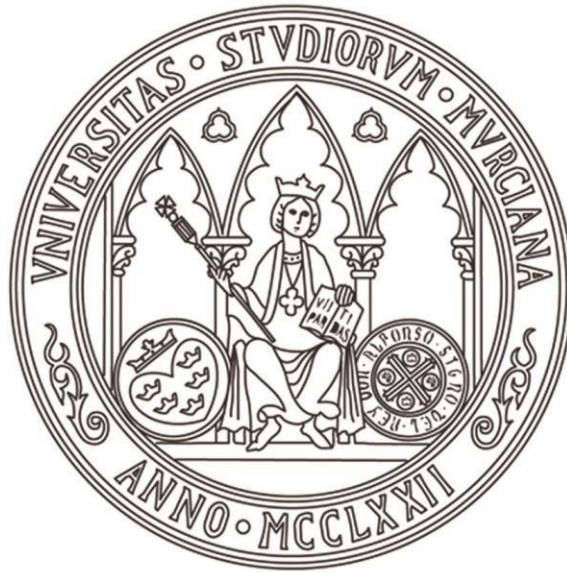




UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Función de la proteína CarF en la transducción de la señal
luminosa en la bacteria *Myxococcus xanthus* y su conservación
en eucariotas superiores

D. Antonio Joaquín Monera Girona
2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Función de la proteína CarF en la transducción de la señal luminosa
en la bacteria *Myxococcus xanthus* y su conservación en eucariotas
superiores

Autor: D. Antonio Joaquín Monera Girona

Director/es: D.^a Montserrat Elías Arnanz y D.^a Marta Fontes Bastos



**DECLARACIÓN DE AUTORIA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Antonio Joaquín Monera Girona

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Función de la proteína CarF en la transducción de la señal luminosa en la bacteria *Myxococcus xanthus* y su conservación en eucariotas superiores

y dirigida por,

D./Dña. Montserrat Elías Arnanz

D./Dña. Marta Fontes Bastos

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 25 de octubre de 2022

Fdo.: Antonio Joaquín Monera Girona

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los Interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



D^a. Montserrat Elías Arnanz, Catedrática de Genética del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, y **D^a. Marta Fontes Bastos**, Profesora Titular de Genética del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, **AUTORIZAN**.

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Función de la proteína CarF en la transducción de la señal luminosa en la bacteria *Myxococcus xanthus* y su conservación en eucariotas superiores”, realizada por D. Antonio Joaquín Monera Girona, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de septiembre de 2022

Montserrat Elías Arnanz

Marta Fontes Bastos

Trabajo realizado por el graduado Antonio Joaquín Monera Girona en el Área de Genética del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, bajo la dirección y supervisión de D^a. Montserrat Elías Arnanz y D^a. Marta Fontes Bastos, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología con Mención de Doctorado Internacional.

Antonio Joaquín Monera Girona ha realizado la Tesis Doctoral financiado por una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (FPU16/05250), y opta a la Mención de Doctorado Internacional gracias a la estancia realizada en la Universidad de Bonn en Alemania durante 3 meses, financiada con una ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales (EST19/00586).

La presente Tesis Doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por las Directoras de Tesis y la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología, se presenta como compendio de tres trabajos previamente publicados o aceptados para su publicación. Las referencias completas de los trabajos que constituyen el compendio de la tesis son las siguientes:

- Gallego-García, A.*, Monera-Girona, A. J.*, Pajares-Martínez, E.*, Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132. * Co-primeros autores.
- Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco, M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9, 1067.
- Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., del Rey-Navalón, I., Pérez-Castaño, R., Galbis-Martínez, M. L., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2022). Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 -Desaturase PEDS1 for human plasmalogen biosynthesis. *Frontiers in cell and Developmental Biology*, 10, 884689.

Así mismo, se considera oportuno incluir como Anexos 1, 2 y 3 de la presente Tesis Doctoral otras actividades adicionales relacionadas con el trabajo presentado, pero todavía pendientes de publicación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

SUMMARY	1
RESUMEN	3
I.INTRODUCCIÓN	5
I.1. Desaturasas de ácidos grasos	7
I.1.1. Síntesis de ácidos grasos insaturados.....	8
I.1.2. Desaturasas de ácidos grasos.....	9
I.1.2.1. Δ^9 -estearoil-CoA desaturasa (SCD).....	11
I.2. Lípidos éter y plasmalógenos	13
I.2.1. Estructura química y características generales.....	13
I.2.2. Distribución de lípidos éter y plasmalógenos en los seres vivos	16
I.2.3. Metabolismo de lípidos éter y plasmalógenos	18
I.2.3.1. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos	18
I.2.3.1.1. Biosíntesis en mamíferos	19
I.2.3.1.2. Biosíntesis en bacterias anaerobias	21
I.2.3.2. Degradación de lípidos éter y plasmalógenos	23
I.2.4. Funciones de lípidos éter y plasmalógenos	26
I.3. <i>Myxococcus xanthus</i>	33
I.3.1. Características generales de las mixobacterias	33
I.3.2. Lípidos éter y plasmalógenos en <i>M. xanthus</i>	36
I.3.2.1. Estructura química de lípidos éter y plasmalógenos en <i>M. xanthus</i>	37
I.3.2.2. Funciones de lípidos éter y plasmalógenos en <i>M. xanthus</i>	38
I.3.2.3. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en <i>M. xanthus</i>	39
I.3.2.3.1. Operón <i>elbA-E</i>	41
I.3.2.3.2. Operón <i>MXAN_1676-1674</i>	42
I.3.3. Respuesta a la luz en <i>M. xanthus</i>	43
I.3.3.1. Ruta de respuesta a la luz dependiente de B ₁₂	44

I.3.3.2. Ruta de respuesta a la luz independiente de B ₁₂	45
I.3.3.2.1. La proteína CarF	48
I.3.3.2.1.1. Homólogos a CarF en animales.....	53
I.3.3.2.1.2. Homólogos a CarF en plantas	54
II. OBJETIVOS.....	57
III. PUBLICACIONES Y RESULTADOS NO PUBLICADOS	61
III.1. A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis.	63
III.2. Light-triggered carotenogenesis in <i>Myxococcus xanthus</i> : new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation	65
III.3. Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 -Desaturase PEDS1 for human plasmalogen biosynthesis	67
III.4. Anexo I: resultados no publicados y discusión sobre los avances en la purificación de CarF	69
III.4.1. Expresión de versiones truncadas de CarF en <i>E. coli</i>	70
III.4.2. Expresión de CarF-Strep en una estirpe de <i>E. coli</i> productora de lípidos éter.....	72
III.4.3. Solubilización de CarF-Strep con nanodiscos poliméricos	75
III.4.4. Expresión en <i>E. coli</i> de proteínas homólogas a CarF	78
III.5. Anexo 2: resultados no publicados y discusión sobre la biosíntesis de lípidos éter en <i>M. xanthus</i>	84
III.5.1. Análisis de posibles dominios en las proteínas ElbA-E y MXAN_1676-1674.....	84
III.5.2. Posible ruta de síntesis de lípidos éter en <i>M. xanthus</i>	87
III.5.3. Efecto de la falta de función de MXAN_1675 y MXAN_1674	90
III.5.4. Estudio del dominio Re/FAR de las proteínas ElbD y MXAN_1675.....	94
III.5.5. Complementación con las enzimas humanas implicadas en la síntesis de lípidos éter.....	97

III.5.6. Distribución de los operones <i>elbA-E</i> y <i>MXAN_1676-1674</i> en mixobacterias	100
III.5.7. Ensayo de complementación química con 1-O-alkil-glicerol	104
III.6. Anexo 3: resultados no publicados y discusión sobre el papel de los plasmalógenos en <i>M. xanthus</i>	108
III.6.1. Complementación química con lípidos éter y plasmalógenos de PC ..	109
III.6.2. Análisis <i>in vivo</i> de los productos derivados de la rotura del plasmalógeno	110
III.6.2.1. Análisis <i>in vivo</i> de los niveles de plasmalógeno y liso-PE en cultivos crecidos en presencia de PPIX	111
III.6.2.2. Análisis <i>in vivo</i> de los niveles de aldehídos grasos	115
III.6.3. Complementación química con los productos de la rotura en la luz del plasmalógeno HsVEPE1	118
III.6.4. Análisis de la formación de posibles aductos mediante el uso de química “clic”	120
III.6.4.1. Complementación química con alquino-16:0-OAG	122
III.6.4.2. Análisis lipídicos a partir de cultivos de <i>M. xanthus</i> crecidos en presencia de alquino-16:0-OAG	124
III.6.4.3. Detección de proteínas modificadas con un grupo alquino en <i>M. xanthus</i>	129
IV. CONCLUSIONES	133
V. BIBLIOGRAFÍA	139

LISTADO DE ABREVIATURAS

- $^1\text{O}_2$: oxígeno singlete
- $^3\text{PPIX}$: protoporfirina IX excitada
- **A**: dominio *long-chain fatty acid CoA synthase*
- AADHAPR: alkyl/acyl DHAP reductase
- ACP: proteína transportadora de grupos acilo
- ACP/T: *acyl carrier protein/thiolation*
- ACS/A: *long chain fatty acid CoA synthase*
- ADHAPS/AGPS: *alkyldihydroxyacetone phosphate acyltransferase*
- AdoCbl: adenosilcobalamina
- AEPE: alquil-éter fosfatidiletanolamina
- AKT: proteína quinasa B
- AT/LPLAT: *dihydroxyacetone phosphate acyltransferase-like*
- **b5**: citocromo b5
- b5R: NADH citocromo b5 reductasa
- Bkd/Esg: *branched-chain keto acid dehydrogenase*
- **C12E8**: dodecil octaetilen glicol éter
- CDP-DAG: citidina difosfato diacilglicerol
- CdsA: *CDP-diacylglycerol synthase*
- CoA: coenzima A
- CuCCA: reacción de cicloadición catalizada por cobre
- **DDM**: dodecil- β -D-maltopiranósido
- DHAP: dihidroxiacetona fosfato
- DHAPAT/GNPAT: *dihydroxyacetone phosphate acyltransferase*
- DIMBA: polímeros de diisobutireno y maleico
- DM: decil- β -D-maltopiranósido
- DMA: dimetilacetal
- **Elb**: *ether lipid biosynthesis*
- EPT: *CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase*
- **FAME**: metil éster de ácido graso
- FAP: factor activador de plaquetas
- FAPR: receptor de FAP
- FAR/Re: *fatty acyl-CoA reductase*
- FAS: *fatty acid synthase*
- FC10: foscolina-10
- FC12: foscolina-12
- **GC-MS**: cromatografía de gases - espectrometría de masas
- GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 β
- HAD: *haloacid dehalogenase-like hydrolase*
- HMGA: proteína eucariótica de alta movilidad grupo A
- HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
- ICM-MS: espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente
- IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
- Iso-FA: ácido graso ramificado "iso"

- LC-MS/MS: cromatografía líquida - espectrometría de masas en tándem
- LDAO: laurildimetilamina-N-óxido
- Liso-PE: liso-fosfatidiletanolamina
- LPA-AT: *lysophosphatidate acyltransferase*
- MeCbl: metilcobalamina
- MSP: proteína de andamiaje
- m/z: relación masa/carga
- OAG: 1-O-alkil-glicerol
- OAG-bisTMS: O-alkil-glicerol bis-trimetilsilil éter
- OG: Octil- β -D-glucopiranosido
- PAP-I: *phosphatidic acid phosphatase*
- PC: fosfatidilcolina
- PE: fosfatidiletanolamina
- PEDS1: desaturasa de plasnamiletanolamina
- PFBHA: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina hidrociorhídrico
- PG: fosfatidilglicerol
- PGP: fosfatidilglicerol-3-fosfato
- PgpA: *PGP phosphatase*
- PI: fosfatidilinositol
- PKA: proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico
- PlsA/PlsR: *plasmalogen synthase A/R*
- PlsEtn: plasmalógeno de fosfatidiletanolamina
- PlsGro: plasmalógeno de fosfatidilglicerol
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PPIX: protoporfirina IX
- PRXQ: peroxirredoxina Q
- PS: fosfatidilserina
- Psd: *PtdSer decarboxylase*
- PsgA: *PGP synthase*
- PssA: *PtdSer synthase*
- PtdEtn: diacilfosfolípidos con fosfatidiletanolamina
- PtdGro: diacilfosfolípidos con fosfatidilglicerol
- PtdSer: diacilfosfolípidos con fosfatidilserina
- PUFA: ácido graso poliinsaturado
- Re: dominio *fatty acyl CoA-like reductase*
- RNAP: polimerasa de RNA
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SCD: Δ 9-estearoil-CoA desaturasa
- SDR: *short-chain dehydrogenase/reductase*
- SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
- SMA: polímeros de estireno y maleico
- TBTA: Tris((1-bencil-4-triazolil)metil)amina
- TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina
- THTPA: Tris((1-hidroxi-propil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina
- VEPE: vinil-éter fosfatidiletanolamina
- WT: *wild type*

SUMMARY

The membrane protein CarF plays a key role in one of the two pathways that operate in *Myxococcus xanthus* to sense blue light and defend the bacterium against photooxidative stress, which stems from the photoexcitation of protoporphyrin IX and consequent generation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). We have recently discovered that CarF is the plasmalethanolamine desaturase (PEDS1) that generates the vinyl-ether bond in plasmalogens, and that this special class of glycerophospholipids somehow signals photooxidative stress. The overall goal of this work has been to delve in-depth into the mode of action of CarF and its homologs in animals, the biosynthesis of plasmalogens and its ether bond precursor in *M. xanthus*, and the novel molecular mechanism of light perception via plasmalogens.

CarF contains twelve cytoplasmic histidines, eight of which are conserved in all homologs (from myxobacteria, Leptospiraceae and Alphaproteobacteria among bacteria; from animals and plants among eukaryotes). Our analysis revealed a good correlation between the extent of conservation of these histidines and their functional importance. Among the histidines that are not conserved in all homologs, H113 deserves a special mention, as it is essential for CarF function and is conserved only in animals, Myxococcales and Leptospiraceae homologs.

Some of the histidines in CarF may participate in the formation of a diiron cluster active site. Consistent with this, the CarF sample, purified after heterologous expression and solubilization in Foscholine-12, was shown to contain iron (~2:1 Fe:CarF). This purified CarF, which exhibits some PEDS1 activity, displayed a tendency to form homooligomers whose functional relevance is unknown. To obtain purified CarF better suited for future studies, diverse strategies were tested: expression of truncated versions, expression of CarF in a cellular environment with ether lipids, expression of protein homologs, and CarF solubilization using polymer nanodiscs.

Despite the enormous evolutionary distance between myxobacteria and animals, all animal homologs tested, including the human one, complemented the lack of CarF in *M. xanthus*. By contrast, none of the plant homologs or that from Alphaproteobacteria analyzed could do so. Thus, as with CarF, its animal homologs correspond to the PEDS1, whose identity had remained unknown over almost 50 years.

Unlike mammals, *M. xanthus* has two pathways available to synthesize the precursors of plasmalogens: a main pathway, widely distributed among myxobacteria,

involving the multidomain protein ElbD (and, possibly, other gene products of the *elbA-E* operon); an ancillary pathway, restricted to the genus *Myxococcus*, in which the three gene products of the *MXAN_1676-1674* operon participate. Experimental and comparative analyses allow us to propose the possible steps wherein the genes of each operon act in the corresponding pathway for the biosynthesis of the ether lipid precursors.

The work accomplished demonstrates that the sole determinant in plasmalogens indispensable for their role in *M. xanthus* is the vinyl ether bond. Susceptibility of this bond to cleavage by $^1\text{O}_2$, yielding a fatty aldehyde and a lysophospholipid, could explain how plasmalogens signal photooxidative stress. Nonetheless, whereas such a degradation of plasmalogens by $^1\text{O}_2$ was clearly detected *in vitro*, this cleavage was more subtle *in vivo*. It may thus be speculated that *M. xanthus* may have developed a highly sensitive system to sense tiny amounts of lysed plasmalogen to trigger the photoprotective response and evade the toxic effects that may be generated by an excess of plasmalogen degradation products. To address the study of this complex mechanism, we have initiated efforts to deploy more sophisticated techniques such as “click chemistry”.

RESUMEN

La proteína membranal CarF desempeña un papel clave en una de las dos rutas que operan en *Myxococcus xanthus* para percibir la luz azul y defenderse del estrés fotooxidativo derivado de la fotoexcitación de la protoporfirina IX y la consiguiente formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Recientemente, hemos desvelado que CarF es la desaturasa de plasmaniletanolamina (PEDS1) que genera el enlace vinil-éter de los plasmalógenos, y que son estos glicerofosfolípidos especiales los que, de algún modo, señalizan el estrés fotooxidativo. El objetivo global de este trabajo ha sido profundizar en el modo de acción de CarF y sus homólogos de animales, la biosíntesis de los plasmalógenos y sus precursores con enlace éter en *M. xanthus*, y el novedoso mecanismo molecular de percepción de la luz a través de los plasmalógenos.

CarF presenta 12 histidinas citoplásmicas, 8 de las cuales se conservan en todos sus homólogos (de mixobacterias, Leptospiraceae y Alphaproteobacteria, entre las bacterias; de animales y plantas, entre los eucariotas). El análisis realizado reveló que existe una buena correlación entre el grado de conservación de las histidinas y su importancia funcional. Entre las histidinas no conservadas en todos los homólogos, cabe destacar la H113, importante para la función de CarF y presente solo en los homólogos de animales, Myxococcales y Leptospiraceae.

Algunas de las histidinas de CarF podrían participar en la formación de un complejo de di-hierro en el centro activo. Consistente con ello, la preparación de CarF purificada, tras expresión heteróloga y solubilización en Foscolina-12, mostró la presencia de hierro ($\sim 2\text{Fe}:1\text{CarF}$). En dicha preparación, que presentó cierta actividad PEDS1, CarF manifestó una tendencia a formar homomúltimeros cuya relevancia funcional se desconoce. Para obtener una preparación de CarF más apta para futuros estudios, se probaron diversas estrategias: expresión de versiones truncadas, expresión de CarF en un ambiente con lípidos éter, expresión de proteínas homólogas, y solubilización de CarF en nanodiscos poliméricos.

A pesar de la enorme distancia evolutiva entre las mixobacterias y los animales, todos los homólogos de animales probados, incluido el humano, complementaron la falta de CarF en *M. xanthus*. Por el contrario, no lo hicieron ni los homólogos de plantas ni el de Alphaproteobacteria analizados. Así pues, como CarF, sus homólogos de animales se corresponden con la PEDS1, cuya identidad había sido una incógnita durante casi 50 años.

A diferencia de mamíferos, *M. xanthus* dispone de dos rutas para sintetizar los precursores de los plasmalógenos: una principal, ampliamente distribuida en mixobacterias, en la que interviene la proteína multidominio ElbD (y, posiblemente, otros productos génicos del operón *elbA-E*); otra, auxiliar y restringida al género *Myxococcus*, en la que intervienen los tres productos génicos del operón *MXAN_1676-1674*. Los análisis experimentales y comparativos permiten postular en qué pasos de la biosíntesis de los lípidos éter precursores podrían participar los genes de cada operón en la ruta correspondiente.

El trabajo realizado demuestra que el único determinante de los plasmalógenos imprescindible para su papel en *M. xanthus* es el enlace vinil-éter. La susceptibilidad de dicho enlace a la rotura por $^1\text{O}_2$, dando lugar a un aldehído graso y un liso-fosfolípido, podría explicar cómo los plasmalógenos señalizan el estrés fotooxidativo. Sin embargo, mientras que *in vitro* se detectó una rotura acusada del plasmalógeno por $^1\text{O}_2$, *in vivo* dicha rotura fue sutil. Cabe pensar, por tanto, que *M. xanthus* haya desarrollado un sistema extremadamente sensible para percibir la mínima cantidad de plasmalógeno roto y desencadenar la respuesta fotoprotectora, evitando los efectos tóxicos que generarían un exceso de productos de degradación del plasmalógeno. Para facilitar el estudio de este complejo mecanismo se han empezado a poner a punto técnicas más sofisticadas como la “química clic”.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Desaturadas de ácidos grasos

Las membranas biológicas constituyen una barrera dinámica que delimita los distintos compartimentos celulares, así como la propia célula. Están constituidas fundamentalmente por lípidos, un grupo muy heterogéneo de moléculas orgánicas hidrofóbicas o anfipáticas que destacan por la amplia diversidad en cuanto a estructura y funciones que desempeñan (Harayama & Riezman, 2018; Li-beisson & Nakamura, 2016). Durante los últimos años se están produciendo grandes avances para tratar de comprender cómo esta enorme diversidad de lípidos puede influir en distintos procesos fisiológicos o patológicos de la célula (Fahy *et al.*, 2011). Así, los lípidos han dejado de ser considerados únicamente como componentes estructurales de la membrana o fuentes de almacenamiento de energía y generación de calor para convertirse en moléculas de señalización, reguladores de proteínas receptoras presentes en la membrana o sustratos para la modificación post-traducciona de proteínas (Chen *et al.*, 2018; Koivuniemi., 2017; Sunshine & Iruela-Arispe, 2017). A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas o los polisacáridos, los lípidos no son moléculas poliméricas. Sin embargo, algunos de ellos sí están formados por diferentes moléculas constituyentes de menor tamaño unidas entre sí. El ejemplo más claro de estas moléculas constituyentes son los ácidos grasos que forman parte de los glicerolípidos y esfingolípidos (Garba *et al.*, 2017; Harayama & Riezman, 2018).

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por cadenas hidrocarbonadas en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. Generalmente, la cadena hidrocarbonada contiene de 4 a 24 átomos de carbono, es lineal y tiene un número par de carbonos. Sin embargo, también se han descrito ácidos grasos con cadenas más largas, ramificadas o con número impar de carbonos. Se dice que los ácidos grasos son saturados cuando la cadena alifática no contiene dobles enlaces, o insaturados cuando tienen uno o más dobles enlaces (Garba *et al.*, 2017). Principalmente, los ácidos grasos contribuyen a mantener la integridad de las membranas biológicas y regulan su rigidez o fluidez en respuesta a cambios ambientales como la temperatura. Además, constituyen una fuente de energía para la célula. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son moléculas señalizadoras implicadas en la respuesta inflamatoria, división celular y regulación del metabolismo lipídico (Bermúdez *et al.*, 2021; De Carvalho & Caramujo, 2018; Garba *et al.*, 2017; Tvrzicka *et al.*, 2011).

I. Introducción

I.1.1. Síntesis de ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados son los componentes mayoritarios de las membranas biológicas en procariotas y eucariotas. Cuando se produce un cambio en la temperatura, la célula trata de mantener la fluidez o rigidez de la membrana alterando la composición de ácidos grasos o modificando la longitud de la cadena hidrocarbonada, el grado de insaturación o el grupo de cabeza polar de los fosfolípidos de los cuales forman parte. Así, la insaturación de los ácidos grasos disminuye el grado de empaquetamiento de los lípidos en la membrana e incrementa su fluidez (De Carvalho & Caramujo, 2018; Garba *et al.*, 2017).

Mientras que la mayoría de los organismos aerobios (desde bacterias a animales) generan los ácidos grasos insaturados mediante una vía dependiente de oxígeno, *Escherichia coli* y otros microorganismos capaces de crecer en condiciones anaerobias han desarrollado una ruta alternativa que no requiere oxígeno para introducir las insaturaciones (Isabella & Clark, 2011).

- En la ruta anaerobia (Figura 1A), que se ha estudiado fundamentalmente en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, la enzima FabA, que muestra una actividad deshidratasa e isomerasa, elimina dos átomos de hidrógeno del β -hidroxidecanol-ACP (siendo ACP la proteína transportadora de grupos acilo) para generar el doble enlace en el *trans*-2-decenoil. A continuación, la actividad isomerasa de FabA convierte el *trans*-2-decenoil en *cis*-3-decenoil, el cual es elongado por FabB y el resto de enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos hasta obtener palmitoleoil (16:1 ω 7) y *cis*-vaccenoil (18:1 ω 7) (Cronan, Jr. & Rock, 2008; Garba *et al.*, 2017; Subramanian *et al.*, 2010). Cabe destacar que otros mecanismos de desaturación anaerobia que no requieren FabA se han descrito en gonococos (Isabella & Clark, 2011) o *Clostridium acetobutylicum* (Zhu *et al.*, 2009).
- En la ruta aerobia (Figura 1B), los ácidos grasos son sintetizados en su forma saturada y después se produce la insaturación por acción de desaturasas de ácidos grasos. Estas enzimas son capaces de introducir un doble enlace, generalmente en configuración *cis*, en la cadena hidrocarbonada (Chen *et al.*, 2013; Garba *et al.*, 2017).

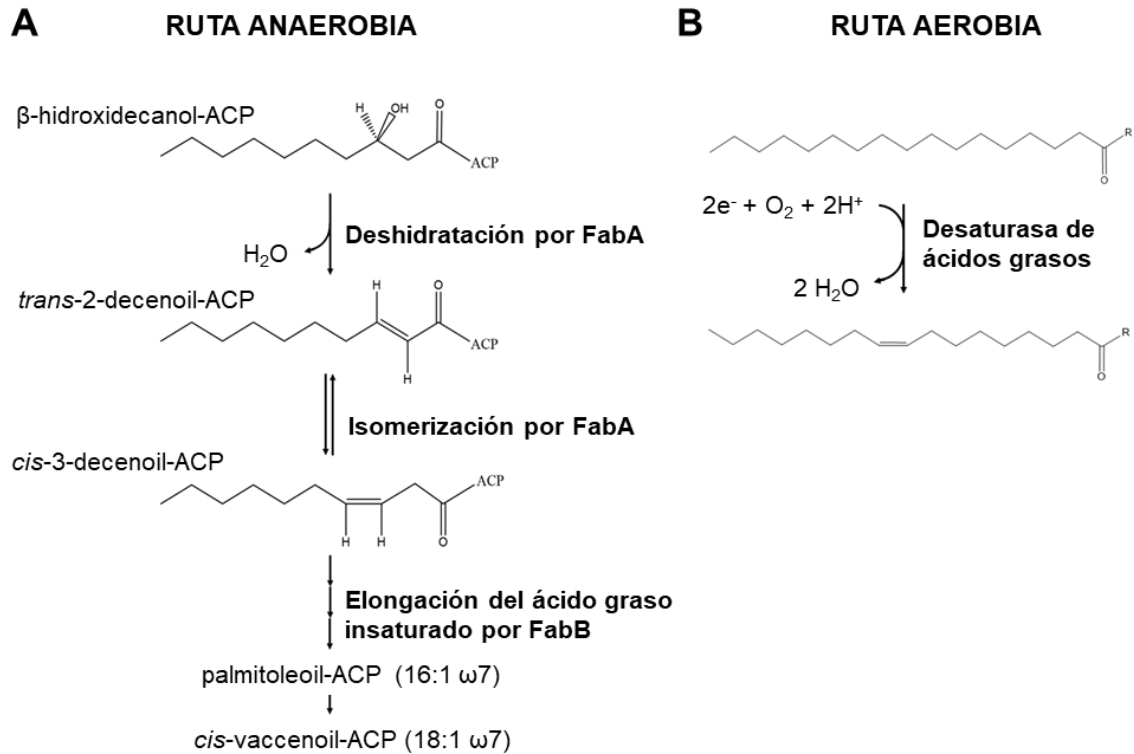


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos insaturados. **A)** Ruta anaerobia descrita en *E. coli* y otros microorganismos capaces de crecer en condiciones anaerobias. **B)** Ruta aerobia, presente en la mayoría de las bacterias y organismos eucarióticos, donde participan las desaturasas de ácidos grasos dependientes de oxígeno. Modificada de Garba *et al.* (2017).

I.1.2. Desaturasas de ácidos grasos

Las desaturasas de ácidos grasos son enzimas capaces de sustraer dos átomos de hidrogeno de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso saturado, generando ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados (Liu *et al.*, 2015; López-Alonso *et al.*, 2003; Sperling *et al.*, 2003). Existe una amplia variedad de desaturasas de ácidos grasos que difieren entre sí en su preferencia por los sustratos, la posición en la que introducen el doble enlace en la cadena hidrocarbonada (**regioespecificidad**) y la configuración del doble enlace que generan (**estereoespecificidad**) (Shen *et al.*, 2020). Dado que la reacción de desaturación es un proceso de oxidación, las desaturasas requieren oxígeno molecular y dos electrones para generar el doble enlace. Los dos electrones son aportados por un donador de electrones que, dependiendo del organismo y del tipo de desaturasa, puede ser una ferredoxina o citocromo b₅ (b₅) (Los & Murata, 1998; Meesapyodsuk & Qiu, 2012). Todas las desaturasas contienen un complejo de di-hierro, mantenido por las cadenas laterales de determinados aminoácidos (histidina, aspártico, glutámico y glutamina), que es esencial para la actividad enzimática (Shanklin *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2020; Sperling *et al.*, 2003).

I. Introducción

Las desaturasas de ácidos grasos se pueden clasificar en dos grupos evolutivamente no relacionados: solubles y de membrana (Garba *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015).

- **Desaturasas de ácidos grasos solubles (desaturasas de acil-ACP)**

Este tipo de desaturasas están presentes en el estroma de los cloroplastos en plantas superiores e introducen el doble enlace en un ácido graso unido a ACP (Los & Murata, 1998). Se han descrito tres tipos de desaturasas solubles ($\Delta 9$ -acil-ACP, $\Delta 6$ -acil-ACP y $\Delta 4$ -acil-ACP), que difieren en la estereoespecificidad y preferencia de sustrato. La enzima más representativa de este grupo es la $\Delta 9$ -estearoil-ACP desaturasa, que actúa sobre el estearoil-ACP (18:0) para producir oleoil-ACP (18:1) (Garba *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015). Esta enzima une dos átomos de hierro mediante dos motivos D/ExxH característicos (aunque otros residuos adicionales no agrupados en estos motivos forman parte del complejo de di-hierro). Todas las desaturasas solubles utilizan ferredoxina como donador de electrones en la reacción de desaturación (Garba *et al.*, 2017; Lindqvist *et al.*, 1996; Los & Murata, 1998).

- **Desaturasas de ácidos grasos de membrana**

Constituyen el grupo más numeroso de desaturasas de ácidos grasos y están muy distribuidas tanto en organismos procarióticos como eucarióticos. Compuestas por unos 300-350 aminoácidos, estas desaturasas suelen ser proteínas hidrofóbicas con 4 dominios transmembranales y 3 motivos ricos en histidina (HXXXXH, HXXHH y HXXHH) implicados en la reacción de desaturación (Bai *et al.*, 2015; López-Alonso *et al.*, 2003; Los & Murata, 1998; Shen *et al.*, 2020). Hay una enorme variabilidad en cuanto a la regioespecificidad que muestran las desaturasas de membrana ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$) (Liu *et al.*, 2015).

Se pueden clasificar en dos grupos:

- **Desaturasas de acil-lípido**

Estas desaturasas están presentes en plantas, membranas de cianobacterias y tilacoides, e introducen el doble enlace en un ácido graso que está unido al glicerol en glicerolípidos polares. Las enzimas de cianobacterias y cloroplastos de plantas utilizan ferredoxina como donador de electrones, mientras que las enzimas del citoplasma de plantas usan un sistema de transporte de electrones compuesto por b_5 y NADH-citocromo b_5 reductasa (b_5R) (Garba *et al.*, 2017; Los & Murata, 1998).

- **Desaturasas de acil-CoA**

Estas desaturasas, presentes en hongos y animales, introducen el doble enlace en ácidos grasos unidos a coenzima A (CoA) y requieren electrones

cedidos por el sistema b_5 y b_5R . La enzima más representativa de este grupo es la $\Delta 9$ -estearoil-CoA desaturasa (SCD) (Garba *et al.*, 2017; Los & Murata, 1998).

I.1.2.1. $\Delta 9$ -estearoil-CoA desaturasa (SCD)

Entre las desaturasas de membrana, la SCD de mamíferos es la mejor caracterizada hasta el momento, ya que se ha obtenido su estructura tridimensional y se ha descrito el mecanismo mediante el cual cataliza la reacción de desaturación. En humanos hay dos SCDs (SCD1 y SCD5), que comparten un 53% de identidad en sus secuencias, mientras que en ratón hay 4 SCDs (SCD1-4, 77-86% de identidad entre ellas) (Nagao *et al.*, 2019). SCD1 se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y cataliza la formación de un doble enlace *cis* en la novena posición del estearoil o palmitoil-CoA, una reacción en la que participa el sistema b_5 y b_5R (Figura 2) (Nagao *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2020).

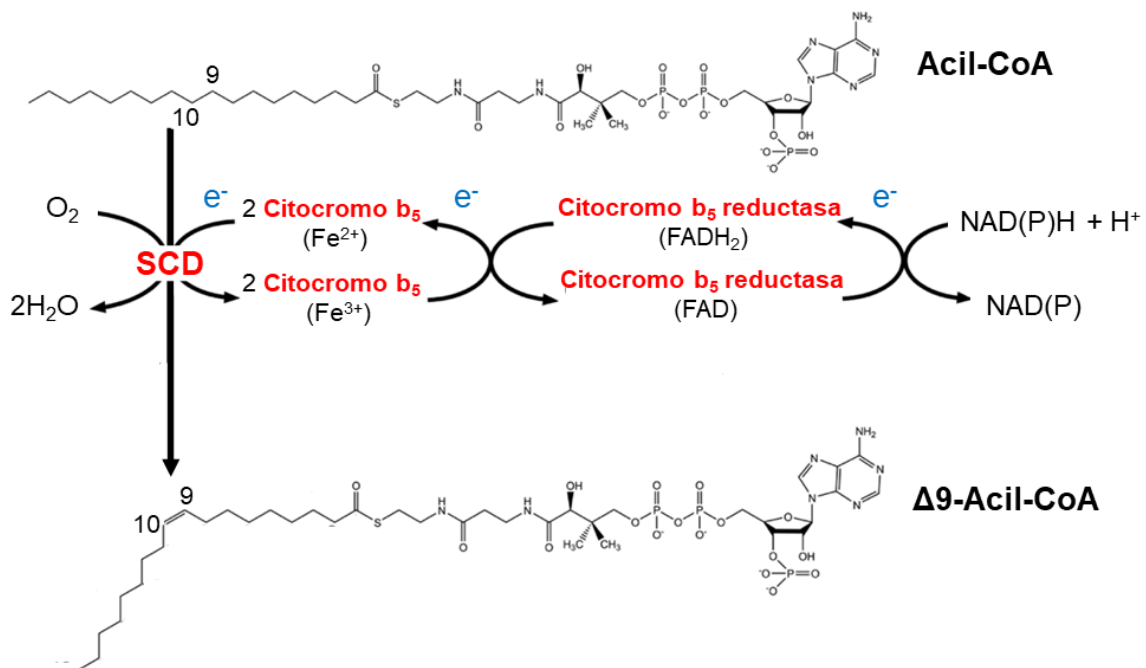


Figura 2. Reacción de desaturación catalizada por la SCD. Las proteínas se indican en color rojo, y las restantes moléculas implicadas en la reacción se indican en color negro. El ácido graso precursor y el producto final se indica en negrita. Los electrones, en color azul, son transferidos secuencialmente desde el NAD(P)H + H⁺ a b_5R , b_5 y O₂. Los números indican la posición de cada carbono en el acil-CoA, empezando a contar desde el grupo carboxilo. Imagen modificada de Nagao *et al.* (2019).

I. Introducción

Estructuralmente, la SCD1 es un monómero con forma de seta, donde la base estaría formada por los 4 dominios transmembranales (TM1, TM2, TM3 y TM4) y la corona por la región citosólica (segmentos N-terminal, C-terminal y lazo hidrofílico entre TM2 y TM3). El sustrato de esta enzima, el esteroil-CoA, tiene la longitud adecuada para encajar en un túnel curvado que se adentra desde la región citosólica superficial hacia el interior hidrofóbico de la proteína. La curvatura del túnel permite que los dos hidrógenos en *cis* de los carbonos 9 y 10 queden próximos al centro activo de la SCD1 y sean sustraídos, generándose el doble enlace en la cadena hidrocarbonada. Por tanto, la forma y el tamaño del túnel determinan la estereoespecificidad y regioespecificidad de la enzima. En el centro activo se encuentran dos átomos de hierro coordinados por 9 histidinas altamente conservadas a nivel de secuencia en otras desaturasas de ácidos grasos, pero también en hidroxilasas y monooxigenasas. Ocho de esas histidinas están agrupadas en 3 motivos ricos en histidina (2 HXXHH y 1 HXXXXH) alejados en la estructura primaria, pero próximos cuando la proteína adquiere su estructura tridimensional. La novena histidina, por el contrario, forma parte de un motivo NXXXH, donde la asparagina es capaz de establecer un enlace por puentes de hidrogeno con una molécula de agua que está coordinando el metal (Figura 3). Generalmente, la mutación a alanina de las histidinas implicadas en la coordinación del metal da como resultado una proteína no funcional (Bai *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2015).

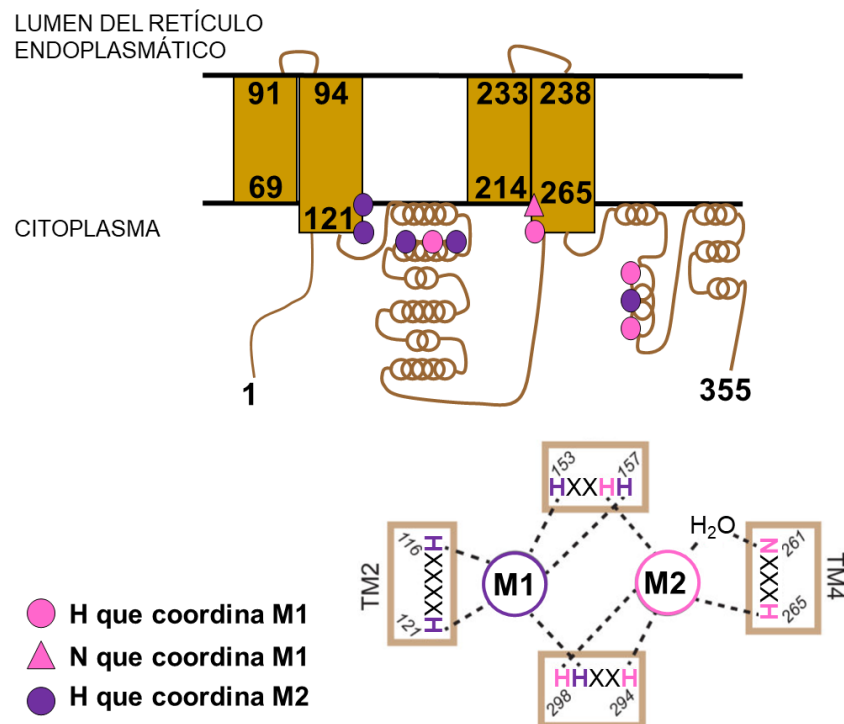


Figura 3. Topología en la membrana de la SCD1 de ratón y organización del complejo de di-hierro. Se muestra la disposición en el citoplasma de las 9 histidinas (representadas como círculos) y la asparagina (representada como un triángulo) implicadas en la coordinación de los dos átomos de hierro (M1 y M2) en el centro activo de la enzima. Se emplea un código de colores para indicar el átomo de hierro que coordina cada residuo. La N261 se une por puentes de hidrógeno a una molécula de agua que coordina el hierro. Modificada de Bai *et al.* (2015).

I.2. Lípidos éter y plasmalógenos

I.2.1. Estructura química y características generales

Generalmente, los glicerofosfolípidos de membrana suelen contener dos ácidos grasos unidos mediante enlaces éster a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol, mientras que en *sn*-3 hay un grupo de cabeza polar compuesto por un fosfato unido a un alcohol, ya sea etanolamina, colina, serina, inositol, glicerol o fosfatidilglicerol (Harayama & Riezman, 2018). Sin embargo, en algunos tejidos de mamíferos se ha observado que hasta el 20% de los glicerofosfolípidos totales tienen una cadena hidrocarbonada unida por un enlace éter, y no éster, a la posición *sn*-1 del glicerol. La forma más común de esta subclase de glicerofosfolípidos con enlace éter son los plasmalógenos, que se caracterizan por tener un enlace vinil-éter (un doble enlace *cis* adyacente al enlace éter) en la posición *sn*-1, el cual aporta a este tipo de fosfolípidos unas propiedades muy particulares (Figura 4) (Dean & Lodhi, 2018; Zhou *et al.*, 2020). La conversión del lípido

I. Introducción

éter precursor (también llamado plasmanil-fosfolípido o alquil-fosfolípido) en plasmalógeno (también llamado plasmenil-fosfolípido o alquenil-fosfolípido) está catalizada por una desaturasa de ácidos grasos dependiente de oxígeno, de cuya existencia se sabía hace ya unos 50 años (Paltauf & Holasek, 1973; Wykle *et al.*, 1972). Sin embargo, la secuencia de la desaturasa responsable ha sido una incógnita hasta que, recientemente, nuestro grupo de investigación (Gallego-García *et al.*, 2019) y, de manera independiente, otro grupo de investigación (Werner *et al.*, 2020), desvelaron su identidad.

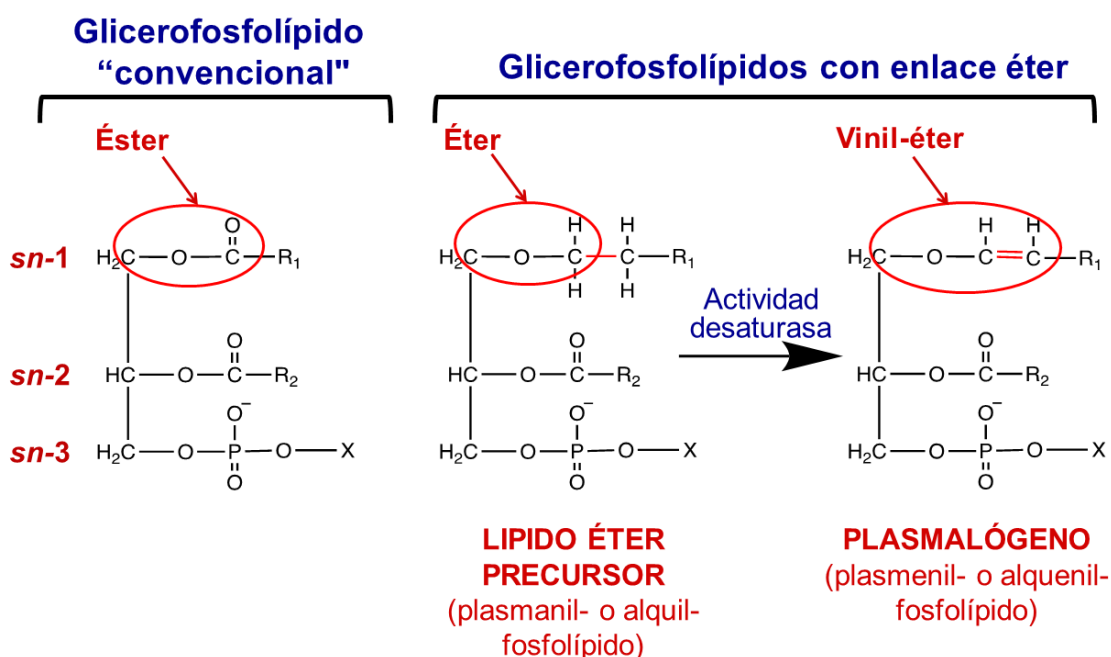


Figura 4. Comparación de la estructura química de glicerofosfolípidos convencionales con la de glicerofosfolípidos con enlace éter (plasmalógenos y sus precursores con enlace éter). R1 y R2 representan las cadenas hidrocarbonadas unidas a las posiciones *sn-1* y *sn-2* del glicerol, respectivamente. X representa el alcohol que conforma el grupo de cabeza polar, y que puede ser etanolamina, colina, serina, inositol, glicerol o fosfatidilglicerol. Con un círculo rojo se señala el tipo de enlace mediante el cual se une la cadena hidrocarbonada a la posición *sn-1* y que diferencia estos tres tipos de glicerofosfolípidos. Modificada de Dean & Lodhi, (2018).

El primer indicio de la existencia de lípidos con enlace éter se produjo en 1915, cuando Kossel y Edlbacher aislaron un alquil-glicerol presente en la fracción insaponificable de una estrella de mar (Kossel & Edlbacher, 1915). Unos años después, en 1924, Toyama postuló la existencia de enlaces éter en lípidos, que podrían generarse por condensación de un alcohol graso de cadena larga con una molécula de glicerol (Snyder, 1999). Sin embargo, no fue hasta 1928 cuando Heilbron y Owens aportaron fuertes evidencias que confirmaban la presencia del enlace éter en alquil-fosfolípidos (Heilbron & Owens, 1928). Con respecto a los plasmalógenos, los científicos alemanes

Feulgen y Voit fueron los primeros en detectarlos (de una forma bastante curiosa) en 1924. Este descubrimiento se produjo al tratar erróneamente muestras frescas de tejido animal con fucsina y ácido sulfuroso. Aplicando este tratamiento observaron que se teñía específicamente el citoplasma de las células, pero no el núcleo, lo que sugería la presencia de aldehídos citoplasmáticos (Feulgen & Voit, 1924). El compuesto original a partir del cual se liberaban estos aldehídos resultó tener naturaleza lipídica y recibió el nombre de plasmalógeno, aunque su estructura química y su enlace vinil-éter no fueron caracterizados con éxito hasta la publicación de una serie de trabajos llevados a cabo por diferentes grupos entre 1957 y 1966 (Cymerman *et al.*, 1966; Debuch, 1958; Marinetti & Erbland, 1958; Norton *et al.*, 1962; Rapport *et al.*, 1957; Snyder, 1999; Warner & Lands, 1961).

Los lípidos éter y plasmalógenos son, en general, constituyentes minoritarios de las membranas biológicas en animales y algunas bacterias. Aun así, son compuestos altamente bioactivos capaces de desempeñar una diversidad de funciones y cuya ausencia en humanos se correlaciona con severas enfermedades como el síndrome de Zellweger, la condrodisplasia punctata rizomélica, Alzheimer o determinados tipos de cáncer (Dean & Lodhi, 2018; Jiménez-Rojo & Riezman, 2019; Magnusson & Haraldsson, 2011). En mamíferos, los lípidos éter y plasmalógenos son especialmente abundantes en cerebro y corazón. De hecho, concentraciones muy elevadas de plasmalógenos de fosfatidiletanolamina (PE) se pueden encontrar en el sistema nervioso, retina y cerebro (hasta el 60% del total de fosfolípidos con etanolamina en la sustancia gris y hasta el 80% en la sustancia blanca), mientras que en corazón hay una gran cantidad de plasmalógenos de PE (50% del total de fosfolípidos con etanolamina) y fosfatidilcolina (PC) (25% de fosfolípidos con colina). Este tipo de lípidos también están presentes, aunque en menor proporción, en riñón, pulmón, músculo esquelético, neutrófilos, eosinófilos y espermatozoides maduros (Braverman & Moser, 2012; Honsho & Fujiki, 2017; Zhou *et al.*, 2020).

En animales y bacterias, los glicerofosfolípidos con enlace éter se caracterizan por tener un alcohol graso unido en la posición *sn*-1 del glicerol mediante un enlace éter (en plasmanil-fosfolípidos) o vinil-éter (en plasmenil-fosfolípidos). En mamíferos, el alcohol graso puede ser saturado (C16:0 y C18:0) o monoinsaturado (C18:1). Por otro lado, la posición *sn*-2 suele estar enriquecida en PUFAs con número par de átomos de carbono, como el ácido araquidónico (C20:4 ω -6) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 ω -3). Finalmente, el grupo de cabeza encontrado con mayor frecuencia es PE y PC, aunque también se han identificado plasmalógenos de fosfatidilserina (PS) y

I. Introducción

fosfatidilinositol (PI) en pequeñas proporciones (Braverman & Moser, 2012; Ivanova *et al.*, 2010; Magnusson & Haraldsson, 2011; Nagy *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2020). En bacterias, la composición de los ácidos grasos unidos al glicerol y del grupo de cabeza polar puede variar significativamente con respecto a lípidos éter y plasmalógenos de mamíferos. Así, es posible encontrar alcoholes grasos de número impar de átomos de carbono, insaturados o ramificados unidos a la posición *sn*-1, mientras que la posición *sn*-2 puede ser ocupada por ácidos grasos ramificados o lineales. Los grupos de cabeza más comunes en bacterias son PE, PS y fosfatidilglicerol (PG), pero también se han encontrado plasmalógenos de cardiolipina (Řezanka *et al.*, 2012).

Una de las principales características que distinguen a las arqueas de las bacterias y de los eucariotas es su compleja e inusual composición lipídica, con abundancia de lípidos éter, pero ausencia de plasmalógenos. En los glicerofosfolípidos de arqueas, la cadena hidrocarbonada es de naturaleza isoprenoide y siempre se une mediante enlaces éter a las posiciones *sn*-2 y *sn*-3 del glicerol-1-fosfato. Curiosamente, la estereoconfiguración del glicerol es opuesta a la descrita en bacterias y eucariotas, donde el grupo de cabeza polar se sitúa en la posición *sn*-3. El lípido éter (di-éter en este caso) más común en las membranas de arqueas es el arqueol (2,3-di-*O*-fitano-*sn*-glicerol). Mediante condensación de dos moléculas de arqueol se genera el lípido tetra-éter bipolar caldarqueol. Las membranas de arqueas, al ser ricas en este lípido, tienden a adquirir una estructura en monocapa más rígida y resistente (Jain *et al.*, 2014; Koga & Morii, 2005). La estabilidad que proporciona el enlace éter a estos lípidos y su particular estructura química podrían explicar la capacidad que tienen las arqueas para sobrevivir en condiciones ambientales muy diversas y, en muchos casos, extremas (Koga, 2012). Así, la presencia de lípidos di-éter, di-éter macrocíclicos y tetra-éter hace que las membranas de arqueas muestren una mayor estabilidad frente al calor, pH ácido y salinidad (Jain *et al.*, 2014; Koga, 2012).

I.2.2. Distribución de lípidos éter y plasmalógenos en los seres vivos

Los lípidos éter y plasmalógenos muestran un patrón de distribución único, amplio y discontinuo a lo largo del árbol de la vida (Figura 5). Entre los organismos eucarióticos, estos compuestos están presentes en animales (muy extendidos tanto en vertebrados como en invertebrados) y algunos protozoos (como los parásitos *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*) pero, curiosamente, no se han encontrado ni en plantas ni en hongos (Jiménez-Rojo & Riezman, 2019; Patnaik *et al.*, 1993; Zhang & Beverley, 2010). Por otro lado, como ya se ha comentado, las arqueas destacan por la enorme abundancia y singularidad química de los lípidos con enlace éter que

constituyen sus membranas biológicas y, sin embargo, carecen de plasmalógenos. Finalmente, los lípidos éter y plasmalógenos se encuentran con mucha frecuencia en bacterias anaerobias estrictas (como muchas especies del género *Clostridium*), pero no están presentes en bacterias aerobias o anaerobias facultativas, a excepción de las mixobacterias (un grupo de bacterias aerobias estrictas incluido dentro de las Deltaproteobacteria) (Goldfine 2017; Lorenzen *et al.*, 2014b; Řezanka *et al.*, 2012; Sohlenkamp & Geiger, 2015).

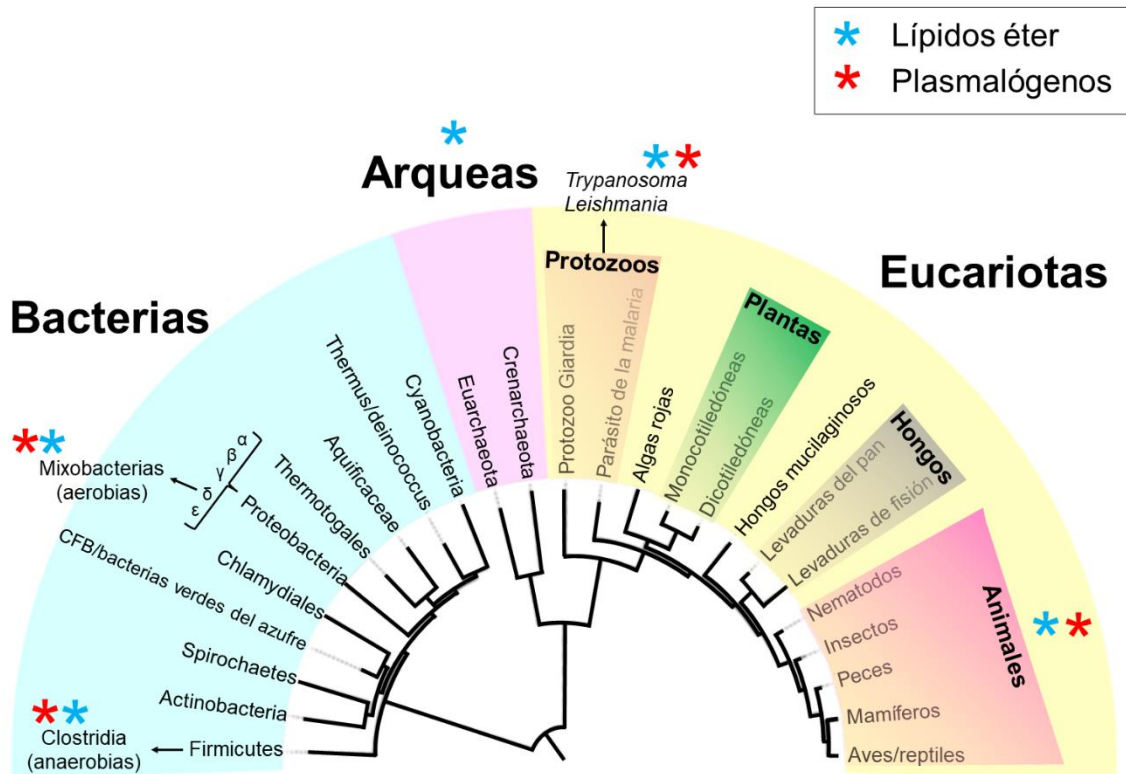


Figura 5. Distribución de lípidos éter y plasmalógenos en el árbol de la vida. Los tres dominios de la vida postulados por Woese aparecen sombreados en colores distintos: eucariotas (amarillo), arqueas (lila) y bacterias (azul). Mediante un asterisco se indica la presencia de lípidos éter (asterisco azul) y plasmalógenos (asterisco rojo) en el dominio o grupo de organismos en cuestión. Imagen cedida por R. Pérez-Castaño.

La extraña distribución de los plasmalógenos en los seres vivos ha sido objeto de estudio durante décadas, lo que ha permitido trazar la posible historia evolutiva de estos compuestos. En general, parece bastante aceptada la hipótesis de que los plasmalógenos surgieron en bacterias anaerobias, donde se habrían mantenido hasta la actualidad debido a la plasticidad que proporcionan a las membranas biológicas, contribuyendo al crecimiento de las células en un rango amplio de temperatura, salinidad y presencia de solutos. Su ausencia en la mayoría de bacterias aerobias podría deberse a la sensibilidad que muestran estos lípidos (más concretamente, el enlace vinil-éter) a

I. Introducción

la rotura por especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la respiración aeróbica (Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001), y a la falta en bacterias de mecanismos capaces de eliminar los aldehídos y liso-fosfolípidos generados tras la rotura de plasmalógenos y que resultan tóxicos en exceso. Únicamente los animales habrían sido capaces de utilizar las propiedades antioxidantes y señalizadoras de los plasmalógenos en su propio beneficio, desarrollando mecanismos para evitar los productos tóxicos generados tras su rotura en condiciones oxidantes, lo que explicaría la reaparición de estos compuestos en organismos superiores aerobios (Goldfine, 2010; Zhou *et al.*, 2020). Por tanto, resulta fascinante que las mixobacterias sean una excepción entre las bacterias aerobias y no solo contengan plasmalógenos sino que, además, los utilicen para percibir el estrés fotooxidativo, como demuestran los estudios realizados por nuestro grupo de investigación y que constituyen parte de esta tesis doctoral.

