

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Implicaciones de los fosfolípidos en respuesta
a estreses abióticos en *Pseudomonas putida*.**

TESIS DOCTORAL

**Patricia Bernal Guzmán
2007**

**Implicaciones de los fosfolípidos en respuesta a
estreses abióticos en *Pseudomonas putida*.**

Memoria que presenta la licenciada en
Biología, Patricia Bernal Guzmán, para
aspirar al Título de Doctora

Fdo.: Patricia Bernal Guzmán

Vº Bº del Director

Vº Bº del Director

Fdo.: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo.: Ana Segura Carnicero
Doctora en Biología
Científica Titular del CSIC

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Patricia Bernal Guzmán
D.L.: Gr. 2698 - 2006
ISBN: 84-338-4205-6

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Departamento de Protección Ambiental de la
Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

A mis padres
A mi hermana
A mi enano

Agradecimientos

El trabajo aquí presentado es el resultado de varios años de esfuerzo y dedicación. La ayuda de todas las personas que me han apoyado tanto personal como profesionalmente a lo largo de todo este tiempo ha sido fundamental para llegar hasta aquí. Por eso quería darle las **gracias** porque sin ellos no hubiese sido posible.

A mis directores, el Dr. Juan L. Ramos Martín, director del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, y a la Dr. Ana Segura Carnicero, de los que he aprendido mucho de lo que se recoge en esta Tesis. Gracias Juan Luis por confiar en mí para formar parte de tu grupo de investigación y por enseñarme a comenzar a andar por el mundo de la ciencia gracias Ana por tu tiempo y por el esfuerzo que me has dedicado.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas que financió mi trabajo durante los años de mi Tesis Doctoral.

A todas (y todos) mis compañer@s de laboratorio que en mayor o menor medida me han ayudado. Es imposible hacer este trabajo sola, y he tenido la suerte de contar con un gran equipo en número y calidad. Gracias a tod@s

A mis compañeros de lab, del minilab y del 1.3, por todo lo compartido y sobre todo a las niñas del 1.3 que con paciencia han aguantado este último tiempo algo más difícil.

Al resto de amigos de Granada que ya no están en el lab. Os extraño muchísimo. Y a los que andan todavía por ahí, gracias por los cafelitos de apoyo.

A todos mis amigos de Morón por demostrarme que siempre estaréis ahí. y por recordarme lo bueno del pueblo.

A mi Familia, porque sin ellos hubiera sido imposible conseguirlo. A mis padres y mi hermana que siempre han estado a mi lado y han apoyado todas mis decisiones, fuera cual fuera, sin juzgarme. Gracias por quererme tanto.

A mi enano, por todo.

ÍNDICE

	Página
APÉNDICES	i
1. Abreviaturas	iii
2. Índice de Figuras	v
3. Índice de Tablas	vii
 INTRODUCCIÓN	 1
1. La membrana externa de las bacterias gram negativas	5
1.1 Estructura y composición de la membrana externa	5
1.1.1 Fosfolípidos	5
1.1.2 Lipopolisacáridos	6
1.1.3 Proteínas	7
1.2 Funciones de la membrana externa	8
2. La membrana interna bacteriana	8
2.1 Estructura y composición de la membrana interna	9
2.1.1 Proteínas	9
2.1.2 Fosfolípidos	11
2.2 Funciones de la membrana interna	13
2.2.1 Generación y conservación de la energía	13
2.2.2 Transporte de solutos	14
2.2.3 Translocación de proteínas dependientes de Sec	14
2.2.4 Señalización transmembrana	15
2.2.5 División celular	16
3. Síntesis de lípidos de membrana	17
3.1 Síntesis de ácidos grasos	17
3.1.1 Enzimas y proteínas de la síntesis de ácidos grasos	18
3.1.2 Modificaciones post-sintéticas	26

• Isomerización <i>cis-trans</i>	26
• Síntesis de ácidos grasos ciclopropano	28
3.2 Síntesis de fosfolípidos	29
3.2.1 Biosíntesis de fosfatidiletanolamina	32
3.2.2 Biosíntesis de fosfatidilglicerol	33
3.2.3 Biosíntesis de cardiolipina	34
4. Topología de membrana y métodos de estudio	37
5. Efectos del estrés en la membrana	42
OBJETIVOS	45
RESULTADOS	49
Capítulo 1. Participación de los ácidos grasos ciclopropanos de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en respuesta a liofilización	51
Capítulo 2. Aumento en la sensibilidad hacia las drogas relacionado con la funcionalidad del transporte en un mutante en la síntesis de cardiolipina de <i>Pseudomonas putida</i>	59
Capítulo 3. Regulación de los genes del metabolismo lipídico en el control de la fluidez de membrana en <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> DOT-T1E	71
DISCUSIÓN GENERAL	81
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	93

APÉNDICE

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario	MIC	concentración mínima inhibitoria
Ap	ampicilina	min	minuto(s)
ARNasa	ribonucleasa	ml	mililitros
ARNm	ARN mensajero	mm	milímetros
ATP	adenosin trifosfato	µl	microlitros
CCCP	carbonilcianida-m-clorofenilhidrazona	Nal	ácido nalidíxico
Cm	cloranfenicol	NAO	10-N-nonyl acridine orange
cpm	desintegraciones por minuto	ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido
DEPC	dietil pirocarbonato	p/v	peso/volumen
DMSO	dimetilsulfóxido	pb	pares de bases
dNTPs	desoxinucleótidos	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DO₆₆₀	densidad óptica medida a λ=660 nm	ref.	referencia
DOC	deoxicolato	Rif	rifampicina
DTT	ditiotreitól	rpm	revoluciones por minuto
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de transcripción reversa
Fig.	figura	SDS	dodecil sulfato sódico
Gm	gentamicina	seg	segundo(s)
h	hora(s)	Sm	estreptomina
H₂O_d	agua desionizada	Tc	tetraciclina
H₂O_{DEPC}	agua desionizada tratada con DEPC	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	UFC	unidades formadoras de colonias
kb	kilobases	v/v	volumen/volumen
Km	kanamicina	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D- galactopiranosido
LPS	lipopolisacárido		
MCS	sitio de clonación múltiple		
medio LB	medio Luria-Bertani		
mg	miligramos		

ÍNDICE DE FIGURAS

En la Introducción:

Figura 1.	Envoltura celular de bacterias gram negativas y gram positivas	4
Figura 2.	Estructura de una molécula general de fosfolípido	5
Figura 3.	Estructura de una molécula de LPS	7
Figura 4.	Representación de una bicapa lipídica	9
Figura 5.	Estructura de los fosfolípidos mayoritarios en bacterias gram negativas	11
Figura 6.	Estructura de los ácidos grasos mayoritarios en <i>Pseudomonas</i>	12
Figura 7.	Esquema general de la síntesis de ácidos grasos	19
Figura 8.	Esquema de la síntesis de ácidos grasos	22
Figura 9.	Esquema de la síntesis de ácidos grasos insaturados	23
Figura 10.	Posible mecanismo de actuación de las rutas aerobias de síntesis de ácidos grasos insaturados en <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 11.	Estructura de los ácidos grasos insaturados	27
Figura 12.	Síntesis de ácidos grasos ciclopropano	29
Figura 13.	Síntesis y activación del ácido fosfatídico	31
Figura 14.	Síntesis de fosfolípidos en bacterias	36
Figura 15.	Esquema de la unión de CL y NAO	39

En Resultados:

Capítulo 2

Figura 1.	Cromatografía en capa fina (TLC) de los fosfolípidos extraídos de <i>P. putida</i> DOT-T1E y su mutante isogénico <i>cls</i>	62
Figura 2.	Tinción de <i>P. putida</i> DOT-T1E y su mutante isogénico <i>cls</i> con NAO	63
Figura 3.	Tamaño de las células de <i>P. putida</i> DOT-T1E y <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>cls</i>	63
Figura 4	Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y su mutante isogénico <i>cls</i> después de un choque repentino de tolueno	64
Figura 5.	Emisión de fluorescencia con respecto al tiempo de bromuro de etidio en <i>P. putida</i> DOT-T1E y su correspondiente mutante <i>cls</i>	65
Figura 6.	Medidas de polarización de la fluorescencia	65

Capítulo 3

Figura 1.	Determinación del punto de iniciación de la transcripción de los genes <i>cti</i> y <i>cls</i>	74
Figura 2.	Construcción de las fusiones $P_{cls}::lacZ$ y $P_{cti}::lacZ$ y ensayos de actividad β -galactosidasa	74
Figura 3.	Medidas de polarización de la fluorescencia de la estirpe silvestre <i>P. putida</i> DOT-T1E y sus mutantes <i>cti</i> , <i>cls</i> y <i>cti-cls</i>	76
Figura 4.	Acumulación de bromuro de etidio en <i>P. putida</i> DOT-T1E y sus mutantes <i>cti</i> , <i>cls</i> y <i>cti-cls</i>	77
Figura 5.	Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y sus mutantes <i>cti</i> , <i>cls</i> y <i>cti-cls</i> tras un choque de tolueno	77

ÍNDICE DE TABLAS

En la Introducción:

Tabla 1.	Fosfolípidos más comunes	6
Tabla 2.	Porcentajes de identidad y similitud entre las tres enoil-reductasas descritas hasta el momento y las posibles secuencias codificantes en <i>P. putida</i> (PP) y <i>P. aeruginosa</i> (PA)	26

En Resultados

Capítulo 1

Tabla 1.	Estirpes bacterianas y plásmidos usados en este estudio	54
Tabla 2.	Efecto de los diferentes lioprotectores en la supervivencia de <i>P. putida</i> KT2440 tras liofilización	54
Tabla 3.	BSR de <i>P. putida</i> KT2440 en diferentes fases de crecimiento	55
Tabla 4.	Perfil de ácidos grasos de células de <i>P. putida</i> KT2440 creciendo en diferentes medios y fases de crecimiento	55
Tabla 5.	BSR y niveles de C17:ciclopropano en <i>P. putida</i> KT2440 y varias estirpes mutantes isogénicas	56

INTRODUCCIÓN

La envoltura celular que rodea al citoplasma de las células bacterianas está formada por la membrana interna o citoplásmica y por la pared celular. La membrana interna es una membrana simétrica constituida por una bicapa fosfolipídica en la que las regiones polares de los fosfolípidos se sitúan en las dos superficies externas de la bicapa, mientras que las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos se dirigen hacia el centro de la membrana. Las bacterias gram positivas y gram negativas difieren considerablemente en la estructura y composición de la pared celular (Figura 1). En las bacterias gram negativas la pared celular se compone de una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglucano mientras que en gram positivas no hay membrana externa sino sólo una capa más ancha de peptidoglucano y ácidos teicoicos. La membrana externa de bacterias gram negativas, a diferencia de la membrana interna, es una membrana asimétrica que contiene fosfolípidos en su monocapa interna y lipopolisacáridos (LPS) en su monocapa externa. Como los fosfolípidos, los LPS también son moléculas anfipáticas que presentan una región hidrofóbica que se sitúa en el interior de la membrana, y una región hidrofílica que se localiza en la superficie de la monocapa externa. Entre las membranas interna y externa de las bacterias gram negativas se localiza el espacio periplásmico, que contiene el peptidoglucano, un polímero que mantiene la rigidez y la morfología de la bacteria. La membrana externa se ancla al peptidoglucano a través de las lipoproteínas; éstas están unidas a la monocapa interna de la membrana externa a través de su región lipídica y se unen al peptidoglucano a través de su región proteica, habiéndose sugerido que esta unión podría participar en el mantenimiento del espacio periplásmico. En el caso de las bacterias gram positivas, el peptidoglucano está unido covalentemente a otros compuestos conocidos como ácidos teicoicos, que se localizan en la superficie externa de la capa de peptidoglucano siendo los principales antígenos de superficie en dichas bacterias.

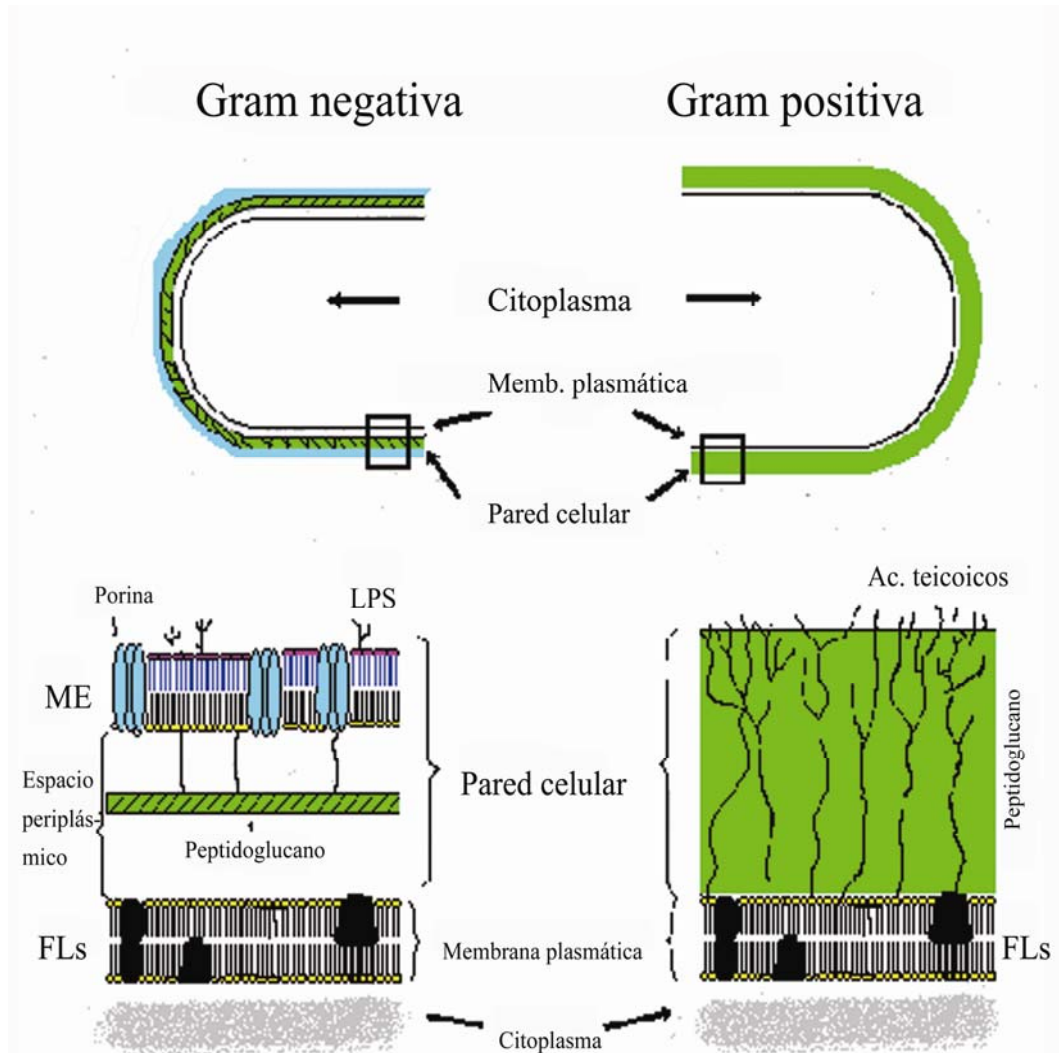


Figura 1. Envoltura celular de bacterias gram negativas y gram positivas

FLs: fosfolípidos

ME: membrana externa

LPS: lipopolisacáridos

1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La membrana externa de las bacterias gram negativas constituye la interfase entre el medio ambiente y el interior celular y, como tal, juega un papel crucial al determinar qué sustancias penetran en la célula y cuales se exportan al exterior celular. Además es la superficie a través de la cual se produce la interacción con las moléculas, superficies u otras células del medio, por ejemplo durante los procesos de simbiosis o patogénesis (Hancock, 1997; Moran, 1996; Nikaido, 1999). La membrana externa bacteriana se ha estudiado con bastante profundidad, y esto ha cambiado la visión que se tenía de cubierta tipo cápsula; actualmente se considera como una membrana dinámica y multifuncional implicada en muchos procesos celulares importantes.

1.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa posee dos tipos de lípidos (fosfolípidos y lipopolisacáridos), así como diversas proteínas características.

1.1.1. FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos son lípidos en los que dos ácidos grasos están unidos por un enlace éster al glicerol en C-1 y C-2 y un grupo de cabeza muy polar o cargado está unido a C-3 mediante un enlace fosfodiéster (Figura 2). Todos los fosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico y se nombran según sus grupos de cabeza polares (Tabla 1). Todos tienen una carga negativa sobre el grupo fosfato a pH 7.0. El grupo de cabeza también puede aportar una o más cargas a pH próximo a 7.

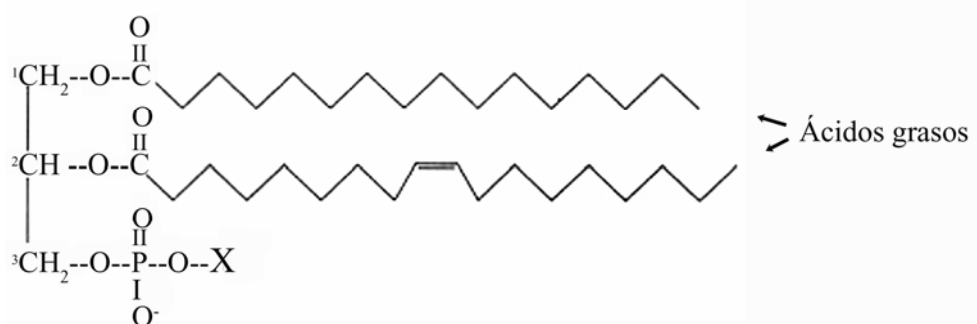


Figura 2. Estructura de una molécula general de fosfolípido X= Grupo de cabeza polar

Nombre de X	Fórmula de X	Nombre del fosfolípido	Carga neta (a pH 7)
-	-H	Ácido Fosfatídico	-1
Etanolamina	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina	0
Colina	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_3^+$	Fosfatidilcolina	0
Serina	$\text{CH}_2\text{-CH-NH}_3^+$ COO^-	Fosfatidilserina	-1
Glicerol	$\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$	Fosfatidilglicerol	-1
Fosfatidilglicerol	$\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-PO}_4\text{-CH}_2\text{-CH(COOR}_1\text{)-CH}_2\text{(COOR}_2\text{)}$	Cardiolipina	-2

Tabla 1. Fosfolípidos más comunes. El ácido fosfatídico es el compuesto básico de estructura fosfomonoéster. Cada derivado se nombra según el grupo de cabeza (X), con el prefijo “fosfatidil”. En la cardiolipina una sola molécula de glicerol es compartida por dos ácidos fosfatídicos.

Los fosfolípidos de la membrana externa se localizan únicamente en su monocapa interna y representan aproximadamente un tercio de los fosfolípidos totales de la envoltura celular. En *Escherichia coli* se cree que la monocapa interna de la membrana externa está compuesta casi exclusivamente de fosfatidiletanolamina (Cronan, Jr. y Rock, 1996).

1.1.2. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

El LPS es un glucolípido anfipático, componente esencial de las bacterias gram negativas, que se localiza exclusivamente en la monocapa externa de la membrana externa. El LPS consta de una región hidrofóbica de anclaje a la membrana, el lípido A, altamente conservada; de una región central de oligosacárido denominada núcleo (*core*,

en inglés); y de una región hidrofílica altamente variable de naturaleza polisacáridica, denominada antígeno O, cadena lateral O o polisacárido O (Figura 3). Ésta última es la fracción inmunodominante de la molécula y, basándose en ella, una especie bacteriana dada se puede clasificar en distintos serotipos (por ejemplo, en *Salmonella enterica* existen más de 600 serotipos agrupados de acuerdo a las reacciones serológicas cruzadas) o en distintos tipos químicos (según su composición de azúcares). Por su parte, la región correspondiente al lípido A posee propiedades de endotoxina, siendo la responsable del choque séptico en el hombre y otros animales (Nikaido, 1996).

Entre sus diversas funciones, las moléculas de LPS estabilizan, anclan y/u orientan las proteínas de la membrana externa. De hecho, se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el ensamblaje de las proteínas de la membrana externa en forma de trímeros es dependiente del LPS (Laird *et al.*, 1994; Nikaido y Vaara, 1985; Ried *et al.*, 1990).

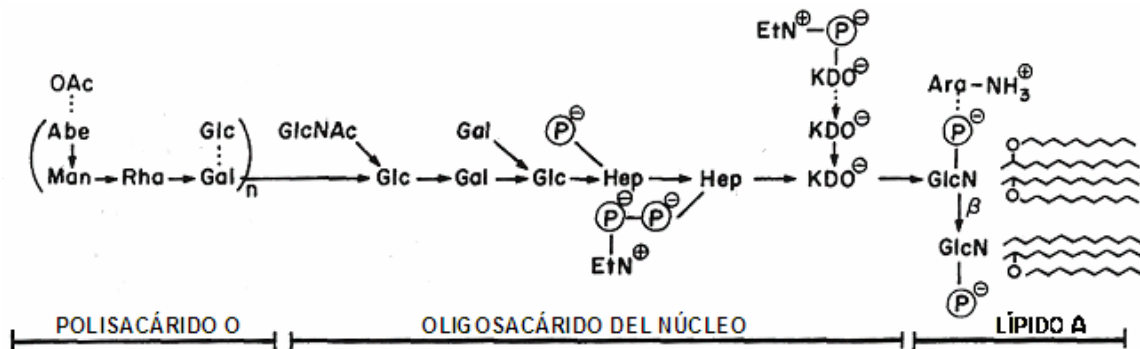


Figura 3. Estructura de una molécula de LPS

1.1.3. PROTEÍNAS

Las proteínas constituyen el 50% del total de los componentes de la membrana externa. La membrana externa contiene un número limitado de proteínas mayoritarias (entre 3 y 8), presentes en cantidades muy elevadas, siendo de las proteínas más abundantes de la célula. Entre ellas caben destacar las porinas inespecíficas que son proteínas formadoras de canales llenos de agua, que permiten la entrada pasiva a través de la membrana externa de moléculas hidrofílicas menores de 600 Da. El límite de

exclusión de estas proteínas viene determinado por el tamaño mínimo del poro que forman. Además de estas proteínas principales, también existen un gran número de proteínas minoritarias (entre 50 y 100). En general, las proteínas de la membrana externa suelen presentar la denominada estructura en barril β formada por cadenas β antiparalelas (Koebnik *et al.*, 2000).

1.2. FUNCIONES DE LA MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa de las bacterias gram negativas juega un papel esencial como barrera de exclusión de compuestos potencialmente nocivos, como detergentes, antibióticos hidrofóbicos, enzimas hidrolíticas, etc. (Nikaido y Vaara, 1985; Vaara, 1992), a la vez que funciona como barrera de permeabilidad selectiva para otros solutos. Además de éstas, la membrana externa también desempeña otras muchas funciones: interviene en la secreción de numerosas moléculas al exterior celular a través de rutas específicas (metabolitos secundarios, sideróforos, enzimas, toxinas, etc.); posee receptores tanto para nutrientes (como las proteínas receptoras de alta afinidad que unen complejos hierro-sideróforos, vitamina B₁₂, etc.), como para la unión de pili conjugativos (por ejemplo, OmpA o el LPS). También participa en otros procesos de interacción con el medio ambiente (por ejemplo, confiere protección contra la acción bactericida del suero, interviene en la unión bacteriana a superficies tanto celulares como de otro tipo, etc.). Además sirve de anclaje a otras estructuras externas como los flagelos y posee incluso un cierto papel estructural, influyendo en la morfología celular (por ejemplo, a través de proteínas como OmpA o Lpp). Conjuntamente con las sustancias inhibitoras que difunden a través de la bicapa lipídica, existen otras que atraviesan la membrana externa a través de porinas inespecíficas, como muchos compuestos β -lactámicos (cuyo tamaño suele ser pequeño), aminoglucósidos (que son muy hidrofílicos), cloranfenicol (pequeño y sin carga), etc.

2. LA MEMBRANA INTERNA BACTERIANA

La membrana interna de las bacterias es similar a la membrana citoplasmática de las células eucariotas, y está formada por una bicapa lipídica compuesta por igual cantidad de lípidos que de proteínas. Esta membrana está implicada en casi todos los aspectos del crecimiento y metabolismo de la bacteria, y es la principal barrera osmótica de la célula.

2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA INTERNA

La membrana citoplásmica está formada por una bicapa lamelar de fosfolípidos y por distintos tipos de proteínas que se intercalan en ella (Figura 4). En esta estructura las cadenas de ácidos grasos (apolares) se sitúan hacia el interior de la bicapa y los grupos de cabeza (polares) hacia el exterior, accesibles para la hidratación. El empaquetamiento molecular está guiado por la repulsión estérica y electrostática de los grupos de cabeza polar y por las interacciones hidrofóbicas de las cadenas acilos.

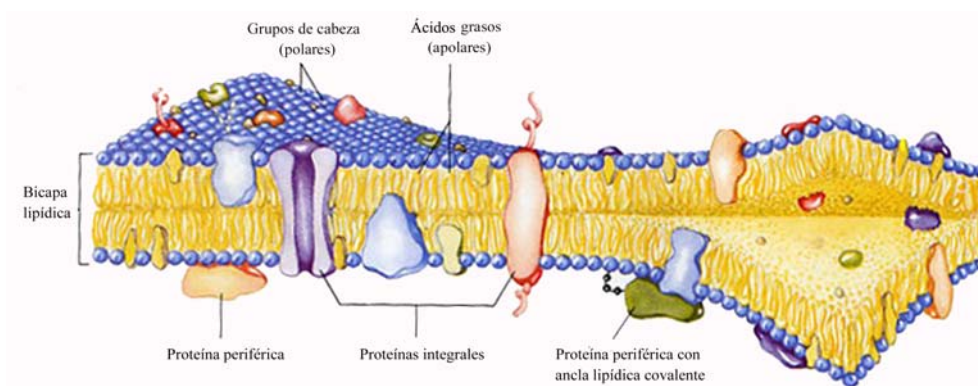


Figura 4. Representación de una bicapa lipídica

La bicapa lipídica forma una barrera hidrofóbica que previene el movimiento descontrolado de moléculas polares y permite la acumulación y retención de metabolitos y proteínas en el interior celular. Los lípidos además proporcionan una matriz apropiada para el funcionamiento adecuado de las proteínas de membrana involucradas en funciones bioenergéticas y biosintéticas. La composición lipídica determina las interacciones y la dinámica de las moléculas de lípidos, las cuales a su vez determinan las propiedades de barrera y permeabilidad de la membrana e influyen en la topología, las interacciones y las funciones de las proteínas de membrana.

2.1.1. PROTEÍNAS

El modelo de membrana del mosaico fluido representa las proteínas de membrana flotando libremente en la bicapa lipídica, donde tienen restringido el movimiento vertical pero son libres para difundir dentro del plano de la membrana. Aunque hay de 30 a 40 moléculas de fosfolípidos (0.5 nm^2 cada una) en cada monocapa por cada molécula de proteína de membrana, el área apolar de las proteínas de membrana típicas,

(por ejemplo, el centro de reacción fotosintética con 11 segmentos transmembranas) cubre alrededor de 10 nm^2 ; por tanto, las proteínas y los lípidos cubren aproximadamente la misma superficie de membrana. El contenido en proteínas de la mayoría de las membranas es tan alto que las proteínas están separadas unas de otras sólo por tres o cuatro capas de moléculas de fosfolípidos.

Basándose en su localización en la membrana interna se pueden encontrar tres tipos de proteínas: proteínas integrales de la membrana con uno o más segmentos transmembrana, proteínas que se anclan en la membrana a través de un dominio transmembrana y presentan dominios que se expanden hacia el periplasma de la célula, y proteínas que se asocian sólo transitoriamente con la membrana interna (periféricas). Las proteínas de la membrana interna se ensamblan en la misma formando estructuras que se disponen de manera que sus dominios hidrofóbicos están en contacto con la membrana y los dominios hidrofílicos se orientan hacia el interior de la proteína. La distribución de las proteínas de la membrana interna varía considerablemente en función de las condiciones de crecimiento de la célula, lo cual produce la expresión de diferentes sistemas productores de energía y la inducción o represión de distintos sistemas de transporte.

2.1.2. FOSFOLÍPIDOS

Los tres tipos de fosfolípidos presentes mayoritariamente en la membrana interna de *Pseudomonas* al igual que en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (las más estudiadas) son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Figura 5). *P. aeruginosa* también sintetiza fosfatilcolina (PC). La PE es el fosfolípido mayoritario constituyendo aproximadamente el 75% de los fosfolípidos totales. Las cantidades relativas de PG y CL dependen de la fase de crecimiento de los cultivos; siendo el PG más abundante en células en fase exponencial, mientras que CL se acumula en células en fase estacionaria (Cronan, Jr. y Rock, 1996; Schweizer, 2004).

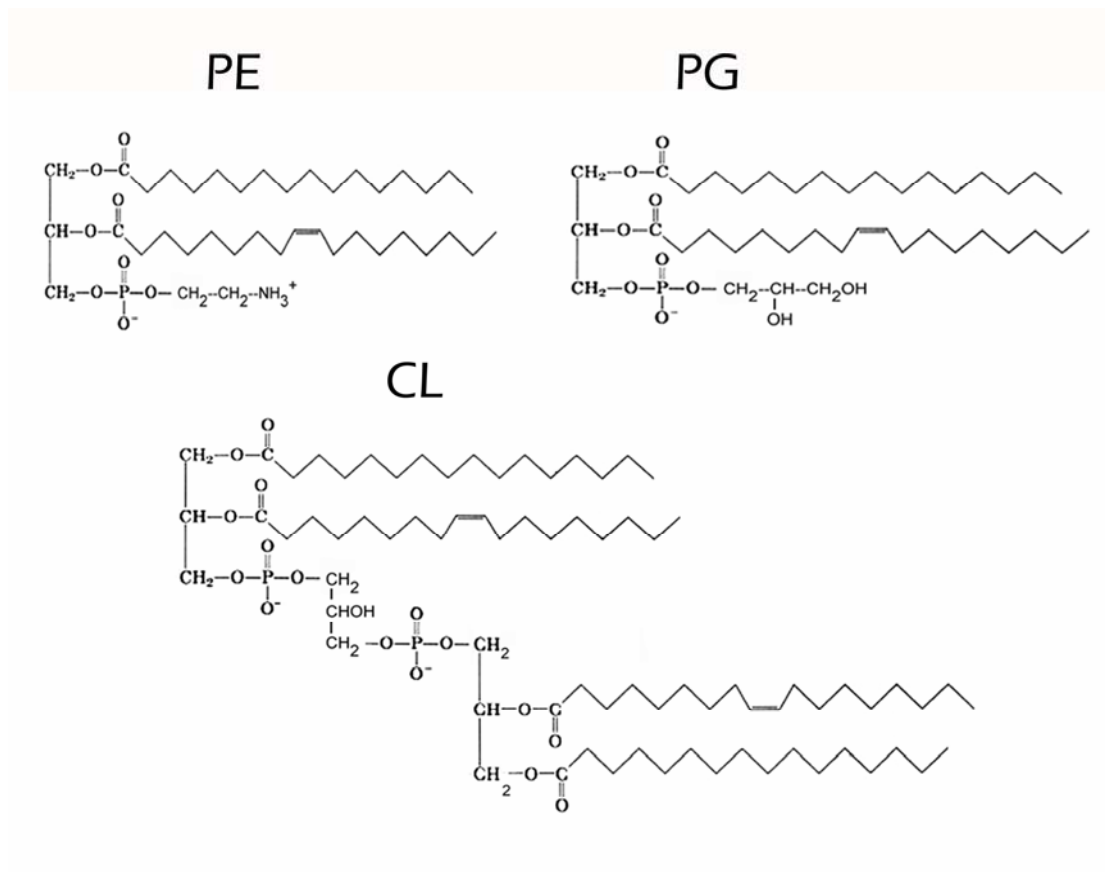


Figura 5. Estructura de los fosfolípidos mayoritarios en bacterias gram negativas

Los ácidos grasos que componen estos fosfolípidos pueden ser saturados e insaturados. En las membranas de *P. putida* los mayoritarios saturados son el ácido mirístico (tetradecanoico, C14:0), palmítico (hexadecanoico, C16:0) y esteárico (octadecanoico, C18:0). Entre los insaturados los más abundantes son: palmitoleico (*cis*-9-hexadecenoico, *cis*- $\Delta^{9,10}$ -16:1) y *cis*-vacénico (*cis*-11-octadecenoico, *cis*- $\Delta^{11,12}$ -18:1) (Figura 6). Los ácidos grasos insaturados se sintetizan como isómeros *cis*, siendo las formas *trans* y los formados post-sintéticamente minoritarios. En algunos géneros como *Pseudomonas* los isómeros *cis* pueden convertirse en sus correspondientes isómeros *trans* como respuesta a cambios ambientales (Junker y Ramos, 1999). Los ácidos grasos formados mediante modificación post-sintética a partir de los isómeros *cis* se denominan ciclo. Existen dos especies tanto en *P. putida* DOT-T1E como en KT2440: C17:ciclopropano (ácido 9,10-metileno-hexadecanoico) y C19:ciclopropano (ácido 11,12-metileno-octadecanoico). La abundancia de estos ácidos grasos es dependiente de la fase de crecimiento, pudiendo alcanzar el primero de ellos valores de hasta el 30% de los ácidos grasos totales en fase de crecimiento estacionaria.

