

UNIVERSITAT DE BARCELONA

CCiT  
Centres Científics i Tecnològics  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Caracterización de una nueva estructura citoplásmica en la bacteria Antártica *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> mediante (Crio-)Microscopía Electrónica de Transmisión: Tomografía y Reconstrucción Tridimensional



Lidia Delgado Valderrama

FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA SANITARIAS

UNIVERSITAT DE BARCELONA

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT DE BARCELONA

INTRODUCCIÓN

**Citoplasma bacteriano por TEM convencional**

- Compartimento homogéneo. pocas estructuras organizadas: nucleóide y ribosomas.



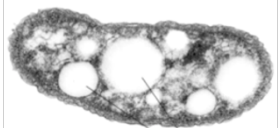
- Cuerpos de inclusión. Ocasionales, en algunas bacterias, en determinadas condiciones de crecimiento.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

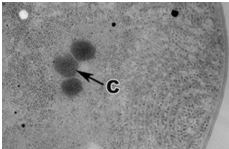
INTRODUCCIÓN

**Cuerpos de inclusión**

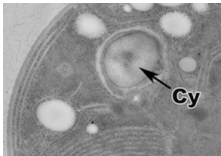
Gránulos de PHB en *Rhodovibrio sodomensis*.



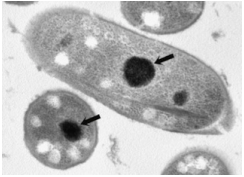
Carboxisomas en *Cyanothece* sp.



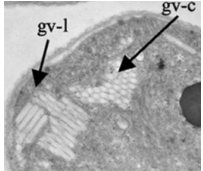
Gránulos de cianoficina en *Cyanothece* sp.

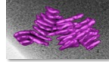


Gránulos de polifosfato en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>



Vesículas de gas en *Microcystis aeruginosa*.

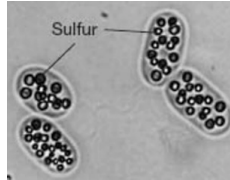




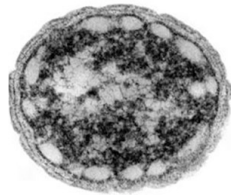
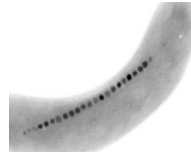
## INTRODUCCIÓN

### Cuerpos de inclusión

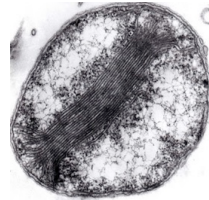
Gránulos de azufre en *Isochromatium buderi*.



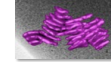
Magnetosomas en *Magnetospirillum magnetotacticum*.



Clorosomas en *Chlorobium tepidum*.



Membranas intracitoplásmicas en *Nitrocystis oceanus*.



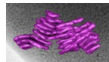
## INTRODUCCIÓN

### Factores limitantes de la MET convencional:

- Fijación química: GA y OsO<sub>4</sub>.
- Deshidratación.
- Inclusión en resina.
- Obtención de secciones de la muestra.
- Contrastado con metales pesados: AU y citrato de plomo.



FUENTE DE ARTEFACTOS, PRESERVACIÓN LIMITADA

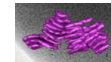
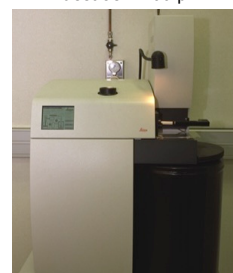
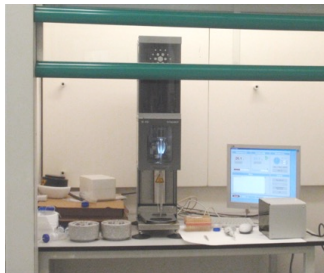


## INTRODUCCIÓN

### Mejoras en TEM: Crioinmovilización

Enfriamiento de la muestra a tasas ultrarrápidas, permitiendo la transformación del agua intrínseca directamente a hielo vítreo (no cristalino).