I.2.3. Metabolismo de lípidos éter y plasmalógenos

I.2.3.1. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos

Las rutas de síntesis de plasmalógenos en organismos aerobios y en bacterias anaerobias difieren profundamente en cuanto a las enzimas implicadas y a los precursores que utilizan. En organismos aerobios el enlace vinil-éter de los plasmalógenos se genera a partir de un alquil-fosfolípido mediante una vía oxidativa en la que participa una desaturasa de plasmaniletanolamina (PEDS1) dependiente de oxígeno. Aunque se sabe menos sobre la síntesis de plasmalógenos en bacterias anaerobias, estudios recientes realizados en *Clostridium perfringens* sugieren que el enlace vinil-éter se generaría directamente a partir del acil-fosfolípido mediante una vía reductiva en la que participa el complejo multienzimático PlsAR (Figura 6) (Jackson *et al.*, 2020). Claramente, la existencia en la naturaleza de dos rutas totalmente distintas para sintetizar plasmalógenos refleja el peculiar proceso evolutivo que han sufrido estos lípidos, así como las relevantes funciones que deben desempeñar en los seres vivos (Zhou *et al.*, 2020). A continuación, se abordará con más detalle la biosíntesis de estos compuestos en mamíferos y bacterias anaerobias.

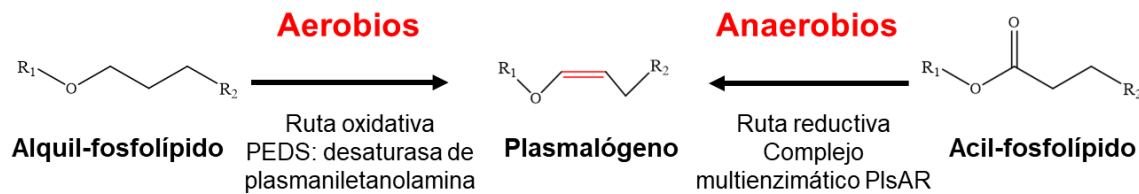


Figura 6. Síntesis de plasmalógenos en organismos aerobios y bacterias anaerobias. En rojo se muestra el enlace vinil-éter típico de los plasmalógenos. Modificada de Jackson *et al.* (2020).

I.2.3.1.1. Biosíntesis en mamíferos

Los lípidos éter y plasmalógenos se sintetizan en mamíferos mediante una ruta compleja, pero bien caracterizada, que comienza en el peroxisoma y acaba en el retículo endoplasmático. Las enzimas peroxisomales catalizan los pasos clave en la formación de los lípidos éter, y para su conversión a plasmalógenos se requiere una PEDS1 localizada en el retículo endoplasmático (Figura 7), sobre la que se centra este trabajo.

La dihidroxiacetona fosfato (DHAP) es el precursor en la biosíntesis de lípidos éter en mamíferos. La DHAP es esterificada en posición *sn*-1 con un acil-CoA sintetizado *de novo* por la enzima multifuncional FAS (*fatty acid synthase*) y activado posteriormente por la ACS (*long chain fatty acid CoA synthase*), dando lugar a 1-acil-DHAP. Este primer paso está catalizado por la DHAPAT/GNPAT (*dihydroxyacetone phosphate acyltransferase*) situada en la matriz del peroxisoma. Paralelamente, FAR1 (*fatty acyl-CoA reductase*), y en menor medida FAR2, reducen un acil-CoA a un alcohol graso, que utiliza la enzima ADHAPS/AGPS (*alkyl-dihydroxyacetone phosphate acyltransferase*) para generar el primer intermediario con enlace éter: 1-O-alkil-DHAP. Ya en el retículo endoplasmático, la AADHAPR (*alkyl/acyl DHAP reductase*) reduce el 1-O-alkil-DHAP a 1-O-alkil-glicero-3-fosfato, que puede proceder también de la fosforilación del 1-O-alkil-glicerol ingerido en la dieta por la quinasa de alquil-glicerol (*AG kinase*). Después, LPA-AT (*lysophosphatidate acyltransferase*) esterifica la posición *sn*-2 con un acil-CoA dando lugar a 1-O-alkil-2-acil-glicero-3-fosfato. El grupo fosfato es eliminado entonces por una PAP-I (*phosphatidic acid phosphatase*) obteniéndose 1-O-alkil-2-acil-glicerol. La PE es añadida como grupo de cabeza polar por la enzima EPT (*CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase*), generando el lípido éter 1-O-alkil-2-acil-glicero-fosfoetanolamina (plasmaniletanolamina o AEPE) (Dean & Lodhi, 2018; Dorninger *et al.*, 2022; Magnusson & Haraldsson, 2011; Watschinger & Werner, 2013b; Zhou *et al.*, 2020).

I. Introducción

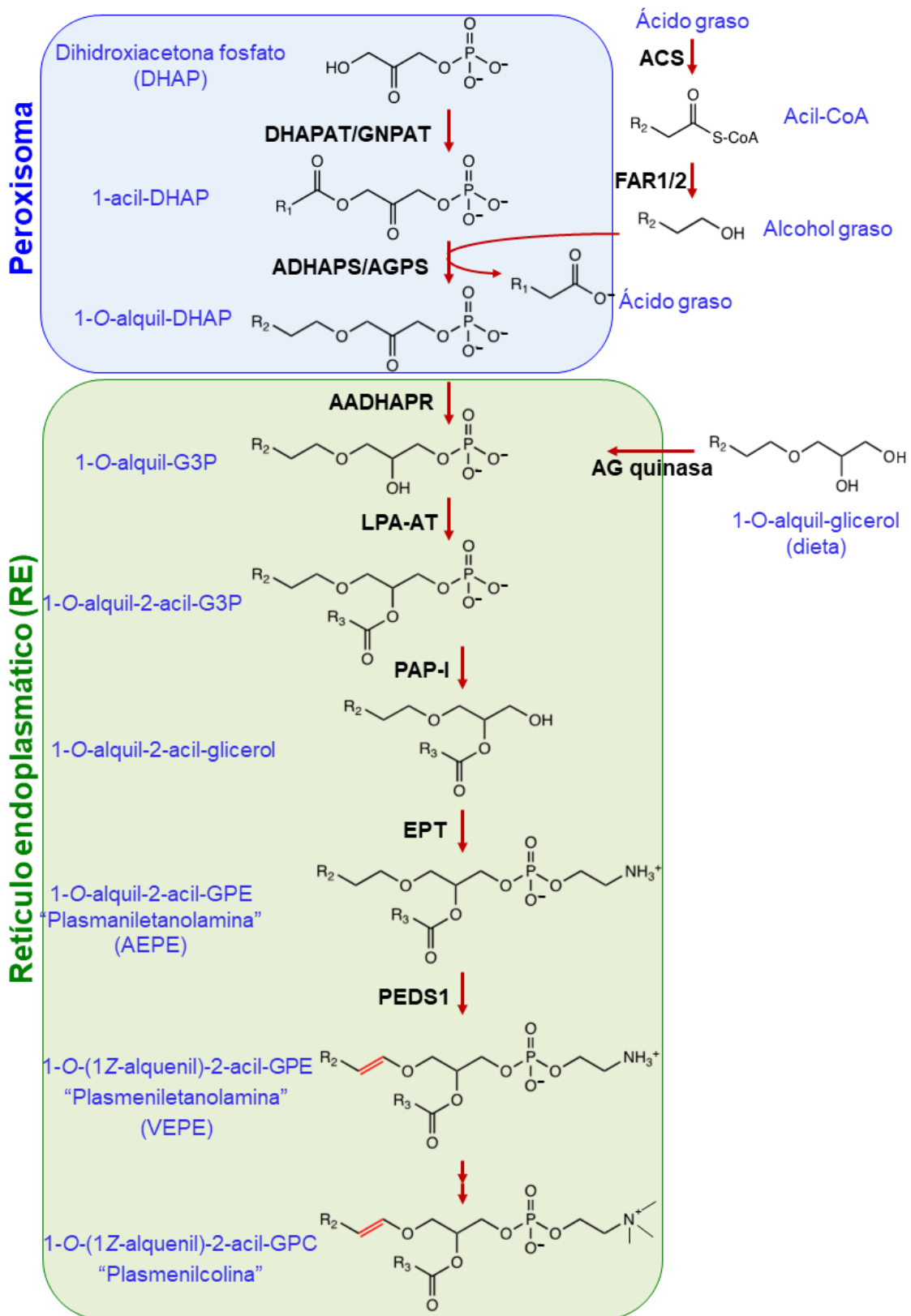


Figura 7. Síntesis de lípidos éter y plasmalógenos en mamíferos. El nombre de los sustratos y productos que intervienen en cada reacción se indica en color azul. En negro se indica el nombre de cada enzima que participa en la ruta. En rojo se representa en enlace vinil-éter de los plasmalógenos. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019) y Padmanabhan *et al.* (2022).

La síntesis de plasmalógenos de PE (plasmeniletanolamina o VEPE) se produce por medio de PEDS1, que es capaz de generar el enlace vinil-éter al eliminar estereoespecíficamente dos hidrógenos unidos a los carbonos C-1 y C-2 de la cadena hidrocarbonada en posición *sn*-1. Como las desaturasas de acil-CoA, esta enzima requiere oxígeno molecular, un nucleótido de pirimidina reducido (NADPH o NADH) y un sistema de transporte de electrones que contiene b_5 para catalizar la reacción de desaturación (Snyder, 1999; Snyder *et al.*, 2008; Watschinger & Werner, 2013b). La incapacidad de purificar y caracterizar esta proteína de membrana ha hecho que, durante los últimos 50 años, sea considerada una enzima huérfana del metabolismo lipídico, al no conocerse su secuencia proteica ni poder asociarla con un gen concreto (Watschinger & Werner, 2013b). Esto ha cambiado en los últimos años tras el descubrimiento, por parte del grupo de investigación en el cual se ha realizado esta tesis doctoral, de que la proteína CarF de *M. xanthus* muestra esta actividad desaturasa implicada en la biosíntesis de plasmalógenos (Gallego-García *et al.*, 2019). Dado que no se ha encontrado en animales ninguna proteína con actividad desaturasa de plasmanilcolina, se ha propuesto que los plasmalógenos de PC se generan en mamíferos mediante hidrólisis de sus análogos de PE y posterior adición de PC como nuevo grupo de cabeza polar (Zhou *et al.*, 2020).

La síntesis *de novo* de plasmalógenos está regulada, a nivel celular, mediante un mecanismo de retroalimentación que detecta el contenido total de plasmalógenos de PE que están dispuestos asimétricamente en la cara interna de la membrana plasmática (donde generalmente se localizan gracias a una flipasa perteneciente a la subfamilia P4 de ATPasas tipo P). Una señal que informa sobre los niveles de plasmalógenos en la membrana se transfiere hasta los peroxisomas, donde modula la estabilidad de la enzima FAR1. Por tanto, FAR1 se convierte en la enzima limitante en la biosíntesis de plasmalógenos (Dorninger *et al.*, 2022; Honsho *et al.*, 2017; Honsho & Fujiki, 2017).

I.2.3.1.2. Biosíntesis en bacterias anaerobias

Aunque la presencia de plasmalógenos en bacterias anaerobias estrictas fue descrita hace más de 50 años (Goldfine, 1964; Wegner & Foster, 1963), poco se sabe sobre la ruta biosintética mediante la cual se generan estos compuestos en dichas bacterias. Experimentos de marcaje realizados hace décadas demostraron que, al contrario de lo que sucede en mamíferos, la DHAP no actúa como precursor en la biosíntesis de plasmalógenos. Además, dichos experimentos sugirieron que estas bacterias son capaces de generar directamente los plasmalógenos a partir de los correspondientes diacilgliceroles (Goldfine, 2010; Goldfine, 2017). En base a estas

I. Introducción

evidencias, se ha propuesto una posible ruta biosintética (Figura 8A) en la cual el glicerol-3-fosfato es acetilado en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2, en dos reacciones sucesivas catalizadas por las enzimas PlsX y PlsY, para dar lugar a ácido fosfatídico. A continuación, la CdsA convierte el ácido fosfatídico en citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG). Posteriormente, dos transformaciones adicionales son requeridas para obtener los diacilfosfolípidos con fosfatidiletanolamina (PtdEtn) o fosfatidilglicerol (PtdGro) a partir de CDP-DAG. Finalmente, los plasmalógenos de PE o PG se forman a partir de PtdEtn o PtdGro, respectivamente. Sin embargo, las enzimas implicadas en la generación del enlace vinil-éter, así como el mecanismo enzimático mediante el cual se genera este tipo de enlace en condiciones anaerobias, han permanecido ocultos durante décadas (Zhou *et al.*, 2020).

Estudios recientes han permitido identificar en *C. perfringens* un operón, llamado *plsA-plsR*, que es esencial para la formación de plasmalógenos. Dicho operón está presente en una amplia variedad de bacterias anaerobias estrictas y facultativas y codifica un complejo constituido por dos proteínas: PlsA y PlsR (Figura 8B). En *C. perfringens*, PlsA presenta dos dominios de activación (Act1 y Act2) y un dominio de reducción/deshidratación (Red1), mientras que PlsB constituye el segundo dominio de reducción/deshidratación (Red2). Sin embargo, la distribución de dominios entre los dos genes que conforman el operón puede variar de unas bacterias a otras. Además, el complejo enzimático PlsA-PlsR requiere tres cofactores [4Fe-4S] para realizar su función. Se ha postulado que este complejo enzimático es capaz, mediante un mecanismo de reducción y deshidratación dependiente de ATP, de convertir directamente el enlace éster en posición *sn*-1 en vinil-éter. La síntesis de plasmalógenos mediada por PlsA-PlsR es fuertemente inhibida en presencia de oxígeno. Una posible represión de la expresión de este operón en condiciones aeróbicas o la sensibilidad de los cofactores [4Fe-4S] al oxígeno podrían explicar la incapacidad de formar plasmalógenos en aerobiosis mediante esta vía de biosíntesis (Jackson *et al.*, 2020).

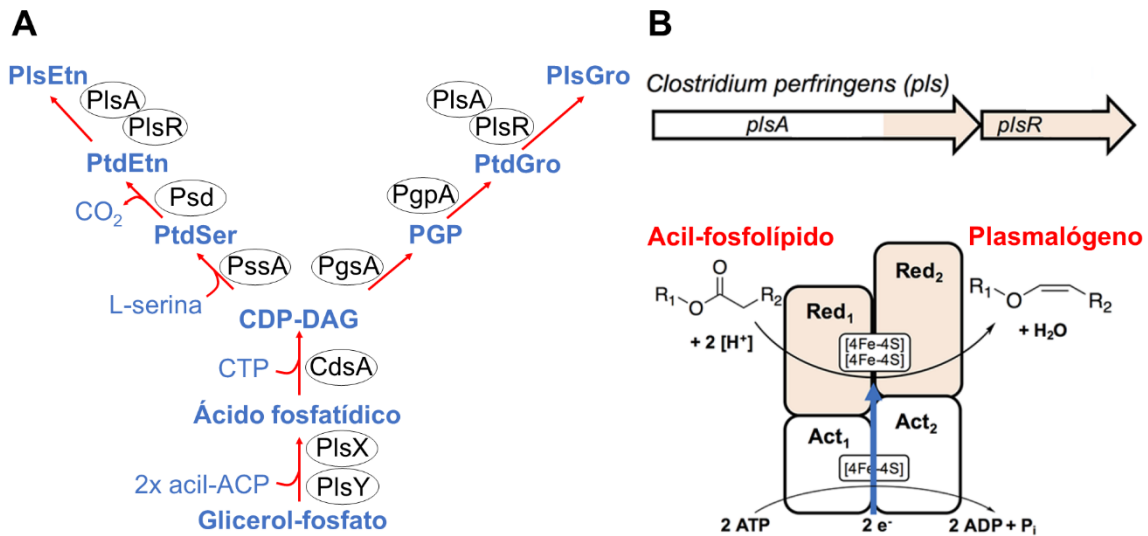


Figura 8. Síntesis de plasmalógenos en bacterias anaerobias. A) Posible ruta de síntesis de plasmalógenos en bacterias anaerobias. El nombre de los sustratos y productos que intervienen en cada reacción se indica en color azul: CDP-DAG (citidina difosfato diacilglicerol), PtdSer (diacilfosfolípido con fosfatidilserina), PtdEtn (diacilfosfolípido con fosfatidiletanolamina), PGP (fosfatidilglicerol-3-fosfato), PtdGro (diacilfosfolípido con fosfatidilglicerol), PlsEtn (plasmalógeno de fosfatidiletanolamina), PlsGro (plasmalógeno de fosfatidilglicerol). Los nombres de las enzimas que participan en la ruta aparecen rodeados por círculos negros: CdsA (*CDP-diacylglycerol synthase*), PssA (*PtdSer synthase*), Psd (*PtdSer decarboxylase*), PgsA (*PGP synthase*), PgpA (*PGP phosphatase*), PlsA/PlsR (*plasmalogen synthase A/R*). **B)** Disposición de los genes *plsA* y *plsR* (arriba), que codifican una enzima multidominio con actividad sintetasa de plasmalógenos en *C. perfringens*, capaz de generar el enlace vinil-éter de los plasmalógenos directamente a partir de los acil-fosfolípidos análogos (abajo). Modificada de Jackson *et al.* (2020) y Zhou *et al.* (2020).

I.2.3.2. Degradación de lípidos éter y plasmalógenos

La degradación de lípidos éter y plasmalógenos en mamíferos ha sido objeto de estudio durante décadas y tiene lugar mediante rutas metabólicas complejas. El lípido éter 1-O-alkil-2-acil-glicerofosfolípido es convertido en 1-O-alkil-2-liso-glicerofosfolípido por acción de una fosfolipasa A2 específica, capaz de hidrolizar el ácido graso unido mediante enlace éster en la posición *sn*-2 (Balboa & Balsinde, 2021) (Figura 9). Los fosfolípidos “liso”, que tienen un grupo hidroxilo libre en *sn*-2, difieren de los fosfolípidos originales en cuanto a sus propiedades y funciones. Los liso-fosfolípidos desempeñan importantes funciones en procesos de señalización y pueden actuar como precursores inmediatos en la biosíntesis de otras moléculas. Sin embargo, su capacidad para desorganizar la estructura de las membranas y provocar lisis celular hace que deban mantenerse a niveles intracelulares bajos para reducir sus efectos tóxicos (Tan *et al.*, 2020). El 1-O-alkil-2-liso-glicerofosfolípido (junto con los alkil-gliceroles procedentes de la dieta) es sustrato de la alkil-glicerol monooxigenasa, la única enzima conocida

I. Introducción

hasta la fecha capaz de romper el enlace éter que mantiene unido al alcohol graso en la posición *sn*-1 del fosfolípido. Esta enzima de membrana, descrita hace décadas (Tietz *et al.*, 1964) muestra una actividad oxidasa dependiente de tetrahydrobiopterina y su centro activo está constituido por un complejo de di-hierro en el que participan ocho histidinas esenciales para la catálisis. Como productos de esta reacción enzimática se obtiene un aldehído graso de cadena larga y el correspondiente derivado del glicerol (Watschinger *et al.*, 2012; Watschinger *et al.*, 2013a; Watschinger & Werner, 2013b). Los aldehídos grasos son extremadamente inestables y tienden a reaccionar con macromoléculas celulares, como las proteínas o el DNA. Para evitar sus efectos tóxicos, las células los convierten rápidamente en ácidos grasos por acción de la enzima aldehído graso deshidrogenasa o en alcoholes grasos por la enzima aldehído graso reductasa (Ebenezer *et al.*, 2020; Keller *et al.*, 2014; Watschinger & Werner, 2013b).

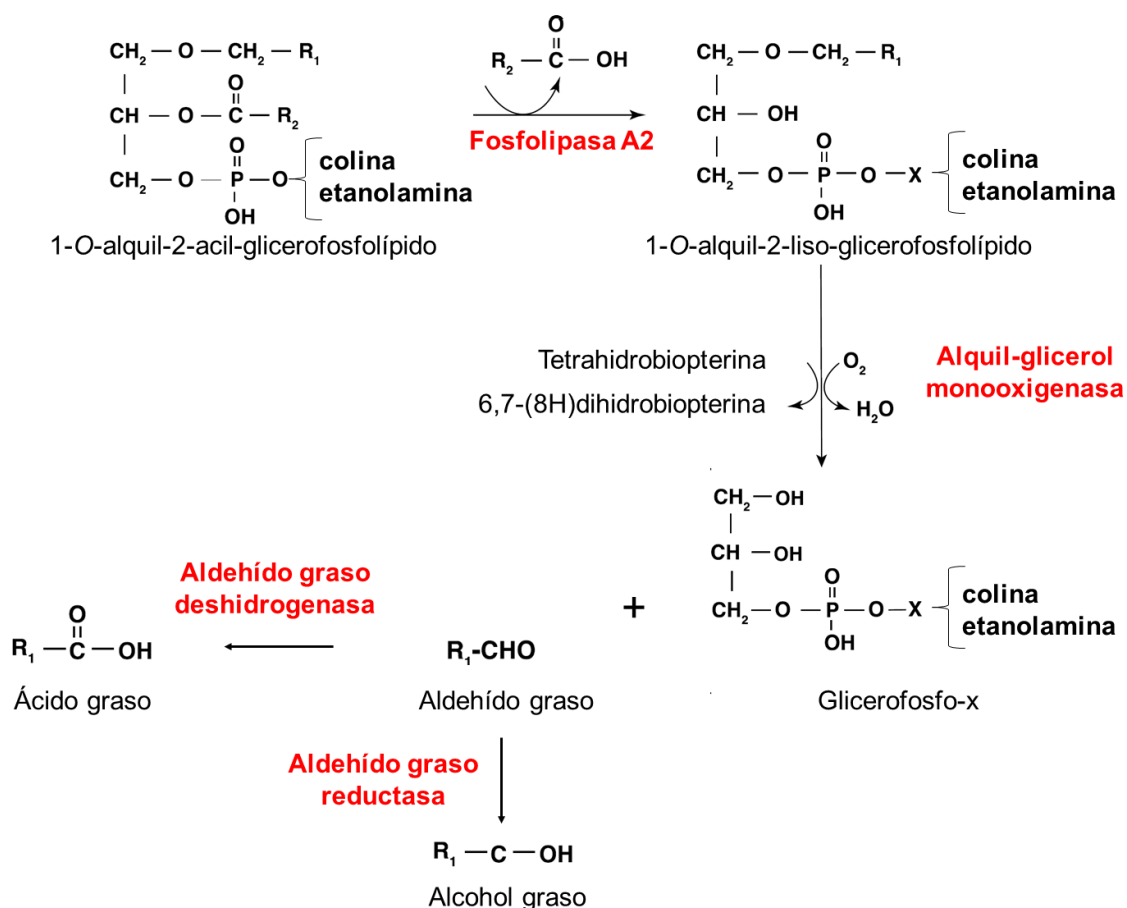


Figura 9. Degradación enzimática de lípidos con enlace éter en mamíferos. El nombre de los sustratos y productos que intervienen en cada reacción se indica en color negro. En rojo se indica el nombre de cada enzima que participa en la ruta. Modificada de Ebenezer *et al.* (2020).

En la rotura enzimática del enlace vinil-éter interviene una plasmalogenasa. Aunque su identidad ha permanecido oculta durante décadas, estudios recientes han asignado esta actividad enzimática al citocromo C. Presente en condiciones fisiológicas en la membrana mitocondrial interna, donde transfiere electrones entre los complejos III y IV, el citocromo C es capaz de interactuar con fosfolípidos cargados negativamente, principalmente cardiolipina, sufriendo un cambio conformacional. El citocromo C alterado deja de actuar como un transportador de electrones y adquiere una actividad peroxidasa que, empleando O₂ y H₂O₂, es capaz de oxidar e hidrolizar el enlace vinil-éter generando un α-hidroxi-aldehído graso y 1-hidroxi-2-acil-glicerofosfolípido (Figura 10) (Dorninger *et al.*, 2022; Goldfine, 2018; Jenkins *et al.*, 2018).

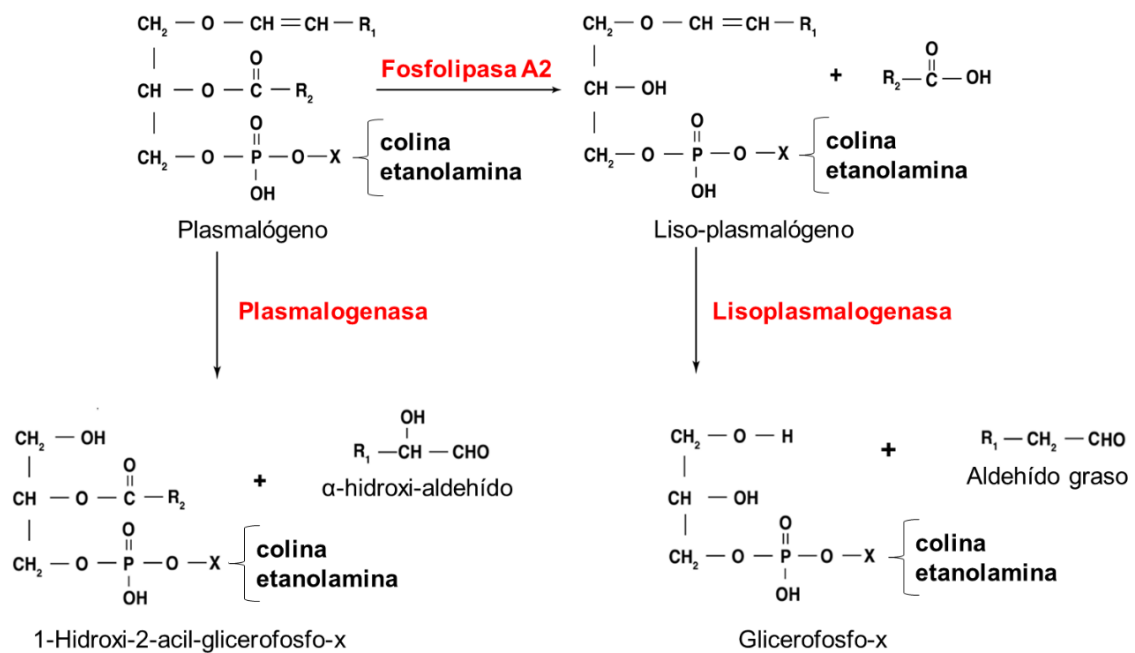


Figura 10. Degradación enzimática de plasmalógenos en mamíferos. El nombre de los sustratos y productos que intervienen en cada reacción se indica en color negro. En rojo se indica el nombre de cada enzima que participa en la ruta. Modificada de Ebenezer *et al.* (2020).

El enlace vinil-éter es también susceptible de rotura no enzimática por acción del oxígeno singlete (¹O₂) generado en condiciones de estrés oxidativo (Ebenezer *et al.*, 2020; Morand *et al.*, 1988; Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001) o por los ácidos hipocloroso (HClO) e hipobromoso (HBrO) producidos tras la activación de neutrófilos y eosinófilos, respectivamente (Albert *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2002; Leßig *et al.*, 2007). Por otro lado, la fosfolipasa A2 genera liso-plasmalógenos, al liberar el ácido graso (generalmente poliinsaturado) unido a la posición *sn*-2 en los plasmalógenos. Los liso-plasmalógenos son moléculas bioactivas capaces de incrementar la fluidez de la membrana, perturbar su organización y, en última instancia, provocar la lisis celular. Para mantener unos

I. Introducción

niveles bajos de liso-plasmalógenos y evitar así los efectos tóxicos que ocasionan estos compuestos, una liso-plasmalogenasa hidroliza el enlace vinil-éter presente específicamente en los liso-plasmalógenos, generando un aldehído graso y un derivado de glicerol. Esta enzima, que fue caracterizada hace años, es esencial para mantener la estabilidad y funcionalidad de las membranas biológicas al regular el balance entre plasmalógenos y liso-plasmalógenos (Dorninger *et al.*, 2022; Ebenezer *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2011).

I.2.4. Funciones de lípidos éter y plasmalógenos

Los lípidos éter y los plasmalógenos participan en múltiples procesos biológicos y su deficiencia ocasiona severos trastornos en mamíferos (Zhou *et al.*, 2020). Bajos niveles de estos lípidos se correlacionan con varias enfermedades neurológicas comunes como Alzheimer, Parkinson, autismo, epilepsia, esclerosis múltiple, esquizofrenia o depresión psiquiátrica (Rangholia *et al.*, 2021). También es frecuente encontrar niveles alterados de lípidos éter en células cancerígenas, aunque dichas alteraciones dependen del tipo celular y del órgano afectado por el cáncer. Mientras que algunos tumores experimentan un incremento en el contenido de lípidos éter, correlacionando dichos niveles con la agresividad del cáncer, otros (como el cáncer de hígado) cursan con niveles de lípidos éter disminuidos (Jiménez-Rojo & Riezman, 2019). Finalmente, defectos en la formación de los peroxisomas o mutaciones en genes clave en la biosíntesis de lípidos éter (*gnpat*, *agps* o *far*) ocasionan diferentes enfermedades como el síndrome de Zellweger o la condrodysplasia punctata rizomélica (Dean & Lodhi, 2018).

Para determinar las funciones exactas que llevan a cabo los lípidos éter y los plasmalógenos se ha trabajado con diferentes modelos animales deficientes en estos lípidos. En ratones, la falta de lípidos éter produce infertilidad en machos, defectos en el desarrollo del ojo, cataratas e hipoplasia del nervio óptico. Por otro lado, en *Caenorhabditis elegans* se ha visto que la ausencia de estos lípidos ocasiona problemas de reproducción, menor tolerancia a las bajas temperaturas, reducción de la vida media y mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. En humanos se han descrito pacientes con mutaciones en los genes *gnpat*, *agps* o *far*, aunque estos individuos tienen severos problemas de crecimiento y no suelen sobrevivir a la infancia (Shi *et al.*, 2016). Hay que tener en cuenta que, al desconocer qué gen cifra la PEDS1 que cataliza el paso clave en la síntesis de plasmalógenos, todos estos estudios se han hecho en modelos animales que tienen impedida la síntesis de lípidos éter y, por consiguiente, también carecen de plasmalógenos. Esto hace que sea muy difícil distinguir qué funciones son

realizadas por los plasmalógenos versus los lípidos éter precursores (Rangholia *et al.*, 2021). A continuación, se describen las principales funciones atribuidas a lípidos éter y plasmalógenos.

A) Los lípidos éter y los plasmalógenos como moduladores de las propiedades de las membranas biológicas

En base a resultados obtenidos mediante simulación de dinámica de membranas, se ha propuesto que los lípidos éter en general y los plasmalógenos en particular forman bicapas lipídicas más rígidas, delgadas y con un mayor grado de empaquetamiento que sus análogos diacilgliceroles. Trabajando con células deficientes en lípidos éter, derivadas de pacientes afectados con síndrome de Zellweger, se ha comprobado que la ausencia de estos lípidos ocasiona un incremento en la fluidez de la membrana, un menor grado de orden en la disposición de los fosfolípidos en la bicapa y un aumento en la síntesis de ácidos grasos saturados para compensar la mayor fluidez que ha adquirido la membrana (Hermetter *et al.*, 1989; Jiménez-Rojo & Riezman, 2019; Rog & Koivuniemi, 2016; Rubio *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2016). Esto se debe a que la ausencia del grupo carbonilo en la posición *sn*-1 de los lípidos éter hace que los grupos de cabeza polar interaccionen más fuertemente entre sí mediante enlaces por puentes de hidrógeno. Además, el enlace vinil-éter de los plasmalógenos hace que las cadenas hidrocarbonadas ancladas en *sn*-1 y *sn*-2 queden paralelas entre sí, lo que favorece aún más el empaquetamiento de los fosfolípidos en la membrana (Dean & Lodhi, 2018; Koivuniemi, 2017). Al modificar la rigidez y el grosor de la membrana, los lípidos éter son capaces de regular la permeabilidad a pequeñas moléculas, modular la agregación celular y afectar a la función de otros lípidos y proteínas (Rog & Koivuniemi, 2016). Además, los lípidos éter contribuyen a formar estructuras de membrana altamente organizadas, como es el caso de la mielina. De hecho, la ausencia de lípidos éter y plasmalógenos se correlaciona con defectos en la mielinización en el sistema nervioso central y periférico (Da Silva *et al.*, 2014; Farooqui & Horrocks, 2001; Teigler *et al.*, 2009).

Los plasmalógenos de PE tienen una mayor tendencia a formar estructuras de fase hexagonal inversa (los fosfolípidos se orientan de forma que las cabezas polares rodean pequeños núcleos de agua y las cadenas hidrocarbonadas se disponen hacia el exterior) en comparación con sus análogos diacilgliceroles. Gracias a esta propiedad, los plasmalógenos promueven la fusión de membranas durante el tráfico intracelular y extracelular de vesículas (Rog & Koivuniemi, 2016). Resulta especialmente relevante el papel que desempeñan estos lípidos durante la sinapsis, ya que las vesículas sinápticas están enriquecidas en plasmalógenos y su deficiencia ocasiona un defecto en la

I. Introducción

formación de vesículas y en la liberación de neurotransmisores (Almsherqi, 2021; Dorninger *et al.*, 2019). Finalmente, las membranas lipídicas curvadas, como la envoltura de virus, las vesículas extracelulares o la mielina son ricas en plasmalógenos de PE y se sabe que la ausencia de estos lípidos es capaz de alterar la topología de dichas membranas e interferir en los procesos biológicos en las que intervienen (Almsherqi, 2021; Koivuniemi, 2017). Aunque está claro que los lípidos éter son importantes reguladores del tráfico de membranas, aún se desconoce sobre qué proceso específico actúan para poder desarrollar esta función (Jiménez-Rojo & Riezman, 2019).

Los plasmalógenos están enriquecidos en las balsas lipídicas, que constituyen subdominios de la membrana plasmática con una composición muy particular de lípidos y proteínas. Aunque se han descrito fundamentalmente en células eucarióticas, estudios recientes confirman la presencia en bacterias de microdominios funcionales de membrana similares a las balsas lipídicas de eucariotas. Las balsas lipídicas suelen contener grandes concentraciones de colesterol y glicoesfingolípidos. También alojan una amplia variedad de proteínas implicadas en señalización celular, interacción célula-célula y tráfico celular (Almsherqi, 2021; Bramkamp & Lopez, 2015; Jiménez-Rojo & Riezman, 2019; Pike, 2003). Se sabe que en las balsas lipídicas predominan los plasmalógenos de PE que contienen ácido araquidónico (Pike, 2003; Pike *et al.*, 2002). Se ha postulado que los plasmalógenos podrían estabilizar las balsas lipídicas al dotarlas de una mayor rigidez, reestructurar directa o indirectamente la disposición de las otras especies lipídicas que constituyen las balsas y facilitar los procesos de transducción de señales (Dean & Lodhi, 2018; Koivuniemi, 2017; Rubio *et al.*, 2018).

B) Los plasmalógenos como antioxidantes

Durante el metabolismo celular, que generalmente tiene lugar en un entorno rico en oxígeno, se generan ROS que, a altas concentraciones, pueden producir efectos tóxicos para las células, dañar biomoléculas o componentes celulares y desencadenar diferentes patologías, tales como enfermedades neurodegenerativas o cáncer (Luoma *et al.*, 2015; Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001).

A diferencia de los lípidos éter, los plasmalógenos muestran propiedades antioxidantes debido a su enlace vinil-éter. Este enlace es muy resistente a degradación enzimática, pero más sensible a oxidación por $^1\text{O}_2$, iones metálicos y otros radicales oxidantes como el peróxido (Almsherqi, 2021). Se sabe que el $^1\text{O}_2$ ataca el enlace vinil-éter de los plasmalógenos generando un intermediario dioxetano que, en condiciones

fisiológicas, se descompone dando lugar a un aldehído graso de cadena larga con un átomo de carbono menos ($n-1$) que la cadena hidrocarbonada original, 2-liso-fosfatidiletanolamina y formiato. El radical hidroxilo (OH^\bullet) también puede actuar sobre el enlace vinil-éter, pero en este caso genera un intermediario epóxido cuya hidrólisis da lugar a α -hidroxi-aldehídos grasos, con el mismo número de carbonos que la cadena hidrocarbonada original (Figura 11) (Morand, 1994; Morand *et al.*, 1988; Stadelmann-Inggrand *et al.*, 2001).

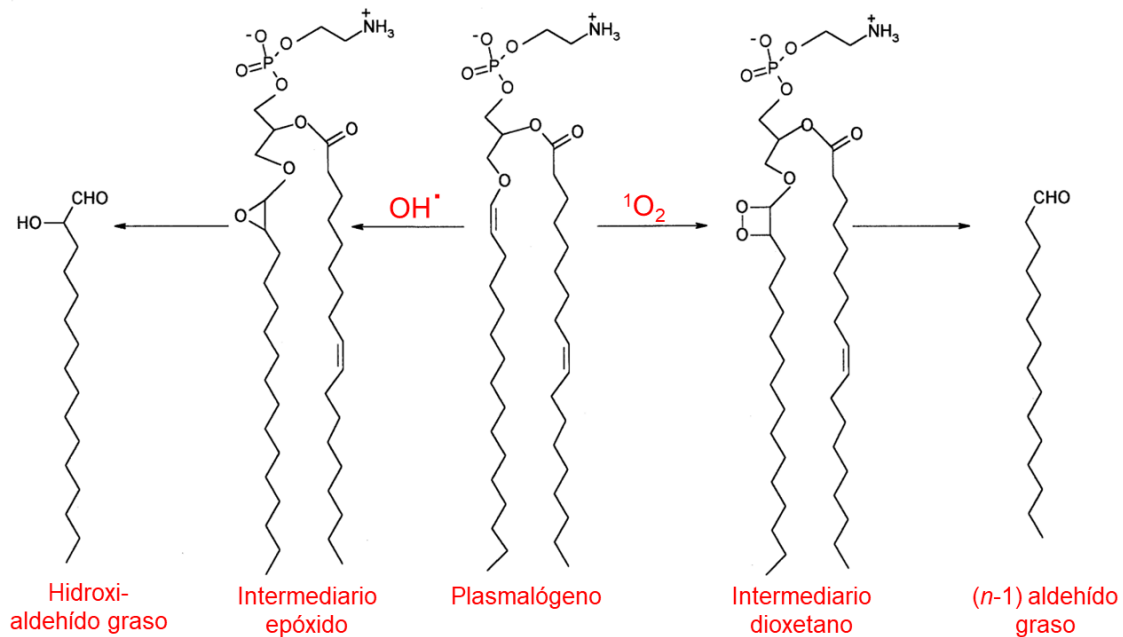


Figura 11. Rotura del enlace vinil-éter de los plasmalógenos por $^1\text{O}_2$ y por radicales hidroxilo. La rotura del enlace vinil-éter también genera 2-liso-fosfatidiletanolamina, no mostrada en la figura. Modificada de Stadelmann-Inggrand *et al.* (2001).

El papel antioxidante de los plasmalógenos queda patente al trabajar con líneas celulares deficientes en plasmalógenos. Estas líneas son más susceptibles a sufrir peroxidación lipídica, muerte celular u otros daños inducidos por especies oxidantes en comparación con las líneas silvestres (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). Además, la elevada sensibilidad de los plasmalógenos a condiciones oxidantes se traduce en una rápida degradación de estos compuestos en presencia de ROS. De hecho, se ha comprobado experimentalmente que las células de mamíferos pueden perder hasta un tercio de su contenido total de plasmalógenos tras 30 minutos de exposición al $^1\text{O}_2$ (Luoma *et al.*, 2015; Magnusson & Haraldsson, 2011; Morand *et al.*, 1988). En base a estos resultados se ha postulado que los plasmalógenos desempeñan un papel protector en las membranas biológicas, ya que estos lípidos tan sensibles a las ROS tienden a “sacrificarse” para así proteger del daño oxidativo a otras posibles dianas

I. Introducción

(Broniec *et al.*, 2011; Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001). Aunque los plasmalógenos claramente desempeñan un papel antioxidante, su degradación en condiciones oxidantes genera aldehídos grasos, unas moléculas muy reactivas e inestables en su forma libre que tienden a reaccionar con múltiples dianas y ocasionar severos daños a nivel celular (Berdyshev, 2011; Domingues *et al.*, 2013; Ebenezer *et al.*, 2020). Por tanto, se requieren más estudios para comprender cómo la acción protectora de los plasmalógenos frente a las ROS prevalece sobre los efectos nocivos de los productos de su oxidación (Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001).

C) Los lípidos éter y los plasmalógenos como moléculas señalizadoras

Uno de los aspectos menos estudiados de los lípidos éter y los plasmalógenos es su enorme potencial como moléculas implicadas en rutas de transducción de señales (Dorninger *et al.*, 2020). Paradójicamente, el primer lípido éter implicado en señalización que se descubrió es también el lípido éter más conocido, el factor activador de plaquetas (FAP). Se trata de un 1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicerofosfolina, que muestra variabilidad en la longitud de la cadena hidrocarbonada unida en *sn*-1, pero siempre tiene un grupo acetilo en *sn*-2 (Rangholia *et al.*, 2021). A pesar de su corta vida media, FAP es una potente molécula de señalización y comunicación intercelular capaz de actuar a concentraciones muy bajas. Esta molécula es sintetizada fundamentalmente en células del sistema inmune (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y macrófagos), aunque las células endoteliales o las plaquetas también la pueden producir (Dorninger *et al.*, 2020; Rangholia *et al.*, 2021). Inicialmente, FAP se describió por su capacidad para ocasionar la agregación de las plaquetas, pero ahora se sabe que puede actuar en múltiples procesos fisiológicos, tales como cicatrización de heridas, angiogénesis, apoptosis, respuesta alérgica e inflamación. Además, FAP también es esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central y desempeña un papel clave en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la formación de la memoria (Hammond *et al.*, 2016). Con respecto a su mecanismo de señalización, FAP es capaz de interactuar con un receptor acoplado a proteína G (receptor de FAP o FAPR) presente en la superficie de la célula diana (fundamentalmente neutrófilos o plaquetas) desencadenando una cascada de señalización intracelular que induce una respuesta, generalmente proinflamatoria, en la célula diana. Es importante destacar que FAP puede ser secretado e interactuar con su receptor presente en células próximas (señalización autocrina o paracrina) o distantes (señalización endocrina), pero también puede situarse en la membrana plasmática e interactuar con el receptor de la célula diana mediante contacto célula-célula (señalización yuxtacrina) (Rangholia *et al.*, 2021).

Aunque con menor relevancia biológica que el FAP, hay otros lípidos éter que actúan como moléculas señalizadoras. Es el caso de los 1-O-alkil-glicerol (OAG), unos lípidos muy utilizados en experimentos de complementación *in vivo* e *in vitro* por su capacidad para convertirse en otros lípidos éter y plasmalógenos. Los OAGs son potentes estimuladores de la respuesta inmunitaria al promover la proliferación y maduración de linfocitos B y T. Además, también son capaces de neutralizar los efectos adversos para el organismo generados bajo condiciones de estrés (Poleschuk *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2014). Otros lípidos éter señalizadores son los plasmanil-fosfolípidos (precursores directos de los plasmalógenos) que, en su forma oxidada, son capaces de regular los efectos producidos por las partículas LDL oxidadas contribuyendo a mantener el estado inflamatorio durante la formación de la placa de aterosclerosis (Davies *et al.*, 2001). Además, se ha visto que las especies de plasmanil-colina desempeñan un papel crucial en el desarrollo y maduración de neutrófilos y pueden unirse al receptor nuclear PPAR γ para estimular la adipogénesis (Dean & Lodhi, 2018; Dorninger *et al.*, 2020). Finalmente, y aunque hay muchos más ejemplos, es necesario destacar la importancia de los seminolípidos (1-O-alkil-2-acil-3-[β -3'-sulfogalactosil]-glicerol). Presentes casi exclusivamente en los testículos de mamíferos y especialmente abundantes en la membrana plasmática de los espermatozoides, estos lípidos parecen estar implicados en procesos de comunicación intercelular e interacción célula-célula y su ausencia ocasiona defectos en la espermatogénesis e infertilidad en machos (Dorninger *et al.*, 2020; Honke, 2013; Luddi *et al.*, 2017).

Los plasmalógenos son un reservorio de moléculas señalizadoras y segundos mensajeros que pueden ser liberados mediante rotura del fosfolípido original. En mamíferos, la posición *sn*-2 suele estar ocupada por un PUFA, generalmente ácido araquidónico o ácido docosahexaenoico. Como se ha comentado anteriormente, una fosfolipasa A2 puede romper el enlace éster en *sn*-2 dando lugar a un liso-plasmalógeno y el PUFA. Ya libres, los PUFAS pueden actuar como mediadores intracelulares y regular la expresión génica o actuar como sustratos en la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, resolvinas, docosatrienos y neuroprotectinas, todos ellos implicados en procesos inflamatorios (Astudillo *et al.*, 2019; Balboa & Balsinde, 2021; Braverman & Moser, 2012; Magnusson & Haraldsson, 2011; Rangholia *et al.*, 2021). Además, los liso-plasmalógenos también son moléculas biológicamente activas y participan en múltiples procesos como la estimulación y maduración de células iNKT, alteraciones electrofisiológicas en los miocitos, activación de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA) e inhibición de la Na⁺-K⁺-ATPasa en células renales (Braverman & Moser, 2012; Dorninger *et al.*, 2020). Por otro lado, y como se ha

I. Introducción

comentado con anterioridad, el enlace vinil-éter en *sn*-1 es susceptible de rotura oxidativa para dar lugar a aldehídos grasos. Se han descrito, al menos, dos procesos biológicos donde estos aldehídos grasos desempeñan un papel señalizador: en primer lugar, la activación de neutrófilos en presencia de endotoxinas bacterianas estimula la liberación de mieloperoxidasa que, en presencia de iones Cl^- , convierte el H_2O_2 en ácido hipocloroso (HOCl). Por otro lado, la activación de eosinófilos por alérgenos incrementa la liberación de una peroxidasa de eosinófilos que produce ácido hipobromoso (HOBr) a partir de H_2O_2 e iones Br^- . Tanto el HOCl como el HOBr rompen el enlace vinil-éter dando lugar a 2-cloro- y 2-bromo-aldehídos grasos, respectivamente (Albert *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2002, Albert *et al.*, 2003; Ebenezer *et al.*, 2020). Los cloro-aldehídos modulan procesos inflamatorios e inmunológicos aumentando la permeabilidad de las células endoteliales y promoviendo la migración de los neutrófilos (Palladino *et al.*, 2018). Los bromo-aldehídos grasos parecen actuar como quimioatrayentes de fagocitos (Albert *et al.*, 2003).

D) Los lípidos éter y los plasmalógenos en diferenciación celular

Los lípidos éter y plasmalógenos también están implicados en procesos de diferenciación celular. Un ejemplo es el papel que desempeñan los OAGs como factores inductores de la adipogénesis. Estos OAGs, de origen endógeno, regulan los pasos más tempranos en la transformación de pre-adipocitos a adipocitos al inducir la expresión de genes clave en el proceso de diferenciación. Con respecto al mecanismo de acción, parece que los OAGs son capaces de actuar indirectamente sobre el receptor PPAR γ para inducir la adipogénesis, aunque se requieren más estudios para determinar cómo los OAGs producen la activación del receptor (Homan *et al.*, 2011).

Aún más claro es el rol que juegan los plasmalógenos en la diferenciación de las células de Schwann. Estas células se localizan en el sistema nervioso periférico y contribuyen a la mielinización de los axones. Los plasmalógenos son cruciales para la diferenciación de las células de Schwann, al reclutar en la membrana plasmática a la proteína quinasa B (Akt) para su fosforilación y activación. Una vez activada, Akt fosforila a la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), inhibiendo su actividad e induciendo la diferenciación de las células de Schwann. Como la deficiencia en plasmalógenos impide el reclutamiento y activación de la Akt, y la consiguiente inhibición de GSK3 β , se bloquea la diferenciación de las células de Schwann. Fenotípicamente, esto se traduce en defectos en la mielinización de los axones (Figura 12) (Da Silva *et al.*, 2014; Dean & Lodhi, 2018).

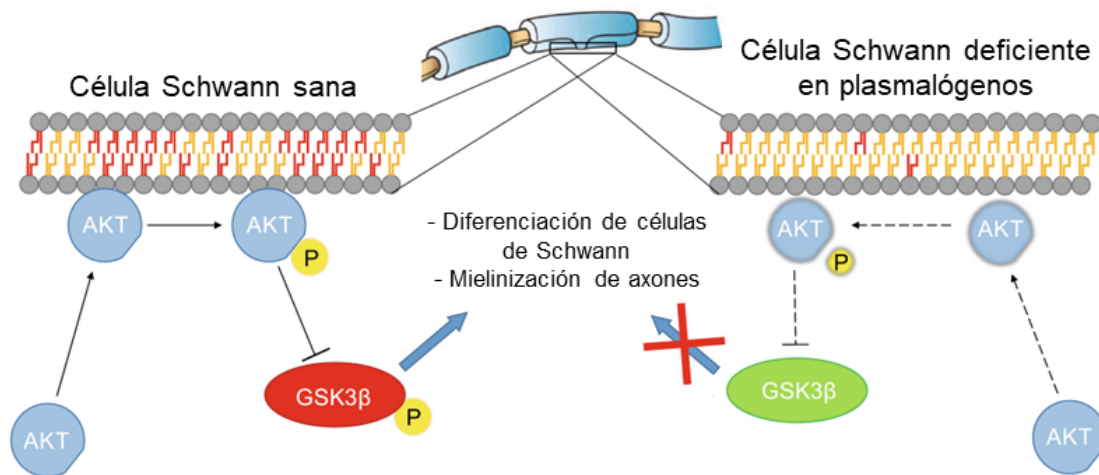


Figura 12. Papel de los plasmalógenos en diferenciación de las células de Schwann y mielinización de axones. Para representar la bicapa lipídica, los fosfolípidos convencionales se marcan en color amarillo y los plasmalógenos en color rojo. Los óvalos representan proteínas implicadas en la ruta de señalización. La forma activa de la GSK3 β se representa en color verde y la inactiva en color rojo. El grupo fosfato se representa con la letra P sobre fondo amarillo. Las flechas negras y finas representan regulación positiva, mientras que las líneas romas representan regulación negativa. Las flechas negras discontinuas representan aquellos procesos que no se producen debido a la deficiencia en plasmalógenos. Modificada de Dean & Lodhi, (2018).

I.3. *Myxococcus xanthus*

I.3.1. Características generales de las mixobacterias

Se conoce como mixobacterias a un grupo de bacterias Gram negativas, no patogénicas, no fotosintéticas, de morfología bacilar y tamaño relativamente grande (0,7-1,2 μm de ancho y 3-12 μm de largo). Todas las mixobacterias descritas hasta la fecha son aerobias estrictas, a excepción de *Anaeromyxobacter dehalogenans*, que es anaerobia facultativa (Mohr, 2018; Sanford *et al.*, 2002). A nivel taxonómico, las mixobacterias se incluyen dentro de las Deltaproteobacteria (Shimkets & Woese, 1992). Atendiendo a criterios morfológicos y fisiológicos, y teniendo en cuenta los análisis de secuenciación de rRNA 16S, el orden Myxococcales se ha subdividido en tres subórdenes: Sorangiineae, Nannocystineae y Cystobacterineae (siendo *M. xanthus* el organismo más estudiado en este suborden) (Reichenbach, 1999; Shimkets & Woese, 1992).

El genoma de las mixobacterias está constituido por un único cromosoma circular, que destaca por su alto contenido en pares G+C (64-72%, siendo en *M. xanthus* del 65,5%) y su elevado tamaño en comparación con los genomas de otras bacterias

I. Introducción

(9-16,04 Mb, siendo de 9,14 Mb el genoma de *M. xanthus*, que triplica en tamaño al de *E. coli*) (Dawid, 2000). La expansión del genoma en las mixobacterias se debe, en parte, a la duplicación masiva de genes y la posterior divergencia de las copias generadas hasta adquirir nuevas funciones. La duplicación y la divergencia génica han permitido la evolución del complejo mecanismo de señalización que precisan las mixobacterias para mantener su ciclo de vida multicelular (Goldman *et al.*, 2006; Kaiser & Dworkin, 2008). Además, muchos genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios parecen haber sido adquiridos mediante transferencia horizontal (Goldman *et al.*, 2006; Yhang & Higgs, 2014).

Las mixobacterias habitan fundamentalmente en el suelo, encontrándose preferentemente en suelos con un pH neutro o ligeramente alcalino (pH 6,0-8,0), e incluso sobre excrementos de herbívoros, sobre materia vegetal en descomposición y en la corteza y hojas de los árboles. Además, algunas especies son capaces de vivir en agua dulce o en ambientes marinos y salinos. *M. xanthus* puede actuar como una bacteria saprófita y alimentarse en el suelo a partir de materia orgánica muerta derivada de plantas y microorganismos, pero también puede actuar como una bacteria depredadora capaz de atacar a una gran variedad de bacterias, hongos y levaduras. Preferentemente, utiliza como fuente de carbono y energía aminoácidos y lípidos, que son catabolizados mediante varias rutas metabólicas. La depredación es un proceso cooperativo en el cual las células de *M. xanthus*, cuando están próximas a una presa, comienzan a moverse de forma coordinada para formar *biofilms* multicelulares conocidos como enjambres. Cuando los enjambres entran en contacto con la presa secretan un conjunto de metabolitos secundarios, antibióticos y enzimas hidrolíticas que matan y lisan a la presa, liberándose los productos hidrolizados al medio extracelular, donde son captados y consumidos por la mixobacteria (Figura 13) (Berleman & Kirby, 2009; Thiery & Kaimer, 2020). Este mecanismo de depredación ha dotado a las mixobacterias de un enorme arsenal de productos naturales con propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antitumorales, que podrían tener un gran potencial en la industria farmacológica y biotecnológica (Gregory *et al.*, 2019; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

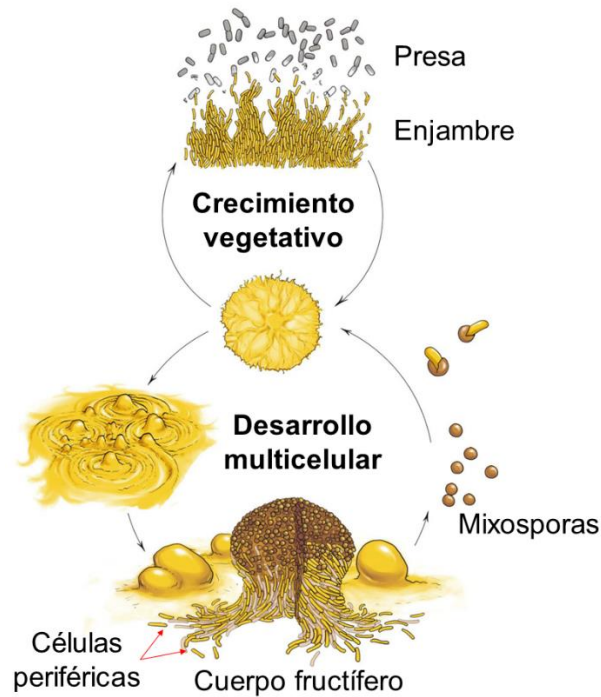


Figura 13. Ciclo de vida de *M. xanthus*. Modificada de Muñoz-Dorado *et al.* (2016).

Uno de los aspectos más interesantes de las mixobacterias es su complejo ciclo de vida, que ha sido estudiado fundamentalmente en *M. xanthus* (Figura 13). Dicho ciclo consta de dos fases: una de crecimiento vegetativo y otra de desarrollo multicelular. En ambas fases se requiere el movimiento coordinado de las bacterias mediante dos sistemas de movilidad complementarios e independientes de flagelos: un movimiento aventurero (A) que hace que las células se puedan mover individualmente, y un movimiento social (S) que permite el movimiento de grandes grupos de células (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016). En la fase de crecimiento vegetativo, que tiene lugar cuando hay nutrientes en el medio, las células se agrupan de manera coordinada para formar enjambres capaces de crecer, dividirse y desplazarse en busca de nuevos nutrientes o presas (Zusman *et al.*, 2007). Cuando escasean los nutrientes, las células comienzan a moverse colectivamente y a intercambiar señales intercelulares que inducen la agregación de las bacterias hasta formar cuerpos fructíferos, unas estructuras macroscópicas compuestas por 10^5 - 10^6 células densamente empaquetadas (Kaiser, 2004; Kroos, 2007; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016). En esta fase de desarrollo multicelular, el 10% de la población inicial experimenta un proceso de diferenciación morfológica y fisiológica para dar lugar a mixosporas esféricas, localizadas en el interior del cuerpo fructífero, que son resistentes al calor, la sequedad y la radiación ultravioleta (Dawid, 2000). El 30% de la población se diferencia en células periféricas, que han perdido su capacidad de división y se mueven alrededor y entre los cuerpos fructíferos buscando

I. Introducción

nuevos nutrientes. Las células restantes sufren un proceso de muerte celular programada y los nutrientes liberados al medio favorecen la diferenciación de las mixosporas (Lee *et al.*, 2012; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; O'Connor & Zusman, 1991). Finalmente, cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles en el entorno, las células periféricas regresan al estado vegetativo y las mixosporas germinan, dando lugar a un enjambre capaz de iniciar una nueva fase de crecimiento vegetativo (Elías-Arnanz & Murillo, 1991a; Elías-Arnanz & Murillo, 1991b; Whitfield *et al.*, 2020).