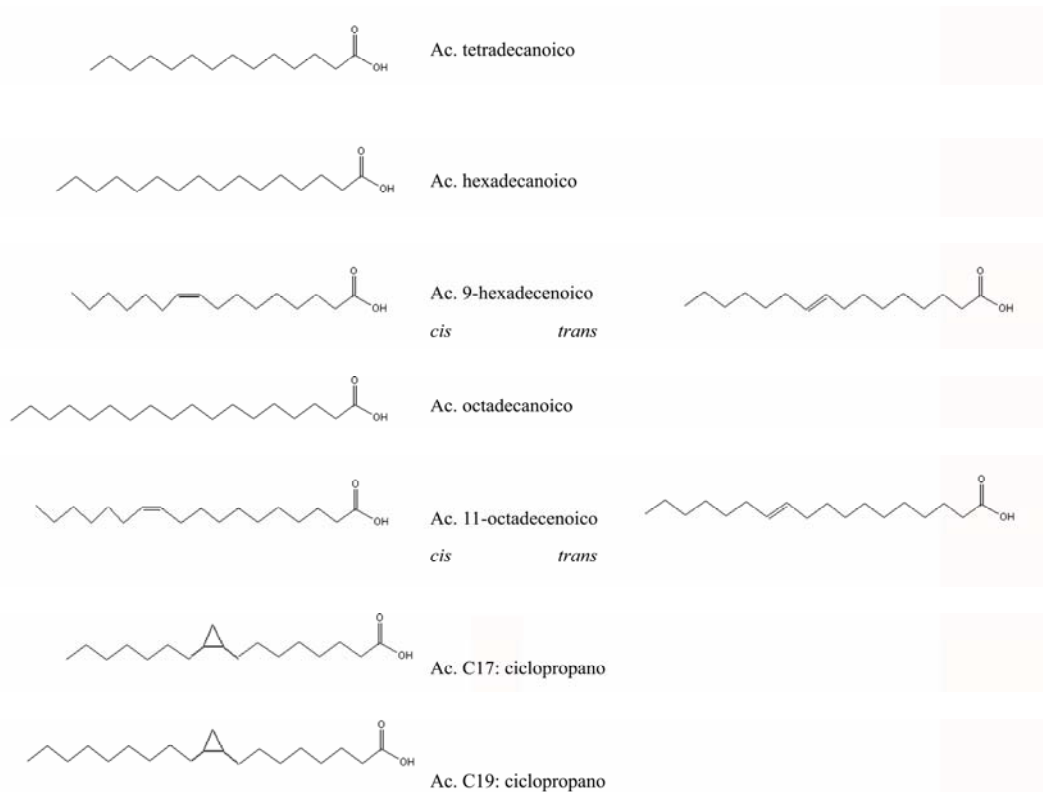


Figura 6. Estructura de los ácidos grasos mayoritarios en *Pseudomonas*

En *E. coli* las composiciones de los ácidos grasos de las dos membranas son similares, aunque la membrana interna está enriquecida en ácidos grasos insaturados. Este enriquecimiento se atribuye a los niveles incrementados de PG en la membrana citoplásmica, el cual contiene una fracción mayor de ácidos grasos insaturados que los otros dos fosfolípidos (Cronan, Jr. y Rock, 1996).

2.2. FUNCIONES DE LA MEMBRANA INTERNA

Para una revisión exhaustiva del papel de la membrana interna se recomienda leer el excelente trabajo de Robert (Kadner, 1996). En esta sección de la introducción se hará breve mención a algunas de estas funciones. La membrana citoplásmica tiene múltiples funciones celulares importantes; contiene centenares de proteínas diferentes, diversos transportadores de nutrientes y productos metabólicos, así como muchas enzimas que intervienen en el metabolismo de la generación y conservación de la energía, en la síntesis de lípidos, en la exportación de proteínas, la translocación de macromoléculas de la pared celular, la señalización transmembrana, la homeostasis y la división celular entre otras.

2.2.1. GENERACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA ENERGÍA

La mayoría de los procesos biosintéticos y de transporte en *E. coli* y *S. typhimurium* son llevados a cabo por la hidrólisis de los enlaces fosfato de alta energía del ATP, el GTP o el PEP (fosfoenolpiruvato), o por el acoplamiento de gradientes de iones transmembrana.

La composición de la cadena de transferencia de electrones bacteriana es bastante flexible y puede cambiar en respuesta a la presencia de sustratos particulares. Existen además diferencias considerables entre las cadenas de transferencia de electrones de células aeróbicas y anaeróbicas. Las cadenas respiratorias bacterianas actúan como una serie de complejos de proteínas separados físicamente. Numerosas deshidrogenasas unidas a membranas transfieren dos electrones o átomos de hidrógeno desde sus sustratos específicos a la reserva de quinonas, que son transportadores móviles que difunden a través de la membrana. Algunas deshidrogenasas son componentes transmembranas integrales, y otras son subunidades catalíticas que están unidas a la

membrana a través de una subunidad transmembrana que la ancla o bien a través de un segmento interno unido a membrana.

2.2.2. TRANSPORTE DE SOLUTOS

Las proteínas de transporte específico permiten a las moléculas hidrofílicas atravesar la barrera de permeabilidad hidrofóbica de la bicapa lipídica. Sólo unos pocos tipos de moléculas (agua, ácidos grasos de cadena corta, compuestos no polares) pueden entrar sin un transportador. Las bacterias poseen un gran número de sistemas de transporte activo con una alta afinidad y especificidad de sustrato y con una amplia variedad de mecanismos de acoplamiento de energía.

Los mecanismos de acoplamiento de energía incluyen (i) sistemas simporte o antiporte con gradientes de iones; (ii) permeasas periplásmicas, que son complejos multiprotéicos que incluyen una proteína periplásmica de unión al sustrato y que funcionan con hidrólisis de ATP; (iii) transporte de iones por ATPasas tipo P; (iv) sistemas de transporte seriado que median el transporte activo a través de la membrana externa y la citoplásmica; y (v) procesos de translocación en grupo que llevan a cabo simultáneamente el transporte y la modificación de sus sustratos. La mayoría de los nutrientes son transportados por sistemas múltiples (por ejemplo, la galactosa es transportada por cinco sistemas diferentes y la prolina por al menos tres), normalmente incluyen un sistema de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad. Este uso de sistemas de transporte múltiples permite a la célula optimizar la energía y la afinidad de estos sistemas para acomodarse a condiciones ambientales especiales.

2.2.3. TRANSLOCACIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DEL SISTEMA SEC

Algunas proteínas de la membrana citoplásmica y la mayoría de las proteínas destinadas al espacio periplásmico o a la membrana externa son translocadas por una ruta secretora denominada ruta general (Sec) y que es dependiente del funcionamiento de las proteínas SecA, SecE y SecY.

El determinante topogénico principal necesario para la entrada de una proteína en la ruta secretora Sec es la secuencia señal amino-terminal (también denominada péptido líder). La secuencia señal típica consta de entre 20 y 25 aminoácidos y aunque

no tiene una secuencia específica, si tiene 4 segmentos que guardan ciertas características comunes. El extremo amino-terminal de la secuencia señal está cargado positivamente y es muy importante para que la translocación se dé de forma eficiente y se asocie a fosfolípidos ácidos de la membrana citoplásmica así como a la proteína SecA. La carga positiva ayuda a orientar la secuencia señal anclando el extremo amino-terminal en la cara citoplásmica de la membrana. A continuación hay un segmento no polar (de 7 a 10 residuos) que tiene una fuerte propensión a asumir una estructura α -helicoidal en el ambiente no polar proporcionado por la bicapa lipídica o por las proteínas transmembranas del complejo secretor. La formación de la α -hélice ayuda a tirar del tercer segmento del péptido señal a través de la membrana y a llevar el sitio de rotura a la peptidasa líder, la cual está anclada en la cara periplásmica de la membrana plasmática por dos segmentos transmembranas. Este tercer segmento a menudo comienza con un residuo incompatible con la formación de estructuras en α -hélice y el último segmento es el sitio de reconocimiento de la peptidasa por la cual se procesa esta señal. El sitio de corte de la principal peptidasa señal (I) es precedido por aminoácidos de pequeño tamaño en las posiciones -1 y -3, siendo el residuo -1 casi siempre una alanina.

La translocación del resto de la proteína se lleva a cabo gracias a la acción repetida de la proteína de membrana periférica SecA dependiente de ATP y probablemente tiene lugar a través de un canal formado por las proteínas de translocación SecY, SecD, SecE, SecF y otras. La translocación de proteínas es dependiente de la hidrólisis de ATP y está fomentada por la presencia de un potencial eléctrico orientado, con la carga positiva en la cara de la membrana hacia la cual se moverá la proteína.

2.2.4. SEÑALIZACIÓN TRANSMEMBRANA

Las bacterias responden a muchas señales ambientales a través de un sistema de transducción de señales transmembrana. Un enorme número de sistemas reguladores actúan a través de cascadas de fosforilación de proteínas que están ampliamente distribuidas en bacterias. Estos sistemas son denominados “sistemas reguladores de dos componentes” porque comprenden como mínimo, una proteína denominada sensor quinasa, que se autofosforila en un residuo de histidina, y otra proteína denominada

regulador de respuesta, que acepta el fosfato del sensor kinasa en un residuo de aspartato. La mayoría de los reguladores de respuesta fosforilados activan genes específicos a nivel de su transcripción. La membrana citoplásmica es el sitio de numerosas proteínas reguladoras transmembranas que se expresan a un nivel constitutivo bajo y que controlan la expresión génica en respuesta a cambios ambientales.

2.2.5. DIVISIÓN CELULAR

La división celular implica la partición del citoplasma en dos compartimentos, cada uno de los cuales tiene que contener una copia de la información genética de la célula. En bacterias gram negativas como *E. coli* y *S. typhimurium*, la división, también entendida como septación o constricción, implica la invaginación circunferencial de las tres capas de la envoltura celular entre los cromosomas segregados. La constricción y el proceso de replicación del cromosoma están bien coordinados y muy pocas veces se forman células sin DNA.

La biosíntesis del septo es un proceso complejo. En ella está implicada la maquinaria biosintética del peptidoglucano y también mecanismos para que esta maquinaria haga su acción de forma localizada y para que se dé la invaginación circunferencial del septo naciente. Las proteínas que llevan a cabo la incorporación y el procesamiento de los precursores del peptidoglucano, están ancladas en la membrana citoplásmica con sus sitios activos expuestos al peptidoglucano en el periplasma. El precursor del peptidoglucano, un disacárido pentapéptido, es sintetizado en el citoplasma y es translocado a través de la membrana plasmática acoplado a un transportador de lípidos. El mismo transportador se usa para la translocación de los precursores de las cadenas de azúcar de los LPS.

Un segundo aspecto de la formación del septo es la localización de la proteína FtsZ en la membrana justo en el sitio de formación del septo. Al comienzo de la constricción, las moléculas de FtsZ se mueven desde el citoplasma a la superficie interna de la membrana plasmática, donde forman un anillo estrecho alrededor de la circunferencia de la célula. Este anillo FtsZ se encoge en diámetro mientras permanece asociado con el septo en crecimiento. La constricción del anillo FtsZ es dependiente de su actividad GTPasa intrínseca y podría ser el proceso que conduce a la división de la

célula. Otro proceso relacionado con la membrana es la determinación del sitio de formación del septo, en el cual, las proteínas MinCDE cooperan en especificar que el septo se forme en el punto medio de la célula y no en otros puntos.

La membrana citoplásmica tiene un papel muy importante en los procesos de replicación y segregación del cromosoma. El origen de replicación *oriC*, la proteína DnaA que inicia el proceso de replicación desenrollando el origen de replicación y otras proteínas accesorias se ensamblan en la membrana citoplásmica para la iniciación de la replicación. Además, el nucleoide tiene entre 20 y 80 puntos más de unión a la membrana para asegurar la segregación de cada nucleoide hijo en su correspondiente mitad de la célula hasta que se complete la formación del septo.

Por último, una de las funciones más importantes que se lleva a cabo en la membrana interna es la **síntesis de lípidos**, que veremos con más detalle a continuación.

3. SÍNTESIS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA

Las enzimas de la biosíntesis de lípidos están distribuidas entre el citosol y la membrana interna. Las enzimas sintéticas de ácidos grasos y la glicerol-3-fosfato (G3P) sintasa son citosólicas, mientras que las enzimas de la síntesis de fosfolípidos se encuentran en la membrana interna. Por tanto, la síntesis de lípidos la podemos dividir en dos partes: (i) la síntesis de los ácidos grasos (FAS = del inglés *Fatty Acid Synthesis*) y (ii) la unión de los ácidos grasos completos a la molécula de G3P seguido de la adición y modificación de los grupos de cabeza polar para producir los fosfolípidos celulares mayoritarios.

3.1. SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS (FAS)

Para una revisión exhaustiva se recomienda consultar el trabajo de Herbert (Schweizer, 2004), publicado en el libro de la serie de *Pseudomonas*. La síntesis de los ácidos grasos es esencial para las funciones celulares, proporciona precursores para la síntesis de fosfolípidos y otros constituyentes celulares como lipopolisacáridos, ramnolípidos, ácidos polihidroxicanoicos, oligosacáridos y proteínas. La síntesis de homoserín-lactonas aciladas (AHLs, del inglés: *Acylated Homoserine Lactone*), que se requieren para la comunicación célula-célula de la que dependen muchos otros

procesos, necesita grupos acilos que son donados por proteínas que portan grupos acilos (acyl-ACPs) derivadas de la ruta biosintética de los ácidos grasos (Fab).

A pesar de la importancia que los ácidos grasos tienen en la fisiología y la virulencia de muchas cepas diferentes de *Pseudomonas*, la genética y la biología molecular de la biosíntesis de los ácidos grasos y sus conexiones entre rutas sólo han sido estudiadas ampliamente en *P. aeruginosa*. Las rutas generales parecen ser similares en otras *Pseudomonas* y bacterias relacionadas, con la excepción de la síntesis de algún constituyente celular único que requiere algunas enzimas exclusivas que no se encuentran en *P. aeruginosa*.

3.1.1. ENZIMAS Y PROTEÍNAS DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Existen dos rutas biosintéticas de ácidos grasos denominadas tipo I y II. La síntesis de ácidos grasos tipo I se lleva a cabo por complejos de proteínas multifuncionales que catalizan distintas reacciones usando distintos dominios o diferentes cadenas polipeptídicas. Por el contrario, cada paso de la ruta de tipo II se lleva a cabo por una proteína independiente con una función concreta (Campbell y Cronan, Jr., 2001). Las rutas tipo I son típicas de mamíferos, aves y levaduras mientras que las de tipo II se dan principalmente en bacterias y plantas.

En la mayoría de la bacterias, incluyendo *P. aeruginosa*, algunos de los genes que codifican enzimas bacterianas de FAS se encuentran formando operones mientras otros son unidades monocistrónicas

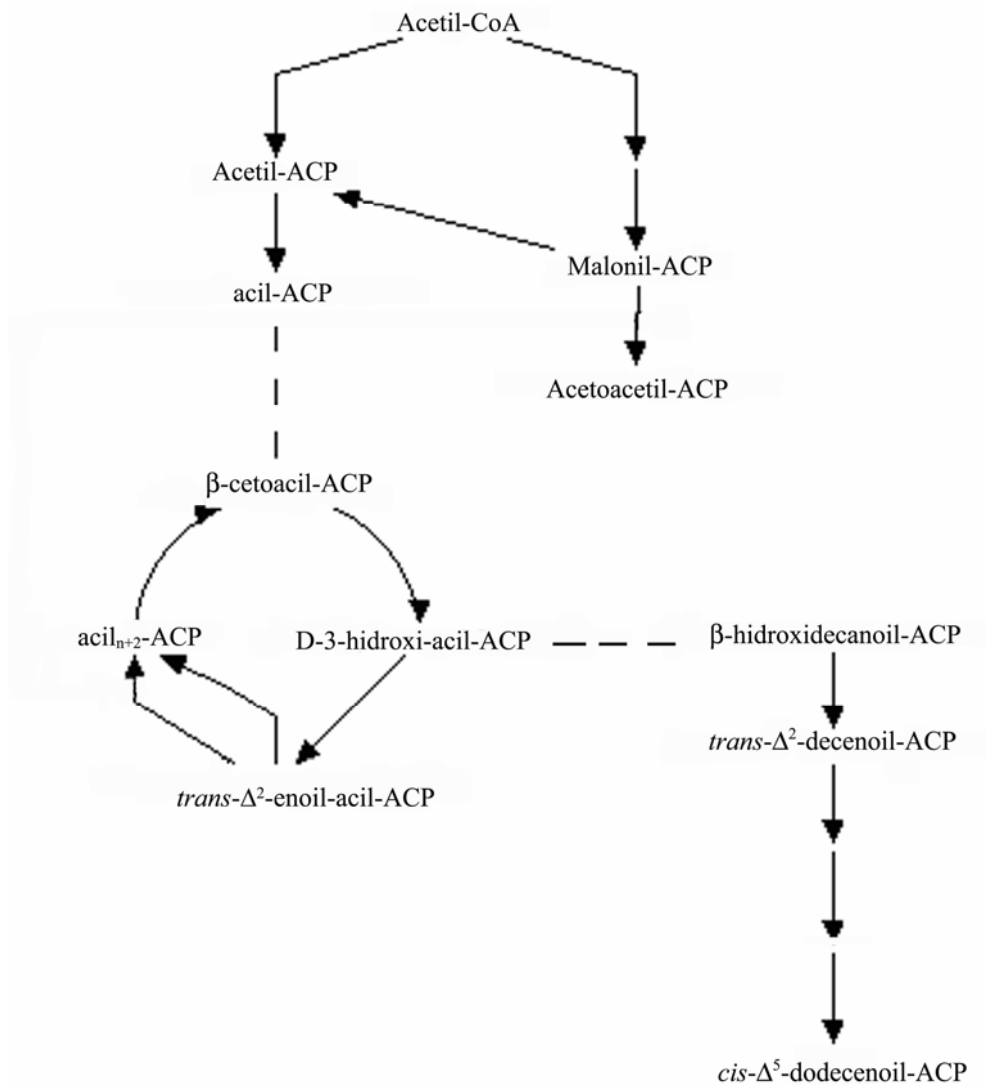


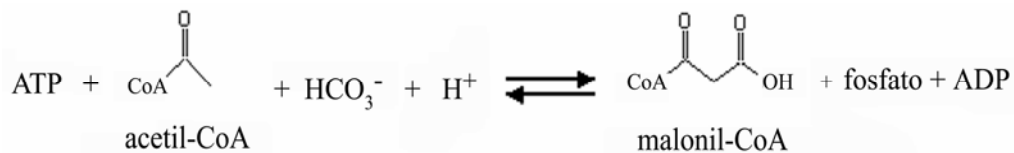
Figura 7. Esquema general de la síntesis de ácidos grasos

El mecanismo de síntesis de ácidos grasos está conservado en procariotas y eucariotas, (las arqueas sintetizan lípidos derivados de isoprenoides) y tiene lugar en dos fases, la fase de iniciación y la fase de elongación (Figura 7). A menudo hay múltiples proteínas que llevan a cabo la misma reacción química básica, y debido a diferencias en la especificidad del sustrato, cada una juega un papel único en la regulación fisiológica

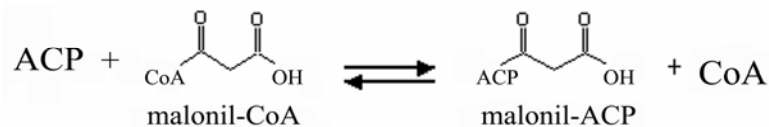
del espectro de productos producidos por la ruta (Cronan, Jr. y Rock, 1996). Estas fases se han caracterizado bien en *E. coli*.

En los pasos iniciales de la biosíntesis de ácidos grasos se sintetiza, a partir de su precursor acetil-CoA, el primer intermediario importante, acetoacetyl-ACP. Hay varios caminos alternativos para generar este intermediario a partir del acetil-CoA, los cuales implican algunas combinaciones de los intermediarios malonil-CoA, malonil-ACP y acetil-ACP. Estas primeras reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos pueden usar tanto una proteína pequeña y muy soluble a la que los intermediarios acilos de la biosíntesis de los ácidos grasos se unen a través de un enlace tioéster con el grupo prostético, ACP (del inglés: *Acyl Carrier Protein*) como la coenzima A (CoA) para activar los intermediarios. Veremos con más detalles una de las rutas:

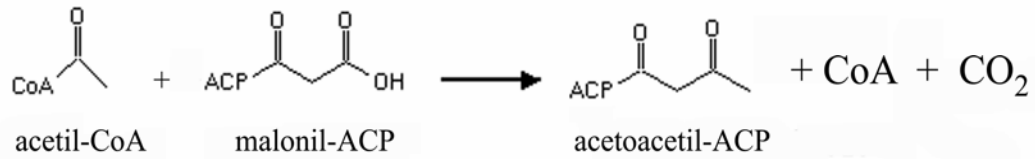
En la fase de **iniciación**, el acetil-CoA se transforma en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC dependiente de ATP codificada por *accA*, *accB*, *accC*, *accD*).



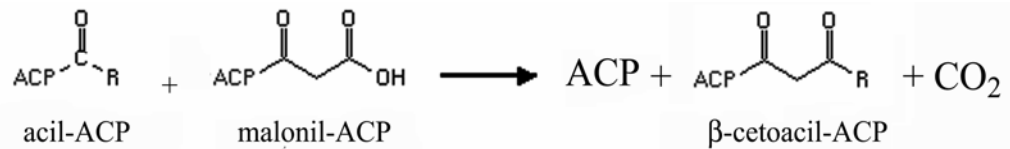
El malonil-CoA pasa a malonil-ACP gracias a la malonil-CoA:ACP transacilasa (MTA), codificada por *fabD*.



Durante la **fase de elongación**, la β -cetoacetyl-ACP sintasa III o KAS III (codificada por *fabH*) cataliza la condensación de malonil-ACP con acetil-CoA en la primera ronda de elongación, dando lugar a acetoacetyl-ACP.



En sucesivas rondas de elongación el producto en formación (acil-ACP) se condensa con malonil-ACP para formar β -cetoacil-ACP. Esta reacción está catalizada bien por la β -cetoacil-ACP sintasa I o KAS I (codificada por *fabB*) o bien por la β -cetoacil-ACP sintasa II o KAS II (codificada por *fabF*).



El β -cetoacil-ACP sufre de forma consecutiva reducción (*fabG* o β -cetoacil-ACP reductasa), deshidratación (*FabZ* o β -hidroxiacil-ACP deshidratasa y *FabA* o β -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa), y de nuevo reducción (*FabI* o enoil-ACP reductasa) para completar una ronda de la cadena de elongación, dando lugar a acil-ACPs saturados. Un esquema detallado de la síntesis de ácidos grasos se muestra en la figura 8.

Para la síntesis de ácidos grasos saturados, el proceso de elongación se repite hasta que la cadena acilo alcanza la longitud deseada (normalmente de 14 a 18 carbonos en bacterias gram negativas).

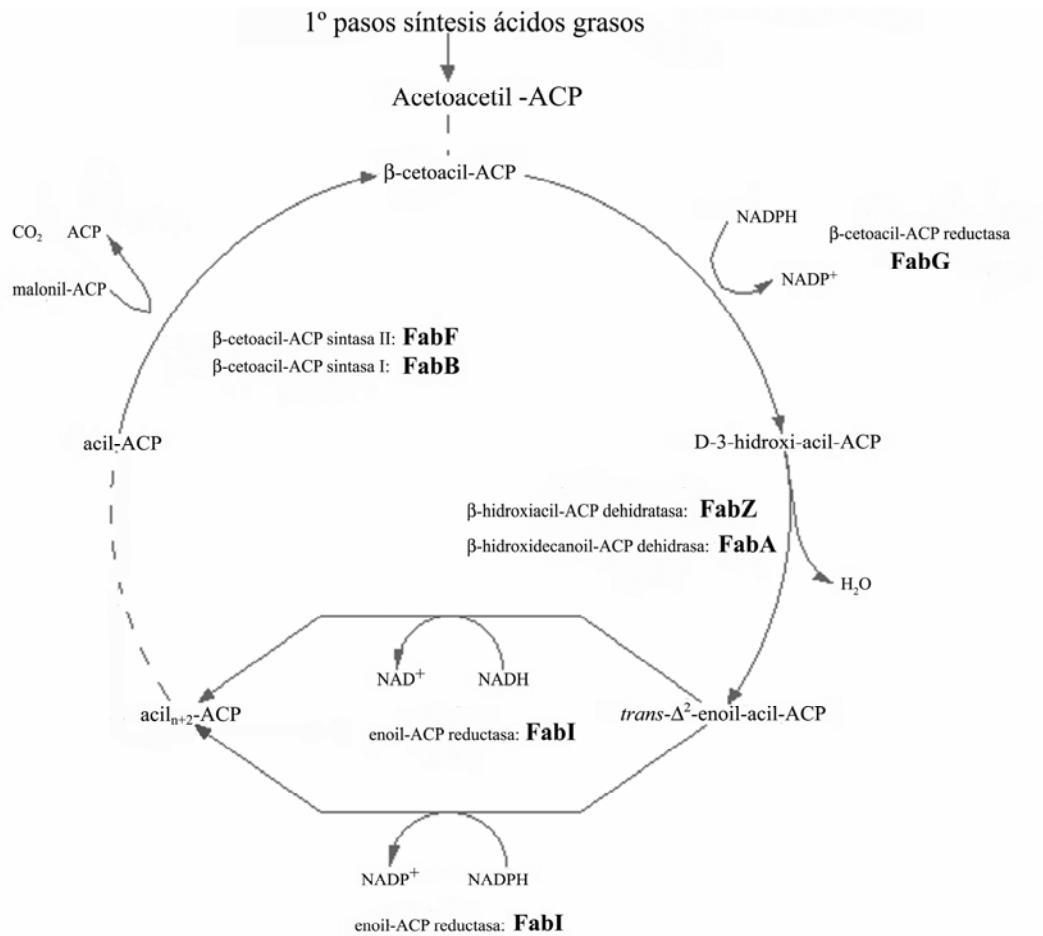


Figura 8. Esquema de la síntesis de ácidos grasos

En α y γ Proteobacterias, la síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados está conectada por la ruta biosintética de ácidos grasos insaturados anaeróbica. Los ácidos grasos insaturados se producen por una isomerización del doble enlace *trans*-2 a un doble enlace *cis*-3 en la etapa de 10 carbonos de la síntesis. Esta isomerización es catalizada por la enzima FabA con su función *trans*-2-decenoil-ACP isomerasa. El producto *cis*-3 se condensa con malonil-ACP (mediante KAS I) para formar β -cetoacil-ACP, básicamente saltándose el paso de la enoil-ACP reductasa (FabI) y manteniendo así el doble enlace. En subsecuentes rondas de elongación, la cadena acilo se extiende hasta el producto de longitud total (Figura 9).

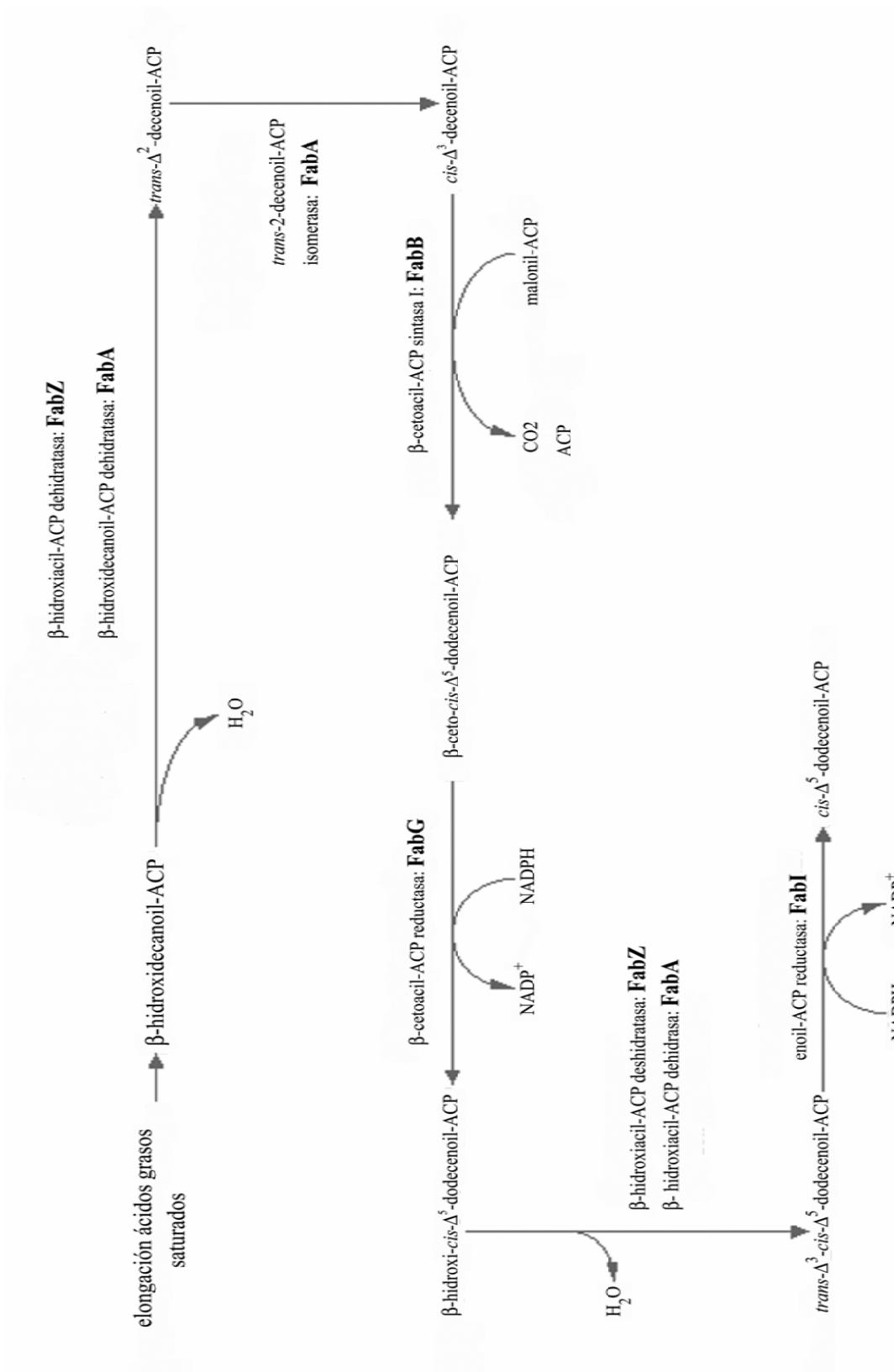


Figura 9. Esquema de la síntesis de ácidos grasos insaturados

Mutaciones en los locus *fabA* o *fabB* producen auxotrofia para ácidos grasos insaturados, siendo necesario el aporte de los mismos al medio de cultivo para el crecimiento de las células (Hoang y Schweizer, 1997). También se debe señalar que FabF es el responsable de la modulación de la longitud de la cadena de los ácidos grasos insaturados: a menor temperatura, *P. aeruginosa* sintetiza más *cis*-vacénico, y esta adaptación no se da en mutantes *fabF* (Kutchma *et al.*, 1999).

