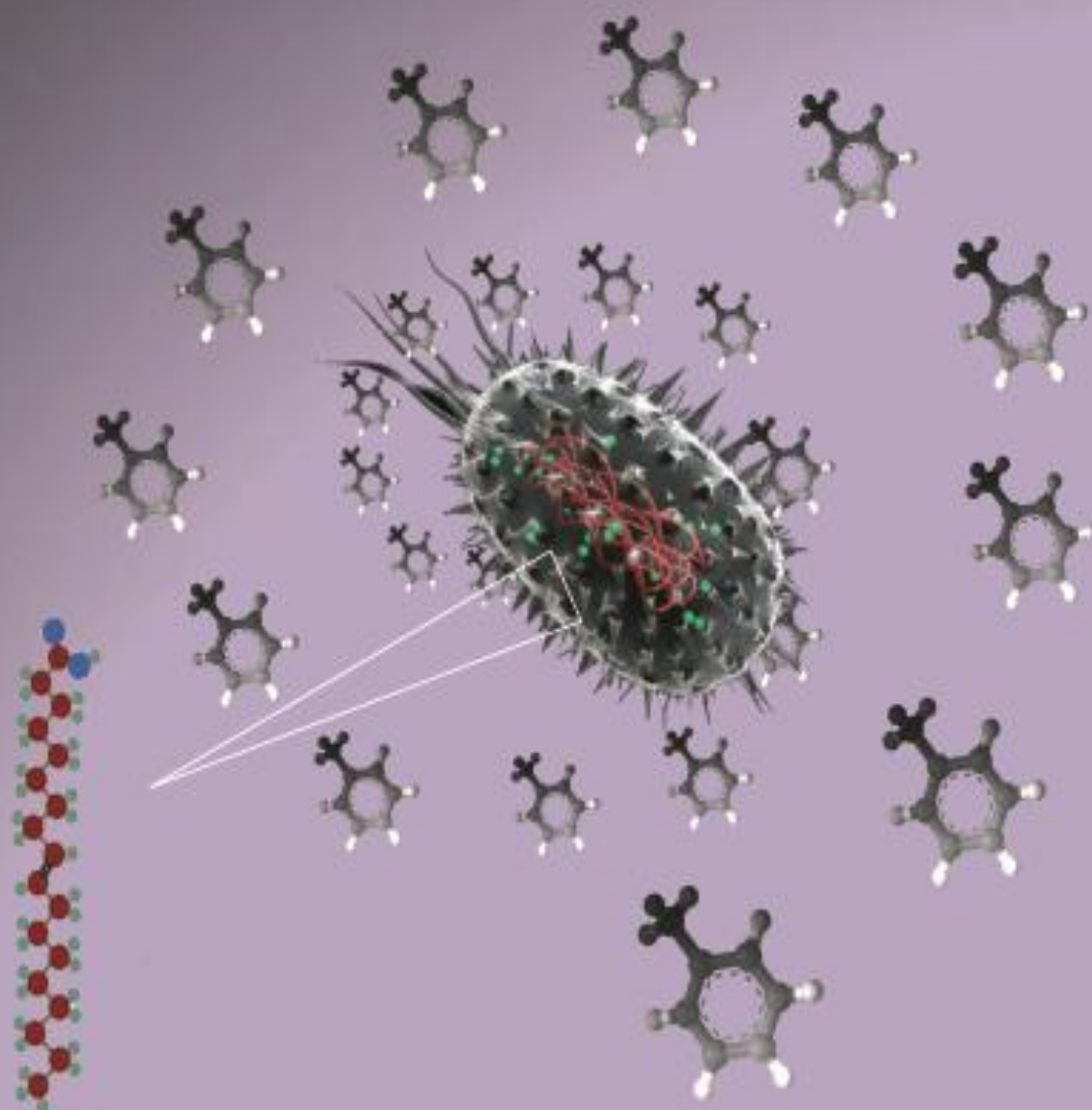


Estudio de la Ciclopropano sintasa

Tesis Doctoral



Cecilia Vanesa Pini Gutiérrez

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cecilia Vanesa Pini Gutiérrez
D.L.: GR 789-2011
ISBN: 978-84-694-0180-4

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología



“ESTUDIO DE LA CICLOPROPANO SINTASA”

Tesis Doctoral

Cecilia Vanesa Pini Gutiérrez

2010

“ESTUDIO DE LA CICLOPROPANO SINTASA”

Memoria que presenta la Licenciada en Biología
Cecilia Vanesa Pini Gutiérrez
para aspirar al título de Doctor en Biología Molecular

Fdo:

Cecilia Vanesa Pini Gutiérrez

VºBº del Director
Fdo:

VºBº de la Directora
Fdo:

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

Ana Segura Carnicero
Doctora en Biología
Científica Titular del CSIC

EEZ-CSIC/Universidad de Granada

2010

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, (C.S.I.C), Granada.

"La verdad sin investigación es... poca verdad"

Dr. Clemente Estable (Uruguay, 1894-1976). Discípulo del Dr. Ramón y Cajal.

"Cuando creíamos tener todas las respuestas de pronto, cambiaron todas las preguntas."

M. Benedetti (Uruguay, 1920-2009)

A mi familia,

mi lugar en el mundo.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Juan Luis Ramos y Ana Segura, gracias por darme la oportunidad de formar parte de vuestro equipo, por la dirección científica, por el tiempo y apoyo que me han dedicado estos años.

A Magela Laviña, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, por su apoyo incondicional aún desde la distancia.

A todos aquellos compañeros de equipo, que hicieron que me sintiera como en casa. ningún hombre es una isla, me hubiera resultado imposible realizar este trabajo sin la ayuda y palabras de ánimo de todos ustedes.

En especial a Craig por sus consejos constantes, por la calidad científica y humana invaluable. A Alejandro, por abrazarme siempre en el momento justo, por demostrarme tu cariño a tu manera, gracias por tu amistad. A Jesús L., por su optimismo y a Chemi por la buena energía que me transmites.

A Maribel y Estrella, que siempre han tenido tiempo para ayudarme.

A Patri Godoy por acompañarme en el mundo lipídico, y Lázaro por su compañerismo y las clases de aeróbicos los viernes por la mañana, jujú. A Vanina, por ser el libro gordo de Petete en versión científica.

A las flípis (ellas saben quienes son), por hacerme más gratas las horas de trabajo y mucho más aún las que estábamos fuera de él.

A Pedro, que cada vez que él estaba de guardia lograba que yo entrara al centro con una sonrisa puesta en la cara.

A Sara y Sandy, gracias a las dos por dejarme entrar en sus vidas y por ser parte de la mía. Sarita, que sepas que me va a ser difícil mirar a la izquierda y no ver tu careto.

Mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho que mi vida en Granada sea más bella, a Ben, mis compis slaseros, a nuestros camareros del bar de cocktails (sí chicas, no podía dejar de darles las gracias a ellos también jujú) y un gran número de etcéteras.

A mis viejos, por tener confianza en mí, por mostrarme que las cosas con fortaleza se alcanzan. Gracias por enseñarme a volar. A mis hermanos Romina, Emiliano y Chiara, porque son los mejores compañeros de ruta que me ha dado la vida, sin ustedes no sería la persona que soy. Al resto de mi familia, que es muy grande tanto en número como en corazones, mis abuelos, tíos, primos, y sobrinos gracias por hacerme sentir que los diez mil kilómetros que nos separan sean sólo eso, una distancia física.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
APÉNDICES	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	v
Abreviaturas	vii
Tablas de cepas y plásmidos	ix
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. PSEUDOMONAS DE ORIGEN AMBIENTAL	
1.1. BIOLOGÍA DE <i>PSEUDOMONAS</i>	3
1.2. IMPORTANCIA DE ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE DEFENSA Y ADAPTACIÓN A ESTRÉS EN MICROORGANISMOS AMBIENTALES	5
1.3 MECANISMOS DE DEFENSA Y ADAPTACIÓN A ESTRESSES AMBIENTALES	7
1.3.1 Respuesta a desecación, temperatura y a hambre a largo plazo	7
1.3.2 Respuesta a disolventes orgánicos	9
2. LA ENVOLTURA CELULAR BACTERIANA	12
2.1 LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	13

2.1.1 Los lipopolisacáridos	14
2.1.2 Proteínas de membrana externa	14
2.1.3 El peptidoglicano	14
2.2 LA MEMBRANA INTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVA	15
2.2.1 Arquitectura de la membrana interna	15
2.2.2 Proteínas de la membrana interna	16
2.2.3 Funciones de la membrana interna	17
2.2.4 Los fosfolípidos	20
2.3 MODIFICACIONES POST SINTÉTICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE MEMBRANA EN RESPUESTA A CAMBIOS EN EL MEDIO AMBIENTE	24
2.3.1. Isomerización <i>cis-trans</i>	25
2.3.2. La enzima <i>cis-trans</i> isomerasa	27
2.3.3 Síntesis de ácidos grasos ciclopropanos	28
2.3.4. La enzima ciclopropano sintasa	30
3. PROMOTORES BACTERIANOS	32
3.1 ESTRUCTURA DE LOS PROMOTORES DEPENDIENTES DE σ^{38}	33
3.2. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DEL FACTOR σ^{38} (RpoS)	34
<u>OBJETIVOS</u>	39
<u>RESULTADOS</u>	41
CAPÍTULO 1:	
43	

Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT T1E

RESUMEN	45
INTRODUCCIÓN	47
RESULTADOS	
DISCUSIÓN	52
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	53
BIBLIOGRAFÍA	
54	
CAPÍTULO 2:	59
Regulation of the cyclopropane synthase <i>cfaB</i> gene in <i>P. putida</i> KT2440 in response to environmental changes	
RESUMEN	61
INTRODUCCIÓN	62
RESULTADOS	64
DISCUSIÓN	
70	
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
72	
BIBLIOGRAFÍA	
74	
CAPÍTULO 3	

Is membrane fluidity the main component for activation of the *cis-to-trans* isomerase in *Pseudomonas putida*?

84

RESUMEN	87
INTRODUCCIÓN	88
RESULTADOS	90
DISCUSIÓN	94
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	95
BIBLIOGRAFÍA	98
<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	107
<u>CONCLUSIONES</u>	117

Apéndice

Índice de figuras

Introducción:

Figura 1. Organización esquemática de la envoltura celular de las bacterias gram positivas y gram negativas	11
Figura 2. Organización esquemática de la membrana interna	14
Figura 3. Esquema de la estructura de un fosfolípido	18
Figura 4. Estructura química de los fosfolípidos mayoritarios presentes en las membranas bacterianas	19
Figura 5. Estructura de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de <i>Pseudomonas</i>	21
Figura 6. Modificaciones de los ácidos grasos de los fosfolípidos en <i>Pseudomonas</i>	22
Figura 7. Esquema de la membrana en estado fluido y viscoso	24
Figura 8. Comparación de las secuencias consenso de promotores reconocidos por E σ^{70} y E σ^{38}	31

Resultados:

Capítulo 1

Figura 1. A-Reacción catalizada por la ciclopropano sintasa. B- Representación esquemática de los marcos de lectura abiertos del gen <i>cfaB</i> en <i>P. putida</i> DOT T1E. C- Representación esquemática de los marcos de lectura abiertos cercanos al gen <i>cfaB</i> en <i>P. putida</i> DOT T1E.	48
Figura 2. Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT T1E.	50
Figura 3. Mapeo del punto de inicio de la transcripción del gen <i>cfaB</i> .	50
Figura 4. Expresión del promotor <i>cfaB</i> medido como actividad β -galactosidasaa lo largo de la curva de crecimiento de <i>P. putida</i> DOT T1E.	51

Capítulo 2

Figura 1. Representación esquemática de las reacciones catalizadas	
--	--

por la CFA y la CTI	63
Figura 2. A- Representación esquemática de la localización del gen <i>cfaB</i> en el cromosoma de <i>P. putida</i> KT2440	65
B- Secuencia intergénica de los genes <i>lpd3</i> y <i>cfaB</i>	
C- Expresión del gen <i>cfaB</i> a lo largo de la curva de crecimiento (medido como actividad β -galactosidasa)	
C- Expresión del gen <i>cfaB</i> , <i>rpoS</i> y <i>cti</i> a distintos puntos de la curva de crecimiento	
Figura 3. A- Secuencias consenso de σ^{70} y σ^{38} en <i>E. coli</i> , en el promotor <i>cfaB</i> en el promotor Pm del plásmido pWW0 para la degradación de tolueno en <i>P. putida</i> mt2.	66
B- Representación esquemática de los promotores mutantes y medida de actividad β -galactosidasa para cada promotor mutante	
Figura 4. Actividad β -galactosidasa expresada a partir de los promotores <i>cfaB</i> y <i>cti</i>	67

Capítulo 3

Figura 1. Medida de generación de la fuerza protón motriz	92
Figura 2. Medidas de polarización de la fluorescencia en KT2440 silvestre en LB y en presencia de distintos estreses.	93

Índice de tablas

Introducción:

Tabla 1. Presencia de ácidos grasos <i>trans</i> en los lípidos bacterianos	25
Tabla 2. Distribución de los CFA en los géneros bacterianos	29

Resultados:

Capítulo 1

Tabla 1. Composición de ácidos grasos en <i>P. putida</i> DOT T1E y sus mutantes Isogénicos en los genes <i>cfaA</i> y <i>cfaB</i>	49
Tabla 2. Supervivencia de los cultivos de <i>P. putida</i> DOT T1E y el mutante <i>cfaB</i> tras la adición de 0,3% (v/v) de <i>m</i> -xileno, etilbenceno y propilbenceno	50
Tabla 3. Transcripción desde el promotor <i>cfaB</i> mediada como actividad β -galactosidasa empleando una fusión del promotor a ' <i>lacZ</i>	51
Tabla 4. Composición de ácidos grasos de la membrana de <i>P. putida</i> DOT T1E cultivado en presencia de benzoato y fenilacetato	54

Capítulo 2

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos totales (medido como porcentaje de lípidos) en fase exponencial de crecimiento ($OD_{660nm} \approx 0.8$) antes y 30 minutos después de la adición de fenilacético	68
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos (medido como porcentaje de lípidos) en <i>P. putida</i> KT2440 (silvestre), y los derivados mutantes <i>P. putida</i> KT2440 <i>cti</i> and <i>P. putida</i> KT2440 <i>cfaB</i> antes y después de 1h de adición de estrés	69
Tabla Suplementaria. Listado de oligonucleótidos internos utilizados para la mutagénesis del promotor <i>cfaB</i> mediante PCR solapantes	82

Capítulo 3

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 tras la exposición a una amplia variedad de compuestos tóxicos	91
Tabla 1. Suplementaria. Perfil de ácidos grasos de la KT2440 y su mutante isogénico <i>aphC</i>	104
Tabla 2. Suplementaria. Perfil de ácidos grasos de la cepa silvestre y mutantes nulos PP_0043 (CzcB) or PP_1395 (TtgB)	104

Índice de abreviaturas

CCCP, carbonilcianida-m-clorofenilhidrazona

CFA, Acido graso ciclopropano

CL, cardiolipina

CTI, *cis trans* isomerasa

DMSO, dimetilsulfóxido

Km, kanamicina

LB, Luria Bertani

LPS, lipopolisacáridos

logP_{ow}, coeficiente de partición de un componente en una mezcla de octanol agua

pb, pares de bases

PE, fosfatidil etanolamina

PG, fosfatidil glicerol

PEP, fosfoenolpiruvato

RND, Resistance Nodulation cell Division

Tc, tetraciclina

TTFA, 2-teonyltrifluoroacetona

Rf, rifampicina

UFA, ácido graso insaturado

Cepas y plásmidos empleados

Cepas

Pseudomonas putida

<i>P. putida</i> DOT-T1E	Rif ^R , Tol ^R	Ramos <i>et al.</i> , 1995, Cap. 1
RpoS	<i>rpoS</i> ::miniTN5::lux	Ramos González, Cap. 1
<i>cfaB</i>	Rif ^R , Km ^R <i>cfaA</i> :: Ω Km	Este trabajo, Cap. 1
<i>cfaA</i>	Rif ^R , Km ^R <i>cfaB</i> :: Ω Km	Este trabajo, Cap. 1
<i>cfaA cfaB</i>	Km ^R , Gm ^R	Este trabajo, Cap. 1
<i>P. putida</i> KT2440	Ap ^R , Cm ^R	Franklin <i>et al.</i> , 1981
RpoS	<i>rpoS</i> ::miniTN5::lux	Ramos González & Molin, 1998, Cap. 2
<i>CfaB</i>	PP_5365	Este trabajo, Cap. 2
<i>Cti</i>	PP_2376 Colección de mutantes	Este trabajo, Cap. 3
<i>AphC</i>	PP_2439 alkyl hidroperóxido, subunidad C	Este trabajo, Cap. 3
<i>TtgB</i>	PP_1385 Km ^R Colección de mutantes	Este trabajo, Cap. 3
<i>CzpB</i>	PP_0043 Km ^R Colección de mutantes	Este trabajo, Cap. 3

Escherichia coli

DH5α	<i>supE44 lacU169(ø80lacZΔM15) hsdR17 (rk⁻mk⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1</i>	Woodcock, 1989
------	--	----------------

Plásmidos

pMP220	Tc ^R , oriRK2 'lacZ,	Spanik <i>et al.</i> , 1987
pMBL-T	Ap ^R , MCS, Plac fusionado al α péptido de <i>lacZ</i> , vector de clonaje para fragmentos de PCR	Molecular Biolabs
pMcfab	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> DOT T1E	Este trabajo, Cap. 1
pBBR1-MCS5	Gm30 ^R oriRK2 mobRK2 Plac fusionado al α péptido de <i>lacZ</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995

pCEC-3	pBBR1-MCS5 con un inserto que contiene al gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> DOT T1E	Este trabajo, Cap. 1
pMP220cfaB	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440	Este trabajo, Cap. 2
pMPcti	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cti</i> de <i>P. putida</i> DOT T1E	Bernal <i>et al.</i> , 2007, Cap. 2
pMP220cfaB1	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la primera base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB2	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la segunda base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB3	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la tercera base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB4	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la cuarta base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB5	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la quinta base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB6	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la sexta base	Este trabajo, Cap. 2
pMP220cfaB7	pMP220 con un inserto que contiene al promotor del gen <i>cfaB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mutado en la séptima base	Este trabajo, Cap. 2

Introducción

1. PSEUDOMONAS DE ORIGEN AMBIENTAL

1.1 BIOLOGÍA DE PSEUDOMONAS

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez como células con órganos polares para su movilidad; algunas especies forman esporas, aunque en general es un evento raro. Esta definición poco específica dada por Migula en 1984 ha ido avanzando a lo largo de los años de forma que la actual definición de *Pseudomonas*, que aparece en la edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, define este género como: “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de entre 0,5-1,0 μm de diámetro por 1,5-5,0 μm de longitud. La mayoría de las especies no acumulan gránulos de poli- β -hidroxibutirato, pero pueden formar poli-hidroxicanoatos cuya longitud es mayor de cuatro carbonos cuando las células se cultivan en alcanos o gluconato. No se conocen estados de células viables pero no cultivables. Son gram-negativas. Son generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares; aunque se han descrito flagelos laterales más cortos. Son aeróbicas, con un tipo de metabolismo respiratorio estricto con oxígeno como aceptor terminal de electrones; en algunos casos el nitrato puede ser usado como aceptor alternativo de electrones, lo que permite en estos casos el crecimiento anaerobio. No producen xantomonadinas. La mayoría, si no todas las especies, no puede crecer bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$). La mayoría de las especies no requiere factores de crecimiento orgánicos. Pueden ser oxidasa positiva o negativa, y son catalasa positiva y quimiorganotróficas. Las cepas de las especies de este género incluyen en su composición los ácidos grasos hidroxilados 3-OH 10:0 y 12:0, y 2-OH 12:0, y ubiquinona Q-9. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunas especies son patógenas de humanos, animales o plantas. El porcentaje de contenido en G+C del ADN está entre 58-69%”.

La amplia distribución de las *Pseudomonas* en la naturaleza (son muy comunes en suelo, agua, alimentos y plantas enfermas) junto con la capacidad para crecer a expensas de gran variedad de compuestos orgánicos simples son

dos de las características más interesantes de este grupo bacteriano. La versatilidad nutricional de *Pseudomonas* (den Dooren de Jong, 1926; Palleroni, 1986; Stainer *et al.*, 1966) hace que, en contraste con otros grupos bacterianos, muchas *Pseudomonas* no se puedan distinguir mediante la utilización de azúcares. De hecho, las cepas de la especie *P. palleronii* no utilizan estos compuestos como fuentes de carbono, y algunas cepas de *P. putida* sólo pueden utilizar los azúcares glucosa y fructosa (del Castillo *et al.*, 2007). Los compuestos orgánicos empleados como fuentes de carbono y energía por muchas especies de *Pseudomonas* incluyen hidrocarburos lineales y aromáticos, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, alcoholes y compuestos aromáticos. Conviene aquí destacar su gran capacidad para utilizar los compuestos aromáticos y la diversidad funcional en cuanto a las rutas empleadas por *Pseudomonas* para metabolizarlos, lo que ha despertado el interés por la utilización de especies de este género en procesos de descontaminación y biocatálisis (Rojas *et al.* 2004; Nijkam *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2009).

La gran versatilidad del género no sólo se deriva de la cantidad y variedad de fuentes de carbono que pueden utilizar sino también de la capacidad de explotar diferentes nichos ecológicos. El género *Pseudomonas* incluye cepas patógenas oportunistas de animales y el hombre, como *P. aeruginosa*, patógenos de plantas como *P. syringae*, cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, como *P. fluorescens* y cepas de suelo como *P. putida* (Lugtenberg & Dekkers, 1999; Palleroni y Moore, 2004). En los últimos cinco años se ha secuenciado el genoma de varias cepas de *Pseudomonas*, entre ellas, las cepas *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000), *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), *P. syringae* pv. tomatoe DC3000 (<http://pseudomonas-syringae.org/>) y *P. fluorescens* Pf-5 (<http://pseudomonas-fluorescens.org/>) y recientemente en nuestro laboratorio, *P. putida* DOT-T1E (Segura *et al.*, en preparación). Estas bacterias presentan en promedio 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos sin función conocida. Vodovar *et al.* (2006), identificaron un grupo de casi 2100 genes que constituyen el núcleo del genoma del género *Pseudomonas*, siendo las regiones no compartidas las que se asociarían a la gran a la versatilidad y capacidad de supervivencia de las diferentes especies y cepas.

1.2 IMPORTANCIA DE ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE DEFENSA Y ADAPTACIÓN A ESTRÉS EN MICROORGANISMOS AMBIENTALES.

La gran capacidad de *Pseudomonas* para adaptarse a diferentes nichos ecológicos indica una alta versatilidad metabólica. Esta versatilidad no sólo se basa en la capacidad de utilizar distintos nutrientes, sino también en su capacidad de adaptación a distintas condiciones medioambientales. Las bacterias del medio ambiente pueden sufrir grandes variaciones en sus condiciones de crecimiento en diversos momentos. Un ejemplo de ello son las bacterias rizosféricas las cuales crecen a expensas de los exudados radiculares que cambian su composición según el estado vegetativo de la planta, su estado fisiológico o las condiciones medioambientales (Miller & Wood, 1996). Asimismo, están expuestas a gran cantidad de compuestos fenólicos que pueden ser tóxicos. Las bacterias filosféricas son otro gran ejemplo de versatilidad y resistencia a estrés ya que pueden sufrir grandes cambios de temperatura y humedad a lo largo del día (Lindow & Brandl, 2003).

Además de todas estas incidencias, las bacterias ambientales han tenido también que adaptarse en muchos casos a la presencia de contaminantes (más o menos tóxicos) en su entorno. Desde la revolución industrial, la producción y el uso de productos químicos se ha incrementado enormemente y muchos de ellos han sido liberados al medio ambiente. Algunos de estos productos se utilizan como insecticidas y pesticidas para el control de plagas y maleza mientras que otros, como los disolventes orgánicos y combustibles, alcanzan la biosfera como resultado de escapes accidentales durante su producción o almacenamiento (Ramos *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 1994).

Para la adaptación a todos estos nichos ecológicos, las *Pseudomonas* tienen que tener una gran capacidad para la integración de señales. De hecho, en el análisis del genoma de *P. putida* KT2440, una de las cepas utilizadas en esta tesis doctoral, se determinó que 450 fases de lectura abierta (de las aproximadamente 6000 que componen el genoma) codificaban reguladores

transcripcionales, con 24 factores sigma y 55 sensores de sistemas de dos componentes (Martínez-Bueno *et al.*, 2002).

La versatilidad y plasticidad del género *Pseudomonas* las hace muy atractivas no sólo desde el punto de vista de la Biología, sino también de la Biotecnología. Cepas de este género son promotoras del crecimiento vegetal tales como *P. fluorescens*, otras son buenas colonizadoras de raíz y degradadoras de contaminantes como *P. putida* KT2440 y otras resistentes a compuestos tóxicos como disolventes orgánicos (*P. putida* DOT-T1E). La toxicidad de los disolventes orgánicos es uno de los factores limitantes tanto en la prevención como en la biorremediación de zonas altamente contaminadas. La utilización eficaz de microorganismos tolerantes a disolventes orgánicos es una posible solución a estos problemas. Asimismo estos microorganismos tienen también interés en la síntesis biológica de compuestos de alto valor añadido que son tóxicos (o cuyo sustrato de partida es tóxico).

Obviamente, para la optimización de cualquiera de las aplicaciones biotecnológicas derivadas de la versatilidad metabólica de *Pseudomonas* es importante conocer los mecanismos de adaptación a las condiciones hostiles que se presentan en la naturaleza, así como los de resistencia a compuestos tóxicos que puedan encontrarse en estos medios.

1.3 MECANISMOS DE DEFENSA Y RESPUESTA A ESTRESARES MEDIOAMBIENTALES

Las bacterias en el medio ambiente están expuestas a una serie de estreses tales como cambios de temperatura, disponibilidad de nutrientes y agua y la presencia de moléculas tóxicas. La supervivencia en un ambiente variable requiere de un amplio rango de respuestas adaptativas rápidas. Aquellos microorganismos capaces de presentar una adaptación fisiológica y bioquímicamente exitosa serán los que colonicen con mayor facilidad un nicho.

1.3.1. Respuesta a desecación, temperatura y hambre a largo plazo

Uno de los estreses ambientales más típicos es la desecación ó deshidratación, que produce daños a nivel de ADN, tiene efectos desnaturizantes en proteínas y causa un aumento de la temperatura de fusión (T_m) de las membranas. La respuesta a este tipo de estrés es muy compleja ya que solapan mecanismos de respuesta a estrés osmótico, falta de nutrientes y tolerancia a desecación. Este solapamiento, se debe a la participación del factor alternativo σ^S , que controla la expresión de un amplio número de genes implicados en el control de la resistencia a estrés y del que se hablará en detalle más tarde en la introducción de esta tesis doctoral. Las dos respuestas más comunes a estrés por desecación en bacterias son la síntesis de solutos compatibles, como trehalosa, los cambios en los lípidos de membrana y protección frente al daño oxidativo. En *P. putida* KT2440, la cantidad de trehalosa sintetizada en respuesta a este tipo de estrés es limitada e incluso bacterias modificadas para producir mayores cantidades de este compuesto no son más tolerantes a desecación (Manzanera *et al.*, 2002). La isomerización *cis-trans* de los ácidos grasos insaturados, de la que también hablaremos más adelante en detalle en esta introducción, también está implicada en la adaptación a la desecación. Los cambios reversibles en la composición de ácidos grasos podrían ayudar a mantener la membrana en una fase líquido-cristalina adecuada.

Los cambios en respuesta a variaciones de temperatura también son fundamentales en la supervivencia de bacterias medioambientales. La temperatura afecta a la fluidez de membrana, flexibilidad de proteínas y la conformación de ácidos nucleicos. En la respuesta tanto a frío como a calor se sintetizan gran cantidad de chaperonas (proteínas de cold-shock o heat shock) que estabilizan la estructura de las proteínas o median en los procesos de traducción. Estas respuestas son muy complejas y han sido estudiadas en profundidad en distintas bacterias, pero se alejan del tema de esta tesis doctoral por lo que remitimos al lector a las diversas revisiones que hay en la literatura sobre este tema, entre ellas Phadtare *et al.*, (1999) y Guisbert *et al.*, (2008). Si queremos destacar, que los cambios en los lípidos de membrana van

encaminados a incrementar la fluidez de la misma (en respuesta a frío) y a disminuirla cuando se responde al calor (Ramos *et al.*, 2001)

Finalmente, la escasez de nutrientes durante periodos largos de tiempo es otro de los estreses ambientales a los que tiene que hacer frente las bacterias ambientales. Se ha observado la aparición de mutaciones en poblaciones que no están proliferando (es decir, que no se replican). Este proceso se denomina mutación adaptativa y su posible significado biológico implica una ventaja adaptativa para las cepas mutadas (Ramos *et al.*, 2002).

1.3.2 Respuesta a disolventes orgánicos

Dado que durante esta tesis se han estudiado algunos aspectos de la respuesta celular frente a distintos disolventes orgánicos, a continuación se detallan los mecanismos de defensa que puede presentar la célula en respuesta a estos compuestos tóxicos.

La toxicidad de un disolvente está directamente relacionada con la lipofilicidad del compuesto, expresada en términos de $\log P_{ow}$, el cual define el coeficiente de partición de un compuesto en un sistema bifásico de octanol /agua (Rekker & de Kort, 1979). Los compuestos con un valor entre 3,5 y 1,5 son tóxicos ya que se acumulan en la membrana citoplasmática causando efectos deletéreos, mientras que aquellos con un valor de $\log P_{ow}$ superior a 4 ó inferior a 1.5 suelen ser bien tolerados por los microorganismos (Inoue & Horikoshi, 1991).