I.3.2. Lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*

Las mixobacterias son capaces de producir una amplia variedad de especies lipídicas, algunas de las cuales son difíciles de encontrar en otros organismos procarióticos. Muchos de estos lípidos inusuales desempeñan un papel crucial en el complejo ciclo de vida de las mixobacterias. Para tratar de determinar los aspectos clave sobre la biosíntesis, el metabolismo y la función que llevan a cabo dichos lípidos se ha recurrido al organismo modelo *M. xanthus*, el cual presenta una composición lipídica muy compleja que incluye una amplia variedad de lípidos neutros (triacilgliceroles y diacilgliceroles), fosfogliceroles (PEs y PGs), liso-fosfolípidos, cardiolipinas y esfingolípidos (ceramidas y ceramidas con PI) (Ahrendt *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2011; Lorenzen *et al.*, 2014b; Reichenbach & Dworkin, 1992; Sohlenkamp & Geiger, 2015). También se ha descrito el enorme potencial que presenta *M. xanthus* para producir mediadores lipídicos como hepoxilinas, trioxilinas y prostaglandinas, poco comunes en procariotas (An *et al.*, 2018). Sin embargo, uno de los aspectos más llamativos cuando se analiza el perfil lipídico de las mixobacterias es la presencia de plasmalógenos puesto que, como se comentó anteriormente, estos compuestos no se han identificado en otras bacterias aerobias o anaerobias facultativas (Garcia *et al.*, 2011; Goldfine, 2017; Lorenzen *et al.*, 2014b; Reichenbach & Dworkin, 1992; Ring *et al.*, 2006). Ya en el año 1972 se detectaron estos lípidos en la membrana de *Myxococcus fulvus* (Kleinig, 1972) y unos años después, en 1987, se consiguió aislar e identificar en *Myxococcus stipitatus* el primer plasmalógeno procedente de una mixobacteria (Stein & Budzikiewicz, 1987). Análisis lipídicos más exhaustivos realizados posteriormente en *M. xanthus* (Lorenzen *et al.*, 2014b; Ring *et al.*, 2006; Shimkets *et al.*, 2006) y otras mixobacterias (Garcia *et al.*, 2011) han permitido estudiar la distribución de estos lípidos en distintas especies y analizar ciertos aspectos relacionados con su biosíntesis, su metabolismo y las funciones que llevan a cabo.

I.3.2.1. Estructura química de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*

En *M. xanthus* solo se han encontrado plasmalógenos de PE, a diferencia de mamíferos, donde también hay plasmalógenos de PC. El plasmalógeno mayoritario en *M. xanthus* es el 1-iso15:0-alquenil-2-iso15:0-acil-fosfatidiletanolamina (en adelante MxVEPE; Figura 14A), siendo el ácido graso 13-metiltetradecanoico (en adelante iso15:0 o también i15:0) el más abundante en *M. xanthus*. Por otro lado, el 1-iso15:0-alquil-2-iso15:0-acil-fosfatidiletanolamina (en adelante MxAEPE; Figura 14B) se ha identificado como el lípido éter precursor directo del MxVEPE y, en condiciones normales, el MxAEPE se encuentra en cantidades muy pequeñas (Gallego-García *et al.*, 2019; Lorenzen *et al.*, 2014b). Además, se han encontrado en *M. xanthus* lípidos éter neutros, con una estructura parecida a triacilgliceroles y diacilgliceroles, siendo el más abundante y el que presenta una mayor relevancia biológica el 1-iso15:0-alquil-2,3-di-iso15:0-acilglicerol (en adelante TG-1; Figura 14B), un 1-alquil-2,3-diacilglicerol muy poco frecuente en la naturaleza (Gallego-García *et al.*, 2019; Hoiczky *et al.*, 2009; Lorenzen *et al.*, 2014b; Ring *et al.*, 2006).

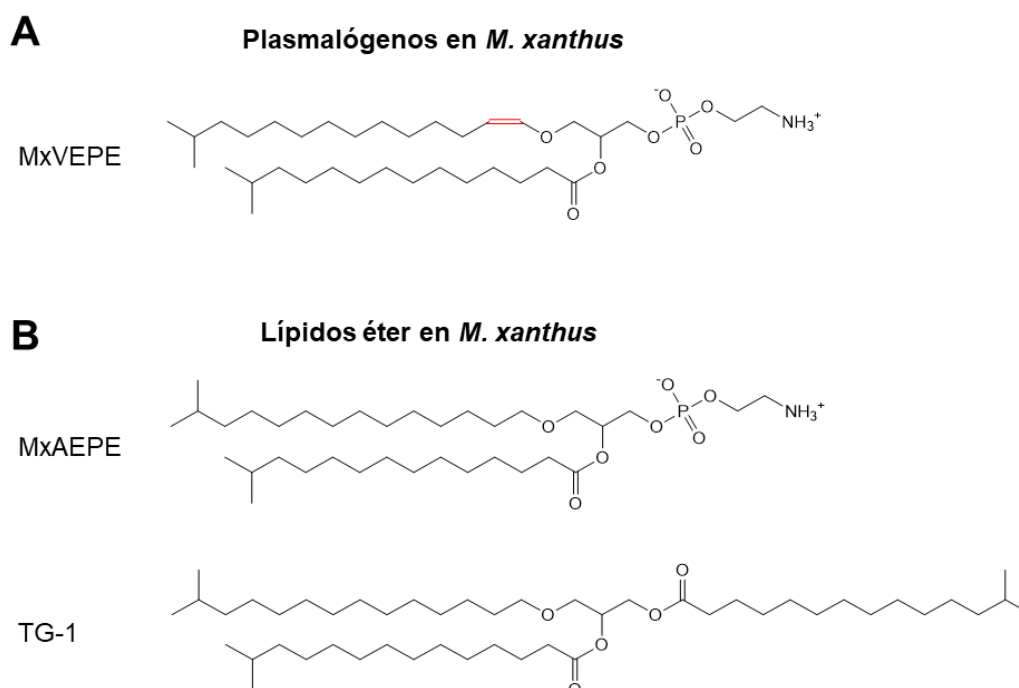


Figura 14. Lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*. **A)** MxVEPE, el plasmalógeno mayoritario en *M. xanthus*. En rojo se ha marcado el enlace vinil-éter característico de los plasmalógenos. **B)** Lípidos éter más relevantes en *M. xanthus*: MxAEPE (precursor directo del MxVEPE) y TG-1 (lípido éter neutro muy inusual).

I. Introducción

I.3.2.2. Funciones de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*

Los lípidos éter parecen ser importantes en procesos clave del desarrollo multicelular de *M. xanthus*, ya que estirpes mutantes incapaces de sintetizar estos lípidos son defectuosas en la formación de cuerpos fructíferos y la esporulación. Así, durante las primeras 48 horas del desarrollo se produce una gran acumulación de TG-1, que pasa de estar totalmente ausente en células vegetativas a convertirse en el lípido éter más abundante en esta bacteria. Los niveles de MxVEPE, aunque aumentan ligeramente durante las primeras 24-48 horas del desarrollo, acaban bajando del ~10% en células vegetativas a ~4% en los cuerpos fructíferos maduros (Ahrendt *et al.*, 2015; Lorenzen *et al.*, 2014a; Lorenzen *et al.*, 2014b; Ring *et al.*, 2006). Se ha observado que, ante la falta de nutrientes, *M. xanthus* convierte el exceso de biomasa en lípidos, que posteriormente son acumulados en cuerpos lipídicos localizados en el interior de la célula. Estos cuerpos lipídicos están constituidos por una gran cantidad de lípidos neutros (fundamentalmente TG-1, y en menor medida otros diacilgliceroles, triacilgliceroles y sus derivados éter) envueltos en una capa de membrana externa compuesta por fosfolípidos (fundamentalmente MxAEPE y MxVEPE). Se ha especulado que los lípidos éter, acumulados en los cuerpos lipídicos y liberados al medio extracelular durante el desarrollo, podrían cumplir una doble función: la parte acilo podría emplearse como fuente de carbono y aportar la energía necesaria para que se complete la formación de los cuerpos fructíferos y la conversión de células vegetativas en mixosporas, mientras que la parte alquilo podría tener una función señalizadora e inducir la expresión de genes implicados en el desarrollo. Esta hipótesis cobra fuerza tras la identificación del iso15:0-*O*-alquil-glicerol, un compuesto derivado del TG-1, como la molécula responsable de transmitir la señal E, una de las 5 señales implicadas en el desarrollo multicelular en *M. xanthus* (Ahrendt *et al.*, 2016; Ahrendt *et al.*, 2015; Bhat *et al.*, 2014a; Bhat *et al.*, 2014b; Hoiczky *et al.*, 2009).

Por otro lado, descubrimientos recientes llevados a cabo por el grupo de investigación en el cual se ha realizado este trabajo han permitido atribuir una nueva función a los plasmalógenos en *M. xanthus*. El descubrimiento de que CarF, una proteína esencial para que la bacteria induzca la síntesis de carotenos en respuesta a la luz, es realmente una enzima que cataliza el paso clave en la biosíntesis de plasmalógenos ha permitido establecer una relación directa entre la presencia de plasmalógenos en *M. xanthus* y su capacidad para percibir la luz y activar la carotenogénesis. Es importante destacar que los lípidos éter no parecen desempeñar ningún papel en la activación de la carotenogénesis por la luz, más allá de ser los

precursores directos de los plasmalógenos. Aunque todavía se desconocen los detalles moleculares, el papel que podrían desempeñar los plasmalógenos en la ruta de respuesta a la luz se analizará con mayor profundidad en el Apartado I.3.3 (Gallego-García *et al.*, 2019).

I.3.2.3. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*

El ácido graso predominante en *M. xanthus*, el iso15:0, es un componente importante de los lípidos éter y plasmalógenos que se han identificado en esta bacteria. El isovaleril-CoA es el precursor en la síntesis del iso15:0 y otros ácidos grasos ramificados “iso” (iso-FAs), además de otros metabolitos secundarios, y se genera mediante dos rutas independientes en *M. xanthus* (Figura 15). Esto es relativamente común en las mixobacterias, donde muchas de las rutas metabólicas más importantes cuentan con rutas de apoyo auxiliares que garantizan la producción del metabolito de interés si la ruta principal falla (Ahrendt *et al.*, 2015; Bode *et al.*, 2009; Ring *et al.*, 2006). En la primera de estas rutas participa el complejo multienzimático Bkd (*Branched-chain Keto acid Dehydrogenase*, también conocido como Esg por su importancia en la transmisión de la señal E), que cataliza la degradación de leucina en isovaleril-CoA. Paralelamente, se ha identificado una ruta alternativa, exclusiva de mixobacterias, que conduce a la formación de isovaleril-CoA a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El HMG-CoA, por otro lado, sirve como precursor en la síntesis de isoprenoides, como los carotenoides, mediante una ruta típicamente eucariótica (véase Pérez-Castaño *et al.*, 2022). Mutaciones en cualquier gen del operón *bkd* altera gravemente el metabolismo lipídico al producir una reducción drástica de los niveles de isovaleril-CoA y, por tanto, de los iso-FAs. En estas condiciones, o ante la falta de leucina en el medio durante una situación de ayuno, se activa la ruta alternativa de síntesis a partir de HMG-CoA. La presencia de mutaciones en ambas rutas supone la pérdida casi total de isovaleril-CoA, siendo la estirpe que presenta estas mutaciones incapaz de formar cuerpos fructíferos o mixosporas en condiciones de ayuno (Bode *et al.*, 2009; Dickschat *et al.*, 2005; Mahmud *et al.*, 2005; Ring *et al.*, 2006). A partir del isovaleril-CoA, la sintasa de ácido grasos sintetiza iso15:0 y, en menor medida, iso17:0 y otros iso-FAs (Bhat *et al.*, 2014b; Lorenzen *et al.*, 2014b).

I. Introducción

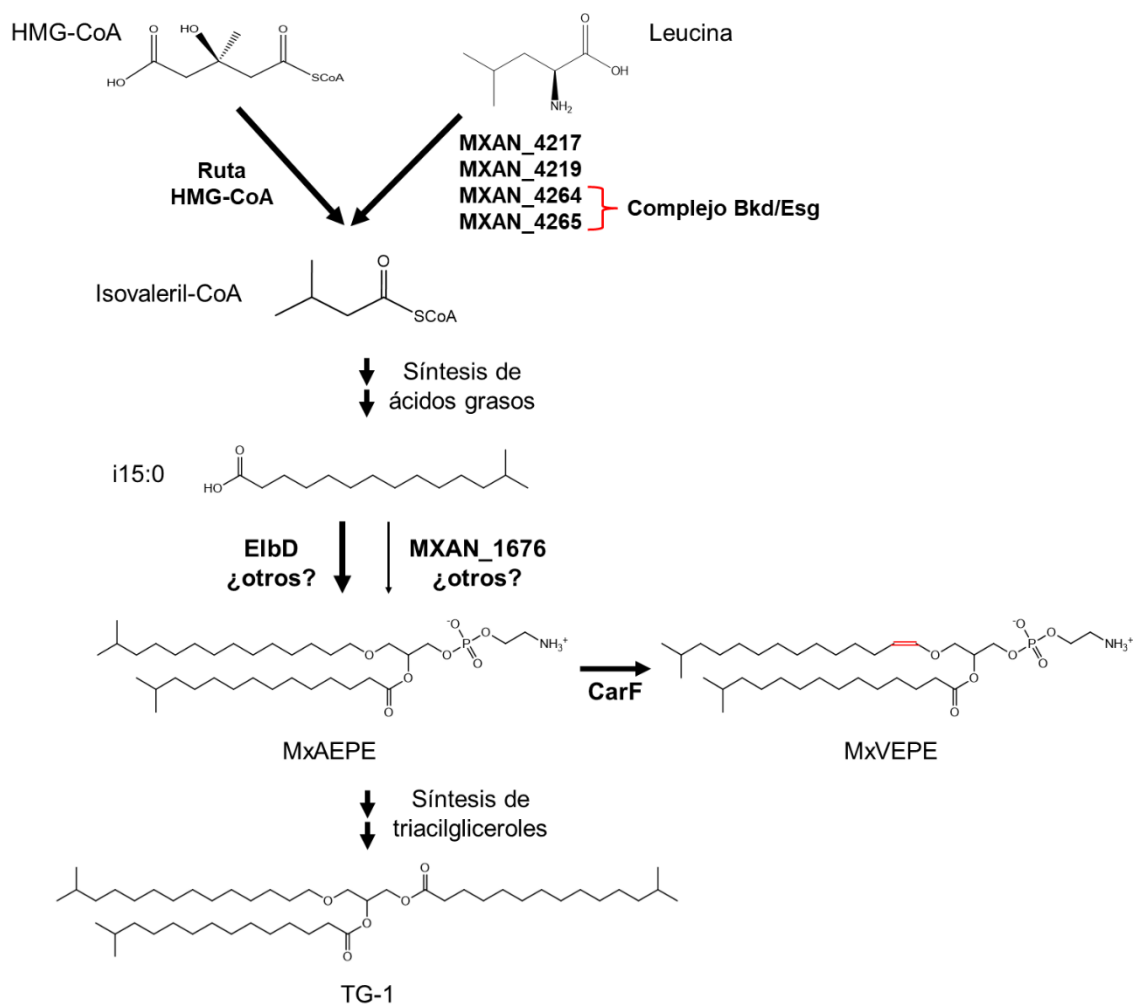


Figura 15. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*. En el esquema se representa la síntesis de isovaleril-CoA a partir de leucina o HMG-CoA. El isovaleril-CoA actúa como precursor en la síntesis de iso15:0 (i15:0), que acabará formando parte del MxAEPE mediante dos rutas independientes en las que participan las proteínas ElbD, por un lado, y MXAN_1676, por otro. CarF es la enzima que genera el enlace vinil-éter (marcado en color rojo) característico del plasmalógeno MxVEPE. Finalmente, el lípido éter neutro TG-1 se sintetiza a partir del MxAEPE. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019) y Ring *et al.* (2006).

Todavía se desconoce cómo se genera el enlace éter en los precursores de los plasmalógenos en *M. xanthus* y hasta qué punto se asemeja a lo que ocurre en animales. Lo más sorprendente es que *M. xanthus* dispone de dos vías paralelas para la formación de lípidos éter a partir de iso15:0, una mayoritaria en la que participa la enzima multifuncional ElbD, y una minoritaria en la que actúa la enzima MXAN_1676. Aunque no se sabe con exactitud qué reacciones llevan a cabo ambas enzimas, es probable que requieran la cooperación con otras proteínas cifradas por los genes agrupados en los posibles operones *elbA-E* y *MXAN_1676-1674* (Ahrendt *et al.*, 2015; Lorenzen *et al.*, 2014a). Del mismo modo que ocurre en animales, una vez sintetizado el AEPE, es la proteína CarF la que genera el enlace vinil-éter característico del

plasmalógeno (Figura 15) (Gallego-García *et al.*, 2019). Finalmente, a partir del MxAEPE también se sintetiza, únicamente durante la fase de desarrollo multicelular, el lípido éter TG-1 (Ring *et al.*, 2006). Aunque el descubrimiento del papel que desempeñan las proteínas ElbD y MXAN_1676 supone un importante punto de partida, son necesarios más estudios para comprender cómo funciona esta doble ruta de síntesis de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido profundizar en la biosíntesis del precursor AEPE en *M. xanthus*. Por otro lado, también es necesario identificar los mecanismos de degradación de estos compuestos en mixobacterias (Ahrendt *et al.*, 2016).

I.3.2.3.1. Operón *elbA-E*

La ruta principal de síntesis de lípidos éter en *M. xanthus* tiene como proteína central la enzima multifuncional ElbD, codificada por el gen *elbD* (MXAN_1528), que forma parte de un posible operón de cinco genes (*elbA-E*) (*elb* hace referencia a *ether lipid biosynthesis*) (Figura 16) (Lorenzen *et al.*, 2014a; Sinninghe Damsté *et al.*, 2018). La interrupción génica (Lorenzen *et al.*, 2014a) o delección en fase (Gallego-García *et al.*, 2019) del gen *elbD* produce una disminución muy pronunciada de los niveles de lípidos éter y, por tanto, de plasmalógenos en *M. xanthus*. Fenotípicamente, esto se traduce en un retraso en la formación de cuerpos fructíferos, defectos en la esporulación y una menor capacidad de sintetizar carotenos en respuesta a la luz (Ahrendt *et al.*, 2016; Gallego-García *et al.*, 2019; Lorenzen *et al.*, 2014a). La proteína ElbD consta de 4 dominios: un dominio *fatty acyl CoA-like reductase* (Re), un dominio *long-chain fatty acid CoA synthase* (A), un dominio *acyl carrier protein/thiolation* (ACP/T) y un dominio *dihydroxyacetone phosphate acyltransferase-like* (AT). Sin embargo, se desconoce con exactitud qué función llevaría a cabo cada uno de estos dominios en la síntesis de lípidos éter. Por otro lado, se ha analizado el efecto ocasionado por la interrupción de los genes *elbA*, *elbB* y *elbE* en el desarrollo multicelular, para así determinar si también están implicados en la formación de lípidos éter (Lorenzen *et al.*, 2014a). Estos experimentos sugieren que *elbA* no participa en la síntesis de lípidos éter. Por el contrario, la interrupción de *elbB* sí genera un ligero retraso en la agregación. Sin embargo, dicho fenotipo puede ser parcialmente compensado expresando *elbD*, por lo que se ha atribuido a un efecto polar ocasionado por la interrupción de *elbB*. Finalmente, *elbE* sí parece desempeñar un papel en la formación de lípidos éter en *M. xanthus* (Lorenzen *et al.*, 2014a).

I. Introducción

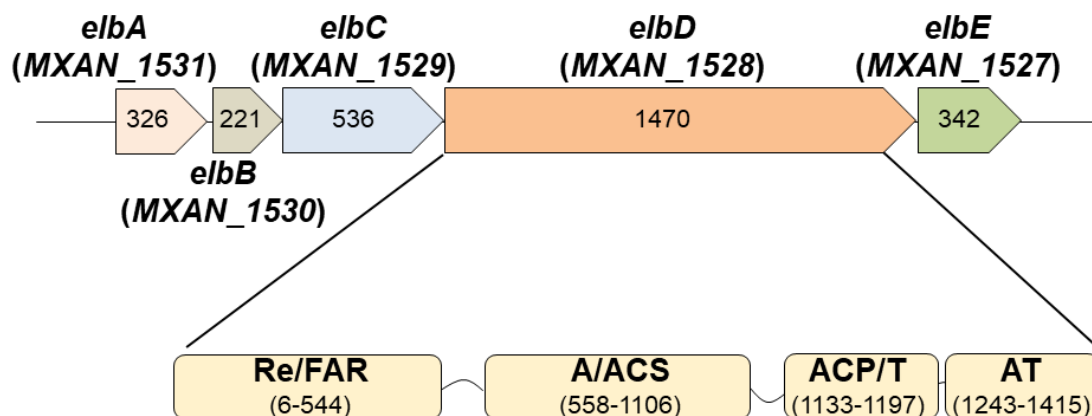


Figura 16. Organización del operón *elbA-E* en *M. xanthus*, mostrando los dominios predichos para la proteína multifuncional *ElbD*. Se indica el tamaño (en aminoácidos) de los productos de cada gen. Para *ElbD*, se indica también la extensión de cada dominio (en aminoácidos). Modificada de Lorenzen *et al.* (2014a).

I.3.2.3.2. Operón *MXAN_1676-1674*

M. xanthus presenta una segunda ruta de síntesis de lípidos éter que, al menos en condiciones normales de crecimiento, supone una contribución menor que la ruta mediada por *ElbD*. En esta ruta auxiliar participa la proteína *MXAN_1676*, determinada por el primer gen del posible operón *MXAN_1676-1674* (Figura 17). La proteína *MXAN_1676* muestra un 46% de identidad con la ADHAPS/AGPS humana, que cataliza uno de los pasos clave en la formación de lípidos éter en mamíferos (Ahrendt *et al.*, 2015; Lorenzen *et al.*, 2014a), por lo que cabe esperar que cumpla una función similar. La interrupción (Lorenzen *et al.*, 2014a) o delección en fase de *MXAN_1676* (Gallego-García *et al.*, 2019) produce una pequeña bajada en los niveles de lípidos éter y plasmalógenos en la bacteria, dando lugar a un fenotipo muy sutil tanto en el desarrollo (Lorenzen *et al.*, 2014a) como en la carotenogénesis (Gallego-García *et al.*, 2019). El papel desempeñado por *MXAN_1676* queda más claro al combinar su mutación con la de *elbD*. Así, la estirpe doble mutante $\Delta elbD \Delta MXAN_1676$ carece por completo de lípidos éter y plasmalógenos, y es incapaz de fotoinducir la síntesis de carotenos (fenotipo Car⁻) (Gallego-García *et al.*, 2019). El gen *MXAN_1675* cifra una proteína con un dominio N-terminal que muestra homología con FAR eucarióticas, capaces de convertir ácidos grasos en alcoholes grasos que pueden unirse posteriormente a fosfolípidos mediante enlaces éter. Este dominio reductasa está acoplado a un dominio AT localizado en el extremo C-terminal de la proteína. En base a sus dominios, se ha postulado que *MXAN_1675* podría estar implicada en la formación de lípidos éter (debido a la presencia del dominio FAR y a la proximidad del gen que lo cifra a

MXAN_1676) y en la síntesis de fosfolípidos de PE (debido a la presencia del dominio AT) (Curtis *et al.*, 2006).

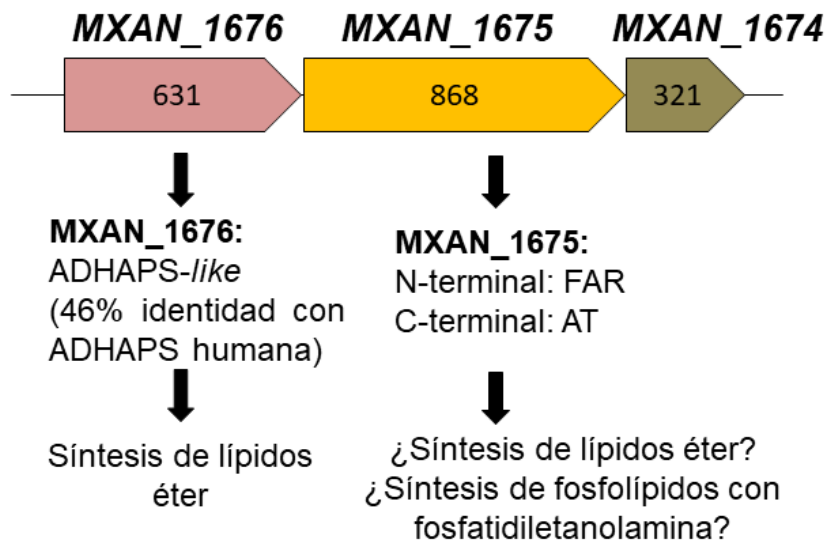


Figura 17. Organización del operón *MXAN_1676-1674* en *M. xanthus* y posibles dominios y funciones. Se indica el tamaño (en aminoácidos) de los productos de cada gen.

I.3.3. Respuesta a la luz en *M. xanthus*

En oscuridad, las colonias de *M. xanthus* muestran un color amarillo debido a la acumulación de DKxanteno, un pigmento hidrosoluble no carotenoide (Meiser *et al.*, 2006). Sin embargo, la irradiación con luz azul induce la síntesis y acumulación de compuestos carotenoides, responsables del cambio de color, del amarillo al rojo anaranjado, que experimentan las colonias (fenotipo Car⁺) (Figura 18) (Martínez-Laborda *et al.*, 1990). Los carotenos desempeñan un papel fotoprotector, ya que son capaces de neutralizar el ¹O₂ y otras ROS que se producen ante un exceso de luz y que ocasionan diversos daños foto-oxidativos y lisis celular (Elías-Arnanz *et al.*, 2008).

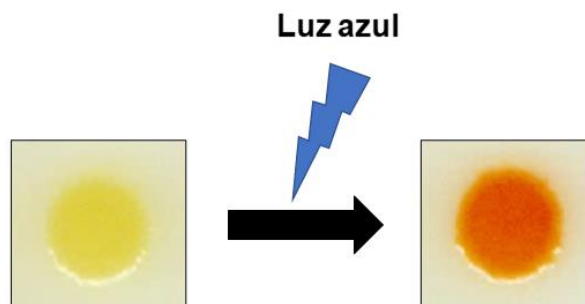


Figura 18. Carotenogénesis inducida por la luz azul en *M. xanthus*. A la izquierda, células de *M. xanthus* crecidas en oscuridad. A la derecha, células expuestas a luz azul, que han adquirido una tonalidad rojiza debido a la acumulación de carotenos.

I. Introducción

La exposición de *M. xanthus* a la luz activa una compleja respuesta transcripcional, mediada por distintas proteínas reguladoras y estructurales, que desencadena la síntesis de carotenos. El grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo se ha centrado en la identificación y caracterización de genes y proteínas implicadas en dicha respuesta a la luz. De dicho trabajo deriva que los genes estructurales implicados en la biosíntesis de carotenos se distribuyen en dos loci independientes: el gen individual *crtIb* y los genes agrupados en el operón *carB* (Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Elías-Arnanz *et al.*, 2011; Padmanabhan *et al.*, 2021). El gen *crtIb* cifra una de las dos deshidrogenasas implicadas en la conversión del fitoeno en licopeno y su expresión es activada por la luz a partir del promotor P_I cuando las células están en fase estacionaria o han consumido la fuente carbonada (Fontes *et al.*, 1993). Por otro lado, el operón *carB*, que se expresa a partir del promotor fotoinducible P_B, está constituido por 9 genes estructurales (*crtE*, *crtIa*, *crtB*, *crtD*, *crtC*, *orf6*, *crtYc*, *crtYd* y *orf9*) y dos genes que cifran proteínas reguladoras (*carA* y *carH*) (Padmanabhan *et al.*, 2021). CarA y CarH son dos proteínas parálogas que, en la oscuridad, reprimen el promotor P_B y, con ello, la carotenogénesis. Ambas están constituidas por un dominio N-terminal de unión al DNA y un dominio C-terminal con un motivo de unión a la vitamina B₁₂. Sin embargo, CarA no requiere la presencia de B₁₂ para ejercer su actividad represora, al contrario que CarH (Elías-Arnanz *et al.*, 2011).

I.3.3.1. Ruta de respuesta a la luz dependiente de B₁₂

La vitamina B₁₂, sintetizada exclusivamente por microorganismos, ha sido estudiada durante años por su compleja estructura química, reactividad y propiedades espectroscópicas. Se han identificado dos formas principales de vitamina B₁₂ que son biológicamente activas: la metilcobalamina (MeCbl) y la adenosilcobalamina (AdoCbl). La sensibilidad a la luz que presentan ambas formas de B₁₂ es una propiedad conocida desde hace años, aunque nunca se le había atribuido ninguna función biológica. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por el grupo de investigación donde se ha desarrollado este trabajo han descubierto que CarH define una nueva familia de fotorreceptores capaces de utilizar como molécula sensora de la luz (cromóforo) la forma AdoCbl de la vitamina B₁₂.

En oscuridad, la apoproteína CarH es un monómero inactivo, que requiere la unión de AdoCbl para formar un tetrámero estable y activo, capaz de unirse al DNA. Como el operador de CarH y el promotor de los genes carotenogénicos agrupados en el operón *carB* solapan, la unión de CarH al DNA impide el acceso de la polimerasa de RNA al promotor P_B y reprime la expresión génica (Figura 19). La exposición a la luz

ultravioleta, azul o verde provoca la fotólisis de la AdoCbl, lo que conduce a la disociación del tetrámero de CarH en monómeros inactivos. Así, el operador queda libre y la polimerasa de RNA puede acceder al promotor y transcribir los genes carotenogénicos, *carA* y el propio *carH* (Figura 19). Curiosamente, *M. xanthus* es incapaz de sintetizar vitamina B₁₂ y solamente puede obtener este cofactor del medio. Ello podría estar relacionado con la existencia en *M. xanthus* de la segunda ruta, independiente de B₁₂, que asegura la regulación de la síntesis de carotenos cuando la disponibilidad de B₁₂ en el medio es reducida (Fernández-Zapata *et al.*, 2018; Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011; Padmanabhan *et al.*, 2017; Padmanabhan *et al.*, 2019; Padmanabhan *et al.*, 2021; Pérez-Castaño *et al.*, 2022).

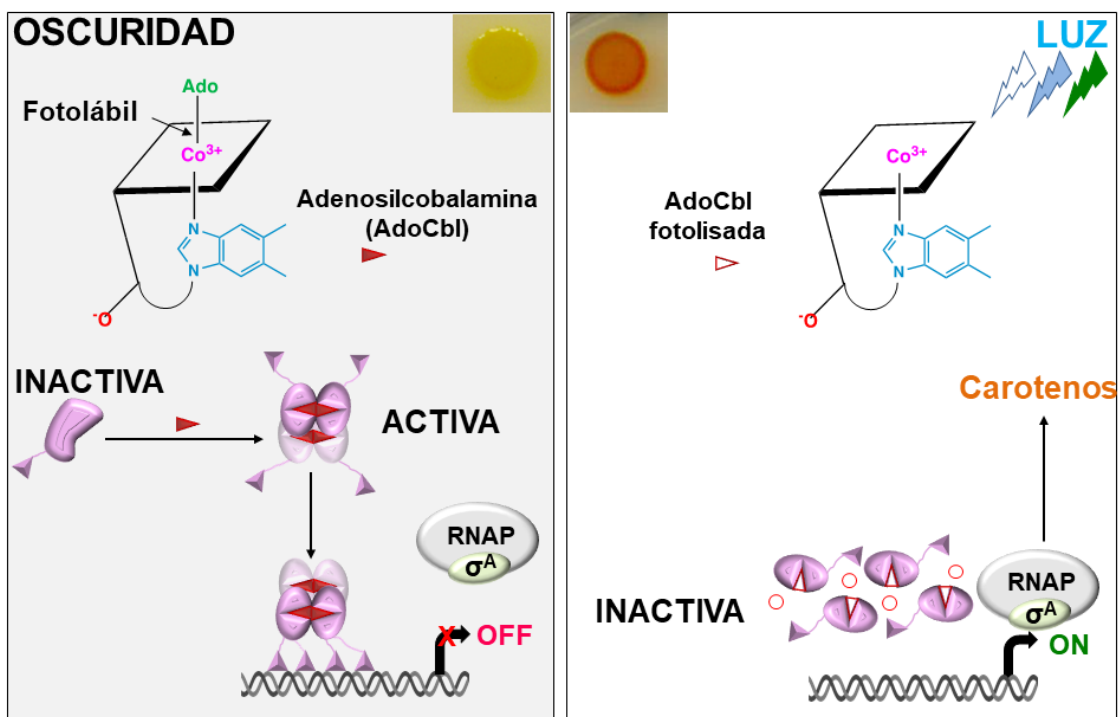


Figura 19. Modelo de acción del represor CarH, implicado en la ruta de respuesta a la luz dependiente de vitamina B₁₂ en *M. xanthus*. En oscuridad, la proteína CarH une AdoCbl (triángulo rojo), tetrameriza y reprime la expresión de los genes carotenogénicos. En la luz, la fotólisis de la AdoCbl (la forma fotolisada se representa como un triángulo rojo con relleno blanco y el producto que se libera como un círculo rojo) produce el desensamblaje del tetrámero de CarH en monómeros inactivos, lo que permite la unión de la RNAP al promotor y la expresión de los genes carotenogénicos. Modificada de Pérez-Castaño *et al.* (2022). RNAP: polimerasa de RNA; σ^A : factor σ mayoritario.

I.3.3.2. Ruta de respuesta a la luz independiente de B₁₂

A diferencia de la ruta dependiente de B₁₂, en la que solo participa CarH, la ruta independiente de B₁₂ es mucho más compleja. Así, en ella participan varios genes, además de *carA*: los genes agrupados en los operones *carQRS* y *carDG*, el gen *ihfA* y

I. Introducción

el gen *carF* (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Ni CarF, que es una proteína de membrana a la que los análisis genéticos sitúan aguas arriba en la cascada de regulación, ni las otras proteínas identificadas muestran homología con fotorreceptores conocidos en otros organismos. En esta ruta, la molécula fotosensible capaz de detectar la luz y activar la síntesis de carotenos es la protoporfirina IX (PPIX), un compuesto tetrapirrólico cíclico precursor en la biosíntesis del grupo hemo (Galbis-Martínez *et al.*, 2012). Esta molécula es altamente hidrofóbica y se acumula en la membrana de *M. xanthus*, sobre todo en fase estacionaria (Burchard & Dworkin, 1966). La PPIX es capaz de absorber luz azul (máximo de absorción: 410 nm) y excitarse, alcanzando un estado triplete de alta energía ($^3\text{PPIX}$). Para regresar a su estado fundamental, la $^3\text{PPIX}$ puede transferir su energía al oxígeno y generar $^1\text{O}_2$, una especie muy reactiva y con una vida media relativamente larga en un ambiente hidrofóbico como es la membrana celular. El $^1\text{O}_2$ es la auténtica señal que se requiere para desencadenar la respuesta carotenogénica (Figura 20), ya que ni la PPIX ni la luz azul son esenciales si el $^1\text{O}_2$ es generado por otro mecanismo independiente (Galbis-Martínez *et al.*, 2012).

El operón *carQRS* desempeña un importante papel en esta ruta y está constituido por tres genes (*carQ*, *carR* y *carS*) traduccionalmente acoplados cuya expresión es inducida por la luz. CarQ y CarR son una pareja de factores σ -anti σ y CarS es un antirrepresor. En oscuridad y, por tanto, en ausencia de $^1\text{O}_2$, CarR mantiene secuestrado en la membrana al factor σ^{ECF} (*extracytoplasmic function*) CarQ (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). La generación de $^1\text{O}_2$ en la luz provoca la inactivación de CarR y la liberación de CarQ, que al unirse al núcleo de la polimerasa de RNA activa directamente su propia expresión (actuando sobre P_{QRS}) y la de *crtIb* (actuando sobre P_I) (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Al inducir la expresión de CarS, CarQ activa indirectamente al promotor P_B , pues CarS imita la estructura del operador de CarA (que se une al DNA en forma de dímeros) y así contrarresta la acción del represor (Figura 20) (León *et al.*, 2010; Navarro-Avilés *et al.*, 2007; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011; Pérez-Marín *et al.*, 2004; Pérez-Marín *et al.*, 2008).

La activación por CarQ de P_{QRS} y P_I requiere la acción de un complejo de regulación global formado por dos factores transcripcionales inusuales, CarD y CarG, que se producen de forma constitutiva (Figura 20) (Elías-Arnanz *et al.*, 2010). CarD está constituida por un dominio C-terminal de unión al DNA que muestra similitud con proteínas eucarióticas de alta movilidad del grupo A (HMGA), y un dominio N-terminal implicado en la interacción consigo misma, con CarG y con la subunidad β de la polimerasa de RNA. CarG es necesaria en todos los procesos en los que interviene

CarD, y aunque es incapaz de unirse directamente al DNA, sí forma un complejo con CarD (Bernal-Bernal *et al.*, 2015; Elías-Arnanz *et al.*, 2010; García-Heras *et al.*, 2009; García-Heras *et al.*, 2013; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). El complejo CarD-CarG también se requiere para la acción de otros factores σ^{ECF} , como DdvS, que controla la expresión de un sistema CRISPR-cas en *M. xanthus* (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014; Bernal-Bernal *et al.*, 2018). En la activación del promotor P_{QRS} también interviene la proteína IhfA, que está implicada en procesos de remodelación cromosómica, recombinación y regulación de la transcripción (Browning *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2001).

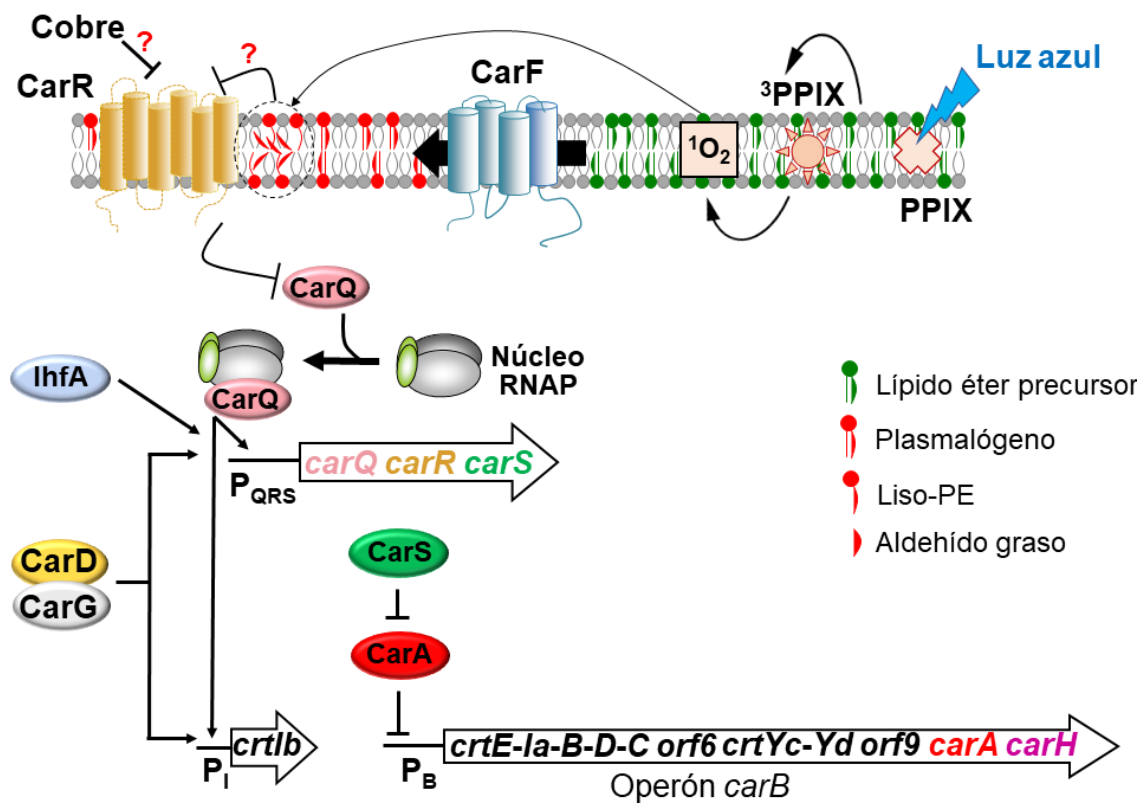


Figura 20. Ruta de respuesta a la luz independiente de B₁₂ en *M. xanthus*. La función y las interacciones que se establecen entre los distintos elementos implicados en esta ruta son explicados con detalle en el texto. Los óvalos representan proteínas. En negro se representan los genes estructurales, que cifran enzimas que participan en la biosíntesis de carotenos. En color se representan los genes que cifran proteínas reguladoras. Las flechas negras y finas representan regulación positiva, mientras que las líneas romas representan regulación negativa. Modificada de Elías-Arnanz *et al.* (2011) y Padmanabhan *et al.* (2022).

El gen *carF*, cuya expresión es constitutiva e independiente de la luz, fue identificado como un gen regulador necesario para la activación de los promotores P_{QRS}, P_B y P_I y, por tanto, para la expresión de los genes carotenogénicos en condiciones de iluminación (Fontes *et al.*, 2003). Que CarF sea la proteína de acción más temprana conocida en esta ruta y que interaccione físicamente con el factor anti- σ CarR (en

I. Introducción

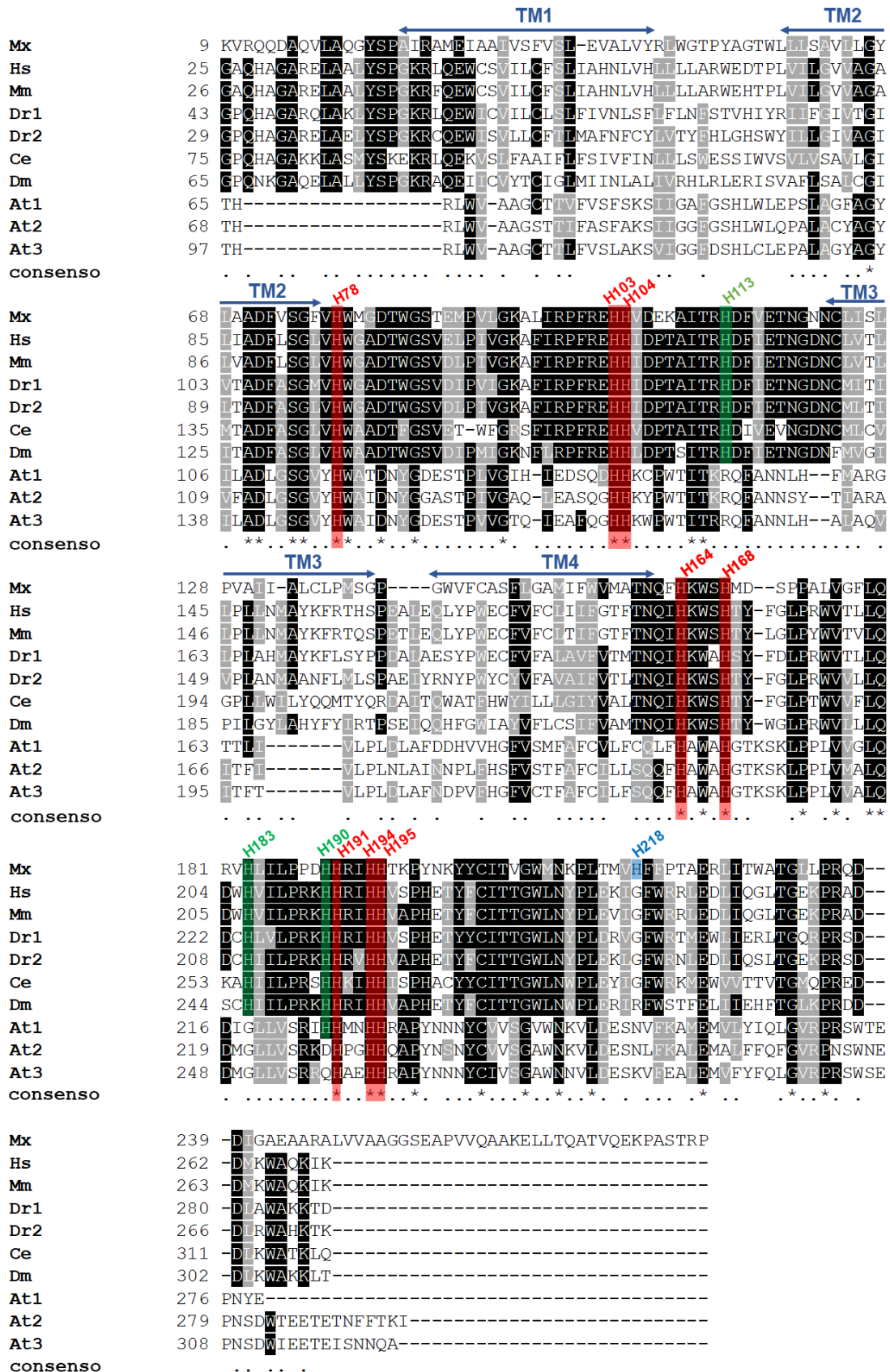
experimentos de doble híbrido bacteriano) llevó a postular su acción como posible factor anti σ , quizás percibiendo directamente la presencia de $^1\text{O}_2$ y provocando la inactivación de CarR (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, el descubrimiento reciente de que CarF es la desaturasa responsable del último paso en la biosíntesis de plasmalógenos ha supuesto un giro inesperado en nuestro modelo sobre la percepción de la luz en la ruta independiente de B_{12} (Figura 20) (Gallego-García *et al.*, 2019). Así pues, CarF se requiere para detectar la luz no porque perciba directamente la señal del $^1\text{O}_2$ sino porque es necesaria para la síntesis de los plasmalógenos que, de alguna manera, son los que transducen la señal. Es sabido que el $^1\text{O}_2$ es capaz de romper el enlace vinil-éter de los plasmalógenos, produciéndose un aldehído graso y 2-liso-fosfatidiletanolamina (liso-PE) (Dean & Lodhi, 2018; Morand *et al.*, 1988; Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001). La rotura del MxVEPE por el $^1\text{O}_2$ podría suponer una perturbación a nivel local en las propiedades estructurales y fisicoquímicas de la membrana. Además, el aldehído graso generado, que es altamente reactivo, podría reaccionar covalentemente con otras proteínas de la ruta y alterar su función (Domingues *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2018). Cualquiera de los dos mecanismos propuestos, o los dos simultáneamente, podrían producir la inactivación de CarR y la liberación de CarQ, aunque no se puede descartar que la inactivación de CarR se produzca mediante un mecanismo alternativo que no implique la rotura del plasmalógeno (Gallego-García *et al.*, 2019).

Curiosamente, la síntesis de carotenos en *M. xanthus* también puede ser inducida por cobre incluso en oscuridad, aunque solamente en condiciones subóptimas de crecimiento. La carotenogénesis inducida por el cobre requiere la activación transcripcional de los mismos genes estructurales que son activados en la luz, e implica a las mismas proteínas reguladoras, a excepción de CarF (Gómez-Santos *et al.*, 2011; Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2018). Por tanto, el cobre parece inactivar directamente a CarR, a través de un mecanismo independiente de CarF y, por tanto, también de los plasmalógenos.

I.3.3.2.1. La proteína CarF

La proteína CarF, compuesta por 281 aminoácidos, se integra en la membrana de *M. xanthus* mediante cuatro dominios transmembranales (TM1, TM2, TM3 y TM4) y parece ser capaz de interactuar consigo misma para formar homomultímeros (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Gallego-García *et al.*, 2019). CarF presenta una distribución muy atípica de proteínas homólogas (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2012; Gallego-García *et al.*, 2019; Thomson *et al.*, 2000). Entre las

bacterias apenas se encuentran homólogos más allá de las mixobacterias y algunas especies del patógeno animal *Leptospira* (60% similitud) y algunas Alphaproteobacteria como el simbionte vegetal *Bradyrhizobium diazoefficiens* (48% similitud). Tampoco



I. Introducción

Figura 21. Alineamiento múltiple entre CarF de *M. xanthus* y varias proteínas homólogas de animales y plantas. Los organismos a los que pertenecen las proteínas alineadas se representan por iniciales: Hs (*Homo sapiens*), Mm (*Mus musculus*), Dr (*Danio rerio*), Ce (*Caenorhabditis elegans*), Dm (*Drosophila melanogaster*), At (*Arabidopsis thaliana*). Tanto *D. rerio* como *A. thaliana* tienen más de un homólogo, nombrados por nosotros como Dr1 y Dr2, y At1, At2 y At3, respectivamente. Los residuos sombreados en negro son idénticos, mientras que los sombreados en gris son similares. Los dominios transmembranales determinados experimentalmente para CarF se marcan con flechas sobre la secuencia y se nombran como TM1, TM2, TM3 y TM4. Sobre la secuencia se indican también los 12 residuos de histidina que tiene CarF. Los residuos de histidina conservados en todas las proteínas se marcan en rojo. Los residuos de histidina conservados en los homólogos de animales y algunas bacterias se marcan en verde. Finalmente, la histidina exclusiva de CarF se marca en azul.

están presentes en arqueas, hongos y organismos eucarióticos unicelulares, en general. Y, sin embargo, se encuentran ampliamente distribuidos en animales (41-46% identidad, 56-59% similitud) (Figura 21), donde reciben el nombre de TMEM189 (o Kua). Resulta especialmente llamativo que CarF y la proteína homóloga de humanos compartan un 46% de identidad y un 57% de similitud. También se encuentran homólogos en plantas, como en *Arabidopsis thaliana* (que presenta tres homólogos) aunque el parecido con CarF es menor (en torno a un 30% de identidad, 45% de similitud) (Figura 21).

En el alineamiento múltiple entre CarF y sus proteínas homólogas en animales y plantas (Figura 21) destacan dos grandes regiones citosólicas donde se agrupan la mayoría de los residuos conservados: la primera está situada entre TM2 y TM3, y la segunda tras TM4 (Figuras 21 y 22). En relación con sus homólogos eucarióticos, CarF presenta un segmento extra, de unos 40 aminoácidos, en su extremo C-terminal (G241-P281), cuya eliminación no afecta al correcto funcionamiento de CarF; por otro lado, la eliminación del segmento N-terminal (M1-A25) sí provoca una pérdida de función (Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Otro de los aspectos que más destaca en el alineamiento es la conservación de varios residuos de histidina, algunos de los cuales están dispuestos como los motivos implicados en la formación de un complejo di-hierro que resulta esencial para la actividad enzimática de ciertas desaturasas e hidroxilasas de ácidos grasos, con las que CarF no comparte una homología significativa (Figuras 21 y 22) (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Los & Murata, 1998; Shanklin *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2015). De las doce histidinas que contiene CarF, ocho de ellas están presentes en la misma posición relativa en todos los homólogos. Otras tres histidinas están conservadas únicamente en los homólogos de animales y algunas bacterias, pero no en los de plantas (y, generalmente, tampoco en los homólogos de Alphaproteobacteria). Finalmente, hay una histidina (H218) que se encuentra únicamente en la proteína CarF de *M. xanthus* (Figuras 21 y 22). Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se concluyó que las histidinas H78, H103, H164

y H195 (conservadas en todos los homólogos), así como H113 (conservada solo en los homólogos de animales) son esenciales para el correcto funcionamiento de CarF, mientras que H218 no lo es (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Determinar si las mutaciones en las histidinas que provocan falta de función afectan o no a la estabilidad de la proteína, así como estudiar el papel de las restantes histidinas, ha sido una de las tareas realizadas en este trabajo.

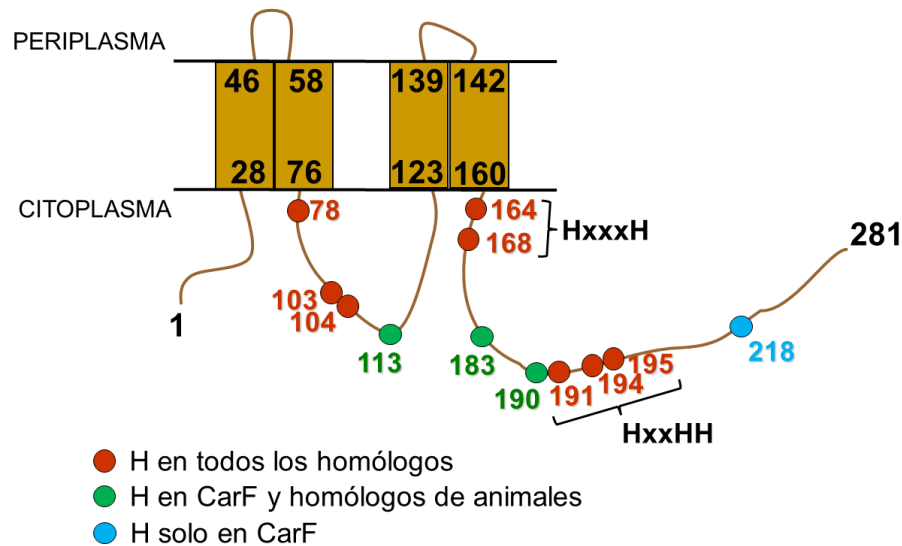


Figura 22. Topología en la membrana de la proteína CarF de *M. xanthus*. Se muestra la disposición en el citoplasma de sus 12 histidinas (representadas como círculos), utilizando un código de colores para indicar el grado de conservación de cada histidina en las proteínas homólogas. Se indican los dos motivos (HxxxH y HxxHH) que podrían participar en la formación de un complejo di-hierro.

Además de los mencionados motivos de histidinas, CarF comparte con alguna desaturasa de membrana descrita, como la SCD de ratón, su topología con 4 hélices transmembranales dispuestas de forma que los extremos N- y C-terminal, así como las histidinas, quedan localizadas en el citoplasma (compárese Figura 3 con Figura 22) (Bai *et al.*, 2015; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Nagao *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2020). Estas observaciones, unidas al hecho de que uno de los tres homólogos presentes en *A. thaliana*, At3/FAD4, muestra una actividad desaturasa de ácidos grasos atípica (Gao *et al.*, 2009), nos llevó a plantearnos que CarF sea también una desaturasa de ácidos grasos. Para someterlo a prueba experimental, el grupo de investigación realizó diversos análisis lipídicos en *M. xanthus*, comparando la estirpe silvestre (WT) con la portadora de la delección de *carF* ($\Delta carF$). La extracción de lípidos totales en estas estirpes y su posterior análisis mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida–espectrometría de masas en tándem) permitió determinar que CarF es esencial para la formación del

I. Introducción

plasmalógeno MxVEPE, ya que su ausencia provoca la eliminación de dicho lípido y la acumulación de MxAEPE (Gallego-García *et al.*, 2019).