En *P. aeruginosa* se han descrito 2 rutas aeróbicas (Figura 10) de formación de ácidos grasos insaturados que complementan la ruta anaeróbica descrita arriba. Estas dos rutas alternativas proporcionan un mecanismo que modifica los ácidos grasos de fosfolípidos ya existentes y que produce ácidos grasos insaturados a partir de ácidos grasos saturados exógenos. La ruta DesA introduce un doble enlace en la posición Δ -9 de las cadenas acilos localizadas en sn-2 (carbono 2 de la molécula de glicerol) de los fosfolípidos de membrana y produce especies moleculares de PE y PG insaturadas. La actividad de DesA puede ser controlada por las propiedades biofísicas de la membrana e inhibida por los altos contenidos de ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de membrana de la estirpe silvestre. La segunda ruta aeróbica requiere DesB que puede desaturar estearato y palmitato exógeno, y los productos principales son 18:1 Δ 9 y 16:1 Δ 9 respectivamente. El gen *desB* forma un operon con *desC*, un gen que codifica una oxidorreductasa que podría funcionar como un transportador de electrones acoplado con la reacción de desaturación de DesB. La expresión del operon *desCB* está controlada por el represor DesT que parece funcionar como un sensor de ácidos grasos exógenos. (Zhu *et al.*, 2006).

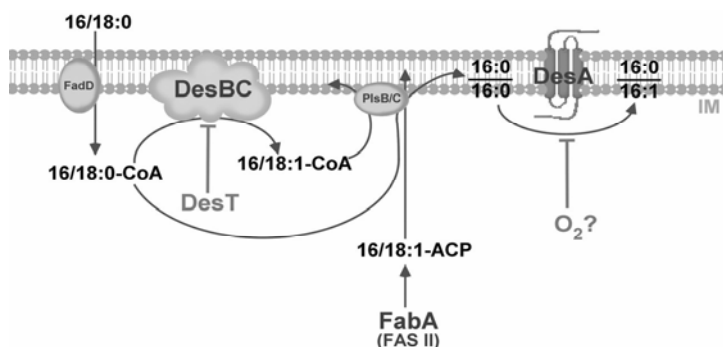


Figura 10. Posible mecanismo de actuación de las rutas aeróbicas de síntesis de ácidos grasos insaturados en *P. aeruginosa*

Con la reciente finalización de la secuenciación de los genomas de *P. putida* KT2440 y *P. syringae* hemos podido realizar un estudio minucioso *in silico* de la presencia, organización génica y grado de conservación de los genes *fab* y sus productos en *P. putida* KT2440, cepa con la que se ha trabajado en esta Tesis Doctoral y que es muy similar a *P. putida* DOT-T1E, otra cepa utilizada en nuestros estudios. Comparando los genomas de *P. putida* y *P. syringae* con *P. aeruginosa* podemos apreciar que con la excepción de *fabH* y *fabI*, el grado de conservación, en términos de productos de genes *fab* (y *acpP*), similitud y organización, en los tres genomas es sorprendente: (i) todos contienen un conjunto principal de genes *fab* y dentro de este conjunto el orden de los genes es el mismo (*fabF-acpP-fabG-fabG*), estando ausente *fabH*; (ii) los tres genomas contienen un posible operon *fabAB*; (iii) el gen *fabZ* está localizado fuera del conjunto génico *fab*; (iv) el grado de similitud de los genes y sus productos es muy alto, tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácidos; y (v) todos los genomas codifican al menos una posible y adicional β -cetoacil-ACP sintasa II (FabF2). Sin embargo, existen algunas diferencias notables. Primero, aunque todos los genomas contienen posibles homólogos de FabH, el grado de conservación es bajo y por tanto es más que cuestionable que este gen y su producto tenga un papel en la biosíntesis de ácidos grasos. Segundo, aunque hay un alto nivel de conservación de genoma entre *P. aeruginosa* y *P. putida* (85% de las regiones codificantes son compartidas), el gen *fabI* que codifica la enoil-ACP reductasa no aparece en el genoma de *P. putida* KT2440, (Schweizer, 2004) discute que *P. putida* podría contener probablemente una enoil-ACP reductasa tipo FabK o FabL (Heath y Rock, 2000; Marrakchi *et al.*, 2002). En un reciente estudio *in silico* (Figura 11) hemos visto que el ORF que presenta mayor similitud con *fabI* de *E. coli* en *P. putida* KT2440 es PP1951, ésta es baja sobre todo si la comparamos con la que presenta *P. aeruginosa*. Aunque no podemos descartar su papel parece más probable que la reductasa funcional en *P. putida* KT2440 sea *fabK* ya que si comparamos *fabK* de *S. pneumoniae* con *P. putida* y *P. aeruginosa* vemos unos números muy parecidos y en *P. aeruginosa* hay evidencias experimentales que apoyan la existencia de la misma. Por último, parece que también pueden existir otras reductasas tipo FadL de *B. subtilis* (Heath *et al.*, 2000).

	Identidad (%)	Similitud (%)	
<i>E. coli fabI</i> (b1288)	28.1	47	PP 1951
	69.5	83.2	PA 1806
<i>S. pneumoniae fabK</i> (SP0419)	36.5	53.9	PP 3827
	32.7	53.5	PA 1024
<i>B. subtilis fabL</i> (Bsu0864)	33.5	56.2	PP 3926
	33.6	52.3	PP 1852
	37.8	56.4	PA 2138

Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las tres enoil-ACP reductasas descritas hasta el momento y las posibles secuencias codificantes en *P. putida* (PP) y *P. aeruginosa* (PA)

Dada la presencia de genes *fab* y *acpP* casi idénticos en *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. syringae*, se puede deducir que las rutas biosintéticas de ácidos grasos son probablemente muy similares en estas tres cepas del género *Pseudomonas*.

3.1.2. MODIFICACIONES POSTSINTÉTICAS

Los ácidos grasos bacterianos sufren varias modificaciones postsintéticas. Dos de las modificaciones conocidas más importantes son la isomerización *cis-trans* y la formación de ácidos grasos ciclopropano. Ninguna de estas modificaciones involucra ácidos grasos libres, coenzima A o ácidos grasos unidos a ACP, sino que usan moléculas de fosfolípidos maduras que están incorporadas y funcionando en la membrana.

• Isomerización *cis-trans*

La isomerización *cis-trans* de los ácidos grasos insaturados juega un papel importante en la adaptación de las bacterias frente a cambios de temperatura o presencia de disolventes orgánicos en el medio. En *Pseudomonas* esta modificación postsintética ha sido bien caracterizada en *P. putida* (Junker y Ramos, 1999). Las células sintetizan los ácidos grasos insaturados como isómeros *cis* y por esta razón estos isómeros son los mayoritarios en las membranas bacterianas, estando los isómeros *trans* menos

extendidos. Esta isomerización podría ser un mecanismo de control de fluidez de membrana incrementando la rigidez de la misma (Heipieper *et al.*, 1992) (Figura 11C). Los ácidos grasos insaturados *cis* presentan una torsión en su cadena hidrocarbonada que no permite un empaquetamiento compacto con los ácidos grasos de su alrededor, provocando mayor fluidez en las membranas donde están presentes. La isomerización a *trans* provoca un cambio en la conformación del ácido graso; este nuevo enlace da lugar a una cadena extendida casi idéntica a la de los ácidos grasos saturados y por tanto permite un mejor empaquetamiento que lleva al aumento de rigidez (Figura 11).

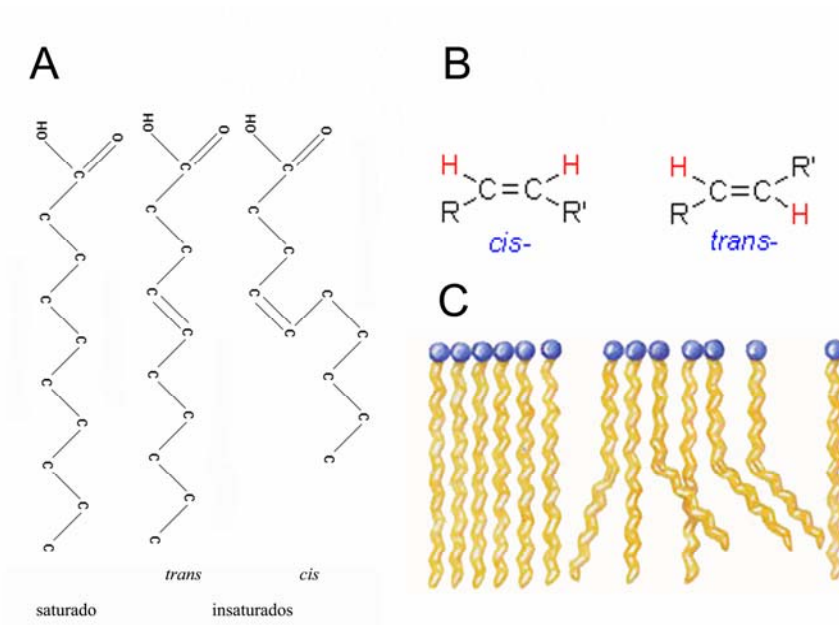


Figura 11. Estructura de los ácidos grasos insaturados. **A:** Estructura y conformación en el espacio de un ácido graso saturado y sus correspondientes isómeros *cis* y *trans*; **B:** conformación espacial de los átomos que forman los dobles enlaces *cis* y *trans*; **C:** Representación de una monocapa lipídica con fosfolípidos saturados e insaturados *cis* y *trans*.

En respuesta a la exposición de varios disolventes o compuestos aromáticos, varias estirpes de *P. putida* cambian rápidamente sus proporciones *cis/trans*. Los isómeros *trans* del ácido palmitoleico y vacénico son directa y rápidamente (se pueden detectar tras cinco minutos de exposición) formados desde el respectivo isómero *cis* sin cambiar la posición del doble enlace. Diversos estudios apuntaban a una expresión

constitutiva del gen *cti*, y esto, junto a la rápida formación del isómero *trans* tras añadir disolvente, abría la incógnita de cómo se activa la enzima *cis-trans* isomerasa (Cti) (Heipieper *et al.*, 2003).

Los genes que codifican las enzimas Cti han sido clonados de varias estirpes de *P. putida* y además de *P. oleovorans*. El gen *cti* se encuentra en todas las *Pseudomonas* secuenciadas. Si comparamos con la proteína Cti KT2440, obtenemos identidades del 89% en *P. entomophila*, del 74% en *P. fluorescens* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* y pv. *tomato*, del 69% en *P. mendocina* y del 66% en *P. aeruginosa*. Un mutante *cti* nulo era incapaz de isomerizar los ácidos grasos insaturados *cis* siendo más sensible a disolventes orgánicos (tolueno) y temperatura, lo que demostraba la participación de esta isomerización en la adaptación de la membrana a estos estreses.

• Síntesis de Ácidos Grasos Ciclopropano

Los ácidos grasos ciclopropanos (CFAs del inglés *Cyclopropane Fatty Acid*) están ampliamente distribuidos entre las bacterias y se forman por la adición de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina a través del doble enlace de los ácidos grasos insaturados (Grogan y Cronan, Jr., 1997) (Figura 12). Los CFAs son normalmente sintetizados al comienzo de la fase estacionaria. A pesar de que la insaturación del doble enlace en los fosfolípidos de membrana está profundamente aislada dentro del interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, esta reacción está catalizada en *E. coli* por una enzima (CFA sintasa) citoplásmica soluble (Wang *et al.*, 1992). La expresión de la CFA sintasa de *E. coli* es inducible en virtud del factor sigma de fase estacionaria RpoS (Wang y Cronan, Jr., 1994) y la actividad del enzima es transitoria debido a una modificación proteolítica dependiente de RpoH (Chang *et al.*, 2000). Entre las *Pseudomonas*, la síntesis inducida de actividad CFA sintasa ha sido descrita en *P. denitrificans* (Jacques y Hunt, 1980), *P. fluorescens* (Crowfoot y Hunt, 1970) y *P. aeruginosa* (Dubois-Brissonnet *et al.*, 2001). Estudios *in silico* muestran la existencia de este gen en el resto de *Pseudomonas* secuenciadas hasta el momento (*P. putida*, *P. entomophila*, *P. syringae* y *P. mendocina*). Aunque la expresión de las CFA sintasas en *P. denitrificans* y *P. aeruginosa* parecía ser dependiente de la fase de crecimiento, los mecanismos moleculares que gobiernan este patrón de expresión no se conocen. Estudios

preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio con *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* KT2440 muestran que la transcripción de este gen es dependiente del factor de transcripción de fase estacionaria σ^S (RpoS). En algunas *Pseudomonas*, los ácidos grasos ciclopropano pueden constituir una gran proporción de los ácidos grasos celulares. Por ejemplo, en células de *P. putida* DOT-T1E creciendo en medio Luria-Bertani en fase estacionaria de crecimiento, el ácido C17:ciclopropano representa más del 30% del contenido de ácidos grasos totales (Ramos *et al.*, 1997). A pesar de que su importancia biológica continúa sin conocerse, la acumulación de estos ácidos grasos ha sido citada como una característica conservada en el grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antifúngica.

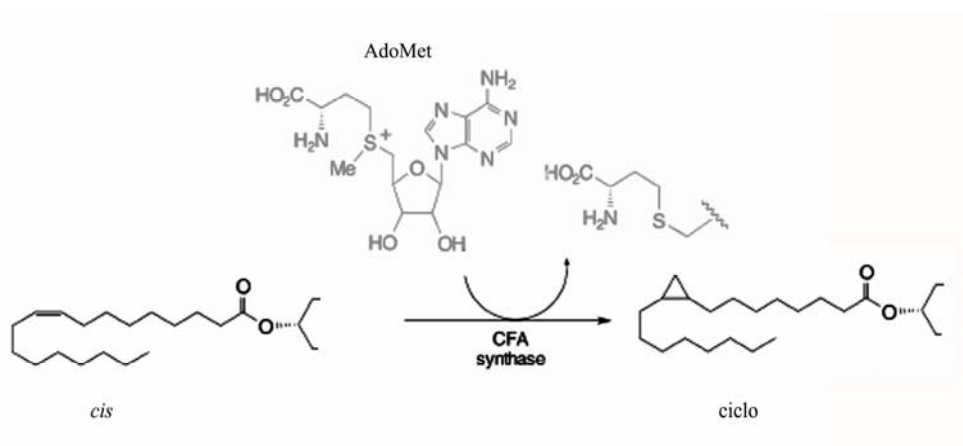


Figura 12. Síntesis de ácidos grasos ciclopropano

3.2. SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos de la membrana interna son sintetizados mayoritariamente por proteínas integrales de la membrana, que presentan sus dominios catalíticos en el citoplasma, o bien mediante proteínas asociadas a membrana (Cronan, Jr. y Rock, 1996), utilizando como molécula precursora el ácido fosfatídico (Huijbregts *et al.*, 2000). Los fosfolípidos son esenciales para la integridad y las funciones biológicas de las membranas bacterianas, y las modificaciones de los fosfolípidos están involucradas en adaptaciones biológicas de bacterias, como la tolerancia a disolventes. Aunque la mayoría de *Pseudomonas* contienen muchas de las especies de fosfolípidos encontrados

en *E. coli*, por ejemplo fosfatidiletanolamina, tienen además la capacidad de sintetizar algunos fosfolípidos no encontrados en *E. coli*, por ejemplo lípidos que contienen ornitina en varias *Pseudomonas* y fosfatidilcolina en *P. aeruginosa* (Wilderman *et al.*, 2002).

Como ya vimos anteriormente, los fosfolípidos están compuestos de una molécula de sn-glicerol-3-fosfato (G3P), cuyo esqueleto de glicerol se esterifica con dos ácidos grasos. Los ácidos grasos sustrato son los acil-ACPs de la ruta biosintética de éstos. Los ácidos grasos se transfieren al G3P en dos reacciones sucesivas (Figura 13A). La primera enzima (G3P aciltransferasa) transfiere los ácidos grasos a la posición 1 del esqueleto de glicerol y la segunda enzima (1-acil-glicerofosfato aciltransferasa) entonces esterifica la posición 2 con un segundo ácido graso. La distribución asimétrica de los ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 está controlada en parte por la especificidad de la cadena acilo de las acil transferasas. La molécula resultante de la diacilación de G3P es el ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico se convierte a CDP-diacilglicerol por la CDP-diacilglicerol sintasa y éste sirve como un intermediario en la biosíntesis de todos los fosfolípidos de membrana (Figura 13B).

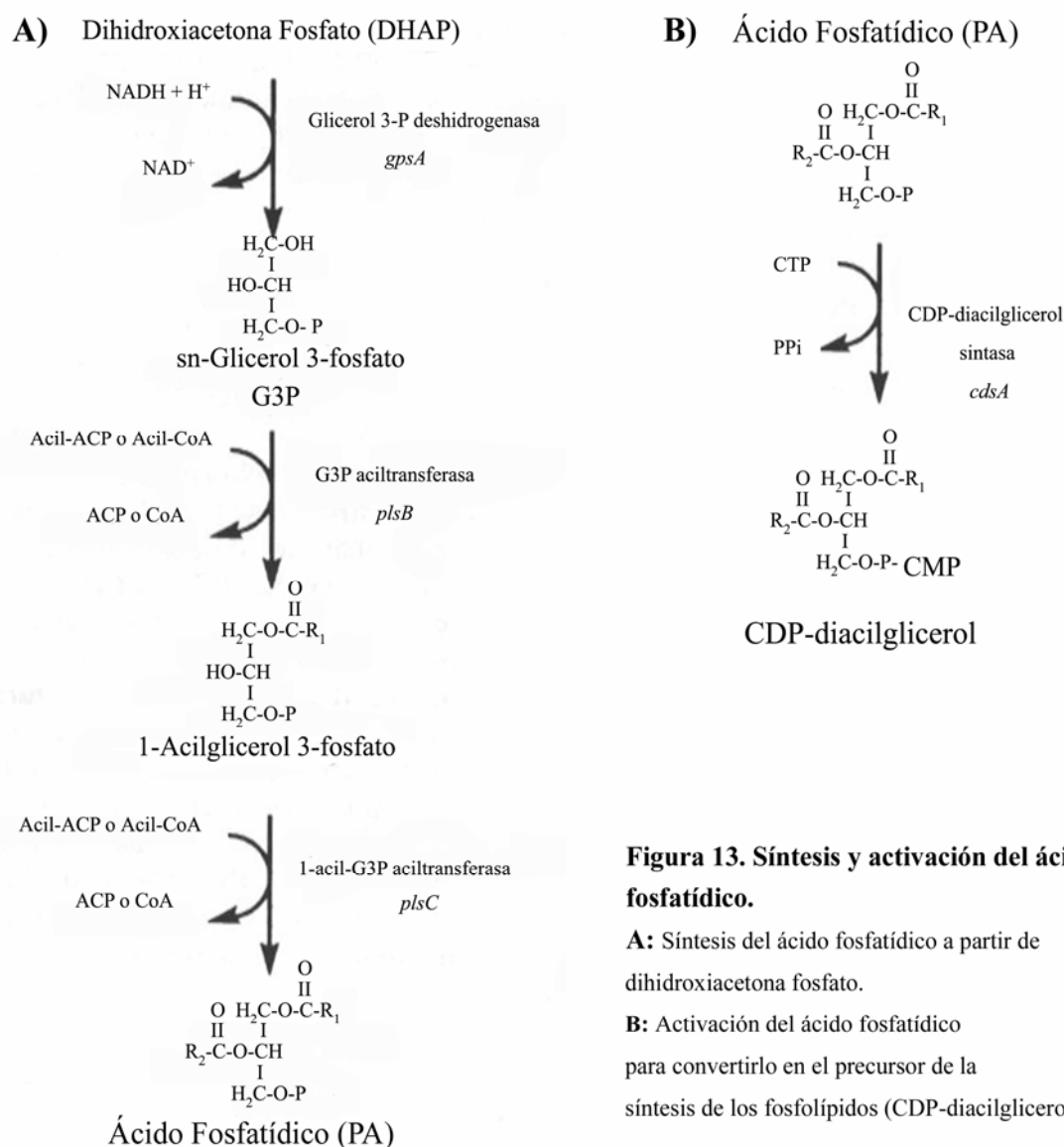


Figura 13. Síntesis y activación del ácido fosfatídico.

A: Síntesis del ácido fosfatídico a partir de dihidroxiacetona fosfato.

B: Activación del ácido fosfatídico para convertirlo en el precursor de la síntesis de los fosfolípidos (CDP-diacilglicerol).

Aunque se sabe poco de las rutas biosintéticas de los fosfolípidos en *Pseudomonas*, se puede asumir que las rutas básicas en estas bacterias son muy similares a las caracterizadas en *E. coli*. Los genomas de *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* poseen genes homólogos a los de *E. coli* que podrían codificar las enzimas biosintéticas de los fosfolípidos. Sin embargo, la presencia de fosfolípidos únicos en *Pseudomonas* necesita enzimas únicos. Uno de estos fue recientemente demostrado en *P. aeruginosa*, la cual sintetiza fosfatidilcolina por una ruta dependiente de colina (Lopez-Lara y Geiger, 2001). En esta ruta, la fosfatidilcolina sintasa (Pcs)

condensa colina directamente con CDP-diacilglicerol para formar fosfatidilcolina en un solo paso.

3.2.1 BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA (PE)

El primer paso en la síntesis de PE es la condensación de CDP-diacilglicerol con serina para formar fosfatidilserina (PS), una reacción catalizada por la PS sintasa (codificada por el gen *pssA*) (Kanfer y Kennedy, 1964) (Figura 14). Esta enzima se encuentra en la fracción de membrana interna como el resto de enzimas de la síntesis de fosfolípidos. El gen estructural de la PS sintasa ha sido identificado, mapeado y clonado en *E. coli* y la proteína ha sido purificada (Raetz, 1976; Raetz *et al.*, 1977). La PS es un componente minoritario en la membrana de *E. coli* ya que es rápidamente transformada a PE por la PS descarboxilasa (codificada por *psd*). Mutantes de *E. coli* en los que el gen *psd* se ha inactivado mediante un marcador de resistencia a Km no son viables (DeChavigny *et al.*, 1991), sin embargo, hay mutantes con una descarboxilasa termosensible que acumulan PS a temperatura no permisiva y que continúan creciendo durante varias horas después del cambio de temperatura (Hawrot y Kennedy, 1975). Sorprendentemente, la letalidad (producida por la falta de fosfatidiletanolamina) es fenotípicamente suprimida por la adición de cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}) en el medio de crecimiento, aunque hay perturbaciones en la función de las permeasas, en el transporte de electrones, en la motilidad y en la quimiotaxis. La fosfatidiletanolamina es un fosfolípido capaz de formar la fase lipídica H_{II} (no-bicapa/hexagonal), y los cationes divalentes interaccionan con la CL para reemplazar a la PE en la formación de esta fase. (Killian *et al.*, 1994; Rietveld *et al.*, 1993; Rietveld *et al.*, 1994). El reemplazo de PE por CL explica que no se pueda introducir un alelo nulo *cls* ni en una estirpe *pss::kan* ni en una *psd::kan* (DeChavigny *et al.*, 1991). Por tanto, la fosfatidiletanolamina es esencial para la regulación polimórfica de la estructura lipídica.

Además de la ruta biosintética de la PS sintasa y la PS descarboxilasa, existe otra forma de sintetizar PE partiendo del lisofosfolípido 2-acilglicerofosfoetanolamina (2-acil-GPE). El 2-acil-GPE proviene de la acción de la fosfolipasa A1, o bien puede ser tomado directamente del medio (Homma *et al.*, 1981; Hsu *et al.*, 1989; Rock, 1984). El 2-acil-GPE se recicla a PE por la acción de la 2-acil-GPE aciltransferasa/acil-ACP

sintasa (el producto del gen *aas*) (Jackowski *et al.*, 1994). Esta enzima fue primero reconocida como una proteína de membrana interna que catalizaba la ligación de ACP a los ácidos grasos en presencia de ATP, Mg^{2+} y altas concentraciones de sales. La enzima contiene ACP como una subunidad unida que actúa como el aceptor del intermediario acilo en la reacción aciltransferasa, y las altas concentraciones de sales se requieren para disociar el acil-ACP intermediario del enzima. Aunque la reacción catalizada por esta acil-ACP sintasa ha resultado ser extremadamente valiosa en la preparación de acil-ACPs que son sustratos para otras enzimas, se cree que la actividad 2-acil-GPE aciltransferasa es la única presente *in vivo*, ya que los ácidos grasos exógenos no son convertidos a derivados acil-ACP que puedan ser utilizados por los enzimas de biosíntesis de ácidos grasos *in vivo*. Mutantes *aas* defectivos tanto en actividad acil-ACP sintasa como en 2-acil-GPE aciltransferasas no acumulan 2-acil-GPE *in vivo* a menos que sean defectivos además en el gen *pldB*, el cual codifica una lisofosfolipasa que representa una segunda ruta para el metabolismo de 2-acil-GPE.

3.2.2. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILGLICEROL (PG)

El primer paso en la síntesis de PG es la condensación de CDP-diacilglicerol con glicerol-3-fosfato (G3P) para formar fosfatidilglicerol fosfato (PGP) reacción llevada a cabo por la PGP sintasa (codificada por *pgsA*). La reacción es análoga a la síntesis de PS y se libera CMP (Figura 14) (Chang y Kennedy, 1967). Se han aislado mutantes de *E. coli* defectivos en la síntesis de PGP (mutantes *pgsA*) que contienen menos del 5% de la actividad PGP sintasa normal *in vitro*; aunque estos mutantes no tienen asociado ningún fenotipo de crecimiento (Nishijima y Raetz, 1979). La inactivación por inserción de un marcador de resistencia a antibiótico (kanamicina) de la PGP sintasa es letal (Heacock y Dowhan, 1987). En una segunda ronda de mutagénesis realizada en los mutantes *pgsA*, se aislaron estirpes sensibles a temperatura que estaban seriamente afectadas en su capacidad de síntesis de PG y que estaban mutadas en un segundo locus, *pgsB* (Nishijima *et al.*, 1981). Un encuentro sorprendente en los dobles mutantes *pgsA pgsB* fue la acumulación de dos nuevos precursores glucolipídicos del lípido A (Nishijima *et al.*, 1981; Takayama *et al.*, 1983). El alelo *pgsB* fue subsecuentemente identificado como una enzima de la biosíntesis del lípido A y ha sido renombrado como *lpxB*. El gen *pgsA* es por tanto el gen estructural para la PGP sintasa que ha sido

clonado en un vector alto numero de copias (pSC101), y cuya secuencia ha sido determinada (Gopalakrishnan *et al.*, 1986). Además, la proteína ha sido purificada a homogeneidad por cromatografía de afinidad en CDP-diacilglicerol-Sefarosa.

El segundo paso en la síntesis de PG es la desfosforilación de PGP catalizada por la PGP fosfatasa (Figura 14). (Icho y Raetz, 1983) aislaron dos genes independientes en *E. coli*, *pgpA* y *pgpB*, que codificaban PGP fosfatasas. Ambos *loci* han sido clonados, y se han determinado sus secuencias. En base al hecho de que *pgpA* codificaba una fosfatasa que específicamente hidrolizaba PGP *in vitro* mientras que la fosfatasa PgpB además hidrolizaba ácido fosfático, se pensó que PgpA era la enzima involucrada directamente en la biosíntesis de PG. Sin embargo, cuando se interrumpen ambos genes en una misma estirpe de *E. coli* (Funk *et al.*, 1992), la síntesis de PG no está afectada aunque las actividades fosfatasas respectivas son muy bajas. Por tanto, ninguna de estas fosfatasas es esencial para la síntesis de PG y queda por descubrir la existencia de al menos otra fosfatasa capaz de operar en la ruta biosintética de PG.

3.2.3. BIOSÍNTESIS DE CARDIOLIPINA (CL)

La CL se produce por la condensación de dos moléculas de PG, por lo que también se conoce como difosfatidilglicerol. Su estructura es única entre los fosfolípidos de membrana ya que posee cuatro cadenas acilo y dos grupos fosfato (Figura 5). Inicialmente, se pensaba que la CL se sintetizaba por la condensación de CDP-diacilglicerol con PG, que es el mecanismo existente en mitocondrias de mamíferos y el que se supone más económico para la célula. Sin embargo, los resultados de una serie de experimentos fisiológicos en *E. coli* indicaban que a diferencia de la síntesis de otros fosfolípidos, la síntesis de CL podía ocurrir bajo condiciones de agotamiento de ATP, mediante la condensación de dos moléculas de fosfatidilglicerol por la acción de la enzima cardiolipina sintasa (Figura 14) (Hirschberg y Kennedy, 1972; Tunaitis y Cronan, Jr., 1973). Este mecanismo que utiliza solo PG como precursor podría ser ventajoso para las células procariotas que tienen que sobrevivir en ambientes más estrictos y variables, ya que el CDP-diacilglicerol se mantiene a niveles bajos y definidos y su síntesis requiere un nuevo aporte de energía. Se sabe que el contenido en CL en membranas aumenta significativamente en fase de

crecimiento estacionaria y bajo condiciones donde el nivel de energía celular es bajo (Hiraoka *et al.*, 1993).

El papel funcional de la CL sintasa fue corroborado por el aislamiento de un mutante (*cls*) deficiente en la síntesis de CL (Pluschke *et al.*, 1978). *E. coli* es capaz de sobrevivir a la disrupción del gen *cls*, aunque las células crecían a una tasa más lenta y a una densidad más baja que las correspondientes células silvestres, indicando que la CL cumple una función en el crecimiento o en la supervivencia. La conclusión de que la CL es un fosfolípido no esencial es complicada porque siempre existe CL residual en los mutantes nulos. El origen de esta CL podría deberse a la actividad de la PS sintasa. Al estudiar de forma individual y combinada los mutantes *cls* y *pss* (deficientes también en la síntesis de PE), se comprobó que el doble mutante tenía niveles más bajos de CL que el mutante *cls* y además era más sensible a la temperatura de crecimiento que *pss*. También se encontró en el mutante *pss* que la síntesis de CL se ve potenciada cuando la síntesis de PE se ve afectada por defectos en *pss* (Shibuya *et al.*, 1985). El alelo nulo *cls* no se puede transferir a mutantes *pss*, sugiriendo que un cierto nivel de CL es esencial para la viabilidad. En *E. coli*, la acumulación de CL y la actividad CL sintasa incrementa cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento, y la CL es el fosfolípido de membrana más estable durante la incubación prolongada en fase estacionaria. Para comprender mejor el mecanismo de cambio dependiente de fase de la actividad cardiolipina sintasa, se estudió la expresión transcripcional del gen *cls*, pero los cambios de expresión eran tan pequeños que no podían explicar los cambios observados en la actividad de la cardiolipina sintasa (Hiraoka *et al.*, 1993).

Los mutantes nulos (*cls*) de *E. coli* pierden viabilidad en la fase estacionaria, apoyando la idea de que la CL es importante para la supervivencia a largo plazo bajo condiciones de ausencia de crecimiento. La sobreexpresión de la CL sintasa, conduce a un aumento de la producción de CL y a una disminución del potencial de membrana y a pérdida de viabilidad. *E. coli* tolera cambios importantes en el contenido total de CL pero la eliminación o sobreproducción de CL provoca desequilibrios fisiológicos importantes.

