



# 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

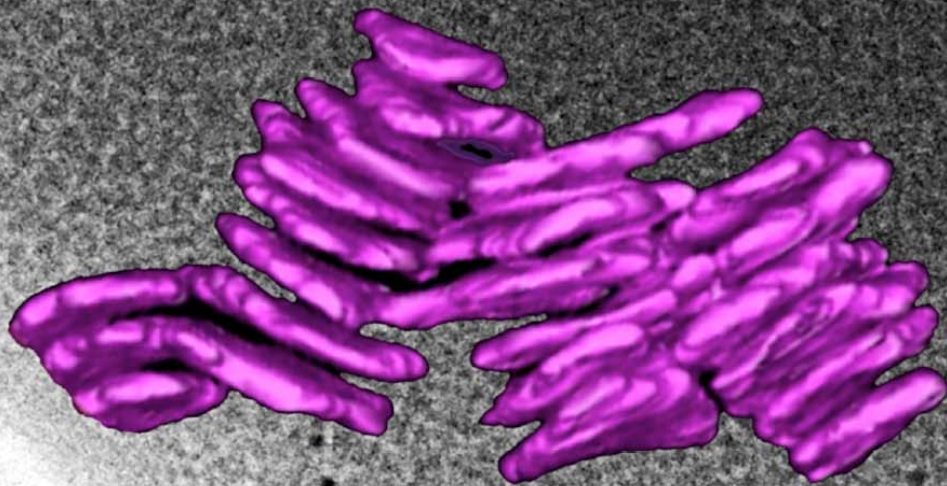
Lidia Delgado Valderrama

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**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  
2014**



**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**





Facultat de Farmàcia  
Departament de Microbiologia i  
Parasitologia Sanitàries

Centres Científics i Tecnològics  
Unitat de Crio-Microscòpia  
Electrònica

Programa de doctorado de Biotecnología

**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**

Memoria presentada por Lidia Delgado Valderrama para optar al título de  
doctora por la Universidad de Barcelona,

Directora de Tesis

Directora de Tesis

Dra. Elena Mercadé Gil

Dra. Carmen López Iglesias

Doctoranda

Lidia Delgado Valderrama, 2014



La presente tesis doctoral ha sido financiada mediante la beca de colaboración con el proyecto FBG 304812 de la Fundació Bosch i Gimpera concedida a la doctoranda Lidia Delgado Valderrama y el proyecto “Obtención de emulsionantes poliméricos de nueva generación, CTQ2010-21183-C02-01” financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español.





En primer lugar, gracias a mis directoras de tesis, la Dra. Carmen López Iglesias y la Dra. Elena Mercadé Gil, sin las cuales este trabajo no habría sido posible. Gracias por haber confiado en mi, dándome la oportunidad de llevar a cabo esta aventura, por vuestro apoyo personal y profesional, por vuestras explicaciones, por vuestro paciente seguimiento y por vuestras aportaciones, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

Gracias a Gema y a Yolanda, mis compañeras del servicio de Crio-Microscòpia de los CCiTUB, por vuestro apoyo incondicional, tanto profesional como personal. Gracias también a aquellas personas que en su paso por la unidad me brindaron su ayuda en algún momento: a Xavi, Nieves, Silvia, Alejandro, Luís, Marga, Ferran, Sonia y Elisenda. De la misma forma, gracias a mis compañeras de tesis, Ornella y Carla, y gracias también a María Jesús, por vuestra colaboración siempre que la he necesitado y por hacerme el camino más agradable.

Gracias al profesor Peter Peters y al Dr. Jason Pierson, Netherlands Cancer Institute, por su colaboración en la implementación de la crioultramicrotomía de secciones vítreas en nuestro laboratorio. Especialmente, gracias al profesor Peter Peters por sus aportaciones y sugerencias, y por facilitarnos el acceso a la plataforma NeCEN para utilizar el microscopio Titan KRIOS. Gracias al Dr. José Jesús Fernández, CNB, y al Dr. José María Seguí, COMAV, por su apoyo en las técnicas de reconstrucción tridimensional y por sus aportaciones, críticas y sugerencias. Gracias al Dr. Martín Ríos, UB, por su valioso soporte estadístico. Gracias también al Dr. Kirsten Skarstad, Oslo University Hospital, por facilitarnos tan amablemente el anticuerpo anti-SeqA.

Gracias a todas aquellas personas que durante los cinco años que ha durado esta etapa me han aportado momentos agradables, transmitiendo siempre su optimismo y ayudándome a relativizar las cosas, dándoles la importancia que les toca. En especial, a Dani, Aïda, Tamara y Laure.

Gracias a Mari, Paco, Anna, Sam, Francesc y Esther, por haber entrado en mi vida durante esta etapa. Gracias a mi familia por estar siempre ahí, por vuestro

apoyo y comprensión incondicionales: a Marmen y Rafael, siempre me habéis hecho sentir como en casa; a Pablo, por demostrarme que, a pesar de todo, todavía tengo un hogar en Écija; a Fali, Laura, Victor y María José, todo es significativamente mejor a vuestro lado; a mis padres, Techí y Manolo, podría escribir líneas y líneas y aún así me quedaría corta: os lo debo TODO. Gracias a Guerau, Diego, Marta, Lucía, Bruc y Mario, me encanta redescubrir el mundo a través de vuestros ojitos. Gracias, Jordi, por tu comprensión y paciencia, por ayudarme a levantarme y a seguir el camino siempre que caigo, por sufrir en primera persona esta tesis, por aportarme esa perspectiva complementaria tan necesaria, por ser la mitad de este equipo y sin la que nuestros proyectos, en ocasiones tildados de locos, no serían posibles y, sobretodo, por hacerme feliz día a día.

*A mis padres, Techí y Manolo*

*A mi abuela, María*

*A Jordi*



*“Le gustaba el territorio y no tenía prisa; se detenía de vez en cuando a hacer anotaciones sobre posibilidades interesantes para futuros viajes o para sacar lo que él llamaba "instantáneas de la memoria". El propósito de esas rápidas fotos era recordarle lugares que podía querer volver a visitar y conocer con más detalles.”*

Robert James Waller



# **ÍNDICE**





<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	<b>3</b>
1.1. Primeros pasos y evolución	3
1.2. Crioinmovilización por “Plunge Freezing”	6
1.3. Crioinmovilización por “High-Pressure Freezing”	8
1.4. Tomografía Electrónica	11
<b>2. Estructura de Procariotas</b>	<b>25</b>
2.1. El citoplasma bacteriano	25
2.2. Tomografía Electrónica aplicada a procariotas	34
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>1. Cepas bacterianas y conservación</b>	<b>57</b>
<b>2. Medios de cultivo</b>	<b>57</b>
<b>3. Condiciones de cultivo</b>	<b>58</b>
<b>4. Técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	<b>59</b>
4.1. Seguridad y precauciones generales durante el uso de nitrógeno líquido	59
4.2. Crioinmovilización por enfriamiento a alta presión	60
4.3. Crioinmovilización por “Plunge Freezing”	65
4.3.1. Crioinmovilización por Vitrobot™	65
4.3.2. Crioinmovilización por “Plunge Freezing” manual	69
4.4. Criosustitución	71
4.5. Inclusión de muestras en resina EPON y confección de bloques	78

4.6. Preparación de muestras por el método de Tokuyasu	80
4.7. Ultramicrotomía	82
4.7.1. Obtención de secciones vítreas	82
4.7.2. Obtención de criosecciones por el método de Tokuyasu	94
4.7.3. Obtención de secciones de muestras incluidas en resina	101
4.8. Inmunocitoquímica	107
4.8.1. Inmunocitoquímica en secciones de resina acrílica	107
4.8.2. Inmunocitoquímica en secciones de Tokuyasu	109
4.9. Contrastado de secciones	110
4.9.1. Contrastado para el estudio de la ultraestructura en secciones de resina epóxica o acrílica	111
4.9.2. Contrastado para el estudio de inmunocitoquímica en cortes de resina acrílica	115
4.9.3. Contrastado para el estudio de la ultraestructura o de la inmunocitoquímica de estructuras en secciones de Tokuyasu	118
4.9.4. Contrastado para estudios de Tomografía Electrónica	119
4.10. Deposición de “fiducial markers”	120
4.11. Criofractura	121
4.12. Observación en el microscopio electrónico de transmisión	123
4.12.1. Preparación del equipo	124
4.12.2. Carga de la muestra en condiciones de temperatura ambiente y ajuste del “wobbler”	129
4.12.3. Carga de la muestra en condiciones criogénicas y ajuste del “wobbler”	131
4.12.4. Búsqueda del foco de la muestra en condiciones “low-dose” (sólo en condiciones criogénicas)	134

4.12.5. Ajuste de la dosis electrónica en condiciones “low-dose” (sólo en condiciones criogénicas)	134
4.12.6. Análisis del hielo de la muestra en condiciones criogénicas	135
4.12.7. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio SPIRIT a temperatura ambiente	136
4.12.8. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio F20 a temperatura ambiente	136
4.12.9. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio F20 a temperaturas criogénicas	137
4.12.10. Retirada del “holder” del microscopio electrónico de transmisión a temperatura ambiente	138
4.12.11. Retirada del “cryo-holder” del microscopio electrónico de transmisión en condiciones criogénicas	138
4.12.12. Calibración del microscopio electrónico de transmisión para experimentos de Tomografía Electrónica a temperatura ambiente y a temperaturas criogénicas	140
4.12.13. Adquisición de series de imágenes en el microscopio electrónico de transmisión para experimentos de Tomografía Electrónica a temperatura ambiente	142
4.12.14. Adquisición de series de imágenes en el criomicroscopio electrónico de transmisión para experimentos de Criotomografía Electrónica	146
4.13. Procesamiento por ordenador	148
4.13.1. Reconstrucción de tomogramas de un solo eje	148

4.13.2.	Reconstrucción de tomogramas de doble eje	153
4.13.3.	Reducción del ruido de tomogramas	160
4.13.4.	Segmentación de tomogramas	161
4.13.5.	Creación de películas de tomogramas	163
4.13.6.	Creación de películas de la segmentación del tomograma	163
<b>5.</b>	<b>Microscopía Confocal</b>	<b>164</b>
5.1.	Marcaje fluorescente de bicapas lipídicas y del nucleoide por FM4-64 y Hoescht	164
5.2.	Marcaje fluorescente de cardiolipina por 10-Nonyl Acridine Orange	165
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		<b>167</b>
1.	<b>Determinación de las condiciones de crecimiento óptimas para la detección de nuevas estructuras citoplásmicas en <i>Pseudomonas deceptionensis</i> M1<sup>T</sup></b>	<b>169</b>
2.	<b>Optimización de las condiciones de experimentales de procesamiento de las muestras para la observación de las nuevas estructuras citoplásmicas en <i>Pseudomonas deceptionensis</i> M1<sup>T</sup> mediante Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	<b>184</b>
2.1.	Determinación del medio de criosustitución	184
2.2.	Determinación del método de contrastado para las secciones de resina	189
2.3.	Determinación del medio de crioinmovilización para la obtención de secciones vítreas	190
2.4.	Determinación del medio para la crioinmovilización por “Plunge Freezing” de <i>Pseudomonas deceptionensis</i> M1 <sup>T</sup>	196

<b>3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante la combinación de técnicas de Microscopía</b>	<b>198</b>
<b>4. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante Tomografía Electrónica</b>	<b>216</b>
4.1. Tomografía Electrónica a temperatura ambiente	216
4.2. Criotomografía Electrónica	223
<b>5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas</b>	<b>236</b>
<b><u>V. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>255</u></b>
<b><u>VI. ABREVIATURAS</u></b>	<b><u>259</u></b>
<b><u>VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO</u></b>	<b><u>265</u></b>
<b><u>VIII. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>289</u></b>
<b><u>XIX. PUBLICACIONES</u></b>	<b><u>315</u></b>



# ***I. INTRODUCCIÓN***





# **1. Microscopía Electrónica de Transmisión**

## **1.1. Primeros pasos y evolución**

El conocimiento en los campos de la Microbiología y de la Biología Celular se ha ido desarrollando en paralelo a las mejoras implementadas en las áreas de la óptica y de la adquisición de imágenes desde el descubrimiento de las células por Robert Hooke y Antonie van Leeuwenhoek en el siglo XVII. El desarrollo de agentes de tinción cromogénicos, permitieron la visualización de cuerpos intracelulares que de otra forma eran invisibles para el ojo humano. Sin embargo, a finales del siglo XIX Ernst Abbe reconoció que la resolución de los microscopios ópticos estaba limitada a la mitad de la longitud de onda de la luz. La invención del microscopio electrónico de transmisión (TEM) por Ruska a principios de los años 30 y la rápida disponibilidad de los equipos, trasladó la Microbiología y la Biología Celular a una nueva Era, en la que la resolución mejoraba alrededor de dos órdenes de magnitud. Durante las siguientes dos décadas se desarrollaron los métodos de preparación de muestras que permitirían las primeras observaciones de estructuras subcelulares. Esta situación, condujo a un gran auge de la Microscopía Electrónica de Transmisión entre los años 50 y 60, que permitió el descubrimiento de muchos orgánulos y estructuras subcelulares (Palade and Porter, 1954; Costerton, 1979).

Sin embargo, existían limitaciones importantes de la técnica como el hecho de que las muestras biológicas hidratadas no se pudieran observar directamente a temperatura ambiente en las condiciones de alto vacío del TEM o que sólo se pudieran estudiar finas capas o secciones de materia sólida (Wyffels, 2001). De esta manera, en el protocolo convencional de preparación de muestras biológicas para su observación en el TEM, éstas se fijaban químicamente con glutaraldehído (GA) y tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ), se deshidrataban, se incluían en resina y, finalmente, se obtenían secciones ultrafinas que se contrastaban con metales pesados (Luft, 1961; Pease and Porter, 1981). Como se hizo

evidente, todas las etapas mencionadas de preparación de muestras podían añadir artefactos a la misma. Por un lado, se observó que la fijación con GA y la deshidratación con solventes orgánicos conducía a la agregación de proteínas, al colapso de glucanos altamente hidratados y a la pérdida de lípidos (Cope and Williams, 1968; Cope and Williams, 1969a; Cope and Williams, 1969b; Kellenberger et al., 1992). Asimismo, teniendo en cuenta que la formación de aniones en la muestra dependía del mismo proceso de fijación y de las condiciones de la inclusión, se hizo evidente que la adsorción diferencial de cationes metálicos pesados por los componentes de la muestra durante el proceso de contrastado no dependía de las estructuras biológicas en sí (North et al., 1999; Wyffels, 2001). De esta forma, los artefactos generados en la preparación de muestras biológicas a través del método convencional limitaban la resolución efectiva a la hora de la observación de muestras en el TEM (Wyffels, 2001).

Con el objetivo de encontrar soluciones a los artefactos derivados del método convencional y de poder observar las muestras biológicas en unas condiciones más cercanas a las que se encuentran en la naturaleza, es decir, hidratadas, se pensó en la crioinmovilización o criofijación (CF) de las mismas. De esta forma, se evitaría la evaporación del agua de la muestra durante su observación en condiciones de alto vacío en el TEM, preservando su estructura y su integridad (Dubochet et al., 1988). Sin embargo, los métodos de CF iniciales provocaban la formación de hielo cristalino en el citoplasma, conllevando a la segregación entre el agua y los solutos, a la concentración y precipitación de los componentes celulares entre las ramificaciones del hielo cristalino y, en los peores casos, al daño de las membranas por los cristales de hielo formados llegando a destruir orgánulos (Escaig, 1982; Allison et al., 1987; Dubochet, 2007; Meryman, 2007).

Para evitar los problemas derivados de la CF, las muestras se pretrataron con agentes anticongelantes o crioprotectores que ya se usaban habitualmente para el almacenaje por congelación de suspensiones celulares, pequeños organismos, fragmentos de tejidos y embriones. De esta forma, previamente a la CF, las muestras biológicas se incubaban con agentes anticongelantes como

la sacarosa, el glicerol y el dimetil sulfóxido (DMSO), los cuales reducían la concentración de agua libre resultando en un efecto crioprotector para la muestra. Sin embargo, se observó que estos agentes crioprotectores también producían alteraciones en la estructura celular, como arrugas y respuestas específicas frente al estrés osmótico (Meryman, 2007), que eran ocasionadas por su efecto deshidratante. A pesar de tratarse de cambios celulares no letales y totalmente reversibles, la ultraestructura de estas muestras se presentaba muy alterada, llegándose a la conclusión de que la única forma de preservarla en unas condiciones cercanas al estado en que se encuentran vivas en la naturaleza sería congelando las muestras de manera que su agua intrínseca pasase directamente a un estado de hielo vítreo o amorfo (no cristalino) (Dubochet, 2007), lo que se conseguiría a tasas de congelación ultrarrápidas que evitasen la cristalización del agua, conduciendo al agua a un estado fluido muy viscoso, el hielo vítreo.

La continua búsqueda de la mejor preservación estructural celular ha llevado a la Microscopía Electrónica de Transmisión al desarrollo de toda una serie de técnicas que comprenden desde el método convencional, en el que es habitual el uso de fijadores químicos y resinas y la observación de las muestras a temperatura ambiente, hasta las técnicas puramente criogénicas, basadas en la fijación de las estructuras celulares por métodos físicos y la observación de las mismas en frío. De esta forma, se ha generado un amplio abanico de métodos en el que también se encuentran técnicas mixtas que combinan ambos procesos (Fig. 1).

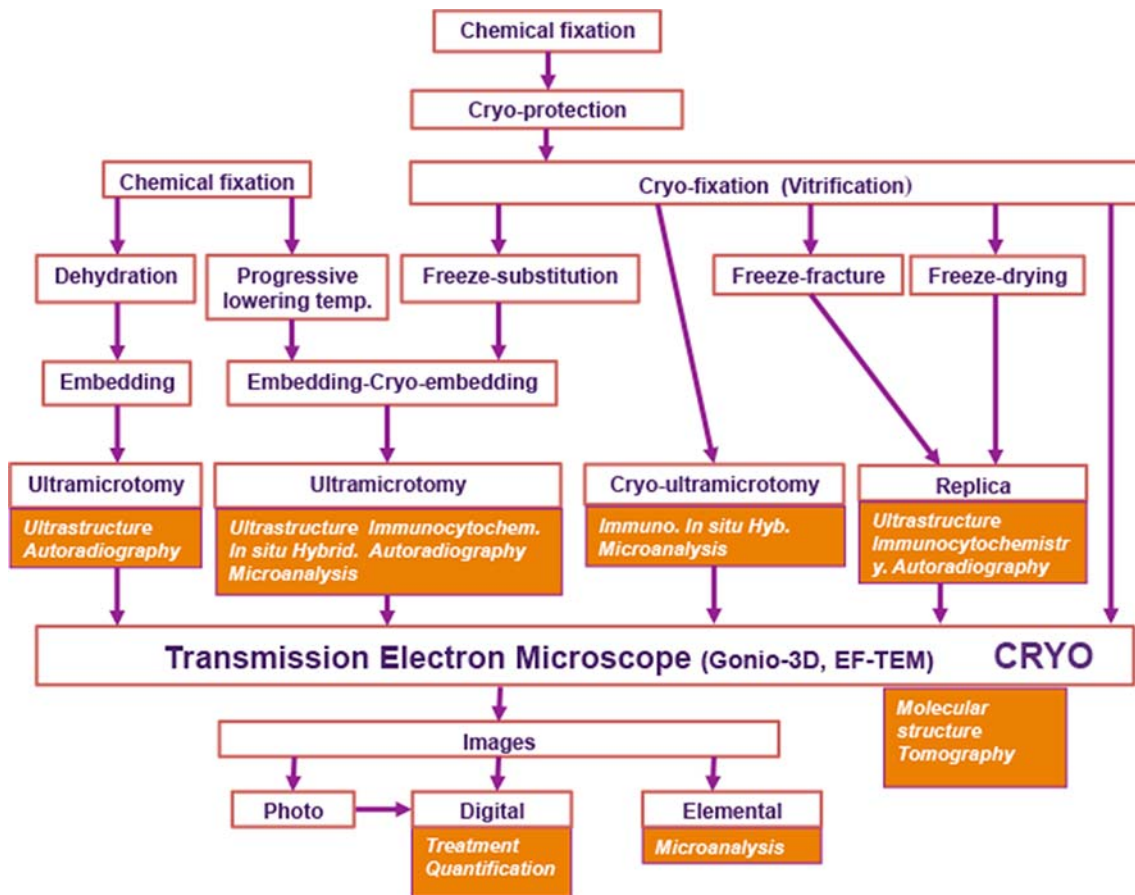


Figura 1. Esquema de las técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión y sus aplicaciones.

## 1.2. Crioinmovilización por “Plunge Freezing”

La CF por “Plunge Freezing” (PF) fue el primer método desarrollado y consiste en la inmersión de una muestra en un gas licuado. El método surgió en los años 70 y, a partir de ese momento, su eficacia se fue mejorando mediante un incremento de la velocidad del proceso que permitía las tasas de enfriamiento necesarias para la vitrificación del agua (Taylor and Glaeser, 1974; Chanzy et al., 1976; Taylor and Glaeser, 1976; Adrian et al., 1984). Actualmente, es una de las técnicas más usadas para el estudio de estructuras celulares, virus y pequeñas células como las bacterias. Los gases más utilizados son el etano y el propano, que se encuentran en fase gaseosa a temperatura ambiente y en fase líquida a bajas temperaturas. El propano es líquido entre  $-42$  y  $-188^{\circ}\text{C}$ , mientras que el etano lo es entre  $-88$  y  $-172^{\circ}\text{C}$ . Ambos se licúan mediante transferencia desde una bombona de gas a un contenedor enfriado con nitrógeno líquido ( $\text{LN}_2$ ) a  $-196^{\circ}\text{C}$ , convirtiéndose a estado líquido

inmediatamente al contactar con la baja temperatura. Además ambos gases presentan alta conductividad térmica, lo que permite una rápida transferencia del calor de la muestra al líquido, permitiendo una CF rápida de las muestras. Para optimizar el intercambio de temperatura requerido y facilitar la vitrificación de las muestras, éstas deben sumergirse a alta velocidad en el gas licuado, que permanece en LN<sub>2</sub> para asegurar su estado líquido y la temperatura más baja posible. Con este objetivo, se suele utilizar una aceleración tres veces mayor que la fuerza gravitacional. En su conjunto, estas condiciones permiten crioinmovilizar muestras a velocidades del orden de 10<sup>4</sup> °C por segundo.

Uno de los equipos para aplicar el método de PF es el Vitrobot<sup>TM</sup> (“Vitrification Robot”; FEI, Eindhoven, The Netherlands), que permite una CF semiautomática dirigida por ordenador de suspensiones finas de especímenes biológicos bajo temperatura y humedad controladas. Para ello, se deposita una gota de la suspensión sobre una rejilla hidrofílica y mediante rápido contacto con el papel de filtro (“blotting”), se extrae la mayor parte de líquido permaneciendo tan sólo una capa de unos 100 nm de grosor (aproximadamente 1:5000 del volumen de muestra aplicada). Esta fina capa de muestra que permanece sobre la rejilla es muy sensible al aumento de la temperatura y a la humedad ambiental, por lo que ambos factores deben controlarse para llevar a cabo una correcta CF evitando la evaporación de agua y concentración de soluto.

A pesar de los beneficios de la CF por PF en suspensiones o células crecidas en una rejilla, esta técnica no suele vitrificar correctamente muestras de tamaño grande (mayores de 500 nm). Esto es debido a que la baja conductividad térmica del agua provoca que las tasas de enfriamiento en la superficie de la muestra sean infinitamente superiores a las de la zona interior de la muestra, permitiendo la cristalización del agua en el interior y limitando la vitrificación a la zona superficial de la muestra (Galway et al., 1995; Studer et al., 1995; Shimoni and Müller, 1998; Nitta and Kaneko, 2004; Dubochet, 2007; Richter et al., 2007). Hay que tener presente que el contenido de agentes crioprotectores intrínseco de la muestra puede tener un papel importante en el proceso de vitrificación de muestras. De esta forma, si el contenido de agentes crioprotectores es elevado, se puede conseguir la vitrificación de muestras algo

más gruesas. Sin embargo, cuando el contenido de agentes crioprotectores es bajo, éste puede dificultar la vitrificación. Una vez la muestra es crioinmovilizada por PF, ésta se mantiene a una temperatura igual o inferior a  $-170^{\circ}\text{C}$  en todo momento, incluso durante su observación en el cryo-TEM. De este modo, se evita la exposición de la muestra a la temperatura de cristalización del hielo vítreo, que tiene lugar por encima de  $-138^{\circ}\text{C}$  (Dubochet and Lepault, 1984) y que afecta irreversiblemente la estructura celular. Por lo tanto, la técnica de PF únicamente aplica tratamientos puramente físicos a la muestra permitiendo su observación y estudio tridimensional (3D) en un estado muy parecido al que se encuentra en la naturaleza.

### **1.3. Crioinmovilización por “High-Pressure Freezing”**

Debido a las limitaciones de tamaño para crioinmovilizar muestras mediante el método de PF, surgió la necesidad de reducir la tasa de enfriamiento para conseguir una correcta vitrificación de muestras mayores, por lo que se desarrolló la técnica “High-Pressure Freezing” (HPF). Esta técnica consiste en aumentar la presión a entre 2000 y 2100 bares durante la congelación de la muestra (Riehle and Hoehli, 1973; Moor et al., 1980), de manera que la presión actúa evitando la expansión del agua que tiene lugar durante la cristalización. De este modo, se mantiene el hielo tan denso como el agua líquida, es decir, en forma de hielo amorfo o vítreo, lo que disminuye las tasas de nucleación y crecimiento de cristales de hielo. Esto permite la reducción de la tasa de enfriamiento necesaria para conseguir que el agua vitrifique (Studer et al., 2001; Vanhecke et al., 2008). Además, debido a que el agua presenta una conductividad térmica baja, la tasa de enfriamiento alcanzada es también la máxima tasa teórica posible en el interior de una muestra de unos  $200\ \mu\text{m}$  (Studer et al., 2008).

Actualmente, el equipo EMPACT (Leica Microsystems, Viena, Austria) es uno de los equipos que permiten la CF de muestras de hasta  $200\ \mu\text{m}$  por congelación con  $\text{LN}_2$  en condiciones de alta presión y está basado en el equipo de Riehle (Riehle and Hoehli, 1973). Una vez más, la presencia intrínseca de agentes crioprotectores en la muestra puede favorecer la vitrificación de

muestras algo mayores. La muestra se introduce en una cámara cerrada dentro del equipo que se presuriza entre 2000 y 2100 bares y, a continuación, sufre una bajada de temperatura desde fuera a  $-196^{\circ}\text{C}$  por doble chorro de  $\text{LN}_2$ , alcanzando una tasa de enfriamiento de 10000 a  $30000^{\circ}\text{C/s}$ . Los mecanismos de presión y temperatura del equipo funcionan independientemente y están sincronizados para actuar en 20 ms, con el objetivo de evitar la formación de cristales que podrían dañar las muestras. Las muestras biológicas deben ser introducidas en uno de los soportes especialmente diseñados justo antes de ser crioinmovilizadas en el equipo HPF. Además, para asegurar una conservación adecuada de la ultraestructura de la muestra tras la CF, el proceso de preparación de la muestra en su correspondiente soporte y su subsecuente enfriamiento debe hacerse lo más rápidamente posible.

Tras la CF por HPF, las muestras dirigidas a estudios estructurales y de reconstrucción 3D pueden seguir varias vías de preparación. Por un lado, éstas pueden ser sometidas a un proceso de criosustitución (FS), que se trata de una técnica híbrida que combina la preservación estructural de la CF con la inclusión en resina a temperatura ambiente (van Harreveld and Crowell, 1964; Schwarz and Humbel, 1989). Este método consiste en la sustitución del hielo presente en una muestra crioinmovilizada por un solvente orgánico a  $-90^{\circ}\text{C}$ . En este contexto de baja temperatura se evita la extracción de lípidos y proteínas, a diferencia de lo que ocurre en el proceso de deshidratación a temperatura ambiente que tiene lugar en el proceso convencional. Una vez toda el agua de la muestra ha sido sustituida por el solvente orgánico, la muestra experimenta una subida de la temperatura gradual y controlada hasta llegar a temperaturas entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y temperatura ambiente, dependiendo del proceso. La FS suele llevarse a cabo en presencia de fijadores químicos que penetran en la muestra lenta y simultáneamente al solvente, permitiendo que ambos se distribuyan uniformemente a través de la muestra antes de que tenga lugar la actividad “crosslinking” característica del proceso del calentamiento. Normalmente, se utilizan fijadores como el  $\text{OsO}_4$ , GA y el acetato de uranilo (UA) en el solvente orgánico (acetona o metanol) que efectúan la fijación química durante el proceso de calentamiento gradual al que se somete la muestra. Generalmente,



se cree que el  $\text{OsO}_4$  empieza a fijar a partir de  $-70^\circ\text{C}$ , que el UA lo hace a temperaturas incluso más bajas y que el GA empieza a fijar alrededor de  $-50^\circ\text{C}$  (White et al., 1976; Humbel et al., 1983; Humbel and Muller, 1985). Generalmente se cree que a  $-90^\circ\text{C}$  el “crosslinking” químico carece de importancia, aunque a medida que la temperatura aumenta progresivamente podría llegar un momento a partir del cual aumentase la frecuencia de este tipo de reacciones químicas. Sin embargo, a la práctica parece ser que a las temperaturas en que actúan los fijadores durante el proceso de calentamiento gradual, las moléculas proteicas y lipídicas no disponen de suficiente energía térmica para moverse, evitándose la aparición de distorsiones como las frecuentemente observadas tras el procesamiento a temperatura ambiente. Además, este entorno de baja temperatura evita que tengan lugar efectos osmóticos (Studer et al., 1992). Seguidamente a la FS, las muestras son infiltradas e incluidas en resina, polimerizadas y seccionadas para su posterior observación en el TEM a temperatura ambiente.

El otro posible camino que pueden seguir las muestras provenientes de HPF es la Criomicroscopía Electrónica de secciones vítreas (CEMOVIS) (Al-Amoudi et al., 2004). Se trata de un método aplicable tanto a células como a tejidos que permite la observación de la estructura en un estado cercano al natural *in situ* por Microscopía Electrónica de Transmisión. Para ello, la muestra crioinmovilizada por HPF es seguidamente cortada en condiciones criogénicas, normalmente  $-150^\circ\text{C}$ , en secciones ultrafinas, de aproximadamente 50 nm, que reciben el nombre de secciones vítreas (VIS). Tras ser seccionada, la muestra se transfiere y se observa en el cryo-TEM, también en condiciones de frío a una temperatura igual o inferior a  $-170^\circ\text{C}$ . Durante todos los pasos que siguen a la CF de la muestra, es importante que ésta se mantenga a temperaturas inferiores a  $-150^\circ\text{C}$  para evitar su exposición a la temperatura de cristalización del hielo vítreo, que ocurre cuando la temperatura aumenta por encima de  $-138^\circ\text{C}$  (Dubochet and Lepault, 1984). De esta manera, la técnica de CEMOVIS únicamente aplica tratamientos puramente físicos a la muestra evitando totalmente interacciones químicas, lo que permite la observación de muestras en un estado muy cercano al que se encuentran en la naturaleza.

### 1.4. Tomografía Electrónica

La Tomografía Electrónica (ET) consiste en la obtención de series de imágenes a partir de proyecciones de una misma muestra en diferentes orientaciones que, posteriormente, son procesadas obteniéndose un mapa 3D (Fig. 2).

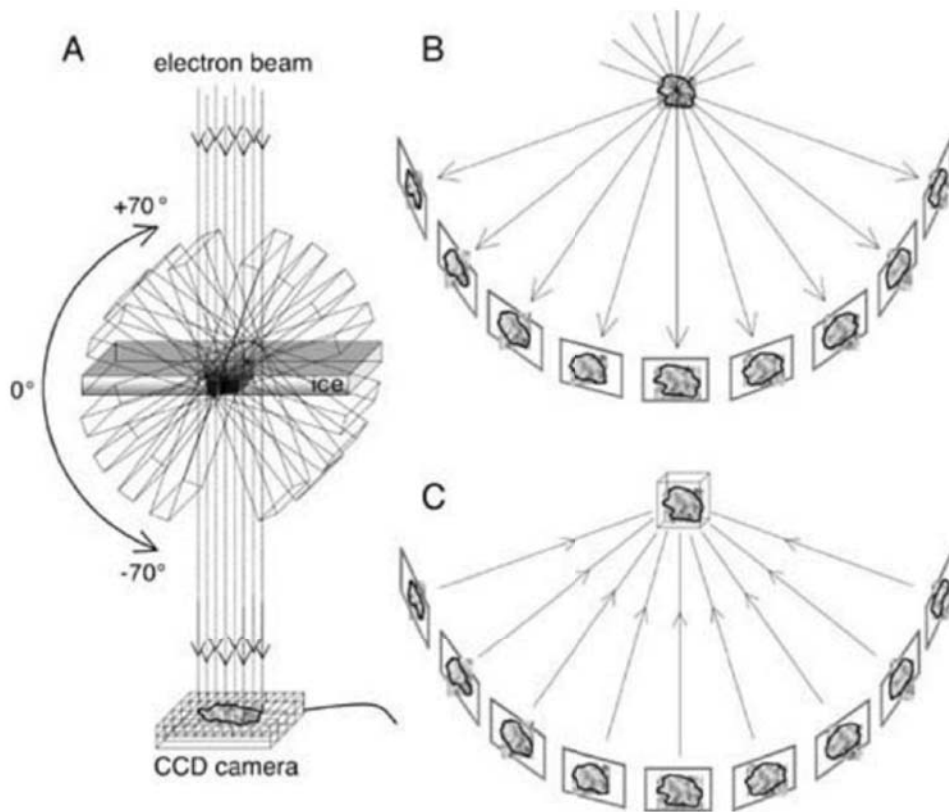


Figura 2. Principios de la ET. (A) La muestra se inclina sobre un eje a la vez que se van adquiriendo las proyecciones de la misma. (B) La serie de imágenes adquirida se ordenan en un cilindro central de la muestra. (C) La estructura 3D del objeto se obtiene por el método “weighted back projection” (WBP) o derivados. (Steven and Belnap, 2005).

Gracias a los avances en la preparación de muestras en un estado cercano al natural, y en la adquisición y procesamiento de imágenes, la ET permite la visualización 3D de la arquitectura de orgánulos, células y virus, así como de procesos dinámicos capturados en un momento concreto de la célula, alcanzando una resolución muy cercana al nivel molecular (Medalia et al., 2002; Grünewald et al., 2003; He et al., 2003; Beck et al., 2004; Kürner et al., 2005; Nicastro et al., 2006; Al-Amoudi et al., 2007; He et al., 2008; Liu et al., 2008). Las técnicas tradicionales de alta resolución estructural necesitan miles

de millones de copias idénticas del mismo objeto aisladas, de manera que los objetos pueden sufrir cambios conformacionales tras su aislamiento, además de que se pierde completamente la información espacio-temporal en el contexto celular. Por otro lado, la Microscopía Óptica únicamente es capaz de visualizar proteínas que han sido marcadas fluorescentemente, permaneciendo invisibles el resto de estructuras, de manera que si los niveles de proteína son muy bajos o muy altos, el seguimiento individual de las mismas puede ser imposible. La ET proporciona información cubriendo el abismo de resolución que se encuentra entre las técnicas de adquisición de imágenes de baja resolución (Microscopía Óptica, Tomografía Médica Monitorizada, Tomografía de Rayos X) y las técnicas estructurales de alta resolución (Cristalografía de Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear, Cristalografía Electrónica, “Single Particle”) (He and Fernández, 2010) (Fig. 3).

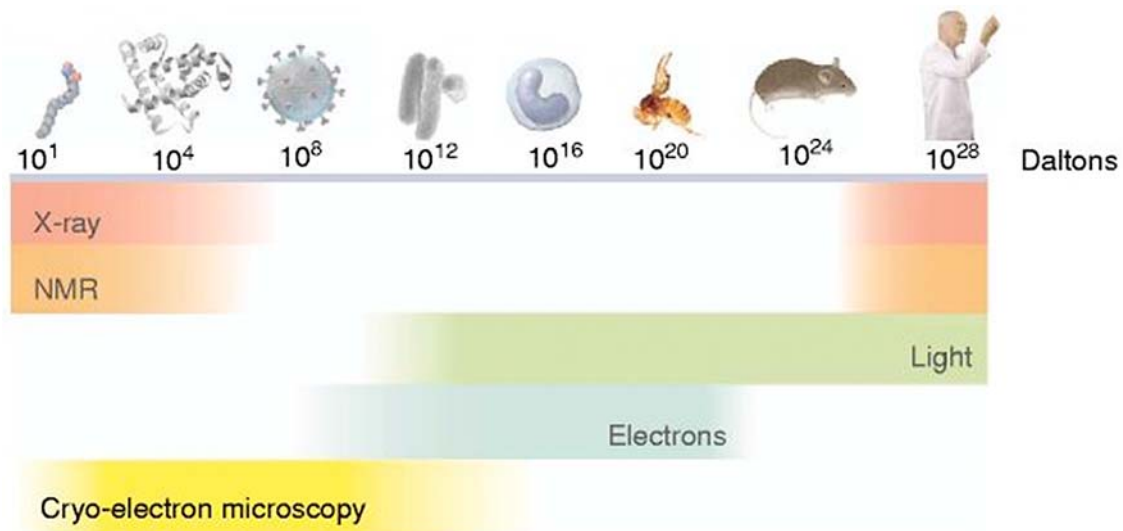


Figura 3. Rango de las técnicas de imagen utilizadas. En un extremo del espectro se encuentran pequeñas entidades biológicas como lípidos, proteínas y virus. En el otro extremo, organismos enteros como los seres humanos. Los tamaños de todos los objetos mostrados se expresan en unidades Dalton. (Subramaniam, 2005).

Además de aportar información intermedia entre ambos tipos de técnicas de adquisición de imágenes, la ET presenta el valor añadido de que los objetos a estudiar se encuentran en un contexto celular muy parecido al que se encontrarían en la naturaleza. De esta manera, la ET proporciona una resolución cercana al nivel molecular (aproximadamente 2 nm), permitiendo el estudio 3D de la organización estructural de componentes a un detalle

suficiente para la identificación de complejos macromoleculares, el análisis de su distribución espacial y sus interacciones en el contexto celular cercano al que se encontraría en la naturaleza (Nickell et al., 2006; Brandt et al., 2009).

La estrategia más sencilla para llevar a cabo ET, es grabar una serie de imágenes de una misma estructura o célula haciéndola rotar sobre un eje a diferentes ángulos y a pequeños incrementos (Fig. 2A y 2B). Debido a las restricciones físicas del instrumento, el rango de ángulos suele estar limitado a  $\pm 70^\circ$ , aunque otros factores como el grosor de la muestra pueden obligar a reducir este rango a  $\pm 60^\circ$  (Lucić et al., 2005; Lengyel et al., 2008). La serie de imágenes adquirida siguiendo este método se denomina serie de eje simple (“single-axis tilt series”). También es posible mejorar la cobertura de ángulos y, por lo tanto, la resolución final mediante la adquisición de otra serie rotando la muestra  $90^\circ$ . De esta forma, se obtienen dos series de la misma estructura en dos ejes orientados perpendicularmente entre sí, lo que se conoce como ET de doble eje (“dual-axis electron tomography”) (Mastronarde, 1997) (Fig. 4 y 5).

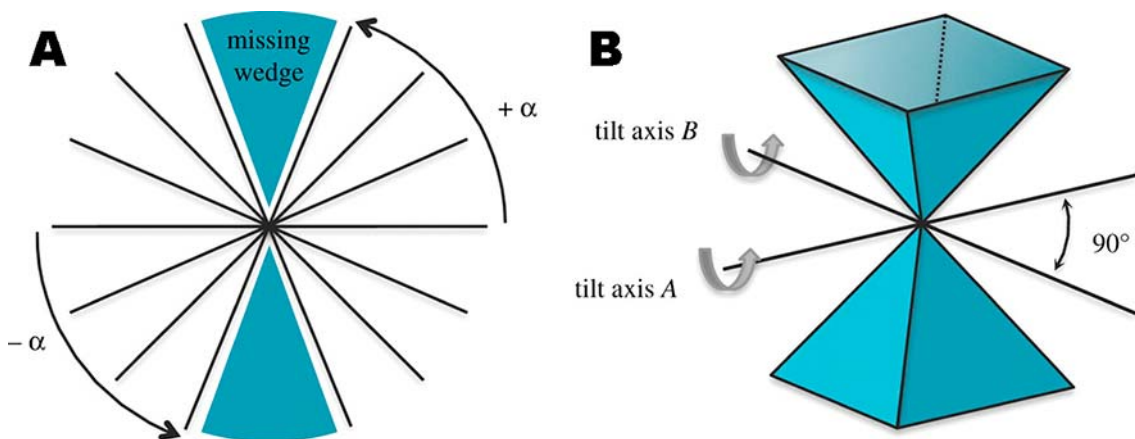


Figura 4. Esquema de la pérdida de información durante la adquisición de series de imágenes por ET. (A) Representación del “missing wedge”. (B) Representación de la “missing pyramid”. (Grandfield et al., 2012).

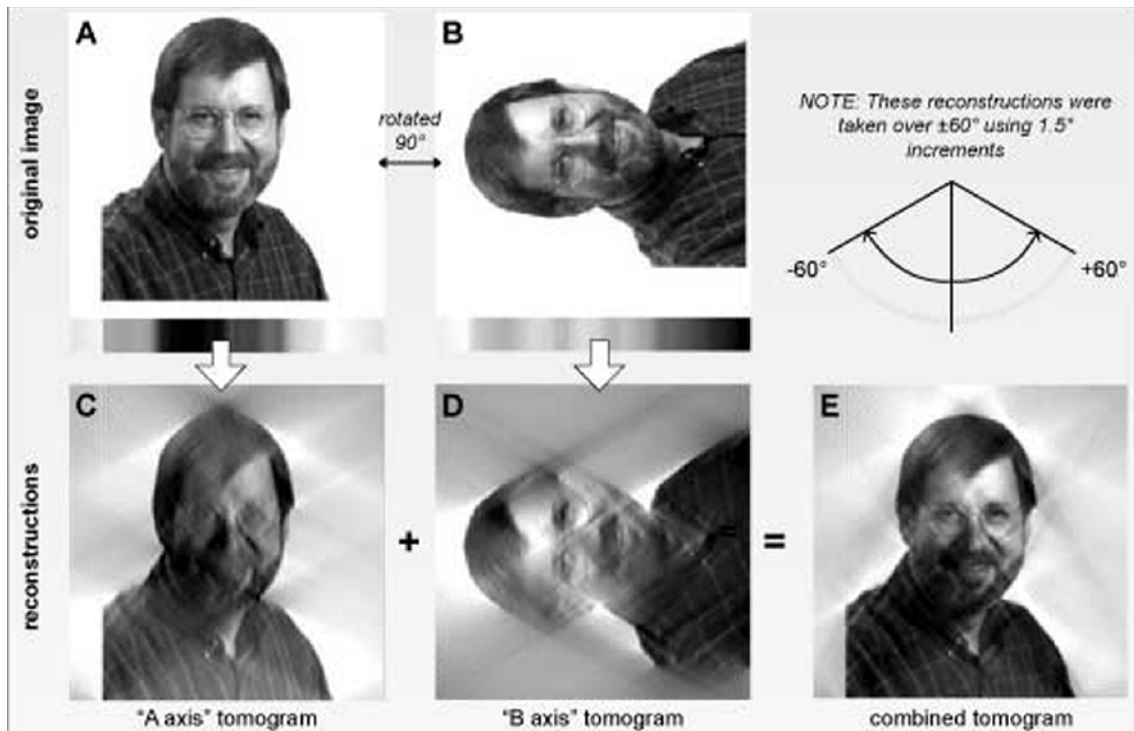


Figura 5. Ilustración de la ET a doble eje. (A) Objeto original en el primer eje ("A axis"). (B) Objeto original rotado 90°, a partir del que se adquirirá la segunda serie de imágenes ("B axis"). (C) Reconstrucción obtenida del primer eje. (D) Reconstrucción obtenida del segundo eje. (E) Tomograma a doble eje resultado de la combinación de los tomogramas (C) y (D) ([http://www.andrewnoske.com/student/uq\\_phdthesis.php](http://www.andrewnoske.com/student/uq_phdthesis.php)).

El desarrollo de la adquisición automática de imágenes en el TEM ha sido crucial para la obtención de imágenes de muestras biológicas sensibles a la dosis electrónica (Dierksen et al., 1992; Dierksen et al., 1993). Aún así, las proyecciones de la serie nunca quedan perfectamente alineadas debido a las imperfecciones mecánicas del equipo y del sistema de lentes electrónico, de manera que, posteriormente, es necesario ajustar el alineamiento. Para facilitar el proceso de alineamiento de las imágenes de una serie adquirida es necesario añadir partículas de oro coloidal a la muestra durante el proceso de preparación previo a la adquisición de imágenes, que se utilizarán como "fiducial markers" entre imágenes sucesivas. Una vez obtenida la serie de imágenes, inicialmente se realiza un alineamiento grueso mediante una aproximación matemática, la correlación cruzada ("cross-correlation"). Posteriormente, las coordenadas de los "fiducials" se marcan de forma manual o semiautomática a través de la serie de imágenes para perfeccionar el alineamiento. Basándose en las coordenadas marcadas, se lleva a cabo un alineamiento más fino, minimizando el error en función de los desplazamientos

y de las rotaciones, entre otros parámetros (Frank, 2006). Posteriormente, se utilizan los principios matemáticos del Teorema de la Sección Central, que establece que una serie de proyecciones del espacio real corresponde a una serie de secciones centrales en el espacio Fourier. De manera que, una transformación inversa de Fourier de las imágenes alineadas da lugar a una reconstrucción 3D de la muestra (Fig. 2C). El método estándar para las reconstrucciones tomográficas es la “weighted back-projection” (WBP), que es equivalente a la aproximación de Fourier, pero trabajando en el espacio real (Frank, 2006). Existen otros algoritmos que llevan a cabo reconstrucciones iterativas como la “simultaneous iterative reconstruction technique” (SIRT). SIRT trata de minimizar las diferencias entre las series de imágenes adquiridas y reproyecciones de la imagen 3D obtenida ayudando a mejorar la calidad de los tomogramas (Gilbert, 1972). En cualquier caso, el rango de inclinación limitado en ET, resulta en una región sin información en el espacio de Fourier conocida como “missing wedge” o “missing pyramid”, según si la adquisición de imágenes ha sido a eje simple o a doble eje, respectivamente (Fig. 4). La pérdida de información es significativamente reducida cuando se lleva a cabo ET de doble eje, de manera que mientras que en un tomograma reconstruido a partir de una sola serie de imágenes de  $\pm 70^\circ$  la pérdida de información es del 22%, cuando se realiza ET a doble eje con el mismo rango de inclinación, ésta se reduce al 7% (He and Fernández, 2010) (Fig. 5). El resultado es una reconstrucción de resolución anisotrópica, es decir, en la que la resolución varía según la dirección en la que se examina el tomograma. Este hecho provoca artefactos como emborronamiento de rasgos espaciales en la dirección del haz que provoca que algunas estructuras aparezcan elongadas en esa dirección, mientras que otras no quedan completamente resueltas. Otro aspecto a tener en cuenta para mejorar la resolución de la reconstrucción es el ángulo de intervalo entre sucesivas imágenes, de manera que, a mayor número de proyecciones adquiridas de la muestra, mejor es la resolución obtenida (Fig. 6).

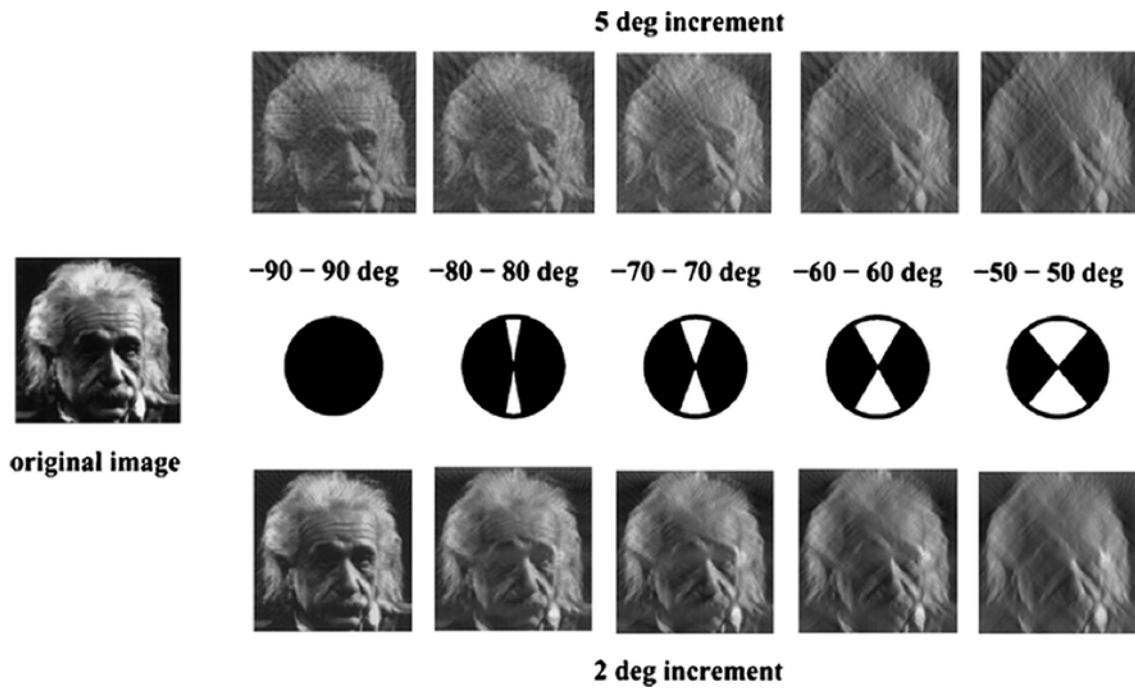


Figura 6. Ilustración de la ET a eje simple. Se aprecia ganancia de la resolución en las reconstrucciones a partir de series de imágenes con mayor cobertura de ángulos (de -90 a 90°) y con menor incremento angular (2°). (Nudelman et al., 2010).

Como se ha visto anteriormente, las técnicas de enfriamiento rápido, como PF y HPF, permiten capturar momentos celulares por inmovilización física de las moléculas existentes en las células vivas en términos de milisegundos, evitando la formación de cristales. Esto permite la preparación de muestras biológicas de alta calidad llegando a alcanzar la máxima resolución posible a la hora de hacer ET. Una vez la muestra se ha criofijado, existen diferentes vías de preparación para llevar a cabo experimentos de tomografía electrónica (Fig. 7).

La ET a temperatura ambiente (RT-ET) se lleva a cabo en secciones de entre 30 y 500 nm de muestra deshidratada e incluida en resina que posteriormente se han contrastado con sales de metales pesados. Esta técnica permite alcanzar una resolución máxima de 5 nm y su utilización está muy extendida, gracias a que la preparación de las muestras es bastante reproducible y a que el proceso de adquisición de imágenes de una muestra a diferentes ángulos en condiciones de temperatura ambiente es más sencillo que en condiciones criogénicas. Esto se debe a que se trata de muestras a las que, por un lado, se les han añadido sales de metales pesados que aumentan el contraste

facilitando la observación y la búsqueda de estructuras de interés en el TEM, y que, por otro lado, al estar fijadas e incluidas en resina, son más resistentes a la acción de los electrones, por lo que no necesitan ser observadas en condiciones de baja dosis electrónica. De hecho, frecuentemente necesitan ser estabilizadas por exposición a dosis electrónica previa a la adquisición de series (aproximadamente  $10^4$  electrones/nm<sup>2</sup>) (He and Fernández, 2010). Se debe tener en cuenta que, aunque esta técnica puede proporcionar una ultraestructura relativamente bien conservada, el hecho de que se utilicen aditivos químicos en la criosustitución cuestiona si la preservación ultraestructural alcanza el nivel molecular. Además, la gran mayoría de procesos de FS suelen incubar la muestra en un solvente orgánico justo antes de la inclusión en resina a temperatura ambiente, factor que también podría alterar la ultraestructura (Paul and Beveridge, 1992; Paul and Beveridge, 1994). Estos motivos hacen dudar de si la estructura celular conseguida se encuentra realmente muy cercana al estado natural. La máxima aproximación teórica de la FS a la estructura nativa de las muestras sucede cuando la muestra se mantiene a temperaturas bajo cero también durante la infiltración y la polimerización, que es lo que sucede cuando se utilizan resinas acrílicas (Roth et al., 1981; Carlemalm et al., 1985; Schwarz and Humbel, 1989). Sin embargo, incluso bajo estas condiciones es difícil predecir el efecto de la resina polimerizada a nivel molecular. Además, sea cuál sea la resina utilizada, siempre es visible cierta contracción de la muestra (Bleck et al., 2010).

La Criotomografía Electrónica (CET) de muestras preparadas por PF es muy efectiva para muestras pequeñas como virus, bacterias, regiones finas de células, proteínas y orgánulos aislados (Koning and Koster, 2009). La gran ventaja de esta técnica es que ofrece la posibilidad de realizar experimentos de ET de muestras en unas condiciones muy cercanas al estado natural de forma rápida sin la adición de artefactos por acción mecánica. Sin embargo, cuando se trata de muestras mayores de 500 nm se debe recurrir a la técnica HPF e, independientemente del proceso que siga, la muestra deberá ser seccionada para visualizarse en el TEM. Es importante tener en cuenta los fenómenos de “inelastic scattering” y “multiple scattering”, que tienen lugar cuando los electrones se desvían de su trayectoria original al atravesar un objeto sólido,



implicando la pérdida de energía en forma de vibraciones y produciendo una degradación acusada de la calidad de imagen (Grimm et al., 1998). Estos fenómenos empiezan a aparecer en el TEM cuando la muestra presenta un grosor mayor de 200 nm, si ésta se observa a 120kV, o un grosor superior a 350 nm, si la observación ocurre a 300kV.

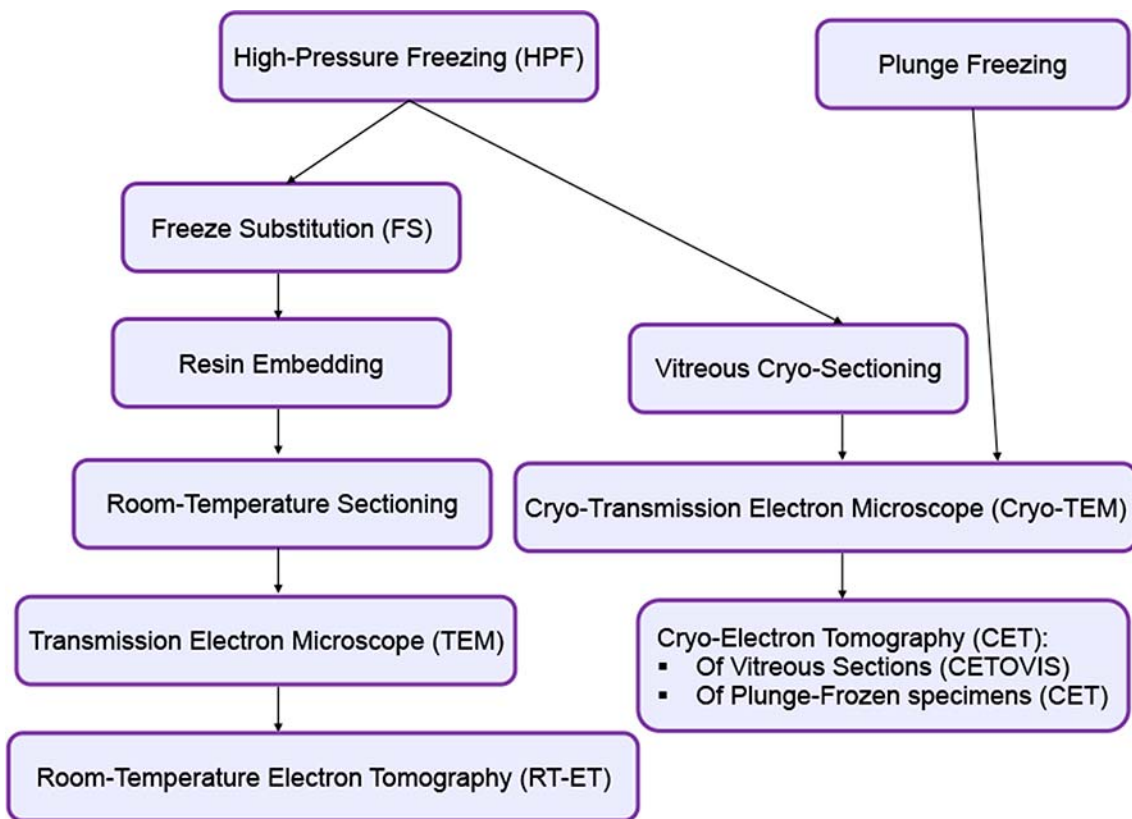


Fig. 7. Esquema de las posibles vías para realizar ET.

En los casos en se pretende estudiar las muestras en un estado hidratado, pero éstas superan el grosor recomendado para realizar CET de células intactas, se debe proceder a seccionar las muestras. De esta forma, para estudiar la gran mayoría de células eucariotas y muchas bacterias y arqueas en un estado muy cercano al natural, las muestras crioinmovilizadas por HPF se deben seccionar directamente en condiciones de frío. La CET de VIS (CETOVIS) es técnicamente más complicada debido a la dificultad práctica de obtener secciones de alta calidad de forma rutinaria. La mayoría de las VIS presentan evidentes artefactos debidos a la acción mecánica del corte: marcas de la cuchilla, compresión, grietas o “crevasses” y “chatter” (Fig. 8) (Chang et al., 1983; McDowall et al., 1983; Al-Amoudi et al., 2005; Al-Amoudi et al., 2007).

A pesar de que los mencionados artefactos no son exclusivos de las VIS, es en esta técnica en la que se manifiestan de forma más acusada, haciendo que el rendimiento de obtención de buenas secciones sea bajo. La compresión provoca que las secciones sean más cortas a lo largo de la dirección de corte, normalmente un 30-45% más cortas (Al-Amoudi et al., 2003). Esta reducción del largo de la sección se compensa, a su vez, por un aumento en el grosor de la misma, permaneciendo el ancho de la sección invariable. Las “crevasses” son una red de fracturas que penetra en la sección desde la cara superficial del corte (Dubochet and McDowell, 1984). Éstas se pueden reducir notablemente disminuyendo el grosor de las criosecciones a 20 nm (Zhang et al., 2004) a expensas de la reducción de volumen celular para cada tomograma. El “chatter” es una variación periódica del grosor de la sección a lo largo de la dirección de corte, muy presente también en las secciones de resina. Aunque los mencionados artefactos afectan la calidad de la imagen, afortunadamente, la mayoría de ellos no suelen presentar problemas para una interpretación precisa de la muestra (Al-Amoudi et al., 2005).

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado tecnologías que podrían mejorar la técnica de CETOVIS en el futuro. Entre ellas se encuentran los micromanipuladores (Ladinsky et al., 2006; Studer et al., 2014), la carga electrostática para adherir las secciones a la rejilla (Pierson et al., 2010) y la solubilización de “quantum dots” o oro coloidal en solventes orgánicos criogénicos para su deposición en criosecciones (Masich et al., 2006; Gruska et al., 2008). También se está desarrollando el método “Cryo-Focused-Ion Beam scanning electron microscope” (Cryo-FIB-SEM) como una forma de producir criosecciones disminuyendo significativamente los artefactos mecánicos (Marko et al., 2007; Hayles et al., 2010; Rigort et al., 2010). De este modo, un haz de iones, generalmente de Galio, se usa para hacer más fino un pellet de células preparadas por HPF. Aunque no aparecen los típicos artefactos del corte mecánico de las VIS, también existen algunos artefactos superficiales. Otra limitación actual es que únicamente se puede obtener una sección por experimento con este método, impidiendo la obtención de secciones seriadas.

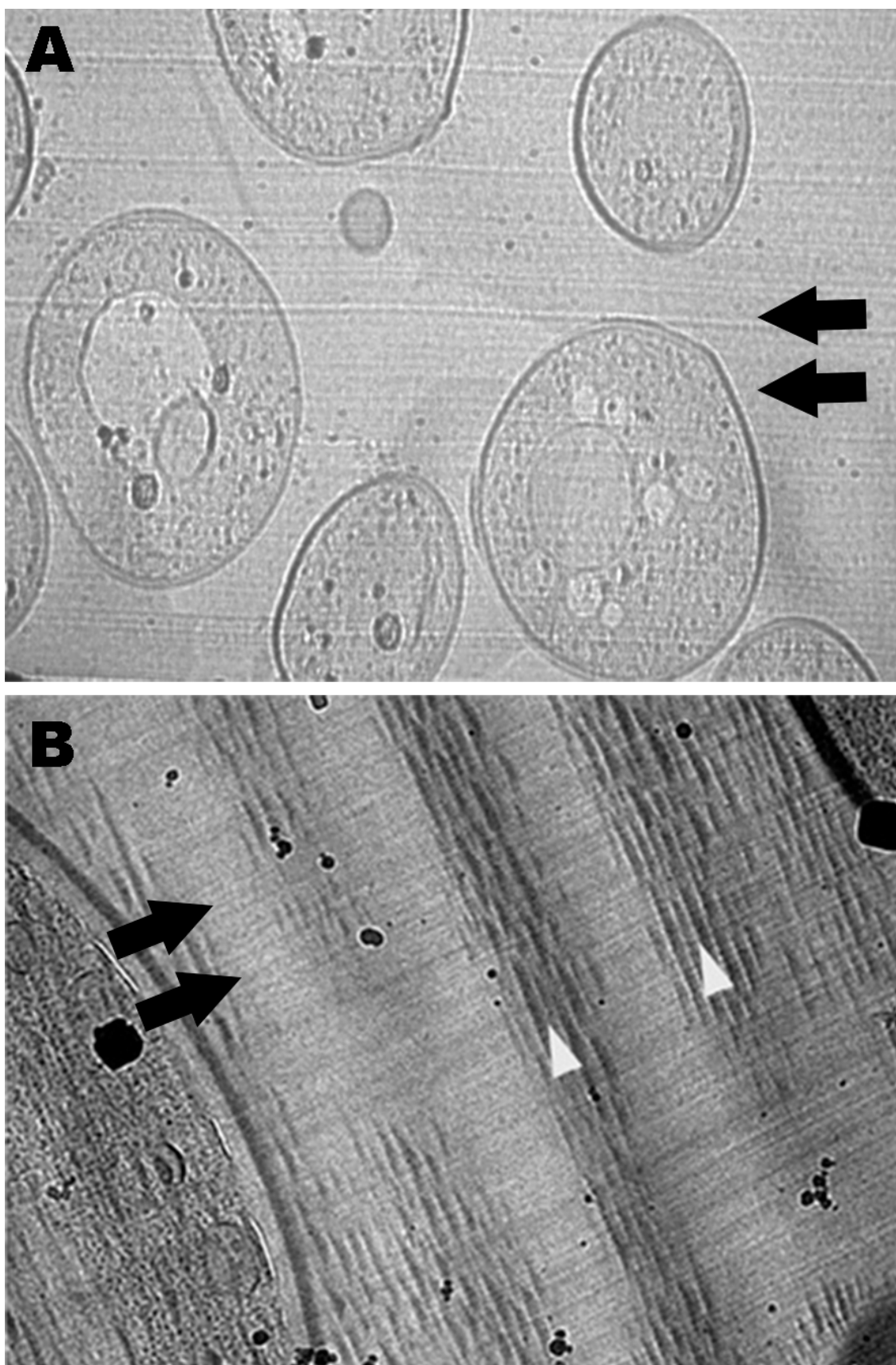


Fig. 8. Artefactos observados por CEMOVIS. (A-B) VIS de levaduras. Las flechas indican la dirección de corte. (A) En la misma dirección del corte se observan líneas correspondientes a las marcas de la cuchilla. Las células muestran compresión en la

misma dirección. (B) Se observa el patrón de bandas característico de “chatter” perpendicularmente a la dirección del corte. Las bandas más oscuras del patrón (cabeza de flecha blanca) presentan “crevasses”. (adaptado de Al-Amoudi et al., 2005).

Las muestras dirigidas a CET deben cargarse en el “cryo-holder” que mantiene la temperatura por debajo de  $-165^{\circ}\text{C}$  para asegurar el estado vítreo también durante la adquisición de imágenes en el cryo-TEM. Para alcanzar una resolución entre 2 y 4 nm las muestras nunca deben superar un grosor de 300 nm y la dosis electrónica se debe ajustar a un valor entre 2500-6000 electrones/nm<sup>2</sup> para adquirir entre 100-300 proyecciones, lo que asegura los 5 electrones/píxel en cada proyección que permiten el ratio señal/ruido por encima del límite detectable por la cámara “charge-coupled device” (CCD). Por otro lado, el grosor de la muestra que atraviesa el haz de electrones a altos ángulos de inclinación se llega a doblar e incluso triplicar, teniendo lugar fenómenos de “multiple scattering” e “inelastic scattering” que degradan la calidad de la imagen. Otro aspecto a tener en cuenta es que el contraste de imagen de muestras biológicas es muy bajo de manera es necesario observar las muestras con un desenfoque de entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  que permite aumentar el contraste de imagen, aunque a expensas de la pérdida de resolución (He and Fernández, 2010).

Una ventaja importante de las muestras crioinmovilizadas observadas en condiciones criogénicas es que el estado del hielo se puede determinar por difracción electrónica (Dubochet et al., 1986; Dubochet et al., 1988). De este modo, se puede distinguir si la muestra se encuentra en condiciones óptimas para hacer un análisis de la estructura cercana a su estado natural. Si la muestra se ha crioinmovilizado correctamente y no ha superado en ningún momento la temperatura de cristalización, se observará hielo vítreo. Si, por el contrario, la CF no ha conseguido vitrificar la muestra o se ha superado la temperatura de cristalización tras la vitrificación, se hará evidente la presencia de hielo cristalino. El hielo cristalino presenta dos formas diferentes: hielo hexagonal, que tiene lugar cuando la CF no ha conseguido vitrificar la muestra, o cúbico, que es el resultado de una subida de la temperatura por encima de la temperatura de cristalización tras la CF de la muestra.

Teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones de cada uno de los métodos de preparación, si se pretende obtener la máxima resolución por ET se debe recurrir a la CET, es decir, la ET llevada a cabo en condiciones criogénicas. A pesar de ello, se debe tener presente que la preservación cercana a la resolución atómica alcanzada por las muestras crioinmovilizadas, a la práctica está restringida al rango de 2 a 6 nm debido a las limitaciones de la dosis electrónica utilizada para no dañar las muestras no contrastadas y al bajo contraste que presentan las muestras (He and Fernández, 2010).

Las reconstrucciones 3D o tomogramas obtenidos a partir de las series de imágenes adquiridas en el TEM proporcionan una gran cantidad de información que debe ser correctamente interpretada. Para ello hay que tener en cuenta las dificultades inherentes a la técnica: los artefactos causados por el “missing wedge”, el bajo ratio de señal/ruido y la complejidad biológica. Por un lado, es necesario tratar el elevado nivel de ruido presente en los tomogramas reconstruidos y que dificultan su visualización y análisis. Dentro de las técnicas de filtrado se encuentran las técnicas de filtrado lineal estándar y las técnicas no lineales. Las técnicas de filtrado lineal estándar se basan en medias locales y ayudan a reducir el ruido a presente a la vez que afectan los rasgos estructurales. Por otro lado, las técnicas de filtrado no lineales son más sofisticadas ya que permiten el filtrado del ruido preservando las estructuras de interés. El algoritmo más utilizado entre las técnicas de filtrado no lineal es la “anisotropic nonlinear diffusion” (AND), que preserva y ensalza estructuras de interés a la vez que elimina el ruido (Frangakis and Hegerl, 2001; Fernández and Li, 2003).

Otro proceso útil que ayuda a la interpretación del tomograma obtenido es la segmentación, que consiste en descomponer el tomograma en múltiples segmentos con el objetivo de extraer, aislar e identificar estructuras de interés y de separarlas del fondo (Vanhecke et al., 2011). Se trata de un proceso que frecuentemente se lleva a cabo de forma manual mediante la detección visual de rasgos estructurales y el trazado manual de los contornos en secciones sucesivas en el tomograma (He et al., 2008).

La ET ofrece muchas ventajas frente a otras técnicas de adquisición de imágenes para estudiar estructuras flexibles y únicas y las distribuciones espacio-temporales de moléculas en células o tejidos en su estado natural. Dado su potencial para revelar la ultraestructura de células y objetos biológicos en 3D y a una resolución macromolecular, es muy probable que la ET tenga un gran impacto en el futuro de la Microbiología y de la Biología Celular (Gan and Jensen, 2012). Además, combinada con herramientas genéticas y moleculares puede utilizarse para resolver gran variedad de preguntas biológicas. Actualmente, la aplicación de la ET está limitada principalmente por las técnicas de preparación y la sensibilidad a la dosis electrónica de las muestras biológicas. Por otro lado, la interpretación directa de estructuras en tomogramas ruidosos reconstruidos a partir de imágenes captadas en condiciones de “low-dose” se encuentra muy limitada, permitiendo sólo la identificación de estructuras tipo membrana, citoesqueleto, complejos moleculares y virus (He and Fernández, 2010). Sin embargo, cabe mencionar que la ET es una técnica todavía muy joven, de manera que todavía existen muchas oportunidades para mejorarla. Un aspecto a mejorar de las imágenes obtenidas por cryo-TEM es el bajo contraste debido a la forma sinusoidal de la función de transferencia de contraste (CTF), empezando con transferencia de contraste cero en la frecuencia espacial cero. La baja resolución debida a la CTF se puede aumentar sustancialmente usando una placa de fase (“phase plate”) (Nagayama and Danev, 2009; Marko et al., 2011; Fukuda and Nagayama, 2012; Dai et al., 2014). Además, unida a la aplicación de un corrector de la aberración esférica aún se pueden mejorar significativamente los resultados (Danev et al., 2009). Por otro lado, los actuales detectores de las cámaras CCD producen un elevado ruido derivado del proceso de conversión electrón-fotón. Por este motivo, se han desarrollado los detectores directos de electrones (DDD), es decir, instrumentos semiconductores que generan señal a partir del impacto de los electrones de alta energía por sí mismos, lo que permite trabajar con tamaños de píxel muy pequeños y a tasas de adquisición de imágenes más rápidas (Milazzo et al., 2005; Deptuch et al., 2007; Jin et al., 2008; McMullan et al., 2009; Milazzo et al., 2010; Milazzo et al., 2011; Bammes et al., 2012; Ramachandra et al., 2014). Este tipo de cámaras proporcionan un

contraste de alta resolución que lleva a la reconstrucción al límite de la resolución del TEM (Chang et al., 2012).

Por otro lado, el análisis de tomogramas es otro paso que consume gran parte del tiempo del proceso. Por este motivo, existe un interés en el desarrollo de métodos potentes y automatizados que permitan calcular, refinar, eliminar el ruido, segmentar y buscar estructuras de interés en los tomogramas. Además, también existe un interés en el desarrollo de etiquetas o “tags” que permiten la identificación de estructuras en tomogramas (Gaietta et al., 2002; Mercogliano and DeRosier, 2007; Diestra et al., 2009; Wang et al., 2011). Otro método para identificar objetos de interés en tomogramas es la Microscopía Correlativa, que combina la Microscopía de Fluorescencia y la Microscopía Electrónica (Plitzko et al., 2009; Briegel et al., 2010). Mediante esta técnica, por un lado, las proteínas de interés se fusionan con fluoróforos y se localizan por Microscopía de Fluorescencia y, por otro lado, la misma muestra se analiza por ET. La imagen final corresponde a la superposición de las imágenes obtenidas por ambas técnicas. Esta técnica funciona mejor a temperatura ambiente ya que permite el uso de lentes de inmersión en aceite con elevada apertura numérica, aunque el movimiento dificulta la correlación de estructuras subcelulares limitando su aplicación a estructuras estáticas (Schlimpert et al., 2012; Patla et al., 2010). Las células también se pueden crioinmovilizar previamente a la adquisición de imágenes por Microscopía de Fluorescencia, aunque se limita la resolución de la fluorescencia debido al uso de objetivos de larga distancia. Recientemente, se han descrito una serie de técnicas de Microscopía de Superresolución que han mejorado significativamente la resolución de la fluorescencia permitiendo la localización de moléculas individuales. Entre ellas, se encuentra “stochastic optical reconstruction microscopy” (STORM) (Rust et al., 2006), “photoactivated localization microscopy” (PALM) (Betzig et al., 2006) y PALM fluorescencia (Hess et al., 2006). Estas técnicas se han empezado a utilizar en combinación con la CET, permitiendo la localización de objetos dinámicos en el contexto celular (Chang et al., 2014).

