005 pDRT008 grown as explained above. A partial mild alkali hydrolysis was achieved by treating lipids with 3 mM KOH for 45 min at 37°C and then neutralized with 3 mM HCl. The mixture was subjected to Bligh and Dyer extraction and the water phase was recovered. After two extractions with *n*-butanol of this water phase, purified SQMG is obtained. ^{35}S -SQGro and ^{35}S -SQMG were quantified by multi-purpose scintillation counter Beckman Coulter LS 6500.

Preparation of palmitoyl-AcpP and in vitro acylation assays with SQGro or SQMG

Purified apo-AcpP of *S. meliloti* was obtained from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS containing plasmid pTB5035 and was converted to functional holo-AcpP using holo-ACP synthase from *S. meliloti* as previously described (Ramos-Vega *et al.*, 2009). To obtain palmitoyl-AcpP, holo-AcpP was incubated with palmitic acid (PO500, Sigma) in the presence of the *E. coli* inner membrane enzyme acyl-ACP synthetase (Aas) obtained from the *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain carrying the plasmid pAasH (Shanklin, 2000). The palmitoyl-AcpP obtained was purified by DEAE-Sepharose chromatography.

E. coli BL21 (DE3) pLysS cells carrying the empty vector pET17b or plasmid pDRT005 (*sqdA*) were grown on 30 ml of LB medium with chloramphenicol and

carbenicillin from overnight inocula grown in the same medium. Cultures were induced at $OD_{620} = 0.4$ with 0.1 mM IPTG and further grown for 4 h at 30 °C. Cells were harvested, resuspended in 1 ml of 100 mM Tris-HCl pH 8.5 buffer and kept frozen at -20 °C. Cells were broken by 3-4 steps of freezing and thawing. Afterwards, 25 units of DNAase I and Mg^{2+} to 5 mM final concentration were added and extract were incubated for 20 min at room temperature. The lysates were centrifuged at 7000 g for 20 min at 4 °C and the supernatants were used as cell-free extracts.

Each *in vitro* reaction contained 20 μ l of the respective cell-free extract, 14000 cpm of ^{35}S -SQGro or ^{35}S -SQMG (or 10000 cpm in the case of experiments in Fig. 7B and C), 100 mM Tris-HCl pH 8.5 and 40 μ M palmitoyl-AcpP or palmitoyl-CoA (P9716 Sigma). Reactions were incubated at 30 °C for 4 h and lipids were extracted by Bligh and Dyer. Then, the aqueous phases were submitted to *n*-butanol extraction to recover SQMG. Lipids were analyzed by one-dimensional TLC and phosphorimaging as described above. A ^{35}S -SQDG sample submitted to partial mild alkaline hydrolysis served as standard for SQDG and SQMG.

Bioinformatic analyses

Phylogenetic analysis to search for the presence in genomes of genes for SQDG biosynthesis was done by separate BLASTP searches of the *S. meliloti* 1021 SMc02490 (SqdA), SqdB, SqdD and SdqC proteins against 16,076 complete proteobacterial genomes from GenBank that had identical GCA (GenBank assemblies) and GCF (RefSeq assemblies) annotations. Homologues to each ORF with at least 60 % sequence coverage and 30 % amino acid identity to the query sequences were included in the search (Table S2). SqdA sequences were aligned using muscle 5.1 (Edgar, 2021). The evolution model was calculated with ProtTest3 (Darriba *et al.*, 2011). The phylogenetic analysis was done RAxML 8.2.12 (Stamatakis, 2014).

Author contributions - JYCR, NGS, EB, JTO, OG, and IMLL designed the study. JYCR, DRT, NGS, AMO, GG, EB, and IMLL carried out the experiments. All authors

carried out the data analysis and discussed the results. JYCR, JTO, OG and IMLL, were involved in drafting the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements and funding

J.Y. C-R. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 596234 from CONACyT. We acknowledge Jonathan Padilla-Gómez for preparing Figure 9. We thank Lourdes Martínez-Aguilar and Miguel Ángel Vences-Guzmán for skillful technical assistance. This work was supported by projects UNAM-PAPIIT (IN202616 and IN200819) as well as by CONACyT 153998 to IM L.-L. OG acknowledges funding from UNAM-PAPIIT (IN201120). The mass spectrometric analyses were carried out using one of the instruments in the University of York Centre of Excellence in Mass Spectrometry, which was created thanks to a major capital investment through Science City York, supported by Yorkshire Forward with funds from the Northern Way Initiative, and subsequent support from EPSRC (EP/K039660/1; EP/M028127/1).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Abraham WR, Meyer H, Lindholst S, Vancanneyt M, Smit, J. (1997). Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Syst Appl Microbiol* 20(4): 522-539. doi:10.1016/s0723-2020(97)80022-7
- Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernández G, Cruz A, Ramírez E, Putonti C, Jiménez B, Martínez E, López V, Arvizu JL, Ayala F, Razo F, Caballero J, Siefert J, Eguiarte L, Vielle JP, Martínez O, Souza V, Herrera-Estrella A, Herrera-Estrella L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15): 5803-5808. doi: 10.1073/pnas.0800981105.
- Basconcello LS, Zaheer R, Finan TM, McCarry BE. (2009a). A shotgun lipidomics approach in *Sinorhizobium meliloti* as a tool in functional genomics. *J Lipid Res* 50(6): 1120-1132. doi:10.1194/jlr.M800443-JLR200.

- Basconillo LS, Zaheer R, Finan TM, McCarry BE. (2009b). Cyclopropane fatty acyl synthase in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology (Reading)* 155(2): 373-385. doi: 10.1099/mic.0.022608-0.
- Basconillo LS, Zaheer R, Finan TM, McCarry BE. (2009c). A shotgun lipidomics study of a putative lysophosphatidic acid acyl transferase (PlsC) in *Sinorhizobium meliloti*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(26): 2873-2882. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.05.014.
- Benning C, Garavito RM, Shimojima M. (2008). Sulfolipid biosynthesis and function in plants. In *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms* (pp. 185-200). Springer, Dordrecht.
- Benning C, Somerville CR. (1992a). Isolation and genetic complementation of a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 174(7): 2352-2360. doi:10.1128/jb.174.7.2352-2360.
- Benning C, Somerville CR. (1992b). Identification of an operon involved in sulfolipid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 174(20): 6479-6487. doi:10.1128/jb.174.20.6479-6487.
- Beringer JE. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84: 188-198. doi: 10.1099/00221287-84-1-188.
- Bligh EG, Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917. doi: 10.1139/o59-099.
- Cedergren RA, Hollingsworth RI. (1994). Occurrence of sulfoquinovosyl diacylglycerol in some members of the family *Rhizobiaceae*. *J Lipid Res* 35(8): 1452-1461.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27(8): 1164-1165. doi: 10.1093/bioinformatics/btr088.
- Edgar RC. (2021). MUSCLE v5 enables improved estimates of phylogenetic tree confidence by ensemble bootstrapping, *bioRxiv* 2021.06.20.449169. doi:10.1101/2021.06.20.449169
- Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1,

- a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 95(4): 1950-1955. doi: 10.1073/pnas.95.4.1950.
- Frentzen M. (2004). Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. Curr Opin Plant Biol 7(3): 270-276. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.001.
- Gao JL, Weissenmayer B, Taylor AM, Thomas-Oates JE, 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(6): 1757-1770. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x.
- 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(1): 63-73. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x.
- Goddard-Borger ED, Williams SJ. (2017). Sulfoquinovose in the biosphere: occurrence, metabolism and functions. Biochem J 474(5): 827-849. doi: 10.1042/BCJ20160508.
- Güler S, Essigmann B, Benning C. (2000). A cyanobacterial gene, *sqdX*, required for biosynthesis of the sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol. J Bacteriol 182(2):543-545. doi: 10.1128/JB.182.2.543-545.2000.
- Güler S, Seeliger A, Härtel H, Renger G, Benning C. (1996). A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. J Biol Chem 271(13): 7501-7507. doi: 10.1074/jbc.271.13.7501.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Heath RJ, Rock CO. (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. J Bacteriol 180(6): 1425-1430. doi: 10.1128/JB.180.6.1425-1430.
- Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold L-M, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M. (2020). Analysis of 1,000+ type-strain genomes

- substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 11: 468. doi: 10.3389/fmicb.2020.00468.
- Joyce LR, Guan Z, Palmer KL. (2019). Phosphatidylcholine biosynthesis in Mitis Group Streptococci via host metabolite scavenging. *J Bacteriol* 201(22): e00495-19. doi: 10.1128/JB.00495-19.
- Kobayashi K. (2016). Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129(4):565-580. doi: 10.1007/s10265-016-0827-y.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166(1): 175-176. doi: 10.1016/0378-1119(95)00584-1.
- 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): 1-17. doi: 10.1007/s00438-004-1030-8.
- Lewin TM, Wang P, Coleman RA. (1999). Analysis of amino acid motifs diagnostic for the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* 38(18): 5764-5771. doi: 10.1021/bi982805d.
- López-Lara IM, Gao JL, Soto MJ, Solares-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(9): 973-982. doi: 10.1094/MPMI-18-0973.
- López-Lara IM, Geiger O. 2000. Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins. *Microbiology (Reading)* 146 (4): 839-849. doi: 10.1099/00221287-146-4-839.
- Moser R, Aktas M, Narberhaus F. (2014). Phosphatidylcholine biosynthesis in *Xanthomonas campestris* via a yeast-like acylation pathway. *Mol Microbiol* 91(4): 736-750. doi: 10.1111/mmi.12492.

- Price MN, Wetmore KM, Waters RJ, Callaghan M, Ray J, Liu H, Kuehl JV, Melnyk RA, Lamson JS, Suh Y, Carlson HK, Esquivel Z, Sadeeshkumar H, Chakraborty R, Zane GM, Rubin BE, Wall JD, Visel A, Bristow J, Blow MJ, Arkin AP, Deutschbauer AM. (2018). Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* 557(7706): 503-509. doi: 10.1038/s41586-018-0124-0.
- Ramos-Vega AL, Dávila-Martínez Y, Sohlenkamp C, Contreras-Martínez S, Encarnación S, Geiger O, López-Lara IM. (2009). SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 1): 257-267. doi: 10.1099/mic.0.022079-0.
- Robertson RM, Yao J, Gajewski S, Kumar G, Martin EW, Rock CO, White SW. (2017). A two-helix motif positions the lysophosphatidic acid acyltransferase active site for catalysis within the membrane bilayer. *Nat Struct Mol Biol* 24(8): 666-671. doi: 10.1038/nsmb.3436.
- Rossak M, Schäfer A, Xu N, Gage DA, Benning C. (1997). Accumulation of sulfoquinovosyl-1-O-dihydroxyacetone in a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* inactivated in *sqdC*. *Arch Biochem Biophys* 340(2): 219-30. doi: 10.1006/abbi.1997.9931.
- Rossak M, Tietje C, Heinz E, Benning C. (1995). Accumulation of UDP-sulfoquinovose in a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* 270(43): 25792-25797. doi: 10.1074/jbc.270.43.25792.
- Sambrook J, Russell DR. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 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(6): 3941-3946. doi: 10.1074/jbc.M008200200.
- Scott HN, Laible PD, Hanson DK. (2003). Sequences of versatile broad-host-range vectors of the RK2 family. *Plasmid* 50(1): 74-79. doi: 10.1016/s0147-619x(03)00030-1.

- Shanklin J. (2000). Overexpression and purification of the *Escherichia coli* inner membrane enzyme acyl-acyl carrier protein synthase in an active form. *Protein Expr Purif* 18(3): 355-360. doi: 10.1006/prev.2000.1206.
- Sharma M, Lingford JP, Petricevic M, Snow AJD, Zhang Y, Järvå MA, Mui JW, Scott NE, Saunders EC, Mao R, Epa R, da Silva BM, Pires DEV, Ascher DB, McConville MJ, Davies GJ, Williams SJ, Goddard-Borger ED. (2022). Oxidative desulfurization pathway for complete catabolism of sulfoquinovose by bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 119(4): e2116022119. doi: 10.1073/pnas.2116022119.
- Sherwood MT. (1970). Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J Appl Bacteriol* 33: 708-713. doi: 10.1111/j.1365-2672.1970.tb02253.x.
- Simon R, Priefer U, Pühler A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technology*1: 784-791. doi:10.1038/nbt1183-784.
- Smith AF, Silvano E, Päuker O, Guillonneau R, Quareshy M, Murphy A, Mausz MA, Stirrup R, Rihtman B, Aguilo-Ferretjans M, Brandsma J, Petersen J, Scanlan DJ, Chen Y. (2021). A novel class of sulfur-containing aminolipids widespread in marine roseobacters. *ISME J*. 15(8): 2440-2453. doi: 10.1038/s41396-021-00933-x.
- Sprott GD, Bakouche L, Rajagopal K. (2006). Identification of sulfoquinovosyl diacylglycerol as a major polar lipid in *Marinococcus halophilus* and *Salinicoccus hispanicus* and substitution with phosphatidylglycerol. *Can J Microbiol* 52(3): 209-219. doi: 10.1139/w05-112.
- Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Studier FW. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219: 37-44. doi: 10.1016/0022-2836(91)90855-z.
- 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. doi: 10.1016/0076-6879(90)85008-c.

- Sugimoto K, Sato N, Tsuzuki M. (2007). Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett. 581(23):4519-4522. doi: 10.1016/j.febslet.2007.08.035.
- Tamot B, Benning C. (2009). Membrane lipid biosynthesis in purple bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration. pp. 119–134 Neil C, Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (eds): The Purple Phototrophic Bacteria, Springer Science +. doi:10.1007/978-1-4020-8815-5_7
- Van Mooy BA, Rocap G, Fredricks HF, Evans CT, Devol AH. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. Proc Natl Acad Sci USA.103(23):8607-8612. doi: 10.1073/pnas.0600540103.
- Vences-Guzmán MÁ, Guan Z, Escobedo-Hinojosa WI, Bermúdez-Barrientos JR, Geiger O, Sohlenkamp C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. Environ Microbiol 17(5): 1487-1496. doi: 10.1111/1462-2920.12562.
- Villanueva L, Bale N, Hopmans EC, Schouten S, Damsté JS. (2014). Diversity and distribution of a key sulpholipid biosynthetic gene in marine microbial assemblages. Environ Microbiol 16(3): 774-87. doi: 10.1111/1462-2920.12202.
- 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(3): 721-733. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x.
- 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(6): 666-672. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.6.666.
- Yu B, Xu C, Benning C. (2002). *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. Proc Natl Acad Sci USA 99(8): 5732-5737. doi: 10.1073/pnas.082696499.