El efecto que causa un compuesto sobre la integridad de la membrana dependerá de la ubicación del mismo en la membrana, lo cual a su vez viene determinado por su estructura molecular y sus distintos sustituyentes (Weber & de Bont, 1996). Por ejemplo, los alcanos que presentan un valor $\log P_{ow} > 3$, tienden a embeberse en la bicapa alineándose con las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Sikkema *et al.*, 1994). Los compuestos más hidrofílicos como los alcoholes $\log P_{ow} < 3$ alinean su cadena no polar con las cadenas acílicas de los fosfolípidos mientras que el grupo hidroxilo polar interacciona con el grupo de

cabeza polar del fosfolípido anclándose en la interfase lípido/agua. Los disolventes, al intercalarse en la membrana, afectan las interacciones de tipo van der Waals que se establecen entre las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos interrumpiendo la bicapa a nivel local. Los disolventes orgánicos fluidifican las membranas bacterianas alterando la barrera de permeabilidad de la misma ya que provocan la filtración de compuestos desde el exterior celular, y la liberación de iones y de metabolitos desde el interior celular hacia el medio externo. Al aumentar la permeabilidad de la membrana a los protones y otros iones se produce un colapso en el potencial de membrana, causando una pérdida en la generación de energía que conlleva a una inhibición de las funciones de la membrana dependientes de energía (Cartwright *et al.*, 1986)

Uno de los principales mecanismos que presentan las células bacterianas para reducir los efectos tóxicos de los disolventes son las bombas de eflujo. Su acción consiste en expulsar activamente el disolvente a través de las dos membranas de la envuelta celular de las bacterias Gram negativas. De esta forma la célula es capaz de mantener una concentración moderada del compuesto tóxico en la membrana. Se han descrito varias bombas de eflujo pertenecientes a la familia RND (*Resistance Nodulation cell Division*) involucradas en la expulsión de disolventes (Rojas *et al.*, 2001). Estos sistemas constan de tres componentes: un transportador de membrana interna dependiente de energía, un canal de membrana externa y una proteína de fusión que conecta ambas estructuras a través del periplasma (Koronakis *et al.*, 2000). En *Pseudomonas putida* DOT T1E se han descrito tres bombas de extrusión codificadas por genes de tolerancia al tolueno (ttg): TtgABC (Ramos *et al.*, 1998), TtgDEF (Mosqueda y Ramos, 2000), TtgGHI (Rojas *et al.*, 2001).

Otro de los mecanismos relevantes en la tolerancia a disolventes son aquellos que permiten un reajuste de la fluidez de la membrana ya que ésta se ve alterada tras la exposición a disolventes (Ramos *et al.*, 2002). Estas modificaciones son similares a las que se producen en respuesta a otros tipos de estreses, como puede ser el choque térmico. Esto es debido a que en condiciones fisiológicas la membrana citoplasmática de las bacterias presenta un estado de fase líquido-cristalina fluida que es esencial conservar en condiciones óptimas

ante una modificación en el ambiente que la rodea (Bloom *et al.*, 1991). Entre los cambios observados en los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, cabe destacar el aumento en los ácidos grasos saturados en presencia de alcoholes de cadena larga y compuestos aromáticos (Cronan 1968; Ingram, 1977) y los cambios en la proporción de ácidos grasos de cadena larga y cadena corta (Pinkart, *et al.*, 1996). Estos mecanismos son considerados mecanismos a largo plazo, ya que requieren la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Ramos *et al.*, 2002). Una respuesta rápida a la presencia de disolventes orgánicos en el medio es la formación de ácidos grasos insaturados en *trans* a partir de los correspondientes ácidos grasos en *cis*.

A lo largo del desarrollo experimental de esta tesis se comprobó que los ácidos grasos ciclopropanos también están implicados en la respuesta a tolueno. Estos ácidos grasos también se forman a partir de los ácidos grasos insaturados *cis* preexistentes en la membrana. Estas dos modificaciones post sintéticas de los ácidos grasos constituyen el eje central de esta tesis y se explicarán en detalle más adelante en la introducción.

Algunas cepas de *P. putida* pueden alterar la composición de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos en respuesta a una exposición frente a disolventes (Ramos *et al.*, 1997) con el fin de influenciar la fluidez de la membrana. Las clases mayoritarias de fosfolípidos presentes en las cepas de *P. putida* son la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilglicerol (PG) y la cardiolipina (CL). La CL presenta una temperatura de transición 10° más alta que la PE, lo cual podría disminuir la fluidez de membrana ante un compuesto tóxico teniendo un efecto estabilizador (Weber & de Bont, 1996).

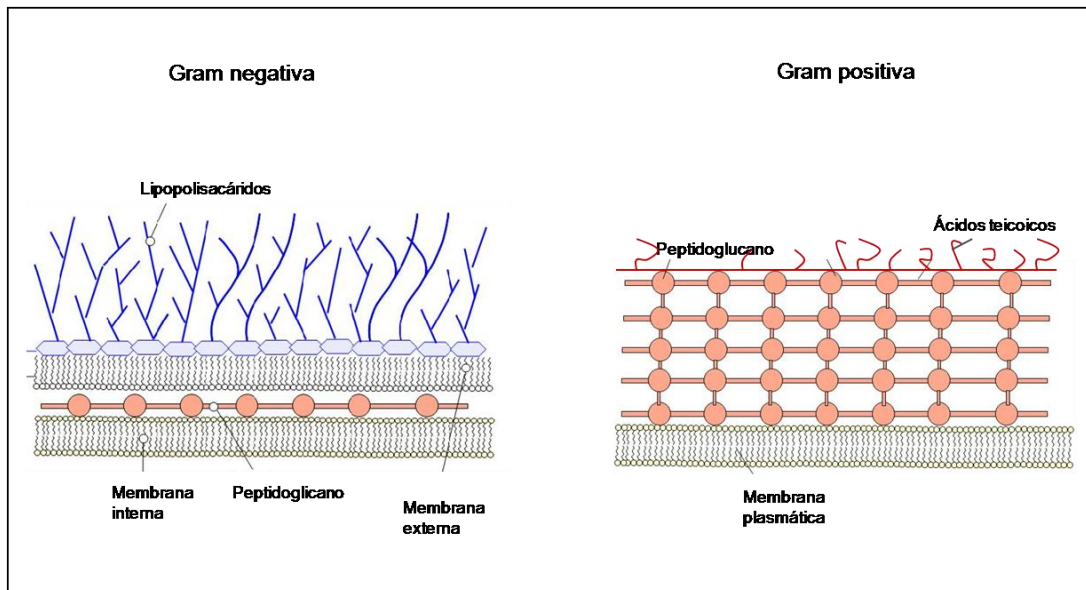
Aunque algunos autores señalan la degradación del compuesto como un factor de tolerancia, se han identificado microorganismos capaces de tolerar ciertos disolventes orgánicos pero que no pueden metabolizarlos (Isken & de Bont, 1996, Mosqueda *et al.*, 1999) por lo que no parece que la biodegradación sea un factor importante en la tolerancia, sobre todo a altas concentraciones del compuesto.

2. LA ENVOLTURA CELULAR

La envuelta celular bacteriana es el primer punto de contacto entre el microorganismo y el medio ambiente, y por tanto, muchos de los mecanismos de tolerancia y adaptación a estrés observados en bacterias son mecanismos que se originan o son consecuencia de adaptaciones en los lípidos de membrana. Al constituir estas modificaciones en la membrana celular la base de esta tesis doctoral, en la siguiente parte de esta introducción se va a explicar en detalle la composición de la envuelta celular bacteriana y las modificaciones post-sintéticas en lípidos de membrana que están implicados en respuesta a estrés.

La envoltura celular bacteriana aísla y a su vez comunica la célula con el medio que la rodea. Esta envoltura está formada por la pared celular y la membrana interna. La membrana interna es una bicapa en donde las moléculas de fosfolípidos se orientan hacia la parte interna a través de sus dominios hidrofóbicos dejando hacia el exterior las regiones polares. Esta bicapa a su vez incorpora distintos tipos de proteínas. La envuelta celular está también compuesta por peptidoglicano, cadenas poliméricas de azúcares que están entrecruzadas con moléculas peptídicas. Dependiendo de la organización estructural del peptidoglicano y las bicapas lipídicas, las bacterias pueden ser divididas en gram positivas y gram negativas (Figura 1). En las bacterias gram positivas la envoltura celular está formada por una capa de peptidoglicano relativamente gruesa (20 a 30 nm) seguida por el periplasma y la membrana citoplasmática (Matias & Beveridge 2006). La envoltura celular de las bacterias gram negativas está constituida por dos bicapas lipídicas separadas por un compartimento viscoso llamado periplasma el cual contiene una fina capa de peptidoglicano (3 a 8 nm) (Matias *et al.* 2003). En las bacterias gram positivas, el peptidoglicano está unido covalentemente a los ácidos teicoicos mientras que en las gram negativas esta estructura es mantenida mediante las lipoproteínas que se unen tanto al peptidoglicano como a las membranas interna y externa.

Figura 1. Organización esquemática de la envoltura celular de las bacterias gram positivas y gram negativas.



2.1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las dos cepas utilizadas en esta tesis doctoral, *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* KT2440 pertenecen al grupo de las gram negativas. En este grupo, la membrana externa es el primer punto de contacto de la célula con el ambiente que la circunda y como tal, es de gran importancia en el intercambio de moléculas hacia y desde el interior celular. La membrana externa se presenta en forma de una bicapa asimétrica (Kamio & Nikaido, 1976), con una monocapa interna conformada por fosfolípidos, de una composición similar a la membrana citoplasmática, y una monocapa externa conformada por lipopolisacáridos (LPS). La membrana externa actúa como barrera de permeabilidad selectiva a solutos y sirve como barrera de exclusión de compuestos perjudiciales para la célula (Nikaido & Vaara, 1985; Hancock, 1997). Además interviene en la secreción de moléculas al exterior celular tales como sideróforos, enzimas y toxinas. Sirve también de anclaje a estructuras externas como flagelos y es responsable del mantenimiento de la estructura.

2.1.1 Los lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son el componente mayoritario de la envoltura celular constituyendo del 3 al 8% del peso seco de una célula (Rietchel *et al.* 1984). Consiste en un glucolípido anfipático que contiene una región hidrofílica representada por el polisacárido denominado antígeno O, el núcleo central (core) del oligosacárido y una región hidrofóbica que es el lípido A. Los LPS pueden tener un tamaño variable dependiendo de las repeticiones del antígeno O presentes en la molécula. Los LPS están exclusivamente localizados en la cara externa de la membrana externa y están anclados a la misma mediante las cadenas acílicas del lípido A (Burrows y Lam, 1999)

2.1.2 Proteínas de membrana externa

La membrana externa bacteriana tiene una composición proteica característica; en general contiene entre 3 y 8 proteínas muy abundantes que coexisten con gran número de proteínas minoritarias. Está atravesada por una gran variedad de canales hidrofílicos formados por proteínas llamadas porinas. Existen porinas de difusión que permiten la entrada pasiva de moléculas hidrofílicas menores de 600 Da y que en general no son químicamente específicas sino que su límite de exclusión depende del tamaño del poro. Junto con estas porinas existen otras con especificidad de sustrato (Llamas *et al.*, 2003).

2.1.3 El peptidoglicano

El peptidoglicano es un heteropolímero formado por dos derivados de azúcar, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico y cuatro aminoácidos (L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y o bien L-lisina o bien ácido diaminopimérico). Estos forman una cadena peptídica de cinco aminoácidos unidos al ácido N-acetilmurámico. Las cadenas de glucanos que se forman alternando residuos de azúcar mediante enlaces β 1-4 están reforzadas por péptidos entrelazados. El peptidoglicano es el responsable del mantenimiento de la morfología bacteriana (Vollmer W. *et al.*, 2008).

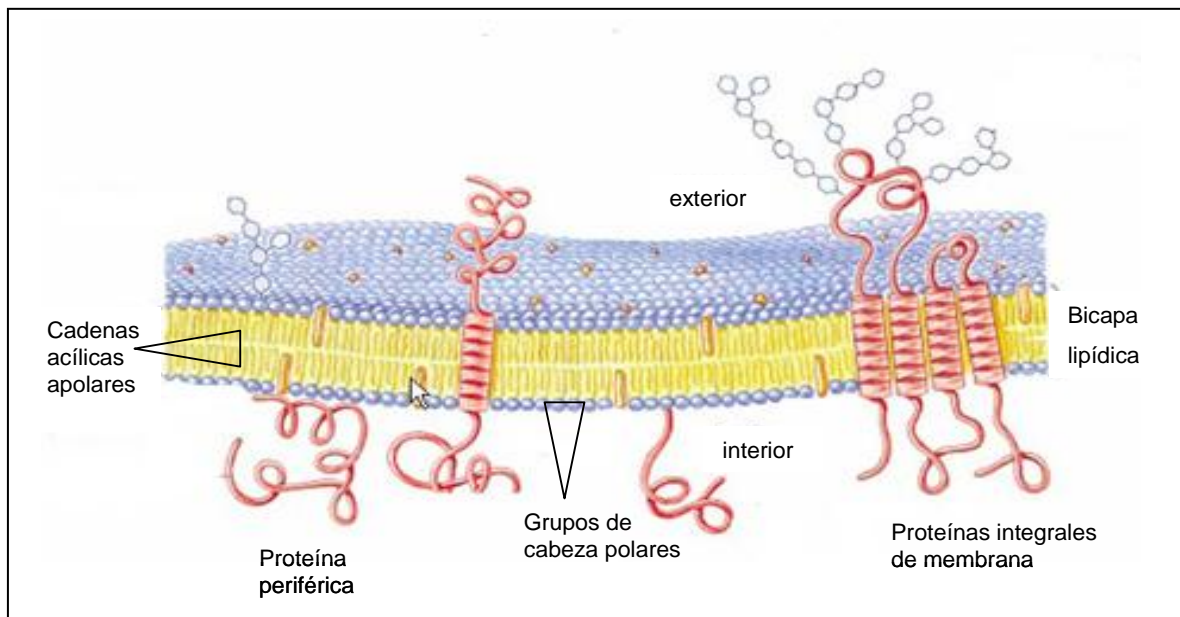
2.2 LA MEMBRANA INTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La arquitectura de la membrana interna bacteriana se presenta como una bicapa lipídica conformada por lípidos y proteínas. Posee un carácter de barrera selectivamente permeable y determina, junto con la membrana externa, el tráfico de solutos hacia y desde el interior celular. La membrana interna bacteriana constituye una matriz que permite el anclaje de distintas proteínas de membrana que cumplen con diversas funciones tales como señalización, división celular y sistemas de transporte de sustratos. La membrana interna tiene además un rol importante en la generación y conservación de la energía mediante el mantenimiento de la fuerza protón motriz a ambos lados de la bicapa (Sikkema *et al.*, 1995).

2.2.1 Arquitectura de la membrana interna

La membrana interna bacteriana está compuesta por una bicapa fosfolipídica en la cual se encuentran embebidas distintas clases de proteínas de membrana. En esta estructura, las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos se ordenan hacia el interior de la bicapa mientras que sus grupos de cabeza polares se localizan en la cara externa de ambas monocapas (Figura 2). La composición lipídica de esta bicapa 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, influyendo en la topología, las interacciones y las funciones de las proteínas de membrana. Con las nuevas técnicas de estudio de la topología de la membrana, se ha observado que hay dominios de lípidos en las membranas bacterianas, es decir áreas de membrana que difieren en su composición lipídica (Matsumoto *et al.*, 2006). En este contexto se sugiere que las proteínas de membrana podrían ejercer un papel estabilizador de estos microdominios lipídicos. De hecho, a algunos de estos dominios se les pueden otorgar papeles fisiológicos relevantes (Mileykovskaya & Dowhan, 2005; Kawai *et al.*, 2004). Este es el caso de dominios de cardiolipina y fosfatidiletanolamina que tienden a formar estructuras no-bicapa (Dowhan, 1997) necesarias en el proceso de división celular y esporulación, donde ocurre la fusión y fisión de membranas.

Figura 2. Organización esquemática de la membrana interna.



Lehninger. Principios de Bioquímica. 4ªEd.

2.2.2 Proteínas de membrana interna

Las proteínas de membrana citoplasmática constituyen el 6% del total de proteínas celulares (Kadner, 1996). Según su localización en la bicapa lipídica se distinguen tres clases de proteínas de membrana. Las proteínas integrales de membrana que presentan uno o más segmentos transmembrana, proteínas que poseen un dominio periplasmático y se anclan a la membrana mediante un dominio transmembrana y proteínas que se asocian a la membrana de manera transitoria (periféricas). Las proteínas de membrana se acomodan de manera que presentan sus dominios hidrofóbicos en contacto con la membrana y los dominios hidrofílicos orientados al interior de la proteína.

2.2.3 Funciones de la membrana interna

La membrana citoplasmática es responsable del desarrollo de múltiples funciones importantes para la célula. Actúa de barrera selectivamente permeable determinando junto con la pared celular la entrada y salida de solutos. El agua,

gases disueltos y moléculas liposolubles difunden a través de la membrana mientras que otras moléculas necesitan de sistemas particulares de transporte. La membrana citoplasmática proporciona una matriz en la cual están embebidas distintas proteínas de membrana que cumplen con diversas funciones tales como enzimas, transportadores y proteínas flagelares. Además es la responsable de mantener la diferencia de potencial de la célula, participar en la división celular, y señalización transmembrana entre otras. En esta sección se mencionarán brevemente algunas de las funciones.

i) Generación y conservación de la energía:

La mayoría de los procesos biosintéticos y de transporte en bacterias son llevados a cabo por la hidrólisis de los enlaces fosfato de alta energía (ATP, GTP ó PEP), ó por el acoplamiento de gradientes de iones transmembrana. Todas las proteínas implicadas en la transducción de energía y la fosforilación oxidativa son proteínas de membrana interna. Se incluyen las proteínas de la cadena de transporte electrónico, la ATP sintasa así como también las proteínas de la cadena transportadora de protones. Su correcto ensamblaje en la membrana es fundamental para el buen funcionamiento de todos los procesos bacterianos.

ii) Translocación de proteínas dependiente del sistema Sec:

Algunas proteínas citoplasmáticas y las proteínas destinadas al periplasma o la membrana externa son traslocadas por una vía secretora general, la cual es definida por la necesidad del funcionamiento de SecA, SecE y SecY. La proteína A transporta generalmente tiene un determinante topológico que se denomina péptido líder en la región amino terminal. Generalmente tiene un tamaño determinado de 20 a 25 aminoácidos de longitud y posee cuatro segmentos con características comunes que son reconocidos por SecA (Laforet *et al.* 1991). El péptido señal se ancla en la cara periplasmática de la membrana interna, la traslocación del resto de la proteína es dirigida por la acción repetida de una proteína periférica de membrana, SecA dependiente de ATP y ocurre probablemente a través de un canal formado por SecY, SecD, SecE y SecF (Hartl, *et al.*, 1990).

iii) Transporte de solutos:

A través de esta bicapa lipídica tan solo unos cuantos tipos de moléculas pueden difundir libremente (agua, ácidos grasos de cadena corta, compuestos no polares), la mayoría requieren un sistema de transporte específico. Estos sistemas de transporte están lógicamente ubicados en la membrana interna y presentan una variedad de mecanismos de transporte activo. Dentro de los mecanismos que acoplan la energía se encuentran: a) el transporte simporte y el antiporte con gradientes de iones, b) permeasas periplasmáticas, las cuales son complejos multiproéticos y necesitan de la hidrólisis de ATP, c) transporte de iones dirigido por ATP asás tipo P, d) sistema de transporte en serie que media el transporte activo a través de la membrana interna y externa, e) proceso de traslocación en grupo llevan a cabo simultáneamente el transporte y la modificación del sustrato. Muchos de los sustratos son transportados por varios sistemas permitiéndole a la célula optimizar la energía y afinidad de estos sistemas de acuerdo con las condiciones ambientales.

iv) División celular:

Este proceso complejo 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. Involucra la invaginación circunferencial de la envoltura celular, la síntesis de lípidos y formación del septo. En esta división celular, la membrana también tiene una función importante en los procesos de replicación y segregación del cromosoma ya que proteínas importantes en este proceso se anclan en la membrana para asegurar la segregación.

v) Síntesis de lípidos de membrana:

Las enzimas de la biosíntesis de lípidos están distribuidas entre el citosol y la membrana interna. Las de síntesis de ácidos grasos están situadas en el citosol, mientras que las de fosfolípidos están localizadas en la membrana interna. Es así que la biosíntesis de lípidos se puede dividir en dos partes: la síntesis de ácidos grasos y la unión de los ácidos grasos completos a la molécula de G3P. Posteriormente se agrega el grupo de cabeza polar formando así el fosfolípido (Paoletti *et al.*, 2007).

v) *Señalización de membrana:*

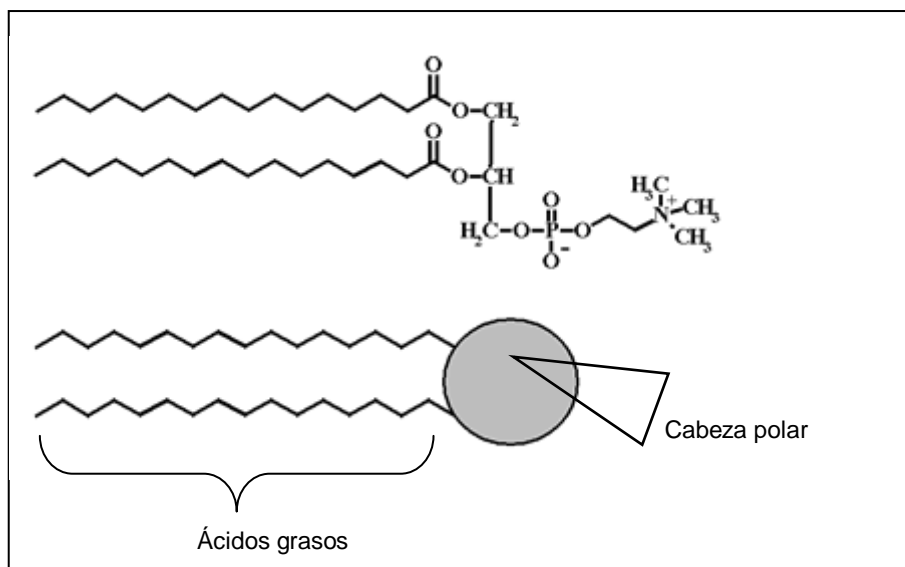
Las bacterias responden a muchas señales a través de sistemas transmembrana de transducción de señales. La membrana interna es la localización de numerosas proteínas reguladoras que controlan la expresión génica en respuesta a cambios ambientales. Existe una larga lista de sistemas regulatorios que actúan a través de cascadas de fosforilación. Estos sistemas se denominan sistemas de dos componentes dado que comprometen una proteína sensor quinasa que se autofosforila y otra proteína llamada regulador de respuesta la cual acepta el fosfato desde la sensor quinasa.

Además también a nivel de membrana se localizan y anclan proteínas implicadas en la quimiotaxis (responsables de medir el gradiente químico) y las proteínas que forman parte del motor y anclaje del flagelo (Facey y Kuhn, 2010).

2.2.4 Los fosfolípidos

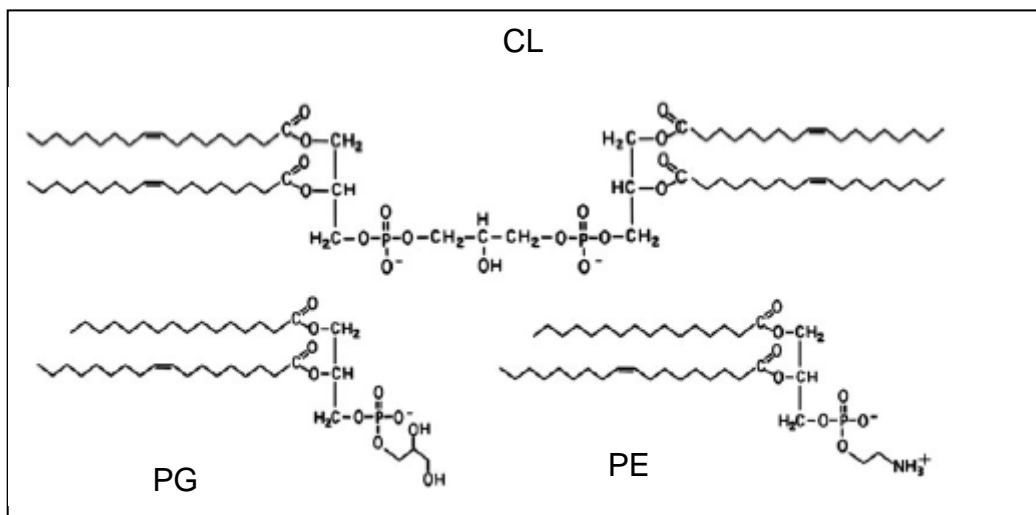
Los fosfolípidos son un componente primordial en las membranas biológicas. Su estructura está formada por dos cadenas de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol a través de enlaces tipo éster en los carbonos C1 y C2. El carbono C3 de la molécula de glicerol se une mediante un enlace fosfodiéster a un grupo de cabeza polar (Figura 3).

Figura 3. Esquema de la estructura de un fosfolípido



Los distintos fosfolípidos se clasifican según sus grupos de cabeza polar. La membrana interna de la mayoría de las bacterias gram negativas, entre ellas las de las cepas de *P. putida* utilizadas en esta tesis doctoral, está compuesta principalmente por fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Figura 4), aunque ésta última se encuentra en menor proporción. La PE constituye el 75% de los fosfolípidos totales mientras que el 25% está constituido por PG y CL. En *Escherichia coli* y bacterias del género *Pseudomonas* se ha visto que tanto la cantidad relativa de CL como de PG depende de la fase de crecimiento del cultivo, siendo el PG es más abundante en fase exponencial mientras que la CL se acumula en fase estacionaria (Cronan & Rock, 1996; Bernal *et al.*, 2007)). La incapacidad de sintetizar la PE resulta letal para las células de *E. coli*, mientras que pueden tolerar la falta de PG o de CL (Matsumoto, 2001). Los ácidos grasos unidos a estos fosfolípidos pueden ser saturados ó insaturados y la longitud de su cadena es también variable.

Figura 4. Estructura química de los fosfolípidos mayoritarios presentes en las membranas bacterianas. (CL: cardiolipina; PG: fosfatidilglicerol; PE: fosfatidiletanolamina).

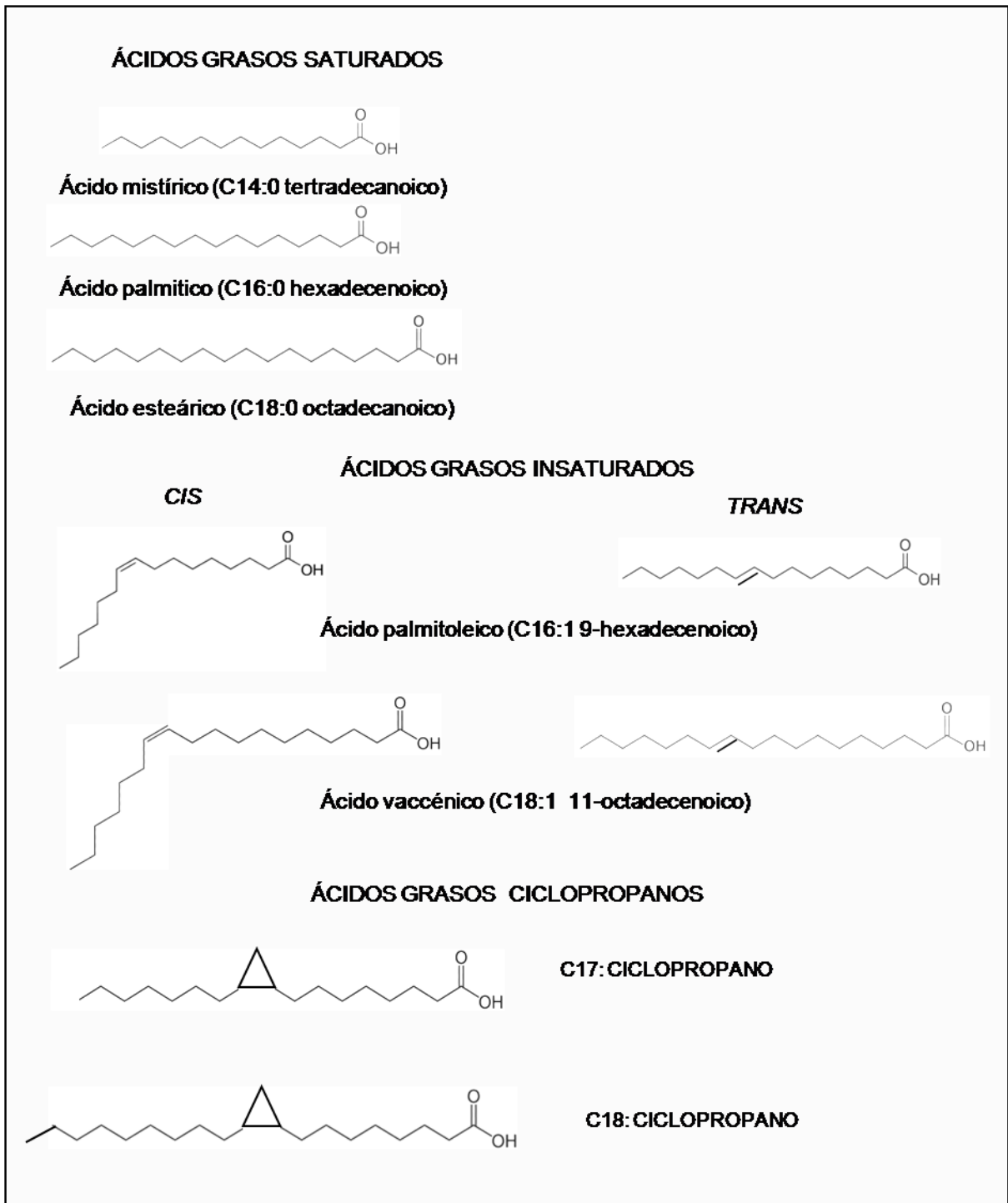


En las bacterias los ácidos grasos se encuentran únicamente como componentes de los lípidos de membrana. Las bacterias suelen poseer una composición de ácidos grasos que puede ser específica para un género o incluso para una especie. De esta forma el estudio de poblaciones microbianas a través

del análisis de sus ácidos grasos se ha convertido en un método de rutina en el laboratorio (Keinänen *et.al.*, 2004). El espectro de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de numerosas especies, es muy bien conocido. Los lípidos mayoritarios en especies de *P. putida* comprenden: los ácidos grasos saturados e insaturados y los ácidos grasos ciclopropano. Dentro de los insaturados se encuentran los *cis*-monoinsaturados, los *trans*-monoinsaturados y los polinsaturados. Los ácidos grasos saturados que se encuentran en mayor proporción en *P. putida* son el palmítico (C16:0 ó hexadecenoico) y en menor cuantía el mirístico (C14:0 ó tetradecanoico) y el esteárico (C18:0 ó octadecanoico). Los ácidos grasos insaturados (UFAs) se sintetizan como isómeros *cis* y los más abundantes son el palmitoleico (*cis*- $\Delta^{9, 10}$ - 16:1 ,o *cis*-9-hexadecenoico) y el *cis*-vaccénico (*cis*- $\Delta^{11, 12}$ - 18:1 *cis*-11 octadecenoico) (Figura 5). Los ciclopropanos más abundantes son el C:17 y C:19 ciclopropano.