La delección de *carF* se combinó con mutaciones en genes esenciales de las dos rutas de síntesis de MxAEPE, dando lugar a una estirpe $\Delta carF \Delta elbD \Delta MXAN_1676$, que carece de MxAEPE y MxVEPE (Figura 23A). Para confirmar el paso exacto de la ruta en el que actúa CarF se realizaron experimentos de complementación química con un plasmalógeno humano (HsVEPE1) y su lípido éter precursor (HsAEPE1), ambos comercialmente disponibles (Figura 23B). En estos experimentos, el HsVEPE1 fue capaz de restablecer por sí solo el fenotipo Car⁺ en las estirpes $\Delta carF$, $\Delta elbD \Delta MXAN_1676$ y $\Delta carF \Delta elbD \Delta MXAN_1676$. Sin embargo, solo la estirpe $\Delta elbD \Delta MXAN_1676$, que contiene CarF, fue capaz de responder a la luz cuando se “alimentó” con el lípido éter HsAEPE1. Mediante espectrometría de masas se confirmó que únicamente esta estirpe es capaz de convertir el HsAEPE1 en el plasmalógeno HsVEPE1, que es utilizado por *M. xanthus* para percibir la luz y activar la síntesis de carotenos (Figura 23C). En base a estos resultados, la proteína CarF fue identificada por el grupo de investigación como la PEDS1, una enzima huérfana del metabolismo lipídico buscada durante décadas (Figura 23D) (Gallego-García *et al.*, 2019).

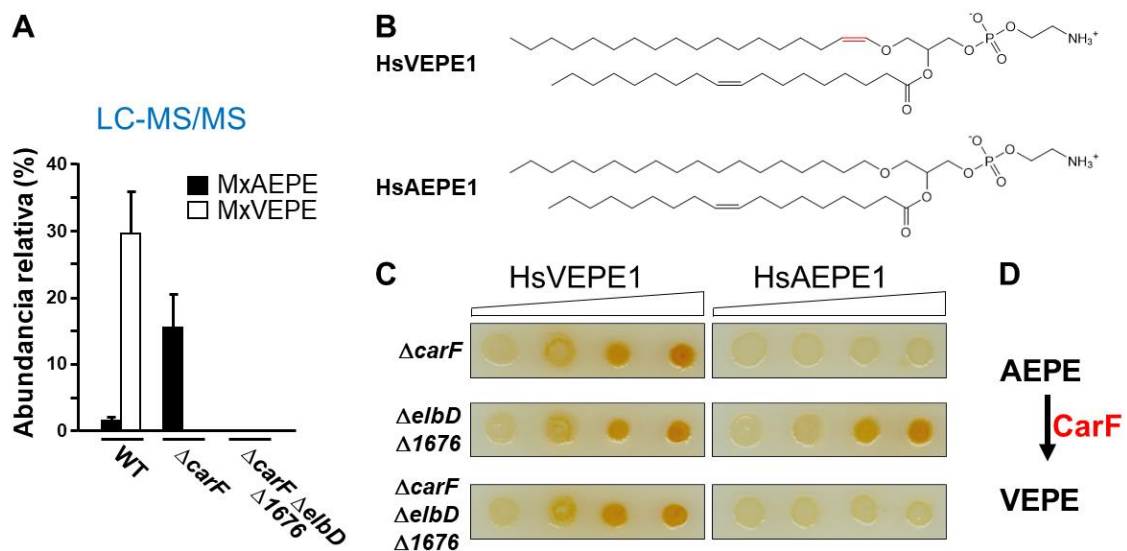


Figura 23. Descubrimiento de la actividad PEDS1 de CarF. **A)** Abundancia relativa de los compuestos MxVEPE y MxAEPE, detectados mediante LC-MS/MS, en las estirpes WT, $\Delta carF$ y $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$. **B)** Estructura química del HsVEPE1 (1-18:0-alquenil-2-18:1-acil-fosfatidiletanolamina) y del HsAEPE1 (1-18:0-alquil-2-18:1-acil-fosfatidiletanolamina). En rojo se representa el enlace vinil-éter del plasmalógeno. **C)** Complementación química alimentando diferentes estirpes de *M. xanthus* con los lípidos HsVEPE1 y HsAEPE1. **D)** Paso en el que actúa CarF. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

I.3.3.2.1.1. Homólogos a CarF en animales

De todas las proteínas homólogas a CarF identificadas en animales, la única que se ha estudiado es la proteína TMEM189 (o Kua) de humanos. El gen *TMEM189*, localizado en el cromosoma 20, está situado inmediatamente aguas arriba de otro gen, llamado *UEV* (Figura 24). Los genes *TMEM189* y *UEV* pueden expresarse como unidades transcripcionales totalmente independientes, ya que cada gen contiene su propio promotor. A partir del gen *TMEM189*, compuesto por 6 exones, se genera una proteína de 270 aminoácidos, que se localiza en el retículo endoplasmático y cuya función se ha abordado en este trabajo. Por otro lado, el gen *UEV* cifra una proteína nuclear enzimáticamente inactiva relacionada con las enzimas E2 (enzimas conjugadoras de ubiquitina). Curiosamente, mediante procesamiento alternativo se puede generar un transcrito híbrido *TMEM189-UEV*, que da lugar a una proteína con dos dominios, TMEM189 en el N-terminal y UEV en el C-terminal. Como TMEM189, la proteína de fusión TMEM189-UEV se localiza en el retículo endoplasmático. En otros animales, como *C. elegans* y *D. melanogaster*, el gen *TMEM189* se encuentra muy alejado del gen *UEV*, a veces incluso en cromosomas diferentes, y no hay ningún tipo de relación entre ambos genes. Se desconoce la función que desempeñan las proteínas TMEM189 de gusanos y moscas (Long, 2000; Thomson *et al.*, 2000), por lo que también se han estudiado en este trabajo.

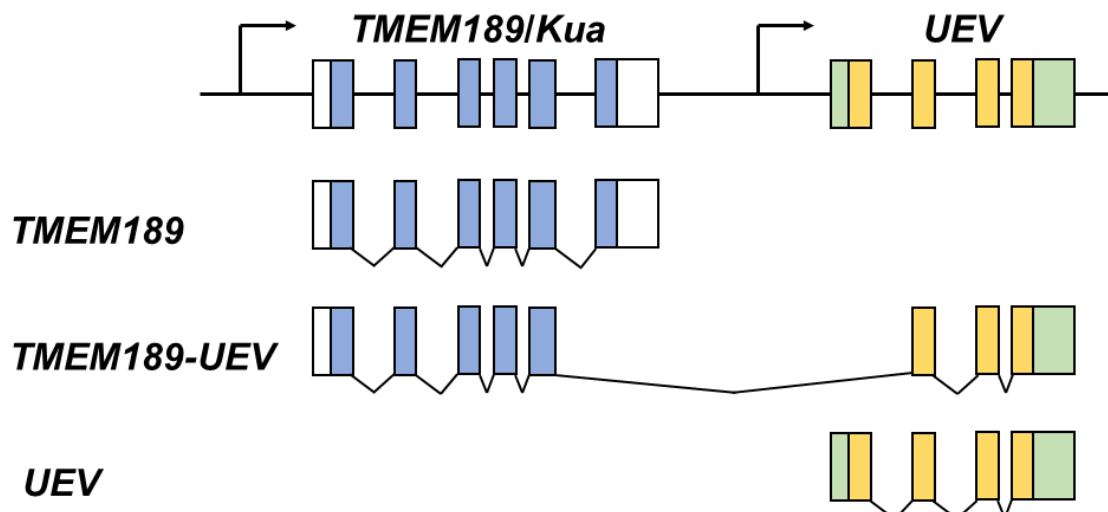


Figura 24. Disposición de los genes *TMEM189/Kua* y *UEV* en humanos. En azul se representan los 6 exones de *TMEM189*, y en blanco sus regiones 5' y 3'UTR. En amarillo se representan los 4 exones de *UEV*, y en verde sus regiones 5' y 3'UTR. Las flechas marcan los promotores de los genes. En la parte inferior se muestran los 3 transcritos generados a partir de estos genes mediante procesamiento alternativo. Modificada de Thomson *et al.* (2000).

I. Introducción

I.3.3.2.1.2. Homólogos a CarF en plantas

Entre los homólogos a CarF en plantas, la proteína FAD4 (también llamada, por nosotros, At3) de *A. thaliana* es la más estudiada. Esta proteína muestra una actividad desaturasa de ácidos grasos, ya que es capaz de introducir un doble enlace *trans* en posición 3 del ácido palmítico (C16:0) esterificado en la posición *sn*-2 del PG, generando un *sn*2-16:1 Δ^{3trans} -PG (Figura 25). Esta actividad desaturasa es bastante inusual, ya que genera un enlace *trans*, cuando la mayoría de los dobles enlaces en plantas se encuentran en configuración *cis*. Además, el doble enlace es introducido muy cerca del extremo carboxilo terminal (Gao *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2020).

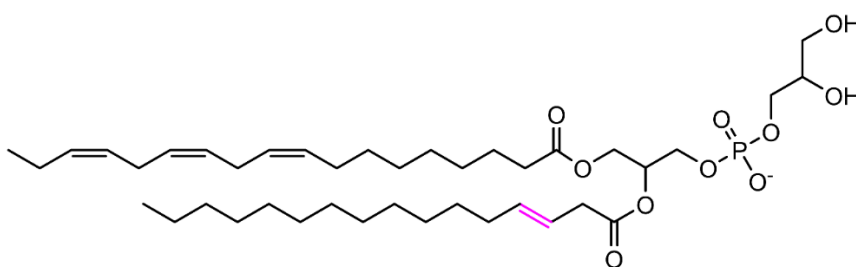


Figura 25. *sn*2-16:1 Δ^{3trans} -PG, producto de la proteína FAD4/At3 de *A. thaliana*. En rosa se muestra el doble enlace Δ^{3trans} que introduce esta enzima. Modificada de Gao *et al.* (2009).

El ácido graso 16:1 Δ^{3trans} está distribuido en todo el reino vegetal y se puede encontrar en membranas fotosintéticas de algas verdes y plantas terrestres, por lo que generalmente se le ha atribuido un importante papel estructural o funcional en la fotosíntesis de organismos eucarióticos. Sin embargo, el mutante *fad4-1* de *A. thaliana*, que carece de *sn*2-16:1 Δ^{3trans} -PG, no muestra ningún defecto en el crecimiento o en la fotosíntesis (Boudière *et al.*, 2014; Browse *et al.*, 1985). La proteína FAD4, de 323 aminoácidos, se localiza en los cloroplastos. Según las predicciones bioinformáticas contiene cuatro dominios transmembranales, como CarF o SCD1, que permiten su anclaje a la membrana de los tilacoides. Así, los tres motivos de histidina identificados (QGHH, HAWAH y HAEHH) quedarían orientados hacia el estroma y podrían interactuar entre sí, conformando un sitio activo similar al que se ha descrito en otras desaturasas de ácidos grasos de membrana (Gao *et al.*, 2009). Otra enzima del cloroplasto, la peroxirredoxina Q (PRXQ), es capaz de estimular la actividad de la enzima FAD4 en *A. thaliana*, pues la deficiencia en PRXQ provoca una reducción del 75% en los niveles de *sn*2-16:1 Δ^{3trans} -PG (Horn *et al.*, 2020). Las peroxirredoxinas son tiorredoxinas que actúan como potentes reductoras de ROS y que participan en la defensa frente al estrés oxidativo, la señalización del estado redox y la regulación del

metabolismo celular. La PRXQ, que desempeña un papel protector en la fotosíntesis, actúa preferentemente sobre el H_2O_2 , reduciéndolo a H_2O . Se ha comprobado que las plantas que carecen de PRXQ son más sensibles a oxidantes, aunque aparentemente no muestran ningún otro fenotipo. Estos resultados parecen sugerir una conexión entre el estado redox del cloroplasto, que podría ser percibido y transmitido por la PRXQ, y la activación de FAD4 y consiguiente producción de $sn2-16:1\Delta^{3trans}$ -PG (Horn *et al.*, 2020; Lamkemeyer *et al.*, 2006; Liebthal *et al.*, 2018). Curiosamente, FAD4 tiene dos proteínas parálogas en *A. thaliana*, llamadas FAD4L1/At2 y FAD4L2/At1. Sin embargo, la función que desempeñan estas proteínas es desconocida, ya que no muestran la misma actividad enzimática descrita para FAD4 (Gao *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2020).

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

El presente trabajo parte del descubrimiento por el grupo de que la proteína membranal CarF, necesaria para que *M. xanthus* perciba la luz, es la desaturasa huérfana responsable del último paso en la biosíntesis de los plasmalógenos. En consecuencia, el papel de CarF en la respuesta a la luz es meramente enzimático y son los plasmalógenos los que, de alguna manera sin precedentes, median dicha respuesta. El objetivo global de esta tesis ha sido profundizar en este descubrimiento a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis del modo de acción molecular de CarF y de sus homólogos eucarióticos. Este objetivo se ha abordado mediante la obtención de versiones mutadas de CarF y su análisis fenotípico, el análisis de complementación por varias proteínas homólogas, y el intento de puesta a punto de un protocolo de purificación de CarF o alguno de sus homólogos para su caracterización *in vitro* y estructural. Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación y en el Anexo 1 (Apartado III.4, resultados no publicados y discusión sobre los avances en la purificación de CarF):

Gallego-García, A. *, Monera-Girona, A. J.*, Pajares-Martínez, E. *, Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132.

*Co-primeros autores

Las conclusiones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 derivan de este objetivo.

2. Análisis de la biosíntesis de los lípidos éter precursores en *M. xanthus*. Este objetivo se ha abordado mediante el análisis de la distribución en mixobacterias de los posibles operones *elbA-E* y *MXAN_1676-1674*, la búsqueda de posibles dominios proteicos en las proteínas *ElbA-E* y *MXAN_1676-1674*, y el análisis genético. Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación y en el Anexo 2 (Apartado III.5, resultados no publicados y discusión sobre la biosíntesis de lípidos éter en *M. xanthus*):

Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., del Rey Navalón, I., Pérez-Castaño, R., Galbis-Martínez, M. L., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2022). Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 -Desaturase PEDS1

II. Objetivos

for human plasmalogen biosynthesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 884689.

Las conclusiones 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 derivan de este objetivo.

3. Análisis del novedoso mecanismo de señalización del estrés fotooxidativo mediado por los plasmalógenos. Este objetivo se ha abordado mediante el análisis *in vivo* e *in vitro* de la rotura del enlace vinil-éter de los plasmalógenos, la “alimentación” de *M. xanthus* con distintos plasmalógenos, lípidos éter o derivados, y la puesta a punto de la técnica de química-clic para identificar posibles dianas de los plasmalógenos o de sus productos de rotura. Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación y en el Anexo 3 (Apartado III.6, resultados no publicados y discusión sobre el papel de los plasmalógenos en *M. xanthus*):

Gallego-García, A. *, Monera-Girona, A. J. *, Pajares-Martínez, E. *, Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132.

*Co-primeros autores

Las conclusiones 16, 17, 18, 19 y 20 derivan de este objetivo.

4. Revisión bibliográfica de los mecanismos implicados en la respuesta a la luz en *M. xanthus*. En lo que atañe a este trabajo, este objetivo pone de relieve que la ruta dependiente de los plasmalógenos constituye un nuevo paradigma en la percepción y transducción de la señal luminosa. Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación:

Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Pajares-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9, 1067.

Las conclusiones 17, 18 y 19 derivan de este objetivo.

III. PUBLICACIONES Y RESULTADOS NO PUBLICADOS

III.1. A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis.

Aránzazu Gallego-García*, Antonio J. Monera-Girona*, Elena Pajares-Martínez*, Eva Bastida-Martínez, Ricardo Pérez-Castaño, Antonio A. Iniesta, Marta Fontes, S. Padmanabhan, Montserrat Elías-Arnanz. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128-132.

*Co-primeros autores

DOI: 10.1126/science.aay1436

Abstract:

Plasmalogens are glycerophospholipids with a hallmark sn-1 vinyl ether bond. These lipids are found in animals and some bacteria and have proposed membrane organization, signaling, and antioxidant roles. We discovered the plasmanylethanolamine desaturase activity that is essential for vinyl ether bond formation in a bacterial enzyme, CarF, which is a homolog of the human enzyme TMEM189. CarF mediates light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*, and plasmalogens participate in sensing photooxidative stress through singlet oxygen. TMEM189 and other animal homologs could functionally replace CarF in *M. xanthus*, and knockout of TMEM189 in a human cell line eliminated plasmalogens. Discovery of the human plasmanylethanolamine desaturase will spur further study of plasmalogen biogenesis, functions, and roles in disease.

Contribuciones del doctorando:

El doctorando realizó el análisis mutacional de las 12 histidinas de CarF, los análisis de complementación con las proteínas homólogas utilizadas, y los estudios *in vivo* e *in vitro* sobre la rotura de los plasmalógenos por la acción del estrés fotooxidativo. Además, participó en los análisis de complementación química con plasmalógenos y sus precursores, en el análisis y discusión de los datos, así como en la edición y revisión crítica del artículo

III. Publicaciones y resultados no publicados

III.2. Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation

S. Padmanabhan, Antonio J. Monera-Girona, Ricardo Pérez-Castaño, Eva Bastida-Martínez, Elena Pajares-Martínez, Diego Bernal-Bernal, María Luisa Galbis-Martínez, María Carmen Polanco, Antonio A. Iniesta, Marta Fontes, Montserrat Elías-Arnanz. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9(5):1067.

DOI: 10.3390/microorganisms9051067

Abstract:

Myxobacteria are Gram-negative δ -proteobacteria found predominantly in terrestrial habitats and often brightly colored due to the biosynthesis of carotenoids. Carotenoids are lipophilic isoprenoid pigments that protect cells from damage and death by quenching highly reactive and toxic oxidative species, like singlet oxygen, generated upon growth under light. The model myxobacterium *Myxococcus xanthus* turns from yellow in the dark to red upon exposure to light because of the photoinduction of carotenoid biosynthesis. How light is sensed and transduced to bring about regulated carotenogenesis in order to combat photooxidative stress has been extensively investigated in *M. xanthus* using genetic, biochemical and high-resolution structural methods. These studies have unearthed new paradigms in bacterial light sensing, signal transduction and gene regulation, and have led to the discovery of prototypical members of widely distributed protein families with novel functions. Major advances have been made over the last decade in elucidating the molecular mechanisms underlying the light-dependent signaling and regulation of the transcriptional response leading to carotenogenesis in *M. xanthus*. This review aims to provide an up-to-date overview of these findings and their significance.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Contribuciones del doctorando:

El trabajo del doctorando fue importante para entender el novedoso papel que desempeñan los plasmalógenos en la percepción y transducción de la señal luminosa en *M. xanthus*, cuyos resultados son objeto de revisión en este artículo. Además, participó en la elaboración de figuras y revisión crítica del manuscrito.

III.3. Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 '-desaturase PEDS1 for human plasmalogen biosynthesis

S. Padmanabhan, Antonio J. Monera-Girona, Elena Pajares-Martínez, Eva Bastida-Martínez, Irene del Rey-Navalón, Ricardo Pérez-Castaño, María Luisa Galbis-Martínez, Marta Fontes, Montserrat Elías-Arnanz. (2022). Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 '-desaturase PEDS1 for human plasmalogen biosynthesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:884689.

DOI: 10.3389/fcell.2022.884689

Abstract:

Plasmalogens are glycerophospholipids with a hallmark sn-1 vinyl ether bond that endows them with unique physical-chemical properties. They have proposed biological roles in membrane organization, fluidity, signaling, and antioxidative functions, and abnormal plasmalogen levels correlate with various human pathologies, including cancer and Alzheimer's disease. The presence of plasmalogens in animals and in anaerobic bacteria, but not in plants and fungi, is well-documented. However, their occurrence in the obligately aerobic myxobacteria, exceptional among aerobic bacteria, is often overlooked. Tellingly, discovery of the key desaturase indispensable for vinyl ether bond formation, and therefore fundamental in plasmalogen biogenesis, emerged from delving into how the soil myxobacterium *Myxococcus xanthus* responds to light. A recent pioneering study unmasked myxobacterial CarF and its human ortholog TMEM189 as the long-sought plasmanylethanolamine desaturase (PEDS1), thus opening a crucial door to study plasmalogen biogenesis, functions, and roles in disease. The findings demonstrated the broad evolutionary sweep of the enzyme and also firmly established a specific signaling role for plasmalogens in a photooxidative stress response. Here, we will recount our take on this fascinating story and its implications, and review the current state of knowledge on plasmalogens, their biosynthesis and functions in the aerobic myxobacteria.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Contribuciones del doctorando:

En este trabajo, el doctorando realizó una búsqueda de dominios proteicos en los genes presuntamente implicados en la biosíntesis de lípidos con enlace éter en *M. xanthus*. También contribuyó en la elaboración de figuras y en la revisión crítica del manuscrito.

III.4. Anexo I: resultados no publicados y discusión sobre los avances en la purificación de CarF

Cada vez hay un mayor interés en estudiar la función de proteínas de membrana y determinar su estructura tridimensional, ya que estas proteínas intervienen en múltiples procesos biológicos y fisiológicos, o son dianas farmacológicas para diferentes fármacos empleados en el ámbito clínico. Sin embargo, trabajar con proteínas de membrana es mucho más complicado que con proteínas solubles, ya que tienen regiones hidrofóbicas que interactúan con los lípidos de membrana y regiones hidrofílicas que lo hacen con el entorno acuoso presente a ambos lados de la membrana (Fiori *et al.*, 2017). Para purificar una proteína de membrana, primero hay que extraerla de la bicapa lipídica. Para ello, es necesario recrear un ambiente especial que mimetice la membrana, en el cual la proteína se mantenga estable y en una conformación lo más parecida posible a su estado nativo. Hay varios agentes capaces de perturbar las bicapas lipídicas y solubilizar las proteínas de membrana. Los más utilizados son los detergentes, moléculas anfipáticas que, a través de su parte hidrofóbica, se insertan en la membrana y la desestabilizan, mientras que su parte hidrofílica permite la formación espontánea de micelas en medio acuoso. Al solubilizar con detergentes, las regiones hidrofóbicas de una proteína de membrana suelen perder la interacción con los lípidos adyacentes y quedan rodeadas por micelas de detergente, mientras que las regiones hidrofílicas quedan expuestas al medio acuoso (Fiori *et al.*, 2017; Stetsenko & Guskov, 2017). La elección del detergente adecuado para solubilizar una proteína de membrana es fundamental para obtener una preparación pura, homogénea, estable y con buena concentración, lo que a su vez es un requisito para obtener la estructura tridimensional de la proteína mediante cristalografía de rayos X. Hay algunos detergentes, como el Dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM), el Decil- β -D-maltopiranosido (DM), el Octil- β -D-glucopiranosido (OG), el Laurildimetilamina-N-óxido (LDAO) o el Dodecil octaetilen glicol éter (C12E8), que son más adecuados que otros para solubilizar y cristalizar proteínas de membrana (Stetsenko & Guskov, 2017).

Como se muestra en el artículo publicado por Gallego-García, Monera-Girona, Pajares-Martínez *et al.* en *Science* (2019), la proteína CarF de *M. xanthus* se pudo expresar en *E. coli*, fusionando una etiqueta Strep a su extremo C-terminal (CarF-Strep), una versión de CarF que es funcional en *M. xanthus*. Mediante un ensayo de solubilidad con distintos detergentes, muy similar al descrito en Gutmann *et al.* (2007), se determinó que CarF-Strep se solubiliza con LDAO, Foscolina-12 (FC12) y Foscolina-10 (FC10), pero no con varios otros detergentes menos agresivos probados (DDM, OG, C12E8, y Cymal-5). No obstante, en FC12 se pudo obtener una preparación de CarF-Strep

III. Publicaciones y resultados no publicados

relativamente concentrada (3 mg proteína pura por litro de cultivo de *E. coli* procesado) que tiende a agregar, pero presenta actividad enzimática, aunque baja. Mediante espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), se pudo estimar la presencia de hierro en una proporción Fe/proteína de $(2.3 \pm 0.6):1$, como cabía esperar de la presencia de los motivos de histidinas comentados anteriormente. En los resultados mostrados en el presente anexo (no incluidos en ninguno de los artículos publicados que componen el compendio) se han abordado diferentes estrategias para tratar de mejorar la calidad de la proteína purificada, favorecer su solubilidad en detergentes más apropiados para cristalografía (principalmente DDM y OG) o incluso prescindir de detergentes y tratar de solubilizar CarF-Strep en nanodiscos poliméricos. Finalmente, también se han intentado expresar en *E. coli* algunas de las proteínas homólogas a CarF, para ver si alguna de ellas tiene un mejor comportamiento que la proteína de *M. xanthus*.

III.4.1. Expresión de versiones truncadas de CarF en *E. coli*

Alineando las secuencias de CarF de *M. xanthus* y sus proteínas homólogas en eucariotas se aprecia que a partir de la isoleucina 240 de CarF hay un fragmento de 41 aminoácidos que está ausente en las otras proteínas (Figura 1A; Nota: las figuras de esta sección III se han numerado a partir de 1, comenzando con esta figura). Aunque este fragmento se elimine total (CarF_{1-240}) o casi totalmente (CarF_{1-247}), la respuesta carotenogénica en *M. xanthus* no se ve afectada y la bacteria sigue siendo capaz de sintetizar plasmalógenos (Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Gallego-García *et al.*, 2019). En este trabajo se ha estudiado si la falta del extremo C-terminal de CarF favorece la expresión o solubilidad en otros detergentes diferentes a FC12 de la proteína con etiqueta Strep en el extremo carboxilo. Además, prescindir de este fragmento no esencial para la actividad enzimática podría facilitar la cristalización y determinación de la estructura tridimensional de CarF, al eliminar posibles regiones flexibles y desestructuradas (Upmanyu & Malviya, 2019). En primer lugar, se clonaron las versiones $\text{carF}_{1-247}\text{-Strep}$ y $\text{carF}_{1-240}\text{-Strep}$ en el plásmido de expresión pETM14. Estas versiones abarcan desde el inicio de CarF hasta la isoleucina 240 (donde se pierde la homología entre la proteína de *M. xanthus* y sus homólogas de eucariotas) o hasta la alanina 247 (para equiparar la longitud de CarF en su extremo C-terminal a la longitud de las proteínas eucarióticas). Los plásmidos generados fueron introducidos en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3), y las células resultantes se crecieron en medio líquido toda la noche a 16°C en presencia de 0.5 mM IPTG (para inducir la expresión de proteína) y 10 μM FeSO_4 (para favorecer que las histidinas que constituyen el centro activo de CarF

III. Publicaciones y resultados no publicados

sean coordinadas por hierro en lugar de zinc, un metal más disponible en *E. coli*). Al día siguiente se recogió el precipitado celular correspondiente a 1 ml de cultivo y se rompieron las células mediante sonicación en tampón 20 mM Tris (pH 7,0), 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5 mM TCEP, 0,1 mM FeSO₄, 1 mM benzamidina, 1 mM PMSF y 1x cóctel inhibidor de proteasas. Se tomaron alícuotas del extracto celular antes (fracción total o FT) y después (fracción soluble o FS) de centrifugar (18000 g, 10 minutos, 4°C), y se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos indicaron que las proteínas CarF₁₋₂₄₇-Strep y CarF₁₋₂₄₀-Strep se expresaban en *E. coli*, a niveles equiparables a los niveles de expresión de la proteína completa. Además, ambas proteínas se comportaron como proteínas solubles en su ambiente membranal, ya que permanecieron en la FS tras el paso de centrifugación (Figura 1B).

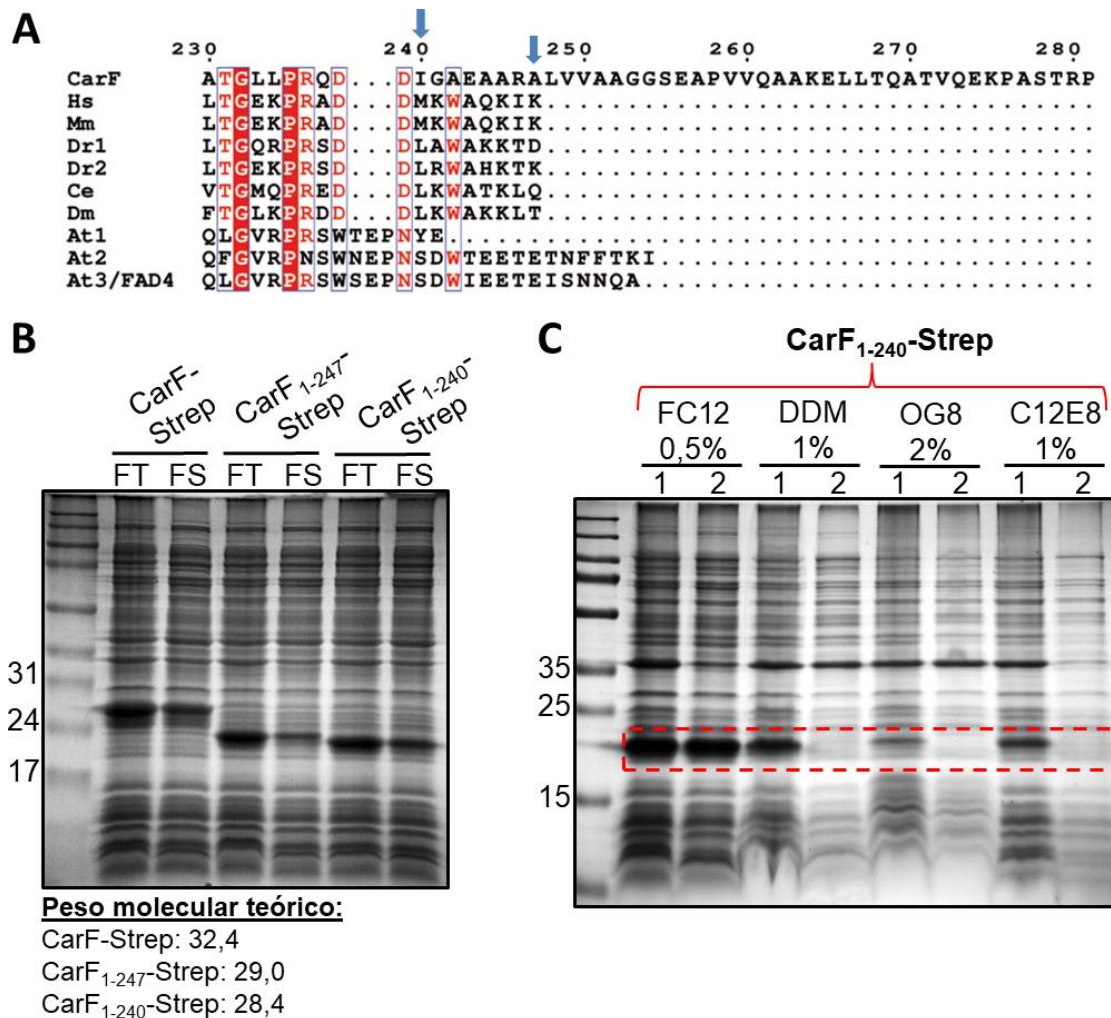


Figura 1. Expresión en *E. coli* de las versiones truncadas CarF₁₋₂₄₇-Strep y CarF₁₋₂₄₀-Strep.
A) Alineamiento de las secuencias correspondientes al extremo C-terminal de CarF y las siguientes proteínas homólogas: Hs (*Homo sapiens*), Mm (*Mus musculus*), Dr1 y Dr2 (*Danio rerio*), Ce (*Caenorhabditis elegans*), Dm (*Drosophila melanogaster*), At1, At2 y At3/FAD4

III. Publicaciones y resultados no publicados

(*Arabidopsis thaliana*). Con una flecha azul se indica la isoleucina 240 y la alanina 247 de CarF. **B)** Fracciones analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie tras la rotura del precipitado celular correspondiente a 1 ml de BL21(DE3) que ha sobreexpresado las proteínas CarF-Strep, CarF₁₋₂₄₇-Strep y CarF₁₋₂₄₀-Strep. FT: fracción total. FS: fracción soluble. **C)** Fracciones obtenidas en el ensayo de solubilización de CarF₁₋₂₄₀-Strep con distintos detergentes, analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie. 1: fracción membranal solubilizada con detergente. 2: sobrenadante tras la ultracentrifugación de dicha fracción para determinar qué proteínas son solubles en dicho detergente. El recuadro rojo indica la posición de la banda correspondiente a CarF₁₋₂₄₀-Strep. En **B** y **C**, se indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores de tamaño más relevantes y de las proteínas de estudio.

Para determinar si la delección del fragmento G₂₄₁-P₂₈₁ modifica la solubilidad de CarF-Strep en distintos detergentes se procesó el precipitado celular correspondiente a 2 litros de cultivo de BL21(DE3) que sobreexpresa la proteína CarF₁₋₂₄₀-Strep, tal y como se ha indicado con anterioridad. Tras realizar una primera centrifugación a baja velocidad (20000 g, 45 minutos, 4°C) para eliminar los restos celulares, el lisado se sometió a ultracentrifugación (200000 g, 2 horas, 4°C) para aislar la fracción membranal. Esta fracción, donde se encuentra la proteína de interés, se disgregó en tampón con distintos detergentes (FC12, DDM, OG8 y C12E8) y se mantuvo toda la noche a 4°C en agitación continua. A continuación, se realizó una segunda ultracentrifugación (200000 g, 2 horas, 4°C) para determinar qué proteínas se mantienen en el sobrenadante y, por tanto, han sido solubilizadas por el detergente. Las diferentes fracciones recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE. Como se aprecia en la Figura 1C, CarF₁₋₂₄₀-Strep únicamente fue solubilizada por FC12, al igual que la proteína completa. Por tanto, la eliminación del extremo C-terminal de CarF no afecta a la expresión de la proteína (con etiqueta Strep en el extremo carboxilo) en *E. coli*, pero tampoco modifica su solubilidad en los detergentes probados.

III.4.2. Expresión de CarF-Strep en una estirpe de *E. coli* productora de lípidos éter

Es posible que, en *M. xanthus*, la proteína CarF se encuentre en microdominios funcionales de membrana. En estas regiones de la membrana, enriquecidas en proteínas especializadas en procesos de señalización y con una composición lipídica muy particular, podrían abundar los lípidos éter y plasmalógenos, en contacto estrecho con CarF. Por ello, la expresión de CarF en un ambiente lipídico más parecido al de *M. xanthus*, con lípidos éter y plasmalógenos, podría ayudar a que la proteína se encuentre en un estado más favorable o mantenga posibles interacciones con estos lípidos. Además, la solubilidad de CarF-Strep en detergentes podría variar al modificar la composición lipídica de la membrana desde la que se extrae la proteína. Como *E. coli*, al igual que la gran mayoría de bacterias, carece de las enzimas necesarias para

III. Publicaciones y resultados no publicados

sintetizar lípidos éter y plasmalógenos, se procedió a generar una estirpe que produjera estos lípidos. Para ello se clonó el operón *MXAN_1676-1674* (que, como se mostrará en el Apartado III.5, está implicado en la biosíntesis de lípidos éter en *M. xanthus*) en el plásmido de expresión pET11b. Este plásmido, solo o en combinación con el plásmido pETM14-*carF-Strep*, se introdujo en BL21(DE3), y las colonias obtenidas se incubaron toda la noche a 16°C con IPTG y FeSO₄ (Figura 2A). Para analizar la expresión de las proteínas de interés se tomaron muestras de 1 ml de cada cultivo y se procesaron siguiendo el mismo protocolo descrito con anterioridad. Al introducir el plásmido pETM14-*MXAN_1676-1674* en BL21(DE3) se apreciaron bandas de proteína (ausentes en la estirpe transformada con los plásmidos pETM14 y pET11b sin inserto) que podrían corresponderse, por tamaño, con *MXAN_1676* y *MXAN_1675*. Sin embargo, no se vio una banda clara que pudiera atribuirse a *MXAN_1674*. Cuando BL21(DE3) se transformó simultáneamente con los plásmidos pETM14-*carF-Strep* y pET11b-*MXAN_1676-1674* se observó que, mientras que la expresión de *MXAN_1676* y *MXAN_1675* se mantuvo, la banda de CarF-Strep fue menos intensa, al menos en la fracción total, que la banda obtenida al transformar solamente con el plásmido pETM14-*carF-Strep*. Por tanto, parece que la expresión de CarF se ve afectada de forma negativa al coexpresarla con las proteínas del operón *MXAN_1676-1674* (Figura 2B).

Para determinar si las nuevas estirpes de *E. coli* generadas pueden sintetizar lípidos éter y plasmalógenos se extrajeron los lípidos totales y se sometieron a un proceso de metilación (para el análisis de los metilésteres de ácidos grasos o FAMES) y de sililación (para el análisis de los lípidos éter), tras el cual los plasmalógenos se detectaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) como dimetilacetal (DMA) y los lípidos éter como O-alkil-glicerol bis-trimetilsilil éter (OAG-bisTMS) (siguiendo el protocolo descrito en Gallego-García *et al.*, [2019]). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de las proteínas del operón *MXAN_1676-1674* conlleva la producción de varios lípidos con enlace éter (sobre todo 16:0-OAG-bisTMS, 14:0-OAG-bisTMS y 16:1-OAG-bisTMS) en *E. coli*. Además, cuando estas proteínas se coexpresaron con CarF-Strep se detectaron pequeñas cantidades de varios plasmalógenos (16:0-DMA o 14:0-DMA) (Figura 2C). Sin embargo, la expresión de la proteína en presencia de sus sustratos y productos no alteró su comportamiento en detergentes, ya que CarF-Strep siguió siendo soluble únicamente con FC12 (Figura 2D), quizás por los bajos niveles producidos en *E. coli*, o por la falta del contexto lipídico adecuado (como se comentó en la Introducción, *M. xanthus* tiene una composición compleja de lípidos en su membrana que difiere, no solo por la presencia de lípidos éter y plasmalógenos, de la de otros procariontes como *E.coli*).

III. Publicaciones y resultados no publicados

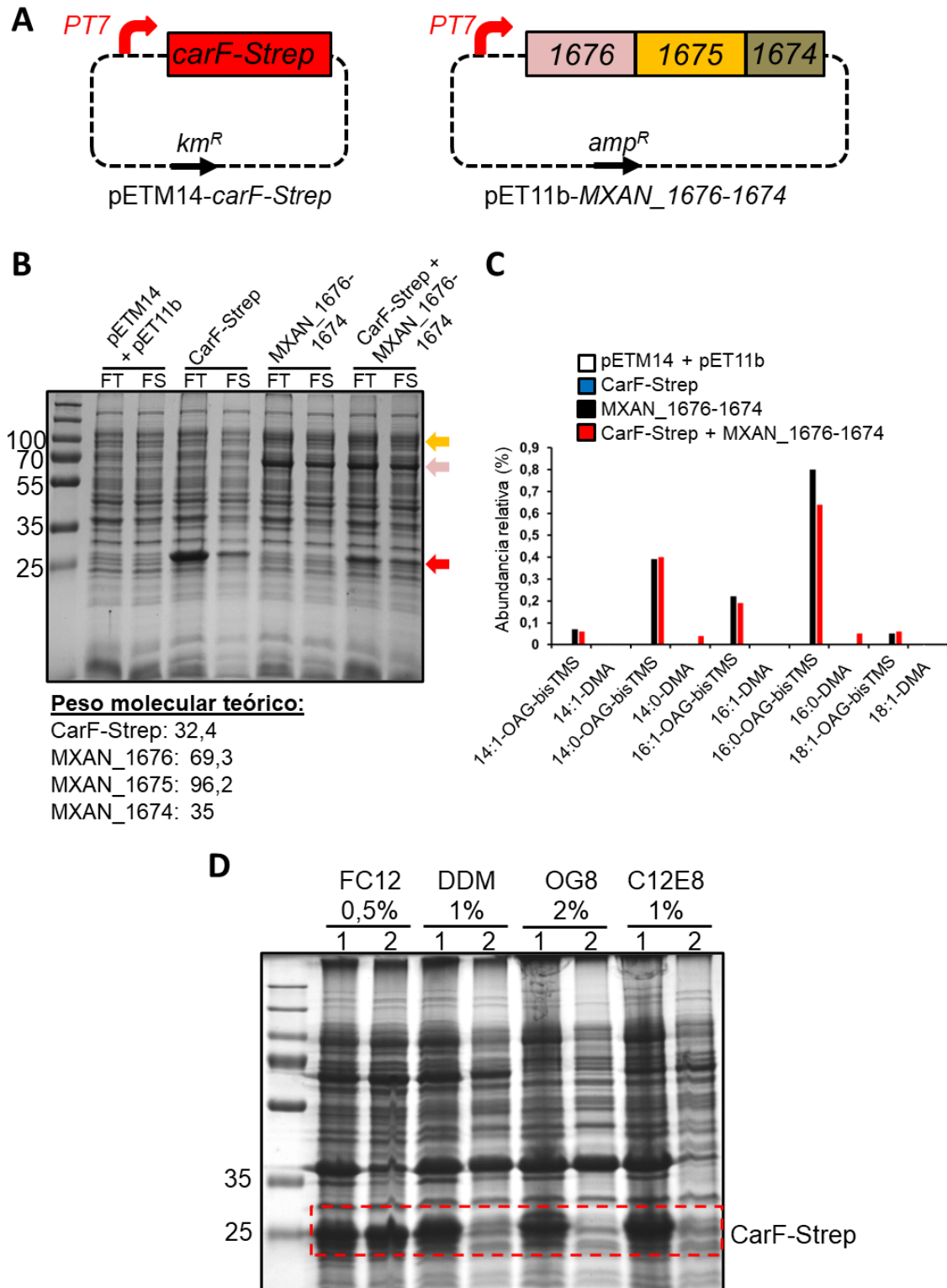


Figura 2. Expresión de CarF-Strep en una estirpe de *E. coli* productora de lípidos éter y plasmalógenos. A) Plásmidos generados para expresar CarF-Strep y las proteínas del operón *MXAN_1676-1674* bajo el control del promotor *P_{T7}*. *km^R*: gen de resistencia a kanamicina. *amp^R*: gen de resistencia a ampicilina. **B)** Fracciones de BL21(DE3) transformada con pETM14-*carF-Strep*, pET11b-*MXAN_1676-1674* o ambos plásmidos simultáneamente, analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie. Como control negativo se transformó BL21(DE3) con los plásmidos pETM14 y pET11b. Mediante flechas, manteniendo el código de colores, se indica la

III. Publicaciones y resultados no publicados

posición de la banda que se correspondería con cada proteína. FT: fracción total. FS: fracción soluble. **C)** Análisis lipídico de las estirpes indicadas. La abundancia relativa de los distintos DMA y OAG-bisTMS se expresa con respecto al total de compuestos detectados en el análisis por GC-MS. **D)** Fracciones obtenidas en el ensayo de solubilización con distintos detergentes de CarF-Strep expresada, en combinación con las enzimas cifradas por el operón *MXAN_1676-1674*, en *E. coli*. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie. 1: fracción membranal solubilizada con detergente. 2: sobrenadante de la segunda ultracentrifugación. Los detergentes empleados son los mismos que los mostrados en la Figura 1. En **B** y **D**, se indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores de tamaño más relevantes y de las proteínas de estudio.

III.4.3. Solubilización de CarF-Strep con nanodiscos poliméricos

La amplia variedad de detergentes comercialmente disponibles con diferentes propiedades y la facilidad en su manejo hace que estos agentes químicos sean los más utilizados para solubilizar y purificar proteínas de membrana (Fiori *et al.*, 2020). Sin embargo, las micelas de detergente no son el ambiente más favorable para que las proteínas de membrana mantengan su estabilidad y, por tanto, su estructura tridimensional y su función. Esto se debe a que el ambiente hidrofóbico que recrean las micelas de detergente es muy simple, en comparación con la complejidad que presenta la bicapa lipídica en las células. La solubilización con detergentes también implica que la proteína sea extraída de su entorno lipídico y se pierdan las posibles interacciones con lípidos específicos que puedan contribuir a su estabilidad o a su función (Fiori *et al.*, 2017; Fiori *et al.*, 2020; Gulamhussein *et al.*, 2020). Para solventar estos problemas, en los últimos años se han empezado a utilizar nanodiscos lipídicos, que son pequeños fragmentos de bicapa lipídica con proteínas de membrana en su interior. Además, el uso de nanodiscos es compatible con diferentes técnicas comúnmente empleadas para determinar la estructura tridimensional de proteínas, como RMN o crio-microscopía electrónica. Los nanodiscos “convencionales” están rodeados por una proteína de andamiaje, que les confiere estabilidad, pero a la vez limita su tamaño. Recientemente, se han diseñado un nuevo tipo de nanodiscos que están delimitados por polímeros de estireno y maleico (SMA) o diisobutireno y maleico (DIBMA) (Fiori *et al.*, 2020; Ravula *et al.*, 2019) (Figura 3).

III. Publicaciones y resultados no publicados

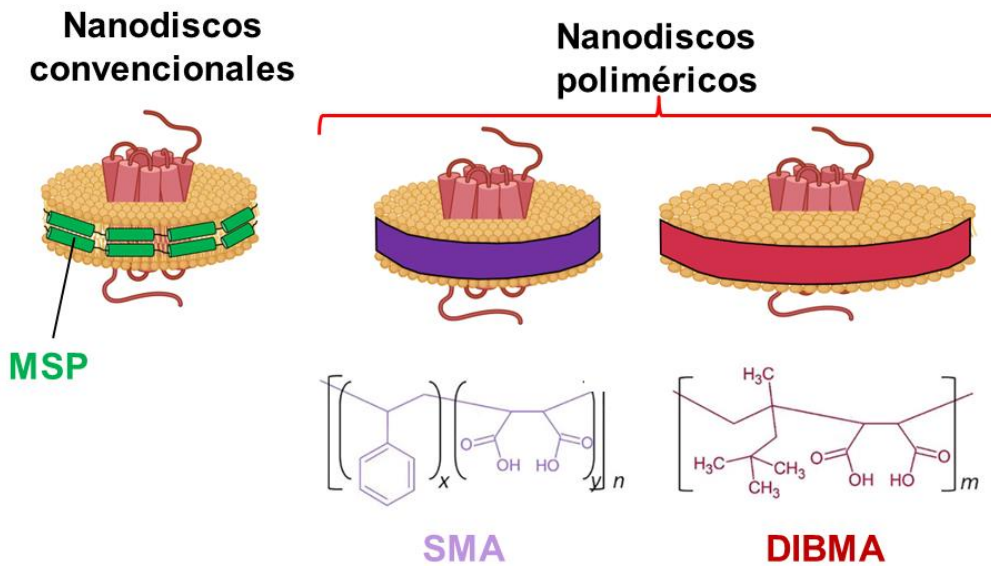


Figura 3. Comparación entre nanodiscos convencionales y nanodiscos poliméricos. En verde se indica la proteína de andamiaje (MSP) que delimita los nanodiscos convencionales. En lila y rojo se representan los polímeros SMA y DIBMA que delimitan los nanodiscos SMALP y DIBMALP, respectivamente.

La principal ventaja que conlleva utilizar nanodiscos poliméricos frente a los convencionales es que los polímeros SMA y DIBMA pueden solubilizar directamente las membranas celulares, sin un paso previo de solubilización en detergente, formando partículas lipídicas (SMALP o DIBMALP) que mantienen las proteínas de membrana en su ambiente lipídico nativo. Además, se han desarrollado diferentes SMA y DIBMA con el objetivo de formar nanodiscos poliméricos que varían entre sí en sus propiedades fisicoquímicas o en el tamaño del disco disponible para ser ocupado por proteínas. Aunque con los SMALPs se obtiene, generalmente, un mayor grado de pureza y una mayor estabilidad de la proteína solubilizada, estos nanodiscos son sensibles a pH ácido ($\text{pH} < 6$) y cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Además, los anillos aromáticos del SMA producen una fuerte señal de absorción a 280 nm, lo que impide utilizar técnicas de espectroscopía óptica en el UV-lejano para determinar la concentración de la proteína de interés. Estas limitaciones han sido solventadas con los DIBMALPs, que además presentan un mayor tamaño y aportan un ambiente lipídico menos rígido (Gulamhussein *et al.*, 2020; Ravula *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se determinó si CarF-Strep, expresada en *E. coli*, puede ser solubilizada por diferentes nanodiscos poliméricos de tipo SMA o DIBMA. Para ello, se lisó el precipitado celular correspondiente a 1 litro de cultivo de BL21(DE3), y el extracto se ultracentrifugó (200000 g, 2 horas, 4°C) para obtener la fracción membranal. Dicha fracción se solubilizó a una concentración de 160 mg/ml en un volumen

III. Publicaciones y resultados no publicados

determinado de tampón con nanodisco (2,5% p/v). La solubilización se realizó toda la noche a 4°C en agitación continua. Tras una segunda ultracentrifugación (200000 g, 2 horas, 4°C) se determinó mediante SDS-PAGE si CarF-Strep se mantenía en el sobrenadante de la segunda ultracentrifugación con alguno de los nanodiscos de interés. Como se aprecia en la Figura 4, los cuatro nanodiscos probados (SMA 25010S, SMA 30010S, DIBMA 10 y DIBMA 12) fueron capaces de solubilizar CarF-Strep, aunque en menor medida que la FC12. Sin embargo, los ensayos de purificación de dichos nanodiscos realizados hasta la fecha, utilizando cromatografía de afinidad (resina Strep-Tactin), han resultado infructuosos. Ello se ha debido a la falta de unión de la proteína embebida en los SMALPS y DIBMALPS a la resina de purificación, lo que parece ser un problema habitual asociado a este tipo de nanodiscos. Dado el interés en conseguir una preparación de CarF en nanodiscos poliméricos para los estudios estructurales e *in vitro*, se continuarán realizando pruebas de solubilización y purificación de CarF fusionado a otras etiquetas, así como su extracción con dichos nanodiscos a partir del propio *M. xanthus*, lo que podría desvelar interacciones lípido-proteína o proteína-proteína insospechadas.

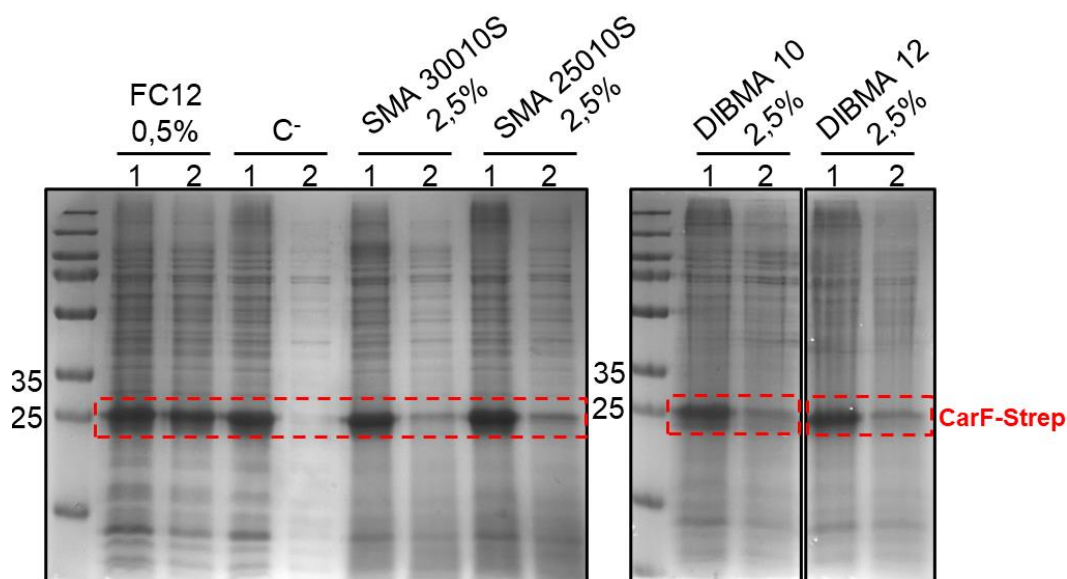


Figura 4. Solubilización de CarF-Strep con distintos nanodiscos poliméricos. Fracciones obtenidas en el ensayo de solubilización con distintos nanodiscos de CarF-Strep sobreexpresada en *E. coli*, analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie. 1: fracción membranal solubilizada con nanodiscos. 2: sobrenadante de la segunda ultracentrifugación. Como control positivo se ha solubilizado CarF-Strep con FC12, mientras que en el control negativo (C⁻) no se ha añadido ni detergente ni nanodiscos. Se indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores de tamaño más relevantes.

III. Publicaciones y resultados no publicados

III.4.4. Expresión en *E. coli* de proteínas homólogas a CarF

Como se ha comentado en los apartados anteriores, aunque se ha podido purificar la proteína CarF-Strep mediante su expresión heteróloga en *E. coli* y la solubilización en FC12, la calidad de la preparación obtenida no es idónea ni para los estudios funcionales *in vitro* ni para los estudios estructurales. Es posible que proteínas homólogas a CarF de otros organismos muestren un mejor comportamiento al purificarlas desde *E. coli*. La presencia de “verdaderos” homólogos de CarF (aquellos que tienen la histidina H113, esencial para la actividad PEDS1) está limitada a metazoa, mixobacterias y *Leptospira*. Las proteínas de dichos organismos son, por tanto, las principales candidatas para analizar su expresión en *E. coli*. Centrándonos en primer lugar en las proteínas TMEM189 de animales, se clonaron las versiones *Hs-Strep* y *Mm-Strep* (que cifran las proteínas de humano y ratón, respectivamente) en el plásmido de expresión pET11b. Por otro lado, *Dr1-Strep*, *Dr2-Strep*, *Ce-Strep* y *Dm-Strep* (que cifran las dos proteínas parálogas de pez cebra, la de *C. elegans* y la de *D. melanogaster*, respectivamente) se clonaron en pETM14. Como se aprecia en la Figura 5, ninguna de las proteínas analizadas se expresó de manera sustancial en *E. coli* en las condiciones ensayadas. No se puede descartar que el uso de otra etiqueta o la variación de las condiciones de expresión ofrezcan mejores resultados. Sin embargo, es posible que estas proteínas, al ser eucarióticas, requieran algún tipo de modificación postraducciona. De ser así, es probable que se expresen mejor en células eucarióticas que contengan su propio gen *TMEM189*, como el sistema Bac-to-Bac (*Baculovirus Expression System*) en células de insecto (Chambers *et al.*, 2018; Irons *et al.*, 2018; Martínez-Solís *et al.*, 2019) o el sistema BacMam (sistema híbrido basado en el uso de células de insecto y células de mamífero) (Fornwald *et al.*, 2016; Goehring *et al.*, 2014; Puente-Massaguer *et al.*, 2022; Shen *et al.*, 2020), que están siendo puestos a punto en nuestro grupo con dicha finalidad.