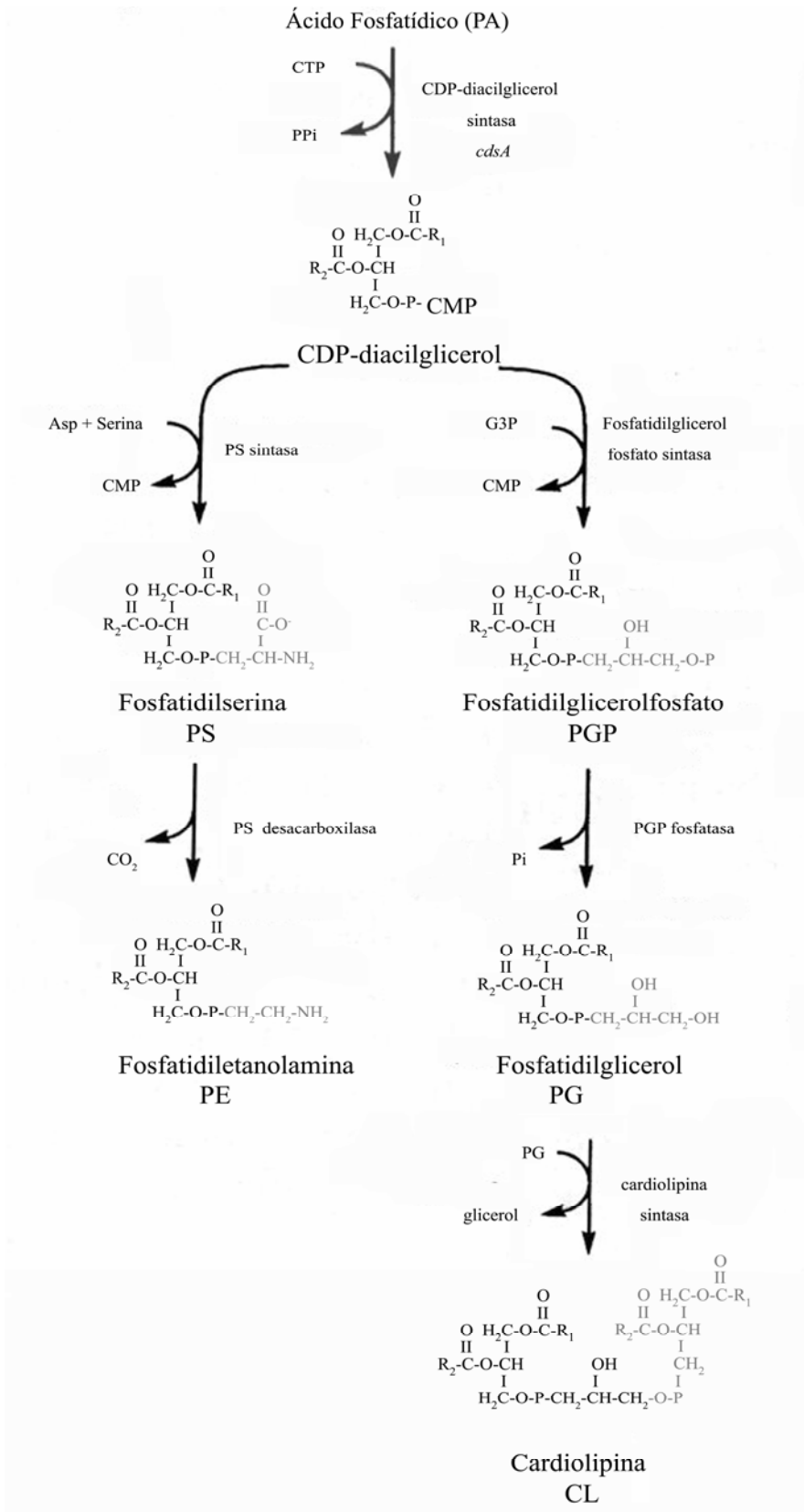


Figura 14. Síntesis de fosfolípidos en bacterias

3. TOPOLOGÍA DE MEMBRANA Y MÉTODOS DE ESTUDIO

El reciente desarrollo de sondas específicas para lípidos ha llevado al descubrimiento de dominios de lípidos en las membranas bacterianas; estos dominios son áreas de membrana que difieren en su composición de lípidos. Esta nueva visión de membrana actualiza el anterior modelo (Singer y Nicolson, 1972) en el que se describía la membrana como un mosaico fluido, donde había homogeneidad de lípidos. Actualmente la formación de estructuras lipídicas complejas en las membranas no se cuestionan, pero surgen muchas preguntas, por ejemplo: ¿cómo se generan y mantienen? o ¿qué función podrían estar desempeñando? Se ha propuesto que las membranas bacterianas contienen un mosaico de microdominios de CL y PE, los cuales están en parte ensamblados ellos mismos de acuerdo con sus respectivas características químicas intrínsecas (Matsumoto *et al.*, 2006).

La distribución lateral heterogénea de los fosfolípidos en las membranas bacterianas se ha estudiado usando distintas aproximaciones. Por ejemplo, se han visualizado dominios ricos en cardiolipina usando con la sonda fluorescente NAO (del inglés *10-N-nonyl-acridine orange*). El modelo del mecanismo de unión de NAO a cardiolipina propone que el grupo nonil de NAO se inserta entre los grupos fosfatos en la superficie hidrofóbica generada por las dos cadenas acilo externas de la cardiolipina (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Así, se han localizado dominios ricos en cardiolipina en el septo y en los polos de células de *E. coli* (Mileykovskaya y Dowhan, 2000). Esta misma localización se observa en células de *B. subtilis* durante el crecimiento exponencial pero no en células con una mutación nula en el gen *clsA* que bloquea la CL sintasa y las células carecen de niveles de CL perceptibles (Kawai *et al.*, 2004). La localización preferencial de CL en los polos de *E. coli* y *B. subtilis* es consecuente con su enriquecimiento en minicélulas, las cuales se forman por división celular aberrante cerca del polo (Koppelman *et al.*, 2001). La fosfatidiletanolamina se puede visualizar con otra sonda denominada Ro (Ro09-0198) (Emoto y Umeda, 2001). En *B. subtilis* la fosfatidiletanolamina se encuentra localizada en el septo de células en fase exponencial, sin embargo en *E. coli* y otras bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas putida*, la señal de fluorescencia se distribuye uniformemente sobre la

superficie celular, sugiriendo que PE está distribuida uniformemente en la membrana. En muchas especies de *Bacillus* la distribución es equivalente a la de *B. subtilis*, por tanto, la distribución de la señal entre bacterias gram positivas y gram negativas es distinta y esto podría significar que la fosfatidiletanolamina juega papeles fisiológicos diferentes en los dos tipos de bacterias.

La localización en el septo de dominios ricos en PE y CL llevó al estudio de la localización subcelular de las enzimas implicadas en la síntesis de estos lípidos. Estas enzimas, descritas anteriormente (sintasas de fosfolípidos) se localizan también de forma mayoritaria en el septo (Nishibori *et al.*, 2005) y parece probable que estén además integradas en complejos proteicos cuya función sea el metabolismo lipídico coordinado. La localización de estas sintasas depende del anillo FtsZ, por tanto, su localización coincide con el ensamblaje de proteínas de división celular y llevaría a la síntesis de fosfolípidos de membrana y peptidoglucano que permitirían la invaginación de la envoltura.

Actualmente se están estudiando las bases químicas que generan los dominios lipídicos. Tanto las interacciones lípidos-lípidos como las interacciones lípidos-proteínas son susceptibles de inducir la formación de estos microdominios. Como ejemplo vamos a describir las propiedades de la cardiolipina que contribuyen a la formación de microdominios lábiles a través de la interacción lípidos-lípidos. La cardiolipina contiene dos ácidos fosfatídicos conectados por un residuo de glicerol, con una unión estrecha y un grupo de cabeza con una configuración pequeña y sólo una carga negativa contrariamente a lo que se muestra en los libros de textos (Haines y Dencher, 2002). Los dos fosfatos en el grupo de cabeza atrapan un protón y quedan en una alineación bicíclica que los coloca juntos unidos por el residuo hidroxilo del glicerol, el cual conecta las dos mitades de la molécula de cardiolipina. Este pequeño grupo de cabeza polar hace que haya un estrecho empaquetamiento de las cadenas acilo hidrofóbicas entre moléculas de cardiolipina por interacciones de fuerzas de van der Waals que se encuentran en lípidos con grupos de cabeza mayores. Se ha sugerido que las interacciones entre grupos de cabeza adyacentes crean un conjunto compacto de

moléculas de cardiolipina, las cuales se ponen de manifiesto en los conjuntos asociados con NAO (Figura 15).

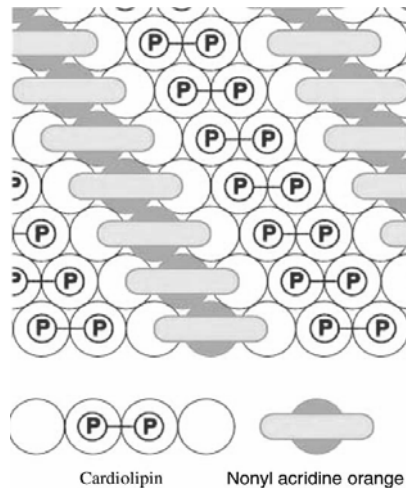


Figura 15. Esquema de la unión

de CL y NAO (Mileykovskaya *et al.*, 2001)

Ciertas proteínas de membrana con afinidad por la cardiolipina podrían además tener un papel en la estabilización de los dominios de cardiolipina. El conjunto de grupos de cabeza formado dentro de los dominios de cardiolipina podría permitir a estas proteínas de membrana unirse específicamente a los mismos. Los dominios ricos en cardiolipina observados de la fluorescencia de NAO en los polos y en el septo podrían ser ricos en tales microdominios estabilizados por proteínas de membrana.

Actualmente se le pueden otorgar varios papeles fisiológicos a los dominios de lípidos. Por ejemplo, la cardiolipina y la fosfatidiletanolamina son propensas a formar estructuras no-bicapa (Dowhan, 1997). Estas estructuras son necesarias en el proceso de división celular y de esporulación, esta última en gram positivas, porque hacen falta para los procesos de fusión y fisión de membranas (Cullis y de Kruijff, 1979). Ésto explicaría la localización en el septo de las sintasas de fosfolípidos que estarían asegurando el abastecimiento de lípidos con la conformación necesaria (Nishibori *et al.*, 2005). También se postula que estos dominios localizados en el septo pueden jugar un papel en la regulación funcional de la maquinaria de división celular y no sólo como formadores de no-bicapa (Weiss, 2004). Por otro lado, también se ha propuesto que la

naturaleza ácida de la cardiolipina puede reclutar proteínas de membrana (DnaA, FtsY, GlpD, PssA y SecA). Los residuos básicos de estas proteínas se asume que interaccionan con la carga negativa de este fosfolípido (Dowhan, 1997; Matsumoto, 2001; Walz *et al.*, 2002).

Otra aproximación diferente que se utiliza para estudiar la membrana es el empleo de sondas que no se unen de forma específica a ningún fosfolípido concreto pero que mimetizan a los lípidos de forma que se insertan en las membranas sin variar su estructura y nos dan información muy valiosa sobre la topología global de las mismas. Estas sondas emiten fluorescencia cuando están embebidas en el ambiente hidrofóbico de la membrana y no cuando se encuentran en ambientes acuosos; tienen la capacidad de emitir luz polarizada con una determinada longitud de onda distinta a la longitud de onda con la que son excitadas, por ejemplo el DPH (1,6 difenil-1,3,5-hexatrieno) tiene como longitud de onda de excitación 358 nm y de emisión 428 nm. El movimiento rotacional de la sonda que depende del estado de la membrana, puede ser medido determinando la despolarización de la luz de excitación. La inserción de una de estas sondas fluorescentes en la membrana citoplasmática de una bacteria no requiere ningún pretratamiento de las células y esto es una inmensa ventaja durante el análisis. La mayoría de las investigaciones sobre membranas citoplasmáticas bacterianas se ha llevado a cabo con DPH para determinar la fluidez de la membrana. Esta sonda se inserta en el corazón de la bicapa y se alinea con las cadenas acilos de los fosfolípidos (Trevors, 2003). La relación entre el valor de polarización de la sonda y la fluidez de la membrana es inversa. En una membrana en estado de gel, la sonda no puede rotar libremente debido a que existen muchas interacciones entre las cadenas acilos. En la membrana líquida-cristalina, las interacciones entre las cadenas acilos son reducidas, permitiendo mayor movimiento de las cadenas y por ello más rotación de la sonda insertada. Cuando la luz polarizada excita la sonda insertada en una membrana fluida, la luz se emite en todas las direcciones ya que la sonda rota. En una membrana en estado de gel, la luz excitada que llega a la sonda retiene su polarización ya que la sonda no puede rotar libremente y por tanto, esta luz retenida puede ser reemitida y medida. Por tanto, la proporción de la polarización retenida por la luz re-emitida es una estimación del estado de la membrana.

(Shinitzky y Barenholz, 1978) describieron la relación que se usa comúnmente para calcular la polarización de la fluorescencia (P): $P = (I_{vv} - I_{hv}G) / (I_{vv} + I_{hv}G)$, donde I_{vv} y I_{hv} son las intensidades de la luz polarizada emitidas en las direcciones perpendicular y paralela con respecto al haz de excitación de la luz, respectivamente. El factor (G) es el factor de corrección para los fotomultiplicadores. Se usa para corregir la sensibilidad diferencial de los fotomultiplicadores a la luz polarizada vertical y horizontalmente. El factor G es la razón entre la luz polarizada vertical y la polarizada horizontal cuando el haz de excitación de luz es polarizado horizontalmente. El factor de corrección es proporcional a la turbidez, y puede ser compensado usando un bajo número de células. La polarización se puede expresar además como el factor de anisotropía.

Como se ha mencionado antes, una limitación importante de la polarización de la fluorescencia es que la despolarización de la sonda solo proporciona datos de la estructura global de la membrana. Efectos específicos localizados sobre los lípidos de membrana no se pueden determinar con este método. Aun así, las sondas fluorescentes de membrana son útiles para obtener información del estado fisiológico de la bacteria bajo una variedad de condiciones ambientales y de crecimiento (Muller *et al.*, 2000). El conocimiento del estado fisiológico de los microorganismos (por ejemplo, durante el crecimiento, el hambre de nutrientes, en la presencia de compuestos antimicrobianos o contaminantes, en un intervalo amplio de temperatura) es especialmente útil en la optimización de procesos biotecnológicos como son el metabolismo microbiano de contaminantes lipofílicos o las fermentaciones microbianas (Kim *et al.*, 2001). La membrana citoplasmática es una estructura celular que refleja el estado celular. Los cambios que llevan a la adaptación de las células y los efectos de los compuestos en la membrana citoplasmática revelan datos extremadamente valiosos.

Otro aspecto que se puede estudiar con sondas fluorescentes es el transporte a través de la membrana. Para ello hay que conocer si el sistema a estudiar transporta la sonda que se va a usar. Un compuesto muy usado para este tipo de experimentos es el bromuro de etidio; esta molécula es débilmente fluorescente en ambientes acuosos pero al unirse con el DNA emite una fuerte fluorescencia; esto hace que podamos medir la acumulación de esta sonda en el citoplasma. Algunas bacterias tienen la capacidad de

expulsar este compuesto de la célula mediante bombas de extrusión; por ejemplo *P. aeruginosa* (Ocaktan *et al.*, 1997) o *P. putida* (Teran *et al.*, 2006). Por tanto, se puede medir la actividad de estas proteínas midiendo la tasa de acumulación de este compuesto en el interior celular. En este tipo de experimento se mide transporte *in vivo* en un espectrofluorímetro como unidades arbitrarias de fluorescencia y cuando se representan frente al tiempo se obtiene una pendiente cuyo valor es una medida de la tasa de acumulación de bromuro de etidio en la célula.

4. EFECTOS DEL ESTRÉS EN LA MEMBRANA

La fluidez de la membrana citoplasmática es un parámetro importante en la homeostasis global de la célula. Las células se adaptan a los estímulos externos alterando la composición de los lípidos de forma que la fluidez de la bicapa permanezca relativamente constante mediante un proceso denominado “adaptación homeoviscosa” (Sinensky, 1974). Las dos cepas de *P. putida* utilizadas en los experimentos de esta Tesis Doctoral son bacterias cuyo hábitat natural es un ambiente cambiante, al cual tienen que adaptarse rápidamente para poder sobrevivir. *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria saprofita del suelo, mientras que *P. putida* DOT-T1E fue aislada originalmente de una planta de tratamientos de aguas residuales urbanas. La rápida adaptación a estos ambientes cambiantes dependerá en gran medida de la respuesta de las mismas. Si tenemos en cuenta que la membrana bacteriana es la primera diana de muchos de los estreses naturales (por ejemplo desecación, cambios de temperatura, presencia de tóxicos orgánicos, etc.), comprenderemos que el estudio de las alteraciones que se producen en los distintos componentes de la membrana en respuesta a estreses ambientales es fundamental para el entendimiento de la fisiología bacteriana. Los mecanismos de adaptación estudiados hasta el momento, y que implican la modificación en la composición de fosfolípidos pueden incluir: i) cambios en el grado de saturación global de los ácidos grasos, ii) formación de ácidos grasos ciclopropanos, iii) isomerización de *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados y iv) modificación de los grupos de cabeza de los fosfolípidos (Hartig *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 1997; Sikkema *et al.*, 1995; Weber y de Bont, 1996). Se ha observado aumento de los ácidos grasos saturados en respuesta a calor (Loffhagen *et al.*, 2002) y disolventes orgánicos

(Pinkart *et al.*, 1996). La síntesis de ácidos grasos ciclopropanos es uno de los factores principales en la resistencia a estrés ácido en *Escherichia coli* (Chang y Cronan, Jr., 1999) y como se verá en este trabajo de Tesis Doctoral es importante en la resistencia a desecación inducida por liofilización en *P. putida* KT2440 (Munoz-Rojas *et al.*, 2006). Hasta ahora se ha descrito el aumento de los isómeros *trans* en respuesta a calor, disolventes orgánicos y otros estreses en diferentes especies de *Pseudomonas* (Heipieper *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 2003; Junker y Ramos, 1999; Loffhagen *et al.*, 2002; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1994).

Al contrario que el papel relativamente bien definido de los cambios producidos en los ácidos grasos de los fosfolípidos en respuesta a estrés, existe poca información sobre la función fisiológica de los grupos de cabeza, tanto en condiciones normales como de estrés. Únicamente se han propuesto varios papeles para la cardiolipina en respuesta a estrés inducido por calor, alto contenido en sales o disolventes orgánicos (Lopez *et al.*, 2006; Shibuya *et al.*, 1985; von Wallbrunn *et al.*, 2002).

Además de todos estos mecanismos de adaptación a nivel de lípidos de membrana, los microorganismos han desarrollado a lo largo de la evolución estrategias adicionales para protegerse de los compuestos inhibidores del medio circundante, como los mecanismos de resistencia activa (por ejemplo, degradando el inhibidor o inactivándolo por modificación enzimática) o más importantes aún los sistemas de extrusión activa de drogas. Entre estos últimos, destacan los que actúan sobre una amplia gama de compuestos (por ejemplo, AcrAB-TolC de *E. coli*, MexAB-OprM de *P. aeruginosa* o los sistemas Ttg de *P. putida* DOT-T1E). Los sistemas de extrusión suelen constar de tres componentes: un transportador de membrana interna, un canal de membrana externa y una proteína accesoria que conecta ambas estructuras a través del periplasma, posibilitando así la salida del compuesto tóxico directamente al exterior celular (Nikaido, 1996). Muchos de los sistemas más estudiados en relación a la extrusión de sustancias tóxicas pertenecen a la familia RND (Resistencia, Nodulación y División Celular). Entre ellos destacamos las bombas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E (revisado en (Ramos *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2004), por su implicación en la tolerancia a disolventes orgánicos, una de las características más

relevantes de esta cepa que ha sido utilizada durante la realización de esta Tesis Doctoral.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio de las modificaciones que se producen en las membranas de bacterias del género *Pseudomonas* en respuesta a diversos factores ambientales.

Las cepas de *Pseudomonas putida* utilizadas en esta Tesis Doctoral son de gran interés por su posible aplicación en distintos procesos biotecnológicos. *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria saprofita del suelo que coloniza las raíces de plantas y puede estimular el crecimiento de las mismas. Además tiene la capacidad de mineralizar muchos compuestos aromáticos y diversos xenobióticos. Estas características hacen que esta cepa sea de enorme interés agro-industrial para llevar a cabo procesos de biorremediación de zonas contaminadas y fitoestimulación de cultivos de interés agrícola. El potencial de esta cepa para fines agrobiotecnológicos hace que el estudio de la conservación a largo plazo de esta cepa en condiciones óptimas sea crítica a la hora de ser explotada comercialmente. Por otro lado, *Pseudomonas putida* DOT-T1E es una bacteria resistente a disolventes orgánicos aislada en el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos en Granada (Ramos *et al.*, 1995). Conocer las bases moleculares de la tolerancia a disolventes orgánicos es fundamental para usar estos microorganismos en procesos de biorremediación y biotransformaciones en sistemas de dos fases. En trabajos anteriores, Ramos y colaboradores (1997) describieron cómo los niveles de cardiolipina aumentaban en células que estaban creciendo en presencia de tolueno y en un trabajo posterior, Junker y Ramos (1999) describieron el papel de la isomerización *cis-trans* en respuesta a tolueno.

Con estos antecedentes, el objetivo general se subdividió en tres objetivos concretos:

- 1.- Estudio de los cambios que se producían en las membranas en respuesta a liofilización; estudio del efecto en la supervivencia tras liofilización de las distintas condiciones de crecimiento, de las distintas fases de crecimiento y de los distintos lioprotectores.

2. Objetivos

2.- Estudio del papel fisiológico de la cardiolipina sintasa en distintas condiciones de crecimiento y en respuesta a distintos estreses.

3.- Estudio de la expresión de los genes que codifican la cardiolipina sintasa (*cls*) y la *cis-trans* isomerasa (*cti*) en condiciones normales y de estrés. Así como la posible cooperatividad de la cardiolipina y los ácidos grasos insaturados en la respuesta celular frente a estrés por tolueno.

RESULTADOS

Capítulo 1

Participación de los ácidos grasos ciclopropanos de *Pseudomonas putida* KT2440 en respuesta a liofilización

Patricia Bernal, Jesús Muñoz-Rojas, Estrella Duque, Patricia Godoy, Ana Segura, y Juan Luís Ramos

Appl Environ Microbiol 2006 Enero **72**(1):472-477

Resumen

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria saprofítica del suelo que coloniza las raíces de plantas, es un microorganismo adecuado para la eliminación de contaminantes y es un huésped estable para genes foráneos usados en procesos de biotransformación. Debido a su potencial uso en la agricultura y en la industria, investigamos las condiciones para la conservación óptima de la estirpe y sus derivados en almacenamientos a largo plazo. La tasa mayor de supervivencia se encontró en células que han alcanzado la fase de crecimiento estacionaria y que han sufrido el proceso de liofilización en presencia de disacáridos (trehalosa, maltosa y lactosa) como lioprotectores. Usando técnicas de polarización de la fluorescencia vimos como las membranas de células de KT2440 eran más rígidas en fase estacionaria de crecimiento que en fase exponencial. Esto era consistente con el hecho de que las células creciendo en fase estacionaria tenían una mayor proporción del ácido graso C17:ciclopropano que las células en fase exponencial. Se construyeron mutantes del gen *cfaB* que codifica la principal sintasa de ácidos grasos ciclopropanos y del gen *cfaA* que codifica para una ciclopropano sintasa minoritaria. Estos mutantes eran más sensibles a liofilización que las células de la estirpe silvestre, sobre todo el mutante nulo en el gen *cfaB* que producía menos del 2% del total de C17:ciclopropano que se producía en la estirpe parental.

Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying

Jesús Muñoz-Rojas,† Patricia Bernal,† Estrella Duque, Patricia Godoy, Ana Segura, and Juan-Luis Ramos*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Estación Experimental del Zaidín, Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

Received 20 June 2005/Accepted 28 September 2005

Pseudomonas putida KT2440, a saprophytic soil bacterium that colonizes the plant root, is a suitable microorganism for the removal of pollutants and a stable host for foreign genes used in biotransformation processes. Because of its potential use in agriculture and industry, we investigated the conditions for the optimal preservation of the strain and its derivatives for long-term storage. The highest survival rates were achieved with cells that had reached the stationary phase and which had been subjected to freeze-drying in the presence of disaccharides (trehalose, maltose, and lactose) as lyoprotectants. Using fluorescence polarization techniques, we show that cell membranes of KT2440 were more rigid in the stationary phase than in the exponential phase of growth. This is consistent with the fact that cells grown in the stationary phase exhibited a higher proportion of C_{17:cyclopropane} as a fatty acid than cells in the exponential phase. Mutants for the *cfaB* gene, which encodes the main C_{17:cyclopropane} synthase, and for the *cfaA* gene, which encodes a minor C_{17:cyclopropane} synthase, were constructed. These mutants were more sensitive to freeze-drying than wild-type cells, particularly the mutant with a knockout in the *cfaB* gene that produced less than 2% of the amount of C_{17:cyclopropane} produced by the parental strain.

Pseudomonas putida KT2440 is a well-characterized saprophytic member of the family *Pseudomonaceae* (38) certified by the National Institutes of Health as a secure host for foreign gene cloning (3). This microorganism uses a number of aromatic compounds, amino acids, and organic acids as carbon and energy sources (2, 34, 39), and it is able to adhere to abiotic and biotic surfaces, being an excellent colonizer of the plant roots (26). The complete genome sequence of *P. putida* KT2440 (27) reveals its nonpathogenic nature and also its potential for applications in agriculture, biocatalysis, bioremediation, and bioplastic production (19, 27, 30).

The availability of complete genome sequences facilitates research with genomics and proteomics, although many of these studies require a collection of mutants large enough to establish unequivocal gene and function relationships to identify regulons and to determine the hierarchy in transcriptional processes. We have constructed an ordered bank of mutants of *P. putida* (E. Duque [www.artemisa.eez.csic.es]) to facilitate detailed functional genomic studies of this microorganism. Long-term storage conservation of the mutant collection is of critical importance. Freezing at -80°C is frequently used for high-throughput analyses and to search for defined phenotypes. However, lyophilization is the most appropriate method for the long-term preservation of the clones. Lyophilization involves the use of lyoprotectants and myoinositol has been used with gram-negative bacteria in general (13, 29, 37) and with *Pseudomonas* in particular (E. Duque, unpublished re-

sults). However, upon lyophilization of *P. putida* KT2440, the recovery rate is on the order of 1 out of 10^4 original cells. To improve survival after lyophilization, we explored here the effect of growth conditions, growth phase, and the nature of lyoprotectants on the lyophilization of *P. putida* KT2440.

Our results indicated that survival of the strain was influenced by the bacterial growth phase and by the type and concentration of lyoprotectants used. We found that growth conditions that result in an increase in the relative amount of C_{17:cyclopropane} fatty acid yielded better survival after lyophilization and that of the compounds we tested trehalose was the best lyoprotectant. We identified *cfaB* as the gene that encodes the major C_{17:cyclopropane} synthase in KT2440 and generated a *cfaB* mutant which, in consonance with the low C_{17:cyclopropane} levels, exhibited reduced survival rates after lyophilization.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The strains and plasmids used in the present study are listed in Table 1. Bacterial cells were grown at 30°C in a Kühner orbital shaker operated at 200 rpm in LB medium or M9 minimal medium containing 20 mM concentrations of different carbon sources (benzoate, choline, citrate, fructose, glucose, proline, and sucrose) (26).

Lyophilization of *P. putida* KT2440. *P. putida* KT2440 cells were grown until the desired turbidity, and then bacterial cells were harvested by centrifugation ($7,500 \times g$ for 10 min), washed twice with phosphate buffer, and resuspended in 30 ml of a lyoprotectant solution. Before the cells were freeze-dried the number of viable cells was counted in triplicate by spreading serial dilutions in LB solid medium. Different compounds were used as lyoprotectants, i.e., amino acids, disaccharides, monosaccharides, polyalcohols, and skimmed milk (Table 2). Sterile ampoules were filled with 500 μl of the bacterial suspension containing the lyoprotectant and covered with sterile cotton placed in the middle part of the ampoule. Ampoules with the bacterial suspension were first frozen at -20°C for 20 min and then submerged in liquid nitrogen. Subsequently, the freeze-drying process was carried out in a Virtis lyophilizer at 30 mtorr for 48 h. After the process, the ampoules were sealed under vacuum. At least three ampoules were used to determine the number of viable cells after lyophilization. To this end, 500

* Corresponding author. Mailing address: Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Prof. Albareda 1, 18008 Granada, Spain. Phone: 34 958 181608. Fax: 34 958 135740. E-mail: jramos@eez.csic.es.

† J.M.-R. and P.B. contributed equally to this study.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study^a

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^b	Source or reference
Strains		
<i>P. putida</i> KT2440		
Wild type	Prototrophic	27
RpoS	<i>rpoS::miniTn5::lux</i>	36
<i>cfaA</i> mutant	Mutant in <i>cfaA</i> inactivated by a Km cassette	This study
<i>cfaB</i> mutant	Mutant in <i>cfaB</i> inactivated by a Gm cassette	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>recA</i> ; host for cloning	18
CC118 λ pir	Rif ^r ; host for pKNG101 plasmid and its derivatives	18
Plasmids		
pKNG101	Sm ^r	20
pUC18Not	Ap ^r ; cloning vector	18
pRK600	Cm ^r ; helper plasmid	18
pUK18	Ap ^r Km ^r ; source of the Km ^r cassette	25
pMS265	Ap ^r Gm ^r ; source of the Gm ^r cassette	4
pKNG101cfaAKm	Sm ^r Km ^r	This study
pKNG101cfaBGm	Sm ^r Gm ^r	This study
pUcfaA	Ap ^r ; pUC18Not derivative bearing <i>cfaA</i>	This study
pUcfaB	Ap ^r ; pUC18Not derivative bearing <i>cfaB</i>	This study
pUcfaAKm	Ap ^r Km ^r	This study
pUcfaBGm	Ap ^r Gm ^r	This study

^a All mutant strains have been deposited in the *P. putida* reference culture collection and can be obtained from E. Duque.

^b Rif^r, rifampin resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Ap^r, ampicillin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance; Km^r, kanamycin resistance.

μ l of M9 buffer solution was added to cells, and after 40 min, with occasional shaking, rehydration was achieved. Bacterial cells were serially diluted and viable cells counted on LB plates.

The bacterial survival ratio (BSR) is reported as the ratio of the log of the number of bacterial cells present in the suspension after lyophilization (AL) to the log number of viable cells before lyophilization (BL) multiplied by 100, i.e., $BSR = (\log_{10} AL / \log_{10} BL) \times 100$.

Analysis of fatty acid profile. *P. putida* KT2440 cells were grown for different periods of time and phospholipids were extracted by the method of Bligh and Dyer (5). To measure fatty acids, phospholipids were transesterified, and methyl ester derivatives were identified by mass spectrometry after gas chromatographic separation as described previously (35).