En cepas de *Pseudomonas* y *Vibrio* se pueden observar también isómeros *trans* de los UFAs, aunque como componentes muy minoritarios en circunstancias normales de laboratorio. En general, la isomerización *cis-trans* ocurre como respuesta a cambios ambientales y se originan una vez que el ácido graso *cis* fue sintetizado (Junker & Ramos, 1999; Heipieper *et al.* 2003). Debido a su implicación en los procesos de respuesta a estrés, esa modificación será tratada detalladamente en una sección posterior.

Figura 5 Estructura de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de *Pseudomonas*

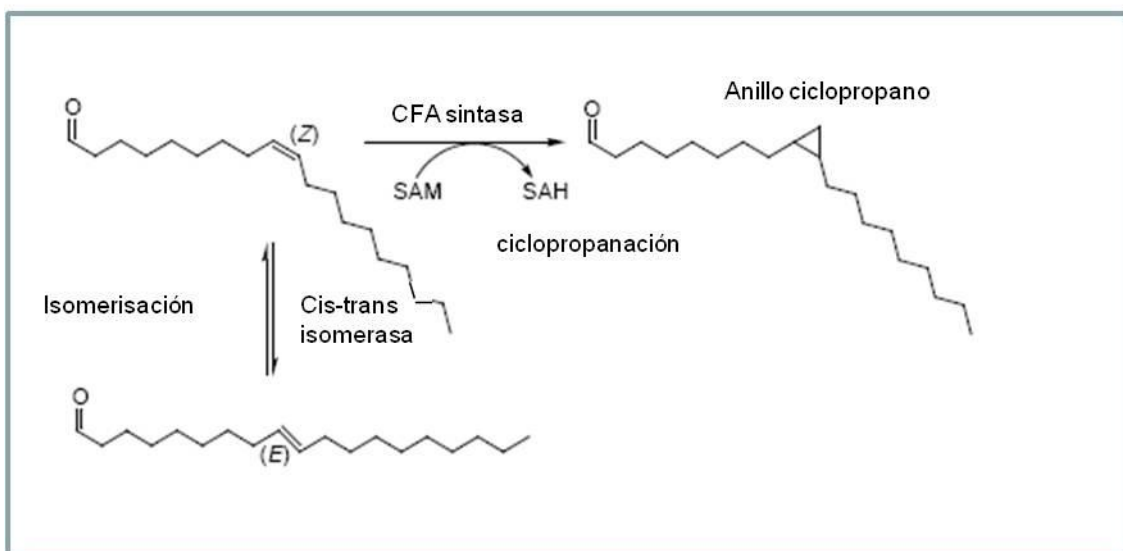


2.3 MODIFICACIONES POST-SINTÉTICAS DE ÁCIDOS GRASOS EN LA MEMBRANA EN RESPUESTA A CAMBIOS EN EL AMBIENTE

En bacterias los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos experimentan modificaciones post sintéticas. Estas reacciones no dependen de la síntesis *de novo* de lípidos sino que ocurren a partir de un ácido graso ya sintetizado. Dentro de las modificaciones de mayor relevancia en *Pseudomonas* se encuentran la formación de ácidos grasos ciclopropanos y la isomerización *cis-trans* (Fig. 6). La modificación de estos ácidos grasos confiere propiedades físicas diferentes a las membranas que los contienen, como por ejemplo cambios en la fluidez de membrana.

Algunos factores ambientales como temperatura o presencia de disolventes orgánicos tienen una gran influencia sobre la fluidez de la membrana. Los microorganismos pueden adaptarse a estos cambios de fluidez modificando su membrana para de mantener un grado de fluidez constante. Este mecanismo es llamado “adaptación homeoviscosa” (Sinensky, 1974).

Figura 6. Modificaciones de los ácidos grasos de los fosfolípidos en *Pseudomonas*. SAM: S-Adenosil-L-Metionina. SAH: S-adenosil homocisteína.



2.3.1 Isomerización cis-trans

Uno de los principales mecanismos adaptativos frente a cambios medioambientales que fluidifican la membrana es la conversión de los ácidos grasos insaturados *cis* al correspondiente isómero *trans*. Esta isomerización ocurre solamente en algunos grupos bacterianos (Tabla 1) y es llevada a cabo por la enzima *cis-trans* isomerasa (CTI).

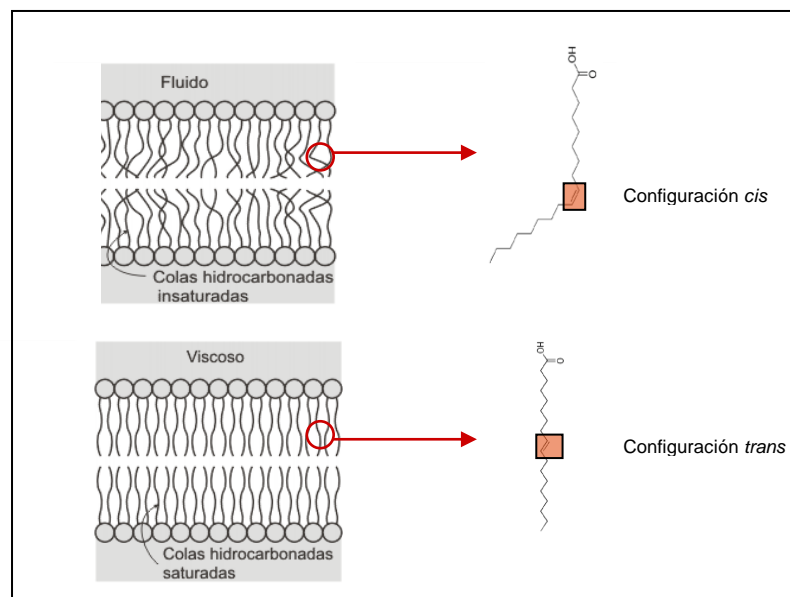
Tabla 1. Presencia de ácidos grasos *trans* en los lípidos bacterianos

Organismo	% total de <i>trans</i>	Ref.
<i>P. putida</i>	10-41	Diefenbach <i>etal.</i> , 1992
<i>P. aeruginosa</i>	1-41	Conrad <i>et al.</i> , 1981
<i>P. atlantica</i>	22-35	Guckert <i>et al.</i> , 1987
<i>Vibrio cholerae</i>	1-23	Guckert <i>et al.</i> , 1986
<i>Vibrio sp.</i>	4-16	Henderson <i>et al.</i> , 1993
<i>Methylococcus luteus</i>	17.8	Guckert <i>et al.</i> , 1991
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1-10	Nichols <i>et al.</i> , 1994
<i>Anabaena sp.</i>	5	Caudales & Wells, 1991
<i>Nostoc sp.</i>	3.4	Caudales & Wells, 1991

En una membrana que presenta un alto contenido de ácidos grasos saturados, las cadenas acílicas producen interacciones hidrofóbicas óptimas entre ellas provocando un alto grado de empaquetamiento entre los fosfolípidos. La presencia de ácidos grasos insaturados rompe esta estructura; el doble enlace *cis* provoca una torsión en la cadena acílica con un ángulo de unos 30°. Debido a esta torsión, los fosfolípidos deben ubicarse de una manera más extendida en la membrana permitiendo una cierta fluidez (Fig. 7). En condiciones normales la membrana tiene un determinado estado de fluidez óptimo para el funcionamiento de todos los mecanismos moleculares que permiten la actividad bacteriana. En situaciones en las que se produce una mayor fluidificación de esta membrana (por

ejemplo, aumento de temperatura, presencia de disolventes orgánicos u otros) se rompe este óptimo y si las bacterias no tuviesen mecanismos de compensación, se produciría una alteración significativa de las propiedades de la membrana que podría conllevar a la muerte celular. Para evitar esta fluidificación de la membrana, los ácidos grasos insaturados pasan de estar en una conformación *cis* a la conformación *trans*, en la que adoptan una estructura extendida similar a la de los ácidos grasos saturados (Figura 7). Por lo tanto, la isomerización *cis-trans* provoca una reducción significativa de la fluidez de la membrana operando como un mecanismo de respuesta rápida frente a cambios ambientales. De este modo frente a una perturbación en el ambiente, la membrana se estabiliza manteniendo a la célula en condiciones fisiológicas adecuadas para poner en marcha mecanismos adaptativos de larga duración (Keweloh *et al.*, 1991).

Figura 7. Esquema de la membrana en estado fluido y viscoso. El estado fluido es mantenido por la organización de los ácidos grasos con doble enlace *cis*. En el estado viscoso la membrana presenta una configuración más rígida debido a la presencia de ácidos grasos saturados o insaturados con doble enlace *trans*.



El mecanismo de isomerización *cis-trans* ha sido estudiado en detalle en *P. putida* y *Vibrio* ABE-1. La especificidad de la enzima por su sustrato viene dada

por la posición del doble enlace y no por la longitud de la cadena acílica, prefiriendo aquellos ácidos grasos que presentan el doble enlace en posición 9 (Keweloh *et al.*, 1991). Los ácidos grasos *trans* son sintetizados por una isomerización directa del doble enlace *cis* sin un cambio en la posición del doble enlace. La enzima tiene un sitio de unión a hemo en su secuencia y por tanto se ha sugerido que el hierro (probablemente Fe^{3+}) juega un papel fundamental en la reacción catalítica (Holtwick *et al.*, 1999). El mecanismo enzimático propuesto se lleva a cabo a través de la formación de un complejo enzima-sustrato en el cual el hierro electrofílico del grupo hemo retira un electrón del doble enlace en *cis*, transformando el enlace sp^2 en sp^3 . El doble enlace es después reconstituido tras la rotación a la configuración *trans* (von Wallbrunn *et al.*, 2003). Mutaciones que destruyen el motivo de unión al grupo hemo en *P. putida* P8 provocan la pérdida de función de la enzima (Holtwick *et al.*, 1999), y por tanto apoyan la teoría de la presencia de citocromo C y grupo hemo en el centro catalítico de la enzima. La reacción no necesita cofactores, ni de energía (Heipieper *et al.*, 2003).

2.3.2 La enzima *cis-trans* isomerasa

Uno de los aspectos más interesantes de la enzima CTI está relacionado con su mecanismo de activación. La enzima se expresa de forma constitutiva (Diefenbach & Keweloh, 1994; Junker & Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007b) y dado que la conversión *cis-trans* ocurre rápidamente (se puede detectar 10 minutos después de someter el cultivo a un choque de tolueno) resulta poco probable que la isomerización sea causada por una inducción de la isomerasa (Okuyama *et al.* 1990; Heipieper *et al.* 1992; Junker & Ramos, 1999). De hecho, experimentos realizados en nuestro laboratorio con una fusión transcripcional del promotor de la CTI a la enzima β -galactosidasa, demostraron que la transcripción no se inducía por disolventes orgánicos (Bernal *et al.*, 2007b), un compuesto que provoca la isomerización *cis-trans*.

La CTI tiene una localización periplásmica (Okuyama *et al.*, 1998; Junker & Ramos, 1999; Pedrotta & Witholt, 1999) mientras que su sustrato, el doble enlace *cis*, está embebido en la membrana (Heipieper *et al.*, 2003). Por tanto, una de las primeras teorías que surge sobre el mecanismo de activación de esta enzima

propone que los ácidos grasos insaturados *cis* se desprenden de los fosfolípidos de la membrana; el ácido graso en *cis* se isomeriza por la CTI en el periplasma y posteriormente se liga al lisofosfolípido de nuevo (Cronan, 2002). No obstante, este modelo no está avalado por el hecho de que la conversión puede ocurrir incluso en condiciones en las cuales el crecimiento celular está inhibido y en completa ausencia de una fuente de energía que sería necesaria al menos para la unión del ácido graso al lisofosfolípido. La otra explicación, más plausible pero aún sin demostrar, se basa en el hecho de que la enzima sólo tiene acceso al sustrato cuando las condiciones de la membrana permiten el acceso, es decir, cuando la fluidez de la misma aumentara. Así, en respuesta a un estímulo externo que aumentara la fluidez de la membrana, la CTI podría tener acceso al doble enlace y realizar la conversión (Heipieper *et al.*, 2001; 2003). Cuando las membranas adquieran una rigidez mayor, la enzima ya no tendría acceso al doble enlace y la isomerización *cis-trans* se detendría. Este mecanismo tan simple permite conciliar el hecho de que la enzima esté constitutivamente presente en las células y que sin embargo sólo se observe isomerización *cis-trans* en respuesta a agentes fluidificantes de membrana. Cabe destacar por último que el ratio *trans/cis* se ha sugerido que se puede utilizar como medida de estrés celular. Esto puede ser una opción valiosa en procesos de biorremediación (Heipieper *et al.*, 1995).

2.3.3 Síntesis de ácidos grasos ciclopropanos

La formación de ácidos grasos ciclopropanos (CFAs) está ampliamente distribuída en las bacterias; Entre los géneros bacterianos en los que se conoce que se producen CFAs se encuentran bacterias anaerobias estrictas, anaerobias facultativas, anaerobias aerotolerantes, microaerófilas, y aerobias obligatorias (Tabla 2). Algunos procariotas no tienen CFAs porque carecen del precursor de los mismos, los ácidos grasos *cis*-insaturados. Los CFA se forman durante la fase estacionaria del cultivo celular (Grogan & Cronan, 1997; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) llegando a constituir un 25% del contenido en ácidos grasos de la membrana, y su aumento coincide con una disminución del contenido de los ácidos *cis*-insaturados. Esto sugirió que los CFA eran sintetizados a partir de los dobles enlaces *cis* de los ácidos grasos insaturados (Cronan *et al.*, 1974). Por lo tanto los CFA tienen la

configuración *cis* sobre el anillo ciclopropano y ocurren sólo en organismos que sintetizan estructuralmente ácidos grasos *cis*-insaturados tales como el ácido palmitoleico y el *cis*-vaccénico. La formación de CFAs ocurre de manera post sintética, es decir cuando el fosfolípido se encuentra ya formando parte de la membrana celular.

Tabla 2. Distribución de los CFA en los géneros bacterianos

Producción de CFA		Producción de ácidos grasos insaturados pero no de CFA	
Gram positivas	Gram negativas	Gram positivas	Gram negativas
<i>Arthobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Leptospira</i>
<i>Bfidobacterium</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Bordetella</i>		<i>Neisseria</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Campylobacter</i>		<i>Rhodobacter</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Caulobacter</i>		<i>Spirochaeta</i>
	<i>Chlorobium</i>		<i>Treponema</i>
	<i>Citrobacter</i>		
	<i>Enterobacter</i>		
	<i>Helicobacter</i>		
	<i>Klebsiella</i>		
	<i>Nitrobacter</i>		
	<i>Proteus</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Rhizobium</i>		
	<i>Salmonella</i>		
	<i>Serratia</i>		
	<i>Thiobacillus</i>		
	<i>Vibrio</i>		
	<i>Yersinia</i>		

Algunos autores han señalado que la presencia de CFAs en la membrana tiene influencia sobre las propiedades de la misma (Jarrel *et al.*, 1983; Loffhagen *et al.*, 2007), hecho que se ve apoyado por su participación en resistencia a estrés ácido en *E. coli* (Chang & Cronan, 1999) ó en liofilización en *P. putida* KT2440 (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Como veremos más adelante, formando parte de los resultados de esta tesis doctoral, también influyen la tolerancia a tolueno en *P. putida* DOT-T1E (Pini *et al.*, 2009).

2.3.4 La enzima ciclopropano sintasa.

La síntesis de los CFA la cataliza una enzima soluble, la CFA sintasa (Wang *et al.* 1992). La biosíntesis de los CFA ocurre a través de la metilación de un doble enlace *cis* de un ácido graso insaturado. El donador del carbono metilado es el grupo activado S-metilo de la S-adenosil-L-metionina (Figura 6). La acción de esta enzima implica su unión a un componente soluble, la S-AdoMet y uno insoluble, el doble enlace *cis* de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Figura 6). No existe un requerimiento estricto sobre la posición del doble enlace *cis* que acepta el carbono. El ácido graso ciclopropano puede formarse en los isómeros correspondientes a las posiciones *cis*-9, *cis*-10 y *cis*-11 de los ácidos grasos insaturados C16:1 y C18:1. Sin embargo los dobles enlaces *cis* en las posiciones cercanas al final de una cadena acílica C₁₈ no forman ciclopropano ni tampoco se forman a partir de dobles enlaces en configuración *trans* (Ohlrogge *et al.*, 1978; Silbert *et al.*, 1973).

La formación de CFA es irreversible y éstos disminuyen conforme las células se dividen, diluyéndose a medida que avanza el crecimiento celular. En *E. coli* y *P. putida* KT2440 se ha demostrado que los mutantes deficientes en esta enzima son perfectamente viables demostrándose que los CFA no son componentes esenciales en la membrana, al menos en condiciones de laboratorio (Grogan & Cronan, 1986; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

La regulación de la CFA sintasa en *E. coli* es muy compleja. A nivel transcripcional, el gen *cfa* se expresa a partir de dos promotores; uno de ellos tiene una secuencia consenso de un promotor dependiente de σ^{70} mientras que el otro es reconocido por un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa,; el producto del gen *rpoS* (Wang & Cronan, 1994). RpoS (σ^{38}), es responsable de la expresión de genes cuyos productos se acumulan en fase estacionaria y cuyo nivel de activación se regula de manera compleja por condiciones ambientales tales como densidad celular, presión osmótica y temperatura (Zambrano *et al.* 1993.; Pratt & Silhavy, 1996). El promotor de la *cfa* dependiente de σ^{70} presenta una escasa

actividad pero al comienzo de la fase estacionaria hay un aumento de la transcripción del gen *cfa* a partir del promotor dependiente de σ^{38} .

Además de esta regulación transcripcional, la enzima CFA es inestable, con una vida media muy corta (Wang y Cronan, 1994; Chang *et al.*, 2000) y se sabe que está sometida a proteólisis dependiente del factor de transcripción RpoH. En *E. coli* la disminución de la actividad CFA-sintasa se produce después de que prácticamente todos los fosfolípidos con ácidos grasos insaturados hayan sido convertidos a ciclopropano y dado que la ciclopropanación no es reversible, la degradación de la enzima no afecta a los niveles de CFAs en la membrana. Chang y colaboradores (2000) propusieron que la disminución de la actividad CFA sintasa es una estrategia de optimización celular designada para un uso eficiente de un intermediario metabólicamente costoso, como es la AdoMet (que requiere 3 ATPs para la síntesis de una molécula [Umbarger 1978]).

3. PROMOTORES BACTERIANOS

Dado la importancia del promotor σ^{38} (RpoS) en la actividad de la ciclopropano sintasa, y por tanto en la regulación de una de las actividades que han sido objeto de estudio en esta tesis doctoral, consideramos conveniente hacer una breve introducción general sobre los promotores bacterianos.

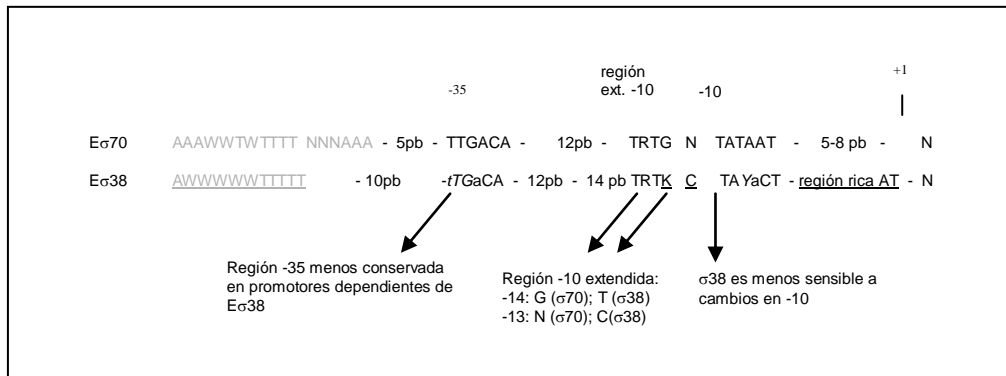
Los promotores son secuencias particulares de ADN reconocidas por la ARN polimerasa. La ARN polimerasa es responsable de la síntesis de los ARNm, ARNr y ARNt. La holoenzima está constituida por el *core* el cual contiene las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$ y una subunidad adicional, el factor σ . En procariontes, los cambios generados en la expresión génica están mediados por el factor σ el cual es el responsable del reconocimiento del promotor y unión al ADN de manera específica. Bacterias diferentes codifican una gran variedad de factores σ , y cada uno de ellos regula determinados grupos de genes. Esta selectividad en el reconocimiento del promotor por parte del factor σ se logra a través del reconocimiento de distintas secuencias en los promotores.

Las secuencias consenso que se describen en el capítulo II de esta tesis están basadas fundamentalmente en el estudio de promotores de *E. coli*. Los elementos del promotor que resultan cruciales para su reconocimiento por parte de la ARNP- σ^{70} son el elemento -35, localizado cerca de la posición -35 relativa al inicio de la transcripción y que tiene como secuencia consenso 5' - TTGACA- 3', y el elemento -10, próximo a la posición -10 y que tiene como secuencia consenso 5'- TATAAT-3' (Gross *et al.*, 1992). *In vitro*, el factor σ^{38} es similar al factor σ^{70} en cuanto a su secuencia de reconocimiento de los motivos -10 y -35 del promotor (Figura 8) (Gaal *et al.* 2001). *In vivo*, la selectividad de la holoenzima que contiene o bien el factor σ^{70} o bien el factor σ^{38} por el promotor depende de la capacidad de la holoenzima para tolerar diferencias en las secuencias consenso de los distintos promotores (Typas & Hengge, 2006).

3.1 ESTRUCTURA DE LOS PROMOTORES DEPENDIENTES DE σ^{38}

El factor σ^{38} (RpoS) posee una estructura molecular y funcional muy similar al factor σ^{70} (RpoD) sin embargo existen una serie de condiciones que conducen a una diferencia en la selectividad de la holoenzima que porta σ^{70} y la que porta σ^{38} . Primeramente, la ARNP/ σ^{38} es más flexible a variaciones de la secuencia que se apartan del consenso en las regiones -10 y -35, así como a cambios en la distancia que separa ambos motivos (Typas & Hengge, 2006). Los promotores dependientes de σ^{38} presentan una alta conservación de la secuencia en la región -10 mientras que la secuencia en la región -35 está más degenerada que en los promotores dependientes de σ^{70} (Hengge-Aronis & Becker, 2001). La ARNP/ σ^{38} reconoce una secuencia -10 más extendida con respecto a la que reconoce ARNP/ σ^{70} en las posiciones -13 (C) y -14 (T) con respecto al punto de inicio de la transcripción. Asimismo la zona entre la región -10 y el punto de inicio de la transcripción presenta secuencias ricas en AT (Gaal *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2005). Las diferencias entre estas dos clases de promotores se resumen en la figura 8.

Figura 8 Comparación de las secuencias consenso de promotores reconocidos por $E \sigma^{70}$ y $E \sigma^{38}$



3.2 FUNCIÓN FISIOLÓGICA DEL FACTOR σ^{38} (RpoS)

El gen *rpoS* se identificó en *E. coli* como un regulador central durante la fase estacionaria (Lange & Hengge-Aronis, 1991a). Normalmente se acompaña por una reducción o cese del crecimiento celular y provee a la célula de la capacidad de sobrevivir al estrés actual y de prevenir futuros estreses (protección cruzada). Esto contrasta con las respuestas específicas a estrés las cuales se disparan por una única señal de estrés que induce proteínas que le permiten a la célula enfrentar esta situación particular. Mientras que las respuestas específicas a estrés se basan en la reparación del daño celular que ya ha ocurrido, la respuesta general a estrés induce un estado de resistencia en el cual el daño celular se previene en lugar de tener que ser reparado (Storz *et al.* 2000). RpoS participa en la supervivencia a la deficiencia en nutrientes (Lange & Hengge-Aronis, 1991a), en los cambios morfológicos cuando la célula entra en fase estacionaria (Lange & Hengge-Aronis, 1991b), en la protección cruzada contra el estrés (osmótico, ácido y oxidativo) (Loewen & Hengge-Aronis, 1994) y en osmorregulación (Hengge-Aronis, R. 1996).

El gen *rpoS* ha sido descrito también en bacterias no entéricas y se ha visto que modula la virulencia (Iriarte *et al.*, 1995). Dentro de las bacterias no entéricas, el gen *rpoS* se ha encontrado en el género *Pseudomonas*. En *P. fluorescens* el gen *rpoS* se ha relacionado con la resistencia a agentes oxidativos, y regulación de síntesis de antibióticos (Samiguet *et al.*, 1995). En el trabajo realizado por

Ramos-González y Molin (1998), se describió la caracterización fenotípica de un mutante en este gen en *P. putida* KT2440. En esta cepa el mutante en *rpoS* muestra una supervivencia reducida a la falta de fuente de carbono así como también en presencia de etanol y *m*-metilbenzoato.

El grupo de degradación de tóxicos orgánicos de Granada había puesto de manifiesto que la resistencia a disolventes orgánicos en *Pseudomonas putida* era un proceso multifactorial en el que juegan un papel esencial distintas bombas de eflujo que expulsan disolventes, los ácidos grasos de la membrana que actúan como barrera impermeable y un conjunto de chaperonas que ayudan a aumentar la estructura de las proteínas y el funcionamiento celular.

En esta tesis Doctoral se han observado temas relacionados con los cambios de fluidez de membrana y su papel en la tolerancia a disolventes orgánicos, cuyos objetivos específicos se detallan en la siguiente sección.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio de las modificaciones post-sintéticas de los ácidos grasos en bacterias del género *Pseudomonas* y su participación en respuesta a estrés.

Para alcanzar este objetivo general, se propusieron tres objetivos específicos:

- 1.-** Estudio del papel fisiológico de los ácidos grasos ciclopropano en respuesta a estrés.
- 2.-** Estudio de la regulación de la expresión de los ácidos grasos ciclopropano, a nivel de expresión génica
- 3.-** Estudio del mecanismo de activación de la enzima *cis-trans* isomerasa en respuesta a estrés.

Resultados

Capítulo 1

Capítulo 1

Los ácidos grasos ciclopropanos están involucrados en la tolerancia frente a estrés por disolventes pero no en resistencia a estrés ácido en *Pseudomonas putida* DOT- T1E

Cecilia-Vanesa Pini, Patricia Bernal, Patricia Godoy, Juan-Luis Ramos y Ana Segura

Resumen

Las membranas bacterianas constituyen la primera barrera física contra los diferentes estreses ambientales. *Pseudomonas putida* DOT-T1E acumula ácidos grasos ciclopropano (CFA) en la fase estacionaria. En esta cepa el gen *cfaB* codifica la ciclopropano sintasa responsable de la síntesis de los CFA, y su expresión es mediada por la ARN polimerasa con el factor σ^{38} . Se generó un mutante *cfaB* de *P. putida* DOT-T1E y se estudió su respuesta frente a disolventes, pH ácido, y otras condiciones tales como cambios de temperatura, osmolaridad alta, y presencia de antibióticos o metales pesados en el medio de cultivo. Un mutante con el gen *cfaB* delecionado resultó más sensible a estrés por disolventes orgánicos que la cepa silvestre, pero contrastando con *E. coli* y *Salmonella entérica*, el mutante *cfaB* de *P. putida* DOT-T1E fue tan tolerante frente a un choque ácido como la cepa silvestre. El mutante fue también igual de tolerante que la cepa parental frente a ciertas drogas, antibióticos y otros agentes dañinos.

Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E

Cecilia-Vanesa Pini, Patricia Bernal,[†] Patricia Godoy, Juan-Luis Ramos and Ana Segura*

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

Summary

Bacterial membranes constitute the first physical barrier against different environmental stresses. *Pseudomonas putida* DOT-T1E accumulates cyclopropane fatty acids (CFAs) in the stationary phase of growth. In this strain the *cfaB* gene encodes the main cyclopropane synthase responsible of the synthesis of CFAs, and its expression is mediated by RNA polymerase with sigma factor σ^{38} . We generated a *cfaB* mutant of *P. putida* DOT-T1E and studied its response to solvents, acid pH and other stress conditions such as temperature changes, high osmolarity and the presence of antibiotics or heavy metals in the culture medium. A CfaB knockout mutant was more sensitive to solvent stress than the wild-type strain, but in contrast to *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, the *P. putida cfaB* mutant was as tolerant to acid shock as the wild-type strain. The *cfaB* mutant was also as tolerant as the parental strain to a number of drugs, antibiotics and other damaging agents.

Introduction

Bacterial life in the environment is threatened by predators, and by many abiotic factors such as temperature changes, presence of toxic and chaotropic compounds, exposure to ultraviolet radiation, desiccation conditions and many other physical and chemical agents (Ramos *et al.*, 2002). Cellular membranes constitute the first physical barrier against physicochemical challenges, and

are provided with a series of sensors that trigger a succession of responses to overcome damage caused by noxious agents. One such response is the alteration of membrane lipid composition, an observation made more than 30 years ago by Sinensky (1974), who proposed the term 'homeoviscous adaptation' to refer to these changes.

A number of environment protection agencies have declared organic solvents as hazardous pollutants (<http://www.epa.gov>; European Union's Guideline 1999/13/EG). These chemicals are inherently toxic, and when they reach soils and waters, they affect the biodiversity of specific niches (Huertas *et al.*, 2000). A limited number of microbes survive exposure to solvents, and the molecular mechanisms of solvent resistance have been partially elucidated in Gram-negative bacteria (Sikkema *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2002). Some bacterial strains belonging to the genus *Pseudomonas* (as *P. putida* DOT-T1E or *P. putida* S12) are extremely tolerant to organic solvents and extrusion of toxic compounds via a series of efflux pumps has been proposed to be the main mechanism of solvent tolerance (Isken and de Bont, 1996; Kieboom *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001; Rodríguez-Hervá *et al.*, 2007); however, membrane modifications play an important role in the response to toluene and other solvents as well as the response to other environmental stresses such as acid stress or temperature shifts (Pinkart *et al.*, 1996; Chang and Cronan, 1999; Junker and Ramos, 1999; Loffhagen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Bernal *et al.*, 2007a).

Changes in the overall degree of fatty acid saturation or in the *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids have been directly implicated in the cellular responses to fluidizing agents such as temperature or organic solvents (Heipieper *et al.*, 1992; Sikkema *et al.*, 1995; Weber and de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Junker and Ramos, 1999; Härtig *et al.*, 2005). The amount of *trans* unsaturated fatty acids in the *P. putida* membrane increased up to 10-fold just 5 min after toluene addition, enhancing membrane rigidity (Junker and Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007b). However, less is known about the role in the response to these environmental challenges of other membrane phenomena such as the modification of phospholipid head groups or the formation of cyclopropane

Received 17 September, 2008; revised 5 November 2008; accepted 17 December, 2008. *For correspondence. E-mail ana.segura@eez.csic.es; Tel. (+34) 958 181600; Fax (+34) 958 129600. [†]Present address: Microbiology Group, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, University of London, 29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, UK.

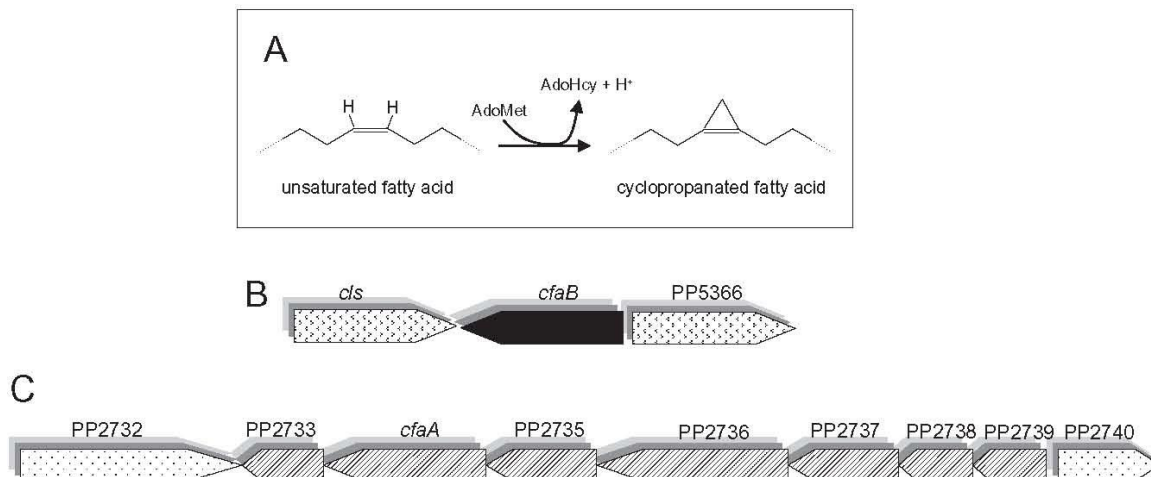


Fig. 1. A. Reaction catalysed by the cyclopropane synthase. B. Schematic representation of the ORFs surrounding the *cfaB* gene in *P. putida* DOT-T1E. *cis* stands for the cardiolipin synthase gene, PP5366 encoded for a putative dihydroipoamide dehydrogenase 3. C. Schematic representation of the ORFs surrounding the *cfaA* gene in *P. putida* DOT-T1E. PP2732, PP2733, PP2735 and PP2736 are hypothetical proteins; PP2737 encode for a putative oxidoreductase (short-chain dehydrogenase/reductase family), PP2738 for a putative transcriptional regulator, PP2739 for a putative sensory box protein and PP2740 for a putative transcriptional regulator of the MerR family.

fatty acids (CFA) (Ramos *et al.*, 1997; Bernal *et al.*, 2007a). Cyclopropane fatty acids have been proposed to be involved in the resistance of some γ -proteobacteria to certain stresses such as low pH (Chang and Cronan, 1999; Kim *et al.*, 2005) or freeze-drying conditions (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). However, little is known about the effect of changes in cyclopropane levels in response to organic solvents. The CFAs are produced by a postsynthetic modification of *cis* unsaturated fatty acids, which involves the addition of a methylene group across the double bond of these unsaturated fatty acids (Grogan and Cronan, 1997). This reaction is catalysed by the enzyme cyclopropane synthase (Fig. 1A). In *Escherichia coli* and *P. putida*, CFAs accumulated during the late-exponential and stationary phases of bacterial growth (Grogan and Cronan, 1997; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). In the solvent-sensitive *P. putida* KT2440 genome, two different putative cyclopropane synthase genes (*cfaA* and *cfaB*) have been annotated (Nelson *et al.*, 2002). A *P. putida* KT2440 *cfaB* mutant was shown to be unable to synthesize CFA and that a *cfaA* mutant had only slightly lower levels of CFAs than the parental strain (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

In this study, we identified the *cfaA* and *cfaB* genes in *P. putida* strain DOT-T1E. *Pseudomonas putida* DOT-T1E is a highly solvent-tolerant strain that was isolated from a waste water treatment plant in Granada (Ramos *et al.*, 1995). This strain is able to grow in the presence of high concentrations of toluene (up to 90% toluene [v/v]) and it is also able to degrade toluene via the toluene dioxygenase pathway (Mosqueda *et al.*, 1999). This is a model

strain regarding solvent tolerance not only because of its high tolerance but because of the accumulated data about the molecular mechanisms of solvent tolerance (Ramos *et al.*, 2002; Rodríguez-Hervá *et al.*, 2007). The *cfaB* gene product seems to be the only one responsible for the synthesis of CFA. Expression of the *cfaB* gene was shown to be RpoS-dependent. We generated a *cfaB* mutant of *P. putida* DOT-T1E and studied its response to solvents, low pH and other stresses such as temperature shifts, high osmolarity and the presence of antibiotics or heavy metals in the medium. The mutant was more sensitive to toluene shocks than the wild-type strain, but in contrast to *E. coli* and *Salmonella enterica*, the *P. putida cfaB* mutant was as tolerant to acid shock as the wild-type strain.

Results

CfaB is the main cyclopropane synthase in *P. putida* DOT-T1E

Total chromosomal DNA of *P. putida* DOT-T1E was hybridized against *cfaA* and *cfaB* gene probes generated by PCR amplification using oligonucleotides based on the *cfaA* and *cfaB* gene sequence of *P. putida* KT2440. We found that the *cfaA* gene hybridized to a single 20 kb fragment PpuMI or 3.5 kb XcmI fragment, whereas the *cfaB* gene hybridized to an EcoRI fragment of about 14 kb or a BamHI fragment of about 12 kb in the DNA of the solvent-tolerant DOT-T1E strain. We subsequently amplified and sequenced the complete *cfaA* and *cfaB* genes from the chromosome of *P. putida* DOT-T1E. Translation of the nucleotide sequences into amino acid sequences

Table 1. Fatty acid composition of *P. putida* DOT-T1E and its *cfaA* and *cfaB* mutant derivatives.

Fatty acid	Wild-type (exp)	Wild-type (st)	<i>cfaA</i> ⁻ (exp)	<i>cfaA</i> ⁻ (st)	<i>cfaB</i> ⁻ (exp)	<i>cfaB</i> ⁻ (st)	<i>cfaB</i> ⁻ (pCEC-3) (exp)	<i>cfaB</i> ⁻ (pCEC-3) (st)
C14:0	1.52	0.9	1.57	0.46	0.00	0.73	0.00	0.00
C15:0	0.08	0.822	0.11	0.33	0.00	0.69	0.00	0.00
C16:1,9 <i>cis</i>	21.7	7.09	21.12	5.46	25.5	34.1	14.63	2.85
C16:1,9 <i>trans</i>	0.28	0.0	0.70	0	0.00	0	0.00	0.00
C16:0	40.38	50.8	41.59	51.9	39.6	51.5	35.35	40.15
^a C17:cyclo	0.79	25.8	1.49	24.3	0.00	1.9	2.45	24.10
C17:0	0.0	0.49	0.06	0	0.00	0.39	0.00	0.00
C18:1,11 <i>cis</i>	12.24	9.55	8.93	12.8	12.9	7.38	10.50	15.06
C18:1,11 <i>trans</i>	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00
C18:0	22.96	4.257	24.42	5.35	21.8	3.28	32.52	12.35
^a C19:cyclo	0.00	0.46	0.00	0.32	0.00	0	0.00	0.00

a. C17:cyclo, 9,10-methyl hexadecanoic acid; C19:cyclo, 11,12-methyl octadecanoic acid.

Data are given as percentages of the total fatty acid content. Fatty acids were extracted at the exponential (exp) and late-stationary phase after 24 h of incubation (st). Shaded numbers corresponded with the CFAs.

revealed 98.7% identity between CfaB proteins of *P. putida* KT2440 and DOT-T1E, and 99% identity between CfaA proteins in the two organisms, although the translated *cfaA* in DOT-T1E is 26 amino acid longer than that deduced from the KT2440 genome sequence. An *in silico* analysis of the chromosomal region around the *cfaA* and *cfaB* genes in *P. putida* KT2440 suggested that the *cfaB* gene is transcribed as a monocistronic unit, as it is divergent from the 3' downstream gene and convergent with the gene located in 5' (Fig. 1B). In contrast, the originally annotated *cfaA* gene is in a cluster of seven open reading frames that are transcribed in the same direction (Fig. 1C). This gene organization is identical in both the solvent-sensitive *P. putida* KT2440 and solvent-tolerant *P. putida* DOT-T1E strains. We have shown with RT-PCR that cluster in *P. putida* DOT-T1E is transcribed as a single operon (data not shown). The functions of the gene products of this operon are unknown.

To assign a function to each of the genes in *P. putida* DOT-T1E, knockout mutants of the two putative *cfa* genes were constructed as described in *Experimental procedures*, and fatty acid profiles were established in cells in the early-exponential and stationary phases. In the wild-type strain cyclopropane levels were higher in the stationary phase of growth than in the exponential phase (Table 1). As expected, relative levels of the precursor unsaturated fatty acids (C16:1,9 *cis* for C17:cyclo and C18:1,11 *cis* for C19:cyclo) diminished as cyclopropane levels increased. The *cfaA* mutant contained almost the same amount of CFA as the wild-type strain, whereas CFA levels in the *cfaB* mutant were undetectable (Table 1). A double *cfaA**cfaB* mutant had the same fatty acid profile as the *cfaB*⁻ strain (data not shown). To verify that *cfaB* was responsible for CFA synthesis we complemented the *cfaB* mutant with plasmid pCEC-3, which carries the *cfaB* gene. The results showed that in the complemented strain the pattern of fatty acids in the sta-

tionary phase was similar to that in the parental strain. These data support that the *cfaB* gene product is the one responsible for CFA synthesis in *P. putida* DOT-T1E.

The cfaB mutant is more sensitive to organic solvent shocks than the wild-type strain

Cyclopropane fatty acids have been implicated in the resistance to different stresses in *E. coli*, *S. enterica* serovar Thyphimurim and *P. putida* KT2440 (Chang and Cronan, 1999; Kim *et al.*, 2005; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). To study the role of CfaB in stress resistance in *P. putida* DOT-T1E, cultures in the stationary phase (OD ≈ 2.5–3.0) of the wild-type and *cfaB* mutant were exposed to different stress conditions and survival was compared. We found that survival of the *cfaB* mutant strain was nearly 1.5 orders of magnitude lower than in the wild type when exposed to 0.3% (v/v) toluene (Fig. 2). Complementation of the *cfaB* mutation by pCEC-3 restored survival to levels similar to those in the wild-type strain (Fig. 2). Increased organic solvent sensitivity of the *cfaB* mutant was confirmed when solvent shock was triggered with 0.3% (v/v) xylene, ethylbenzene or propylbenzene instead of toluene. Survival rate of the *cfaB* mutant was correlated with the theoretical toxicity of the hydrocarbons (that is related with the log *P*_{ow} value) and was lower than that of the wild-type strain (Table 2).

Aromatic organic acids such as *p*-hydroxybenzoate or protocatechuate are tolerated up to a concentration of 25 mM without affecting survival rate in the wild type (Ramos-González *et al.*, 2001). This was also the case for the *cfaB* mutant strain with other aromatic organic acids such as benzoate or salicylate. In *E. coli* CFAs are involved in acid stress resistance in the stationary phase. To test whether this was the case in *P. putida* DOT-T1E, HCl (to 20 mM) was added to cultures of the parental and *cfaB* mutant strains grown in Luria–Bertani (LB) until the

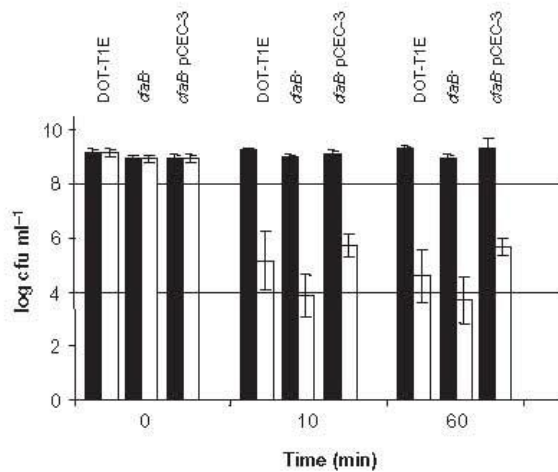


Fig. 2. Survival of *P. putida* DOT-T1E, its *cfaB*⁻ derivative strain and the *cfaB*⁺ pCEC-3 complemented strain at 0, 10 and 60 min after the addition of 0.3% (w/v) toluene. Black bars, survival of control cultures; white bars, survival of cultures with toluene.

stationary phase. We found that viability of both strains decreased by two orders of magnitude after 24 h. Then we run an experiment where cells grown on minimal medium supplemented with glucose until stationary phase were harvested and HCl was added to obtain pHs of 6, 5.5, 5, 4.5, 4 and 3.5. There was no difference between the wild type and mutant (100% survival at pH 6, 5.5, 5 and 4, and no survival at pH 3.5).

Mutant *cfaB* cells showed no differences in survival rates compared with the wild type when cultures at the late-exponential growth phase were exposed to temperature shifts from 30°C to 16°C or from 30°C to 42°C. The mutant was also not more sensitive to a number of antibiotics and heavy metals than the wild type.

The series of results presented above suggested that the *cfaB* gene product is specifically involved in organic solvent stress, but not in a general stress response.

Transcriptional analysis of the *cfa* genes

The higher levels of CFA during the stationary phase suggested that *cfaB* expression might be governed by the

Table 2. Survival of the *P. putida* DOT-T1E and *cfaB*⁻ cultures after the addition of 0.3% (v/v) *m*-xylene, ethylbenzene or propylbenzene.

	log <i>P_{ow}</i>	DOT-T1E	<i>cfaB</i> ⁻	<i>tigGHI</i>	<i>tigABC</i> ⁻
None		9.3 ± 0	9.3 ± 0.6	9.4 ± 0.1	9.2 ± 0.1
<i>m</i> -xylene	3.2	9.4 ± 0.7	7.0 ± 0.4	7.5 ± 0.3	6.6 ± 0.2
Ethylbenzene	3.4	8.8 ± 0.1	8.0 ± 0.2	6.3 ± 0.1	5.9 ± 0.3
Propylbenzene	3.6	9.3 ± 0.2	8.8 ± 0.1	8.9 ± 0.1	8.5 ± 0.1

Solvents were added when cultures reached the stationary phase, and cells were plated 10 min after the solvent was added. Survival is expressed as log cfu ml⁻¹. Logarithm of the partition coefficient of an organic solvent in a mixture of octanol/water (log *P_{ow}*) was used as a toxicity indicator. Organic solvents with log *P_{ow}* between 1 and 4.5 are very toxic for microorganisms. Within this range, organic solvents with lower log *P_{ow}* values are more toxic than those with higher values.

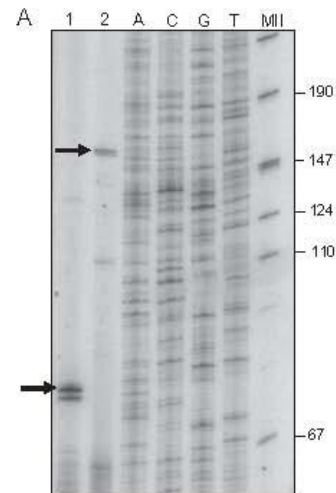


Fig. 3. Mapping of the transcription start point of the *cfaB* gene. A, Primer extension analysis. Lane 1, primer extension using primer p100; lane 2, primer extension using primer p180. B, The +1 position in the promoter region is in boldface; the putative σ^{38} recognition sequence is boxed.

RpoS sigma factor. To test this hypothesis we first determined the transcriptional start point of the *cfaB* gene, which was found 53 nucleotides upstream from the ATG start codon (Fig. 3). Around the -10 region we found a sequence that resembled that proposed to be recognized by RNA polymerase/ σ^{38} (5'-CTACTCT-3'). To further study the expression of the *cfaB* gene we fused the *cfaB* promoter region to *'lacZ* to yield plasmid pMPcfaB. Figure 4 shows that expression of the *cfaB* gene was clearly dependent on the growth phase, with a sharp increase in expression when the culture entered the late-exponential phase and persistently high levels throughout the stationary phase. The response of the *cfaB* promoter was totally different to that of the promoter of the efflux pump TtgGHI (Fig. 4) in which no increase in expression was observed

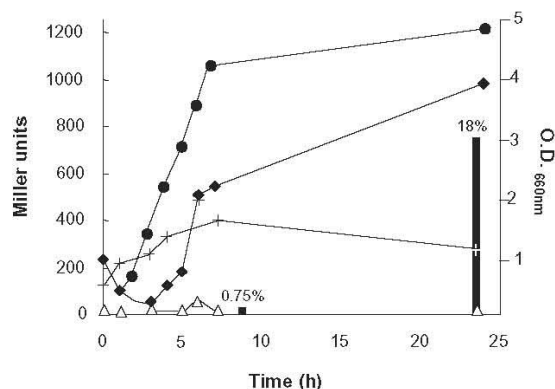


Fig. 4. Expression of the *cfaB* promoter (measured as β -galactosidase activity) along the *P. putida* DOT-T1E growth curve. Circles indicate culture growth. Black diamonds, white triangles and crosses indicate β -galactosidase activity of pMcfab, pMP220 without promoter and pMP220 with $P_{mgc}::lacZ$ (promoter of *tigGHI* efflux pump; Rojas *et al.*, 2003) respectively. Black bars show the percentage of CFAs in the membranes.

during stationary phase. This increase in expression, together with the finding of a -10 region with high similarity to a consensus sequence for σ^{38} , indicated that expression of the cyclopropane synthase gene was tightly controlled by RpoS. To verify the role of RpoS in the expression of *cfaB* we introduced plasmid pMPcfaB into a *P. putida rpoS*-deficient strain. Expression of the *cfaB* promoter was completely shut down in this genetic background (not shown), confirming that RpoS is the sigma factor responsible for transcription of the *cfaB* gene of *P. putida* DOT-T1E. At the same time as expression of β -galactosidase was measured, we determined CFA levels in the cells, and found that in the wild-type strain CFAs became detectable as *cfaB* expression increased, whereas no C17:CFA was detected in the *rpoS* mutant background at any time.

cfaB expression under different stress conditions

To determine whether the expression of *cfaB* was influenced by the above stress conditions, we used a $P_{cfaB}::lacZ$ fusion. Table 3 shows that in the stationary phase *cfaB* expression occurred at around 500 Miller units, a level of expression that was not significantly influenced by the presence of toluene or propylbenzene. The addition of HCl to 20 mM did not affect the level of β -galactosidase either (not shown). However, the addition of 15 mM benzoate led to a 2.5-fold increase in β -galactosidase levels (Table 3). No differences in expression were observed when the plasmid was introduced in the *rpoS* mutant or when the assay was done with the plasmid without promoter; that is, activity levels were always below 40 Miller units (not shown). These

results suggested that organic acids rather than inorganic acids were able to induce *cfaB* expression. To further test this hypothesis we analysed the expression of the promoter when different organic acids were added to the culture medium. None of the linear organic acids (mono- and di-carboxylic) increased expression from the *cfaB* promoter; however, several aromatic acids such as phenylacetate, salicylate and 2- or 3-toluate led to a modest increase in expression (Table 3). *cfaB* expression did not change after shifting cells from 30°C to 42°C or to 16°C.

Based on the expression results, we decided to test whether cells growing in the presence of benzoate or phenylacetate would exhibit higher levels of CFA than cells growing only on LB. The results revealed that the modest increase in *cfaB* expression in the presence of organic acids did not translate into higher levels of CFA, probably because under these conditions the *cis-trans* isomerase was also competing for the same substrate (Table 4).

Membrane fluidity

As described above, lipid membrane composition is an important determinant in tolerance towards different stresses, especially in response to those that affect membrane fluidity. The role of CFA in membrane fluidity has not been studied in detail. To determine membrane fluidity in the wild-type and *cfaB* mutant strains, we analysed fluorescence polarization values when the cultures were incubated with the dye 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. The *P* values for all cultures were 0.25 ± 0.04 , indicating that there were no significant differences in membrane fluidity between the wild-type and mutant strains.

Table 3. Transcription from the *cfaB* promoter determined as β -galactosidase activity using a fusion of the *cfaB* promoter to *lacZ*.

Compound	Miller units
None	520 \pm 15
Acetate	500 \pm 10
Citrate	350 \pm 5
Succinate	500 \pm 20
Lactate	260 \pm 5
Protocatechuate	460 \pm 30
Benzoate	1170 \pm 20
Phenylacetate	1290 \pm 30
Salicylate	1050 \pm 40
2-Toluate	1230 \pm 45
3-Toluate	1210 \pm 35
4-Toluate	750 \pm 5
3-Hydroxybenzoate	880 \pm 35

Bacterial cultures were grown until they reached a turbidity at an 660 nm of 2.5–3.0. β -Galactosidase assays were determined as described by Miller (1972) 3 h after acid addition. Data are average values of three independent assays. All compounds were added to reach a final concentration of 15 mM except for protocatechuate, which was used at a final concentration of 5 mM.

Table 4. Fatty acid composition of *P. putida* DOT-T1E membranes grown in the presence of benzoate or phenylacetate.

Fatty Acid	LB	LB + benzoate	LB + phenyl acetate
C14:0	0.37	0	0.5
C15:0	0	0.35	0
C16:1.9 <i>cis</i>	7.78	3.72	2.79
C16:1.9 <i>trans</i>	0	7.14	4.05
C16:0	43.4	46.4	45.6
C17:cyclo	23.3	16.9	20.07
C17:0	0	0	0
C18:1.11 <i>cis</i>	18.6	12.56	11.78
C18:1.11 <i>trans</i>	0	0	1.47
C18:0	5.9	11.6	12.8
C19:cyclo	0.5	1.23	1.13

Cells were grown until they reached OD₆₆₀ = 2 and then 15 mM of benzoate or phenylacetate was added. Lipids were extracted 16 h after the acid was added. Data are given as percentages of the total fatty acid content. Shaded entries highlight the increases in *trans*-UFAs and CFAs in response to benzoate and phenyl acetate.

Discussion

Although CFAs are present in bacterial cytoplasmic membranes at high levels during the stationary phase of growth (when they can represent up to 25% of the total fatty acid content), their physiological role has not been clearly established. The CFAs are nonessential components of the membranes, at least under laboratory conditions, as mutants unable to synthesize CFAs are viable. Although in *P. putida* DOT-T1E two putative open reading frames may encode a cyclopropane synthase, our results suggest that the *cfaB* gene product is the main enzyme involved in cyclopropane synthesis. Although we subjected the *cfaA* mutant to the same stresses as the *cfaB* mutant we did not obtain any distinctive phenotype for the *cfaA* mutation. Our results also show that the lack of CFA in the membranes of the *P. putida* DOT-T1E *cfaB* mutant increased toluene sensitivity as determined by the diminished viability (by 1.5 orders of magnitude) of mutant cultures with respect to the wild type. The decrease in solvent tolerance has also been documented when other enzymes responsible for the synthesis of membrane components (such as *cis-trans* isomerase or cardiolipin synthase) were knocked out (Junker and Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007a). The fact that the *cfaB* mutant cultures did not totally lose viability after solvent shock indicates that CFAs are involved in, but not essential for, solvent tolerance. Thus far the viability of mutant cultures after exposure to toluene (log *P*_{ow} 2.4) has been reported to be lost completely only when some of the efflux pumps directly involved in solvent extrusion have been knocked out (Rojas *et al.*, 2001). Other organic solvents with log *P*_{ow} values higher than that of toluene are less toxic for bacterial cells and viability of cultures exposed to a sudden shock with these solvents remained high even in the efflux pump mutants (Table 2). Our results confirmed

the toxic effect of these solvents, with a higher decrease in solvent tolerance in the *cfaB* mutant when *m*-xylene was added to the culture, subtle effects on *cfaB* survival with ethylbenzene and almost no differences with propylbenzene.

The involvement of CFA in solvent tolerance has been described in the anaerobic bacteria *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Zhao *et al.*, 2003); overexpression of cyclopropane synthase in this microorganism increased butanol tolerance; however, it decreased butanol production. In *C. acetobutylicum* butanol was able to increase the CFA content in membranes (Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984), whereas in *P. putida* DOT-T1E no increase in CFA content was detected after toluene was added, and *cfa* gene expression was not induced in the presence of the solvent.

We found no other differences between the wild type and the *cfaB* mutant with regard to resistance to other stresses. Brown and colleagues (1997) reported a correlation between *E. coli* strains with a high degree of intrinsic acid tolerance and higher CFA content in the membranes of these strains. In this connection it was also found that *cfa* null mutants of *E. coli* and *S. enterica* were more sensitive to acid stress than the corresponding wild-type strain (Chang and Cronan, 1999; Kim *et al.*, 2005). We found no pH at which survival of the *P. putida* DOT-T1E *cfaB* mutant was compromised in comparison with the wild-type strain, suggesting that in *P. putida* CFA may not be related with survival after acid stress. In *E. coli* and *S. enterica* expression of the *cfa* gene is driven from two promoters (one dependent on σ^{70} and another on σ^{38}); however, in *P. putida* DOT-T1E *cfaB* gene expression is mediated by RNA polymerase only with σ^{38} . Expression of the *cfa* gene in *E. coli* increased in response to short-chain carboxylic acids such as acetate, which is present in its natural gut niche (Arnold *et al.*, 2001); in contrast with *E. coli*, short-chain organic acids did not induce *cfaB* gene of *P. putida* DOT-T1E, although aromatic carboxylic acids did induce *P. putida* DOT-T1E *cfaB* gene expression. Whether the response to organic and inorganic acids reflects different regulatory mechanisms of cyclopropane synthase in pseudomonadaceae and enteric bacteria remain to be elucidated. The role of CFA in survival of *P. putida* under environmental conditions is an area that deserves further research, in particular in the rhizosphere of plants, a niche in which *P. putida* proliferates and in which a large number of aromatic carboxylic acids derived from lignin breakdown are present.