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(9): 2686-2697. doi: 10.1093/nar/gkl365.

Tables

Table 1. Membrane lipid composition of *S. meliloti* strains under phosphate limitation.^a

Lípid	Composition (% of total ¹⁴ C)					
	WT	$\Delta 2490$	$\Delta sqdB$	$\Delta 2490/2490$	$\Delta 2490/ EV$	$\Delta olsB-\Delta btaA$
DGTS	57.3 ± 3.7	55.2 ± 8.3	59.9 ± 6	51.4 ± 6.8	51.1 ± 5.5	ND
MMPE	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.5	0.8 ± 0.7	0.6 ± 0.6	2.4 ± 1.8
CL	3.1 ± 2.1	2.9 ± 1.7	3.2 ± 1.8	2.6 ± 1.4	3.5 ± 1.7	4 ± 2.7
PE+OL	14.8 ± 1.4	17.4 ± 2.1	17.3 ± 2.3	15.3 ± 1	20.5 ± 3.2	17.9 ± 3.9
PG	8.1 ± 2	16.2 ± 3.4	13.1 ± 3.4	5 ± 1	16.6 ± 3.9	11.7 ± 1.1
PC	8.2 ± 2	7.7 ± 3.1	6.2 ± 2.1	10.1 ± 3.4	7.7 ± 3.7	48.1 ± 1.6
SQDG	7.9 ± 3.2	ND	ND	14.8 ± 5.9	ND	15.9 ± 5.7
SQDG+PG	16 ± 4.1	16.2 ± 3.4	13.1 ± 3.4	19.8 ± 6.6	16.6 ± 3.9	27.6 ± 6.2

^a Membrane lipid composition of *Sinorhizobium meliloti* 1021 wild type (WT), and derivatives of thereof: NG8 ($\Delta 2490$), SLD12 ($\Delta sqdB$), NG8 carrying pDRT007 ($\Delta 2490/2490$), NG8 carrying the empty vector pBBR1MCS-2 ($\Delta 2490/EV$) and OD1 ($\Delta olsB-\Delta btaA$) after growth on low (0.02 mM) phosphate-containing minimal medium. The values shown are mean values ± standard deviation derived from three independent experiments. ND, not detected.

Table 2. Mass spectrometric data from SQDG species in extracts of *S. meliloti* NG8 pDRT007 and *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pDRT005 pDRT008.

[M-H] ⁻ nominal <i>m/z</i>	<i>S. meliloti</i> NG8 pDRT007 ^a [M-H] ⁻ (<i>m/z</i> error) and product ion accurate <i>m/z</i> values (assignment)	<i>E. coli</i> pDRT005 pDRT008 ^b [M-H] ⁻ (<i>m/z</i> error) and product ion accurate <i>m/z</i> values (assignment)	Deduced fatty acid composition
763	-	763.46710 (0.1 ppm) 535.25823 (- C ₁₄ H ₂₈ O ₂) 509.24255 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂)	14:0, 16:1
765	-	765.48279 (0.04 ppm) 537.27395 (- C ₁₄ H ₂₈ O ₂) 509.24258 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	14:0, 16:0
789	-	789.48277 (0.07 ppm) 535.25818 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂)	16:1, 16:1
791	791.49843 (0.07 ppm) 537.27391 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂) 535.25818 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	791.49841 (0.07 ppm) 537.27383 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂) 535.25819 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	16:0, 16:1 ^c
793	793.51405 (0.09 ppm) 537.27389 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	793.51407 (0.07 ppm) 537.27388 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	16:0, 16:0
817	-	817.51403 (0.11 ppm) 563.28944 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂) 535.25826 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	16:1, 18:1
819	819.52975 (0.03 ppm) 563.28958 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂) 537.27381 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	819.52973 (0.05 ppm) 563.28954 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂) 537.27388 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	16:0, 18:1 ^c

831	831.52956 (0.25 ppm) 577.30502 (- C ₁₆ H ₃₀ O ₂) 535.25816 (- C ₁₉ H ₃₆ O ₂)	-	16:1, 19:1
833	833.54526 (0.2 ppm) 577.30493 (- C ₁₆ H ₃₂ O ₂) 537.27395 (- C ₁₉ H ₃₆ O ₂)	-	16:0, 19:1
845	845.54526 (0.2 ppm) 563.28972 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	845.54523 (0.23 ppm) 563.28963 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	18:1, 18:1
847	847.56089 (0.21 ppm) 565.30499 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂) 563.28936(- C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	-	18:0, 18:1
859	859.56101 (0.08 ppm) 577.30511 (- C ₁₈ H ₃₄ O ₂) 563.28972 (- C ₁₉ H ₃₆ O ₂)	-	18:1, 19:1
873	873.57638 (0.39 ppm) 577.30509 (- C ₁₉ H ₃₆ O ₂)	-	19:1, 19:1

^a The most intense signals were observed at *m/z* 819 and 833, with less intense signals at *m/z* 793, 859 and minor additional signals at *m/z* 791, 831, 845, 847, and 873.

^b The most intense signal was at *m/z* 819, with less intense species at *m/z* 791, 793, 817, 845 and very minor signals at *m/z* 763, 765, and 789.

Note that it is not possible from these data to make comparisons between the amounts of the SQDGs in the two different systems.

-: not observed.

^c Compounds reported by Yu *et al.* (2002) in *E. coli* expressing the *Arabidopsis* genes SQD1 and SQD2.

Table 3. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or Plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M1</i> ; cloning strain	Hanahan, 1983
S17-1	<i>thi pro recA hsdR⁻ hsdM⁺</i> RP4 integrated in the chromosome, 2-Tc::Mu, Km::Tn7 (Tp ^R /Sm ^R)	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21(DE3)	Expression strain	Studier <i>et al.</i> , 1990.
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 1021	Wild type used throughout this study	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
our		
NG8	<i>smc02490::cm</i>	This study
SLD12	<i>sqdB::kan</i>	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
OD1	Deficient in OL and DGTS, <i>olsA::spec</i> ; <i>btaA::gm</i>	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
Plasmids		
pLysS	Causes repression of T7 polymerase, Cm ^R	Studier, 1991
pET16b	Expression vector, Cb ^R	Novagen
pET17b	Expression vector, Cb ^R	Novagen
pBBR1MCS-2	Broad host-range vector, Nm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pRK404	Broad host-range vector, Tc ^R	Scott <i>et al.</i> , 2003
pRSFDuet-1	Expression vector, Km ^R	Novagen
pCDFDuet-1	Expression vector, Sp ^R	Novagen
pDRT005	pET16b carrying <i>smc02490</i> , Cb ^R	This study
pDRT007	pBBR1MSC-2 carrying <i>smc02490</i> , Nm ^R	This study
pBW41	pUC19a with a 7.2 kb PtsI fragment containing <i>sqdBDC</i>	Weissenmayer <i>et al.</i> , 2000

pDRT006	pRK404 with a 7.2 kb PstI fragment containing <i>sqdBDC</i> , Tc ^R	This study
pDRT008	pRK404 carrying <i>sqdBDC</i> , Tc ^R	This study
pJCR003	pET17b carrying <i>sqdB</i> , Cb ^R	This study
pJCR005	pRSFDuet-1 carrying <i>sqdB</i> (<i>mcs-2</i>) and <i>sqdD</i> (<i>mcs-1</i>), Km ^R	This study
pJCR006	pRSFDuet-1 carrying <i>sqdB</i> (<i>mcs-2</i>) and <i>sqdDC</i> (<i>mcs-1</i>), Km ^R	This study
pJCR007	pCDFDuet-1 carrying <i>smc02490</i> , Sp ^R	This study
pTB5035	<i>acpP_{Sm}</i> in pET9a, Km ^R	López-Lara and Geiger, 2000
pAL20	<i>acpS_{Sm}</i> in pET9a, Km ^R	Ramos-Vega <i>et al.</i> , 2009
pAasH	<i>aaSEc</i> in pET28a, Km ^R	Shanklin, 2000

^a Tc^R, Tp^R, Km^R, Cm^R, Gm^R, Cb^R, Nm^R: tetracycline, trimethoprim, kanamycine, cloramphenicol, gentamicin, carbenicillin, and neomycin resistance, respectively.

Figures

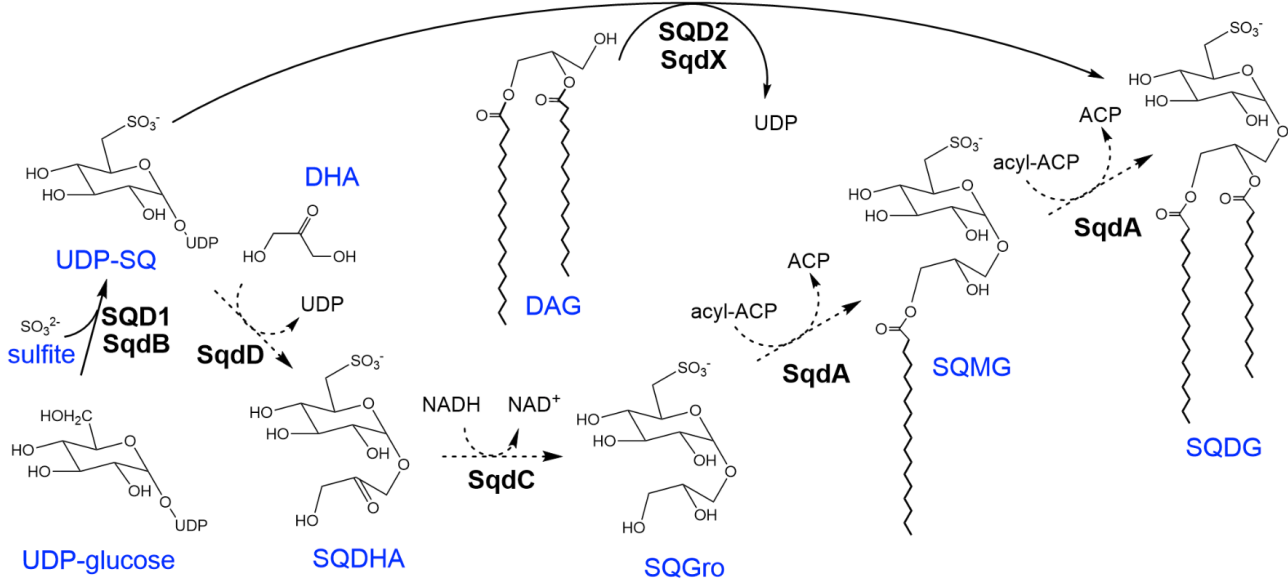


Figure 1. Pathways for SQDG biosynthesis. In all organisms producing SQDG, biosynthesis starts with the assembly of UDP-sulfoquinovose (UDP-SQ) from UDP-glucose and sulfite using the enzyme SqdB or its orthologue SQD1. In cyanobacteria and plants, SqdX or SQD2 transfer the sulfoquinovose moiety from UDP-SQ to diacylglycerol (DAG) leading to sulfoquinovose diacylglycerol (SQDG) formation. The proposed pathway for SQDG biosynthesis in *R. sphaeroides* after formation of UDP-SQ is indicated with dashed lines. SqdD transfer sulfoquinovose from UDP-SQ to dihydroxyacetone (DHA) leading to sulfoquinovosyl dihydroxyacetone (SQDHA) formation. SqdC reduces the ketone group in SQDHA to form sulfoquinovosyl glycerol (SQGro). SqdA has homology to acyltransferases and could performed one or two of the acylations required to form SQDG via sulfoquinovosyl monoacylglycerol (SQMG).

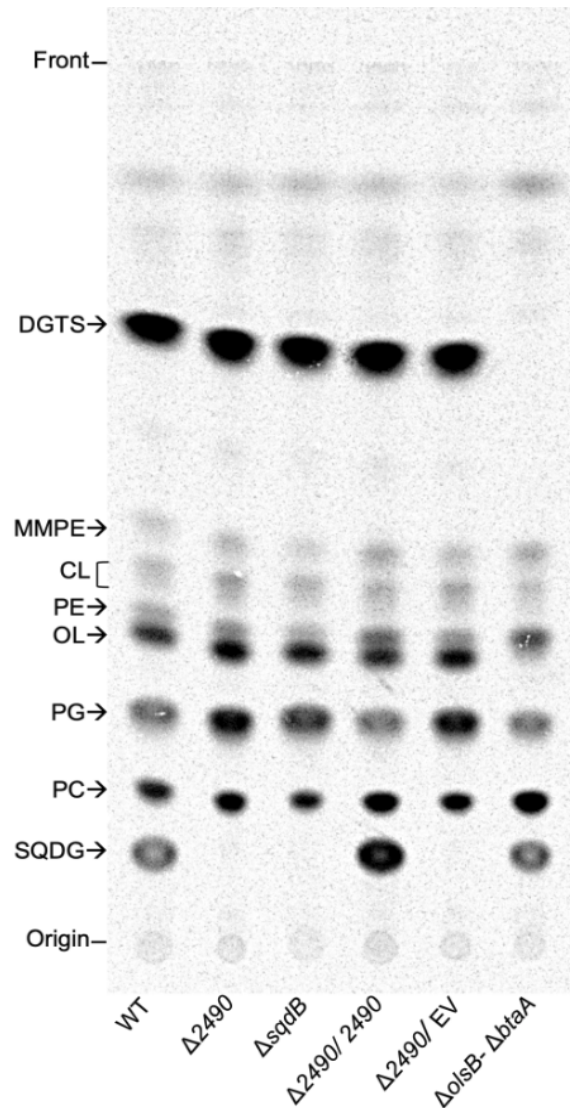


Figure 2. SMC02490 is essential for SQDG biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*.

S. meliloti strains were radiolabeled during growth on Sherwood minimal medium with limiting (0.02 mM) concentrations of phosphate and lipids were separated by one-dimensional TLC. The strains analyzed were *S. meliloti* wild type 1021 (WT), and derivatives thereof: NG8 ($\Delta smc02490$), SLD12 ($\Delta sqdB$), NG8 carrying pDRT007 ($\Delta smc02490/smc02490$), NG8 carrying the empty vector pBBR1MCS-2 ($\Delta smc02490/EV$) and OD1 ($\Delta olsB-\Delta btaA$). Migration of phosphorus-free lipids was identified by its absence in respective mutants: SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol (absent in $\Delta sqdB$); DGTS, diacylglyceryl trimethylhomoserine; and OL, ornithine lipid (both absent in $\Delta olsB-\Delta btaA$). Migration of phosphorus-containing lipids PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine, CL, cardiolipin; MMPE, monomethylphosphatidylethanolamine were assigned by comparing different mutant strains (Fig. S1).