III. Publicaciones y resultados no publicados

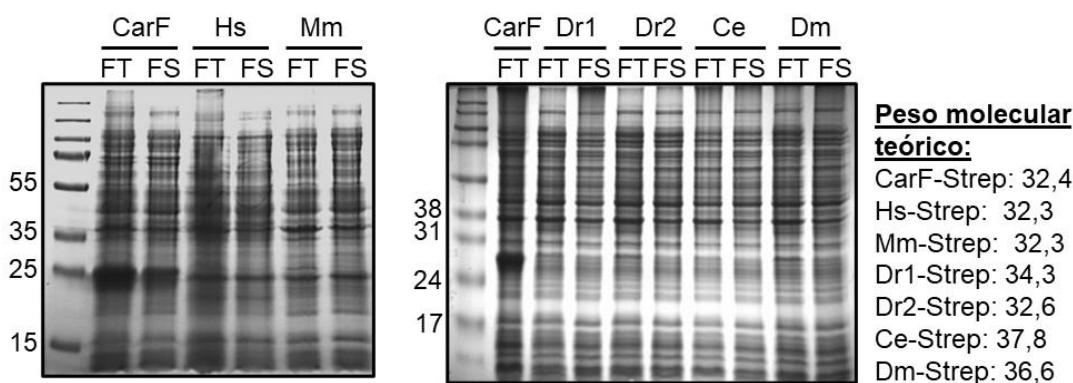
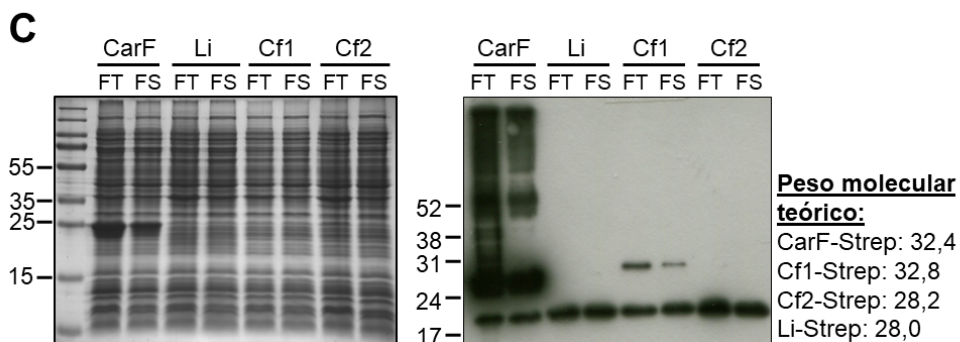
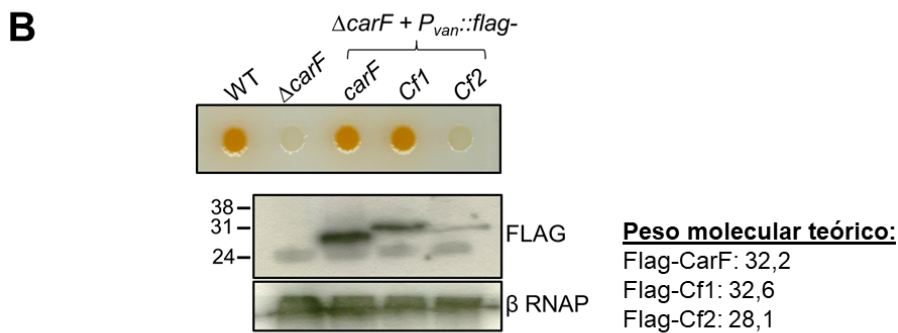
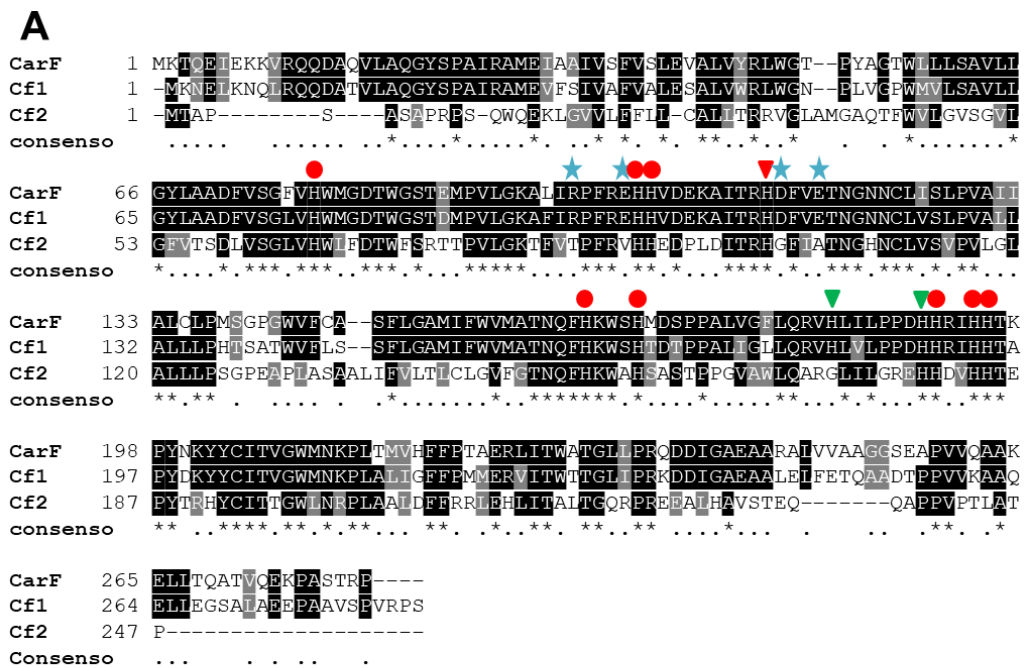


Figura 5. Expresión en *E. coli* de proteínas homólogas a CarF de animales. A) Fracciones analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie tras la rotura del precipitado celular correspondiente a 1 ml de BL21(DE3) que ha sobreexpresado las siguientes proteínas homólogas a CarF, todas ellas fusionadas a una etiqueta Strep en el extremo C-terminal: Hs (humana), Mm (ratón), Dr1 y Dr2 (dos parálogos de pez cebra), Ce (*C. elegans*) y Dm (*D. melanogaster*). Se indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores de tamaño más relevantes y de las proteínas ensayadas. FT: fracción total. FS: fracción soluble.

Como en bacterias solo se han encontrado homólogos funcionales a CarF en *Leptospira* y mixobacterias, se eligió, por un lado, el homólogo de *L. interrogans* como representante de *Leptospira*. Por otro lado, entre las mixobacterias, nos resultó llamativo el hecho de que *Cystobacter fuscus* tenga dos proteínas similares a CarF, nombradas en este trabajo como Cf1 y Cf2, por lo que también se abordó su estudio. Ambas proteínas conservan las 9 histidinas esenciales para la actividad desaturasa de CarF (incluida la histidina 113), pero mientras que Cf1 tiene un tamaño similar a CarF de *M. xanthus*, Cf2 es una proteína más corta, tanto por su extremo N-terminal como por el C-terminal (Figura 6A). Antes de probar la expresión de los homólogos bacterianos de CarF en *E. coli*, se analizó si Cf1 y Cf2 son funcionales (ya se había visto que la proteína de *L. interrogans* puede reemplazar a CarF de *M. xanthus*) (Gallego-García *et al.*, 2019). Para ello, se expresaron estas proteínas, fusionadas al epítipo FLAG en su extremo amino y bajo el control del promotor inducible por vanilato, en la estirpe de *M. xanthus* $\Delta carF$. Mediante un ensayo de cambio de color en la luz se vio que Cf1, pero no Cf2, complementa la falta de CarF en la bacteria. En el análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-FLAG se determinó que Cf2 se expresa en *M. xanthus*, aunque no tanto como Cf1 o CarF expresados a partir del mismo promotor inducible y con la etiqueta FLAG (Figura 6B). Por tanto, es probable que la falta de complementación por Cf2 se deba, más que a la falta de proteína, a la no conservación de ciertos residuos presentes en todos los homólogos funcionales de CarF y que posiblemente son importantes para su función (véase Figura 6A). Para probar la expresión de los homólogos de CarF de *L. interrogans* y *C. fuscus* en *E. coli* se les fusionó una etiqueta Strep en su extremo C-

III. Publicaciones y resultados no publicados

terminal. Las versiones *Li-Strep*, *Cf1-Strep* y *Cf2-Strep* se clonaron en pETM14, y la expresión de las proteínas de interés se analizó mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie, no observándose expresión de ninguna de las tres. Al utilizar una técnica más sensible, como el *Western blot*, se detectó la proteína Cf1, aunque los niveles de expresión fueron muy pequeños en comparación con los de CarF (Figura 6C), por lo que no se procedió a intentar su purificación. Así pues, al menos en las condiciones ensayadas, la expresión en *E. coli* de los homólogos bacterianos de CarF no supone una mejoría en relación con la expresión de las proteínas eucarióticas.



III. Publicaciones y resultados no publicados

Figura 6. Expresión en *E. coli* de proteínas homólogas a CarF de bacterias. **A)** Alineamiento múltiple de CarF de *M. xanthus* y Cf1 y Cf2 de *C. fuscus*. Mediante un círculo se indican las histidinas conservadas en todos los homólogos de CarF, mientras que los triángulos representan las histidinas conservadas en algunos homólogos. Las histidinas esenciales para la actividad desaturasa se indican en rojo y las no esenciales en verde. Las estrellas azules marcan residuos conservados en todos los homólogos funcionales de CarF, que han variado en Cf2 y que podrían ser responsables de que esta proteína no funcione en el ensayo de complementación. **B)** Fenotipo de color a las 48 horas de iluminación con vanilato 0,5 mM de las estirpes indicadas (arriba) y análisis de la estabilidad de Cf1 y Cf2 por *Western blot* usando anticuerpos anti-FLAG a partir de extractos celulares de las estirpes correspondientes crecidas con vanilato 0,5 mM. (abajo). El control de carga se ha realizado con anticuerpos que reconocen la subunidad β de la polimerasa de RNA (β RNAP). **C)** Fracciones analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie (izquierda) y *Western blot* (derecha) tras la rotura del precipitado celular correspondiente a 1 ml de BL21(DE3) que ha sobreexpresado las proteínas homólogas a CarF indicadas, todas ellas fusionadas a una etiqueta Strep en el extremo C-terminal. FT: fracción total. FS: fracción soluble. En **B** y **C**, se indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores de tamaño más relevantes y de las proteínas de estudio.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Estirpes de *M. xanthus*

Estirpe	Descripción	Origen/fuente
DK1050	Estirpe silvestre	Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984
MR992	$\Delta carF$	Fontes <i>et al.</i> , 2003
MR3128	$\Delta carF + P_{van}::flag-carF$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3428	$\Delta carF + P_{van}::flag-Cf1carF$	Este trabajo
MR3429	$\Delta carF + P_{van}::flag-Cf2carF$	Este trabajo

Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción/utilidad*	Origen/fuente
pET11b	Vector que permite expresar la proteína de interés en la estirpe de <i>E. coli</i> BL21(DE3). Amp ^R	EMBL
pETM14	Vector que permite expresar la proteína de interés en la estirpe de <i>E. coli</i> BL21(DE3). Km ^R	EMBL
pMR3679	Vector que permite expresar la proteína de interés bajo el promotor P _{van} , inducible por vanilato. Se integra en el genoma de <i>M. xanthus</i> mediante recombinación homóloga a través de un fragmento de 1,38 kb; Km ^R	Iniesta <i>et al.</i> , 2012
pMR4652	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>carF-Strep</i> en <i>E. coli</i> . Km ^R	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
pMR4697	Derivado de pET11b para sobre-expresar <i>HscarF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>HscarF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR4699	Derivado de pET11b para sobre-expresar <i>MmcarF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>MmcarF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR4883	Derivado de pET11b para sobre-expresar <i>MXAN_1676-1674</i> en <i>E. coli</i> . Amp ^R	Este trabajo
pMR4981	Derivado de pMR3679 con <i>P_{van}::flag-Cf1carF</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4982	Derivado de pMR3679 con <i>P_{van}::flag-Cf2carF</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4983	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>LicarF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (con uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR4984	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>Cf1carF-Strep</i> en <i>E. coli</i> . Km ^R	Este trabajo
pMR4985	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>Cf2carF-Strep</i> en <i>E. coli</i> . Km ^R	Este trabajo
pMR5021	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>carF₁₋₂₄₀-Strep</i> en <i>E. coli</i> . Km ^R	Este trabajo
pMR5022	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>carF₁₋₂₄₇-Strep</i> en <i>E. coli</i> . Km ^R	Este trabajo
pMR5027	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>Dr1carF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>Dr1carF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR5028	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>Dr2carF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>Dr2carF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR5029	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>CecarF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>CecarF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo
pMR5030	Derivado de pETM14 para sobre-expresar <i>DmcarF-Strep</i> en <i>E. coli</i> (<i>DmcarF</i> con el uso de codones optimizado para <i>M. xanthus</i>). Km ^R	Este trabajo

*Los homólogos de CarF, excepto la proteína de *M. xanthus*, se indican con un prefijo correspondiente a la abreviatura del nombre de la especie, y un número en caso de que existan varios parálogos en la misma especie.

III.5. Anexo 2: resultados no publicados y discusión sobre la biosíntesis de lípidos éter en *M. xanthus*

En el artículo publicado por Gallego-García, Monera-Girona, Pajares-Martínez *et al.* en *Science* (2019) se estableció que *M. xanthus* y los animales utilizan la misma enzima, CarF/TMEM189, para convertir el enlace éter de los precursores de tipo plasmaniletanolamina (AEPE) en el enlace vinil-éter de los plasmalógenos o plasmeniletanolamina (VEPE). Mientras que en mamíferos están bien establecidos los pasos que conducen a la síntesis del AEPE y las enzimas implicadas en ellos (véase Apartado I.2.3.1.1) (Padmanabhan *et al.*, 2022), poco se sabe sobre cómo *M. xanthus* lleva a cabo dicha síntesis y cuánto se asemeja a la de mamíferos, más allá del paso de conversión de AEPE en VEPE. Sí se ha establecido algo llamativo a partir de nuestro trabajo y el de otros grupos, y es que *M. xanthus* dispone de dos vías para la síntesis de AEPE, una principal en la que interviene ElbD y una secundaria en la que interviene MXAN_1676 (Gallego-García *et al.*, 2019; Lorenzen *et al.*, 2014a). Dado que *elbD* y MXAN_1676 forman parte de posibles operones, los otros genes de dichos operones podrían estar también implicados en la síntesis de AEPE. Del análisis del operón *elbA-E* mediante interrupción génica deriva que *elbE* (pero no *elbA* y *elbB*) parece requerirse, como *elbD*, en la biosíntesis de lípidos éter (Lorenzen *et al.*, 2014a). Con respecto al operón MXAN_1676-1674, solo se ha analizado el efecto de eliminar la función de MXAN_1676, por interrupción génica (Lorenzen *et al.*, 2014a) o por delección en fase (Gallego-García *et al.*, 2019), dado su parecido con la enzima de mamíferos ADHAPS/AGPS.

Los resultados presentados en este anexo (no publicados en ninguno de los artículos que constituyen el compendio) tienen como principal objetivo profundizar en la biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en mixobacterias en general y *M. xanthus* en particular.

III.5.1. Análisis de posibles dominios en las proteínas ElbA-E y MXAN_1676-1674

Para determinar qué funciones podría desempeñar cada uno de los genes de los posibles operones *elbA-E* y MXAN_1676-1674 en la formación de lípidos éter en *M. xanthus*, en este trabajo se ha realizado un análisis de posibles dominios en los productos génicos correspondientes usando las herramientas bioinformáticas *Conserved Domains* del NCBI y la base de datos *Pfam*.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Al analizar la secuencia de las proteínas ElbA-E con dichos programas bioinformáticos se obtuvieron los resultados recopilados en la Figura 7:

- **ElbA y ElbE** están anotadas como *NAD dependent epimerase/dehydratase* y tienen un dominio SDR (*short-chain dehydrogenases/reductases*), por lo que forman parte de la superfamilia de proteínas SDR. Estas enzimas, ampliamente distribuidas en el árbol de la vida, catalizan una gran variedad de reacciones metabólicas e interaccionan con distintos sustratos mediante su dominio C-terminal. Tanto ElbA como ElbE podrían actuar como reductasas, ya que presentan el motivo de unión al cofactor NAD y el motivo catalítico típicos de las SDR extendidas, lo que sugiere que su función podría ser redundante. Ambas proteínas comparten un 27% de identidad, que se encuentra en el rango de otras proteínas SDR (15-30%) que, a pesar de tener niveles bajos-medios de identidad, muestran propiedades estructurales similares (Gräff *et al.*, 2019; Oppermann *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2009).
- **ElbB** está anotada como una *haloacid dehalogenase-like hydrolase* (HAD). Las proteínas de la familia HAD están muy distribuidas en los seres vivos y catalizan importantes funciones en el metabolismo primario y secundario. Aunque tienen especificidad por múltiples sustratos y muestran diferentes actividades enzimáticas, el 80% de las proteínas HAD son fosfatasa. A pesar de los niveles bajos-medios de identidad (15-30% identidad) que tienen entre sí, todas las proteínas HAD presentan tres motivos (DXD, T/S y K) que también se encuentran en la secuencia de ElbB (Caparrós-Martín *et al.*, 2013; Kuznetsova *et al.*, 2015).
- **ElbC** está anotada como una *lactate racemase N-terminal domain*. Los programas bioinformáticos utilizados solo revelaron que tiene un dominio de función desconocida, DUF2088, encontrado en algunos procariotas.
- **ElbD** tiene 4 dominios ya descritos en la bibliografía y confirmados en nuestro análisis: un dominio *fatty acyl-CoA reductase* (Re/FAR) con un 30% de identidad con la enzima FAR1 humana (que reduce un ácido graso a alcohol graso durante la síntesis de lípidos éter), un dominio *long-chain fatty acid CoA synthase* (A/ACS), un dominio *acyl carrier protein/thiolation domain* (ACP/T) y un dominio *dihydroxyacetone phosphate acyltransferase-like* (AT/LPLATs) que recuerda a la proteína DHAPAT/GNPAT, implicada en la síntesis de lípidos éter en mamíferos (Lorenzen *et al.*, 2014a).

III. Publicaciones y resultados no publicados

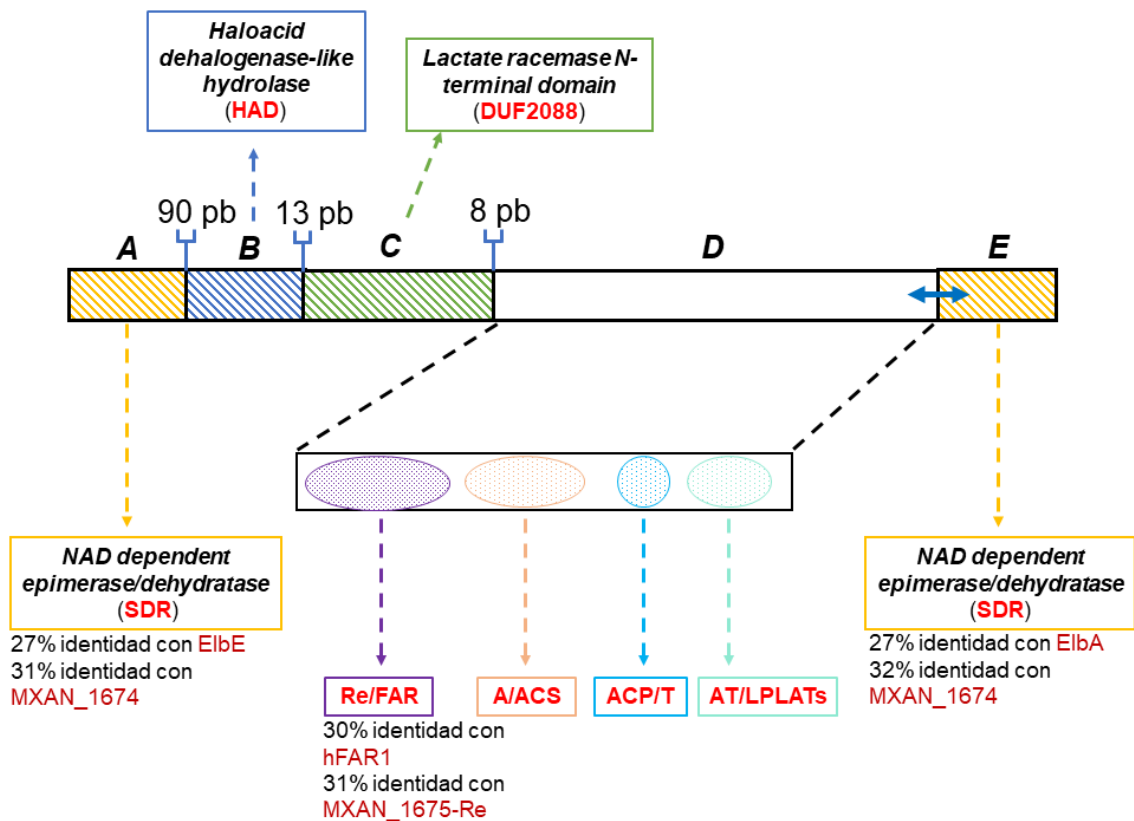


Figura 7. Anotación de los genes del operón *elbA-E* y dominios de las correspondientes proteínas predichos por programas bioinformáticos. La anotación de cada proteína en *Pfam* se indica en letra de color negro y cursiva. Los dominios encontrados para cada proteína usando el buscador de dominios del NCBI se indican en letra de color rojo y cursiva. Los rectángulos representan los 5 genes del posible operón (se indican también las distancias intergénicas en pb), mientras que los óvalos representan los 4 dominios descritos para ElbD. Con una doble flecha azul se indica que los genes en cuestión están acoplados traduccionalmente. Se usa un código de colores para asignar a cada gen su correspondiente anotación y los dominios descritos. El código de colores para *elbA* y *elbE* es similar ya que ambos genes están anotados como SDR.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis bioinformático con las proteínas MXAN_1676-1674 se muestran en la Figura 8.

- **MXAN_1676** está anotada como una *alkyldihydroxyacetone phosphate acyltransferase-like* (AGPS) y, de hecho, muestra un parecido notable con la enzima ADHAPS/AGPS humana (46% identidad). Además, MXAN_1676 contiene los dos dominios característicos de la AGPS: *FAD binding* y *FAD oxidase C*.
- **MXAN_1675**, como ya se había descrito, presenta dos dominios: un dominio *fatty acyl-CoA reductase* (Re/FAR), con un 32% de identidad con la enzima FAR1 humana y un 31% de identidad con el dominio Re/FAR de la proteína ElbD; un dominio *lysophospholipid acyltransferase* (AT/LPLAT) con un 35% de identidad con el dominio aciltransferasa presente en la enzima GNPAT humana.

III. Publicaciones y resultados no publicados

- **MXAN_1674** está anotada, al igual que ElbA y ElbE, como una *NAD dependent epimerase/dehydratase* con un dominio SDR. Por tanto, entre las dos rutas de síntesis de lípidos éter propuestas hay tres genes (*elbA*, *elbE* y *MXAN_1674*) que cifran enzimas con una posible actividad reductasa y que podrían ser redundantes. Así, *MXAN_1674* comparte un 31% de identidad con *ElbA* y un 32% con *ElbE*.

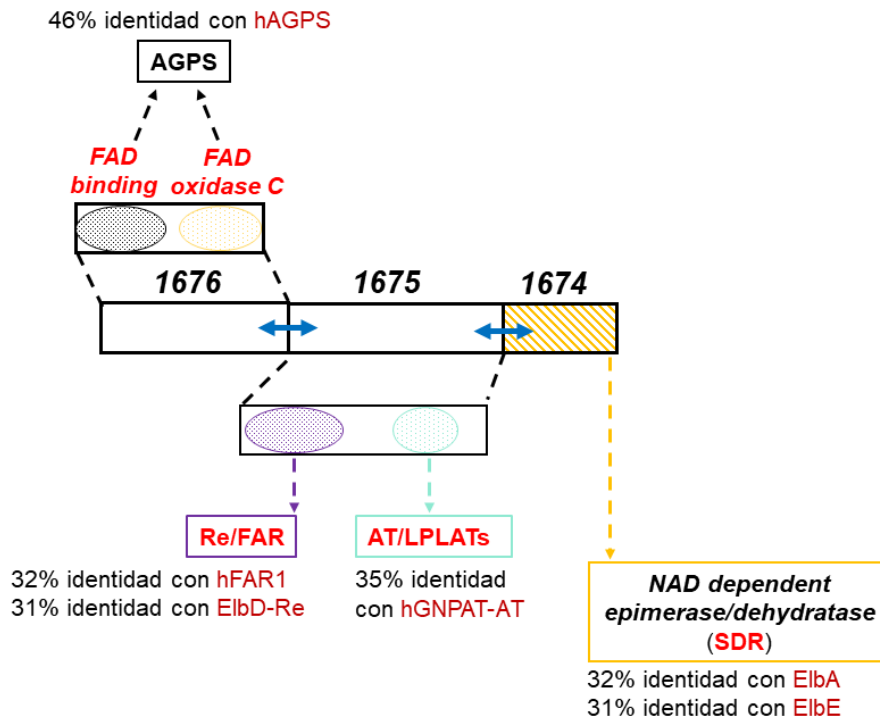


Figura 8. Anotación de los genes del operón *MXAN_1676-1674* y dominios de las correspondientes proteínas predichos por programas bioinformáticos. La anotación de cada proteína en *Pfam* se indica en letra de color negro y cursiva. Los dominios encontrados para cada proteína usando el buscador de dominios del NCBI se indican en letra de color rojo y cursiva. Los rectángulos representan los 3 genes del operón, mientras que los óvalos representan los diferentes dominios descritos para *MXAN_1676* y *MXAN_1675*. Con una doble flecha azul se indica que los genes en cuestión están acoplados traduccionalmente. Se usa un código de colores para asignar a cada gen su correspondiente anotación y los dominios descritos. *hAGPS*: *AGPS* humana. *hFAR1*: *FAR1* humana. *hGNPAT-AT*: dominio *AT* de *GNPAT* humana.

III.5.2. Posible ruta de síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*

Teniendo en cuenta los dominios proteicos predichos para las proteínas *ElbA-E* y *MXAN_1676-1674*, y lo establecido en mamíferos (véase Apartado I.2.3.1.1), cabe especular sobre una posible secuencia de pasos para la síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*, que queda reflejada en la Figura 9. En dicha secuencia se ha asignado una posible función a cada una de las proteínas de los dos operones, a excepción de *ElbC*, para la cual los programas bioinformáticos no aportan ninguna información relevante.

III. Publicaciones y resultados no publicados

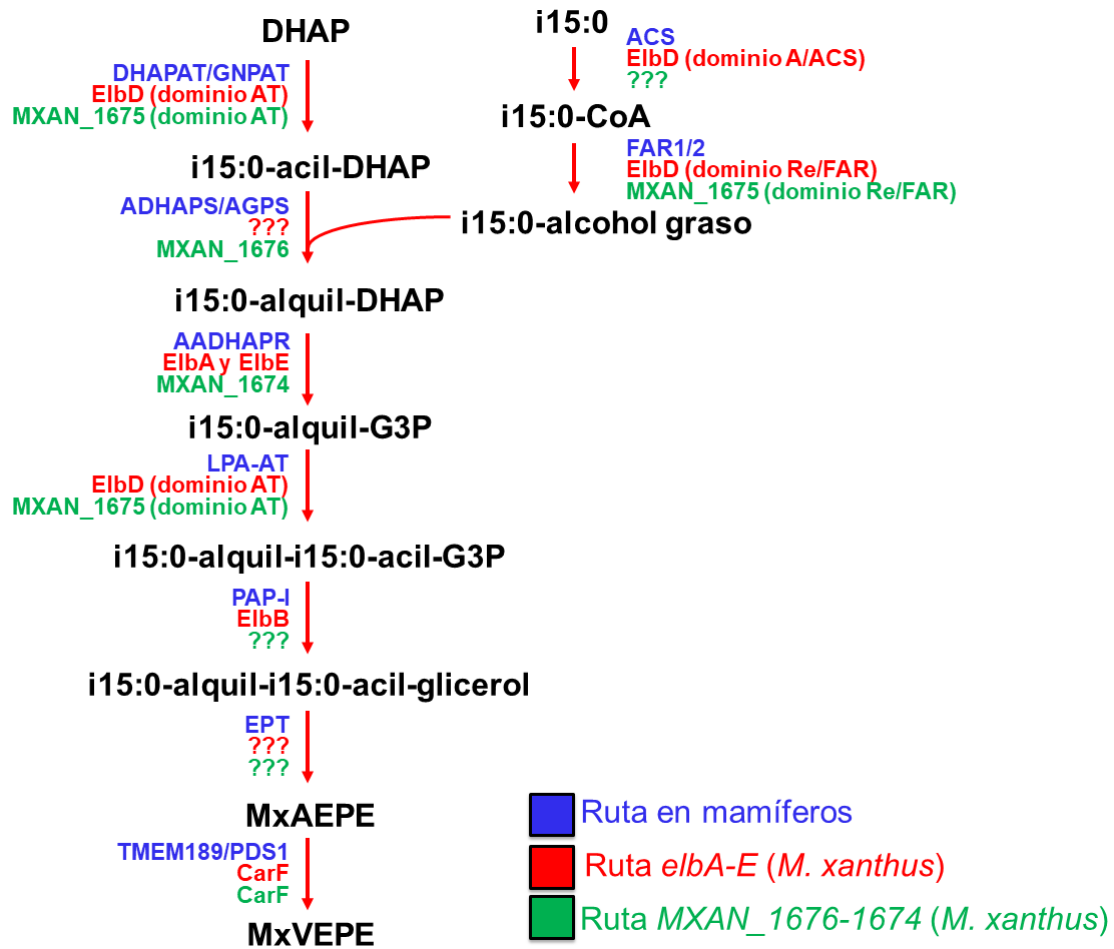


Figura 9. Posible ruta de síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*. El nombre de los sustratos y productos que intervienen en cada reacción se indica en letra de color negro. Mediante un código de colores se indica el nombre de las enzimas que participan en la ruta de síntesis de mamíferos y las dos rutas de *M. xanthus*.

Como ocurre en mamíferos, la síntesis de lípidos éter en *M. xanthus* podría comenzar con la esterificación en *sn*-1 de la DHAP por un acil-CoA (i15:0-CoA, en *M. xanthus*) dando lugar a acil-DHAP (i15:0-acil-DHAP). Dicho paso podría realizarlo el dominio AT de ElbD en la ruta mayoritaria y el dominio AT de MXAN_1675 en la ruta minoritaria, ya que ambas proteínas muestran cierta homología con la enzima DHAPAT/GNPAT, que cataliza el paso equivalente en mamíferos. En paralelo, el dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 podría reducir el i15:0-CoA a i15:0-alcohol graso, como hace la proteína FAR1/2 en mamíferos. Cabe destacar que la activación del ácido graso i15:0 a i15:0-CoA requiere una ACS. Aunque en *M. xanthus* hay, al menos, otras 59 proteínas con dominio A/ACS que podrían catalizar este paso de activación, es posible que la enzima multifuncional ElbD utilice su propio dominio A/ACS para activar por sí misma los ácidos grasos que intervienen en la síntesis de lípidos éter. Por el contrario, la ruta secundaria no cuenta con una proteína con dominio A/ACS y,

III. Publicaciones y resultados no publicados

por tanto, debe tomar el i15:0-CoA generado por otras ACS de *M. xanthus*. El siguiente paso podría consistir en el reemplazo del grupo acilo del i15:0-acil-DHAP por un alcohol graso (i15:0-alcohol graso) para dar lugar al i15:0-alkuil-DHAP, el primer intermediario con enlace éter. En *M. xanthus*, esta reacción estaría catalizada por la proteína MXAN_1676, que comparte un 46% de identidad con la AGPS humana. Curiosamente, no se han encontrado otras proteínas con similitud a AGPS o MXAN_1676 en *M. xanthus*, por lo que resulta enigmático cómo podría generarse el enlace éter en la ruta en la que participa ElbD.

El siguiente paso podría consistir en la reducción del i15:0-alkuil-DHAP a i15:0-alkuil-G3P. Tres de las proteínas de estudio podrían actuar como reductasas, al tener un dominio SDR: ElbA y ElbE en una ruta y MXAN_1674 en la otra. Después, la posición *sn-2* sería esterificada con un i15:0-CoA para dar lugar a i15:0-alkuil-i15:0-acil-G3P mediante la acción de una aciltransferasa (AT). Aunque en la ruta que proponemos los dominios AT de ElbD y MXAN_1675 ya participan en un paso previo, no se puede descartar que también actúen en la formación del i15:0-alkuil-i15:0-acil-G3P. Posteriormente, una fosfatasa eliminaría el grupo fosfato dando lugar a i15:0-alkuil-i15:0-acil-glicerol. Ya que ElbB está anotada como una proteína HAD, y teniendo en cuenta que la mayoría de las proteínas de esta familia son fosfatasas, es posible que ElbB catalice este paso en la ruta principal de formación de lípidos éter en *M. xanthus*. Sin embargo, no se ha encontrado una fosfatasa análoga en la otra ruta. Finalmente, el MxAEPE se formaría a partir de i15:0-alkuil-i15:0-acil-glicerol por una proteína homóloga a la EPT aún por identificar en *M. xanthus*.

Es evidente que en ambas rutas de síntesis de lípidos éter hay proteínas o dominios proteicos que se asemejan a las enzimas de mamíferos. También en ambas rutas faltan elementos proteicos esenciales para la formación de estos fosfolípidos. En base a estos resultados, la ruta cifrada por el operón *MXAN_1676-1674* podría ser más parecida a la ruta de mamíferos al tener proteínas con las tres actividades enzimáticas esenciales en la biosíntesis (AGPS, FAR y un dominio AT parecido al de la GNPAT). Por el contrario, en la ruta cifrada por el operón *elbA-E* falta una proteína que sea parecida a la AGPS. Esta ruta, por tanto, debe seguir un mecanismo de síntesis del enlace éter diferente al de mamíferos, independiente de AGPS y dependiente de la proteína multifuncional ElbD. ElbD también cuenta con un dominio ACP/T que, en complejos multienzimáticos, puede actuar como un “brazo oscilante” que sirve para anclar diferentes sustratos (principalmente ácidos grasos activados o aminoácidos) a la parte proteica y desplazarlos entre los diferentes dominios (Pugh & Wakil, 1965). Por

III. Publicaciones y resultados no publicados

tanto, es posible que *ElbD* también cuente con su propio “brazo oscilante” que aproxime los sustratos a los diferentes dominios proteicos para que se produzcan las reacciones.

III.5.3. Efecto de la falta de función de *MXAN_1675* y *MXAN_1674*

Los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo sugieren que *MXAN_1675* y *MXAN_1674* podrían participar en la biosíntesis de lípidos con enlace éter en *M. xanthus*. De ser así, estos genes formarían parte, junto con *MXAN_1676*, de una ruta de biosíntesis alternativa a la formada por *elbD* y, posiblemente, los genes adyacentes (Gallego-García *et al.*, 2019). Sabiendo que los niveles de plasmalógenos y lípidos éter correlacionan con la capacidad de *M. xanthus* para responder a la luz, se realizaron deleciones en fase de los genes *MXAN_1675* ($\Delta 1675$) y *MXAN_1674* ($\Delta 1674$), y se analizó el efecto fenotípico que supone la ausencia de estos genes. Para construir los mutantes por deleción, se amplificaron regiones aguas arriba (*up*) y aguas abajo (*down*) de cada gen. Puesto que estos genes forman parte de un operón y están acoplados traducionalmente, las regiones amplificadas incluyen la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros aminoácidos de la proteína (14 aminoácidos para *MXAN_1675* y 19 aminoácidos para *MXAN_1674*) y los últimos (18 aminoácidos para *MXAN_1675* y 8 aminoácidos para *MXAN_1674*). De esta forma se evita que la traducción de los siguientes genes del operón se vea afectada al generar la deleción. Los fragmentos *up* y *down* se clonaron en un plásmido que contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina y uno que confiere sensibilidad a galactosa (Figura 10A) y se introdujeron en *M. xanthus* para generar las estirpes mutantes. Tras la integración de dichos plásmidos en el genoma de *M. xanthus* mediante un primer hecho de recombinación homóloga, las colonias resultantes (merodiploides) se seleccionaron por su resistencia a kanamicina. Creciendo los merodiploides en ausencia de kanamicina se produjo la pérdida del plásmido mediante un segundo hecho de recombinación homóloga y la generación de haploides. Las colonias haploides fueron seleccionadas mediante siembra en placas de medio con galactosa 2% (ya que los merodiploides portadores del gen *galk* no pueden sobrevivir en este medio) y, por PCR, se determinó qué colonias eran portadoras de la deleción del gen de interés. Una vez generados los mutantes simples $\Delta 1675$ y $\Delta 1674$ se analizó su fenotipo en luz, comparándolo con el de la estirpe silvestre (WT), la estirpe $\Delta elbD$ y la estirpe $\Delta 1676$. Los mutantes $\Delta 1675$ y $\Delta 1674$ adquirieron una coloración roja en la luz, similar a la del mutante $\Delta 1676$, que apenas se distingue de la que adquiere la estirpe WT. Por comparación, el mutante $\Delta elbD$ (usado como control) mostró una coloración roja menos intensa que cualquiera de los mutantes en el operón *MXAN_1676-1674* (Figura 10B). Para analizar con mayor claridad si los genes *MXAN_1675* y *MXAN_1674* contribuyen a la carotenogénesis se procedió a generar estirpes mutantes de dichos genes en un fondo $\Delta elbD$, donde la ruta principal de síntesis de lípidos éter está impedida. Al analizar el fenotipo de color para los dobles mutantes $\Delta elbD \Delta 1675$ y $\Delta elbD \Delta 1674$ se observó que ambas estirpes, al igual que el mutante $\Delta elbD \Delta 1676$, son incapaces de

III. Publicaciones y resultados no publicados

responder a la luz (fenotipo Car⁻) (Figura 10C). Para correlacionar el fenotipo en carotenogénesis con el contenido en lípidos éter y plasmalógenos de cada estirpe se extrajeron los lípidos, y se analizaron por GC-MS los FAMES de los mutantes $\Delta elbD \Delta 1675$ y $\Delta elbD \Delta 1674$. En este análisis el plasmalógeno MxVEPE se detecta como iso-15:0-dimetilacetal (i15:0-DMA) y sus precursores con enlace éter como iso-15:0-O-alkil-glicerol bis-trimetilsilil éter (i15:0-OAG-bisTMS). Los resultados obtenidos indicaron que los mutantes analizados carecen de i15:0-DMA e i15:0-OAG-bisTMS (Figura 10C), por lo que se concluye que *MXAN_1675* y *MXAN_1674* colaboran en la ruta secundaria de síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*.

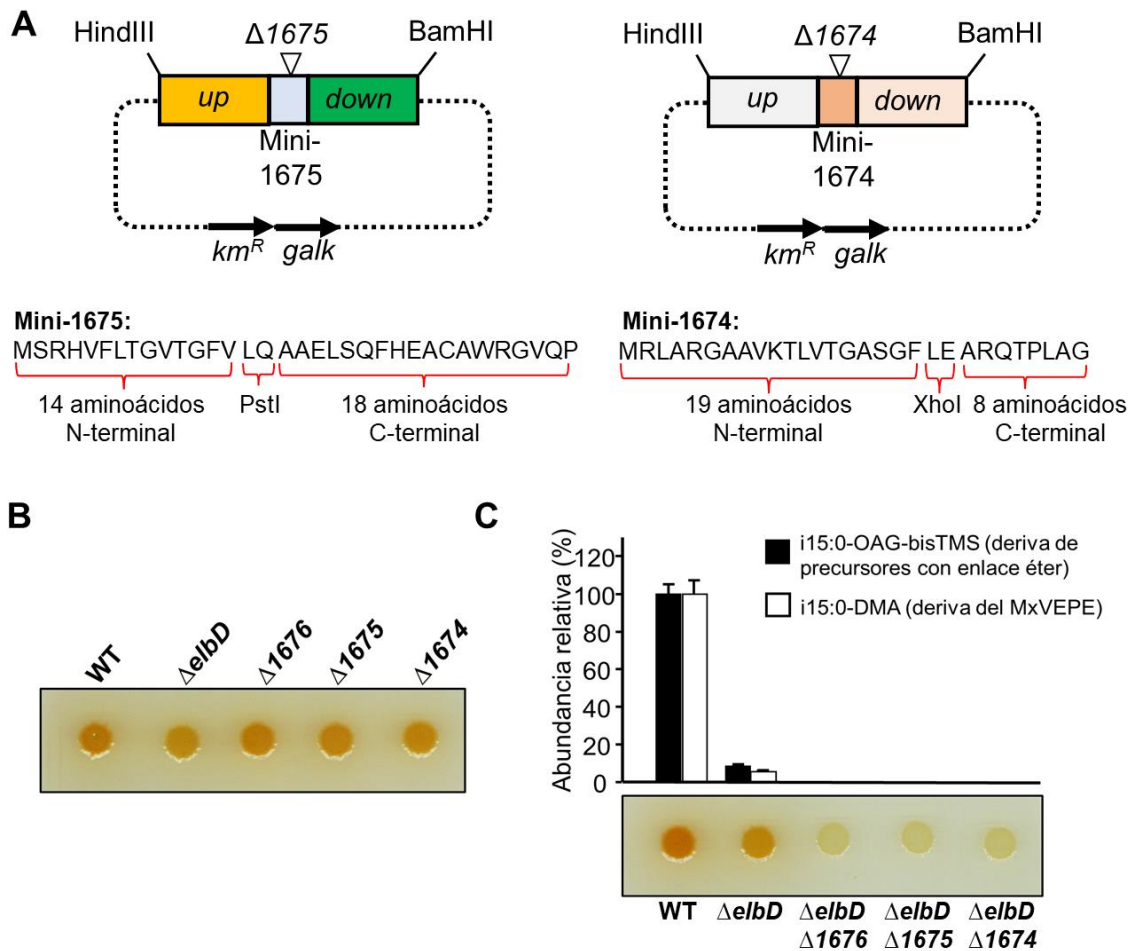


Figura 10. Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta 1675$ y $\Delta 1674$. **A)** Plásmidos generados para deletar los genes *MXAN_1675* y *MXAN_1674*. Ambos plásmidos incluyen la región aguas arriba (*up*) y aguas abajo (*down*) del gen a deletar, así como la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros y los últimos aminoácidos de la proteína cifrada por dicho gen. Se indica la secuencia de aminoácidos de la “mini” proteína generada en cada caso. *km^R*: gen de resistencia a kanamicina. *galk*: gen que confiere sensibilidad a galactosa. Se indican los sitios de restricción empleados. **B)** Fenotipo de color a las 48 horas de iluminación de las estirpes indicadas. **C)** Análisis de FAMES (arriba) y fenotipo de color tras 48 horas de iluminación (abajo) de las estirpes indicadas. La abundancia relativa del i15:0-DMA y del i15:0-OAG-bisTMS se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los datos se han normalizado en base a una cantidad fija del estándar interno 17:0 y los niveles del WT se ajustaron al 100%.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Aunque al diseñar la delección de *MXAN_1675* y *MXAN_1674* se dejaron nucleótidos al principio y al final de cada gen para generar una delección en fase que permita la traducción de una miniproteína y, así, evitar afectar la traducibilidad del resto de genes del operón, siempre es conveniente comprobar que el fenotipo observado se debe exclusivamente a la falta del gen deletado y no a un efecto polar. Para comprobarlo, se expresaron *MXAN_1675* y *MXAN_1674*, bajo el control del promotor P_{van} inducible por vanilato, en las estirpes $\Delta elbD \Delta 1675$ y $\Delta elbD \Delta 1674$, respectivamente (Figura 11A). A continuación, se procedió a analizar, mediante un ensayo cualitativo de cambio de color en medio sólido, si las estirpes responden a la luz en presencia del inductor vanilato. Como puede observarse en la Figura 11B, las estirpes $\Delta elbD \Delta 1675 + P_{van}::1675$ y $\Delta elbD \Delta 1674 + P_{van}::1674$ se pusieron rojas cuando fueron iluminadas en presencia de vanilato, al igual que las estirpes utilizadas como control ($\Delta elbD \Delta 1676 + P_{van}::elbD$ y $\Delta elbD \Delta 1676 + P_{van}::1676$). Además, el análisis de FAMES confirmó que el fenotipo Car^+ que han adquirido estas estirpes se correlaciona con la reaparición de lípidos con enlace éter y plasmalógenos (Figura 11B). Parece, por tanto, que el fenotipo defectuoso para la carotenogénesis se debe únicamente a la delección de los genes de estudio.

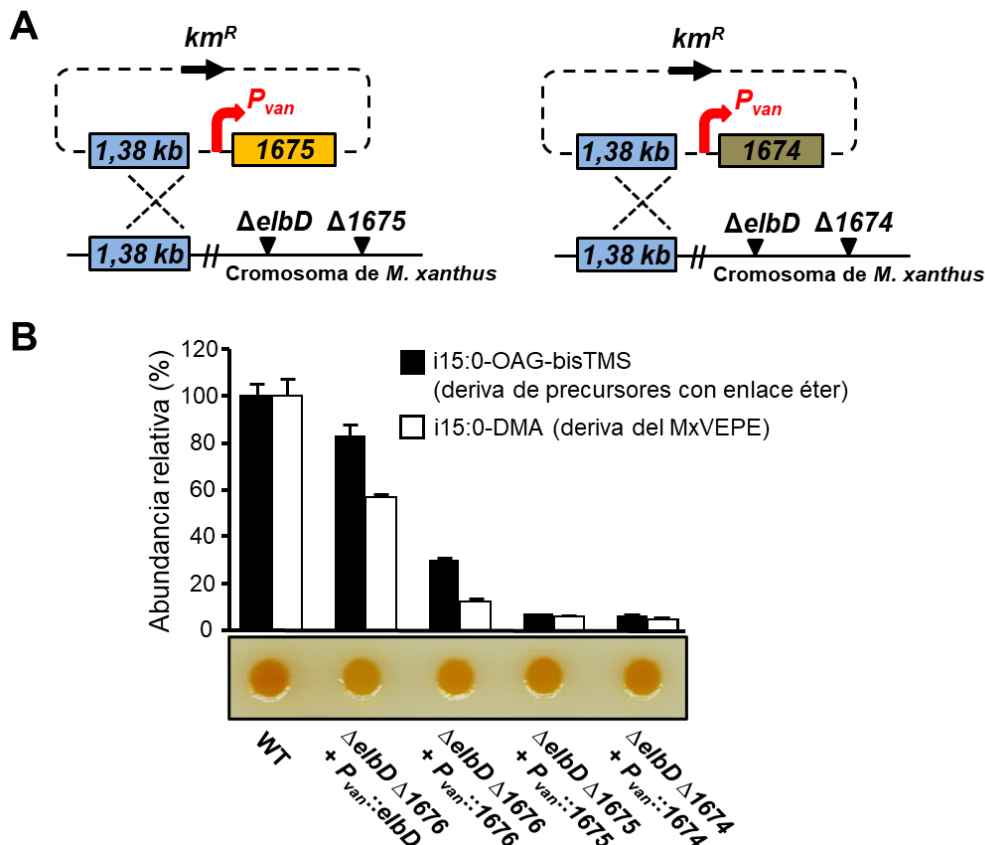


Figura 11. Análisis de complementación de las delecciones $\Delta 1675$ y $\Delta 1674$. **A)** Plásmidos generados para expresar *MXAN_1675* y *MXAN_1674* bajo el control del promotor P_{van} y su integración en el genoma de *M. xanthus* por recombinación homóloga (representada como rayas discontinuas) mediante un fragmento de 1,38 kb presente tanto en el plásmido como en el genoma de *M. xanthus*. km^R : gen de resistencia a kanamicina. **B)** Análisis de FAMES (arriba) y

III. Publicaciones y resultados no publicados

fenotipo de color tras 48 horas de iluminación (abajo) de las estirpes indicadas crecidas con vanilato 0,5 mM. La abundancia relativa del i15:0-DMA y del i15:0-OAG-bisTMS se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los datos se han normalizado en base a una cantidad fija del estándar interno 17:0 y los niveles del WT se ajustaron al 100%.

Para completar el análisis genético del operón *MXAN_1676-1674*, se procedió a deletar en fase todo el operón. Para ello se construyó un plásmido con la región *up* de *MXAN_1676* y la región *down* de *MXAN_1674*. Al igual que antes, entre la región *up* y *down* se incluyó la secuencia de nucleótidos que determina los primeros 10 aminoácidos de *MXAN_1676* y los últimos 8 aminoácidos de *MXAN_1674* (Figura 12A). El plásmido resultante se introdujo en la estirpe silvestre y en la $\Delta elbD$ para generar los mutantes $\Delta 1676-1674$ y $\Delta elbD \Delta 1676-1674$, respectivamente, y se analizó su capacidad para responder a la luz. La delección de todo el operón en fondo silvestre apenas tuvo efecto sobre la carotenogénesis (al igual que ocurría con la delección de los tres genes por separado), pero sí se obtuvo un fenotipo Car^- al deletar el operón en fondo $\Delta elbD$ (compárese la Figura 12B con la Figura 10B y C).

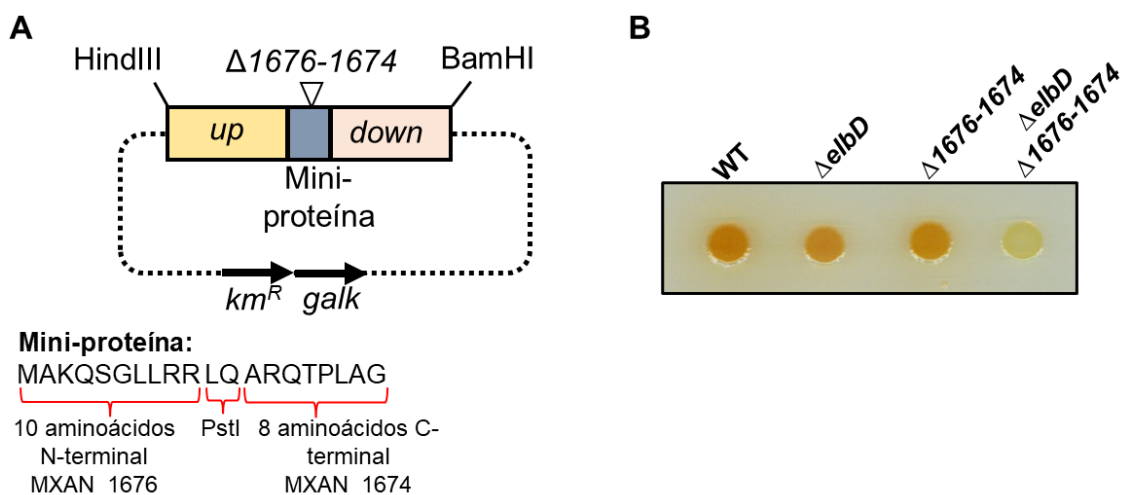


Figura 12. Generación de mutantes $\Delta 1676-1674$ y $\Delta elbD \Delta 1676-1674$ y análisis fenotípico. **A)** Plásmido generado para deletar el operón *MXAN_1676-1674*. Este plásmido incluye la región aguas arriba (*up*) de *MXAN_1676* y la región aguas abajo (*down*) de *MXAN_1674*, así como la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros aminoácidos de *MXAN_1676* y los últimos aminoácidos de *MXAN_1674*. Se indica la secuencia de aminoácidos de la “mini” proteína generada. *km^R*: gen de resistencia a kanamicina. *galk*: gen que confiere sensibilidad a galactosa. Se indican los sitios de restricción empleados. **B)** Fenotipo de color a las 48 horas de iluminación de las estirpes indicadas.

La estirpe $\Delta elbD \Delta 1676-1674$ se utilizó para corroborar, mediante análisis de complementación, las conclusiones extraídas a partir de las estirpes portadoras de las delecciones individuales. Para ello, como control, se generó un plásmido que permite

III. Publicaciones y resultados no publicados

expresar *MXAN_1676-1674* bajo el control de P_{van} (inducible por vanilato) y dicho plásmido, así como los que expresan cada uno de los tres genes por separado, se introdujeron en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676-1674$ (Figura 13A). Como puede observarse en la Figura 13B, se recuperó la capacidad de responder a la luz cuando se expresó el operón completo, pero no cuando se expresó individualmente cualquiera de los tres genes. Estos resultados confirman que *MXAN_1676* no basta para la síntesis de lípidos éter por la ruta minoritaria y que se requieren también tanto *MXAN_1675* como *MXAN_1674* (Figura 13B).

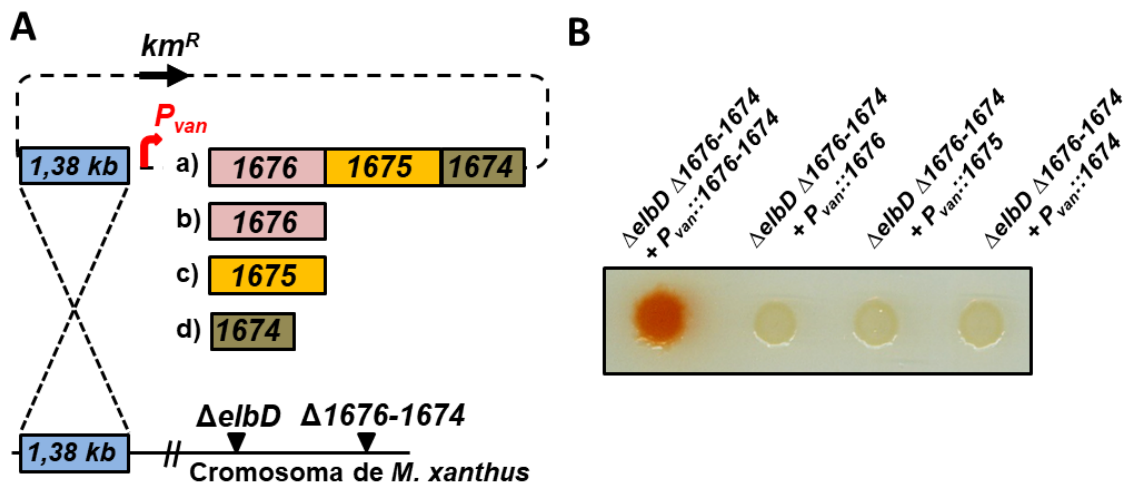


Figura 13. Análisis de complementación de la delección $\Delta 1676-1674$. **A)** Plásmidos utilizados para expresar *MXAN_1676-1674*, así como los tres genes que constituyen el operón por separado, bajo el promotor P_{van} en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676-1674$, donde se integra por recombinación homóloga (representada como rayas discontinuas) a través de un fragmento de 1,38 kb. km^R : gen de resistencia a kanamicina. **B)** Fenotipo de color de las estirpes indicadas a las 48 horas de iluminación y en presencia de vanilato 0,5 mM.

III.5.4. Estudio del dominio Re/FAR de las proteínas ElbD y *MXAN_1675*

Como se ha comentado anteriormente, las dos rutas de síntesis de lípidos éter en *M. xanthus* tienen una proteína con un dominio Re/FAR (Figura 14A): el segmento proteico que abarca los aminoácidos 6-544 de ElbD y el que abarca los aminoácidos 3-320 de *MXAN_1675*. Para estudiar la implicación de dichos dominios proteicos en la síntesis de lípidos éter en *M. xanthus* se procedió a generar las versiones $ElbD_{418-1470}$ y $1675_{285-868}$, que carecen de la mayor parte del dominio Re/FAR. En ambos casos se han tenido en cuenta las predicciones de estructura secundaria de ElbD y *MXAN_1675* y los aminoácidos importantes en la catálisis, para eliminar parte del dominio Re/FAR sin alterar demasiado la estabilidad o funcionalidad del resto de la proteína (ya que ambas proteínas tienen otros dominios que podrían ser importantes en la

III. Publicaciones y resultados no publicados

biosíntesis de lípidos éter). Para comprobar que las proteínas truncadas, expresadas en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1675$ bajo el control de P_{van} , son estables en *M. xanthus* se les añadió una etiqueta FLAG en el extremo amino (Figura 14B) y se realizó un ensayo de *Western blot* con anticuerpos anti-FLAG. Como puede observarse en la Figura 14C, las versiones FLAG-ElbD₄₁₈₋₁₄₇₀ y FLAG-1675₂₈₅₋₈₆₈ se expresan de manera estable en *M. xanthus* y, sin embargo, no complementan la falta de ElbD o de MXAN_1675, respectivamente. Por lo tanto, el dominio Re/FAR parece ser necesario para la función de ElbD y MXAN_1675 en sus respectivas rutas de síntesis de lípidos éter.