Interestingly, although the *cfaB* gene in pCEC-3 was expressed from a plasmid promoter, the CFA levels observed during the exponential phase were only slightly higher than when *cfaB* was expressed from its own promoter. This indicates that some other regulatory mechanisms operate to control the levels of CFAs in the

membranes. In *E. coli* CFA synthase is unstable because of RpoH-dependent proteolysis (Chang *et al.*, 2000), and in *P. putida* *rpoH* expression is induced in the presence of alkylbenzoates (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006), so increased cyclopropane synthase degradation might explain the discrepancy between *cfaB* expression and CFA content in the membranes. Proteolysis of cyclopropane synthase has been suggested to be an important mechanism to avoid consumption of S-adenosyl-methionine in the exponential phase during which this compound is required for the synthesis of other molecules. The complexity of the regulation of CFA might be related not only to membrane physical properties, but it might also respond to a general metabolic regulation.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

Pseudomonas putida DOT-T1E and its mutant derivatives were routinely grown on LB or M9 minimal medium supplemented with the carbon sources indicated in the text (Abril *et al.*, 1989). Cultures were incubated at 30°C and shaken on an orbital platform operating at 200 strokes per minute. The stationary phase was normally reached after 5 h of growth ($OD_{600} \approx 2.5$ –3).

Construction of plasmid and mutant strains

The *P. putida* DOT-T1E *cfaB* gene was amplified from chromosomal DNA using oligonucleotides Kpncfa2b (5'-TAGGTACCGTAGGCGTCGTGGCCAATTA-3') and EcoRlcfa (5'-TGAATTCGGCCGCTCCTGCACAACC-3'), and digested with EcoRI and KpnI. This DNA was ligated to pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995), which had been previously cut with the same enzymes. The resulting plasmid, named pCEC-3, was transformed in the *P. putida* DOT-T1E and *P. putida* DOT-T1E *cfaB*⁻ strains. The resulting gentamicin-resistant colonies were checked for the presence of the plasmid, and one clone of each transformation was selected for further analysis.

To construct a *cfaB* mutant strain, a small fragment (706 bp) of the *cfaB* gene was amplified using oligonucleotides CFA1 (5'-ATGCTTGCTCAACTCCACC-3') and CFA2-6 (5'-GTATGGGTGCGACTGTTGGA-3'). This fragment was cloned into the pMBL-T vector (Dominion MBL, Spain) to obtain pANA247, which was cut with BamHI, and the 2.2 kb BamHI fragment (containing the Ω ::km cassette) of pHP45 Ω -Km (Prentki and Krisch, 1984) was ligated in the linearized plasmid. The resulting plasmid (pANA247K) was introduced into *P. putida* DOT-T1E by electroporation (Enderle and Farwell, 1998), and cultures were plated onto LB medium plus kanamycin to select for the single homologous recombination event that disrupts *cfaB* by incorporating the plasmid into the chromosome. A *cfaA* mutant strain was constructed as in Muñoz-Rojas *et al.* (2006), but using *P. putida* DOT-T1E as a recipient strain. To construct the double mutant (*P. putida* DOT-T1E *cfaA*⁻ *cfaB*⁻) we excised the Ω ::Km cassette of plasmid pANA247 with BamHI and replaced it with the Gm^r cassette of pMS255 (Ko and Park, 2000) pre-

viously recovered with BamHI. The new plasmid (pCEC-1) was electroporated into *P. putida* DOT-T1E *cfaA*⁻ strain and gentamicin-resistant clones were selected. All mutants were checked by Southern blot (not shown).

Survival after stress treatment

Cultures of the wild-type and mutant strains were grown in LB medium until the stationary phase ($OD_{600} \approx 2.5$). Then cultures were divided into two halves, one of which was treated with the stress agent [temperature shift from 30°C to 42°C or 16°C, addition of 15 mM benzoate, 0.7 M NaCl, 20 mM HCl or 0.3% (v/v) organic solvent] while the other one was kept as a control. Serial dilutions of the cultures were plated onto LB after 30 min, 1 h and 4 h to determined survival rates. In the assays with organic solvents, cells were plated after 10, 30 and 60 min; data represent the media of at least three independent experiments. Acid resistance was also tested as described by Chang and Cronan (1999). Briefly, cells of cultures growing in M9 minimal medium supplemented with glucose in the stationary phase were harvested and resuspended in M9 minimal medium. Hydrochloric acid was added until pH of the cultures reached 6, 5.5, 5, 4.5, 4 or 3.5 and survival was measured after incubation for 1 and 3 h at 30°C.

Fatty acid analysis

Phospholipids were extracted as described by Bligh and Dyer (1959) and *trans*-esterified as described before (Bannon *et al.*, 1982). After gas chromatographic separation, the fatty acids were identified by mass spectrometry. Data presented in tables are representative of three experiments.

β -Galactosidase assays

The *cfaB* promoter was amplified using oligonucleotides PstlcfaB2 (5'-AACTGCAGAGCGGCAGATGCAA-3') and EcoR1cfaB2 (5'-GGAATTCGCTGGCAGCTTCGT-3'). The fragment was then cut with PstI and EcoRI and cloned into pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) previously cut with the same enzymes to construct plasmid pMPcfaB. This plasmid was electroporated into *P. putida* DOT-T1E and *P. putida* DOT-T1E *rpoS*. Cultures were grown overnight on LB medium plus tetracycline, and on the following morning they were diluted to an OD_{600} of 0.1. When the cultures reached the stationary phase ($OD \approx 3.0$) they were exposed to different stressors, for example, 37°C or 16°C, 20 mM HCl, 15 mM benzoate, 15 mM phenylacetate, 25 mM protocatechuate, 25 mM *p*-hydroxybenzoate, 5 mM propylbenzene, 15 mM succinate, 15 mM acetate and 15 mM citrate, and 0.075% (v/v) toluene. β -Galactosidase activity was assayed 1, 3 and 20 h after stress treatment.

Fluorescence anisotropy measurements

Membrane fluidity was determined by measuring fluorescence polarization of the dye 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene probe inserted into the lipid bilayer of the cytoplasmic membranes. Experiments were done as described by Bernal and colleagues (2007a) except that cultures were harvested during the early stationary phase.

Primer extension analysis

Cells of *P. putida* DOT-T1E grown overnight in LB medium were diluted 1:100 in the same medium. After 12 h of incubation, 15 ml samples were harvested by centrifugation and RNA was extracted as described before (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005). Primer extension analysis of 100 µg of total RNA samples was carried out as described previously (Marqués *et al.*, 1993) using ³²P-end-labelled oligonucleotides. For this step we used oligonucleotides p180 (5'-GAATGGTGACCTGAGGACTA-3') and p100 (5'-CAATGCA GGTGGAAGTTGAG-3'), which were complementary to the coding strands within the *cfab* gene. cDNAs were run in urea sequencing gels, and gels were exposed to a phosphor-imaging screen (Fuji Photo Film) for 5–12 h. Phosphor-imaging screens were scanned with a phosphor-imaging instrument (Molecular imager FX; Bio-Rad).

Gene accession number

The sequence of the *P. putida* DOT-T1E *cfab* gene has been deposited under number DQ665843. The sequence of the *P. putida* DOT-T1E *cfab* and surrounding genes has been deposited under number DQ665844.

Acknowledgments

This study was supported grants from the CICYT (BIO2006-05668) and the Junta de Andalucía (CVI-344), and ERA-NET PSYSMO (GEN2006-27750-C5-5E/SYS). C.V.P. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Cátedras Volantes program of the Santander-Central-Hispano Bank and CSIC. *Pseudomonas putida* DOT-T1E *rpoS*⁻ was a gift from Dr M. I. Ramos-Gonzalez. We thank 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.

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 pWW0. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4191–4198.

Arnold, C.N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., and Siegele, D.A. (2001) Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* **183**: 2178–2186.

Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., and O'Rourke, K.L. (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and readability. III. Literature review of an investigation into the development of a rapid procedure for methoxide catalysed methanolysis of fats and oils. *J Chromatogr* **247**: 71–89.

Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J.L., and Segura, A. (2007a) A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ Microbiol* **9**: 1135–1145.

Bernal, P., Segura, A., and Ramos, J.L. (2007b) Compensatory role of the *cis-trans* isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol* **9**: 1658–1664.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917.

Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A., and Nichols, P.D. (1997) Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int J Food Microbiol* **37**: 163–173.

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.

Chang, Y.-Y., Eichel, J., and Cronan, J.E., Jr (2000) Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *J Bacteriol* **182**: 4288–4294.

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.

Enderle, P.J., and Farwell, M.A. (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* **25**: 954–958.

Grogan, D.W., and Cronan, J.E., Jr (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 429–441.

Heipieper, H.J., Diefenbach, 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 from substrate toxicity. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1847–1852.

Huertas, M.J., Duque, E., Molina, L., Rosselló-Mora, R., Mosqueda, G., Godoy, P., *et al.* (2000) Tolerance to sudden organic solvent shocks by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from toluene polluted sites. *Env Sci Technol* **34**: 3395–3400.

Härtig, C., Löffhagen, 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.

Isken, S., and de Bont, J.A.M. (1996) Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol* **178**: 6056–6058.

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.

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.

Kim, B.H., Kim, S., Kim, H.G., Lee, J., Lee, I.S., and Park, Y.K. (2005) The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* *Microbiol* **151**: 209–218.

Kim, K., Lee, S., Lee, K., and Lim, D. (1998) Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J Bacteriol* **180**: 3692–3696.

- Ko, M., and Park, C. (2000) Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Molecular Biology* **303**: 371–382.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., II, 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.
- 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.
- 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.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M.I., and Ramos, J.L. (1999) Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**: 69–76.
- 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.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808. Erratum in: *Environ Microbiol*. 2003, **5**: 630.
- 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.
- Prentki, P., and Krisch, H.M. (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303–313.
- Ramos-González, M.I., Godoy, P., Alaminos, M., Ben-Basset, A., and Ramos, J.L. (2001) Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to *p*-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4388–4341.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., and 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**: 3911–3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haidour, 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.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., *et al.* (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol* **56**: 743–768.
- Rodríguez-Hervá, J.J., García, V., Hurtado, A., Segura, A., and Ramos, J.L. (2007) The *tigGHI* solvent efflux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. *Environ Microbiol* **9**: 1550–1561.
- 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., Guazzarone, 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 of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **185**: 4755–4763.
- 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.
- 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.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* **9**: 27–39.
- Vollherbst-Schneck, K., Sands, J.A., and Montencourt, B.S. (1984) Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **47**: 193–194.
- Weber, F.J., and de Bont, J.A.M. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**: 225–245.
- Zhao, Y., Hindorf, L.A., Chuang, A., Monroe-Augustus, M., Lyristis, M., Harrison, M.L., *et al.* (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

Capítulo 2

Regulación del gen *cfaB* de la ciclopropano sintasa en *P. putida* KT2440 en respuesta a cambios ambientales

Cecilia-Vanesa Pini, Patricia Godoy, Patricia Bernal, Juan-Luis Ramos y Ana Segura.

Resumen

Los ácidos grasos ciclopropanos (CFAs) se han encontrado en los fosfolípidos de las membranas de una variedad de eubacterias y su presencia se relaciona con la sobrevivencia a estrés. En *Pseudomonas putida* los CFAs se acumulan en la membrana durante la fase estacionaria de crecimiento, pero no se conoce en detalle los mecanismos de regulación involucrados en la expresión del gen de la CFA sintasa. En este trabajo se demuestra que la expresión del gen *cfaB* en *P. putida* KT2440 es dependiente del factor sigma RpoS y que RpoS reconoce la secuencia 5'-CTACTCT-3' entre las bases -8 y -14 con respecto al punto de inicio de la transcripción. También hemos mutagenizado el promotor *cfaB* y se ha establecido la importancia de la posición de cada nucleótido para la transcripción mediada por RpoS. Las posiciones -9,-12,-13 y -14 son las más críticas para la máxima actividad del promotor en *Pseudomonas putida*. Los sustratos de la CFA sintasa, los ácidos grasos *cis* insaturados, son también sustratos de otra enzima relacionada con el estrés, la *cis-trans* isomerasa (CTI). A pesar de emplear el mismo sustrato, hemos observado que la actividad de la CTI no está limitada por la actividad de la CFA sintasa y viceversa. De hecho, en un mutante nulo la cantidad de ácidos grasos *trans* sintetizados luego de la adición de un estrés específico no fue mayor que en la cepa parental a pesar del hecho de que hay más ácidos grasos insaturados *cis* que pueden ser utilizados por la CTI como sustrato. En un mutante deficiente en la enzima CTI el nivel de ácidos grasos ciclopropano resultó similar a la cepa parental bajo una amplia variedad de condiciones de cultivo.

Regulation of the cyclopropane synthase *cfaB* gene in *Pseudomonas. putida* KT2440

Cecilia Pini, Patricia Godoy, Patricia Bernal, Juan-Luis Ramos and Ana Segura*

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

* Corresponding author: Ana Segura

Phone: +34 958 181600, Ext: 114

Fax: +34 958 129600

e-mail: ana.segura@eez.csic.es

SUMMARY

Cyclopropane Fatty Acids (CFAs) have been found in the membrane phospholipids of a variety of eubacteria and it has been reported that they are involved in stress endurance. In *Pseudomonas putida* CFAs accumulate in the membrane during the stationary growth phase, but little is known about the regulatory mechanisms involved in the control of the expression of the *cfa* synthase gene expression. We show here that *cfaB* gene expression in *P. putida* KT2440 is dependent on the RpoS sigma factor and that RpoS recognizes the sequence 5'-CTACTCT-3' between -8 and -14 from the main transcription start point. We have carried out a mutational study of the *cfa* promoter and have determined the importance of each nucleotide position in the RpoS. Positions -9, -12, -13 and -14 are the most critical for maximal activity. In *Pseudomonas putida* the substrates of the CFA synthase, *cis*-unsaturated fatty acids (*cis*-UFAs), are also substrates for another stress-related enzyme, the *cis-trans* isomerase (CTI). Despite using the same substrates, we have observed that the activity of the CTI is not limited by the CFA synthase activity and *viceversa*. For instance in a *cfaB* knockout mutant the amount of *trans*-UFAs synthesized after organic shock was similar to that in the parental background in spite of available *cis*-UFAs susceptible to be used as a substrates by CTI. In this regard in a *cti* deficient mutant background the level of cyclopropane fatty acids under a variety of growth conditions were similar to those in the parental one under the same conditions.

INTRODUCTION

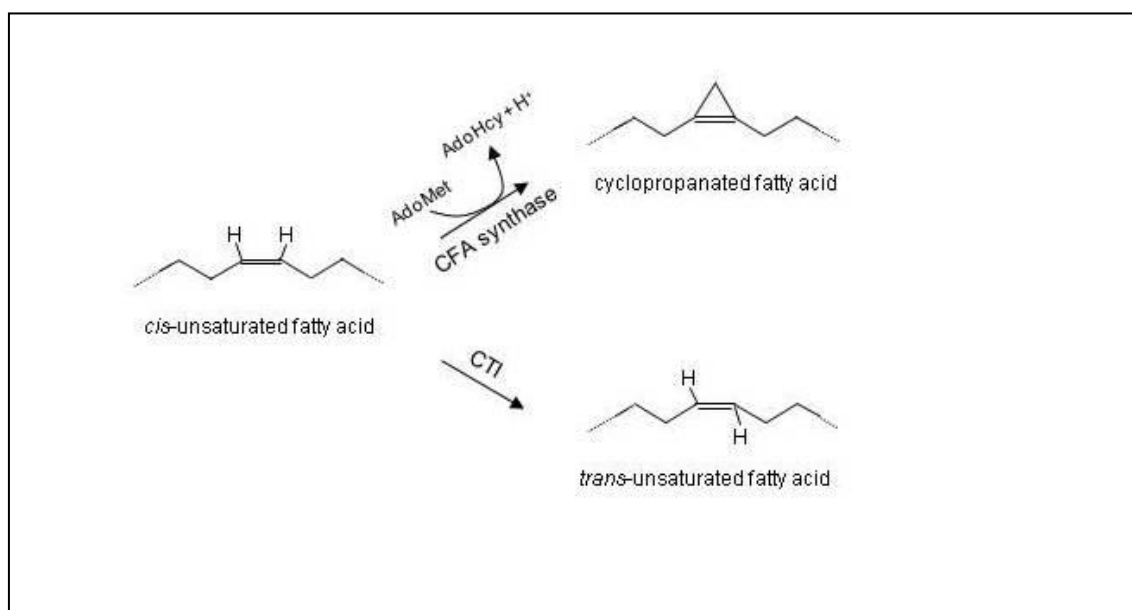
Pseudomonas species colonize many different environments and consequently have diverse lifestyles. Species belonging to this genus have been described as opportunistic human and plant pathogens (such as *P. aeruginosa*) (Yahr and Greenberg, 2005; Yang *et al.*, 2008; Attila *et al.*, 2008), beneficial to plants (*P. putida* or *P. fluorescens*) (Molina *et al.* 2000; Gal *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007, Giddens *et al.* 2007) , or plant pathogens (e.g. *P. syringae*) (Uppalapati *et al.* 2008). In all the different environments these bacteria can inhabit they are threatened by many different biotic and abiotic factors; and consequently they have developed mechanisms to cope with different stresses (Ramos *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2010). The ability to colonize multiple habitats reflects a high adaptability and this trait correlates with the comparative high number of sigma factors present in this group of gamma proteobacteria (Ramos-González and Molin, 1999; Martinez-Bueno *et al.*, 2002; Venturi, 2003; Potvin *et al.*, 2008). One extensively studied alternative sigma factor is RpoS (σ^S or σ^{38}) which controls the expression of genes involved in survival to starvation and other stresses that lead to growth reduction (stationary phase), virulence (Loewen *et al.*, 1998; Ishihama, 2000) and in niche colonization (Jorgensen *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1999).

In *P. putida* KT2440, a soil bacterium with significance in bioremediation and promotion of plant growth, RpoS controls the expression of at least 50 proteins (Ramos-González and Molin, 1998), and among them is the cyclopropane synthase, the enzyme responsible for the addition of a methylene group across the double bound of *cis* unsaturated fatty acids to form cyclopropane fatty acids (Grogan and Cronan, 1997; Pini *et al.*, 2009; Figure 1). Regulation of the cyclopropane synthase (CFA synthase) is of great interest because of its role in the response to stresses such as acid stress in *E. coli* (Chang and Cronan, 1999) and the presence of toxic compounds like toluene and other organic solvents in *P. putida* (Pini *et al.*, 2009). In *E. coli* and *P. putida*, cyclopropane fatty acids (CFAs) start to accumulate at the late stages of the exponential growth phase, and reach maximal levels at the stationary growth phase (Grogan and Cronan, 1997; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Pini *et al.*, 2009). Although two different putative cyclopropane synthase genes (*cfaA* [PP2734] and *cfaB* [PP5365]) had been annotated in the *P. putida* KT2440 genome (Nelson *et al.*, 2002), Muñoz-Rojas and coworkers (2006) demonstrated that the *cfaB* gene of *P. putida* KT2440 encoded the main enzyme

responsible for the synthesis of CFAs, a result that was latter confirmed in other *P. putida* strains (Pini *et al.*, 2009).

The substrates of the CFA-synthase, the *cis*-unsaturated fatty acids (*cis*-UFAs), are also substrates for the *cis-trans* isomerase (CTI, Figure 1), a key enzyme in the modification of the membrane fluidity in response to the presence of organic solvents or temperature changes (Heippieper *et al.*, 1992; Sikkema *et al.*, 1995; Pinkart *et al.*, 1996; Weber and de Bont, 1996; Junker and Ramos, 1999; Loffhagen *et al.*, 2001; Härting *et al.*, 2005; Bernal *et al.*, 2007). The presence of *trans*-UFAs and CFAs in microbial membranes has an influence on its properties (Jarrel *et al.*, 1983; Loffhagen *et al.* 2007) and several reports had suggested competition for *cis*-UFAs between *cis*- to *trans*- isomerase and cyclopropane synthase for synthesis of *trans*-UFAs and the CFAs respectively (Härtig *et al.*, 2005; Pini *et al.*, 2009). It was therefore of interest to explore if cross-talk between these two enzymes exists in *Pseudomonas* to control membrane structure.

Figure 1: Schematic representation of the reactions catalyzed by the CFA synthase and CTI.



The results shown in this work confirmed that, in contrast with the observations in *E. coli*, in which a sigma-70 and a RpoS promoter overlap and contribute to the transcription of the *cfaB* gene (Wang and Gronan, 1994), in *P. putida* KT2440 there is a single transcriptional start point and that the expression of the *cfaB* promoter is fully

dependent on the RpoS sigma factor. The nature of this promoter was confirmed through the identification of four nucleotides in the -10 region that are necessary for high expression of the *cfaB* promoter. Despite the fact that CFA synthase and CTI utilize the same *cis*-UFAs as substrates, the level of *trans*-UFAs or CFAs in the membranes of mutants deficient in CTI or cyclopropane synthase are not significantly different than those in the parental strain, suggesting that the amount of *cis*-UFAs is not limiting for the activity of these two stress-related enzymes.

RESULTS

Transcriptional analysis of the *cfaB* gene in *P. putida* KT2440

In *P. putida* KT2440 the *cfaB* gene is transcribed divergently with respect to the *lpd3* gene encoding a dihydrolipoamide dehydrogenase and convergently with the *cls* (cardiolipin synthase) gene (Fig. 2A), suggesting that *cfaB* gene is a monocistronic unit. In order to identify the promoter of the *cfaB* gene, we first determined the transcriptional start point (tsp) of the KT2440 *cfaB* gene, which was located 53 nucleotides upstream of the proposed ATG codon of the CFA sequence (Figure 2B). Putative consensus sequences for the Shine-Dalgarno box, and for the -35 and -10 boxes of an RpoS-dependent promoter were found upstream from the transcription initiation point (Figure 2B). To confirm that the expression of *cfaB* promoter in this strain was RpoS-dependent, the *cfaB* promoter was fused to the *lacZ* gene in plasmid pMP220 and β -galactosidase activity was measured in *P. putida* KT2440 and in its isogenic RpoS mutant (Ramos-Gonzalez and Molin, 1998). As seen in Figure 2C, expression of the *cfaB* promoter in *P. putida* KT2440 was fully dependent on growth phase and no expression was detected in the RpoS knock-out mutant strain. As expected, real-time PCR assays showed that the expression of *rpoS* and *cfaB* genes was almost null in the exponential growth phase, while both genes were expressed at a relatively high level during the stationary phase (Figure 2D). *cfaB* expression started to decrease slightly before the expression of the *rpoS* gene.

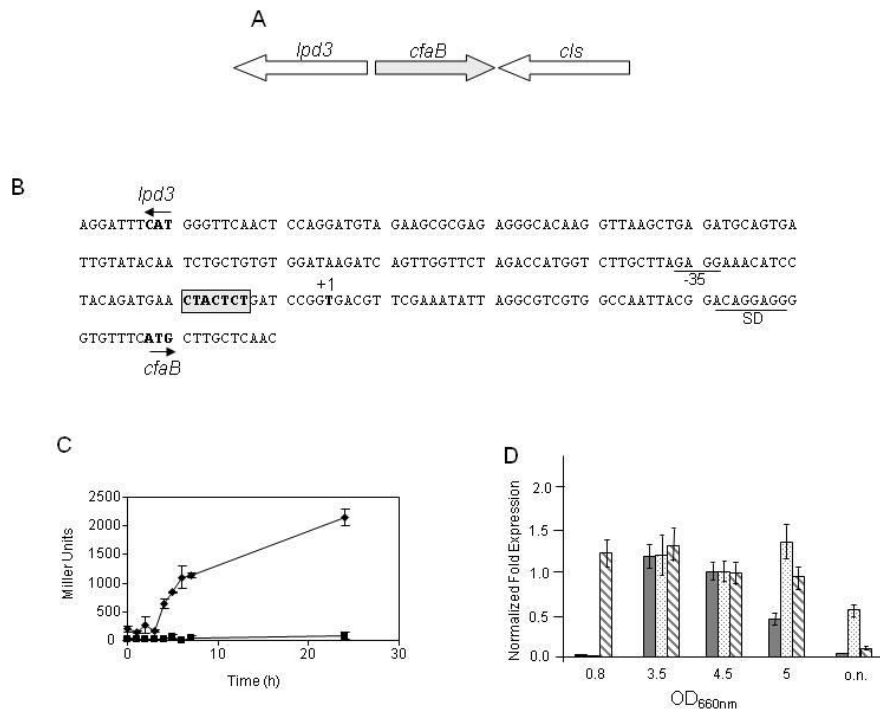


Figure 2: A) Schematic representation of the localization of the *cfaB* gene in the *P. putida* KT2440 chromosome; *cls*: cardiolipin synthase; *lpd3*: dihydrolipoamide dehydrogenase. B) Intergenic sequence between *lpd3* and *cfaB* genes. The putative Shine-Dalgarno (SD) and RpoS -35 consensus sequences have been underlined, and the -10 region is within the grey box. The transcriptional start point is bolded. C) Expression of the *cfaB* gene throughout the growth curve. Diamonds represent data of the wild-type strain; squares data of the RpoS mutant. D) Expression of the *cfaB* (grey bars), *rpoS* (dotted bars) and *cti* (stripped bars) genes at different points during the growth cycle ($OD_{660nm} \approx 0.8, 3.5, 4.5, 5.0$ and overnight [o.n.]) measured by real-time PCR.

Promoter analysis

In the *cfaB* promoter, the proposed consensus sequence for RpoS recognition differs only in one position from the *E. coli* consensus (Figure 3A) and it covers from -8 to -14 rather than from -7 to -13. To analyze the importance of each nucleotide in the putative RpoS recognition site in the *cfaB* promoter, we generated transverse point mutations in each of the 7 nucleotides between positions -8 and -14, (Figure 3B).

A							
-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	
X	T	A	T	A	A	T	σ^{70} <i>E. coli</i> .
-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	
C	T	A	T/C	A/G	C/G	T	σ^{38} <i>E. coli</i> .
-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	
C	T	A	C	T	C	T	<i>cfaB</i> <i>P. putida</i>
-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	
T	T	A	G	G	C	T	Pm <i>P. putida</i> pWW0

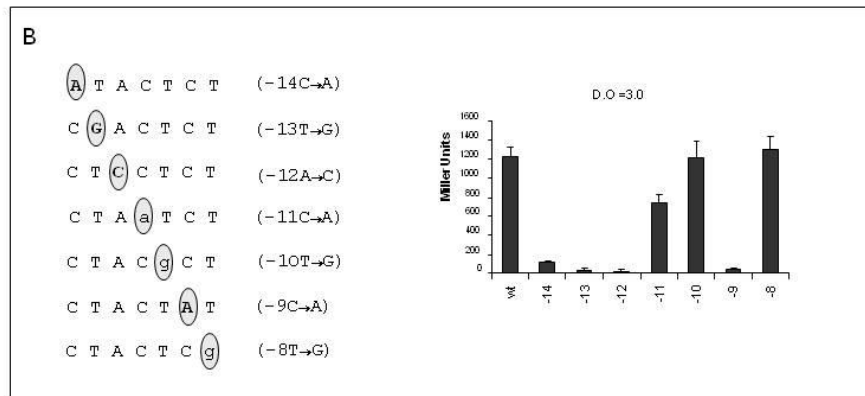


Figure 3: A) Consensus sequences of the σ^{70} and σ^{38} in *E. coli*, in the *cfaB* promoter and in the Pm promoter of the pWW0 plasmid for toluene degradation in *P. putida* mt-2. B) Schematic representation of the mutant promoters and their expression level measured as β -galactosidase at $OD_{660nm} \approx 3.0$. Capital, bolded letter indicated the essential positions in the consensus sequences

The mutant promoters were cloned in the pMP220 plasmid and β -galactosidase expression was followed throughout the growth curve. Expression from wild-type and mutant promoters during the exponential growth phase was low (never higher than 100 Miller Units) (not shown). However, the expression increased when the culture reached a turbidity at 660 nm of around 1.5 and maximum levels were detected when the cultures had reached a turbidity of 3 (Figure 3B). Mutations at positions -14, -13, -12 and -9 completely abolished the *cfaB* promoter activity. A mutation at position -11 resulted in a drop of promoter activity, while mutations at -8 and -10 had almost no effect in the promoter activity. The expression of all these promoter mutants in the *rpoS* background was null (results not shown), indicating that the expression from the mutant promoters was still dependent on RpoS sigma factor.

Does CFA synthase compete with CTI for the substrate?

Previous observations in our laboratory showed that the addition of phenylacetate or benzoate to the culture medium increased the expression from the *cfaB* promoter without an increment in the relative amount of CFAs in the membrane of *P. putida* DOT-T1E (Pini *et al.*, 2009). Under these conditions, the levels of *trans*-UFAs showed a significant increase (with the concomitant reduction in the amount of *cis*-UFAs). These facts led us to hypothesize that one plausible explanation was competition for the substrate by the two stress-related enzymes in *Pseudomonas*, the CTI and the CFA synthase (Figure 1). To explore this possibility, we first analyzed the expression of the *cfaB* and *cti* genes in *P. putida* KT2440 using *cti* and *cfaB* promoter fusions to *lacZ* (Bernal *et al.*, 2007; this work) and measured β -galactosidase activity when phenylacetate was added to cells that had reached early stationary growth phase ($O.D._{660nm} \approx 2$). As seen in Figure 4, both promoters increased their expression by 3-fold in the presence of this aromatic acid.

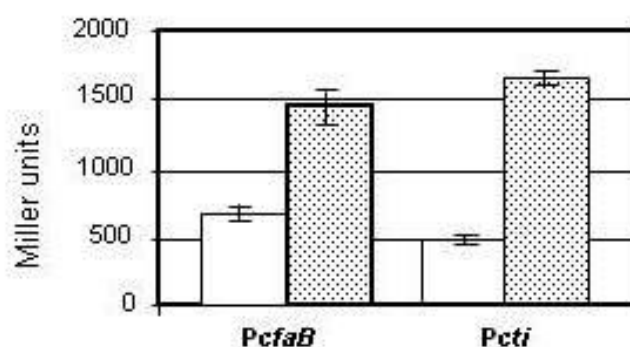


Figure 4: β -galactosidase activity of the *cfaB* and *cti* promoters. Cells were cultured until they reached a turbidity of 2 (OD_{660nm}). Then, 20 mM phenylacetate (dotted grey bars) was added to one flask while no treatment was done to the other flask (white bars). β -galactosidase activity was measured 1h after stress addition.