A pesar de que el objetivo inicial de la ET es generar una imagen 3D de un objeto individual, cuando existen múltiples copias de una estructura particular

en una célula o en un grupo de células se puede obtener información adicional mediante la técnica “subtomogram averaging” (Al-Amoudi et al., 2011; Saibil et al., 2012; Daum et al., 2013; Zanetti et al., 2013). Esta técnica se basa en la clasificación y la media de diferentes partículas de una estructura idéntica en un tomograma. Los avances en la instrumentación, los experimentos y en el esquema de reconstrucción han mejorado los métodos de corrección de la CTF, mejoras en la estimación del defoco y mejoras en el alineamiento de las serie de imágenes y de los subtomogramas, consiguiendo refinar la reconstrucción obtenida por el tomograma llegando a alcanzar resoluciones (sub-)nanométricas. (Voortman et al., 2014).

## **2. Estructura de Procariotas**

### **2.1. El citoplasma bacteriano**

Durante muchos años, el concepto del citoplasma bacteriano era el de un compartimento homogéneo que contenía macromoléculas, enzimas y pocas estructuras de interés en comparación con las células eucariotas. De esta forma, se pensaba que las estructuras interesantes de los procariotas se encontraban en el exterior de la célula, protegiendo un interior sencillo. Este pensamiento estuvo extendido incluso después de la aparición del TEM, ya que al observar la mayoría de organismos procariotas por esta técnica, únicamente se observaban áreas irregulares con apariencia fibrosa correspondientes al nucleoide bacteriano y una gran cantidad de pequeños gránulos distribuidos por el resto de citoplasma que correspondían a los ribosomas. Ocasionalmente, y sólo en algunas bacterias y en determinadas condiciones de crecimiento, podían observarse distintos tipos de inclusiones intracitoplásmicas, denominadas cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión corresponden a acúmulos de materia orgánica o inorgánica que pueden ocupar, en algunos casos, una parte importante del



citoplasma y pueden ser visualizados con el TEM e incluso algunos de ellos con el microscopio óptico. Normalmente, estos cuerpos de inclusión permiten almacenar materiales de reserva de algún tipo. Los gránulos de almacenamiento orgánicos engloban los gránulos de poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos (PHA) y los gránulos de glucógeno. Los gránulos de PHA son un tipo de cuerpo de inclusión muy frecuente en los procariotas que se utiliza como reserva de carbono y de energía. De esta forma, los PHAs son sintetizados cuando existe un exceso de carbono, y se utilizan como esqueletos de carbono para la biosíntesis o para generar ATP cuando las condiciones lo requieren. Dentro de los gránulos de PHA, los gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) son el tipo de cuerpo de inclusión más común. Los monómeros de PHB unidos por enlaces ésteres forman largos polímeros de PHB de longitud variable, los cuales se agregan en forma de gránulos (Jendrossek, 2009). El PHB puede formar varios cuerpos dentro del citoplasma y al observarse en el TEM se visualizan como bolas redondeadas poco densas a los electrones con tamaños entre 0,2 y 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 9).

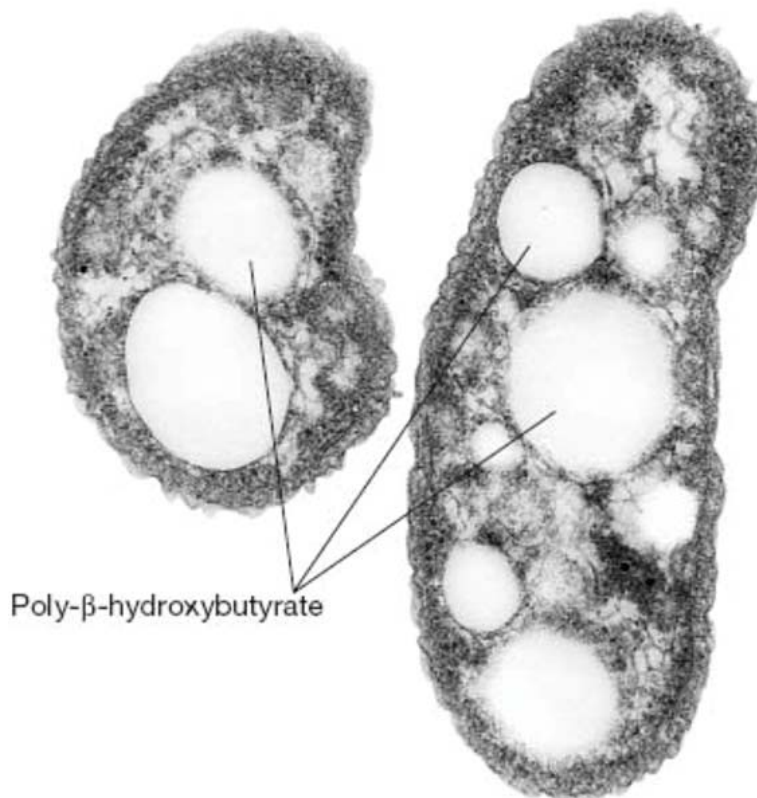


Figura 9. Gránulos de PHB en *Rhodovibrio sodomensis*. (Madigan et al., 2006).

Los gránulos de glucógeno son el otro tipo de cuerpo de inclusión orgánico y también sirven como almacén de carbono y energía. De este modo, la glucosa es almacenada formando glucógeno cuando existe un exceso de carbono en el ambiente y se consumen cuando éste se hace limitante (Shively et al., 1988). Los gránulos de glucógeno son mas pequeños, entre 20 y 100 nm, y se reparten de un modo bastante uniforme por el citoplasma. Normalmente, una determinada especie bacteriana sólo contiene uno de los dos tipos de polímero, aunque alguna bacteria fotosintética, puede contener simultáneamente PHB y glucógeno. Muchas bacterias también pueden almacenar pequeñas gotas lipídicas como reserva energética que se visualizan asimismo como bolas poco densas a los electrones.

Un tipo especial de cuerpos de inclusión orgánicos son los carboxisomas, los cuales están presentes en muchas cianobacterias, en bacterias nitrificantes y en tiobacilos. Se trata de unas estructuras poliédricas de aproximadamente 100 nm de diámetro y que contienen la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa en una disposición paracristalina (Fig. 10). De esta forma, tienen una función de reserva de esta enzima a la vez que pueden ser el lugar de fijación del dióxido de carbono (Cannon et al., 2001).

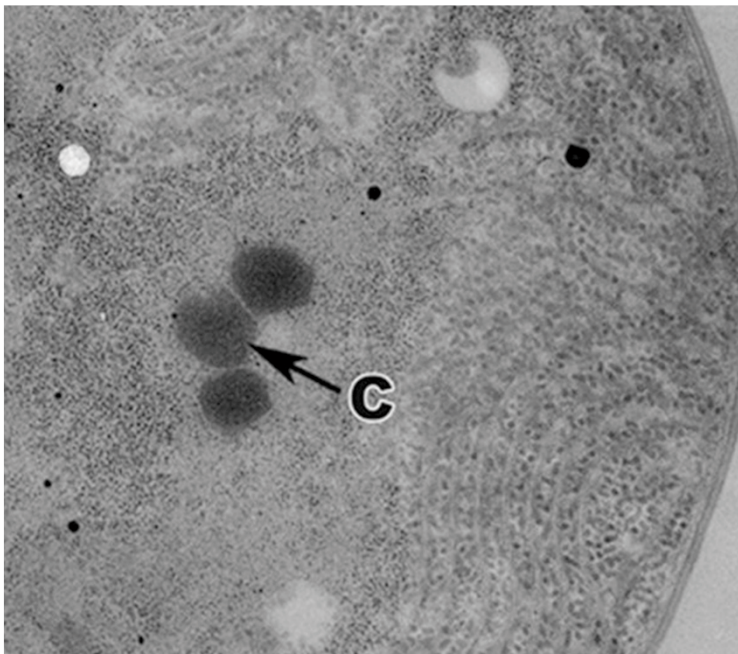


Figura 10. Carboxisomas en *Cyanospora* sp. (Zhang et al., 2014).

Asimismo, las cianobacterias pueden contener también unos gránulos denominados cianoficina (Simon, 1971), que están constituidos por polipéptidos de los aminoácidos arginina y ácido aspártico y que actúan como almacén de nitrógeno para la bacteria (Fig. 11).

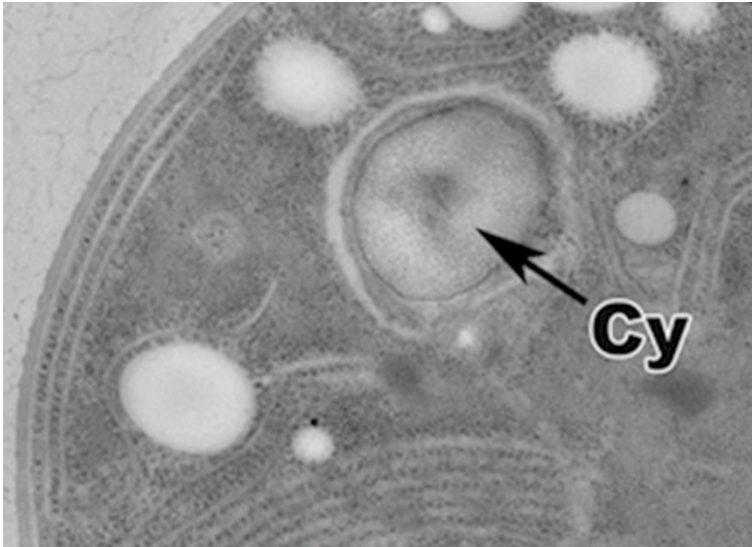


Figura 11. Gránulos de cianoficina en *Cyanoshece* sp. (Zhang et al., 2014).

Las vesículas de gas son otro tipo de cuerpos de inclusión presentes principalmente en cianobacterias y en bacterias fotosintéticas. Se trata de agregados de un número de estructuras pequeñas, huecas y cilíndricas, cuya pared está compuesta únicamente por pequeñas proteínas (Fig. 12). Concretamente, se trata de la repetición de un único tipo proteico conformando un cilindro rígido hueco e impermeable al agua, pero a la vez permeable a los gases atmosféricos. Gracias a estas estructuras, las bacterias que las presentan pueden regular su flotabilidad para permanecer en la profundidad necesaria para obtener una intensidad de luz, concentración de oxígeno y niveles de nutrientes adecuados (Jarrell and McBride, 2008).

En relación a los gránulos de naturaleza inorgánica, en procariotas se pueden encontrar dos tipos principales: los gránulos de polifosfato y los de azufre. Los gránulos de polifosfato o volutina están compuestos por polímeros lineales de ortofosfatos unidos por enlaces éster. Éstos actúan como reservas de fosfato, componente importante de los constituyentes celulares, como los ácidos

nucleicos (Fig. 13). En algunas células actúan como reserva y fuente de energía directa para reacciones químicas (Brown and Kornberg, 2008).

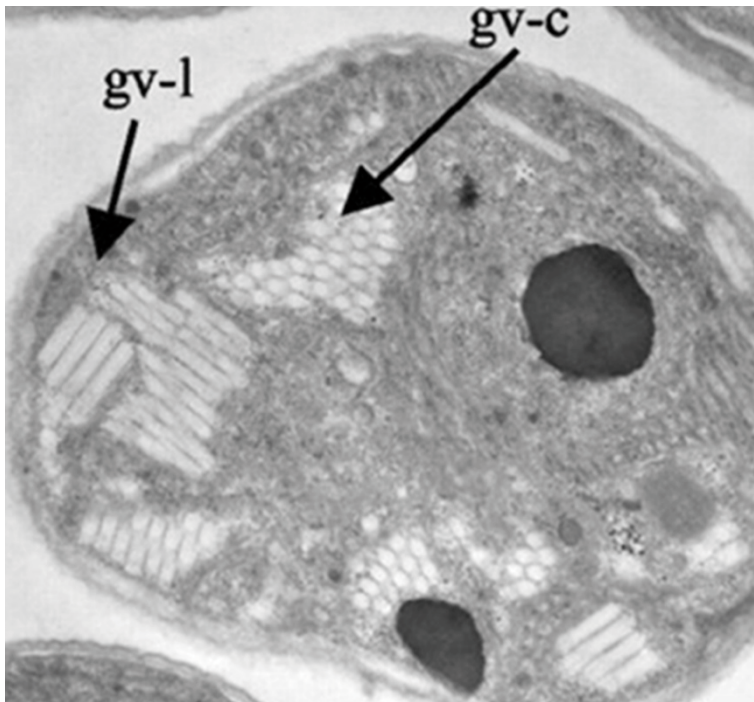


Figura 12. Vesículas de gas en *Microcystis aeruginosa*. (Mlouka et al., 2004).

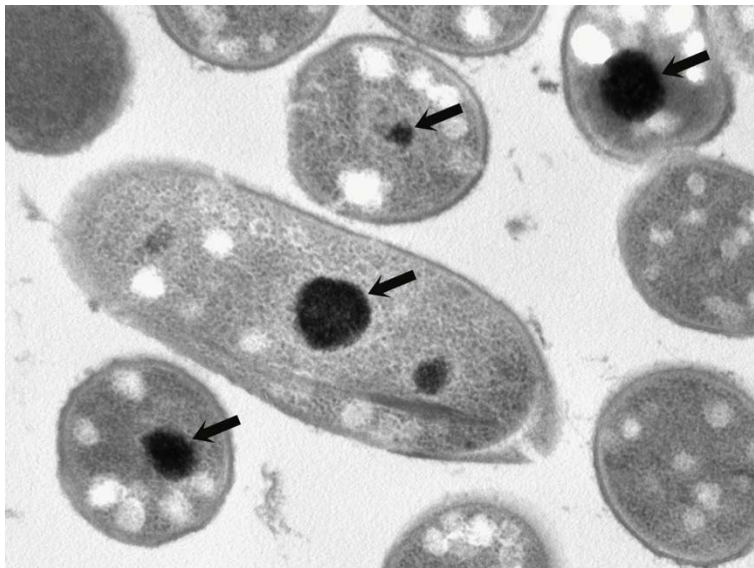


Figura 13. Gránulos de polifosfato en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> (Delgado L).

Los gránulos de azufre son un tipo de cuerpo de inclusión inorgánico que se observa temporalmente en algunas bacterias, como las bacterias púrpuras fotosintéticas (Fig. 14). Estas bacterias pueden utilizar el sulfuro de hidrógeno como dador de electrones en la fotosíntesis, acumulando el azufre sobrante en

el espacio periplásmico o formando gránulos citoplasmáticos especiales (Saier, 2013).

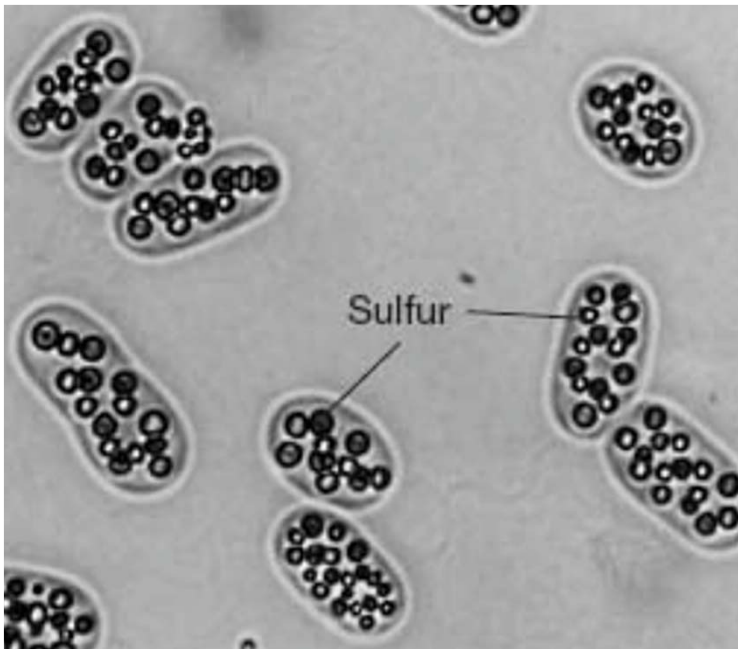


Figura 14. Gránulos de azufre en *Isochromatium buderi*. (Madigan et al., 2006).

Un tipo especial de cuerpo de inclusión inorgánico son los magnetosomas, cuya función no es de reserva (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Los magnetosomas contienen hierro en forma de magnetita rodeado por una membrana y ayudan a las bacterias acuáticas que los presentan a orientarse en el campo magnético terrestre y de esta forma nadar hacia los sedimentos ricos en nutrientes o a la profundidad óptima en hábitats de agua dulce o marinos (Fig. 15).

Existe otro tipo de cuerpo de inclusión llamado clorosoma y que está presente en bacterias verdes del azufre y en algunas bacterias fototrofas anoxigénicas, pertenecientes a las familias *Chloroflexaceae* y *Oscillochloridaceae*. Los clorosomas son complejos de antena fotosintéticos de gran tamaño, que cuentan con forma elipsoidal y que carecen de matrices de proteínas soportando los pigmentos fotosintéticos (Fig. 16).

Los clorosomas en las bacterias verdes del azufre presentan una longitud de 100-200 nm y un ancho de 50-100 nm, mientras en las bacterias fototrofas anoxigénicas son algo más pequeños. La composición de los clorosomas

consiste principalmente de bacterioclorofila con pequeñas cantidades de carotenoides y quinonas rodeados por una monocapa galactolípidica con diez proteínas diferentes unidas a ella. Los modelos actuales de la estructura de la bacterioclorofila y de los carotenoides (los principales constituyentes) dentro de los clorosomas suponen una organización lamelar, donde largas cadenas farnesol de bacterioclorofila se entremezclan con carotenoides, formando una estructura similar a una multicapa lipídica (van Dorssen et al., 1986).

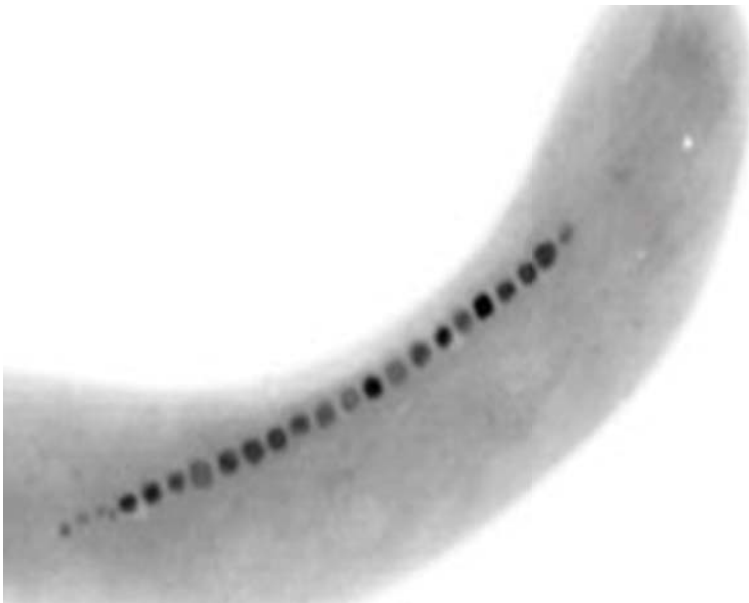


Figura 15. Magnetosomas en *Magnetospirillum magnetotacticum*. (<http://www.calpoly.edu/~rfrankel/magbac101.html>).

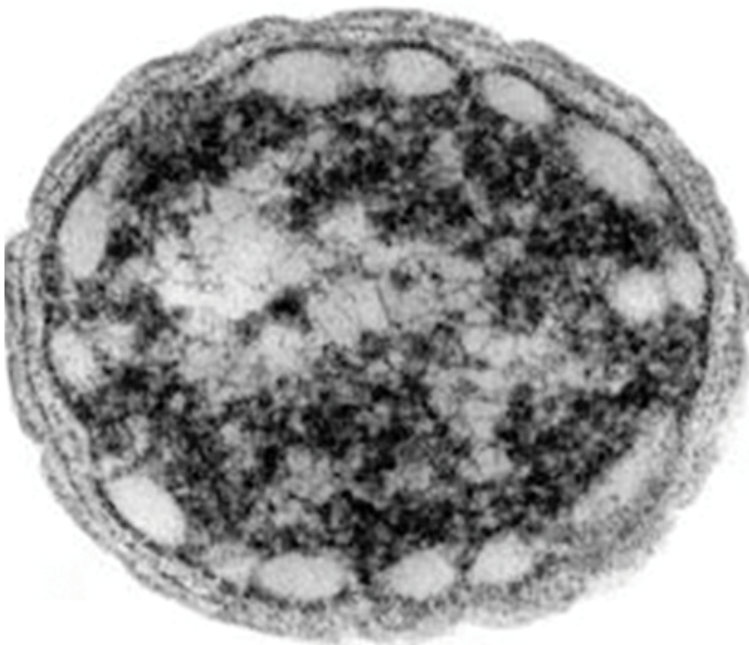


Figura 16. Clorosomas en *Chlorobium tepidum*. (Frigaard et al., 2002).

Por otra parte, aunque los procariotas carecen de orgánulos membranosos complejos como mitocondrias o cloroplastos, en el citoplasma de algunos procariotas pueden observarse estructuras membranosas internas. Los sistemas internos de membrana son plegamientos de la membrana plasmática (PM) que pueden ser extensos y complejos (Fig. 17). Se observan principalmente en bacterias fotosintéticas y en bacterias quimioautotróficas, de manera que parecen estar implicados en procesos de producción de energía al permitir una mayor superficie de membrana donde llevar a cabo procesos metabólicos para generar energía (Niederman, 2006).



Figura 17. Membranas intracitoplásmicas en *Nitrocystis oceanus*. ([http://grasslakeideas.blogspot.com.es/2006\\_12\\_01\\_archive.html](http://grasslakeideas.blogspot.com.es/2006_12_01_archive.html)).

Unas estructuras membranosas visualizadas a través del TEM en numerosas bacterias y que han generado más de 20 años de controversia han sido los denominados mesosomas. Se observaron por primera vez en los años cincuenta como invaginaciones de la PM después de un proceso de fijación química de muestras de bacterias Gram positivas para ser observadas por TEM (Chapman and Hillier, 1953). Inicialmente se relacionaron con varios procesos como, por ejemplo, constituir puntos de anclaje del cromosoma bacteriano antes de iniciar su replicación, también se relacionaron con la formación del septo de división y con lugares en los que se realizaban

procesos de fosforilación oxidativa (Pontefract et al., 1969). Posteriormente se sugirió que los mesosomas eran malformaciones que se producían en el proceso de fijación química de las muestras para observarlas por TEM. Durante la sustitución del agua con disolventes orgánicos para la posterior inclusión de las muestras en resinas, la PM parecía ser deformada por el disolvente formando estas invaginaciones. Ya en los años 80, gracias a la introducción de las técnicas de CF y a las mejoras de los equipos de FS para Microscopía Electrónica de Transmisión, se llegó a la conclusión de que los mesosomas no existen en las células procariotas de forma natural (A W McDowall et al., 1983).

La aplicación de mejoras en distintas técnicas de Microscopía ha puesto en duda el pensamiento generalizado de que el citoplasma bacteriano no está estructurado. La idea inicial de que los procariotas carecen de un elevado nivel de organización citoplásmica como sucede en las células eucariotas, ya no es válida. Así por ejemplo, se han identificado proteínas procariotas homólogas a los tres elementos del citoesqueleto eucariota. La proteína FtsZ, que participa en la división celular, es homóloga a la tubulina. La proteína MreB, que contribuye a la morfología celular, es homóloga a la actina y, asimismo, la crescentina, que también participa en la morfología celular, es homóloga a proteínas del filamento intermedio (Shih and Rothfield, 2006). Gracias a la Microscopía de Fluorescencia y a la posibilidad de fusionar estas proteínas con marcadores fluorescentes, como la GFP, se ha podido determinar su localización y, asimismo, la existencia de dinamismo en su distribución intracelular. Podemos, por tanto, hablar de un citoesqueleto bacteriano y empezar a analizar procesos dinámicos que ocurren en el citoplasma bacteriano para localizar y concentrar, en el lugar y momento preciso, enzimas asociados a distintos procesos metabólicos. En la actualidad, las nuevas técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión y de reconstrucciones 3D están aportando una nueva visión del citoplasma bacteriano y, a continuación, se comentaran algunos de estos avances.



## **2.2. Tomografía Electrónica aplicada a procariotas**

La ET ha permitido la determinación de la arquitectura 3D de muchas estructuras procariotas, mejorando el conocimiento que se tenía de las mismas, aportando información nueva y, en algunos casos, refutando algunas hipótesis. Los resultados obtenidos de ET cubren diversas estructuras procariotas subcelulares entre las que se encuentran los filamentos del citoesqueleto, membranas celulares y paredes celulares, apéndices superficiales como los flagelos, compartimentos internos y el nucleoide. De la misma forma, estos resultados han proporcionado información sobre la función de las estructuras mencionadas en los procesos de división celular, movilidad, quimiotaxis, patogenicidad e interacción célula-célula (Jensen and Briegel, 2007; Li and Jensen, 2009; Milne and Subramaniam, 2009; Gan and Jensen, 2012). Dentro de la ET, cabe destacar la importancia de la CET, ya que es la única técnica que ha permitido el estudio de estructuras en unas condiciones muy similares a las que se encontrarían en la naturaleza, evitando los artefactos propios de los procesos de la fijación química, deshidratación, inclusión y contrastado.

Como se ha mencionado, la CET ha proporcionado, por ejemplo, información fundamental en relación a los filamentos de citoesqueleto bacteriano. Esta técnica ha permitido la observación de filamentos en el citoplasma (Briegel et al., 2006; Li et al., 2007; Borgnia et al., 2008) en el periplasma (Charon et al., 2009) e incluso en la superficie de bacterias que se desplazan por el sistema “gliding” (Liu et al., 2007). Cabe destacar que los filamentos de citoesqueleto rara vez podían ser observados mediante las técnicas de TEM tradicionales, hasta el punto que se estableció la creencia de que la ausencia de los mismos era una característica de los organismos procariotas. El desarrollo de la Microscopía Óptica de Fluorescencia y de los métodos de marcaje por GFP revolucionaron la Biología Celular bacteriana, ya que condujeron a pensar que muchas proteínas bacterianas formaban hélices, anillos y otros filamentos (Gitai, 2005). Los filamentos del citoesqueleto se observaron por primera vez por CET en la bacteria *Spiroplasma melliferum* (Kürner et al., 2005). Posteriormente, en la especie *Caulobacter crescentus* se descubrieron varias clases de filamentos distribuidos en el citoplasma formando un anillo en la zona

del septo de división, filamentos en zonas polares y filamentos responsables de la curvatura interna y forma de la bacteria (Briegel et al., 2006). Un estudio que combinaba el uso de la Microscopía de Fluorescencia con CET (combinación de técnicas que recibe el nombre de Microscopía Correlativa) demostró que los filamentos presentes en la curvatura interna correspondían a polímeros de CTP sintasa que regulaban negativamente la curvatura de la célula (Ingerson-Mahar et al., 2010) (Fig. 18).

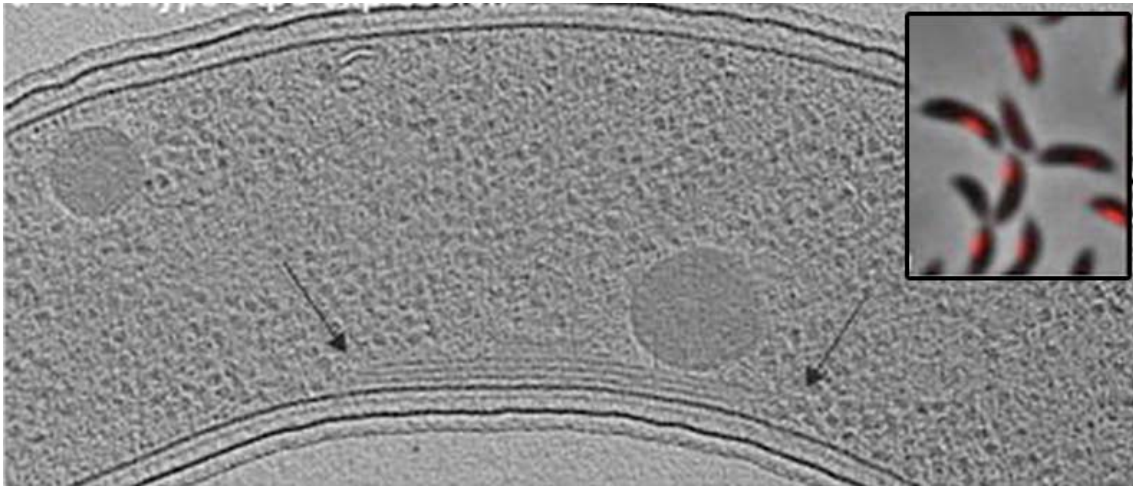


Figura 18. Sección de un criotomograma de una célula de *Caulobacter crescentus*. Se observan los filamentos responsables de la curvatura interna. En el cuadro pequeño se observa la localización de la CTP sintasa por Microscopía de Fluorescencia. (Ingerson-Mahar et al., 2010).

En la bacteria Gram negativa *Magnetospirillum magneticum* se descubrió también mediante CET otro tipo de filamentos que se encontraban flanqueando tándems lineales de magnetosomas y que se identificaron como la proteína tipo actina MamK (Komeili et al., 2006; Scheffel et al., 2006). Además, se descubrió que los magnetosomas en realidad eran cristales de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) rodeados por una membrana de tipo bicapa lipídica no cerrada formando vesículas como siempre se había pensado, sino que la membrana que rodeaba los cristales procedía de invaginaciones de la PM (Fig. 19).

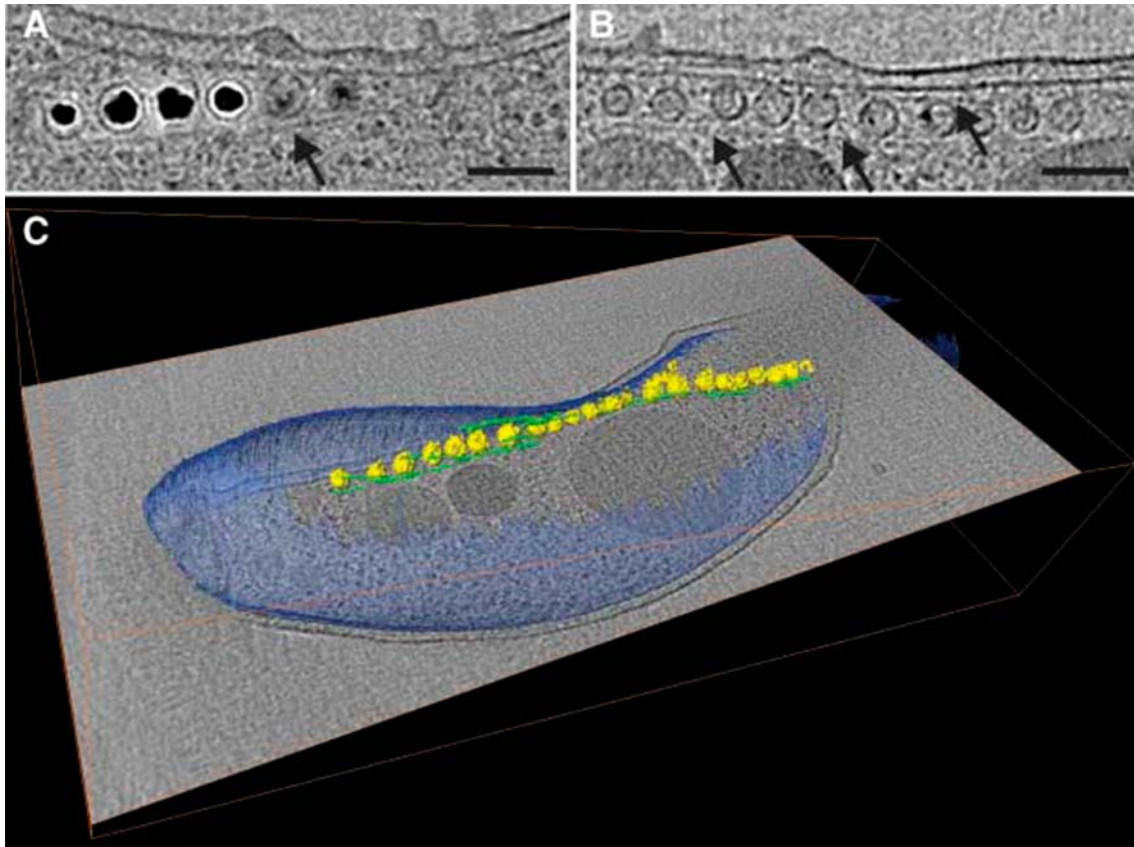


Figura 19. Cadenas de magnetosomas flanqueados por filamentos de citoesqueleto en *Magnetospirillum magneticum* detectados por CET. (A) Cadena de magnetosomas ampliada. (B) Vista similar de magnetosomas formada en ausencia de hierro (ausencia de cristales de magnetita). (C) Organización 3D de los magnetosomas y sus filamentos asociados respecto a la célula completa. (Komeili et al., 2006).

Más adelante, la técnica de CET permitió detectar otro tipo de filamentos homólogos a la actina que se encontraban agrupados en haces y que estaban involucrados en la maquinaria de segregación de plásmidos, los ParM (Salje et al., 2009). Por otro lado, también se pudieron observar por CET filamentos de la proteína tipo tubulina FtsZ en células de *Caulobacter crescentus* en división, que, a diferencia de lo esperado tras las observaciones por Microscopía Óptica de Fluorescencia, estaban dispuestos formando fragmentos que daban lugar a un arco alrededor de la membrana interna en el sitio de constricción durante el proceso de septación de la división celular (Li et al., 2007) (Fig. 20).

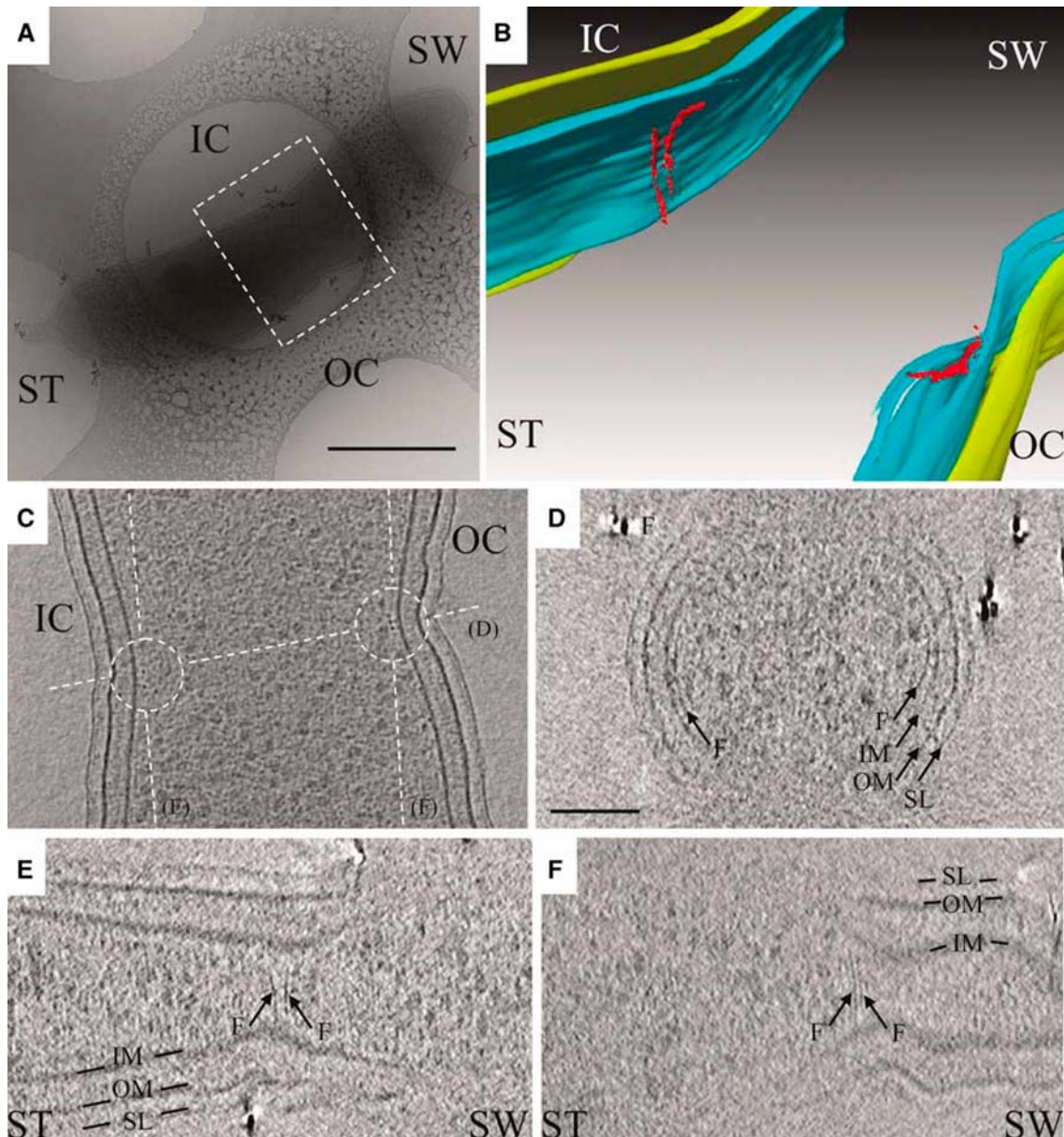


Figura 20. Filamentos tipo arco (FtsZ) en el lugar de división en *Caulobacter crescentus*. (A) Célula a baja magnificación en el cryo-TEM. (B) Segmentación de la zona marcada en (A). (C-F) Diferentes secciones del criotomograma en el que se observan los filamentos FtsZ (F). (Li et al., 2007).

Además, se observó que los filamentos FtsZ podían adoptar tanto conformaciones rectas como curvadas, lo que corroboraba el modelo “iterative pinching” de la constricción celular (Erickson, 1997). El hecho de que los filamentos MamK y FtsZ nunca se hubieran podido observar por Microscopía Electrónica tradicional podría deberse a que los procesos de fijación química y deshidratación provocaban su despolimerización (Pilhofer et al., 2010). Anecdóticamente, algunos filamentos que se daban por hecho que existían

basándose en experimentos de Microscopía de Fluorescencia, no se han podido detectar en CET. Un ejemplo es otra proteína homóloga de la actina, la MreB, la cuál se había observado en forma de largas hélices que rodeaban células alargadas en el interior de las membranas citoplásmicas (Jones et al., 2001; Shih et al., 2003; Figge et al., 2004; Srivastava et al., 2007; Chiu et al., 2008). Sin embargo, al observarse por CET no fue posible detectar este tipo de hélices de MreB (Swulius et al., 2011), cuestionando su naturaleza (Domínguez-Escobar et al., 2011; Garner et al., 2011).

Las envueltas bacterianas también han sido objeto de estudio en experimentos de CET. Las envueltas de las micobacterias presenta un gran interés médico debido a que son impermeables a los antibióticos, hecho directamente relacionado con su virulencia y resistencia al tratamiento. La aplicación de CET a las envueltas de distintas bacterias ha permitido observar con mayor resolución su estructura y aportar nuevos datos. Estudios en las bacterias *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* y *Corynebacterium glutamicum* demostraron que la capa externa de la pared mostraba la estructura de una bicapa lipídica, la cual desaparecía en bacterias mutantes deficientes en ácidos micólicos, demostrando que estos eran componentes de la membrana externa (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008).

Por otro lado, se conoce que la fortaleza mecánica de las paredes bacterianas reside en el peptidoglicano, el cual presenta forma de saco y cuya subunidad es bien sabida desde hace décadas. Sin embargo, su arquitectura molecular completa no resultaba tan clara. De hecho, existían dos modelos diferentes propuestos sobre la organización del peptidoglicano: el laminado (“layered”) y el de andamio (“scaffold”). Estudios de CET aplicados a *Escherichia coli* y a *Caulobacter crescentus* revelaron cadenas individuales de glucanos orientados en el plano del “saco” perpendicularmente al eje largo de la célula y espaciados entre sí entre 5-8 nm, lo que estableció el nuevo modelo desordenado, circunferencial y laminado (Gan et al., 2008).

La CET también ha sido crucial en el estudio de maquinarias macromoleculares bacterianas en su contexto celular (Zhao et al., 2014). Un

ejemplo es el motor del flagelo que no se puede purificar sin alterar su estructura (Tang et al., 1996; Thomas et al., 2001). El motor del flagelo intacto se pudo visualizar por primera vez en criotomogramas de *Treponema primitia* (Murphy et al., 2006). Se pudo observar que el flagelo de esta especie era inusualmente más ancho que de otras especies bacterianas (Murphy et al., 2008), aunque compartía una arquitectura similar a las espiroquetas del género *Borrelia* (Liu et al., 2009; Kudryashev et al., 2010). Posteriormente, un estudio comparativo del rotor del flagelo de once especies diferentes puso de manifiesto la plasticidad de esta estructura a lo largo de la evolución para satisfacer las necesidades de movilidad de las diferentes especies bacterianas (Chen et al., 2011) (Fig. 21).

Otro sistema de movilidad bacteriano revisado por CET es el de “gliding” estudiado en *Flavobacterium johnsoniae*. Esta bacteria exhibía penachos de filamentos de unos 5 nm de grosor que surgían desde la pared. Se observó que estos filamentos no se encontraban en la célula mutante *gldF*<sup>-</sup> que, además, no presentaba movilidad. Sin embargo, las mismas células mutantes complementadas con un plásmido que codificaba para la proteína GldF, les hacía recuperar la movilidad. Aunque las proteínas Gld no parecen formar parte de los filamentos, es conocido que se localizan en la cara interna de la membrana externa y que pueden condicionar la movilidad (Liu et al., 2007).

La CET también ha permitido ampliar el conocimiento de la quimiotaxis bacteriana, mecanismo mediante el cual las bacterias son capaces de detectar moléculas en su medio ambiente y, en función de ello, regular la dirección hacia dónde desplazarse. Los quimiorreceptores son las estructuras que permiten este mecanismo de señalización y se conforman en tándems embebidos en la membrana interna. Mientras que la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear habían proporcionado modelos atómicos de varios componentes de este sistema de señalización, la CET reveló que los receptores están universalmente organizados en tándems hexagonales (Briegel et al., 2008; Khursigara et al., 2008), proporcionando una base para los modelos mecanísticos de cooperatividad (Fig. 22).

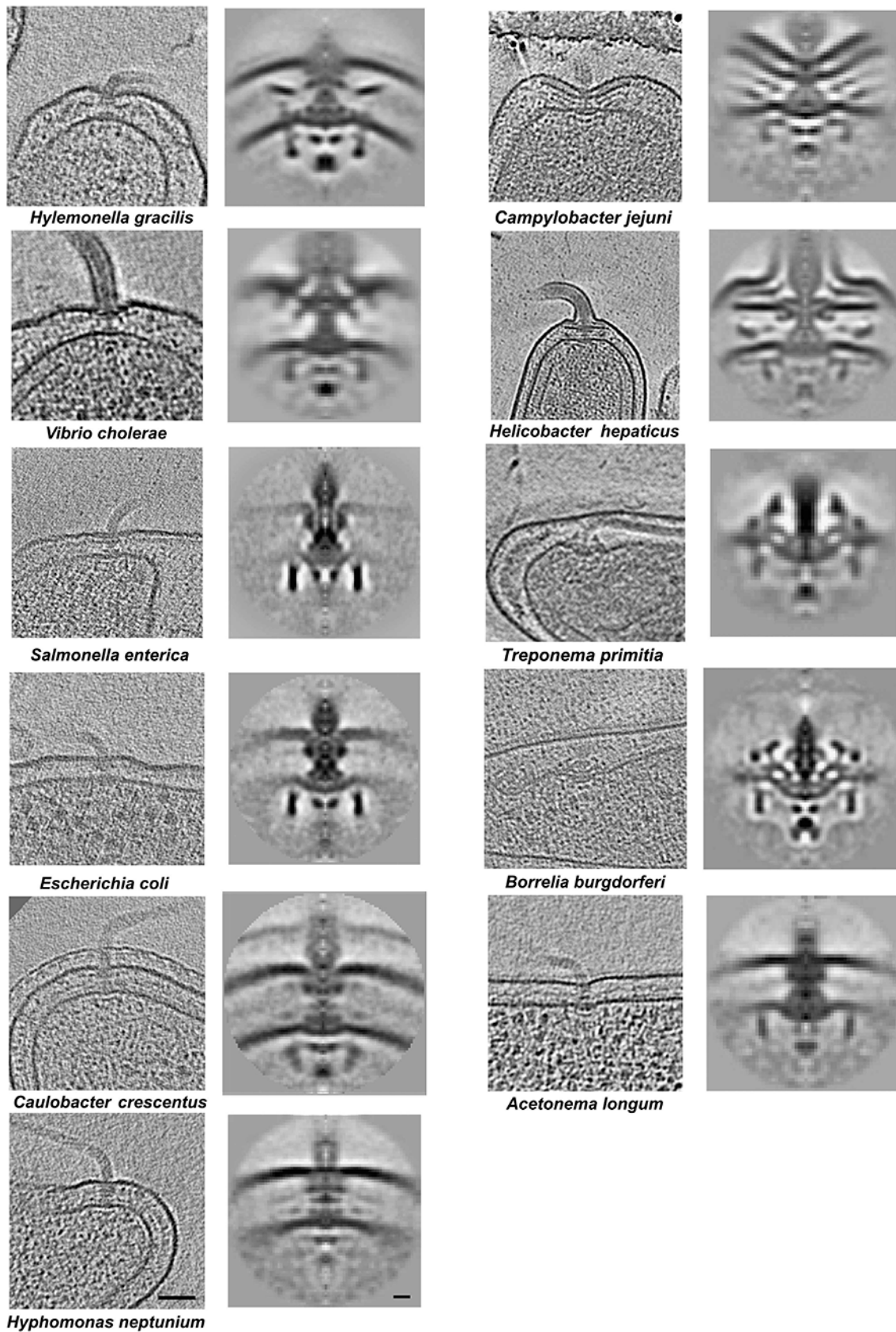


Figura 21. Estructura del motor del flagelo en diferentes bacterias. A la izquierda se observan las secciones de los tomogramas y a la derecha las reconstrucciones de los motores del flagelo. (Chen et al., 2011).

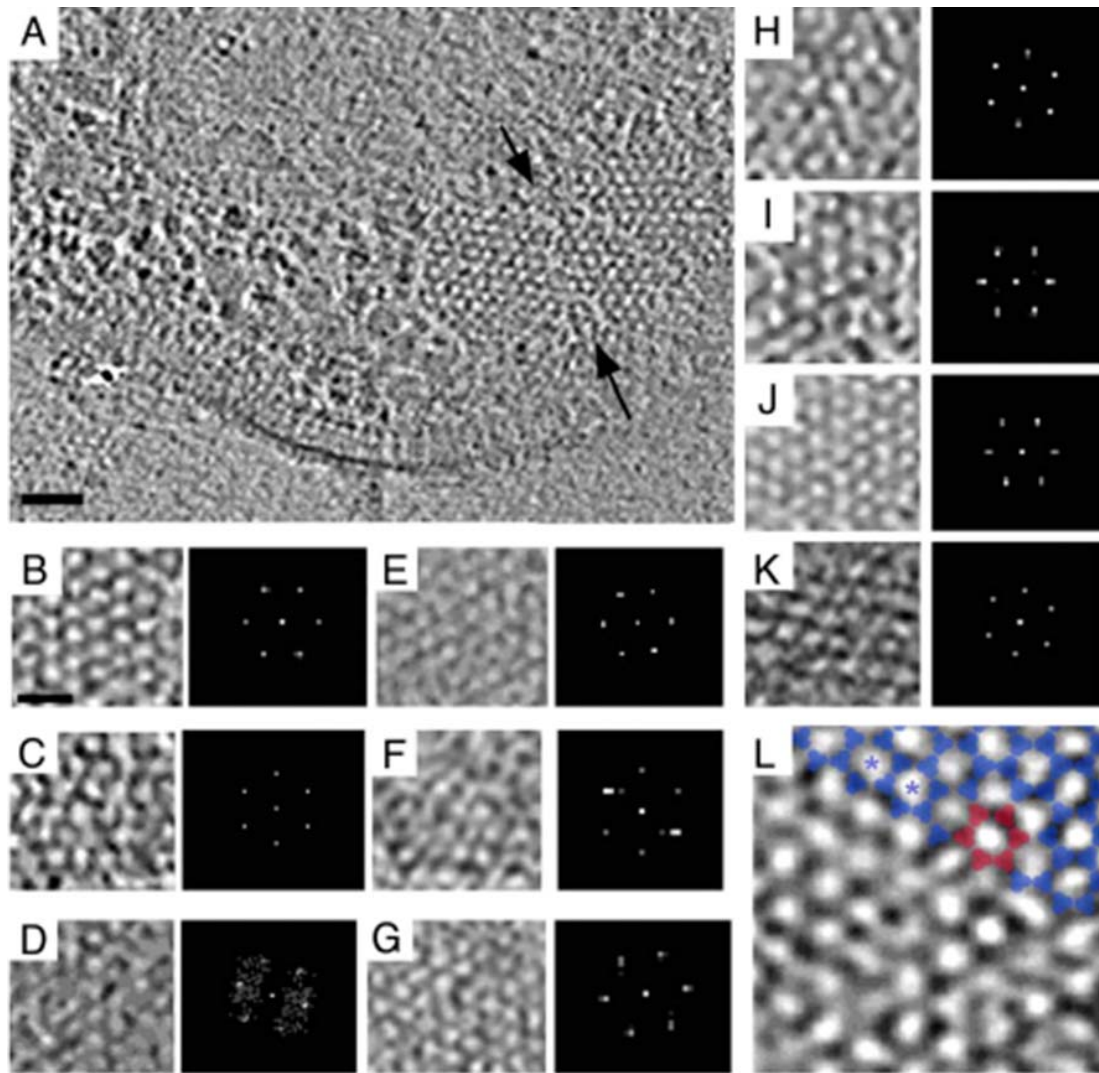


Figura 22. Estructura universal de los quimiorreceptores. (A) Quimiorreceptor organizado hexagonalmente en *Thermotoga maritima*. (B-K) Comparación de quimiorreceptores en diferentes especies bacterianas: (B) *T. maritima*, (C) *Acetonebacter longum*, (D) *Campilobacter jejuni*, (E) *Helicobacter hepaticus*, (F) *Magnetospirillum magneticum*, (G) *Halothiobacillus neapolitanus*, (H) *Rhodobacter sphaeroides*, (I) *Escherichia coli*, (J) *Vibrio cholerae*, (K) *Treponema primitia*. (Briegleb et al., 2008).

La estructura de los carboxisomas fue reportada por CET por primera vez en *Halothiobacillus neapolitanus* (Schmid et al., 2006). Se presentaron como icosaedros regulares de diferentes tamaños. Otros estudios posteriores corroboraron esta arquitectura en la bacteria *Synechococcus* WH8102 (Iancu et al., 2007) (Fig. 23).

Otras estructuras también reconocidas por CET han sido la lámina S en ciertas bacterias o arqueas (Grimm et al., 1998; Baumeister et al., 1999; Comolli et al., 2013; Shin et al., 2013) y los cuerpos citoplasmáticos ricos en fósforo, cuya



composición elemental ha sido determinada en algunos casos por espectroscopia de electrones (Comolli et al., 2006; Borgnia et al., 2008).

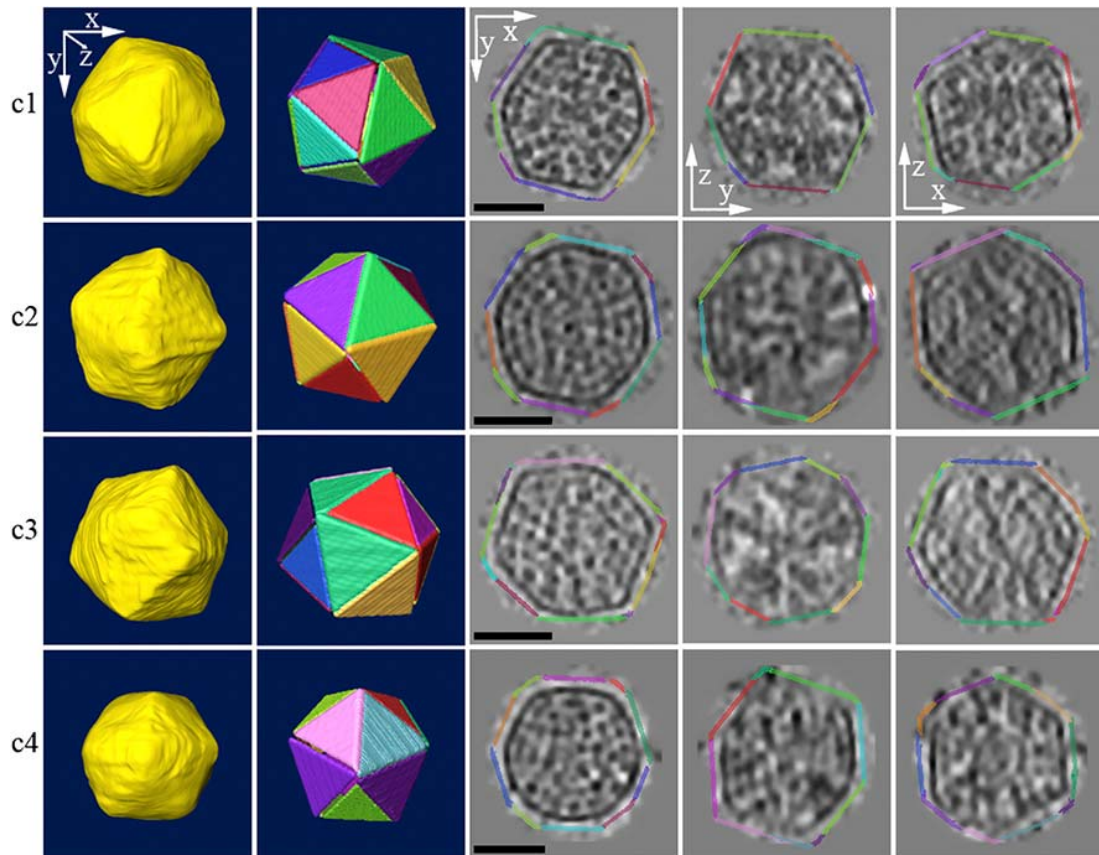


Figura 23. Estructura de los carboxisomas. (c1-c4) Cuatro carboxisomas reconstruidos individualmente, uno por fila. A la izquierda se observan las superficies segmentadas manualmente y a la derecha tres secciones centrales ortogonales. (Iancu et al., 2007).

Existen varios estudios de CET que se han encargado de caracterizar membranas bacterianas fotosintéticas. El primero de ellos estaba aplicado a dos cepas de cianobacterias del género *Prochlorococcus*, la MIT9313 y la MED4, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas entre sí y que manifiestan gran importancia ecológica (Ting et al., 2007). La cepa MED4 comparada con la primera presentaba menor volumen celular, un carboxisoma más pequeño, menor número de lamelas intracitoplásmicas y una arquitectura de pared celular mínima (Fig. 24). Un análisis genómico de ambas cepas evidenció importantes diferencias entre ambas, incluyendo los genes implicados en la síntesis del peptidoglicano. Otro estudio de CET en *Rhodospseudomonas viridis* documentó estructuras tipo túnel conectando las

membranas fotosintéticas a la PM interna y el elevado nivel de empaquetamiento de los sacos planos (Konorty et al., 2008).

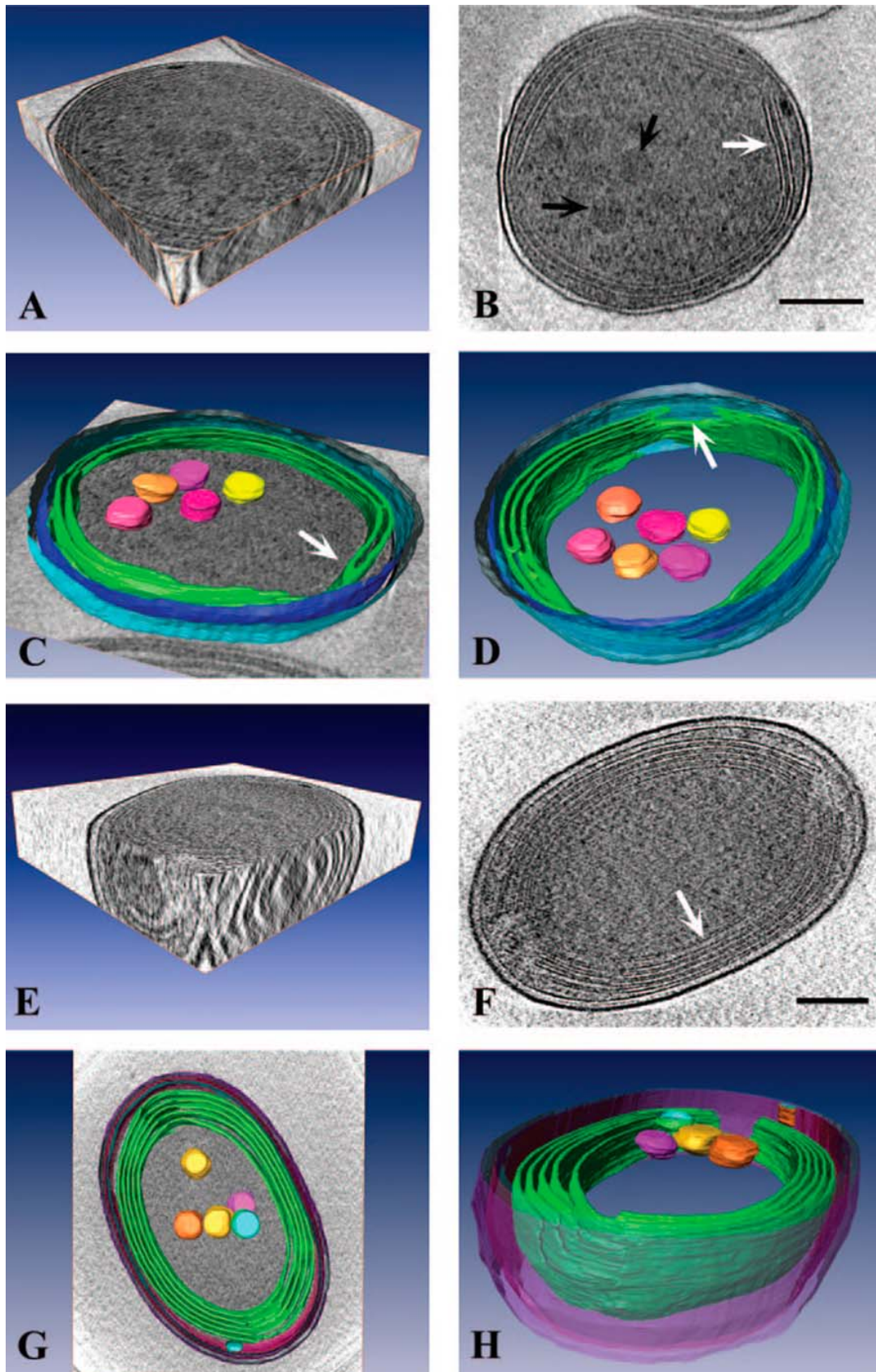


Figura 24. Diferencias en la arquitectura de dos cepas de *Prochlorococcus* estrechamente relacionadas por CET. (A-D) Cepa MED4. (E) Cepa MIT9313. (Ting et al., 2007).

El nucleoide bacteriano, contenedor del genoma compactado, se reconocía en las imágenes tradicionales de Microscopía Electrónica de Transmisión como una zona más clara dentro del citoplasma. Los criotomogramas de células bacterianas mostraron con gran detalle una zona central libre de ribosomas que exhibían una textura más fina que el resto del citoplasma. Un claro ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo en *Bdellovibrio bacteriovorus* (Borgnia et al., 2008). Otros estudios de CET en *Gemmata obscuriglobus* mostraron una red de compartimentos de doble membrana que probablemente rodeaban la cromatina compactada, una organización que se piensa que aumenta la tolerancia a la radiación de estas especies (Lieber et al., 2009). La CET también ha revelado la estructura de la zona de contacto de dos bacterias simbióticas, *Ignicoccus hospitalis* y *Nanoarchaeum equitans* (Junglas et al., 2008), la estructura de arqueas ultrapequeñas de muestras de biofilms de minas ácidas (Comolli et al., 2008), así como las adaptaciones estructurales de las bacterias oxidadoras de hierro a un estilo de vida rico en hierro (Comolli et al., 2011).

Otra aportación importante de la CET es el estudio de la interacción entre virus y huésped (Fu and Johnson, 2012; Guerrero-Ferreira and Wright, 2013). Se pudieron investigar los cambios que sufría el dsDNA del fago  $\epsilon 15$  a lo largo de la infección en *Salmonella* (Chang et al., 2010). Se observó que mientras algunas cápsides de los fagos estaban llenas de DNA, otras estaban vacías por haber inyectado sus genomas al huésped. Una comparación de los fagos llenos y vacíos mostró que la cola debe experimentar cambios conformacionales importantes para poder inyectar el genoma viral. Otro estudio en *Sulfolobus* desveló la capacidad de los virus para alterar drásticamente la estructura de esta arquea (Fu et al., 2010). La arquea se infectó con un virus dsDNA del linaje Adeno-PRD1, el cuál presenta una membrana lipídica interna. La CET reveló nuevos detalles de la estructura piramidal que sobresalía de la superficie celular (Fig. 25). En el citoplasma se observaron algunos virus parcialmente ensamblados que mostraban una cápside proteica parcial y una

capa lipídica también parcial, lo que sugería que en este tipo de virus, la cápside y la membrana lipídica se ensamblan en el citoplasma. Este hecho resulta sorprendente si se tiene en cuenta que las células no infectadas de *Sulfolobus* no parecen ensamblar vesículas citoplásmicas u orgánulos.

La CET también ha permitido aportar nueva información en el estudio de las infecciones bacterianas en células eucariotas revelando transiciones estructurales no descritas hasta el momento tanto en el patógeno como en el huésped. La captación de momentos de los estadios tempranos de la endocitosis mediada por la bacteria *Chlamydia trachomatis* LGV2 permitió observar que los cuerpos elementares están polarizados: un polo se caracteriza por una invaginación tubular de la PM y el otro presenta una expansión periplásmica asimétrica que sostiene los sistemas de secreción tipo III. Además, los cuerpos elementales orientan el polo que presenta los sistemas de secreción III a las células a infectar, llevándose a cabo un contacto que induce la internalización de la bacteria. Una vez ocurre la internalización, la bacteria pierde su polaridad y pierde los sistemas de secreción III (Nans et al., 2014) (Fig. 26).

La CET también se ha utilizado en combinación con la técnica PALM permitiendo profundizar en el estudio del sistema de secreción tipo VI en la bacteria *Myxococcus xantus* (Chang et al., 2014). Este sistema de secreción está ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas y se relaciona con la inyección de sustancias inhibitoras a células huésped. También se conoce que presenta una naturaleza dinámica y una localización aleatoria en el interior de la célula. Gracias a esta técnica se identificaron múltiples y nuevas conformaciones del sistema de secreción tipo VI (Fig. 27).

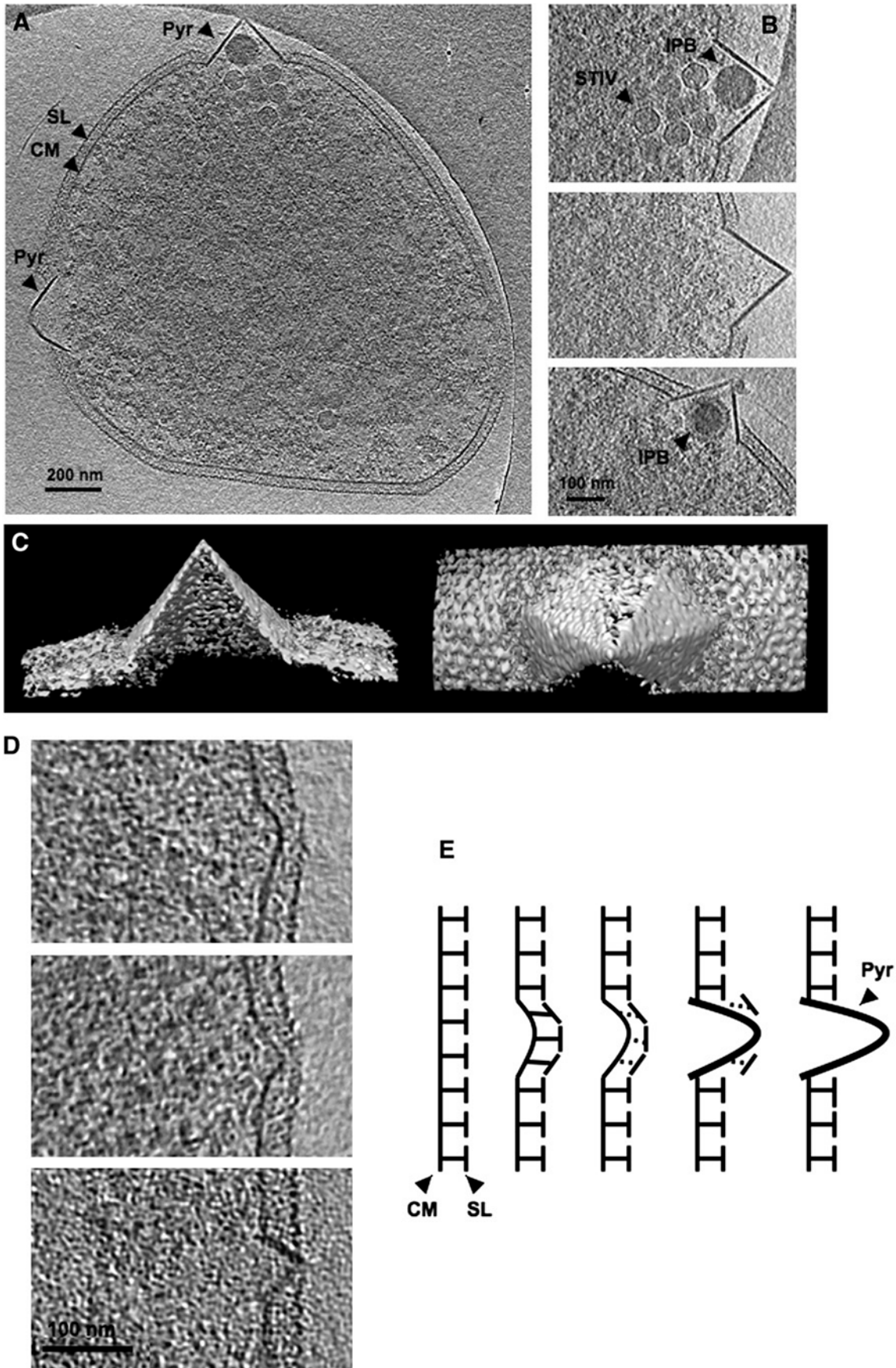


Figura 25. CET de *Sulfolobus solfataricus* infectado con un virus dsDNA del linaje Adeno-PRD1. (A) Sección del criotomograma. (B) Zonas ampliadas de las pirámides.

(C) Representación de la superficie de la pirámide. (D) Zonas ampliadas de pirámides incipientes. (E) Modelo de la formación de la pirámide. (Fu et al., 2010).

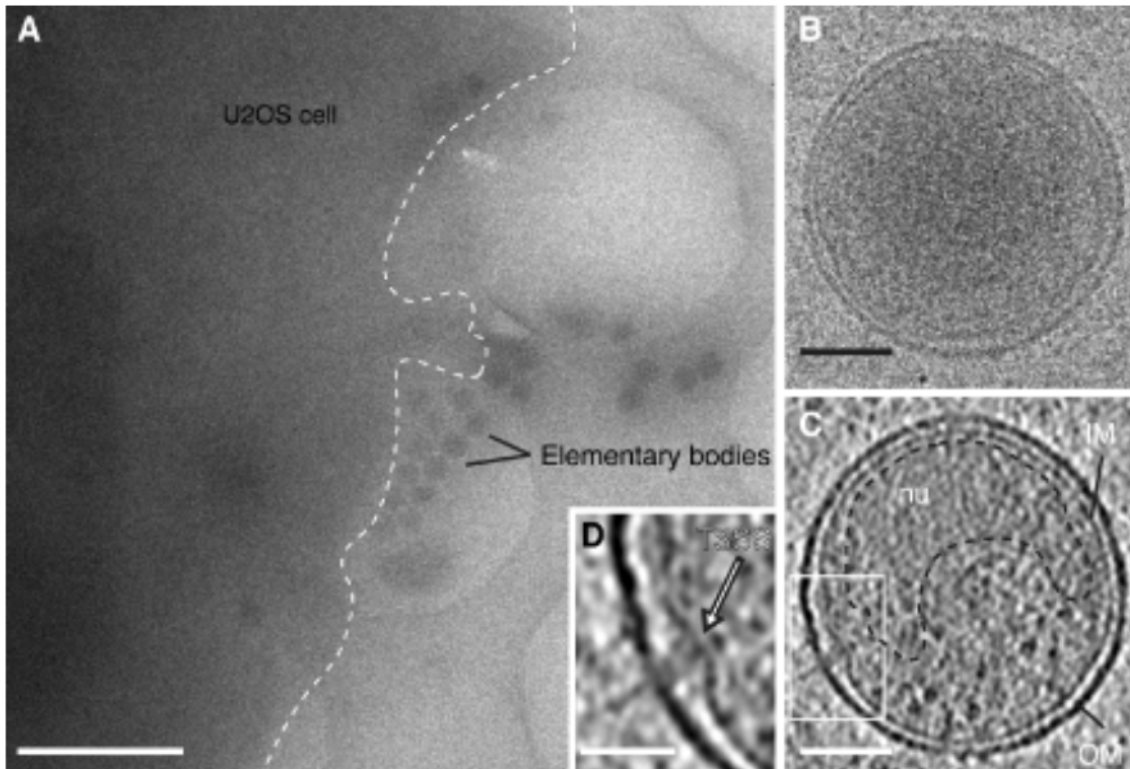


Figura 26. CET de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* LGV2. (A) Micrografía a bajos aumentos de una célula U2OS crioinmovilizada tras 15 min de exposición a cuerpos elementales de *C. trachomatis*. (B) Imagen a 0° de inclinación de la serie adquirida. (C) Sección del tomograma de un cuerpo elemental de *C. trachomatis*. (D) Recuadro ampliado de (C) donde se observa el complejo macromolecular del sistema de secreción III (flecha blanca). (Nans et al., 2014).

Como se ha podido observar, la CET es una herramienta que ha permitido “reanalizar” estructuras bacterianas ya conocidas para confirmar su existencia y ampliar los conocimientos que teníamos de las mismas en un entorno celular cercano al natural. Sin embargo, también cabe destacar que esta técnica ha abierto nuevas oportunidades para el descubrimiento de nuevas estructuras bacterianas en unas condiciones similares a las que se encontrarían en la naturaleza. De esta forma, el estudio de nuevas bacterias de hábitats desconocidos constituye un tema muy interesante en la búsqueda de rasgos y estructuras procariontas inusuales. Un ejemplo son las estructuras “hami” presentes en un nuevo grupo de arqueas de ambientes fríos y ricos en azufre, que constituyen un nuevo tipo de apéndices proteicos filamentosos de elevada

complejidad que se describieron por primera vez por CET (Moissl et al., 2005) (Fig. 28).