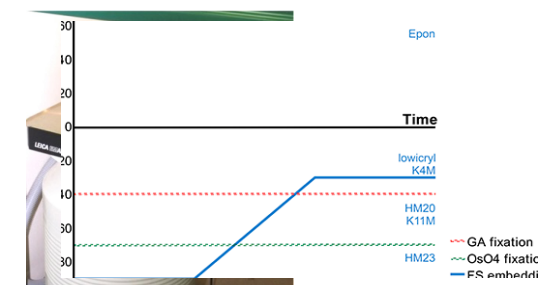
- **PF.** Congelación por inmersión en un gas licuado.  
Muestras < 500 nm
- **HPF.** Congelación por doble chorro de LN<sub>2</sub> en condiciones de presión elevada (≈2000 bares).  
Muestras < 200 μm

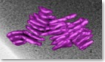


## INTRODUCCIÓN

### Mejoras en TEM a temperatura ambiente

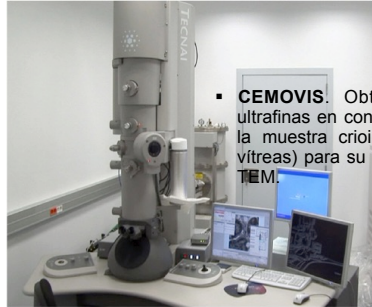
**Criosustitución:** sustitución del hielo presente en la muestra crioinmovilizada por un solvente orgánico a -90°C en presencia de fijadores químicos (OsO<sub>4</sub>, GA, UA).





## INTRODUCCIÓN

### Mejoras en TEM: Observación en condiciones criogénicas

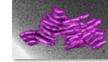


recta de la muestra  
or PF.

- **CEMOVIS.** Obtención de secciones ultrafinas en condiciones criogénicas de la muestra crioinmovilizada (secciones vítreas) para su observación en el cryo-TEM.

Knife edge

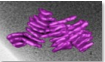
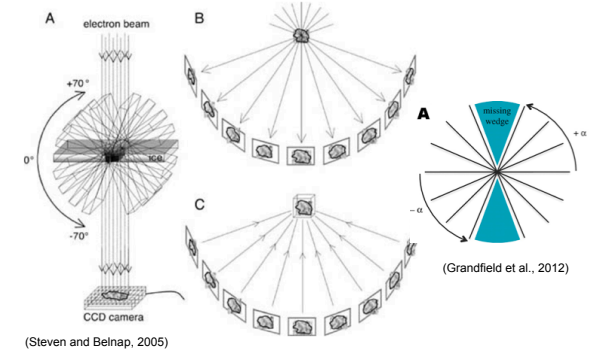
Eyelash



## INTRODUCCIÓN

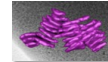
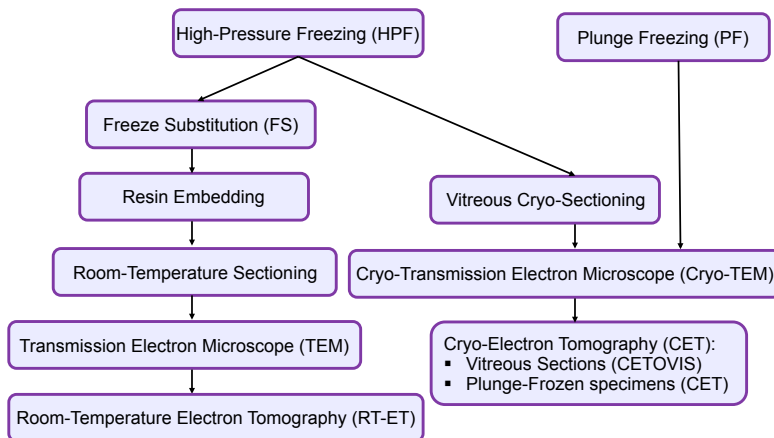
### Mejoras en TEM: Tomografía Electrónica

Obtención de series de imágenes a partir de proyecciones de una misma muestra en diferentes orientaciones que, posteriormente, son procesadas obteniéndose un mapa 3D.