However, we found that in these conditions, in *P. putida* KT2440 there was a clear increase in the amount of *trans*-UFAs levels without increase in the CFA content (Table 1). Since not all the *cis*-UFAs were converted to the *trans*-isomer (Table 1), we suggested that in *P. putida* KT2440 the amount of *cis*-UFAs is not a limiting factor for the CTI or CFA synthase. We then reasoned that what may limits the activity of the enzymes was not the total amount of *cis*-UFAs, but the amount of accessible *cis*-double bounds in the membranes which is in connection with the proposal that accessibility of the CTI and CFA synthase to the substrate is the key step in the action of these enzymes (Taylor and Cronan, 1979; Heipieper *et al.* 2001).

Table 1: Fatty acid content (as a percentage of the total fatty acids) at early stationary growth phase ($OD_{660nm} \approx 2$) before and 30 minutes after phenylacetic acid addition.

	LB	Phe
C14:0	0	0,14 ± 0,2
C16:1,9 <i>cis</i>	42,2 ± 0,4	28,5 ± 2
C16:1,9 <i>trans</i>	0	12,35 ± 3,8
C16:0	30,35 ± 0,5	29 ± 0
C17:cyclo	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,57
C18:1,11 <i>cis</i>	18,2 ± 1,4	21,8 ± 1,4
C18:1,11 <i>trans</i>	0	0
C18:0	8,2 ± 1,9	5,5 ± 0,21
C:19	0	0

To explore the possibility of competition for substrate between the two enzymes, the wild-type strain, a *P. putida* KT2440 *cti*::*Km* mutant (Duque *et al.*, 2007), and a *P. putida* KT2440 *cfaB*:*ΩKm* mutant (Muñoz-Rojas *et al.*, 2007) were used to study the membrane lipid composition at mid-stationary growth phase in the presence or absence

of phenylacetate or toluene. The levels of CFAs in the membrane of the *cti* mutant were not significantly different of those of the wild-type despite the absence of *trans*-UFAs.

Also, the relative amounts of *trans*-UFAs in response to stress in the *cfaB* mutant was similar than in the wild-type (Table 2), despite the higher availability of substrate (*cis*-UFAs). These results indicated that although the *cfaB* and *cti* genes are expressed in the stationary growth phase (Figure 2D) there is no competition for the common substrate between both enzymes. Therefore, other factors should operate to control the CFA and *trans*-UFA content in the membranes.

Table 2: Fatty acid content (as percentage of total fatty acids) in *P. putida* KT2440 (wild-type), and the mutant derivatives *P. putida* KT2440 *cti*⁻ and *P. putida* KT2440 *cfaB*⁻ before and after 1h of stress addition. Fatty acids were extracted from cultures in mid stationary growth phase (OD_{660nm} ≈ 3).

Wild-type							
	LB	Tol	Phe				
C14:0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2				
C16:1,9 <i>cis</i>	28.1 ± 2.6	26.6 ± 2.0	22.4 ± 4.0				
C16:1,9 <i>trans</i>	0	5.4 ± 0.2	4.4 ± 0.8				
C16:0	33.8 ± 1.06	33.6 ± 4.38	31.8 ± 1.6				
C17: cyclo	14.8 ± 5.4	13.6 ± 2.0	15.0 ± 5.6				
C18: 1,11 <i>cis</i>	17.9 ± 0.1	17.5 ± 5.0	19.2 ± 1.1				
C18:1,11 <i>trans</i>	0	0	0				
C18:0	4.1 ± 1.9	3.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2				
C19:0	0	0	0				

<i>cti</i> ⁻				<i>cfaB</i> ⁻			
	LB	Tol	Phe	LB	LB	Tol	Phe
C14:0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	C14:0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0
C16:1,9 <i>cis</i>	25.3 ± 2.0	25.5 ± 0.1	23.4 ± 1.3	C16:1,9 <i>cis</i>	40.1 ± 3.6	31.4 ± 3.7	33.6 ± 3.3
C16:1,9 <i>trans</i>	0	0	0	C16:1,9 <i>trans</i>	0	6.2 ± 1.0	4.7 ± 0.4
C16:0	34.0 ± 1.4	33.5 ± 0.9	33.2 ± 1.0	C16:0	32.2 ± 2.4	31.2 ± 1.0	29.6 ± 0.8
C17: cyclo	12.2 ± 4.2	10.3 ± 2.2	12.7 ± 3.5	C17: cyclo	0	0	0
C18:1,11 <i>cis</i>	21.5 ± 4.2	22.3 ± 1.7	21.0 ± 0.1	C18:1,11 <i>cis</i>	21.0 ± 2.4	24.2 ± 0.5	20.2 ± 3.89
C18:1,11 <i>trans</i>	0	0	0	C18:1,11 <i>trans</i>	0	0	0
C18:0	7.5 ± 4.6	6.7 ± 3.1	8.1 ± 1.6	C18:0	5.2 ± 2.2	7.1 ± 1.1	6.9 ± 0.8
C19:0	0	0	0	C19:0	0	0	0

DISCUSSION

Primer extension analysis revealed that the *cfaB* gene in *P. putida* KT2440 is expressed from a single promoter, and that its expression does not occur in an RpoS deficient background confirming the total dependence of *cfaB* expression on the alternative σ -factor, σ^{38} . Most of the knowledge about the CFA synthase gene expression came from studies in *E. coli*, in which its expression is driven from two promoters, one σ^{70} -dependent and the other σ^{38} -dependent (Wang and Cronan, 1994). Furthermore, in *Pseudomonas*, two enzymes, the CTI and the CFA synthase, use the same substrate (the *cis*-unsaturated fatty acids) while in *E. coli* the CTI has not been found. Because of these differences with the *E. coli* paradigm we became interested in the regulation and formation of CFAs in *Pseudomonas*. The *cfaB* promoter of *P. putida* KT2440 has a sequence very similar to the RpoS recognition consensus sequence of *E. coli* (Figure 3A; Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Lee and Gralla, 2001; Weber *et al.*, 2005), with six out of seven nucleotides being conserved. RpoS recognition sequences have been thoughtfully investigated in *E. coli* and several studies indicated that the -13C, -12T, -11A and -7T nucleotides are essential for maximum expression of the RpoS-dependent transcription (Hiratsu *et al.*, 1995; Bordes *et al.*, 2000; Lee and Gralla, 2001) and that these four positions are highly conserved among genes whose expression is RpoS-dependent (Weber *et al.*, 2005). In the *P. putida* KT2440 *cfaB* promoter, changes in -14C, -13T and -12A (that correspond to -13C, -12T and -11A in *E. coli* consensus sequence) were also found to be essential for the *cfaB* promoter expression in agreement with the results mentioned above. Mutation in -8T, critical in *E. coli* (-7T), did not lead to a significant decrease in promoter activity in the *P. putida* KT2440 *cfaB* promoter. This position was also pointed out as critical in the recognition of σ^{32} and σ^{38} in the Pm promoter that controls the expression of the *meta* operon in the pWW0 toluene degradation pathway (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2005) of *P. putida* mt-2. However, these experiments were done in *E. coli* and the importance of this position in promoter recognition by σ -factors in *Pseudomonas* might be different to that in *E. coli*. Position -10 in Pm was relevant for recognition by the σ factor, and when we mutated the equivalent position in the *cfaB* promoter (-11C), a reduction of the expression by 3.5-fold was observed. Interestingly, nucleotide -9C in the *cfaB* promoter, was critical for activity. This position is conserved in 70% of the RpoS-dependent promoters in *E. coli*

(Weber *et al.*, 2005) and it was not previously found to be essential for RpoS recognition.

CFAs content in *Pseudomonas* membranes is tightly regulated in such way that they are only produced during the stationary phase of bacterial growth and they never represent more than 20-30% of the total fatty acids. In *Pseudomonas*, changes in membrane fluidity caused by environmental factors such as temperature or presence of toxic substances are counteracted by changes in the ratio of saturated to unsaturated fatty acids, or in the ratio between *cis*- and *trans*-unsaturated fatty acids (Heipieper *et al.*, 1992; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997). Several reports suggested that the amount of *trans*-UFAs could be influenced by the cyclopropane content of the membrane (Härtig *et al.*, 2005; Pini *et al.*, 2009). However, we have shown here that the amount of *trans*-UFAs after, for example toluene and phenylacetate stress, was similar in the wild-type strain (5.4) and in the *cfab* mutant (6.2) suggesting that the CTI has a similar activity level in both strains. Similarly, the proportion of CFAs did not change in the absence of CTI. Furthermore, when cells were submitted to different stresses at the stationary growth phase (when the content of CFAs was high), the presence of *trans*-UFAs was still observed. Thus, we suggest that CTI and CFA synthase do not directly compete for the substrate and that other mechanisms should regulate the CFAs content in the membrane. In *E. coli*, the level of CFA synthase is controlled by proteolytic cleavage (Chang *et al.*, 2000).

The facts that in *P. putida* introduction of plasmid pCEC-3 (that expressed *cfab* from a plasmid promoter) did not advance synthesis of CFAs during exponential growth phase (Pini *et al.*, 2009; Pini *et al.* unpublished) and that gratuitous induction of the *cfab* expression by phenylacetate did not result in an immediate increase in CFA levels in exponential phase, can be explained if the CFA enzyme in *P. putida* is being subjected to proteolysis as in *E. coli*. To further explore this possibility in *Pseudomonas* KT2440, we are currently introducing plasmid pCEC-3 into several protease deficient mutants (Duque *et al.*, 2007) to check if in any of these mutants we can detect the presence of CFAs during exponential growth phase.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions

Pseudomonas putida KT2440 was grown on LB medium. Cultures were incubated at 30 °C and shaken on an orbital platform operating at 200 strokes per minute.

Fatty acid analysis

Cells were grown on LB until exponential (OD₆₆₀ 0.8) or stationary phase (OD₆₆₀ 3) of growth and samples were harvested by centrifugation prior lipid extraction according Bligh and Dyer (1959). When the stressor was supplied, cells were first grown until they reached the exponential or stationary phase, then the compound was added and cultures were incubated for 1h under the same growth conditions prior to lipid extraction. Fatty acids were identified and determined by mass spectrometry after gas chromatographic separation and the area of the peaks used to determine their relative amounts.

Construction of plasmids for β -galactosidase analysis

cfaB promoter was amplified using oligonucleotides EcoRIcfaB2 (5'GGAATTCGCTGGCAGCTTCGT 3') and PstIcfaB2 (5'AACTGCAGAGCGGCAGATGCAA 3') that bears *EcoRI* and *PstI* restriction sites respectively to facilitate cloning. The P_{*cfaB*} mutant promoters were generated by overlap extension polymerase chain reaction mutagenesis as described previously (Gallegos *et al.*, 1996). The internal oligonucleotides used for mutagenesis exhibited one mismatch with respect to the wild-type sequence (Suppl. Mat.); external primers were EcoRIcfaB2 and PstIcfaB2. The PCR fragments were cut with *EcoRI* and *PstI* and cloned into pMP220 (Spaink *et al.*, 1987), previously cut with the same enzymes, to construct plasmid pMPcfaBKT2440.

This plasmid was electroporated into *P. putida* KT2440 and into *P. putida* C1R1, a *P. putida* KT2440 RpoS mutant (Ramos-González and Molin, 1998).

β -galactosidase assays

Cultures were grown overnight at 30°C on LB medium plus tetracycline and on the following morning were diluted to an OD₆₆₀ of 0.1. β -galactosidase activity was measured along the growth curve; plasmid without promoter was used as negative control. Phenylacetate (20 mM) was added when the cultures reached the early

stationary phase (OD₆₆₀ 2) and β -galactosidase activity was measured 1h after stressor addition.

qRT-PCR assays

Pseudomonas putida KT2440 was grown in LB medium and samples were taken at different times of the growth curve. RNA isolation from the pellets was performed by TRIzol reagent (Invitrogen). The RNA samples were treated with DNase I (1U/5 μ g RNA) (Roche) at 37°C for 1h. Agarose gel electrophoresis and quantification at 260 and 280 nm were performed to assess the integrity and purity of the RNA. Five μ g of the RNA were used to synthesize cDNA using 200 U of Superscript II^a reverse transcriptase (Invitrogen) in a mixture containing, 25 ng of random primers, 10 mM of dNTP Mix (Roche) and 40 U of RNase OUT (Roche), following the manufacturer instructions. Five μ l of the RT reaction were used to perform real-time PCR using 12.5 μ l of IQTM SYBR® Green Supermix (Biorad) in a 25 μ l reaction containing 600 nM of the appropriate primer. Amplification and detection of specific products was performed with the BioRad-IQ5 system with the following profile: 1 cycle at 95°C for 5 minutes plus 40 amplification cycles (95°C for 10s, 57°C for 30s, 72°C for 30s). Amplification was done in triplicate for each cDNA preparation. Controls without template or with the sample before the reverse transcription were included for each reaction on the same plate. The critical threshold cycle (C_T) is defined as the cycle at which the fluorescence becomes detectable above background. All values were compared using the C_T method, where the fluorescence of each gene ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) was normalized to the housekeeping gene 16S (ΔC_T). Primers used for amplification were: 5'-CATCACCGATGCCAAGTACC-3' and 5'-GTTGCGCTTGTCACGATAGG-3' for the *cti*, 5'-CATCTGCCGCTGAGGCTGAA-3' and 5'-ACGAATGCGGTGCCTAGCTG-3' for *cfaB*, 5'-CCTATGCGACCTGGTGGATT-3' and 5'GCGCAGGTAGACGTTTCAGTT-3' for *rpoS* and 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' and 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3' for 16S RNA.

Acknowledgements

This work was supported by FEDER supported Consolider-C (BIO2006-05668) from the Ministry of Science and Innovation and FEDER supported Junta de Andalucía project of Excellence (Ref: CVI3010). We acknowledge support of an Intramural CSIC Project (200440E571). C-V. Pini was supported by a scholarship from the BCSH and

the CSIC. We thank Dr. E. Duque for the gift of the *Pseudomonas putida* KT240 *cti* mutant, Dr. M.I. Ramos-González for the *P. putida* C1R1 mutant. We also thank C. Lorente and M. Fandila for secretarial support.

REFERENCES

Attila, C., Ueda, A., Cirillo, S.L.G., Cirillo, W.C. and Wood, T.K. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence factors and poplar tree response in the rhizosphere *Microbial Biotech.* **1**:17-29.

Bernal, P., Segura, A., and Ramos, J.L. (2007) Compensatory role of the *cis-trans* isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.* **9**:1658-1664.

Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M. and Venturi, V. (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* **180**: 264-271.

Bligh, E.G and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.

Bordes P., Repolla, F., Kolb, A. and Gutierrez, C. (2000) Involvement of differential efficiency of transcription by E σ^s and E σ^{70} RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli osmE* promoter. *Mol. Microbiol.* **35**:845-853.

Chang, Y.Y. and Cronan J.E., Jr. (1999) Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:249-259.

Chang, Y.-Y., Eichel, J. and Cronan, J.E. Jr. (2000) Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *J. Bacteriol.* **182**:4288-4294.

Daniels, C., Godoy, P., Duque, E., Molina-Henares, M.A., de la Torre, J., del Arco, J.M., Herrera, C., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Ferrer, M. and Ramos, J.L. (2010)

Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol. **192**:2169-2181.

Domínguez-Cuevas, P., Marín, P., Ramos, J.L. and Marqués, S. (2005) RNA polymerase holoenzymes can share a single transcription start site for the Pm promoter. J. Biol. Chem. **280**:41315-41323.

Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J. and Ramos, J.L. 2007. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas* vol. V: A model System in Biology, Eds. Juan L. Ramos and A. Filloux. Springer, The Netherlands, Chapter 8, 227-251

Duque E., de la Torre, J., García, V., Pini, C., Rodríguez-Conde, S., Godoy, P. Henares-Molina, M.A., Krell, T., Daniels, C., Ramos J.L. and Segura, A (2009) Protocols for the characterization of solvent tolerant microorganisms Handbook of hydrocarbons and lipid microbiology (Ed. K.N. Timmis). Vol 4, pp:3958-3964

Espinosa-Urgel, M., Chamizo, C. and Tormo, A. (1996). A consensus structure for σ^S -dependent promoters. Mol. Microbiol. **21**:657-659

Gal, M., Preston, G.M., Massey, R.C., Spiers, A.J. and Rainey, P.B. (2003) Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. Mol. Ecol. **12**:3109-3121.

Gallegos, M.T., Marqués, S. and Ramos, J.L. (1996) The TACAN4TGCA motif upstream from the -35 region in the sigma70-sigmaS-dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XylS regulators. J. Bacteriol. **178**:6427-34

Giddens, S.R., Jackson, R.W., Moon C.D., Jacobs, M.A., Zhang, X.-X., Gehrig S.M. and Rainey P.B. (2007) Mutational activation of niche-specific genes provides insight

into regulatory networks and bacterial function in a complex environment. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 104:18247-18252.

Grogan , D.W. and Cronan, J.E. Jr. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 429-441.

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.

Heipieper, H.J., Diefenbach, R., and Keweloh H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol degrading strain *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1847-1752.

Heipieper, H.J., de Waard, P., van der Meer, P., Killian, J.A., Isken, S., de Bont, J.A.M., Eggink, G., and de Wolf, F.A. (2001) Regiospecific effect of 1-octanol on *cis-trans*

isomerisation of unsaturated fatty acids in the solvent-tolerant strain *Pseudomonas putida* S12. Appl. Microbiol. Biotechnol. **57**:541-547.

Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**: 373-395.

Hiratsu, K., Shinagawa, H., and Makino, K. (1995) Mode of promoter recognition by the *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing the sigma S subunit: identification of the recognition sequence of the fic promoter. Mol Microbiol. 18:841-50.

Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annu. Rev. Microbiol. **54**: 499-518.

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. *Biochem.* **22**:5611-5619.

Jishage, M., Iwata, A. Ueda, S., and Ishihama, A. (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **178**:5447-5451.

Jones J., Studholme D.J., Knight C.G., Preston G.M. (2007) Integrated bioinformatic and phenotypic analysis of RpoN-dependent traits in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environ Microbiol.* **9**:3046-3064.

Jorgensen F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P. and Stewart, G.S. (1999) RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145**: 835-844.

Jovcic, B., Bertani, I., Venturi, V., Topisirovic, L. and Kojic, M. (2008) 5' untranslated region of the *Pseudomonas putida* WCS358 stationary phase sigma factor *rpoS* mRNA is involved in RpoS translational regulation. *J. Microbiol.* **46**:56-61.

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.

Kojic, M. and Venturi, V. (2001) Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J. Bacteriol.* **183**:3712-3720.

Lee, S.J. and Gralla, J.D. (2001). Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**:30064-30071.

Loewen, P.C., Hu, B. Strutinsky, J. and Sparling, R. (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**: 707-717.

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.

Loffhagen, N., Härtig, C., Geyer, W., Voyevoda, M. and Harms, H. (2007) Competition between *cis*, *trans* and cyclopropane fatty acid formation and its impact on membrane fluidity. *Eng. Life. Sci.* **1**:67-74.

Martinez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M. and Ramos, J.L. (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiol.* **4**:842-855.

Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L. and Ramos, J.L. (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

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P. Segura, A. and Ramos, J.L. (2006) Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:472-477.

Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A., Fouts D.E., Gill S.R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R.T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., 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.A., Timmis K.N., Düsterhöft A., Tümmler B., and Fraser C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* **4**:799-808. Erratum in: *Environ Microbiol.* (2003) **5**:630.

- Pini, C.-V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J.L. and Segura, A. (2009) Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotech.* **2**:253-261
- 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.
- Potvin, E., Sanschagrín, F. and Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:38-55.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haidour, A., Reyes, F., and Fernández-Barrero, A. (1997) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**:3887-3890.
- Ramos, J.L., E. Duque, M.T. Gallegos, P. Godoy, M.I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran and A. Segura (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**:743-768.
- Ramos-González M.I. and Molin, S. (1998) Cloning, sequencing and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**: 3421-3431.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S. and Greenberg, E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**: 973-985.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and B. Poolman (1995) Mechanisms of membrane toxicity by hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E. and Lugtenberg, B.J.J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol. Biol.* **9**:27-39.

Suh, S.J., Silo-Suh, L., Woods, D.E., Hassett, D.J., West, S.E. and Ohmand, D.E. (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **181**: 3890-3897.

Taylor F.R. and Cronan J.E. Jr. (1979) Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*. Stabilization, purification, and interaction with phospholipid vesicles. Biochemistry. **18**:3292-3300.

Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Ishiga, T., Mysore, K.S., and Bender C.L. (2008) Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato seedlings: phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. Mol Plant Microbe Interact. **21**:383-95.

Venturi, V. (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? Mol. Microbiol. **49**: 1-9.

Wang, A.Y. and Cronan, J.E. Jr. (1994) The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the results of and RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. Mol. Microbiol. **11**:1009-1017.

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.

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch V.F. and Hengge R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. J. Bacteriol. **187**:1591-1603.

Yang, L., Haagensen, J.A., Jelsbak, L., Johansen, H.K., Sternberg, C., Høiby, N., and Molin S. (2008) *In situ* growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. J. Bacteriol. **190**:2767-2776.

Yahr, T.L., and Greenberg E.P. (2004) The genetic basis for the commitment to chronic versus acute infection in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cell*. **16**:497-8.

Zgurskaya, H.I., Keyhan, M. and Matin, A. (1997) The sigma S level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol. Microbiol.* **24**: 643-651.

Supplementary material: List of internal oligonucleotides used in the overlap extension PCR mutagenesis of the *cfaB* promoter

Primer	Sequence (5'--3')	Primer	Sequence (5'--3')
Cfa2.1	AGATGAA <u>A</u> TACTCTGATCCGG	Cfa2.1r	CCGGATCAGAGT <u>A</u> TTTCATCT
Cfa2.2	AGATGAAC <u>G</u> ACTCTGATCCGG	Cfa2.2r	CCGGATCAGAGT <u>C</u> GTTTCATCT
Cfa2.3	AGATGAACT <u>C</u> CTCTGATCCGG	Cfa2.3r	CCGGATCAGAG <u>G</u> AGTTTCATCT
Cfa2.4	AGATGAACTA <u>A</u> TCTGATCCGG	Cfa2.4r	CCGGATCAGAT <u>T</u> AGTTTCATCT
Cfa2.5	AGATGAACTAC <u>G</u> CTGATCCGG	Cfa2.5R	CCGGATCAG <u>C</u> GTAGTTTCATCT
Cfa2.6	AGATGAACTACT <u>A</u> TGATCCGG	Cfa2.6r	CCGGATCA <u>T</u> AGTAGTTTCATCT
Cfa2.7	AGATGAACTACTC <u>G</u> GATCCGG	Cfa2.7r	CCGGATC <u>C</u> GAGTAGTTTCATCT

Capítulo 3

Capítulo 3

¿Es la fluidez de membrana el componente principal para la activación de la *cis-trans* isomerasa en *Pseudomonas putida*?

Cecilia-Vanesa Pini, Ana Segura y Juan-Luis Ramos

Resumen

Las membranas bacterianas constituyen la primera barrera física contra distintos estreses ambientales. Muchos compuestos tóxicos se disuelven en las membranas celulares, alterando sus funciones, inhibiendo el crecimiento del cultivo celular y causando daños irreversibles tales como la muerte celular. Para sobrellevar el estrés producido por estos compuestos en las membranas, las bacterias emplean estrategias de corto y largo plazo que modifican la fluidez de la membrana. La estrategia más efectiva a corto plazo observada en *Pseudomonas putida* es la de contrarrestar el aumento en la fluidez de la membrana ocasionado por diferentes drogas mediante la isomerización de los ácidos grasos *cis* insaturados a *trans*. La estructura extendida de los ácidos grasos *trans* ayuda a contrarrestar el daño producido por las drogas. En este estudio presentamos resultados que apoyan que la *cis-trans* isomerasa, que se sintetiza constitutivamente en *P. putida* KT2440 accede a su sustrato embebido en la membrana tras un aumento en la fluidez de la membrana. Este incremento en la fluidez puede estar mediado por una gran variedad de sustancias químicas tales como disolventes orgánicos, metales pesados o detergentes.

Is membrane fluidity the main component for activation of the *cis-to-trans* isomerase in *Pseudomonas putida*?

Cecilia Pini^{1,2}, Ana Segura¹ and Juan-Luis Ramos^{1,3,*}

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Environmental Protection – Estación Experimental del Zaidín - CSIC, Granada, Spain

²Programa de Doctorado de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain

³Unidad Asociada CSIC, Universidad de Huelva, Huelva, Spain

*Corresponding author: Juan L. Ramos

EEZ-CSIC

C/ Profesor Albareda, 1

18008 Granada, Spain

Phone: +34 958 181608

Fax: +34 958 129600

e-mail: juanluis.ramos@eez.csic.es

SUMMARY

Bacterial membranes constitute the first physical barrier against different environmental stresses. Many toxic compounds dissolve the cell membranes, altering functions, inhibiting cell growth and causing irreversible damage such as cell death. To overcome the stress produced by these compounds on the membranes, bacteria use long- and short-term strategies that modify membrane fluidity. One of the most powerful, short-term responses observed in *Pseudomonas putida* to overcome the increase in membrane fluidity caused by drugs is the *cis* to *trans* isomerisation of unsaturated fatty acids. The long extended structure of *trans* fatty acids helps to counteract drug-induced damage. In this study we present results that support that the constitutively synthesized *cis-trans* isomerase of *P. putida* KT2440 accesses its substrate, embedded in the cell membranes, upon an increase in cell membrane fluidity mediated by a wide variety of chemicals, such as organic solvents, heavy metals or detergents.

INTRODUCTION

Bacterial cells are surrounded by a cellular envelope that is made up of the cytoplasmic membrane and the cell wall. The cytoplasmic membrane is a phospholipid bilayer that provides an appropriate matrix for the functioning of membrane proteins involved in many different cellular functions (Kadner, 1996). Microorganisms in the environment are exposed to multiple stress agents that can alter their membrane fluidity and hamper their survival. This feature was suggested to render cell membranes an ideal location for primary stress sensing (Vigh *et al.*, 1998). To overcome environmental damages, microbes respond by modifying their membranes to maintain a constant degree of fluidity. This mechanism is called “homeoviscous adaptation” (Grau and Mendoza, 1993; Sinensky, 1974; Ingram, 1986; Mansilla *et al.*, 2004) and involves long and short-term changes. The changes include the synthesis of phospholipid head groups and fatty acid chains, or post-synthetic changes, such as *cis*-to-*trans* isomerization of unsaturated fatty acids (Junker and Ramos, 1999).

Pseudomonas putida are saprophytic microbes that colonize multiple niches and which exhibit a high versatility to adapt to changing environmental conditions and stresses (Reva *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2010). The lipid composition of *Pseudomonas putida* has been studied in detail (Bernal *et al.*, 2007a; Muñoz-Rojas *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1994; Pinkart and White, 1997; Heipieper *et al.*, 1996; Keweloh and Heipieper., 1996). In these bacteria, the main membrane phospholipids are phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL). PE represents about 75% of total phospholipids, whereas the relative amounts of PG and CL depend on the growth phase of the cultures, PG being the most abundant in the exponential phase while CL accumulates during the stationary phase (Bernal *et al.*, 2007a; Boeris *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 1997; Pinkart and White, 1997). Fatty acids attached to phospholipids can be saturated or unsaturated. Among the main saturated fatty acids in the membranes of *P. putida* are myristic acid (tetradecanoic acid, C14:0), palmitic acid (hexadecanoic acid, C16:0) and stearic acid (octadecanoic, C18:0). The most abundant fatty acids among the unsaturated ones are palmitoleic acid (*cis*-9-hexadecenoic, *cis*) and *cis*-vaccenic acid (*cis*-11-octadecenoic). The acyl chains of saturated fatty acids create a network of hydrophobic interactions among them that lead to a highly packed, rigid membrane. Because of the free rotation of the C-C bonds,

saturated acyl chains are maximally extended. Unsaturated fatty acids are synthesized as *cis* isomers and possess a 30° non-movable bend in the acyl chain that disturbs the acyl chain ordered package leading to a lower phase transition temperature of the membranes and higher fluidity (Cronan and Gelman, 1975). *Trans* fatty acids are post-synthetically made in a reaction catalyzed by a *cis*-to-*trans* isomerase (CTI) (Holtwich *et al.*, 1997; Junker and Ramos, 1999; Segura *et al.*, 2010). *Trans* fatty acids adopt a long extended structure similar to that of saturated fatty acids (Cronan and Gelman, 1975; Cevc, 1991; Heipieper *et al.*, 1995), and the membranes built on *trans* fatty acids have lower fluidity than membranes with *cis* fatty acids (Weber *et al.*, 1994; Okuyama *et al.*, 1991; Cronan and Gelman, 1975). Addition of phenol, chlorinated phenols, styrene, toluene and other solvents to cultures of different *P. putida* strains resulted in an increase in *trans* fatty acids with concomitant decrease in the corresponding *cis* unsaturated fatty acids (Junker and Ramos 1999; Weber *et al.*, 1994; Cruden *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 1992). This direct isomerization of the *cis* configuration of the double bond occurred without a shift of the double bond position (Diefenbach and Keweloh, 1994). The CTI protein is constitutively expressed in the cells (Bernal *et al.*, 2007b; Junker and Ramos, 1999; Heipieper *et al.*, 1992) and allows bacteria to adapt rapidly to changes in the environment through cell membrane stabilization, which in turn allows the cells to remain in a physiologically-acceptable state in which they can induce other long-term adaptive mechanisms (Keweloh *et al.*, 1990; Okuyama *et al.*, 1991; Keweloh *et al.*, 1991; Sikkema *et al.*, 1995). The CTI enzyme contains a heme binding center (Holtwick *et al.*, 1999) located in the periplasmic space (Pedrotta and Witholt, 1999; Junker and Ramos, 1999). Although the reaction mechanism of CTI is unknown, the heme (Fe³⁺) iron has been proposed to attack the double bond causing the removal of an electron from the double bond to form a transient radical complex covalently bound to iron and enabling the rotation from the *cis* to the *trans* configuration (Heipieper *et al.*, 2004; von Wallbrunn *et al.*, 2003).