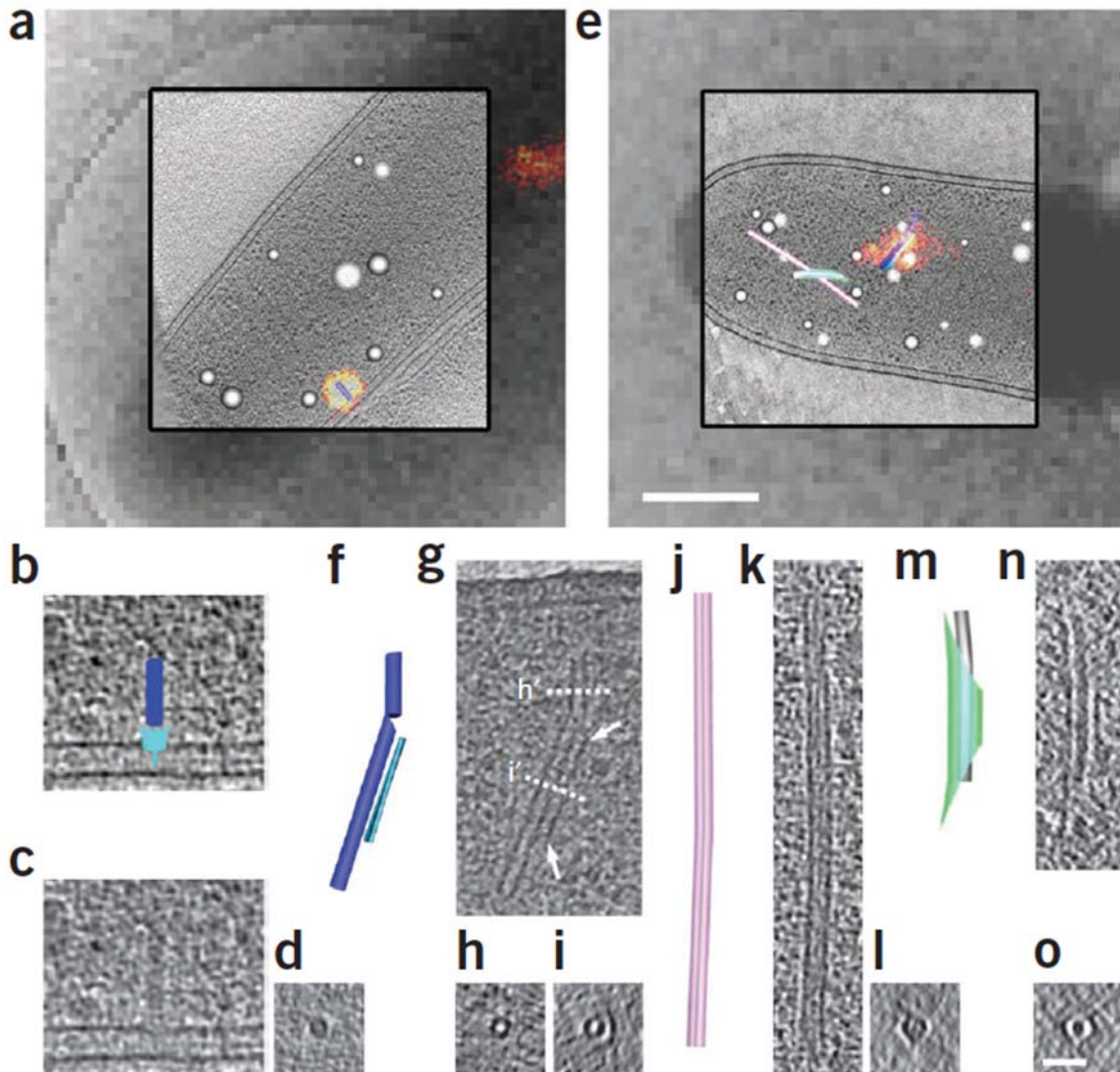


Figura 27. Identificación de nuevas estructuras del sistema de secreción VI en *Myxococcus xantus* por Microscopía correlativa (Cryo-PALM-CET). (A) Sistema de secreción tipo VI en conformación contraída y sujeto a la PM. (B) Sección del tomograma en que se muestra la estructura tubular de (A). (C) Misma sección del tomograma que (B) sin resaltar la estructura. (D) Sección cruzada del sistema de secreción VI en (C). (E) Estructura doblada del sistema de secreción VI. (F), (J) y (M) Modelos segmentados de las estructuras tubulares que se observan en (E). (G), (K) y (N) Secciones del tomograma de las secciones tubulares correspondientes a los modelos segmentados (F), (J) y (M), respectivamente. (H) e (I) Secciones del tomograma de las secciones cruzadas de las estructuras tubulares de (G). (L) y (O) Secciones cruzadas de (K) y (N), respectivamente. (Chang et al., 2014).

De la misma forma, existe el caso de la bacteria *Treponema primitia* que se analizó por CET, conduciendo al descubrimiento de nuevas estructuras implicadas en la motilidad de esta bacteria. Entre las estructuras descritas se

encuentran fibrillas, estructuras en forma de “bowl”, estructuras en forma de arco y la presencia de dos capas de peptidoglicano dispuestas formando un sándwich a lado y lado del flagelo (Murphy et al., 2008).

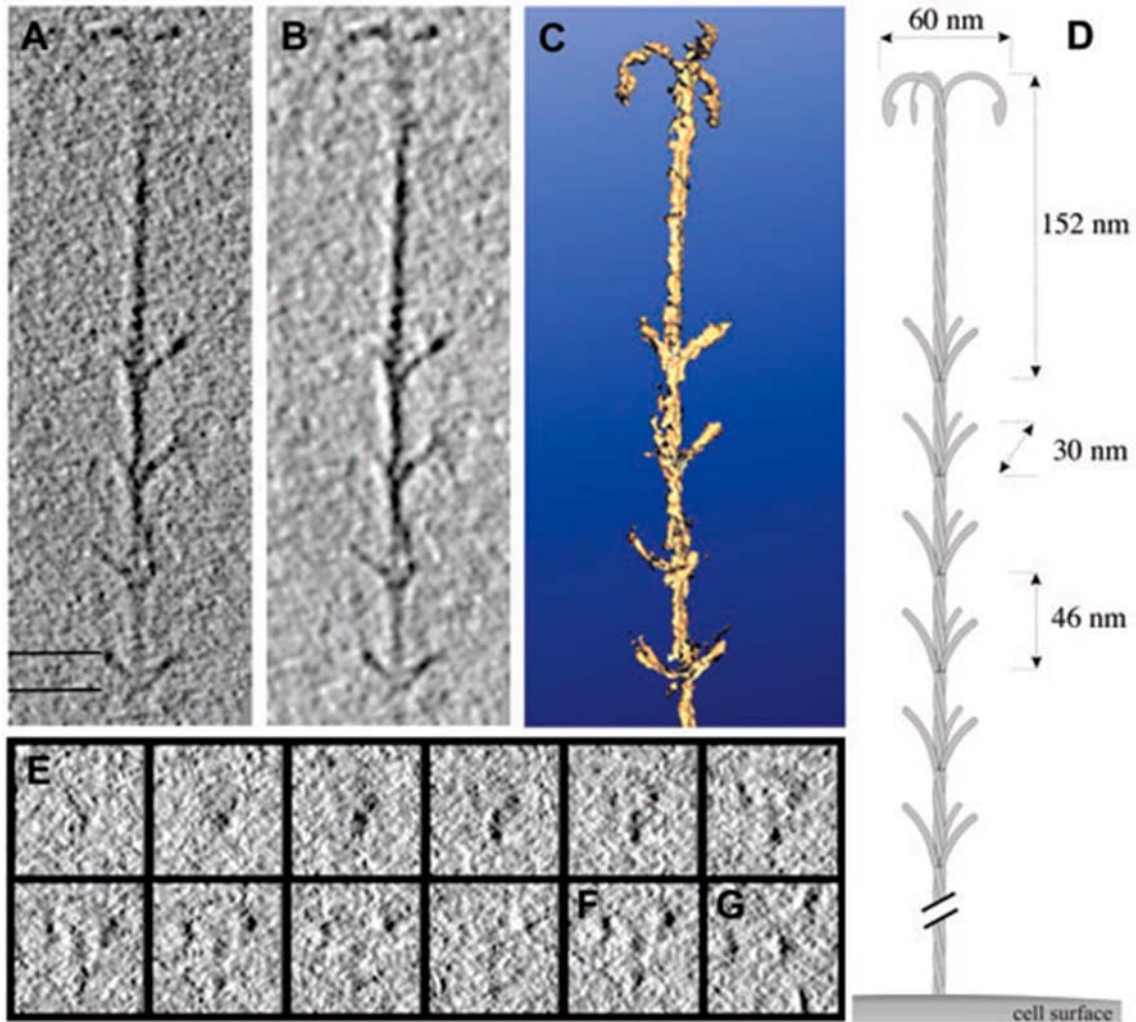


Figura 28. CET de una estructura “hamus”. (A) Sección de un criotomograma donde aparece un “hamus”. (B) Sección del criotomograma mostrado en (A) tras un tratamiento para eliminar el ruido. (C) Modelo del mismo criotomograma. (D) Modelo de la estructura “hamus” con las medidas indicadas. (E-G) Diferentes secciones del criotomograma. (Moissl et al., 2005).

Otras nuevas estructuras también descritas por CET son los “nanopods”, descubiertos en bacterias *Delftia sp.* y que se trata de un nuevo tipo de orgánulos de morfología que varía entre esférica y espiral y que proporcionan un camino a través del cuál las células pueden liberar vesículas de membrana externa a cierta distancia (Shetty et al., 2011) (Fig. 29).



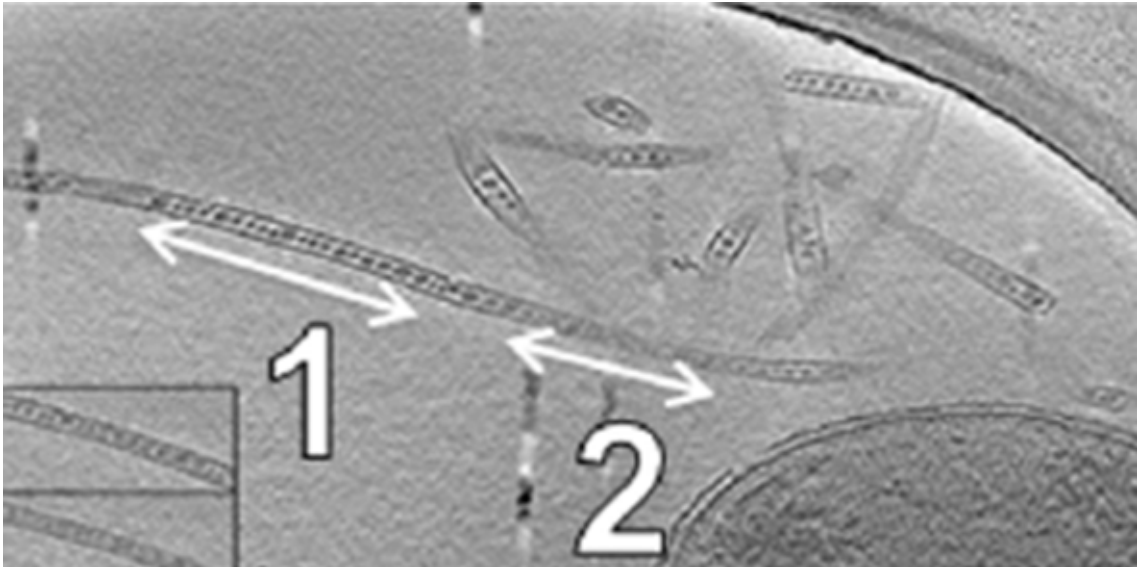


Figura 29. Sección de un criotomograma en el que aparecen nanopods cerca de una célula de *Delftia sp.* (Shetty et al., 2011).

Podemos señalar pues, que a pesar de necesitar equipos costosos y de tratarse de una técnica laboriosa, la CET es actualmente una herramienta imprescindible para el estudio y el avance de los conocimientos de la estructura de las células procariotas.

## ***II. OBJETIVOS***



En los últimos años, el estudio de la ultraestructura procariota ha vuelto a generar un gran interés científico debido a que las técnicas de Criomicroscopía Electrónica de Transmisión permiten observar las muestras biológicas prácticamente en su estado natural sin la interferencia de procesos artefactuales. Asimismo, el desarrollo de la Tomografía Electrónica ha permitido reconstruir tridimensionalmente estructuras biológicas para su estudio, lo que ha motivado una reevaluación de muchas de ellas. Estos avances tecnológicos ofrecen nuevas oportunidades para el descubrimiento y estudio de nuevas estructuras bacterianas. Por este motivo, el estudio de bacterias nuevas procedentes de hábitats “desconocidos” presenta un especial interés para encontrar y caracterizar nuevos rasgos en células procariotas.

La cepa M1 objeto de estudio de esta tesis, es una bacteria aeróbica, Gram negativa, adaptada al frío que fue aislada por el grupo de la Dra. Elena Mercadé del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, a partir de una muestra de un sedimento marino procedente de la Isla Decepción (Islas Shetland del Sur, Antártida). Se trata de un bacilo corto, catalasa y oxidasa positivos y móvil gracias a la presencia de flagelo polar y que es capaz de crecer a temperaturas que oscilan entre los -4 y los 34°C (psicrotolerante). Recientemente, fue aceptada como una nueva especie bacteriana con el nombre de *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>.

Las primeras observaciones microscópicas de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> permitieron detectar unas estructuras intracitoplásmicas inusuales que aparentemente no coincidían con ningún cuerpo de inclusión o formación membranosa descrita hasta entonces en células procariotas, lo que nos llevó a pensar que podría tratarse de una nueva estructura procariota.

Así pues, el objetivo general de esta tesis ha sido caracterizar a nivel estructural un tipo de cuerpo de inclusión o estructura intracitoplásmica presente en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> mediante el uso de las técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión y Tomografía Electrónica, tanto a temperatura ambiente como en condiciones criogénicas.

Con el mencionado fin, se han establecido los objetivos concretos siguientes:

- Determinar las condiciones de crecimiento óptimas para la detección de la nueva estructura citoplásmica en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>.
- Optimizar las condiciones experimentales de procesamiento de las muestras para la observación de la nueva estructura citoplásmica en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y Criomicroscopía Electrónica de Transmisión.
- Caracterizar la nueva estructura mediante la combinación de técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión de muestras procesadas por criofijación a alta presión y criosustitución, por Tokuyasu, y de réplicas de criofractura.
- Caracterizar la nueva estructura mediante Criomicroscopía Electrónica de secciones vítreas, llevando a cabo la puesta a punto de la técnica de crioultramicrotomía de secciones vítreas (CEMOVIS).
- Caracterizar la nueva estructura de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> mediante Tomografía Electrónica tanto a temperatura ambiente a partir de secciones de resina (ET), como en condiciones criogénicas a partir de bacteria completa (CET) y de secciones vítreas (CETOVIS).
- Estudiar la función de las nuevas estructuras.

### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***



## **1. Cepas bacterianas y conservación**

Los estudios se llevaron a cabo principalmente en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> (LMG 25555<sup>T</sup>) aislada a partir de sedimentos recogidos de Isla Decepción (Antártida) y caracterizada por el grupo de trabajo de la Dra. E. Mercadé, en el Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. También se han ensayado otras cepas bacterianas dentro del género *Pseudomonas*: *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup>, *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup>, *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> y *P. guineae* M8<sup>T</sup> (LMG24016<sup>T</sup>), siendo esta última también perteneciente a la misma colección de bacterias adaptadas al frío aisladas a partir de muestras antárticas a la que pertenece *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. Asimismo, también se han empleado otras cepas bacterianas tipo como *Escherichia coli* W3310 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Las cepas se conservaron por resiembras en nevera a 4°C. Para su mantenimiento a largo plazo, se utilizó el sistema de CRYO-BILLES (AES, AEB400100, Combourg, Francia) y se congelaron a -80°C.

## **2. Medios de cultivo**

- Triptona Soja Agar (TSA, Oxoid) (g·L<sup>-1</sup>): peptona de caseína, 15; peptona de soja, 5; NaCl, 5; Agar, 15; pH 7,3
- Medio de Triptona Soja líquido (Oxoid) (g·L<sup>-1</sup>): peptona de caseína, 15; peptona de soja, 5; NaCl, 5.
- Agar Marino (pH 7,6, Difco) (g·L<sup>-1</sup>): peptona, 5; extracto de levadura, 1; NaCl, 19,45; FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 0,1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,24; MgCl<sub>2</sub>, 8,8; CaCl<sub>2</sub>, 1,8; KCl, 0,55; NaHCO<sub>3</sub>, 0,16; KBr, 0,08; SrCl<sub>2</sub>, 0,034; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,022; Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, 0,004; NaF, 0,0024; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,008; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,0016; Agar, 0,015.



- Infusión de Cerebro y Corazón Agar (BHI Agar, pH 7,4, Difco) ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): peptona, 10; infusión de corazón bovino, 10; infusión de cerebro bovino, 7,50; dextrosa, 2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5;  $\text{NaCl}$ , 5; Agar, 15.
- Medio Mínimo Líquido (MM3, pH 7,0) ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): glucosa (Fluka), 20; bacto-peptona (Oxoid), 0,5; extracto de levadura (Oxoid), 0,1;  $\text{NaNO}_3$  (Panreac), 7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Fluka), 2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 0,7;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 0,1;  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 0,018;  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (Panreac), 0,4; oligoelementos, 1mL).
- Caldo de Triptona y Soja solidificado (TSB Agar, pH 7,3, Oxoid) ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ): peptona de caseína, 17; peptona de soja, 3;  $\text{NaCl}$ , 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,5; glucosa, 2,5 Agar, 15).

### **3. Condiciones de cultivo**

En la mayoría de experimentos, las muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se cultivaron 12 días a 0°C en TSA. También se probaron otras condiciones de crecimiento para la cepa en TSA a 0°C: 6, 8, 9, 13, 15, 17, 20 y 30 días. Otras condiciones experimentales en TSA fueron: 11 y 13 días a 4°C, 5 días a 15°C y 48 h a 27°C. Adicionalmente se ensayaron otros medios de cultivo sólidos como el agar BHI 3 días a 15°C, TSB solidificado 4 días a 15°C y agar marino 15 días a 0°C. Todas las incubaciones se realizaron en condiciones de aerobiosis. Por otro lado, la cepa también se hizo crecer en cultivos líquidos como el MM3 durante 2, 10, 24, 48h y 6 días a 15°C y en TSA líquido durante 65h a 0°C, 46 y 48h a 15°C y 40h a 27°C.

Las cepas *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup>, *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup> y *P. guineae* M8<sup>T</sup> se cultivaron en TSA 12 días a 0°C, mientras que *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> también se hizo crecer en TSA 12 días pero a 4°C.

Finalmente, las muestras de *Escherichia coli* W3310 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se cultivaron en TSA 13d a 12°C.

En el apartado de Resultados se especificarán las condiciones de cultivo utilizadas en cada experimento.

## **4. Técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión**

### **4.1. Seguridad y precauciones generales durante el uso de nitrógeno líquido**

Antes de trabajar con LN<sub>2</sub> se deben conocer algunas de sus propiedades que pueden acarrear serios problemas para la salud. El LN<sub>2</sub> hierve a -196°C, de manera que cuando estamos manipulando este líquido, constantemente se está liberando gas nitrógeno (GN<sub>2</sub>) al ambiente. Es importante tener en cuenta que, al evaporarse el LN<sub>2</sub>, se expande en un ratio de 1:700 y que, una vez el GN<sub>2</sub> alcanza un porcentaje por encima del 78% en el aire, provoca la reducción del contenido de oxígeno por debajo del 21%, lo que, a su vez, puede producir inconciencia repentina, sin la existencia de síntomas previos, y, en el caso que se permaneciera inconsciente en este ambiente bajo en oxígeno, podría conducir a la muerte. Este hecho unido a que GN<sub>2</sub> es inodoro e insípido conlleva a que siempre se deba trabajar en lugares bien ventilados. Para asegurar una correcta ventilación del lugar de trabajo, es recomendable la utilización de un analizador de O<sub>2</sub> (en la escala de 0 a 25%) para evitar la caída de los niveles de oxígeno por debajo del 18%. Los objetos a temperatura ambiente que se quieran enfriar por contacto con LN<sub>2</sub> deben hacerlo por inmersión muy lenta. La inmersión de un objeto en LN<sub>2</sub>, provoca la formación de una capa de GN<sub>2</sub> que evita la transferencia elevada de calor. Durante este período inicial, se evapora poco LN<sub>2</sub>, sin embargo, una vez que el objeto se ha enfriado completamente suele ocurrir un fuerte burbujeo y producción de GN<sub>2</sub>.

Siempre que se manipule LN<sub>2</sub> se debe tener en cuenta que tanto su forma líquida como el gas que libera son extremadamente fríos, de manera que ambos estados pueden provocar quemaduras en piel y ojos. En el caso de

quemaduras por salpicaduras, aplicar inmediatamente abundante agua templada en la piel. Si las quemaduras son graves se debe acudir a un especialista. En el caso que el LN<sub>2</sub> afecte a los ojos, aplicar inmediatamente abundante agua templada y acudir a un especialista.

Las precauciones generales para trabajar con LN<sub>2</sub>:

- Utilizar gafas cubiertas lateralmente y abiertas por arriba y por abajo para permitir el escape de LN<sub>2</sub> en caso de salpicadura.
- Siempre que sea posible, no utilizar guantes ya que, si entrasen en contacto con el LN<sub>2</sub>, podrían provocar quemaduras en las manos. Si fueran necesarios, estos deben ser fácil y rápidamente retirables.
- Es recomendable el uso de calzado abierto y fácil de retirar para permitir la salida de LN<sub>2</sub> en caso de salpicadura o derrame. Se debe evitar el uso de calzado alto tipo bota. Sólo se pueden usar botas en caso de llevar pantalones anchos largos por fuera de las mismas.

#### **4.2. Crioinmovilización por enfriamiento a alta presión**

El equipo usado en nuestros experimentos de HPF es el EMPACT (Leica Microsystems, Vienna, Austria) que presenta sistemas de alta presión y de enfriamiento separados (Fig. 1).

Protocolo:

1. Preparación del equipo.
  - a. Conectar el equipo a la red eléctrica.
  - b. Encender el interruptor alimentador del EMPACT.
  - c. Abrir la entrada de GN<sub>2</sub> conectada al instrumento. Fijar una presión de al menos 8 atmósferas, para presurizar la cámara que contendrá las muestras.
  - d. Llenar el recipiente o Dewar con LN<sub>2</sub>.
  - e. Llenar el contenedor de metilciclohexano.



Figura 1. Equipo de HPF EMPACT de Leica Microsystems.

2. Preparación de la cámara para almacenar las muestras congeladas en el EMPACT.
  - a. Colocar el contenedor adecuado para las muestras que se van a congelar según el soporte metálico que se vaya a utilizar para crioinmovilizar la muestra (tubos de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro interior o Planchettes de 1,5 mm de diámetro y 200  $\mu\text{m}$  de profundidad).
  - b. Llenar la cámara con  $\text{LN}_2$ .
3. Preparación de la muestra:
  - a. Colocar las muestras a procesar cerca del equipo. Las muestras cultivadas a bajas temperaturas se mantienen a dicha temperatura hasta el momento de su procesamiento.
  - b. Seleccionar el tipo de soporte para la CF de las muestras según el proceso que seguirá la muestra. Las muestras que continuarán un proceso de FS e inclusión en resina se criofijarán en Planchettes, mientras que las que serán seccionadas directamente en condiciones vítreas se criofijarán en tubos de cobre.
  - c. Preparar agente crioprotector (dextrano al 30% en PBS;  $M_r$  del dextrano  $\sim 40000$ , procedente de *Leuconostoc sp.*). Sólo será necesario

en el caso de las muestras que serán seccionadas directamente en condiciones criogénicas (VIS).

- d. Montar las muestras en el soporte de CF, bajo lupa óptica y según el soporte de CF y el tipo de muestra:
  - i. Montaje en Planchette. Utilizar el soporte de montaje para Planchettes de Leica (Fig. 2).



Figura 2. Montaje de una muestra de cultivo en medio sólido en una planchette.

1. Cultivos en medios sólidos. Mezclar varias colonias aisladas, recoger una muestra con un palillo o un pincel y depositarla en la cavidad circular de la Planchette.
2. Cultivos en medios líquidos. Centrifugar a 3000 rpm 5 min hasta obtener un pellet y eliminar con una micropipeta el máximo de sobrenadante posible. Con la ayuda de una micropipeta, coger una pequeña cantidad del pellet y depositarla en la cavidad de la Planchette.

En cualquier caso, asegurarse de que no existen burbujas de aire que puedan dificultar la transmisión de la presión a través de la muestra.

- ii. Montaje en tubos de cobre (Fig. 3). Enganchar un cuadrado de Parafilm en la plataforma de observación de la lupa óptica con la ayuda de unas gotas de agua. Eliminar papel de recubrimiento de Parafilm y colocar una gota del agente crioprotector.
  1. Cultivos en medios sólidos. Mezclar varias colonias aisladas, recoger una muestra con un palillo o un pincel y depositarla en la gota de agente crioprotector sobre el Parafilm. Disgregar al

máximo la muestra en la gota evitando la formación de burbujas de aire. Con una micropipeta coger un volumen y rellenar el tubo de cobre bajo la lupa evitando la formación de burbujas.

2. Cultivos en medios líquidos. Centrifugar a 3000 rpm 5 min y descartar el máximo de sobrenadante. Con una micropipeta coger un volumen directamente del pellet y depositarlo en la gota de dextrano al 30% en PBS. Homogeneizar la gota, recoger un volumen con la micropipeta y rellenar el tubo de cobre bajo la lupa evitando la formación de burbujas.

En cualquier caso, se recomienda montar la muestra en el soporte elegido y criofijarla en menos de un minuto para evitar alteraciones estructurales.

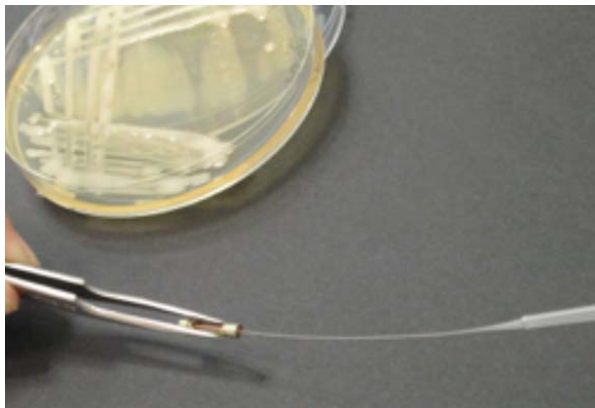


Figura 3. Montaje de una muestra de cultivo en medio sólido en un tubo de cobre.

4. Fijar el cilindro de manipulación al soporte que contiene la muestra y, a continuación, transferir la muestra al interior de la cámara de CF.
5. CF.
  - a. Pulsar “lock” en la pantalla del instrumento de HPF para cerrar la cámara.
  - b. Pulsar “start” también en la pantalla del equipo para permitir que la presión aumente en la cámara. Una vez la presión alcance 2000 bares, se aplicarán dos chorros de LN<sub>2</sub> que criofijarán la muestra.
6. Almacenamiento de las muestras.
  - a. Las muestras crioinmovilizadas caerán automáticamente en el LN<sub>2</sub>.

- b. Retirar el cilindro de manipulación de los soportes contenedores de la muestra, permaneciendo éstas sumergidas bajo el LN<sub>2</sub>.
  - c. Transferir las muestras criofijadas a una caja de almacenaje de muestras siempre bajo LN<sub>2</sub>.
  - d. Preparar criotubos para guardar cada una de las muestras diferentes criofijadas a los que previamente se les ha realizado cuatro agujeros en la parte superior, que permitirán la entrada de LN<sub>2</sub> en contacto con las muestras.
  - e. Con la ayuda de pinzas, enfriar los tubos sumergiéndolos en un contenedor con LN<sub>2</sub> sin muestras cercanas para evitar la transferencia de calor a las mismas, hasta que alcancen la temperatura del LN<sub>2</sub>, momento en el que cesará el burbujeo. Una vez enfriados, transferirlos de uno en uno al contenedor del equipo donde se encuentran las muestras, guardar las Planchettes correspondientes en su interior en todo momento bajo LN<sub>2</sub>, cerrar el tubo y transferirlo a otro contenedor con LN<sub>2</sub>. Hay que asegurarse de que todo el material está bien frío antes de entrar en contacto con la muestra para evitar la transferencia de calor que dañaría su conservación. Los criotubos, una vez enfriados, deben permanecer el mínimo tiempo posible fuera del LN<sub>2</sub> para evitar al máximo la contaminación de las muestras por cristales de agua ambiental.
  - f. Con la ayuda de unas pinzas aislantes, fijar los criotubos en una caña previamente enfriada en LN<sub>2</sub> e introducirla seguidamente en una de las cestas o Canisters que contiene en su interior Dewar de almacenaje de muestras hasta la continuación del proceso.
7. Apagar el equipo.
- a. Pulsar “shut down” en la pantalla.
  - b. Vaciar el Dewar de LN<sub>2</sub>.
  - c. Activar el sistema “bake out” en la pantalla para secar el instrumento.
  - d. Apagar el interruptor alimentador una vez acabado el ciclo de secado.

### 4.3. Crioimmobilización por “Plunge Freezing”

#### 4.3.1. Crioimmobilización por Vitrobot™

El equipo utilizado en nuestros experimentos para crioimmobilizar muestras por PF es el Vitrobot™ (“Vitrification Robot”; FEI, Eindhoven, The Netherlands), que se lleva a cabo de forma semiautomática bajo condiciones de temperatura y humedad controladas y que está completamente dirigido por ordenador (Fig. 4).



Figura 4. Equipo Vitrobot™ para la crioimmobilización de muestras por PF.

Protocolo:

1. Preparación del equipo.
  - a. Rellenar el humidificador con agua destilada.
  - b. Activar el flujo de aire presurizado conectado al instrumento.
  - c. Encender el Vitrobot™. Automáticamente el PC conectado al equipo se encenderá y se abrirá el programa que lo controla (“Vitrobot User Interface”).
2. Preparación de la “User Interface”.
  - a. Fijar la temperatura de la cámara climatizada a 25°C.
  - b. Fijar la humedad de la cámara climatizada al 100%.
  - c. Encender la luz de la cámara climatizada.
  - d. Seleccionar la aplicación manual de la muestra.
  - e. Seleccionar el número de “blots” a 1 (“blot total”).



- f. Seleccionar el tiempo de cada “blot” a 1 (“blot time”).
  - g. Seleccionar la posición de la rejilla entre las almohadillas de “blotting” a 2 (“blot offset”). Ésta determinará la fuerza a la que el exceso de líquido se extraerá de la rejilla.
3. Preparación de la cámara climatizada.
    - a. Verificar que las luces están encendidas y que el control de la presión neumática está activo.
    - b. Fijar los papeles de filtro para el “blotting” en las almohadillas utilizando lo anillos clip blancos.
  4. Preparación de la muestra.
    - a. Con ayuda de un palillo, recoger colonias bacterianas aisladas de la placa y depositarlas en 500  $\mu$ L de agua milliQ hasta obtener una turbidez elevada (aproximadamente 10 en escala McFarland).
    - b. Agitar con equipo Vortex la muestra hasta que no queden agregados.
    - c. Centrifugar la muestra 8 min a 3000 rpm.
    - d. Descartar el sobrenadante y resuspender en 500  $\mu$ L de agua milliQ.
    - e. Agitar con equipo Vortex la muestra hasta que no queden agregados.
    - f. Centrifugar la muestra 8 min a 3000 rpm.
    - g. Descartar el sobrenadante y resuspender en 250  $\mu$ L de agua.
    - h. Agitar con equipo Vortex la muestra hasta que no queden agregados.
  5. Preparación de la rejilla, justo antes de empezar el experimento.
    - a. Colocar las rejillas Holey Carbon o Quantifoil que van a ser utilizadas en el experimento sobre un trozo de Parafilm en una placa de Petri.
    - b. Hacer un tratamiento de luz ultravioleta (UV) a las rejillas con el equipo “Glow-Discharge” (BALTEC modelo CTA005). Este tratamiento hace la superficie de carbón de las rejillas más hidrofílica asegurando una dispersión uniforme de la muestra sobre la rejilla.
      - Abrir la cámara y depositar la placa abierta. Fijar el tiempo de exposición deseado entre 30 s y 1 min.
      - Pulsar el interruptor del equipo y esperar a que se alcance la presión adecuada (aproximadamente  $10^{-2}$  mbar, justo cuando se empiezan a encender leds amarillos en el cuadro de control).

- Pulsar “start” en el cuadro de control. Se encenderá la luz UV en la cámara y en el cuadro de control aparecerá un contador. Una vez se alcance el tiempo ajustado, se apagará la luz UV, apagar entonces el interruptor del equipo y esperar unos segundos a que se vaya el vacío de la cámara.
    - Abrir la cámara, coger la placa con las rejillas y acercarlas al equipo para empezar la CF.
  - c. Clicar “place new grid” para que el soporte de las pinzas se coloque en el lugar adecuado.
  - d. Pinzar una rejilla de las preparadas con la pinza del Vitrobot.
  - e. Fijar la pinza al eje central del Vitrobot, teniendo en cuenta que la cara de la rejilla que contiene el carbón debe quedar encarada a la puerta lateral de la cámara climatizada.
  - f. Clicar “continue” para levantar la pinza con la rejilla a la cámara climatizada.
6. Preparación del contenedor enfriador.
- a. Rellenar con LN<sub>2</sub> el contenedor y esperar hasta que todas las partes hayan alcanzado la temperatura del LN<sub>2</sub>, momento en que el burbujeo cesará.
  - b. Licuar el etano en el contenedor destinado a ello dentro del contenedor de LN<sub>2</sub>.
  - c. Colocar el contenedor de LN<sub>2</sub> en el anillo-plataforma bajo el Vitrobot.
  - d. Clicar “continue” que elevará el contenedor hacia la parte inferior de la cámara climatizada.
7. Aplicación de la muestra.
- a. Clicar “start process” para posicionar la rejilla a la altura de la puerta lateral.
  - b. Con ayuda de una micropipeta, coger un volumen de 5 µl de la muestra preparada.
  - c. Abrir manualmente la puerta lateral de la cámara climatizada.
  - d. Introducir la pipeta por el lateral y depositar la gota de muestra sobre la rejilla sujeta por las pinzas en el interior de la cámara climatizada,

con la precaución de no tocar la rejilla con la punta de la pipeta para no doblarla.

- e. Cerrar la puerta lateral.
8. “Blotting” y CF.
    - a. Clicar “continue” para eliminar el exceso de suspensión de la rejilla por “blotting” con los papeles de filtro previamente colocados. El proceso es automatizado y se llevará a cabo con las condiciones de “blotting”, tiempo y fuerza seleccionadas en el paso 2.
    - b. Seguidamente y automáticamente las pinzas se inyectan al etano líquido. El eje sostenedor de las pinzas es impulsado por aire a presión hacia el LN<sub>2</sub> con una aceleración tres veces mayor que la fuerza gravitacional.
  9. Transferencia de la rejilla tras la CF.
    - a. Siempre manteniendo la rejilla bajo el etano y con cuidado de no colisionar la rejilla con las paredes del recipiente contenedor del etano, desenganchar las pinzas del eje central del Vitrobot.
    - b. Transferir la rejilla crioinmovilizada al rejillero previamente sumergido en LN<sub>2</sub>. La salida de la rejilla del etano debe hacerse poco a poco para que el etano remanente en la superficie de la rejilla sea mínimo. Una vez fuera, la rejilla debe ser rápidamente sumergida en LN<sub>2</sub> y, a continuación, ésta ya puede introducirse en una de las cuatro posiciones del rejillero. Anotar la posición del rejillero que ocupa cada una de las muestras que se va almacenando.
    - c. Enfriar la tapa del rejillero y enroscarla en el mismo.
    - d. Preparar un Dewar con LN<sub>2</sub> y enfriar un tubo Falcon modificado abierto para guardar el rejillero. Los Falcons modificados constan de cuatro agujeros en la parte superior del tubo, que permite la entrada de LN<sub>2</sub> en su interior, y un hilo largo que atraviesa el tapón por arriba y queda enganchado a la pared del tubo, que hace que el tapón y el tubo permanezcan unidos una vez abierto facilitando la manipulación bajo LN<sub>2</sub>.
    - e. Transferir el rejillero al interior del Falcon modificado abierto y cerrarlo. La transferencia del rejillero debe ser muy rápida para evitar la

transferencia de calor a la muestra y la contaminación por cristales de agua.

- f. Transferir el Falcon cerrado al Dewar de almacenamiento de muestras dejando parte del hilo fuera del mismo. Fijar el hilo al Dewar con cinta adhesiva y anotar la muestra en la misma. Las rejillas permanecerán almacenadas hasta el momento de su observación en el cryo-TEM.

#### 10. Desconexión del Vitrobot.

- a. Apagar el interruptor del equipo.
- b. Apagar el ordenador.
- c. Vaciar el humidificador.

### **4.3.2. Crioinmovilización por “Plunge Freezing” manual**

Esta técnica ha sido utilizada con la finalidad de preparar las muestras que posteriormente seguirán la técnica criofractura (FF). Con este objetivo, la muestra es aplicada entre dos piezas de cobre formando un sándwich y, seguidamente, crioinmovilizada por inmersión en propano. El recipiente metálico utilizado para la CF consta de un cubo grande, que contendrá el LN<sub>2</sub>, una plataforma que se acopla en su interior y en la que se encaja un recipiente más pequeño, que contendrá el propano.

Protocolo:

1. Colocar las placas de cobre que formarán los sándwiches con la muestra en un vaso de precipitado y, en la campana de gases y con protección de guantes, cubrirlos con ácido sulfúrico. Agitar levemente y descartar el ácido sulfúrico.
2. Cubrir las piezas de cobre con agua destilada, agitar y descartar el contenido. Repetir este paso varias veces.
3. Cubrir de nuevo con acetona, descartar la acetona y poner el vaso de precipitado en una estufa a 40°C hasta que queden bien secos.
4. Preparar todo el material necesario para la CF sobre la poyata: recipiente metálico para la CF, pinzas aislantes del frío, recipientes de aluminio, lupa, criotubos, muestra crecida en medio sólido, placas de cobre para formar los

- sándwiches ya limpias, rejillas de oro, bisturí, papel de filtro, palillos de dientes.
5. Rellenar con LN<sub>2</sub> el recipiente grande y esperar hasta que todas las partes hayan alcanzado la temperatura del LN<sub>2</sub>, momento en que el burbujeo cesará.
  6. Licuar el propano en el contenedor destinado a ello dentro del contenedor de LN<sub>2</sub>.
  7. Bajo la lupa y con ayuda de un bisturí, rayar la superficie de las placas de cobre que se van a utilizar para formar los sándwiches.
  8. Utilizar un palillo recoger varias colonias aisladas de la muestra y colocarlas encima de la parte rayada de una pieza de cobre.
  9. Situar la rejilla de oro encima de la muestra y colocar más muestra del mismo modo que en el paso 8 encima de la rejilla.
  10. Formar el sándwich con la otra mitad de cobre y con papel de filtro eliminar el exceso de muestra en los bordes del sándwich.
  11. Con unas pinzas aislantes, coger el sándwich, sumergir en el propano aplicando fuerza y agitando vigorosamente para que el calor se disipe rápidamente dentro del propano, y, seguidamente, sumergir en LN<sub>2</sub> y depositar en un recipiente de aluminio.
  12. Repetir los pasos 8, 9, 10 y 11 para cada muestra que se quiera crioinmovilizar.
  13. Preparar criotubos para guardar cada una de las muestras diferentes crioinmovilizadas a los que previamente se les ha realizado cuatro agujeros en la parte superior, que permitirán la entrada de LN<sub>2</sub> en contacto con las muestras.
  14. Con la ayuda de pinzas, enfriar los criotubos sumergiéndolos en el contenedor de LN<sub>2</sub> hasta que alcancen la temperatura del LN<sub>2</sub>, momento en el que cesará el burbujeo.
  15. Guardar los sándwiches en su interior en todo momento bajo LN<sub>2</sub> y cerrar el criotubo.
  16. Con la ayuda de unas pinzas aisladas, fijar los criotubos en una caña previamente enfriada en LN<sub>2</sub> e introducirla en uno de los Canisters del Dewar de almacenaje de muestras hasta la continuación del proceso. Anotar el nombre de la caña y su ubicación en el Dewar.

#### 4.4. Criosustitución

El equipo utilizado en nuestros experimentos de FS ha sido el AFS (“Automatic Freeze Substitution”) de Leica EM, que permite la FS automática previamente programada por el usuario. El equipo consta de tres módulos: la unidad de control, que permite el almacenaje de hasta 9 programas diferentes; la cámara de sustitución, en la que tiene lugar la FS, la infiltración, la inclusión y la polimerización; y el Dewar, que permite mantener la temperatura deseada durante todo el proceso.



Figura 5. Equipo AFS de Leica.

Protocolo:

1. Preparación de medios de FS. Los medios utilizados en nuestros experimentos según su objetivo han sido:
  - a. Medios utilizados para la observación de la ultraestructura:
    - 2%  $\text{OsO}_4$  0,1% UA en acetona (McDonald and Morphew, 1993).
    - 1%  $\text{OsO}_4$  0,25% GA en acetona (Murk et al., 2003).
    - 1%  $\text{OsO}_4$  0,1% UA 1-5% agua en acetona (Walther and Ziegler, 2002).
    - 2%  $\text{OsO}_4$  0,1% GA en acetona (Jiménez et al., 2009).
    - 1%  $\text{OsO}_4$  0,5% UA 3% GA en metanol (Van den Bergh et al., 1997).

- b. Medios utilizados para la posterior inmunocitoquímica de las muestras:
- 0,5% UA en acetona.
  - 0,5% UA en metanol.
  - 2% UA 1% agua en acetona.

Preparar los medios de FS con antelación al proceso, manteniendo un Stock congelado. Prepararlos protegidos de la luz, en campana y con guantes. Justo después de su preparación, alicuotarlos en criotubos no agujereados y cerrarlos. Fijar los tubos en una caña y sumergirla lentamente en LN<sub>2</sub> con ayuda de unas pinzas aisladas hasta alcanzar la temperatura del mismo. Una vez congelados, almacenar la caña en un Canister del Dewar de almacenamiento de muestras hasta su utilización. El OsO<sub>4</sub>, presente en la mayoría de medios de FS, se oxida rápidamente en presencia de luz, cambiando progresivamente su color de amarillo a marrón y perdiendo su efectividad. Si este cambio ocurre, descartar el medio.

2. Preparación del equipo.
- a. Conectar el equipo a la red eléctrica.
  - b. Levantar la placa de cristal móvil de la cámara de FS y abrirla deslizando la tapa de cristal hacia atrás.
  - c. Abrir la tapa de la abertura de llenado de LN<sub>2</sub> (en el centro de la cámara de FS), insertar el embudo y rellenar con LN<sub>2</sub> todo el Dewar del equipo (el diagrama del Dewar en el panel de control muestra todas las luces encendidas).
3. Programar el AFS en el panel de control. Hay que tener en cuenta el diagrama de la curva de temperaturas que se compone de varias etapas (T1, S1, T2, S2, T3). Las etapas "T" corresponde a aquellas en las que la temperatura se mantiene constante, mientras que las etapas "S" son aquellas en las que existe una subida de la temperatura).
- a. Pulsar el botón "T1" y seleccionar la temperatura de FS deseada ("temp" en el panel de control) pulsando los botones "+" o "-". Seleccionar también el tiempo deseado para T1 ("time") con "+" o "-".
  - b. T2, T3 se programan de la misma forma que T1.

- c. Pulsar el botón “S1” y seleccionar el la tasa de aumento de temperatura usando “+” o “-” “temp”.
- d. S2 se programa de la misma forma. El intervalo de tiempo requerido para los procesos de calentamiento y enfriamiento entre T1-T2 y T2-T3 aparece automáticamente en la pantalla de tiempo.
- e. Pulsar “store” seguido por el número de memoria deseado (“memory”). Pulsar “start” y seguidamente “pause” y esperar a que el equipo alcance la temperatura deseada de iniciación de la FS.

*Programas de FS usados según el objetivo:*

- a. Estudio de la Ultraestructura.

Etapa	Reactivo	Duración / Tasa	Temperatura / Temperatura final
T1	Medio FS	72h	-90°C
S1	Medio FS	5°C/h	4°C
T2	Medio FS	2h	4°C

- b. Estudio de Inmunocitoquímica.

Etapa	Reactivo	Duración / Tasa	Temperatura / Temperatura final
T1	Medio FS	72h	-90°C
S1	Medio FS	3°C/h	-50°C / -40°C (HM20 / HM23)
T2	Acetona Lowicryl:Acetona (V:V) Lowicryl	96h	-50°C / -40°C (HM20 / HM23)
S2	Lowicryl	5°/h	22°C
T3	Lowicryl	24h	22°C



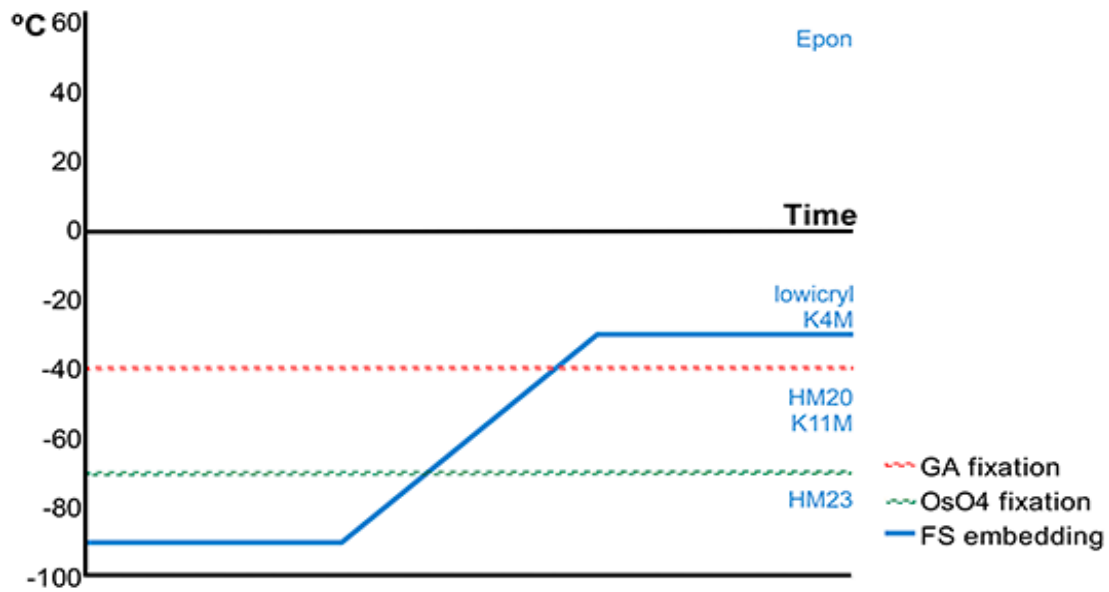


Figura 6. Diagrama de la curva de temperatura del proceso de FS. Se muestran las temperaturas mínimas a las que polimerizan las resinas EPON, Lowicryl K4M, Lowicryl HM20, Lowicryl K11M y Lowicryl HM23. También se observan las temperaturas a las que actúan los fijadores GA y OsO<sub>4</sub>.

#### 4. Preparación de las muestras para la FS.

- a. En un Dewar con LN<sub>2</sub> recuperar la caña contenedora del medio de FS deseado y la caña contenedora de las muestras.
- b. Llenar un recipiente de poliestireno con LN<sub>2</sub> hasta un nivel suficiente para tapar los criotubos en posición vertical. Introducir contenedores de aluminio y esperar hasta que se enfríen.
- c. Con ayuda de las pinzas aisladas, recuperar los criotubos que contienen las Planchettes crioinmovilizadas y los criotubos contenedores de los medios de FS y trasladarlos rápidamente en los contenedores de aluminio dentro del recipiente de poliestireno con LN<sub>2</sub>.
- d. Con la ayuda de dos pinzas y con los criotubos en todo momento bajo LN<sub>2</sub>, abrir los criotubos contenedores de Planchettes.
- e. Sacar fuera del LN<sub>2</sub> los tubos contenedores de medio de FS y esperar aproximadamente un minuto. Con las manos protegidas con guantes de algodón y guantes de nitrilo encima, ir de uno en uno desenroscándolos, sin llegar a abrirlos del todo, sumergiéndolos de nuevo bajo el LN<sub>2</sub>, acabándolos de abrir con la ayuda de las pinzas y colocándolos abiertos en un contenedor de aluminio. Los criotubos con

el medio de FS congelado cuestan mucho de abrir directamente bajo  $\text{LN}_2$ , ya que al congelarlos el aire que había en el interior se comprime. Si lo dejamos cierto tiempo fuera del  $\text{LN}_2$ , éste se descomprime y permite que desenrosquemos. En este paso es necesario llevar guantes de nitrilo encima de los de algodón porque al desenroscar los criotubos siempre se escapan vapores de fijadores presentes en el medio de FS.

- f. Utilizando las pinzas coger cada Planchette que se quiere criosustituir e introducirla en un criotubo con medio de FS. Hay que tener la precaución de enfriar bien las pinzas antes de tocar las Planchettes y de que las Planchettes nunca superen el nivel del  $\text{LN}_2$ .



Figura 7. Transferencia de una Planchette con muestra a un criotubo que contiene el medio de FS.

- g. Bajo la lupa y con la ayuda de las pinzas colocar las Planchettes con la muestra mirando hacia abajo (cara la superficie del medio de FS congelado) y tapar todos los criotubos.
  - h. Fijar los criotubos con Planchettes que no se vayan a utilizar en sus correspondientes cañas y guardar éstas en su Canister correspondiente dentro del Dewar de almacenamiento de muestras.
5. Iniciación de la FS.
- a. Asegurarse de que el equipo ha alcanzado la temperatura deseada. Abrir la tapa del AFS y deslizarla hacia atrás. Con ayuda de las pinzas aislantes, transferir desde el poliestireno los recipientes de aluminio con los criotubos con medio de FS y muestra al interior de la cámara de sustitución del AFS.

- b. Pulsar de “pause” para iniciar el programa. Tras cierto tiempo tras la iniciación del programa, el medio de FS se habrá atemperado y presentará un estado líquido. Cuando esto haya ocurrido, abrir la tapa del AFS deslizándola hacia atrás y, con ayuda de una lupa y unas pinzas, darle la vuelta a las Planchettes que estarán ahora en el fondo de los tubos. Con ello se consigue que ahora que el medio se ha licuado, la muestra permanezca en contacto con la mayor parte de medio de FS. Finalmente, cerrar la cámara de sustitución y dejar que continúe el programa iniciado.
6. Proceso de la FS. Según el tipo de programa elegido es necesario realizar cambio de soluciones durante el proceso de FS.
    - a. En el caso de las muestras dirigidas al estudio de la ultraestructura, esperar que finalice el programa completo a 4°C (ver más arriba el cuadro del programa con las etapas). Tras la FS, los contenedores de aluminio con los criotubos se trasladan con unas pinzas directamente del AFS a la campana extractora de gases a temperatura ambiente para continuar el proceso fuera ya del equipo de FS. Una vez en la campana de gases, mantener las muestras dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este tiempo, lavar con acetona el medio de FS usando pipetas Pasteur. Realizar cuatro lavados de 15 min. A partir de aquí, las muestras deben ser incluidas en resina epóxica con el objetivo de fabricar bloques duros que contendrán la muestra y que podrán ser cortados (ver más abajo el apartado 4.5).
    - b. En el caso de las muestras dirigidas al estudio de la inmunocitoquímica todo el proceso hasta la obtención de bloques de Lowicryl tiene lugar en el interior del AFS (ver más arriba el cuadro del programa con las etapas). Tras la FS y subida de la temperatura a -50°C o a -40°C según si la resina de inclusión será Lowicryl HM20 o Lowicryl HM23 (etapas T1 y S1) tiene lugar la etapa T2. Al empezar, las Planchettes se transfieren a tubos Eppendorf de baja adherencia dónde tendrán lugar una serie de cambios con pipetas Pasteur desechables (Fig. 8). Es importante introducir previamente el reactivo a utilizar en un recipiente en la cámara de sustitución y esperar unos minutos a que se atempere.
      - Hacer cuatro lavados de 15 min con acetona.

- Lowicryl:Acetona (1:3) 2h.
- Lowicryl:Acetona (2:2) 2h.
- Lowicryl:Acetona (3:1) 2h.
- Lowicryl 1h.
- Lowicryl toda la noche.
- Lowicryl 2h.
- Dejar los tubos abiertos, colocar el anillo protector sobre los tubos y deslizar la puerta de la cámara de sustitución. Encajar la lámpara de luz UV encima de la cámara y encenderla (asegurarse de que la LED azul está encendida en el diagrama del AFS. Se dejará actuar 72h en las que tendrá lugar la polimerización.



Figura 8. Cambio de soluciones en el interior de la criocámara del AFS de Leica.

Una vez finalizados los mencionados pasos, comienza la fase S2, en la que la temperatura irá subiendo a 5°C/h hasta alcanzar los 22°C. En este punto, las muestras se mantendrán durante 48h a esta temperatura (T3) para permitir el endurecimiento de los bloques de Lowicryl. Pasado este tiempo se pueden extraer los bloques del AFS y únicamente es necesario retirar los bloques de los tubos Eppendorf de baja adherencia (dando unos golpes con el tubo Eppendorf sobre la poyata los bloques se acaban desenganchando) (Fig. 9).



Figura 9. Bloques de resina Lowicryl HM23.

#### **4.5. Inclusión de muestras en resina EPON y confección de bloques**

Una vez las muestras han sido criosustituidas de acuerdo al programa indicado para el estudio de la ultraestructura, han permanecido 2h en oscuridad a temperatura ambiente y han sido lavadas con acetona con el objetivo de eliminar completamente el medio de FS, éstas deben ser sometidas a un proceso de infiltración con resina EPON que debe realizarse en campana de gases y con el uso de guantes de nitrilo:

Protocolo:

1. Extraer la acetona de la muestra y añadir una solución de EPON:Acetona 1:3. Dejar en una noria de agitación durante 3h.
2. Descartar la solución anterior y añadir una solución de EPON:Acetona 2:1. Dejar en una noria de agitación durante 3h.
3. Descartar la solución anterior y añadir una solución de EPON:Acetona 3:1. Dejar en agitación durante toda la noche.
4. Descartar la solución anterior y añadir resina EPON sin catalizador. Dejar en agitación 6h.
5. Renovar el EPON sin catalizador de la muestra y dejar en agitación durante toda la noche.
6. Renovar el EPON sin catalizador y dejar en agitación durante 6h.

7. Renovar el EPON sin catalizador y dejar en agitación durante toda la noche.
8. Eliminar el EPON sin catalizador y sustituirlo por EPON con catalizador. Dejar en agitación 3-4h.
9. Preparar la lupa cerca de la ventana abierta, proteger la mesa con papel de filtro, preparar los moldes para la confección de bloques y el material necesario para la confección de los mismos: pipetas Pasteur, papel para limpiar, placas de Petri, bisturí, pinzas y palillos de dientes.
10. Colocarse la máscara de protección de agentes químicos y trasladar las muestras y la resina con catalizador a la zona de trabajo.
11. Sacar la Planchette del tubo y ponerla encima de una placa de Petri. Con ayuda de un bisturí, hacer saltar la muestra de la Planchette. Poner un poco de EPON con catalizador en un pocillo del molde, coger la muestra de la placa con un palillo y trasladarla al pocillo. Repetir el proceso con todas las muestras llenando un pocillo diferente cada vez.
12. Rellenar todos los pocillos con muestra con resina con catalizador.
13. Meter los moldes en la estufa a 60°C y dejarlos polimerizar 48h.
14. Limpiar toda la zona de trabajo inmediatamente después de finalizar los bloques.
15. Transcurrido este tiempo, sacar los moldes de la estufa y sacar los bloques polimerizados (Fig. 10). La resina una vez polimerizada, no presenta toxicidad.

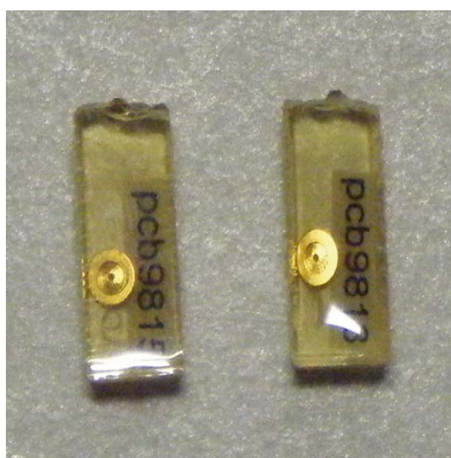


Figura 10. Bloques de resina EPON.

#### **4.6. Preparación de muestras por el método de Tokuyasu**

Se trata de una técnica introducida por Tokuyasu que consiste en la utilización de sacarosa como agente crioprotector tras la fijación química y previamente a su congelación por inmersión en LN<sub>2</sub> (Tokuyasu, 1973). La sacarosa evita la formación de cristales en la muestra durante la congelación y permite que la muestra se pueda seccionar de un modo relativamente sencillo.

Protocolo:

1. Con ayuda de un palillo recoger varias colonias aisladas de bacterias y disolverlas en 4% paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato 0,1 M (PB) o en tampón PHEM 0,1 M (2 mM Hepes, 60 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2-7,6) en un Eppendorf. Dejar actuar 1 h. Tras la fijación, si no se va a continuar el proceso el mismo día, se puede centrifugar a 3000 rpm 5 min, descartar el sobrenadante y almacenar la muestra en una solución 2% PFA en el mismo tampón usado durante la fijación a 4°C.
2. Centrifugar a 3000 rpm 5 min, descartar el sobrenadante, añadir glicina 50 mM en PB o en PHEM 0,1 M (según tampón usado inicialmente), disgregar el pellet y dejar a 4°C 10 min. Repetir 4 veces. La glicina inactiva los grupos aldehído del GA.
3. Centrifugar a 3000 rpm 5 min.
4. Inclusión con 12% gelatina en PB o PHEM 0,1 M.
  - a. Descartar el sobrenadante y añadir 12% gelatina en PB o PHEM 0,1 M atemperada a 37°C, resuspender el pellet y dejar 20 min a 37°C.
  - b. Centrifugar a 3000 rpm 10 min a 37°C.
  - c. Descartar el sobrenadante y añadir 12% gelatina en PB o PHEM 0,1 M a 37°C y dejar 15 min a 37°C.
  - d. Centrifugar a 3000 rpm 10 min a 37°C.

Guardar las pipetas Pasteur en la estufa a 37°C durante los cambios para evitar la solidificación de la gelatina durante el proceso.

5. Dejar las muestras en hielo 30 min para que se endurezca la gelatina.
6. Preparación de los fragmentos de muestra bajo la lupa con la ayuda de un bisturí con mango.

- a. Cortar la punta del Eppendorf donde se encuentra el pellet y, a continuación, cortar la punta en dos partes.
  - b. Descartar el plástico y recuperar la gelatina.
  - c. Cortar la muestra incluida en la gelatina en fragmentos pequeños.
7. Poner los fragmentos en un Eppendorf con sacarosa 2,3 M. Colocarlo en una noria de agitación dentro de una cámara a 4°C durante toda la noche.
  8. Montar los fragmentos de muestras en soportes Pins (Leica) con ayuda de la plataforma de montaje de Pins de Leica, pinzas y bajo la lupa. Antes de montar los Pins, rayar con ayuda de un bisturí la superficie del Pin para mejorar la adhesión de la muestra. Montar el fragmento en un lateral del Pin (Fig. 11).



Figura 11. Soportes Pins en la plataforma de montaje (Leica). En el Pin situado más a la derecha se observa un fragmento de muestra ya montado en una zona lateral de la superficie circular.

9. Congelar los Pins sumergiéndolos en LN<sub>2</sub> con ayuda de unas pinzas (Fig. 12).



Figura 12. Congelación de un Pin que contiene una muestra por inmersión en LN<sub>2</sub>.



10. Guardar los Pins montados en criotubos perforados y los criotubos en un Dewar de almacenamiento de muestra (ver apartado 4.2).

#### **4.7. Ultramicrotomía**

Esta técnica consiste en la obtención de secciones suficientemente delgadas de la muestra que permitan el paso de electrones a través de ellas y, por lo tanto, su observación en el TEM. Según si las muestras se han preparado en bloques de resina, en Pins o en tubos de cobre, la ultramicrotomía se hará a temperatura ambiente o a bajas temperaturas (crioultramicrotomía), variando las condiciones de corte. El equipo utilizado en nuestros experimentos es el Ultracut UC6 de Leica, que consta del panel de control táctil, el ultramicrotomo, la criocámara acoplable al ultramicrotomo y con iluminación LED integrada, el equipo ionizador con control remoto (CRION), la bomba de LN<sub>2</sub> y el Dewar de LN<sub>2</sub> con ruedas (Fig. 13).



Figura 13. Equipo Ultramicrotomo UC6 de Leica.

##### **4.7.1. Obtención de secciones vítreas**

Los tubos de cobre que contienen la muestra crioinmovilizada por HPF (ver apartado 4.2) seguirán este proceso con el objetivo de conseguir secciones

muy delgadas de la muestra crioinmovilizada para su visualización en el TEM en condiciones de frío (cryo-TEM).

Protocolo:

1. Preparación del equipo y del material de trabajo.
  - a. Encender el interruptor localizado en el panel de control.
  - b. Preparar el sistema de para mantener la humedad cercana al 0% en el equipo. En nuestros experimentos se ha utilizado la “cryo-box” (Pierson et al., 2010) y las placas de criocámara (Studer et al., 2014), obteniéndose resultados satisfactorios con ambos sistemas. La “cryo-box” es una cámara de policarbonato transparente que envuelve todo el ultramicrotomo dónde se insufla  $\text{GN}_2$  para mantener en su interior una atmósfera baja en humedad. Esta cámara presenta cavidades para introducir las manos y manipular en su interior (Fig. 14). Las placas de criocámara son unas placas de policarbonato transparentes que se acoplan y tapan la criocámara, manteniendo en su interior una concentración baja humedad y que presentan orificios para introducir las herramientas necesarias para manipular en su interior.



Figura 14. Ultramicrotomo UC6 montado para crioultramicrotomía (criocámara FC6) de VIS con la “cryo-box” (“Cryo-sphere anti-contamination glove-box”).

- c. Acoplar la criocámara al ultramicrotomo y conectar el tubo de la misma al Dewar.
- d. Encender el interruptor controlador de la criocámara.

- e. Rellenar el Dewar con LN<sub>2</sub> hasta que el dibujo del mismo en la pantalla del panel de control aparezca completamente lleno (color azul).
- f. Introducir en la parte frontal del brazo el portamuestras para tubos de cobre de Leica. Montar las cuchillas en el portacuchillas de Leica y fijar encima, con la herramienta indicada, la plataforma de Leica para mejorar mecánicamente la adherencia de las secciones en la rejilla. Con la ayuda de la herramienta de Leica adecuada, introducir todo el montaje en el interior de la cámara haciéndolo coincidir con el Pin que se encuentra en la parte inferior de la cámara con la cavidad correspondiente en el portacuchillas. El portacuchillas de Leica permite la fijación de dos cuchillas, poner una cuchilla de piramidar en la parte derecha y una cuchilla de diamante para realizar los cortes ultrafinos en la parte izquierda. Es importante extremar las precauciones en el movimiento de las cuchillas ya que el filo está muy afilado y podría dañarse con el mínimo contacto con cualquier objeto sólido. La cuchilla utilizada para piramidar es la “cryotrim 45° tool” (DIATOME), mientras que la utilizada para la obtención de VIS es la “CEMOVIS 35° knife” (DIATOME) (Fig. 15).
- g. En el panel de control seleccionar las temperaturas del brazo del portamuestras, de la cuchilla y de la cámara a -150°C y seleccionar “start”, que activará el sistema automático de bombeo de LN<sub>2</sub> al tanque que se encuentra en la pared de la criocámara. En el panel de control se puede observar cómo va bajando las temperaturas del brazo del portamuestras, del portacuchillas y de la cámara a medida que procede el bombeo de LN<sub>2</sub>, esperar a que la temperatura sea -150°C en las tres medidas.
- h. Preparar el material para trabajar en la mesa del ultramicrotomo: bastones de madera largos con un pelo enganchado en la punta, herramientas de Leica, rejillas Quantifoil o Holey Carbon, pinzas cruzadas del número 4 con la punta doblada en un ángulo aproximado de 60° y con goma para inmovilizar la rejilla pinzada, pinzas aislantes del frío, guantes de algodón y guantes de nitrilo.
- i. Recuperar del Dewar de almacenamiento de muestras la caña contenedora de los criotubos que incluyen los tubos de cobre

preparados anteriormente (ver apartado 4.2). Para ello, colocar la caña en un Dewar con LN<sub>2</sub>.

- j. Cuando la cámara alcance la temperatura deseada, encender las luces necesarias en el panel de control para iluminar la criocámara, transferir rápidamente el criotubo que contiene los tubos de cobre preparados a la criocámara. Con ayuda de unas pinzas naranjas, abrir el criotubo, coger uno de los tubos de cobre y fijarlo en el portamuestras con las herramientas de Leica indicadas para ello.
- k. Fijar el portamuestras con el tubo de cobre al brazo del ultramicrotomo con la herramienta indicada, haciendo coincidir la numeración 0 del portamuestras con la marca localizada en la parte superior del brazo del ultramicrotomo (Fig. 15).
- l. Cerrar el criotubo, transferirlo al Dewar que contiene la caña y fijarlo en la misma caña en la que se encontraba. Asegurarse cada cierto tiempo de que el nivel de LN<sub>2</sub> cubre las muestras de la caña e ir reponiendo el LN<sub>2</sub> cuando sea necesario.

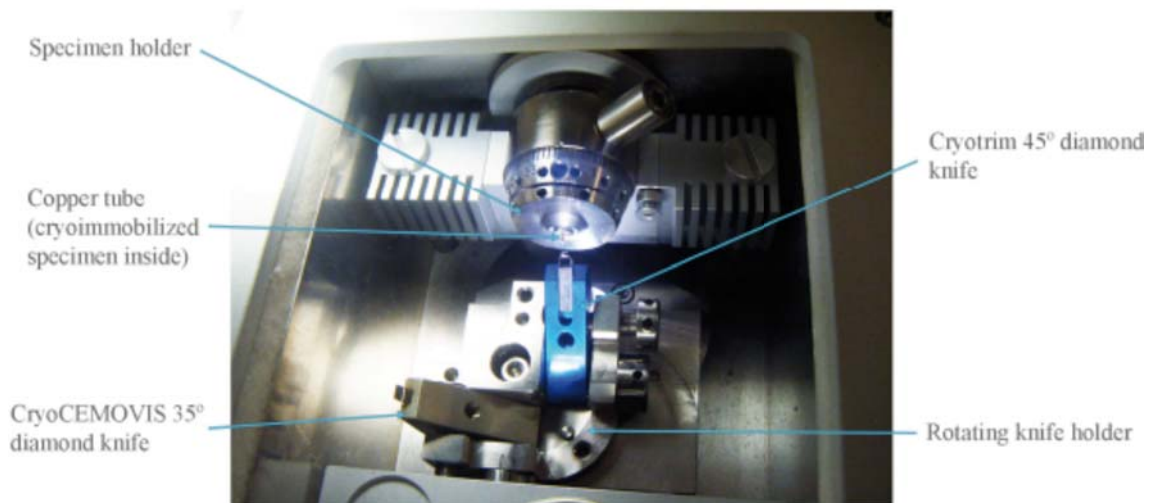


Figura 15. Criocámara del ultramicrotomo UC6 (FC6) para la crioultramicrotomía de VIS.

2. Realización de la pirámide en la muestra. Este paso consiste en disminuir la sección frontal de la muestra, lo que permite disminuir la acción de las fuerzas fricción entre la muestra y la cuchilla. De esta forma, se alarga la

vida de la cuchilla de diamante y se logran obtener secciones ultrafinas de alta calidad.

- a. Apretar las cuchillas al portacuchillas con las herramientas indicadas para ello, girarlo colocando la cuchilla de piramidar en posición de cortar (encarada al tubo de cobre) y fijarlo con la herramienta adecuada.
- b. En el panel de control, utilizar los controladores que dirigen al portacuchillas norte-sur (N-S) y este-oeste (E-O) para acercar y encarar la cuchilla a la muestra. A la derecha de la rueda N-S se encuentran los botones de acercamiento fino a la muestra, los que presentan flechas. Cada pulsación flecha arriba/flecha abajo corresponde a la distancia fijada en “approach” hacia delante/atrás, respectivamente. Mantener este valor fijado a 0,5  $\mu\text{m}$ . Extremar las precauciones al acercar la cuchilla a la muestra ya que el menor contacto podría dañar el filo de la cuchilla.
- c. Colocar el ionizador en la circunferencia imantada que se encuentra en la superficie de la criocámara apuntando hacia el filo de la cuchilla y conectar el botón “power” del mismo.
- d. En la pantalla táctil, pulsar “antistatic” para activarlo y, con los botones “+” y “-”, seleccionar al máximo su poder. Mientras se está piramidando el poder antiestático se mantendrá al máximo para eliminar toda viruta cargada electrostáticamente por la fricción de la cuchilla con la muestra durante el proceso de corte, que, de otra manera, permanecería en la cara de la muestra.
- e. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 100 mm/s y 200 nm, respectivamente.
- f. Pulsar “start” en el panel de control para empezar a cortar. Dejar que el brazo avance un recorrido completo (200  $\mu\text{m}$ ) y esperar a que se haga el “reset” automáticamente al finalizar el recorrido. Si se trata de un tubo nuevo de cobre, repetir de nuevo este paso. Se obtendrá una cara lisa en la superficie del tubo de cobre.
- g. Volver a acercar la cuchilla de piramidar a la muestra y desplazar la cuchilla lateralmente haciendo coincidir el vértice izquierdo de la misma

con el borde de cobre derecho en contacto con la muestra. Desplazar levemente la cuchilla lateralmente hacia el centro de la muestra con ayuda de los controles N-S y E-O (Fig. 16A).

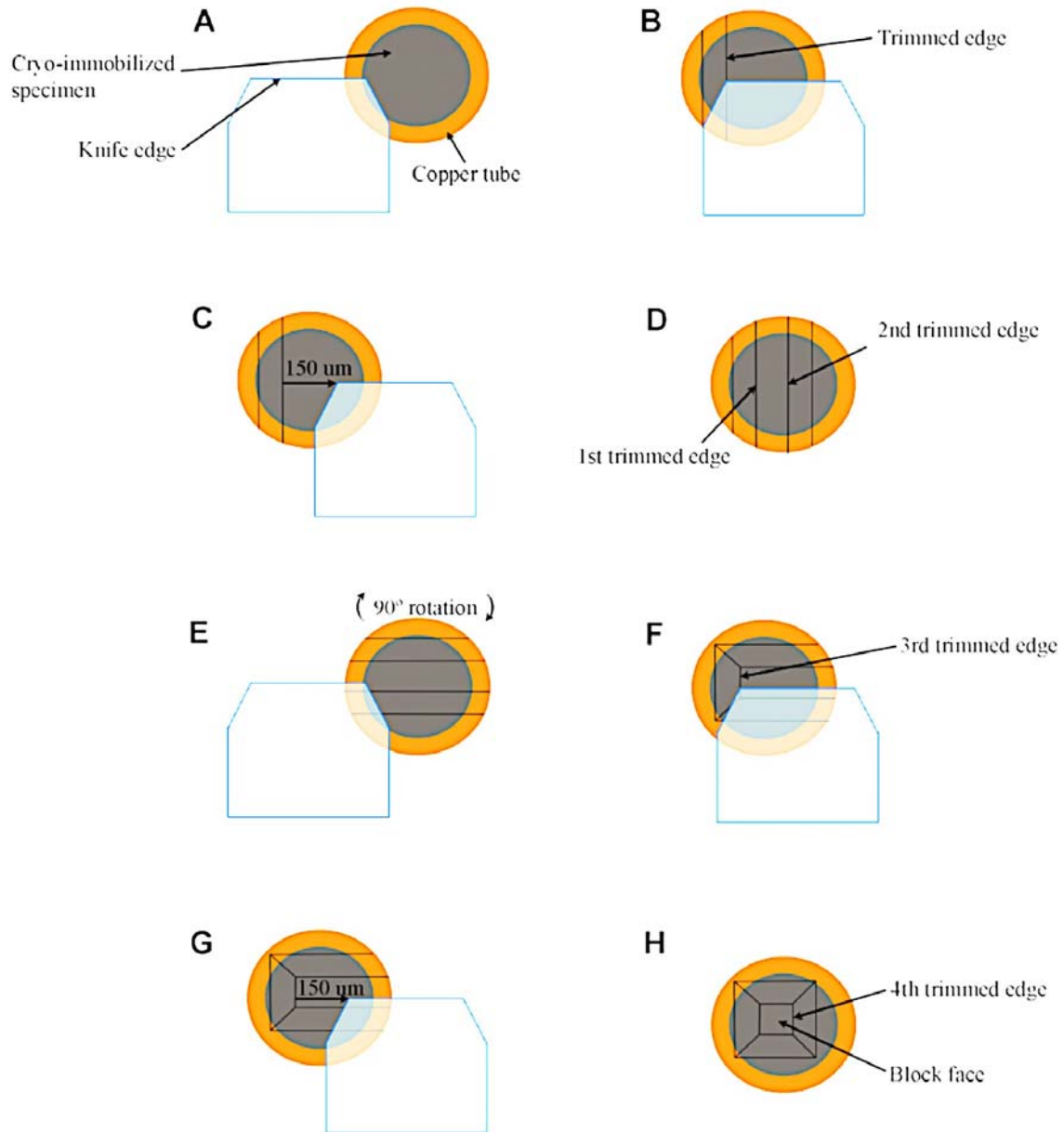


Figura 16. Esquema de la realización de una pirámide en la superficie de un tubo de cobre.