Membrane fluidity determinations. Membrane fluidity was determined by measuring the fluorescence polarization of the probe DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) inserted into the cytoplasmic membranes. Cells in two different growth phases were harvested by centrifugation (10,000 $\times g$ for 1 min), washed in sterile 15 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), and resuspended in same buffer to a turbidity at 660 nm of 0.2. Then, 1 μ l of the fluorescent membrane probe (12 mM stock solution in tetrahydrofuran) was added to 3 ml of the resuspended culture in a quartz cuvette to obtain a final concentration of 4 μ M and incubated with a magnetic stirring at 200 rpm for 10 min in the dark at 30°C to allow probe incorporation into the cytoplasmic membrane (43). Fluorescence polarization was measured by using a spectrofluorimeter (Photon Technology International, Inc.) equipped with a thermostated stabilized cell cuvette holder and a cuvette stirrer. The excitation wavelength for the DPH probe was 358 nm, and the emission wavelength was 428 nm. The slit width for the excitation and emission beams was 12 and 10 nm, respectively. The intensities parallel (I_{V_V}) and perpendicular (I_{V_H}) to the vertically polarized excitation beam were recorded and the degree of polarization (P) calculated from the intensity measurements with the equation $P = (I_{V_V} - I_{V_H}) / (I_{V_V} + I_{V_H})$, where G was the correlation factor for instrument polarization. G values were calculated as the ratio of

vertical to horizontal measurements when the excitation light was polarized horizontally; the higher the value of polarization, the lower the membrane fluidity. Values were analyzed by using the FELIX (PTI) software program (43).

Construction of *cfaA*- and *cfaB*-null mutants of *P. putida* by gene replacement. The original annotation of the *P. putida* KT2440 genome identified two potential open reading frames encoding C₁₇:cyclopropane synthase (PP2734 and PP5365). These enzymes have been named CFA-A and CFA-B based on our work. Mutants of *P. putida* KT2440 with knockouts in the *cfaA* and *cfaB* genes were constructed by reverse genetic procedures. All plasmids for allelic replacements were based on the pKNG101 suicide vector and are listed in Table 1. Plasmids pKNG101cfaAKm and pKNG101cfaBGm bear truncated *cfaA* and *cfaB* alleles that were marked with kanamycin (Km) and gentamicin (Gm), respectively. *Escherichia coli* CC118 λ pir (pKNG101cfaAKm) was mated with *P. putida* KT2440 in the presence of the helper *E. coli* HB101(pRK600). *Pseudomonas putida* KT2440 transconjugants were selected on M9 minimal medium with benzoate as the carbon source and Km. The nature of the cointegration event was confirmed by PCR. A random clone was chosen and grown on LB without Sm for 20 generations. Then cells were spread on LB Km plates supplemented with 7% (wt/vol) of sucrose. Among the sucrose-resistant clones we searched for the Sm-sensitive ones as putative resolved clones. Several such clones were found, and upon confirmation of gene replacement by Southern blot a random clone was retained for further assays. This mutant strain was called KT2440-*cfaA*.

To construct KT2440 derivatives with a knockout in *cfaB*, we proceeded as described above except that we used pKNGcfaBGm to generate a chromosomal knockout in *cfaB*. A single mutant clone, KT2440-*cfaB* was retained for further work.

Statistical analysis. Data for different experiments were compared by using the Student *t* test.

RESULTS

Disaccharides as lyoprotectants for *P. putida* KT2440. To select lyoprotectants that conferred high survival to *P. putida* KT2440 cells after freeze-drying, we tested the disaccharides, monosaccharides, polyalcohols, amino acids, and complex mixtures shown in Table 2 at the indicated concentrations. In this series of assays *P. putida* KT2440 cultures were grown in LB medium until the mid-exponential phase, when the cell density was ca. 10⁸ CFU/ml. Aliquots of 5 ml were harvested by centrifugation, and cells were suspended in 5 ml of the indicated lyoprotectant. Before and after lyophilization the number of

TABLE 2. Effect of different lyoprotectants on the survival of *P. putida* KT2440 upon lyophilization

Compound	Concn (μ M [or %])	Characteristic	Mean BSR (SD)
Lactose	0.20	Disaccharide	80.35 (1.63)
Maltose	0.20	Disaccharide	83.73 (1.18)
Sucrose	0.20	Disaccharide	78.03 (2.16)
Trehalose	0.13	Disaccharide	83.72 (1.51)
Fructose	0.20	Monosaccharide	65.32 (5.79)
Galactose	0.20	Monosaccharide	69.80 (3.83)
Glucose	0.20	Monosaccharide	67.80 (2.11)
Manose	0.20	Monosaccharide	71.68 (1.70)
Manitol	0.20	Polyalcohol	42.34 (6.76)
Myoinositol	0.27 (5%)	Polyalcohol	27.92 (4.77)
Sorbitol	0.27	Polyalcohol	61.69 (1.31)
Citrate	0.25	Tricarboxylic acid	41.82 (5.39)
Betaine	0.2	Amino acid	38.33 (6.20)
Glycine	0.2	Amino acid	23.23 (4.89)
Lysine	0.2	Amino acid	30.92 (1.08)
Proline	0.2	Amino acid	40.04 (4.77)
LB medium		Complex mixture	56.04 (5.81)
Skimmed milk	(20%)	Complex mixture	67.01 (1.83)

^a The BSR is the ratio (log CFU/ml after freeze-dry/log CFU/ml before freeze-dry) \times 100. Each value represents the average of five independent determinations.

TABLE 3. BSR of *P. putida* KT2440 at different growth phases^a

Lyoprotectant	Mean BSR (SD) at:		
	Exponential (early) phase	Exponential (late) phase	Late stationary phase
Myoinositol	12.21 (8.00)	22.55 (7.5)	47.18 (2.00)
Trehalose	62.44 (5.0)	78.46 (5.0)	90.15 (1.50)

^a *P. putida* KT2440 was grown on LB overnight. The culture was then diluted 100-fold. When it reached a turbidity at 660 nm of about 0.6 (early exponential phase), 1.2 (late exponential phase), or 4 (late stationary phase), aliquots were lyophilized with myoinositol or trehalose as the lyoprotectant.

viable cells was counted to estimate the BSR, as described in Materials and Methods. In general, we found that disaccharides were better lyoprotectants (BSR values of ca. 80) than monosaccharides (BSR values of ca. 68) and that these latter were better than polyalcohols, organic acids, LB, and amino acids. It should be noted that skimmed milk yielded a survival rate similar to that obtained with monosaccharides.

Effect of culture conditions and growth phase on the survival of *P. putida* KT2440 upon lyophilization. For the following series of assays we used two different lyoprotectants: trehalose, which gave a high BSR under our experimental conditions, and myoinositol, a lyoprotectant often used to freeze-dry microorganisms (13, 29). First, cells were grown in rich LB medium overnight and then diluted 100-fold in fresh LB medium, and the number of viable cells was determined at the early and late exponential phases and at the stationary phase. At these times aliquots of cultures were withdrawn and freeze-dried, and the BSR was determined. We found that regardless of the growth phase, the BSR was higher with trehalose than with myoinositol and that BSR was higher in cells that had reached the stationary phase than in cells in the exponential phase (Table 3).

We carried out assays similar to those described above but with cells grown in M9 minimal medium with different C sources, namely, betaine, benzoate, citrate, glucose, proline, and sucrose. We also found that, in general, survival was greater in cells that had reached the stationary phase than in cells in the exponential phase (not shown).

In our laboratory it has been a frequent practice to use solid LB or solid M9 minimal medium with citrate to grow cells for freeze-drying. We used 24-h-old plates that had been kept at 30°C and suspended cells for freeze-drying with trehalose or myoinositol. With trehalose the mean BSR value was 91 ± 3 , and with myoinositol the mean value was 48 ± 1 .

Regardless of how bacteria had been grown (liquid or solid medium) and whether cells were grown on rich or minimal medium, freeze-dried cells were stored under vacuum in the dark at 18 to 22°C. We found that survival decreased slightly with time and after 1 year the BSR of stored cells declined from 90 ± 2 to 80 ± 3 .

Why do cells in the stationary phase survive better than cells in the exponential growth phase? The results described above suggested that culture conditions and the physiological state of *P. putida* cells notably influenced tolerance to the freeze-drying process, a finding that may be related to changes in the properties of the membranes with growth. We tested membrane fluidity of *P. putida* by determining the polarization value (P) in cells that had been grown on citrate as a carbon source or LB and that had reached the exponential or the

stationary phase. Polarization values were significantly higher in cells in the stationary phase (0.313 ± 0.007) than in the exponential phase (0.288 ± 0.010), indicating that the membranes of *P. putida* were more rigid in the stationary phase than in the exponential growth phase. Membrane fluidity can be influenced by the composition of phospholipids. We reported before that the fatty acid composition of *P. putida* varied according to the growth phase. Ramos et al. (35) found that cells grown in LB medium to the exponential phase exhibited low levels of C_{17:cyclopropane} (the most abundant cyclopropane fatty acid [CFA] found in *P. putida*), whereas CFA levels were high in the stationary phase. To test this potential correlation, we determined the fatty acid profile in cells growing on LB and M9 minimal media with citrate. In agreement with previous observations, C_{17:cyclopropane} levels were higher in cells that had reached the stationary phase in M9 with citrate or LB. Concomitantly with the increase in C_{17:cyclopropane}, we noted an increase in BSR (Table 4).

Survival of mutants deficient in the synthesis of C_{17:cyclopropane} in *P. putida* KT2440 upon freeze-drying. To gain further insight into the potential role of CFA in freeze-drying we generated mutants in the synthesis of C_{17:cyclopropane}. In gram-negative bacteria C_{17:cyclopropane} is made from C_{16:1cis} in a reaction catalyzed by CFA synthases (9). The genome of KT2440 had been sequenced previously and two potential CFA synthase genes were annotated (27). These genes are called *cfaA* and *cfaB* here, and their translated products corresponded to PP2734 and PP5365, respectively. We inactivated each of the genes by using *cfaA*:Km and *cfaB*:Gm mutant alleles and used them to generate each of the single mutants by allelic exchange.

We analyzed C_{17:cyclopropane} levels in the mutant strains growing on citrate when cells had reached the exponential and the stationary phase. In the mutant strains C_{17:cyclopropane} in the exponential phase was negligible, whereas in the stationary phase the level of C_{17:cyclopropane} in the *cfaA* mutant was 20% of the total fatty acids versus ca. 30% in the wild type. Surprisingly, in the *cfaB* mutant C_{17:cyclopropane} level in the stationary phase was less than 0.2% in LB, and it was not detected in cells grown on citrate as the sole carbon source (Table 5). We measured polarization values with the *P. putida* CFA-deficient strain and found that P values in the exponential and stationary

TABLE 4. Fatty acid profiles from *P. putida* KT2440 cells grown in different media and at different growth stages

Lipid	Mean % \pm SD ^a			
	Exponential phase		Stationary phase	
	Citrate	LB	Citrate	LB
C _{14:0}	2.65 \pm 0.28	1.77 \pm 0.20	1.38 \pm 0.11	2.09 \pm 0.43
C _{15:0}	ND	0.06 \pm 0.05	ND	0.81 \pm 0.02
C _{16:1,9cis}	10.48 \pm 1.31	23.74 \pm 1.93	0.42 \pm 0.19	3.09 \pm 0.53
C _{16:1,9trans}	4.66 \pm 0.30	6.47 \pm 0.56	1.81 \pm 0.8	1.24 \pm 0.43
C _{16:0}	31.53 \pm 0.68	35.45 \pm 2.79	42.61 \pm 0.91	33.22 \pm 0.27
C _{17:cyclopropane}	0.71 \pm 0.16	4.96 \pm 0.64	30.05 \pm 0.46	33.21 \pm 1.19
C _{17:0}	0.44 \pm 0.04	0.31 \pm 0.09	0.70 \pm 0.49	0.75 \pm 0.03
C _{18:1,11cis}	11.75 \pm 1.77	14.55 \pm 0.83	6.30 \pm 0.58	14.11 \pm 0.74
C _{18:1,11trans}	0.91 \pm 0.15	0.81 \pm 0.06	ND	1.04 \pm 0.26
C _{18:0}	36.84 \pm 3.28	11.88 \pm 6.13	10.24 \pm 1.26	6.89 \pm 0.40
C _{19:cyclopropane}	ND	ND	6.50 \pm 0.87	4.15 \pm 0.82
BSR	66.67 \pm 2.88	79.23 \pm 0.98	92.07 \pm 2.20	91.28 \pm 1.50

^a Each value represents the average of three repetitions from independent experiments. BSR values are shown at the bottom of the table. ND, not detected.

TABLE 5. BSR and levels of C_{17:cyclopropane} in *P. putida* KT2440 and several isogenic mutant strains

<i>P. putida</i> strain	Mean % (SD) ^a			
	Level of C _{17:cyclopropane} at:		BSR at:	
	Exponential phase	Stationary phase	Exponential phase	Stationary phase
KT2440	0.5 (0.2)	30.7 (1.5)	68.5 (2.21)	91.83 (1.63)
<i>cfaA</i> mutant	0.1 (0.1)	20.2 (3.60)	64.94 (6.3)	85.31 (1.23)
<i>cfaB</i> mutant	ND	ND	58.94 (5.3)	70.55 (1.60)
<i>ropS</i> (miniTn5: <i>lux</i>) mutant	0.1 (0.1)	7.0 (1.0)	66.48 (2.7)	73.39 (1.99)

^a Each value represents the average of three repetitions from independent experiments. Cells were grown in M9 minimal medium with 20 mM citrate. The turbidity of the cultures in the exponential phase was around 0.3 ± 0.05 at 660 nm, whereas in the stationary phase the turbidity at 660 nm was 2.5 ± 0.2 . ND, not detected.

phase were similar to those observed for the wild type. In this mutant strain the increase in rigidity observed could be due to a fivefold increase in the levels of C_{16:1trans} (not shown). We calculated the BSR of each strain with a mutation in the *cfa* genes, in cells in the exponential and stationary phase. For the *cfaB* mutant, regardless of the growth phase, BSR values were much lower than those of the parental strain. For the *cfaA* mutant in the exponential phase, the BSR values were similar to those of the wild-type strain; however, when cells reached the stationary phase the values were slightly lower (Table 5). It then follows that BSR values correlate well with C_{17:cyclopropane} levels.

In *E. coli* *cfa* transcription is mediated by the *ropS* sigma factor when cells reach the stationary phase (11, 45). This also seems to be the case in KT2440 (P. Bernal et al., unpublished). We tested CFA levels in an *ropS* KT2440 mutant background and found that the *ropS* mutant produced very small amounts of C_{17:cyclopropane} in the stationary phase and that its BSR values were concomitantly lower than those of the wild-type strain.

DISCUSSION

Freeze-drying is the method often used for the preservation and long-term storage of bacterial cells (29); however, it has negative effects on the viability of many cell types (24). It is known that lyophilization of bacteria results in the loss of viability during the process (32) and that such loss is influenced by the lyoprotectant used (12, 22, 44), the initial cell density (8, 28), and the physiological state of the cells (6, 13). Several compounds and mixtures were used as lyoprotectants for *P. putida* KT2440 in the present study. We found that viability was affected to a certain extent under all conditions compared here but that disaccharides, e.g., trehalose, maltose, and lactose, were the best lyoprotectants. This finding is in agreement with observations reported in experiments with other microorganisms (*Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, and *Pseudomonas chlororaphis*) that were protected during lyophilization by disaccharides (22, 23, 28). The molecular mechanism behind the protective effect of disaccharides during freeze-drying is unknown, although it has been suggested that these chemicals

protect membrane integrity by replacing water molecules in the membrane during the freeze-drying process (23).

With disaccharides as lyoprotectants for *P. putida* KT2440, we observed that survival was notably influenced by the physiological state of bacteria. In particular, cells in the stationary phase survived better than those in the exponential phase. In the stationary phase bacteria accumulate compatible solutes (21, 31, 40) and produced stress proteins under carbon starvation conditions (17, 28). We cannot rule out these possibilities of protecting the cells against damage during lyophilization; nevertheless, we suggest that membrane alterations are the main factor responsible for the increase in BSR. We found that the increase in BSR in the stationary phase correlated with an increase in C_{17:cyclopropane} levels. The presence of high levels of C_{17:cyclopropane} in the stationary phase are in agreement with a recent report by Härtig et al. (16), although we have noticed higher levels of C_{18:0} in the same strain under the growth conditions we used. Cyclopropane fatty acids seem to stabilize membrane lipids against turnover and degradation (23). Several reports have indicated that CFAs are involved in stress tolerance.

Zhao et al. (47) reported that overexpression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase in *Clostridium* sp. influenced butanol resistance and in *E. coli* and *Streptococcus* sp. CFAs were said to be involved in acid stress since *E. coli* *cfa* mutants were shown to be more sensitive to stress (7, 33). In *E. coli* CFA deficiency also led to increased sensitivity to recurring freeze-thaw cycles (42). *Azotobacter vinelandii* synthesizes C_{17:cyclopropane} fatty acid during differentiation into cysts as a mechanism of resistance to water and other environmental stresses (41). It seems then that under certain conditions CFA can function as a resistance barrier against environmental stresses. We reasoned that if C_{17:cyclopropane} fatty acid was involved in increased tolerance to lyophilization in *P. putida*, mutants deficient in the synthesis of C_{17:cyclopropane} fatty acids should be less tolerant to freeze-drying than wild-type cells. First, we showed that single mutants in *cfaA* or *cfaB* grew as fast as the wild type in LB rich medium. We then tested the mutants' response to lyophilization. Our finding that the single *cfaB* mutant, which produced very low levels of C_{17:cyclopropane}, was hypersensitive to lyophilization even when it reached the stationary phase of growth on LB medium, supports a role of this fatty acid in tolerance to lyophilization. The *cfaA* single mutant that synthesized ca. 66% of the total C_{17:cyclopropane} fatty acid produced by the wild type was more sensitive than the parental strain to lyophilization but much more resistant than the *cfaB* mutant. The increased resistance to freeze-drying offered by C_{17:cyclopropane} fatty acid can be interpreted as evidence for its role in the alteration of the membrane's chemical properties. This is in consonance with the increased resistance of CFA to ozonolysis, singlet oxygen, and mild oxidative treatments (14, 15).

In *P. putida* CFA synthesis occurred in the stationary phase, and expression of *cfa* genes seems to be mediated by the RpoS sigma factor. This was suggested by the finding that an *ropS* knockout mutant produced very low levels of CFA. In consonance with the low levels of C_{17:cyclopropane} fatty acids, the RpoS mutant was also hypersensitive to lyophilization. In *E. coli* the expression of the *cfa* genes is influenced not only by RpoS but also by the Crp and Fur proteins (46). Under our

growth conditions a role for iron in CFA synthesis can be ruled out, since KT2440 was grown in iron-rich medium, and no iron siderophores were detected in the medium. Catabolite repression might play a role in *cfb* gene expression, but in *P. putida* the intimate mechanisms of catabolite repression have not been elucidated (1, 10). In the near future we plan to perform detailed transcriptional studies of *cfb* synthesis in different genetic backgrounds.

In short, our results indicate that cyclopropane fatty acids are important in *P. putida* KT2440 for survival in freeze-drying processes and that the highest survival rates in this strain are achieved with disaccharides as lyoprotectants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the CICYT (BIO-2003-00515) and a grant from the European Commission (BIOCARTÉ QLK3-CT-2002-1923). J.M.-R. was the recipient of a postdoctoral fellowship of the "Cátedra Volante" program from Banco de Santander-Central-Hispano/CSIC. P.B. is the recipient of an I3P fellowship.

We thank Carmen Lorente for secretarial assistance and Karen Shashok for improving the English in the manuscript.

REFERENCES

- Aranda-Olmedo, I., J. L. Ramos, and S. Marqués. 2005. Integration of signals through the PTS and CRC systems in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4191–4198.
- Arias-Barrau, E., E. R. Olivera, J. M. Luengo, C. Fernández, B. Galan, J. L. García, E. Díaz, and B. Miñambres. 2004. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **186**:5062–5077.
- Bagdasarian, M. M., and K. N. Timmis. 1982. Host: vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **96**:47–67.
- Becker, A., M. Schmidt, W. Jäger, and A. Pühler. 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**:37–39.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911–917.
- Broadbent, J. R., and C. Lin. 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* **39**:88–102.
- Chang, Y. Y., and J. E. Cronan, Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:249–259.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixido, N. García, and I. Viñas. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* **89**:793–800.
- Cronan, Jr., J. E., R. Reed, F. R. Taylor, and M. B. Jackson. 1979. Properties and biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **138**:118–121.
- Dinamarca, M. A., A. Ruiz-Manzano, and F. Rojo. 2002. Inactivation of cytochrome *o* ubiquinol oxidase relieves catabolite repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.* **184**:3785–3793.
- Eichel, J., Y.-Y. Chang, D. Riesenberger, and J. E. Cronan, Jr. 1999. Effect of ppGpp on *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthesis is mediated through the RpoS sigma factor (σ^S). *J. Bacteriol.* **181**:572–576.
- Font de Valdéz, G., G. Savoy de Giori, A. Pesce de Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* **20**:560–566.
- García-López, M. D., and F. Uruburu-Fernández. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM* **30**:12–16.
- Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr. 1986. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in the synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **166**:872–877.
- Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:429–441.
- Härtig, C., N. Loffhagen, and H. Harms. 2005. Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1915–1922.
- Hecker, M., and U. Volker. 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **44**:35–91.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
- Jiménez, J. I., B. Miñambres, J. L. García, and E. Díaz. 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways for *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:824–841.
- Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137–141.
- Kets, P. W., A. Galinski, M. de Wit, J. A. M. de Bont, and H. J. Heipieper. 1996. Mannitol as a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **178**:6665–6670.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3592–3597.
- MacDonald, P. M., B. D. Sykes, and R. N. McElhane. 1985. Florine-19 nuclear magnetic resonance studies of lipid fatty acyl chain order and dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B membranes. A direct comparison of the effects of *cis* and *trans* cyclopropane ring and double-bond substituents on orientational order. *Biochemistry* **24**:4651–4659.
- MacKenzie, A. P. 1976. Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: Gram type, suspending media and freeze rate. *Dev. Biol. Stand.* **36**:263–277.
- Ménard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cell. *J. Bacteriol.* **175**:5899–5906.
- Molina, L., C. Ramos, E. Duque, M. C. Ronchel, J. M. García, L. Wyke, and J. L. Ramos. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* **32**:315–321.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, L. P. Chris, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, S. Meestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:799–808.
- Palmfeldt, J., P. Radstrom, and B. Hahn-Hagerdal. 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* **47**:21–29.
- Perry, S. F. 1995. Free-drying and cryopreservation of bacteria. *Methods Mol. Biol.* **38**:21–30.
- Pieper, D. H., V. Martins dos Santos, and P. N. Golyshin. 2004. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**:215–224.
- Poolman, B., and E. Glaesker. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**:397–407.
- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755–805.
- Quivey, R. G., Jr., R. Faustoferri, K. Monahan, and R. Marquis. 2000. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutants*. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:89–92.
- Ramos, J. L., E. Díaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos, and K. N. Timmis. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* **12**:1349–1356.
- Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes, and A. Fernández-Barrero. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**:3887–3890.
- Ramos-González, M. I., and S. Molin. 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**:3421–3431.
- Redway, K. F., and S. P. Lapage. 1974. Effect of carbohydrates and related compounds on the long-term preservation of freeze-dried bacteria. *Cryobiology* **11**:73–79.
- Regenhardt, D., H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernandez, C. Strompl, E. R. Moore, and K. N. Timmis. 2002. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:912–915.
- Revelles, O., M. Espinosa-Urgel, S. Molin, and J. L. Ramos. 2004. The *davDT* operon of *Pseudomonas putida*, involved in lysine catabolism, is induced in response to the pathway intermediate delta-aminovaleric acid. *J. Bacteriol.* **186**:3439–3446.
- Roesfler, M., and V. Müller. 2001. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* **3**:743–754.
- Su, C. J., R. Reusch, and H. L. Sadoff. 1979. Fatty acids in phospholipids of cells, cysts and germinating cysts of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **137**: 1434–1436.

42. Taylor, F., and J. E. Cronan, Jr. 1976. Selection and properties of *Escherichia coli* mutants defective in the synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **125**:518–523.
43. Trevors, J. T. 2003. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* **57**:87–103.
44. Tsvetkov, T., and R. Brankova. 1983. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* **20**:318–323.
45. Wang, A.-Y., and J. E. Cronan, Jr. 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS (KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol. Microbiol.* **11**:1009–1017.
46. Zhang, Z., G. Gosset, R. Barabote, C. S. González, W. A. Cuevas, and U. Sauer. 2005. Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:980–990.
47. Zhao, Y., L. A. Hindorff, A. Chuang, M. Monroe-Augustus, M. Lyrstis, M. L. Harrison, F. B. Rudolph, and G. N. Bennet. 2003. Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2831–2841.

Capítulo 2

Aumento en la sensibilidad hacia las drogas relacionado con la funcionalidad del transporte en un mutante en la síntesis de cardiolipina de *Pseudomonas putida*

Patricia Bernal, Jesús Muñoz-Rojas, Ana Hurtado, Juan Luís Ramos y Ana Segura

Resumen

Las membranas biológicas han desarrollado diferentes mecanismos para modificar su composición en respuesta a estímulos químicos en un proceso denominado “adaptación homeoviscosa”. Entre otros mecanismos, se han observado modificaciones en la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados, en la proporción de isómeros *cis/trans*, en el nivel de ácidos grasos ciclopropano e incluso cambios en la composición de los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Para entender mejor el papel de los grupos de cabeza de los fosfolípidos en la adaptación al estrés provocado por disolventes, construimos un mutante nulo en el gen *cls* (cardiolipina sintasa) en *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Como se esperaba, las membranas del mutante *cls* contenían menos cardiolipina que las de la cepa silvestre. Aunque no se observaron defectos considerables en la tasa de crecimiento del mutante comparado con el silvestre, las células mutantes eran significativamente más pequeñas que las silvestres. El mutante era más sensible a tolueno y a varios antibióticos, esto parecía indicar bien que las bombas de extrusión RND que expulsan estas drogas del interior celular no funcionaban eficientemente o bien que la permeabilidad de membrana estaba alterada en el mutante. Sin embargo, las membranas de la cepa mutante *cls* parecían ser más rígidas que las de la cepa silvestre, como se observó con medidas de polarización de la fluorescencia usando la sonda DPH que se intercala en las membranas. Por último, vimos que el bromuro de etidio es bombeado en *P. putida* por al menos una bomba RND responsable en parte de la resistencia a disolventes y antibióticos, y que por tanto, una mayor tasa de acumulación de bromuro de etidio por parte de las células mutantes nos estaba indicando que el funcionamiento de las bombas de extrusión estaba comprometido

como consecuencia de la alteración en la composición de los grupos de cabeza de los fosfolípidos

A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality

Patricia Bernal¹, Jesús Muñoz-Rojas², Ana Hurtado¹, Juan L. Ramos^{1*} and Ana Segura¹

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Estación Experimental del Zaidín, Department of Environmental Protection, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain.

²CICM-ICUAP-BUAP, Puebla, Mexico.

Summary

Biological membranes have evolved different mechanisms to modify their composition in response to chemical stimuli in a process called “homeoviscous adaptation.” Among these mechanisms, modifications in the ratio of saturated/unsaturated fatty acids and in *cis/trans* fatty acid isomers, cyclopropanation and changes in the phospholipids head group composition have been observed. To further understand the role of phospholipid head groups in solvent stress adaptation, we knocked out the *cls* (cardiolipin synthase) gene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. As expected, *cls* mutant membranes contained less cardiolipin than those of the wild-type strain. Although no significant growth rate defect was observed in the *cls* mutant compared to the wild-type strain, mutant cells were significantly smaller than the wild-type cells. The *cls* mutant was more sensitive to toluene shocks and to several antibiotics than the parental strain, suggesting either that the RND efflux pumps involved in the extrusion of these drugs were not working efficiently or that membrane permeability was altered in the mutant. Membranes of the *cls* mutant strain seemed to be more rigid than those of the parental strain, as observed by measurements of fluorescence polarization using the DPH probe, which intercalates into the membranes. Ethidium bromide is pumped out in *Pseudomonas putida* by at least one RND efflux pump involved in antibiotic and solvent resistance, and the higher rate of accumulation of ethidium bromide inside mutant cells indicated that functioning of the efflux pumps was compromised as a consequence of the alteration in phospholipid head group composition.

Introduction

Biological membranes play essential roles in cell physiology because they create a permeability barrier and a matrix containing proteins that perform multiple functions. Some of these functions are the generation of proton motive force, the exchange of solutes between the cell and the external environment, and adherence to biotic and abiotic surfaces (Sikkema *et al.*, 1995; Hancock, 1997; Nikaido, 1999). Bacterial membranes constitute the first contact point between microbes and the environment, and for this reason bacteria have developed different mechanisms to defend themselves from the action of different membrane-disturbing agents such as changes in temperature or pH, and deleterious chemicals.

The pseudomonads are a group of gram-negative bacteria that have been extensively studied because of their interesting catabolic activities and their ability to colonize different niches including soil, plant rhizosphere and water (Palleroni and Moore, 2004). *Pseudomonas putida*, among other bacteria, is able to modify the composition of its membranes in response to different stresses in a process that has been called “homeoviscous adaptation” and that tends to compensate for changes induced by environmental factors (Sinensky, 1974). The mechanisms of adaptation involve modifications in phospholipid composition and can include: i) changes in the overall degree of fatty acid saturation, ii) formation of cyclopropane fatty acids, iii) *cis* to *trans* isomerization of unsaturated fatty acids, and iv) modification of phospholipid head groups (Sikkema *et al.*, 1995; Weber and de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Härting *et al.*, 2005). Increases in saturated fatty acids have been observed in the response to heat (Loffhagen *et al.*, 2001) and organic solvents (Pinkart *et al.*, 1996). Cyclopropanation of fatty acids is a major factor in acid resistance in *Escherichia coli* (Chang and Cronan, 1999) and it has recently been reported to be important in resistance to desiccation induced by lyophilization in *P. putida* KT2440 (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Because of the extended conformation of saturated and *trans*-unsaturated fatty acids, an increase in the proportion of *trans* fatty acids has been related with increased rigidity of the membrane (because of high packing order), while the kinked structures of *cis* unsaturated fatty acids resulted in higher membrane fluidity. Increases in *trans* isomers have been also reported in response to heat, organic solvents and other stresses in different *Pseudomonas* species (Heipiepper *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997;

Received 18 August 2006; accepted 29 September, 2006. *For correspondence. E-mail jlramos@eez.csic.es; Tel (+34) 958181608; Fax (+34) 958135740

Junker and Ramos, 1999; Heipiepper et al., 2003; Loffhagen et al., 2001).

In contrast to the relatively well-defined role of phospholipid fatty acids in the response to different environmental cues, little information is available about the role of phospholipid head groups, although a role for cardiolipin in response to stress induced by heat, high salt content or organic solvents have been described (Shibuya et al., 1985; von Wallbrunn et al., 2002; Lopez et al., 2006). *P. putida* DOT-T1E membranes contain three main phospholipid head groups; phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) (Ramos et al., 1997). *P. putida* DOT-T1E is a toluene-tolerant bacterium that can thrive in the presence of very high toluene concentrations, (i.e. 10% vol/vol) (Ramos et al., 1995). A major change seen in the *P. putida* DOT-T1E phospholipid head groups is an increase in the CL content of the membrane in cells grown with and without toluene in the stationary phase together with a decrease in the level of PE (Ramos et al., 1997), although the biological significance of this finding is unknown.

In an attempt to elucidate the role of cardiolipin in the fluidity of *P. putida* DOT-T1E membranes and to understand the role of this phospholipid head group in stress responses, we generated a mutant in the cardiolipin synthase gene that catalyzes the transfer of a phosphatidyl group from one phosphatidylglycerol molecule to another. We found that the decrease in CL content in the membranes of *P. putida* influences the size of the cells, membrane fluidity and the efficiency of the multidrug efflux pumps involved in antibiotic and organic solvent resistance.