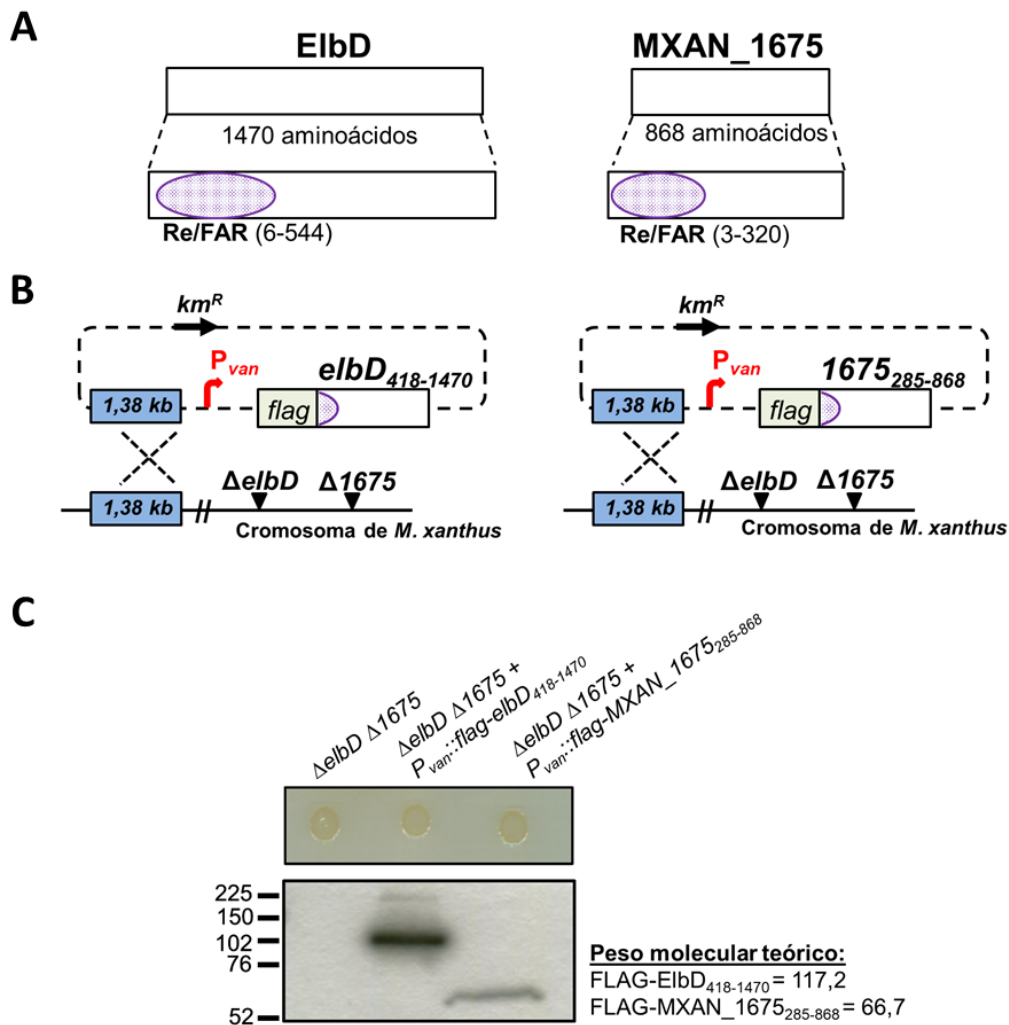


Figura 14. Delección de parte del dominio Re/FAR en ElbD y MXAN_1675. **A)** Dominio Re/FAR predicho para las proteínas ElbD y MXAN_1675. **B)** Plásmidos generados para expresar FLAG-ElbD₄₁₈₋₁₄₇₀ y FLAG-1675₂₈₅₋₈₆₈ bajo el control del promotor P_{van} y su integración en el genoma de *M. xanthus* (fondo $\Delta elbD \Delta 1675$) por recombinación homóloga (representada como rayas discontinuas) a través de un fragmento de 1,38 kb. km^R : gen de resistencia a kanamicina. **C)** Fenotipo de color a las 48 horas de iluminación y en presencia de vanilato 0,5 mM de las estirpes indicadas (arriba) y análisis de la estabilidad de FLAG-ElbD₄₁₈₋₁₄₇₀ y FLAG-1675₂₈₅₋₈₆₈ por *Western blot* usando anticuerpos anti-FLAG a partir de extractos celulares de las estirpes correspondientes crecidas con vanilato 0,5 mM. (abajo). Se muestran los pesos moleculares (en kDa) de las proteínas usadas como marcadores de tamaño y de las proteínas de estudio.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Para analizar si el dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 actúa como tal se realizó un ensayo de complementación química con un alcohol graso (octadecanol) y un ácido graso (ácido esteárico). Mientras que el ácido graso sería el sustrato sobre el que actuaría Re/FAR, el alcohol sería el producto. Por tanto, si el dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 puede catalizar esta reacción, su falta sería complementable por el octadecanol, pero no por el ácido esteárico. Para realizar dichos experimentos, se depositaron alícuotas de octadecanol, ácido esteárico y el plasmalógeno HsVEPE1 como control positivo (disueltos en cloroformo) en placas de medio sólido suplementado o no con vanilato. Una vez evaporado el cloroformo se depositaron sobre los compuestos secados alícuotas de cultivos líquidos de las estirpes $\Delta elbD \Delta 1675$, $\Delta elbD \Delta 1675 + P_{van.::flag-elbD}_{418-1470}$ y $\Delta elbD \Delta 1675 + P_{van.::flag-1675}_{285-868}$. Como se puede ver en la Figura 15, las estirpes que expresan las versiones truncadas de ElbD o de MXAN_1675 mostraron cierto nivel de fotoinducción cuando se incubaron con el octadecanol en las placas de medio con vanilato, pero mantuvieron el fenotipo Car⁻ al ser incubadas con ácido esteárico. Por lo tanto, el dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 parece estar realmente implicado en la conversión de un ácido graso en un alcohol graso que, como ocurre en mamíferos, sería fundamental para la formación del enlace éter en el siguiente paso. Cabe destacar, no obstante, que la coloración roja que se obtuvo al complementar con octadecanol no fue tan intensa como la que se vio al complementar con HsVEPE1. Esto podría deberse a que las células de *M. xanthus* captan con mayor facilidad un plasmalógeno suministrado exógenamente que un alcohol, o a que la actividad enzimática que debe generar el enlace éter a partir del alcohol graso (posiblemente, MXAN_1676 en la ruta minoritaria, y una proteína/dominio proteico por asignar en la ruta mayoritaria) no reconozca tan eficazmente el octadecanol como el i15:0 alcohol graso, que se espera sea su sustrato natural en *M. xanthus*.

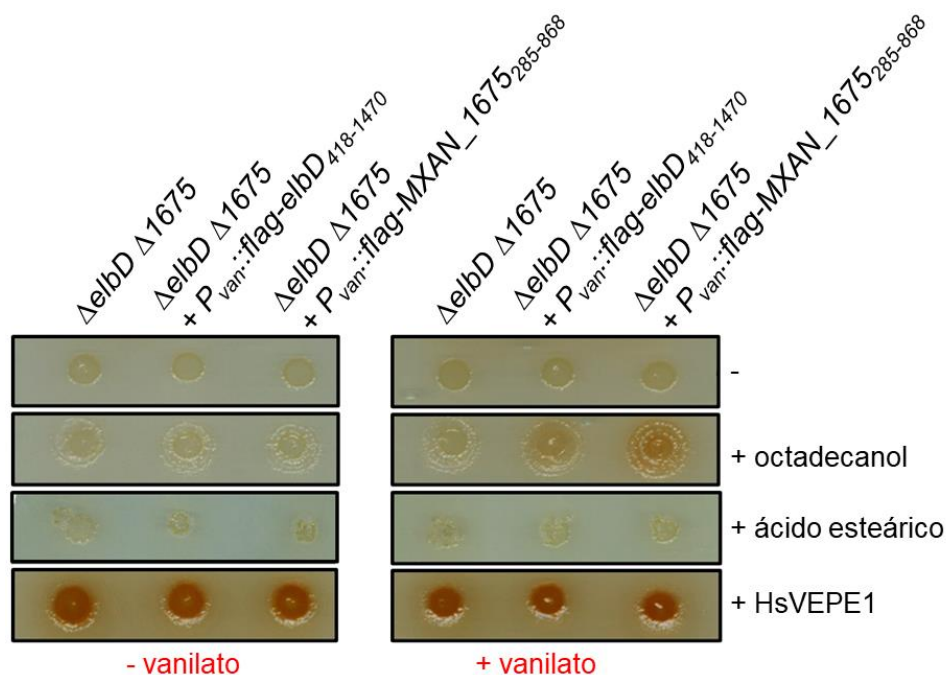


Figura 15. Análisis de la implicación del dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 en la síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*. Análisis de la respuesta a la luz de las estirpes de *M. xanthus* indicadas, complementadas químicamente con 40 nmoles de octadecanol, ácido esteárico o HsVEPE1 en placas de medio sin o con vanilato 0,5 mM.

III.5.5. Complementación con las enzimas humanas implicadas en la síntesis de lípidos éter

Como ya se ha comentado, MXAN_1676 muestra una similitud notable con la enzima ADHAPS/AGPS de mamíferos, mientras que ElbD y MXAN_1675 contienen dominios Re/FAR y AT que se parecen, respectivamente, a las enzimas FAR1 y GNPAT. Dado que *MXAN_1676*, *MXAN_1675* y *elbD* son esenciales en la biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus*, y su delección genera un fenotipo defectuoso en la carotenogénesis, nos preguntamos si las enzimas humanas serían capaces de complementar la falta de las proteínas bacterianas y restablecer el fenotipo silvestre para la carotenogénesis.

En primer lugar, se intentó complementar la delección de *MXAN_1676* expresando en *M. xanthus* la enzima humana hAGPS (Figura 16A). Para ello, se generaron plásmidos portadores de la secuencia del gen *hAGPS* (bajo el control del promotor P_{van}) con el uso de codones optimizado para *M. xanthus* y con o sin la etiqueta FLAG en el extremo 5' del gen. Tras introducir ambos plásmidos en el mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ (Figura 16B), se analizó el fenotipo de color en respuesta a la iluminación. Como puede observarse en la Figura 16C, ninguna de las dos estirpes que expresan hAGPS

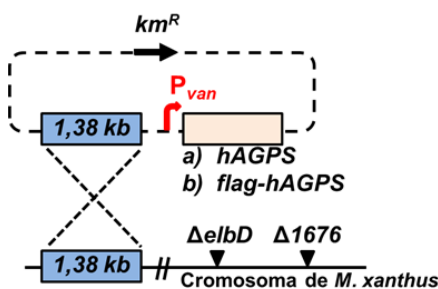
III. Publicaciones y resultados no publicados

respondieron a la luz. Que hAGPS no sea capaz de suplir la falta de MXAN_1676, a pesar de la similitud entre ambas (Figura 16A), no parece deberse a que la proteína humana no se exprese bien o sea inestable en *M. xanthus*, ya que al menos la versión con la etiqueta FLAG pudo detectarse mediante *Western blot* (Figura 16D). Quizás se deba a que MXAN_1676, para ser funcional, tenga que formar un complejo con las otras dos proteínas que participan en la misma ruta (MXAN_1675 y MXAN_1674) y a que hAGPS sea incapaz de establecer las interacciones necesarias para formar dicho complejo.

A

1676	1	-----VAKQSGIL--RR--LGNVALNEVSRERFESTSPT--ES--SGDTRFPPTP
hAGPS	1	MAEAAAAAGGTGLGAGASYGSAADRRDRDPDPDRAGRRIRVLSGHIHLGRPREAISTNECKARRASAATAAFDAIPAAQESGTIP
consenso	 *
1676	43	AASKVEESLEGWGFADNRFFVKPDGSTVLGTGRYNISNVALPDLMQWFAGKLAASPFGYDNRNEPH-YPPIPAAKKNLVAAL
hAGPS	85	KKRQVVMKWNWGWYNDSEFFFNKKGQIELTGKRYPISGMLLETFKEWIQNTLQVNEHKTTSKASLNESTTPPSVVNEDFDHDL
consenso	 *
1676	126	REFLKEEQLDIPKQIRRRHGHHTGGELIADRYSKLDLRPDDVVFPRGHDVVRIVEVATQHGACVIFGGGTNVLEELRIPLS
hAGPS	169	REI--NISYSQVADDRVFRHGHCHLHETLIREGMFRIPDVLVPTCHDQVVKLVNACKYNLCIPIGGGTSVSYELMCPAD
consenso		. * . . . *
1676	210	INVEALRIPLSEERLVIAVDMRQMNRIWVDPVNRMACTEAGATGRHMEIAKGFETMGHEPDSLEFSTGGVIAANNASGMK
hAGPS	250	ISVSYELMCPADETRTIISIDTSQMNRIWVDENNLTAVHEAGITGQELERQKESGCTGHEPDSLEFSTGGVVSFRASGMK
consenso		* *
1676	294	KNRYGNIEDLVLDYQIVTPQGIERPRQAPRESVGVNPRQMFEGSEGNFGLVITAVYKFPPEVQIYGSVIFEDLETGIFSLY
hAGPS	334	KNRYGNIEDLVHFKVTPRGIIEKSCQSPRMSIGPDIHFTMSEGLGVIETATIKRPPPEVQIYGSVAIFENFQGVACLR
consenso		* *
1676	378	AIQQSGAVPASIRVMDNTQHFHQAALKPAKHGAALKVSETEKAVVTKLKGFDPYKLAVALLFEGRREBVAFOEKIVYRIASE
hAGPS	419	EIAKQRCAPASIRIMDNKQHFQGHALKPQVSSIFTSFLDGGKKFYITKFKGFDPENQLSVATLFEGRREKVLQHEKQVYDIAAK
consenso	 *
1676	462	HGKKGANGERGVQLTIGIAYIRDLEFHAIAESFETVPPWSRAVDLYERVQRVEKEHAALGIPGKVFFTPGRFTQVYQGTG
hAGPS	503	FGGANGELNGRGVLLTIVIAYIRDLALEHIVLGESEFETAPWDRVDLCRNVKERTRECKEKGQFAPFSTCRVITQTYDAG
consenso		* *
1676	546	VATYFYLIFYARGVSDPVGAVAALEHAAAREEILAGGSLSHHHGVGKIRRDIPVYSFAALALNKVKAAIDPNIIFGASNCG
hAGPS	587	ACTYFYFAFNVRGISDPLTVFEQTEAAAREEILANGGSLSHHHGVGKIRKQILKESISVGFVMLISVKEVYVDNINIFGNRNLL
consenso		* *
1676	630	INGPVALTPDEEAH
hAGPS		-----
consenso		

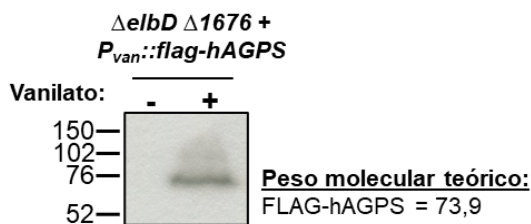
B



C



D



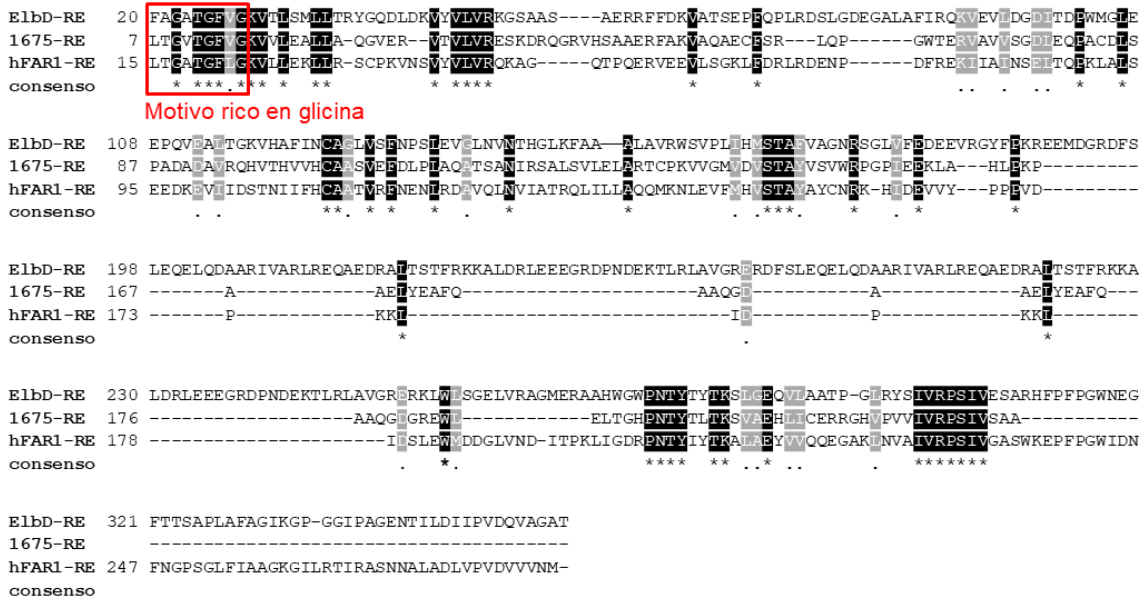
III. Publicaciones y resultados no publicados

Figura 16. Análisis de complementación de la delección de *MXAN_1676* con la enzima hAGPS en *M. xanthus*. **A)** Alineamiento múltiple de las proteínas *MXAN_1676* y hAGPS. **B)** Plásmidos generados para expresar hAGPS y FLAG-hAGPS bajo el control del promotor P_{van} y su integración en el genoma de *M. xanthus* por recombinación homóloga (representada como rayas discontinuas) mediante un fragmento de 1,38 kb. km^R : gen de resistencia a kanamicina. **C)** Fenotipo de color a las 48 horas de iluminación y en presencia de vanilato 0,5 mM de las estirpes indicadas. Para las estirpes que expresan hAGPS con o sin etiqueta FLAG se muestran varios electroporantes independientes (crecidos en forma de raya). **D)** Detección de FLAG-hAGPS por *Western blot* usando anticuerpos anti-FLAG a partir de extractos celulares de la correspondiente estirpe de *M. xanthus* crecida sin y con vanilato 0,5 mM. Se indican los pesos moleculares (kDa) de las proteínas usadas como marcadores de tamaño y de la proteína de estudio.

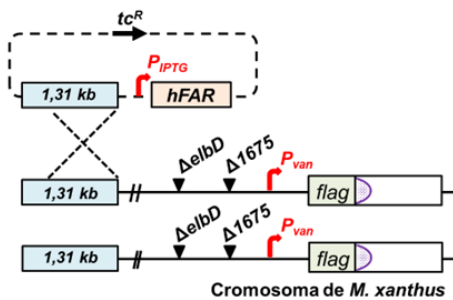
Aunque los dominios Re/FAR de ElbD y *MXAN_1675* alinean peor con el dominio reductasa de hFAR (Figura 17A) de lo que lo hace *MXAN_1676* con hAGPS, los resultados mostrados en este trabajo (Apartado III.5.4) apuntan a que estos dominios Re/FAR catalizan la misma reacción que la hFAR en humanos. Por tanto, se probó a complementar la falta del dominio Re/FAR de ElbD y *MXAN_1675* con hFAR. Para ello se clonó en un plásmido de expresión el gen *hFAR* (con el uso de codones optimizado para *M. xanthus*), aguas abajo de un promotor inducible por IPTG (P_{IPTG}). Este plásmido se introdujo, por separado, en las estirpes de *M. xanthus* $\Delta elbD \Delta 1675 + P_{van}::flag-elbD_{418-1470}$ y $\Delta elbD \Delta 1675 + P_{van}::flag-1675_{285-868}$ (Figura 17B). La incapacidad de responder a la luz de las estirpes resultantes (Figura 17C) sugiere que hFAR es incapaz de suplir la falta del dominio Re/FAR en ElbD y *MXAN_1675*. No obstante, sería conveniente añadir una etiqueta FLAG en uno de los extremos de hFAR para comprobar si la proteína es estable en *M. xanthus*. De expresarse de manera estable, la falta de complementación podría deberse a razones similares a las argüidas para explicar que hAGPS no complemente la falta de *MXAN_1676*.

III. Publicaciones y resultados no publicados

A



B



C

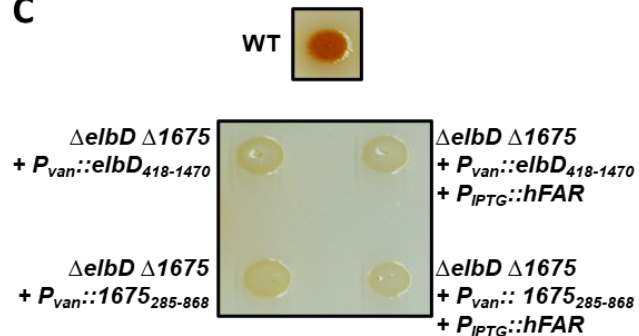


Figura 17. Análisis de complementación de la falta del dominio Re/FAR de ElbD y MXAN_1675 con la enzima hFAR en *M. xanthus*. A) Alineamiento del dominio Re/FAR de las proteínas ElbD (20-358), MXAN_1675 (7-225) y hFAR (15-284). En rojo se marca el motivo rico en glicina, típico de enzimas con actividad reductasa. **B)** Plásmidos generados para expresar hFAR bajo el control del promotor P_{IPTG} y su integración en el genoma de *M. xanthus* por recombinación homóloga (representada como rayas discontinuas) a través de un fragmento de 1,31 kb ubicado entre los genes *MXAN_18-19*. tc^R : gen de resistencia a tetraciclina. **C)** Fenotipo de color de las estirpes indicadas a las 48 horas de iluminación y en presencia de vanilato 0,5 mM y de IPTG 1 mM.

III.5.6. Distribución de los operones *elbA-E* y *MXAN_1676-1674* en mixobacterias

Las mixobacterias son las únicas bacterias aerobias descritas hasta la fecha que tienen plasmalógenos (Goldfine, 2017). Los análisis lipídicos han detectado plasmalógenos en la mayoría de las especies de Cystobacterineae analizadas, aunque también en algunas especies de Sorangiineae y Nannocystineae; por otro lado, muchas de estas mixobacterias también tienen lípidos con enlace éter (García *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2014). Cabe esperar que la presencia o ausencia de plasmalógenos y

III. Publicaciones y resultados no publicados

lípidos éter en mixobacterias correlacione con la presencia o ausencia de CarF y de una u otra ruta (o ambas) de síntesis de lípidos éter encontradas en *M. xanthus*. Determinar si los genes que forman parte de los operones *elbA-E* y *MXAN_1676-1674* están presentes o no en otras mixobacterias y si mantienen la misma organización que en *M. xanthus* podría ayudar a entender cómo ha evolucionado la capacidad de sintetizar lípidos éter en el orden Myxococcales. Para ello, se realizaron búsquedas con BLASTP enfrentando las secuencias proteicas de CarF (Gallego-García *et al.*, 2019), de ElbA-E y de MXAN_1676-1674 de *M. xanthus* con los genomas de 27 especies de mixobacterias (17 Cystobacterineae incluyendo al propio *M. xanthus*, 6 Sorangiineae y 4 Nannocystineae) accesibles en el repositorio de secuencias de IMG/M (*Integrated Microbial Genomes & Microbiomes*).

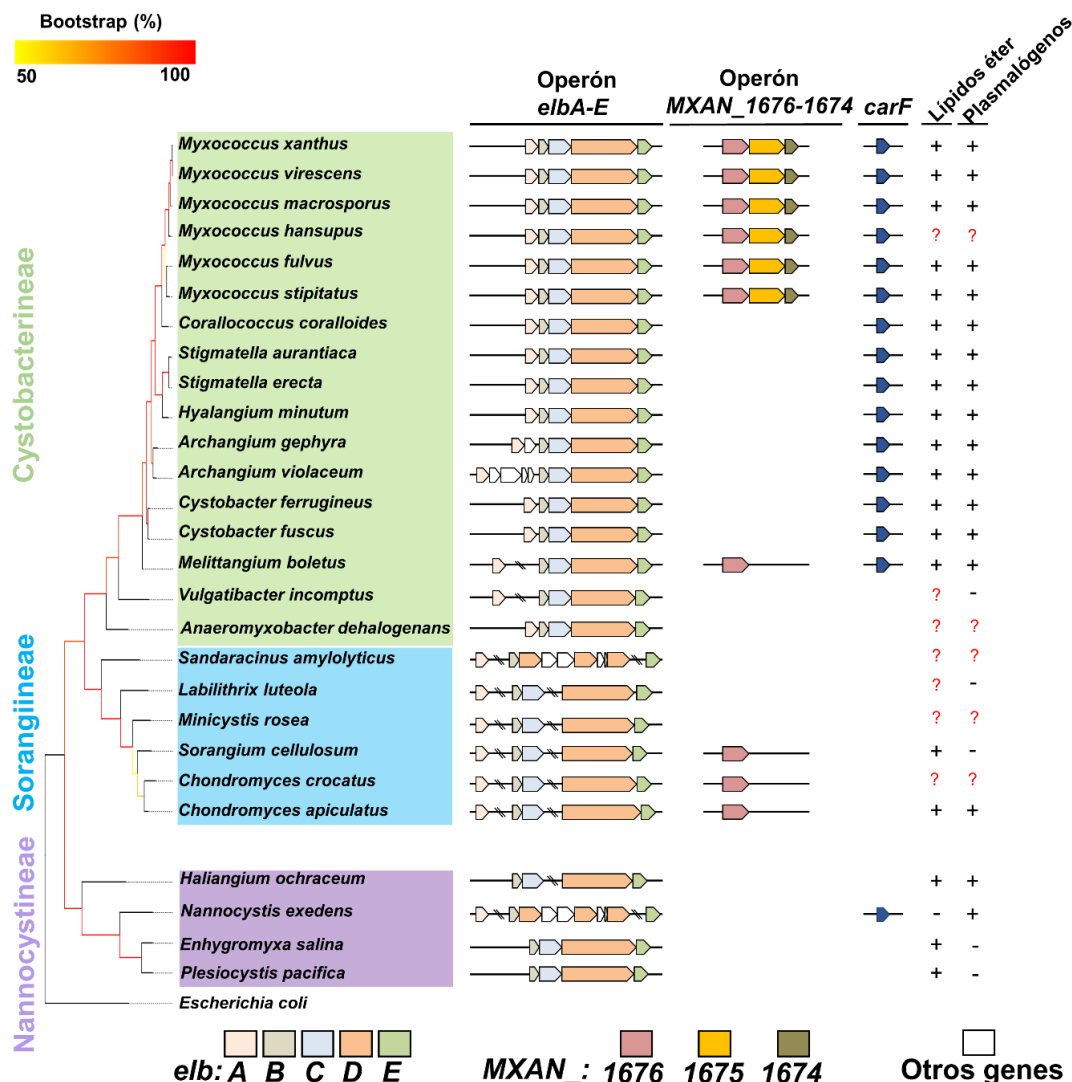


Figura 18. Distribución de los operones *elbA-E* y *MXAN_1676-1674* en mixobacterias, comparada con la distribución de *CarF* y de la presencia de plasmalógenos y lípidos éter. El árbol filogenético de las mixobacterias está basado en el RNA ribosómico 16S. Se incluye *E. coli* en el análisis como una especie más alejada evolutivamente que no presenta ni lípidos éter

III. Publicaciones y resultados no publicados

ni plasmalógenos y, por tanto, no tiene ninguno de los genes de estudio. Con dos barras se indica que los genes están alejados en el genoma. Se incluye la distribución de homólogos de CarF determinada por Gallego-García *et al.* (2019). A la derecha, se recopilan los resultados publicados por otros grupos referentes a los análisis de lípidos éter y plasmalógenos en mixobacterias. Los símbolos + y - indican, respectivamente, la presencia o ausencia de una especie lipídica. El símbolo ? indica que no hay datos sobre si una especie lipídica está presente o no en la mixobacteria indicada.

Los resultados obtenidos, recopilados en la Figura 18, muestran que el operón *MXAN_1676-1674* solo está presente en *M. xanthus* y otras cinco especies, todas ellas del género *Myxococcus*. En otras cuatro especies (una del orden Cystobacterineae y las otras del orden Sorangiineae) se encuentran homólogos de *MXAN_1676*, pero no de las otras dos proteínas que también son necesarias. Por otro lado, el operón *elbA-E* se encuentra mucho más extendido. Así, con la misma organización que presenta en *M. xanthus*, aparece no solo en las otras cinco especies de *Myxococcus* analizadas sino también en siete especies de Cystobacterineae adicionales. Además, también aparecen los genes *elbA-E* en el resto de Cystobacterineae analizadas, pero con *elbA* como un gen independiente cercano o lejano a los otros genes. En Sorangiineae se pierde la organización en forma de operón y los genes se distribuyen en tres bloques alejados unos de otros: *elbA*, *elbB-C* y *elbD-E*. Finalmente, en Nannocystineae no hay homólogos a *elbA*, y el dúo *elbB-C* pueden encontrarse de forma independiente o formando un operón junto con *elbD-E*. Curiosamente, en *Sandaracinus amylolyticus* y *Nannocystis exedens*, que pertenecen a subórdenes distintos, se observa una misma organización, pero muy diferente a la del resto de especies analizadas. Ambas especies carecen de *elbC* y presentan un *elbD* fragmentado en varios genes. Estos resultados sugieren que el operón *elbA-E*, tal cual se observa en *M. xanthus* y otras Cystobacterineae, pudo haber surgido de la fusión de tres módulos génicos que en otras mixobacterias se encuentran separados: *elbA*, *elbB-C*, y *elbD-E* (que siempre aparecen acoplados traducionalmente). De los cinco genes, *elbA* parece ser el más prescindible, quizás por su posible función redundante con *elbE*. Por otro lado, la asociación recurrente entre el módulo *elbB-C* y el *elbD-E* sugiere un posible papel para *elbB-C* en la síntesis de lípidos éter. Ello nos ha llevado a plantearnos la obtención de mutantes por delección en fase de *elbB* y *elbC*, que están siendo generados, ya que el análisis por interrupción génica de *elbB* no dio resultados claros (Lorenzen *et al.*, 2014a) y la función de *elbC* nunca se ha analizado.

La prevalencia en mixobacterias de la ruta basada en *elbD-E*, y posiblemente otros genes del operón, es coherente con el hecho de que dicha ruta constituya la vía principal de biosíntesis de lípidos éter en mixobacterias. Además, su presencia

III. Publicaciones y resultados no publicados

explicaría que la mayoría de las mixobacterias analizadas tengan lípidos con enlace éter. Que ElbD concentre varias de las actividades enzimáticas implicadas en la formación de lípidos éter en una única proteína multidominio, capaz de catalizar varios pasos de síntesis, podría explicar la predominancia de esta ruta. Por otro lado, la ruta minoritaria y dependiente de *MXAN_1676-1674*, más parecida a la de mamíferos, podría haberse adquirido por transferencia horizontal específicamente en el género *Myxococcus*, o haber estado presente en el ancestro de las mixobacterias y haberse perdido posteriormente en la mayoría de las especies, paralelamente a la evolución y consolidación de la ruta mayoritaria. En cualquier caso, resulta sorprendente que varias especies de mixobacterias sigan manteniendo dos vías independientes para la síntesis de lípidos éter. Tal vez, en el hábitat natural de *Myxococcus*, la presencia de dos rutas alternativas confiera una ventaja evolutiva a las células.

Por otro lado, la búsqueda de homólogos a CarF en las 27 especies de mixobacterias ha revelado su presencia casi exclusivamente en el suborden Cystobacterineae (Figura 18) (Gallego-García *et al.*, 2019; Pérez-Castaño *et al.*, 2022). En líneas generales, se observa una buena correlación entre las mixobacterias que presentan plasmalógenos y las que presentan CarF, con solo dos discrepancias: las especies *Haliangium ochraceum* y *Chondromyces apiculatus*, en las que se han encontrado plasmalógenos (García *et al.*, 2011), pero ningún homólogo de CarF. Asumiendo que la detección de plasmalógenos en dichas especies no obedece a un error experimental, hay dos posibles explicaciones a estas discrepancias: o bien el genoma de ambas mixobacterias no está realmente completo y entre las regiones sin secuenciar hay un gen que cifra una proteína homóloga a CarF, o bien estas mixobacterias son capaces de sintetizar plasmalógenos mediante un mecanismo distinto que no requiera una PEDS1 (algo más improbable, dado que la síntesis de plasmalógenos por una desaturasa es un mecanismo conservado en todos los organismos aerobios desde mixobacterias hasta humanos). También representa un caso atípico *N. exedens*, del suborden Nannocystineae, por tratarse de la única especie en la que se han detectado plasmalógenos, acorde con la presencia de CarF, pero no lípidos éter. Quizás este resultado se deba a la inusual organización en *N. exedens* de los homólogos de *elbA-E* (pues esta especie carece del operón *MXAN_1676-1674*).

III. Publicaciones y resultados no publicados

III.5.7. Ensayo de complementación química con 1-O-alkil-glicerol

Como se comentó en la Introducción, el 1-O-alkil-glicero-3-fosfato es un compuesto intermediario en la ruta de biosíntesis de plasmalógenos en mamíferos, que puede proceder de la reducción de 1-O-alkil-DHAP, pero también de la fosforilación por la AG quinasa del 1-O-alkil-glicerol ingerido en la dieta (véase Apartado I.2.3.1.1). Nuestro trabajo ha demostrado que *M. xanthus* puede captar del medio de cultivo tanto plasmalógenos humanos como los lípidos éter de PE precursores y transformarlos en el correspondiente plasmalógeno, si la estirpe en cuestión tiene CarF. Para determinar si *M. xanthus*, como las células de mamíferos, es capaz de incorporar 1-O-alkil-glicerol exógeno y utilizarlo como intermediario en la biosíntesis de plasmalógenos, se realizó un experimento de complementación química de las estirpes $\Delta carF$, $\Delta elbD \Delta 1676$ y $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$ con 1-18:0-O-alkil-glicerol (1-18:0-OAG) y con el compuesto en el que se transformaría en mamíferos, el 1-18:0-O-alkil-glicero-3-fosfato (1-18:0-OAG3P). Ambos, disponibles comercialmente, tienen un ácido graso de 18 átomos de carbono unido mediante un enlace éter al glicerol en posición *sn*-1, y tienen libre la posición *sn*-2. Mientras que la posición *sn*-3 está libre en 1-18:0-OAG, un grupo fosfato ocupa esta posición en el 1-18:0-OAG3P (Figura 19). Los experimentos de complementación química se realizaron depositando, en placas de medio sólido, alícuotas (en cloroformo) de 1-18:0-OAG, 1-18:0-OAG3P y, como controles, HsAEPE1 y HsVEPE1. Una vez evaporado el cloroformo, se depositaron alícuotas de cultivos líquidos de las estirpes de *M. xanthus* indicadas anteriormente sobre los lípidos secados. Al analizar el fenotipo de color que adoptaron las estirpes crecidas en presencia de estos lípidos se observó que el 1-18:0-OAG fue capaz de restaurar la respuesta a la luz, a niveles cualitativamente similares al HsAEPE1, en la estirpe que tiene CarF ($\Delta elbD \Delta 1676$). Estos resultados indican que las células de *M. xanthus* también son capaces de captar el 1-18:0-OAG y convertirlo en plasmalógeno que, a falta del análisis lipídico correspondiente, se esperaría que contenga 18:0(Plasm) (es decir, 18:0 unido por un enlace vinil-éter) en la posición *sn*-1 e i15:0 en la posición *sn*-2. Si, como ocurre en mamíferos, el 1-18:0-OAG debe fosforilarse en la posición *sn*-3 como paso previo a la adición del grupo acilo en posición *sn*-2, cabría esperar que el 1-18:0-OAG3P también complemente. Sin embargo, dicho compuesto no funcionó (Figura 19). Es posible que, al estar cargado negativamente por el grupo fosfato, el 1-18:0-OAG3P no sea captado eficazmente por *M. xanthus*. En cualquier caso, que un 1-O-OAG sirva de intermediario para la biosíntesis de plasmalógenos puede resultar de gran utilidad en los experimentos de química “clíc” que se plantean en el siguiente anexo, como estrategia para abordar el estudio del mecanismo de señalización del estrés fotooxidativo mediado por los plasmalógenos.

III. Publicaciones y resultados no publicados

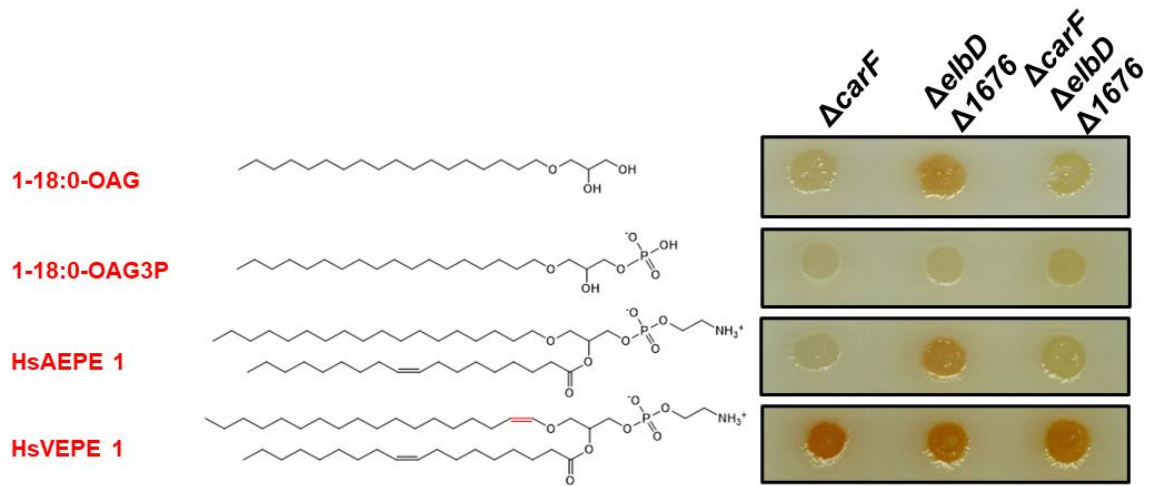


Figura 19. Complementación química con lípidos con OAGs. Análisis de la respuesta a la luz de diferentes estirpes de *M. xanthus* complementadas químicamente con 20 nmoles de cada lípido en placas de medio sólido. Se usaron los lípidos HsAEPE1 y HsVEPE1 como controles del experimento.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Estirpes de *M. xanthus*

Estirpe	Descripción	Origen/fuente
DK1050	Estirpe silvestre	Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984
MR3267	$\Delta elbD$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3320	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3346	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676 + P_{van}::elbD$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3348	$\Delta MXAN_1676$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3376	$\Delta elbD \Delta MXAN_1674$	MR3267 x pMR4891
MR3377	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675$	MR3267 x pMR4890
MR3378	$\Delta MXAN_1674$	DK1050 x pMR4891
MR3379	$\Delta MXAN_1675$	DK1050 x pMR4890
MR3380	$\Delta elbD \Delta MXAN_1674 + P_{van}::MXAN_1674$	MR3376 x pMR4894
MR3381	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675 + P_{van}::MXAN_1675$	MR3377 x pMR4895
MR3390	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676 + P_{van}::MXAN_1676$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3391	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676-1674$	MR3267 x pMR4902
MR3392	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676-1674 + P_{van}::MXAN_1676-1674$	MR3391 x pMR4860
MR3394	$\Delta MXAN_1676-1674$	DK1050 x pMR4902
MR3406	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676 + P_{van}::hAGPS$	MR3320 x pMR4940
MR3411	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676 + P_{van}::flag-hAGPS$	MR3320 x pMR4945
MR3653	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675 + P_{van}::flag-elbD_{418-1470}$	MR3377 x pMR5199
MR3654	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675 + P_{van}::flag-MXAN_1675_{285-868}$	MR3377 x pMR5200
MR3677	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675 + P_{van}::flag-elbD_{418-1470} + P_{IPTG}::hFAR$	MR3653 x pMR5212
MR3678	$\Delta elbD \Delta MXAN_1675 + P_{van}::flag-MXAN_1675_{285-868} + P_{IPTG}::hFAR$	MR3654 x pMR5212
MR3847	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676-1674 + P_{van}::MXAN_1676$	MR3391 x pMR4903
MR3848	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676-1674 + P_{van}::MXAN_1675$	MR3391 x pMR4895
MR3849	$\Delta elbD \Delta MXAN_1676-1674 + P_{van}::MXAN_1674$	MR3391 x pMR4894

Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción /utilidad	Origen/fuente
pBJ114	Vector para generar deleciones génicas en <i>M. xanthus</i> ; Km ^R Gal ^S	Julien <i>et al.</i> , 2000
pMR3679	Vector que permite expresar la proteína de interés bajo el promotor <i>Pvan</i> , inducible por vanilato. Se integra en el genoma de <i>M. xanthus</i> mediante un fragmento de 1,38 kb; Km ^R	Iniesta <i>et al.</i> , 2012
pMR4449	Vector que permite expresar la proteína de interés bajo el promotor PIPTG, inducible por IPTG. Se integra en el genoma de <i>M. xanthus</i> mediante un fragmento de 1,31 kb ubicado entre los MXAN18-19. Tc ^R	Cedido por A. Iniesta
pMR4783	Derivado de pBJ114 para generar la deleción de <i>elbD</i> ; Km ^R Gal ^S	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
pMR4828	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::elbD</i> ; Km ^R	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
pMR4832	Derivado de pBJ114 para generar la deleción de <i>MXAN_1676</i> ; Km ^R Gal ^S	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
pMR4860	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::1676-1674</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4890	Derivado de pBJ114 para generar la deleción de <i>MXAN_1675</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4891	Derivado de pBJ114 para generar la deleción de <i>MXAN_1674</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4894	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::MXAN_1674</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4895	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::MXAN_1675</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4902	Derivado de pBJ114 para generar la deleción del operón <i>MXAN_1676-1674</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4903	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::MXAN_1676</i> ; Km ^R	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
pMR4940	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::hAGPS</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4945	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::flag-hAGPS</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR5199	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::flag-elbD₄₁₈₋₁₄₇₀</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR5200	Derivado de pMR3679 con <i>Pvan::flag-MXAN_1675₂₈₅₋₈₆₈</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR5212	Derivado de pMR4449 con <i>PIPTG::hFAR</i> ; Tc ^R	Este trabajo

III.6. Anexo 3: resultados no publicados y discusión sobre el papel de los plasmalógenos en *M. xanthus*

Los resultados publicados por Gallego-García, Monera-Girona, Pajares-Martínez *et al.* en *Science* (2019) establecieron que CarF se requiere en la respuesta a la luz porque es una desaturasa esencial para sintetizar los plasmalógenos y que son estos compuestos los que, de algún modo, median la señalización del estrés fotooxidativo. Así pues, basta con suplementar el medio de cultivo con plasmalógenos para restaurar la respuesta a la luz en la estirpe $\Delta carF$, sin importar que el plasmalógeno suministrado exógenamente difiera del propio de *M. xanthus* (en la longitud y presencia o no de ramificaciones o dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas), como ocurre con los tres plasmalógenos humanos utilizados (HsVEPE1, HsVEPE2 y HsVEPE3). El papel de los plasmalógenos en la respuesta a la luz de *M. xanthus* y, probablemente, de otras mixobacterias (véase Anexo 2 y Pérez-Castaño *et al.* 2022), representa uno de los ejemplos más claros y llamativos del papel señalizador de dichos lípidos.

El modelo que barajamos actualmente sobre el posible papel de los plasmalógenos en la señalización del 1O_2 está inspirado en la conocida sensibilidad del enlace vinil-éter, pero no del enlace éter del precursor AEPE, a la rotura por 1O_2 . Según Morand *et al.* (1988) y nuestros propios datos (Gallego-García *et al.*, 2019), *in vitro* dicha rotura genera un aldehído graso de tipo alcanal (aquellos que contienen enlaces sencillos en su cadena hidrocarbonada) con un átomo de carbono menos (que se pierde como ácido fórmico) y el resto de la molécula (liso-PE). La rotura del plasmalógeno podría: (I) ocasionar una perturbación local en las propiedades fisicoquímicas de la membrana que provoque la inactivación de CarR, la liberación de CarQ y, en última instancia, la activación de la expresión de los genes carotenogénicos; (II) mediar la señalización a través del aldehído graso, la liso-PE o ambos productos simultáneamente. Ambos compuestos son conocidos por sus funciones señalizadoras, pero también por los efectos tóxicos que producen a nivel celular cuando se encuentran en exceso. Según Domingues *et al.*, (2013), los alcanales pueden formar aductos de Schiff con lisina, arginina y el extremo amino-terminal de proteínas. Como CarR tiene varios residuos susceptibles de ser atacados por esta vía, una posibilidad es que su inactivación en la luz se produzca por la formación de aductos con aldehídos grasos derivados del plasmalógeno. En este trabajo se han realizado nuevos experimentos para profundizar en el novedoso papel de los plasmalógenos en la señalización del estrés fotooxidativo.

III.6.1. Complementación química con lípidos éter y plasmalógenos de PC

Experimentos previos del grupo demostraron que la señalización del estrés fotooxidativo mediada por los plasmalógenos en *M. xanthus* ocurre independientemente del tipo de cadena hidrocarbonada (número de carbonos, ramificada o no, saturada o insaturada) en la posición *sn*-1 y *sn*-2 del glicerofosfolípido (Gallego-García *et al.*, 2019). Para entender mejor los determinantes que subyacen al papel de los plasmalógenos en *M. xanthus*, nos preguntamos si tener en *sn*-3 un grupo de cabeza polar distinto a PE, como la PC, afectaría a la capacidad de señalización de los plasmalógenos. Los fosfolípidos de PC son el subtipo de fosfolípidos más abundante en las membranas celulares de eucariotas y desempeñan un papel importante en señalización celular, siendo la principal fuente de segundos mensajeros lipídicos. Sin embargo, se estima que solamente el 15% de las bacterias tienen las rutas metabólicas necesarias para sintetizar fosfolípidos de PC, y que aproximadamente el 10% poseen realmente estos lípidos en sus membranas biológicas. Entre las proteobacterias, los fosfolípidos de PC (o los genes implicados en su biosíntesis) se han encontrado en Alphaproteobacteria (fundamentalmente *Rhodobacterales* y *Rhizobiales*), Gammaproteobacteria (la mayoría de las especies de *Pseudomonas* y en los géneros *Legionella*, *Halomonas* y *Francisella*) y unas pocas especies de Deltaproteobacteria (*Desulfovibrio*), entre las que no se incluye *M. xanthus* (Lorenzen *et al.*, 2014b). Fuera de las proteobacterias, se han encontrado fosfolípidos de PC en *Chlamydiae*, espiroquetas (*Borrelia* y *Treponema*) y *Planctomycetes*. En algunas bacterias simbióticas o patogénicas que contienen fosfolípidos de PC se ha visto que son importantes en la interacción con el hospedador eucariótico (Geiger *et al.*, 2013; Sohlenkamp *et al.*, 2003; Sohlenkamp & Geiger, 2015).

Para estudiar el posible efecto del cambio en el grupo de cabeza polar, se realizó un experimento de complementación química con el lípido éter C16:0(éter)-18:1-PC y el plasmalógeno C18:0(Plasm)-18:1-PC, usando como controles del experimento los análogos de PE. Como puede observarse en la Figura 20, no se apreció ninguna diferencia entre las estirpes alimentadas con las formas PC versus las formas PE. Así pues, el compuesto C16:0(éter)-18:1-PC rescató la respuesta a la luz solamente en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ (como era de esperar, ya que es la única que tiene CarF y puede sintetizar plasmalógenos a partir del lípido éter suministrado exógenamente), y cuando se alimentó con C18:0 (Plasm)-18:1-PC se restauró la respuesta a la luz en las tres estirpes analizadas. Puede concluirse, por tanto, que tener PE o PC en posición *sn*-3 no afecta a la capacidad de señalización de los plasmalógenos. El enlace vinil-éter se postula, por tanto, como el único elemento invariable e imprescindible que se requiere para que un lípido sea capaz

III. Publicaciones y resultados no publicados

de inducir la respuesta a la luz en *M. xanthus*, lo cual tiene sentido ya que es lo único que diferencia, a nivel estructural, a los plasmalógenos de sus precursores con enlace éter.

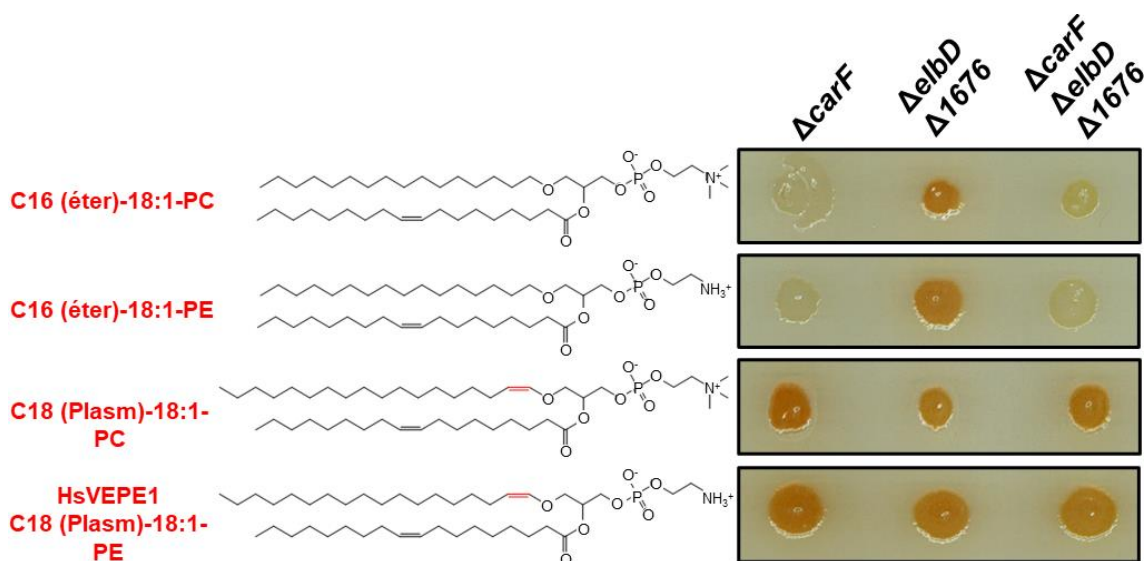


Figura 20. Complementación química con lípidos éter y plasmalógenos de PC. Análisis de la respuesta a la luz de diferentes estirpes de *M. xanthus* complementadas químicamente con 20 nmoles de cada lípido en placas de medio sólido. Los lípidos de estudio son C16(éter)-18:1-PC y C18(Plasm)-18:1-PC. Los lípidos C16(éter)-18:1-PE y HsVEPE1 se usaron como controles del experimento.

III.6.2. Análisis *in vivo* de los productos derivados de la rotura del plasmalógeno

In vitro, la exposición del plasmalógeno humano HsVEPE1 al 1O_2 generado por la iluminación en presencia de PPIX provocó una destrucción de ~80% del plasmalógeno, paralelamente a la aparición de 2-18:1-liso-PE y heptadecanal (Gallego-García *et al.*, 2019). A favor del modelo que implica la rotura de los plasmalógenos también están los resultados derivados de los experimentos realizados *in vivo* que indican una bajada, aunque sutil (~10%), de los niveles de plasmalógenos en la luz, siempre y cuando se utilice una estirpe $\Delta carF$ (“alimentada” con HsVEPE1). Además, si a la imposibilidad de mantener los niveles de plasmalógenos por la falta de CarF se suma la imposibilidad de sintetizar carotenos y de atenuar, por tanto, el estrés fotooxidativo, la bajada es algo más perceptible (~20-30%) (Gallego-García *et al.*, 2019). Que en el fondo genético silvestre apenas se detecte una reducción en los niveles de plasmalógenos tras la iluminación (Gallego-García *et al.*, 2019) sugiere que el mecanismo debe ser lo suficientemente sensible como para percibir la rotura de cantidades mínimas de plasmalógenos. Esto permitiría, por un lado, evitar los efectos tóxicos que ocasionaría,

III. Publicaciones y resultados no publicados

a nivel celular, un exceso en la producción de aldehídos grasos o liso-fosfolípidos y, por otro, disparar la ruta de síntesis de carotenos ante los primeros indicios de la presencia de $^1\text{O}_2$ y evitar así la muerte celular por fotólisis.

Experimentos previos del grupo demostraron que la adición de PPIX al medio de cultivo provoca que las células silvestres de *M. xanthus* respondan con mayor eficacia a la iluminación (Galbis-Martínez *et al.*, 2012). Cabría, por tanto, esperar que la presencia de PPIX en el medio facilite la detección, en un contexto por lo demás silvestre, de la rotura de los plasmalógenos, medida por la reducción en los niveles de dichos lípidos, así como por la aparición de sus productos de rotura que, hasta la fecha, no habían sido analizados *in vivo*.

III.6.2.1. Análisis *in vivo* de los niveles de plasmalógeno y liso-PE en cultivos crecidos en presencia de PPIX

El análisis de los niveles de MxVEPE y de 2-i15:0-liso-PE en cultivos de la estirpe silvestre crecidos en luz y oscuridad en presencia de PPIX se realizó mediante LC-MS/MS. Para la toma de muestras se partió de un cultivo de 10 ml de la estirpe silvestre, y tras 8 horas de crecimiento se llevó a un volumen de 100 ml. Este cultivo se incubó toda la noche (o/n) en oscuridad, y al día siguiente se ajustó a una densidad óptica de 0,65 y se añadió PPIX hasta una concentración final de 5 μM (la máxima concentración que permitió el crecimiento de *M. xanthus* en las condiciones de iluminación utilizadas). A partir de dicho cultivo se tomaron 4 alícuotas de 10 ml que se transfirieron a matraces para ser incubadas durante 30 minutos y dos horas en oscuridad o luz (9 W/m²) (Figura 21A). Una vez tomadas las muestras, se extrajeron los lípidos totales y se cuantificó la presencia de MxVEPE y de 2-i15:0-liso-PE (Figura 21B). Como puede verse en la figura 21C, a los 30 minutos de iluminación ya se apreció una ligera bajada del plasmalógeno (~7%), similar a la observada previamente en un fondo ΔcarF , que fue acompañada de una subida, también sutil, en la 2-i15:0-liso-PE. Que la iluminación durante 2 horas no resulte en una bajada mayor en los niveles de plasmalógenos (Figura 21C) podría deberse a que, al trabajar en una estirpe silvestre, es posible que el MxVEPE se vaya regenerando tras la rotura en la luz y también al efecto fotoprotector de los carotenos, puesto que los cultivos iluminados durante dos horas ya mostraron síntesis de carotenos, a juzgar por la coloración rojiza del precipitado celular. Por otro lado, que los niveles de 2-i15:0-liso-PE tras dos horas de iluminación sean algo menores que tras los 30 minutos podría deberse a la conversión de 2-i15:0-liso-PE en otro compuesto, como podría ser un fosfolípido convencional (por adición de un grupo acilo en posición *sn*-1) o a su degradación. Quizás, en el entorno en el cual se encuentra el plasmalógeno en

III. Publicaciones y resultados no publicados

la célula y con la cantidad de PPIX a la que podemos trabajar (5 μM que añadimos exógenamente más la poca PPIX endógena que acumula de manera natural *M. xanthus*) no quepa esperar una rotura mayor.