## INTRODUCCIÓN

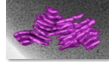
### Tomografía Electrónica



## INTRODUCCIÓN

### Mejoras en TEM aplicadas al estudio de la estructura procariota

1. Estudio de las estructuras en condiciones similares a las que se encuentran en la naturaleza.
2. Determinación de la arquitectura 3D de estructuras procariotas conocidas. Conocimiento más preciso.
3. Aporte de información nueva sobre la función de estructuras.
4. Descubrimiento de nuevas estructuras bacterianas.

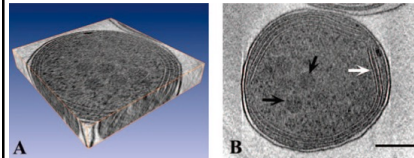
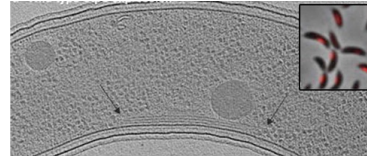


## INTRODUCCIÓN

### 2. Determinación de la arquitectura 3D de estructuras procariontas conocidas.

#### Filamentos citoesqueleto

*Caulobacter crescentus*. Filamentos responsables de la curvatura interna.  
(Ingerson-Mahar et al., 2010).

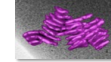
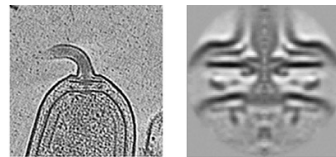


#### Membranas celulares

*Prochlorococcus* sp. Membranas fotosintéticas.  
(Ting et al., 2007).

#### Flagelo

Motor del flagelo en *Helicobacter hepaticus*.  
(Chen et al., 2011).

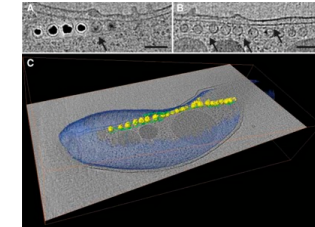


## INTRODUCCIÓN

### 2. Determinación de la arquitectura 3D de estructuras procariontas conocidas.

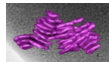
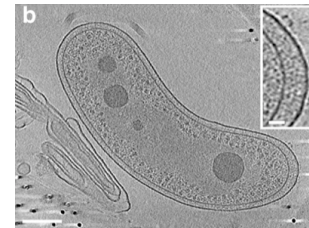
#### Cuerpos de inclusión

Magnetosomas en *Magnetospirillum magneticum*.  
(Komeili et al., 2006).



#### Nucleoide

Zona central libre de ribosomas en *Bdellovibrio bacteriovorus*.  
(Borgnia et al., 2006).

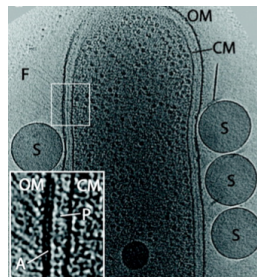
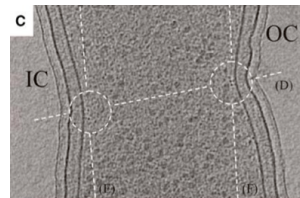


## INTRODUCCIÓN

### 3. Aporte de información nueva sobre la función de estructuras

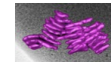
#### División celular

Filamentos tipo arco (FtsZ) en el lugar de división de *Caulobacter crescentus*.  
(Li et al., 2007).



#### Motilidad

Gliding en *Flavobacterium johnsoniae*.  
(Liu et al., 2007).

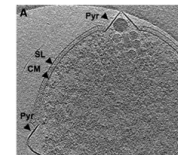
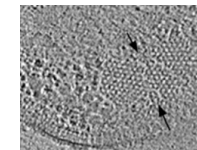


## INTRODUCCIÓN

### 3. Aporte de información nueva sobre la función de estructuras

#### Quimiotaxis

Quimiorreceptor organizado hexagonalmente en *Thermotoga maritima*.  
(Briegleb et al., 2008).