A question that remains unanswered is how the CTI enzyme becomes active in the presence of an external stimulus. Results from different laboratories support that under normal growth conditions the periplasmic CTI enzyme cannot reach its target that is buried in the lipid bilayer (Heipieper *et al.*, 2001). We show here that a variety of

different chemicals that increase the membrane fluidity favour the access of CTI to its substrate to facilitate double bond isomerization and a concomitant decrease in membrane fluidity.

RESULTS

Effect of several chemical agents on the *cis/trans* ratio of unsaturated lipids in *Pseudomonas putida* KT2440.

Our previous studies have shown that the *cis-to-trans* isomerase gene (*cti*) of *Pseudomonas putida* KT2440 is expressed constitutively (Junker and Ramos, 1999); however, the *trans* isomers were practically absent in cell membranes unless cells were exposed to stress agents such as organic solvents (Junker and Ramos, 1999). Since organic solvents intercalate the cellular membranes and disorganize them, the presence of these compounds in the culture media could have an effect on the membrane potential to induce the formation of free oxygen radicals (Park and Imlay, 2003; Machlin and Bendich, 1987; Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Therefore, we raised alternative non-exclusive hypotheses that the CTI is activated either through the detection of oxidative agents that affect the redox state of the iron centre present in the CTI enzyme, or through the alteration of the cell membrane potential, or even through the enhancement of membrane fluidity because of the physical incorporation of solvents to the cell membranes.

To provide clues to solve the above hypotheses, an initial series of assays were done in which sublethal concentrations of various stress-inducing compounds were added to *P. putida* cells growing exponentially in LB medium. These stressors included hydrogen peroxide (0.024% [v/v]) and methyl viologen [100 μ M], as compounds that induce the formation of oxygen radicals; a number of uncouplers of the respiratory chain that alter the cell membrane potential, such as thenoyltrifluoroacetone (TTFA) [1 mM], [2 mM] and carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) [50 μ M]; one detergent (Triton X-100) [0.4% v/v]; an organic solvent such as toluene (0.075% [v/v]), and two heavy metals, CdCl₂ and ZnCl₂, (1 mM). For each of these compounds the concentration was previously established so that it did not interfere with cell survival (i.e., over 99.9% of the cells survived after 10 min), and the presence of these chemicals did not affect the growth rate in the exponential phase more than 10%. After 30 minutes

exposure to these chemicals cells were harvested and the profile of fatty acids determined. In agreement with previous studies, we found that almost 60% of fatty acids corresponded to saturated forms (Table 1) in control cells, and that the rest accounted for unsaturated fatty acids. Only C16:1 *cis* and C18:1 *cis* were found among the unsaturated ones in control cells not exposed to stress agents.

Table 1. Fatty acid composition of *Pseudomonas putida* KT2440 upon exposure to a wide variety of toxic compounds.

	LB	H ₂ O ₂	CdCl ₂	ZnCl ₂	CCCP	TFA	Triton	Toluene
C14:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
C16:1,9 <i>cis</i>	28,3	27,8	21,5	18,8	24,4	22	37,5	22,9
C16:1,9 <i>trans</i>	0	0	5,6	11,9	9,4	11,5	7,4	17,1
C16:0	35,4	36,4	36,8	38,8	35,5	36,8	28,1	32,8
C17:cyclo	1,7	1,1	2,2	2,6	1,6	1,4	0	0,17
C18:1,11 <i>cis</i>	19,8	20	19,6	15,5	12,9	16,3	18	8,6
C18:1,11 <i>trans</i>	0	0	0	0	0	0	1,8	0,5
C18:0	14,5	13,5	13,4	12,6	15,59	11,5	19,1	14,6
C:19	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0

The pattern of fatty acids in cells exposed to H₂O₂ (Table 1) or methyl viologen (not shown) was similar to that of the control, and no *trans* isomers were found (Table 1). This set of results suggests that active oxygen forms are not the signals that trigger *cis* to *trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in the membrane of *Pseudomonas*. To provide further grounds to the above set of results we used of a mutant deficient in *aphC*, the main peroxidase in *Pseudomonas* that efficiently removes H₂O₂ and organic peroxides (Kim *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007). A culture of the mutant strain was supplemented with 0.024% (v/v) H₂O₂ and changes in the membrane fatty acid composition were determined. We found that the fatty acid profile of the mutant did not change in response to H₂O₂ (Suppl. Table 1), which suggests that deficiency in the removal of this chemical did not interfere with fatty acid isomerisation and therefore

supports the idea of the lack of effect of oxidative stress on isomerisation of *cis* unsaturated fatty acids. *Pseudomonas putida* cells exposed to CdCl₂, ZnCl₂, CCCP, TTFA, 4-CP, Triton X-100 and toluene made *trans* isomers (Table 1). However, the levels of the *trans* isomers varied according to the compound added, variations for C16:1 *trans* ranged from undetectable levels, in the absence of stressors, to 5.5 to 17 % of total lipids (see Table 1). With Toluene, Triton X-100 we observed that low levels of the C18:1 *trans* isomer were eventually be produced (Table 1).

Since we observed *cis* to *trans* isomerisation of fatty acids in *P. putida* in the presence of uncouplers of respiratory chain, but not in the presence of H₂O₂ or methyl viologen, we reaffirmed the idea that active oxygen forms do not activate CTI; but the question on whether the change was due to an alteration of the cell membrane potential or to an increase in membrane fluidity remained opened. To distinguish between these two possibilities; we determined on the one hand, the membrane potential ($\Delta\psi$), that as part of the proton motive force (PMF) can be used as indicator of the energetic state of living cells after stress (Muller *et al.*, 2000), and on the other hand, we measured membrane fluidity in cells exposed to different stressors. We measured $\Delta\psi$ in spheroplasts of *P. putida* KT2440, prepared from cells grown on LB using the fluorochrome DiSC₅(5).

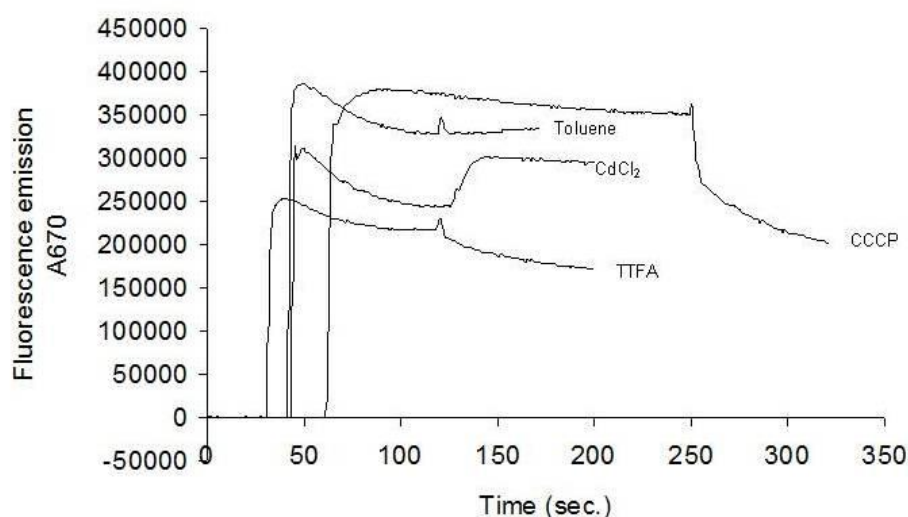


FIGURE 1. Cells were grown in LB medium, harvested in the exponential phase of growth ($OD_{660} \sim 0.7$) and converted to spheroplasts, as described in Materials and Methods. Generation of the proton motive force by spheroplasts was followed by monitoring the fluorescence quenching of DiSC₂(5), as described in Materials and Methods.

We found that addition of toluene at the same concentration that provokes *trans* fatty acid formation did not significantly affect the membrane potential (See Fig. 1). However, a lower extent of TFFA and CCCP provoked a strong depolarization of the membrane (Fig. 1). CdCl₂ (Fig. 1) and to a minor extent ZnCl₂ caused a weak membrane hyperpolarization (not shown). This suggested that alteration of membrane potential is not a discriminatory signal in the activation of CTI.

Subsequently we determined the physical state of the membrane using fluorescence polarization and the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe to examine membrane fluidity in the presence of the above set of stressors (Trevors, 2003, Bernal *et al.*, 2007 b). Fluorescent polarization values were higher in control cells than in cells exposed to TFFA, ZnCl₂, CdCl₂, toluene and Triton X-100 (Figure 2). This set of results points to the fact that membrane fluidity is relevant for CTI activation.

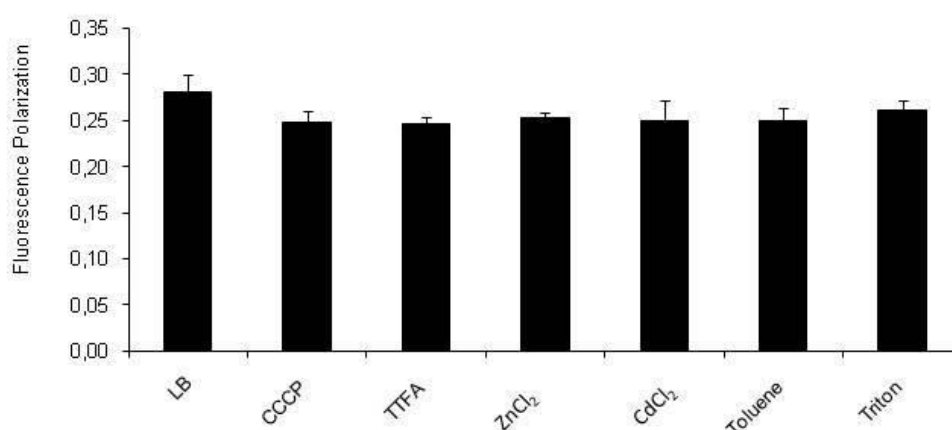


FIGURE 2. Fluorescence polarization measurements in the wild-type KT2440 strain on LB and in the presence of several stressors.

In the extrusion of heavy metals and organic solvents there are a number of RND extrusion pumps involved (Godoy *et al.*, 2010) that have been shown to act synergistically to remove drugs from the cell membranes. We tested whether deficiency in a single efflux pump removing heavy metals (i.e., CzcABC) or solvents (TtgABC)

could lead to an altered fatty acid profile in response to stressors. To this end we determined the fatty acid profile of a mutant deficient in PP0043 (*czcB*) and PP1385(*tigB*) growing in the presence of toluene or Cl₂. We found that the mutants had indeed a similar fatty acid profile as the parental strains that made *trans* isomers in response to stressors (Suppl. Table 2). As with the wild-type strain we found that indeed the membranes of the CzcABC and TigABC mutants exhibited increased fluidity in response to ZnCl₂, and toluene (Suppl. Fig. 2), which further supported that membrane fluidity is a key factor that influences *cis*-to-*trans* isomerization, in *P. putida*.

DISCUSSION

Bacteria in the environment encounter a wide range of conditions and their survival depends largely on their ability to adapt to new conditions. As the selective barrier between living cells and their environment, the plasma membrane plays a key role in cell viability. The barrier function of the cytoplasmic membrane is known to depend critically on the physical state of lipid bilayers making it susceptible to environmental changes (Cronan *et al.*, 1987). It is also known that membrane fluidity influences the conformation of the active site of some membrane-associated enzymes with the result that such enzymes display higher activity when membrane lipids are comparatively more fluid (Cronan *et al.*, 1987).

The set of results presented above support that *cis*- to *trans*-isomerization in response to toxic chemicals is mediated in *P. putida* by CTI upon an increase in membrane fluidity. Results obtained by Heipieper *et al.* (2001) about the regiospecific isomerisation of linoleic acid (C18:2 Δ 9-*cis*, Δ 12-*cis*) in *Pseudomonas putida* S12 membranes when treated with 1-octanol also support this hypothesis. Linoleic acid is a di-unsaturated fatty acid that is not naturally synthesized in *P. putida*, but which can be incorporated in membrane lipids up to 15% of total fatty acids if supplied exogenously. Treatment with 0.04% (v/v) 1-octanol induced the formation of the Δ 9-*trans*, Δ 12-*cis* isomer but neither the Δ 9-*cis*, Δ 12-*trans* isomer nor the Δ 9-*trans*, Δ 12-*trans* isomer were detected. These results were interpreted as that the CTI enzyme could not reach the Δ 12 position of the acyl-chain that is buried more deeply into the bilayer, the Δ 9 position being accessible only after membrane fluidification.

It should also be noted however, that CTI activity may not only depend on an increase in substrate accessibility after membrane fluidification, but that its activity could be enhanced upon binding to the surface of phospholipid membranes, as described for lipases, phospholipases and other enzymes, a process called interfacial activation (Gelb *et al.*, 1995). This has been well documented with mammalian phospholipase A₂ (PLA₂) that belong to a large family of lipolytic enzymes that catalyze the hydrolysis of the fatty acid ester at *sn*-2 position of the phospholipids. The phospholipase A₂ action does not only depend on the entry of the enzyme into the membrane (Lichtenbergova *et al.*, 1998), but also on its interfacial activation mediated by the physical properties of the membrane, including membrane fluidity, curvature, spacing and surface charge (Hendrickson *et al.*, 1981; Tatulian, 2001).

At present, the molecular details of CTI activation in *P. putida* are still not fully understood, but the set of results presented here add an element to this process in the sense that the first signal that triggers the *cis*- to *trans* isomerization in response to toxic chemicals is the increase in membrane fluidity, whether interfacial activation is also relevant awaits further studies *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Pseudomonas putida* KT2440 and its mutant derivatives were routinely grown on LB or M9 minimal medium supplemented with 0.2% (wt/vol) of glucose (Abril *et al.*, 1989). Cultures were incubated at 30 °C and shaken on an orbital platform operating at 200 strokes per minute. The set of isogenic KT2440 mutants used in this study were obtained from the *Pseudomonas* Reference Culture Collection (Duque *et al.*, 2007).

Fatty acid analysis. Cells were grown on LB until exponential phase (OD₆₆₀ 0.8) of growth was reached, then the different stressors were added and after 30 min cells were harvested by centrifugation. Phospholipids were extracted as described by Bligh and Dyer (1959) and esterified as described before (Bannon *et al.*, 1982). After gas chromatographic separation, the fatty acids were identified by mass spectrometry.

Cell membrane labelling 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. Bacterial cells were grown on LB media and when the cultures reached the exponential growth phase (turbidity of 0.7 at 660 nm) they were harvested by centrifugation at 10000 g for 1 min, washed in sterile 15 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) and suspended in the same buffer to a turbidity at 660 nm of 0.2. One microlitre 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). Stressors were added at the indicated concentration in the legend for the Figures and in the footnotes for the Tables. Fluorescence polarization was measured using a spectrofluorimeter (Photon Technology International) 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 (Kim *et al.*, 2001; England *et al.*, 2003). Values were analysed using the FELIX (PTI) software program.

Determination of $\Delta\psi$.

Cells were converted to spheroplasts by treatment with lysozyme and ethylenediaminetetracetic acid (EDTA). The cells were grown to an OD_{660nm} of 0.7 in M9 minimal medium supplemented with glucose. Fifty ml of the cultures were centrifuged (10000 g for 5 min, at 4 °C), and harvested cells were resuspended in 6.3 ml

of 0.75 M sucrose and 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), and then treated with 0.1 mg per ml of lysozyme for 5 min on ice. Then 13.5 ml of 1.5 mM EDTA (pH 7.5) solution was added. The cell suspension was incubated for 15 min. at 30 °C and observed under a phase contrast microscope. More than 95% of the cells appeared as spheroplasts.

The generation of the proton motive force was monitored using the cationic dye 3,3'-diethylthiadicarbocyanine iodide [DiSC(2)₃], which translocates into the lipid bilayer of hyperpolarized membranes, resulting in quenching of its fluorescence (Sims *et al.*, 1974). The reaction mixture (total volume 1ml) contained buffer A [125mM HEPES, 0.9% (w/v) NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 0.4% (w/vol) glucose], spheroplasts (about 10⁶ per ml) and 0.08 μM DiSC(2)₃. The fluorescence emission of DiSC₂(3) was measured at 570 nm with excitation at 555 nm using a spectrofluorimeter (Photon Technology International). Once the fluorescent emission reached the steady-state, stressors (toluene (0.075%), ZnCl₂ (1 mM), CdCl₂ (1 mM), CCCP (50 μM) or TTFA (1 mM), were added to the reaction mixture. The membrane potential was determined as the difference between the fluorescence measurements before and 1 minute after the addition of the stressor.

References

- Abril, M.A., C. Michán, K.N. Timmis, and J.L. Ramos (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.
- Bannon, C.D., G.J. Breen, J.D. Craske, N.T. Hai, N.L. Harper, and K.L. O'Rourke (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and readability. III. Literature review of an investigation into the development of a rapid procedure for methoxide catalysed methanolysis of fats and oils. *J. Chromatogr.* **247**: 71.
- Bernal, P., J. Muñoz-Rojas, A. Hurtado, J.L. Ramos, and A. Segura (2007a) A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ. Microbiol.* **9**: 1135-1145.
- Bernal, P, A. Segura, and J.L. Ramos JL (2007b) Compensatory role of the *cis-trans* isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.* **9**: 1658–1664.
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Boeris P.S., Domenech C,E,, Lucchesi G,I. (2007) Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J. Appl. Microbiol.* 103:1048-1054.
- Broadbent, J.R., Larsen, R.L., Deibel, V., and Steele, J.L. (2010) Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J. Bacteriol.* **192**:2445-2458.
- Cevc, G. (1991) How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain assymetry and degree of saturation - an effective chain-length model. *Biochemistry* **30**: 7186-7193.
- 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.
- Cronan, J.E., and E.P. Gelman (1975) Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation. *Bacteriol. Rev.* **9**: 232-256.

Cronan, J.E., Jr., Gennis, R.B., and Maloy, S.R. (1987) Cytoplasmic membrane, p. 31-55. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Cruden, D.L., J.H. Wolfram, R.D. Rogers, and D.T. Gibson (1992) Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2723-2729.

Diefenbach, R., and H. Keweloh (1994) Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. Arch. Microbiol. **162**: 120-125.

Domínguez-Cuevas, P., J.E. González-Pastor, S. Marqués, J.L. Ramos and V. de Lorenzo. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. J. Biol. Chem. **281**:11981-11991.

Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J. and Ramos, J.L. 2007. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas* vol. V: A model System in Biology, Eds. Juan L. Ramos and A. Filloux. Springer, The Netherlands, Chapter 8, 227-251

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 ration vessel. Biochim. Biophys. Acta **1624**:76-80.

Gelb, M.H., Jain, M.K., Hanel, A.M. and Berg, O.G. (1995) Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolysis: lessons from secretory phospholipase A₂. Annu. Rev. Biochem. **64**:653-688.

Godoy, P., A.J. Molina-Henares and J.L. Ramos. (2010) Four groups of RND efflux pumps are defined by a general family profile. Microbial. Biotechnology, in press.

Grau, R., and D. de Mendoza (1993) Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **8**: 535-542.

Grogan, D.W., and Cronan Jr., J.E. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:429-441.

Heipieper, H.J., G. Neumann, N. Kabelitz, M. Kastner, and H.H. Richnow (2004) Carbon isotope fractionation during *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 285–290.

Heipieper, H.J., de Waard, P., van der Meer, P., Killian, J.A., Isken, S., de Bont, J.A.M., Eggink, G., and de Wolf, F.A. (2001) Regiospecific effect of 1-octanol on *cis-trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in the solvent-tolerant strain *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:541-547.

Heipieper, H.J., R. Diefenbach, and H. Keweloh (1992) A possible mechanism of the protection of the phenol degrading strain *Pseudomonas putida* P8 from the toxicity of the substrate: The conversion of *cis-* into *trans*-unsaturated fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1752.

Heipieper, H.J., B. Loffeld, H. Keweloh, and J.A.M. de Bont (1995) The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: An indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere* **30**: 1041-1051.

Heipieper, H.J., G. Meulenbeld, Q. van Oirschot, and J.A.M. de Bont (1996) Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2773-2777.

Hendrickson HS, Trygstad W.M, Loftness TL, Sailer S.L. (1981) Phospholipase A2 activity on mixed lipid monolayers: inhibition and activation of phospholipases A2 from porcine pancreas and *Crotalus adamanteus* by anionic and neutral amphiphiles. *Arch Biochem Biophys.* **212**:508-14.

Holtwick, R., Keweloh, H. and Meinhardt, F. (1999). *Cis/trans* isomerase of unsaturated fatty acids of *Pseudomonas putida* P8: Evidence for a heme protein of the cytochrome c type. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:179-185.

Ingram, L.O. (1986). Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol.* **4**: 40-44.

Junker, F., and J.L. Ramos (1999) Involvement of the *cis/trans* isomerase CtiT1 in solvent resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.*, **181**: 5693-5700.

4:

Kadner, R. (1996). Cytoplasmic membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Ed. FC. Neidhardt, R Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C.

Link, K.B. Low, W.S. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Sachaechter, and H.E. Umbarger, Washington, DC ASM Press.

Keweloh, H., R. Diefenbach, and H.J. Rehm (1991) Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid compositions of the membrane lipids. *Arch. Microbiol.* **157**: 49-53.

Keweloh, H., and H.J. Heipieper (1996) *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**: 129-137.

Keweloh, H., G. Weyrauch, and H.J. Rehm (1990) Phenol induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 66-71.

Kim YH, Cho K, Yun SH, Kim JY, Kwon KH, Yoo JS, Kim SI (2006) Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics.* **6**(4):1301-18.

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.

Lichtenbergova L., Yoon, E.T., and Cho, W. (1998) Membrane penetration of cytosolic phospholipase A₂ is necessary for its interfacial catalysis and arachidonate specificity. *Biochem.* **37**:14128-14136

Machlin, L.J., and Bendich, A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB J.* **1**:441-445.

Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., and de Mendoza, D. (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**:6681-6688.

Muller, S., Ulrich, S., Losche, A., Loffhagen, N., Babel, W. (2000) Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Methods* **40**:67-77

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A. and Ramos, J.L. (2007) Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:472-477.

Okuyama, H., N. Okajima, S. Sasaki, S. Higashi, and N. Murata (1991) The *cis/trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes

in ambient temperature in the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochem. Biophys. Acta* **1084**: 13-20.

Park, S., and Imlay, J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**:1942-1950.

Pedrotta, V. and Witholt, B. (1999) Isolation and characterization of the *cis-trans* unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J. Bacteriol.* **181**:3256-3261.

Pinkart, H.C. and White, D.C. (1997). Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas strains*. *J. Bacteriol.* **179**:4219-4226

Ramos, J.L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haidour, 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-González, M.I., Rojas, A., Teran, W. and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**:743-768.

Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Bohm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D. and Tümmler, B. (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **188**:4079-4092

Segura, A., P. Bernal, C. Pini, T. Krell, C. Daniels, and J.L. Ramos (2010) Membrane composition and modifications in response to aromatic hydrocarbons in gram negative bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chap. 163. 1596-1603.

Sikkema, J., J.A.M. de Bont, and B. Poolnan (1995) Membrane toxicity of cyclic hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.

Sims P.J., Waggoner A.S., Wang C.H., Hoffman J.F. (1974) Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry.* **13**:3315-30.

Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 522-525.

Tatulian, S.A. (2001) Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A₂ (PLA₂): Membrane surface properties and membrane-induced

structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA₂ activation. *Biophys. J.* **80**:789-800

Trevors, J.T. (2003) Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods* **57**:87-103

Vigh, L., Maresca, B., and Harwood, J.L. (1998) Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**:369-374.

von Wallbrunn, A., Richnow, H.H., Neumann, G., Meinhardt, F., and Heipieper, H.J. (2003) Mechanism of *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**:1730-1733.

Weber, F.J., S. Isken, and J.A.M. de Bont (1994) *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**: 2013-2017.

Suppl. Table 1. Fatty acid profile of the wildtype KT2440 strain and its isogenic *aphC* mutant.

	KT2440	KT2440 H₂O₂	KT2440 Δ<i>aphC</i>	KT2440 Δ<i>aphC</i> H₂O₂
C14:0	0,4	0.3	0,4	0
C16:1,9 <i>cis</i>	29	33	28	33
C16:1,9 <i>trans</i>	0	0	0	0
C16:0	33	32	34	32
C17:cyclo	2,5	2	1,6	0
C18:1,11 <i>cis</i>	18	17	20	19
C18:1,11 <i>trans</i>	0	0	0	0
C18:0	7,5	6	6	5
C:19	0	0	0	0

Suppl. Table 2. Fatty acid profile of the wild type and mutants with a knock-out at PP0043 (CzcB) or PP1395 (TtgB)

	KT2440		Δ PP_0043			Δ PP_1385		
	+ZnCl ₂	+Toluene	-	+ZnCl ₂	+Toluene	-	+ZnCl ₂	+Toluene
C14:0								
C16:1,9 <i>cis</i>	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
C16:1,9 <i>trans</i>	19	93	30	15	24	26	16,6	19
C16:0	12	17	0	14	6,2	0	11,6	11,5
C17:cyclo	38	33	31	29	30	31	27,6	29,2
C18:1,11 <i>cis</i>	3	0,1	1,2	2	2	2	2	2
C18:1,11 <i>trans</i>	13	15	28	25	29	27	28,5	28,6
C18:0	0	25	0	3,7	0	0	0	6,5
C:19	15	9	10,3	9,4	7,2	9,5	8,2	7,3
	12	42	0	17,7	6,2	0	11,6	18

Discusión general

La vida en la Tierra contiene una gran diversidad biológica. Gran parte de los seres vivos del planeta son microorganismos que, hasta la fecha, se han encontrado en todos los nichos ecológicos que han sido explorados. En estos nichos, los microorganismos se encuentran a menudo expuestos no sólo a duras condiciones de temperatura, acidez, ó salinidad típicas de ecosistemas extremos, sino también a una gran diversidad de condiciones cambiantes en ecosistemas más moderados. Por ejemplo, una población bacteriana del suelo puede estar sometida a grandes diferencias de temperatura entre la noche y el día o en la disponibilidad de agua a lo largo del tiempo. La supervivencia bajo estas condiciones tan variables requiere una gran adaptabilidad. Dado que la envoltura celular es la frontera que mantiene independizado el interior del microorganismo del medio externo, es obvio que esta envoltura debe tener funciones importantes en resistencia a estrés, recepción de señales, entrada de nutrientes y en todas aquellas funciones relacionadas con la “comunicación” con el exterior. En este sentido es bien conocida la función de muchas proteínas de gran importancia en el ciclo vital de la bacteria que se localizan en la membrana, como por ejemplo las responsables del transporte de nutrientes, los complejos necesarios para la generación y conservación de energía, la translocación de proteínas ó los sistemas de señalización de membrana. Cada vez más se pone de manifiesto que la unión de los lípidos a estas proteínas es imprescindible para el correcto funcionamiento de éstas (Fyfe and Jones, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2003, Hamilton, 2004, Kolbe *et al.*, 2000). En la última década están recibiendo una atención mayor los lípidos que conforman la membrana y que son responsables de gran parte de la arquitectura de la misma. La membrana ya no es contemplada como un mero “soporte” de proteínas, sino que los lípidos son actualmente considerados como componentes esenciales para el funcionamiento correcto de las actividades que tienen lugar en la membrana. Además se ha descrito que la membrana es un mosaico compuesto por multitud de dominios lipídicos específicamente situados y con funciones determinadas (Matsumoto *et al.*, 2006; López & Kolter, 2010). Por tanto, mantener una estructura de membrana lo más próxima a la óptima es de vital importancia para todos los organismos vivos. Así, se ha visto por ejemplo que tras hemodiálisis los pacientes presentan un aumento de colesterol en sus glóbulos rojos lo que provoca una modificación de las propiedades de

deformación y resistencia hemolítica (Clerc *et al.*, 1990). Hay que recordar que en condiciones fisiológicas el colesterol es el componente lipídico principal que mantiene la rigidez de las membranas de células eucariotas. En bacterias, que no presentan colesterol, la modificación de los ácidos grasos y fosfolípidos cumple esta función de homeostasis. El mantenimiento de las propiedades de las membranas bacterianas es un proceso dinámico ya que, como hemos dicho, las condiciones ambientales en las que debe sobrevivir una bacteria pueden ser muy variables y es bien conocido que numerosos factores tales como, la temperatura, presencia de sustancias tóxicas químicas o sequía, alteran considerablemente las propiedades de la membrana. Estas modificaciones afectan a la estabilidad de la bicapa lipídica y a su fluidez, así como también a las proteínas embebidas en ella. Para contrarrestar las perturbaciones que pueden causar las condiciones ambientales en las membranas biológicas, los lípidos pueden sufrir cambios en sus cadenas acílicas ó grupos de cabeza alterando el empaquetamiento dentro de la bicapa, modificando así la fluidez de la misma. Estos cambios reciben el nombre de adaptación homeoviscosa, un término acuñado por primera vez por Sinensky en 1974.