- h. Una vez establecida la posición E-O adecuada, apagar las luces superiores del ultramicrotomo dejando encendida únicamente la luz inferior. En estas condiciones, la luz inferior es proyectada hacia arriba y es reflejada por la cuchilla sobre la superficie de la muestra, lo que

permite hacerse una idea de la distancia entre la cuchilla y la muestra. Avanzar al máximo la cuchilla con los controles N-S y “step” hasta que no se observe sombra alguna reflejada sobre la superficie de la muestra. Encender de nuevo la luz superior del ultramicrotomo.

- i. En la pantalla táctil, pulsar “mode” varias veces hasta que aparezca un triángulo invertido. Esta opción permite fijar la cantidad de micras en profundidad que se quieren cortar para que el ultramicrotomo lo haga automáticamente. Introducir 50  $\mu\text{m}$  como profundidad de la pirámide y pulsar “ok”. Pulsar “start” en el panel de control, dejar que el brazo avance las 50  $\mu\text{m}$  señaladas.
- j. Retirar un poco la cuchilla de la cara frontal de la muestra con el control N-S y con los controladores E-O hacer coincidir el borde acabado de piramidar con el vértice derecho de la cuchilla (Fig. 16B).
- k. En el la pantalla táctil, pulsar “mode” hasta que se encienda el icono de una flecha horizontal con dos puntas. Aparecerá un contador, poner a 0 el contador pulsando “clear” y desplazar la cuchilla lateralmente hacia la izquierda con el control E-O hasta que en el contador aparezcan 130  $\mu\text{m}$ . Esta opción del ultramicrotomo permite establecer con precisión la medida del lado final de la pirámide (en este caso, 80  $\mu\text{m}$ ). Hay que tener en cuenta que los vértices de la cuchilla de piramidar presentan un ángulo de  $45^\circ$ , de manera que cuando cortamos frontalmente 1  $\mu\text{m}$  también reducimos lateralmente la pirámide 1  $\mu\text{m}$ . Este hecho se tiene que tener en cuenta en el desplazamiento lateral para que la pirámide resultante presente las dimensiones deseadas. De esta forma, si la pirámide deseada es de 80  $\mu\text{m}$  de lado y 50  $\mu\text{m}$  de profundidad, hay que desplazarse 130  $\mu\text{m}$  lateralmente a partir del primer borde de la pirámide y allí realizar el segundo borde de la misma. Cuando la cuchilla haya cortado las 50  $\mu\text{m}$  de profundidad, la pirámide final tendrá un lado de 130  $\mu\text{m}$  menos 50  $\mu\text{m}$ , es decir, las 80  $\mu\text{m}$  establecidas inicialmente (Fig. 16C).
- l. Apagar la luz superior del ultramicrotomo dejando la luz inferior encendida y volver a acercar al máximo la cuchilla con los controles N-S y “step” a la muestra hasta no visualizar sombra proyectada sobre la muestra. Encender de nuevo la luz superior del ultramicrotomo.

- m. En la pantalla táctil, pulsar “mode” varias veces hasta que aparezca un triángulo invertido. Esta opción permite fijar la cantidad de micras en profundidad que se quieren cortar para que el ultramicrotomo lo haga automáticamente. Introducir 50  $\mu\text{m}$  y pulsar “ok”. Pulsar “start” en el panel de control, dejar que el brazo avance las 50  $\mu\text{m}$  señaladas (Fig. 16D).
  - n. Usar repetidas veces el control N-S hasta retirar la cuchilla de la muestra dejando bastante margen de seguridad entre ambas.
  - o. Usando las herramientas adecuadas, aflojar el tornillo que fija el portamuestras al brazo del ultramicrotomo y girar el portamuestras 90°. Fijar de nuevo el tornillo. Siempre que se manipula con herramientas para aflojar tornillos dentro de la criocámara hay que tener la precaución de alejar el portacuchillas a una zona de seguridad para evitar colisiones y el deterioro del filo de la misma. El portamuestras presenta unas marcas con numeración: el 9 corresponde a 90°, el 18 a 180° y así sucesivamente, permitiendo controlar con precisión el ángulo de giro del portamuestras haciendo coincidir la numeración escogida con la marca existente en el brazo del ultramicrotomo (Fig. 16E).
  - p. Repetir de nuevo los pasos g-m para crear los bordes de la pirámide tercero y cuarto (Fig. 16F, 16G y 16H).
3. Obtención de secciones ultrafinas. Estas secciones se recogerán en rejillas para su posterior observación en el TEM.
    - a. Retroceder el portacuchillas hacia atrás con el control N-S, desconectar el antiestático (pedal derecho o “antistatic” en pantalla táctil) y girarlo ligeramente. Utilizar las herramientas adecuadas para aflojar el portacuchillas, rotarlo de manera que la cuchilla de corte quede enfrentada a la muestra y fijar de nuevo el tornillo.
    - b. Acercar la cuchilla de diamante al máximo a la pirámide recién fabricada con extrema precaución para evitar colisiones y daños en el filo. Para ello usar los controladores N-S, “step” y E-O y apagar la luz superior del ultramicrotomo como se ha visto anteriormente. La pirámide debe quedar encarada a una zona no dañada del filo de la cuchilla. Es recomendable tener un control del estado del filo de la cuchilla de diamante. Con este objetivo, se empieza a cortar con la



zona situada más a la izquierda del filo y, con el tiempo y a medida que ésta empieza a presentar signos de desgaste, se van utilizando zonas situadas más a la derecha. Cuando el desgaste del filo de la cuchilla es general, ésta se envía a fábrica para que sea reafilada.

- c. Volver a apuntar el antiestático hacia el filo de la cuchilla, encenderlo y situar su poder aproximadamente a la mitad.
- d. En la pantalla táctil, pulsar “mode” varias veces hasta que aparezca una pirámide, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 0,80 mm/s y 50 nm, respectivamente.
- e. Fijar la ventana de corte en que la velocidad del brazo del ultramicrotomo se ajustará a la velocidad seleccionada de corte y que debe coincidir con el recorrido en el que se efectúan secciones. Para ello, con el movimiento manual del brazo, situar la pirámide justo encima del filo de la cuchilla y, en la pantalla táctil, pulsar “start”. A continuación, situar manualmente la pirámide justo debajo del filo de la cuchilla y, en la pantalla táctil, pulsar “end”.
- f. Pulsar “start” en el panel de control y con la ayuda de un pelo fijado a la punta de un palo ir estirando hacia abajo las secciones que se van cortando y que permanecen juntas en una tira (Fig. 17 y 18).



Figura 17. Criocámara del UC6 de Leica preparada para la obtención de VIS. Se observa el acercamiento del pelo (punta del palo de madera) al filo de la cuchilla de diamante.

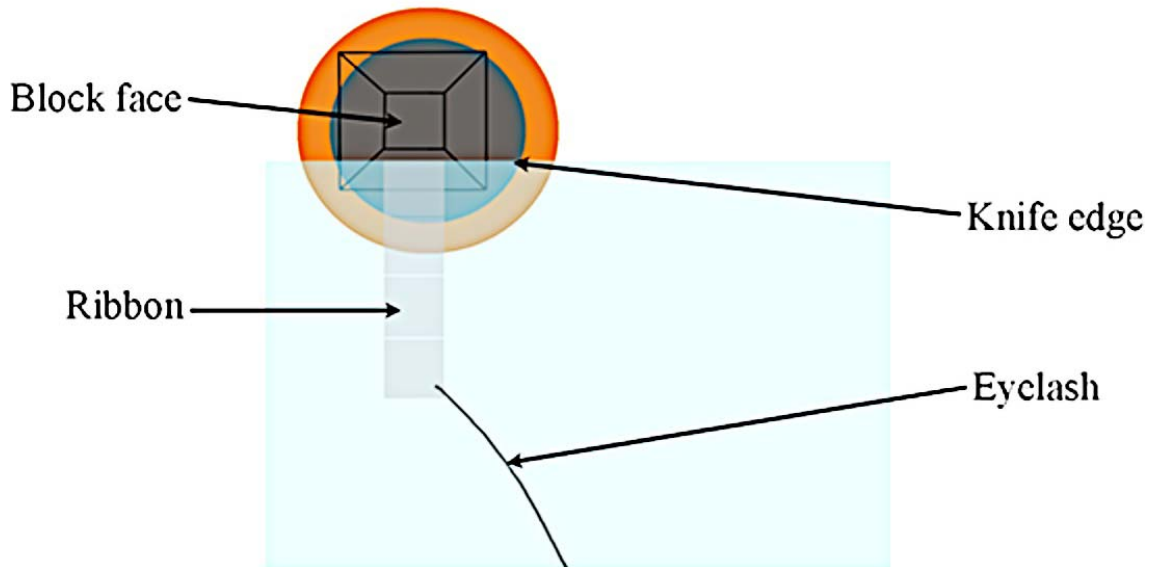


Figura 18. Esquema de la obtención de VIS.

- g. Adecuar el poder antiestático con “+” y “-” en la pantalla táctil hasta encontrar unas condiciones en que los cortes se deslicen por el filo de la cuchilla sin engancharse, pero que tampoco vuelen demasiado por la acción del antiestático, lo que permitirá su manipulación con el pelo.
  - h. Una vez obtenida una tira lo suficientemente larga, apoyarla en la cuchilla bien estirada manteniendo sujeto su extremo con el pelo, apagar el antiestático con ayuda del pedal izquierdo y, con mucho cuidado, retirar el pelo de la tira, que reposará sobre la cuchilla.
  - i. Hacer dos “step” para alejar mínimamente la cuchilla de la pirámide.
4. Recogida de las secciones ultrafinas en rejillas.
    - a. Colocar las rejillas Holey Carbon o Quantifoil que van a ser utilizadas sobre un trozo de Parafilm en una placa de Petri.
    - b. Hacer un tratamiento de luz UV a las rejillas con el equipo “Glow Discharge” (BALTEC modelo CTA005). Este tratamiento hace la superficie de carbón de las rejillas más hidrofílica asegurando una dispersión uniforme de la muestra sobre la rejilla.
      - Abrir la cámara y depositar la placa abierta.
      - Fijar el tiempo de exposición deseado entre 30 s y 1 min.
      - Pulsar el interruptor del equipo y esperar a que se alcance la presión adecuada (aproximadamente  $10^{-2}$  mbar, justo cuando se empiezan a encender leds amarillos en el cuadro de control).

- Pulsar “start” en el cuadro de control. Se encenderá la luz UV en la cámara y en el cuadro de control aparecerá un contador. Una vez se alcance el tiempo ajustado, se apagará la luz UV.
  - Apagar el interruptor del equipo y esperar unos segundos a que se vaya el vacío de la cámara.
  - Abrir la cámara, coger la placa con las rejillas y acercarlas a ultramicrotomo.
- c. Colocar un rejillero en el hueco de la plataforma de Leica indicado para ello.
  - d. Coger una rejilla de las preparadas con las pinzas de punta doblada.
  - e. Coger con la mano izquierda la pinza e introducir la rejilla en una zona profunda de la criocámara (sin soltarla en ningún momento) y esperar aproximadamente medio minuto hasta que la rejilla se atempere.
  - f. Acercar la rejilla a la cuchilla de diamante con extrema precaución.
  - g. Con la mano derecha, coger un bastón de madera con un pelo en su extremo e introducirlo en una zona profunda de la criocámara, manteniéndolo allí unos pocos segundos hasta que se atempere.
  - h. Acercar el pelo a la sección situada más abajo de la tira, con extremo cuidado tocarla hasta que se enganche en el pelo.
  - i. Elevar la sección y situar la rejilla debajo de la misma casi tocándola.
  - j. Aplicar una descarga con ayuda del pedal derecho del ionizador que hará que la sección se adhiera a la rejilla. Si no se adhiere, asegurarse que las secciones y la rejilla se encuentran muy cercanas entre sí y volver a pulsar el pedal derecho hasta conseguir el efecto deseado.
  - k. Dejar el bastón sobre la mesa y utilizando ambas manos soltar la rejilla encima de la plataforma fija de porcelana con las secciones mirando hacia arriba. Con ayuda de unas pinzas, cerrar la plataforma de porcelana móvil sobre la primera en la que se encuentra la rejilla y, con ayuda de una herramienta de Leica, aplicar toda la fuerza que sea posible encima del montaje durante un minuto. Este método mecánico mejora la adherencia de las secciones a la rejilla permitiendo en la mayoría de casos experimentos posteriores de ET.

- i. Con ayuda de unas pinzas y con mucho cuidado, levantar la placa de porcelana, recuperar la rejilla y guardarla en el rejillero.
5. Almacenamiento de muestras, recogida del material y desconexión del equipo.
- a. Apagar el ionizador, retirarlo de la criocámara y depositarlo en una zona segura de la mesa de trabajo.
  - b. Retirar al máximo el portacuchillas del portamuestras usando el control N-S.
  - c. Preparar un Dewar con LN<sub>2</sub> y enfriar un Falcon modificado abierto para guardar el rejillero como en el apartado 4.3.1.
  - d. Enfriar la tapa del rejillero en LN<sub>2</sub> y enroscarla en el mismo.
  - e. Transferir el rejillero al interior del Falcon modificado abierto y cerrar el Falcon.
  - f. Transferir el Falcon cerrado al Dewar de almacenamiento de muestras de la misma forma que en el apartado 4.3.1. Las rejillas permanecerán almacenadas hasta el momento de su observación en el cryo-TEM.
  - g. Recuperar el criotubo que contenía el tubo de cobre utilizado de la caña, transportarlo a la criocámara y abrirlo.
  - h. Aflojar el portamuestras con las herramientas adecuadas y, con ayuda de unas pinzas, retirar el tubo de cobre utilizado, introducirlo en el criotubo abierto, cerrarlo, traspasarlo a la caña y la caña al interior del Dewar de almacenamiento de muestras.
  - i. Mediante el uso de las herramientas indicadas para ello, aflojar el portacuchillas y retirarlo de la criocámara.
  - j. Poner el portacuchillas bajo el grifo de agua destilada, dejando correr el agua hasta que desaparezca el hielo de la superficie, momento en que alcanza la temperatura del agua destilada.
  - k. Retirar las cuchillas del portacuchillas con las herramientas adecuadas y poner el portacuchillas en una estufa a 40°C.
  - l. Con ayuda de una cuchilla de afeitar, hacer una terminación en punta a un bastón de poliestireno del kit de limpieza de cuchillas de diamante de DIATOME, sumergirla en etanol al 70%, quitarle el exceso de líquido, pasar la zona más fina de la punta de poliestireno por el filo de

- la cuchilla de diamante unas tres veces para dejarlo limpio y guardar la cuchilla en su caja. Hacer el proceso para cada cuchilla.
- m. Aflojar todos los tornillos del portamuestras con las herramientas indicadas.
  - n. En la pantalla táctil, pulsar “pump” para apagar la bomba de LN<sub>2</sub> y “heat”, lo que iniciará un proceso de calentamiento de toda la criocámara.
  - o. Apagar el ionizador y apagar la pantalla táctil. Es importante mantener encendido el controlador de la criocámara hasta que haya finalizado el proceso “heat” (aproximadamente dos horas después de su inicio). Transcurrido este tiempo, apagar el controlador de la criocámara.
  - p. Una vez el tubo por donde fluye el LN<sub>2</sub> desde el Dewar hasta la criocámara ha perdido la rigidez, retirar la caña del Dewar y colgarla en su correspondiente soporte en la pared hasta su nuevo uso.

#### **4.7.2. Obtención de criosecciones por el método de Tokuyasu**

Los Pins montados según la técnica de Tokuyasu (ver apartado 4.6) seguirán este proceso con el objetivo de conseguir secciones finas de la muestra.

Protocolo:

1. Preparación del equipo y del material de trabajo.
  - a. Encender el interruptor localizado en el panel de control.
  - b. Acoplar la criocámara al ultramicrotomo y al Dewar.
  - c. Encender el interruptor controlador de la criocámara.
  - d. Rellenar el Dewar con LN<sub>2</sub> hasta que la imagen del Dewar de la pantalla del panel de control aparezca completamente llena (color azul).
  - e. Introducir en la parte frontal del brazo el portamuestras para Pins de Leica.
  - f. Montar las cuchillas en el portacuchillas de Leica y, con la ayuda de la herramienta de Leica, introducir el montaje en el interior de la cámara haciéndolo coincidir con el Pin que se encuentra en la parte inferior de la cámara con la cavidad correspondiente en el portacuchillas. El

portacuchillas de Leica permite la fijación de dos cuchillas, poner una cuchilla de vidrio para piramidar en la parte izquierda y una cuchilla de diamante para realizar los cortes ultrafinos en la parte derecha. Es importante extremar las precauciones en el movimiento de las cuchillas ya que el filo está muy afilado y podría dañarse con el mínimo contacto con cualquier objeto sólido. La cuchilla de diamante utilizada para Tokuyasu es la “cryo-immuno knife” de 35°.

- g. En el panel de control seleccionar las temperaturas del brazo del portamuestras, de la cuchilla y de la cámara a  $-100^{\circ}\text{C}$  y seleccionar “start”, que activará el sistema automático de bombeo de  $\text{LN}_2$  al tanque que se encuentra en la pared de la criocámara. En el panel de control se puede observar cómo va bajando las temperaturas del brazo del portamuestras, del portacuchillas y de la cámara a medida que procede el bombeo de  $\text{LN}_2$ , esperar a que la temperatura sea  $-100^{\circ}\text{C}$  en las tres medidas.
- h. En un Eppendorf, mezclar 500  $\mu\text{L}$  de una solución de metilcelulosa 2% con 500  $\mu\text{L}$  de una solución de sacarosa 2,3 M en PB 0,1 M. Colocar el Eppendorf en una noria dentro de la cámara a  $4^{\circ}\text{C}$  y dejarlo 40 min.
- i. Preparar el material para trabajar en la mesa del ultramicrotomo: vaso de precipitado con agua milliQ, bastones de madera largos con un pelo enganchado en la punta, bastones de madera con un alambre fino en forma de “loop” en un extremo, herramientas de Leica, rejillas de níquel con recubrimiento de Formwar sobre un Parafilm dentro de una placa de Petri, un recipiente de poliestireno con hielo con el Eppendorf preparado en el paso anterior y en el que se pondrá la placa con las rejillas a medida que se obtengan cortes de muestra.
- j. Recuperar del Dewar de almacenamiento de muestras la caña contenedora de los criotubos que incluyen los Pins preparados. Colocar la caña en un Dewar con  $\text{LN}_2$ .
- k. Cuando la cámara alcance la temperatura deseada, encender las luces necesarias en el panel de control para iluminar la criocámara y transferir rápidamente el criotubo que contiene los Pins preparados a la criocámara. Con ayuda de unas pinzas, abrir el tubo, coger uno de los

Pins y fijarlo en el portamuestras con las herramientas de Leica indicadas para ello.

- i. Fijar el portamuestras con el Pin al brazo del ultramicrotomo con la herramienta indicada haciendo coincidir la numeración 0 del portamuestras con la marca localizada en el brazo del ultramicrotomo.
  - m. Cerrar el criotubo, transferirlo al Dewar que contiene la caña y fijarlo en la misma caña en la que se encontraba. Asegurarse cada cierto tiempo de que el nivel de LN<sub>2</sub> cubre las muestras de la caña e ir reponiendo el LN<sub>2</sub> cuando sea necesario.
2. Realización de la pirámide en la muestra. Este paso consiste en la disminución de la sección de la muestra lo que reduce la acción de las fuerzas de fricción entre la muestra y la cuchilla. Esto permite alargar la vida de la cuchilla de diamante y obtener secciones ultrafinas de alta calidad.
- a. Apretar las cuchillas al portacuchillas con las herramientas indicadas para ello, girarlo colocando la cuchilla de vidrio en posición de cortar (encarada al Pin) y fijarlo con la herramienta adecuada.
  - b. En el panel de control, utilizar los controladores en forma de rueda que dirigen al portacuchillas norte-sur (N-S) y este-oeste (E-O) para acercarla y encararla a la muestra. A la derecha de la rueda N-S se encuentran los botones de acercamiento fino a la muestra que presentan flechas. Cada pulsación flecha arriba/flecha abajo corresponde a la distancia fijada en "approach" hacia delante/atrás, respectivamente. Mantener este valor fijado a 0,5 μm. Extremar las precauciones al acercar la cuchilla a la muestra ya que el menor contacto podría dañar el filo de la cuchilla.
  - c. Colocar el ionizador en la circunferencia imantada que se encuentra en la superficie de la criocámara apuntando hacia el filo de la cuchilla y conectar el botón "power" del mismo.
  - d. En la pantalla táctil, pulsar "antistatic" para activarlo y, con los botones "+" y "-", seleccionar al máximo su poder. Mientras se está piramidando el poder antiestático se mantendrá al máximo para eliminar toda viruta cargada electrostáticamente por la fricción del corte que de otra manera permanecería en la cara de la muestra.

- e. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 100 mm/s y 200 nm, respectivamente.
- f. Pulsar “start” en el panel de control para empezar a cortar. Dejar que el brazo avance un recorrido completo (200  $\mu\text{m}$ ) y esperar a que se haga el “reset” automáticamente al finalizar el recorrido. Se obtendrá una cara lisa en la superficie de la muestra.
- g. Volver a acercar la cuchilla de vidrio a la muestra y desplazar la cuchilla lateralmente de manera que el filo izquierdo de la misma se encuentre en la zona central de la muestra algo desplazada hacia el lado derecho con ayuda de los controles N-S, “step” y E-O. De las cuchillas de vidrio, sólo se puede utilizar la esquina izquierda para realizar la pirámide, ya que para la correcta la fabricación de las mismas asegurando un buen filo, únicamente la mencionada esquina es la que mantiene un ángulo de 90°.
- h. Pulsar “start” en el panel de control, dejar que el brazo avance otro recorrido completo (200  $\mu\text{m}$ ) y esperar a que se haga el “reset” automáticamente al finalizar el recorrido.
- i. Usando las herramientas adecuadas, aflojar el tornillo que fija el portamuestras al brazo del ultramicrotomo y girar el portamuestras 90°. Fijar de nuevo el tornillo. Siempre que se manipula con herramientas y se aflojan tornillos dentro de la cámara hay que tener la precaución y alejar el portacuchillas a una zona de seguridad para evitar colisiones y deterioro del filo de la misma. El portamuestras presenta unas marcas con numeración. El 9 corresponde a 90°, el 18 a 180° y así sucesivamente, permitiendo controlar con precisión el ángulo de giro del portamuestras haciendo coincidir la numeración escogida con la marca existente en el brazo del ultramicrotomo.
- j. Repetir los pasos g y h para crear el segundo borde de la pirámide. Girar la muestra 90° según el paso i.
- k. Mediante la utilización de los controles N-S, “step” y E-O, volver a acercar la cuchilla a la superficie de la muestra y hacer coincidir el filo izquierdo de la cuchilla con el borde que queda en posición vertical piramidado anteriormente.





- d. Volver a apuntar el antiestático hacia el filo de la cuchilla, encenderlo y situar su poder aproximadamente a la mitad.
  - e. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 0,80 mm/s y 60 nm, respectivamente.
  - f. Fijar la ventana de corte en que la velocidad del brazo del ultramicrotomo se ajustará a la velocidad seleccionada de corte y que debe coincidir con el recorrido en el que se efectúan secciones. Para ello, con el movimiento manual del brazo, situar la pirámide justo encima del filo de la cuchilla y, en la pantalla táctil, pulsar “start”. A continuación, situar manualmente la pirámide justo debajo del filo de la cuchilla y, en la pantalla táctil, pulsar “end”.
  - g. Pulsar “start” en el panel de control y con la ayuda de un pelo situado en la punta de un palo ir estirando hacia abajo las secciones que se van cortando y que permanecen juntas en una tira.
  - h. Adecuar el poder antiestático con “+” y “-” en la pantalla táctil hasta encontrar un balance entre cortes que no permanecen enganchados al filo de la cuchilla por fuerzas electrostáticas, pero que tampoco vuelan demasiado, lo que permitirá su manipulación con el pelo.
  - i. Una vez obtenida una tira lo suficientemente larga, apoyarla en la cuchilla bien estirada manteniendo sujeto su extremo con el pelo, apagar el antiestático con ayuda del pedal derecho y, con mucho cuidado, retirar el pelo de la tira, que reposará sobre la cuchilla.
4. Recogida de las secciones ultrafinas en rejillas.
    - a. Mojar el “loop” en la solución sacarosa-metilcelulosa preparada inicialmente y, rápidamente, introducirlo en la criocámara y apoyarlo encima de la tira de cortes que descansa sobre la cuchilla. Este paso debe realizarse a una velocidad adecuada para que la congelación de la gota de sacarosa-metilcelulosa suceda después que ésta contacte con la tira de cortes (nunca antes).
    - b. Retirar el “loop” del interior de la criocámara, dejar que se descongele la gota de sacarosa-metilcelulosa, hacer coincidir el “loop” con la superficie de una rejilla de níquel con Formwar y dejar la caja contenedora de rejillas en el hielo. Cuando se recogen los cortes con el

“loop”, estos quedan en la cara inferior del “loop”, de manera que al poner en contacto la parte inferior con la rejilla, los cortes quedarán adheridos a la superficie de la misma.

5. Almacenamiento de muestras, recogida del material y desconexión del equipo.
  - a. Apagar el ionizador, retirarlo de la criocámara y depositarlo en una zona segura de la mesa de trabajo.
  - b. Retirar al máximo el portacuchillas del portamuestras usando el control N-S.
  - c. Mediante el uso de las herramientas indicadas para ello, aflojar el portacuchillas y retirarlo de la criocámara.
  - d. Poner el portacuchillas bajo el grifo de agua destilada, dejando correr el agua hasta que desaparezca el hielo de la superficie, momento en que se alcanza la temperatura del agua destilada.
  - e. Retirar las cuchillas del portacuchillas con las herramientas adecuadas y poner el portacuchillas en una estufa a 40°C.
  - f. Si la cuchilla de vidrio todavía es funcional, guardarla en una caja de cuchillas. Si por el contrario el extremo izquierdo está demasiado deteriorado para piramidar correctamente, descartarla.
  - g. Con ayuda de una cuchilla de afeitar, hacer una terminación en forma de punta a un bastón de poliestireno, sumergirla en etanol al 70%, quitarle el exceso de líquido, pasar la zona más fina de la punta de poliestireno por el filo de la cuchilla de diamante unas tres veces para dejarlo limpio y guardar la cuchilla en su caja.
  - h. Recuperar el criotubo contenedor de los Pins de la caña, transportarlo a la criocámara y abrirlo.
  - i. Aflojar el portamuestras y con ayuda de unas pinzas, retirar el Pin utilizado, introducirlo en el criotubo abierto, cerrar el criotubo, traspasarlo a la caña y la caña en el interior del Dewar de almacenamiento de muestras.
  - j. Colocar la placa de Petri contenedora de las rejillas con cortes en la nevera a 4°C hasta nueva continuación con el proceso.
  - k. Aflojar todos los tornillos del portamuestras con las herramientas indicadas.

- l. En la pantalla táctil, pulsar “pump” para apagar la bomba de LN<sub>2</sub> y “heat”, lo que iniciará un proceso de calentamiento de toda la criocámara.
- m. Apagar el ionizador y apagar la pantalla táctil. Es importante mantener encendido el controlador de la criocámara hasta que haya finalizado el proceso de “heating” (aproximadamente dos horas después de su inicio). Transcurrido este tiempo, apagarlo.
- n. Una vez el tubo por donde fluye el LN<sub>2</sub> desde el Dewar hasta la criocámara ha perdido la rigidez por el paso de LN<sub>2</sub>, retirar la caña del Dewar y colgarla en su correspondiente soporte en la pared hasta su nuevo uso.

#### **4.7.3. Obtención de secciones de muestras incluidas en resina**

Los bloques de resina EPON o acrílica (HM20 y HM23) en los que se han incluido las muestras que han seguido los procesos de CF y FS (ver apartados 4.2, 4.4 y 4.5) continuarán este proceso para la obtención de secciones muy finas de la muestra que permitan su posterior observación en el TEM.

Protocolo:

1. Preparación del equipo y del material de trabajo.
  - a. Preparar el material necesario sobre la mesa del ultramicrotomo: soporte de piramidar, soporte para cuchillas, llave Allen del ultramicrotomo, cuchillas de afeitar de un solo filo, cuchillas de afeitar de doble filo, pipetas Pasteur de vidrio normales y modificadas (cuya punta ha sido cerrada y ligeramente doblada por acción de una llama), bastones con un pelo enganchado en un extremo, vasos de precipitado con agua milliQ, papel de filtro, portaobjetos limpios, pinzas Dumont número 4 con aro de goma, rejillas adecuadas según la finalidad del experimento (rejillas de cobre con Formwar para muestra que se va a observar en el TEM directamente; rejillas de níquel u oro con una capa de Formwar para muestra que va a continuar con un proceso de inmunocitoquímica antes de ser observada; rejillas de cobre sin ningún tipo de recubrimiento si la muestra va a someterse a experimentos de

- RT-ET), rejillero, cuchillas de vidrio con balsa y sin balsa, cuchillas de diamante DIATOME de 45° para cortar a temperatura ambiente, kit de limpieza de cuchillas.
- b. Preparar el material necesario sobre la mesa de tinción: poner a calentar una placa a unos 60°C, azul de metileno al 0,5% en una botella de plástico con cuentagotas, botella de agua milliQ y vaso de precipitado grande.
  - c. Encender el equipo con el botón power situado en la parte lateral de la pantalla táctil.
2. Piramidar bloques. Para ello se utiliza el soporte de piramidar que se acopla a la plataforma del ultramicrotomo.
- a. Aflojar el tornillo que fija el arco al brazo del ultramicrotomo, retirar el arco, acoplarlo a la abertura del soporte de piramidar manteniendo la misma dirección del arco y fijarlo mediante el giro del tornillo que se encuentra en la parte lateral del soporte.
  - b. Fijar el portamuestras al arco usando la llave Allen.
  - c. Colocar un bloque con la muestra hacia arriba en el portamuestras y fijarlo con la llave Allen.
  - d. Observando a través de la lupa, centrar todo el montaje en nuestro plano deslizándolo el soporte de piramidar sobre las guías de la plataforma del ultramicrotomo, asegurándose de que cuando se trabaja a diferentes aumentos seguimos observando el bloque centrado, y fijar el soporte a la plataforma del ultramicrotomo mediante el giro del tornillo que se encuentra en el lateral de la plataforma.
  - e. Orientar el bloque con el tornillo de movimiento N-S del arco para observar correctamente la muestra.
  - f. Con ayuda de una cuchilla de afeitar, piramidar manualmente la muestra eliminando la resina de alrededor, de manera que quede una esculpida una pirámide de sección cuadrada o rectangular conteniendo la muestra.
3. Obtención de secciones semifinas para valorar y seleccionar zona de la muestra.
- a. Retirar el arco con el portamuestras del soporte de piramidar y fijarlo de nuevo al brazo del ultramicrotomo.

- b. Colocar el portacuchillas en la plataforma del ultramicrotomo.
- c. Colocar una cuchilla de vidrio y fijarla con el tornillo adecuado.
- d. Acercar la cuchilla a la muestra con el control N-S del panel de control y posicionarla en una zona del filo de la cuchilla que no esté dañada con el control E-O del panel de control.
- e. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 100 mm/s y 200 nm, respectivamente.
- f. Pulsar “start” en el panel de control. A través de los oculares controlar cuando los cortes de resina que se van formando tienen muestra. Cuando se observe una porción de muestra suficiente, volver a pulsar “start” en el panel para parar el ultramicrotomo.
- g. Con ayuda del control N-S, alejar la cuchilla del bloque.
- h. Aflojar el tornillo de la cuchilla de vidrio, retirarla y colocar en su lugar una cuchilla de vidrio con una balsa. Guardar la cuchilla retirada si todavía es aprovechable.
- i. Acercar la cuchilla a la muestra con el control N-S y situar la pirámide encarada a una zona del filo de la cuchilla no deteriorada con el control E-O.
- j. Acercar al máximo la cuchilla a la muestra con el control “step”.
- k. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte y fijarlos con el comando rueda a 1 mm/s y 300 nm, respectivamente.
- l. Pulsar “start” y, cuando empiece a cortar muestra, rellenar la balsa con ayuda de la pipeta Pasteur con agua, poco a poco, evitando que se moje la cara frontal del bloque. Si se mojase, parar el ultramicrotomo y secarla bien con papel de filtro.
- m. Parar el ultramicrotomo con el control “start” cuando haya unos 4-5 cortes flotando en la balsa y retirar la cuchilla con el control N-S del bloque.
- n. Colocar una gota de agua milliQ sobre un portaobjetos limpio y, con ayuda de una pipeta Pasteur modificada, recoger los cortes y colocarlos sobre la gota.

- o. Poner el portaobjetos en la placa caliente unos 10 minutos para que los cortes queden bien estirados y fijados sobre el portaobjetos.
  - p. Añadir una gota de azul de metileno al 0,5% sobre cada corte y dejar el portaobjetos sobre la placa durante unos 20 segundos.
  - q. Colocar el portaobjetos sobre el vaso de precipitado vacío y aplicar un chorro de agua milliQ sobre los cortes hasta eliminar el exceso de azul de metileno.
  - r. Dejar el portaobjetos sobre la placa caliente hasta que esté bien seco y analizar la muestra en el microscopio óptico. Este paso permite revisar que la muestra esté correcta y así poder seleccionar una pequeña porción de muestra donde repiramidar.
4. Repiramidar bloques. Este paso consiste en confeccionar una pirámide en una pequeña zona de la muestra a partir de la que se obtendrán los cortes ultrafinos que se observarán en el TEM, posteriormente. Para ello se necesita de nuevo el soporte de piramidar.
- a. Aflojar el tornillo que fija el arco con el portamuestras y la muestra al brazo del ultramicrotomo, retirar el arco, acoplarlo a la abertura del soporte de piramidar manteniendo la misma dirección del arco y fijarlo mediante el giro del tornillo que se encuentra en la parte lateral del soporte.
  - b. Observando a través de la lupa, centrar todo el montaje en nuestro plano deslizando el soporte de piramidar sobre las guías de la plataforma del ultramicrotomo, asegurándose de que cuando se trabaja a diferentes aumentos seguimos observando el bloque centrado, y fijar el soporte a la plataforma del ultramicrotomo mediante el giro del tornillo que se encuentra en el lateral de la plataforma.
  - c. Orientar el bloque con el tornillo de movimiento N-S del arco para observar correctamente la muestra.
  - d. Intentar identificar en la superficie del bloque la zona que se ha decidido cortar tras la observación del corte semifino en el microscopio óptico.
  - e. A máximos aumentos en el ultramicrotomo y con ayuda de una cuchilla de afeitar de doble filo, marcar manualmente un trapecio en la superficie de la zona seleccionada de manera que sea del tamaño de

un cuadro y medio de la cuadrícula que se observa en uno de los oculares del ultramicrotomo. Este trapecio debe ser lo más simétrico posible para facilitar el proceso de corte ultrafinos.

- f. Con ayuda de una cuchilla de afeitar de un filo, piramidar manualmente la muestra eliminando la resina de alrededor del trapecio dibujado, de manera que quede una esculpida una pirámide de sección en forma de trapecio que contiene la muestra.
5. Obtención de secciones para la observación en el TEM.
    - a. Retirar el arco con el portamuestras del soporte de piramidar y fijarlo de nuevo al brazo del ultramicrotomo.
    - b. Colocar el portacuchillas en la plataforma del ultramicrotomo.
    - c. Con ayuda de la llave Allen, retirar la cuchilla con balsa y fijar una cuchilla de diamante de 45°. Vaciar la balsa de agua de la cuchilla de vidrio y guardarla en el caso del que el filo todavía sea aprovechable.
    - d. Acercar la cuchilla a la muestra con el control N-S del panel de control y posicionarla en una zona del filo de la cuchilla que no esté dañada con el control E-O del panel de control.
    - e. Con ayuda del tornillo que modifica el ángulo del arco y el que controla la rotación del bloque, orientar la muestra de manera que el lado corto del trapecio quede en la parte superior y que el filo de la cuchilla sea paralelo a toda la superficie lisa del bloque. Para facilitar este paso, dejar encendida únicamente la luz inferior del ultramicrotomo de manera que la luz se refleja en el filo de la cuchilla y se proyecta en la superficie del bloque. Para conseguir el objetivo, la sombra debe ser igual de gruesa y paralela a la cuchilla cuando se proyecta sobre toda la superficie de la pirámide esculpida al mover manualmente el brazo del ultramicrotomo. Una vez obtenido este resultado, acercar al máximo la cuchilla al bloque con el control “step” (hasta que desaparezca la sombra proyectada sobre la superficie del bloque cuando únicamente se encuentra encendida la luz inferior del ultramicrotomo).
    - f. En la pantalla táctil, seleccionar la velocidad (“speed”) y grosor (“width”) del corte. Fijar los mencionados parámetros con el comando rueda a 0,8 mm/s y 60 nm, respectivamente, si se desea obtener secciones ultrafinas de la muestra, ya sea para su posterior observación directa



- en el TEM o para continuar con un proceso de inmunocitoquímica antes de su observación. Si la finalidad es realizar experimentos de ET, se fijarán los parámetros a 0,8 mm/s y 200 nm, respectivamente.
- g. Pulsar “start” en el panel de control. Cuando se empiece a cortar el bloque, rellenar la balsa con ayuda de la pipeta Pasteur con agua, poco a poco, evitando que se moje la cara frontal del bloque. Si se mojase, parar el ultramicrotomo y secarla bien con papel de filtro.
  - h. A través de los oculares controlar el proceso de corte variando las condiciones de grosor y velocidad de corte, si fuera necesario. Cuando en la balsa se aprecien unos 30 cortes flotando, parar el ultramicrotomo con el control “start” y hacer un par de “step” hacia atrás para retirar la cuchilla de la muestra.
  - i. Juntar unos 20 cortes con ayuda de un bastón con pelo en su extremo. Coger una rejilla por el borde con unas pinzas del número 4 y fijarla con una goma evitando su pérdida al dejar de presionar la pinza. Si la rejilla presenta recubrimiento de Formwar, independientemente del material del que esté hecha, coger con la mano derecha la pinza con la rejilla y con la izquierda un bastón con pelo, sumergir la rejilla inclinada (evitando que el agua llegue a contactar con la pinza) y con el pelo acercar los cortes a la rejilla lo más juntos que se pueda entre sí, hasta que lleguen a contactar con la rejilla en la superficie del agua. Levantar rápidamente la rejilla verticalmente. Si la rejilla no presenta ningún tipo de recubrimiento, una vez pinzada presionarla por la parte inferior sobre una superficie dura para hacerle una ligera inclinación, sumergirla completamente bajo el agua, situarla bajo los cortes y subir la rejilla en plano lo más rápido posible.
  - j. Bajo la lupa confirmar que los cortes permanezcan en la superficie de la misma.
  - k. Guardar la rejilla en un rejillero y dejar este último en un desecador al menos dos horas antes de continuar con algún proceso.
  - l. Utilizar el control N-S para alejar la cuchilla del bloque.
  - m. Aflojar el tornillo que sujeta la cuchilla con la llave Allen, retirarla y sumergirla en un chorro de agua destilada, de manera que el chorro incida sobre el filo directamente.

- n. Con ayuda de una cuchilla Gillette, hacer una terminación en punta a un bastón de poliestireno, sumergirla en etanol al 70%, quitarle el exceso de líquido, pasar la zona más fina de la punta de poliestireno por el filo de la cuchilla de diamante unas tres veces para dejarlo limpio y guardar la cuchilla en su caja.
- o. Utilizar la llave Allen para aflojar el tornillo que sujeta el bloque, retirarlo y guardarlo en la carpeta de almacenamiento de bloques.
- p. Recoger el material y aspirar los restos de resina que hayan quedado en el ultramicrotomo y la mesa de trabajo.

#### **4.8. Inmunocitoquímica**

Esta técnica permite marcar específicamente antígenos de interés para su localización en el contexto celular. La técnica se aplica en secciones de resina acrílica (en nuestros experimentos HM20 y HM23; ver apartado 4.7.3) o de Tokuyasu (ver apartado 4.7.2) y se lleva a cabo sobre una tira larga de Parafilm enganchada en la poyata. A medida que avanza el proceso, se va retirando papel para descubrir una nueva porción de Parafilm suficiente para poner las gotas del reactivo necesario para cada paso de la inmunocitoquímica. De manera que se van colocando las rejillas encima de cada gota quedando los cortes en contacto directo con la gota el tiempo establecido para cada reactivo y paso.

##### **4.8.1. Inmunocitoquímica en secciones de resina acrílica**

Protocolo:

1. Preparar el material y reactivos para comenzar el proceso, filtrando agua y tampones: rejillas con cortes, rejillero, Parafilm, agua milliQ, micropipetas, pipetas Pasteur de vidrio, pinzas del número 4, papel de filtro, anticuerpos primarios y secundarios, PBS 10 mM, glicina 0,05 M en PBS 10 mM, BSA 5% en PBS 10 mM, BSA 1% en PBS 10 mM, Tween20 0,25% en PBS 10 mM y GA al 25% (EMS).

2. Cortar una tira larga de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharla a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con las pinzas finas, tirar de una de las puntas del papel que protege el Parafilm en el lado izquierdo, descubrir una porción de Parafilm suficiente para poner las primeras gotas de reactivo del proceso de inmunocitoquímica y doblar el papel retirado hacia la derecha (encima del Parafilm que permanece sin descubrir). A medida que avanza a técnica, se irán depositando las gotas de reactivo necesarias para cada paso de la técnica sobre el Parafilm descubierto, colocando las rejillas en las gotas con los cortes mirando hacia abajo y, respetando los tiempos establecidos en el protocolo por reactivo descritos más abajo, se irán haciendo los cambios de rejilla entre las diferentes gotas de reactivos, descubriendo cuando sea necesario más porción de Parafilm y doblando el papel retirado hacia la derecha.
3. Hacer un paso en PBS 10 mM.
4. Hacer dos cambios de 2 min en glicina 0,05 M en PBS 10 mM.
5. Un paso en BSA 5% en PBS 10 mM.
6. Cambiar a BSA 5% en PBS 10 mM y dejar 10 min.
7. Un paso en BSA 1% en PBS 10 mM.
8. Cambiar a la solución de anticuerpo primario y dejar actuar durante 30 min.  
Anticuerpos primarios utilizados:
  - a. "Mouse" IgM anti-dsDNA anticuerpo monoclonal (Novus Biologicals, Littleton, USA, clon AC-30-10). La dilución utilizada fue 1/10 en BSA 1% en PBS 10 mM.
  - b. "Rabbit" IgG anti-SeqA policlonal (facilitado por el Dr. Kirsten Skarstad, Oslo University Hospital, The Norwegian Radium Hospital, Department of Cell Biology) (Slater et al., 1995). La dilución utilizada fue 1/150 en BSA 1% en PBS 10 mM.
9. Hacer un cambio a Tween20 0,25% en PBS 10 mM.
10. Hacer cuatro pasos de Tween20 0,25% en PBS 10 mM de 4 min cada uno.
11. Hacer un cambio en BSA 1% en PBS 10 mM.
12. Pasar a la solución de anticuerpo secundario y dejar actuar durante 15 min.  
Anticuerpos secundarios utilizados:

- a. "Goat anti-mouse" IgM de 12 nm. La dilución utilizada fue 1/30 en BSA 1% en PBS 10 mM.
  - b. "Goat anti-rabbit" IgG de 12 nm. La dilución utilizada fue 1/30 en BSA 1% en PBS 10 mM.
13. Cambiar a PBS 10 mM y, seguidamente, hacer cuatro pasos de 5 min cada uno en PBS 10 mM.
  14. Cambiar a GA 1% en PBS 10 mM y dejar 5 min.
  15. Hacer diez lavados con agua MilliQ de 1 min cada uno.
  16. Guardar las rejillas en un rejillero dentro del desecador y dejar secar al menos dos horas.
  17. Contrastar las rejillas según el apartado 4.9.2.

#### **4.8.2. Inmunocitoquímica en secciones de Tokuyasu**

Protocolo:

1. Preparar con antelación gelatina al 2% en PHEM 0,1 M en placas de Petri y guardarlas en la nevera hasta su utilización.
2. Colocar las rejillas de Tokuyasu guardadas en la nevera sobre la gelatina al 2% en PHEM, con la cara que contiene los cortes enfrentada a la gelatina e incubar las placas 30 min a 37°C.
3. Cortar una tira larga de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharla a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con las pinzas finas, tirar de una de las puntas del papel que protege el Parafilm en el lado izquierdo, descubrir una porción de Parafilm suficiente para poner las primeras gotas de reactivo del proceso de inmunocitoquímica y doblar el papel retirado hacia la derecha (encima del Parafilm que permanece sin descubrir). A medida que avanza a técnica, se irán depositando las gotas de reactivo necesarias para cada paso de la técnica sobre el Parafilm descubierto, colocando las rejillas en las gotas con los cortes mirando hacia abajo y, respetando los tiempos establecidos en el protocolo por reactivo descritos más abajo, se irán haciendo los cambios de rejilla entre las diferentes gotas de reactivos, descubriendo cuando sea necesario más porción de Parafilm y doblando el papel retirado hacia la derecha.

4. Preparar el material y reactivos para comenzar el proceso, filtrando agua y tampones: rejillas con cortes, rejillero, Parafilm, agua milliQ, micropipetas, pipetas Pasteur de vidrio, pinzas del número 4, papel de filtro, anticuerpos primarios y secundarios, PHEM 0,1 M, FBS al 10% en PHEM 0,1 M, FBS al 1% en PHEM 0,1 M, FBS 0,2% en PHEM 0,1 M, GA al 25% (EMS).
5. Recoger las rejillas de la gelatina con ayuda de unas pinzas colocarlas en gotas glicina 0,15 M en PHEM 0,1 M y hacer varios cambios en el mismo reactivo de 2 min cada uno.
6. Pasar a FBS al 10% en PHEM 0,1 M y dejar incubar 10 min.
7. Cambiar a FBS al 1% en PHEM 0,1 M y dejar incubar 2 min.
8. Incubar con la solución de anticuerpo primario en FBS al 1% en PHEM 0,1 M durante una hora. El anticuerpo primario utilizado fue Mouse IgM anti-dos-DNA anticuerpo monoclonal (Novus Biologicals, Littleton, USA, clon AC-30-10) diluido 1/10.
9. Cambiar a FBS al 0,2% en PHEM 0,1 M 2 min.
10. Cambiar a FBS al 1% en PHEM 0,1 M 2 min.
11. Incubar con la solución de anticuerpo secundario en FBS al 1% en PHEM 0,1 M durante 30 min. El anticuerpo secundario utilizado en nuestros experimentos fue Goat anti-mouse IgM de 12 nm diluido 1/30.
12. Cambiar a PHEM 0,1 M y, seguidamente, hacer cuatro pasos en PHEM 0,1 M de 5 min cada uno.
13. Cambiar a GA al 1% en PHEM 0,1 M y dejar 5 min.
14. Hacer diez lavados con agua MilliQ de 1 min cada uno.
15. Contrastar (ver apartado 4.9.3).

#### **4.9. Contrastado de secciones**

El contrastado consiste en la aplicación de metales pesados que presentan afinidad por determinadas estructuras celulares, lo que aportan densidad electrónica a la muestra permitiendo el aumento de contraste y facilitando su observación en el TEM.

#### **4.9.1. Contrastado para el estudio de la ultraestructura en secciones de resina epóxica o acrílica**

Protocolo estándar:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de UA al 2% en agua y citrato de plomo en agua, hidróxido de sodio (Fluka), botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina EPON o acrílica (HM20, HM23), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio. Las soluciones UA y citrato de plomo se preparan con antelación y se mantienen a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de UA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 30 min.
4. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de UA, recogiendo el agua usada en un cristizador.
5. Colocar las rejillas en un rejillero y dejar secar aproximadamente unos 15 min.
6. Sobre el Parafilm, colocar una pequeña cantidad de hidróxido de sodio. Con ayuda de mitad no cubierta de la placa de Petri agrupar el hidróxido de sodio y dejarlo tapado.
7. Colocar tantas gotas de citrato de plomo como rejillas se tengan que contrastar cerca del montón de hidróxido de sodio y mantener el conjunto tapado con la placa de Petri.
8. Colocar las rejillas sobre las gotas de citrato de plomo con los cortes en contacto con las mismas y dejar 5 min.

9. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
10. Guardar las rejillas de nuevo en el rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM.

Protocolo para aumentar el contraste de membranas:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de UA 2% en metanol 70% (acetato de uranilo metanólico, MUA), metanol 70%, metanol 50%, metanol 30% y citrato de plomo en agua, hidróxido de sodio (Fluka), botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristalizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina EPON o acrílica (HM20, HM23), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio. El MUA y los metanoles a diferentes concentraciones se preparan con antelación y se mantienen a 4°C hasta el momento de su utilización.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de MUA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 5 min.
4. Cambiar todas las rejillas a metanol 70% y dejar 3 min.
5. Cambiar a metanol 50% y dejar 3 min.
6. Cambiar a metanol 30% y dejar 3 min.
7. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
8. Guardar las rejillas en un rejillero y dejarlas secar unos 15 min.

9. Sobre el Parafilm, colocar una pequeña cantidad de hidróxido de sodio. Con ayuda de mitad no cubierta de la placa de Petri agrupar el hidróxido de sodio y dejarlo tapado.
10. Colocar tantas gotas de citrato de plomo como rejillas se tengan que contrastar cerca del montón de hidróxido de sodio y mantener el conjunto tapado con la placa de Petri.
11. Colocar las rejillas sobre las gotas de citrato de plomo con los cortes en contacto con las mismas y dejar 4 min.
12. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
13. Guardar las rejillas de nuevo en el rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM.

*Otros protocolos para el estudio de la ultraestructura que mejoran el contraste de estructuras específicas:*

1. Impregnación por ácido tánico mediada por OsO<sub>4</sub>. Se trata de una estrategia para visualizar diferentes tipos de membranas celulares y aumentar el contraste de membranas para estudios de ET, ya que consigue un contrastado uniforme en toda la muestra. El proceso comienza con la CF de las colonias bacterianas por HPF en Planchette (ver apartado 4.2), continúa con una FS con el programa para ultraestructura y con el medio de FS 2% OsO<sub>4</sub> 0,1% GA en acetona (ver apartado 4.4). Tras los lavados con acetona de la muestra a temperatura ambiente, proceder como se indica a continuación.

Protocolo:

- a. Extraer la acetona y sustituir por una solución de ácido tánico en acetona al 1%. Dejarlo actuar una hora a 4°C.
- b. Hacer 4 lavados con acetona de 15 min.
- c. Extraer la acetona y sustituir por una solución de OsO<sub>4</sub> en acetona al 1%.
- d. Hacer 4 lavados con acetona de 15 min.



- e. Proceder con la inclusión en EPON, ultramicrotomía y observación en el TEM a temperatura ambiente (ver apartados 4.5, 4.7.3 y 4.12). Si el contrastado por tánico no es satisfactorio para el estudio de la estructura en cuestión, se puede contrastar la muestra como si procediera de un proceso de inmunocitoquímica (ver apartado 4.9.2).
2. Tetróxido de Rutenio ( $\text{RuO}_4$ ). Se trata de un protocolo para aumentar el contraste de ácidos grasos saturados e insaturados por acción del  $\text{RuO}_4$ .

Protocolo:

- a. Con ayuda de un palillo recoger varias colonias aisladas de bacterias y disolverlas en GA al 5% en tampón cacodilato 0,1M (pH 7,3).
- b. Dejar toda la noche a 4°C.
- c. Hacer 5 lavados en tampón cacodilato 0,1M (pH 7,3) de 10 min. Para cada lavado, centrifugar durante 5 min a 3000 rpm para obtener un pellet, descartar el sobrenadante, añadir tampón cacodilato 0,1M y disgregar el pellet (pH 7,3).
- d. Centrifugar durante 5 min a 3000 rpm para obtener un pellet compacto.
- e. Descartar el sobrenadante y añadir una solución de 0,25%  $\text{RuO}_4$  0,25%  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  en tampón cacodilato 0,1M (pH 6,8). Dejar actuar 1h a 4°C y en oscuridad. Repetir este paso. Evitar en todo momento disgregar el pellet ya que tras la fijación química con  $\text{RuO}_4$  no se conseguirá obtener un pellet centrifugando.
- f. Hacer 5 lavados de 15 min con agua milliQ a 4°C.
- g. Descartar el sobrenadante, añadir tampón cacodilato 0,1M (pH 6,8) y dejar toda la noche a 4°C.
- h. Crioinmovilizar el pellet por HPF (4.2).
- i. Criosustituir las Planchettes con el medio de FS 1%  $\text{OsO}_4$  0,5% UA 3% GA en metanol y el programa de estudio de la ultraestructura (ver apartado 4.4).
- j. Proceder con la inclusión en EPON, ultramicrotomía y observación en el TEM a temperatura ambiente (ver apartados 4.5, 4.7.3 y 4.12).

#### **4.9.2. Contrastado para el estudio de inmunocitoquímica en cortes de resina acrílica**

Protocolo estándar:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de UA al 2% en agua y citrato de plomo en agua, hidróxido de sodio (Fluka), botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristalizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina acrílica (HM20, HM23) en las que se ha realizado un protocolo de inmunocitoquímica (ver apartado 4.8.1), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de UA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 15 min.
4. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de UA, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
5. Colocar las rejillas en un rejillero y dejar secar aproximadamente unos 15 min.
6. Sobre el Parafilm, colocar una pequeña cantidad de hidróxido de sodio. Con ayuda de mitad no cubierta de la placa de Petri agrupar el hidróxido de sodio y dejarlo tapado.
7. Colocar tantas gotas de citrato de plomo como rejillas se tengan que contrastar cerca del montón de hidróxido de sodio y mantener el conjunto tapado con la placa de Petri.
8. Colocar las rejillas sobre las gotas de citrato de plomo con los cortes en contacto con las mismas y dejar 1 min.

9. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
10. Guardar las rejillas de nuevo en el rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM de transmisión.

Protocolo para mejorar el contraste de membranas:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de UA 2% en metanol 70% (MUA), metanol 70%, metanol 50%, metanol 30% y citrato de plomo en agua, hidróxido de sodio (Fluka), botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristalizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina EPON o acrílica (HM20, HM23), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio. El MUA y los metanoles a diferentes concentraciones se preparan con antelación y se mantienen a 4°C hasta el momento de su utilización.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de MUA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 5 min.
4. Cambiar todas las rejillas a metanol 70% y dejar 3 min.
5. Cambiar a metanol 50% y dejar 3 min.
6. Cambiar a metanol 30% y dejar 3 min.
7. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
8. Guardar las rejillas en un rejillero y dejarlas secar unos 15 min.

9. Sobre el Parafilm, colocar una pequeña cantidad de hidróxido de sodio. Con ayuda de mitad no cubierta de la placa de Petri agrupar el hidróxido de sodio y dejarlo tapado.
10. Colocar tantas gotas de citrato de plomo como rejillas se tengan que contrastar cerca del montón de hidróxido de sodio y mantener el conjunto tapado con la placa de Petri.
11. Colocar las rejillas sobre las gotas de citrato de plomo con los cortes en contacto con las mismas y dejar 1 min.
12. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de citrato de plomo, recogiendo el agua usada en un cristalizador.
13. Guardar las rejillas de nuevo en el rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM.

Protocolo para sombrear la cromatina:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de permanganato de potasio 2% en agua y UA 2% en agua, botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristalizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina acrílica (HM20, HM23) en las que se ha realizado un protocolo de inmunocitoquímica (ver apartado 4.8.1), rejillero.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Preparar una solución de permanganato de potasio 1% UA 1% en agua a partir de las soluciones preparadas anteriormente.
4. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de permanganato de potasio 1% UA 1% en agua como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Dejar actuar durante 15 min.
5. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de UA, recogiendo el agua usada en un cristalizador.

6. Colocar las rejillas en un rejillero y dejar al menos dos horas antes de su observación en el TEM.

#### **4.9.3. Contrastado para el estudio de la ultraestructura o de la inmunocitoquímica de estructuras en secciones de Tokuyasu**

Protocolo:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de oxalato de uranilo al 2% pH 7 y UA 4% en metilcelulosa 2%, agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, rejillas con cortes de 60 nm de Tokuyasu, rejillero, placa metálica, hielo, "loops", gradilla.
2. Si las rejillas no provienen de la técnica de inmunocitoquímica, sino que estaban almacenadas en placas de Petri en la nevera tras la recogida de los cortes (ver apartado 4.7.2), éstas necesitan una preparación previa:
  - a. Colocar las rejillas de Tokuyasu guardadas en la nevera sobre la gelatina al 2% en PHEM, con la cara que contiene los cortes enfrentada a la gelatina e incubar las placas 30 min a 37°C.
  - b. Hacer diez lavados con agua MilliQ de 1 min cada uno.
3. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con las pinzas finas, tirar de una de las puntas del papel que protege el Parafilm en el lado izquierdo y descubrirlo. Depositar tantas gotas de oxalato de uranilo 2% como rejillas vayan a ser contrastadas, colocar las rejillas sobre las gotas con los cortes mirando hacia abajo y dejar 5 minutos.
4. Hacer tres lavados con agua milliQ también en gotas sobre el Parafilm.
5. Colocar la placa metálica sobre el hielo y, sobre la misma, enganchar un trozo de Parafilm con unas gotas de agua y descubrirlo. Depositar tantas gotas de UA 4% en metilcelulosa 2% como rejillas se están contrastando, poner las rejillas sobre las gotas con los cortes mirando hacia abajo y dejar 7 min.
6. Para cada rejilla, introducir un "loop" en la gota en la que se encuentra por debajo de la rejilla y levantarlo poco a poco para salir de la gota atrapando la rejilla lo más centrada posible en el "loop". Pasar el "loop" por la parte

metálica sobre un papel de filtro haciendo una línea recta de manera que absorba la mayor parte de metilcelulosa y tan sólo quede una fina capa sobre la rejilla quedando sujeta en el "loop". Colocar el mango del "loop" en una gradilla y dejar secar la rejilla al menos dos horas.

7. Con ayuda de unas pinzas, romper con cuidado la capa fina de metilcelulosa que ha quedado alrededor de la rejilla, retirar la rejilla y guardarla en un rejillero dentro del desecador hasta su observación en el TEM.

#### **4.9.4. Contrastado para estudios de Tomografía Electrónica**

Protocolo estándar con UA acuoso:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, solución de UA al 2% en agua, botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristizador, rejillas con cortes de 250 nm de resina EPON o acrílica (HM20, HM23) (ver apartado 4.7.3), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de UA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 8 min.
4. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ para eliminar el exceso de solución de UA, recogiendo el agua usada en un cristizador.
5. Guardar las rejillas en el rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM.

Protocolo para mejorar el contraste de membranas con MUA:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, soluciones de UA 2% en metanol 70% (MUA), metanol 70%, metanol 50%, metanol 30%, botella de agua milliQ, pipetas Pasteur de vidrio, cristizador, rejillas con cortes de 60 nm de resina EPON o acrílica (HM20, HM23), rejillero, placa de Petri de cristal con una de las mitades cubierta con papel de aluminio.
2. Cortar un trozo de Parafilm y, sin retirar el papel, engancharlo a la mesa con el Parafilm hacia abajo y con la ayuda de unas gotas de agua. Pasar un papel por encima para eliminar el exceso de agua. Con ayuda de las pinzas finas, retirar el papel que cubre el Parafilm.
3. Sobre el Parafilm colocar tantas gotas de MUA como rejillas vayan a ser contrastadas y colocar encima las rejillas con los cortes encarados hacia las gotas. Proteger de la luz con la parte de la placa de Petri cubierta con papel de aluminio y dejar durante 5 min.
4. Cambiar todas las rejillas a metanol 70% y dejar 3 min.
5. Cambiar a metanol 50% y dejar 3 min.
6. Cambiar a metanol 30% y dejar 3 min.
7. Una a una, coger las rejillas con las pinzas y aplicar un chorro abundante de agua milliQ, recogiendo el agua usada en un cristizador.
8. Guardar las rejillas en un rejillero, colocarlo en el interior del desecador y dejar transcurrir al menos dos horas antes de observar las rejillas en el TEM.

#### **4.10. Deposición de “fiducial markers”**

Consiste en depositar en la superficie de las rejillas que van a utilizarse para experimentos de ET marcadores densos a los electrones (“fiducial markers” o “fiducials”) que se adhieran a la rejilla de forma aleatoria y heterogénea en toda su superficie. En nuestros experimentos se ha utilizado proteína A conjugada con oro coloidal de 10 nm (CMC) como “fiducial markers”. Las rejillas utilizadas, dependen del tipo de experimento que se vaya a realizar: RT-ET o CET. Para llevar a cabo los experimentos de RT-ET, los cortes de 200 nm de bloques de

resina epóxica o acrílica recogidos en rejillas de cobre sin recubrimiento de Formvar (ver apartado 4.7.3) se contrastan (según el apartado 4.9.4) y a continuación se aplican los “fiducial markers” en las dos caras de los cortes. Por otro lado, para realizar CET las rejillas deben ser tratadas previamente a la CF, en el caso de bacterias completas que vayan a ser criofijadas por PF, o a la recogida de VIS, en el caso de CETOVIS (ver apartados 4.3.1 y 4.7.1). Para ello, las rejillas Holey Carbon o Quantifoil deben tratarse con “fiducial markers” únicamente en la cara en la que se aplicará posteriormente la muestra.

Protocolo:

1. Preparar sobre la poyata todo el material necesario: Parafilm, pinzas, papel de filtro, solución de proteína A conjugada con oro 1/500 en PBS 10 mM, agua milliQ, micropipetas, pipetas Pasteur de vidrio, rejillas, rejillero.
2. Cortar una tira de Parafilm y engancharla en la poyata con unas gotas de agua, eliminando el exceso de agua con un papel. Descubrir el Parafilm.
3. Depositar las gotas necesarias de solución de proteína A conjugada con oro según las rejillas a tratar.
4. Colocar las rejillas con la cara superior encarada a la gota y dejar 10 min.
5. Sobre el Parafilm hacer 10 lavados con agua de 1 min cada uno.
6. En el caso de las rejillas que ya contienen cortes de resina, repetir los pasos 3, 4 y 5 con la otra cara de las rejillas.
7. Guardar las rejillas en un rejillero dentro de un desecador y dejarlas secar al menos dos horas antes de mirarlas en el TEM (RT-ET) o de aplicar la muestra (CET o CETOVIS).

#### **4.11. Crio fractura**

Las muestras que han sido crioinmovilizadas por PF manual (ver apartado 4.3.2) seguirán esta técnica. El equipo utilizado en nuestros experimentos es el Bal-Tec BAF-060 de Leica llevando a cabo la fractura a  $-100^{\circ}\text{C}$  y a  $10^{-7}$  mbar (Fig. 19). Las réplicas se obtuvieron por sombreado unidireccional en la superficie expuesta con 2 nm de Pt/C a  $45^{\circ}$  y 20 nm de C a  $90^{\circ}$ .



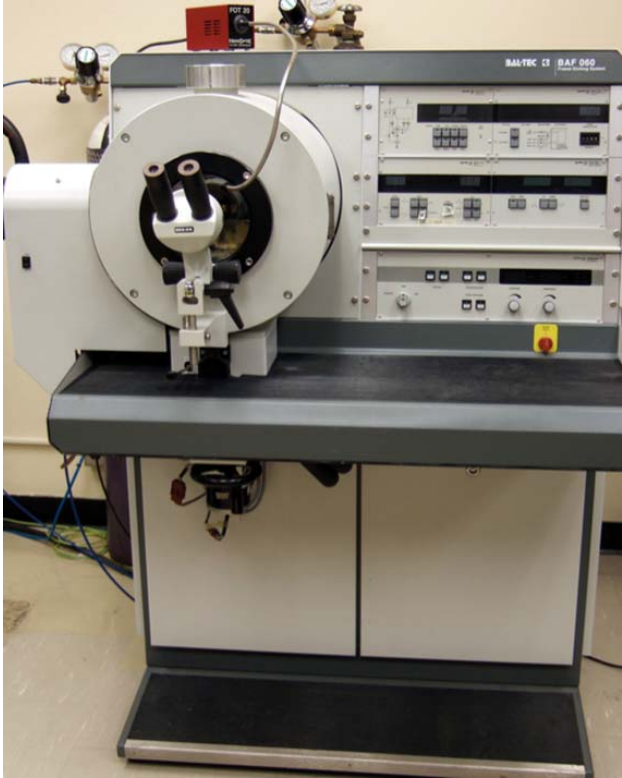


Figura 19. Equipo de FF Bal-Tec BAF-060 de Leica.

#### Protocolo preparación de rejillas:

1. Preparar todo el material necesario sobre la poyata: placa de porcelana con pocillos, lejía, agua milliQ, "loop", pinzas del número 4, rejillas de cobre con Formwar, rejillero.
2. Rellenar un pocillo por muestra de la placa de porcelana con lejía y poner las muestras con réplica en su interior. Dejar que la lejía digiera la muestra durante 3h.
3. Rellenar varios pocillos más con agua milliQ y hacer a cada réplica cambios de pocillo con ayuda del "loop".
4. Con las pinzas, coger una rejilla de cobre, sumergirla en el agua situándola debajo de un fragmento de réplica y rápidamente levantarla para atraparla sobre la rejilla.
5. Repetir el paso 4 para cada muestra.
6. Guardar las rejillas en un rejillero dentro de un desecador al menos dos horas hasta su observación en el TEM.

#### 4.12. Observación en el microscopio electrónico de transmisión

Para llevar a cabo los experimentos se han utilizado dos microscopios según las necesidades y tipo de estudio: el SPIRIT 120 kV (Fig. 20), que utiliza un filamento de hexaboruro de lantano ( $\text{LaB}_6$ ), y el F20 200 kV (Fig. 21), que funciona con un cañón de electrones de tipo Emisión de Campo (FEG), ambos de FEI. Tanto la observación de secciones ultrafinas de resina y de Tokuyasu como la observación de réplicas procedentes de la técnica de FF se ha realizado en el microscopio SPIRIT a 120 kV. La observación directa y la adquisición de series de imágenes a diferentes ángulos a partir de VIS y de bacterias completas crioinmovilizadas mediante Vitrobot se ha llevado a cabo en el F20 a 200 kV. Sin embargo, la adquisición de series a partir de secciones finas de resina para posteriormente llevar a cabo reconstrucciones 3D se ha efectuado tanto en el microscopio SPIRIT como en el F20.



Figura 20. Microscopio SPIRIT 120 kV.



Figura 21. Microscopio F20 200 kV.

#### **4.12.1. Preparación del equipo**

Protocolo:

1. Rellenar con LN<sub>2</sub> el Dewar del microscopio.
2. Si se está trabajando con el microscopio SPIRIT, se debe encender el microscopio:
  - a. Pulsar el botón “HT” (alta tensión) del panel de control.
  - b. En la pestaña “setup” del Software, deslizar la flecha a 40 kV y clicar el botón “high tension” (alta tensión) que se activará (pasará de gris a color amarillo).
  - c. Ir a la pestaña “auto function” y, en el apartado “control”, activar la opción “condition”.
  - d. Esperar a que el TEM suba el HT hasta 120 kV, proceso que le llevará aproximadamente unos 20 min.
  - e. Encender el filamento clicando el botón “filament”, que al activarse quedará de color amarillo.

El microscopio F20 al funcionar con FEG siempre debe estar encendido, por lo que no existe un procedimiento análogo al descrito en este paso.

3. Abrir válvulas clicando el botón amarillo “col. valves closed” que pasará a gris y verificar que el haz de luz es visible.
4. Alinear el microscopio:

a. Alineamientos diarios:

- Retirar el diafragma de objetivo, girando la palanca hacia la derecha.
- En el software, ir a la pestaña “tune” donde aparecen los “direct alignments”.
- Clicar el primer alineamiento, “gun tilt”, centrar el haz con la “track ball” del panel de control y abrirlo. Utilizar las ruedas multifunción x-y (o botones deflectores) para reducir al máximo el valor de tiempo de exposición, visible en la pantalla del ordenador en la parte baja. Pulsar “done”.
- Clicar “gun shift”, concentrar el haz y centrarlo con los controles multifunción x-y. Pulsar “done”.
- Clicar “beam tilt pp x” y reducir el movimiento del haz de electrones con ayuda de los controles multifunción x-y. Clicar “done”.
- Clicar “beam tilt pp y” y proceder como en el paso anterior.
- Clicar “beam shift”, concentrar el haz y centrarlo con los controles multifunción x-y. Al acabar, clicar “done”.
- Clicar “rotation center” y, con ayuda de las ruedas multifunción x-y, conseguir que el movimiento del haz sea concéntrico. Pulsar “done”.
- Si se van a realizar experimentos de ET y se está utilizando el microscopio F20, es necesario también realizar los siguientes alineamientos:
  - Clicar “tomo beam shift pp x” y reducir el movimiento del haz de electrones con ayuda de los controles multifunción x-y. Clicar “done”.
  - Clicar “tomo beam shift pp y” y proceder como en el paso anterior.
  - Clicar “tomo beam shift”, concentrar el haz y centrarlo con los controles multifunción x-y. Al acabar clicar “done”.
  - Clicar “tomo rotation center” y, con ayuda de las ruedas multifunción x-y, conseguir que el movimiento del haz sea concéntrico. Pulsar “done”.

b. Alineamientos semanales:

- Seleccionar la pestaña “align” y en el apartado de “alignments” abrir la carpeta “gun”.
- Clicar “gun tilt”, concentrar el haz a máxima intensidad y centrar con los controles multifunción x-y. Seleccionar “done”.
- Seleccionar “gun tilt pivot points” y seguir las indicaciones: minimizar el movimiento de los “pivot points” para las direcciones x-y con las ruedas multifunción y rehacer “gun tilt” concentrando el haz a máxima intensidad y centrándolo con los controles multifunción x-y. Al finalizar, clicar “done”.
- Clicar “gun shift”, cambiar el “spot size” a 9 con los controles del panel asignados para ello (“L3” para disminuir el “spot size” y “R3” para aumentar el “spot size”). Concentrar el haz y centrarlo con las ruedas multifunción x-y. Cambiar a “spot size” 3 con los controles “L3” y “R3”, concentrar el haz y centrarlo de nuevo con las ruedas multifunción x-y. Repetir el proceso de nuevo en “spot size” 9 y 3 tantas veces sea necesario hasta que los cambios en el haz cambiando de “spot size” sean muy pequeños. Clicar “done”.
- Seleccionar “spot size dependent gun shift” y, siguiendo los pasos indicados, centrar el haz en cada “spot size” que seleccionará el microscopio. Clicar “done”.

5. Ajuste de los astigmatismos de condensador y de objetivo.

a. Astigmatismo de condensador.

- Ir a la pestaña “tune” y, en el apartado “stigmator”, seleccionar “condenser” que pasará a ser de color amarillo. Mediante el uso de los comandos multifunción x-y conseguir que el haz sea concéntrico. Repetir este procedimiento para cada “spot size” que se va a utilizar durante la observación (a temperatura ambiente normalmente se trabaja a un “spot size” entre 1 y 3, mientras que a temperaturas criogénicas, entre 5 y 6). Para ello, cambiar el “spot size” con los controles necesarios en el panel de control.

- Una vez conseguido, proteger los valores de condensador clicando en “none”, de manera que el botón “condenser” cambiará a color gris.
  - b. Astigmatismo de objetivo. En este paso es necesario introducir una muestra en el microscopio. Si se trata de rejillas preparadas para su observación a temperatura ambiente, introducir directamente la muestra a observar. Si la muestra es difícil de enfocar o si se trata de una rejilla preparada para ser observada en condiciones criogénicas, hacer los ajustes de astigmatismo de objetivo con una rejilla conocida preparada para su observación a temperatura ambiente y, una vez calibrado el microscopio, poner la rejilla que se quiere estudiar. Para la introducción de una rejilla en el TEM para su observación a temperatura ambiente ver el apartado 4.12.2.
    - Ajustar los aumentos a un valor cercano a x20000 y ajustar al máximo el foco, mediante los controles correspondientes en el panel.
    - Ir a la pestaña “tune” y activar “objective”. Con ayuda de los controles deflectores intentar mejorar el foco.
    - Subir ligeramente el aumento, reenfocar al máximo y mejorar el foco de nuevo. Ir repitiendo este paso superando los aumentos a los que se va a trabajar para asegurar un correcto foco durante toda la observación en el TEM.
    - Pulsar “none” para desactivar la opción de ajuste del astigmatismo de objetivo.
6. Ajuste de la cámara (“gain correction”).
- a. Si es necesario, ejecutar el software de control de la cámara (TIA).
  - b. Buscar una zona que sea un agujero o en la que no haya muestra y ajustar el haz de manera que ilumine toda la pantalla fluorescente.
  - c. Ir al menú de la cámara “CCD/TV camera”, en “controller” verificar que esté seleccionado “tia CCD” y en “camara”, “CCD”.
  - d. Pulsar “acquire” para tener una imagen de referencia. Si la imagen es gris uniforme, la cámara está correctamente ajustada. Si no lo es, continuar con los siguientes pasos.