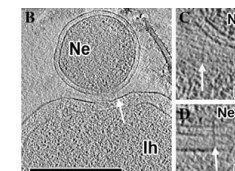


#### Patogenicidad

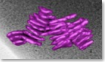
*Sulfolobus solfataricus* infectado con un virus dsDNA del linaje Adeno-PRD1.  
(Fu et al., 2010).

#### Interacción célula-célula

Zona de contacto entre *Ignococcus hospitalis* y *Nanoarchaeum equitans*.  
(Junglas et al., 2008).



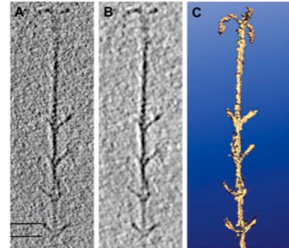
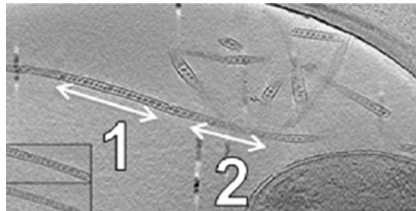




#### 4. Descubrimiento de nuevas estructuras bacterianas

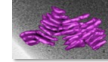
##### “Hami”

Arqueas de ambientes fríos y ricos en azufre.  
(Moissl et al., 2005).



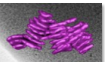
##### “Nanopods”

*Delftia* sp.  
(Shetty et al., 2011).

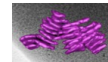


#### Mejoras en TEM aplicadas al estudio de la estructura procariota

- ✓ Han descartado el pensamiento generalizado de que el citoplasma bacteriano no está estructurado.
- ✓ La posibilidad de estudiar las muestras en un estado cercano al natural ha vuelto a generar un gran interés científico en el estudio de la ultraestructura procariota.
- ✓ Han abierto nuevas oportunidades para el descubrimiento de nuevas estructuras bacterianas. Bacterias de hábitats “desconocidos”.



## OBJETIVOS



#### Aislamiento y caracterización de microorganismos antárticos

Cepa M1

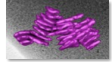
Sedimento marino de Isla Decepción (Antártida), psicotolerante (-4°C a 34°C), aeróbica, Gram negativa, catalasa y oxidasa positivas, bacilo corto, flagelo polar, aceptada en el 2011 como una nueva especie: ***Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>**.



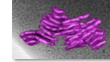
ESTRUCTURAS CITOPLÁSMICAS ATÍPICAS



CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

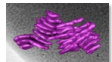
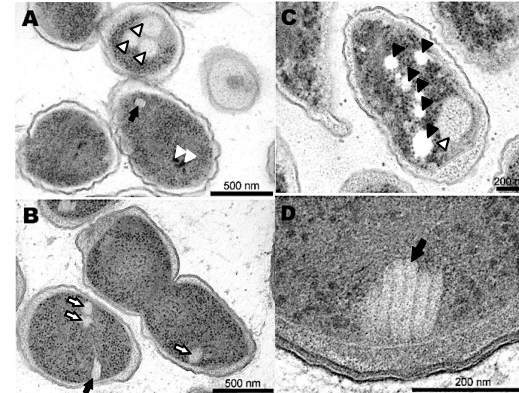


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



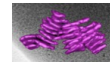
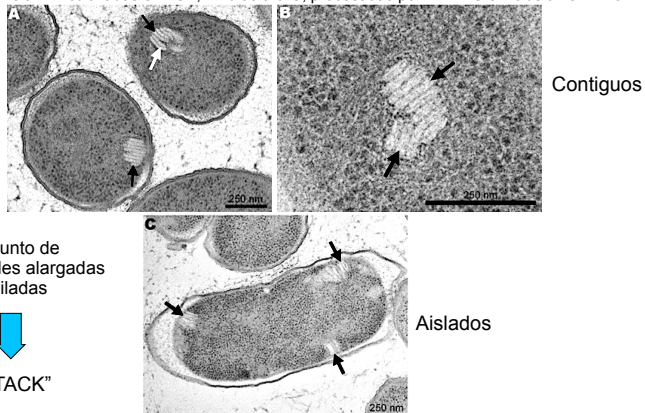
### 1. Determinación de las condiciones de crecimiento óptimas para la detección de nuevas estructuras citoplásmicas

*P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA, 5 días a 15°C, procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON.