Los mecanismos mediante los cuales se produce esta adaptación homeoviscosa son variados y han sido expuestos en la introducción de este resumen de tesis doctoral. En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín se había comenzado con el estudio en *Pseudomonas putida* de tres procesos importantes en la adaptación a distintos estreses como son el papel de la cardiolipina sintasa en respuesta a disolventes orgánicos (Bernal *et al.*, 2007a), la modificación de ácidos grasos *cis*-insaturados en respuesta a estrés por disolventes orgánicos y temperatura (Junker and Ramos, 1999; Bernal *et al.*, 2007b) y el papel de los ácidos grasos ciclopropano (CFAs) en desecación (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). En este trabajo de tesis doctoral nos pareció interesante profundizar en el estudio de las modificaciones post-sintéticas que se producían en los ácidos grasos de las membranas de *P. putida*. Estas dos modificaciones son concretamente la conversión de los ácidos grasos *cis*-insaturados a la conformación *trans* que se produce en respuesta a distintos estreses (por ejemplo, presencia de

disolventes orgánicos) y la formación de CFAs también a partir del mismo sustrato. Aunque el papel fisiológico y estructural de los CFAs había sido estudiado en profundidad en *Escherichia coli*, las únicas funciones claramente demostradas hasta el momento del inicio de esta tesis doctoral eran la de su contribución a la tolerancia frente a estrés ácido en *E. coli* (Chang and Cronan, 1999) y a liofilización en *P. putida* KT2440 (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Se tenía la idea general de que los CFAs al acumularse en la fase estacionaria de crecimiento contribuían a fortalecer las membranas cuando las células entraban en esta etapa, caracterizada por una disminución de nutrientes y por la presencia de compuestos tóxicos y de desecho. Los estudios realizados con la cepa tolerante a disolventes orgánicos *P. putida* DOT-T1E durante esta tesis doctoral, demostraron que al contrario de lo que ocurría en *E. coli*, los CFAs no participaban en la tolerancia frente a estrés ácido pero sí en respuesta a disolventes orgánicos. Al igual que ocurre con otras modificaciones de lípidos de membrana en respuesta a disolventes orgánicos, la supervivencia celular tras el choque con el compuesto tóxico no depende exclusivamente de este mecanismo. Por lo tanto la presencia de CFAs en la membrana se puede considerar un mecanismo auxiliar que contribuye pero no es determinante en la tolerancia a disolventes orgánicos. El hecho de que los CFAs en *Pseudomonas* no participen en respuesta a acidez pero sí a disolventes orgánicos se puede interpretar como un reflejo de los distintos estilos de vida de estos géneros bacterianos; mientras *E. coli* es una bacteria común en el tracto intestinal de mamíferos, en donde puede estar sometida a distintos valores de pH bajos dependiendo de la zona en la que se encuentre, *P. putida* DOT-T1E es una bacteria medioambiental que tiene que enfrentarse a menudo a la presencia de contaminantes, la mayoría de ellos liberados al medioambiente por las actividades industriales del hombre.

Aunque los CFAs se postulan como un mecanismo protector frente al estrés celular que le supone a un cultivo entrar en fase estacionaria, el mutante en el gen *cfaB*, que codifica la ciclopropano sintasa, es perfectamente viable (al igual que mutantes de *E. coli* que no sintetizan CFAs) y por tanto el papel fisiológico que cumplen estos ácidos grasos en condiciones normales sigue siendo desconocido. Conviene tener en cuenta que las distintas fases del

crecimiento bacteriano (fase de latencia, exponencial y estacionaria) descritas en el laboratorio probablemente no reflejen el comportamiento bacteriano en el medio ambiente y condiciones como la escasez de nutrientes, típicas de la fase estacionaria de crecimiento, pueden ser las circunstancias más corrientes en los ecosistemas bacterianos naturales (Matilla *et al.*, 2007).

Experimentos mostrados a lo largo de este trabajo, ponen de manifiesto que el promotor del gen *cfaB* está controlado por el factor sigma, RpoS. Este factor es típico de fase estacionaria y muchos de los genes que controla están precisamente relacionados con la respuesta a distintos tipos de estrés (Hengge-Aronis, 1996). Al observar que los CFAs estaban implicados en la tolerancia a disolventes orgánicos, se pensó que la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo podría inducir la expresión del gen *cfaB* y por tanto aumentar los niveles de CFAs en la membrana. Sin embargo, bajo las distintas condiciones ensayadas durante, la presencia de CFAs dependió únicamente del estado fisiológico del cultivo y no de factores externos como pueda ser la presencia de tolueno en el medio (ver Cap. 2). Esto nos reafirma en la idea de que la presencia de CFAs es un mecanismo pasivo de protección frente a disolventes orgánicos; si este estrés ocurre mientras las células están en fase estacionaria (o fisiológicamente equivalente) los CFAs le confieren un grado mayor de tolerancia, pero no es un mecanismo que se active específicamente en respuesta a disolventes orgánicos.. Curiosamente, sí que se observó un aumento de la transcripción de *cfaB* en respuesta a concentraciones relativamente altas de fenilacético pero este aumento de expresión génica no conducía a un aumento de la proporción de CFAs en la membrana. Este resultado era bastante sorprendente, ya que en bacterias suele regir el principio de máxima economía; la transcripción génica conlleva un gasto de energía y en caso de que ésta no se traduzca en un beneficio para la bacteria, se supone innecesaria. Este hecho nos llevó a contemplar la posibilidad de que esta inducción gratuita fuese consecuencia de una competencia entre la enzima *cis-trans* isomerasa (CTI) y la CFA sintasa por el sustrato de la reacción (en ambos casos el doble enlace *cis* de los ácidos grasos insaturados). La *cis-trans* isomerasa es la enzima que modifica la configuración del doble enlace de los ácidos grasos insaturados, que se

sintetizan en bacterias en conformación *cis*, y que está implicada en la regulación de la fluidez de la membrana (refs). Esta modificación conformacional del ácido graso sirve para contrarrestar los efectos de algunos estreses ambientales (como por ejemplo presencia de disolventes orgánicos ó aumento de temperatura). Los mutantes de *P. putida* KT2440 en los genes *cfaB* (que no sintetizan CFAs) y *cti* (que no forman ácidos grasos *trans*) nos permitieron estudiar la posible competencia entre ambas enzimas. Así comprobamos que en presencia de estrés en fase estacionaria, el mutante *cti* no presentaba una mayor cantidad de CFA en su membrana. Asimismo, cuando se analizó bajo las mismas condiciones el contenido lipídico del mutante en el gen *cfaB* se vió que los ácidos grasos *trans* se formaron en cantidades similares a las de la cepa silvestre, indicando que los dobles enlaces *cis* no eran un factor limitante para la producción de ácidos grasos *trans* en fase estacionaria y por tanto que no existía competencia por ambas enzimas. Experimentos llevados a cabo en el laboratorio mostraron que el gen *rpoS* era inducido por fenilacético y por tanto que la inducción de *cfaB* por este ácido es posiblemente una consecuencia del aumento de los niveles de este factor sigma sin mayor consecuencia fisiológica.

Tanto la CFA sintasa como la CTI son enzimas muy interesantes desde el punto de vista bioquímico. La CFA sintasa es una enzima de localización citoplásmica (Taylor y Cronan, 1979) y la CTI ha sido aislada del periplasma bacteriano (Pedrotta *et al.*, 1999) y sin embargo, el sustrato de ambas, el doble enlace de los ácidos grasos insaturados *cis* está embebido en la membrana bacteriana. En ambos casos, el acceso de una enzima localizada en un ambiente hidrofílico a un sustrato hidrofóbico plantea un reto interesante a la hora de estudiar su mecanismo de acción y su regulación. Aunque para ambas enzimas se había propuesto como un posible mecanismo de acción y activación un aumento en la permeabilidad de membrana que hiciese más accesible el sustrato a la enzima, no parece que ambas sean activadas por las mismas rutas. Por un lado, la CFA sintasa no varía su nivel de actividad en vesículas en las que los lípidos tienen un mayor ó menor desorden (Taylor & Cronan, 1979) y por otro en esta tesis doctoral se ha visto que cuando las células son sometidas a un estrés que fluidifica la membrana la cantidad de

CFAs en las membranas no se ve alterada. Además, los CFAs se forman durante la fase estacionaria, y resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) pusieron en evidencia que la fluidez de las membranas no varía entre la fase exponencial y estacionaria. Todos estos datos parecen descartar que la activación de la CFA sintasa sea dependiente de la fluidez de membrana. Además, la actividad de esta enzima se circunscribe al momento en que se induce la expresión génica (durante la fase estacionaria) mientras que el gen *cti* tiene una expresión constitutiva a lo largo de todo el ciclo celular. Pese a tener esta expresión constitutiva, los ácidos grasos de configuración *trans* sólo se forman cuando las bacterias se enfrentan en determinadas situaciones en las que la fluidez de la membrana aumenta. Es por tanto evidente que los mecanismos por los cuales estas dos enzimas se activan tienen que ser diferentes, aunque ambas sean proteínas localizadas en ambientes hidrofílicos que tienen que alcanzar un mismo sustrato embebido en el interior de la bicapa lipídica y por tanto en un ambiente hidrofóbico. En el caso de la CFA sintasa nuestros resultados, juntamente con los del grupo de Cronan (Chang & Cronan, 2000) manifiestan que la acción enzimática es probablemente resultado de una compleja regulación a nivel a nivel transcripcional y post traduccional (Chang *et al.*, 2000; capítulos 1 y 2 de esta tesis doctoral), mientras que en el caso de la CTI nuestros resultados son compatibles con una activación enzimática dependiendo del grado de fluidez que alcanza la membrana (ver capítulo 3). Es por tanto más que llamativo que dos enzimas que emplean el mismo sustrato presenten mecanismos de acción tan diferentes: mientras que la formación de CFAs no parece depender de la organización de la membrana (la CFA sintasa se sintetiza y alcanza el sustrato embebido en un ambiente hidrofóbico) la CTI no alcanza este sustrato hasta que las condiciones de fluidez de la membrana lo permiten. Por último, queremos destacar que ni el gen *cti* ni el *cfaB* se inducen en presencia de tolueno, aunque las proteínas que codifican si están implicadas en la tolerancia a disolventes orgánicos por lo que una inducción génica directa por el estrés queda descartada para ambas proteínas.

En conjunto los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han aportado un mayor conocimiento sobre las modificaciones post-sintéticas que se

producen en los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas bacterianas y su participación en respuesta a estrés. El estudio de las modificaciones de la membrana para la adaptación a distintas situaciones ambientales tiene gran importancia no sólo desde el punto de vista fisiológico, en donde a medida que avanzan los estudios se pone de manifiesto la complejidad de regulación de los lípidos de la membrana, sino también desde el punto de vista biotecnológico y medioambiental. Bajo condiciones naturales, la degradación de contaminantes es controlada usualmente por una variedad de parámetros físicos y químicos y por tanto, aquellos microorganismos que mejor se adapten a las condiciones ambientales desfavorables (ó simplemente cambiantes) serán los que sobrevivan dentro de la comunidad bacteriana y los que llevarán a cabo la biorremediación. La utilización de microorganismos para la síntesis de productos de alto valor añadido también requiere una óptima adaptación bacteriana a las distintas condiciones del reactor, por ejemplo su adaptación a concentraciones crecientes de un compuesto final que pueda ser nocivo para la célula. La mayor comprensión de estos procesos de adaptación, incluyendo las modificaciones en los ácidos grasos de las membranas bacterianas ayudará a entender y mejorar estos procesos.

Conclusiones

- 1- Los ácidos grasos ciclopropanos no son componentes esenciales de las membranas de *P. putida* DOT-T1E en condiciones de laboratorio.
- 2- El producto del gen *cfaB* es la enzima involucrada en esta cepa en la síntesis de ácidos grasos ciclopropanos.
- 3- Los ácidos grasos ciclopropanos están involucrados en la tolerancia a disolventes orgánicos en *P. putida* DOT T1E.
- 4- La expresión del promotor del gen *cfaB* es dependiente del factor sigma RpoS y ocurre en la fase estacionaria del cultivo microbiano.
- 5- Las bases -14, -13, -12 y -9 con respecto al punto de iniciación de la transcripción son fundamentales para la función del promotor *cfaB* en *P. putida* KT2440
- 6- Las enzimas *cis-trans* isomerasa y ciclopropano sintasa no compiten directamente por los dobles enlaces *cis* de los ácidos grasos insaturados presentes en los fosfolípidos de membrana.
- 7- Una apertura de la membrana provocada por agentes que provocan un incremento en la fluidez de la membrana permiten que la enzima CTI acceda a su sustrato enterrado en la parte hidrofóbica de la membrana.

Bibliografía

Aguilar, P.S., Cronan J.E.Jr. and de Mendoza, D. 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* **180**: 2194-2200

Becker, G. and Hengge-Aronis R. 2001. What makes an *Escherichia coli* promoter σ^s dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^s . *Mol. Microbiol.* **39**: 1153-1165

Bergey (2005) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Volume 2: The proteobacteria. 2nd edition. Garrity, George M (Eds). Originally published by Williams & Wilkins, 1984

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 related to transport functionality *Environ. Microbiol.* **9**:1135-1145

Bernal, P., Segura, A. and Ramos, J.L. 2007b. Compensatory role of the *cis-trans* isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.* **9**:1658-1664.

Bloom, M.E., Evans, E., and Mouritsen, Q.G. 1991. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q. Rev. Biophys.* **24**:293-397

Burrows LL, Lam JS. 1999. Effect of *wzx* (*rfbX*) mutations on A-band and B-band lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* O5. *J. Bacteriol.* **181**:973-80.

Cartwright, C.P., J.R. Uroszek, M.J. Beavan, F.M. S., Ruby, S.F.M. de Moria and A.H. Rose.1986. Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:369-377

Carty S.M., Sreekumar K.R. Raetz C.R.H. 1999. Effect of cold heat shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biochem*, **274**:9677-9685

Caudales, R., and Wells, J.M. 1991. Differentiation of free-living *Anabaena* and *Nostoc* Cyanobacteria on the basis of fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:246-251.

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.

Chang, Y.-Y., Eichel, J., and Cronan J.E. Jr. 2000. Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *J. Bacteriol.* **182**:4288-4294.

- Conrad, R.S. Wulf, R.G., and Ankrom, K.A. 1981. Fatty Acids of *Pseudomonas aeruginosa* grown on media affecting polymix susceptibility. *Curr. Microbiology*. **5**: 231-234
- Cronan, J.E. 1968. Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **95**:2054-2061
- Cronan, J.E. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:202-205.
- Cronan, J.E., Jr., Nunn, W.D., and Batchelor, J.G. 1974. Studies on the synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **348**:63-75
- Cronan J.E. and Rock C.O. 1996. Biosynthesis of Membrane Lipids. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC. Neidhart, R. Curtis III, J.L. Ingraham, ECC Link, K.B. Low, WS Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M Schaechter and H.E. Umbarger, Washington, D.C.: ASM press
- del Castillo T, Ramos J.L. 2007. Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *J Bacteriol.* **189**:6602-10
- Den Dooren de Jong, L.E. 1926. *Bigdrage tot de kennis van het mineralisatieproces*. Nijgh & van Ditmar, Rotterdam.
- Diefenbach, R., Heipieper, R., 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
- Diefenbach, R., and H. Keweloh. 1994. Synthesis of trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* P8 by direct isomerisation of the double bonds of lipids. *Arch. Microbiol.* **162**:120-125
- Dowhan W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem.* **66**:199-232
- Facey SJ and Kuhn A. 2010. Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci.* **67**:2343-62.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S. T., Nguyen, L. H., Burgess, R. R., and Gourse, R. L. 2001. Promoter recognition and discrimination by $E\sigma^S$ RNA polymerase. *Mol Microbiol.* **42**: 939-954
- Grogan, D.W. and Cronan, J.E. Jr. 1986. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **166**:872-877.

Grogan, D.W. and Cronan, J.E. Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:429-441.

Gross, C., Lonetto, M., and Losick, R. 1992. In transcriptional Regulation. Vol. 1, S. McKnight and K. Yamamoto, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) pp. 129-176.

Guckert, J.B., Hood, M.A., AND White, D.C. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the *cis/trans* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:794-801

Guckert, J.B., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1987. Biosynthesis of *trans* fatty acids from acetate in the bacterium *Pseudomonas Atlantica*, *Can. J. Microbiology* **33**:748-754

Guckert, J.B., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within *Proteobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2631-2641

Guisbert, E., Yura, T., Rhodius, V.A. and Gross, C.A. 2008. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol..Mol. Biol. Rev.*, **72**: 545-554

Hancock, R.E.W. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **5**:37-42.

Hartl, F-U., Lecker, S.,Schiebel, E. and Wickner, W. 1990. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane. *Cell* **63**:269-279

Heipieper, H.J., de Waard, P., van der Meer, P., Killian, J.A., Isken, S., de Bont, J.A.M., Eggink, G. and the Wolf, F.A. 2001. Regiospecific effect of 1-octanol on *cis-trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in the solvent-tolerant strain *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:541-547.

Heipieper HJ, Diefenbach, R., and Keweloh, H. 1992. A Possible Mechanism of the protection of phenol degrading strain *Pseudomonas Putida* P8 from the toxicity of the substrate: the conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1847-1852.

Heipieper, H.J., Loffeld, B., Keweloh, H. and de Bont, J.A.M. 1995 The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere* **30**:1041-1051.

Heipieper, H.J., Meulenbeld, G., Van Oirschot, Q. and de Bont, J.A.M. 1996. Effect of environmental factors on the *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2773-2777

- 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. Review.
- Henderson, R.J., Millar, R.M., Sargent, J.R., and Jostensen, J.P. 1993. Trans-monoenoic and polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium in relation to growth conditions. *Lipids* **28**:389-396
- Hengge-Aronis, R. 1996. Back to log phase : sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:887-893
- Holtwick, R.F. Meinhardt, and H. Keweloh. 1997. Cis-trans isomerisation of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2773-2777
- Ingram L.O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohol. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678
- Ingram L.O. 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and food additives. *Appl. Environm., Microbiol.* **33**:1233-1236
- Inoue, A. and Horikoshi K. 1991. Estimation of solvent tolerance of bacteria by the solvent parameter LogP. *J. Ferm. Bioeng.* **71**:194-196
- Isken, S. and de Bont, J.A. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol.* **178**:6056-6058.
- Jarrel, H.C., Tulloch, A.P. and Smith, I.C.P. 1983. Relatives roles of cyclopropane-containing and *cis*-unsaturated fatty acids in determining membrane properties of *Acholeplasma laidlawii*: a deuterium nuclear magnetic resonance study. *Biochem.* **22**:5611-5619.
- 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
- Kadner, R.J. 1996. Cytoplasmic membrane. 7, 58-87. F.C. Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, B. Low, B. Magasanik, W.S. Reiznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Kamio, Y., and Nikaido, H.. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimutium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**:2561-2570.

- 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.
- Keinänen MM, Martikainen PJ, Kontro MH. 2004. Microbial community structure and biomass in developing drinking water biofilms. Can J Microbiol. **50**:183-91.
- Keweloh, H., Diefenbach, R., and Rehm, H.J. 1991. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of fatty acids composition of the membrane lipids. Arch. Microbiol. **157**:49-53
- Klein W, Weber M.H.W. and Marahiel M.A. 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*, isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. J. Bacteriol. **181**:5341-5349
- Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. 2000. Crystal structure of bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature **405**:914-919
- Laforet, G.A., Kendall, D.A. 1991. Functional limits of conformation, hydrophobicity, and steric constraints in prokaryotic signal cleavage regions. Wild type transport by a simple polymeric signal sequence. J. Biol. Chem. **266**:1326-1334
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. 1991a. Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **5**:49-59
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. 1991b. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ J Bacteriol. **173**:4474-81.
- Llamas MA, Rodríguez-Herva JJ, Hancock RE, Bitter W, Tommassen J, Ramos JL. 2003. Role of *Pseudomonas putida* tol-oprL gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. J Bacteriol. **185**:4707-16.
- Loewen, P.C. and Hengge-Aronis, R. 1994. The role of the sigma S (KatF) in bacterial global regulation. Annu. Rev. Microbiol. **48**:53-80.
- Loffhagen, N., Härtig, C., Geyer, W., Voyevoda, M., and Harms, H. 2007. Competition between *cis*, *trans* and cyclopropane fatty acid formation and its impact on membrane fluidity. Eng. Life. Sic. **1**:67-74.
- López D. and Kolter R. 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. Genes Dev. **24**:1893-902.
- Lutanberg, B.J. and L.C. Dekkers. 1999. Why makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? Environ. Microbiol. **1**:9-13

Manzaneras, M., Al-Amoudi, V. R. F., Dubochet, J., and Beveridge, T. J. 2003. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**:6112-6118

Martínez-Bueno MA, Tobes R, Rey M, Ramos JL. 2002. Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol.* **4**:842-55.

Matias, V. R. F. and T. J. Beveridge. 2006. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol. Biol.* **56**:240-251

Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J. and Ramos J.L. 2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* **8**(9):R179.

Matsumoto K. 2001. Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual role of anionic phospholipids. *Mol. Microbiol.* **39**:6 1427-1436.

Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H. 2006 Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* **61**:1110-1117.

Miller, K. and J.M. Wood. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:101-136

Migula, W. 1894. Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe.* **1**: 235-238

Mileykovskaya, E. and Dowhan, W.. 2005. Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr Opin. Microbiol.* **8**:135-142.

Mosqueda, G., M.I. Ramos-González and J. L. Ramos. 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**:69-76

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. Environm. Microbiol.* **72**:472-477

Nelson, K.E., C. Weinl. 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. B, 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. Eisean, K.N. Timmis, A. Dusterhöft, 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

Nichols, D.S., McMeekin, T.A., and Nichols, P.D. 1994. Manipulation of polyunsaturated branched-chain and trans-fatty acids production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *Microbiology* **140**:577-584

Nikaido H. and Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32

Okuyama, H., Sasaki, S., Higasashi, S. and Murata, N. 1990. The trans-unsaturated fatty acid in a psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. Strain ABE-1. *J. Bacteriol.* **172**:3515-3518.

Okuyama, H., Ueno, A., Enari, D., Morita, N., and Kusano T. 1998. Purification and characterization of 9-hexadecenoic acid *cis-trans* isomerase from *Pseudomonas* sp. strain E-3. *Arch. Microbiol.* **169**:29-35

Ohlrogge, J.B., F. Gunstone, I. Ismail, and W. E.M. Lands. 1976. Positional specificity of cyclopropane ring formation from *cis*-octadecenoic acid isomers in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **431**:257-267

Palleroni, N.J. 1986. Taxonomy of *Pseudomonas*. In "The Bacteria". Vol. X. Sokatch, J.R. (ed.) Academic Press. London. 3-25

Palleroni, N.J. and E. Moore. 2004. Taxonomy of *Pseudomonas*. Chapter 1 in *The Pseudomonads*. Vol 1.pp??

Paoletti L, Lu YJ, Schujman GE, de Mendoza D, Rock CO. 2007. Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **189**:5816-24

Pedrotta, V. and Witholt, B. 1999. Isolation and characterization of the *cis-trans* isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J. Bacteriol.* **181**: 3256-3261.

Peuchant, E., Motta, C., Salles, C., and Clerc, M. 1990. A compensatory mechanism improving red cell membrane fluidity in hemodialysed patients *Clinica Chimica Acta***90**: 57-66

Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:175-180.

Pini, C.V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J.L. and Segura, A. 2009. Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Mol. Biotech.* **2**:253-261.

Pinkart, H-J-C-, Wolfram, R., 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

Pratt, L., and T.J. Silhavy.1996. The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:2488-2492

Ramos, J.L., Díaz, E. Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O`Gara, S., Ramos, C. And Tommis, K.N. 1994. The behaviour of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology N.Y.* **12**:1349-1358

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 concentration of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**, pp. 3911–3916.

Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A. Terán, W. And Segura, A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**: 743-768

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

Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Hervas, J.J., Godoy, P., Haïdours, A., Reyes, F., and A. Fernandez-Barrero. 1997. Mechanism of Solvent Tolerance in Bacteria *J. Biol.Chem.* **272**:3887-3890 .

Ramos, J.L., M.T. Gallegos, S. Marqués, M.I. Ramos-Gonzales, M. Espinosa and A. Segura. 2001. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stresses. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:166-171 Rekkert, R.F. and de Kort, H.M. 1979. The hydrofobic fragmental constant: an extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem.* **14**:479:488

Ramos-González, M.I. and Molin, S. 1998. Cloning, sequencing and phenotypic characterization of the rpoS gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**:3421-3431

Rietchel, E. T., Mayer, H., Wollenweber, H. W., Zahringer, U., Luderitz, O., Westphal, O. and Brade H. 1984. in: J. Y. Homma, S Kanegasaki, O. Luderitz, T. Shiba and O. Westphal (Eds.), *Bacterial endotoxin:Chemical, Biological and Clinical Aspects*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 11-22

Rojas A, Duque E, Mosqueda G, Golden G, Hurtado A, Ramos JL, Segura A. 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol.* **183** 13:3967-73.

Rojas, A., Smichd, A. , Duque E., Hurtado, A., Ramos J.L. and Segura, A. 2004. Biotransformation in double-phase systems: physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols

and biosynthesis of substituted catechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3637-3643

Samiguet, A.J., Kraus, J., Henkels, M.D., Muehlchen, A.M. and Loper, J.E. 1995. The sigma factor sigmaS affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* PF-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:12255-12259

Sikkema, J.B. Poolman, W.N. Konings and J.A.M de Bont. 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**:2986-2992

Sikkema J, de Bont J.A, Poolman B.
Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995
59:201-22

Silbert, D.F., T. Ulbright, and J. Honegger. 1973. Utilization of exogenous fatty acids for complex lipid biosynthesis and its effect on de novo fatty acid formation in *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry* **12**:164-171

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

Stainer, R.Y., Palleroni, N.J. and M. Doudoroff. 1966. The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271

Storz, G. and Hengge- Aronis, R. 2000. Bacterial stress responses. ASM Press. Washington D.C.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-64.

Typas, A. and Hengge-Aronis, R. 2005. Differential ability of sigma(s) and σ^{70} of *Escherichia coli* to utilize promoters containing half or full UP-elements sites. *Mol. Microbiol.* **55**, 250-260

Typas, A. and Hengge-Aronis, R. 2006. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigma promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **59**: 1037-1051

Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Biochem.* **47**:533-606

Van der Meer, J.R., de Vos W.M., Harayama, S., and Zehnder, A.B. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**:677-694

Vodovar, N., Vallenet, D. Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Mediguez, C. and Boccardi, F. 2006. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotech.* **24**: 673-679.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:149-67.

Von Wallburnn, Richnow, H.H., Newman, G., Meinhardt, F. and Heipieper H.J. 2003. Mechanism of *cis-trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* J. *Bacteriol.* **185**:1730-1733.

Wang A.Y., Grogan D.W. and Cronan J.E., Jr. 1992. Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification and studies of the enzyme active site. *Biochemistry* **31**:11020-11028

Wang A.Y., and Cronan J.E., 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

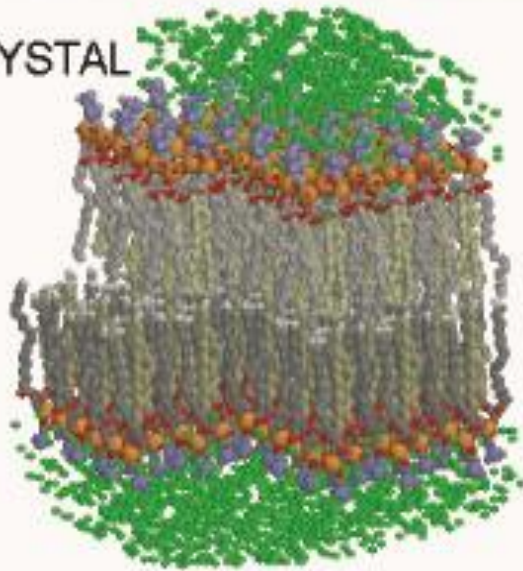
Weber, F.J 1994. Toluene: biological waste-gas treatment, toxicity and microbial adaptation. PhD thesis. Uni. Wageningen. The Netherlands

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

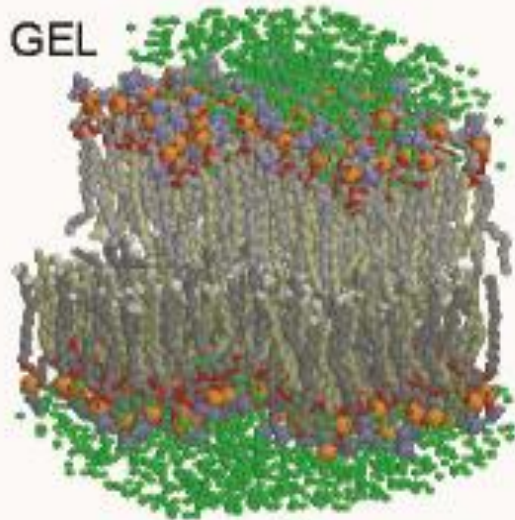
Ying-Ying Chang and Cronan, J.E.Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**(2):249-259

Zambrano, M., D. Siegle, M. Almiron, A. Tomo, and R. Kolter. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over the stationary phase cultures. *Science* **259**:1757-1760

CRYSTAL



GEL



Molecular Dynamics Simulation
of Phosphatidyl Choline Bilayer

Carbon/Palmitic Water Oxygens
Nitrogen Oleic Phosphorus
Oxygen

H Heller, M Schaefer, K Schulten,
J Phys Chem 97:8343, 1993.
RasMol Image by E Martz

FLUID