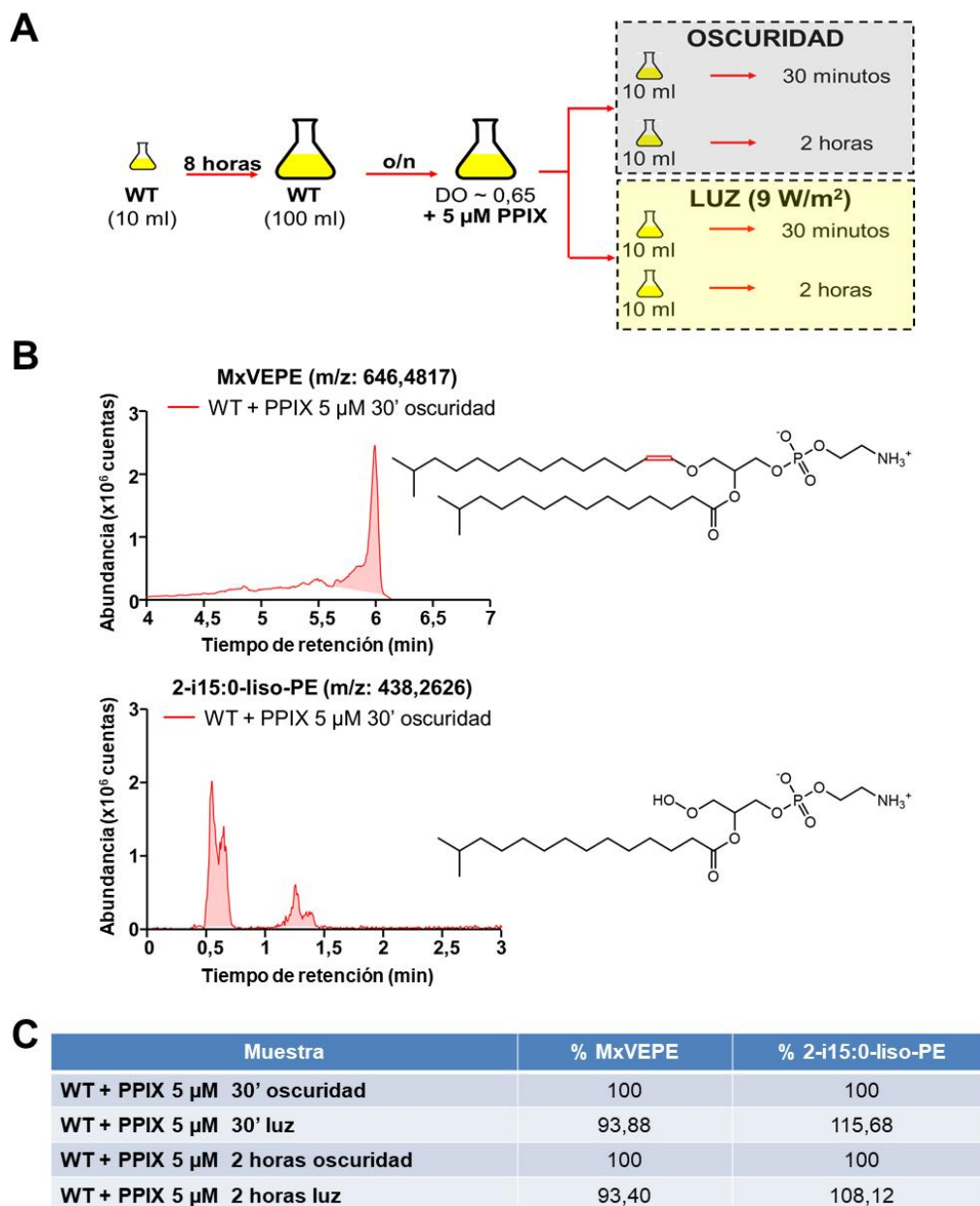


Figura 21. Estudio por LC-MS/MS de los niveles de MxVEPE y 2-i15:0-liso-PE en muestras de la estirpe silvestre de *M. xanthus* crecidas en luz y oscuridad. A) Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Detección de MxVEPE y 2-i15:0-liso-PE por LC-MS/MS. Se muestran los cromatogramas del ion derivado del MxVEPE (arriba) y la 2-i15:0-liso-PE (abajo), y se somborean los picos que se corresponden con cada compuesto. **C)** Cuantificación de MxVEPE y 2-i15:0-liso-PE. Para cuantificar se ha tomado el área de cada compuesto y se ha relativizado con respecto al área del fosfolípido mayoritario en *M. xanthus* (i15:0-i15:0-PE). Finalmente, se han normalizado los valores considerando el 100% los niveles de cada lípido en las muestras de oscuridad.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Experimentos similares se realizaron en la estirpe $\Delta carF$ (para evitar la regeneración del plasmalógeno) complementada químicamente con el HsVEPE2. Este plasmalógeno humano ofrece la ventaja de presentar un grupo acilo en la posición *sn*-2, el ácido araquidónico (20:4 ω 6), que no está presente en *M. xanthus*. Ello permite analizar de manera más “limpia” la desaparición del plasmalógeno, pues la forma liso-PE que se generaría (2-20:4-liso-PE) solo puede proceder de la rotura del enlace vinil-éter. Para realizar este experimento se partió de un cultivo de 10 ml de la estirpe $\Delta carF$. Tras 8 horas de crecimiento, se llevó a 100 ml y se incubó toda la noche en oscuridad. Al día siguiente se ajustó a una DO~0,65 y se añadió el plasmalógeno HsVEPE2. Tras 2 horas de crecimiento para que las células incorporasen el plasmalógeno en sus membranas, se añadió PPIX hasta una concentración final de 5 μ M y se procedió como en el experimento anterior (Figura 22A).

El análisis por LC-MS/MS permitió detectar de manera inequívoca el HsVEPE2 y también la 2-20:4-liso-PE que, aunque en cantidades pequeñas, se pudo observar en la oscuridad (Figura 22B). La cuantificación relativa de los niveles de HsVEPE2 y 2-20:4-liso-PE en las muestras analizadas (Figura 22C) indicó una bajada muy ligera (~2%) de los niveles de HsVEPE2 y una subida de los de 2-20:4-liso-PE tras 30 minutos de exposición a la luz. Quizás porque las células responden muy rápidamente a la luz y a las 2 horas ya han sintetizado carotenos, no se observó una mayor bajada en los niveles de plasmalógeno a este tiempo que a los 30 minutos. Por otro lado, no se mantuvo el aumento en los niveles de 2-20:4-liso-PE a las 2 horas, sino que se produjo una bajada que es posible se deba, como se comentó anteriormente, a su eliminación progresiva en las células, ya sea por degradación o por conversión en un fosfolípido convencional. Sorprende la presencia de 2-20:4-liso-PE en oscuridad, que podría resultar de una rotura enzimática o de la acción de ROS endógenas distintas al 1O_2 , capaces de generar liso-PE, pero formas del aldehído diferentes a las que se producen cuando la rotura está mediada por 1O_2 (véase Morand *et al.*, 1988, Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001, Jenkins *et al.*, 2018). No obstante, cualquiera que sea el mecanismo por el que ocurre la rotura del plasmalógeno en la oscuridad, es obvio que no dispara la respuesta carotenogénica, pues las células permanecen amarillas. Quizás se deba a que no alcanza el umbral de sensibilidad del mecanismo de detección, al tipo de aldehído que se genera en estas circunstancias (de ser el aldehído la molécula señalizadora), o al contexto de localización subcelular donde se produce la rotura.

III. Publicaciones y resultados no publicados

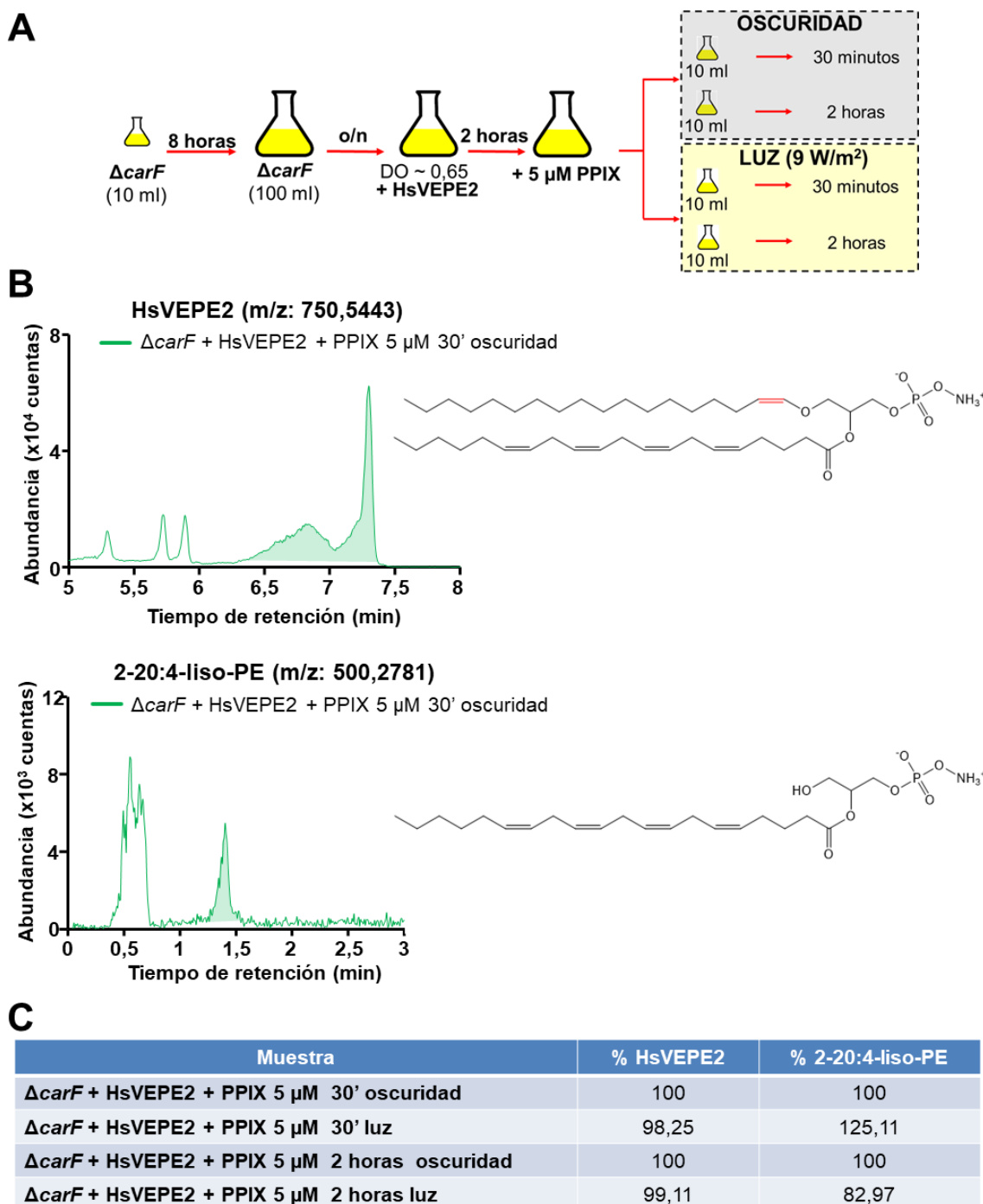


Figura 22. Estudio por LC-MS/MS de los niveles de HsVEPE2 y 2-20:4-liso-PE en muestras de *M. xanthus* $\Delta carF$ alimentadas con HsVEPE2 y crecidas en luz y oscuridad. A) Protocolo seguido para la obtención de las muestras. B) Detección de HsVEPE2 y 2-20:4-liso-PE por LC-MS/MS. Se muestran los cromatogramas del ion derivado del HsVEPE2 (arriba) y la 2-20:4-liso-PE (abajo), y se somborean los picos que se corresponden con cada compuesto. C) Cuantificación de los niveles de HsVEPE2 y 2-20:4-liso-PE en las muestras de estudio. Para cuantificar se ha tomado el área de cada compuesto y se ha relativizado con respecto al área del fosfolípido mayoritario en *M. xanthus* (i15:0-i15:0-PE). Finalmente, se han normalizado los valores considerando el 100% los niveles de cada lípido en las muestras de oscuridad.

III.6.2.2. Análisis *in vivo* de los niveles de aldehídos grasos

La tendencia de los aldehídos grasos a ser metabolizados rápidamente o reaccionar con agentes nucleofílicos dificulta enormemente su detección. Por ello, para facilitar su análisis por GC-MS suelen estabilizarse previamente mediante derivatización, siendo el O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina hidroclorehídrico (PFBHA) el compuesto más utilizado con este fin. La reacción correspondiente genera oximas, que son térmicamente más estables y, por tanto, más fáciles de detectar. Un aldehído graso derivatizado en forma de oxima se puede identificar por la presencia en su espectro de masas de iones con una relación masa/carga (m/z) de 181 y 239 (característicos de aldehídos grasos alifáticos saturados) y un ion con relación m/z de $[M-181]^+$, que permite determinar la longitud de la cadena hidrocarbonada del aldehído graso (Berdyshev, 2011; Jain & Thielen, 1995) (Figura 23).

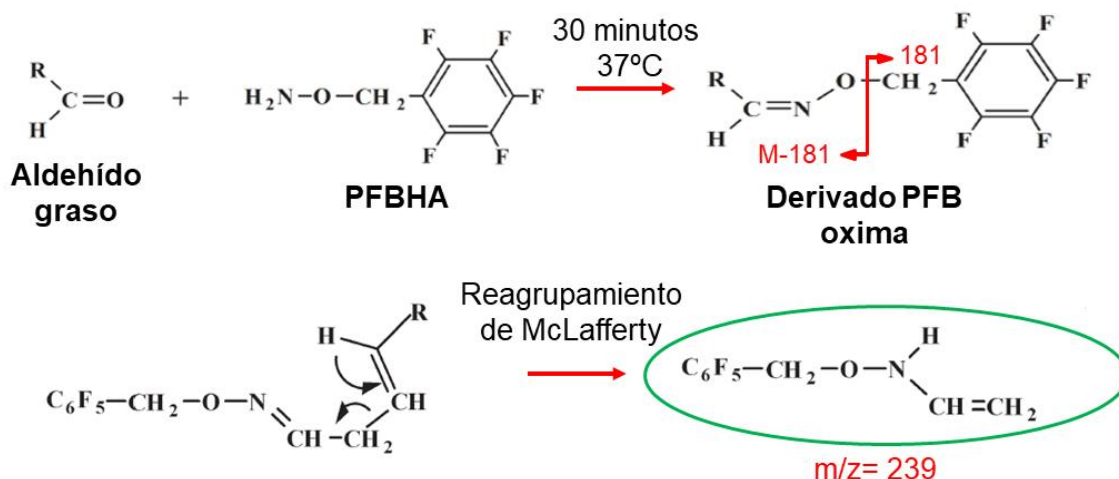


Figura 23. Derivatización de aldehídos grasos con PFBHA. El derivado PFB oxima se puede identificar fácilmente por GC-MS al presentar dos iones con una relación m/z característicos: 181 y M-181 (siendo M el peso molecular del derivado PFB oxima). Además, los aldehídos alifáticos saturados sufren un proceso conocido como reagrupamiento de McLafferty, que genera un ion con m/z de 239. Imagen modificada de Berdyshev *et al.* (2011).

Para analizar *in vivo* el otro posible producto de la rotura del plasmalógeno en la luz, el aldehído graso de tipo alcanal, se incubaron cultivos de la estirpe silvestre y de la estirpe $\Delta carF$ alimentada con HsVEPE1, ambos crecidos en presencia de 5 μ M de PPIX durante 30 minutos en oscuridad o luz. Inmediatamente después de tomar las muestras se realizó la derivatización con PFBHA (Figura 24A). En el experimento con la estirpe silvestre se detectó un i15:0-pentafluorobenzil oxima (i15:0-PFB oxima) tanto en las muestras de luz como en las de oscuridad, pero no se detectó en la luz (tampoco en oscuridad) el aldehído esperado (i14:0-PFB oxima), con un átomo de carbono menos

III. Publicaciones y resultados no publicados

que el grupo alquilo. Tampoco se observó cualquier otro aldehído graso (Figura 24B). Al alimentar la estirpe $\Delta carF$ con HsVEPE1 en luz y oscuridad y derivatizar las muestras con PFBHA se identificó un C18:0-PFB oxima, en muy bajas cantidades, de nuevo en luz y oscuridad (Figura 24C), pero no el C17:0-PFB oxima esperado. El hecho de que estos aldehídos se detecten en oscuridad y que la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas no concuerde con la esperada según el modelo de rotura por 1O_2 propuesto por Morand *et al.* (1988), ni con las pruebas *in vitro* realizadas en nuestro laboratorio (Gallego-García *et al.*, 2019), nos lleva a sospechar que podrían producirse por rotura inespecífica del plasmalógeno en la propia bacteria o durante el proceso de derivatización, o que tienen otra procedencia. Hay que tener en cuenta que los plasmalógenos están considerados como un reservorio de aldehídos grasos, y que estos compuestos pueden liberarse tras la degradación del enlace vinil-éter por plasmalogenasas, lisoplasmalogenasas o condiciones ácidas (Ebenezer *et al.*, 2020; Oberg *et al.*, 2012). El hecho de que no logremos identificar un aldehído específico de la luz no significa necesariamente que nuestro modelo de señalización sea incorrecto. El conjunto de los datos apunta a que, *in vivo*, la rotura de los plasmalógenos en la luz es mínima. De no ser así, quizás los efectos tóxicos del aldehído o el liso-lípido superarían los beneficios que supone para la célula el poder detectar el estrés foto-oxidativo y activar los diferentes sistemas defensivos (síntesis de carotenos y, posiblemente, otros sistemas complementarios). Si, además, la rotura es localizada y el poco aldehído generado reacciona rápidamente con su diana, puede ser extremadamente difícil su detección mediante la técnica utilizada.

III. Publicaciones y resultados no publicados

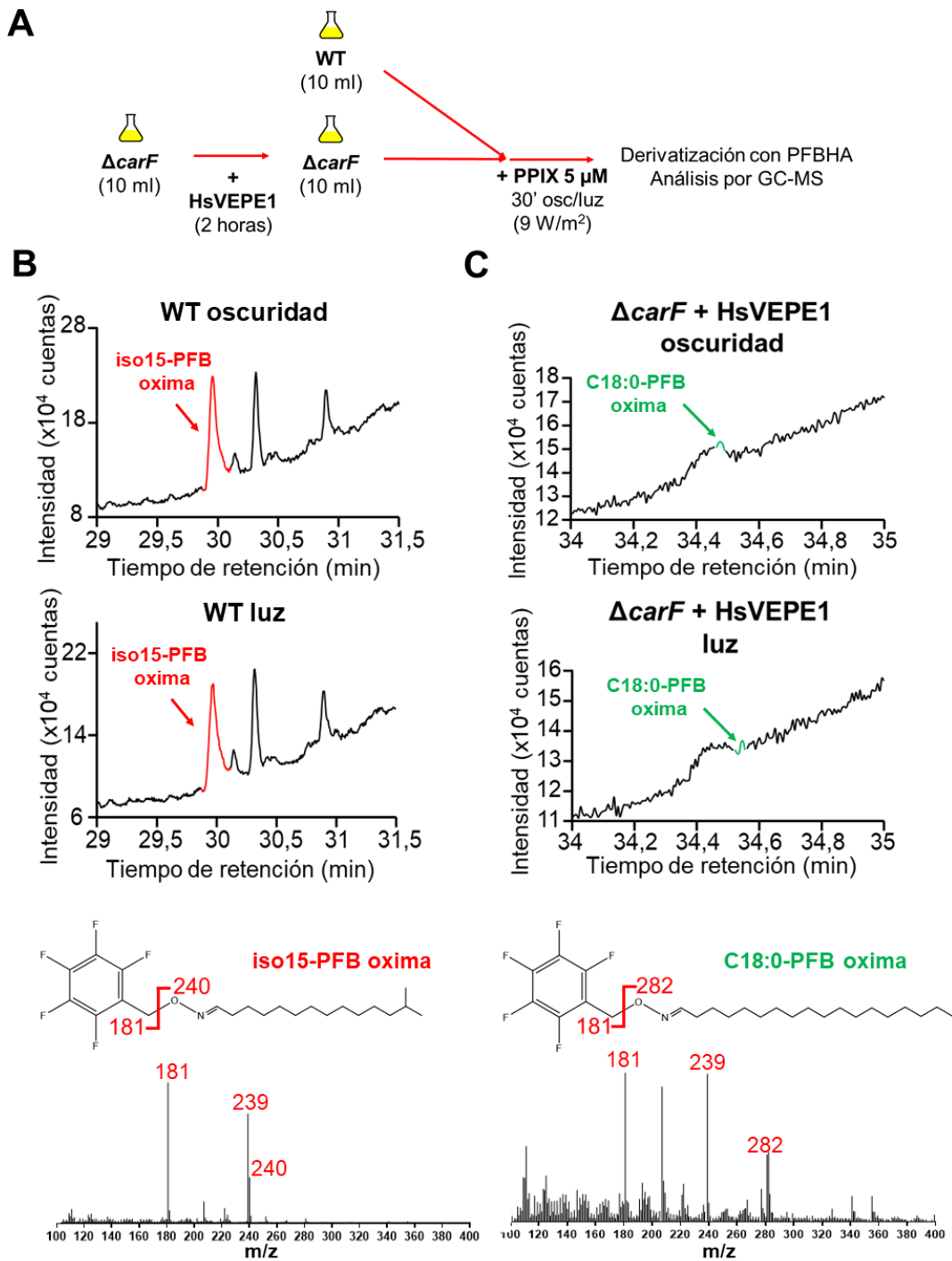


Figura 24. Detección de aldehídos grasos en muestras de *M. xanthus* incubadas en luz y oscuridad mediante derivatización con PFBHA y análisis por GC-MS. A) Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Detección de i15:0-PFB oxima por GC-MS en cultivos de la estirpe silvestre incubados en oscuridad y luz durante 30 minutos con 5 μM de PPIX. Se muestran los cromatogramas (arriba), el espectro de masas del i15:0-PFB oxima y su estructura química (abajo). **C)** Detección de C18:0-PFB oxima por GC-MS en cultivos de la estirpe ΔcarF alimentada con HsVEPE1 incubados en oscuridad y luz durante 30 minutos con 5 μM de PPIX. Se muestran los cromatogramas (arriba), el espectro de masas del C18:0-PFB oxima y su estructura química (abajo).

III. Publicaciones y resultados no publicados

III.6.3. Complementación química con los productos de la rotura en la luz del plasmalógeno HsVEPE1

Ya se ha comentado que, *in vitro*, la exposición del plasmalógeno HsVEPE1 a la luz (blanca, 2 horas) en presencia de PPIX (25 μ M) resulta en la descomposición de una buena parte del plasmalógeno, dando lugar a 2-18:1-liso-PE y heptadecanal (Gallego-García *et al.*, 2019). Si el mecanismo de señalización de la luz *in vivo* depende de la rotura del plasmalógeno por $^1\text{O}_2$, quizás la adición exógena de los correspondientes productos podría simular la acción de la luz y provocar una activación de la carotenogénesis en la oscuridad.

Los experimentos de complementación se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito con anterioridad. En una primera aproximación (Figura 25), se utilizó la estirpe $\Delta carF$ y el plasmalógeno HsVEPE1 tratado o no *in vitro* con luz azul (405 nm) durante 15 minutos en presencia de PPIX (a 25 o 50 μ M), antes de ser depositado sobre el medio de cultivo. A modo de control, se dispensó el plasmalógeno pretratado o no con luz azul en ausencia de PPIX, y la PPIX sola a una u otra concentración. Una vez depositados los distintos compuestos y las células, las placas se incubaron en oscuridad o en la luz. Como puede observarse en la figura 25, el pretratamiento del plasmalógeno a la luz en presencia de PPIX no se tradujo en la síntesis de carotenos en la oscuridad, pues los cultivos siguieron creciendo de color amarillo. Este resultado no parece que sea achacable a una rotura insuficiente de los plasmalógenos en las condiciones utilizadas. Más bien parece que el pretratamiento realizado conduce a una destrucción de buena parte de los plasmalógenos, lo que explicaría que las células “alimentadas” con el plasmalógeno previamente expuesto a la luz, siempre y cuando también esté presente la PPIX, no se vuelvan rojas y se fotolisen de manera más patente (probablemente por los efectos tóxicos de los productos derivados de la destrucción de gran parte del plasmalógeno).

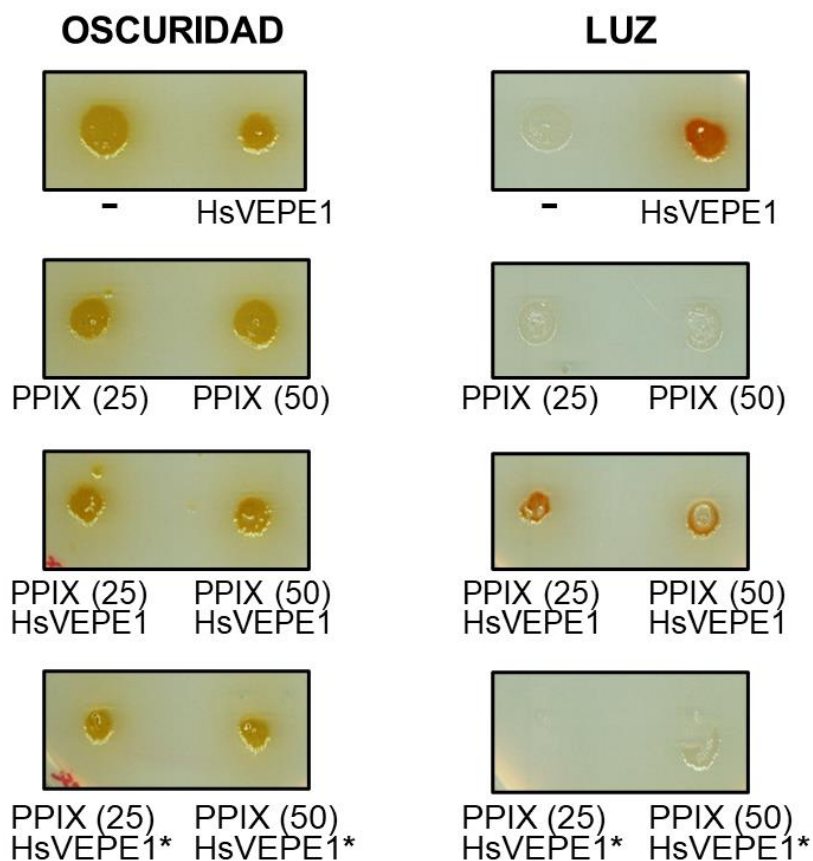


Figura 25. Complementación química de la estirpe *AcarF* con el plasmalógeno sin tratar (HsVEPE1) y previamente tratado (HsVEPE1*) *in vitro* con luz azul en presencia de PPIX. Para analizar el fenotipo en la luz, las células fueron incubadas en oscuridad (izquierda) o luz (derecha) durante 48 horas. El símbolo “-” indica que las células no han sido incubadas ni con PPIX ni con HsVEPE1. La cantidad de HsVEPE1 utilizada en el análisis de complementación fue de 20 nmoles.

Puesto que la 2-18:1-liso-PE y el heptadecanal están comercialmente disponibles, otra forma de analizar si los productos de degradación del plasmalógeno, añadidos exógenamente, pueden mimetizar el efecto de la luz consistió en realizar experimentos de complementación química (en este caso se utilizó la estirpe silvestre) con los compuestos adquiridos. Como se muestra en la Figura 26, ni la 2-18:1-liso-PE ni el heptadecanal administrados por separado, ni conjuntamente, fueron capaces de inducir la carotenogénesis en oscuridad.

Los resultados negativos en ambos experimentos de complementación química podrían deberse a una captación deficiente de los compuestos añadidos exógenamente o, en caso de que *M. xanthus* sí pueda captarlos, a que la rotura deba ocurrir *in situ*, cerca de la diana o dianas, para disparar con éxito el mecanismo de señalización. Por otro lado, no podemos descartar que el mecanismo de señalización sea completamente distinto y no se requiera la rotura del plasmalógeno. Sin embargo, esto es muy

III. Publicaciones y resultados no publicados

improbable puesto que, como se ha comentado anteriormente, lo único que distingue al plasmalógeno de su precursor AEPE, que no sirve para señalar el estrés fotooxidativo, es que el enlace éter del AEPE no es susceptible de rotura por $^1\text{O}_2$.

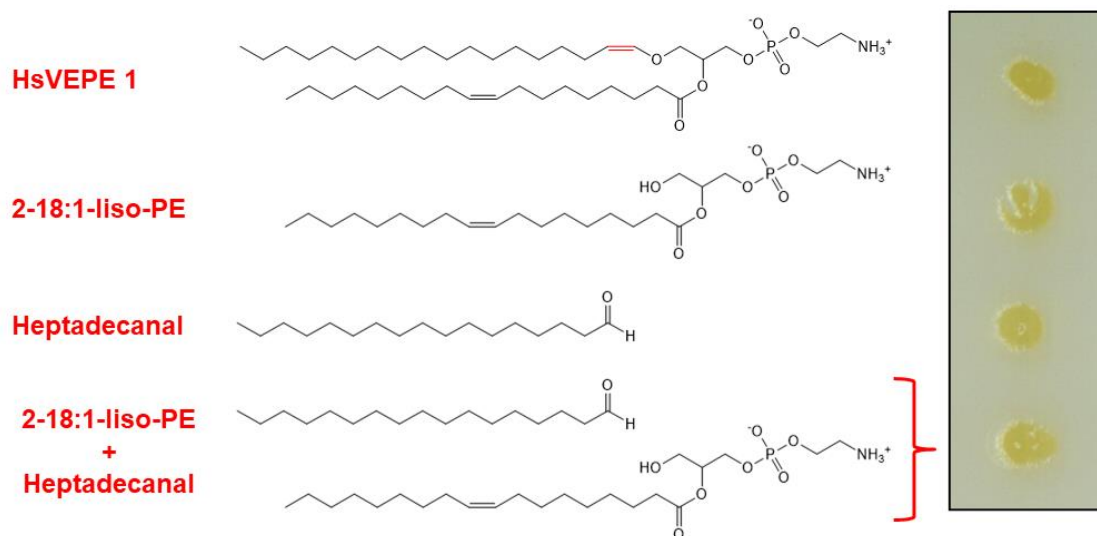


Figura 26. Complementación química de la estirpe silvestre de *M. xanthus* con heptadecanal, 2-18:1-liso-PE y con ambos compuestos. Las células de *M. xanthus* fueron alimentadas en oscuridad con 20 nmoles de cada compuesto por separado o conjuntamente en placas de medio CTT.

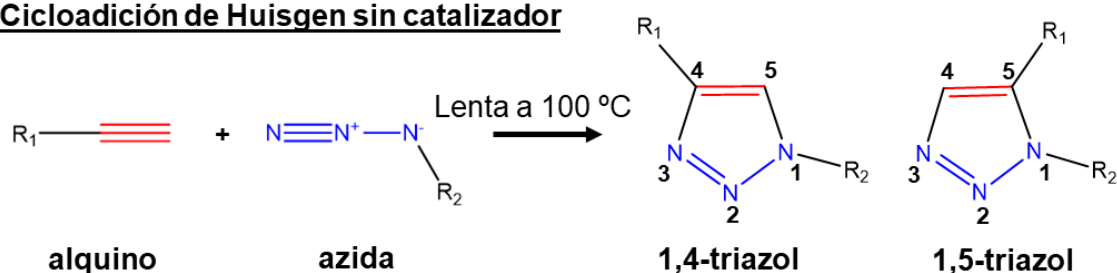
III.6.4. Análisis de la formación de posibles aductos mediante el uso de química “clic”

Como ya se ha comentado, estudiar el mecanismo de señalización de la luz en *M. xanthus* con los métodos tradicionales puede ser realmente complejo. Durante décadas se han utilizado sustratos radioactivos para seguirle la pista a los compuestos lipídicos *in vivo*. Sin embargo, esta práctica está en desuso, ya que la síntesis de estos reactivos puede ser laboriosa, requiere un equipamiento específico, está sujeta a regulación especial y la cuantificación de la señal puede ser realmente tediosa. Como alternativa al marcaje radioactivo se pueden utilizar lípidos con etiquetas fluorescentes. Aunque estos lípidos ofrecen una mayor sensibilidad, la fusión de etiquetas tan grandes puede tener un gran impacto sobre su estructura u otros aspectos de su biología (Gaebler *et al.*, 2013). Para solventar estos problemas, en los últimos años se han puesto a punto nuevas técnicas que se basan en la reacción química entre dos grupos funcionales. Estas técnicas, conocidas comúnmente como técnicas de química “clic”, se han aplicado con éxito en todo tipo de estudios biológicos, ya que son fáciles de realizar, muy selectivas, tienen un alto rendimiento en entornos acuosos y apenas generan sub-productos. Por tanto, un abordaje experimental basado en los principios de la química

III. Publicaciones y resultados no publicados

clic podría ayudarnos a comprender mejor cómo funciona el proceso de señalización del estrés fotooxidativo mediado por los plasmalógenos. En lipidómica, la versión más utilizada es la que consiste en una reacción de cicloadición catalizada por Cu^{I} entre un alquino y una azida (CuCCA), que fue descrita por Huisgen (1963) y que da lugar a un 1,2,3-triazol (McKay & Finn, 2015; Parker & Pratt, 2020). En su modalidad no catalizada, había que aplicar calor para que la reacción se produjera a una velocidad aceptable, y se generaba una mezcla de 1,4 y 1,5-triazoles. En 2002, varios trabajos (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe *et al.*, 2002) confirmaron que el Cu^{I} incrementaba significativamente la velocidad de esta reacción a temperatura ambiente. Otra ventaja de la CuCCA es que se genera únicamente el isómero 1,4-triazol (Figura 27) (Liang & Astruc, 2011).

Cicloadición de Huisgen sin catalizador



CuCCA

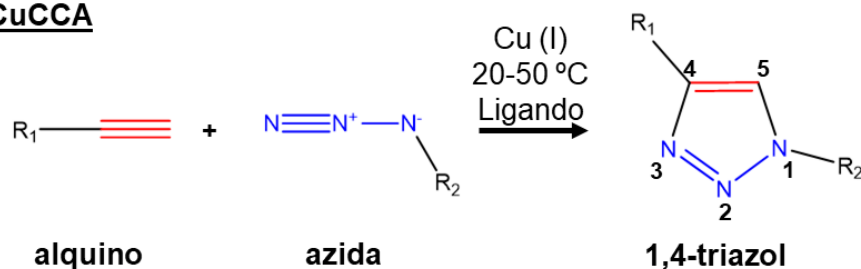


Figura 27. Reacción de cicloadición de Huisgen sin catalizador (arriba) y catalizada por Cu^{I} (CuCCA) (abajo). Imagen modificada de Liang & Astruc. (2011).

Uno de los aspectos más ventajosos de la reacción CuCCA es que no solamente se puede utilizar en experimentos *in vitro* y *ex vitro*, sino también en células y organismos vivos. Esto se debe a que la CuCCA no requiere temperaturas excesivamente altas, puede realizarse en un entorno acuoso y diferentes compuestos de cobre pueden catalizar esta reacción (lo más sencillo es utilizar sales de Cu^{II} , como el CuSO_4 , en combinación con un agente reductor, como el ascorbato de sodio, que convierta el Cu^{II} en Cu^{I}). La citotoxicidad del Cu^{I} hace que, sobre todo en los experimentos *in vivo*, se utilicen ligandos biocompatibles para mantener la velocidad de la CuCCA a concentraciones menores de cobre. En la mayoría de los casos se utiliza como ligando

III. Publicaciones y resultados no publicados

un donador nitrogenado polidentado, como el Tris((1-bencil-4-triazolil)metil)amina (TBTA) o el Tris((1-hidroxi-propil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (THTPA).

La principal limitación que tienen estas técnicas es la escasa disponibilidad comercial de lípidos marcados con grupos alquino o azida y su elevado coste. Para aprender las novedosas técnicas de química clic se realizó una estancia breve durante la fase final del doctorado en el Grupo de Investigación dirigido por el Prof. Christoph Thiele (LIMES Institute, Universidad de Bonn). Los resultados preliminares derivados de la realización de dicha estancia se exponen en los siguientes subapartados.

III.6.4.1. Complementación química con alquino-16:0-OAG

Para solventar cualquier problema biológico, es posible aplicar la reacción CuAAC en dos orientaciones distintas. Se considera que la orientación ideal es etiquetar el compuesto de interés con alquino y usar una sonda con azida para purificar o marcar con fluorescencia aquellas moléculas que contengan el alquino. Sin embargo, no se debe descartar la orientación contraria, en la que la azida se utiliza como etiqueta y el compuesto con alquino como sonda (Parker & Pratt, 2020). En general, el etiquetar un lípido con alquino no suele afectar a su funcionalidad o su capacidad para interaccionar con proteínas, ya que es un grupo funcional pequeño, ni demasiado hidrofílico ni demasiado hidrofóbico (Gaebler *et al.*, 2013). No obstante, y siempre que sea posible, se debe corroborar que al introducir el alquino no se ve afectada la funcionalidad del lípido.

Lo ideal para estudiar mediante química clic el mecanismo de señalización de la luz propuesto sería utilizar un plasmalógeno con un alquino en el ácido graso unido a *sn*-1. En caso de que el enlace vinil-éter se rompiera en la luz, se liberaría un aldehído graso con alquino, al que podríamos seguirle la pista y determinar si forma aductos con alguna proteína, como podría ser CarR (Figura 28). Combinando las estrategias de química clic con análisis de proteómica, podríamos llegar a identificar qué proteínas son modificadas covalentemente por el aldehído y también si existen proteínas que se unen al plasmalógeno completo.

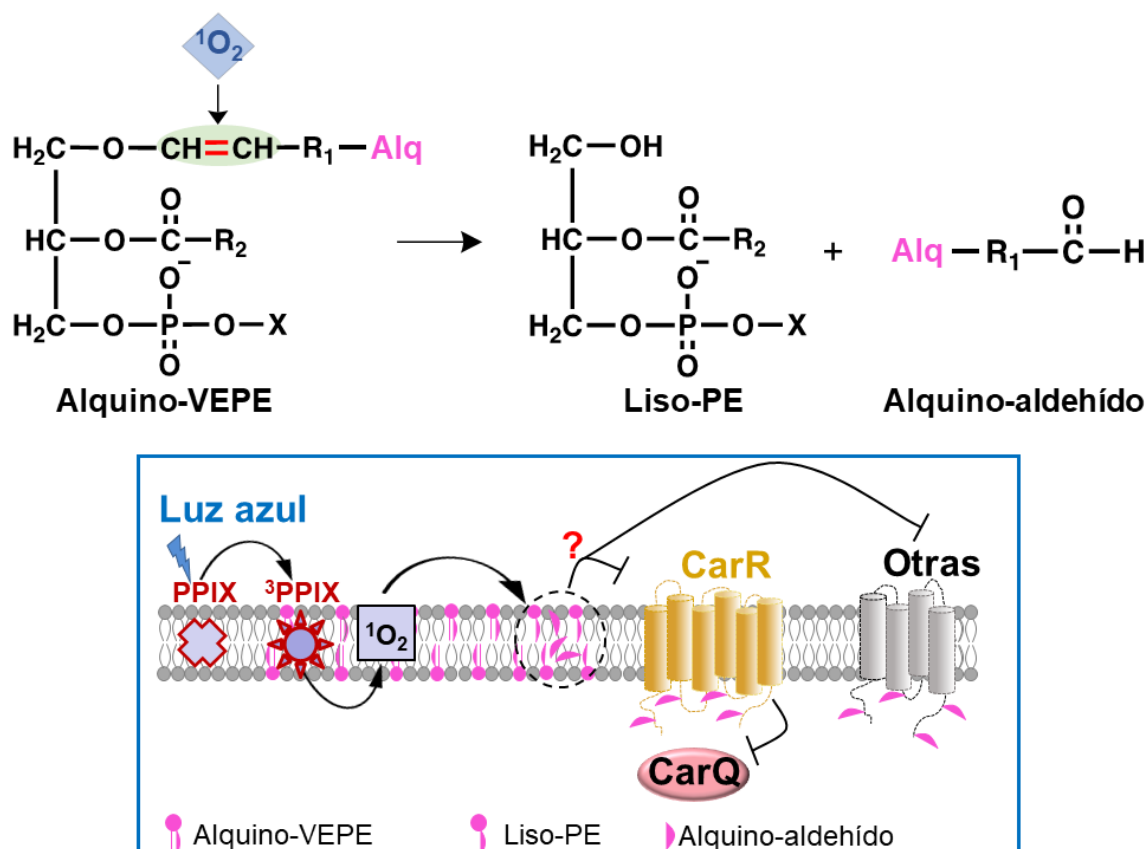


Figura 28. Estudio del modelo de señalización de la luz en *M. xanthus* usando lípidos “clicables”. Arriba se representa la rotura del alquino-VEPE en la luz. “Alq” representa el triple enlace alquino. Abajo se postula cómo la formación del aldehído graso tras la rotura del alquino-VEPE por 1O_2 podría desencadenar la respuesta carotenogénica mediante la formación de aductos con CarR y/u otras proteínas. Como los experimentos se realizarían en una estirpe que carece de lípidos éter y plasmalógenos propios, todo el VEPE (de origen exógeno) presente en las células llevaría el grupo alquino.

Puesto que la síntesis química de un plasmalógeno “clicable” es relativamente compleja y costosa, una alternativa es utilizar un alquino-OAG, como el alquino-16:0-OAG, que había sido sintetizado en el grupo del Prof. Thiele y estaba disponible en su laboratorio. Dados los resultados positivos obtenidos con el 1-18:0-OAG (Apartado III.5.7), cabría esperar que el alquino-16:0-OAG sea captado por *M. xanthus*, se convierta en un alquino-AEPE (incorporando presumiblemente un i15:0 en *sn*-2 y PE en *sn*-3) y, posteriormente, en un alquino-VEPE (Figura 29A). Para confirmar si *M. xanthus* puede utilizar el alquino-16:0-OAG para responder a la luz, se depositaron alícuotas de este lípido (disuelto en etanol) en placas de medio sólido. Una vez evaporado el etanol, se depositaron alícuotas de cultivos de la estirpe de *M. xanthus* $\Delta elbD \Delta 1676$ sobre el lípido ya secado. Esta estirpe carece de lípidos éter y plasmalógenos propios, pero al tener CarF intacto sería capaz de generar plasmalógenos si se le suministra un precursor con enlace éter (Figura 29A). Cuando se analizó el fenotipo a la luz (Figura 29B) se observó que las colonias de

III. Publicaciones y resultados no publicados

ΔelbD Δ1676 alimentadas con alquino-16:0-OAG adquirieron un color rojo. Así pues, la administración exógena del alquino-16:0-OAG permite rescatar la respuesta a la luz de las células que carecen de lípidos éter, presumiblemente por su conversión en alquino-VEPE (con un ácido graso i15:0 en la posición *sn*-2) en el interior de la célula.

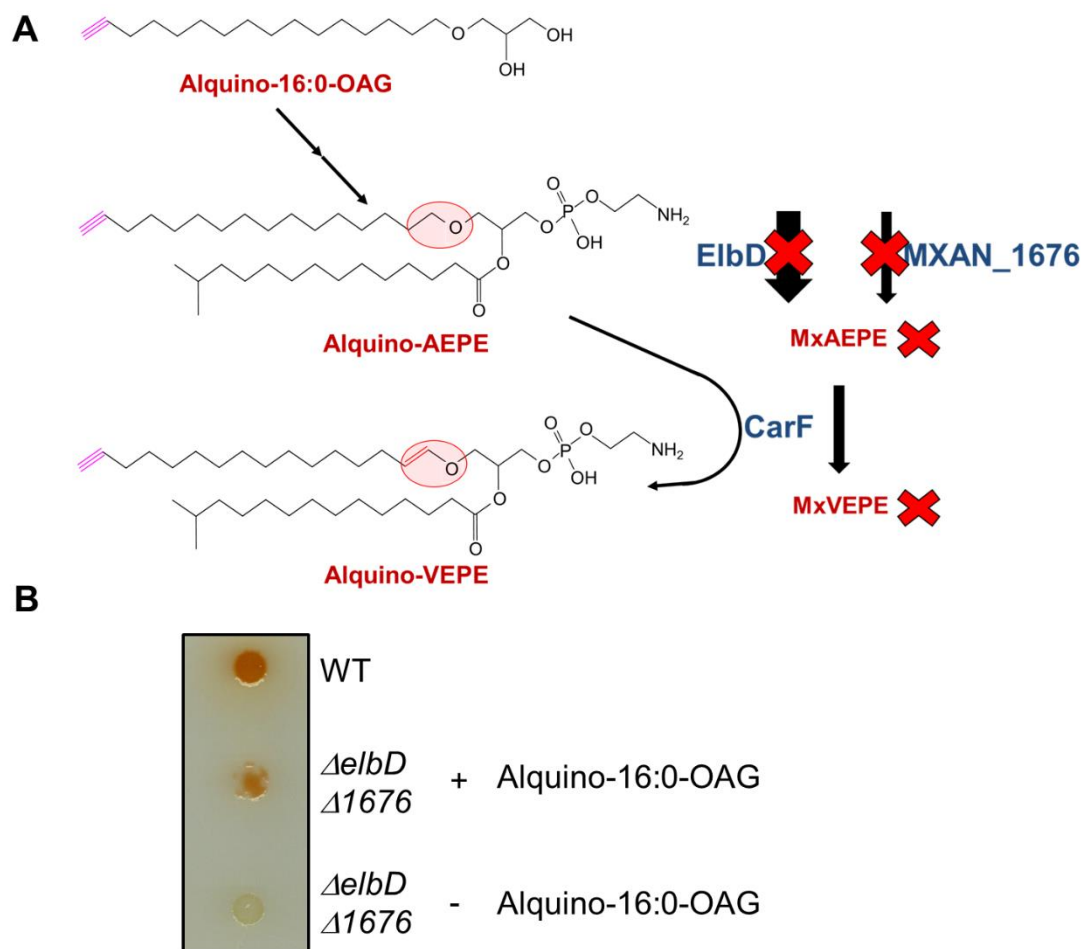


Figura 29. Complementación química con alquino-16:0-OAG. A) Alimentación de la estirpe de *M. xanthus ΔelbD Δ1676* con alquino-16:0-OAG y posible mecanismo de conversión del lípido original en alquino-AEPE y alquino-VEPE. Los nombres de las enzimas se indican en color azul, mientras que en rojo se indican los nombres de los sustratos y productos. En rosa se marca el grupo alquino. Con una “X” roja se indica ausencia de una determinada enzima o producto. **B)** Análisis de la respuesta a la luz de la estirpe de *M. xanthus ΔelbD Δ1676* sin complementar y complementada químicamente con 40 nmoles de alquino-16:0-OAG en placas de medio sólido.

III.6.4.2. Análisis lipídicos a partir de cultivos de *M. xanthus* crecidos en presencia de alquino-16:0-OAG

Para corroborar la conversión del alquino-16:0-OAG en alquino-VEPE en las estirpes de *M. xanthus* alimentadas con dicho compuesto, se recurrió a realizar los análisis lipídicos utilizando la técnica del *multiplexing* (Thiele *et al.*, 2019). De este modo es posible detectar en MS/MS todos aquellos lípidos con un grupo alquino y analizar

III. Publicaciones y resultados no publicados

simultáneamente 3 réplicas técnicas de cada condición, para abaratar costes, reducir el ruido y la fluctuación técnica, y mejorar el rendimiento de la muestra. Además, es posible cuantificar de forma absoluta los lípidos usando un estándar interno, compuesto por una mezcla de lípidos de diferentes clases (PEs, PCs, Pls, ceramidas, diacilgliceroles o triacilgliceroles) que contienen ácidos grasos marcados con un alquino. El análisis se lleva a cabo extrayendo previamente los lípidos y realizando la reacción clic con un clic-*reporter*, que es una molécula cargada con un grupo azida terminal que permite la ionización de los lípidos etiquetados, incrementando su señal en el MS/MS, y que sirve para identificar los lípidos con alquino (Figura 30A). Para poder analizar simultáneamente 3 réplicas técnicas, es necesario utilizar tres clic-*reporters* diferentes: C175-73, C175-75 y C175-77 (Figura 30A). Los tres compuestos tienen una masa de 175 Da, que tras la reacción clic se suma a la masa del lípido con alquino y se detecta como ion parental con la masa correspondiente en el primer análisis de masas (MS1). Pero al tener cada clic-*reporter* una composición diferente de deuterio, cuando se fragmenta el ion parental en el segundo análisis de masas (MS2) y se libera dimetiletilamina, la pérdida neutra que se produce es distinta en cada caso: de 73, 75 y 77 Da, respectivamente (M^*-73 , M^*-75 y M^*-77 , siendo M^* la masa del ion parental) (Figura 30B).

III. Publicaciones y resultados no publicados

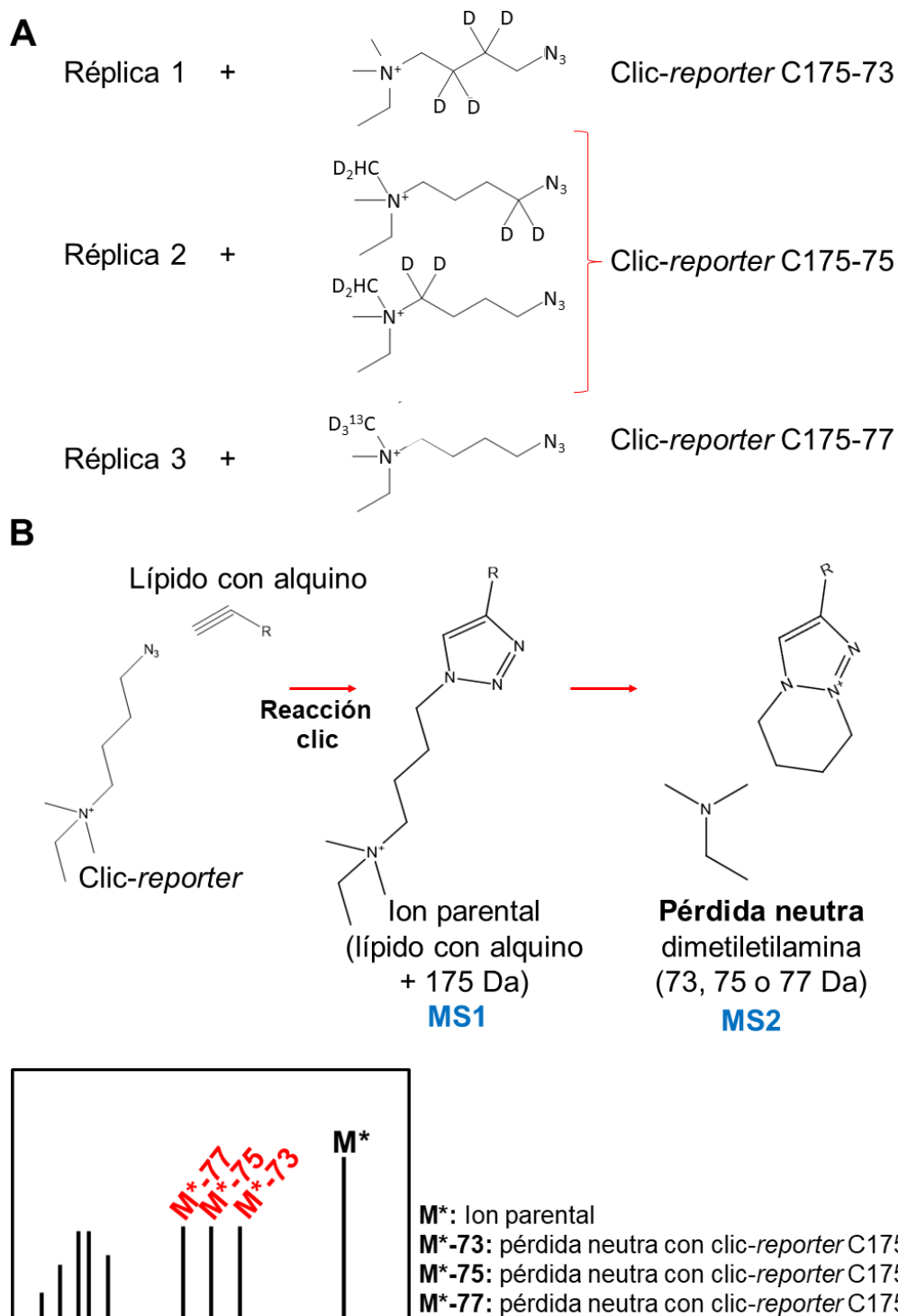


Figura 30. Técnica *multiplexing* para el análisis de especies lipídicas marcadas con un grupo alquino. A) Cada réplica técnica se incubó con un clic-reporter diferente: C175-73, C175-75 o C175-77. **B)** Reacción clic entre el lípido marcado con alquino y el clic-reporter (arriba) y análisis, mediante espectrometría de masas, de los iones generados en MS1 (M^*) y MS2 (M^*-73 , M^*-75 y M^*-77). Imagen modificada de Thiele *et al.* (2019).

III. Publicaciones y resultados no publicados

Para realizar los análisis lipídicos en *M. xanthus*, se inició un cultivo líquido de la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ y, tras incubarlo toda la noche, se ajustó a una DO~0,75 y se alimentó con alquino-16:0-OAG durante 8 horas. Las muestras tomadas se procesaron y analizaron por MS/MS mediante la técnica del *multiplexing*, y con el programa *LipidXplorer* se obtuvo una tabla con las especies lipídicas que contienen un grupo alquino. De formarse el alquino-VEPE con i15:0 en la posición *sn*-2, al reaccionar con cada uno de los tres *clic-reporters* se obtendrían tres compuestos diferentes con el mismo peso molecular (832,66 Da), que generarían la señal del ion parental en MS1 (Figura 31A). En MS2, cuando cada uno de los tres compuestos se fragmentase y perdiese la dimetiletilamina, se producirían tres iones característicos (759, 757 y 755 Da) que se corresponderían, respectivamente, con las pérdidas neutras M*-73, M*-75 y M*-77 (Figura 31A). De igual forma, se podría detectar el alquino-AEPE. El análisis de los resultados obtenidos reveló la presencia de alquino-VEPE y cantidades muy pequeñas de alquino-AEPE en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ alimentada con el alquino-16:0-OAG (Figura 31B). Por lo tanto, una vez dentro de la célula, dicho lípido se convierte casi en su totalidad en un plasmalógeno híbrido, distinto al MxVEPE de *M. xanthus*, pero igualmente capaz de inducir la respuesta carotenogénica. Además, se identificaron otras muchas especies lipídicas con alquino pertenecientes a diferentes clases (ceramidas, diacilgliceroles, triacilgliceroles, PEs, PCs y Pls), aunque a niveles bajos. Es probable que el propio recambio al que están sujetos los lípidos en las células haga que el alquino-16:0 se libere del alquino-VEPE y se reincorpore a otros lípidos, lo que explicaría estos resultados.

III. Publicaciones y resultados no publicados

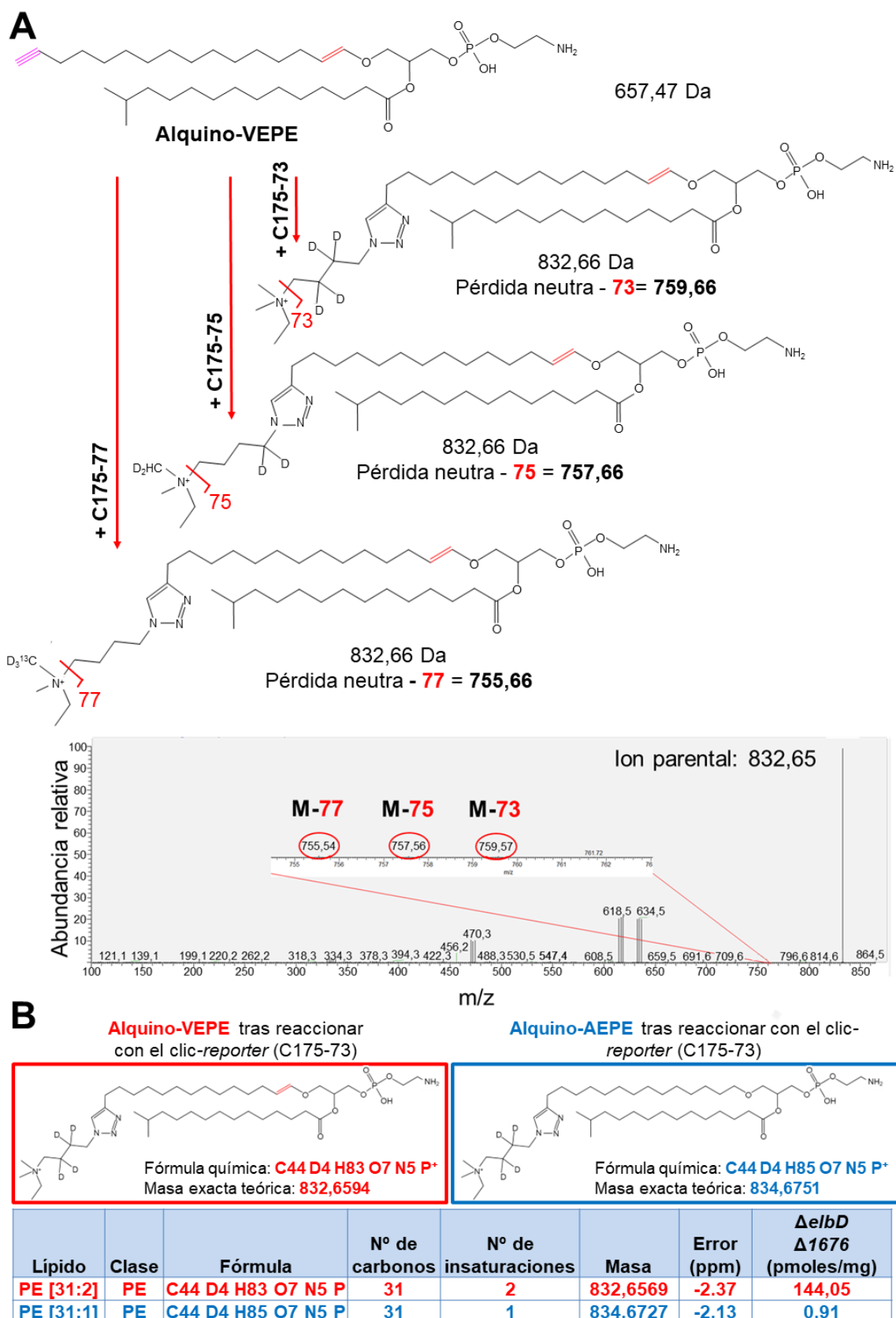


Figura 31. Análisis lipídico de la estirpe de *M. xanthus* Δ elbD Δ 1676 alimentada con el alquino-16:0-OAG. A) Reacción clic del alquino-VEPE con tres clic-reporters utilizados y productos generados (arriba) y el espectro en MS2 característico del alquino-VEPE tras la reacción clic (abajo). Debajo de cada fórmula se indica su peso molecular (en Da) y la pérdida

neutra que experimenta en MS2. En rosa se marca el grupo alquino y en rojo el enlace vinil-éter. **B)** Cuantificación del alquino-VEPE (marcado en color rojo) y alquino-AEPE (marcado en color azul) identificados en las muestras de estudio.