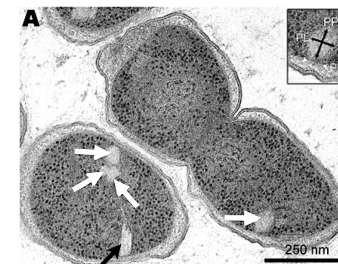


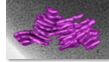
### 3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas combinando técnicas microscópicas

*P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA, 12 días a 0°C, procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON.



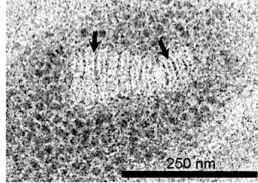
### 3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas combinando técnicas microscópicas



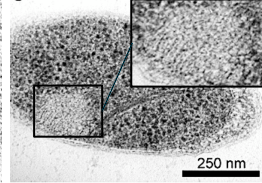


### 3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas combinando técnicas microscópicas

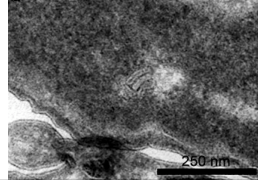
HPF-FS e inclusión en EPON



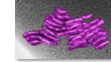
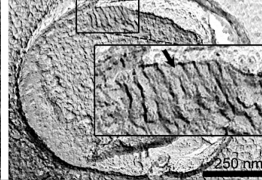
HPF-FS e inclusión en Lowicryl HM23



Tokuyasu

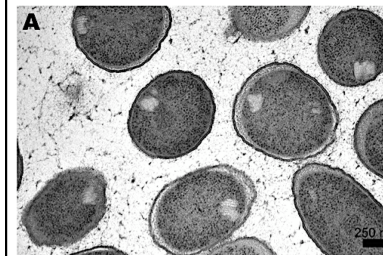


FF

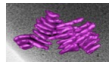
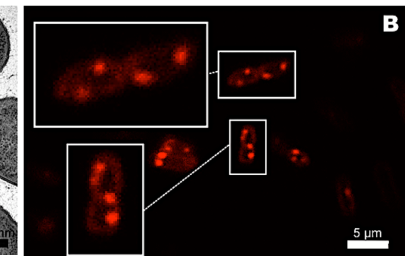


### 3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas combinando técnicas microscópicas

TEM (HPF-FS e inclusión en EPON)

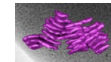
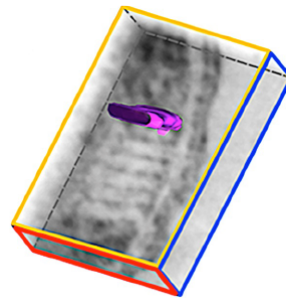
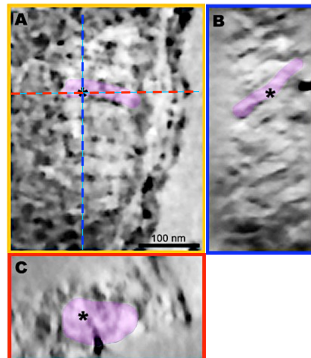


Microscopio Confocal (marcaje con FM4-64)