- e. Pulsar abrir el desplegable de arriba a la derecha, ir a la pestaña “bias/gain”.
  - f. Pulsar “all bias” y esperar a que acabe el proceso.
  - g. Pulsar “all gain” y, cuando finalice el proceso, clicar en “acquire”.
  - h. Revisar la imagen adquirida, si es gris uniforme la calibración de la cámara es correcta. Si no lo es, repetir los pasos f, g y h hasta que la imagen sea gris uniforme.
7. Retirar la muestra utilizada en el ajuste del astigmatismo de objetivo. En el caso de que la muestra utilizada para ajustar el astigmatismo de objetivo no sea la muestra que se quiere estudiar, ésta se debe retirar (ver apartado 4.12.10).
  8. Ajuste de la “low dose”. Si se va a trabajar en condiciones criogénicas es muy importante ajustar previamente a la introducción de la muestra el mecanismo de observación “low-dose” (a baja dosis de electrones).
    - a. En “workset” seleccionar la pestaña “low dose” y pulsar el botón “low dose”, que al activarse quedará de color amarillo.
    - b. Activar el primer botón “search” y mirar en la pantalla fluorescente del microscopio. Asegurarse de que hay haz de luz y centrarlo con la “track ball” del panel. Fijar los aumentos a los que se quiere trabajar en modo “search” (normalmente entre x2000-10000) y el “spot size” (normalmente 5-6) con los controles correspondientes. Dejar el haz centrado y abierto de manera que cubra toda o prácticamente toda la pantalla fluorescente del TEM. Volver a clicar “search”, que se desactivará pasando a ser el botón de amarillo a gris.
    - c. Activar el botón “focus” y mirar en la pantalla fluorescente del microscopio. Asegurarse de que hay haz de luz y centrarlo con la “track ball” del panel. Fijar los aumentos a los que se quiere trabajar en modo “focus” (normalmente entre x15000-40000) y el “spot size” al mismo valor que se ha fijado en “search” con los controles correspondientes. Dejar el haz centrado y abierto de manera que cubra completamente la pantalla fluorescente del TEM. Desactivar “focus”.
    - d. Activar el botón “exposure” y mirar en la pantalla fluorescente del microscopio. Asegurarse de que hay haz de luz y centrarlo con la “track ball” del panel. Fijar los aumentos al mismo valor que se han fijado en

“Focus” (normalmente entre x15000-40000) y el “spot size” al mismo valor fijado en los modos “search” y “focus” con los controles correspondientes. Dejar el haz centrado y abierto de manera que cubra completamente la pantalla fluorescente del TEM. Volver a clicar “exposure”, que se desactivará, cambiando el color del botón de amarillo a gris.

- e. Activar y desactivar repetidas veces los distintos modos para verificar que el haz permanece centrado en cada caso, volviéndolo a corregir hasta que al cambiar de modo siempre se sitúe en el centro.
9. Calibración del “blank”. Si se va a trabajar en condiciones criogénicas es muy importante ajustar previamente el “blank”. Dentro de la pestaña “low dose”, pulsar la pestaña que abre el menú lateral, aparecerá “screen” y pulsar “calibrate” y “blanker”. Mover el comando multifunción X en sentido horario hasta que desaparezca la luz completamente y pulsar “OK”.
10. Desactivar el botón “low dose”, asegurarse de que los aumentos están en el rango LM y retirar el diafragma de condensador.

#### **4.12.2. Carga de la muestra en condiciones de temperatura ambiente y ajuste del “wobbler”**

Protocolo:

1. Asegurarse que la “cryo-box” situada en un lateral de la columna está fuera.
2. Cerrar las válvulas clicando sobre el botón “col. valves closed”, que se pondrá amarillo. Si se está trabajando con el microscopio F20, clicar en el programa del microscopio sobre el botón “turbo on”, que permanecerá de color naranja mientras esté haciendo el vacío de la precámara. Una vez haya alcanzado el nivel de vacío necesario, el botón “turbo” quedará de color amarillo. Levantar con la herramienta del soporte del “holder” la pieza que sujetará la rejilla y, con ayuda de unas pinzas, coger del rejillero la rejilla que se va a utilizar y posicionarla en la cavidad del “holder” de temperatura ambiente destinada a la misma, con los cortes mirando hacia arriba. Volviendo a usar la herramienta del soporte, cerrar la pieza y asegurarse de que la rejilla está bien pinzada.



- a. En el apartado “stage” del programa, ir a “holder” y clicar en “reset”.
- b. Retirar el “holder” que contiene la rejilla de su soporte e introducirlo en el microscopio en cuestión según las indicaciones:
  - Microscopio SPIRIT. Introducir con cuidado el “holder” en la cavidad destinada a ello en el “compustage” del microscopio, haciendo coincidir un pivote que se encuentra en el “holder” con una ranura localizada en la cavidad del “compustage”, y apretar ligeramente hasta que el “holder” quede bien sujeto. Esperar a que el microscopio haga el vacío en la precámara, momento en que se apagará la luz roja situada en el “compustage”, girar en sentido anti-horario el “holder” e introducirlo lentamente (el microscopio lo succionará, de manera que se debe evitar que entre demasiado rápido y brusco).
  - Microscopio F20. Asegurarse de que el botón “turbo” esté de color amarillo. Clicar el botón “prepump air locked”, que pasará a color amarillo, para detener el vacío de la precámara, coger el “holder” y, en el momento en que la luz roja del “compustage” se apague, introducirlo por la cavidad del “compustage” indicada para ello haciendo coincidir de nuevo el pivote del “holder” con la ranura del “compustage”. Apretar ligeramente hasta que el “holder” quede bien sujeto, esperar a que el microscopio acabe el vacío de la precámara y, en el momento en que la luz roja del “compustage” se apaga, girar en sentido anti-horario el “holder” e introducirlo lentamente (ralentizando la succión del “holder” por parte del microscopio).
- c. Poner el diafragma mediante el giro de la palanca correspondiente de la columna hacia la izquierda.
- d. Abrir válvulas, asegurarse de que el haz de electrones es visible.
- e. Bajar los aumentos a una zona LM (“low magnification”) y retirar el diafragma (palanca hacia la derecha).
- f. Buscar una zona con cortes mediante el uso del cursor y centrarla en la pantalla fluorescente.

- g. Insertar de nuevo el diafragma y subir los aumentos a valores en los que se quiere trabajar (normalmente entre x20000-200000), ajustando la el haz siempre que sea necesario (mayor/menor intensidad del luz con control “brightness” y centrado con “track ball”).
- h. Buscar dentro del corte una zona con muestra mediante el cursor.
- i. En el apartado “stage”, abrir las opciones laterales, ir a la pestaña “control”, pulsar el botón “wobbler”, lo que activará el balanceo del conjunto formado por el “compustage” y el “holder” de lado a lado, movimiento que también se aprecia cuando la muestra se observa en el TEM. Utilizando los controles “z” (arriba y abajo) del panel de control minimizar al máximo el desplazamiento lateral de la muestra mientras existe el balanceo.
- j. Volver a pulsar “wobbler” para desactivar esta opción.

#### **4.12.3. Carga de la muestra en condiciones criogénicas y ajuste del “wobbler”**

Protocolo:

1. Introducir la “cryo-box” situada en un lateral de la columna en el interior. Para ello se debe ajustar el número 1.
2. Cubrir con corcho y/o papel de filtro la mesa del cryo-TEM y la poyata cercana al microscopio.
3. Preparar el material necesario para la carga de la muestra en la poyata cerca del cryo-TEM: traspasar los Falcons que contienen las rejillas a observar del Dewar contenedor de muestras a un Dewar bajo con LN<sub>2</sub> (ya sean rejillas preparadas por PF como por HPF y VIS, ver apartados 4.3.1 y 4.7.1) y dejarlos abiertos en el interior del mismo, pinzas del número 4, pinzas aislantes del frío, herramienta para fijar el anillo que sostiene la rejilla al “cryo-holder” (“clip ring”), luz accesoria, “cryo-holder” insertado en su soporte (GATAN), dos Dewars llenos de LN<sub>2</sub>, embudos con tela para filtrar, guantes de algodón y guantes de nitrilo.
4. En el apartado “stage” del programa, ir a “holder” y clicar en “reset”.
5. Activar el botón “turbo on”, que se pondrá de color naranja mientras hace el vacío en la precámara del microscopio.

6. Poner un embudo en el Dewar del “cryo-holder” y el otro, en el recipiente que forma el soporte del “cryo-holder” y rellenar poco a poco con LN<sub>2</sub> hasta ya no exista burbujeo. A partir de este paso es importante protegerse las manos con guantes de algodón y guantes de nitrilo encima.
7. Con ayuda de las asas del soporte del “cryo-holder”, transportar todo el conjunto ya enfriado a la mesa del “cryo-TEM” y conectar el cable del controlador en la zona del Dewar del “cryo-holder”.
8. En la pantalla del controlador, observar la temperatura del “cryo-holder” y esperar a que ésta alcance los -170°C. Mantener en todo momento la punta del “cryo-holder” sumergida en LN<sub>2</sub>, añadiendo más siempre que fuera necesario.
9. Enfriar bien la herramienta que fija el anillo en el recipiente de LN<sub>2</sub> en el que se encuentra la punta del “cryo-holder” y extraer el “clip ring”. Apoyar la herramienta con cuidado en el borde del recipiente manteniendo en todo momento el extremo de la misma que sostiene el “clip ring” bajo LN<sub>2</sub>.
10. Traspasar rápidamente el rejillero que se encuentra en el interior del Falcon a la cavidad destinada para ello en el recipiente del soporte del “cryo-holder”, desenroscar la tapa del rejillero y dejarla de nuevo en el interior del Falcon (en LN<sub>2</sub>).
11. Pinzar una rejilla del interior del rejillero y colocarla en la cavidad de la punta del “cryo-holder” destinada para ello. Evitar en todo momento que la rejilla supere el nivel del LN<sub>2</sub> (Fig. 21).
12. Apoyar con cuidado las pinzas en el borde del recipiente del soporte del “cryo-holder”, volver a coger la herramienta que sostiene el “clip ring” y fijarlo sobre la rejilla. Con ayuda de las pinzas, asegurarse de que el “clip ring” y, por lo tanto, la rejilla estén bien sujetos.
13. Desconectar del Dewar del “cryo-holder” el cable del controlador.
14. Asegurarse de que el botón “turbo on” esté de color amarillo.
15. Clicar el botón “prepump air locked”, que pasará a color amarillo, para detener el vacío de la precámara. Coger el “cryo-holder” sin retirarlo del soporte y, en el momento en que la luz roja del “compustage” se apague, retirarlo rápidamente del soporte e introducirlo por la cavidad del “compustage” indicada para ello haciendo coincidir de nuevo el pivote del “holder” con la ranura del “compustage”. Apretar ligeramente hasta que el

“holder” quede bien sujeto, esperar a que el microscopio acabe el vacío de la precámara y, en el momento en que la luz roja del “compustage” se apaga, girar en sentido anti-horario el “holder” (se derramará parte del contenido de LN<sub>2</sub> presente en el Dewar del “cryo-holder”) e introducirlo lentamente (ralentizando la succión del “holder” por parte del microscopio).



Figura 21. “Cryo-holder” de GATAN en su soporte. Arriba a la derecha se puede observar la cavidad del soporte que se rellena de LN<sub>2</sub>, el rejillero con las rejillas preparadas (azul) y la punta del “cryo-holder” dónde se carga la rejilla.

16. Rápidamente, rellenar con LN<sub>2</sub> el Dewar del “cryo-holder” y reconectar el cable del controlador. Verificar que la temperatura no supera los -170°C.
17. Asegurarse de que la opción “low dose” está desactivada, que los aumentos se encuentran en el rango de baja magnificación (LM, “low magnification”) y que el diafragma está fuera (palanca hacia la derecha).
18. Abrir válvulas, buscar una zona periférica en la que haya muestra mediante el uso del cursor.
19. Introducir el diafragma, activar la “low dose” y el modo “search” y buscar una zona en la que haya muestra con el cursor.

20. En el apartado “stage”, abrir las opciones laterales, ir a la pestaña “control”, pulsar el botón “wobbler”, lo que activará el balanceo del conjunto formado por el “compustage” y el “holder” de lado a lado, movimiento que también se aprecia cuando la muestra se observa en el TEM. Utilizando los controles “z” (arriba y abajo) del panel de control minimizar al máximo el desplazamiento lateral de la muestra mientras existe el balanceo.
21. Volver a pulsar “wobbler” para desactivar esta opción.

#### **4.12.4. Búsqueda del foco de la muestra en condiciones “low-dose” (sólo en condiciones criogénicas)**

Protocolo:

1. Buscar una zona de la periferia de la rejilla (se puede observar bajando los aumentos al rango LM, ver apartado 4.12.3), con la “low dose” activada y en modo “search”, buscar una zona mediante el uso del cursor en la que se observe borde de la capa de carbón y muestra, ya sean VIS o bacterias completas por PF, y centrarla. Cambiar a modo “focus”.
2. Pulsar en el panel “eucentric height” y hacer un “reset” de los valores de foco con el control correspondiente.
3. Con el control del foco del panel, girar en sentido anti-horario hasta enfocar claramente el borde del carbón y volver a hacer un “reset” de los valores de foco con el control correspondiente.
4. Seguir girando el control del foco en sentido anti-horario lentamente hasta que la muestra quede lo más enfocada que sea posible.

#### **4.12.5. Ajuste de la dosis electrónica en condiciones “low-dose” (sólo en condiciones criogénicas)**

Protocolo:

1. En la pestaña de “low dose”, activar la “low dose” y, a continuación, activar “exposure”.

2. Asegurarse de que la pantalla fluorescente del cryo-TEM está bajada (si no lo está, pulsar el botón que se encuentra a la izquierda de la columna que sirve tanto para bajarla como para subirla).
3. Desplegar las opciones con la pestaña de la derecha, seleccionar la pestaña “options”, pulsar “measure” y activar la opción “continuously”. Aparecerá el valor de dosis electrónica a la que estamos trabajando. Es importante ajustar bien la dosis según el experimento que se vaya a realizar:
  - a. Observación directa. Se puede utilizar una dosis de 80-100 electrones/nm<sup>2</sup> por segundo por foto.
  - b. ET. La dosis máxima que puede recibir un nanómetro cuadrado de muestra es de 5000 electrones. Se debe tener en cuenta la cantidad total de imágenes de una misma zona a diferentes ángulos que se van a adquirir, normalmente unas 70 imágenes. Al dividir 5000/70 resulta una dosis máxima por segundo de 71,42 electrones/nm<sup>2</sup>. En estas condiciones, fijar un valor de dosis electrónica de 50-60 electrones/nm<sup>2</sup> por segundo.

Ajustar el valor deseado de dosis con el comando “brightness” del panel de control.

#### **4.12.6. Análisis del hielo de la muestra en condiciones criogénicas**

Protocolo:

1. Con la “low dose” activada y en modo “search”, buscar una zona con muestra de interés con el cursor.
2. Bajar la pantalla fluorescente mediante el botón que se encuentra a la izquierda de la columna del microscopio.
3. Pulsar “diffraction” en el panel de control.
4. Usar el mando “brighthness” para conseguir visualizar el patrón de difracción formado por aros de luz concéntricos. Si en la pantalla está completamente oscura y únicamente se observan estos aros de luz, significa que la muestra es vítrea y, por lo tanto, se puede trabajar en ella. Por el contrario, la presencia de pequeños puntos brillantes en la pantalla junto con los aros

concéntricos indica que el hielo es cristalino y, por lo tanto, se debe buscar otra zona para trabajar.

5. Volver a pulsar “difraction” para desactivar la opción.

#### **4.12.7. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio SPIRIT a temperatura ambiente**

Protocolo:

1. Una vez la rejilla ha sido cargada en el TEM y el wobbler ha sido ajustado en una zona con muestra (ver apartado 4.12.2), introducir la cámara con el control correspondiente y activarla (icono cámara) en el software controlador.
2. Ajustar la luz con el control “brightness” de manera que en el diagrama de exposición que aparece en la pantalla presente el máximo en el 50.
3. Ajustar el foco con el control “focus” en la imagen que nos aparece en la pantalla del ordenador.
1. Desplazarse por la rejilla con el uso del cursor mirando en la pantalla del ordenador. Si en algún momento se quiere buscar una zona diferente de la rejilla, puede ser útil cambiar los aumentos al rango LM (ver apartado 4.12.2).
4. Siempre que se quiera tomar una imagen, ajustar previamente los aumentos deseados y la luz y pulsar el icono de la cámara.
5. Clicar en el icono del diskette, seleccionar la ruta en la que se quiere guardar, poner un nombre y pulsar “guardar”.

#### **4.12.8. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio F20 a temperatura ambiente**

Protocolo:

1. Una vez la rejilla ha sido cargada en el TEM y el wobbler ha sido ajustado en una zona con muestra (ver apartado 4.12.2), subir la pantalla fluorescente del TEM con el botón situado a la izquierda de la columna.
2. En el menú “CCD/TV camera”, pulsar “preview”, lo que activará la cámara, apareciendo su imagen en la pantalla del ordenador.

3. Ajustar la luz con el control “brightness” y el foco con el control “focus” en la imagen que nos aparece en la pantalla del ordenador.
4. Desplazarse por la rejilla con el uso del cursor mirando en la pantalla del ordenador. Si en algún momento se quiere buscar una zona diferente de la rejilla, puede ser útil cambiar los aumentos al rango LM (ver apartado 4.12.2).
5. Siempre que se quiera tomar una imagen, ajustar previamente los aumentos deseados y la luz y pulsar el botón “acquire”.
6. Clicar en el icono del diskette, seleccionar la ruta en la que se quiere guardar, poner un nombre y pulsar “guardar” (se guardará en un formato que sólo se puede ver en el TEM).
7. Encima de la imagen hacer botón derecho con el ratón y seleccionar “export data”, buscar la ruta en la que se quiere guardar la imagen, seleccionar la extensión “.tif” con “scale bar” y clicar “guardar” (el formato “.tif” ya es un archivo genérico que se puede observar en cualquier ordenador).

#### **4.12.9. Observación directa y captura de imágenes en el microscopio F20 a temperaturas criogénicas**

Protocolo:

1. Una vez se han realizado todos los ajustes correspondientes para trabajar en “low dose” (ver apartados 4.12.3, 4.12.4, 4.12.5, 4.12.6 y 4.12.9), bajar los aumentos al rango de LM para buscar muestra ya en la zona central de la rejilla (proceder según el apartado 4.12.3).
2. Con la “low dose” activada y en modo “search”, desplazarse por la rejilla con el uso del cursor mirando en la pantalla del ordenador.
3. Siempre que se quiera tomar una imagen, pasar a modo “exposure” y pulsar “expose”. Una vez ajustado el foco según el apartado 4.12.4, sólo se reajustará en aquellos casos en los que sea necesario.
4. Clicar en el icono del diskette, seleccionar la ruta en la que se quiere guardar, poner un nombre y pulsar “guardar” (se guardará en un formato que sólo se puede ver en el TEM).



5. Encima de la imagen hacer botón derecho con el ratón y seleccionar “export data”, buscar la ruta en la que se quiere guardar la imagen, seleccionar la extensión “.tif” con “scale bar” y clicar “guardar” (el formato “.tif” ya es un archivo genérico que se puede observar en cualquier ordenador).

#### **4.12.10. Retirada del “holder” del microscopio electrónico de transmisión a temperatura ambiente**

Protocolo:

1. Pulsar “col. valves closed” para cerrar las válvulas (el botón debe quedar de color amarillo).
2. Tirar del “holder” hacia fuera del TEM con mucho cuidado y lentamente hasta llegar a un tope.
3. Con las mismas precauciones, girar en sentido horario el “holder” hasta llegar a otro tope.
4. Volver a tirar el “holder” hacia fuera, retirándolo completamente.
5. Colocar el “holder” sobre su soporte y, con la ayuda de la herramienta del soporte del “holder”, levantar la pieza que sujeta la rejilla, coger la rejilla con unas pinzas y colocarla en su correspondiente ubicación en el rejillero.

#### **4.12.11. Retirada del “cryo-holder” del microscopio electrónico de transmisión en condiciones criogénicas**

Protocolo:

1. Pulsar “col. valves closed” para cerrar las válvulas (el botón debe quedar de color amarillo).
2. Proteger la mesa del cryo-TEM con papel de filtro y/o corcho y tener a mano una caja de poliestireno para recoger el LN<sub>2</sub> que pueda caer.
3. Tirar del “cryo-holder” hacia fuera del TEM con mucho cuidado y lentamente hasta llegar a un tope.
4. Con las mismas precauciones que en el paso anterior, girar en sentido horario el “cryo-holder” hasta llegar a otro tope. Colocar justo debajo la caja de poliestireno para recoger el LN<sub>2</sub> que caerá del Dewar del “cryo-holder”.

5. Volver a tirar el “cryo-holder” hacia fuera, retirándolo completamente.
6. Introducir la punta del “cryo-holder” en el orificio destinado para ello en la “dry-pumping station” (GATAN).
7. Fijar el tubo de plástico de la “dry-pumping station” al tubo metálico orientado hacia abajo del Dewar del “cryo-holder”.
8. Asegurarse de que las válvulas de la estación de vacío y la del Dewar del “cryo-holder” están cerradas (roscas apretadas en sentido horario) y encender el botón “power” de la “dry-pumping station”. Esperar a que el vacío llegue a  $10^{-4}$  Torr.
9. Empezar a abrir la válvula de la estación poco a poco y, cuando empiece a bajar el nivel de vacío, parar y esperar a que éste empiece a recuperarse. Una vez ocurra, abrir totalmente la válvula y esperar a que el nivel de vacío alcance de nuevo el valor  $10^{-4}$  Torr.
10. Según si el “cryo-holder” se vaya a utilizar seguidamente o no, proceder:
  - a. Si el “cryo-holder” se va a volver a utilizar seguidamente, conectar la clavija del controlador al Dewar, activar el ciclo de “warm-up” y esperar aproximadamente 20 min a que acabe el ciclo para poder utilizar de nuevo el “cryo-holder”.
  - b. Si el “cryo-holder” no se va a volver a utilizar seguidamente, empezar a abrir la válvula del Dewar poco a poco, parando siempre que sea necesario para evitar que el vacío llegue a  $10^{-1}$  Torr. Conectar la clavija del controlador al Dewar del “cryo-holder”, activar el ciclo de zeolita en el controlador y poner el tiempo deseado (entre 1-99h). Antes de que acabe el ciclo de zeolita se debe cerrar la válvula del Dewar.
11. Justo antes de utilizar el “cryo-holder” de la “dry-pumping-station”, cerrar todas las válvulas, desconectar la estación de vacío mediante el botón “power” y proceder a retirarlo.

#### **4.12.12. Calibración del microscopio electrónico de transmisión para experimentos de Tomografía Electrónica a temperatura ambiente y a temperaturas criogénicas**

Protocolo:

1. Realizar todos los alineamientos y ajustes de la cámara CCD necesarios en el TEM según el apartado 4.12.1.
2. Preparar una rejilla para las calibraciones. Para ello, utilizar una rejilla de cobre de 200 mesh, con una capa de carbón y sin muestra. Preparar la rejilla según el apartado 4.10, depositando oro únicamente en la cara superior de la rejilla.
3. Colocar el “tomo-holder” en su soporte y fijar la rejilla en la cavidad correspondiente localizada en su extremo. El “tomo-holder” dispone de una punta más fina que el “holder” de observación directa, dónde se fija la rejilla con ayuda de unas pequeñas placas metálicas. Estas placas se deslizan lateralmente con ayuda de unas pinzas para sujetar el borde de la rejilla y se deben fijar con el destornillador correspondiente. Independientemente de si el experimento de ET se llevará a cabo en condiciones de temperatura ambiente o en condiciones criogénicas, la mayoría de pasos de la calibración se pueden realizar en condiciones de temperatura ambiente con el “tomo-holder”, que se introduce en el TEM siguiendo el mismo procedimiento usado para el “holder” de observación directa (ver apartado 4.12.2). A excepción del paso 14, que se debe ejecutar con el mismo “holder” con el que se realizará el experimento y en las mismas condiciones (si es el “cryo-holder”, se hará en condiciones criogénicas).
4. En el software ir a la pestaña “experiments”, seleccionar el componente del desplegable “TEM tomography component” y el experimento “TEM basic calibrations” y pulsar “start”. Se abrirá el panel “xplore 3D-TEM calibrations”.
5. Clicar la opción “adjust imaging conditions” y asegurarse de que la luz y el foco son adecuados (usar los controles “brightness” y “focus”).
6. Clicar “magnification calibration” y pulsar “proceed”. El aumento correcto para este ajuste se elegirá automáticamente. Si el resultado de la

calibración es positivo, aparecerá un mensaje indicando que la calibración “succeeded”. Si no lo es, repetir.

7. Seleccionar “image shift calibration”, activar la opción “use MCF for shift measurement”, fijar los aumentos al mismo valor que se utilizó para la “magnification calibration”, ajustar la luz y el foco con los correspondientes controles y clicar “proceed”. Repetir el proceso con el aumento que se prevé utilizar para el experimento de ET. Esperar al resultado de la calibración y rehacerla si es necesario.
8. Fijar los aumentos en un valor bajo del rango HM (alta magnificación), ajustar la luz y el foco con los controles necesarios, clicar “stage shift calibration task”, activar la opción “use MCF for shift measurement” y pulsar “proceed”. Esperar al resultado de la calibración y rehacerla si es necesario.
9. Fijar los aumentos en un valor de HM intermedio (alrededor de x40000), revisar el astigmatismo de objetivo (ver apartado 4.12.1), enfocar la imagen con “focus”, seleccionar “beam tilt calibration” y pulsar “proceed”. Esperar al resultado de la calibración y rehacerla si es necesario.
10. Fijar los aumentos en un valor de HM intermedio (alrededor de x40000), revisar el astigmatismo de objetivo, enfocar la imagen con “focus”, clicar en “focus/stigm. calibration task” y pulsar “proceed”. Esperar al resultado de la calibración y rehacerla si es necesario.
11. Fijar los aumentos en un valor de HM intermedio (alrededor de x40000), enfocar la imagen con “focus”, clicar en “eucentric focus calibration” y pulsar “proceed”. Esperar al resultado de la calibración y rehacerla si es necesario.
12. Clicar en “settle holder” y “proceed” y esperar a que finalice. Este ajuste hay que hacerlo una vez cada vez que se introduce un “holder” (ya sea para calibraciones como para adquirir series de imágenes).
13. Fijar los aumentos en un valor de HM intermedio (alrededor de x40000), seleccionar “optimized position calibration” y “proceed”. Si el valor difiere del valor anterior más de 2  $\mu\text{m}$ , ajustar los alineamientos “beam shift”, “rotation center” y los alineamientos “tomo...” de los “direct alignments” (ver apartado 4.12.1) y rehacer la “optimized position calibration”.

14. Fijar los aumentos en un valor bajo del rango HM, ajustar la luz y el foco con los controles necesarios, buscar una zona de la rejilla en la que se aprecie alguna característica atípica (partícula, suciedad...) y centrarla, seleccionar "holder calibration", pulsar "proceed" y, de nuevo, "proceed". Revisar la gráfica obtenida y, en el caso que aparezcan saltos repentinos, rehacer la calibración. Revisar también la serie de imágenes guardada asegurándose de que la estructura centrada inicialmente permanece más o menos centrada a lo largo de toda la serie. Si en algún momento la estructura desaparece del plano, rehacer la calibración. Si se considera que la calibración es correcta, pulsar "apply".
15. En el software del microscopio, ir a la pestaña "experiments", seleccionar el componente del desplegable "TEM tomography component" y el experimento "TEM auto functions" y pulsar "start". Se abrirá el panel "auto tasks".
16. Seleccionar "eucentric height" y pulsar "proceed". Revisar que hace correctamente la función.
17. Seleccionar "auto focus" y pulsar "proceed". Revisar que hace correctamente la función.

#### **4.12.13. Adquisición de series de imágenes en el microscopio electrónico de transmisión para experimentos de Tomografía Electrónica a temperatura ambiente**

1. Recuperar del rejillero la rejilla que contiene las secciones plásticas (ver apartados 4.7.3 y 4.9.4) con los "fiducial markers" depositados (ver apartado 4.10) que se quiere utilizar para el experimento.
2. Preparación de la rejilla (sólo en adquisición de series de imágenes a doble eje). Con un marcador permanente de punta fina hacer un pequeño punto en un margen de la rejilla preparada para los experimentos de ET. Hacer otro punto también en el margen de la rejilla a unos 90° aproximados de la primera marca.
3. Preparación del "tomo-holder". Este paso sólo es necesario para la adquisición de series de imágenes a doble eje. Localizar la cavidad en la

que se introduce la rejilla y, con un marcador permanente de punta fina, hacer un pequeño punto en un margen.

4. Carga de la rejilla en el “tomo-holder” e introducción en el TEM. La carga de la rejilla en el “tomo-holder” se realizará de la misma forma descrita en el apartado 4.12.12. En el caso que se quiera realizar un experimento de ET a doble eje, además se deberá hacer coincidir una de las marcas realizadas en el borde de la rejilla con la marca del “holder” de ET. El procedimiento de introducción en el TEM es el mismo descrito en el apartado 4.12.2.
5. Abrir válvulas, bajar los aumentos al rango de LM, apartar el diafragma de objetivo, ajustar la luz y situarse aproximadamente en el centro de un agujero céntrico de la rejilla.
6. Introducir el diafragma de objetivo, ajustar los aumentos a un valor aproximado a x20000, ajustar la luz y el foco con los comandos correspondientes y buscar estructuras de interés en la zona mediante el cursor, ya sea directamente mirando la pantalla fluorescente o por observación en la pantalla del ordenador (ver apartados 4.12.7 y 4.12.8, según microscopio utilizado). Si no se encuentra una zona de interés en ese agujero de la rejilla o es demasiado próximo a una barra de la misma, buscar en el centro de otro agujero también situado en la zona céntrica de la rejilla (rehaciendo los pasos 5 y 6) hasta conseguirlo.
7. Una vez localizada alguna estructura de interés y si se tiene previsto realizar ET, guardar una imagen en el rango HM, a muy bajos aumentos, para tener una panorámica de la estructura de interés dentro de la muestra, y guardar otra en rango LM, para tener una panorámica del corte en el que se encuentra la estructura dentro de la rejilla (para adquirir imagen en el rango LM será necesario ajustar el “spot size” a valores elevados).
8. Fijar a los aumentos deseados para captar series de imágenes (normalmente, entre x59000-x100000 en el microscopio SPIRIT y entre x29000-x100000, en el microscopio F20) y ajustar la luz y el foco.
9. En el software del microscopio, ir a la pestaña “experiments”, seleccionar en el desplegable “TEM tomography component”, el experimento “TEM tomography” y pulsar “start”. Se abrirá el panel “TEM tomography”.
10. Seleccionar la opción “acquire tilt series” y pulsar “proceed”.

11. Revisar los parámetros de la cámara y pulsar “proceed”.
  - a. Valores en el microscopio SPIRIT:
    - Search: “binning” 2-4 y “full size”.
    - Focus: “binning” 1 y “half size”.
    - Exposure: “binning” 1 y “full size”.
    - Tracking: “binning” 2-4 y “full size”.
  - b. Valores en el microscopio F20:
    - Search: “binning” 4 y “full size”.
    - Focus: “binning” 2 y “half size”.
    - Exposure: “binning” 2 y “full size”.
    - Tracking: “binning” 4 y “full size”.
12. Aparecerán los parámetros de adquisición:
  - a. “max. negative angle”/“max. positive angle”:  $-60^{\circ}/+60^{\circ}$
  - b. “acquisition scheme”: “start at  $0^{\circ}$ ”
  - c. “relaxation time”: 2 s
  - d. “low tilt step”/“high tilt step”:  $1^{\circ}/2^{\circ}$
  - e. “high tilt switch”:  $40^{\circ}$
  - f. Activar “start at eucentric height” y “start with autofocus”.
  - g. “applied defocus”: 0.
  - h. Activar “track before acquisition” y “track after acquisition”.
  - i. “file type”: “MRC series”
  - j. “directory”: aparece el directorio que está por defecto.
  - k. “save as”: pulsar el botón “...”, modificar la ruta si es necesario, poner el nombre de archivo y pulsar “save”.

Pulsar “apply” y “proceed”.
13. Cuando el programa lo solicite, centrar la estructura de interés haciendo doble clic en ella o utilizando el cursor. Pulsar “proceed”.
14. Activar la opción “manual tracking at  $0^{\circ}$ ”.
15. Revisar que el proceso de adquisición de series funcione correctamente.
  - a. Si el foco no fuera el correcto, activar la opción “manual focusing” y enfocar manualmente cuando el programa lo solicite.
  - b. Si la estructura no se encontrase bien centrada, activar la opción de “manual tracking before” o las dos opciones de “manual tracking”

(“after” o “before”) y centrar la estructura, cuando lo solicite el programa, haciendo doble clic sobre ella.

Estas opciones se pueden ir activando y desactivando durante el proceso de adquisición de series.

16. Una vez finalizada la adquisición de la serie, seleccionar “visualize”.
17. En “load input data set”, pulsar “...”, buscar el archivo que hemos guardado y que tiene extensión “.mrc” y clicar “open”. Se podrá visualizar la serie de imágenes guardada. Si el resultado es satisfactorio, el archivo “.mrc” ya se puede utilizar para reconstruir el tomograma.
18. En “output (AVI) movie” se puede guardar la serie en un formato visible en cualquier ordenador sin necesidad de tener instalado un software de reconstrucción. Para ello, pulsar “...”, poner el mismo nombre de archivo y guardarlo (ahora se guardará en formato “.avi”).
19. En el caso que se quiera hacer ET a doble eje, hay que continuar el proceso como se describe seguidamente. Retirar el “holder” para ET del microscopio (ver apartado 4.12.10) y colocarlo sobre su soporte.
20. Con ayuda del destornillador, abrir los tornillos que aprietan las placas que fijan la rejilla al “holder” y, con las pinzas, deslizarlas hacia los laterales dejando la rejilla completamente descubierta.
21. Con las pinzas, girar la rejilla haciendo coincidir la otra marca del borde con la marca de “tomo-holder” y fijarla en su nueva posición mediante el destornillador.
22. Introducir el “tomo-holder” en el TEM (ver 4.12.2).
23. Abrir válvulas, bajar los aumentos al rango de LM, apartar el diafragma de objetivo y ajustar la luz.
24. Abrir la imagen panorámica de la rejilla con los cortes realizada anteriormente y girarla de forma adecuada (si la rejilla se ha girado en sentido horario, girar la imagen de la misma forma, y a la inversa). Tomando esta imagen como mapa, localizar el corte y el agujero y situarse aproximadamente en el centro del mismo con ayuda del cursor.
25. Introducir el diafragma de objetivo, ajustar los aumentos a un valor muy bajo dentro del rango HM.
26. Abrir la imagen panorámica de la estructura de interés y girarla de la forma adecuada (si la rejilla se ha girado en sentido horario, girar la



imagen en sentido antihorario, y a la inversa). Tomando esta imagen como mapa, usar el cursor para localizar la estructura de interés.

27. Una vez localizada, fijar los mismos aumentos usados en la adquisición del primer eje y ajustar la luz y el foco.
28. Proceder a la adquisición de la segunda serie para la nueva posición de la rejilla repitiendo los pasos 9-18.

#### **4.12.14. Adquisición de series de imágenes en el criomicroscopio electrónico de transmisión para experimentos de Criotomografía Electrónica**

Protocolo:

1. Recuperar en un Dewar con LN<sub>2</sub> las rejillas preparadas para CET, ya sean bacterias completas crioinmovilizadas por PF (ver apartado 4.3.1) o VIS de bacterias crioinmovilizadas por HPF (CETOVIS) (ver apartados 4.7.1).
2. Introducir una de las rejillas en el “cryo-TEM” según el protocolo 4.12.3.
3. Hacer los ajustes y comprobaciones necesarios: foco, dosis electrónica y comprobación del hielo (ver apartados 4.12.4, 4.12.5 y 4.12.6).
4. Bajar los aumentos al rango de LM, apartar el diafragma de objetivo y abrir válvulas.
5. Ajustar la luz y situarse aproximadamente en el centro de un agujero céntrico en la rejilla donde haya muestra.
6. Introducir el diafragma de objetivo, activar la “low dose” en modo “search” y buscar una estructura de interés.
7. Cambiar a modo “focus” y desplazar en enfoque una zona situada entre 2-8 μm centrar la estructura de interés. Para ello ir a la pestaña “focus”, seleccionar un ángulo de desplazamiento y, por arrastre de la flecha, las micras. La imagen se desplazará a la vez que se arrastra la flecha, permitiéndonos elegir una distancia donde la imagen se pueda enfocar fácilmente.
8. Enfocar manualmente la muestra y volver al modo “search”.
9. En el software del microscopio, ir a la pestaña “experiments”, seleccionar en los desplegados “TEM tomography component” y “TEM tomography” y pulsar “start”. Se abrirá el panel “TEM tomography”.

10. Seleccionar la opción “acquire tilt series” y pulsar “proceed”.
11. Revisar los parámetros de la cámara y pulsar “proceed”.  
Valores (microscopio F20):
  - a. “search”: “binning” 4 y “full size”.
  - b. “focus”: “binning” 2 y “half size”.
  - c. “exposure”: “binning” 2 y “full size”.
  - d. “tracking”: “binning” 4 y “full size”.
12. Aparecerán los parámetros de adquisición:
  - a. “max. negative angle”/“max. positive angle”:  $-60^{\circ}/+60^{\circ}$ .
  - b. “acquisition scheme”: “start at 0”.
  - c. “relaxation time”: 2 s.
  - d. “low tilt step”/“high tilt step”:  $1^{\circ}/2^{\circ}$ .
  - e. “high tilt switch”:  $40^{\circ}$ .
  - f. Activar “start at eucentric height” y “start with autofocus”.
  - g. “applied defocus”:  $-6\ \mu\text{m}/-12\ \mu\text{m}$  (según si se están adquiriendo imágenes a partir de VIS o de bacterias completas crioinmovilizadas por PF).
  - h. “intensity ratio”: 1,6.
  - i. Activar “track before acquisition” y “track after acquisition”.
  - j. “file type”: “MRC series”.
  - k. “directory”: aparece el directorio que está por defecto.
  - l. “save as”: pulsar el botón “...”, modificar la ruta si es necesario, poner el nombre de archivo y pulsar “save”.

Pulsar “apply” y “proceed”
13. Cuando el programa lo solicite, centrar la estructura de interés haciendo doble clic en ella o utilizando el cursor. Pulsar “proceed”.
14. Activar la opción “manual tracking at 0”.
15. Revisar que el proceso de adquisición de series funcione correctamente.
  - a. Si el foco no fuera correcto, activar la opción “manual focusing” y enfocar manualmente cuando el programa lo solicite.
  - b. Si la estructura no se encontrase bien centrada, activar la opción de “manual tracking before” y/o “after” y centrar la estructura, cuando lo solicite el programa, haciendo doble clic sobre ella. Se debe tener en

cuenta que el “manual tracking before” realiza una exposición extra a la muestra cada vez, de manera que se debe limitar su uso.

Estas opciones se pueden ir activando y desactivando durante el proceso de adquisición de series.

16. Una vez finalizada la adquisición de la serie, seleccionar “visualize”.
17. En “load input data set”, pulsar “...”, buscar el archivo que hemos guardado y que tiene extensión “.mrc” y clicar “open”. Se podrá visualizar la serie de imágenes guardada. Si el resultado es satisfactorio, el archivo “.mrc” se podrá utilizar para reconstruir el tomograma.
18. En “output (AVI) movie” se puede guardar la serie en un formato visible en cualquier ordenador sin necesidad de tener instalado un software de reconstrucción. Para ello, pulsar “...”, poner el mismo nombre de archivo y guardarlo (ahora se guardará en formato “.avi”).

### **4.13. Procesamiento por ordenador**

#### **4.13.1. Reconstrucción de tomogramas de un solo eje**

La reconstrucción 3D de las series adquiridas a un solo eje se ha llevado a cabo únicamente a partir de series de imágenes tomadas en condiciones criogénicas. Para ello, se han utilizado los programas IMOD (Kremer et al., 1996) y Tomo3D (Agulleiro et al., 2010; Agulleiro and Fernández, 2011).

Protocolo:

1. Se debe cambiar la extensión “.mrc” guardada por el TEM durante la adquisición de la serie a extensión “.st”. Para ello proceder:
  - a. Copiar la carpeta con los archivos guardados durante la adquisición de la serie a la ruta donde queremos guardar los tomogramas y archivos generados durante su reconstrucción.
  - b. Abrir el terminal y buscar el directorio en el que vamos a trabajar.
  - c. Cambiar la extensión del archivo con el comando:  
`mv nombre_serie.mrc nombre_serie.st`
2. En el terminal, abrir el programa Etomo y seleccionar “new tomogram”.

3. En “dataset name”, clicar en el icono de la carpeta y buscar la serie guardada en formato “.st”.
4. Seleccionar “single axis” y “single frame”.
5. Pulsar el botón “scan header” y se rellenarán automáticamente las casillas “pixel size” e “image rotation”. En la casilla “fiducial diameter” escribir 10.
6. Seleccionar “extract tilt angles from data” y pulsar el botón “create com scripts”.
7. Seleccionar el botón “pre-processing”.
  - a. Pulsar “find X-rays (trial mode)” y, a continuación, “view x-ray model”. Se abrirá la serie con los valores de píxel extremos (tanto altos como bajos) marcados, los cuales podrían afectar el contraste e, incluso, provocar artefactos en la reconstrucción. Estos valores extremos se originan al incidir aleatoriamente rayos X en la cámara CCD durante la adquisición o por la oscuridad inicial.
  - b. Para corregir estos valores, pulsar “create fixed stack” y, a continuación, “view fixed stack”. Si el resultado es correcto, seleccionar “use fixed stack” para seguir trabajando a partir de la serie corregida.
  - c. Cerrar la ventana con la serie corregida y pulsar el botón “done”.
8. Seleccionar el botón “coarse alignment”.
  - a. Pulsar “calculate cross-correlation” para que el programa encuentre un alineamiento inicial entre las imágenes sucesivas de la serie.
  - b. Pulsar “generate coarse aligned stack” para generar la serie alineada y, a continuación, “view aligned stack in 3dmod”. Se abrirá la serie alineada para su comprobación.
  - c. Cerrar la ventana con la serie y clicar “done”.
9. Ir al siguiente botón del menú lateral, “fiducial model generation”. En este paso se generará el modelo de “fiducial markers” a partir de los que se observan en la imagen.
  - a. Pulsar “seed fiducial model” lo que abrirá la serie alineada y la ventana “bead fixer” con la opción “make seed” marcada. Asegurarse de que en la ventana “bead fixer” la opción “automatic new contour” también está activada. Situarse en una imagen del centro de la serie (normalmente el ángulo 0°) y, en la imagen seleccionada, marcar aproximadamente 20-40 “fiducial markers” de los que aparecen haciendo clic sobre ellos.

- b. Guardar el modelo en “file” < “save model”.
  - c. Clicar “track seed model” para que el programa automáticamente localice los “fiducial markers” seleccionados en las otras imágenes.
  - d. Pulsar “fix fiducial model” lo que hará que la ventana “bead fixer” cambie al modo “fill gaps”, que permite interactuar con el modelo y rellenar los “fiducial markers” que no han sido localizados por el programa. Clicar “go to next gap” lo que seleccionará un “fiducial marker” que no se ha encontrado automáticamente en alguna imagen adyacente. Mirar las imágenes anterior y posterior y clicar en el “fiducial marker” que no ha sido localizado por el programa. Volver a pulsar “go to next gap” procediendo de la misma forma indicada anteriormente sucesivamente con todos los “fiducial markers” fallidos hasta que aparezca el mensaje “no more gaps are found”.
  - e. Guardar el modelo modificado (ver el apartado b).
  - f. Pulsar “done”.
10. Pulsar el botón lateral “fine alignment”.
- a. Seleccionar “do not sort fiducials into 2 surfaces for analysis” y pulsar “compute alignment”.
  - b. Abrir el archivo “.log” del alineamiento haciendo botón derecho sobre el cuadro de opciones de “fine alignment” y seleccionar “align log file”. Se abrirá un cuadro con diferentes pestañas y los detalles del alineamiento. Dentro de la pestaña “errors”, fijarse en el valor “residual error mean” que es el valor que se deberá intentar minimizar.
  - c. “view 3D model” para ver como están distribuidos los “fiducial markers” en la rejilla. Se puede girar para poder visualizarlo desde cualquier plano.
  - d. Pulsar “view residual vectors”, lo que mostrará la diferencia entre el punto del modelo actual, en rojo, y el punto del vector residual, en verde. El desplazamiento del residual respecto al del modelo actual aparecerá multiplicado por un factor 10 para poder así distinguirlo del punto del modelo actual, ya que los desplazamientos son frecuentemente inferiores a 2 píxeles.

- e. Seleccionar “view/edit fiducial model” para recargar el modelo de “fiducial markers”. Esto volverá a abrir la ventana “bead fixer” con el modo “fix big residuals” activado.
  - f. Seleccionar “go to next big residual” en la ventana “bead fixer”, lo que seleccionará el punto del modelo que presenta un valor residual grande con una flecha roja marcando la dirección de movimiento recomendado para minimizar el error. Si la flecha señala el centro del oro, clicar “move point by residual” y el punto del modelo se desplazará al centro del “fiducial” correspondiente. Si la recomendación que indica la flecha no marca el centro del oro, mover el punto manualmente al centro del mismo.
  - g. Repetir el paso f tantas veces sea necesario hasta que aparezca el mensaje “no more residuals are found”
  - h. Guardar el modelo en “file” < “save model”.
  - i. Proceder según el paso b para abrir el archivo “align log file”. Ir a la pestaña “surface angles”, copiar el parámetro “Total tilt angle change” y pegarlo en la caja “fine alignment volume position parameters” (bajo “total tilt angle offset”).
  - j. Pulsar “compute alignment” y, a continuación, “reread log file” en la ventana “bead fixer”.
  - k. Repetir los pasos f, g, h, i y j hasta minimizar al máximo el error (ver apartado b). En las condiciones ensayadas, el error debe ser inferior a 1. Para mejorarlo, también se pueden rehacer los pasos indicados modificando parámetros en la pestaña “global variables” de la ventana “fine alignment”: “rotation solution type”, “magnification solution type” y “tilt angle solution type”.
  - l. Clicar “done”.
11. Pulsar “tomogram positioning” en el menú lateral. El objetivo de este paso es conseguir que la reconstrucción sea lo más plana posible y que encaje en el mínimo volumen posible. Para ello se recogen tres regiones del tomograma: de la parte de arriba, de la parte media y de la parte de abajo de la serie de imágenes.
- a. En “tomogram thickness” poner un valor al menos un 50% mayor del grosor de la sección. Si todos los “fiducial markers” están en una

- superficie o si el análisis de superficie en el alineamiento indica un ángulo grande de rotación en el eje de las X ( $>2^\circ$ ), se puede doblar el grosor esperado de la sección.
- b. Pulsar “create sample tomograms”. Esta opción extraerá y alineará una franja de 60 píxeles de la parte de arriba, de la parte media y de la parte baja del tomograma. A continuación, creará 10 secciones de la reconstrucción de cada una de las partes de la serie alineada y las llamará “top.rec”, “mid.rec” y “bot.rec”, respectivamente.
  - c. Clicar “create boundary models”. 3dmod abrirá las tres reconstrucciones de una vez y también creará un modelo vacío llamado “tomopitcha.mod”. En la ventana 3dmod se puede cambiar de reconstrucción (“top.rec”, “mid.rec”, “bot.rec”) clicando las flechas derecha o izquierda. Colocarse en “top.rec”, situar un punto en la parte izquierda de la superficie que define la región que contiene material biológico y un segundo punto a la derecha de la superficie (los puntos quedarán conectados entre sí con una línea). En la parte de debajo de la región con material biológico hacer lo mismo. Repetir el procedimiento con “mid.rec” y “bot.rec”.
  - d. Guardar el modelo en “file” < “save model”.
  - e. Generalmente, si el grosor del tomograma final es alrededor de unos 10-20 píxeles mayor que la distancia entre las líneas que se dibuja se obtiene un mejor resultado. Para ello, en la casilla “added border thickness” se puede poner 5, para hacer el tomograma 10 píxeles más grueso, o 10, para hacer el tomograma 20 píxeles más grueso.
  - f. Clicar “compute Z shift and pitch angles”, que basándose en los contornos modelo, determinará los parámetros para hacer que la reconstrucción sea tan plana como sea posible y encaje en el volumen más pequeño posible. Se creará un archivo de salida llamado “tomopitcha.log”.
  - g. Clicar “create final alignment” y, una vez finalice, pulsar “done”.
12. Pulsar “final aligned stack” en el menú lateral.
- a. Clicar “create full aligned stack” para aplicar las transformaciones del alineamiento a toda la imagen y así obtener la serie completa alineada. Se creará un archivo con la extensión “.ali”.

- b. Pulsar “view full aligned stack” para revisar la serie completa alineada.
  - c. Ir a la pestaña “2D filter” y aplicar el filtro.
  - d. Pulsar “done”.
13. En el terminal, pasar las densidades al intervalo [0,255] con el comando:  
newstack –scale 0,255 nombre\_serie.ali nombre\_serie0255.ali
14. Realizar la reconstrucción con SIRT mediante el comando:  
tomo3d –a nombre\_serie.tlt –i nombre\_serie.ali –o nombre\_serie.mrc –z  
250 –S –l 30
- Se generará el archivo “nombre\_serie.mrc” que corresponde a la reconstrucción 3D o tomograma.
15. Para visualizar el tomograma ir al terminal y abrir el programa IMOD. Se abrirá un cuadro y en “image file(s)”, clicar “select” y buscar el archivo reconstruido (terminación “.rec”). En las opciones de la derecha, seleccionar “flip y and z”. Pulsar “OK” y se abrirá el tomograma en la ventana 3dmod.
16. Si se desea recortar una zona de interés en el tomograma, proceder:
- a. En la “zap window” abierta con el tomograma reconstruido, buscar las coordenadas XYZ de lo que será el tomograma recortado para continuar con el procesado. En el terminal:  
Trimvol –x “valor mínimo de x”, “valor máximo de x” –y “valor mínimo de y”, “valor máximo de y” –z “valor mínimo de z”, “valor máximo de z”  
nombre\_serie.rec nombre\_serie\_recortado.mrc
  - b. Se generará el archivo “nombre\_serie\_recortado.mrc”, que corresponde al recorte de las coordenadas indicadas anteriormente.
  - c. Reorientar el tomograma. En el terminal:  
imod –Y nombre\_serie\_recortado.mrc

#### **4.13.2. Reconstrucción de tomogramas de doble eje**

La reconstrucción 3D de doble eje se ha llevado a cabo a partir de series de imágenes tomadas en condiciones de temperatura ambiente. Para ello, se han utilizado los programas IMOD (Kremer et al., 1996) y Tomo3D (Agulleiro et al., 2010; Agulleiro and Fernández, 2011).



Protocolo:

1. Las dos series correspondientes a ejes diferentes deben nombrarse correctamente para ser reconocidas por el programa (terminaciones “a” y “b” para las series primera y segunda, respectivamente). Además, se debe cambiar la extensión “.mrc” guardada por el TEM durante la adquisición de la serie a extensión “.st”. Para ello proceder:
  - a. Copiar la carpeta con los archivos guardados durante la adquisición de la serie a la ruta donde queremos guardar los tomogramas y archivos generados durante su reconstrucción.
  - b. Abrir el terminal y buscar el directorio en el que vamos a trabajar.
  - c. Cambiar el nombre de cada serie con los comandos:
    - Primera serie:  
`mv nombre_serie.mrc nombre_seriea.st`
    - Segunda serie:  
`mv nombre_serie.mrc nombre_serieb.st`
2. En el terminal, lanzar el programa Etomo y seleccionar “new tomogram”.
3. En “dataset name”, clicar en el icono de la carpeta y buscar la primera serie guardada en formato “.st”.
4. Seleccionar “double axis” y “single frame”.
5. Pulsar el botón “scan header” y se rellenarán automáticamente las casillas “pixel size” y “image rotation”. En la casilla “fiducial diameter” escribir 10.
6. Seleccionar “extract tilt angles from data” para el “axis a” y para el “axis b” y pulsar el botón “create com scripts”. Se abrirá la ventana “etomo” y arriba estará seleccionado el eje “a”, que es el primer eje con el que se trabajará.
7. Seleccionar el botón “pre-processing”.
  - a. Pulsar “find x-rays (trial mode)” y, a continuación, “view x-ray model”. Se abrirá la serie con los valores de píxel extremos (tanto altos como bajos) marcados, los cuales podrían afectar el contraste e, incluso, provocar artefactos en la reconstrucción. Estos valores extremos se originan al incidir aleatoriamente rayos X en la cámara CCD durante la adquisición o por la oscuridad inicial.

- b. Para corregir estos valores, pulsar “create fixed stack” y, a continuación, “view fixed stack”. Si el resultado es correcto, seleccionar “use fixed stack” para seguir trabajando a partir de la serie corregida.
    - c. Cerrar la ventana con la serie corregida y pulsar el botón “done”.
  8. Seleccionar el botón “coarse alignment”.
    - a. Pulsar “calculate cross-correlation” para que el programa encuentre un alineamiento inicial entre las imágenes sucesivas de la serie.
    - b. Pulsar “generate coarse aligned stack” para generar la serie alineada y, a continuación, “view aligned stack in 3dmod”. Se abrirá la serie alineada para su comprobación.
    - c. Cerrar la ventana de la serie y clicar “done”.
  9. Ir al siguiente botón del menú lateral, “fiducial model generation”. En este paso se generará el modelo de “fiducial markers” a partir de los que aparecen en la imagen.
    - a. Pulsar “seed fiducial model” lo que abrirá la serie alineada y la ventana “bead fixer” con la opción “make seed” marcada. Asegurarse de que en la ventana “bead fixer” la opción “automatic new contour” también está activada. Situarse en una imagen del centro de la serie (normalmente el ángulo 0°) y, en la imagen seleccionada, marcar aproximadamente 20-40 “fiducial markers” de los que aparecen haciendo clic sobre ellos.
    - b. Guardar el modelo en “file” < “save model”.
    - c. Clicar “track seed model” para que el programa automáticamente localice los “fiducial markers” seleccionados en las otras secciones.
    - d. Pulsar “fix fiducial model” lo que hará que la ventana “bead fixer” cambie al modo “fill gaps”, que permite interactuar con el modelo y rellenar los “fiducial markers” que no han sido localizados por el programa. Clicar “go to next gap” lo que seleccionará un “fiducial marker” que no se ha encontrado automáticamente en alguna sección adyacente. Mirar las imágenes anterior y posterior y clicar en el “fiducial marker” que no ha sido localizado por el programa. Volver a pulsar “go to next gap” procediendo de la misma forma indicada anteriormente para todos los “fiducial markers” fallidos hasta que aparezca el mensaje “no more gaps are found”.
    - e. Guardar el modelo modificado (ver el apartado b).

- f. Pulsar “done”.
10. Pulsar el botón lateral “fine alignment”.
    - a. Seleccionar “sort fiducials into 2 surfaces for analysis” y pulsar “compute alignment”.
    - b. Abrir el archivo log del alineamiento haciendo botón derecho sobre el cuadro de opciones de “fine alignment” y seleccionar “align log file”. Se abrirá un cuadro con diferentes pestañas y los detalles del alineamiento. Dentro de la pestaña “errors”, fijarse en el valor “residual error mean” que es el valor que se deberá intentar minimizar.
    - c. “view 3D model” para ver como están distribuidos los “fiducial markers” en la rejilla. Se puede girar para poder visualizarlo desde cualquier plano.
    - d. Pulsar “view residual vectors”, lo que mostrará la diferencia entre el punto del modelo actual, en rojo, y el punto del vector residual, en verde. El desplazamiento del residual respecto al del modelo actual aparece multiplicado por un factor 10 para poder distinguirlo del punto del modelo actual, ya que los desplazamientos son frecuentemente inferiores a 2 píxeles.
    - e. Seleccionar “view/edit fiducial model” para recargar el modelo de “fiducial markers”. Esto volverá a abrir la ventana “bead fixer” con el modo “fix big residuals” activado.
    - f. Seleccionar “go to next big residual” en la ventana “bead fixer”, lo que seleccionará el punto del modelo que presenta un residual grande con una flecha roja marcando la dirección de movimiento recomendado para minimizar el error. Si la flecha señala el centro del oro, clicar “move point by residual” y se verá como el punto del modelo se centrará en el “fiducial” correspondiente. Si la recomendación de la flecha no señala el centro del oro, mover el punto manualmente al centro del mismo.
    - g. Repetir el paso f tantas veces sea necesario hasta que aparezca el mensaje “no more residuals are found”
    - h. Guardar el modelo en “file”<”save model”.
    - i. Proceder según el paso b para abrir el archivo “align log file”. Ir a la pestaña “surface angles”, copiar el parámetro “total tilt angle change” y

- pegarlo en la caja “fine alignment volume position parameters” (bajo “total tilt angle offset”).
- j. Pulsar “compute alignment” y, a continuación, “reread log file” en la ventana “bead fixer”.
  - k. Repetir los pasos f-j hasta minimizar al máximo el error (ver apartado b). En las condiciones ensayadas, el error debe ser inferior a 1. Para mejorarlo, también se pueden rehacer los pasos indicados modificando parámetros en la pestaña “global variables” de la ventana “fine alignment”: “rotation solution type”, “magnification solution type” y “tilt angle solution type”.
  - l. Clicar “done”.
11. Pulsar “tomogram positioning” en el menú lateral. El objetivo de este paso es conseguir que la reconstrucción sea lo más plana posible y que encaje en el mínimo volumen posible. Para ello se recogen tres regiones del tomograma: de la parte de arriba, de la parte media y de la parte de abajo de la serie de imágenes.
- a. En “tomogram thickness” poner un valor al menos un 50% mayor del grosor de la sección. Si el análisis de superficie en el alineamiento indica un ángulo grande de rotación en el eje de las X ( $>2^\circ$ ) se puede doblar el grosor esperado de la sección.
  - b. Pulsar “create sample tomograms”. Esta opción extraerá y alineará una franja de 60 píxeles de la parte de arriba, de la parte media y de la parte baja del tomograma. A continuación creará 10 secciones de la reconstrucción de cada una de las partes de la serie alineada y las llamará “topa.rec”, “mida.rec” y “bota.rec”, respectivamente.
  - c. Clicar “create boundary models”. 3dmod abrirá las tres reconstrucciones de una vez y también empezará un modelo vacío llamado “tomopitcha.mod”. En la ventana 3dmod se puede cambiar de reconstrucción (“topa.rec”, “mida.rec”, “bota.rec”) clicando las flechas derecha o izquierda. Colocarse en “topa.rec”, situar un punto en la parte izquierda de la superficie que define la región que contiene material biológico y un segundo punto a la derecha de la superficie (los puntos quedarán conectados entre sí con una línea). En la parte

- de debajo de la región con material biológico hacer lo mismo. Repetir el procedimiento con “mida.rec” y “bota.rec”.
- d. Guardar el modelo en “file” < “save model”.
  - e. Generalmente, si el grosor del tomograma final es alrededor de unos 10-20 píxeles mayor que la distancia entre las líneas que se dibuja suele mejorar el resultado. Para ello, en la casilla “added border thickness” poner 5, para hacer el tomograma 10 píxeles más grueso, o 10, para hacer el tomograma 20 píxeles más grueso.
  - f. Clicar “compute z shift and pitch angles”. Basándose en los contornos modelo, determinará los parámetros para hacer que la reconstrucción sea tan plana como sea posible y encaje en el volumen más pequeño posible. Se creará un archivo de salida llamado “tomopitcha.log”.
  - g. Clicar “create final alignment” y, una vez finalice, pulsar “done”.
12. Pulsar “final aligned stack” en el menú lateral.
    - a. Clicar “create full aligned stack” para aplicar las transformaciones del alineamiento a toda la imagen para obtener la serie completa alineada. Se creará un archivo con la extensión “.ali”.
    - b. Pulsar “view full aligned stack” para revisar la serie completa alineada.
    - c. Ir a la pestaña “2D filter” y aplicar el filtro.
    - d. Pulsar “done”.
  13. En el terminal, pasar las densidades al intervalo [0,255] con el comando:  
`newstack -scale 0,255 nombre_seriea.ali nombre_seriea0255.ali`
  14. Realizar la reconstrucción con SIRT con el comando:  
`tomo3d -a nombre_seriea.tlt -i nombre_seriea0255.ali -o nombre_seriea.rec -z 250 -S -l 30`  
Se generará el archivo “nombre\_seriea.rec” que corresponde a la reconstrucción 3D o tomograma de la serie “a”.
  15. Para visualizar el tomograma ir al terminal y abrir el programa IMOD. Se abrirá un cuadro y en “image file(s)”, clicar “select” y buscar el archivo reconstruido (terminación “.mrc”). En las opciones de la derecha, seleccionar “flip y and z”. Pulsar “OK” y se abrirá el tomograma en la ventana 3dmod.
  16. Clicar “axis b” y repetir los pasos 7-8 para el eje b.
  17. Pulsar “fiducial model generation” en el menú de la izquierda.

- a. Con la opción “make seed and track” seleccionada, clicar “transfer fiducials from other axis”, lo que creará un modelo para el segundo eje basado en el modelo creado inicialmente para el primer eje. Cuando la acción finalice, el programa indicará la correspondencia entre ambos ejes y almacenará la información en el fichero “transferfid.log”, que se puede abrir haciendo botón derecho sobre la ventana de Etomo y seleccionándolo.
  - b. Clicar “view seed model” para ver los “fiducials” que ha marcado el programa a partir del modelo hecho para el eje a.
  - c. Pulsar “track seed model” para rastrear y marcar automáticamente los “fiducials” a lo largo de toda la serie.
  - d. Pulsar “fix fiducial model” lo que abrirá el menú “bead fixer”. Rellenar los “fiducial markers” que no han sido marcados automáticamente por el programa de la misma forma que se hizo con el eje a (ver pasos 9c-f).
18. Repetir los pasos 10-15 para el eje b. Se obtendrá la reconstrucción del eje b creándose un archivo “nombre\_serieb.rec”.
  19. Pulsar “axis a” de nuevo.
  20. Clicar “tomogram combination” del menú lateral.
    - a. Seleccionar la opción “match the b tomogram to a”.
    - b. Seleccionar “fiducials on both sides”.
    - c. Seleccionar “medium patches” y pulsar “create/edit patch region model”.
    - d. Dibujar un contorno alrededor de la zona de interés aproximadamente cada 10 secciones del tomograma y guardarlo en “file<save”, lo que creará un archivo llamado “patch\_region.mod”.
    - e. Pulsar “create combine scripts” e ignorar el mensaje de peligro que se abre.
    - f. Clicar “start combine” para empezar el proceso de combinación de los dos ejes adquiridos. El programa avanzará automáticamente a “initial match” y finalmente a “final match”. Se generará un archivo llamado “sum.rec” que corresponde a la reconstrucción final.
    - g. Cuando finalice la combinación, pulsar “open combined volume” para ver el tomograma final.

h. Pulsar “done”.

21. Recortar una zona de interés en el tomograma.

a. En la “zap window” abierta con el tomograma reconstruido, buscar las coordenadas xyz de lo que será el tomograma recortado para continuar con el procesado. En el terminal:

```
trimvol -x “valor mínimo”,”valor máximo” -y “valor mínimo”,”valor máximo” -z “valor mínimo”,”valor máximo” sum.rec nombre_serie_recortado.mrc.
```

Se generará el archivo “nombre\_serie\_recortado.mrc”, que corresponde al recorte de las coordenadas indicadas anteriormente.

b. Reorientar el tomograma. En el terminal:

```
imod -Y nombre_serie_recortado.mrc
```

#### **4.13.3. Reducción del ruido de tomogramas**

Para empezar a corregir el ruido de fondo de los tomogramas (“denoising”) es necesario entrar en el terminal y buscar la ruta del tomograma que se quiere procesar. En nuestros experimentos se han probado varios programas para aumentar el contraste y para reducir el ruido de los tomogramas:

1. Inversión del contraste con Bsoft (Heymann et al., 2008). En el terminal:

```
bimg -invert nombre_serie.mrc nombre_serie_i.mrc
```

2. “Denoising” con TomoBflow (Fernández, 2009). En el terminal:

```
tomobflow -v 7 -t 4 -g 0.75 nombre_serie.mrc nombre_serie_bflow.mrc
```

3. “Denoising” con TomoAND (Fernández and Li, 2003; Fernández and Li, 2005; Fernández et al., 2007).

a. Abrir el programa en el terminal.

b. Escribir “nombre\_serie.mrc”.

c. Escribir “nombre\_serie\_AND.mrc”.

d. Escribir el número de iteraciones que se desea.

e. “CED”: 0.

f. “k constant for EED”: -1.

g. “CED/EED balance”: 1.

h. “proportion of CED along 2nd eigen vector”: 0.25.

i. “proportion of smoothing based on grey level”: 0.5.

- j. “coordinates of the noise area” (x y z): “valor x” “valor y” “valor z”.  
Donde x, y, z son las coordenadas de un punto cualquiera de la zona de ruido.
- k. “sigma”: 0.5.
4. “Denoising” con TomoEED (Fernández and Li, 2003; Fernández and Li, 2005; Fernández et al., 2007):  
tomoeed -i “número\_iteraciones” nombre\_serie.mrc  
nombre\_serie\_EED.mrc
5. “Denoising” con filtro de Mediana:
- Con el programa Bsoft (Heymann et al., 2008). En el terminal:  
bmedian -iter 1 nombre\_serie.mrc nombre\_serie\_median3.mrc
  - Con el programa IMOD (Kremer et al., 1996). En el terminal:  
clip median nombre\_serie.mrc nombre\_serie\_medianclip.mrc
6. “Denoising” con “bilateral filtering” del programa Bsoft (Heymann et al., 2008). En el terminal:  
bbif nombre\_serie.mrc nombre\_serie\_bbif.mrc

#### 4.13.4. Segmentación de tomogramas

Protocolo:

- En el terminal, buscar la ruta en la que se encuentra el tomograma a segmentar y, a continuación, abrir el programa IMOD.
- En “image file(s)” seleccionar el archivo del tomograma tratado, confirmar que “zap window” está seleccionado y marcar “flip y and z”. Pulsar “OK”.
- Se abrirá la ventana “zap window” con el tomograma y la ventana de información del programa.
- Ventana de información del programa.
  - Arriba a la izquierda, se puede observar las cajas: “object”, “contour” y “point”, correspondientes al objeto que se está segmentando, contorno del objeto en esa sección y punto seleccionado del mencionado contorno, respectivamente.
  - Arriba a la derecha, aparecen las cajas de control de posición. Indicar las coordenadas x, y, z del punto seleccionado.



- c. En el centro a la izquierda, están las barras deslizantes de blanco y negro, que permiten ajustar el contraste y brillo manualmente.
  - d. El botón “auto” permite el ajuste automático del contraste.
  - e. Según si está activada la opción “movie” o “model”, se puede observar el tomograma en forma de película o permite la edición del modelo, respectivamente.
5. La “zap window”.
- a. El “zoom” se puede ajustar clicando en las flechas de arriba a la izquierda.
  - b. El botón de cuadros negros y blancos permite hacer el pixelado más fino o grueso.
  - c. La barra deslizante “z” permite seleccionar una sección determinada dentro del tomograma.
6. Edición de objetos. Una vez en la “zap window” seleccionar “edit”<”object”.
- a. Crear un objeto para cada estructura diferente que se quiere segmentar en el tomograma. Se pueden editar tres tipos de contornos:
    - “closed contours” para dibujar los límites alrededor de estructuras que se encuentran en un plano de la imagen.
    - “open contours” para dibujar el final de un contorno que no está conectado al punto inicial.
    - “scattered points” para dibujar puntos aislados en forma de esfera.
  - b. Una vez seleccionado un objeto, dibujar su contorno para cada sección del tomograma.
  - c. Guardar los cambios en el modelo: “file”<”save”.
7. Observación del modelo segmentado en 3D y creación de superficies para cada objeto.
- a. Pulsar la tecla “v” en el teclado para abrir el modelo segmentado.
  - b. “edit”<”objects”, se abrirá la pantalla de edición de objetos.
  - c. Seleccionar todos los objetos segmentados, clicar “meshing” del menú lateral y pulsar “mesh all”, esto creará para cada objeto segmentado una superficie basada en los contornos dibujados. Si existe en el tomograma algún objeto que es cerrado y que deja de aparecer a partir

de alguna sección del tomograma, seleccionar la opción “cap” a la hora de hacer el “meshing” de esta estructura.

#### **4.13.5. Creación de películas de tomogramas**

Protocolo:

1. Abrir el tomograma en la “zap window” del programa IMOD (ver 4.13.4) y asegurarse de que en la ventana de información está seleccionado el modo “movie”.
2. Fijar la “zap window” al tamaño y “zoom” deseados.
3. Ir a “edit”>“movies” para abrir la ventana de películas.
4. Fijar el inicio (“start”), el final (“end”) y el incremento (“increment”) deseados para la película.
5. Seleccionar “snapshot” to “tiff”.
6. Clicar con el ratón en cualquier punto de la ventana “zap” y verificar que en la ventana de información se está escribiendo la serie de imágenes (“zap001.tif”, “zap002.tif”...) en el directorio donde se encuentra el tomograma.
7. Una vez que la serie de imágenes se ha grabado, abrir el programa QuickTime Pro y abrir la secuencia de imágenes (“file”<“open image sequence”<seleccionar la primera imagen de la secuencia).
8. Guardar el archivo (“file”<“save as”).

#### **4.13.6. Creación de películas de la segmentación del tomograma**

Protocolo:

1. Abrir el modelo segmentado en IMOD (ver 4.13.4) y asegurarse de que en la ventana de información está seleccionado el modo “movie”.
2. Fijar el modelo al tamaño y “zoom” deseados.
3. En la ventana “model view” ir a “file”>“movie” para abrir la ventana de películas.
4. Fijar el inicio (“set start”) y el final (“set end”).
5. Activar “write files” y clicar en “make”. Las imágenes se guardaran en formato “.tif” (“modv0000.tif”, “modv0001.tif”...)

6. Una vez que la serie de imágenes se ha grabado, abrir el programa QuickTime Pro y abrir la secuencia de imágenes (“file”<”open image sequence”<seleccionar la primera imagen de la secuencia).
7. Guardar el archivo (“file”<”save as”).

## **5. Microscopía Confocal**

### **5.1. Marcaje fluorescente de bicapas lipídicas por FM4-64 y del nucleoide por Hoescht**

El reactivo FM4-64 es conocido por tratarse de un marcador fluorescente de unión específica a bicapas lipídicas (Wikström et al., 2009). De esta forma, permite la observación de las bicapas lipídicas celulares mediante Microscopía de Fluorescencia. El reactivo Hoechst es un colorante fluorescente del DNA que presenta un comportamiento lipófilo, por lo que puede atravesar fácilmente las membranas celulares. De esta forma, se puede utilizar para visualizar el nucleoide bacteriano mediante Microscopía de Fluorescencia.

Protocolo:

1. Disolver colonias aisladas crecidas en TSA 12 días a 0°C en tampón hasta conseguir una turbidez aproximada de 10 en la escala de McFarland.
2. Reconstituir el reactivo FM4-64 en 800  $\mu\text{L}$  de agua (queda una concentración de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
3. Preparar 950  $\mu\text{L}$  cultivo y añadir 50  $\mu\text{L}$  de FM4-64 reconstituido (el FM4-64 queda una concentración de reactivo de 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
4. Agitar 1 h en oscuridad en una noria.
5. Centrifugar a 10000 rpm durante 2,5 min.
6. Quitar sobrenadante, añadir 1 mL de tampón y resuspender.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 2,5 min.
8. Quitar sobrenadante y resuspender en 250  $\mu\text{L}$  de tampón.

9. Coger 250  $\mu\text{L}$  del cultivo marcado con FM4-64 y añadir 1  $\mu\text{L}$  de Hoescht Stock (1 mg/mL). El reactivo Hoescht queda a una concentración final de 4  $\mu\text{g/mL}$ .
10. Dejar 30 min en oscuridad en una noria.
11. Preparar agarosa 0,7% en agua. Hervir el Eppendorf al baño maría y, una vez la agarosa esté líquida y homogénea, se mantiene en el baño a 50°C.
12. En un portaobjetos colocar una gota de cultivo y una gota de agarosa y cubrir con un cubreobjetos tratado con poly-L-lysine. Apretar con unas pinzas el cubre para eliminar el exceso y dejar una capa fina de agarosa.
13. Sellar el cubreobjetos con laca de uñas.
14. Mirar en el microscopio confocal:
  - a. FM4-64:  
 $\lambda_{\text{excitación}} = 515 \text{ nm}$   
 $\lambda_{\text{emisión}} = 640 \text{ nm}$
  - b. Hoescht:  
 $\lambda_{\text{excitación}} = 362 \text{ nm}$   
 $\lambda_{\text{emisión}} = 461 \text{ nm}$

## **5.2. Marcaje fluorescente de cardiolipina por 10-Nonyl Acridine Orange**

El reactivo metacromático 10-Nonyl Acridine Orange (NAO) se une específicamente a fosfolípidos cargados negativamente, entre los que se encuentra la cardiolipina, presente en la PM bacteriana. Cuando la preparación es observada a una longitud de onda entre 450-490 nm, se visualizan de color verde todos los fosfolípidos cargados negativamente. Sin embargo, cuando la observación se realiza entre 515-570 nm, únicamente se visualiza de color rojo la unión específica del reactivo a la cardiolipina (Bernal et al., 2007; Mileykovskaya and Dowhan, 2009). De este modo, el marcaje de células con NAO permite observar las membranas celulares.