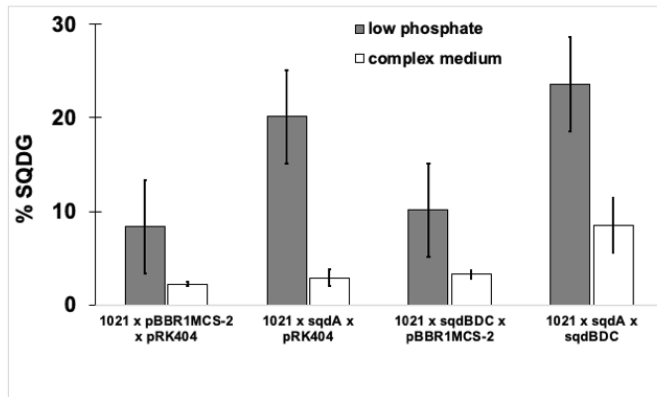
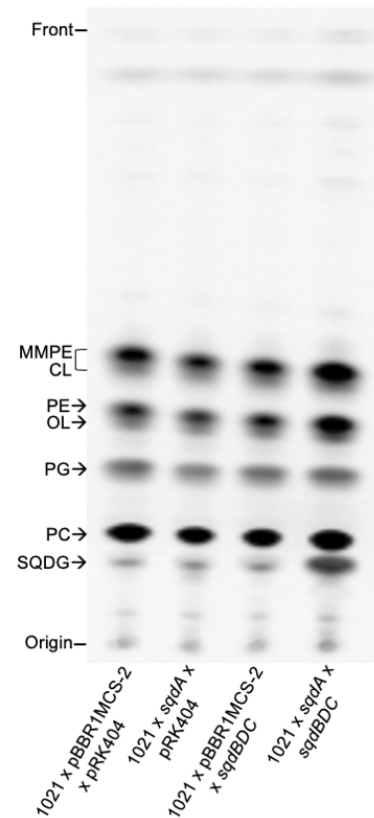
A**B**

Figure 3. Expression of *sqdA* and *sqdBDC* from plasmids significantly increases the amount of SQDG formed in *S. meliloti*.

A. Percentage of SQDG formed by *S. meliloti* 1021 wild type carrying either two empty vectors (1021 x pBBR1MCS-2 x pRK404), pDRT007 and pRK404 (1021 x *sqdA* x pRK404), pDRT008 and pBBR1MCS-2 (1021 x *sqdBDC* x pBBR1MCS-2) or pDRT007 and pDRT008 (1021 x *sqdA* x *sqdBDC*) grown on Sherwood minimal medium with limiting (0.02 mM) concentrations of phosphate (grey bars) or on PYCa⁺⁺ complex medium (white bars). Bars and error bars represent the mean and standard deviation of the SQDG percentage obtained for each strain from there independent experiments. A representative TLC of the lipid profile from the different strains grown on low phosphate medium is shown in Supporting information Fig. S2 and of the lipid profile of the strains grown on complex medium is shown in (B).

B. Separation on TLC of ¹⁴C-labeled lipids formed by *S. meliloti* 1021 wild type carrying either two empty vectors (1021 x pBBR1MCS-2 x pRK404), pDRT007 and pRK404 (1021 x *sqdA* x pRK404), pDRT008 or pBBR1MCS-2 (1021 x *sqdBDC* x pBBR1MCS-2) or pDRT007 and pDRT008 (1021 x *sqdA* x *sqdBDC*) grown on PYCa⁺⁺ complex medium.

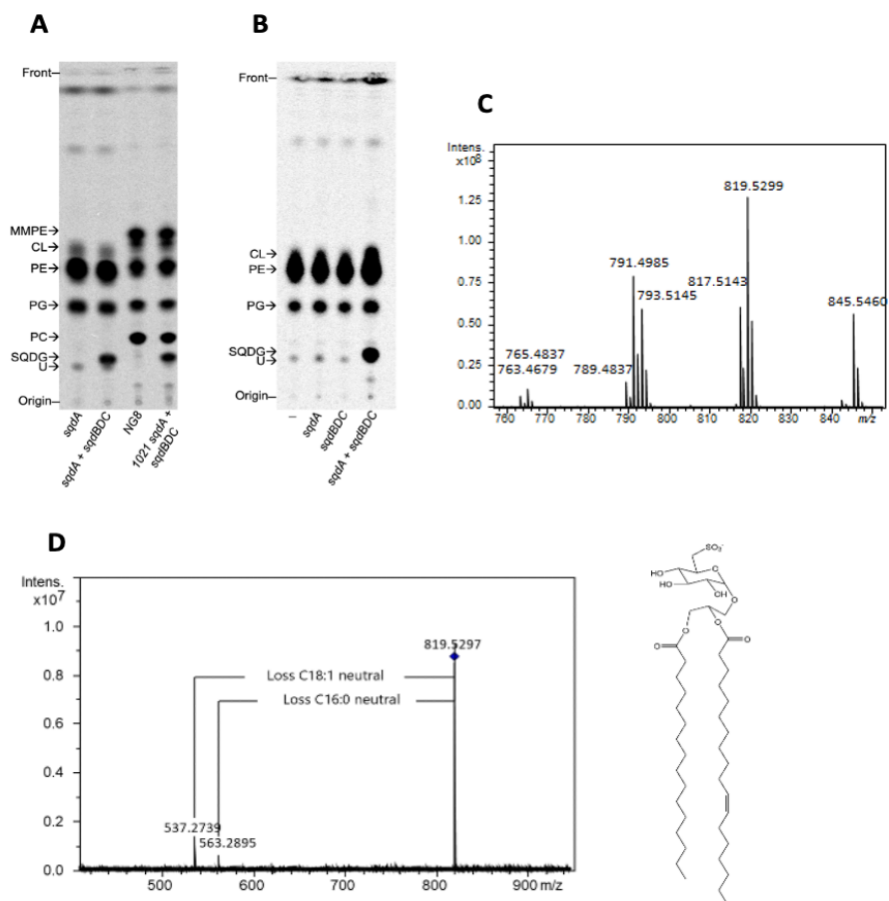


Figure 4. Expression of sinorhizobial *sqdBDC* and *smc02490* (*sqdA*) in *Escherichia coli* results in SQDG formation.

A. ^{14}C -acetate labeled lipids from *E. coli* BL21(DE3) pLysS containing either pDRT005 (*sqdA*) or pDRT005 plus pDRT008 (*sqdA* + *sqdBDC*) and lipids from *S. meliloti* deficient in *sqdA* (NG8) or from *S. meliloti* wild type carrying pDRT007 and pDRT008 (1021 *sqdA* + *sqdBDC*).

B. ^{14}C -acetate labeled lipids from *E. coli* BL21(DE3) pLysS containing either the empty vectors pET17b and pRK404 (-), pRK404 and pDRT005 (*sqdA*), pET17b and pDRT008 (*sqdBDC*) or pDRT005 plus pDRT008 (*sqdA* + *sqdBDC*).

C. Partial MALDI mass spectrum of lipids from *E. coli* BL21(DE3) pLysS containing pDRT005 plus pDRT008 showing different SQDG signals.

D. Collision induced dissociation product ion spectrum of the ion at m/z 819 produces only two very clear product ions derived by loss of each of the two fatty acyl chains. Tentative structure shown at the right of the panel.

Abbreviations for lipids spots in TLCs as in Fig. 2. U: unknown lipid.

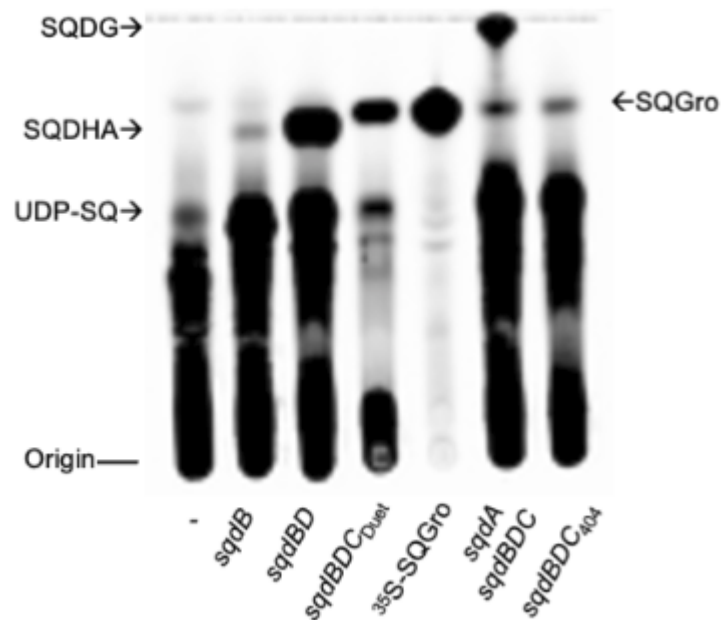


Figure 5. SQGro is an intermediary in the sinorhizobial pathway for SQDG biosynthesis.

Thin layer chromatography of ^{35}S -sulfate labelled, water-soluble compounds obtained from *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying either the empty vector pET17b (-), pJCR003 (*sqdB*), pJCR005(*sqdBD*), pJCR006 (*sqdBDC_{Duet}*), pDRT005 and pDRT008 (*sqdA sqdBDC*), or pDRT008 (*sqdBDC₄₀₄*) in comparison to ^{35}S -labeled sulfoquinovosyl glycerol SQDG (^{35}S -SQGro). prepared from purified ^{35}S -SQDG. UDP-SQ: UDP sulfoquinovose, SQDHA: possible sulfoquinovosyl dihydroxyacetone. The mobile phase was ethanol: water: acetic acid (20:10:1, v/v).

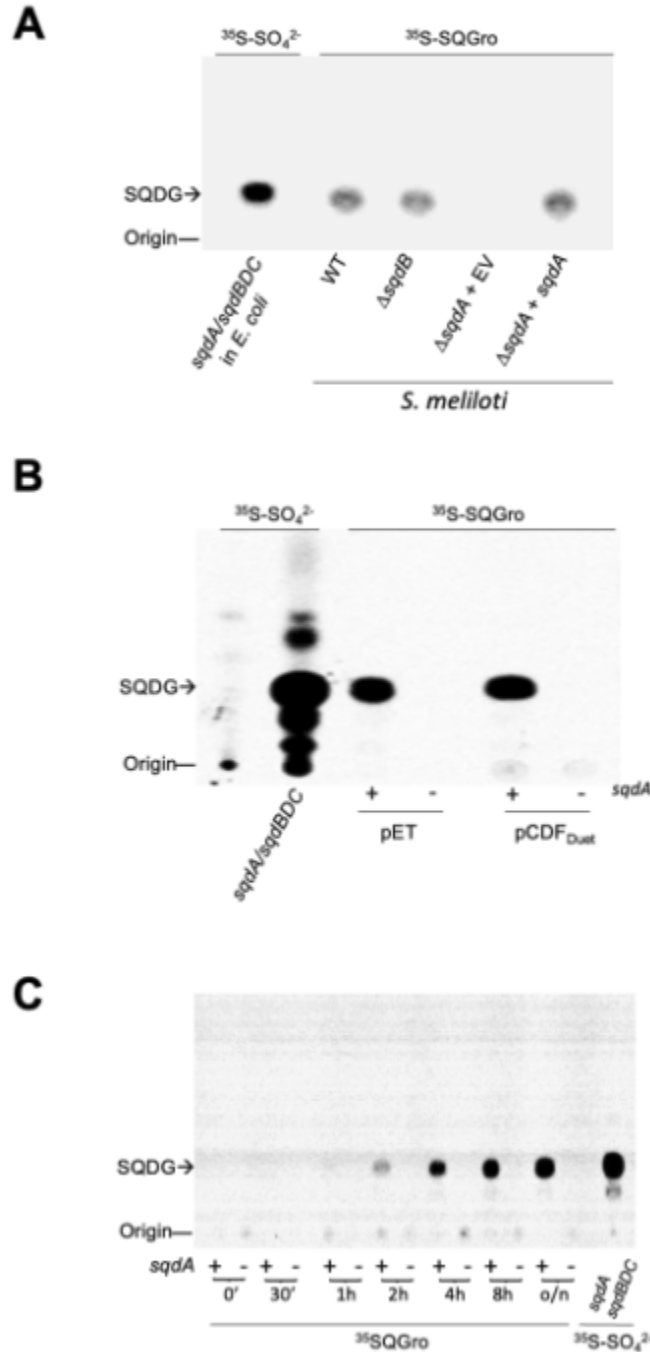


Figure 6. SqdA is required for incorporation of exogenous SQGro into SQDG.

A. ^{35}S -labeled lipids isolated from *S. meliloti* wild type carrying pDRT007 and pDRT008 (*sqdA sqdBDC*), *S. meliloti* wild type (WT), *sqdB* mutant SLD12 ($\Delta sqdB$), and *sqdA* mutant NG8 carrying an empty vector ($\Delta sqdA + EV$) or complemented with pDRT007 ($\Delta sqdA + sqdA$) and grown in PYCa^{++} complex medium in the presence of ^{35}S -sulfate (*sqdA sqdBDC*) or in the presence of ^{35}S -SQGro.

B. ^{35}S -labeled lipids isolated from *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying either pET17b and pRK404 (-), pDRT005 and pDRT008 (*sqdA sqdBDC*), or pET-plasmids (pET) containing *sqdA* (+), or empty vector (-), or pCDF_{Duet} plasmids (pCDF_{Duet}) containing *sqdA* (+) or empty vector (-) grown in LB medium in the presence of ^{35}S -sulfate or in the presence of ^{35}S -SQGro.

C. Incorporation of ^{35}S -SQGro by *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying either the empty plasmid pET17b (-) or the *sqdA* bearing plasmid pDRT005 (+) at the indicated times. As a control SQDG obtained from *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying pDRT005 and pDRT008 (*sqdA sqdBDC*) grown in the presence of ^{35}S -labeled sulfate.