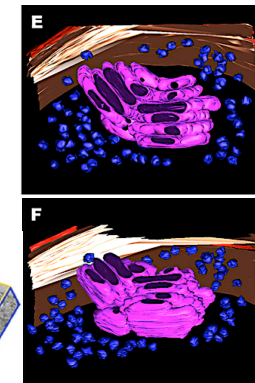
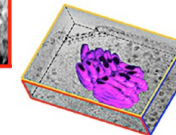
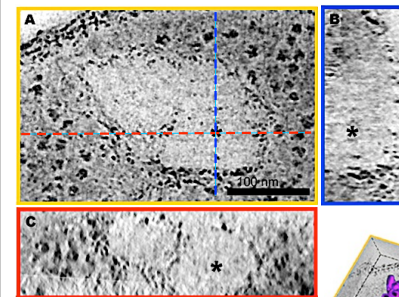
### 4. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante Tomografía Electrónica

RT-ET a doble eje de secciones de 250 nm de en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON.

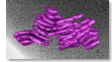


### 4. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante Tomografía Electrónica

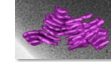
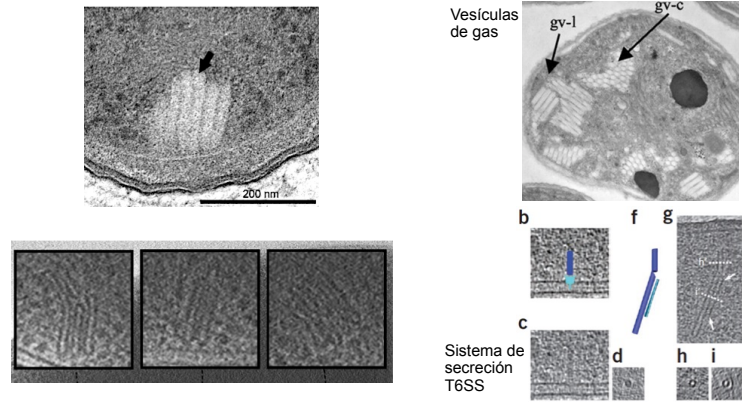
RT-ET a doble eje de secciones de 250 nm de en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON.





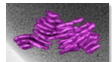
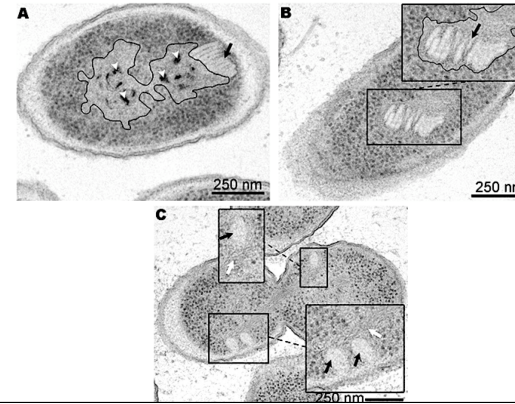


### 4. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante Tomografía Electrónica



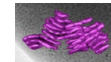
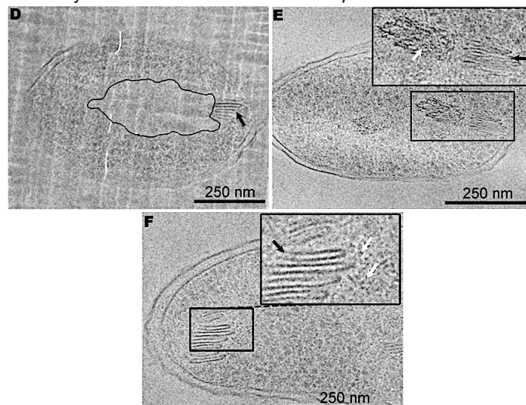
### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

Proximidad "Stacks" y nucleóide bacteriano en *P. deceptionensis* M1T: HPF-FS e inclusión en EPON.