Protocolo:

1. Disolver colonias en PBS hasta obtener una turbidez aproximada de 10 en la escala de McFarland.
2. Hacer 2 lavados en PBS para eliminar moco de la bacteria (centrifugaciones 10 min 3000 rpm, eliminar el sobrenadante y añadir nuevo PBS).
3. Reconstituir el reactivo 10-Nonyl Acridine Orange (NAO) en DMSO a una concentración final de 0,03 M.
4. Añadir 0,1  $\mu\text{L}$  del reactivo preparado a 1,5 mL de cultivo. El reactivo NAO queda a una concentración final de 200 nM ( $2 \cdot 10^{-7}$  M).
5. Dejar 1 h en oscuridad.
6. En un portaobjetos colocar una gota de cultivo y una gota de Prolonggold y cubrir con un cubreobjetos tratado con poly-L-lysine. Apretar con unas pinzas el cubre para eliminar exceso y dejar una capa fina.
7. Mirar en el microscopio confocal. NAO:

$$\lambda_{\text{excitación}} = 470 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emisión verde}} = 540 \text{ nm}; \lambda_{\text{emisión rojo}} = 640 \text{ nm}$$

## ***IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



## **1. Determinación de las condiciones de crecimiento óptimas para la detección de nuevas estructuras citoplásmicas en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>**

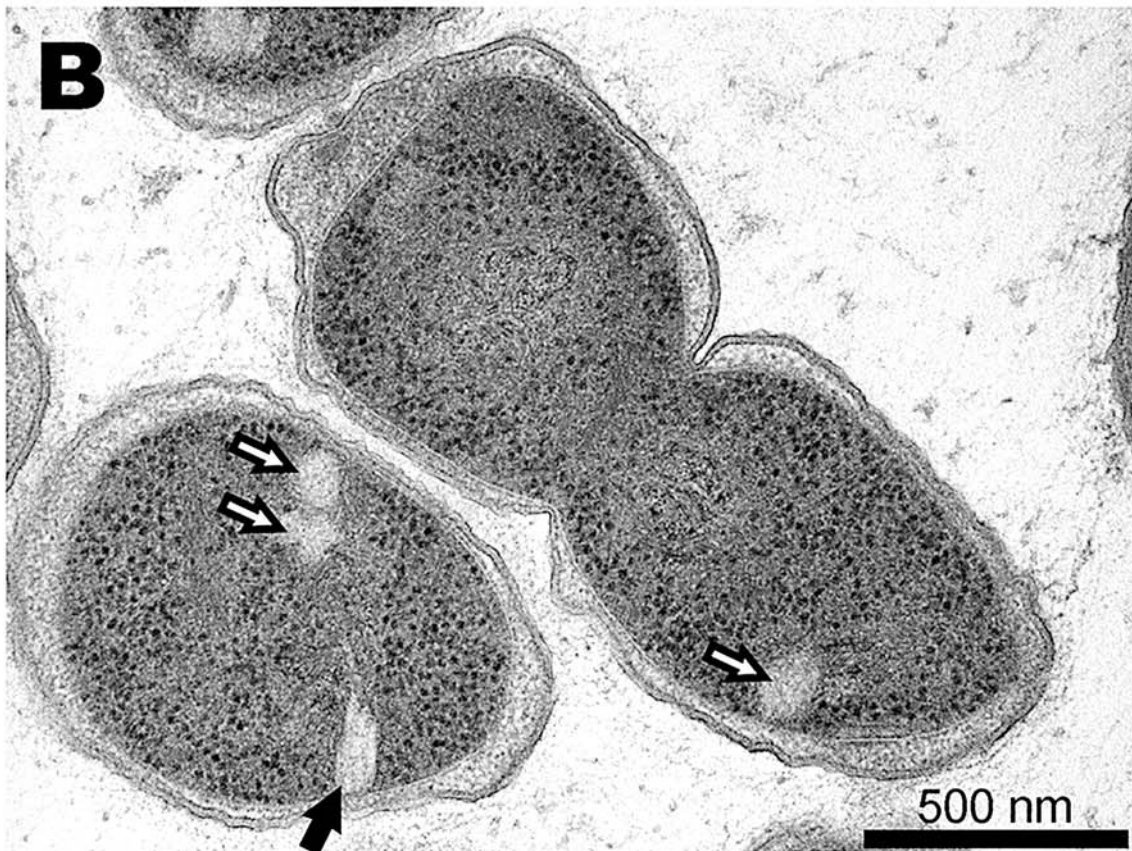
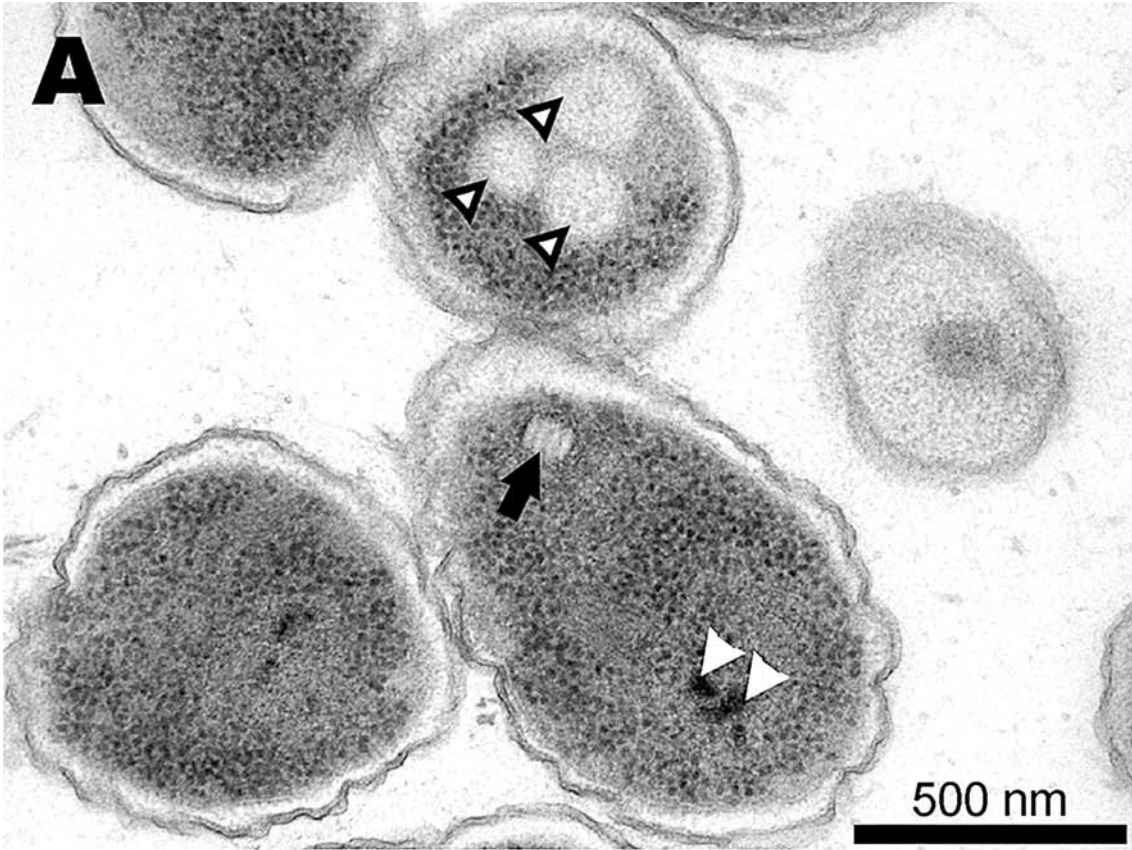
La bacteria en la que se ha basado principalmente el presente estudio ha sido *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>, aislada a partir de una muestra de un sedimento marino recogido en la isla Decepción, ubicada en las islas Shetland del Sur en la Antártida, y que recientemente ha sido aceptada como una nueva especie bacteriana (Carrión et al., 2011). Una vez aislada a partir de sedimentos, *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se cultivó en TSA a 15°C durante 5 días con el objetivo de conocer su aspecto por TEM. Para ello, las muestras fueron crioinmovilizadas por HPF, criosustituidas, incluidas en resina, seccionadas y contrastadas. Las observaciones se llevaron a cabo en el TEM a 120kV. Se observó que *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> contiene diferentes tipos de cuerpos de inclusión de morfología variable (Fig. 1): gránulos de polifosfato (puntas de flecha blancas, Fig. 1A), vesículas intracitoplásmicas bien delimitadas por una membrana de tipo bicapa lipídica (puntas de flecha blancas con contorno negro, Fig. 1A y 1C), espacios en el citoplasma completamente transparentes a los electrones y no delimitados por ningún tipo de membrana (puntas de flecha negras, Fig. 1C), inclusiones en forma de estructuras alargadas más o menos bien delimitadas y apiladas (flechas negras, Fig. 1A, 1B y 1D) e inclusiones de morfología circular-ovalada relativamente bien delimitadas pero no rodeadas por una bicapa lipídica (flechas blancas con contorno negro, Fig. 1B).

Respecto a las inclusiones observadas, los gránulos de polifosfato junto con enzimas asociados, son cuerpos de inclusión inorgánicos importantes en procesos metabólicos básicos como la síntesis de ácidos nucleicos. Asimismo, están implicados en alguna función estructural y cabe destacar su relación con respuestas a situaciones de estrés. Estas inclusiones de polifosfato se observan con frecuencia en la mayoría de bacterias en función del medio de cultivo y fase de crecimiento en que se toma la muestra (Kim et al., 1998; Rao et al., 2009). Las vesículas bien delimitadas por una membrana de tipo bicapa



lipídica, presentan un contenido con una densidad a los electrones menor que la del citoplasma y muy similar a la del espacio periplásmico. Normalmente, las bacterias al crecer en medios ricos con un exceso de fuente de carbono pueden almacenar materiales de reserva en forma de cuerpos de inclusión como PHAs, que pueden estar rodeados por una membrana no unitaria, aunque este no parece ser el caso de las inclusiones de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, ya que la membrana que rodea este tipo de inclusiones tiene el perfil de tinción de bicapa lipídica idéntico al de la membrana citoplásmica, y además las inclusiones de PHA son todavía menos densas a los electrones. Por el momento, se desconoce la naturaleza de estas inclusiones y no han sido objeto de mayor estudio en esta tesis doctoral.

La cepa M1 destacaba, una vez aislada, por el fuerte olor que desprendían sus cultivos, lo que llevaba a pensar que producía compuestos volátiles sulfurosos. De hecho, estos compuestos han sido recientemente descritos en la tesis doctoral de Ornella Carrión (Carrión Fonseca, 2014). De esta forma, las inclusiones observadas en el citoplasma como espacios más o menos circulares completamente transparentes a los electrones y no delimitados por ningún tipo de membrana, podrían corresponder a los compuestos volátiles mencionados. Es conocido que cuando los compartimentos celulares gaseosos son sometidos a la CF por alta presión (HPF), no se produce una transmisión adecuada de la presión a la célula, formándose cristales de hielo que dañan la estructura celular. El resultado es que los compartimentos celulares gaseosos estallan alterándose la ultraestructura, lo que es una limitación importante de la técnica de HPF aplicada al estudio de organismos que los contienen (Studer et al., 2008).



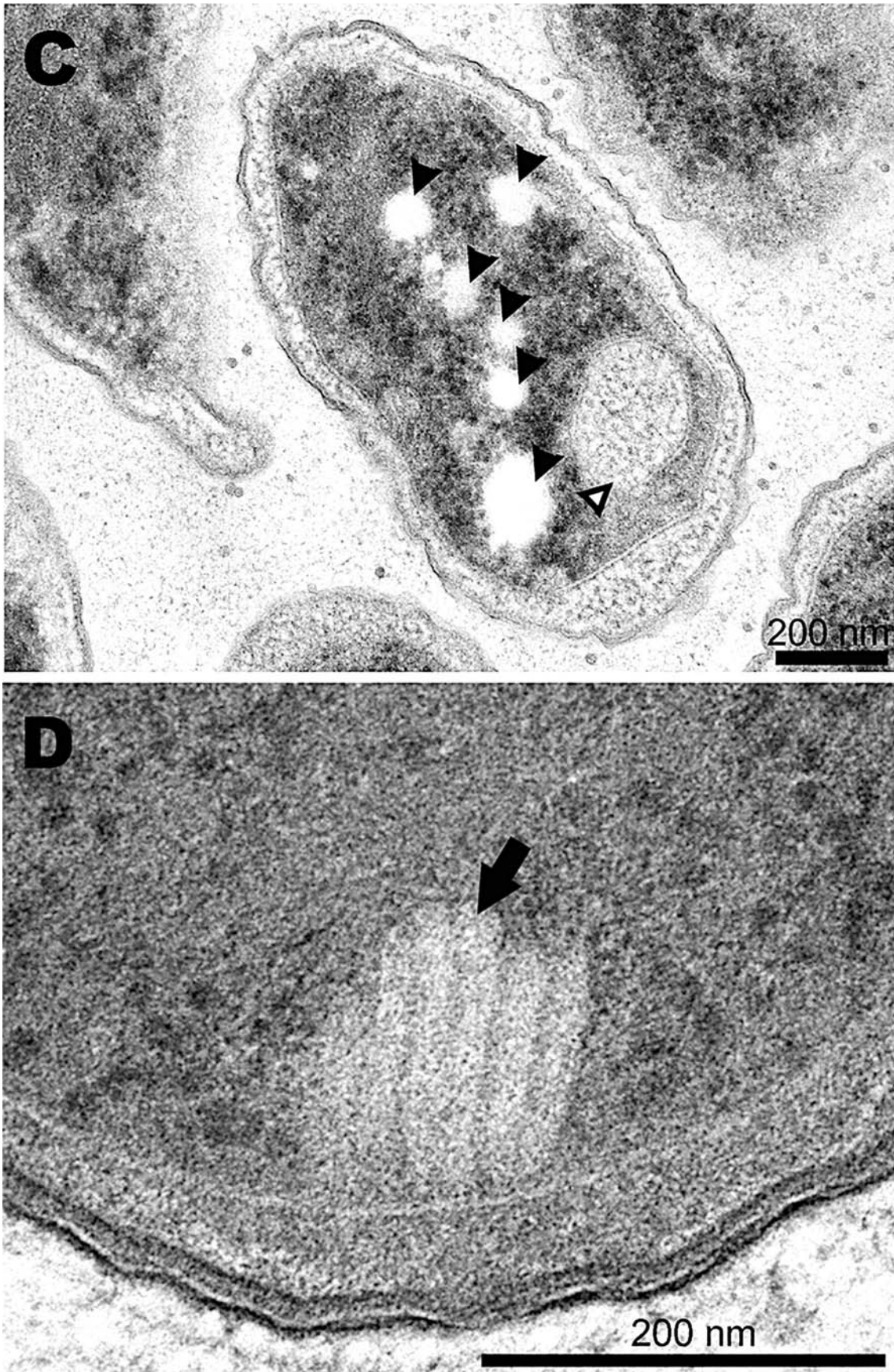


Figura 1. Tipos de cuerpos de inclusión en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> observados por TEM. Las micrografías (A), (B), (C) y (D) muestran distintos cortes de

bacterias obtenidos en las mismas condiciones. Las cabezas de flecha blancas señalan los gránulos de polifosfato; las cabezas de flecha blancas con borde negro señalan las inclusiones tipo vesículas bien delimitadas por una bicapa lipídica; las cabezas de flecha negras señalan los espacios transparentes a los electrones no delimitados; las flechas negras muestran estructuras en forma de bastones alargados y apilados; las flechas blancas con borde negro indican las inclusiones de morfología más o menos circular claramente no delimitadas por una bicapa lipídica.

Entre todas las inclusiones visualizadas por TEM en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> destacan las inclusiones en forma de estructuras alargadas más o menos bien delimitadas y apiladas, ya que después de un amplio repaso bibliográfico no nos consta que hayan sido visualizadas anteriormente en ningún otro tipo de bacteria, por lo que podría tratarse de una nueva estructura bacteriana no descrita hasta el momento. Además, un dato curioso es que estas estructuras alargadas compartían similar localización intracitoplásmica y similar densidad a los electrones que las inclusiones de morfología circular-ovaladas, posiblemente porque ambas estructuras podrían estar relacionadas de alguna forma. Por todo ello, se inició la caracterización ultraestructural de estas inclusiones con técnicas de TEM, cryo-TEM y ET con el objetivo de confirmar si nos encontrábamos frente a un tipo de inclusión o estructura citoplásmica bacteriana novedosa.

El siguiente paso fue analizar por TEM la bacteria cultivada en un medio líquido, para determinar la presencia de las inclusiones en función de la fase de crecimiento. De esta manera, *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se cultivó en un caldo de triptona soja sin solidificar a 15°C durante 48h. Las muestras se volvieron a procesar por HPF seguido de FS para su observación en el TEM. En estas condiciones experimentales, las células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> no presentaron inclusiones alargadas apiladas ni inclusiones circulares-ovaladas en sus citoplasmas. Sorprendentemente, únicamente se observaron los espacios transparentes a los electrones no delimitados anteriormente descritos (Fig. 2A). Además, frecuentemente se observaban discontinuidades puntuales de la membrana externa bacteriana que podrían corresponder a roturas de la misma causadas por la técnica HPF, posiblemente debido a la presencia de compuestos volátiles en estos puntos transparentes a los electrones del citoplasma bacteriano (Fig. 2B).

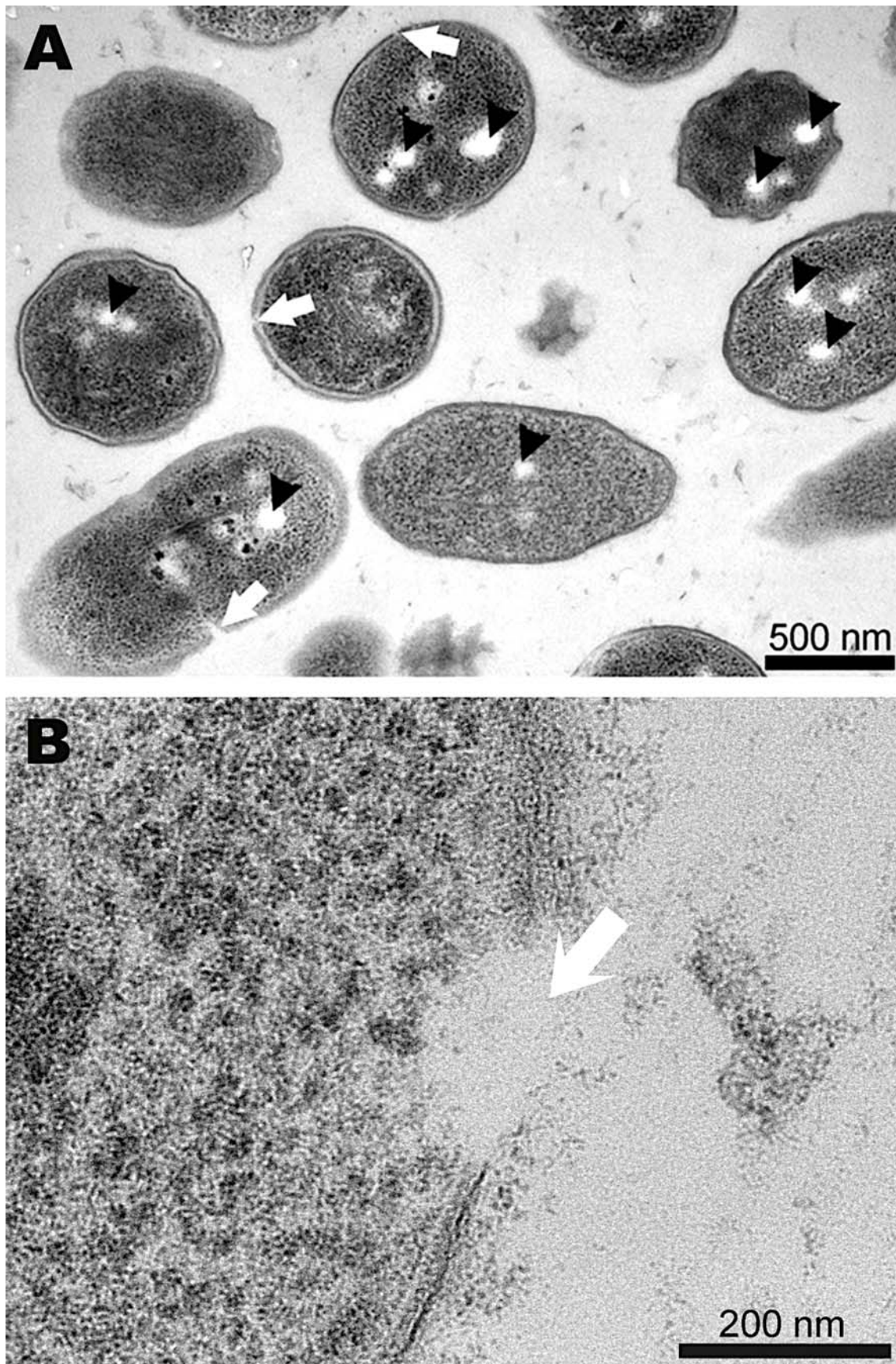


Figura 2. Células de *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en caldo de triptona soja a 15°C durante 48h visualizadas por TEM. (A) Las puntas de flecha negras

señalan inclusiones tipo vesícula transparentes a los electrones no delimitadas; las flechas blancas, discontinuidades puntuales de la membrana externa. (B) Ampliación de una discontinuidad puntual de la membrana externa (flecha blanca).

Se realizó un estudio de la cinética de crecimiento de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> para determinar la posible relación de las estructuras apiladas con alguna fase del crecimiento. La determinación de una relación entre las inclusiones y la fase de crecimiento permitiría realizar cultivos sincrónicos, que, a su vez, podrían aportar información sobre la función de las inclusiones. Para ello, se recogieron muestras de la bacteria cultivada en un medio mínimo mineral líquido (MM3) a diferentes tiempos. Teniendo en cuenta la curva de cinética de crecimiento de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> a 15°C, las muestras se recogieron a las 2, 8, 24, 48, 72 y 120 h, y se procesaron por HPF y FS para su observación en el TEM (Fig. 3).

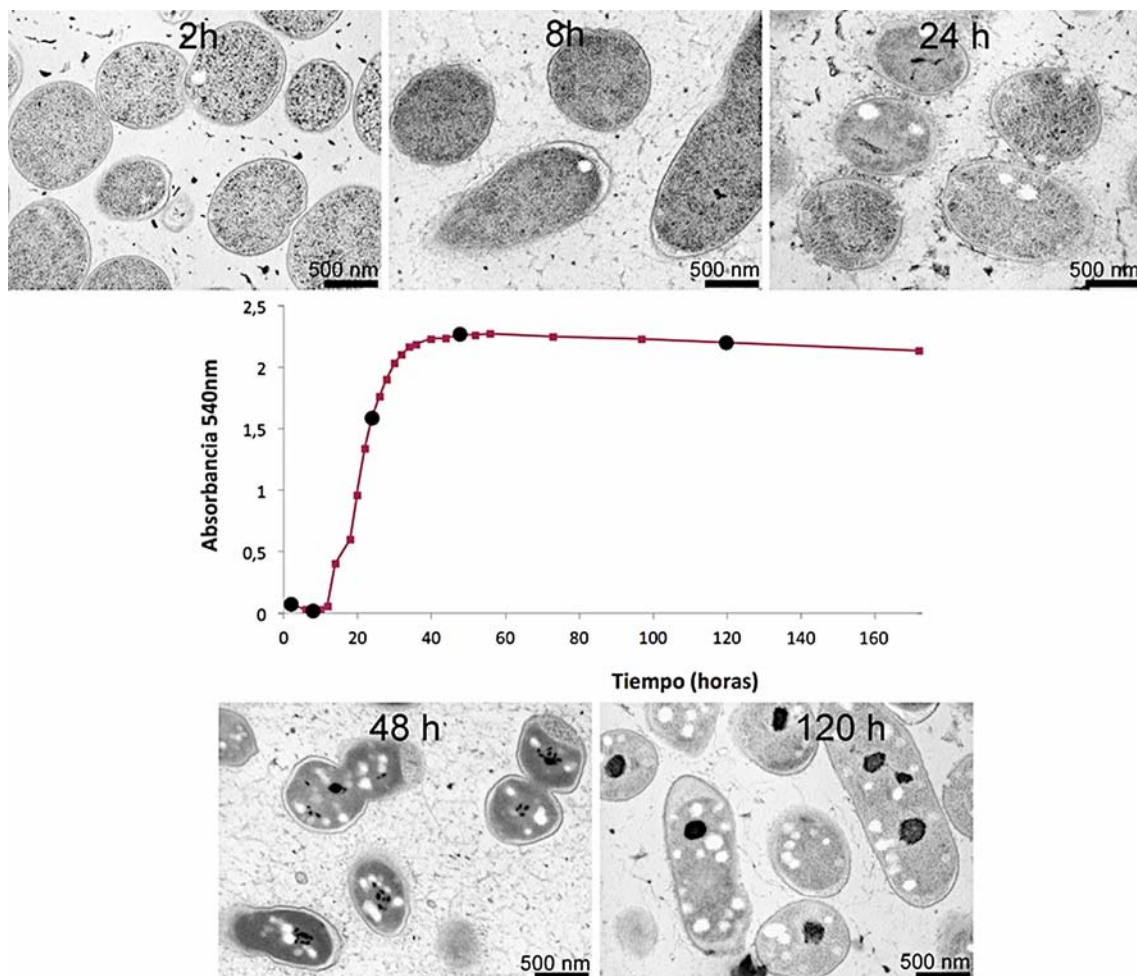
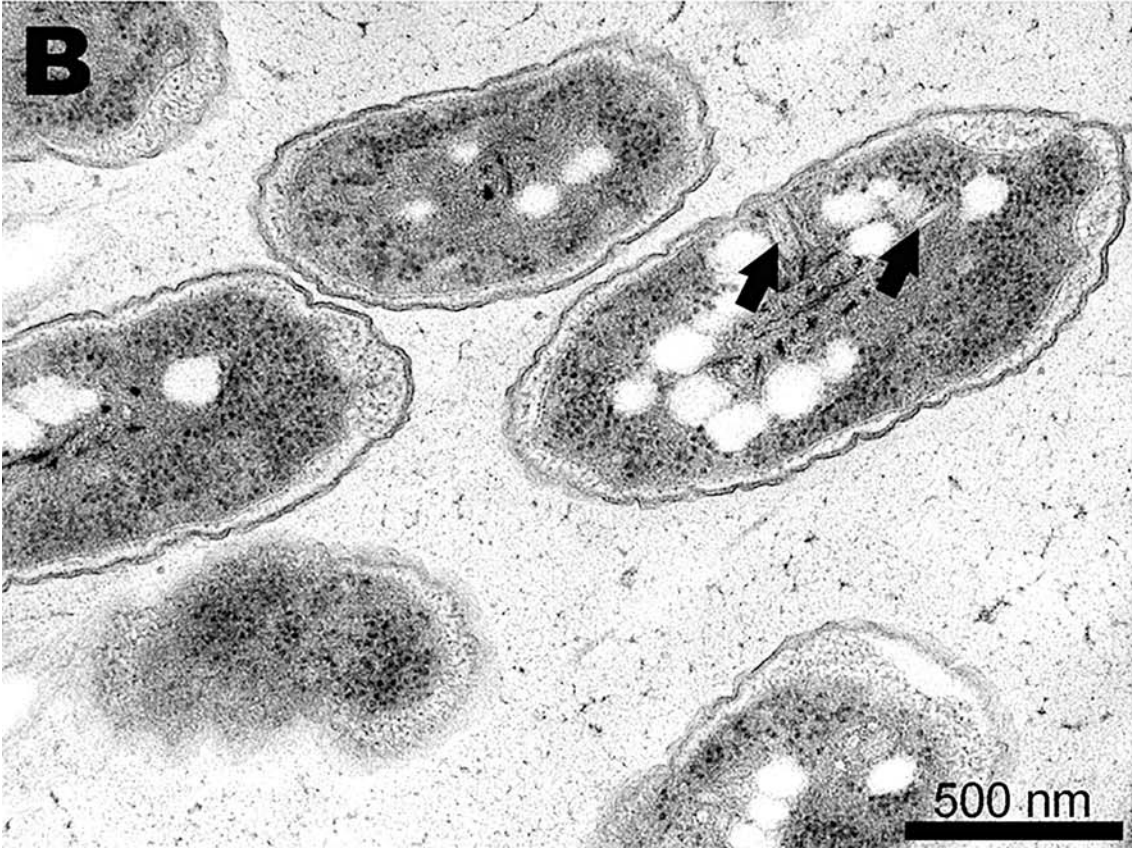
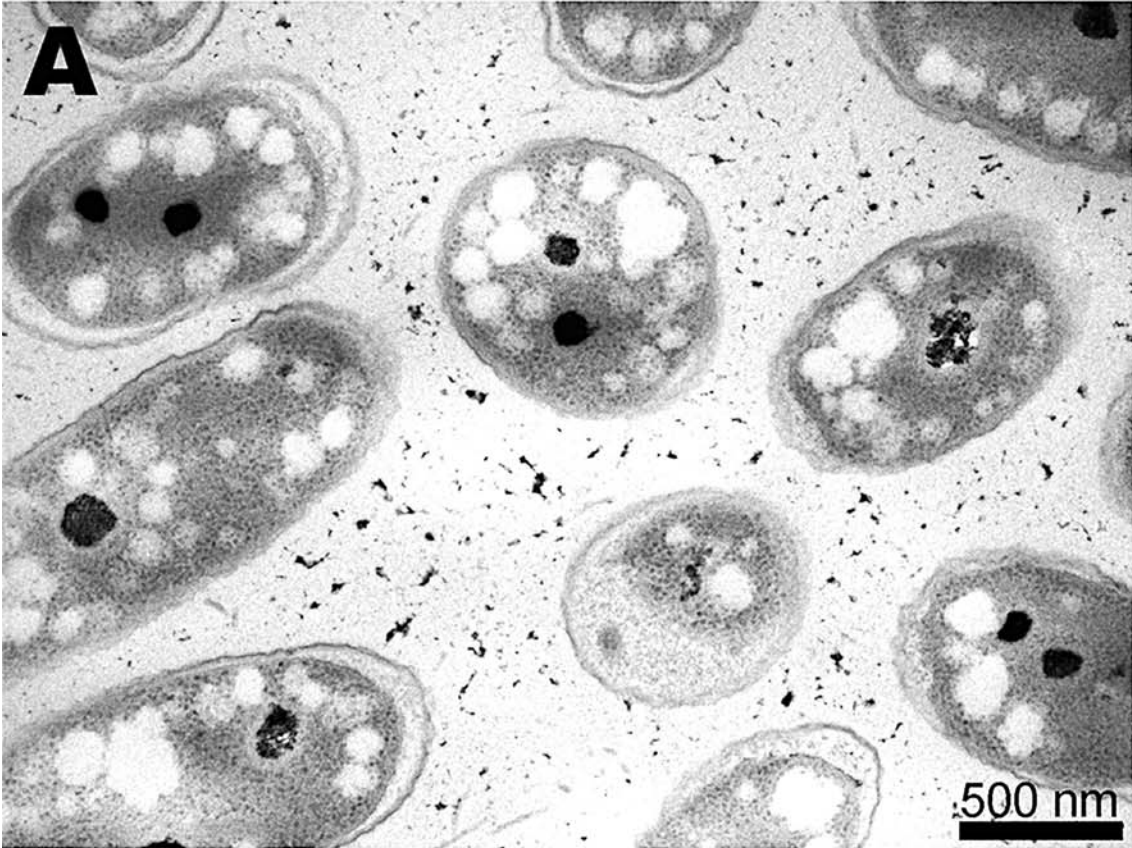


Figura 3. Curva de la cinética de crecimiento de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en medio mínimo mineral (MM3) a 15°C en agitación y micrografías de TEM de la

estructura presentada por las células que se recuperaron a tiempos de incubación: 2, 8, 24, 48 y 120h.

Los resultados revelaron que a las 2h de crecimiento, la bacteria empezaba a mostrar espacios transparentes a los electrones no delimitados, los cuales eran abundantes en el citoplasma a partir de las 24h del crecimiento, coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial. También se observó que a partir de las 48h se almacenaban en el citoplasma de la bacteria abundantes gránulos de polifosfato de tamaño considerable. Cabe destacar que, a lo largo de las observaciones en el TEM de la bacteria crecida a diferentes tiempos, en ningún momento se observaron cuerpos de inclusión alargados y apilados más allá de alguno aislado en todo el conjunto de micrografías. Por lo tanto, no fue posible determinar unas condiciones, utilizando este medio mineral mínimo líquido, que permitieran visualizar la presencia de inclusiones alargadas apiladas a una frecuencia suficiente para llevar a cabo su caracterización ultraestructural. De la misma forma, no fue posible establecer una relación de estas nuevas estructuras con una fase del crecimiento bacteriano en las condiciones estudiadas.

Al no poder encontrar estructuras apiladas cultivando la bacteria en medio líquido, se procedió al estudio de las mismas en bacterias cultivadas en diferentes medios sólidos. Consecuentemente, se cultivaron las muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en diferentes tipos de medios sólidos durante tres días a 15°C: medio mínimo mineral solidificado, TSB solidificado y BHI. Seguidamente, cada muestra se procesó por HPF y FS para su observación en el TEM (Fig. 4). Las observaciones en el TEM revelaron que, en las condiciones ensayadas, las bacterias crecidas en medio mineral solidificado no albergaban estructuras alargadas apiladas en interior. El citoplasma de estas bacterias mostró una elevada presencia de espacios transparentes a los electrones no delimitados y de gránulos de polifosfato de tamaño considerable (Fig. 4A).





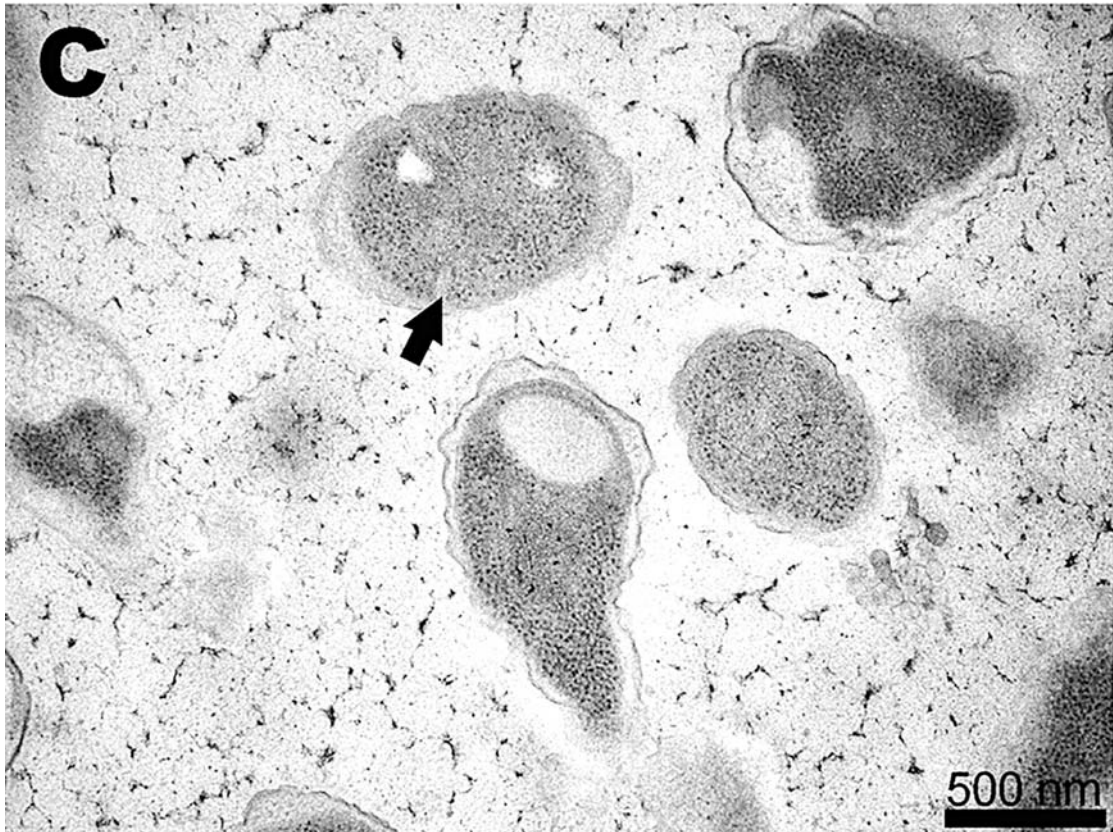


Figura 4. Micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en diferentes medios sólidos. (A) Medio mineral mínimo solidificado. (B) Medio TSB solidificado. (C) Medio BHI. Las flechas señalan estructuras alargadas apiladas.

Por otro lado, las bacterias crecidas en TSB solidificado en las condiciones ensayadas mostraron con cierta frecuencia inclusiones alargadas apiladas que coexistían con una elevada cantidad de espacios transparentes a los electrones no delimitados (Fig. 4B). Por último, las muestras cultivadas en medio BHI presentaban, en general, baja frecuencia de inclusiones, tanto del tipo alargadas apiladas, como de vesículas delimitadas por una membrana, así como también de espacios transparentes a los electrones no delimitados. Estos resultados indicaron que únicamente las bacterias crecidas en TSB solidificado albergaban en su interior y con cierta frecuencia estructuras alargadas apiladas. Sin embargo, la coexistencia de este tipo de estructuras con inclusiones transparentes a los electrones no delimitadas, posiblemente relacionadas con la producción de compuestos gaseosos, obstaculizaba el uso de estas condiciones de crecimiento para el estudio estructural de las nuevas inclusiones. Por lo tanto, los medios de crecimiento sólidos utilizados en este experimento no mejoraron las condiciones iniciales de observación de estas

estructuras (TSA a 15°C durante 5 días), por lo que se siguió trabajando a partir de muestras cultivadas en TSA.

Como se ha mencionado anteriormente, *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> es una bacteria adaptada al frío psicotolerante, ya que puede crecer a temperaturas entre -4 y 34°C. Teniendo en cuenta el rango de temperaturas a las que podía crecer la bacteria, se continuó con el estudio de la presencia de las estructuras alargadas apiladas en muestras cultivadas en TSA a diferentes temperaturas con el fin de determinar si la temperatura podía influir en la presencia de las nuevas estructuras. En esta ocasión, nuevas muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se cultivaron a 0°C y a 30°C, temperaturas cercanas a los límites de tolerancia de temperatura superior e inferior para el crecimiento de la bacteria. En cada caso, se realizaron medidas diarias del diámetro de las colonias, hasta determinarse el tiempo de incubación necesario para que éstas alcanzasen un diámetro de unos 2-3 mm, que es el que presentaban las colonias cultivadas a 15°C durante 5 días visualizadas anteriormente. Los tiempos establecidos fueron a 12 días para las bacterias crecidas a 0°C y 2 días para las cultivadas a 30°C. Seguidamente, las muestras se procesaron por HPF y FS para su observación en el TEM (Fig. 5). El análisis de las micrografías mostró que las bacterias cultivadas a 0°C durante 12 días presentaban frecuentemente estructuras alargadas apiladas e inclusiones circulares ovaladas de similar densidad a los electrones en su interior. Sin embargo, el resto de inclusiones descritas inicialmente, no se apreciaron o se observaron a muy baja frecuencia (Fig. 5A). Por otro lado, las micrografías de las muestras crecidas a 30°C durante 2 días apenas presentaron inclusiones en el citoplasma, percibiéndose alguna estructura alargada apilada muy esporádicamente (Fig. 5B). El motivo por el que se observaron más inclusiones apiladas alargadas en las muestras crecidas a 0°C que las cultivadas a 15 o a 30°C, de momento, se desconoce. Podría deberse a que quizá se trate de una estructura dinámica que se forma en un lugar concreto del citoplasma bacteriano, donde permanece el tiempo necesario para realizar una función determinada. De esta forma, el crecimiento de la bacteria a 0°C podría ralentizar el proceso completo permitiendo una mayor duración en el tiempo de estas estructuras y, por lo tanto, facilitando la captación de las mismas durante la CF.

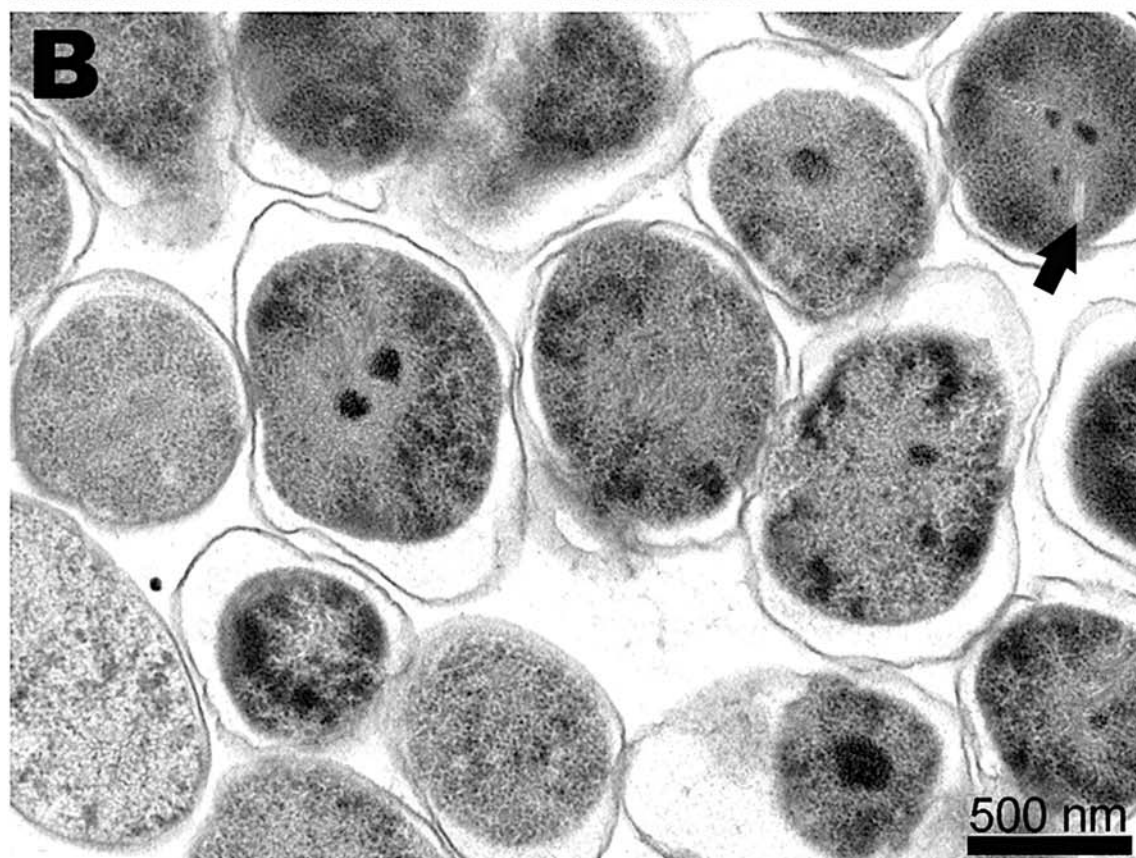
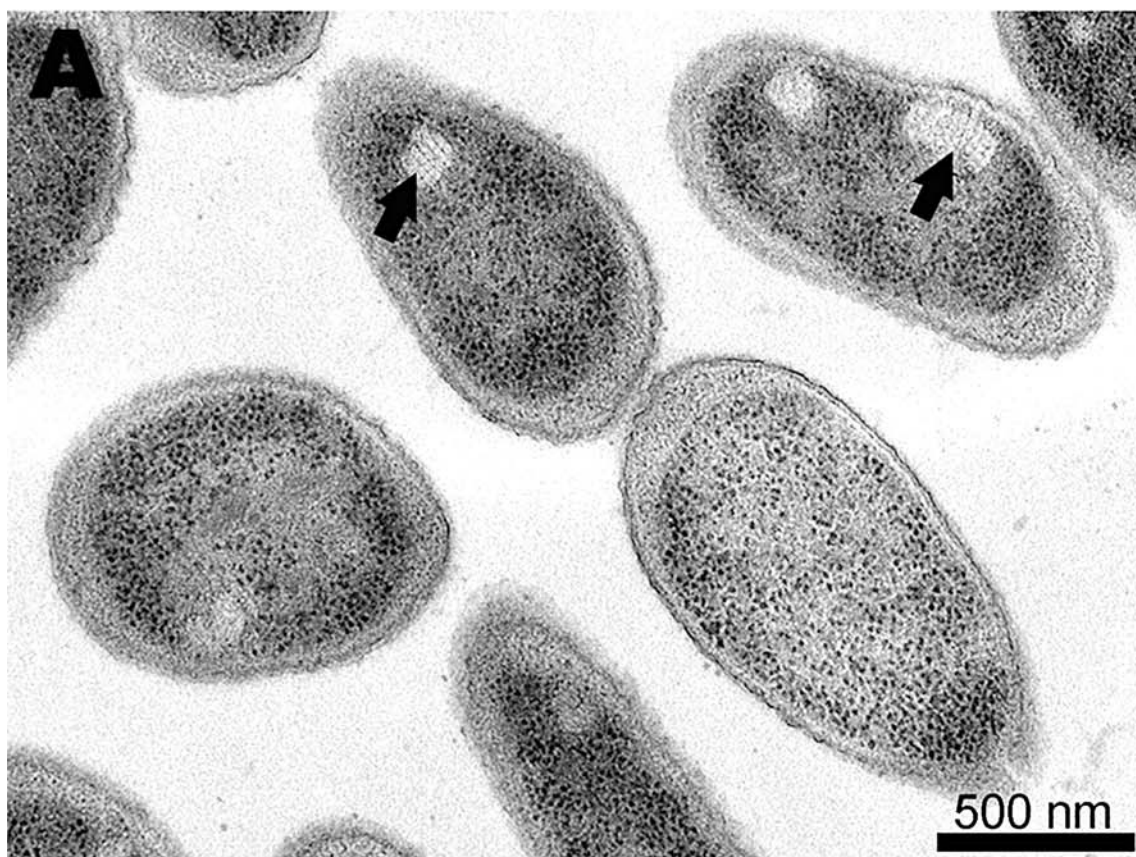
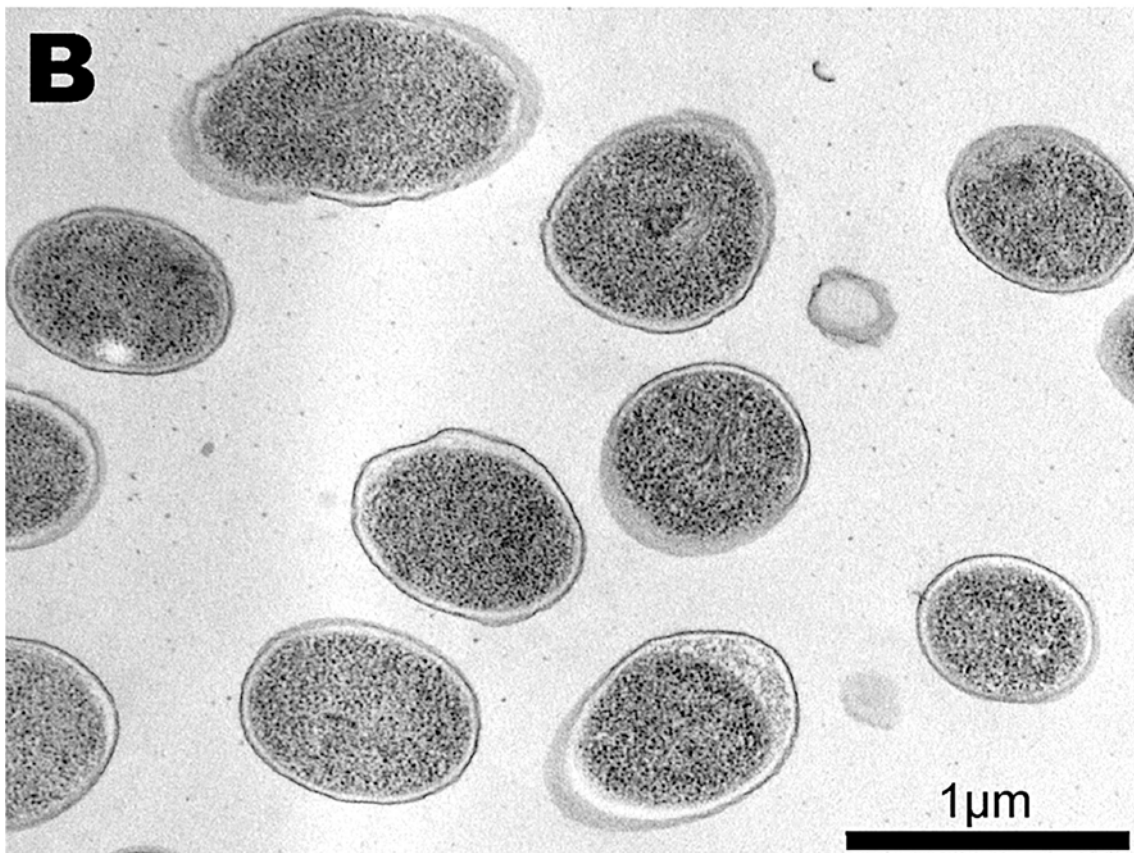
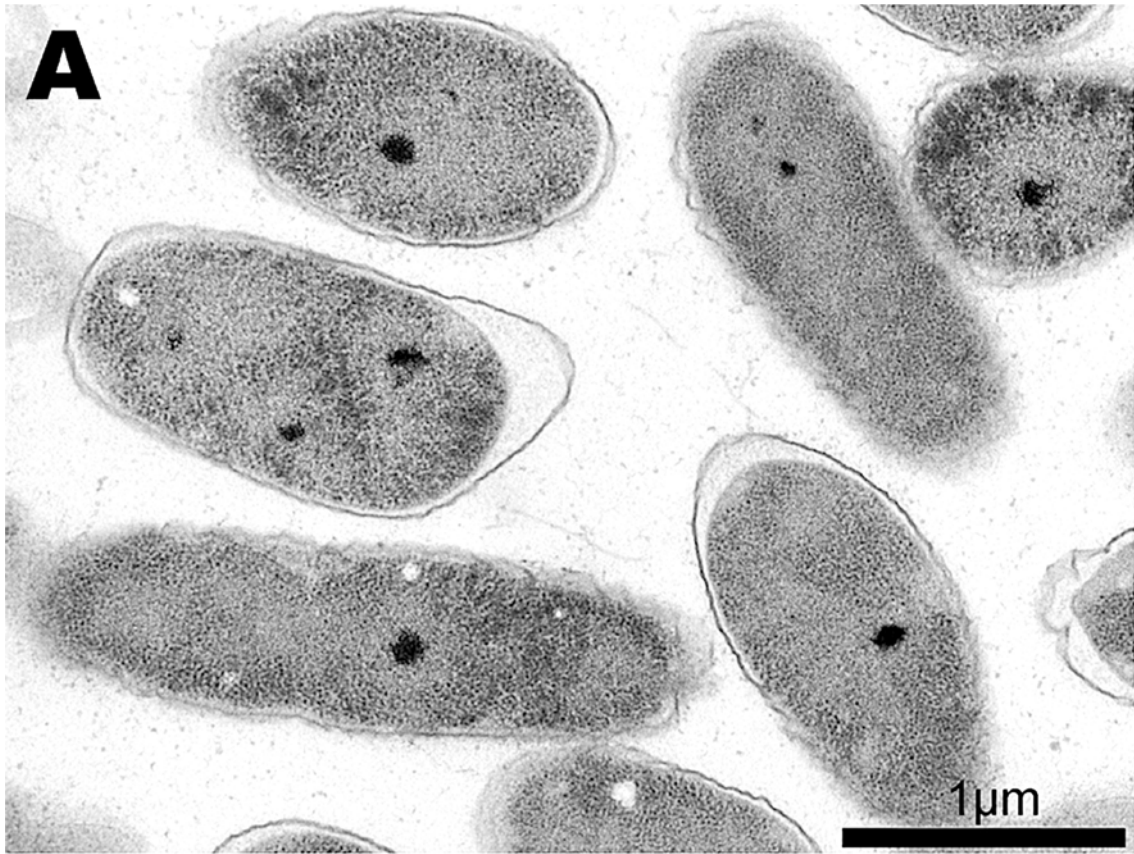


Figura 5. Micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a distintas temperaturas. (A) A 0°C durante 12 días. (B) A 30°C durante 2 días. (A) y (B) Las flechas señalan las inclusiones alargadas.

Dado que las muestras crecidas a 0°C en TSA durante 12 días mostraron inclusiones alargadas apiladas de forma frecuente y en ausencia de otros tipos de cuerpos de inclusión que pudiesen alterar la estructura celular durante la técnica HPF, se continuó investigando la nueva estructura a 0°C. En esta ocasión, se procedió a estudiar la presencia de las estructuras alargadas apiladas en muestras cultivadas en TSA a 0°C a diferentes tiempos de incubación. Las nuevas muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se cultivaron a 0°C durante 6, 20 y 30 días y, seguidamente, se procesaron por HPF y FS para la observación en el TEM (Fig. 6), complementando así la información de los resultados obtenidos previamente a 12 días. También se llevó a cabo una cuantificación de las estructuras alargadas apiladas en todos los casos (muestras crecidas a 0°C durante 6, 12, 20 y 30 días). Se observó que las muestras cultivadas durante 6 días a 0°C presentaban muy pocas inclusiones en el citoplasma. Además, se trataba de inclusiones incipientes y muy pequeñas, por lo que no fue posible determinar a qué tipo correspondían (Fig. 6A). Después de 20 días de incubación, las inclusiones citoplásmicas fueron poco frecuentes, siendo las de tipo transparentes a los electrones no delimitadas las más abundantes (Fig. 6B). Al alcanzar los 30 días de incubación, las bacterias prácticamente no presentaron cuerpos de inclusión en el citoplasma (Fig. 6C). Las cuantificaciones pusieron de manifiesto que únicamente las bacterias crecidas en TSA a 0°C durante 12 días presentaban estructuras alargadas apiladas a la frecuencia necesaria para realizar un estudio estructural de las mismas. Concretamente, en las mencionadas condiciones, el 23,67% de las bacterias observadas presentaban este tipo de inclusión citoplásmica (Tabla 1). El hecho de que este tipo de inclusiones citoplásmicas únicamente se observara a una frecuencia significativa tras un tiempo de incubación concreto (12 días), podría indicar la existencia de algún tipo de relación entre ellas y una determinada fase crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se estableció que las condiciones de crecimiento de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> que se utilizarían para llevar a cabo la caracterización estructural de las nuevas inclusiones serían 12 días a 0°C en TSA.



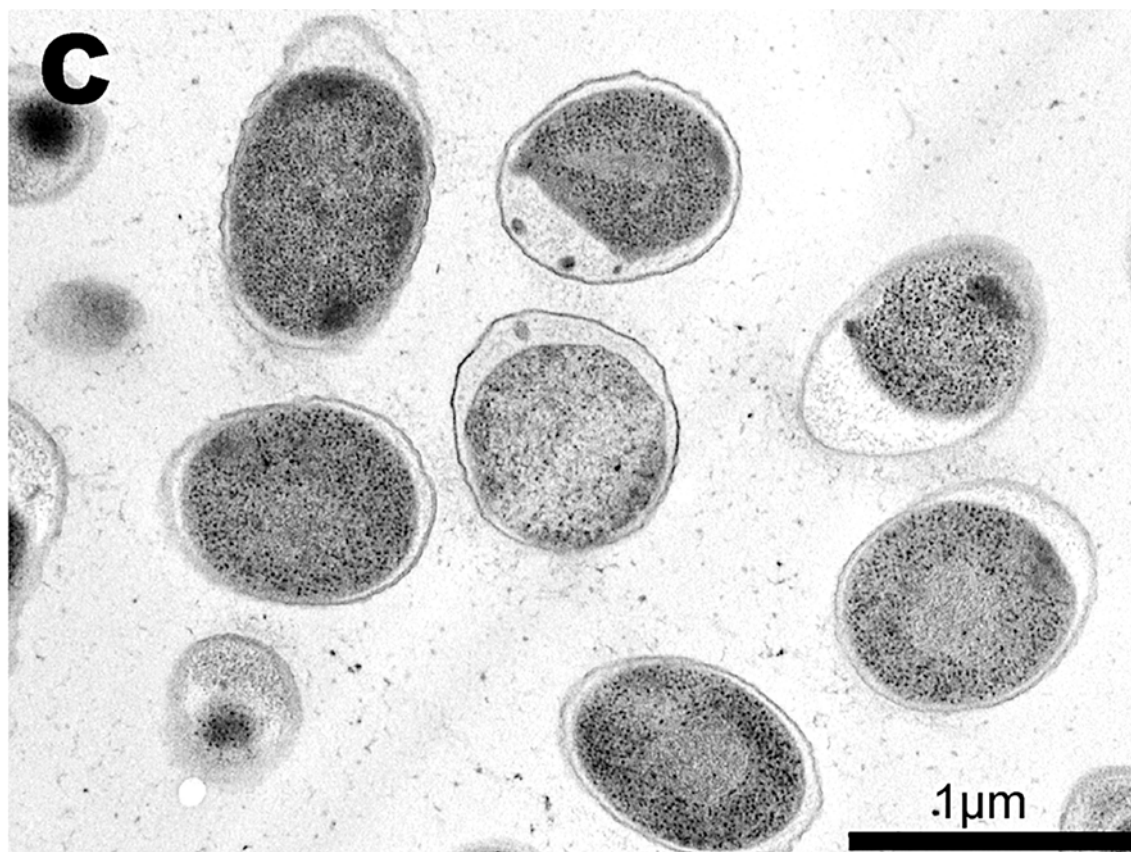


Figura 6. Micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C a diferentes tiempos de incubación. (A) Durante 6 días. (B) Durante 20 días. (C) Durante 30 días.

Tabla 1. Cuantificación de la presencia de inclusiones alargadas apiladas a partir de las micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C a diferentes tiempos de incubación.

<b>Crecimiento</b>	<b>Total Fotos</b>	<b>Total Bacterias</b>	<b>Total Inclusiones Alargadas Apiladas</b>	<b>% Bacterias con Inclusiones Alargadas Apiladas</b>
6 días	59	283	0	0,00%
12 días	60	452	107	23,67%
20 días	44	471	12	2,55%
30 días	60	366	1	0,27%

## **2. Optimización de las condiciones experimentales de procesamiento de las muestras para la observación de las nuevas estructuras citoplásmicas en *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> mediante Microscopía Electrónica de Transmisión**

A lo largo de este apartado se ensayaron diferentes condiciones experimentales de la preparación de muestras por Microscopía Electrónica de Transmisión con el objetivo de determinar aquellas en las que se optimizaba la ultraestructura bacteriana y la visualización de las estructuras alargadas apiladas objeto de nuestro estudio.

### **2.1. Determinación del medio de criosustitución**

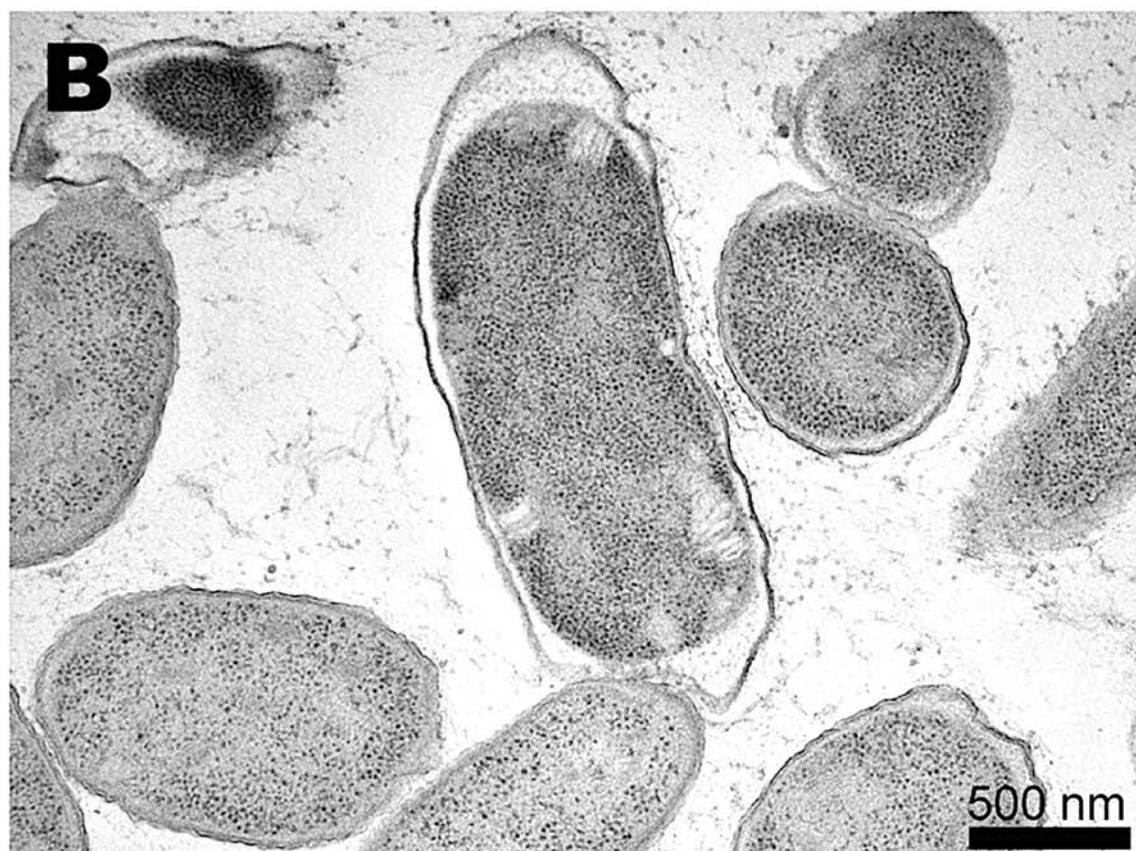
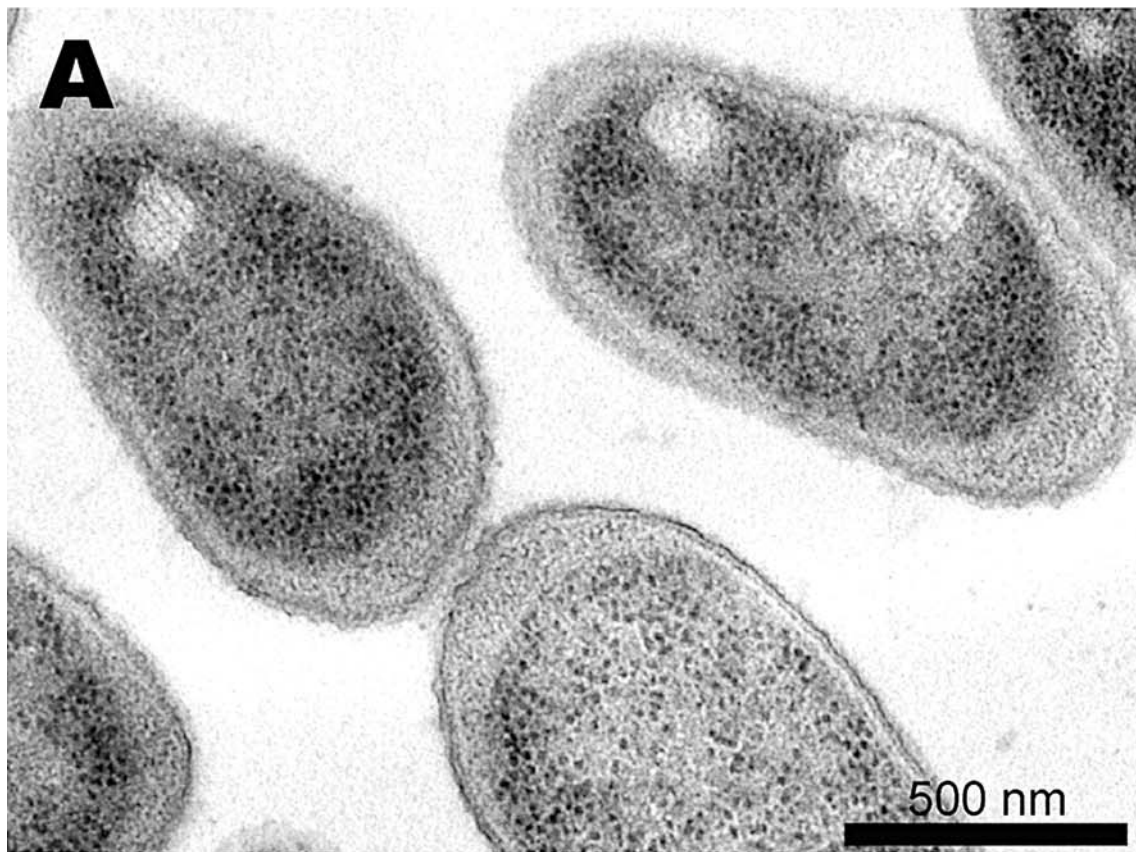
Se ensayaron diferentes composiciones de fijadores en el medio de FS, algunas de ellas combinadas con protocolos descritos para aumentar el contraste de membranas, con la intención de optimizar la conservación y visualización de la ultraestructura bacteriana, y, por lo tanto, de las estructuras objeto de estudio. En todos los casos la inclusión se realizó en resina EPON y el contrastado con UA, 30 min, seguido de citrato de plomo, 5 min. Los Medios de FS utilizados fueron:

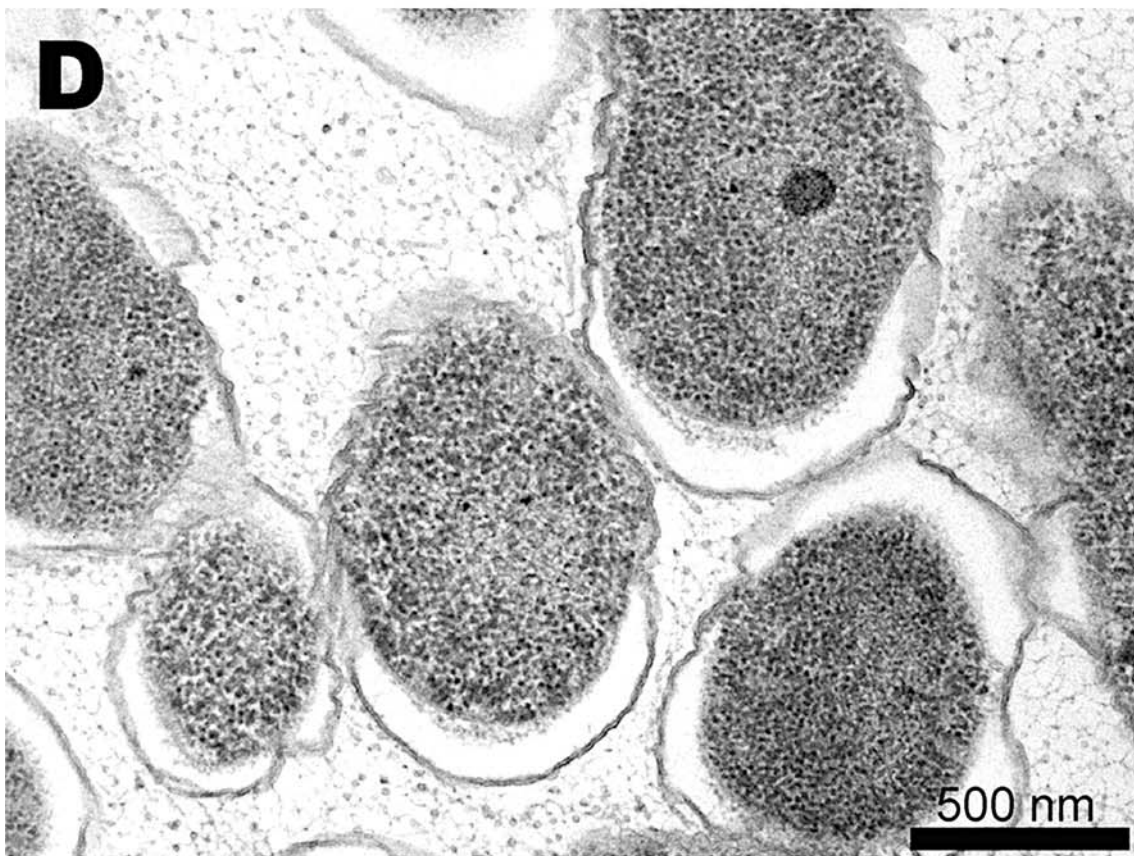
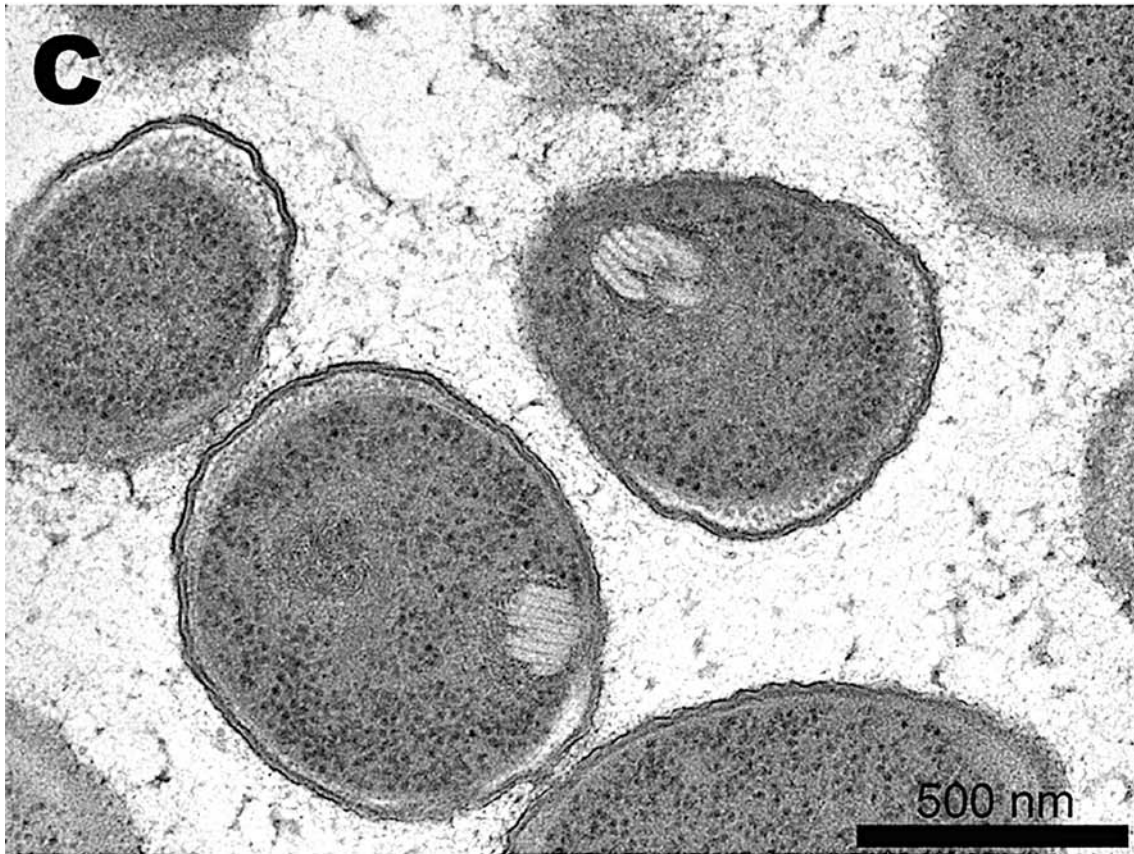
- a. 2% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA en acetona (McDonald and Morphew, 1993).
- b. 1% OsO<sub>4</sub> 0,25% GA en acetona (Murk et al., 2003).
- c. 2% OsO<sub>4</sub> 0,1% GA en acetona (en este caso, tras la FS y antes de la inclusión en resina, se siguió un protocolo de impregnación con ácido tánico) (Jiménez et al., 2009).
- d. 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 5% agua en acetona (Walther and Ziegler, 2002).
- e. 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 3% agua en acetona (Walther and Ziegler, 2002).
- f. 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 1% agua en acetona (Walther and Ziegler, 2002).
- g. 1% OsO<sub>4</sub> 0,5% UA 3% GA en metanol (previamente a la CF y a la FS se

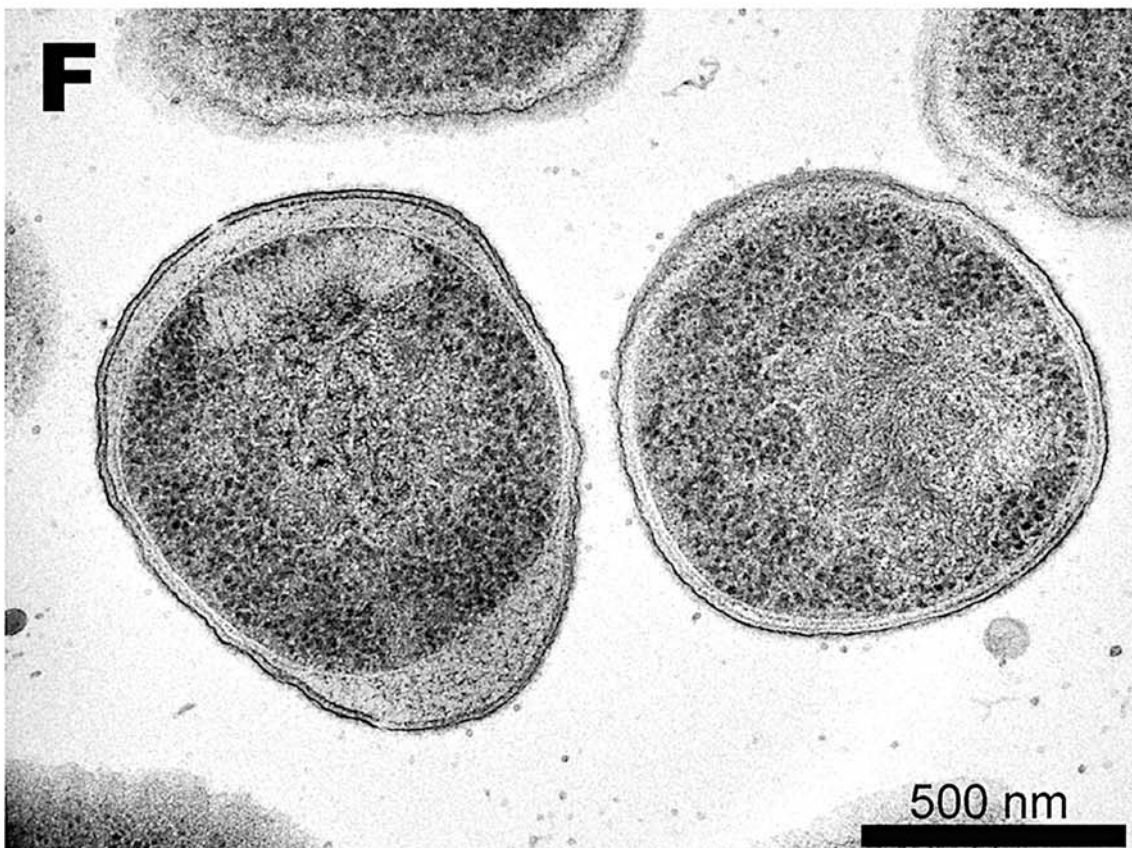
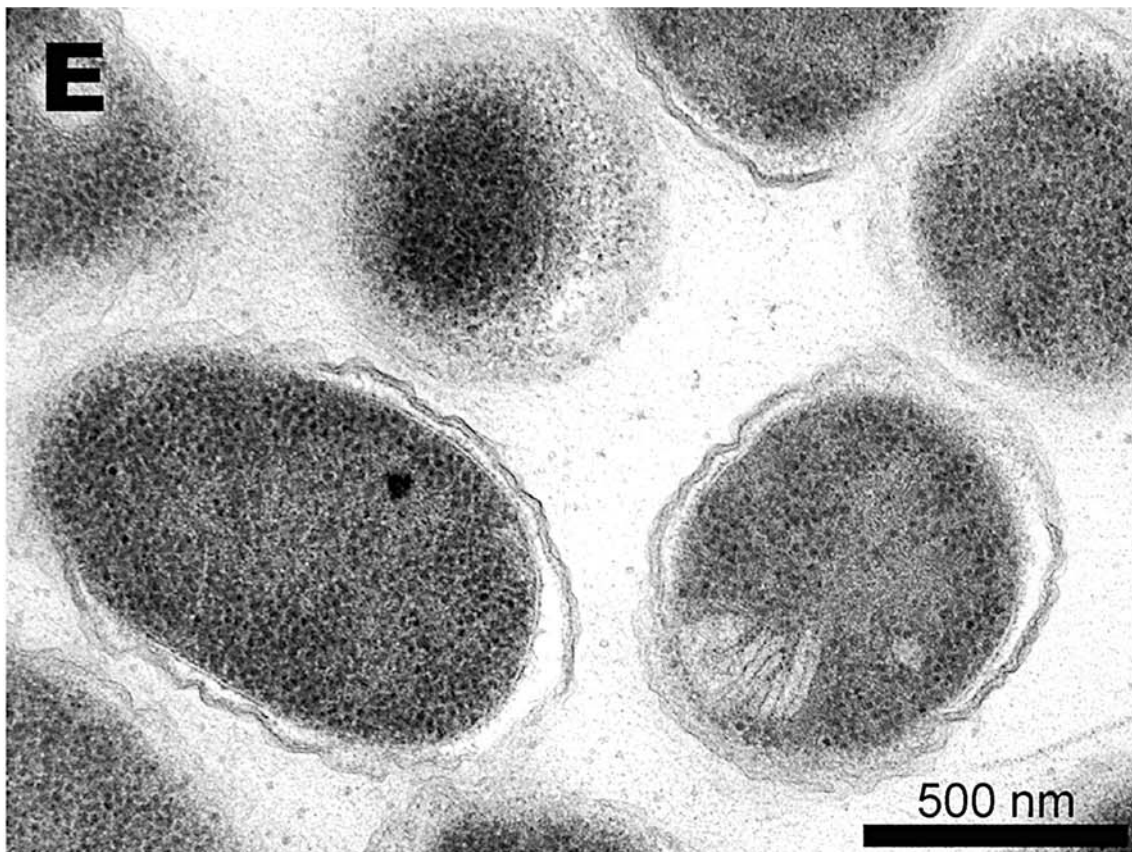
siguió un protocolo de fijación química con  $\text{RuO}_4$  antes de la CF) (Van den Bergh et al., 1997).