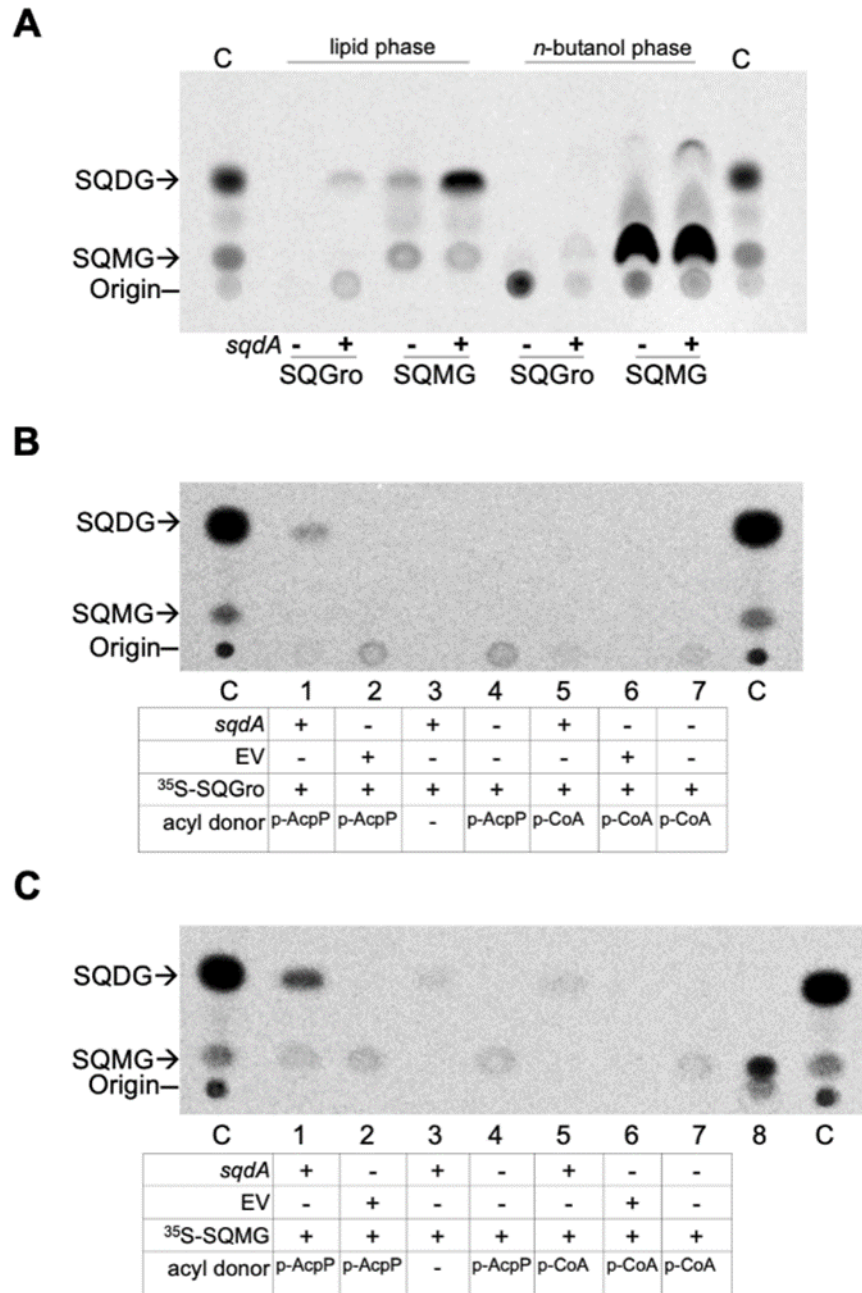


Figure 7. Crude extracts of *E. coli* carrying *sqdA* can convert SQGro and SQMG to SQDG.

A. Four reactions were set up with crude extracts obtained either from *E. coli* carrying the empty vector pET17b (-) or the *sqdA*-containing plasmid pDRT005 (+). With both extracts the labeled substrates ³⁵S-SQGro or ³⁵S-SQMG were assayed. All reactions contained palmitoyl-AcpP as acyl donor. Compounds obtained in the chloroform phase of a Bligh and Dyer extraction (lipid phase) are shown. The resulting aqueous

phase of the Bligh and Dyer extraction of the reactions was submitted to *n*-butanol extraction (*n*-butanol phase) and separated by one dimension TLC analysis.

B and **C**. One dimensional TLC analyses of ³⁵S-lipids obtained from different *in vitro* reactions using as substrates ³⁵S-SQGro (**B**) or ³⁵S-SQMG (**C**) and as acyl donors palmitoyl-AcpP (p-AcpP), palmitoyl-CoA (p-CoA) or none (-). The use of crude extracts obtained either from *E. coli* carrying the *sqdA*-containing plasmid pDRT005 (*sqdA*) or carrying the empty vector pET17b (EV) is indicated. In lane 8 of **C**, a portion of the purified ³⁵S-SQMG (the same amount as used in reactions) is shown and no SQDG is detectable.

Partial hydrolysates of ³⁵S-SQDG samples contained SQMG and SQDG and were used as controls (C).

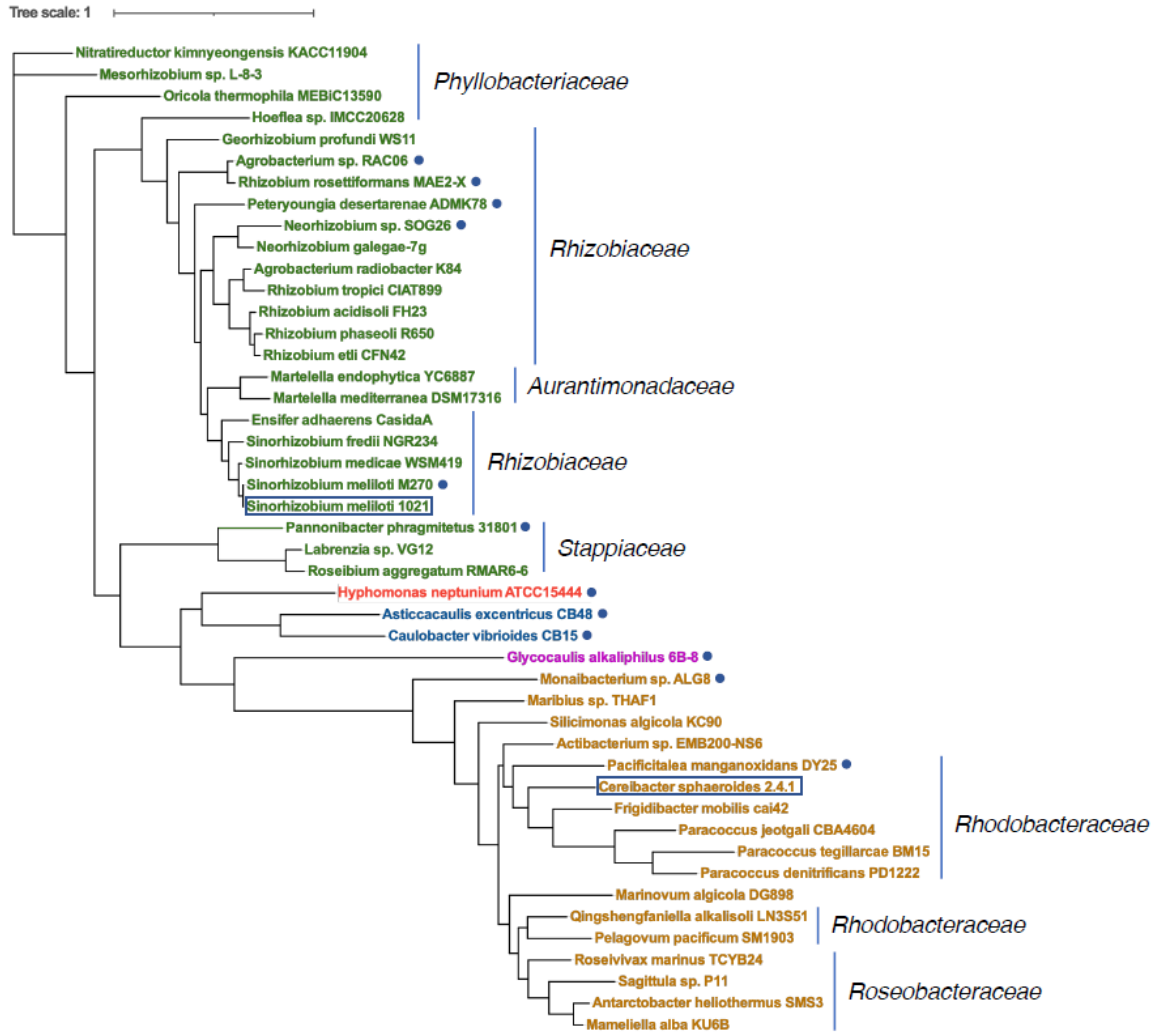


Figure 8. Phylogenetic analysis of the distribution of SqdA proteins. Maximum likelihood phylogenetic tree of homologous proteins from the indicated genomes based on the amino acid sequence of SMc02490. Strains are coloured according to the order they belong to *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) in green, *Rhodobacterales* in light brown, *Hyphomonadales* in red, *Caulobacterales* in blue, and *Maricaulales* in pink. Families are indicated next to the tree. Sequences which are encoded in genomes without the other genes for SQDG biosynthesis are marked with a blue dot next to them. The strains *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *Cereibacter* (*Rhodobacter*) *sphaeroides*, require SqdA for SQDG biosynthesis are enclosed in rectangles. Sequences were aligned using muscle 5.1 (Edgar, 2021). Maximum likelihood phylogenetic tree was generated with 100 bootstrap replicates (RAxML 8.2.12). The scale bar is provided as a reference for branch lengths. Gene locus tags are available in Tables S2 and S3.

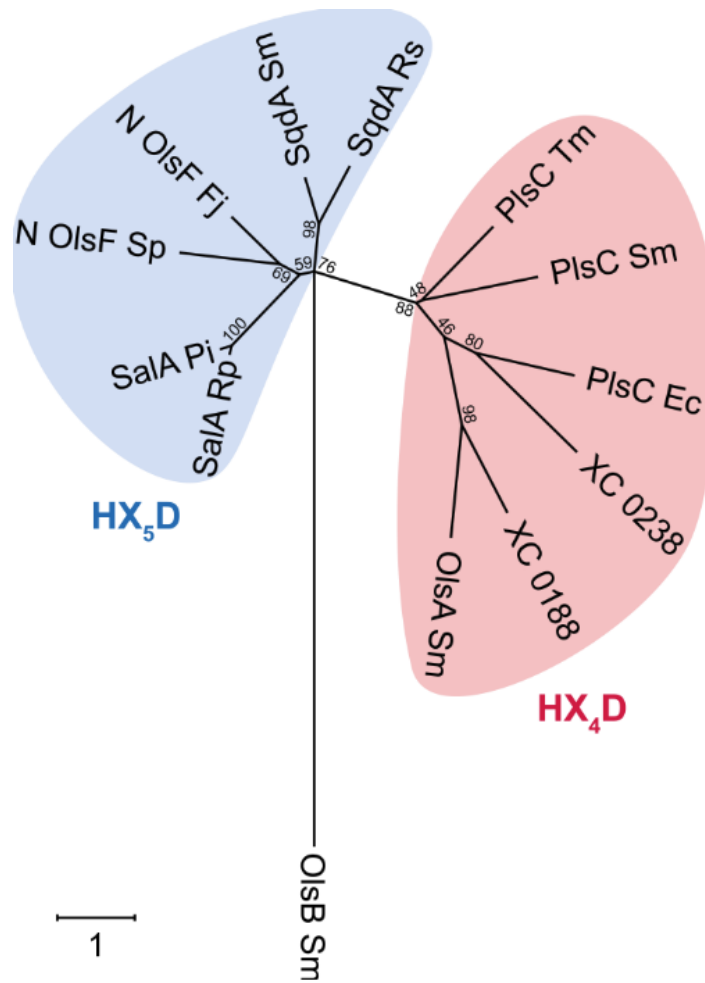


Figure 9. Unrooted phylogenetic tree of selected lyso-lipid acyltransferases with demonstrated function. Amino acid sequences were aligned using the Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The tree was constructed using the program MEGA version X (<http://www.megasoftware.net/>) employing the maximum likelihood method. Distances between sequences are expressed as 1 change per amino acid residue. The number at each node represents the bootstrap value as a percentage of 100 replications. ORFs were SqdA from *R. sphaeroides* (SqdA Rs) and *S. meliloti* (SqdA Sm) required for SQDG biosynthesis (Benning and Sommerville, 1992a; this work), *N*-terminal sequences (300 aa) of OlsF sequences from *F. johnsoniae* (N OlsF Fj) and from *S. proteomaculans* (N OlsF Sp) involved in ornithine lipid biosynthesis (Vences-Guzmán *et al.*, 2015), SalA from *Phaeobacter inhibens* (SalA Pi) and from *Ruegeria pomeroyi* (SalA Rp) required for biosynthesis of a sulfur-containing amino lipid (Smith *et al.*, 2021); PlsC from *Thermotoga maritima* (PlsC Tm) (Robertson *et al.*, 2017), PlsC from *E. coli* (PlsC Ec) and PlsC from *S. meliloti* (PlsC Sm) (Basconcello

et al., 2009b), OlsA from *S. meliloti* (OlsA Sm) (Weissenmayer *et al.*, 2002), and the two lyso-PC acyltransferases (XC 0238 and XC0188) described in *X. campestris* (Moser *et al.*, 2014). The sequence of the *N*-acyltransferase OlsB from *S. meliloti* (OlsB Sm) was used as outgroup (Gao *et al.*, 2004).

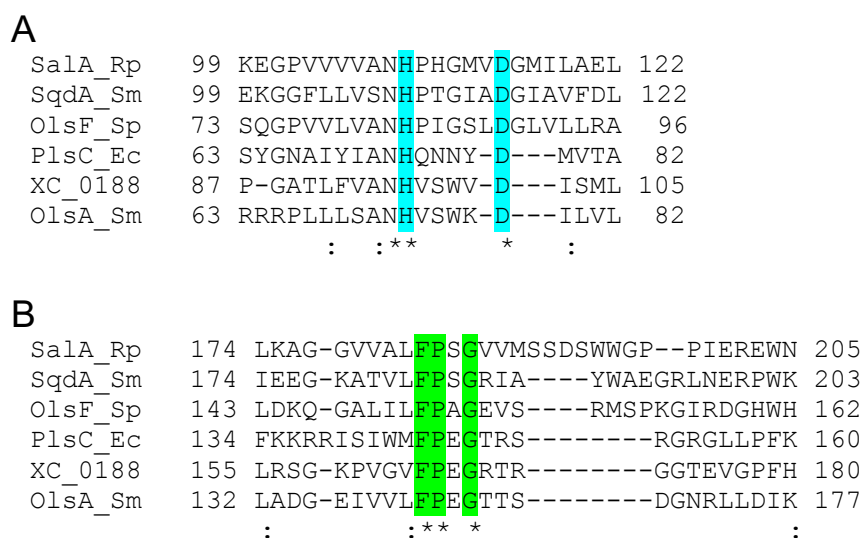


Figure 10. Alignment of two conserved blocks of *S. meliloti* SqdA and other characterized lyso-lipid acyltransferases of bacteria. Amino acid sequences were aligned using the Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). In **(A)** the region containing the amino acids of the catalytic center (HX_{4/5}D) with H and D in light blue shading are shown. In SqdA, SalA, and *N*-terminal OlsF there are 5 amino acids between H and D while in PlsC, XC_0188 and OlsA there are 4 amino acids. In **(B)** the region containing the substrate binding site (FPXGXX) with FP and G in green is shown. Description of ORFs are given in figure legend 9.