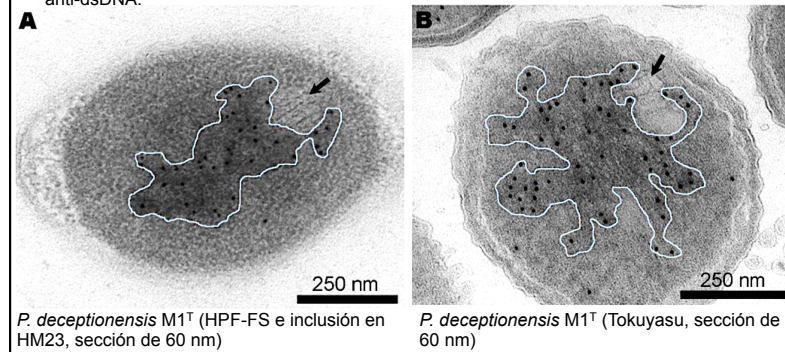
### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

Proximidad "Stacks" y nucleóide bacteriano en *P. deceptionensis* M1T: CEMOVIS.

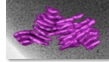


### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

Proximidad "Stacks" y nucleóide bacteriano en *P. deceptionensis* M1T: Inmunoquímica anti-dsDNA.

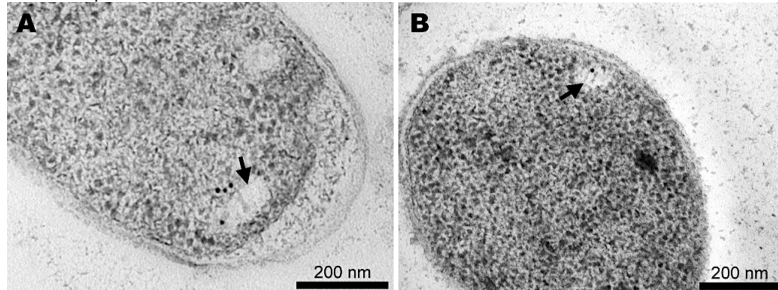






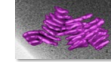
### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

Proximidad "Stacks" y nucleóide bacteriano en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>: Inmunocitoquímica anti-SeqA.



**A**  
*E. coli* K12 cultivada en TSA 12°C 11 días (HPF-FS e inclusión en HM20, sección de 60 nm)

**B**  
*P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA 12°C 11 días (HPF-FS e inclusión en HM20, sección de 60 nm)



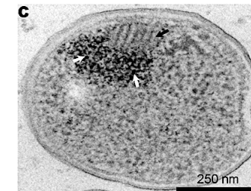
### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

"Stacks" en otras especies bacterianas del género *Pseudomonas*.

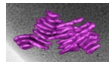


**A**  
*P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C 12 días (HPF-FS e inclusión en EPON)

**B**  
*P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C 12 días (HPF-FS e inclusión en EPON)

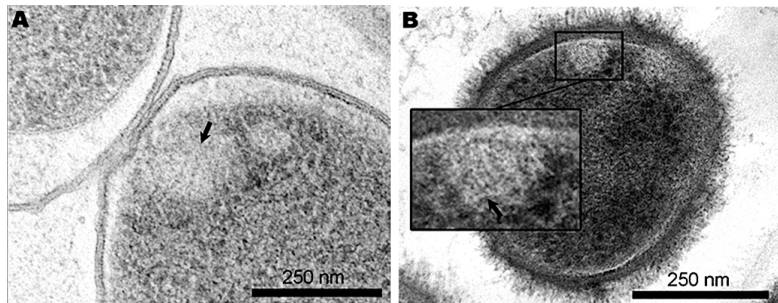


**C**  
*P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> cultivada en TSA a 4°C 12 días (HPF-FS e inclusión en EPON)



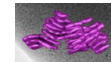
### 5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas

"Stacks" en especies bacterianas de otros géneros.