Results

The P. putida DOT-T1E cls knockout mutant has less cardiolipin in its membranes than the wild-type strain

In order to identify the *P. putida* DOT-T1E *cls* gene, we blasted the *P. putida* P8 CLS protein sequence (von Wallbrunn et al., 2002) against the *P. putida* KT2440 genome, a closely related strain to *P. putida* DOT-T1E, whose genome has been completely sequenced (Nelson et al., 2002). A protein, PP5364, that is 94% identical to the *P. putida* P8 protein was identified as a potential cardiolipin synthase (CLS). Using oligonucleotides based on the KT2440 *cls* sequence and chromosomal DNA from *P. putida* DOT-T1E as template we amplified a 2712 bp band whose sequence revealed the presence of an ORF that is 99% identical to the CLS protein of KT2440. Only one band was observed when we hybridized the putative *cls* gene against the *P. putida* DOT-T1E chromosome in a Southern blot (not shown) indicating that this was the only highly homologous sequence to the *cls* gene present in *P. putida* DOT-T1E.

A *P. putida* DOT-T1E *cls* knockout mutant strain was constructed as described in Materials and Methods. Ramos

et al. (1997) reported that almost 80% of the total phospholipid head group content of *P. putida* DOT-T1E membranes growing on LB in the stationary phase corresponded to PE, while PG and CL made up about 10% to 12%. This finding has been confirmed in this study. The *cls* knockout mutant strain showed a significant decrease in cardiolipin content with a concomitant increase in the amount of PG, the immediate precursor of the CL (Figure 1). In the *cls* mutant the residual CL content accounted for about 4% of the total phospholipid head groups. No significant variation in fatty acid composition between the parental and the *cls* mutant were found (not shown).

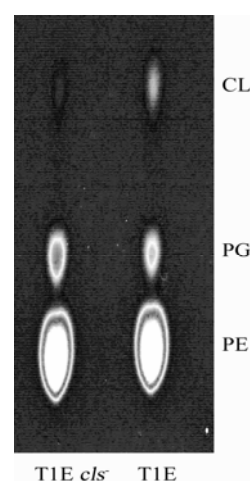


Fig. 1. Thin layer chromatography (TLC) of phospholipids extracted from *P. putida* DOT-T1E and its isogenic *cls* mutant. TLC plates were developed and stained as described in Materials and Methods.

We visualized CL in the membranes of the wild-type and mutant strains using the fluorescent dye 10-*N*-Nonyl acridine orange (NAO). This dye binds to anionic phospholipid head groups, and the affinity of CL for NAO is much higher than that of the monoacidic phospholipids (Mileykovskaya et al., 2001). Against the background of NAO staining of wild-type *P. putida* DOT-T1E cells (Figure 2), green fluorescent spots were observed at the poles and at mid-cell of individual cells, and also near septa when cells were dividing (Figure 2, A). Mutant cells in which the CL content was lower than in the wild type were homogeneously stained and no fluorescent spots were visible (Figure 2, B). These results support that the CL content in the mutant cells, though detectable by total preparation, was not distributed in the cell membranes as in the parental strain.

The decreased in CL content affects the size of P. putida DOT-T1E cls mutant cells

We determined growth rates of the wild-type and the *cls* mutant strain on rich LB medium and on M9 minimal medium supplemented with three different carbon sources: 0.5% (wt/vol) glucose, 10 mM citrate or 10 mM benzoate.

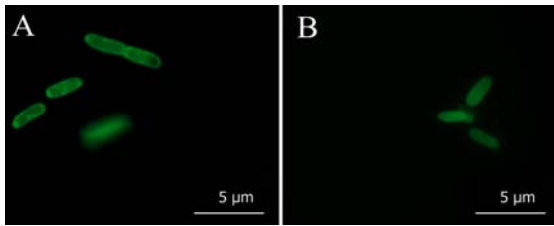


Fig. 2. Staining of *P. putida* DOT-T1E and its isogenic *cls* mutant with NAO. Cells growing on LB medium in the early exponential phase were stained as described in Materials and Methods. Wild-type *P. putida* DOT-T1E cells (A) and the *cls* mutant (B).

Although growth rates of the parental and its isogenic mutant strain in the corresponding medium determined as CFU/ml were similar in all culture media, we found that turbidity of the *P. putida* *cls* cultures was always lower than in its parental strain. Furthermore, we found that wild-type colonies were larger than colonies of the mutant strain after overnight culture (Fig. 3.1). This result prompted us to determine the cell size of the *P. putida* DOT-T1E and its *cls* mutant strain, for which cells growing on M9 medium plus glucose in the exponential phase were examined under the microscope. Cells of the wild-type strain were $2.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ long while *cls* mutant cells were only $1.9 \pm 0.06 \mu\text{m}$ long (See also Figure 3.2 and 3.3). Both phenotypes, colony and cell size were partially recovered when the *cls* gene was introduced in the mutant cells in a plasmid (Figure 3). Cell size of the complemented mutant was $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, whereas the size of the mutant cells when transformed with the plasmid without the *cls* gene was $1.9 \pm 0.08 \mu\text{m}$. The recovery in size of the complemented mutant strain correlates with the fact that CL levels in the complemented

mutant cells recovered the wild-type levels and were even slightly higher (1.3-fold) (not shown).

Influence of CL content in P. putida DOT-T1E on responses to different stresses

Cardiolipin in other microorganisms has been suggested to participate in different stress responses (Ono and White, 1971; Hiraoka *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997; Shiba *et al.*, 2004). To find out what kind of stress responses were affected in the *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant we tested the survival of wild-type and mutant strains in response to different stress conditions. We found that a sudden decrease in pH (by adding HCl to the culture medium to pH 4) had no effect whatsoever on the survival rate when compared to the wild-type strain (viable cells decreased from 10^9 CFU ml⁻¹ to 10^5 CFU ml⁻¹ 5 hours after HCl addition). *P. putida* DOT-T1E and its isogenic mutant were equally sensitive to alkaline pH and less than 10^3 CFU/ml survived a sudden increase of pH to 10.5. We also tested whether the addition of anionic or cationic detergents (0.5% [wt/vol] SDS, 2% [wt/vol] deoxycholate or 1% [wt/vol] Triton X-100), organic acids (20 g l⁻¹ *p*-hydroxybenzoate) and chelating agents (0.5 mM EDTA) influenced the growth of the mutant strain. No significant differences in growth rates and yields were observed between the two strains (results not shown). No significant growth differences between the parental DOT-T1E and its isogenic *cls* mutant were observed in LB at temperatures ranging from 16°C to 37°C. CL has been shown to be involved in saline stress responses in *Bacillus subtilis* (Lopez *et al.*, 2006). We found also that *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant strain was slightly

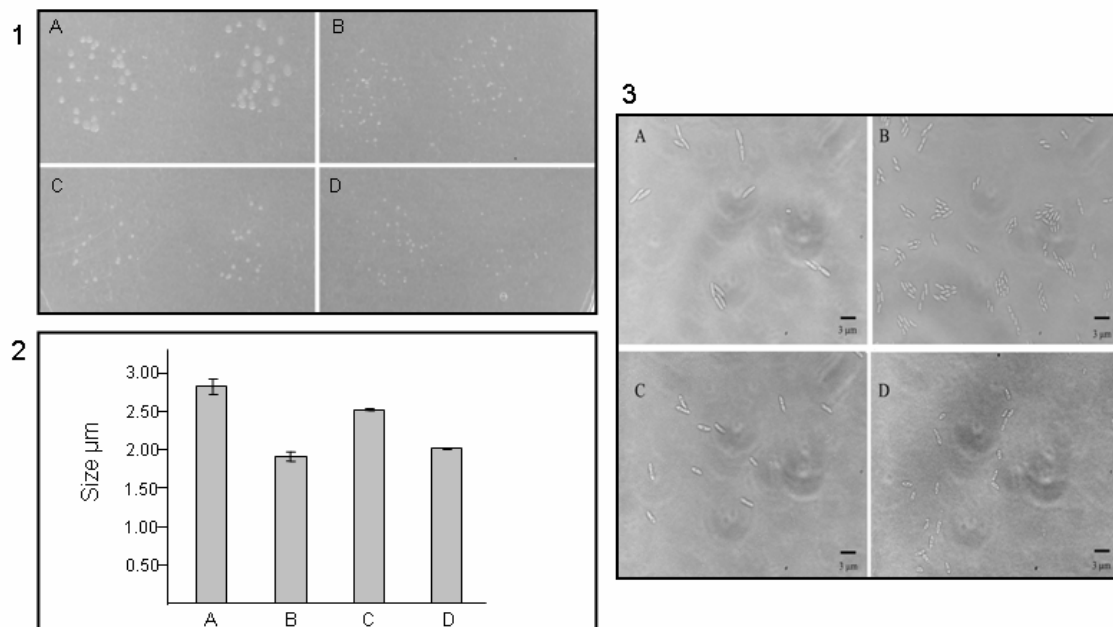


Fig. 3. Size of *P. putida* DOT-T1E and *P. putida* DOT-T1E *cls* cells. 1) Colonies of the different strains 2) Average size of the cells (one hundred cells were measured) and 3) Photograph of the cells under light microscope. A) wild-type, B) *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant C) *P. putida* DOT-T1E *cls* (pBcls) D) *P. putida* DOT-T1E *cls* (pBBR1MCS-2)

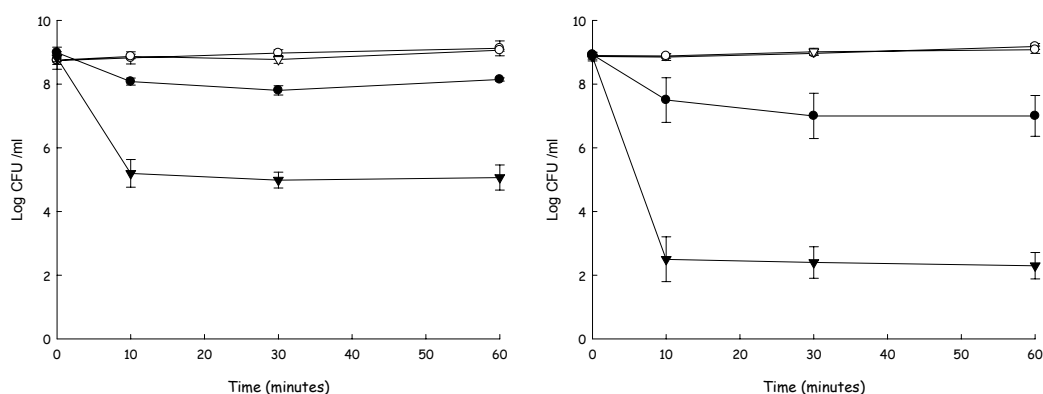


Fig. 4. Survival of *P. putida* DOT-T1E and its isogenic *cls* mutant after a sudden toluene shock. The wild-type strain (A) and the *cls* mutant strain (B) were either subjected or not to the sudden addition of toluene. Cells were grown on LB (inverted triangles) or on LB with toluene in the gas phase (circles). The cultures were split in two halves, and to one half we added 0.3% (vol/vol) toluene (dark symbols), whereas the other half was kept as a control (open symbols). CFU/ml were counted at the indicated times

more sensitive towards saline stress than the wild-type strain. For these assays cells were grown on LB until the exponential phase was reached, and were then spread on LB or LB + 0.7 M NaCl. While 100% of the wild-type cells grew on 0.7 M NaCl, only 33% of the mutant cells managed to grow in this medium.

Interestingly, the *cls* mutant was much more sensitive than the wild-type strain when confronted with 0.3% (vol/vol) toluene (Figure 4). These results indicated that CL plays an important role in the initial response to this organic solvent. In *P. putida* DOT-T1E, solvent tolerance is mediated by three efflux pumps: TtgABC (Ramos *et al.*, 1998), TtgDEF (Mosqueda and Ramos, 2000) and TtgGHI (Rojas *et al.*, 2001), and two of them (TtgABC and TtgGHI) have been also implicated in the extrusion of antibiotics (Terán *et al.*, 2003). We decided to test whether antibiotic resistance was also influenced by CL content. We found that the MIC₅₀ for chloramphenicol and tetracycline, two antibiotics extruded by the Ttg pumps, was clearly lower in the *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant than in the wild-type strain: the MIC₅₀ for Cm and Tc in the wild-type strain was 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 1.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, whereas in the mutant the values were 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for Cm and 0.45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for Tc. These results suggested that the efflux of the toxic drugs was not working as efficiently in the mutant strain as they were in the wild-type strain.

To further test this possibility we tested expression of the efflux pump operons in the mutant strain, as well as the functioning of the efflux pumps. For expression assays we used plasmids available in our laboratory in which the promoter of each efflux operon was fused to a *'lacZ* gene (Duque *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2003) and measured β -galactosidase activity in cells induced with sublethal toluene concentrations (6 mM) and in the absence of the aromatic hydrocarbon. Neither the expression level nor the induction range of any of the three efflux pump operons were affected in the *cls* mutant (data not shown).

For monitoring efflux pump activity we exploited the fact that the TtgABC efflux pump of *Pseudomonas putida* DOT-T1E extrudes ethidium bromide (EtBr) (Terán *et al.*, 2006) and we monitored the accumulation of this compound in the cell. Ethidium bromide emitted weak fluorescence in aqueous solution but strong fluorescence in a hydrophobic environment (i.e., when intercalated with DNA). As seen in Figure 5, the rate of accumulation of EtBr in the *cls* mutant was higher than in wild-type cells. To elucidate whether this accumulation was consequence of altered permeability to the membranes or malfunctioning of the efflux pumps, we treated cells with carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) to deprive them of energy before the addition of EtBr. Cells were then incubated for 20 min with EtBr that accumulated in the cells. The amount of EtBr accumulated in the mutant cells was about 15% lower than in the wild-type cells, which suggests that the mutant membranes could be less permeable to EtBr than those of the wild-type cells. Therefore the higher the accumulation of EtBr in the mutant cells, in spite of an apparent decrease in permeability to this chemical, points towards a clear impediment in the functioning of the efflux pumps responsible for the extrusion of EtBr.

To provide further support to the observation that the decreased levels of CL influenced the extrusion of EtBr, we repeated the above assays with the mutant strain but carrying the *cls* gene cloned in the broad host-range plasmid pBcls. In the complemented strain accumulation of EtBr followed the pattern of the parental strain, which supports that CL levels can influence efflux pump functioning.

Membrane fluidity in wild-type and mutant strains

To characterize the physical state of the membrane in *P. putida* DOT-T1E and its corresponding mutant, we used steady-state fluorescence polarization to examine

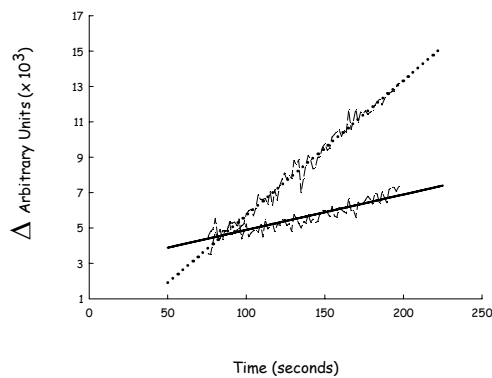


Fig. 5. Time course of EtBr fluorescence emission by *P. putida* DOT-T1E and its *cls* mutant strain. EtBr was added to cells in 100 mM NaCl, 50 mM K₂HPO₄ (pH 7.0) in a thermostated cuvette at 30 °C in a spectrofluorimeter and fluorescence emission was recorded in time. Wild-type strain (continuous line), *cls* mutant strain (dotted line).

membrane fluidity. Fluorescent polarization values were higher in the *cls* mutant (Figure 6A) than in the wild type, indicating that the mutant membrane was less fluid than in the wild-type strain. To rule out the possibility that higher rigidity of the membrane was caused by changes in the fatty acids, we analyzed the fatty acid composition of the two strains; no significant differences in fatty acid profiles were observed between the wild-type and mutant strain (data not shown).

It is known that organic solvents such as toluene intercalate into the membrane, causing an increase in fluidity (Sikkema *et al.*, 1995). *P. putida* DOT-T1E, as well as other *Pseudomonas* strains, is able to counteract this fluidification effect by converting *cis*-unsaturated fatty acids to their corresponding *trans* isomers. This adaptation in membrane fluidity was clearly evidenced by 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) polarization (Figure 6B). As expected, the addition of toluene to the *P. putida* DOT-T1E cell culture immediately before incubation with DPH led to a decrease in fluorescence polarization, indicating increased fluidity of the membranes (Figure 6B b). However, when the cells were grown in the presence of sublethal concentrations of toluene, the polarization values were higher than those of cells without toluene (Figure 6B c), indicating a more rigid state of the membrane as a consequence of adaptive mechanisms in response to toluene. When toluene was added to preinduced cultures shortly before the DPH probe (Figure 6B, d), membrane fluidity was slightly reduced compared to preinduced cells without toluene (Figure 6B c) but was still higher than in the cultures without preinduction (Figure 6B b). The profile of changes in membrane fluidity in the *cls* mutant cells in response to toluene were similar to those described above for the wild-type strain (Figure 6B e through h), except that in preinduced cells treated with toluene the fluorescence polarization decreased significantly from 0.32 to 0.26 (Figure 6B g versus h). These findings suggest that the

adaptation response of the membrane to organic solvents may be compromised in the *cls* mutant.

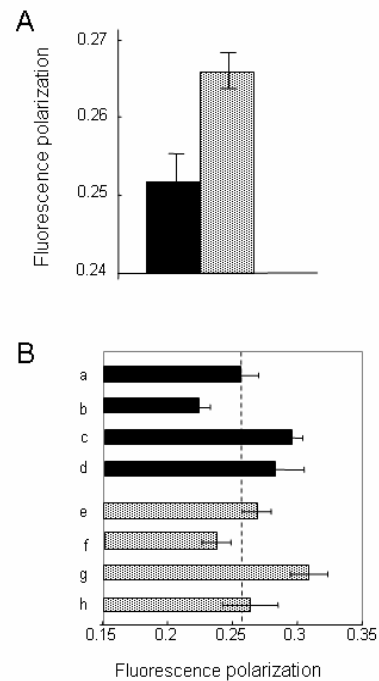


Fig. 6. Fluorescent polarization measurements. A) Fluorescent polarization of *P. putida* DOT-T1E (dark bar) and its derivative *cls* mutant (dotted bar). B) *P. putida* DOT-T1E fluorescent polarization values (black bars) and *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant (dotted bars) when cells were: a,e) growing on LB; b,f) growing on LB and 0.1% (vol/vol) toluene added shortly before DPH addition; c, g) growing on LB plus 3 mM toluene; d,h) growing on LB plus 3 mM toluene and 0.1% (vol/vol) toluene was added shortly before the DPH addition. Values are the mean \pm SD of at least three independent assays.

Discussion

Bacteria live in changing environments where they encounter different stresses, and not surprisingly many of the adaptive mechanisms cells have developed to cope with environmental hazards are located in the membrane. Several studies have investigated changes in fatty acid composition in response to stress; however, the influence of phospholipid head groups in membrane adaptation is less well known. Because genetic manipulation of the lipid composition in the membranes is a useful approach to study the functions of some of these phospholipids, we decided to knock out the *cls* gene of *P. putida* DOT-T1E. This led to a decrease in CL content, although, as reported for other strains (Pluschke *et al.*, 1978; von Wallbrunn *et al.*, 2002), the *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant still produced some basal levels of CL. Residual CL content in a *cls*

mutant of *E. coli* was shown to be due to cardiolipin synthase activity of phosphatidylserine synthase (encoded by the *pss-1* gene) (Shibuya *et al.*, 1985), this could be also the case in *P. putida*.

Our first interesting observation was that the CL content influenced cell size in the *P. putida cls* mutant. The colocalization of several proteins involved in cell division and DNA replication with certain classes of phospholipid head groups has led to the conclusion that lipids are involved in cell division (Mileykovskaya and Dowhan, 2005). The MinD protein of *E. coli* belongs to the class of amphitropic proteins whose structure suggested preference interactions with anionic phospholipid head groups. Localization of the MinD protein in an *E. coli* mutant deficient in PE synthesis showed a very similar pattern of cellular distribution to that of the localization of CL domains (Mileykovskaya *et al.*, 2003). This protein is part of the Min system, which prevents the aberrant localization of the cell division machinery at the cell poles. Localization of CL-rich domains at mid-cell is also consistent with their functional role as the binding sites for the polymerization of the prokaryotic cell division amphitropic protein FtsZ into the Z-ring (Mileykovskaya and Dowhan, 2005). Initiation of DNA replication at *oriC* in *E. coli* is known to occur at mid-cell, and DnaA requires anionic phospholipid head groups for membrane association (Castuma *et al.*, 1993). In *Bacillus subtilis* the pattern of CL spots also suggested that CL-containing domains are involved in cell division and sporulation (Kawai *et al.*, 2004). In *P. putida* DOT-T1E the pattern of distribution of CL is quite similar to that of *E. coli* (Mileykovskaya and Dowhan, 2000), with spots clearly visible near the poles and the middle of the cell, and at the septal regions in dividing cells, a distribution that supports its participation in cell division. Changing the proportions of anionic phospholipids may alter some of the divisional processes, which could lead to cell division before the cell has reached the average size of the wild-type cells.

Several reports have suggested that CL participates in resistance to several stresses such as starvation, toxic chemicals, heat or saline environments (Ono and White, 1971; Hiraoka *et al.*, 1993). However, *P. putida* DOT-T1E *cls* mutants were not more severely affected than the wild type by most of the different stresses we tested. In comparison to wild-type cells, the most relevant phenotype of the *cls* mutant strain was its increased sensitivity to exposure to toxic compounds that are eliminated from the cell via RND (resistance, nodulation, cell division) efflux pumps. This is in agreement with the pioneering observation made in Dr. White's laboratory that inhibition of CL synthesis in *Haemophilus parainfluenza* by certain drugs interfered with their extrusion by interrupting energy-dependent transport systems (Ono and White, 1971). In this regard phospholipids have been shown to play an

important role in the stabilization of protein complexes, in protein folding and insertion in the membranes, translocation across membranes, and orientation of transmembrane domains within the membrane (Kusters *et al.*, 1991; Klompenburg *et al.*, 1998; Bogdanov *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Pfeiffer *et al.*, 2003). Efflux pumps of the RND family consist of three different proteins: an inner membrane protein, an outer membrane protein and a periplasmic highly asymmetric protein (the fusion membrane protein). The crystal structure of the three components of the RND efflux pump AcrAB-TolC in *E. coli* has been resolved (Koronakis *et al.*, 2000; Avila-Sakar *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2002). AcrB is an inner membrane translocase that has twelve transmembrane domains and two large periplasmic loops. This component is organized as a trimer in a jellyfish-like structure, with a headpiece approximately 100 Å thick (periplasmic) and a transmembrane region 50 Å thick. Three of the transmembrane domains of each protomer are arranged in a ring-like manner with a central hole that crosses the membrane and extends to the bottom of the headpiece. Interestingly, the authors of the structure suggested that part of this hole might be filled with phospholipids (Murakami *et al.*, 2002). If phospholipids help to stabilize efflux protein complexes or facilitate complex assembly, the decrease in CL in the mutant strain might directly or indirectly reduce the efficiency of efflux pump functioning. The function of a multidrug transporter of the ABC family is reportedly affected by membrane fluidity in *Candida albicans* (Smriti *et al.*, 1999), and our *cls* mutant has a less fluid membrane than the wild type.

The increased sensitivity to antibiotics and toluene in the *cls* mutant might also have been due to indirect effects derived from altered membrane permeability. However, several lines of evidence suggest that this is not the case. First of all, polarization measurements indicated a more rigid state of the membranes in the *cls* mutant, and rigidification would decrease the permeability to toluene. Furthermore, in CCCP-treated cells, EtBr accumulated at lower levels in *cls* mutant cells than in the wild-type cells. These two lines of evidence support that the *cls* mutant membranes are less permeable than wild-type cells to this compound. Secondly, no other chemical stresses (detergents, chelating agents and others) affected the growth or survival of the *cls* mutant, as would have been expected if the membrane barrier was weakened by the low amount of CL.

Our results emphasize the importance of membrane phospholipid head group composition in the physiology of *Pseudomonas putida*. A reduction in the CL content leads to a reduced cellular size and decreased survival after sudden solvent shocks or exposure to antibiotics. The natural niche of *P. putida* is the plant rhizosphere, where secondary plant products with antibiotic properties are

produced. Extrusion of toxic chemicals is mediated by and adaptation of *P. putida* under changing environmental conditions can be influenced by the phospholipid composition of the membranes.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

Pseudomonas putida DOT-T1E was grown on LB or M9 minimal medium with 25 mM glucose, 10 mM citrate or 10 mM benzoate as the sole carbon source (Abril *et al.*, 1989). Cultures were incubated at 30 °C and shaken on an orbital platform operating at 200 strokes per minute.

*Inactivation of the chromosomal *cls* gene of Pseudomonas putida DOT-T1E*

To construct a cardiolipin synthase knock-out mutant, the *Pseudomonas putida* *cls* gene was amplified from chromosomal DNA with primers CLS5B3: 5'-AAAGGATCCGAATTCCCAGTCACTGAG-3' (located 550 pb upstream from the *cls* gene in the genome sequence of *P. putida*) and CLS3H3: 5'-AAAAGCTTGCAGATTCTCGATTATCG-3' (located 630 pb downstream from the *cls* gene of *P. putida*) and the amplification product was cloned into pUC18Not to obtain plasmid pUCLS-T1E.

Plasmid pUCLS-T1E was cut with *Nco*I and *Stu*I and the ends were made blunt with Klenow. The 1-kb *Bsa*I and *Nco*I fragment from pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) bearing the *aacC1* gene that encodes for gentamycin resistance was inserted into pUCLS-T1E to yield plasmid pUCLSGm. A 3.05-kb *Not*I fragment containing the *cls::aacC1* allele was subcloned into pKNG101 (Kaniga *et al.*, 1991) previously cut with the same restriction enzyme to obtain pKNG-CLSGm. This plasmid was used for allelic exchange, for which it was transferred to the *P. putida* DOT-T1E strain via triparental mating. Merodiploids were selected in M9 minimal medium with benzoate plus gentamycin and streptomycin, and the double recombination event was selected based on sucrose toxicity as described (Kaniga *et al.*, 1991). The correct insertion of the mutant allele of *cls* into the chromosome was checked by PCR analysis and Southern blot hybridization (not shown).

*Cloning of the *cls* gene and complementation of the Pseudomonas putida DOT-T1E *cls* mutant strains*

The *cls* gene was amplified from chromosomal DNA using oligonucleotides KpnI*cls* (5'-CAGGTACCGTGAAGTGTACTCGGCAAGCA-3') and EcoRI*cls* (5'-CGGAATTCAGGTCGCTCTCACAAC-3') and

RND efflux pumps (Terán *et al.*, 2006). Therefore, fitness digested with *Kpn*I and *Eco*RI. This DNA was ligated to pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) that had been previously cut with the same enzymes. The resulting plasmid was named pBcls and it was eventually transformed into the *P. putida* DOT-T1E *cls* mutant by electroporation.

Survival in response to toluene shocks

Cells were grown overnight in 30 ml on LB medium (uninduced cultures) or on LB plus toluene in the gas phase (induced cultures). Then cultures were diluted 1:100 and grown under the same conditions until they reached a turbidity of about 0.8 at 660 nm. These cultures contained about 10⁸ CFU ml⁻¹. The cultures were divided into two halves; to one 0.3% (vol/vol) toluene was added (t = 0) and the other was kept as a control. The number of viable cells was determined before toluene was added and 10, 30 and 60 min after toluene addition.

Minimal inhibitory concentration

Experiments were done as described by Amsterdam (1991). Plates were incubated 20 h at 30°C. MIC₅₀ is the minimal concentration that yield 50% growth inhibition compared to the control without antibiotic.

Analysis of phospholipids

Phospholipids were extracted according to Bligh and Dyer (1959). To determine the nature of the head groups, phospholipids were separated by thin-layer chromatography (TLC) on commercially available plates (Merck) coated with Silica Gel 60, 5 × 10 cm. Development was in chloroform-methanol-glacial acetic acid (65:25:8, vol/vol). Lipids were visualized with iodine vapors (Ames, 1968).

NAO staining

Overnight LB cultures were diluted 1:1000 and grown on LB liquid medium until they reached early exponential growth phase (turbidity at 660 nm around 0.2). Cells were stained by adding to the culture 10-*N*-nonyl acridine orange to reach a final concentration of 200 nM. After 1 h incubation at room temperature in the dark, 2 µl of the culture was mixed with 10 µl 0.9% (wt/vol) sodium chloride. Then, cells were immobilized on a microscope slides coated with poly-L-lysine and 10 µl of antifading solution (100 mM NaCl, 50 mM potassium phosphate [pH 7.0], 25 mg *p*-phenylenediamine in 5 ml PBS (pH 12) plus 20 ml of glycerol) was added (Mileykovskaya and Dowhan, 2000).

Samples were observed with a Zeiss microscope (Axioskop 20) equipped with a Zeiss Plan-NEOFLUAR 100×/1.30 oil 44 04 80 objective (immersion oil 1250 centistokes), a 70-W HBO lamp, and a Zeiss 09 filter set (excitation wavelength 450-490nm, and emission wavelength 515-570 nm). Photographs were taken using a Nikon DS Cooled Camera Head DS-5Mc.

Cell membrane labeling and fluorescence anisotropy measurements

Membrane fluidity was determined by measuring fluorescence polarization of the probe DPH inserted into the lipid bilayer of the cytoplasmic membranes. Cells in exponential growth phase were harvested by centrifugation at 10 000 g for 1 min, washed in sterile 15 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) and suspended in same buffer to a turbidity at 660 nm of 0.2. One μ l of the fluorescent membrane probe (12 mM stock solution in tetrahydrofuran) was added to 3 ml of the suspended culture in a quartz cuvette to obtain a final concentration of 4 μ M, and incubated with magnetic stirring at 200 rpm for 10 min in the dark at 30 °C to allow incorporation of the probe into the cytoplasmic membrane (Trevors, 2003). Fluorescence polarization was measured using a spectrofluorimeter (Photon Technology International, Inc.) equipped with a thermostated stabilized cell cuvette holder and a cuvette stirrer. The excitation and emission wavelengths for the DPH probe were 358 and 428 nm respectively. The slit width for the excitation and emission beams was 12 and 10 nm, respectively. The intensities parallel (I_{VV}) and perpendicular (I_{VH}) to the vertically polarized excitation beam were recorded and the degree of polarization (P) calculated from the intensity measurements with the equation. $P=(I_{VV}-I_{VH}G)/(I_{VV}+I_{VH})$, where G was the correlation factor for instrument polarization expressed as the ratio of vertical to horizontal measurements when the excitation light was polarized in the horizontal direction; the higher the value of polarization, the lower the membrane fluidity (England *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001). Values were analyzed using the FELIX (PTI) software program.

Accumulation of ethidium bromide in cells

Experiments were done basically as described by Ocaktan *et al.* (1997). Cells were harvested by centrifugation when cultures reached a turbidity of 0.6-0.7 at 660 nm, washed once with in 100 mM NaCl and 50 mM potassium phosphate, and suspended again in the same buffer at $A_{660} = 0.3$. Ethidium bromide (EtBr) dissolved in water was added at a final concentration of 10 μ M. When indicated, CCCP dissolved in absolute methanol was added to reach a concentration of 100 μ M. Fluorescence was measured at 30 °C with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Inc.). The excitation and emission

wavelengths were 520 and 590 nm respectively, and slit widths were 5 nm for excitation and 10 nm for emission. Assays were repeated at least 4 times.

GenBank accession number

The sequence of the cardiolipin synthase gene of *P. putida* DOT-T1E has been deposited under number AY960982.

Acknowledgments

This study was supported by Grants CICYT-BIO2003-00515, BIO2006-05668, GEN2001-4698-CO5-03, VEM2004-08560 and Junta de Andalucía.