Supplementary Information

Formation of sulfoquinovosyl diacylglycerol by acylation of sulfoquinovosyl glycerol

Jessica Y. Cuevas-Rivas¹, Diego Rodriguez-Terrones¹, Napoleón González-Silva¹, Ángeles Moreno-Ocampo¹, Gabriela Guerrero¹, Ed Bergström², Jane E. Thomas-Oates², Otto Geiger¹ and Isabel M. López-Lara^{1*}

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, Mexico.

²Department of Chemistry and Centre of Excellence in Mass Spectrometry, University of York, York, UK.

*Corresponding author: Isabel M. López-Lara. E-mail: isabel@ccg.unam.mx; Telephone: +52-7773291703

Table S1. Membrane lipid composition of *Sinorhizobium meliloti* 1021 carrying either two empty vectors (1021 x pBBR1MCS-2 x pRK404), *smc02490* in pBBR1MCS-2 and pRK404 vector (1021 x pDRT007 x pRK404), pBBR1MCS-2 vector and *sqdBDC* in pRK404 (1021 x pBBR1MCS-2 x pDRT008) or *smc02490* in pBBR1MCS-2 and *sqdBDC* in pRK404 (1021 x pDRT007 x pDRT008) after growth on low (0.02 mM) phosphate-containing minimal medium or on PYCa⁺⁺ complex medium.^a

Composition (% of total ¹⁴ C)								
Lipid	1021 x pBBR1MCS-2 x pRK404		1021 x pDRT007 x pRK404		1021 x pBBR1MCS-2 x pDRT008		1021 x pDRT007 x pDRT008	
	low phosphate	complex medium	low phosphate	complex medium	low phosphate	complex médium	low phosphate	complex medium
DGTS	62.3 ± 1.6	ND	53.8 ± 2.4	ND	59.1 ± 1.2	ND	43.3 ± 0.2	ND
MMPE + CL	6.8 ± 1.2	30.7 ± 2.3	7.3 ± 1.5	28.3 ± 0.9	7.0 ± 1.2	28 ± 3.8	9.3 ± 0.8	27.5 ± 4.7
PE+ OL	12.3 ± 1.6	19.7 ± 0.1	8.8 ± 3.2	19.7 ± 1.1	11.1 ± 1	19.5 ± 2.2	9.7 ± 2	19.2 ± 4.4
PG	5.8 ± 1	10.4 ± 1.6	3.5 ± 0.6	9.1 ± 1.1	6.9 ± 0.8	9.5 ± 0.8	3.6 ± 0.3	7 ± 0.8
PC	4.5 ± 0.9	37 ± 1.1	6.5 ± 1.4	40 ± 1.3	5.7 ± 0.7	39.7 ± 5.2	10.6 ± 1.4	37.8 ± 11.2
SQDG	8.3 ± 1.6	2.2 ± 0.2	20.1 ± 2.6	2.9 ± 0.9	10.2 ± 2.8	3.3 ± 0.4	23.5 ± 3.4	8.5 ± 2.9

^a The values shown are mean values ± standard deviation derived from three independent experiments. ND, not detected.

Table S2. Alphaproteobacteria containing the four ORFs SqdA, SqdB, SqdD and SqdC for SQDG biosynthesis. For each ORF, an identity $\geq 30\%$ and a coverage of at least 60% to the *S. meliloti* 1021 ORFs was considered. (Excel document Table S2).

Table S3. Alphaproteobacteria containing a copy of SqdA showing an E value of less than e^{-40} and which do not contain homologous for SqdB, SqdD or SqdC. (Excel document Table S3).

Table S4. Oligonucleotides primers used for construction of NG8 mutant ($\Delta smc02490$). Introduced restriction sites are underlined.

Primer number	Oligonucleotide primer sequences (5' \rightarrow 3')	Restriction site	PCR product bp	Plasmid
primer pair for upstream region:				
oLOP163	ATGTTGATATCGATGCGTCGCGAAAGAGTGG	EcoRV	1072	pNG45
oLOP164	AAAGGATCCCAGCGTATCGACGATATGGC	BamHI		
primer pair for downstream region:				
oLOP165	AAAGGATCCCCGATGGAAGTGACACGTGC	BamHI	1045	pNG50
oLOP166	ACTCTCTAGAGAAGACTGGTCTCCGGTTCG	XbaI		

For inactivation of the gene coding for SMC02490, the upstream and downstream regions were PCR-amplified (XL-PCR kit; Applied Biosystems) with each specific pair of oligonucleotide primers from genomic DNA of *S. meliloti* 1021, introducing restriction sites (underlined). Subsequently, the upstream region was cloned into the pCR2.1-TOPO® vector (Invitrogen) and the downstream region into pBluescriptSK+ (Stratagene) resulting in plasmid pNG45 and pNG50, respectively. The 1072 bp EcoRV-BamHI upstream fragment was excised from pNG45 and was cloned into pNG50 digested with EcoRV-BamHI, resulting in plasmid pNG52. Then, the chloramphenicol resistance-conferring cassette was obtained from pCAT (González-Silva *et al.*, 2011) as BamHI fragment and cloned between upstream and downstream regions contained in pNG52. From here, the regions usually flanking *smc02490* and the chloramphenicol resistance-conferring cassette located in between those regions were cloned into the suicide vector pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) leading to plasmid pNG54. The construct was introduced into wild type *S. meliloti* 1021, and double recombinants in which

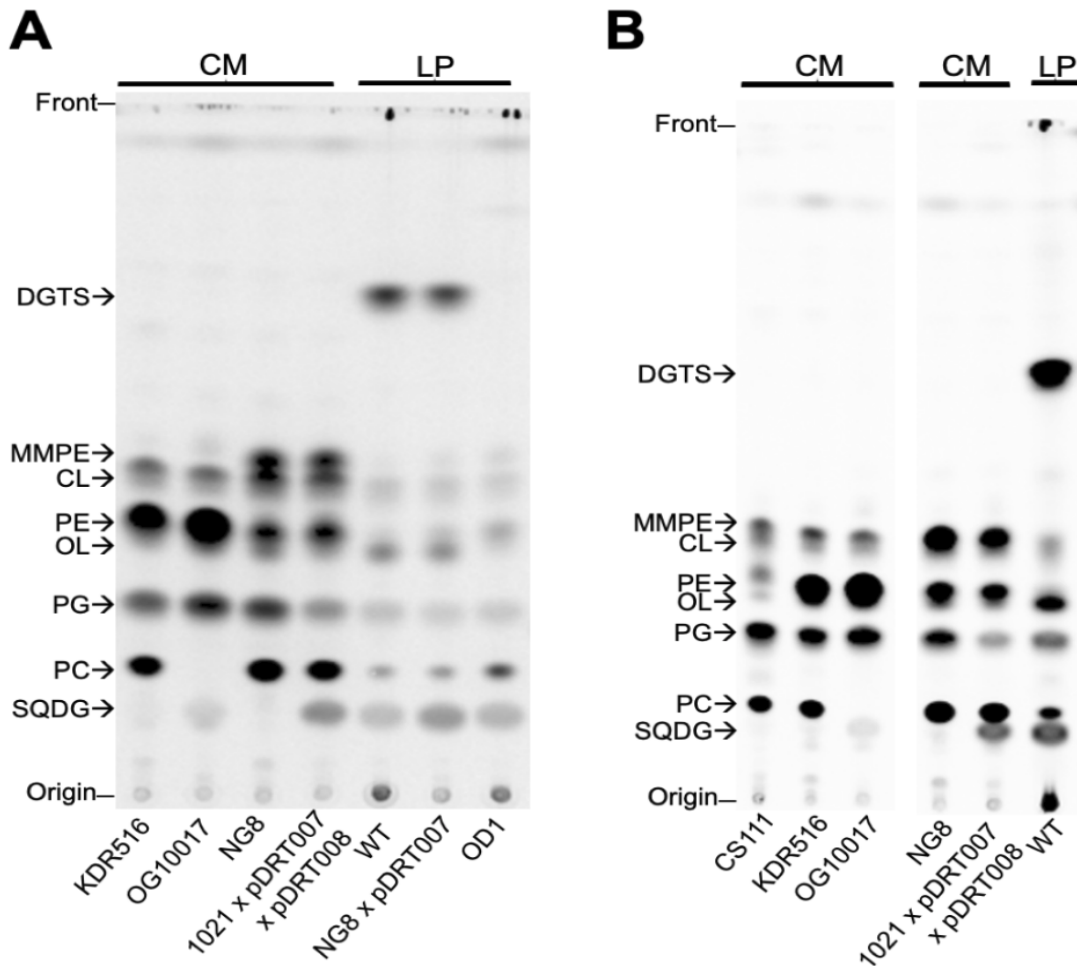
chloramphenicol resistance-conferring cassette had replaced the sinorhizobial gene were obtained following a procedure described previously (Sohlenkamp *et al.*, 2004). Mutations in which the original sinorhizobial gene was replaced by the chloramphenicol resistance-conferring cassette were confirmed by Southern-blot hybridization.

Table S5. Oligonucleotides primers used for construction of expression plasmids.

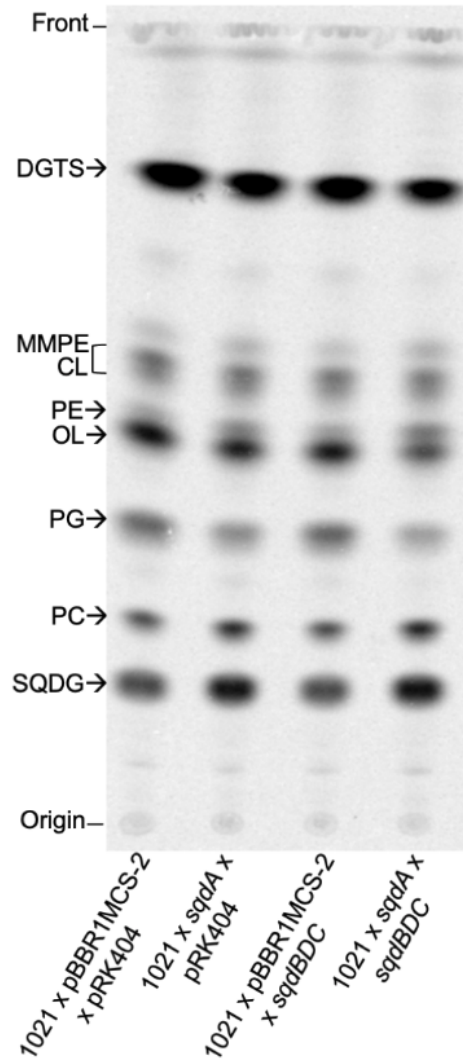
Primer name	Oligonucleotide primer sequences (5' → 3')	Restriction site	Plasmid name	Expressed protein
oLOP161	ACCTTATCCATGGCGAGACGTGATTCGGC	NcoI	pDRT005	SMc02490
oLOP162	AAAGGATCCTTAGCCCCGTACAACCGCCC	BamHI		(SqdA)
oLOP357	AGGAATACATATGAAGATTGCAGTCCTCGGC	NdeI	pJCR003	SqdB
oLOP358	AATGGATCCTCATGAAACCGATTTTCAGCCG	BamHI		
oLOP359	ACCTTATCCATGGGCCGCGTCTTCGCCAG	NcoI	pJCR001	SqdD
oLOP360	TAATGGATCCTCATGGCGACGTGAGGCCGG	BamHI		
oLOP361	TAATGGATCCTTAGGGTGAGGGCGAAATC	BamHI	pJRC002	SqdDC

Additional references for supplementary materials

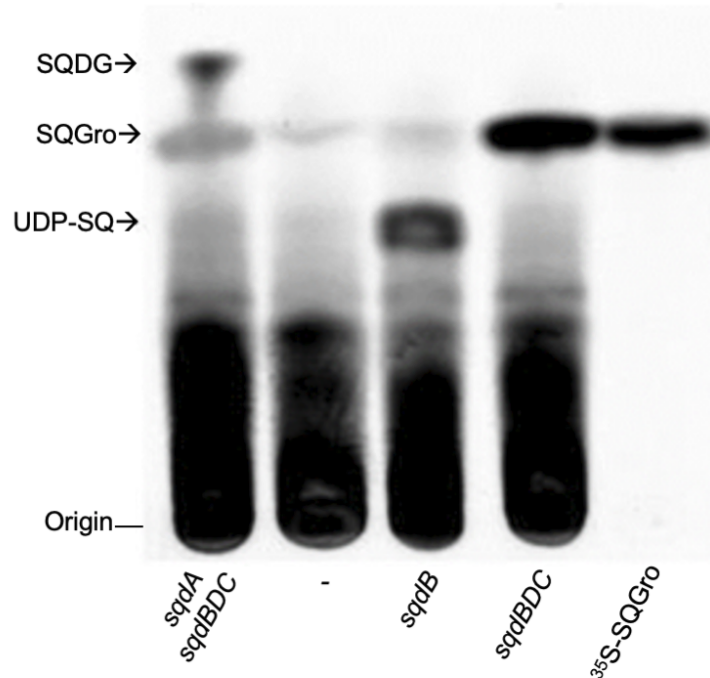
- de Rudder KE, López-Lara IM, Geiger O. (2000). Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol Microbiol* 37(4): 763-772. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02032.x.
- Geiger O, Sohlenkamp C, Vera-Cruz D, Medeot DB, Martínez-Aguilar L, Sahonero-Canavesi DX, Weidner S, Pühler A, López-Lara IM. (2021). ExoS/ChvI two-component signal-transduction system activated in the absence of bacterial phosphatidylcholine. *Front Plant Sci* 12: 678976. doi: 10.3389/fpls.2021.678976.
- González-Silva N, López-Lara IM, Reyes-Lamothe R, Taylor AM, Sumpton D, Thomas-Oates J, Geiger O. (2011). The dioxygenase-encoding *olsD* gene from *Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry* 50(29): 6396-63408. doi: 10.1021/bi200706v.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1): 69-73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-90327.
- Sohlenkamp C, de Rudder KE, Geiger O. (2004). Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *J Bacteriol* 186(6): 1667-1677. doi: 10.1128/JB.186.6.1667-1677.