Las muestras criosustituidas con los medios a y b mostraron un citoplasma bien conservado y buena visibilidad de las inclusiones alargadas apiladas, aunque las envueltas celulares no aparecieron muy bien definidas (Fig. 7A y 7B). Las muestras criosustituidas con el medio c mostraron un citoplasma bien conservado, buena visibilidad de las inclusiones alargadas apiladas y membranas bien definidas. Sin embargo, el citoplasma quedaba demasiado contrastado para realizar posteriormente estudios de ET (Fig. 7C). En las muestras criosustituidas en presencia de agua (Fig. 7D, 7E y 7F) se mejoraba notablemente la visibilidad de membranas, aunque en algunos casos existían alteraciones importantes en la morfología de las bacterias y en el periplasma. Éste es el caso del medio de FS con un 5% de agua, donde las bacterias aparecieron alteradas y los periplasmas hinchados y totalmente transparentes a los electrones (Fig. 7D). Cuando existía un 3% de agua en el medio de FS, la ultraestructura mejoraba significativamente, pero todavía se apreciaban lugares periplásmicos con el mencionado artefacto (Fig. 7E). Finalmente, las muestras criosustituidas con un 1% de agua mostraron una mejora sustancial de ultraestructura respecto a todas las condiciones experimentales anteriores. Además, las estructuras alargadas apiladas y las membranas aparecieron bien definidas (Fig. 7F). Las muestras procesadas según g presentaron agregaciones citoplásmicas típicas de la fijación química llevada a cabo con anterioridad a la CF. Además, a pesar de que las estructuras alargadas apiladas se observaron bien delimitadas, el citoplasma apareció demasiado oscuro para llevar a cabo el tipo de estudio previsto (Fig. 7G). Por lo tanto, después de analizar las micrografías de todos los casos experimentales de muestras criosustituidas por diferentes medios de FS se concluyó que el medio de FS que contenía un 1%  $\text{OsO}_4$ , un 0,1% UA y un 1% de agua (condición f) (Walther and Ziegler, 2002) permitía las condiciones óptimas para el estudio ultraestructural de la muestra objeto de estudio y la caracterización del nuevo tipo de inclusiones citoplásmicas. De esta forma, se estableció este medio de FS para el estudio estructural de las inclusiones alargadas apiladas.









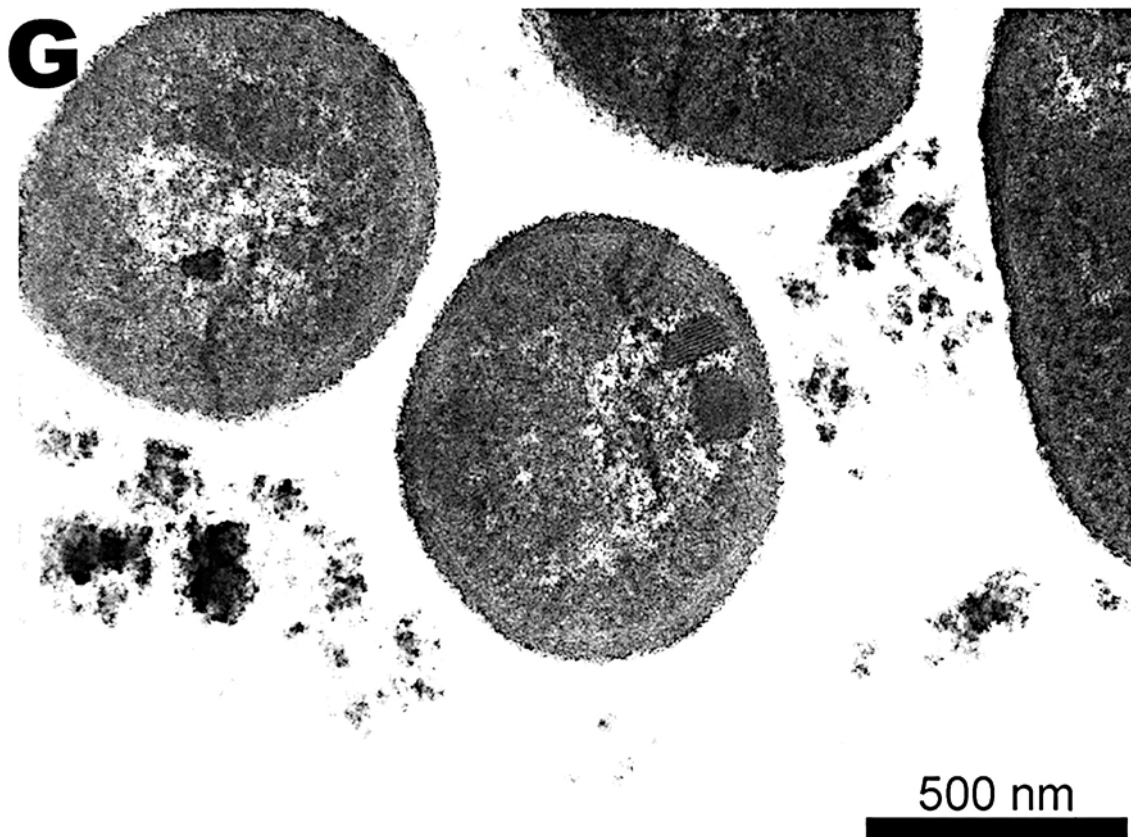


Figura 7. Micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C durante 12 días, procesadas por HPF y criosustituidas utilizando diferentes medios de FS. (A) Medio 2% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA en acetona. (B) Medio 1% OsO<sub>4</sub> 0,25% GA en acetona. (C) Medio 2% OsO<sub>4</sub> 0,1% GA en acetona (tras la FS se llevó a cabo un proceso de impregnación con ácido tánico). (D) Medio 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 5% agua en acetona. (E) Medio 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 3% agua en acetona. (F) Medio 1% OsO<sub>4</sub> 0,1% UA 1% agua en acetona. (G) Medio 1% OsO<sub>4</sub> 0,5% UA 3% GA en metanol (previamente a la CF y a la FS, la muestra se fijó químicamente con RuO<sub>4</sub>).

## **2.2. Determinación del método de contrastado para las secciones de resina**

Tratando de encontrar otros recursos para mejorar la visualización de la ultraestructura bacteriana, y, por lo tanto, de las estructuras objeto de estudio, se probaron dos métodos de contrastado diferentes. Por un lado, se utilizó el método estándar de contrastado que consiste en la aplicación sobre las secciones de UA acuoso, 30 min, seguido de citrato de plomo, 5 min. Por otro lado, se utilizó un método de contrastado basado en MUA, ya que el metanol facilita la penetración de los agentes de contrastado en la muestra (Stempak and Ward, 1964). Para ello, se aplicó MUA sobre las secciones, dejándolo

actuar durante 5 min y, seguidamente, citrato de plomo, 1 min (Fig. 8). Se pudo confirmar que las muestras contrastadas con MUA seguidas de citrato de plomo presentaron una notable mejora en la definición de los cuerpos de inclusión y de las membranas bacterianas. De este modo, se estableció el contrastado con MUA para la caracterización de las estructuras alargadas apiladas.

### **2.3. Determinación del medio de crioinmovilización para la obtención de secciones vítreas**

Se ensayaron diferentes composiciones de medios para la CF por HPF de tubos de cobre para la obtención de VIS de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. Teniendo en cuenta que la bibliografía, se prepararon medios de CF utilizando el porcentaje de dextrano más común, el 20% (Al-Amoudi et al., 2003; Matias et al., 2003; Zuber et al., 2008), combinado con diferentes solventes: agua, tampones y medios de cultivo bacterianos. También se preparó otro medio de CF que contenía un porcentaje de dextrano utilizado con menor frecuencia en la bibliografía, un 30% (Eltsov and Dubochet, 2005), disuelto en uno de los solventes más utilizados, el PBS. De esta forma los Medios utilizados fueron:

- a. 20% dextrano en agua (Fig. 9A).
- b. 20% dextrano en tampón Ringer 1/4.
- c. 20% dextrano en tampón Hepes (Fig. 9B).
- d. 20% dextrano en tampón PBS (Fig. 9C).
- e. 30% dextrano en tampón PBS (Fig. 9D).
- f. 20% dextrano en medio mineral mínimo (MM3) (Fig. 9E).
- g. 20% dextrano en medio de crecimiento TSB (Fig. 9F).
- h. 20% dextrano en medio de crecimiento TSB con adición de levaduras.

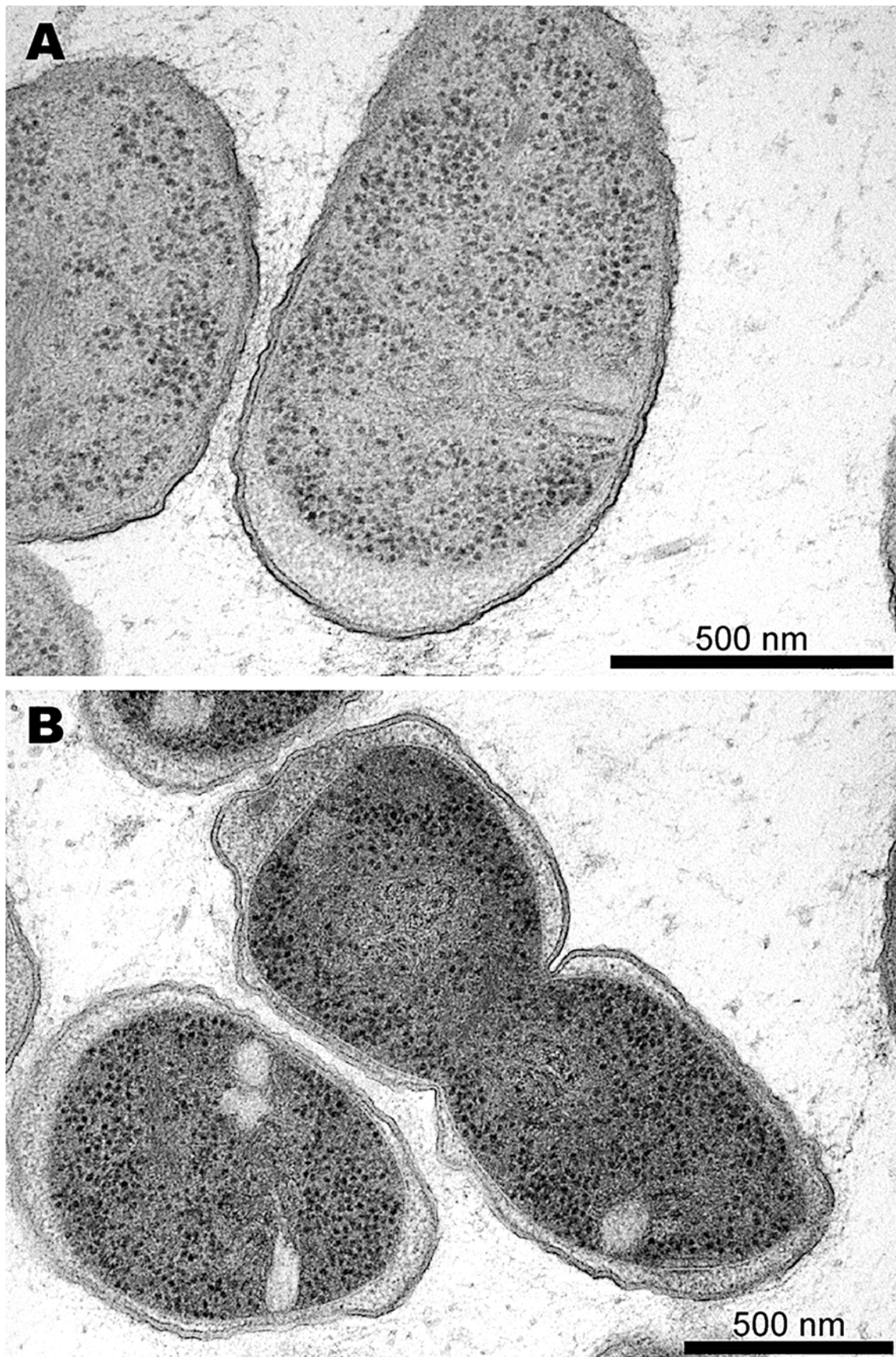
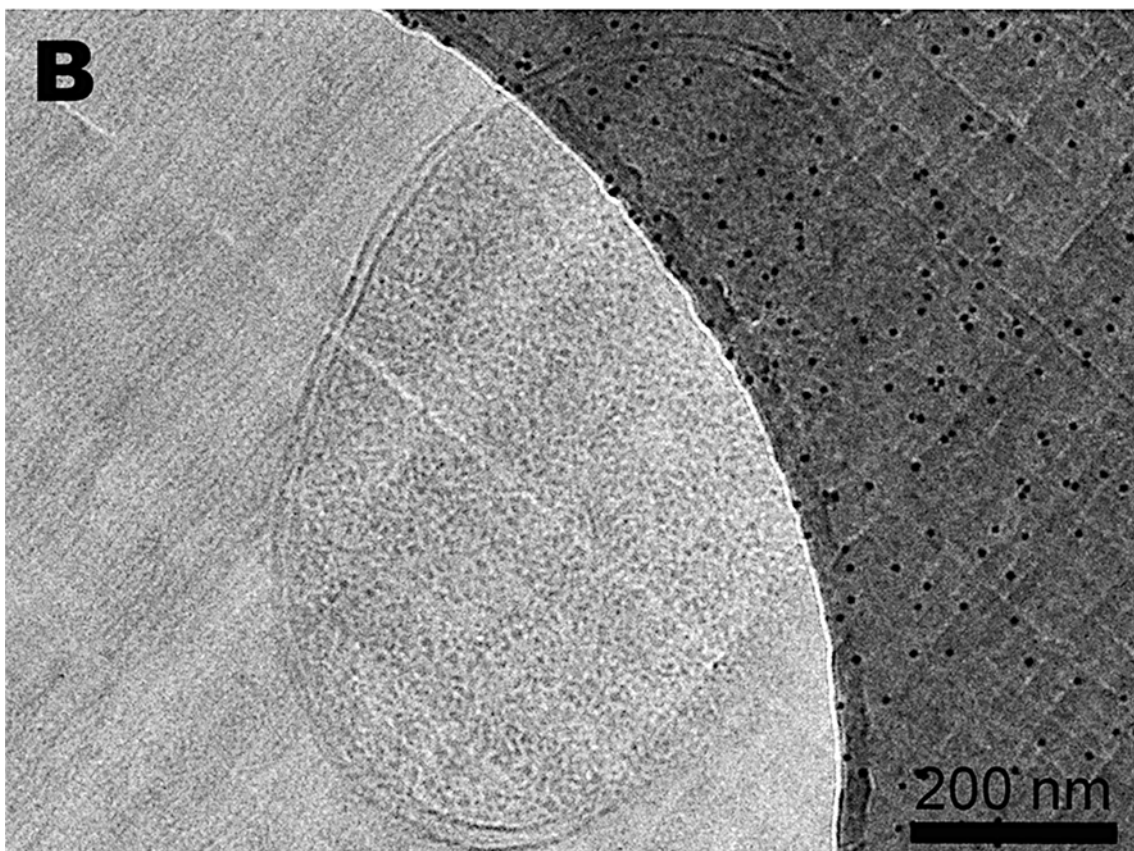
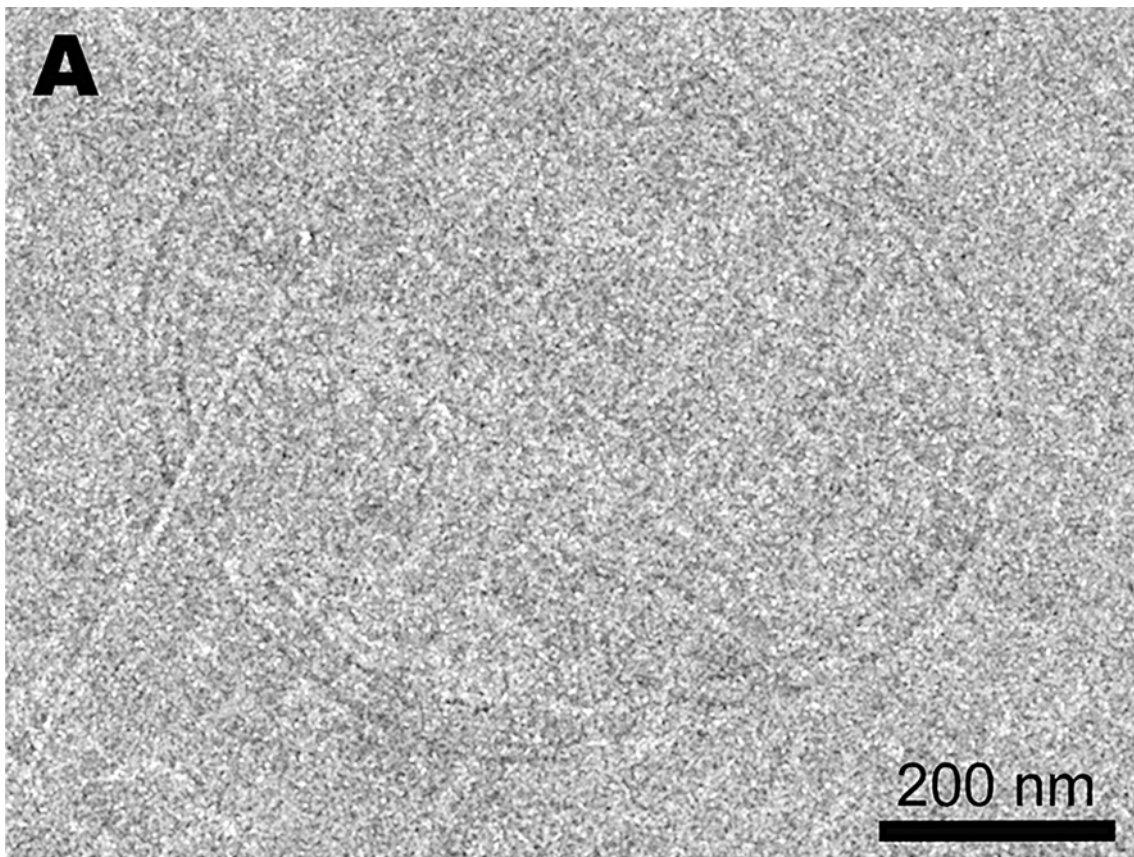
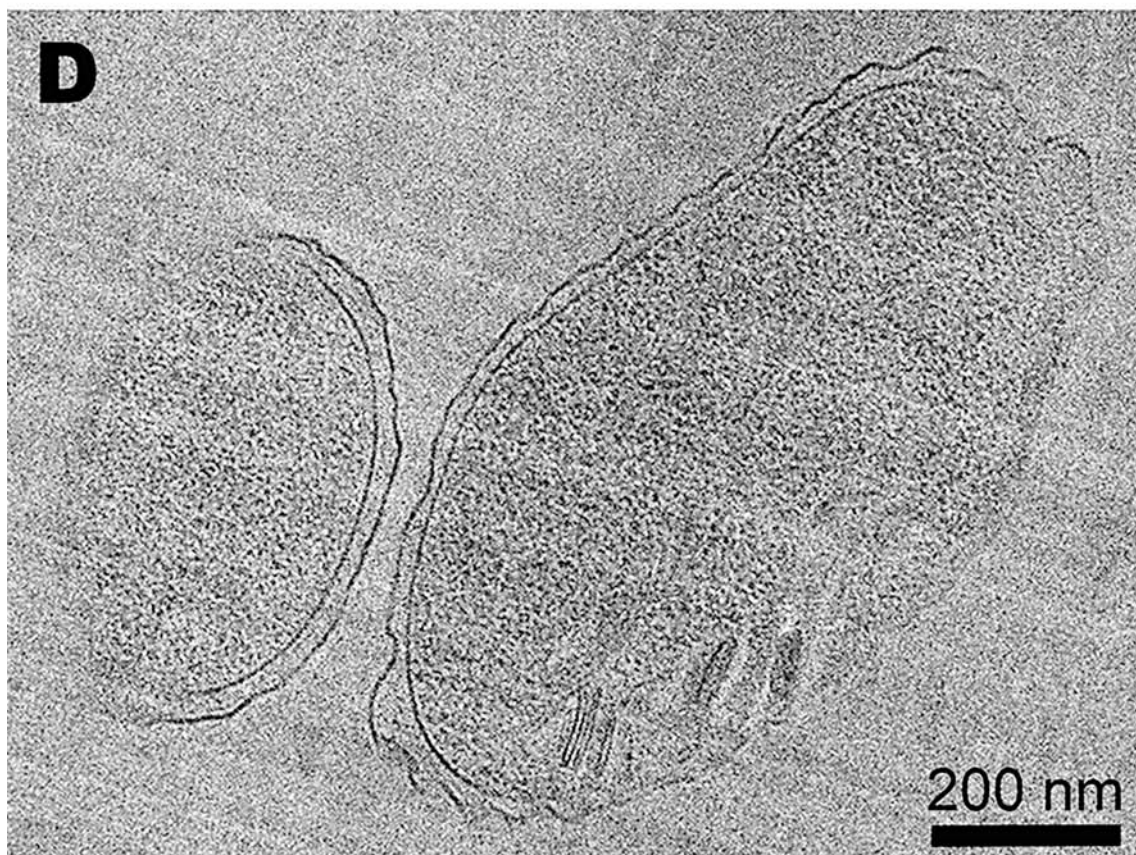
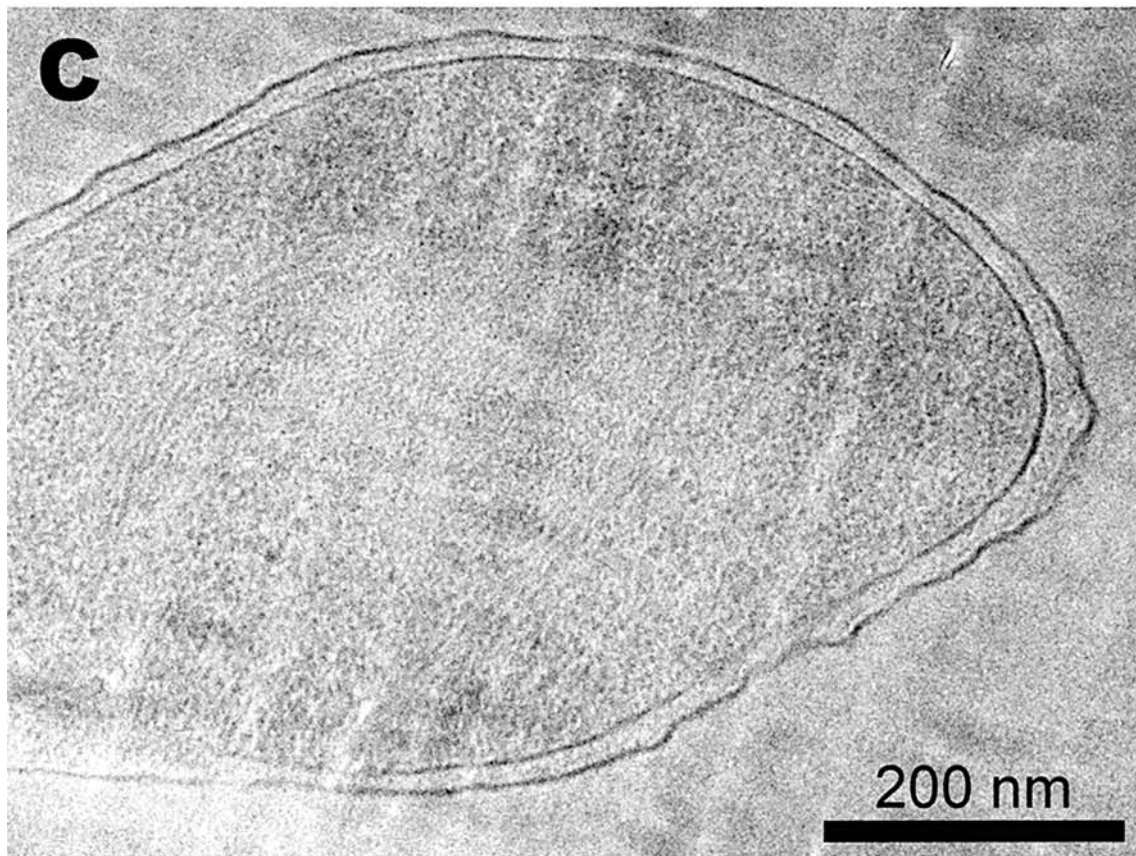


Figura 8. Micrografías de secciones de resina EPON de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. (A) Contrastada con UA, 30 min, y citrato de plomo, 5 min. (B) Contrastada con MUA, 5 min, y citrato de plomo, 1 min.

Las condiciones b y h no permitieron la obtención de VIS, probablemente porque la CF llevada a cabo en las mencionadas condiciones no permitió la vitrificación de la muestra y, por lo tanto, la consistencia de las mismas no fue la adecuada para la obtención de secciones. Las condiciones c, d y e (Fig. 9B, C y D, respectivamente) permitieron la obtención de VIS de manera más óptima respecto a los otros casos que se pudieron analizar. Este hecho, se pudo apreciar por el fácil deslizamiento de las secciones sobre la cuchilla, facilitando la obtención de secciones largas y muy lisas, y su recogida, lo que se relaciona con una buena vitrificación de la muestra. Por el contrario, en los casos a, f y g (Fig. 9A, E y F, respectivamente), las secciones se adherían continuamente a la cuchilla, dificultando la obtención de secciones largas y, en los casos en que se consiguieron, éstas presentaban muchas arrugas. Al analizar las micrografías, se puso de manifiesto que en los casos en que las muestras se seccionaron con mayor facilidad, éstas también presentaron una ultraestructura mejor conservada y se apreció una mejor definición de las membranas y del citoplasma bacterianos. Finalmente, se escogió el medio 30% dextrano en PBS (condición e) (Eltsov and Dubochet, 2005) para continuar los experimentos de caracterización ultraestructural, ya que, tras un análisis de los cortes obtenidos en estas condiciones, estos se apreciaron en general más lisos y menos artefactuados por la acción mecánica respecto a las secciones obtenidas a partir de los medios 20% de dextrano en PBS y 20% de dextrano en Hepes.







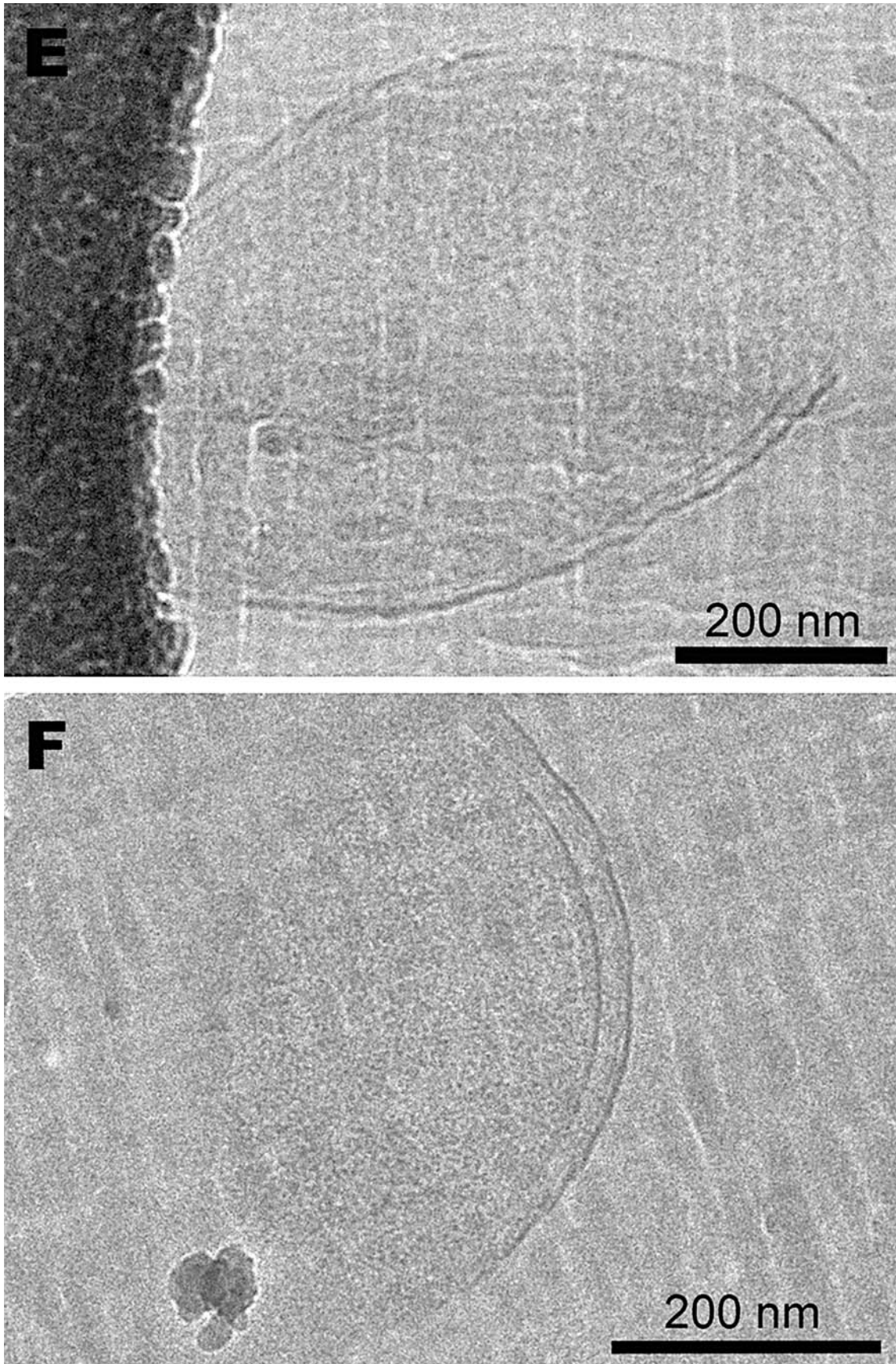


Figura 9. Micrografías del cryo-TEM a partir de VIS de 50 nm de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> crioinmovilizada en diferentes medios. (A) 20% dextrano en agua. (B) 20%

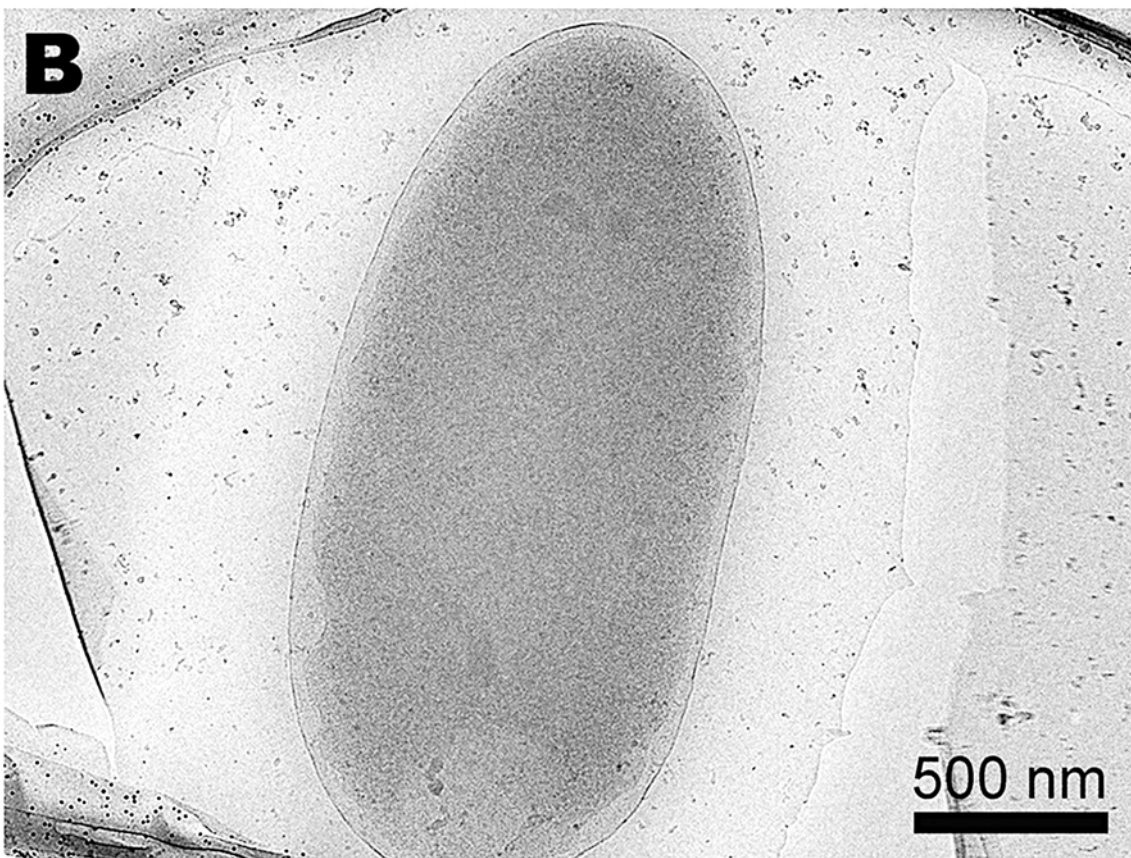
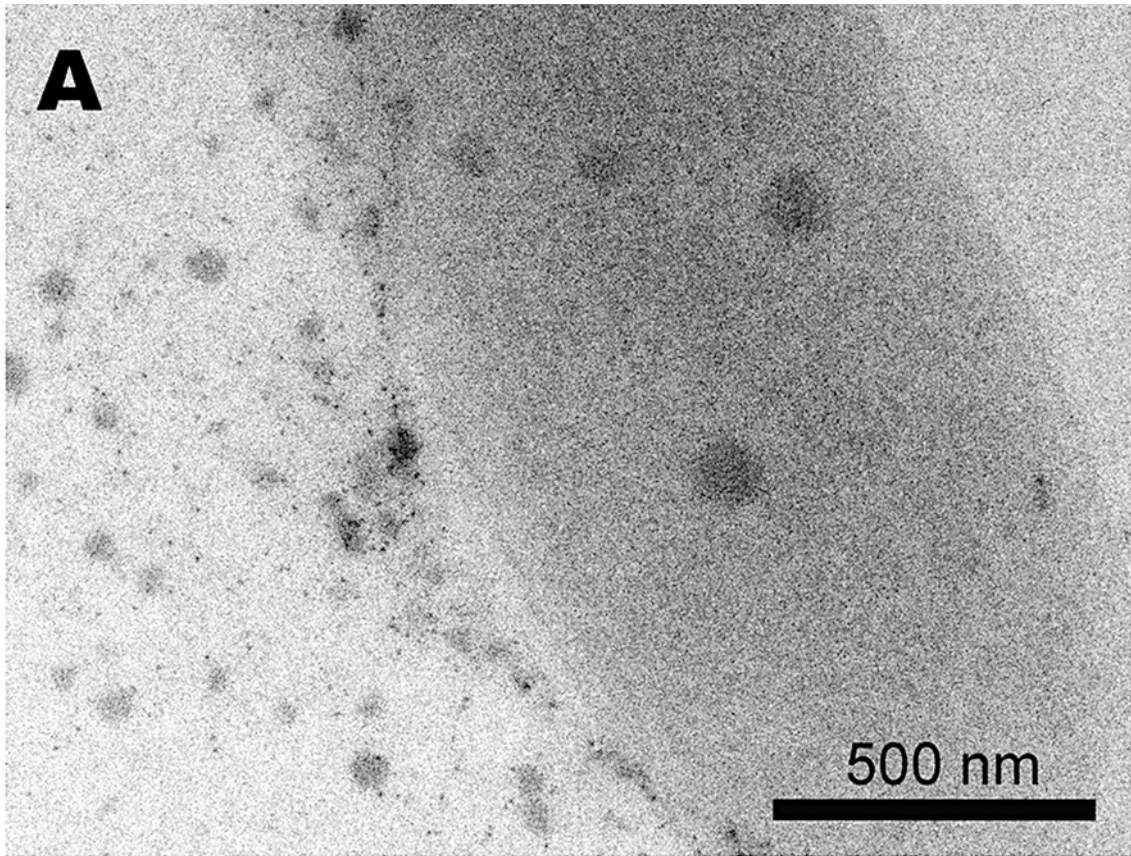
dextrano en tampón Hepes. (C) 20% dextrano en PBS. (D) 30% dextrano en PBS. (E) 20% dextrano en medio mineral mínimo (MM3). (F) 20% dextrano en TSB.

#### **2.4. Determinación del medio para la crioinmovilización por “Plunge Freezing” de *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>**

Teniendo en cuenta que en la bibliografía existe cierta variabilidad en los medios para la CF de bacterias por esta técnica, tratándose la mayoría de ellos tampones y medios de cultivo bacterianos (Zhang et al., 2004; Briegel et al., 2008 Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008; Sani et al., 2010), se ensayaron tres medios diferentes para la CF de las muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>:

- a. Tampón PHEM.
- b. Tampón PBS.
- c. Agua.

Las micrografías mostraron que cuando las bacterias se crioinmovilizaban en un medio que sólo contenía agua, éstas presentaban una mejor definición de las membranas y de las estructuras citoplásmicas (Fig. 10). Además, la ultraestructura de las bacterias crioinmovilizadas en agua no se apreció alterada respecto a las bacterias crioinmovilizadas en tampones. Este hecho probablemente se deba a que la disolución de la muestra se llevó a cabo justo en el momento antes de la CF, evitando que las bacterias permaneciesen demasiado tiempo en agua. Por otro lado, se observó que el uso de tampones, como el PHEM y el PBS, conducía a un aumento de la suciedad de fondo de la muestra. Por lo tanto, se estableció que los estudios para la caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras por PF se llevarían a cabo en muestras disueltas en agua justo en el instante antes de su CF.



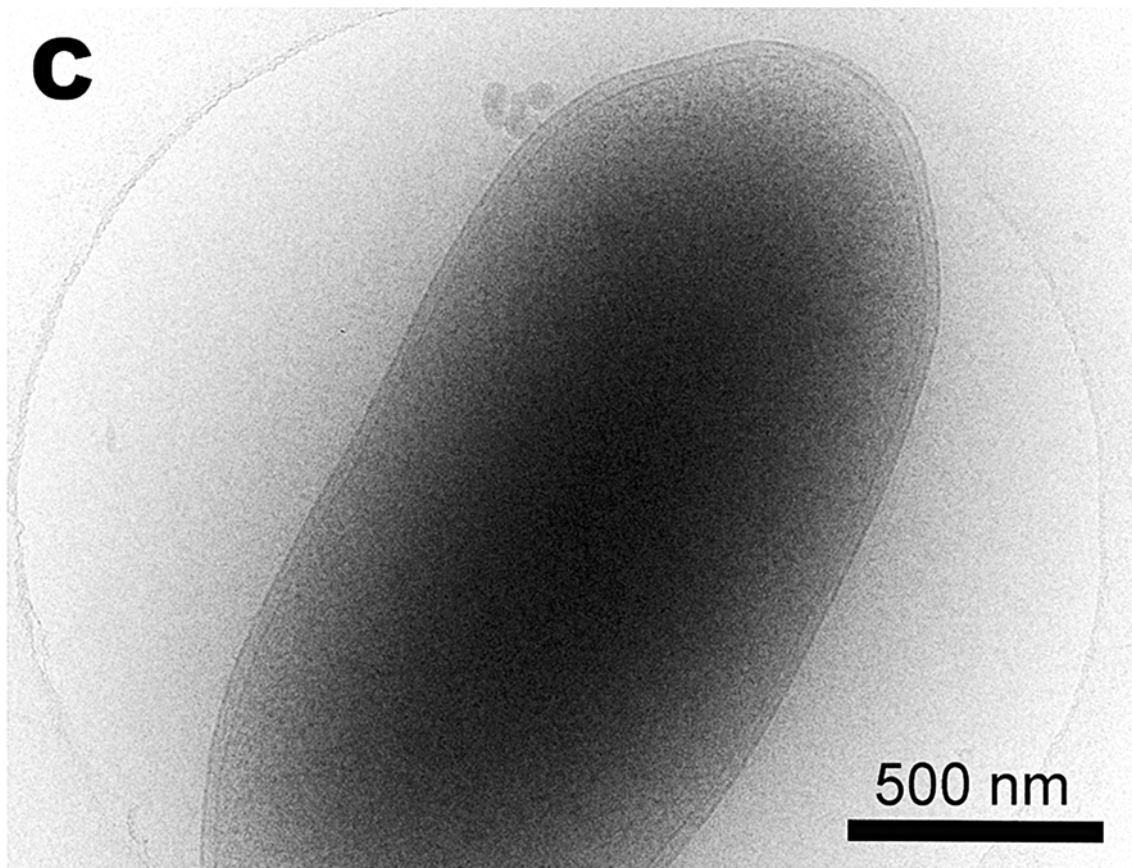


Figura 10. Micrografías de células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> crioinmovilizadas por PF en diferentes medios. (A) Tampón PHEM 0,1M. (B) Tampón PBS. (C) Agua.

### **3. Caracterización ultraestructural de las nuevas estructuras citoplásmicas mediante la combinación de técnicas de Microscopía**

Una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas para el estudio del nuevo tipo de inclusiones citoplásmicas, se analizaron las micrografías de las secciones de las muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA a 0°C durante 12 días, crioinmovilizadas por HPF, criosustituidas en presencia de un 1% de agua, incluidas en resina EPON y contrastadas con MUA. Se confirmó que las inclusiones alargadas apiladas eran estructuras organizadas, regulares y singulares, ubicadas en el citoplasma bacteriano y que no presentaban similitud con ninguna inclusión ni estructura citoplásmica descrita

hasta el momento. Cuando estas estructuras se observaban en 2D en los cortes bacterianos, se visualizaban como agrupaciones de un número variable de subunidades alargadas en forma de bastón, paralelas entre sí y localizadas en la mayoría de casos, cerca de la PM. A menudo la orientación de estas estructuras era perpendicular respecto a PM, aunque la inclinación podía variar (Fig. 11A). Normalmente, las subunidades se observaban rectas y alargadas, aunque en algunos casos presentaban una ligera curvatura (Fig. 11A). De ahora en adelante, nos referiremos a cada ensamblaje completo formado por diferentes subunidades alargadas paralelas y apiladas entre sí con el término “Stack”.

Inicialmente, se pensó que esta estructura podría tratarse de inclusiones o vesículas de gas, ya que la cepa tiene una gran capacidad para producir compuestos orgánicos volátiles de azufre (VOSCs), como el dimetilsulfuro (DMS) o metanotiol (Carrión Fonseca, 2014). Además, algunas de las imágenes de las nuevas estructuras podrían recordar a las vesículas de gas presentes en algunas bacterias fotosintéticas (ver Fig. 12 del capítulo Introducción). Estas vesículas de gas observadas en el TEM muestran una estructura a base de agrupaciones regulares con forma de cilindro bicónico de unos 200-1000 nm de longitud y de unos 70 nm de diámetro. Sin embargo, la observación de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en el TEM nunca mostró estructuras circulares en el citoplasma correspondientes a las secciones transversales de las vesículas de gas. Las subunidades de las vesículas de gas están rodeadas de una monocapa de uniones globulares de proteína ensambladas helicoidalmente mostrando un aspecto de bandas, característica que tampoco fue apreciable en las observaciones de los “Stacks” de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en el TEM. Por lo tanto, las vesículas de gas son estructuras de mayor tamaño y estructuralmente muy diferentes a los “Stacks”.

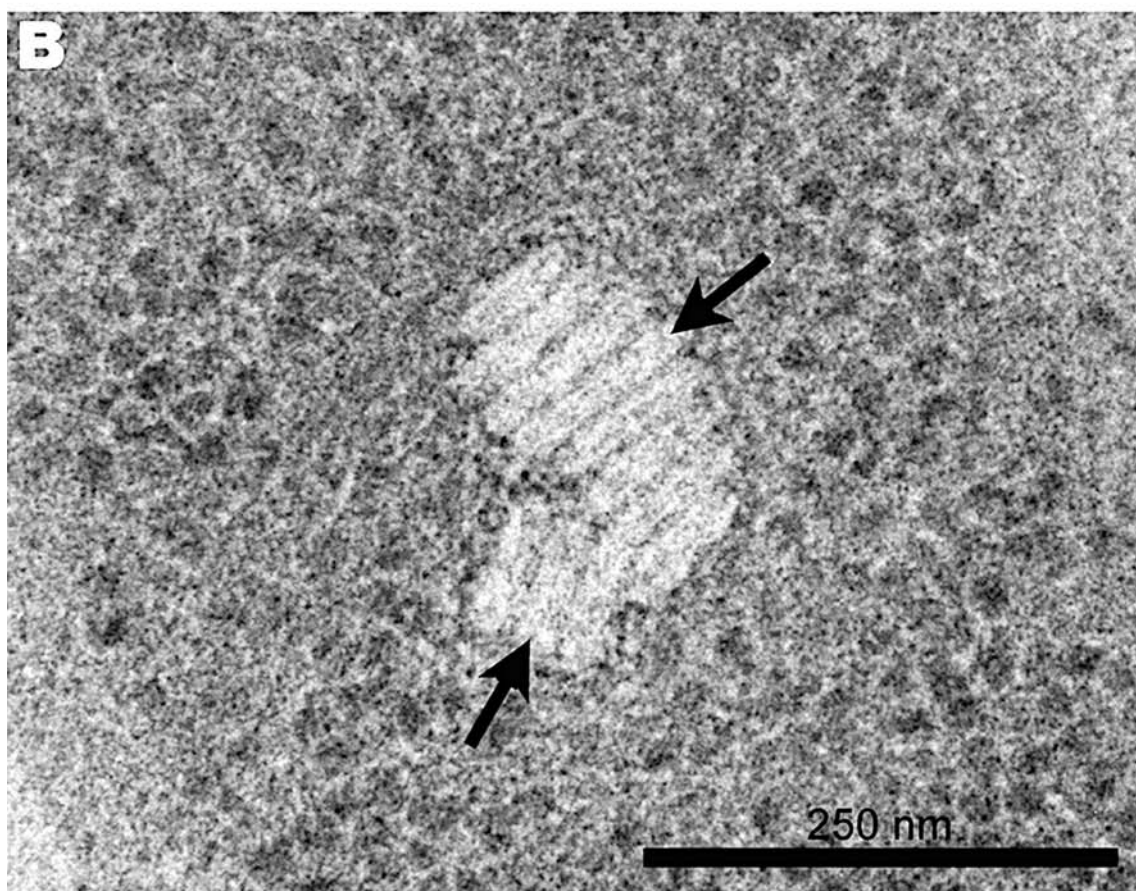
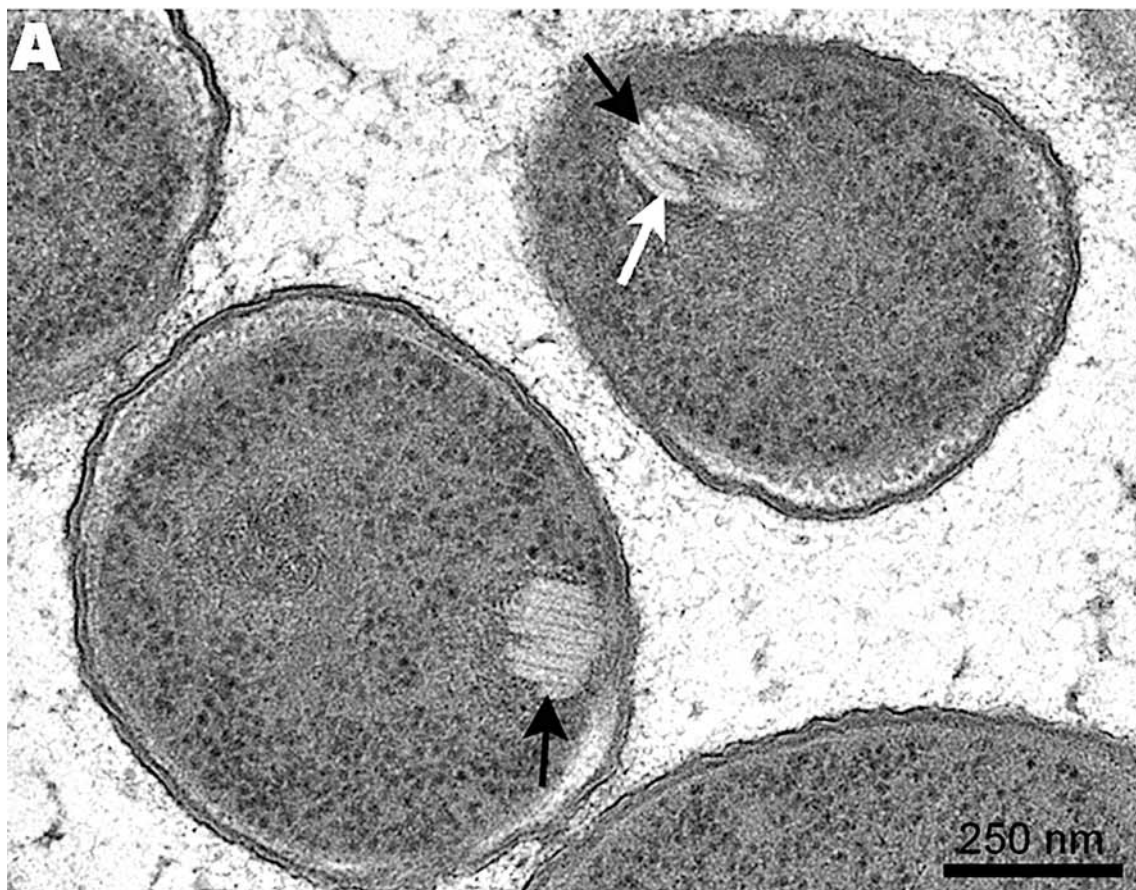




Figura 11. Micrografías de “Stacks” en el citoplasma de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. (A-C) Secciones de 60 nm de EPON de muestras procesadas por HPF-FS. (A) Las flechas negras señalan “Stacks” compuestos por diferentes subunidades dispuestas más o menos perpendicularmente a la PM. La mayoría de las subunidades son rectas, observándose ligeramente curvadas en algunos casos (flecha blanca). (B) Muestra dos “Stacks” dispuestos contiguamente y presentando orientaciones diferentes entre sí en el citoplasma bacteriano (flechas negras). (C) Las flechas negras marcan tres “Stacks” dispuestos perpendicularmente a la PM en el citoplasma de una misma bacteria.

Con la finalidad de caracterizar estas nuevas estructuras, se cuantificaron las subunidades alargadas que formaban cada “Stack” y para ello se analizaron 170 “Stacks” visualizados en secciones de EPON de 60 nm. Tras cuantificar un total 854 subunidades repartidas entre los mencionados 170 “Stacks”, se comprobó que los “Stacks” consistían en agrupaciones de entre 1 y 14 subunidades alargadas, obteniéndose un valor medio de 5,02 subunidades por “Stack” (Tabla 2). Después de analizar los datos, se pudo confirmar que el 90,59% de los “Stacks” presentaban entre 2 y 8 subunidades, siendo los más frecuentes los formados por 4 subunidades (16,47%) (ver imágenes en Material Suplementario, apartado 1.1).



Tabla 2. Frecuencia y porcentaje del número de subunidades (N) que componen cada "Stack" contabilizados en 170 "Stacks".

N	Frecuencia	%
1	4	2,35
2	20	11,76
3	27	15,88
4	28	16,47
5	26	15,29
6	24	14,12
7	15	8,82
8	14	8,24
9	3	1,76
10	5	2,94
11	1	0,59
12	2	1,18
14	1	0,59

Por otro lado, en estas mismas muestras se realizaron medidas para precisar el tamaño de las subunidades que componen los "Stacks". Para ello, se midieron 59 subunidades obteniendo valores de largo y ancho de cada uno de ellos (Tabla 3, primera fila). El análisis de las medidas mostró que las subunidades en forma de bastones presentaban una longitud variable, que oscilaba entre 39,65 y 160,59 nm, obteniéndose un valor medio de  $93,71 \pm 26,22$  nm; mientras que el ancho de las mismas presentaba mayor regularidad, con un valor medio de  $15,88 \pm 2,25$  nm.

Tabla 3. Valores medios del largo y del ancho de las subunidades que componen los "Stacks" en secciones de 60 nm siguiendo diferentes técnicas de preparación y en réplicas de Pt/C de bacterias criofracturadas (FF).

	Largo Medio	SD	Ancho Medio	SD
HPF + FS + EPON	93,71	26,22	15,88	2,25
FF	75,03	11,54	13,59	2,14
HPF + FS + HM23	85,85	22,46	12,81	1,69
Tokuyasu	85,49	19,04	14,13	1,73
HPF + VIS	76,35	23,68	12,09	3,18

También mediante la observación de las micrografías de cortes ultrafinos de la cepa cultivada en TSA durante 12 días a 0°C, se apreció que las células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> que presentaban "Stacks" en sus citoplasmas podían

contener uno o varios simultáneamente. Para poder determinar la cantidad de “Stacks” por bacteria, se llevaron a cabo cuantificaciones en 162 bacterias en secciones ultrafinas de EPON, contándose un total de 230 “Stacks” y obteniéndose una media de 1,42 “Stacks” por bacteria. Se determinó, asimismo, que las células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> visualizadas a partir de secciones ultrafinas mostraban un máximo de cuatro “Stacks” en el citoplasma. Sin embargo, el 93,21% de las células analizadas presentaban entre 1 y 2 “Stacks”, siendo mayoritarias las que sólo contenían uno (67,28%). Se pudo apreciar que en los casos en los que aparecían más de un “Stack” simultáneamente en el citoplasma de una bacteria, los diferentes “Stacks” podían encontrarse agrupados y adyacentes entre sí en una misma localización citoplásmica, aunque con una orientación diferente (Fig. 11B); o bien, aislados ocupando distintos lugares dentro del citoplasma bacteriano (Fig. 11C). De este modo, las células que presentaron más de un “Stack” simultáneamente se analizaron de nuevo con la intención de determinar la frecuencia en la que los “Stacks” aparecían adyacentes entre sí en una misma localización o aislados en el citoplasma celular (Tabla 4). Se pudo comprobar que en los casos en los que se observaba más de un “Stack” en el citoplasma, la distribución contiguos o adyacentes entre sí era prácticamente el doble de frecuente que la distribución aislados y localizados en distintos sitios del citoplasma (ver imágenes en Material Suplementario, apartado 1.1).

Tabla 4. Distribución y porcentaje del número de “Stacks” por bacteria, diferenciando su disposición de forma contigua o aislada en los casos en los que aparecen dos o más simultáneamente en el citoplasma.

N “Stacks”/Bacteria	N Bacterias	%
1 “Stack”	109	67,28
2 “Stacks” contiguos	28	17,28
2 “Stacks” aislados	14	8,64
3 “Stacks” contiguos	4	2,47
3 “Stacks” aislados	3	1,85
4 “Stacks” contiguos	3	1,85
4 “Stacks” aislados	1	0,62
Total	230	100

Paralelamente, las observaciones mediante TEM de muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> crecidas durante 12 días a 0°C, procesadas mediante HPF-FS e inclusión en EPON, permitieron observar frecuentemente las estructuras de forma circular-ovalada con transparencia a los electrones similar a la de los "Stacks". Además, en las condiciones ensayadas se pudo confirmar que estas estructuras presentaban una frecuencia y localización similares que las de los "Stacks" (Fig. 12A, ver más imágenes en Material Suplementario, apartado 1.1). Con la finalidad de analizar estas estructuras y determinar si existía algún tipo de relación entre las mismas y los "Stacks", también se efectuaron medidas de las estructuras circulares-ovaladas. Se tuvo en cuenta el hecho de que estas estructuras suelen presentar una forma ligeramente ovalada, cuyo lado más largo se aprecia en sentido perpendicular a la PM. Por este motivo, se realizaron dos medidas de cada estructura ovalada analizada: una en sentido perpendicular (PP) y otra en sentido paralelo a la PM (PL) (Fig. 12B). Para ello, se tomaron 155 medidas de estas estructuras en sentido perpendicular a la PM y otras 155, en sentido paralelo a la misma. Se obtuvo una media del largo (perpendicular a la PM) de  $100,57 \pm 27,01$  nm y una media del ancho (paralela a la PM) de  $93,26 \pm 27,21$  nm (Fig. 12B). Estos resultados confirmaron que las estructuras visualizadas presentaban una forma ligeramente ovalada y, además, se pudo comprobar que sus dimensiones eran similares a la longitud de las subunidades de los "Stacks". (Fig. 12B). Esta similitud entre las dimensiones de ambas estructuras, juntamente con las semejanzas puntualizadas anteriormente entre los "Stacks" y las estructuras ovaladas, apuntaba a que ambas estructuras podrían corresponder a diferentes proyecciones 2D de una misma estructura.

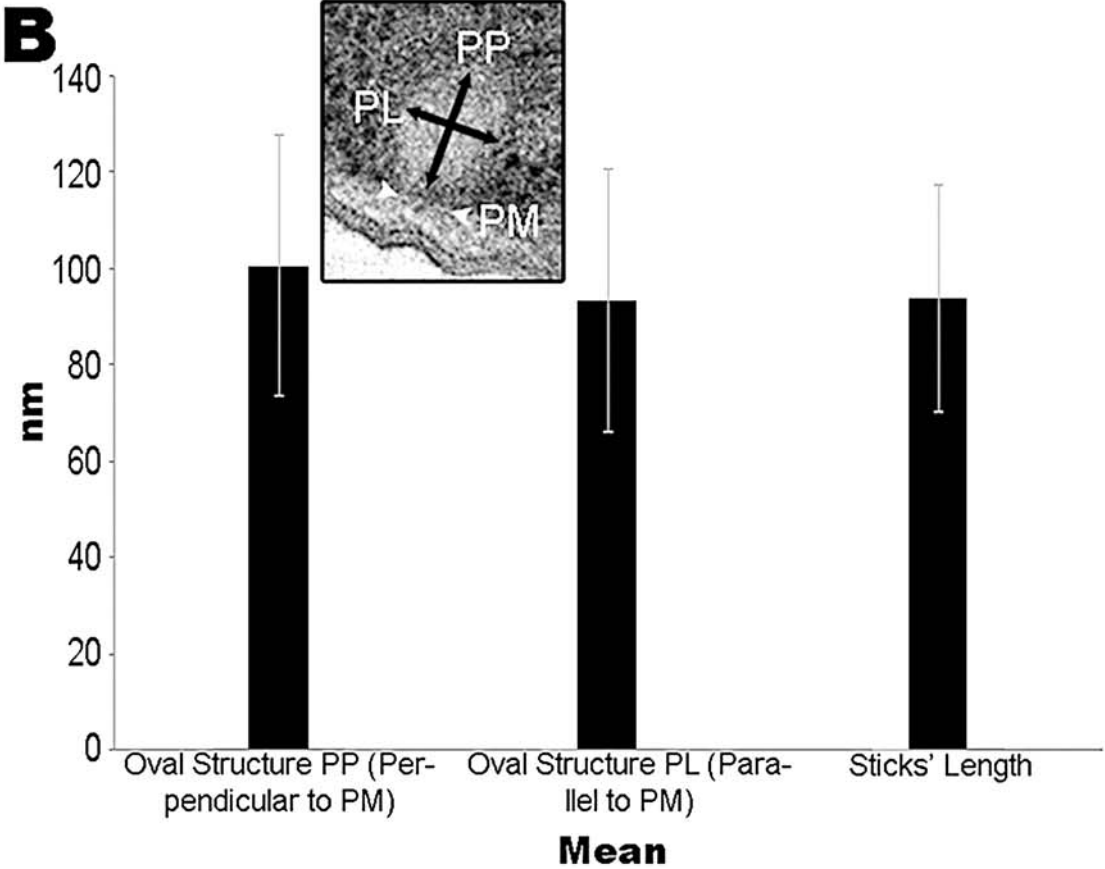


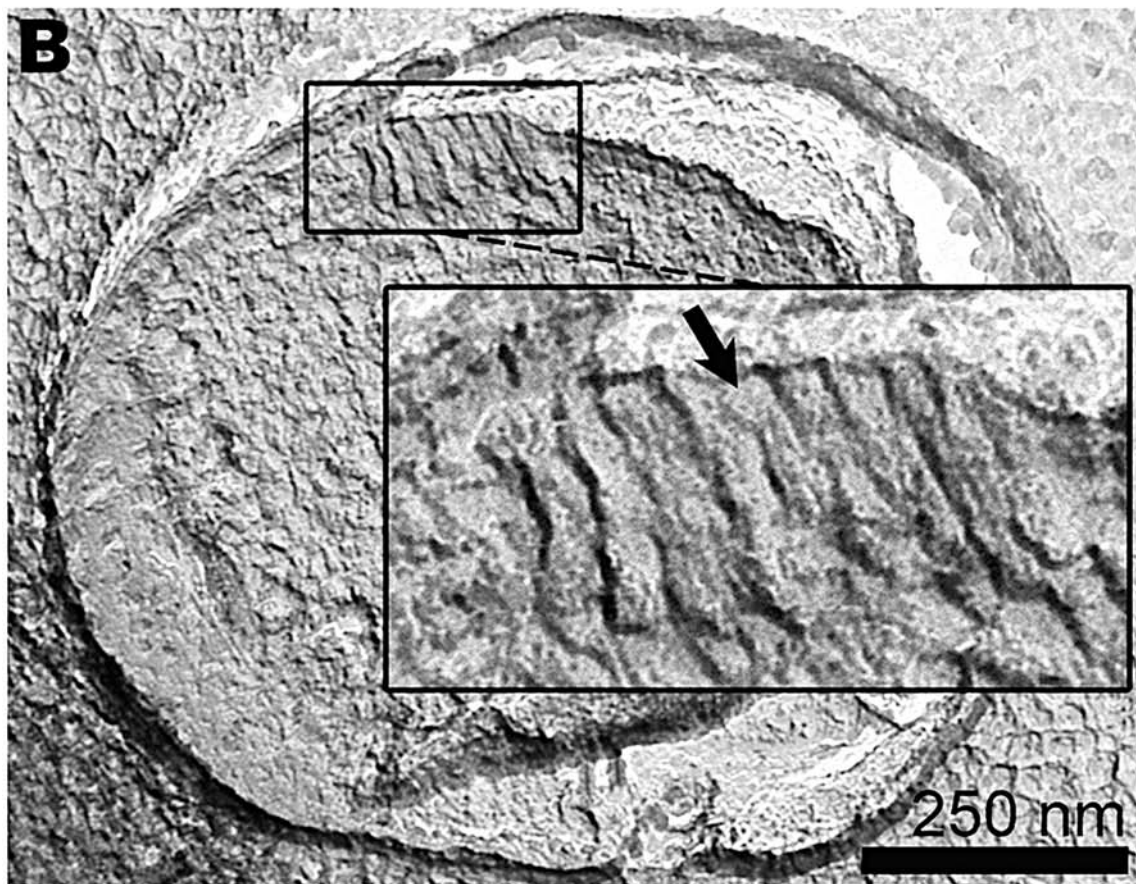
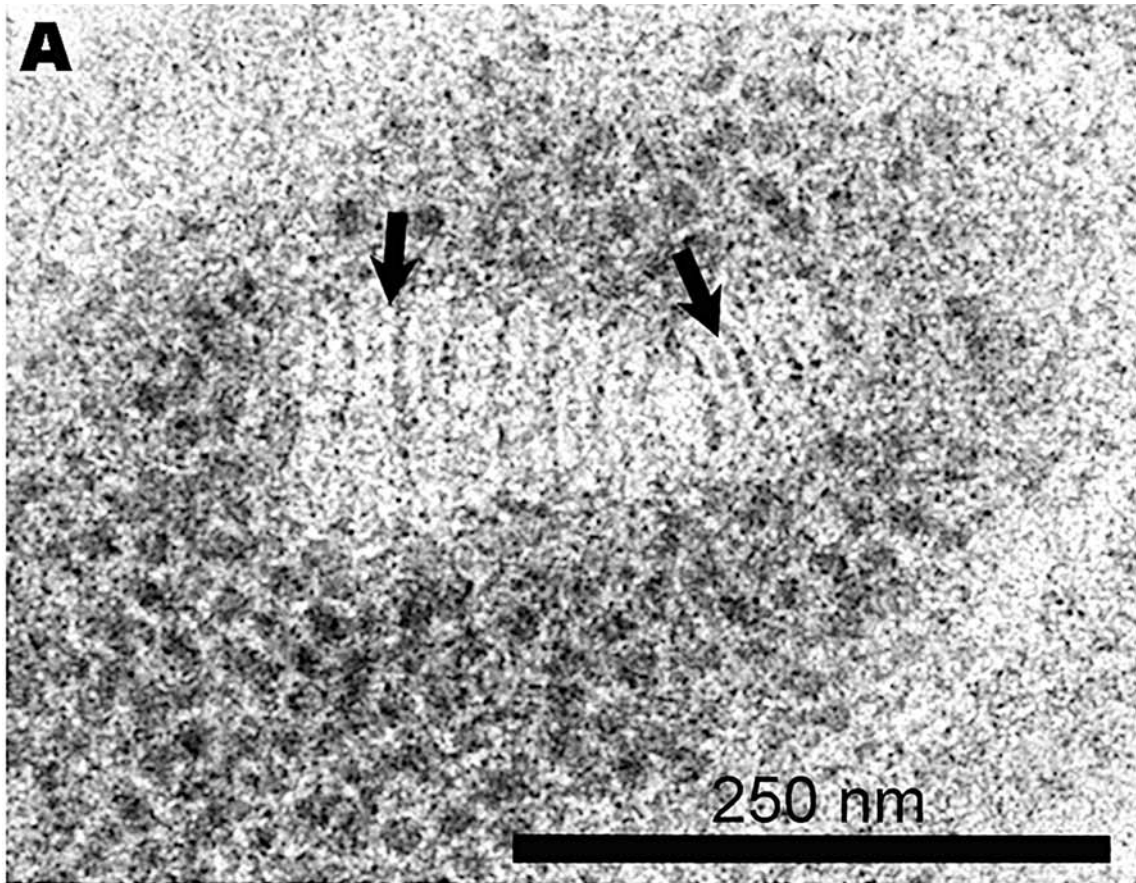
Figura 12. Análisis de las estructuras circulares-ovaladas observadas en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. (A) Sección de 60 nm de la muestra incluida en EPON. Se observa un “Stack” marcado con una flecha negra y las estructuras circulares-ovaladas señaladas con flechas blancas, ambas con similar densidad a los electrones y similar localización intracitoplásmica. (B) Gráfica comparando las medidas de las estructuras circulares-ovaladas y las medidas del largo de las subunidades de los “Stacks” (“Sticks”). Las barras de error corresponden a valores de desviación estándar (SD). (PP) Orientación perpendicular a la PM; (PL) Orientación paralela a la PM; (PM) Membrana plasmática.