**A**  
*E. coli* W3310 cultivada en TSA a 12°C durante 12 días (HPF-FS e inclusión en EPON)

**B**  
*B. subtilis* ATCC6633 cultivada en TSA a 12°C durante 12 días (HPF-FS e inclusión en EPON)



OPEN ACCESS freely available online

PLOS ONE

### The Stack: A New Bacterial Structure Analyzed in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> by Transmission Electron Microscopy and Tomography

Lidia Delgado<sup>1,2</sup>, Ornella Carrión<sup>2</sup>, Gema Martínez<sup>2</sup>, Carmen López-Iglesias<sup>1</sup>, Elena Mercadé<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Ciro-Microscopía Electrónica, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> Laboratori de Microbiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

#### Abstract

In recent years, improvements in transmission electron microscopy (TEM) techniques and the use of tomography have provided a more accurate view of the complexity of the ultrastructure of prokaryotic cells. Cryoimmobilization of specimens by rapid cooling followed by freeze substitution (FS) and sectioning, freeze fracture (FF) and observation of replicas, or cryoelectron microscopy of vitreous sections (CEM/CEVS) now allow visualization of biological samples close to their native state, enabling us to refine our knowledge of already known bacterial structures and to discover new ones.

Application of these techniques to the new Antarctic cold-adapted bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> has demonstrated the existence of a previously undescribed cytoplasmic structure that does not correspond to known bacterial inclusion bodies or membranous formations. This structure, which we term a "stack", was mainly visualized in slow growing cultures of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> and can be described as a set of stacked membranous discs usually arranged perpendicularly to the cell membrane, but not continuous with it, and found in variable number in different locations within the cell. Regardless of their position, stacks were mostly observed very close to DNA fibers. Stacks are not exclusive to *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> and were also visualized in slow-growing cultures of other bacteria. This new structure deserves further study using cryoelectron tomography to refine its configuration and to establish whether its function could be related to chromosome dynamics.

**Citation:** Delgado L, Carrión O, Martínez G, López-Iglesias C, Mercadé E (2013) The Stack: A New Bacterial Structure Analyzed in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> by Transmission Electron Microscopy and Tomography. PLoS ONE 8(9): e73297. doi:10.1371/journal.pone.0073297

**Editor:** Mitchell F. Balish, Miami University, United States of America

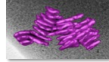
**Received:** April 16, 2013; **Accepted:** July 18, 2013; **Published:** September 9, 2013

**Copyright:** © 2013 Delgado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the Government of Spain (CICYT project CTQ 2010-21183-C02-01-PPQ) and by the Autonomous Government of Catalonia (grant 2009SGR1212). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mmercade@ub.edu, carmenl@ccit.uib.edu (CLL)



## Cryo-electron tomography of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections to analyze the recently described bacterial cytoplasmic structure, the Stack



Lidia Delgado<sup>a,b</sup>, Gema Martínez<sup>a</sup>, Carmen López-Iglesias<sup>a,\*</sup>, Elena Mercadé<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Cryo-Electron Microscopy, Scientific and Technological Centers, University of Barcelona, Barcelona, Spain  
<sup>b</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 12 December 2014  
Accepted 13 January 2015  
Available online 21 January 2015

**Keywords:**  
Cryo-electron microscopy  
Cryo-electron tomography  
Vitreous sections  
Plunge freezing  
High-pressure freezing  
Stacks

### ABSTRACT

Cryo-electron tomography (CET) of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections (CETOVIS) were used to revise and expand the structural knowledge of the "Stack", a recently described cytoplasmic structure in the Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>. The advantages of both techniques can be complementarily combined to obtain more reliable insights into cells and their components with three-dimensional imaging at different resolutions. Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) and CET of frozen-hydrated *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells confirmed that Stacks are found at different locations within the cell cytoplasm, in variable number, separately or grouped together, very close to the plasma membrane (PM) and oriented at different angles (from 35° to 90°) to the PM, thus establishing that they were not artifacts of the previous sample preparation methods. CET of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections verified that each Stack consisted of a pile of oval disc-like subunits, each disc being surrounded by a lipid bilayer membrane and separated from each other by a constant distance with a mean value of  $5.2 \pm 1.3$  nm. FM4-64 staining and confocal microscopy corroborated the lipid nature of the membrane of the Stacked discs. Stacks did not appear to be invaginations of the PM because no continuity between both membranes was visible when whole bacteria were analyzed. We are still far from deciphering the function of these new structures, but a first experimental attempt links the Stacks with a given phase of the cell replication process.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).