Supplementary figure S1. Lipid profile of different *S. meliloti* strains resolved by one-dimensional TLC. **A** and **B** are two different examples of TLCs using ^{14}C -acetate labeled lipids obtained from *S. meliloti* strains grown either for 24 hours on complex media (CM) or for 48 hours on low (0.02 mM) phosphate-containing minimal medium (LP). Lipids were obtained from the strains KDR516 which lacks MMPE and DMPE (de Rudder *et al.*, 2000), OG10017 which lacks MMPE, DMPE and PC (de Rudder *et al.*, 2000), NG8 which lacks SQDG (this work). The wild type 1021 containing plasmids pDRT007 and pDRT008, increased production of SQDG on CM (this work) whereas wild type 1021 (WT) grown on LP forms DGTS, OL and SQDG major lipids (Geiger *et al.*, 1999). NG8 carrying pDRT007, increased the amount of SQDG (this work), OD1, lacks DGTS and OL (López-Lara *et al.*, 2005), and CS111, lacks PE (Sohlenkamp *et al.*, 2004). Spots for PE and OL were not separated and, therefore, were quantified together. In some cases, as in (**B**), CL and MMPE were not completely separated and were quantified together. In the examples shown here, the complex medium used was LB/MC containing 10 mM CaCl_2 that confers similar growth rate to strains 1021, CS111 and OG10017 (Geiger *et al.*, 2021).



Supplementary figure S2. Separation on TLC of ^{14}C -labeled lipids formed by *S. melioli* 1021 wild type carrying either two empty vectors (1021 x pBBR1MCS-2 x pRK404), pDRT007 and pRK404 (1021 x *sqdA* x pRK404), pDRT008 or pBBR1MCS-2 (1021 x *sqdBDC* x pBBR1MCS-2) or pDRT007 and pDRT008 (1021 x *sqdA* x *sqdBDC*) grown on Sherwood minimal medium with limiting (0.02 mM) concentrations of phosphate. A representative TLC out of three is shown and the corresponding lipid quantifications are presented in Table S1.



Supplementary figure S3. SQGro is an intermediary in the sinorhizobial pathway for SQDG biosynthesis.

Thin layer chromatography of ^{35}S -sulfate labelled, water-soluble compounds obtained from *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying either pDRT005 and pDRT008 (*sqdA sqdBDC*), the empty vector pET17b (-), pJCR003 (*sqdB*), pJCR006 (*sqdBDC_{Duet}*), in comparison to ^{35}S -labeled sulfoquinovosyl glycerol prepared from purified ^{35}S -SQDG (^{35}S -SQGro). UDP-SQ: UDP sulfoquinovose. The mobile phase was ethanol: water: acetic acid (20:10:1, v/v).

DISCUSIÓN GENERAL

A continuación, se presenta una discusión general de los datos obtenidos en esta tesis doctoral.

Los lípidos de membrana bacterianos se clasifican en dos grandes grupos, los que poseen el grupo fosfato y los que no lo tienen, dentro de estos últimos se encuentra el sulfolípidos SQDG cuya distribución es mayoritaria en el grupo de las Gram negativas.

Los SQDGs están conformados por un grupo cabeza 6-desoxi-6-sulfoquinovosa en la posición *sn*-3 del esqueleto del glicerol y 2 ácidos grasos unidos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2.

El primer cuestionamiento en el desarrollo de este proyecto doctoral sobre la biosíntesis de sulfolípidos en *S. meliloti* fue, si la enzima SMc02490, homóloga a SqdA, se requería para sintetizar este lípido. Confirmamos de manera exitosa que SMc02490 es esencial para la biosíntesis de SQDG.

La expresión de *smc02490* en *trans* en un mutante deficiente de SQDG (NG8) restaura la formación de SQDG mientras que la introducción del vector vacío no lo hace.

Habiendo encontrado esta proteína funcionalmente homóloga a SqdA de *R. sphaeroides* y conociendo bien los otros tres genes involucrados en la síntesis de este lípido (*sqdBDC*) en nuestro organismo modelo avanzamos en el desarrollo de este proyecto, ya que una de nuestras interrogantes inmediatas era también conocer cuál era la función de la enzima SqdA en la biosíntesis del SQDG.

Evaluamos si la expresión de *sqdA* y *sqdBDC* contenidos en plásmidos en *S. meliloti* aumentaba significativamente la formación de SQDG en condiciones de suficiente fosfato y encontramos que el mutante NG8 de *S. meliloti* que lleva en *trans* el gen *sqdA* aumenta significativamente la cantidad de SQDG formada con respecto a la cantidad formada por la cepa silvestre en condiciones de limitación de fosfato ($14,8 \pm 5,9$ vs $7,9 \pm 3,2$), lo que indica un efecto de la dosis debido al nivel aumentado de *sqdA* proporcionado por el plásmido.

Estudiamos también el efecto proporcionado por copias extra del operón *sqdBDC* en *S. meliloti*. En condiciones de limitación de fosfato, la presencia de pRK404 que lleva *sqdBDC* no aumentó significativamente la formación de SQDG.

Basado en estos resultados, desarrollamos un experimento para averiguar si la expresión de *sqdA* y *sqdBDC* en *Escherichia coli* da como resultado la formación de SQDG.

En estudios anteriores se demostró que la biosíntesis de SQDG en *Arabidopsis* procede en dos pasos y la expresión de *SQD1* y *SQD2* en *E. coli* condujo a la formación de SQDG en esta bacteria (Yu *et al.*, 2002). Dado que la expresión homóloga de *sqdA* y el operón *sqdBDC* aumentó la formación de SQDG en *S. meliloti* cuando se cultivó en un medio complejo, exploramos si la expresión heteróloga de los cuatro genes en *E. coli* conduciría a la formación de SQDG.

Como era de esperar, la expresión de solo *sqdA* en *E. coli* no condujo a la formación de un compuesto con una movilidad similar a SQDG. Sin embargo, la expresión de *sqdA* y *sqdBDC* en *E. coli* condujo a una mancha prominente que muestra una movilidad similar a la de SQDG formada en *S. meliloti*.

Usando espectrometría de masas MALDI en modo de iones negativos, se observaron un total de ocho valores m/z consistentes con las especies SQDG solo en el espectro del extracto lipídico de la cepa de *E. coli* portadora de plásmidos con *sqdA* y con *sqdBDC*.

En la cepa de *E. coli* portadora de *sqdA* y *sqdBDC* cultivada en medio LB durante 18 h después de la inducción con IPTG, la cantidad de SQDG producida alcanza el $15,5 \pm 1,5$ % de los lípidos totales. Por lo tanto, utilizamos esta construcción para obtener SQDG para estudios posteriores. Esta cepa de *E. coli* productora de SQDG también podría usarse para obtener SQDG o derivados de la misma para futuras aplicaciones biotecnológicas (Benning *et al.*, 2008).

Al observar que se forma una cantidad significativa de SQDG después de la expresión de *sqdA* y *sqdBDC* en *E. coli*, resultado que soporta que las enzimas sinorhizobiales para la biosíntesis de SQDG son funcionales en *E. coli*, se propuso

que el SQGro se forme por la acción de las enzimas SqdB, SqdD y SqdC codificadas por el operón *sqdBDC*.

Obtuvimos SQGro fácilmente del SQDG ya que los enlaces ésteres de los glicerolípidos son sensibles al tratamiento con álcali suave. De esta manera, el SQDG no marcado obtenido de la cepa de *E. coli* sobreproductora se trató con álcali suave y se purificó el posible SQGro.

El análisis de esta muestra por espectrometría de masas MALDI en modo de iones negativos dio como resultado una precisión de masa para la composición elemental de SQGro dentro de 0,03 ppm. Además, el espectro de iones del producto mostró la pérdida de glicerol.

Después de demostrar que la hidrólisis alcalina suave de SQDG conduce a la formación de SQGro, se preparó un control de este compuesto siguiendo el mismo procedimiento, pero a partir de un cultivo desarrollado en presencia de [³⁵S]-sulfato. Hicimos diferentes construcciones de plásmidos para poder expresar genes en el orden de la vía biosintética propuesta. Los compuestos solubles en agua marcados con [³⁵S]-sulfato de la cepa de *E. coli* que expresa *sqdB* contienen una mancha prominente que no está presente en la cepa de *E. coli* que lleva un vector vacío. Con base en su comportamiento cromatográfico y la función conocida de SqdB, identificamos este compuesto como UDP-SQ. La expresión de *sdqBD* condujo a la acumulación de un punto de migración más rápido.

Rossak *et al.* (1997) encontraron que una cepa de *R. sphaeroides* mutada en *sqdC*, pero intacta en *sqdBD*, acumulaba sulfoquinovosil-1-O-dihidroxiacetona. Además, el compuesto de migración más rápida en la cepa de *E. coli* que expresa *sqdBD* mostró un R_f similar al mostrado anteriormente para la sulfoquinovosil dihidroxiacetona en un análisis de sistema TLC análogo (Fig. 3 en Rossak *et al.*, 1997). La expresión en *E. coli* de plásmidos que portan los genes *sqdBDC* resultó en la formación de una mancha con migración idéntica al control preparado de SQGro. Además, la cepa productora de SQDG presenta una mancha con la misma migración de SQGro. Mostramos por primera vez que SQGro es probablemente el

producto formado por el operón *sqdBDC* y reforzamos la idea del SQGro como intermediario en la biosíntesis de SQDG.

Para confirmar aún más al SQGro como intermediario de la biosíntesis de SQDG, agregamos ³⁵S-SQGro a diferentes cepas de *S. meliloti*. La adición de SQGro a la cepa silvestre *S. meliloti* da como resultado la detección de un compuesto marcado que migró como el control SQDG. Curiosamente, SQDG también se forma después de la adición de SQGro en una mutante de *S. meliloti* en *sqdB* que, de otro modo, es incapaz de formar SQDG. Este resultado indica que el SQGro reemplaza la función del operón *sqdBDC* y respalda aún más que SQGro es el producto formado por la acción del operón.

Para convertir SQGro en SQDG se requiere de dos acilaciones realizadas por al menos una aciltransferasa (Fig. 5). SqdA es la enzima candidata para realizar al menos una de estas acilaciones. De hecho, la adición de SQGro al mutante de *S. meliloti* que carece del gen para SqdA no dio como resultado la formación de SQDG mientras que la complementación de dicho mutante con el gen *sqdA* en *trans* restauró la formación de SQDG. Por lo tanto, se requiere SqdA para convertir SQGro exógeno en el lípido de membrana SQDG.

Además, la adición de SQGro a cepas de *E. coli* que portan *sqdA* en un plásmido pET16b o pCDFDuet resulta en la formación de SQDG mientras que las cepas que portan el plásmido vacío no forman ningún compuesto lipídico marcado con ³⁵S.

La formación de SQDG depende del tiempo y se puede observar después de 2 horas de inducción con IPTG en una cepa de *E. coli* portadora de *sqdA*. Estos resultados indican que SqdA puede realizar ambas acilaciones y convierte SQGro en SQDG o que las enzimas de *E. coli* realizan la reacción de acilación que falta.

Esta ruta de biosíntesis de SQDG a partir de SQGro sigue el mismo esquema que la llamada ruta de acilación de glicerofosocolina (GPC) descrita por primera vez en bacterias en el patógeno vegetal *Xanthomonas campestris* (Moser *et al.*, 2014) y, más tarde, en patógenos humanos Gram-positivos del grupo *Streptococcus mitis* (Joyce *et al.*, 2019). En la vía de acilación de GPC, la GPC exógena o la

lisofosfatidilcolina se acilan para formar PC. Se demostró que los estreptococos patógenos pueden usar los abundantes metabolitos humanos GPC y liso-PC para sintetizar el lípido de membrana PC (Joyce *et al.*, 2019).

Los SQDG son lípidos muy abundantes y las acil hidrolasas inespecíficas los convierten secuencialmente en los metabolitos liso-SQDG y SQGro (Goddard-Borger & Williams, 2017). Recientemente, se han descrito diferentes vías de degradación de sulfoquinovosa y SQGro (Sharma *et al.*, 2022) que permiten utilizar estos compuestos como fuente de carbono y azufre. Según nuestros resultados, el SQGro ambiental también se puede utilizar como componente biosintético para la síntesis del lípido de membrana SQDG, de manera análoga a como se utiliza la GPC humana como componente biosintético para la síntesis de PC (Joyce *et al.*, 2019).

La adición de SQGro marcado a un cultivo de *E. coli* que lleva *sqdA* condujo a la formación de SQDG, pero estos experimentos *in vivo* no aclararon la reacción específica llevada a cabo por SqdA. Anteriormente, se ha demostrado en el grupo de investigación del Dr. Geiger que las aciltransferasas OlsA y OlsB de *S. meliloti*, requeridas para la síntesis de LO, utilizan preferentemente la proteína acarreadora de acilo AcpP como donante de grupos acilo en las reacciones respectivas (Weissenmayer *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004).

Cuando se incubaron extractos libres de células de una cepa de *E. coli* portadora de un vector vacío con ³⁵S-SQGro y palmitoil-AcpP, no se detectaron compuestos marcados en la extracción lipídica ni en la posterior extracción con *n*-butanol de la fase acuosa de la reacción. Sin embargo, cuando la reacción se realizó con extractos libres de células de *E. coli* que habían expresado *sqdA*, se detectó la formación de SQDG y SQMG en la fase lipídica y *n*-butanol, respectivamente. Cuando se usó ³⁵S-SQMG como sustrato, el extracto crudo de una *E. coli* portadora de un vector vacío podría formar algo de SQDG. Sin embargo, cuando se usó el extracto de *E. coli* que contenía SqdA, la cantidad de SQDG formada aumentó significativamente (5x). Estos resultados muestran claramente un papel directo de

SqdA en la acilación de SQMG para formar SQDG, y concluimos que SqdA realiza la segunda acilación en la biosíntesis de SQDG.

La formación de SQDG a partir de SQGro requería la presencia de extracto crudo de la cepa que contenía *sqdA* y palmitoil-AcpP, mientras que no se detectó ningún producto cuando se usó palmitoil-CoA en lugar de palmitoil-AcpP. Para el segundo paso de acilación de SQMG a SQDG, SqdA formó algo de SQDG en ausencia de donador de acilo, que no aumentó cuando se agregó palmitoil-CoA a la reacción. Por lo tanto, SqdA requiere acil-AcpP como donante del grupo acilo para la reacción de aciltransferasa.