We thank C. Lorente and M. Fandila for secretarial assistance and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

References

- Abril, M.A., Michán, C., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790.
- Ames, G.F. (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J. Bacteriol.* **95**: 833-843.
- Amsterdam, D. (1991) Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, p 72-78. En V. Lorian (ed.) Antibiotics in laboratory medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Avila-Sakar, A.J., Misaghi, S., Wilson-Kubalek, E.M., Downing, K.H., Zgurskaya, H., Nikaido, H., and Nogales, E. (2001) Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J. Struct. Biol.* **136**: 81-88.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Bogdanov, M., Heacock, P.N., and Dowhan, W. (2002) A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.* **21**: 2107-2116.
- Castuma, C.E., Crooke, E., and Kornberg, A. (1993) Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator protein of replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 24665-24668.
- Chang, Y.-Y., and Cronan, J.E. (1999) Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**: 249-259.
- Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G., and Ramos, J.L. (2001) Global and cognate regulators control the

- expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1100-1106.
- England, L.S., Gorzelak, M., and Trevors, J.T. (2003) Growth and membrane polarization in *Pseudomonas aeruginosa* UG2 grown in randomized microgravity in a high aspect ratio vessel. *Biochim. Biophys. Acta* **1624**: 76-80.
- Hancock, R.E.W. (1997) The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **5**: 37-42.
- Härtig C., Loffhagen, N., and Harms, H. (2005) Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1915-1922.
- Heipiepper, H., Diefenbach, J.R., and Keweloh, H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852.
- Heipiepper, H., Meinhardt, F., and Segura, A. (2003) The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 1-7.
- Hiraoka, S., Matsuzaki, H., and Shibuya, I. (1993) Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **336**: 221-224.
- Inoue, K., Matsuzaki, H., Matsumoto, K., and Shibuya, I. (1997) Unbalanced membrane phospholipids compositions affect transcriptional expression of certain regulatory genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2872-2878.
- Junker, F., and Ramos, J.L. (1999) Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **181**: 5693-5700.
- Kaniga K., I. Delor and G.R. Cornelis (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., and Matsumoto, K. (2004) Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J. Bacteriol.* **186**: 1475-1483.
- Kim, I.S., Lee, H., and Trevors, J.T. 2001. Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and biphenyl on cell membranes of *Ralstonia eutropha* H850. *FEMS Microbiol. Lett.* **200**: 17-24.
- Klompenburg, W.V., Paetzel, M., de Jong, J.M., Dalbey, R.E., Demel, R.A., von Heijne, G., de Kruijff, B. (1998) Phosphatidylethanolamine mediates insertion of the catalytic domain of leader peptidase in membranes. *FEBS Lett.* **431**: 75-79.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoyl, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Koronakis V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914-919.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kusters, R., Dowhan, W., and de Kruijff, B. (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes. *J. Biol. Chem.* **266**: 8659-8662.
- Loffhagen, N., Härtig, C., and Babel, W. (2001) *Pseudomonas putida* NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the *trans/cis* ratio of fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 317-323.
- López, C.S., Alejandro, F.A., Heras, H., Rivas, E.A., and Sánchez-Rivas, C. (2006) Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* **152**: 605-616.
- Mileykovskaya E., and Dowhan, W. (2000) Visualization of phospholipids domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-Nonyl Acridine Orange. *J. Bacteriol.* **182**: 1172-1175.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., LLutterodt, and Haines, T.H. (2001) Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett.* **507**: 187-190.
- Mileykovskaya, E., Fishov, I., Fu, X., Corbin, B., Margolin, W., and Dowhan, W. (2003) Effects of phospholipids composition on MinD-membrane interactions *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **278**: 22193-22198.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 135-142.
- Mosqueda, G., and Ramos, J.L. (2000) A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* **182**: 937-943.
- Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura A., and Ramos, J.L. (2006) Involvement of C17:cyclopropane fatty acid in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 472-477.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**: 587-593.
- Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D.,

- Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Nikaido, H. (1999) Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* **181**: 4-8.
- Ocaktan A., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1997) Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21964-21969.
- Ono, Y., and White, D.C. (1971) Consequences of the inhibition of cardiolipin metabolism in Haemophilus parainfluenzae. *J. Bacteriol.* **180**: 1065-1071.
- Palleroni, N.J., and Moore, E.R.B. (2004) Taxonomy of Pseudomonads: experimental approaches. In: *Pseudomonas*, Vol 1, 3-44. Ed. J.L. Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY.
- Pfeiffer, K, Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., and Shägger, H., (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **278**: 52873-52880.
- Pinkart, H.C., Wolfram., J.W., Rogers, R., and White, D.C. (1996) Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1129-1132.
- Pluschke, G., Hirota, Y., and Overath, P. (1978) Function of phospholipids in *Escherichia coli*. Characterization of a mutant deficient in cardiolipin synthesis. *J. Biol. Chem.* **253**: 5048-5055.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., and Haïdour, A. (1995) Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes F., and Fernández-Barrero, A. (1997) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890.
- Ramos, J.L, Duque, E., Godoy, P., and Segura, A. (1998) Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180**: 3323-3329.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L. and Segura, A. (2001) Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**: 3967-3973.
- Rojas, A., Segura, A., Guazzoroni, M.E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M.T., and Ramos, J.L. (2003) *In vivo* and *in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator
- Timmis, K.N., Düsterhöft, A., Tümmler, B., and Fraser, of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**: 4755-4763.
- Shiba, Y., Yokoyama, Y., Aono, Y., Kiuchi, T., Kusaka, J., Matsumoto, K., and Hiroshi, H. (2004) Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J. Bacteriol.* **186**: 6526-6535.
- Shibuya, I., C. Miyazaki and A. Ohta. 1985. Alteration of phospholipids composition by combined defects in phosphatidylserine and cardiolipin synthases and physiological consequences in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**:1086-1092.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of the membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 522-525.
- Smriti, S., Krishnamurthy and Prasad, R. (1999) Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 475-481.
- Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J.L., and Gallegos, M.T. (2003) Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3067-3072.
- Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., and Gallegos, M.T. (2006) Effector-repressor interactions. Binding of a single effector molecule to the operator bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.* **281**: 7040-7048.
- Trevors, J.T. (2003) Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* **57**: 87-103.
- von Wallbrunn, A., Heipiepper, H.J., and Meinhardt, F. (2002) *Cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in a cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 179-185.
- Weber, F.J., Isken, S., and de Bont, J.A. (1994) *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**: 2013-2017.
- Weber, F. J., and de Bont, J.A. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 225-245.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002) Gluing the respiratory chain together. *J. Biol. Chem.* **277**: 43553-43556.

Capítulo 3

Regulación de los genes del metabolismo lipídico en el control de la fluidez de membrana en *Pseudomonas putida* DOT-T1E

Patricia Bernal, Ana Segura y Juan Luís Ramos

Resumen

En bacterias gram negativas, la fluidez de la membrana depende de los grupos de cabeza y de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos. La exposición de *Pseudomonas putida* a agentes estresantes da lugar a modificaciones en los lípidos de membrana a corto y largo plazo. El principal mecanismo de adaptación a corto plazo observado en respuesta a disolventes orgánicos es la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados en una reacción mediada por la *cis/trans* isomerasa (CTI); a largo plazo tiene lugar un incremento en los niveles de cardiolipina. Los genes *cti* y *cls* (cardiolipina sintasa) de la cepa resistente a disolventes *P. putida* DOT-T1E forman unidades monocistrónicas y se expresan desde promotores σ^{70} . La expresión desde el promotor *cls* es 6 veces mayor en la fase de crecimiento estacionaria que en la exponencial, y no se ve influida por la presencia de disolventes orgánicos. El gen *cti* se expresa a un nivel constante en las fases logarítmica y estacionaria, pero su nivel de expresión es moderadamente regulado positivamente (se induce) en respuesta a tolueno. Mediante ensayos de polarización de la fluorescencia vimos que los mutantes deficientes en el gen *cti* poseen membranas menos rígidas que la estirpe silvestre, mientras que los mutantes *cls* tenían sus membranas más rígidas. Un doble mutante *cti/cls* tiene las membranas similares al silvestre en cuanto a rigidez, lo que parece deberse a un efecto compensatorio de las mutaciones con respecto a la fluidez de membrana. Sin embargo, los mutantes *cls* y *cti/cls* son más sensibles a disolventes que la estirpe silvestre y que el mutante *cti* debido al mal funcionamiento de los transportadores que expulsan estas drogas.

Regulation of lipid metabolism genes involved in the control of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* DOT-T1E

Patricia Bernal, Ana Segura and Juan-Luis Ramos*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Estación Experimental del Zaidín, Department of Environmental Protection, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

Summary

In gram-negative bacteria, cell membrane fluidity is influenced by phospholipid head group composition and linked fatty acids. Exposure of *Pseudomonas putida* to stressing agents results in short- and long-term modifications in membrane lipids. The main adaptive change observed in response to organic solvents in the short term is the *cis* to *trans* isomerization of unsaturated fatty acids in a reaction mediated by *cis/trans* isomerase (CTI); whereas in the long term an increase in cardiolipin content takes place. The *cti* and *cls* (cardiolipin synthase) genes in the solvent-tolerant *P. putida* DOT-T1E strain form monocistronic units and are expressed from sigma-70 promoters. Expression from the *cls* promoter is 6-fold higher in the stationary phase than in the log phase, and expression of the *cls* gene is not influenced by solvents. The *cti* gene is expressed at fairly constant levels in the log and stationary phase, but its level of expression is moderately up-regulated in response to toluene. We used fluorescence polarization assays to show that mutants deficient in the *cti* gene exhibit less rigid membranes than the wild-type strain, whereas mutants with a knockout in the *cls* gene exhibit increased membrane rigidity. A double *cti/cls* mutant has similar membrane rigidity as the wild-type strain, which points towards a compensatory effect of the mutations with regard to membrane fluidity. However, the *cls* and *cls/cti* mutants were more sensitive to solvents than the wild-type and the *cti* mutant because of the impaired functioning of efflux drug transporters.

Introduction

The cell envelope in gram-negative bacteria is usually made of an outer membrane and an inner or cytoplasmic membrane. The outer membrane is an asymmetric lipid

bilayer containing lipopolysaccharides, phospholipids and relatively few types of protein. This layer is an efficient permeability barrier. The cytoplasmic membrane is a typical lipid bilayer composed of roughly equal amounts of phospholipids and proteins, and it is primarily responsible for regulating the flow of nutrients and metabolic products in and out of the cell.

In Pseudomonads there are three main phospholipids: phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL) (Schweizer *et al.*, 2004). Although their ratio is influenced by the growth phase, PE is the most abundant and constitutes about 75% of the total phospholipid content. Phosphatidylglycerol and CL account for 25% of total phospholipids, although PG is most abundant in cells in the logarithmic phase whereas CL accumulates in stationary phase cells (Ramos *et al.*, 1997; Bernal *et al.*, 2007). In *Pseudomonas* species the predominant fatty acids are saturated palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0), the mono-unsaturated palmitoleic acid (*cis*- $\Delta^{9,10}$ -16:1) and *cis*-vaccenic acid (*cis*- $\Delta^{11,12}$ -18:1), and a fatty acid with a cyclopropane ring (*cis*-9,10-methylenehexadecanoic acid) known as C17:cyclopropane (Ramos *et al.*, 1997; Schweizer *et al.*, 2004).

Saturated fatty acids pack tightly side by side to optimize their van der Waals interactions, and this results in a rigid form of the membrane that melts at high temperatures. The *cis*-double bond from unsaturated fatty acids introduces a kink in the hydrocarbon chains, which causes a disturbance in the highly-ordered package of the acyl chains; which in turn results in membranes with a relatively high fluidity (Seelig and Waespe-Šarcevic, 1978; Keweloh and Heipieper, 1996). However, the *cis* conformation is not the only form of unsaturated fatty acid; some bacteria contain both *cis* and *trans* positional isomers (Diefenbach *et al.*, 1992). *Trans* unsaturated fatty acids, with their long linear structures, behave more like saturated fatty acids, taking up less volume and creating a more ordered membrane (Diefenbach *et al.*, 1992). Cyclopropane fatty acyl chains seem to confer a certain degree of rigidity to the cell membrane (Jarrell *et al.*, 1983).

Membrane fluidity is maintained within certain limits to allow the membrane to function optimally, a process called "homeoviscous adaptation" (Sinensky, 1974). This process encompasses a variety of mechanisms that change the quantity and composition of lipids to maintain proper membrane structure and function (Sinensky, 1974; Suutari and Laakso, 1994; Heipieper *et al.*, 1992; Diefenbach *et al.*,

Received 22 November 2006; *For correspondence. E-mail jramos@eez.csic.es; Tel (+34) 958181608; Fax (+34) 958135740

1992; Sikkema *et al.*, 1995; Donato *et al.*, 1997, 2000; Ramos *et al.*, 2002).

In the solvent-tolerant bacteria *Pseudomonas putida* DOT-T1E (Ramos *et al.*, 1995) the main changes in response to solvents at the membrane level are the isomerization of *cis* unsaturated fatty acids, and an increase in CL content, although at present how these changes are interrelated in this strain has not been studied. In this study we identify the promoters for the *cls* and *cti* genes encoding cardiolipin synthase and *cis/trans* isomerase, and study whether their expression is fine-tuned in response to growth phase and solvents. In a double *cls/cti* mutant we show that although deficiency in *trans* unsaturated fatty acids results in more fluid membranes, deficiency in CL has the opposite effect, and deficiency in both genes compensates the effect of each. Nonetheless, the double mutant is more sensitive to solvents than parental strains probably because resistance-nodulation-cell division (RND) efflux pumps do not function well.

Results and Discussion

The cti and cls genes are expressed constitutively in P. putida

Our previous studies have shown that several strains of the *P. putida* species reacted to the presence of toluene in the culture medium by extruding the solvent with efflux pumps (Isken and de Bont 1996; Kieboom *et al.*, 1998; Segura *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2002), chaperones that refold denatured proteins (Segura *et al.*, 2005; Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006; Volkers *et al.*, 2006), and modifications at the membrane level such as the isomerization of *cis* unsaturated fatty acids to *trans* in a reaction mediated by the *cis/trans* isomerase, and the increase in CL as a phospholipid head group (Heipieper *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1997; Junker and Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007). The biosynthesis of cardiolipin is mediated by a cardiolipin synthase (Cls) that condenses two PG molecules (Hirschberg and Kennedy, 1972; Tunaitis and Cronan, 1973).

The *cti* and *cls* genes are not linked in the *P. putida* chromosome, and form monocistronic units (Nelson *et al.*, 2002). To analyze the transcriptional expression of these genes we first established their corresponding transcriptional start point (tsp) by primer extension analyses with the appropriate primers. For the *cls* gene we found a single tsp that corresponded to an A located 24 nucleotides upstream from the first A of the proposed ATG start codon

(See Figure 1A). In the -10/-35 region we found hexamers 5'-TCTGTT-3' and 5'-TTGCAG-3', which resembled those proposed to be recognized by RNA polymerase/ σ^{70} in *P. putida* (Figure 1C; Domínguez-Cuevas and Marqués, 2004). For the *cti* gene we also found a major mRNA band whose tsp corresponded to a G located 294 nucleotides upstream from the A of the first ATG (Figure 1B). We again found sequences that resembled -10/-35 hexamer motifs (5'-CACGAT-3' and 5'-TTGGCC-3') recognized by RNA polymerase/ σ^{70} . Therefore the *cti* promoter also seems to be a σ^{70} -dependent promoter (Figure 1C).

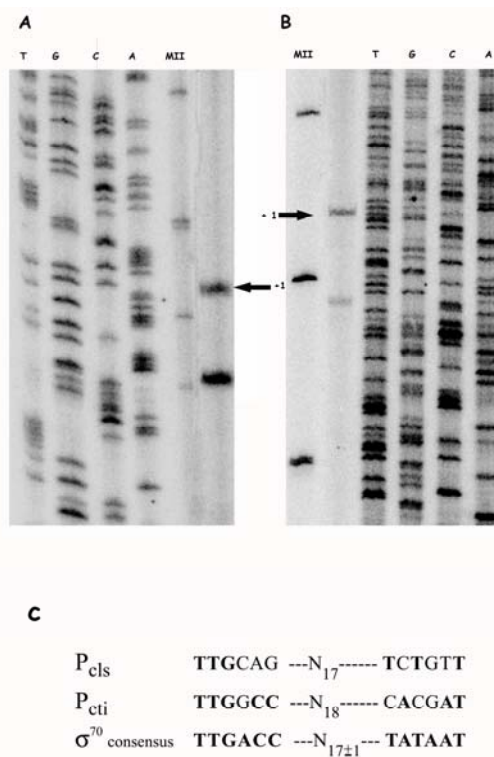


Figure 1. Mapping of the transcription start point of the *cti* and *cls* genes.

Cells of *Pseudomonas putida* DOT-T1E grown overnight in LB medium were diluted 1:100 in the same medium. When the cultures reached a turbidity of 0.7 at 600 nm (exponential phase), 10-ml samples were harvested by centrifugation and RNA was extracted as described (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005). The oligonucleotides 5'-TGAGCTGTCCGCACGGTGAA-3' and 5'-GCCATCACGATTGTGGCC-3' were complementary to the coding strand within the *cti* (A) and *cls* (B) open reading frames respectively. Primer extension analysis of 100 μ g total RNA samples was carried out as described previously (Marqués *et al.*, 1993) using the 32 P-end-labeled oligonucleotide described above. cDNAs were run in urea sequencing gels, and gels were exposed to a phosphor-imaging screen (Fuji Photo Film Co. Ltd.) for 5 to 12 h. Phosphor-imaging screens were scanned with a phosphor-imaging instrument (Molecular imager FX; Bio-Rad). (C) The -10/-35 hexamers of the *cti* and *cls* promoters are shown in alignment with the sigma-70 *Pseudomonas* consensus sequences (Domínguez-Cuevas and Marqués, 2004).

This information was used to generate fusions of the promoter region of the *cls* (P_{cls}) and *cti* (P_{cti}) genes to '*lacZ*' in the low-copy number wide-host range pMP220 vector. These two constructions were used to monitor the expression of the corresponding promoters along the growth curve, and the influence of organic solvents on the expression pattern. We found a relatively high basal level of expression of the *cti* gene in cells growing in LB medium (about 200 Miller units), and expression increased up to 1.5-fold in the early stationary phase (Figure 2). When cells were grown in the presence of toluene a modest but consistent increase (1.1- to 1.4-fold) was observed. These results point towards the constitutive expression of the *cti* gene, however its transcriptional level can increase up to 2-fold in response to different solvents and growth phases. Expression from P_{cls} increased from about 50 Miller units in the early log phase to about 300 Miller units in the stationary phase (Figure 2). In the presence of sublethal toluene concentrations, expression from P_{cls} both in the exponential and in the stationary phase was similar to that in cells not exposed to toluene.

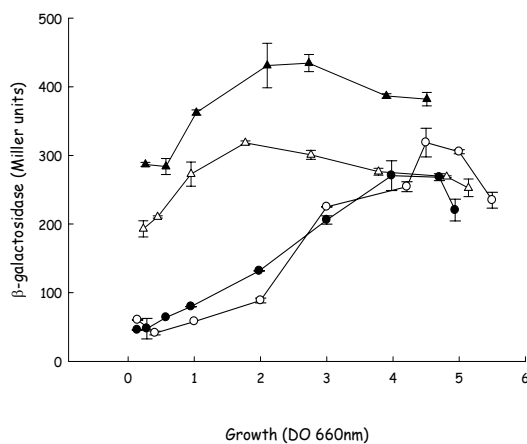


Figure 2. Construction of $P_{cls}::lacZ$ and $P_{cti}::lacZ$ fusions and β -galactosidase assays. *P. putida* DOT-T1E bearing the pMP220 derivative pMPcti ($P_{cti}::lacZ$) (triangles) or pMPcls ($P_{cls}::lacZ$) (circles) was grown overnight on LB medium with tetracycline in the absence (open symbols) or the presence (closed symbols) of toluene. The cultures were then diluted, and when they reached the indicated turbidity, β -galactosidase activity was assayed in permeabilized whole cells according to Miller's method (1972). Data are the average of at least 3 independent assays run in duplicate.

Characteristics of the membranes of the *cti/cls* double mutant

The above series of results indicated that *cti* and *cls* are expressed at a basal level that guarantees sufficient CL and *trans* fatty acids in the membranes of *P. putida*. To study

the potential cooperative or antagonistic effects of changes in CL and *trans* unsaturated fatty acids, we used a genetic approach and generated the corresponding single or double mutants.

Single *cti* and *cls* mutants were available in our research group (Junker and Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007). For the construction of a double *cti/cls* double mutant we used homologous recombination. The *P. putida* DOT-T1E *cti* mutant was used as the parental strain to construct a double *cti/cls* mutant. The *cls* gene was inactivated *in vivo* with the suicide pKNG-CLSGm plasmid, which carries a *cls::Gm* mutant allele and whose construction was described by Bernal *et al.* (2007). Merodiploids were generated and mutants were selected exactly as described by Rodríguez-Herva and Ramos (1996). A derivative of *P. putida* DOT-T1E *cti* in which the *cls* gene was inactivated was called *P. putida* DOT-T1E *cti/cls*. The nature of the *cls* mutation in this strain was confirmed by PCR and Southern blot (not shown).

To characterize the membrane properties in the mutants deficient in unsaturated *trans* isomers, cardiolipin, or both, we first determined membrane rigidity by measuring fluorescence polarization of the diphenylhexatriene probe inserted into the lipid bilayer of the cytoplasmic membranes. In agreement with previous findings in cells growing on LB, the membranes of the *cls* mutant were more rigid than those of the wild-type strain (Figure 3). We found that, as expected, in the *cti* mutant deprived of *trans* unsaturated fatty acids, membranes were less rigid than in the wild-type strain (Figure 3). Membrane characteristics in the double *cti/cls* mutant were intermediate. As expected in all strains under study, a sudden addition of a sublethal toluene concentration to these cultures resulted in the immediate fluidification of the membranes (Figure 3).

We found that like the wild-type strain, the *cti*, *cls* and *cti/cls* mutants were able to grow in LB medium with sublethal toluene concentrations, i.e., 3 mM. Our results showed that long-term incubation of the parental or mutant strains with toluene produced more rigid membranes than in cells grown on LB alone (Figure 3), although the order of membrane rigidity noted earlier (*cls* mutant > wild type \geq *cti/cls* > *cti*) was conserved (Figure 3). As with cells growing on LB alone, the sudden addition of 0.3% (wt/vol) toluene led to fluidification. This set of results therefore showed that the adaptation of *P. putida* to sublethal concentrations of toluene led to increased rigidity regardless of the strain's genetic background. These changes may be related to proteomic alterations, since previous studies found that almost 100 new proteins were synthesized in response to toluene, and levels of existing proteins changed in response to organic solvents (Segura *et al.*, 2005; Volkers *et al.*, 2006).

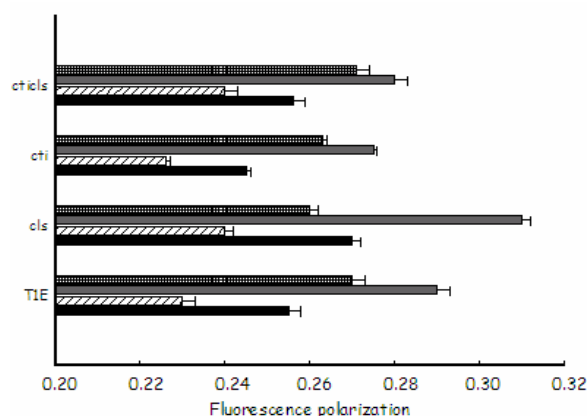


Figure 3. Fluorescence polarization measurements in wild-type *P. putida* DOT-T1E and its mutants. Bacterial cells were grown on LB or LB plus 3 mM toluene supplied via the gas phase. When the cultures reached a turbidity of 0.7 at 660 nm, cells were harvested by centrifugation at $10\,000 \times g$ for 1 min, washed in sterile 15 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) and suspended in the same buffer to a turbidity of 0.2 at 660 nm. Each sample was divided into two aliquots, one was kept as a control and to the other one we added 0.1% toluene (vol/vol). Thereafter, 1 μ l of the fluorescent membrane probe (12 mM stock solution in tetrahydrofuran) was added to 3 ml of the suspended culture in a quartz cuvette to obtain a final concentration of 4 μ M, and the mixture was incubated with magnetic stirring at 200 rpm for 10 min in the dark at 30 °C to allow incorporation of the probe into the cytoplasmic membrane (Trevors, 2003). Fluorescence polarization was measured with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Inc.), as described before (Bernal *et al.*, 2007). Values were analyzed with the FELIX (PTI) software program. The higher the polarization value, the lower the membrane fluidity. The control of cells grown on LB is indicated by black bars and the corresponding sample with added toluene by striped bars. The control of cells grown on LB plus toluene is indicated by grey bars, whereas the corresponding samples with added toluene are shown in squared bars.

Decreased extrusion of drugs in mutants deficient in cardiolipin

The fluidity of biological membranes can be explained according to the fluid mosaic model by Singer and Nicholson (1972). Experimental evidences suggested that cell membranes are laterally polarized to produce specific environments for certain membrane proteins, in particular the polar chemoreceptor proteins, as well as proteins involved in cell division at the midcell and at asymmetrically positioned septa (for a review see Shapiro *et al.*, 2002; Mileykovskaya and Dowhan, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006). Microscopic visualization of membrane lipids in bacterial cells has reinforced the view that bacterial membranes possess structural heterogeneity: uneven distribution of fluorescent lipophilic dyes and selective staining of septal regions has been observed in mycobacteria (Christensen *et al.*, 1999), and CL-specific fluorescent dye has led to the

unequivocal visualization of distinct domains in *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *P. putida* cells (Mileykovskaya *et al.* 2001; Kawai *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007). In contrast, no domain-specific localization of the fluorescent marker was observed in cells carrying a *cls* null mutation that blocked CL synthase in the gram-positive *B. subtilis* and in the gram-negative *P. putida* (Kawai *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007). In this context we showed before that the *cls* mutation affected the correct functioning of the RND efflux pumps (Bernal *et al.*, 2007). This proposal by Bernal *et al.*, (2007) is based on the fact that the rate of accumulation of ethidium bromide in *P. putida cls* mutant cells was higher than in wild-type cells. The observation that the functioning of efflux transporters could be influenced by bacterial phospholipid composition was already envisaged by White's group some 30 years ago (Ono and White, 1971).

Consistent with the rigidity studies described above, our present results show that the entry of ethidium bromide into CCCP-treated *cti* mutant cells was 1.4-fold faster than in the parental strain, whereas the rate of entry in the *cls* mutant was 1.4-fold slower, and the introduction of a *cls* mutation into the *cti* mutant produced a compensatory effect, so that the rate of entry was similar to that determined for the wild-type strain. To investigate the impact of the deficiency in *trans* unsaturated fatty acids and/or of cardiolipin in the cell membranes on the functioning of RND efflux pumps, we tested the extrusion of ethidium bromide in *cti*, *cls* and *cti/cls* mutants in relation to the parental strain. In the *cti* mutant the rate of accumulation of ethidium bromide was similar to that in the parental strain (Figure 4). In the *cti/cls* double mutant, the rate of extrusion was slower than in the wild type, consequently ethidium bromide accumulated at a 2-fold higher rate than in the *cti* mutant. These results indicated that membrane rigidity was altered in the *cti*, *cls* and *cti/cls* mutants, whereas deficient efflux pump functioning remained mainly linked to the *cls* deficiency. The molecular mechanism behind the deficiency in RND functioning is unknown; however, it should be taken into account that certain membrane proteins with affinity to CL may have a role in the stabilization of CL patches. It has been established that the head-group array, formed within patches of CL, might allow certain membrane proteins to bind specifically to the patches, e.g. the MurG protein or the photosynthetic reaction centers in photoautotrophic bacteria (van den Brink-van der Laan, 2003; Fyfe and Jones, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006). Therefore, deficient RND efflux pump functioning may be related to the improper insertion of the efflux pump component proposed to interact with the fatty acids (Murakami *et al.*, 2002).

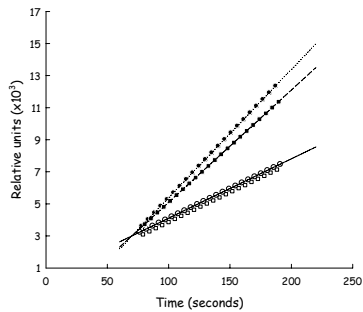


Figure 4. Accumulation of ethidium bromide in DOT-T1E and its isogenic mutants. Experiments were done basically as described by Ocaktan *et al.* (1997). Cells were harvested by centrifugation when cultures reached a turbidity of 0.6-0.7 at 660 nm, washed once with 100 mM NaCl and 50 mM potassium phosphate, and suspended again in the same buffer at $A_{660} = 0.3$. Ethidium bromide dissolved in water was added at a final concentration of 10 μ M. Fluorescence was measured at 30 °C with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Inc.). The excitation and emission wavelengths were 520 and 590 nm, respectively, and slit widths were 5 nm for excitation and 10 nm for emission. \circ , wild-type; \diamond , *cti* mutant; \bullet , *cls* mutant; \blacklozenge , *cti/cls* mutant.

Response of *P. putida* DOT-T1E and isogenic *cti*, *cls* and *cti/cls* mutants to toluene

Although toluene itself does not have a very strong effect on

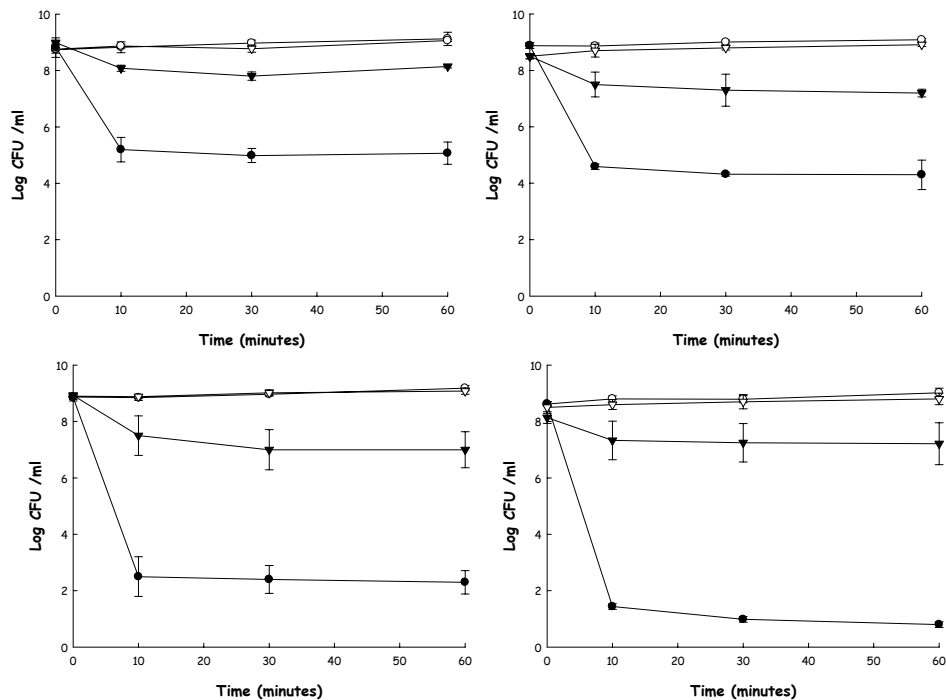


Figure 5. Survival in response to toluene shocks. Cells were grown overnight on LB liquid medium (circles) or on LB liquid medium plus toluene supplied in the gas phase (triangles). Then cultures were diluted 1:100 and grown under the same conditions until they reached a turbidity of about 0.8 at 660 nm. These cultures contained about 10^9 CFU/ml. The cultures were divided into two halves; to one 0.3% (vol/vol) toluene was added ($t = 0$) (closed symbols), and the other was kept as a control (open symbols). The number of viable cells was determined before toluene was added and 10, 30 and 60 min after toluene addition.

the level of expression of the *cti* and *cls* genes, inactivation of these genes resulted in alterations in membrane rigidity and in efflux pump functioning. This led us to test the survival of DOT-T1E and its isogenic mutants after toluene exposure. We cultured *P. putida* DOT-T1E, each of the single *cti* and *cls* mutants, and the double *cti/cls* mutant until the late log phase in the absence and in the presence of sublethal concentrations of toluene, and then subjected the cultures to a toluene shock. In cells grown in the absence of toluene we found that the survival of the wild-type and *cti* mutant cells was on the order of 10^{-4} (Figure 5), whereas survival of the *cls* mutant was approximately 5×10^{-7} and survival of the double mutant was on the order of 3×10^{-8} (Figure 5). These results indicated that the double *cti/cls* mutation had a more acute effect than the *cti* mutation itself, although the combination of both mutations exacerbated sensitivity to a solvent shock. When cells were induced with low concentrations of toluene, the wild type, *cti*, *cls* and double *cti/cls* mutants exhibited a survival rate of about 10^{-1} . Together these results suggest that once the adaptive machinery of *Pseudomonas putida* is induced against solvents, the effects of mutations that affect membrane phospholipids are compensated for.