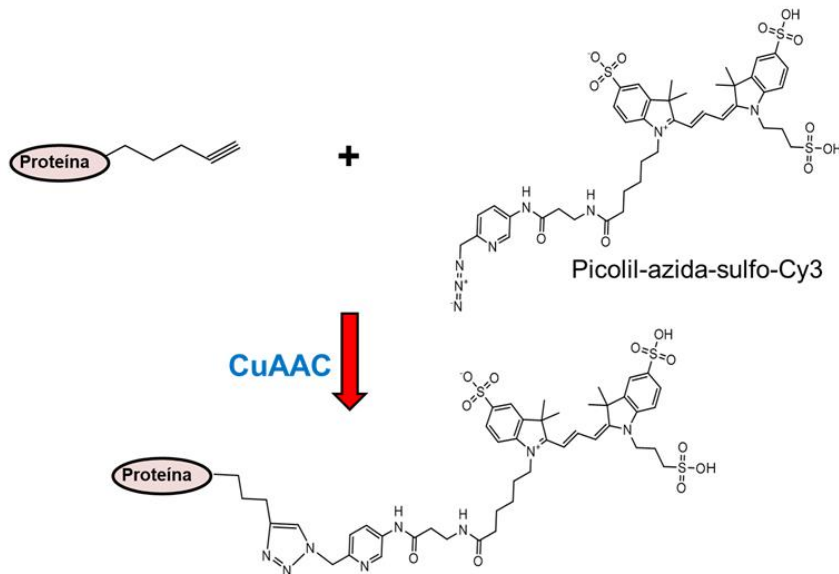
III.6.4.3. Detección de proteínas modificadas con un grupo alquino en *M. xanthus*

Una vez demostrada la conversión del alquino-16:0-OAG en alquino-VEPE en *M. xanthus*, se procedió a realizar una primera prueba usando la química-clic para analizar la posible formación de aductos de CarR con el aldehído graso que se generaría mediante rotura del enlace vinil-éter por $^1\text{O}_2$. La aproximación utilizada se basa en la reacción de cicloadición entre las proteínas capaces de interaccionar covalentemente con un lípido con alquino y el compuesto fluorescente Picolil-azida-sulfo-cy3 (Figura 32A) (Delago *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2020; Vila *et al.*, 2008). Ello permite identificar, en primer lugar, las posibles dianas mediante SDS-PAGE y excitación del gel resultante con luz verde (~520 nm) y, posteriormente, tras recortar las bandas observadas, mediante espectroscopía de masas.

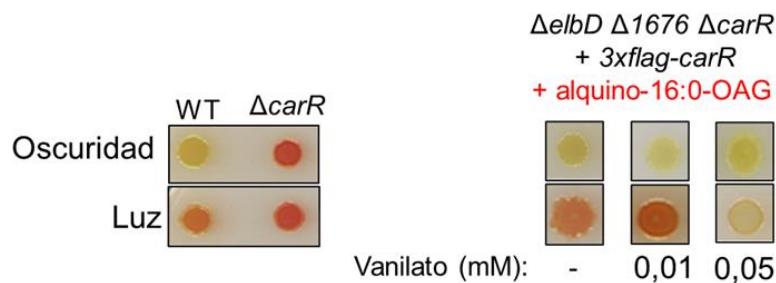
Los experimentos se realizaron en un fondo génico $\Delta elbD \Delta 1676 \Delta carR$, en el cual se sobreexpresó CarR fusionado a una etiqueta 3xFLAG en su extremo amino y bajo el control del promotor *Pvan*. Como el crecimiento de la estirpe correspondiente en presencia de 0,01 mM de vanilato recrea el comportamiento silvestre (mejor de lo que lo hace la expresión basal), pero concentraciones superiores del inductor convierten a la estirpe en Car⁻ (presumiblemente porque el exceso de CarR mantiene siempre a CarQ secuestrada en la membrana), se eligió la concentración más baja del inductor (Figura 32B). Así, para la toma de muestras, se iniciaron cultivos líquidos de las estirpes $\Delta elbD \Delta 1676 \Delta carR$ y $\Delta elbD \Delta 1676 \Delta carR + Pvan::3xflag-carR$ y, tras crecerlos durante toda la noche en presencia de vanilato 0,01 mM, se ajustaron a una DO~0,75 y se alimentaron con 50 μM de alquino-16:0-OAG. Tras 2 horas creciendo en oscuridad se subdividió cada cultivo, de forma que la mitad se incubó en oscuridad y la otra mitad en luz durante 6 horas más. Los resultados obtenidos al procesar las muestras (Figura 32C) indicaron la presencia de múltiples bandas fluorescentes, de mayor o menor intensidad, en todas las muestras. Sin embargo, no se apreciaron diferencias claras en el patrón de bandas obtenido entre las muestras de luz y oscuridad. Aunque pudo detectarse la proteína 3xFLAG-CarR mediante *Western blot* (Figura 32C), no fue posible discernir si dicha proteína se corresponde con alguna de las múltiples bandas fluorescentes obtenidas tras realizar la reacción clic con el Picolil-azida-sulfo-Cy3.

III. Publicaciones y resultados no publicados

A



B



C

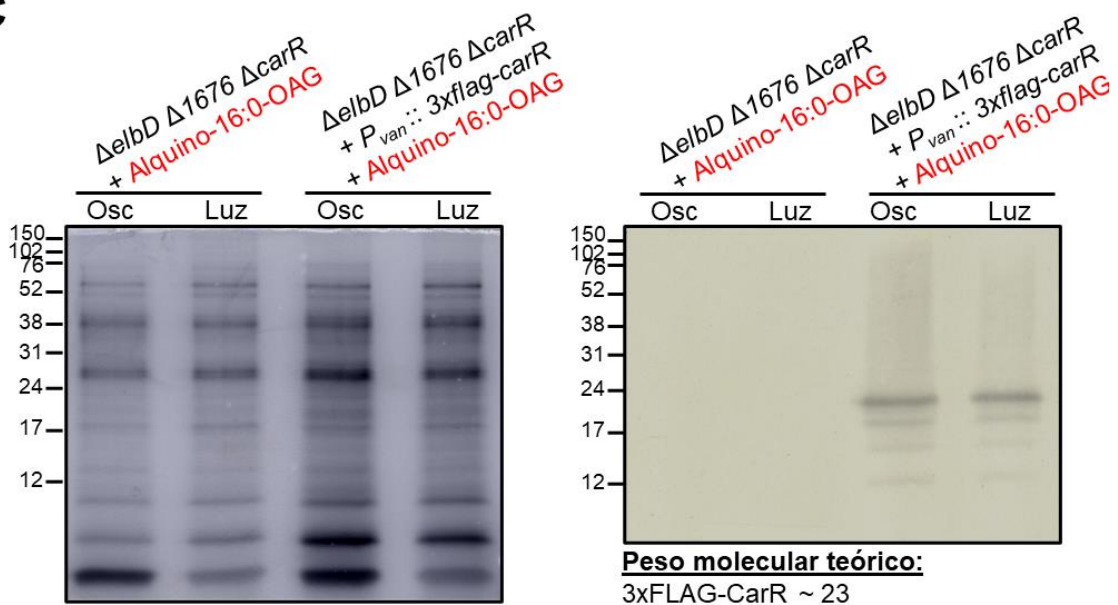


Figura 32. Detección de proteínas modificadas con grupo alquino en estirpes de *M. xanthus* alimentadas con alquino-16:0-OAG en oscuridad y luz. A) Reacción clic entre proteínas modificadas con grupo alquino y Picolil-azida-sulfo-Cy3. B) Fenotipo de color de la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676 \Delta carR$ + *P_{van}::3xflag-carR* a diferentes concentraciones de vanilato en luz y oscuridad. C) Análisis mediante excitación con luz verde (izquierda) y *Western blot* (derecha) de la fracción proteica procedente de diferentes cultivos de *M. xanthus* e incubada con Picolil-azida-sulfo-Cy3 en unas condiciones óptimas para que se produzca la reacción clic.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Sorprende el número de proteínas de *M. xanthus* que acaban etiquetadas con un grupo alquino, ya sea por interacción directa con el alquino-16:0-OAG o con alguno de los lípidos derivados o sus subproductos (alquino-AEPE o alquino-VEPE). El análisis de las muestras mediante espectrometría de masas en un futuro quizás aporte información relevante sobre las interacciones lípido-proteína en *M. xanthus*. En cualquier caso, para poder determinar con mayor claridad si CarR se modifica o no por un alquino-aldehído graso (o, menos probable, por el alquino-plasmalógeno) se procederá al uso de técnicas más “limpias”, como la inmunoprecipitación de 3FLAG-CarR y su posterior incubación con el compuesto fluorescente, o la incubación del extracto proteico total con azida-PEG3-biotina seguido de la purificación e identificación de las proteínas biotiniladas.

III. Publicaciones y resultados no publicados

Estirpes de *M. xanthus*

Estirpe	Descripción	Origen/fuente
DK1050	Estirpe silvestre	Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984
MR992	$\Delta carF$	Fontes <i>et al.</i> , 2003
MR3082	$\Delta carR$	Cedido por E. Pajares
MR3316	$\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3320	$\Delta elbD \Delta 1676$	Gallego-García <i>et al.</i> , 2019
MR3784	$\Delta carR \Delta elbD \Delta 1676 + P_{van::3xflag-carR}$	Cedido por V. Espejo

IV. CONCLUSIONES

IV. Conclusiones

The research that comprises this thesis and the results obtained led to the following conclusions:

- 1- There is a correlation between the degree of conservation of histidines in CarF and its homologs and their functional importance. Thus, each of the eight CarF histidines conserved in all homologs (H78, H103, H104, H164, H168, H191, H194 and H195) is essential for function. H113, conserved in homologs from metazoa, Myxococcales and *Leptospira*, but not in those from plants or Alphaproteobacteria, is also required for function. By contrast, H183 and H190, conserved only in some homologs, and H218, present only in CarF, can be dispensed with.
- 2- Some of the functionally important histidines in CarF (H164, H168; H191, H194 and H195) are arranged in motifs that may be involved in forming a di-iron cluster, as shown for other fatty acid desaturases. Consistent with this, CarF-Strep expressed and purified from *E. coli*, using FC12 as detergent for membrane extraction, contains iron (Fe:CarF stoichiometry of ~2:1). It also exhibits some enzymatic activity and the ability to form homomultimers.
- 3- Two truncated versions of CarF (CarF₁₋₂₄₀ and CarF₁₋₂₄₇), which lack a C-terminal segment of CarF that is absent in its animal homologs and that is not required for function, could also be expressed with a Strep-tag fusion in *E. coli*. However, removing this segment did not improve solubility in detergents less harsh than FC12.
- 4- Expression of CarF-Strep in an *E. coli* strain engineered to produce ether lipids, albeit to low levels, did not modify its solubility in the set of detergents tested.
- 5- CarF-Strep is soluble in the SMA and DIBMA polymeric nanodiscs, but the conditions tested so far did not allow purification.
- 6- Despite the huge evolutionary distance between bacteria and animals, all animal homologs tested, including the human one, complemented the lack of *carF* in *M. xanthus*. Thus, like CarF, the human and corresponding animal homologs (known as TMEM189) correspond to the plasmalyethanolamine desaturase involved in the biosynthesis of plasmalogens, whose identity had remained unknown for the last 50 years.
- 7- Likewise, the *Leptospira* CarF homolog also complemented the lack of *carF* in *M. xanthus*, consistent with the presence of all nine histidines important for function. By contrast, the Alphaproteobacteria and plant homologs tested, all of which lack CarF H113 and share a lower degree of similarity with CarF, failed to complement.
- 8- None of the animal (human, mouse, zebra fish, *C. elegans* and *D. melanogaster*) or bacterial (*L. interrogans* and *Cystobacter fuscus*) CarF homologs tested were expressed (as C-terminal fusions to a Strep-tag) in substantial amounts in *E. coli*.

IV. Conclusiones

- 9- Compared to mammalian cells, which have just one pathway to synthesize ether lipids, *M. xanthus* has evolved two parallel pathways: a main pathway and an ancillary one, both of which converge at CarF.
- 10- The main pathway, which depends on the multifunctional protein EibD and possibly other gene products from the *elbA-E* cluster, as suggested by their protein domains, appears to be widely represented in Myxococcales and exhibits a modular gene arrangement.
- 11- The ancillary pathway depends not only on MXAN_1676 (46% identical to human ADHAPS/AGPS) but also on MXAN_1675 (with Re/FAR domain) and MXAN_1674 (a possible NAD dependent epimerase/dehydratase). This pathway, more akin to the mammalian one, is restricted to the genus *Myxococcus*, suggesting that it was acquired by horizontal gene transfer or, alternatively, that it was present in a myxobacterial ancestor and was then lost in most species, as the main pathway evolved.
- 12- As expected, there is a good correlation between myxobacterial species that have been reported to produce plasmalogens and those which have a CarF homolog.
- 13- The Re/FAR domain in EibD and MXAN_1675 is required in *M. xanthus* to convert a fatty acid into a fatty alcohol, a step that is critical for ether lipid biosynthesis in mammalian cells.
- 14- Despite the similarity between MXAN_1676 and human ADHAPS/AGPS, expression of the latter in *M. xanthus* lacking MXAN_1676 was unable to rescue the response to light.
- 15- Based on experimental and comparative analyses, we propose two possible routes starting with DHAP in *M. xanthus* that may lead to formation of the ether bond, which CarF converts into the vinyl ether bond of plasmalogens. In addition, as with mammalian cells, *M. xanthus* can import 1-O-alkyl glycerol and use it as an intermediary compound for plasmalogen biosynthesis.
- 16- Signaling of photooxidative stress by plasmalogens in *M. xanthus* specifically requires their vinyl ether bond, but it occurs irrespective of their side chains at *sn*-1 or *sn*-2 and of their polar head group.
- 17- The ~80% plasmalogen reduction observed upon light exposure in the presence of PPIX *in vitro* suggests a molecular mechanism whereby the vinyl ether bond becomes broken, to generate lyso-PE and an *n*-1 fatty aldehyde, whose reaction with CarR and/or other proteins may underlie signaling.
- 18- However, the small decrease in plasmalogen content, concomitant to only a small increase in lyso-PE (and lack of light-specific aldehyde detection), observed upon exposure to light *in vivo*, suggests that *M. xanthus* cells must use a very sensitive

IV. Conclusiones

system to detect the minimal amount of plasmalogen cleaved in the light, perhaps to avoid the toxic effects that might arise from excess aldehyde or lyso-PE.

- 19- Failure to induce carotenogenesis in the dark upon feeding *M. xanthus* with the two HsVEPE1 photocleavage-products may indicate deficient uptake or that the plasmalogen breakdown must occur *in situ*, next to its target(s), for efficient signaling. Though improbable, an alternative mechanism whereby plasmalogens need not be broken cannot be ruled out.
- 20- *M. xanthus* can take the alkyne-16:0-OAG and convert it into an alkyne-plasmalogen. This will allow future use of click-chemistry techniques to further probe the molecular basis for plasmalogen-mediated photooxidative stress signaling.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abellón-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellán, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2014).** The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function σ factors. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2475–2490.
- Ahrendt, T., Dauth, C., & Bode, H. B. (2016).** An iso-15: 0 O-alkylglycerol moiety is the key structure of the E-signal in *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 162(1), 138–144.
- Ahrendt, T., Wolff, H., & Bode, H. B. (2015).** Neutral and phospholipids of the *Myxococcus xanthus* lipidome during fruiting body formation and germination. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6538–6547.
- Albert, C. J., Crowley, J. R., Hsu, F. F., Thukkani, A. K., & Ford, D. A. (2001).** Reactive chlorinating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens: Identification of 2-chlorohexadecanal. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23733–23741.
- Albert, C. J., Crowley, J. R., Hsu, F. F., Thukkani, A. K., & Ford, D. A. (2002).** Reactive brominating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens. Disparate utilization of sodium halides in the production of α -halo fatty aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4694–4703.
- Albert, C. J., Thukkani, A. K., Heuertz, R. M., Slungaard, A., Hazen, S. L., & Ford, D. A. (2003).** Eosinophil peroxidase-derived reactive brominating species target the vinyl ether bond of plasmalogens generating a novel chemoattractant, α -bromo fatty aldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8942–8950.
- Almsherqi, Z. A. (2021).** potential role of plasmalogens in the modulation of biomembrane morphology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:673917.
- An, J. U., Song, Y. S., Kim, K. R., Ko, Y. J., Yoon, D. Y., & Oh, D. K. (2018).** Biotransformation of polyunsaturated fatty acids to bioactive hepoxilins and trioxilins by microbial enzymes. *Nature Communications*, 9(128).
- Astudillo, A. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2019).** Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A_2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(6), 772-283.
- Bai, Y., McCoy, J. G., Levin, E. J., Sobrado, P., Rajashankar, K. R., Fox, B. G., & Zhou, M. (2015).** X-ray structure of a mammalian Stearoyl-CoA Desaturase. *Nature*, 524(7564), 252–256.
- Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2021).** Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules*, 11(3), 428.
- Berdyshev, E. (2011).** Mass spectrometry of fatty aldehydes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(11), 680–693.
- Berleman, J. E., & Kirby, J. R. (2009).** Deciphering the hunting strategy of a bacterial

V. Bibliografía

wolfpack. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 942–957.

- Bermúdez, M. A., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2021).** Lipid droplets, phospholipase A₂, arachidonic acid and atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(12), 1891.
- Bernal-Bernal, D., Abellón-Ruiz, J., Iniesta, A. A., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018).** Multifactorial control of the expression of a CRISPR-Cas system by an extracytoplasmic function σ /anti- σ pair and a global regulatory complex. *Nucleic Acids Research*, 46(13), 6726–6745.
- Bernal-Bernal, D., Gallego-García, A., García-Martínez, G., García-Heras, F., Jiménez, M. A., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2015).** Structure-function dissection of *Myxococcus xanthus* CarD N-terminal domain, a defining member of the CarD-CdnL-TRCF family of RNA polymerase interacting proteins. *PLoS ONE*, 10(3).
- Bhat, S., Ahrendt, T., Dauth, C., Bode, H. B., & Shimkets, L. J. (2014a).** Two Lipid Signals Guide Fruiting Body Development of *Myxococcus xanthus*. *MBio*, 5(1).
- Bhat, S., Boynton, T. O., Pham, D., & Shimkets, L. J. (2014b).** Fatty acids from membrane lipids become incorporated into lipid bodies during *Myxococcus xanthus* differentiation. *PLoS ONE*, 9(6), e99622.
- Bode, H. B., Ring, M. W., Schwär, G., Altmeyer, M. O., Kegler, C., Jose, I. R., Singer, M., & Müller, R. (2009).** Identification of additional players in the alternative biosynthesis pathway to Isovaleryl-CoA in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *ChemBioChem*, 10(1), 128–140.
- Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M. A., & Maréchal, E. (2014).** Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 470–480.
- Bramkamp, M., & Lopez, D. (2015).** Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 81–100.
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012).** Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(9), 1442–1452.
- Broniec, A., Klosinski, R., Pawlak, A., Wrona-Krol, M., Thompson, D., & Sarna, T. (2011).** Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(7), 892–898.
- Browning, D. F., Grainger, D. C., & Busby, S. J. W. (2010).** Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), 773–780.
- Browse, J., McCourt, P., & Somerville, C. R. (1985).** A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Science*, 227(4688), 763–765.
- Burchard, R. P., & Dworkin, M. (1966).** Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 91(2), 535–545.

- Caparrós-Martín, J. A., McCarthy-Suárez, I., & Culiáñez-Macià, F. A. (2013).** HAD hydrolase function unveiled by substrate screening: Enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* subclass I phosphosugar phosphatase AtSgpp. *Planta*, 237(4), 943–954.
- Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A. (2018).** Overview of the Baculovirus Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, 91, 5.4.1-5.4.6.
- Chen, B., Sun, Y., Niu, J., Jarugumilli, G. K., & Wu, X. (2018).** Protein lipidation in cell signaling and diseases: function, regulation, and therapeutic opportunities. *Cell Chemical Biology*, 25(7), 817–831.
- Chen, H., Gu, Z., Zhang, H., Wang, M., Chen, W., Lowther, W. T., & Chen, Y. Q. (2013).** Expression and purification of integral membrane fatty acid desaturases. *PLoS ONE*, 8(3), 1–9.
- Cronan, Jr., J. E., & Rock, C. O. (2008).** Biosynthesis of membrane lipids. *EcoSal Plus*, 3(1).
- Curtis, P. D., Geyer, R., White, D. C., & Shimkets, L. J. (2006).** Novel lipids in *Myxococcus xanthus* and their role in chemotaxis. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1935–1949.
- Cymerman, C., Hamon, D. P., Purushothaman, K. K., Roy, S. K., & Lands, W. E. (1966).** Optical rotatory dispersion and absolute configuration of natural plasmalogen. *Tetrahedron*, 22(1), 175-8.
- Da Silva, T. F., Eira, J., Lopes, A. T., Malheiro, A. R., Sousa, V., Luoma, A., Avila, R. L., Wanders, R. J. A., Just, W. W., Kirschner, D. A., Sousa, M. M., & Brites, P. (2014).** Peripheral nervous system plasmalogens regulate Schwann cell differentiation and myelination. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2560–2570.
- Davies, S. S., Pontsler, A. V., Marathe, G. K., Harrison, K. A., Murphy, R. C., Hinshaw, J. C., Prestwich, G. D., St. Hilaire, A., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., & McIntyre, T. M. (2001).** Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands and agonists. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16015–16023.
- Dawid, W. (2000).** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 403–427.
- De Carvalho, C. C. R., & Caramujo, M. J. (2018).** The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(2583).
- Dean, J. M., & Lodhi, I. J. (2018).** Structural and functional roles of ether lipids. *Protein and Cell*, 9(2), 196–206.
- Debuch, H. (1958).** Nature of the linkage of the aldehyde residue of natural plasmalogens. *Journal of Neurochemistry*, 2(2–3), 243–248.

V. Bibliografía

- Delago, A., Gregor, R., Dubinsky, L., Dandela, R., Hendler, A., Krief, P., Rayo, J., Aharoni, A., & Meijler, M. M. (2021). A bacterial quorum sensing molecule elicits a general stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–12.
- Dickschat, J. S., Bode, H. B., Kroppenstedt, R. M., Müller, R., & Schulz, S. (2005). Biosynthesis of iso-fatty acids in myxobacteria. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(15), 2824–2831.
- Domingues, R. M., Domingues, P., Melo, T., Pérez-Sala, D., Reis, A., & Spickett, C. M. (2013). Lipoxidation adducts with peptides and proteins: Deleterious modifications or signaling mechanisms? *Journal of Proteomics*, 92, 110–131.
- Dorninger, F., Forss-Petter, S., Wimmer, I., & Berger, J. (2020). Plasmalogens, platelet-activating factor and beyond – Ether lipids in signaling and neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 145, 105061.
- Dorninger, F., König, T., Scholze, P., Berger, M. L., Zeitler, G., Wiesinger, C., Gundacker, A., Pollak, D. D., Huck, S., Just, W. W., Forss-Petter, S., Pifl, C., & Berger, J. (2019). Disturbed neurotransmitter homeostasis in ether lipid deficiency. *Human Molecular Genetics*, 28(12), 2046–2061.
- Dorninger, F., Werner, E. R., Berger, J., & Watschinger, K. (2022). Regulation of the metabolism and traffic in mammals: the fog begins to lift. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:946393.
- E**benezer, D. L., Fu, P., Ramchandran, R., Ha, A. W., Putherickal, V., Sudhadevi, T., Harijith, A., Schumacher, F., Kleuser, B., & Natarajan, V. (2020). S1P and plasmalogen derived fatty aldehydes in cellular signaling and functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865, 158681.
- Elías-Arnanz, M., Fontes, M., & Padmanabhan, S. (2008). Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex regulatory network. D. E. Whitworth (Ed.), *Myxobacteria: multicellularity and differentiation* (211-225). Washington, D. C: ASM Press.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F. J. (1991a). Mutations affecting germination in *Myxococcus xanthus*. *Journal of General Microbiology*, 137(2), 389–397.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F. J. (1991b). Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *Journal of General Microbiology*, 137(2), 381–388.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2010). The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: A bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 764–778.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 128–135.

- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011).** Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637–647.
- Farooqui, A. A., & Horrocks, L. A. (2001).** Plasmalogens: Workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist*, 7(3), 232–245.
- Fernández-Zapata, J., Pérez-Castaño, R., Aranda, J., Colizzi, F., Polanco, M. C., Orozco, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018).** Plasticity in oligomerization, operator architecture, and DNA binding in the mode of action of a bacterial B₁₂-based photoreceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46), 17888–17905.
- Feulgen, R., & Voit, K. (2001).** Über die für die Nuclealfärbung und Nuclealreaktion verantwortlich zu machenden Gruppen. *Hoppe-Seyler's zeitschrift für physiologische chemie*, 137, 272-286.
- Fiori, M. C., Jiang, Y., Altenberg, G. A., & Liang, H. (2017).** Polymer-encased nanodiscs with improved buffer compatibility. *Scientific Reports*, 7(1).
- Fiori, M. C., Zheng, W., Kamilar, E., Simiyu, G., Altenberg, G. A., & Liang, H. (2020).** Extraction and reconstitution of membrane proteins into lipid nanodiscs encased by zwitterionic styrene-maleic amide copolymers. *Scientific Reports*, 10(1).
- Fontes, M., Galbis-Martínez, L., & Murillo, F. J. (2003).** A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 47(2), 561–571.
- Fontes, M., Ruiz-Vázquez, R., & Murillo, F. J. (1993).** Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *The EMBO Journal*, 12(4), 1265-1275.
- Fornwald, J. A., Lu, Q., Boyce, F. M., & Ames, R. S. (2016).** Gene expression in mammalian cells using BacMam, a modified Baculovirus System. *Methods in Molecular Biology*, 1350, 95–116.
- Gaebler, A., Milan, R., Straub, L., Hoelper, D., Kuerschner, L., & Thiele, C. (2013).** Alkyne lipids as substrates for click chemistry-based in vitro enzymatic assays. *Journal of Lipid Research*, 54(8), 2282–2290.
- Galbis-Martínez, L., Galbis-Martínez, M. L., Murillo, F. J., & Fontes, M. (2008).** An anti-antisigma factor in the response of the bacterium *Myxococcus xanthus* to blue light. *Microbiology*, 154(3), 895–904.
- Galbis-Martínez, M. L., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2012).** CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1427–1436.
- Gallego-García, A., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., Elías-**

V. Bibliografía

- Arnanz, M. (2019).** A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132.
- Gao, J., Ajjawi, I., Manoli, A., Sawin, A., Xu, C., Froehlich, J. E., Last, R. L., & Benning, C. (2009).** FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *The Plant Journal*, 60(5), 832–839.
- Garba, L., Shukuri Mo, M., Nurbaya Os, S., & Noor Zalih, R. (2017).** Review on fatty acid desaturases and their roles in temperature acclimatisation. *Journal of Applied Sciences*, 17(6), 282–295.
- García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2013).** High-mobility-group a-like CarD binds to a DNA site optimized for affinity and position and to RNA polymerase to regulate a light-inducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 195(2), 378–388.
- García-Heras, F., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2009).** Functional equivalence of HMGA- and histone H1-like domains in a bacterial transcriptional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13546–13551.
- García, R., Pistorius, D., Stadler, M., & Müller, R. (2011).** Fatty acid-related phylogeny of myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 1930–1942.
- Geiger, O., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2013).** Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 503–513.
- Goehring, A., Lee, C., Wang, K. H., Michel, J. C., Claxton, D. P., Bacongus, I., Althoff, T., Fischer, S., Garcia, K. C., & Gouaux, E. (2014).** Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nature Protocols*, 9(11), 2574–2585.
- Goldfine, H. (1964).** Composition of the aldehydes of *Clostridium butyricum* plasmalogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2130–2134.
- Goldfine, H. (2010).** The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Progress in Lipid Research*, 49(4), 493–498.
- Goldfine, H. (2017).** The anaerobic biosynthesis of plasmalogens. *FEBS Letters*, 591(18), 2714–2719.
- Goldfine, H. (2018).** Cytochrome c takes on plasmalogen catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8710–8711.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J.A., Ronning, C. M., Barbazuk, W. B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H. S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S. A., Vaudin, M., Wiegand, R., & Kaplan, H. B. (2006).** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19605.
- Gómez-Santos, N., Pérez, J., Sánchez-Sutil, M. C., Moraleda-Muñoz, A., & Muñoz-Dorado, J. (2011).** CorE from *Myxococcus xanthus* is a copper-dependent RNA

polymerase sigma factor. *PLoS Genetics*, 7(6).

Gräff, M., Buchholz, P. C. F., Stockinger, P., Bommarius, B., Bommarius, A. S., & Pleiss, J. (2019). The Short-chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database (SDRED): A classification and analysis system for a highly diverse enzyme family. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 87(6), 443–451.

Gregory, K., Salvador, L. A., Akbar, S., Adaikpoh, B. I., & Cole Stevens, D. (2019). Survey of biosynthetic gene clusters from sequenced myxobacteria reveals unexplored biosynthetic potential. *Microorganisms*, 7(6).

Gulamhussein, A. A., Uddin, R., Tighe, B. J., Poyner, D. R., & Rothnie, A. J. (2020). A comparison of SMA (styrene maleic acid) and DIBMA (di-isobutylene maleic acid) for membrane protein purification. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(7).

Gutmann, D. A. P., Mizohata, E., Newstead, S., Ferrandon, S., Henderson, P. J. F., Van Veen, H. W., & Byrne, B. (2007). A high-throughput method for membrane protein solubility screening: The ultracentrifugation dispersity sedimentation assay. *Protein Science*, 16(12), 1422–1428.

Hammond, J. W., Lu, S. M., & Gelbard, H. A. (2016). Platelet activating factor enhances synaptic vesicle exocytosis via PKC, elevated intracellular calcium, and modulation of synapsin 1 dynamics and phosphorylation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.

Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 281–296.

Heilbron, I. M., & Owens, W. M. (1928). CXXIV.-The unsaponifiable matter from the oils of elasmobranch fish. Part IV. the establishment of the structure of selachyl and batyl alcohols as monoglyceryl ethers. *Journal of the Chemical Society*, 942-947.

Hermetter, A., Rainer, B., Ivessa, E., Kalb, E., Loidl, J., Roscher, A., & Paltauf, F. (1989). Influence of plasmalogen deficiency on membrane fluidity of human skin fibroblasts: a fluorescence anisotropy study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 978(1), 151–157.

Hoiczky, E., Ring, M. W., McHugh, C. A., Schwär, G., Bode, E., Krug, D., Altmeyer, M. O., Lu, J. Z., & Bode, H. B. (2009). Lipid body formation plays a central role in cell fate determination during developmental differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 74(2), 497–517.

Homan, E. A., Kim, Y. G., Cardia, J. P., & Saghatelian, A. (2011). Monoalkylglycerol ether lipids promote adipogenesis. *Journal of the American Chemical Society*, 133(14), 5178–5181.

Honke, K. (2013). Biosynthesis and biological function of sulfoglycolipids. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 89(4), 129–138.

Honsho, M., Abe, Y., & Fujiki, Y. (2017). Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Scientific Reports*, 7.

V. Bibliografía

- Honsho, M., & Fujiki, Y. (2017).** Plasmalogen homeostasis – regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Letters*, 591(18), 2720–2729.
- Horn, P. J., Smith, M. D., Clark, T. R., Froehlich, J. E., & Benning, C. (2020).** PEROXIREDOXIN Q stimulates the activity of the chloroplast 16:1^{Δ3trans} FATTY ACID DESATURASE4. *The Plant Journal*, 102(4), 718–729.
- Hu, B., Gadalla, M., Thiele, C., & Veit, M. (2020).** Photoactivable cholesterol as a tool to study interaction of Influenza Virus Hemagglutinin with cholesterol. *Bio-Protocol*, 10(4).
- Huisgen, R. (1963).** 1,3-Dipolar cycloadditions Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2(10), 565–632.
- Iñiesta, A. A., García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Gallego-García, A., & Elías-Arnanz, M. (2012).** Two systems for conditional gene expression in *Myxococcus xanthus* inducible by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside or vanillate. *Journal of Bacteriology*, 194, 489–501.
- Irons, S. L., Chambers, A. C., Lissina, O., King, L. A., & Possee, R. D. (2018).** Protein production using the Baculovirus Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, 91, 5.5.1-5.5.22.
- Isabella, V. M., & Clark, V. L. (2011).** Identification of a conserved protein involved in anaerobic unsaturated fatty acid synthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: Implications for facultative and obligate anaerobes that lack FabA. *Molecular Microbiology*, 82(2), 489–501.
- Ivanova, P. T., Milne, S. B., & Brown, H. A. (2010).** Identification of atypical ether-linked glycerophospholipid species in macrophages by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 51(6), 1581–1590.
- Jackson, D. R., Cassilly, C. D., Plichta, D. R., Vlamakis, H., Liu, H., Melville, S. B., Xavier, R. J., & Clardy, J. (2020).** Plasmalogen biosynthesis by anaerobic bacteria: identification of a two-gene operon responsible for plasmalogen production in *Clostridium perfringens*. *ACS Chemical Biology*, 16(1), 6–13.
- Jain, S., Caforio, A., & Driessen, A. J. M. (2014).** Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Jain, V., & Thielen, D. (1995).** Determination of aldehydes in basic medium by gas chromatography using O-benzylhydroxylamine derivatization. *Journal of chromatography*, 709(2), 387-392.
- Jenkins, C. M., Yang, K., Liu, G., Moon, S. H., Dilthey, B. G., & Gross, R. W. (2018).** Cytochrome c is an oxidative stress-activated plasmalogenase that cleaves plasmenylcholine and plasmenylethanolamine at the sn-1 vinyl ether linkage. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8693–8709.

- Jiménez-Rojo, N., & Riezman, H. (2019).** On the road to unraveling the molecular functions of ether lipids. *FEBS Letters*, 593(17), 2378–2389.
- Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Ortiz-Guerrero, J. M., Chen, P. Y. T., Kang, G., Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M., & Drennan, C. L. (2015).** Structural basis for gene regulation by a B₁₂-dependent photoreceptor. *Nature*, 526(7574), 536–541.
- Julien, B., Kaiser, A. D., & Garza, A. (2000).** Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 9098-9103.
- Kaiser, D. (2004).** Signaling in Myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 58, 75–98.
- Kaiser, D., & Dworkin, M. (2008).** From glycerol to the genome. *American Society of Microbiology Press*: 257-284.
- Keller, M. A., Zander, U., Fuchs, J. E., Kreutz, C., Watschinger, K., Mueller, T., Golderer, G., Liedl, K. R., Ralser, M., Kräutler, B., Werner, E. R., & Marquez, J. A. (2014).** A gatekeeper helix determines the substrate specificity of Sjögren-Larsson Syndrome enzyme fatty aldehyde dehydrogenase. *Nature Communications*, 5.
- Kleinig, H. (1972).** Membranes From *Myxococcus fulvus* (myxobacterales) containing carotenoid glucosides. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 274(2), 489–498.
- Koga, Y. (2012).** Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea*, 2012.
- Koga, Y., & Morii, H. (2005).** Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(11), 2019–2034.
- Koivuniemi, A. (2017).** The biophysical properties of plasmalogens originating from their unique molecular architecture. *FEBS Letters*, 591(18), 2700–2713.
- Kossel, A., & Edlbacher, S. (1915).** Beiträge zur chemischen Kenntnis der Echinodermen. *Physiol. Chem*, 94, 277-283.
- Kroos, L. (2007).** The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators. *Annual Review of Genetics*, 41, 13–39.
- Kuznetsova, E., Nocek, B., Brown, G., Makarova, K. S., Flick, R., Wolf, Y. I., Khusnutdinova, A., Evdokimova, E., Jin, K., Tan, K., Hanson, A. D., Hasnain, G., Zallot, R., Crécy-Lagard, V., Babu, M., Savchenko, A., Joachimiak, A., Edwards, A. M., Koonin, E. V., & Yakunin, A. F. (2015).** Functional diversity of haloacid dehalogenase superfamily phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical, structural, and evolutionary insights. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18678–18698.

V. Bibliografía

- Lamkemeyer, P., Laxa, M., Collin, V., Li, W., Finkemeier, I., Schöttler, M. A., Holtkamp, V., Tognetti, V. B., Issakidis-Bourguet, E., Kandlbinder, A., Weis, E., Miginiac-Maslow, M., & Dietz, K. J. (2006).** Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *Plant Journal*, 45(6), 968–981.
- Leßig, J., Schiller, J., Arnhold, J., & Fuchs, B. (2007).** Hypochlorous acid-mediated generation of glycerophosphocholine from unsaturated plasmalogen glycerophosphocholine lipids. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1316–1324.
- Lee, B., Holkenbrink, C., Treuner-Lange, A., & Higgs, P. I. (2012).** *Myxococcus xanthus* developmental cell fate production: heterogeneous accumulation of developmental regulatory proteins and reexamination of the role of MazF in developmental lysis. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3058–3068.
- León, E., Navarro-Avilés, G., Santiveri, C. M., Flores-Flores, C., Rico, M., González, C., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., Jiménez, M. A., & Padmanabhan, S. (2010).** A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5226–5241.
- Liang, L., & Astruc, D. (2011).** The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(23-24), 2933–2945.
- Li-beisson, Y., & Nakamura, Y. (2016).** Lipids in plant and algae development. *Subcellular Biochemistry*, 86.
- Liebthal, M., Maynard, D., & Dietz, K. J. (2018).** Peroxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, 28(7), 609–624.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., & Shanklin, J. (1996).** Crystal structure of $\Delta 9$ stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO Journal*, 15(16), 4081–4092.
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2015).** Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature. *PLoS ONE*, 10(4).
- Long, M. (2000).** A new function evolved from gene fusion. *Genome Research*, 10, 1655–1657.
- López-Alonso, D., García-Maroto, F., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido, J. A., & Vilches, M. A. (2003).** Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(10), 1111–1124.
- Lorenzen, W., Ahrendt, T., Bozhüyük, K. A. J., & Bode, H. B. (2014a).** A multifunctional enzyme is involved in bacterial ether lipid biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 425–427.
- Lorenzen, W., Bozhüyük, K. A. J., Cortina, N. S., & Bode, H. B. (2014b).** A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *Journal of Lipid Research*, 55(12), 2620–2633.

- Los, D. A., & Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1394, 3–15.
- Luddi, A., Gori, M., Crifasi, L., Marrocco, C., Belmonte, G., Costantino-Ceccarini, E., & Piomboni, P. (2017). Impaired spermatogenesis in the twitcher mouse: A morphological evaluation from the seminiferous tubules to epididymal transit. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(2), 77–85.
- Luoma, A. M., Kuo, F., Cakici, O., Crowther, M. N., Denninger, A. R., Avila, R. L., Brites, P., & Kirschner, D. A. (2015). Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 296–310.
- M**agnusson, C. D., & Haraldsson, G. G. (2011). Ether lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(5), 315–340.
- Mahmud, T., Wenzel, S. C., Wan, E., Wen, K. W., Bode, H. B., Gaitatzis, N., & Müller, R. (2005). A biosynthetic pathway to isovaleryl-CoA in myxobacterial: The involvement of the mevalonate pathway. *ChemBioChem*, 6(2), 322–330.
- Marinetti, J., & Erbland, E. S. (1958). Phosphatides of pig heart cell fractions. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(3), 562–565.
- Martínez-Laborda, A., Balsalobre, J. M., Fontes, M., & Murillo, F. J. (1990). Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *MGG Molecular & General Genetics*, 223(2), 205–210.
- Martínez-Solís, M., Herrero, S., & Targovnik, A. M. (2019). Engineering of the Baculovirus Expression System for optimized protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 113–123.
- McKay, C. S., & Finn, M. G. (2014). Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chemistry & Biology* 21(9), 1075–1101.
- Meesapyodsuk, D., & Qiu, X. (2012). The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use. *Lipids*, 47(3), 227–237.
- Meiser, P., Bode, H. B., & Müller, R. (2006). The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19128–19133.
- Mohr, K. I. (2018). Diversity of Myxobacteria — we only see the tip of the iceberg. *Microorganisms*, 6(84).
- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F. J., & Muñoz-Dorado, J. (2005). Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 56(5), 1159–1168.
- Morand, O. H. (1994). Reactivity of plasmalogens to singlet oxygen and radicals. *Methods in Enzymology*. 234(1984), 603–620.

V. Bibliografía

Morand, O. H., Zoeller, R. A., & Raetz, C. R. H. (1988). Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11597–11606.

Moreno, A. J., Fontes, M., & Murillo, F. J. (2001). *ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 557–569.

Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., & Pérez, J. (2016). Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Frontiers in Microbiology*, 7(781).

Nagao, K., Murakami, A., & Umeda, M. (2019). Structure and function of $\Delta 9$ -Fatty acid desaturase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 67(4), 327–332.

Nagy, K., Brahmabhatt, V. V., Berdeaux, O., Bretillon, L., Destailats, F., & Acar, N. (2012). Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: Identification of atypical species with odd carbon chains. *Journal of Lipid Research*, 53(4), 776–783.

Navarro-Avilés, G., Jiménez, M. A., Pérez-Marín, M. C., González, C., Rico, M., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., & Padmanabhan, S. (2007). Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Molecular Microbiology*, 63(4), 980–994.

Norton, W. T., Gottfried, E. L., & Rapport, M. M. (1962). The structure of plasmalogens: VI. Configuration of the double bond in the α,β -unsaturated ether linkage of phosphatidyl choline. *Journal of Lipid Research*, 3(4), 456–459.

Oberg, T. S., Ward, R. E., Steele, J. L., & Broadbent, J. R. (2012). Identification of plasmalogens in the cytoplasmic membrane of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 880–884.

O'Connor, K. A., & Zusman, D. R. (1991). Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 173(11), 3342–3355.

Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., & Jörnvall, H. (2003). Short-chain Dehydrogenases/Reductases (SDR): The 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 143–144, 247–253.

Ortiz-Guerrero, J. M., Polanco, M. C., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B₁₂-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7565–7570.

- Padmanabhan, S., Jost, M., Drennan, C. L., & Elías-Arnanz, M. (2017).** A new facet of vitamin B₁₂: gene regulation by photoreceptors. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 485–514.
- Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., del Rey-Navalon, I., Pérez-Castaño, R., Galbis-Martínez, M. L., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2022).** Plasmalogens and photooxidative stress signaling in Myxobacteria, and how it unmasked CarF/TMEM189 as the Δ^1 '-Desaturase PEDS1 for human plasmalogen biosynthesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 884689.
- Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Pajares-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco, M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021).** Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: New paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, *9*(5).
- Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., & Elías-Arnanz, M. (2019).** B₁₂-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Current Opinion in Structural Biology*, *57*, 47–55.
- Palladino, E. N. D., Katunga, L. A., Kolar, G. R., & Ford, D. A. (2018).** 2-Chlorofatty acids: Lipid mediators of neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Lipid Research*, *59*(8), 1424–1432.
- Paltauf, F., & Holasek, A. (1973).** Enzymatic synthesis of plasmalogens. Characterization of the 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine desaturase from mucosa of hamster small intestine. *The Journal of Biological Chemistry*, *248*(5), 1609–1615.
- Parker, C. G., & Pratt, M. R. (2020).** Click chemistry in proteomic investigations. *Cell*, *180*(4), 605–632.
- Patnaik, P. K., Field, M. C., Menon, A. K., Cross, G. A. M., Yee, M. C., & Bütikofer, P. (1993).** Molecular species analysis of phospholipids from *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic forms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *58*(1), 97–105.
- Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Galbis-Martínez, M. L., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2022).** Coenzyme B₁₂-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis across Myxococcales. *Environmental Microbiology*, *24*(4), 1865–1886.
- Pérez-Marín, M. C., López-Rubio, J. J., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., & Padmanabhan, S. (2004).** The N terminus of *Myxococcus xanthus* CarA repressor is an autonomously folding domain that mediates physical and functional interactions with both operator DNA and antirepressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33093–33103.
- Pérez-Marín, M. C., Padmanabhan, S., Polanco, M. C., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2008).** Vitamin B₁₂ partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *67*(4), 804–819.

V. Bibliografía

- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., & Moraleda-Muñoz, A. (2018).** The complex global response to copper in the multicellular bacterium *Myxococcus xanthus*. *Metallomics*, *10*(7), 876–886.
- Persson, B., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jörnvall, H., Kallberg, Y., Kavanagh, K. L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T. M., Thornton, J. M., Adamski, J., & Oppermann, U. (2009).** The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related Enzymes) Nomenclature Initiative. *Chemico-Biological Interactions*, *178*(1–3), 94–98.
- Peñalver-Mellado, M., García-Heras, F., Padmanabhan, S., García-Moreno, D., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2006).** Recruitment of a novel zinc-bound transcriptional factor by a bacterial HMGA-type protein is required for regulating multiple processes in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *61*(4), 910–926.
- Pike, L. J. (2003).** Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research*, *44*(4), 655–667.
- Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N., & Gross, R. W. (2002).** Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: A quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, *41*(6), 2075–2088.
- Poleschuk, T. S., Sultanov, R. M., Ermolenko, E. V., Shulgina, L. V., & Kasyanov, S. P. (2020).** Protective action of alkylglycerols under stress. *Stress*, *23*(2), 213–220.
- Puente-Massaguer, E., Cajamarca-Berrezueta, B., Volart, A., González-Domínguez, I., & Gòdia, F. (2022).** Transduction of HEK293 cells with BacMam Baculovirus is an efficient system for the production of HIV-1 virus-like particles. *Viruses*, *14*(3), 636.
- Pugh, E. L., & Wakil, S. J. (1965).** Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *240*(12), 4727–4733.
- Qian, L., Zhang, M., Wu, S., Zhong, Y., Van Tol, E., & Cai, W. (2014).** Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes. *PLoS ONE*, *9*(4).
- Rangholia, N., Leisner, T. M., & Holly, S. P. (2021).** Bioactive ether lipids: primordial modulators of cellular signaling. *Metabolites*, *11*(41).
- Rapport, M. M., Lerner, B., Alonzo, N., & Franzl, R. E. (1957).** The structure of plasmalogens II. Crystalline lysophosphatidyl ethanolamine (acetal phospholipide). *Journal of Biological Chemistry*, *225*(2), 859–867.
- Ravula, T., Hardin, N. Z., & Ramamoorthy, A. (2019).** Polymer nanodiscs: advantages and limitations. *Chemistry and Physics of Lipids*, *219*, 45–49.

- Reichenbach, H. (1999).** The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology*, 1(1), 15–21.
- Reichenbach, H., & Dworkin, M. (1992).** The Myxobacteria. *The Prokaryotes*, 3416–3487.
- Řezanka, T., Křesinová, Z., Kolouchová, I., & Sigler, K. (2012).** Lipidomic analysis of bacterial plasmalogens. *Folia Microbiologica*, 57(5), 463–472.
- Ring, M. W., Schwär, G., Thiel, V., Dickschat, J. S., Kroppenstedt, R. M., Schulz, S., & Bode, H. B. (2006).** Novel iso-branched ether lipids as specific markers of developmental sporulation in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36691–36700.
- Rog, T., & Koivuniemi, A. (2016).** The biophysical properties of ethanolamine plasmalogens revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(1), 97–103.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. (2002).** A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 41(14), 2596–2599.
- Rubio, J. M., Astudillo, A. M., Casas, J., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2018).** Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Frontiers in Immunology*, 9:1723.
- Ruiz-Vazquez, R. M., & Murillo, F. J. (1984).** Abnormal motility and fruiting behavior of *Myxococcus xanthus* bacteriophage-resistant strains induced by a clear-plaque mutant of bacteriophage Mx8. *Journal of Bacteriology*, 160, 818-821.
- Sanford, R., Cole, J. R., & Tiedje, J. M. (2002).** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-Halorespiring facultative anaerobic Myxobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 893–900.
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G., & Münck, E. (1997).** Mössbauer studies of alkane ω -hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2981–2986.
- Shen, J., Wu, G., Tsai, A. L., & Zhou, M. (2020).** Structure and mechanism of a unique diiron center in mammalian Stearoyl-CoA Desaturase. *Journal of Molecular Biology*, 432(18), 5152–5161.
- Shi, X., Tarazona, P., Brock, T. J., Browse, J., Feussner, I., & Watts, J. L. (2016).** A *Caenorhabditis elegans* model for ether lipid biosynthesis and function. *Journal of Lipid Research*, 57(2), 265–275.
- Shimkets, L. J., Dworkin, M., & Reichenbach, H. (2006).** *The Myxobacteria* (7).
- Shimkets, L., & Woese, C. R. (1992).** A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

V. Bibliografía

the United States of America, 89(20), 9459–9463.

- Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C., Foesel, B. U., Huber, K. J., Overmann, J., Nakagawa, S., Kim, J. J., Dunfield, P. F., Dedysh, S. N., & Villanueva, L. (2018).** An overview of the occurrence of ether- and ester-linked iso-diabolic acid membrane lipids in microbial cultures of the Acidobacteria: Implications for brGDGT paleoproxies for temperature and pH. *Organic Geochemistry*, 124, 63–76.
- Snyder, F. (1999).** The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(3), 265–278.
- Snyder, F., Lee, T., & Wykle, R. (2008).** Ether-linked lipids and their bioactive species. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 245–276.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015).** Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133–159.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2003).** Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in Lipid Research*, 42(2), 115–162.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T. K., & Heinz, E. (2003).** The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(2), 73–95.
- Stadelmann-Ingrand, S., Favreliere, S., Fauconneau, B., Mauco, G., & Tallineau, C. (2001).** Plasmalogen degradation by oxidative stress: Production and disappearance of specific fatty aldehydes and fatty α -hydroxyaldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(10), 1263–1271.
- Stein, J., & Budzikiewicz, H. (1987).** 1-O-(13-Methyl-1-Z-tetradecenyl)-2-O-(13-methyltetradecanoyl)-glycero-3-phospho- ethanolamine, a plasmalogen from *Myxococcus stipitatus*. *Z. Naturforsch.*, 42b, 1017–1020.
- Stetsenko, A., & Guskov, A. (2017).** An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals*, 7(7), 1–16.
- Subramanian, C., Rock, C. O., & Zhang, Y. M. (2010).** DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 280–285.
- Sunshine, H., & Iruela-Arispe, M. L. (2017).** Membrane lipids and cell signaling. *Current Opinion in Lipidology*, 28(5), 408–413.
- Tan, S. T., Ramesh, T., Toh, X. R., & Nguyen, L. N. (2020).** Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 80, 101068.
- Teigler, A., Komljenovic, D., Draguhn, A., Gorgas, K., & Just, W. W. (2009).** Defects in myelination, paranode organization and Purkinje cell innervation in the ether lipid-deficient mouse cerebellum. *Human Molecular Genetics*, 18(11), 1897–1908.
- Thiele, C., Wunderling, K., & Leyendecker, P. (2019).** Multiplexed and single cell

tracing of lipid metabolism. *Nature Methods*, 16(11), 1123–1130.

Thiery, S., & Kaimer, C. (2020). The Predation strategy of *Myxococcus xanthus*. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Thomson, T. M., Lozano, J. J., Loukili, N., Carrió, R., Serras, F., Cormand, B., Valeri, M., Díaz, V. M., Abril, J., Burset, M., Merino, J., Macaya, A., Corominas, M., & Guigó, R. (2000). Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffector UEVI with Kua, a newly identified gene. *Genome Research*, 10(11), 1743–1756.

Tietz, A., Lundberg, M., & Kennedy, E. (1964). A new pteridine-requiring enzyme system for the oxidation of glyceryl. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(12), 4081–4090.

Tornøe, C. W., Christensen, C., & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry*, 67(9), 3057–3064.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, 155(2), 117–130.

Upmanyu, N., & Malviya, V. N. (2019). Crystallization of membrane and soluble proteins: difference in approach. *Chromatography and Separation Techniques Journal*, 2(1), 118.

Vila, A., Tallman, K. A., Jacobs, A. T., Liebler, D. C., Porter, N. A., & Marnett, L. J. (2008). Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chemical Research in Toxicology*, 21(2), 432–444.

Warner, H. R., & Lands, W. E (1961). The metabolism of plasmalogen: enzymatic hydrolysis of the vinyl ether. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2404–2409.

Watschinger, K., Fuchs, J. E., Yarov-Yarovoy, V., Keller, M. A., Golderer, G., Hermetter, A., Werner-Felmayer, G., Hulo, N., & Werner, E. R. (2012). Catalytic residues and a predicted structure of tetrahydrobiopterin- dependent alkylglycerol mono-oxygenase. *Biochemical Journal*, 443, 279–286.

Watschinger, K., Fuchs, J. E., Yarov-Yarovoy, V., Keller, M. A., Golderer, G., Hermetter, A., Werner-Felmayer, G., Hulo, N., & Werner, E. R. (2013). First insights into structure-function relationships of alkylglycerol monooxygenase. *Pteridines*, 24(1), 99–103.

Watschinger, K., & Werner, E. R. (2013a). Alkylglycerol monooxygenase. *IUBMB Life*, 65(4), 366–372.

V. Bibliografía

- Watschinger, K., & Werner, E. R. (2013b). Orphan enzymes in ether lipid metabolism. *Biochimie*, 95(1), 59–65.
- Wegner, G. H., & Foster, E. M. (1963). Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *Journal of Bacteriology*, 85, 53–61.
- Werner, E. R., Keller, M. A., Sailer, S., Lackner, K., Koch, J., Hermann, M., Coassin, S., Golderer, G., Werner-Felmayer, G., Zoeller, R. A., Hulo, N., Berger, J., & Watschinger, K. (2020). The *TMEM189* gene encodes plasmamylethanolamine desaturase which introduces the characteristic vinyl ether double bond into plasmalogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(14), 7792–7798.
- Whitfield, D. L., Sharma, G., Smaldone, G. T., & Singer, M. (2020). Peripheral rods: a specialized developmental cell type in *Myxococcus xanthus*. *Genomics*, 112(2), 1588–1597.
- Wu, L. C., Pfeiffer, D. R., Calhoon, E. A., Madiari, F., Marcucci, G., Liu, S., & Jurkowitz, M. S. (2011). Purification, identification, and cloning of lysoplasmalogenase, the enzyme that catalyzes hydrolysis of the vinyl ether bond of lysoplasmalogen. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 24916–24930.
- Wykle, R. L., Blank, M. L., Malone, B., & Snyder, F. (1972). Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine. *Journal of Biological Chemistry*, 247(17), 5442–5447.
- Y**amamoto, E., Muramatsu, H., & Nagai, K. (2014). *Vulgatibacter incomptus* gen. nov., sp. nov. and *Labilithrix luteola* gen. nov., sp. nov., two myxobacteria isolated from soil in Yakushima Island, and the description of *Vulgatibacteraceae* fam. nov., *Labilitrichaceae* fam. nov. and *Anaeromyxobacteraceae* fam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3360–3368.
- Yhang, Z., & Higgs, P. I. (2014). Myxobacteria. Genomics, cellular and molecular biology. Caister Academic Press.
- Z**hang, K., & Beverley, S. M. (2010). Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(2), 55–64.
- Zhou, Y., Yu, N., Zhao, J., Xie, Z., Yang, Z., & Tian, B. (2020). Advances in the biosynthetic pathways and application potential of plasmalogens in medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:765.
- Zhu, G., Koszelak-Rosenblum, M., Connelly, S. M., Dumont, M. E., & Malkowski, M. G. (2015). The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29820–29833.
- Zhu, L., Cheng, J., Luo, B., Feng, S., Lin, J., Wang, S., Cronan, J. E., & Wang, H. (2009). Functions of the *Clostridium acetobutylicum* FabF and FabZ proteins in

unsaturated fatty acid biosynthesis. *BMC Microbiology*, 9(119).

Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z., & Kirby, J. R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 862–872.