Las búsquedas iniciales de BLASTP con las secuencias SqdA y SqdD, que son específicas para la ruta de acilación de SQGro (Fig. 5), recuperaron solo secuencias de Alphaproteobacteria. Para determinar qué tan extendida podría estar esta vía para la biosíntesis de SQDG, buscamos en una colección de 16,076 genomas completos de proteobacterias, aquellos que portaban ORFs que mostraban ≥ 30 % de identidad de secuencia de proteínas y ≥ 60 % de cobertura con respecto a los ORFs de *S. meliloti*. La búsqueda arrojó un total de 238 genomas que codificaban las cuatro proteínas Sqd.

Todos los genomas eran de Alphaproteobacteria y 182 de ellos pertenecen al orden *Hyphomicrobiales*, que recientemente fue propuesto para reemplazar al orden *Rhizobiales* (Hördt *et al.*, 2020). De ellos, un total de 160 pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*, 9 a *Phyllobacteriaceae*, 9 a *Stappiaceae* y 4 a *Aurantimonadaceae*. Los otros 56 genomas pertenecen al orden Rhodobacterales donde 48 son de la familia *Rhodobacteraceae* y 9 de la familia *Roseobacteraceae*. Así, entre las proteobacterias, la ocurrencia de los cuatro ortólogos para la biosíntesis de SQDG en un organismo ocurre en menos del 1,5 % de los genomas analizados. Sin embargo, dado que el número total de Alphaproteobacteria presentes en nuestra colección fue de 1625, la prevalencia de la vía de acilación de SQGro en genomas completos asciende al 14,6 % dentro de Alphaproteobacteria.

La vía de acilación de SQGro parece estar restringida a algunos miembros de los órdenes *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) y *Rhodobacterales* de Alphaproteobacteria.

Villanueva *et al.* (2014) construyeron una filogenia extendida de proteínas SqdB y uno de los grupos que definieron, *sqdB2B*, incluye solo Alphaproteobacteria de los órdenes *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) y *Rhodobacterales*, reflejando así la distribución de la vía de acilación del SQGro. Curiosamente, recuperaron secuencias abundantes y diversas de genes del grupo *sqdB2B* en esteras microbianas marinas (Villanueva *et al.*, 2014), lo que podría indicar una prevalencia importante de la vía de acilación SQGro en dicho ecosistema.

La presencia de solo SqdA permite la incorporación de SQGro exógeno en los lípidos de la membrana y, por lo tanto, buscamos genomas que no contengan SqdB, SqdD o SqdC, pero que lleven un SqdA posiblemente funcional.

Determinamos experimentalmente que el límite del valor E es 10^{-40} para que una proteína tenga posiblemente la función de SqdA y encontramos 35 genomas que contienen SqdA y ninguno de los otros genes para la biosíntesis de SQDG. La mayoría de los genomas que contienen un SqdA huérfano eran de *Caulobacterales* (16), también se encontró en 7 genomas de *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) y en 7 genomas de *Rhodobacterales*. SqdA solo también aparece en 3 genomas del orden Hyphomonadales y 1 genoma del orden Maricaulares. Parece que SqdA tiene una distribución más amplia en Alphaproteobacteria que los otros genes necesarios para la ruta completa, ya que están restringidos a *Hyphomicrobiales* y *Rhodobacterales*.

Se construyó un árbol evolutivo con secuencias SqdA representativas (figura 8 en Cuevas-Rivas *et al.*, 2022) con secuencias de los *Hyphomicrobiales* y *Rhodobacterales*. Curiosamente, en ambos órdenes hay genomas que contienen SqdA huérfanos que muestran una alta relación con las proteínas SqdA con función demostrada. La prevalencia de SqdA por sí sola puede permitir que el organismo tome SQGro del medio ambiente para formar SQDG como hemos propuesto.

Analizamos mediante BlastP a SqdA con otras liso-lípido aciltransferasas que presentan un motivo HX₅D. Nuestro análisis mostró una similitud significativa entre

la secuencia de SqdA de *S. meliloti* y el dominio N-terminal de las proteínas OlsF (28 % de identidad y valor E de 6×10^{-27} en una superposición de 202 aminoácidos entre SqdA_{Sm} y OlsF_{Sp}). OlsF contiene dos dominios de aciltransferasa que son responsables de los dos pasos de acilación necesarios para la biosíntesis de lípidos de ornitina en *Serratia proteomaculans* o en *Flavobacterium johnsoniae* (Vences-Gúzman *et al.*, 2015).

El dominio C-terminal en OlsF está lejanamente relacionado con OlsB, una aciltransferasa de *S. meliloti* responsable de la N-acilación de ornitina para formar liso-lípido de ornitina (Gao *et al.*, 2004). La segunda acilación del lípido de ornitina en *S. meliloti* se lleva a cabo por la O-aciltransferasa OlsA (Weissenmayer *et al.*, 2002). Curiosamente, el dominio N-terminal de OlsF no está relacionado con OlsA, aunque ambos realizan la acilación del liso lípido de ornitina (Vences-Guzmán *et al.*, 2015; Weissenmayer *et al.*, 2002).

Heath y Rock (1998) describieron un motivo HX₄D como indicativo de aciltransferasas. Sin embargo, el dominio N-terminal de OlsF muestra un motivo HX₅D (Vences-Guzmán *et al.*, 2015). Durante nuestra alineación para construir el árbol filogenético de las proteínas SqdA, también encontramos un motivo HX₅D que se conserva estrictamente en todas las secuencias de SqdA.

Recientemente, se describió otra liso-lípido aciltransferasa, SalA, con un motivo HX₅D estrictamente conservado. SalA se requiere para el segundo paso de acilación de un aminolípido que contiene azufre recientemente descrito (Smith *et al.*, 2021). Otras liso-lípido aciltransferasas bacterianas bien caracterizadas son PlsC, responsable del paso final en la biosíntesis del fosfolípido ácido fosfatídico, el ya mencionado OlsA, y las liso-fosfatidilcolina aciltransferasas XC_0238 y XC_0188 de *X. campestris* (Moser *et al.*, 2014).

Un árbol filogenético construido con diferentes liso-lípidos aciltransferasas bacterianas separa claramente las que tienen un motivo HX₅D de las que tienen el motivo HX₄D (figura 9 en Cuevas-Rivas *et al.*, 2022). Alineamientos múltiples de secuencias con aciltransferasas representativas muestran la presencia de dos motivos de secuencia conservados (Fig. 10), que representan el centro catalítico

(HX_{4/5}D) y el posible bloque III identificado en las aciltransferasas como sitio de unión al sustrato (Lewin *et al.*, 1999), respectivamente. Merece un mayor análisis mecanístico la presencia del motivo HX₅D en las proteínas SqdA, SalA y OlsF .

La evidencia experimental generada en el presente trabajo de tesis contribuye en varios niveles referentes al campo de los lípidos de membrana sin P, siendo específicos en los SQDGs. Desde la biosíntesis y su distribución hasta la degradación de los mismos. Se propone que esta ruta de biosíntesis de SQDG en donde el ensamble ocurre de manera diferente a como lo hacen plantas y cianobacterias, tiene el propósito principal de ocupar la sulfoquinovosa glicerol presente en el ambiente en cantidades significativas.

Si bien el campo de los SQDGs no es totalmente desconocido, aún faltan muchos puntos que elucidar. Como por ejemplo, determinar las funciones biológicas específicas de éstos y sus intermediarios.

Es de total importancia conocer el impacto que tiene la degradación de este lípido azufrado, ya que según las estimaciones del ciclo del S en el mundo preindustrial predicen que la mayor proporción de S disponible para el crecimiento de las plantas estaba presente en la materia orgánica en descomposición del suelo. Además, la mayor parte del S presente en los organismos vivos se encontró en las plantas, con cantidades mucho más pequeñas contenidas en los microbios y los animales. Aproximadamente la mitad de este S en la biosfera está presente en los SQDGs y la otra mitad en proteínas. A partir de estimaciones del flujo a través de las plantas dentro del ciclo mundial anual del S, se cree que la síntesis anual total de SQDGs es del orden de 10¹³ kg por año. Estos cálculos se basan en varios supuestos, de modo que esta cifra puede representar una sobreestimación del flujo de S a través de SQDG. Sin embargo, incluso si este número es incorrecto en uno o dos órdenes de magnitud, sigue siendo una cifra asombrosamente grande que hace que la biosíntesis y degradación de SQ sea un contribuyente importante al ciclo global del biosulfuro (Revisado en Goddard-Borger & Williams, 2017).

Todos estos conocimientos generados en ciencia básica deben ser extrapolados y utilizados en el ámbito biotecnológico, médico y farmacéutico ya que sus aplicaciones resultan ser bastante prometedoras en estas áreas.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados generados en este estudio, se establece que:

1. La enzima SMc02490 es esencial para la biosíntesis del sulfolípidos SQDG en *S. meliloti* y por tanto identificamos a SqdA en nuestro modelo de estudio.
2. La expresión heteróloga de los cuatro genes *smc02490* (*sqdA*), *sqdB*, *sqdC* y *sqdD* en *E. coli* da lugar a la biosíntesis de SQDG.
3. La expresión de *sqdBDC* de *S. meliloti* en *E. coli* conduce a la formación del intermediario SQGro.
4. *S. meliloti* puede formar SQDG a partir de la adición de SQGro exógeno.
5. Se demostró mediante ensayos enzimáticos *in vitro* que SqdA es una aciltransferasa involucrada en la acilación de SQMG y que además usa acil-acpP como donante de grupos acilo.
6. La presencia de la enzima SqdA en bacterias permite el uso del abundante metabolito SQGro para la formación del lípido de membrana sin fósforo SQDG.
7. Los genes para la ruta SqdBDC solo se encuentran en los órdenes *Rhodobacterales* y *Rhizobiales* de las alfaproteobacterias.

PERSPECTIVAS

Los resultados y conclusiones generados en esta tesis doctoral dan sustento para proponer las siguientes perspectivas:

1. Establecer la reacción enzimática realizada por SqdA con la enzima purificada His-SqdA.
2. Establecer si el SQDG puede actuar como fuente de S en *S. meliloti* durante la inanición de sulfato, así como en los diferentes organismos que lo contienen.
3. Estudiar la distribución de la ruta en diferentes ecosistemas a través de estudiar datos presentes en metagenomas y metatranscriptomas.
4. Demostrar la función planteada en este trabajo para las proteínas SqdC y SqdD diseñando ensayos enzimáticos *in vitro*.
5. Con el conocimiento adquirido durante el desarrollo de este proyecto se podrán diseñar cepas de *E. coli* en las que el SQDG sea el lípido mayoritario, hasta más del 50%. Será de alto interés biotecnológico obtener SQDGs en gran cantidad y pureza a partir de cepas de *E. coli* superproductoras para su estudio en nuevos campos como la medicina.
6. Siguiendo una línea biotecnológica y aplicable se podrán diseñar cepas que produzcan el intermediario monoacilado SQMG, que es el derivado que presenta algunos de los efectos biológicos mencionados anteriormente.

CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo, así como sus características relevantes, están listados en la Tabla 1.

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes ^a	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M1</i> ; cepa para clonación	Hanahan, 1983
S17-1	<i>thi pro recA hsdR⁻ hsdM⁺</i> RP4 integrado en el cromosoma, 2-Tc::Mu, Km::Tn7 (Tp ^R /Sm ^R)	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21(DE3)	Cepa de sobreexpresión	Studier <i>et al.</i> , 1990.
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 1021	Cepa silvestre utilizada a lo largo de este estudio	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
our		
NG8	<i>smc02490::cm</i>	Este estudio
SLD12	<i>sqdB::kan</i>	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
OD1	Deficiente en OL y DGTS, <i>olsA::spec</i> ; <i>btaA::gm</i>	López-Lara <i>et al.</i> , 2005
Plasmidos		
pLysS	Causa represión de la polimerasa T7, Cm ^R	Studier, 1991
pET16b	Vector de expresión, Cb ^R	Novagen
pET17b	Vector de expresión, Cb ^R	Novagen
pBBR1MCS-2	Vector de amplio hospedero, Nm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pRK404	Vector de amplio hospedero, Tc ^R	Scott <i>et al.</i> , 2003
pRSFDuet-1	Vector de expresión, Km ^R	Novagen
pCDFDuet-1	Vector de expresión, Sp ^R	Novagen
pET28a	Vector de expresión, Km ^R	Novagen
pDRT005	pET16b que contiene <i>smc02490</i> , Cb ^R	Este estudio

pDRT007	pBBR1MSC-2 que contiene <i>smc02490</i> , Nm ^R	Este estudio
pBW41	pUC19a con un fragment PtsI de 7.2 kb que contiene <i>sqdBDC</i>	Weissenmayer <i>et al.</i> , 2000
pDRT006	pRK404 con un fragment PtsI 7.2 kb que contiene <i>sqdBDC</i> , Tc ^R	Este estudio
pDRT008	pRK404 que contiene <i>sqdBDC</i> , Tc ^R	Este estudio
pJCR003	pET17b que contiene <i>sqdB</i> , Cb ^R	Este estudio
pJCR005	pRSFDuet-1 que contiene <i>sqdB</i> (mcs-2) y <i>sqdD</i> (mcs-1), Km ^R	Este estudio
pJCR006	pRSFDuet-1 que contiene <i>sqdB</i> (mcs-2) y <i>sqdDC</i> (mcs-1), Km ^R	Este estudio
pJCR007	pCDFDuet-1 que contiene <i>smc02490</i> , Sp ^R	Este estudio
pTB5035	<i>acpP_{Sm}</i> en pET9a, Km ^R	López-Lara and Geiger, 2000
pAL20	<i>acpS_{Sm}</i> en pET9a, Km ^R	Ramos-Vega <i>et al.</i> , 2009
pAasH	<i>aas_{Ec}</i> en pET28a, Km ^R	Shanklin, 2000

^aTc^R, Tp^R, Km^R, Cm^R, Gm^R, Cb^R, Nm^R: resistencia a tetraciclina, trimetoprima, kanamicina, cloranfenicol, gentamicina, carbenicilina y neomicina, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham WR, Meyer H, Lindholst S, Vancanneyt M, Smit J. 1997. Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *System Appl Microbiol* 20: 522–539.
- Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernández G, Cruz A, Ramírez E, Putonti C, Jiménez B, Martínez E, López V, Arvizu JL, Ayala F, Razo F, Caballero J, Siefert J, Eguiarte L, Vielle JP, Martínez O, Souza V, Herrera-Estrella A, Herrera-Estrella L. 2008. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15): 5803-5808.
- Anderson R, Livermore BP, Kates M, Volcani BE. 1978. The lipid composition of the non-photosynthetic diatom *Nitzschia alba*. *Biochim Biophys Acta* 528: 77–88.
- Aoki M, Sato N, Meguro A, Tsuzuki M. 2004. Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem* 271(4):685-93.
- Barber GA. 1963. The formation of uridine diphosphate L-rhamnose by enzymes of the tobacco leaf. *Arch Biochem Biophys* 103: 276–282.
- Benning C. 1998. Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 53-75.
- Benning C, Huang ZH, Gage DA. 1995. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* 317 (1): 103-111.
- Benning C, Garavito RM, Shimojima M. 2008. Sulfolipid biosynthesis and function in plants. In: *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Springer Netherlands, pp 185-200.
- Benning C, Somerville CR. 1992a. Isolation and genetic complementation of a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 174(7): 2352-2360.