Acknowledgments

This study was supported by grants BIO2003-0515, BIO2006-06558, VEM2004-08560 and VEM2003-20025. We thank C. Lorente for secretarial assistance and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

References

- Aranda-Olmedo I., Ramos, J. L. and Marqués, S. (2005) Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWWO. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4191-4198
- Bernal P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J.L. and Segura, A. (2007) A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthase mutant exhibits increased sensitivity to drugs *Environ. Microbiol.* In press
- Christensen, H., Garton, N.J., Horobin, R.W., Minnikin, D.E., and Barer, M.R. (1999) Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes. *Mol Microbiol* **31**: 1561–1572.
- Diefenbach, R., Heipieper, H. J. and Keweloh, H. (1992) The conversion of *cis*- into *trans*-unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:382-387.
- Domínguez-Cuevas, P. and Marqués, S. (2004). Compiling sigma-70 dependent promoters. In *Pseudomonas* vol. II, pp. 319-344. Ed. J.L. Ramos. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L. and de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* **281**: 11981-11991.
- Donato M. M., Jurado, A. S., Antunes-Madeira, M. C. and Madeira, V. M. (1997) Effects of a lipophilic environmental pollutant (DDT) on the phospholipid and fatty acid contents of *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 341-349.
- Donato M. M., Jurado, A. S., Antunes-Madeira, M. C. and Madeira, V. M. (2000) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem* **66**: 199-232.
- Fyfe, P.K., and Jones, M.R (2005) Lipids in and around photosynthetic reaction centres. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, part 5.
- Heipieper, H., Diefenbach, J.R., and Keweloh, H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852.
- Hirschberg, C. B. and Kennedy, E. P. (1972) Mechanism of the enzymatic synthesis of cardiolipin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **69**:648-51.
- Isken, S. and de Bont, J. A. (1996) Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**: 6056-6058.
- Jarrell, H. C., Tulloch, A. P. and Smith, I. C. P. (1983) Relative roles of cyclopropane-containing and *cis*-unsaturated fatty acids in determining membrane properties of *Acholeplasma laidlawii*: a deuterium nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **22**: 5611-5619.
- Junker, F. and Ramos, J.L. (1999) Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **181**: 5693-5700.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., and Matsumoto, K. (2004) Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J. Bacteriol.* **186**: 1475–1483.
- Keweloh, H. and Heipieper, H. J. (1996) *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**: 1233-1236.
- Kieboom, J., Dennis, J. J., de Bont, J. A. M. and Zylstra, G. J. (1998) Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* **273**:85-91.
- Marqués, S., Ramos, J. L. and Timmis, K. N. (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL *meta* fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and the *xylFJ* region. *Biochim. Biophys. Acta* **1216**:227–237.
- Matsumoto, K., Kusata, J., Nishibori, A., and Hara, H. (2006) Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* **61**: 1110-1117.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., Lutterodt, L., and Haines, T.H. (2001) Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett* **507**: 187–190.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 135–142.
- Miller J. 1972. Experiments in molecular genetics. P.352-355 Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N.Y.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamshita, E. and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587-593.

- Nelson, K.E., C. Weinel, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J.A. Eisen, K.N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler, and C.M. Fraser. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:799–808.
- Ocaktan A., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1997) Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21964–21969.
- Ono, Y. and White, D. C. (1971). Consequences of the inhibition of cardiolipin metabolism in *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Bacteriol.* **108**:1065-1071.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., and Haïdour, A. (1995) Isolation and expansion of the catabolic potencial of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes F. and Fernández-Barrero, A. (1997) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890.
- Ramos J. L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., Terán, W. and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:743-768.
- Rodríguez-Herva, J.J., and Ramos, J.L. (1996) Characterization of an OprL null mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **178**: 5836-5840.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L. and Segura, A. (2001) Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**:3967-3973.
- Schweizer, H.P. (2004) Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads. In: *Pseudomonas* vol. III. Editor J.L. Ramos. Kluwer. London. Chap. 3, pp: 83-110.
- Seelig, J. and Waespe-Šarcevic, N. (1978) Molecular order in *cis* and *trans* unsaturated phospholipids bilayers. *Biochemistry* **17**: 3310-3315.
- Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J.L. and Junker, F. (1999) Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**: 191-198.
- Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S. and Ramos, J.L. (2005) Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J. Bacteriol.* **187**:5937-5945.
- Shapiro, L., McAdams, H.H., and Losick, R. (2002) Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**: 1942–1946.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of the membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 522-525.
- Singer, S. L. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**:720-731.
- Suutari, M. and Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 285-328.
- Trevors, J.T. (2003) Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* **57**:87-103.
- Tunaitis, E. and Cronan, J. E. (1973) Characterization of the cardiolipin synthetase activity of *Escherichia coli* envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**:420-427.
- Van den Brink-van der Laan, E., Boots, J.-W. P., Spelbrink, R. E. J., Kool, G. M., Breukink, E., Killian, J. A. and de Kruijff, B. (2003) Membrane interaction of the glycosyltransferase MurG: a special role for cardiolipin. *J. Bacteriol.* **185**: 3773-3779.
- Volkers R. J., de Jong, A. L., Hulst, A. G., van Baar, B. L., de Bont, J. A. and Wery, J. (2006) Chemostat-based proteomic analysis of toluene-affected *Pseudomonas putida* S12. *Environ. Microbiol.* **8**:1674-1679.

DISCUSIÓN GENERAL

La envoltura celular de las bacterias gram negativas es la frontera que mantiene independizado el interior del microorganismo del medio externo. Este contorno permite la comunicación y a la vez el aislamiento de la célula, imprescindibles ambos para el correcto funcionamiento celular.

Las funciones típicamente asignadas a las membranas han ido cambiando a medida que aumentaba el conocimiento de las mismas. De ser consideradas únicamente las barreras físicas que mantenían la morfología celular, pasaron a ser consideradas como parte importante en la entrada de nutrientes y también en la comunicación con el medio externo. Actualmente se sabe que participan de forma activa en procesos tan sumamente importantes como la división celular, la generación de energía, la resistencia a drogas, etc. (Kadner, 1996; Schweizer, 2004) En estos cambios ha sido fundamental el reconocimiento de los lípidos de membrana no sólo como meros “soportes” de proteínas, sino como componentes esenciales para el perfecto funcionamiento de las funciones celulares. Las interacciones lípidos-proteínas han cobrado un gran protagonismo, la unión a lípidos es imprescindible para el correcto funcionamiento de multitud de proteínas de membrana. Por ejemplo, los centros activos en bacterias fotosintéticas (Fyfe y Jones, 2005) o los supercomplejos de la cadena respiratoria en levaduras (Pfeiffer *et al.*, 2003). Incluso existen los primeros cristales de proteínas con ácidos grasos unidos formando así un verdadero complejo funcional (Hamilton, 2004; Kolbe *et al.*, 2000). Además, el avance de las técnicas moleculares de estudio de lípidos ha evidenciado que la membrana es un mosaico compuesto por multitud de dominios lipídicos específicamente situados y con funciones determinadas (Matsumoto *et al.*, 2006).

Una de las funciones generales de membrana más interesantes y quizás menos conocida es la de censar cambios del medio externo. Las membranas tienen la capacidad de reaccionar a estos cambios modificando su composición, optimizándola de forma que pueda superar la alteración lo más eficientemente posible desde el punto de vista de la supervivencia. Todos los lípidos de las bacterias gram negativas son fosfolípidos, que difieren unos de otros por su composición de ácidos grasos y su grupo de cabeza. Teniendo en cuenta que hay alrededor de 12 especies distintas de ácidos grasos y diversos grupos de cabeza, la variedad de especies moleculares diferentes que se pueden

encontrar en una membrana es enorme. La diferencia estructural de cada una de estas especies jugará un papel determinado a la hora de regular y modificar la membrana. A esta variación en forma y cantidad se le denomina adaptación homeoviscosa y aunque fue descrita por primera vez por (Sinensky, 1974), los detalles más moleculares de esta adaptación no se han comenzado a conocer hasta finales de 1990 (Beney y Gervais, 2001; Cronan, Jr., 2002; Denich *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997).

En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos (DOT) de la Estación Experimental del Zaidín se estudian distintos procesos relacionados con la biodegradación de contaminantes ambientales. Entre ellos, la tolerancia a tolueno de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E; la regulación de distintas rutas catabólicas de degradación de tolueno en *Pseudomonas putida* KT2440 y DOT-T1E, y la utilización de estas cepas con capacidad biodegradativa en procesos de biorremediación (para lo cual se estudia la colonización de semillas o el proceso de liofilización como sistema de conservación de cepas a largo plazo).

Entre las muchas observaciones obtenidas de estas líneas de investigación, existían una serie de datos que nos sugerían que las membranas cumplían una función importante frente a diferentes estreses. Los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre distintas respuestas bacterianas a estrés se enfocaban principalmente desde un punto de vista fisiológico, y nunca se había profundizado demasiado en la bioquímica de los lípidos.

Los resultados que se muestran en esta Tesis Doctoral provienen del estudio de cómo algunos estreses producen cambios importantes en la composición de las membranas; por ejemplo, el aumento de los niveles de cardiolipina durante la exposición a tolueno y el aumento en los niveles de ciclopropano en la fase estacionaria de crecimiento, que es a su vez la fase óptima para llevar a cabo el proceso de liofilización). Así mismo se ha estudiado cómo las modificaciones en algunos componentes de membrana (ausencia de ciclopropano o disminución de la cantidad de cardiolipina) provocan una disminución de la supervivencia tras el estrés, concretamente liofilización en el caso del ciclopropano y choque de tolueno en el caso de la cardiolipina.

La construcción de mutantes en cada uno de los genes identificados *in silico* (*cfaA*, *cfaB* y *cls*) nos permitió demostrar la función que a cada uno de ellos se les había asignado hasta el momento tan sólo por su homología con los correspondientes genes de *Escherichia coli*. De hecho, y aunque el gen *cfaA* estaba descrito como una ciclopropano sintasa, el mutante nulo en este gen no tenía alterado significativamente el perfil de ácidos grasos con respecto a la cepa silvestre, mientras que el gen *cfaB* que estaba descrito sólo como una posible ciclopropano sintasa resultó ser el principal gen responsable de la síntesis de este ácido graso en *Pseudomonas putida*. El mutante nulo *cfaB* carecía totalmente de ácidos grasos ciclopropano. El posible papel de *cls* en la síntesis de cardiolipina quedó también demostrado cuando se analizó el perfil de fosfolípidos y se comprobó que el mutante nulo tenía niveles disminuidos de este fosfolípido comparado con la cepa silvestre. Las posibles razones por las cuales el mutante nulo no carece totalmente de cardiolipina se discuten en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

Aunque a lo largo de esta Tesis Doctoral se ha demostrado que tanto *cfaB* como *cls* son genes que codifican proteínas importantes en la respuesta a cambios en el medio ambiente (el mutante *cfaB* sobrevive peor tras la liofilización y el mutante *cls* es más sensible a disolventes orgánicos y diferentes antibióticos), el papel que cada uno de estos elementos de membrana juega en respuesta a estos estreses no se conoce bien. Los ácidos grasos que tienen un anillo ciclopropano en su cadena hidrocarbonada poseen una configuración distinta al resto de ácidos grasos y parece que estabilizan los lípidos de membrana protegiéndoles frente a la degradación (Macdonald *et al.*, 1985). El hecho de que estos ácidos grasos se acumulen en fase estacionaria, donde el estado fisiológico de la bacteria se corresponde con el de una situación de estrés parece indicar que ciertamente poseen un papel protector frente a situaciones comprometidas. Por otro lado, la cardiolipina también tiene una configuración particular, con cuatro cadenas acilo y dos grupos fosfato. El efecto que un aumento o disminución de este grupo de cabeza tiene en las membranas biológicas ha sido también muy discutido. Algunos autores indican que el aumento en cardiolipina provocaría un aumento de la fluidez de membrana mientras que otros sugieren lo contrario (Haines y Dencher, 2002). Utilizando sondas fluorescentes hemos comprobado que una disminución en el

contenido de CL en *Pseudomonas putida* DOT-T1E provoca una disminución de la fluidez de la membrana.

Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, sugieren que en el mutante nulo *cls* se está produciendo una desorganización de las bombas de extrusión RND que participan en la tolerancia a tolueno y a diferentes antibióticos, y apoyaría el papel de determinados fosfolípidos en la estabilización y correcto funcionamiento de las proteínas de membrana (Bogdanov *et al.*, 2002; Kusters *et al.*, 1991; Pfeiffer *et al.*, 2003; van Klompenburg y de Kruijff, 1998; Zhang *et al.*, 2002)

Esta participación de los componentes lipídicos de la membrana en las funciones celulares es un campo de investigación que está aportando novedades importantes no sólo en el campo de la Microbiología, sino también en el ámbito de la Biología de eucariotas. No hay que olvidar que una de las primeras observaciones que se hicieron con respecto a la implicación de la cardiolipina en procesos celulares fue su participación en el correcto funcionamiento del complejo respiratorio mitocondrial, actuando como elemento de unión de forma que permitía la interacción de algunos de los componentes del complejo (Pfeiffer *et al.*, 2003).

Aunque nuestro interés primordial al realizar estos estudios se centraba en la respuesta a estrés, observamos otra serie de fenotipos asociados a las mutaciones no descritos hasta el momento. El más destacado fue la diferencia de tamaño entre las colonias de la estirpe silvestre y las de la estirpe mutante. Esta variación en el tamaño de colonia correlacionó bien con el tamaño celular, llevándonos a la conclusión de que el contenido en cardiolipina influía en la longitud final de la bacteria. Se observó que las células mutantes tenían un diámetro menor que las silvestres. Está descrito en la literatura que diferentes cambios en las proporciones de los fosfolípidos aniónicos pueden alterar algunos de los procesos de división celular (Mileykovskaya y Dowhan, 2005), lo que en nuestro caso podría estar conduciendo a una división prematura, antes de que la célula haya alcanzado el tamaño medio que alcanzan las células silvestres.

Evidentemente, el nivel de complejidad de las respuestas a estrés no se puede reducir a un solo cambio o a una sola modificación en los componentes de la membrana. Al igual que en presencia de concentraciones subletales de tolueno en las células de *Pseudomonas putida* DOT-T1E hay al menos 134 proteínas que ven aumentados sus

niveles y al menos 117 que los ven reducidos (Segura *et al.*, 2005), los cambios que se produzcan a nivel lipídico involucrarán multitud de factores y componentes. Un estudio lipidómico en el que se determinen no sólo los lípidos sino también la concentración de éstos en su localización intracelular específica y que incluya además las enzimas del metabolismo lipídico así como las responsables de su transporte, su especificidad, localización y regulación nos daría una información más completa de los procesos específicos de respuesta a estrés en las membranas. Este estudio requiere de la comprensión de las propiedades físicas de los lípidos y las membranas, especialmente las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Aunque en eucariotas todos estos estudios comienzan a ser comunes (van Meer, 2005) no ocurre lo mismo en organismos procariontes donde los datos que aparecen al respecto en la literatura son muy escasos. Aún así, en nuestro trabajo hemos podido observar varios cambios e interrelaciones entre lípidos, como la observación de un aumento en la isomerización *cis-trans* y en la síntesis de cardiolipina en respuesta a tolueno. Parecía lógico suponer que ambos cambios eran necesarios para una mejor respuesta. Sin embargo al estudiar el potencial papel cooperativo o los efectos antagonistas de estos dos cambios, mediante ensayos con los mutantes sencillos y con el doble mutante, comprobamos que ambos procesos no actuaban conjuntamente respecto al funcionamiento de las bombas (tan sólo la disminución del contenido de cardiolipina era responsable de este fenotipo), aunque tanto la *cis-trans* isomerasa como la cardiolipina sintasa participaban conjuntamente en la regulación de la fluidez de membrana (con efectos opuestos).

Esta actuación conjunta en la regulación de la fluidez de la membrana abre otro interrogante; ¿supone la respuesta a tolueno un aumento de los isómeros *trans* y por tanto un aumento de la rigidez de la membrana?, si el aumento en el contenido de CL conlleva una fluidificación de la membrana, ¿cómo pueden estos dos fenómenos contradictorios darse en la misma membrana en respuesta al mismo estrés? La participación de los isómeros *trans* en el aumento de rigidez de la membrana es una respuesta casi inmediata (ya se observa claramente cinco minutos después de la adición de tolueno) y contribuye en cierta medida a evitar la entrada de tolueno. Probablemente este sea un mecanismo de adaptación a la presencia de bajas concentraciones de tolueno. El aumento de la síntesis de cardiolipina es una respuesta a largo plazo, y

podría estar favoreciendo la estabilidad de ciertas proteínas de membrana, entre ellas las bombas de extrusión (que también se sintetizan en respuesta a tolueno). Una vez estabilizadas estas proteínas y funcionando los mecanismos de extrusión activa del compuesto tóxico, las barreras de fluidez de membrana tendrían una importancia menor en el proceso de supervivencia.

Este conjunto de resultados pone de manifiesto la importancia de las diferentes especies moleculares de lípidos de membrana y su regulación en la respuesta a estrés. Así, las bacterias tienden a tener una membrana lo más plástica posible que pueda adaptarse a los diferentes ambientes que la rodean tratando de minimizar los daños que los distintos agentes estresantes provocan.

CONCLUSIONES

1. *P. putida* KT2440 es más resistente a estrés por liofilización si las células están en fase estacionaria de crecimiento y si se usan disacáridos como lioprotectores.
2. El mutante *cfaB* de *P. putida* KT2440 tiene niveles casi imperceptibles de C17:ciclopropano y es más sensible al proceso de liofilización que la cepa silvestre.
3. El mutante *cls* de *P. putida* DOT-T1E tiene niveles reducidos de cardiolipina en sus membranas y la distribución de la cardiolipina residual es uniforme a lo largo de la membrana en lugar de formar los dominios que se observan en la cepa silvestre.
4. Además es más sensible a antibióticos y tolueno debido a un mal funcionamiento de las bombas que extruyen estas drogas.
5. Las colonias del mutante *cls* de *P. putida* DOT-T1E son de menor tamaño que las colonias de la cepa silvestre. A su vez las células tiene menor diámetro.
6. Los genes *cls* y *cti* se transcriben desde promotores dependientes de sigma-70. La transcripción desde el promotor *cls* es mayor en fase estacionaria mientras que desde el promotor *cti* es constante a lo largo de la curva de crecimiento y se induce en presencia de tolueno.
7. La mutación *cls* provoca una disminución de la fluidez de membrana. La mutación *cti* un aumento de la misma. Cuando se dan las dos mutaciones juntas se observa un efecto compensatorio.
8. El doble mutante *cti/cls* es más sensible a tolueno que las cepas silvestres. El mal funcionamiento de las bombas de extrusión en este doble mutante se debe únicamente a la mutación *cls*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beney L, Gervais P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:34-42
2. Bogdanov M, Heacock PN, Dowhan W. 2002. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.* 21:2107-16
3. Campbell JW, Cronan JE, Jr. 2001. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:305-32
4. Chang YY, Cronan JE, Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:249-59
5. Chang YY, Eichel J, Cronan JE, Jr. 2000. Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *J. Bacteriol.* 182:4288-94
6. Chang YY, Kennedy EP. 1967. Biosynthesis of phosphatidyl glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J Lipid Res.* 8:447-55
7. Cronan JE, Jr. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:202-5
8. Cronan JE, Jr., Rock CO. 1996. Biosynthesis of Membrane Lipids. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Link, KB Low, WS Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger, Washington, D. C.: ASM Press

9. Crowfoot PD, Hunt AL. 1970. Induced synthesis of cyclopropane fatty acid synthetase in *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* 218:555-7
10. Cullis PR, de Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559:399-420
11. DeChavigny A, Heacock PN, Dowhan W. 1991. Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* 266:5323-32
12. Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods* 52:149-82
13. Dowhan W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66:199-232
14. Dubois-Brissonnet F, Malgrange C, Guerin-Mechin L, Heyd B, Leveau JY. 2001. Changes in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by growth conditions: consequences of resistance to quaternary ammonium compounds. *Microbios* 106:97-110
15. Emoto K, Umeda M. 2001. Membrane lipid control of cytokinesis. *Cell Struct. Funct.* 26:659-65
16. Funk CR, Zimniak L, Dowhan W. 1992. The *pgpA* and *pgpB* genes of *Escherichia coli* are not essential: evidence for a third phosphatidylglycerophosphate phosphatase. *J Bacteriol.* 174:205-13

17. Fyfe PK, Jones MR. 2005. Lipids in and around photosynthetic reaction centres. *Biochem. Soc. Trans.* 33:924-30
18. Gopalakrishnan AS, Chen YC, Temkin M, Dowhan W. 1986. Structure and expression of the gene locus encoding the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 261:1329-38
19. Grogan DW, Cronan JE, Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:429-41
20. Haines TH, Dencher NA. 2002. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 528:35-9
21. Hamilton JA. 2004. Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us. *Prog. Lipid Res.* 43:177-99
22. Hancock RE. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* 5:37-42
23. Hartig C, Loffhagen N, Harms H. 2005. Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1915-22
24. Hawrot E, Kennedy EP. 1975. Biogenesis of membrane lipids: mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive phosphatidylserine decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:1112-6
25. Heacock PN, Dowhan W. 1987. Construction of a lethal mutation in the synthesis of the major acidic phospholipids of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262:13044-9

26. Heath RJ, Rock CO. 2000. A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* 406:145-6
27. Heath RJ, Su N, Murphy CK, Rock CO. 2000. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 275:40128-33
28. Heipieper HJ, Diefenbach R, Keweloh H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1847-52
29. Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A. 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:1-7
30. Hiraoka S, Matsuzaki H, Shibuya I. 1993. Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 336:221-4
31. Hirschberg CB, Kennedy EP. 1972. Mechanism of the enzymatic synthesis of cardiolipin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69:648-51
32. Hoang TT, Schweizer HP. 1997. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *J Bacteriol.* 179:5326-32

-
33. Homma H, Nishijima M, Kobayashi T, Okuyama H, Nojima S. 1981. Incorporation and metabolism of 2-acyl lysophospholipids by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 663:1-13
 34. Hsu L, Jackowski S, Rock CO. 1989. Uptake and acylation of 2-acyl-lysophospholipids by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171:1203-5
 35. Huijbregts RP, de Kroon AI, de Kruijff B. 2000. Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1469:43-61
 36. Icho T, Raetz CR. 1983. Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol.* 153:722-30
 37. Jackowski S, Jackson PD, Rock CO. 1994. Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:2921-8
 38. Jacques NA, Hunt A. 1980. Studies on cyclopropane fatty acid synthesis. Effect of carbon source and oxygen tension on cyclopropane fatty acid synthetase activity in *Pseudomonas denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 619:453-70
 39. Junker F, Ramos JL. 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 181:5693-700
 40. Kadner R. 1996. Cytoplasmic Membrane. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Link, KB Low, WS Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger, Washington, DC.: ASM Press

41. Kanfer J, Kennedy EP. 1964. Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 239:1720-6
42. Kawai F, Shoda M, Harashima R, Sadaie Y, Hara H, Matsumoto K. 2004. Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J. Bacteriol.* 186:1475-83
43. Killian JA, Koorengel MC, Bouwstra JA, Gooris G, Dowhan W, de Kruijff B. 1994. Effect of divalent cations on lipid organization of cardiolipin isolated from *Escherichia coli* strain AH930. *Biochim. Biophys. Acta* 1189:225-32
44. Kim IS, Lee H, Trevors JT. 2001. Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and biphenyl on cell membranes of *Ralstonia eutropha* H850. *FEMS Microbiol. Lett.* 200:17-24
45. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37:239-53
46. Kolbe M, Besir H, Essen LO, Oesterhelt D. 2000. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* 288:1390-6
47. Koppelman CM, den Blaauwen T, Duursma MC, Heeren RM, Nanninga N. 2001. *Escherichia coli* minicell membranes are enriched in cardiolipin. *J. Bacteriol.* 183:6144-7
48. Kusters R, Dowhan W, de Kruijff B. 1991. Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes. *J. Biol. Chem.* 266:8659-62

49. Kutchma AJ, Hoang TT, Schweizer HP. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD). *J Bacteriol.* 181:5498-504
50. Laird MW, Kloser AW, Misra R. 1994. Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 176:2259-64
51. Loffhagen N, Hartig C, Benndorf D, Babel W. 2002. Effects of growth temperature and lipophilic carbon sources on the fatty acid composition and membrane lipid fluidity of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *Acta Biotechnologica* 22:235-43
52. Lopez CS, Alice AF, Heras H, Rivas EA, Sanchez-Rivas C. 2006. Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* 152:605-16
53. Lopez-Lara IM, Geiger O. 2001. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. *J Biotechnol.* 91:211-21
54. Macdonald PM, Sykes BD, McElhaney RN. 1985. Fluorine-19 nuclear magnetic resonance studies of lipid fatty acyl chain order and dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B membranes. A direct comparison of the effects of *cis* and *trans* cyclopropane ring and double-bond substituents on orientational order. *Biochemistry* 24:4651-9
55. Marrakchi H, Zhang YM, Rock CO. 2002. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30:1050-5

56. Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H. 2006. Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular Microbiology* 61:1110-7
57. Matsumoto K. 2001. Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol. Microbiol.* 39:1427-33
58. Mileykovskaya E, Dowhan W. 2000. Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *J. Bacteriol.* 182:1172-5
59. Mileykovskaya E, Dowhan W. 2005. Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:135-42
60. Mileykovskaya E, Dowhan W, Birke RL, Zheng D, Lutterodt L, Haines TH. 2001. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett.* 507:187-90
61. Moran AP. 1996. Bacterial surface structures--an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16:61-2
62. Muller S, Ullrich S, Losche A, Loffhagen N, Babel W. 2000. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Methods* 40:67-77
63. Munoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL. 2006. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:472-7
64. Nikaido H. 1996. Outer Membrane. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC

- Link, KB Low, WS Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger, pp. 29-47. Washington, D. C.: ASM Press
65. Nikaido H. 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* 181:4-8
66. Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32
67. Nishibori A, Kusaka J, Hara H, Umeda M, Matsumoto K. 2005. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* 187:2163-74
68. Nishijima M, Bulawa CE, Raetz CR. 1981. Two interacting mutations causing temperature-sensitive phosphatidylglycerol synthesis in *Escherichia coli* membranes. *J Bacteriol.* 145:113-21
69. Nishijima M, Raetz CR. 1979. Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 254:7837-44
70. Ocaktan A, Yoneyama H, Nakae T. 1997. Use of Fluorescence Probes to Monitor Function of the Subunit Proteins of the MexA-MexB-OprM Drug Extrusion Machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 272:21964-9
71. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H. 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278:52873-80

72. Pinkart HC, Wolfram JW, Rogers R, White DC. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1129-32
73. Pluschke G, Hirota Y, Overath P. 1978. Function of Phospholipids in *Escherichia coli* - Characterization of A Mutant Deficient in Cardiolipin Synthesis. *J. Biol. Chem.* 253:5048-55
74. Raetz CR. 1976. Phosphatidylserine synthetase mutants of *Escherichia coli*. Genetic mapping and membrane phospholipid composition. *J Biol Chem* 251:3242-9
75. Raetz CR, Larson TJ, Dowhan W. 1977. Gene cloning for the isolation of enzymes of membrane lipid synthesis: phosphatidylserine synthase overproduction in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:1412-6
76. Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, Segura A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:743-68
77. Ramos JL, Duque E, Huertas MJ, Haidour A. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* 177:3911-6
78. Ramos JL, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, Godoy P, Haidour A, Reyes F, Fernandez-Barrero A. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272:3887-90

-
79. Ried G, Hindennach I, Henning U. 1990. Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC, and OmpF. *J Bacteriol.* 172:6048-53
80. Rietveld AG, Chupin VV, Koorengel MC, Wienk HL, Dowhan W, de Kruijff B. 1994. Regulation of lipid polymorphism is essential for the viability of phosphatidylethanolamine-deficient *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 269:28670-5
81. Rietveld AG, Killian JA, Dowhan W, de Kruijff B. 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268:12427-33
82. Rock CO. 1984. Turnover of fatty acids in the 1-position of phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259:6188-94
83. Schweizer HP. 2004. Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads. In *Pseudomonas. Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, ed. Juan-Luis Ramos, pp. 83-109. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers
84. Segura A, Godoy P, van Dillewijn P, Hurtado A, Arroyo N, Santacruz S, Ramos JL. 2005. Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J. Bacteriol.* 187:5937-45
85. Segura A, Heipieper HJ, Teran W, Guazzaroni ME, Rojas A, Duque E, Gallegos MT, Ramos JL. 2004. Enzymatic activation of the *cis-trans* isomerase and transcriptional regulation of efflux pumps in *Pseudomonas putida* solvent

- tolerance. In *Pseudomonas. Virulence and Gene Regulation*, ed. Juan-Luis Ramos, pp. 479-508. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers
86. Shibuya I, Miyazaki C, Ohta A. 1985. Alteration of phospholipid composition by combined defects in phosphatidylserine and cardiolipin synthases and physiological consequences in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161:1086-92
87. Shinitzky M, Barenholz Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 515:367-94
88. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59:201-22
89. Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71:522-5
90. Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-31
91. Takayama K, Qureshi N, Mascagni P, Nashed MA, Anderson L, Raetz CR. 1983. Fatty acyl derivatives of glucosamine 1-phosphate in *Escherichia coli* and their relation to lipid A. Complete structure of A diacyl GlcN-1-P found in a phosphatidylglycerol-deficient mutant. *J Biol Chem* 258:7379-85
92. Teran W, Krell T, Ramos JL, Gallegos MT. 2006. Effector-repressor interactions. Binding of a single effector molecule to the operator bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.*

93. Trevors JT. 2003. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* 57:87-103
94. Tunaitis E, Cronan JE, Jr. 1973. Characterization of the cardiolipin synthetase activity of *Escherichia coli* envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.* 155:420-7
95. Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56:395-411
96. van Klompenburg W, de Kruijff B. 1998. The role of anionic lipids in protein insertion and translocation in bacterial membranes. *J. Membr. Biol.* 162:1-7
97. van Meer G. 2005. Cellular lipidomics. *EMBO J* 24:3159-65
98. von Wallbrunn A, Heipieper HJ, Meinhardt F. 2002. *Cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in a cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:179-85
99. Walz AC, Demel RA, de Kruijff B, Mutzel R. 2002. Aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* binds to the cytoplasmic membrane through an amphipathic alpha-helix. *Biochem. J* 365:471-9
100. Wang AY, Cronan JE, Jr. 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol. Microbiol.* 11:1009-17
101. Wang AY, Grogan DW, Cronan JE, Jr. 1992. Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site. *Biochemistry* 31:11020-8

102. Weber FJ, de Bont JA. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1286:225-45
103. Weber FJ, Isken S, de Bont JA. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* 140 (Pt 8):2013-7
104. Weiss DS. 2004. Bacterial cell division and the septal ring. *Mol. Microbiol.* 54:588-97
105. Wilderman PJ, Vasil AI, Martin WE, Murphy RC, Vasil ML. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J. Bacteriol.* 184:4792-9
106. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. 2002. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 277:43553-6
107. Zhu K, Choi KH, Schweizer HP, Rock CO, Zhang YM. 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 60:260-73