- Benning C, Somerville CR. 1992b. Identification of an operon involved in sulfolipid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 174(20): 6479-6487.
- Benson AA. 1963. The plant sulfolipid. *Adv Lipid Res* 1: 387–394.
- Benson AA, Daniel H, Wiser R. 1959. A sulfolipid in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 1582–1587.
- Bergé JP, Debiton E, Dumay J, Durand P, Barthomeuf C. 2002. *In vitro* anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. *J Agric Food Chem* 50 (21): 6227-6232.
- Bharitkar YP, Bathini S, Ojha D, Ghosh S, Mukherjee H, Kuotsu K, Chattopadhyay D, Mondal NB. 2014. Antibacterial and antiviral evaluation of sulfonoquinovosyldiacylglyceride: a glycolipid isolated from *Azadirachta indica* leaves. *Lett Appl Microbiol* 58(2): 184-189.
- Bielecki RL. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 24: 225-252.
- Budzikiewicz H, Rullkötter J, Heinz E. 1973. Massenspektroskopische Untersuchungen an Glycosylglyceriden. *Z Naturforsch* 28: 499–504.
- Cuevas-Rivas JY, Rodriguez-Terrones D, González-Silva N, Moreno-Ocampo A, Guerrero G, Bergström E, Thomas-Oates JE, Geiger O, López-Lara IM. 2022. Formation of sulfoquinovosyl diacylglycerol by acylation of sulfoquinovosyl glycerol. *bioRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.18.504050>.
- Daniel H, Miyano M, Mumma RO, Yagi T, Lepage M, Shibuya I. 1961. The plant sulfolipid. Identification of 6-sulfo-quinovose. *J Am Chem Soc.* 83: 1765-1766.
- Dowhan W, Bogdanov M, Mileykovskaya E. 2008. Functional roles of lipids in membranes. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th Edition). Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. Pp 1-37.
- El Baz FK, El Baroty GS, Abd El Baky HH, Abd El-Salam OI, Ibrahim EA. 2013. Structural characterization and biological activity of sulfolipids from selected marine algae. *Grasas Aceites* 64: 561–571.

- Endo K, Kobayashi K, Wada H. 2016. Sulfoquinovosyldiacylglycerol has an essential role in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 under phosphate-deficient conditions. *Plant and Cell Physiology* (57): 2461-2471.
- Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C. 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1950–1955.
- Frentzen M. 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol* 7: 270–276.
- Gage DA, Huang ZH, Benning C. 1992. Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodobacter spaeroides* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Lipids* 27: 632–636.
- Galibert, F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, *et al.* 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Gao JL, Weissenmayer B, Taylor AM, 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.
- 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.
- Gill CO. 1975. Effect of growth temperature on the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *J Gen Microbiol* 89: 293-298.
- Goddard-Borger ED, Williams SJ. 2017. Sulfoquinovose in the biosphere: occurrence, metabolism and functions. *Biochem J* 474: 827-849.
- Gounaris K, Barber J, Harwood JL. 1986. The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem J* 237(2):313-26.

- Güler S, Seeliger A, Härtel H, Renger G, Benning C. 1996. A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J Biol Chem* 271: 7501–7507.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-580.
- Harwood JL, Nicholls RG. 1979. The plant sulpholipid -a major component of the sulphur cycle. *Biochem Soc Trans* 7: 440–447.
- Haas R, Siebertz HP, Wrage K, Heinz E. 1980. Localization of sulfolipid labeling within cells and chloroplasts. *Plant* 148: 238–244.
- Heath RJ, Rock CO. 1998. A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* 180(6): 1425-1430.
- Heinz E, Schmidt H, Hoch M, Jung KH, Binder H, Schmidt RR. 1989. Synthesis of different nucleoside 5'-diphospho-sulfoquinovoses and their use for studies on sulfolipid biosynthesis in chloroplasts. *Eur J Biochem* 184: 445–453.
- Hielscher-Michael S, Griehl C, Buchholz M, Demuth HU, Arnold N, Wessjohann LA. 2016. Natural products from microalgae with potential against Alzheimer's disease: sulfolipids are potent glutaminy cyclase inhibitors. *Mar Drugs* 2: 14(11).
- Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold L-M, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M. 2020. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* 11: 468.
- Hsieh YJ, Wanner BL. 2010. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol* 13: 198–203.
- Joyce LR, Guan Z, Palmer KL. 2019. Phosphatidylcholine biosynthesis in Mitis Group *Streptococci* via host metabolite scavenging. *J Bacteriol* 201(22): e00495-19.
- Jones MR. 2007. Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog Lipid Res* 46: 56-87.
- Joyard J, Blee E, Douce R. 1986. Sulfolipid synthesis from $^{35}\text{SO}_4$ and $[1-^{14}\text{C}]$ acetate in isolated intact spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 879: 78-87.

- Kim YH, Yoo JS, Kim MS. 1997. Structural characterization of sulfoquinovosyl, monogalactosyl and digalactosyl diacylglycerols by FAB-CID-MS/MS. *J Mass Spec* 32: 968–977.
- Kleppinger-Sparace KF, Mudd JB. 1987. Biosynthesis of sulfoquinovosyl diacylglycerol in higher plants: the incorporation of $^{35}\text{SO}_4$ by intact chloroplasts in darkness. *Plant Physiol* 84: 682–687.
- 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 *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10): 5910-5915.
- Kobayashi K. 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129(4): 565-580.
- Kovach ME, Elzer P, Hill D, Robertson T, Farris M, Roop M, Peterson KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- 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.
- Langworthy TA, Mayberry WR, Smith PF. 1976. A sulfonolipid and novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile *Bacillus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta* 431: 550–569.
- Lewin TM, Wang P, Coleman RA. 1999. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* 38(18): 5764-5771.
- Li FN, Tuo L, Pan Z, Guo M, Lee SM, Chen L, Hu L, Sun CH. 2017. *Aureimonas endophytica* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from *Aegiceras corniculatum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(8): 2934-2940.
- López-Lara IM, Gao JL, Soto MJ, Solares-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.

- López-Lara IM, Geiger O. 2017. Bacterial lipid diversity. *Biochim Biophys Acta* 1862 (2017) 1287-1299.
- López-Lara IM, Geiger O. 2000. Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins. *Microbiology (Reading)* 146 (4): 839-849.
- Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K, Tsuzuki M. 2002. Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 269, 2353– 2358.
- Miyano M, Benson AA. 1962. The plant sulfolipid. VII. Synthesis of 6-sulfo- α -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 1'')-glycerol and radiochemical syntheses of sulfolipids. *J Am Chem Soc* 84: 59-62.
- Mizusawa N, Wada H. 2012. The role of lipids in photosystem II. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* 1817: 194–208.
- Moser R, Aktas M, Narberhaus F. 2014. Phosphatidylcholine biosynthesis in *Xanthomonas campestris* via a yeast-like acylation pathway. *Mol Microbiol* 91(4): 736–750.
- Nakajima Y, Umena Y, Nagao R, Endo K, Kobayashi K, Akita F, Suga M, Wada H, Noguchi T, Shen JR. 2018. Thylakoid membrane lipid sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) is required for full functioning of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *J Biol Chem* 293(38): 14786-14797.
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* 33: 633– 650.
- Okaya Y. 1964. The plant sulfolipid: a crystallographic study. *Acta Cryst* 17: 1276–1282.
- Pech-Canul Á, Nogales J, Miranda-Molina A, Álvarez L, Geiger O, Soto MJ, López-Lara IM. 2011. FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J Bacteriol* 193(22): 6295-6304.

- Plouguerné E, de Souza LM, Sasaki GL, Cavalcanti JF, Villela Romanos MT, da Gama BA, Pereira RC, Barreto-Bergter E. 2013. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Mar Drugs* 11(11): 4628- 4640.
- Pugh CE, Roy AB, Hawkes T, Harwood JL. 1995. A new pathway for the synthesis of the plant sulpholipid, sulphoquinovosyldiacylglycerol. *Biochem J* 309 (Pt 2): 513–519.
- Quasney ME, Carter LC, Oxford C, Watkins SM, Gershwin ME, Alemán JB. 2001. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells by the plant sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J Nutr Biochem* 12 (5): 310-315.
- Radunz A. 1969. Über das sulfochinovosyl-diacylglycerin aus höheren pflanzen, algen und purpurbakterien. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 350: 411- 417.
- Ramos-Vega AL, Dávila-Martínez Y, Sohlenkamp C, Contreras-Martínez S, Encarnación S, Geiger O, López-Lara IM. 2009. SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology (Reading)* 155(1): 257-267.
- Rausch T, Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10: 503-509.
- Rossak M, Schäfer A, Xu N, Gage DA, Benning C. 1997. Accumulation of sulfoquinovosyl-1-O-dihydroxyacetone in a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* inactivated in *sqdC*. *Arch Biochem Biophys* 340(2): 219-230.
- Rossak M, Tietje C, Heinz E, Benning C. 1995. Accumulation of UDP-sulfoquinovose in a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* 270(43): 25792-25797.
- Roy AB, Harwood JL. 1999. Re-evaluation of plant sulfolipid labelling from UDP-[¹⁴C] glucose in pea chloroplasts. *Biochem J* 344 (1): 185–187.
- Sahonero-Canavesi DX, Sohlenkamp C, Sandoval-Calderón M, Lamsa A, Pogliano K, López-Lara IM, Geiger O. 2015. Fatty acid-releasing activities in

Sinorhizobium meliloti include unusual diacylglycerol lipase. Environ Microbiol 17(9): 3391-3406.

- 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(6): 3941-3946.
- Sato N, Aoki M, Maru Y, Sonoike K, Minoda A, Tsuzuki M. 2003. Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in the structural integrity and heat-tolerance of photosystem II. Plant 217: 245-251.
- Sato N, Sonoike K, Tsuzuki M, Kawaguchi A. 1995. Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol. Eur J Biochem 234: 16-23.
- Scott HN, Laible PD, & Hanson DK. 2003. Sequences of versatile broad-host-range vectors of the RK2 family. Plasmid 50: 74-79.
- Seifert U, Heinz E. 1992. Enzymatic characteristics of UDP-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase from chloroplast envelopes. Bot Acta 105: 197–205.
- Shanklin J. 2000. Overexpression and purification of the *Escherichia coli* inner membrane enzyme acyl-acyl carrier protein synthase in an active form. Protein Expr Purif 18(3): 355-360.
- Sharma M, Lingford JP, Petricevic M, Snow AJD, Zhang Y, Järvå MA, Mui JW, Scott NE, Saunders EC, Mao R, Epa R, da Silva BM, Pires DEV, Ascher DB, McConville MJ, Davies GJ, Williams SJ, Goddard-Borger ED. 2022. Oxidative desulfurization pathway for complete catabolism of sulfoquinovose by bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 119(4): e2116022119.
- Shibuya I, Yagi T, Benson AA. 1963. Sulfonic acids in algae. Microalgae and Photosynthetic bacteria. Jpn Soc Plant Physiol. Tokyo University Press, Tokyo, 627–636.
- Shukla SD, Green C, Turner JM. 1980. Phosphatidylethanolamine distribution and fluidity in outer and inner membranes in the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora*. Biochemistry J 188: 131-135.

- Simon R, Prierer U, & Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-790.
- Smith AF, Silvano E, Päufer O, Guillonneau R, Quareshy M, Murphy A, Mausz MA, Stirrup R, Rihtman B, Aguilo-Ferretjans M, Brandsma J, Petersen J, Scanlan DJ, Chen Y. 2021. A novel class of sulfur-containing aminolipids widespread in marine roseobacters. *ISME J* 15(8): 2440-2453.
- Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219: 37-44.
- 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.
- Sugimoto K, Sato N, Tsuzuki M. 2007. Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 581: 4519–4522.
- Sugimoto K, Tsuzuki M, Sato N. 2010. Regulation of synthesis and degradation of a sulfolipid under sulfur-starved conditions and its physiological significance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol* 185(3): 676- 686.
- Tawaraya K, Honda S, Cheng W, Chuba M, Okazaki Y, Saito K, Oikawa A, Maruyama H, Wasaki J, Wagatsuma T. 2018. Ancient rice cultivar extensively replaces phospholipids with non-phosphorus glycolipids under phosphorus deficiency. *Physiol Plant* 163 (3): 297-305.
- Tietje C, Heinz E. 1998. Uridine-diphospho-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelopes. *Planta* 206: 72–78.
- Van Mooy BA, Rocap G, Fredricks HF, Evans CT, Devol AH. 2006. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(23): 8607-8612.
- Vences-Guzmán MÁ, Guan Z, Escobedo-Hinojosa WI, Bermúdez-Barrientos JR, Geiger O, Sohlenkamp C. 2015. Discovery of a bifunctional acyltransferase

- responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. Environ Microbiol 17(5): 1487-1496.
- Villanueva L, Bale N, Hopmans EC, Schouten S, Damsté JS. 2014. Diversity and distribution of a key sulpholipid biosynthetic gene in marine microbial assemblages. Environ Microbiol 16(3): 774-787.
 - 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(3): 721-733.
 - 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.
 - Yu B, Xu C, Benning C. 2002. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. Proc Natl Acad Sci USA 99: 5732-5737.
 - 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(9): 2686-2697.
 - Zähringer U, Moll H, Hettmann T, Knirel YA, Schäfer G. 2000. Cytochrome b558/566 from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* has a unique Asn-linked highly branched hexasaccharide chain containing 6-sulfoquinovose. Eur J Biochem 267: 4144–4149.
 - 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(1): 302-307.
 - Zhang Z, Shrager J, Jain M, Chang CW, Vallon O, Grossman AR. 2004. Insight into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. Eukaryot Cell 3: 1331–1348.