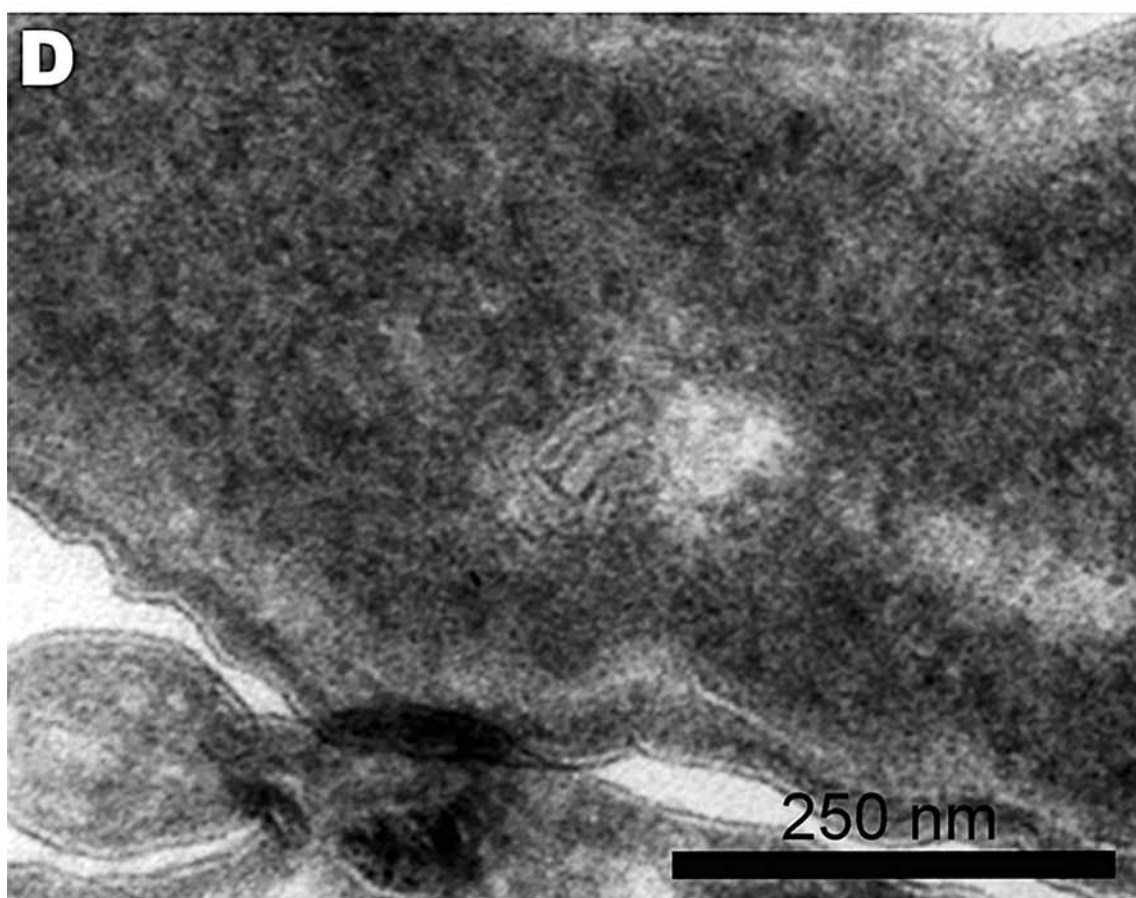
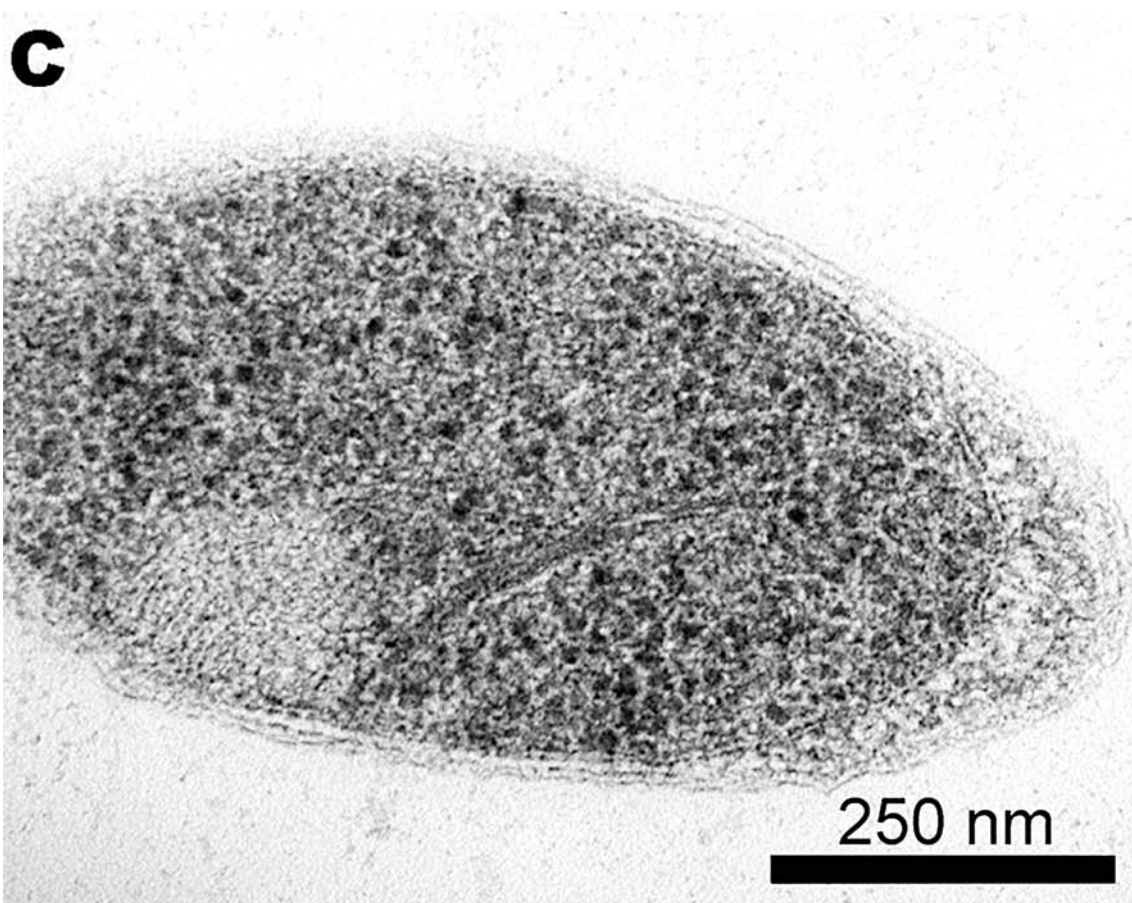
A lo largo de las observaciones en el TEM de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA durante 12 días a 0°C y procesada por HPF-FS e inclusión en EPON, se observó la presencia de una estructura que podría corresponder a una membrana rodeando cada una de las subunidades de los “Stacks” (Fig. 13A). Con la finalidad de estudiar la existencia de una membrana que delimitara las subunidades y conocer su naturaleza, se procesaron nuevas muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA a 0°C durante 12 días por diferentes técnicas de Microscopía. Unas muestras se procesaron por FF y sombreado, técnica conocida porque suele separar las bicapas lipídicas de las membranas dejando expuestas las proteínas transmembrana (Heuser, 2011). Las imágenes obtenidas en el TEM de las réplicas nos permitieron confirmar de nuevo la existencia de los “Stacks” mediante una técnica distinta a las empleadas hasta entonces (Fig. 13B). Las subunidades que componían los “Stacks” se pudieron observar lisas y no se apreciaron protuberancias que indicaran la presencia de proteínas transmembrana características de la PM. De todos modos, los planos de fractura obtenidos no permitieron determinar si las membranas que rodeaban las subunidades de los “Stacks” presentaban la naturaleza de una bicapa lipídica, correspondiera o no a la PM (Fig. 13B).

Otras muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en las mismas condiciones se procesaron por HPF-FS seguido de inclusión en Lowicryl HM23. El Lowicryl HM23 es la resina acrílica más transparente que se conoce, de manera que permite una mejor visibilidad de las membranas (Fontana et al., 2010). Las micrografías mostraron que las subunidades alargadas apiladas de los “Stacks” estaban delimitadas por una membrana de aspecto similar a una membrana lipídica (Fig. 13C). Por otro lado, también se procesaron muestras crecidas en las mismas condiciones por el método de Tokuyasu, característico

por mostrar las membranas lipídicas como entidades blancas debido a la pérdida de lípidos (Griffith et al., 2008), facilitando así la distinción de las membranas lipídicas respecto a membranas de composición diferente. A pesar de que la preservación ultraestructural que permite esta técnica es menor debido a que parte de una fijación química, se pudieron distinguir las subunidades alargadas de los “Stacks” bien delimitadas por una envuelta de color blanquecino, apuntando a una composición lipídica de la misma (Fig. 13D).

También se obtuvieron VIS a partir de las muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en las condiciones óptimas con el objetivo de realizar CEMOVIS y así estudiar la cepa y sus “Stacks” con una de las técnicas consideradas actualmente como menos artefactual, gracias a que permite la observación de la muestra en un estado muy cercano a como ésta se encontraría en la naturaleza. En las micrografías de VIS de 50 nm se observaron “Stacks” en el citoplasma de las bacterias presentando cierta angulación respecto a la PM, coincidiendo con las descripciones previas obtenidas con las otras técnicas. Además, las VIS mostraron que las subunidades que integran los “Stacks” estaban delimitadas por una estructura con similar densidad electrónica que la bicapa lipídica de la PM de la célula (Fig. 13E y 13F; ver más imágenes en Material Suplementario, apartado 2.1). A pesar de que esta técnica ha sido destacada previamente por su capacidad de mostrar la estructura molecular de las membranas (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008), en nuestro caso no fue posible discernir un patrón de bicapa lipídica rodeando las subunidades de los “Stacks”. Sin embargo, sí que se pudo diferenciar el perfil de bicapa en la PM mediante la obtención de patrones de densidad (Fig. 13F). Este hecho planteó la posibilidad de que seguramente las envueltas que rodeaban las subunidades de los “Stacks” podrían tener una composición diferente a la de la PM.







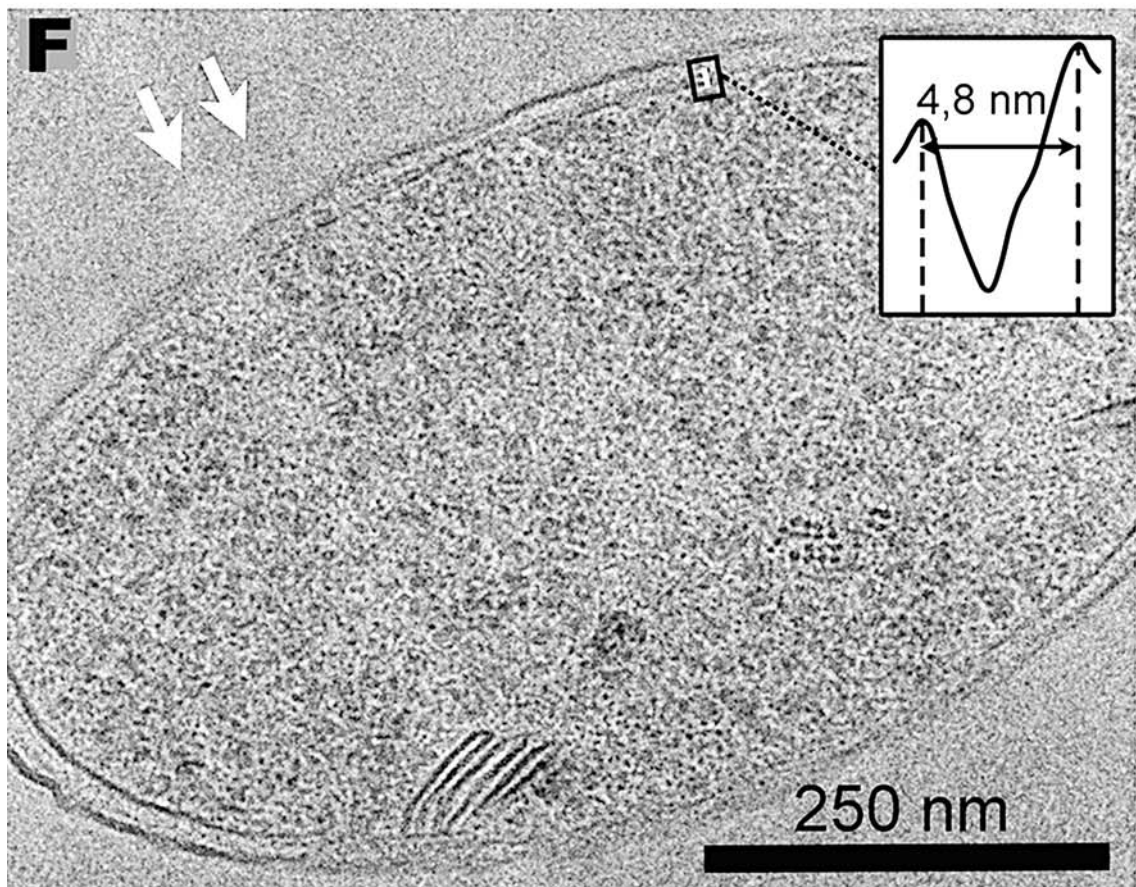
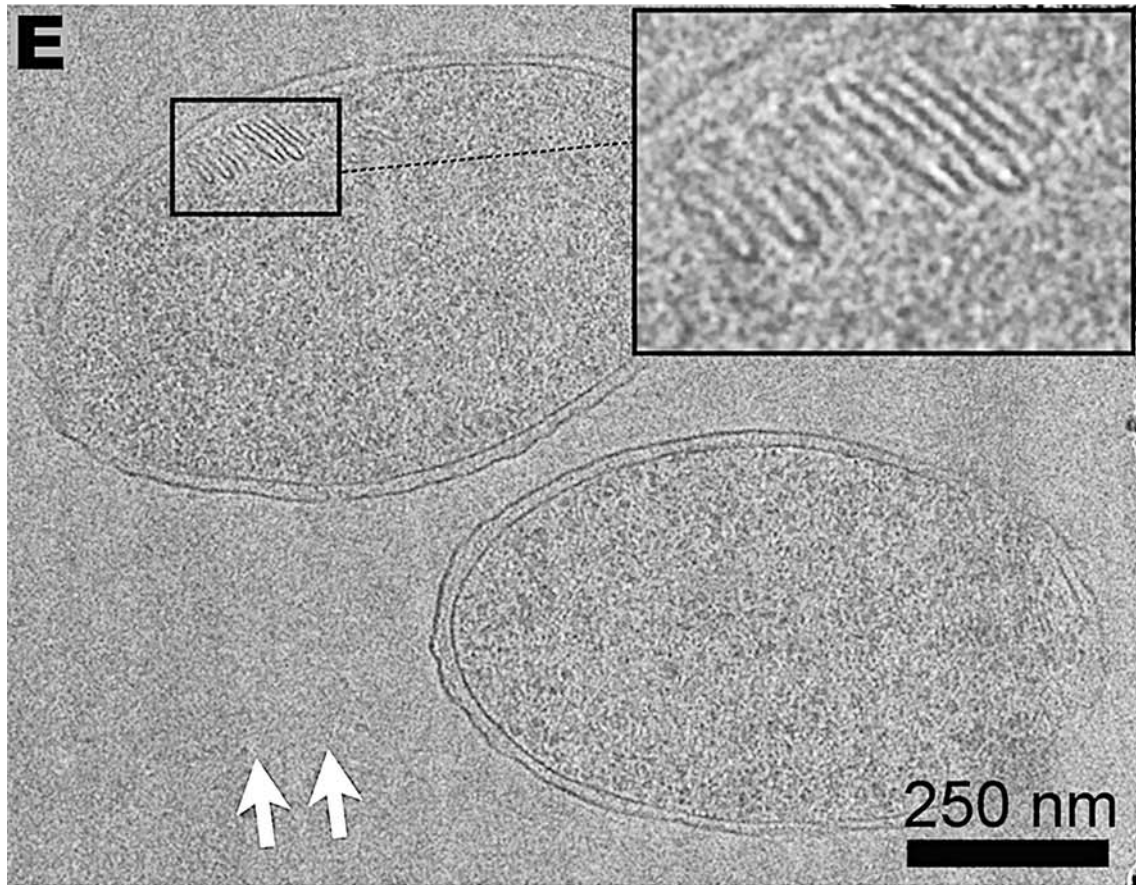


Figura 13. Análisis de los “Stacks” en micrografías obtenidas en el TEM y en el cryo-TEM. (A) Sección de 60 nm de EPON de una muestra procesada por HPF-FS. Se observa un “Stack” en el citoplasma de la bacteria cuyas subunidades parecen delimitadas por una membrana (flechas negras). (B) Micrografía de una réplica de una muestra procesada por FF. La flecha del área ampliada señala un “Stack” más o menos perpendicular a la PM. (C) Sección de 60 nm de Lowicryl HM23 de una muestra procesada por HPF-FS. Se observa un “Stack” en el citoplasma de la bacteria cuyas subunidades parecen delimitadas por una membrana. (D) Sección de 60 nm de Tokuyasu en la que se observan las subunidades de un “Stack” rodeadas por una envuelta blanquecina similar a una bicapa lipídica. (E) y (F) VIS de 50 nm en las que se observan “Stacks” cuyas subunidades aparecen rodeadas por una envuelta de similar densidad a los electrones que la PM.

Con la finalidad de comprobar si existían diferencias entre ambos tipos de membranas, se realizaron 170 medidas del grosor de la PM y otras 170 medidas del grosor de la membrana que envolvía las subunidades de los “Stacks” de 34 bacterias que contenían estas estructuras. Todas las medidas se realizaron sobre micrografías de VIS ya que era la técnica considerada menos artefactual de las utilizadas hasta entonces. Como resultado se obtuvieron los valores medios de  $4,45 \pm 1,25$  nm y  $3,38 \pm 0,98$  nm de grosor de la PM y de la membrana de las subunidades de los “Stacks”, respectivamente. Tras efectuar un ensayo ANOVA de un factor entre ambos grupos de medidas, se obtuvo un  $p$ -valor  $< 0,0001$  que indicaba diferencias significativas entre ambas series de datos. Según la bibliografía, las diferencias observadas en el grosor de las membranas de diferentes especies bacterianas se atribuye principalmente a diferencias en la composición de las mismas (Zuber et al., 2008). Por ello, las diferencias detectadas en el presente estudio entre el grosor de las membranas que rodean las subunidades de los “Stacks” y la PM podrían reforzar la hipótesis de una composición diferente entre ambas.

Un hecho importante a destacar fue que las estructuras alargadas apiladas denominadas “Stacks” se habían podido visualizar hasta el momento mediante diferentes técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión, que incluían técnicas como CEMOVIS y FF, las cuales no utilizaban agentes químicos capaces de generar artefactos. Por lo tanto, todo indicaba a que el posible origen artefactual de estas nuevas estructuras intracitoplásmicas quedaba descartado.

Paralelamente a estos análisis, también se realizaron medidas del largo y del ancho de las subunidades en forma de bastones que forman los "Stacks" con cada una de las técnicas microscópicas utilizadas hasta el momento, obteniéndose los valores medios mostrados en la Tabla 3 (ver filas 2-5). A pesar de las diferencias apreciadas entre las medidas obtenidas mediante las distintas técnicas, seguramente debidas a los distintos procesos de preparación de las muestras, cabe destacar que los resultados se asemejaban considerablemente entre ellos y a los obtenidos inicialmente con las muestras procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON (Tabla 3, fila 1). De esta manera, todas las medidas concluyeron que el largo de las subunidades era variable mientras que el ancho se mantenía prácticamente constante.

El hecho de que los "Stacks" se encontrasen frecuentemente casi perpendiculares y muy cercanos a la PM de las bacterias, juntamente con las similitudes entre ambas envueltas mostradas mediante las técnicas de HPF-FS e inclusión en HM23, Tokuyasu y CEMOVIS, planteó la posibilidad de que los "Stacks" pudieran ser invaginaciones de la PM de la bacteria. En principio, la presencia de este tipo de invaginaciones de la PM se relaciona con bacterias fotosintéticas y bacterias quimioautotróficas, ya que permiten una mayor superficie de membrana donde albergar procesos metabólicos de generación de energía (Niederman, 2006). Asimismo, es destacable que, a pesar de las múltiples muestras observadas hasta entonces, ninguna de las técnicas utilizadas había mostrado la existencia de continuidad entre las membranas de las subunidades de los "Stacks" y la PM bacteriana. Es más, en las imágenes en que se apreciaban perfectamente ambos tipos de membranas, se podía observar la PM recta y continua sin evidencia de conexión con la envuelta que rodeaba las subunidades de los "Stacks" (Fig. 13E, ver área ampliada; ver más imágenes en Material Suplementario, apartado 1.2).

En otro intento de dilucidar la composición de la membrana que envolvía las subunidades de los "Stacks", se llevaron a cabo dos experimentos de Microscopía de Fluorescencia. En ambos casos se partió de la muestra cultivada en TSA a 0°C durante 12 días. Por un lado, las muestras se marcaron con el reactivo metacromático NAO, el cual se une específicamente a

fosfolípidos cargados negativamente, entre ellos, la cardiolipina, presente en la PM bacteriana. De este modo, cuando la preparación se observa a una longitud de onda entre 450-490 nm, todos los fosfolípidos cargados negativamente se presentan de color verde. Por otro lado, cuando la observación se realiza entre 515-570 nm, se puede visualizar exclusivamente la unión específica del reactivo NAO a la cardiolipina que se manifiesta de color rojo (Bernal et al., 2007; Mileykovskaya and Dowhan, 2009). Al observar la preparación en el microscopio confocal a 450-490 nm, se observó marcaje verde correspondiente a fosfolípidos cargados negativamente por todo el interior la bacteria y no únicamente en las membranas, como se esperaba inicialmente (Fig. 14A). Al observarse entre 515-570 nm, se pudieron apreciar ligeros puntos rojos correspondientes a la cardiolipina inmersos en la zona previamente ocupada por el verde (Fig. 14B). De este modo, a pesar de haber utilizado la concentración recomendada del reactivo (Bernal et al., 2007; Mileykovskaya and Dowhan, 2009), el uso de esta técnica no nos permitió el marcaje exclusivo de membranas que podría haber ayudado a determinar la naturaleza de la membrana que rodeaba las subunidades de los “Stacks”.

En otro intento de marcar por fluorescencia las membranas, una muestra de bacterias cultivada en las condiciones óptimas para la presencia de “Stacks” se marcó con el reactivo FM4-64, que es conocido por tratarse de un fluorocromo de unión específica a bicapas lipídicas (Wikström et al., 2009). Las micrografías de las preparaciones mostraron marcaje fluorescente no sólo en el contorno de las bacterias, correspondiente a la PM, sino también en forma de puntos rojos en el interior del citoplasma de las bacterias (Fig. 15B). Además, los mencionados puntos rojos localizados en el citoplasma se observaron mayoritariamente en la región periférica de las células, coincidiendo con la localización y la frecuencia de los “Stacks” descrita anteriormente mediante experimentos de Microscopía Electrónica (Fig. 15A). Teniendo en cuenta que las observaciones previas de la muestra cultivada en las mismas condiciones en el TEM no habían mostrado otro tipo de inclusiones diferente a los “Stacks” y a las estructuras circulares-ovaladas, este resultado podría indicar la existencia de una bicapa lipídica alrededor de las subunidades de los “Stacks”.

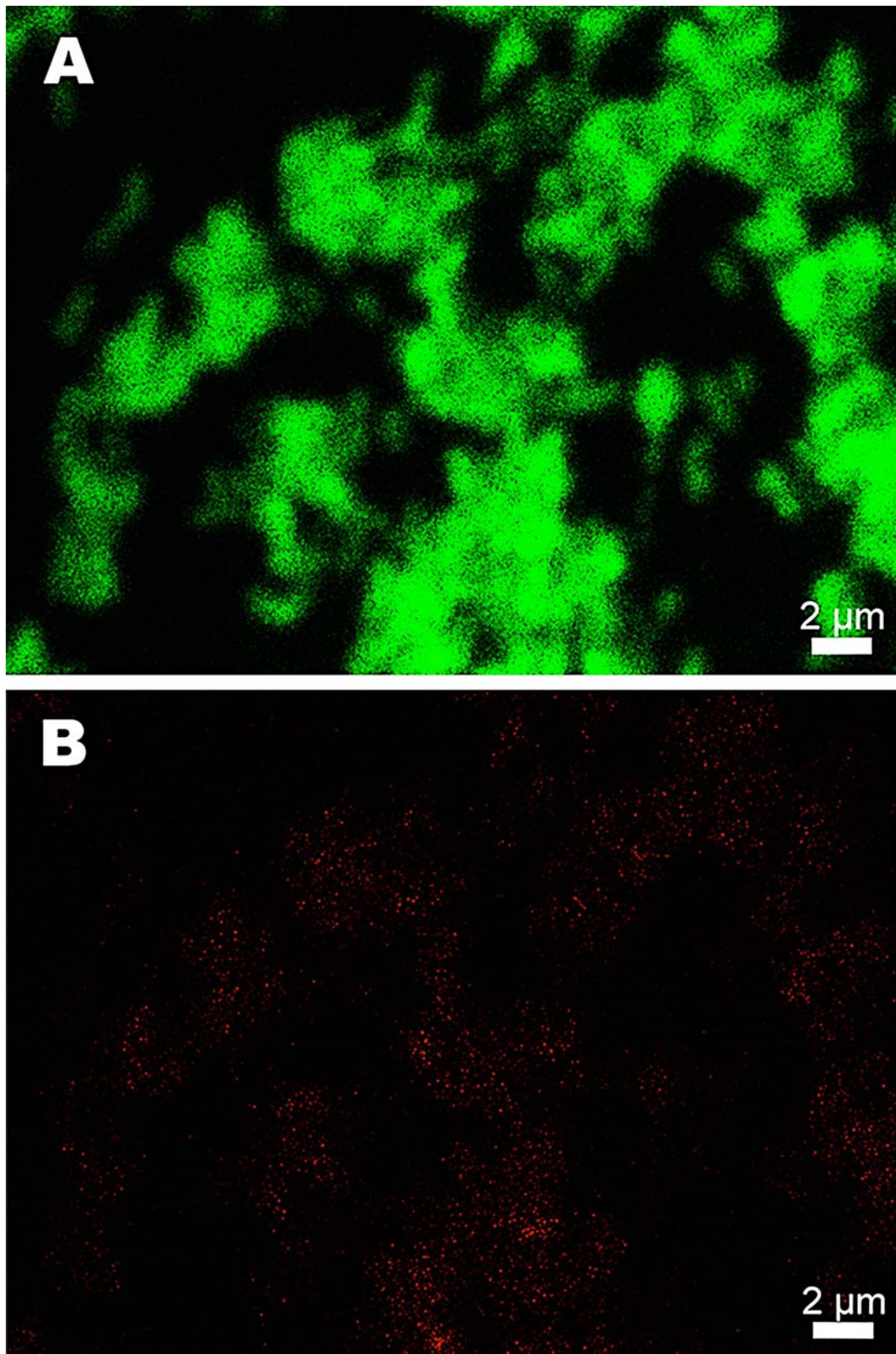


Figura 14. Micrografías de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> marcadas con el reactivo fluorescente NAO y visualizadas en el microscopio confocal. (A) Observación a una longitud de onda entre 450-490 nm. El marcaje verde corresponde al conjunto de fosfolípidos cargados negativamente. (B) Observación a una longitud de onda entre 515-570 nm. El marcaje rojo corresponde específicamente a la cardiolipina.

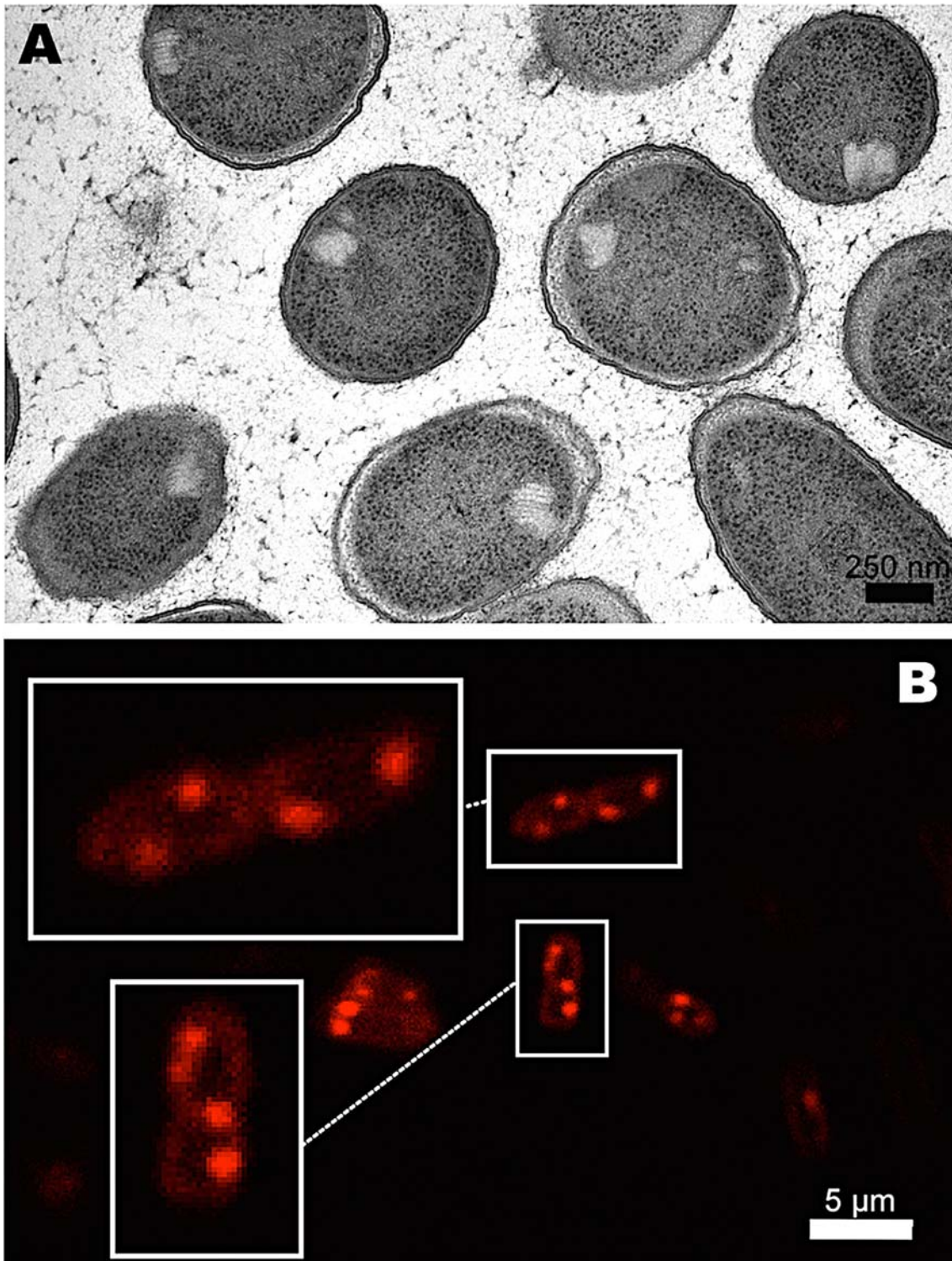


Figura 15. Análisis de la membrana que rodea las subunidades de los “Stacks”. (A) Micrografía de una sección de 50 nm de EPON de células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF-FS. Los “Stacks” se observan en la zona periférica de las células. (B) Marcaje de las células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> con el reactivo fluorescente FM4-64. Se observa el contorno de las bacterias marcado de rojo correspondiente a las membranas lipídicas celulares. También se observa marcaje periférico en forma de puntos rojos en el citoplasma.

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

### **4.1. Tomografía Electrónica a temperatura ambiente**

El primer experimento de tomografía electrónica a temperatura ambiente (RT-ET), tuvo por objetivo estudiar la morfología 3D de los “Stacks” a partir de cortes semifinos y, de esta forma, tratar de determinar si las estructuras circulares-ovaladas correspondían a otras vistas 2D de los “Stacks”. Se procedió a realizar un experimento de RT-ET a doble eje a partir de secciones de 250 nm de muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA a 0°C durante 12 días y procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON. Una vez en el TEM, se adquirieron series a doble eje de la nueva estructura. Según las dimensiones de los “Stacks” obtenidas a partir del análisis de secciones de 60 nm en el apartado anterior, los 250 nm de las secciones semifinas posiblemente permitirían el estudio de una parte importante del “Stack” aunque, seguramente, no en su totalidad. Se realizaron las reconstrucciones de los tomogramas y se analizaron las vistas XYZ de los mismos (Fig. 16, ver vídeo del tomograma en Material Suplementario, Apartado 4.1). La vista XY muestra un “Stack” compuesto por diez estructuras alargadas y paralelas entre sí, localizadas en una zona periférica del citoplasma bacteriano y distribuidas casi perpendicularmente a la PM (Fig. 16A). En la vista YZ se observa el mismo “Stack” que se encuentra posicionado de forma oblicua a lo largo del grosor de la sección semifina (Fig. 16B). Finalmente, la vista XZ permite apreciar la vista frontal de una subunidad del “Stack”, que presenta una morfología circular-ovalada, como las previamente observadas en las secciones ultrafinas. Este hallazgo corroboró la hipótesis que los “Stacks”, inicialmente descritos como estructuras formadas por subunidades alargadas apiladas, y las estructuras circulares-ovaladas, visualizadas en las micrografías iniciales, correspondían en realidad a diferentes proyecciones 2D de la misma estructura. De este

modo, a partir del análisis de tomogramas se pudo determinar que la estructura 3D de los “Stacks” consistía en agrupaciones de subunidades en forma de discos ovalados, planos y apilados entre sí.

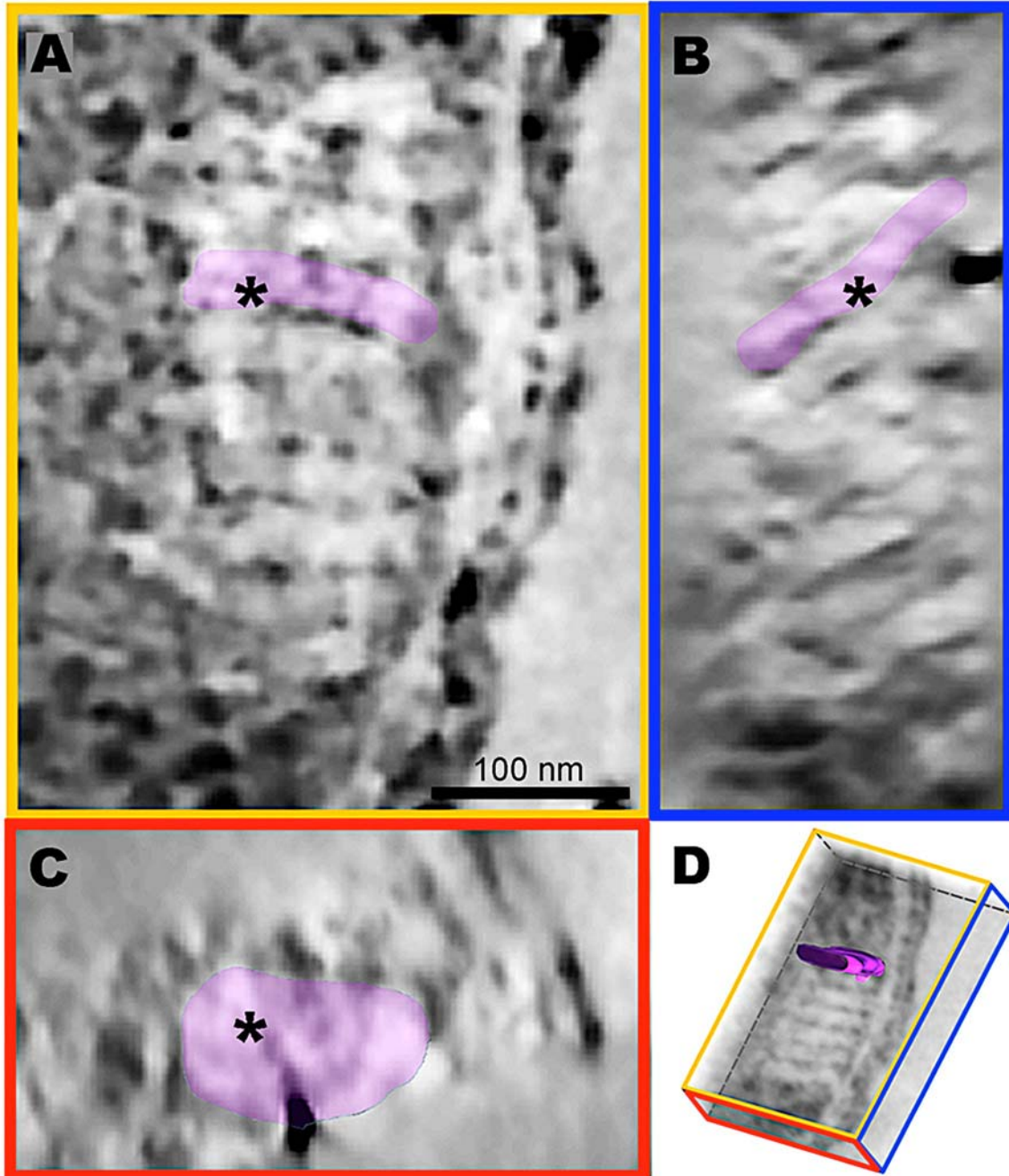


Figura 16. Análisis de un “Stack” de una bacteria *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> por RT-ET a doble eje a 120kV. La adquisición de la serie tomográfica se hizo con un tamaño de píxel de 1,26 nm. El tomograma ha sido filtrado por “bilateral filtering”. (A-C) Secciones de 4 nm de las vistas XYZ del tomograma reconstruido a partir de secciones de EPON de 250 nm procesada por HPF-FS. Los asteriscos corresponden al mismo punto a través de todas las vistas. (A) Vista XY del tomograma. Se observa un “Stack” compuesto por diez subunidades dispuestas perpendicularmente a la PM, una de las cuales se ha resaltado de color lila. (B) Vista YZ del tomograma. Se observa que el



mismo “Stack” está orientado de forma oblicua en esta vista lateral. Se ha resaltado de color lila la misma subunidad que en (A). (C) Vista XZ del tomograma. En esta vista se aprecia que la subunidad resaltada en las anteriores vistas presenta forma de estructura ovalada. (D) Esquema de la distribución de las vistas en el tomograma donde se observa la subunidad del “Stack” segmentada mostrando su morfología 3D de disco ovalado plano.

La Figura 17 muestra las vistas XYZ de otro tomograma a doble eje (A-C) de una porción periférica de una célula de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, en este caso adquirido a 200kV (ver vídeo del tomograma en Material Suplementario, apartado 4.2). La vista XY muestra dos “Stacks” adyacentes, entre los que existe una diferencia de orientación de unos 130° (Fig. 17A). Ambos se encuentran muy cercanos a la PM de la bacteria y, concretamente, el que se sitúa más a la izquierda presenta una orientación casi perpendicular a la misma. La vista YZ muestra la morfología del “Stack” situado a la derecha en la vista XY a lo largo de la sección semifina, observándose como una pila de estructuras aplanadas (Fig. 17B). La vista XZ muestra dos estructuras ovaladas que corresponden a las vistas frontales de dos subunidades planas, cada una perteneciente a uno de los dos “Stacks” observados inicialmente (Fig. 17C). Este resultado concuerda con el obtenido en el tomograma anterior. Además, la segmentación del tomograma que se muestra en las Figuras 17D, 17E y 17F mostró la distribución 3D de los dos “Stacks” contiguos entre sí y cercanos a la PM (ver vídeo de la segmentación en Material Suplementario, apartado 4.3). Cada uno de ellos se compone por subunidades en forma de discos planos y ovalados, apiladas entre sí, ratificando las deducciones iniciales a partir del análisis de las vistas XYZ de ambos tomogramas.

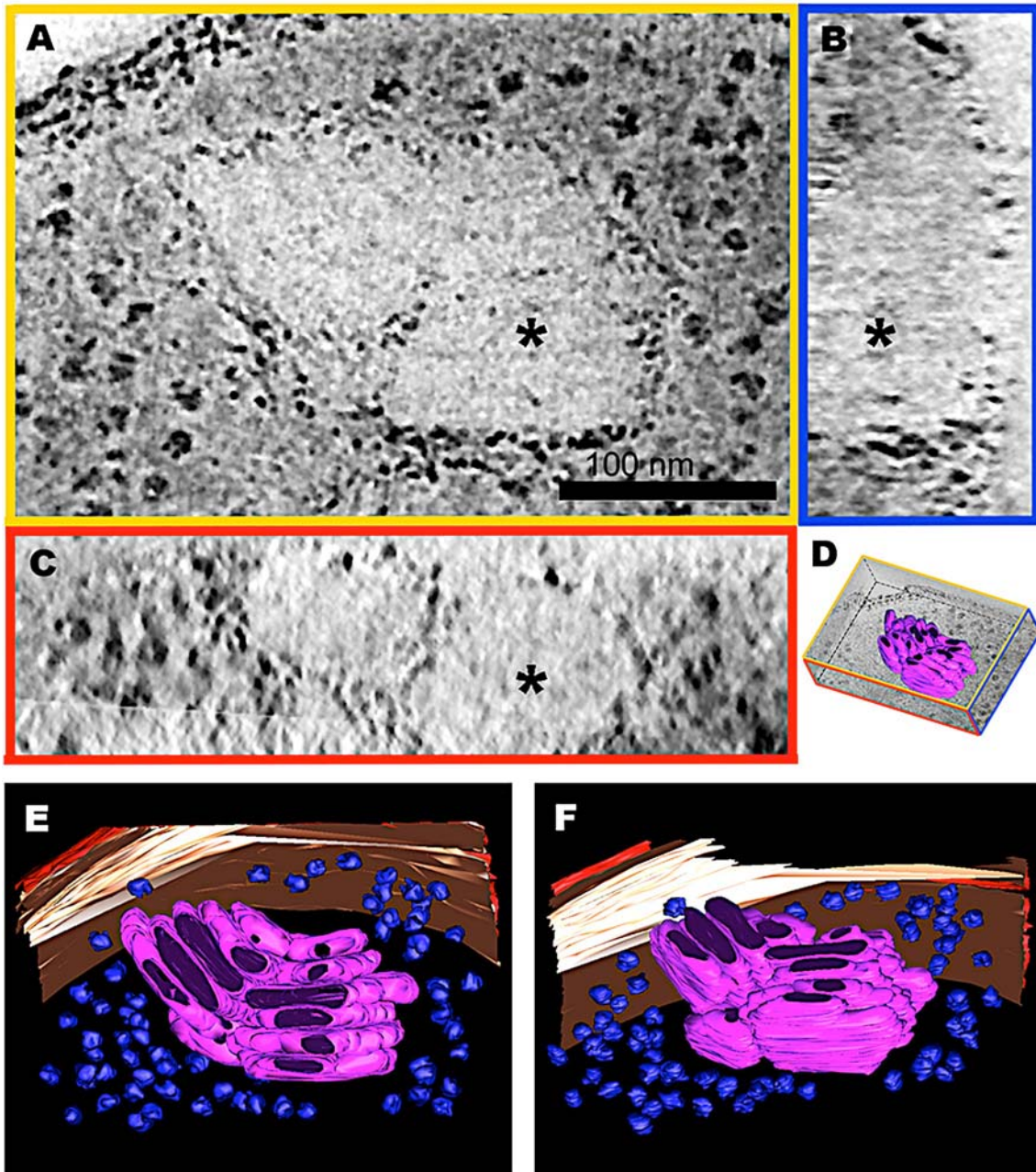


Figura 17. Visualización 3D de dos “Stacks” contiguos en una porción periférica de una célula de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> por RT-ET a doble eje a 200kV. La adquisición de la serie tomográfica se hizo con un tamaño de píxel de 0,42 nm. El tomograma ha sido filtrado por “bilateral filtering”. (A-C) Secciones de 2 nm del tomograma a partir de las vistas XYZ a partir de una sección de 250 nm de EPON. Los asteriscos corresponden al mismo punto a través de las diferentes vistas. (A) La vista XY muestra dos “Stacks” contiguos muy cercanos a la PM. (B) La vista YZ muestra las subunidades alargadas apiladas del “Stack” situado a la derecha en (A). (C) La vista XZ muestra dos subunidades en forma de estructuras ovaladas, pertenecientes a “Stacks” diferentes. (D) Esquema de la distribución de las vistas en el tomograma mostrando los dos “Stacks” segmentados. (E-F) Dos vistas diferentes de la segmentación del tomograma donde se aprecia claramente la morfología 3D de cada uno de los “Stacks”, formados por subunidades en forma de discos ovalados, planos y apilados. En rojo, la membrana externa; en color crema, la PM; en azul, los ribosomas; en lila, los discos ovalados.

A partir de la información obtenida mediante los tomogramas reconstruidos hasta entonces, se realizó un modelo que muestra una célula tipo de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> que presenta la nueva estructura citoplásmica (Fig. 18). La célula contiene varios “Stacks” en su interior localizados en la periferia de la bacteria, muy cerca de la PM. En un recuadro aparece un “Stack” formado por cuatro subunidades en forma de disco ovalado plano (“disc”), una de las cuales (la que aparece en un recuadro) muestra la vista lateral y la vista de debajo. De esta forma, dependiendo del punto de vista, una estructura tridimensional en forma de disco ovalado plano puede visualizarse en 2D como una estructura ovalada (“oval”) o como una estructura en forma de bastón (“stick”).

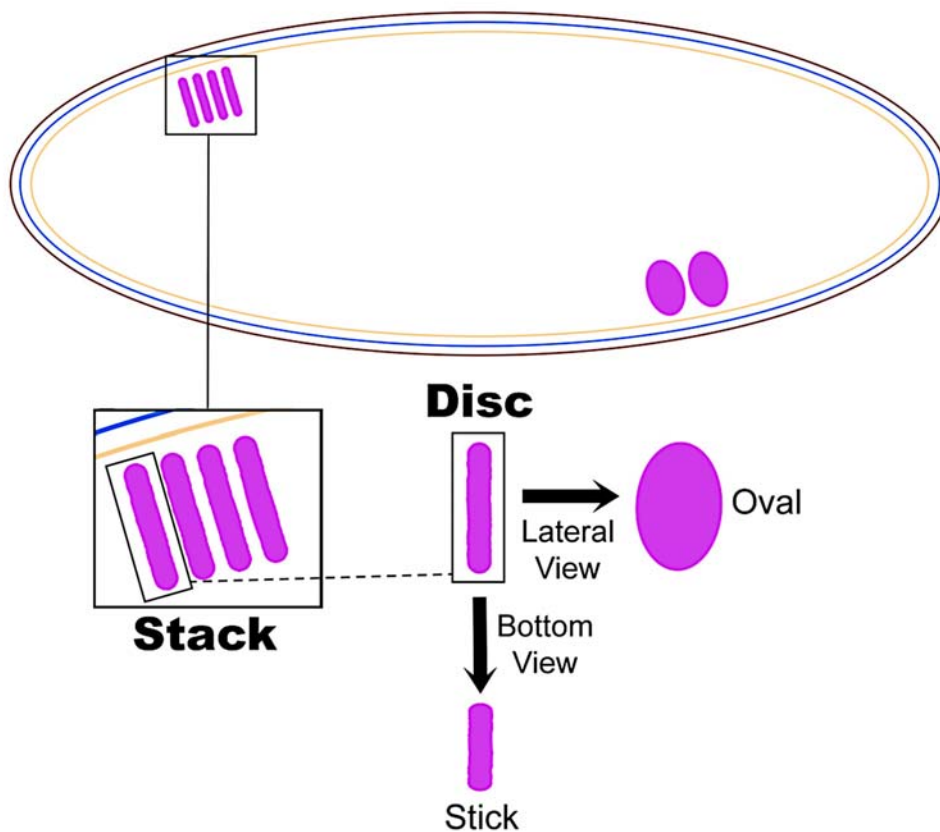


Figura 18. Modelo general de una célula de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> que contiene “Stacks” en el citoplasma. Los “Stacks” se visualizan en la periferia de la bacteria, muy cercanos a la PM. El “Stack” localizado en el área con un recuadro está integrado por una pila de cuatro subunidades. De una de las subunidades del “Stack”, la que se encuentra también en un recuadro, se muestran las vistas laterales y desde debajo. Tridimensionalmente, cada subunidad presenta la forma de un disco plano ovalado, de manera que en las vistas 2D, el “Stack” puede ser observado como una estructura ovalada (“oval”) o como una pila de bastones (“stick”). En lila se observan los “Stacks”; en rojo, la membrana externa; en azul, el peptidoglicano; en color crema, la PM.

El siguiente experimento de RT-ET, se enfocó al estudio de la membrana que rodeaba las subunidades en forma de discos de los “Stacks”. Se procedió a realizar la adquisición de series de imágenes a doble eje y a 200kV a partir de secciones de 250 nm de muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA a 0°C durante 12 días y procesadas por HPF-FS e inclusión en HM23 que, como se ha comentado previamente, es la resina que permite mayor transparencia y, por lo tanto, de la que se espera mejor visibilidad de las membranas (Fontana et al., 2010). En las Figuras 19A y 19B, se muestran las vistas XY y XZ del tomograma, respectivamente (ver vídeo del tomograma en Material Suplementario, apartado 4.4). Las vistas XY y XZ del tomograma muestran un “Stack” casi perpendicular a la PM cuyas subunidades en forma de discos aplanados presentan una envuelta a su alrededor que por su aspecto podría corresponder a una membrana, coincidiendo con los resultados obtenidos por a través del estudio del marcaje por FM4-64 de la muestra por Microscopía de Fluorescencia.

Con anterioridad, ya se habían descrito estudios de RT-ET aplicados al análisis de la organización de sistemas de membranas intracelulares bacterianas. Un ejemplo reciente es el estudio por RT-ET a doble eje de la bacteria planctomycete *Gemmata obscuriglobus*, que presenta un sistema de endomembrana complejo. De esta forma, se pudo determinar que los espacios creados por invaginaciones de la PM no se encontraban en ningún caso cerrados, sino que presentaban interconexiones (Santarella-Mellwig et al., 2013). En nuestro caso, la aplicación de esta técnica nos ha permitido hacer una aproximación inicial a la estructura tridimensional de los “Stacks”, confirmando su composición por subunidades en forma de discos planos apilados entre sí, localizados muy cerca de la PM. Además, la posibilidad de usar resinas más transparentes que el EPON ha permitido dilucidar una envuelta que recuerda a una membrana lipídica alrededor de las subunidades. Sin embargo, el hecho de que no se haya observado continuidad entre la PM y la envuelta que rodea las diferentes subunidades en los tomogramas no permite confirmar la composición de bicapa lipídica de esta supuesta membrana a través de este estudio, aunque el marcaje fluorescente por FM4-64 indicó que pudiera ser así.

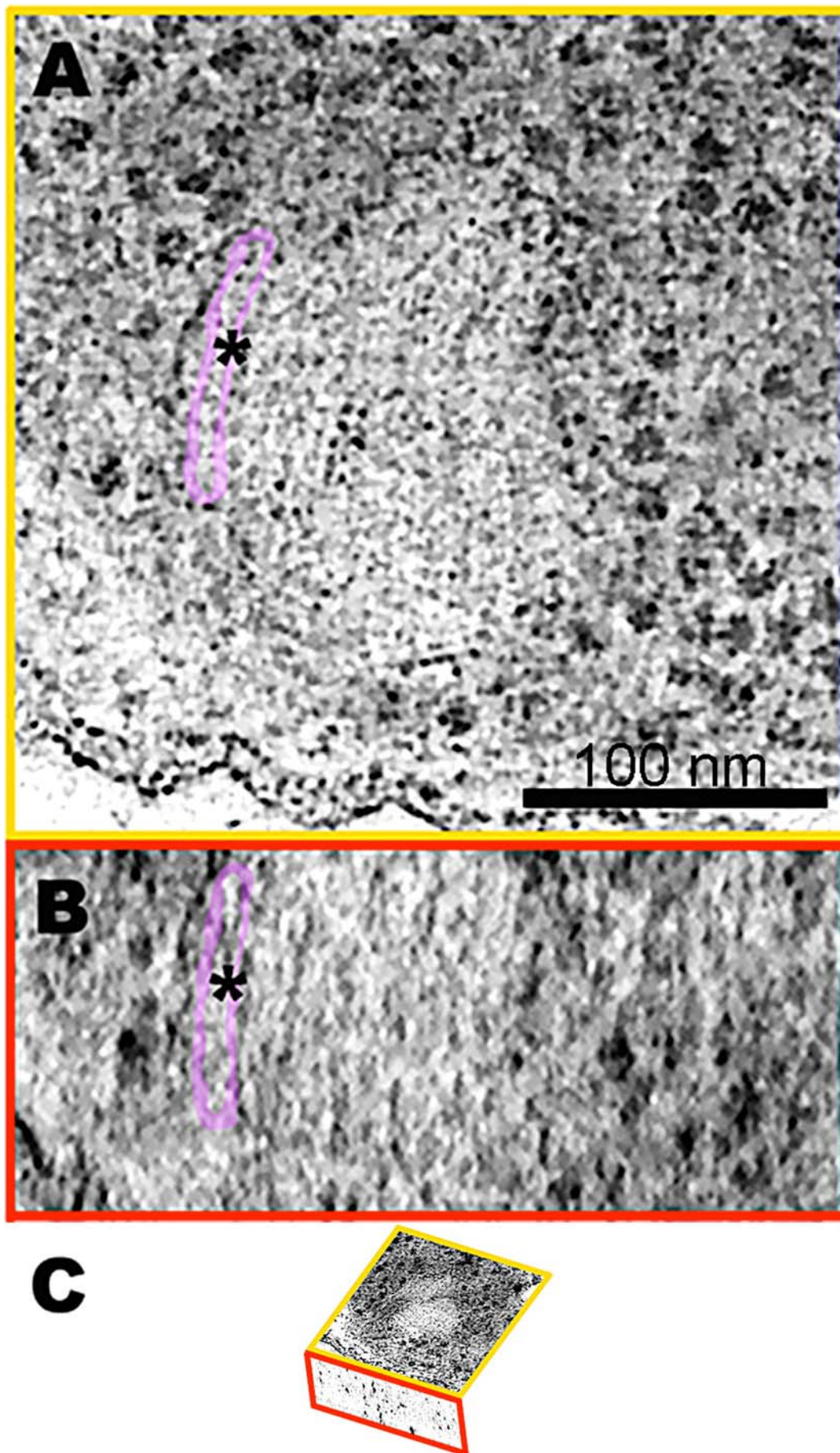


Figura 19. Análisis de un “Stack” de una bacteria *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> por RT-ET a doble eje a 200kV. La adquisición de la serie tomográfica se hizo con un tamaño de píxel de 0,42 nm. El tomograma ha sido filtrado con Tomobflow. (A-B) Secciones de 1,5 nm de las vistas XYZ del tomograma reconstruido a partir de secciones de HM23 de 250 nm de muestra procesada por HPF-FS. Los asteriscos corresponden al mismo punto a través de todas las vistas. Las vistas XY (A) y XZ (B) muestran los discos planos cortados transversalmente y distribuidos perpendicularmente a la PM en una fracción periférica de una célula. Se puede apreciar una envuelta que recuerda a una membrana alrededor de cada disco plano, una de ellas ha sido resaltada de color lila. (C) Esquema de la distribución de las vistas en el tomograma.

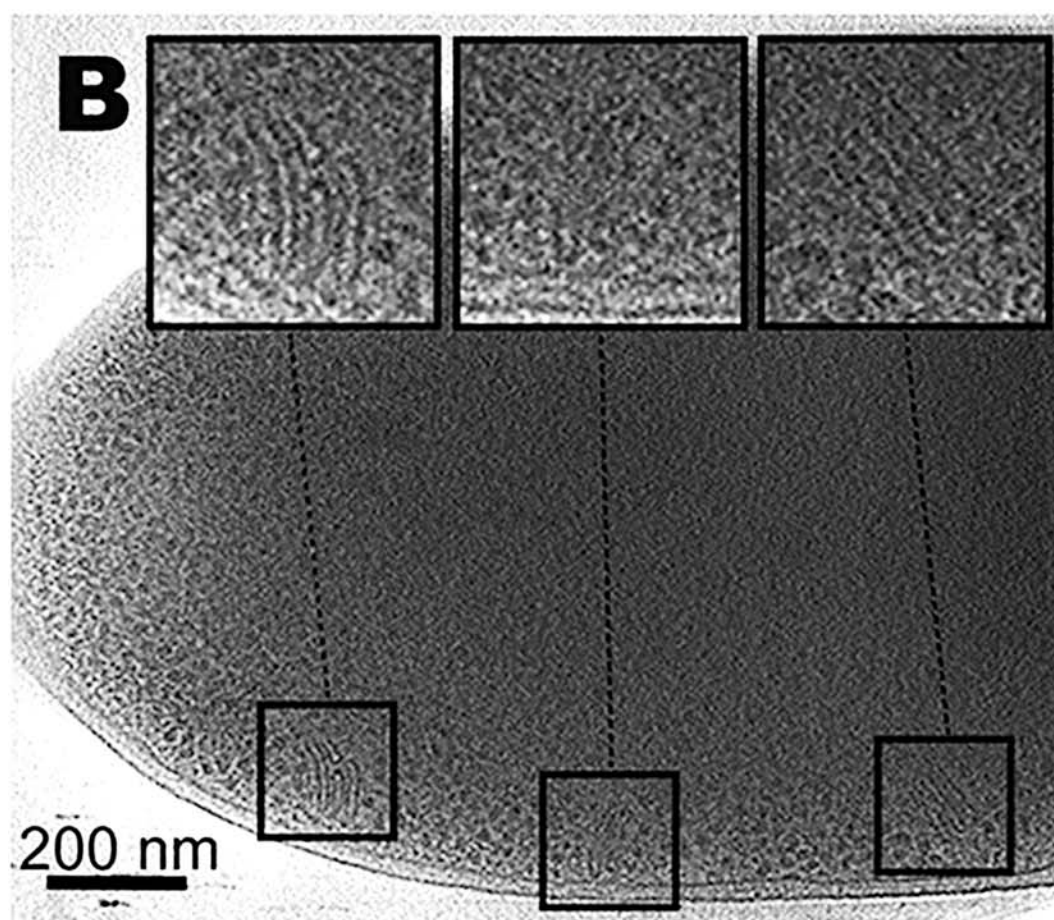
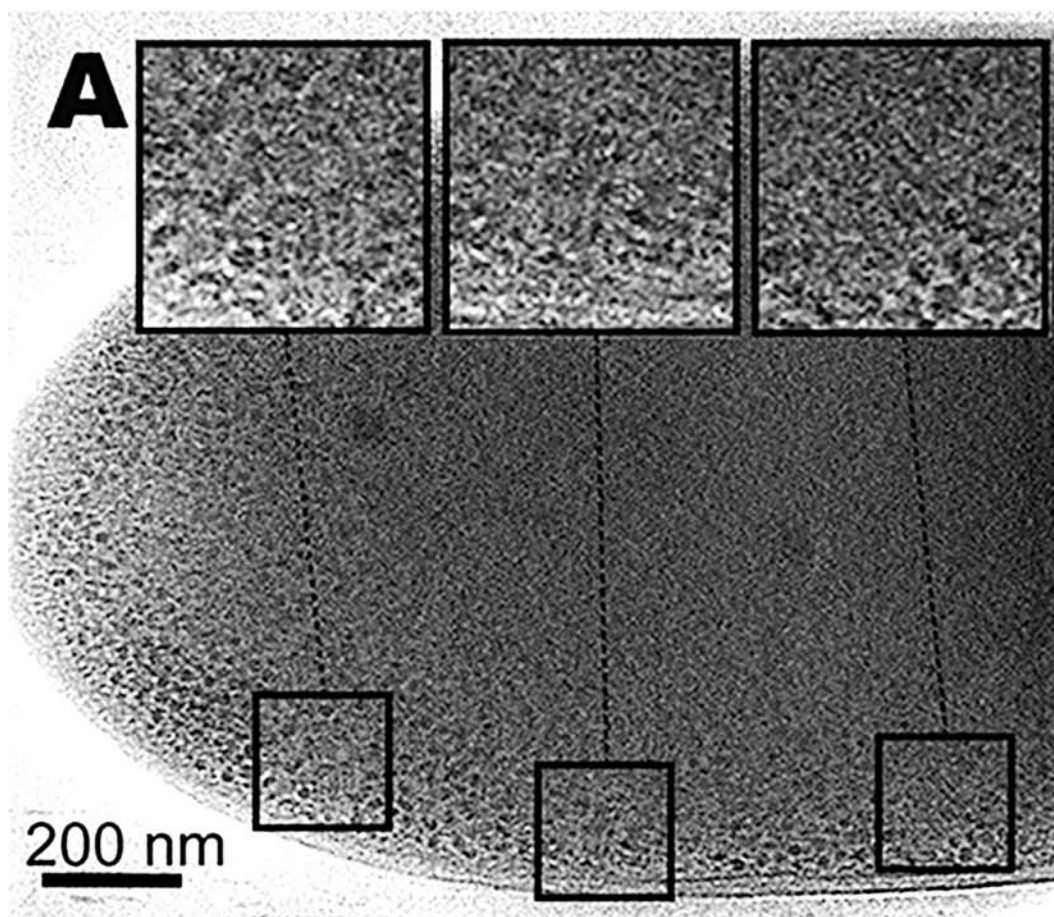
## 4.2. Criotomografía Electrónica

El primer experimento de CET se dirigió al estudio 3D de la organización de los “Stacks” en su totalidad, en el interior de la bacteria completa y en unas condiciones lo más cercanas posibles a como se encontrarían en la naturaleza. Los tomogramas obtenidos con esta técnica podrían aportar nuevas mediciones de la estructura completa y sus subunidades, para contrastar con las conseguidas hasta entonces con las otras técnicas de TEM empleadas, que en su mayoría implicaban la obtención de secciones de las células bacterianas. Asimismo, podrían proporcionar nueva información sobre los discos planos que componen los “Stacks”, como la presencia de una membrana rodeándolos, y podrían ayudar a determinar la existencia de conexiones entre las membranas que rodean estos discos y la PM.

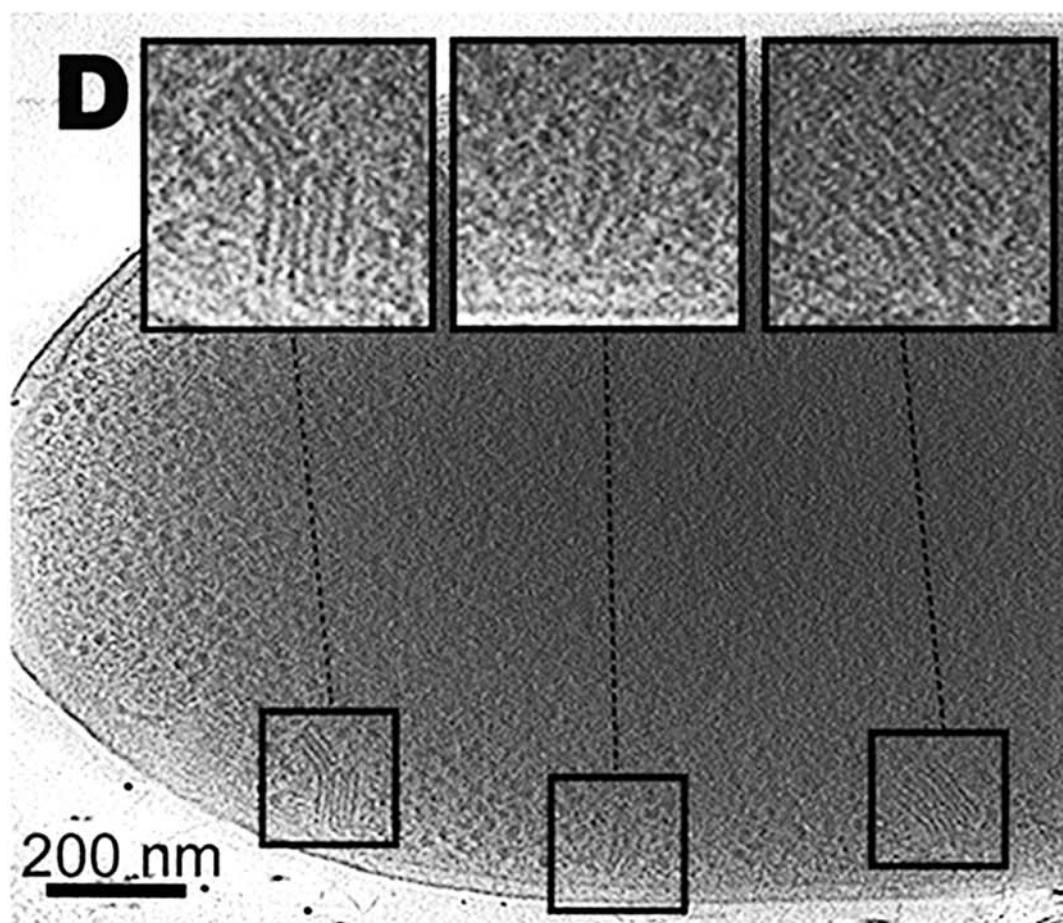
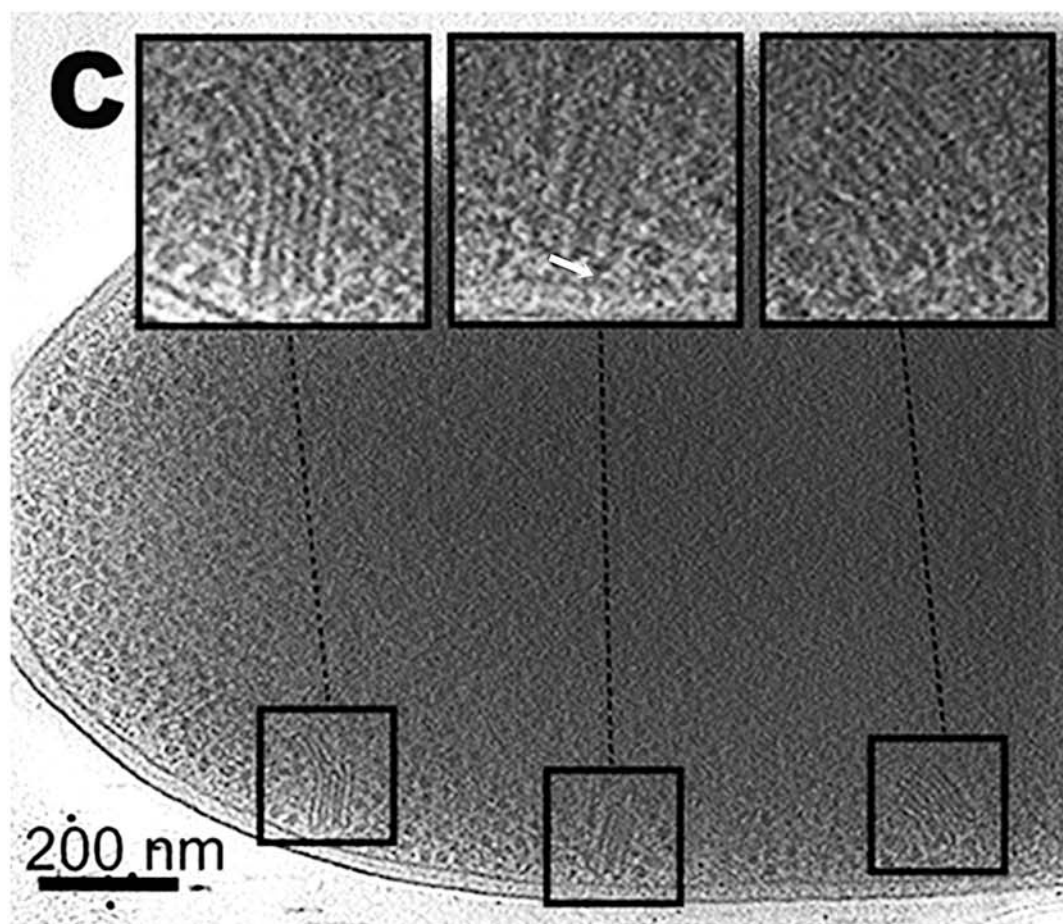
Con esta finalidad, muestras de células enteras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> se crioinmovilizaron por PF y se observaron en el cryo-TEM. La observación directa de las mismas permitió vislumbrar inclusiones tipo “Stacks” en zonas periféricas de la bacteria, reafirmando el hecho de que no son artefactos derivados de los métodos de preparación previos. Sin embargo, la probabilidad de observar la nueva estructura en el interior de bacterias completas en estas condiciones experimentales era muy baja debido al grosor de la bacteria (500 nm). De hecho, únicamente se consiguieron detectar “Stacks” cuando estos se localizaban en zonas lo suficientemente finas para permitir el paso del haz de electrones a través de ellas, factor que limitó las zonas de observación a la periferia de las bacterias. Se adquirieron series de imágenes en las zonas periféricas en las que parecía intuirse algún “Stack” y, después de la

reconstrucción de los tomogramas, la visualización de los mismos se hizo más nítida. A partir de los tomogramas se pudo analizar la relación de estas estructuras con la bacteria en su totalidad y se efectuaron nuevas medidas de las subunidades que forman los “Stacks”, obteniéndose los valores medios  $90,7 \pm 25$  nm y  $13,3 \pm 1,7$  nm, para el largo y el grosor, respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de la medición de las subunidades a partir de “Stacks” completos en el interior de bacterias se asemejaron a los obtenidos mediante las otras técnicas de Microscopía Electrónica utilizadas hasta entonces (Tabla 3). De esta forma, se pudieron validar las medidas obtenidas anteriormente a partir de secciones ultrafinas y de réplicas de FF, y se concluyó que, efectivamente, el largo de los discos es variable mientras que el grosor se mantiene prácticamente invariable.

Teniendo en cuenta que la CET de bacterias completas preparadas por PF permite la observación de los “Stacks” en su totalidad dentro del contexto celular, se quiso estudiar la orientación de los mismos respecto a la PM. Con este objetivo, se realizaron cuantificaciones del ángulo que presentaban los discos respecto a la PM en los criotomogramas, obteniéndose un rango de inclinación respecto a la misma entre 35 y 90°. Los “Stacks” se observaron tanto aislados en el citoplasma celular como agrupados de forma contigua difiriendo en sus respectivas orientaciones (Fig. 20 y Fig. 21; ver vídeos de los tomogramas en Material Suplementario, apartados 4.5 y 4.7), resultado que concuerda con los obtenidos a partir del estudio de secciones. En algunas ocasiones, se pudo observar como los grupos de “Stacks” adyacentes entre sí y situados en una misma localización intracitoplásmica, se iniciaban con un primer “Stack” muy cercano a la PM, sucediéndole a continuación todo el resto de “Stacks” dispuestos en una orientación diferente unos respecto a otros. De esta forma, todo el grupo se adentraba hacia la zona más interna de la bacteria, llegando a alcanzar la zona de mayor grosor de la bacteria, en la que los electrones apenas penetraban y, por lo tanto, no se pudo realizar un análisis en detalle de la estructura en esta zona.







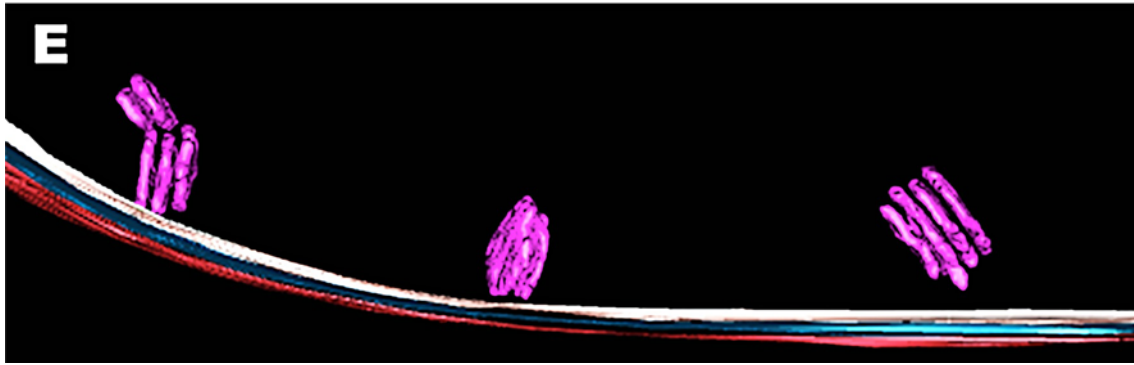
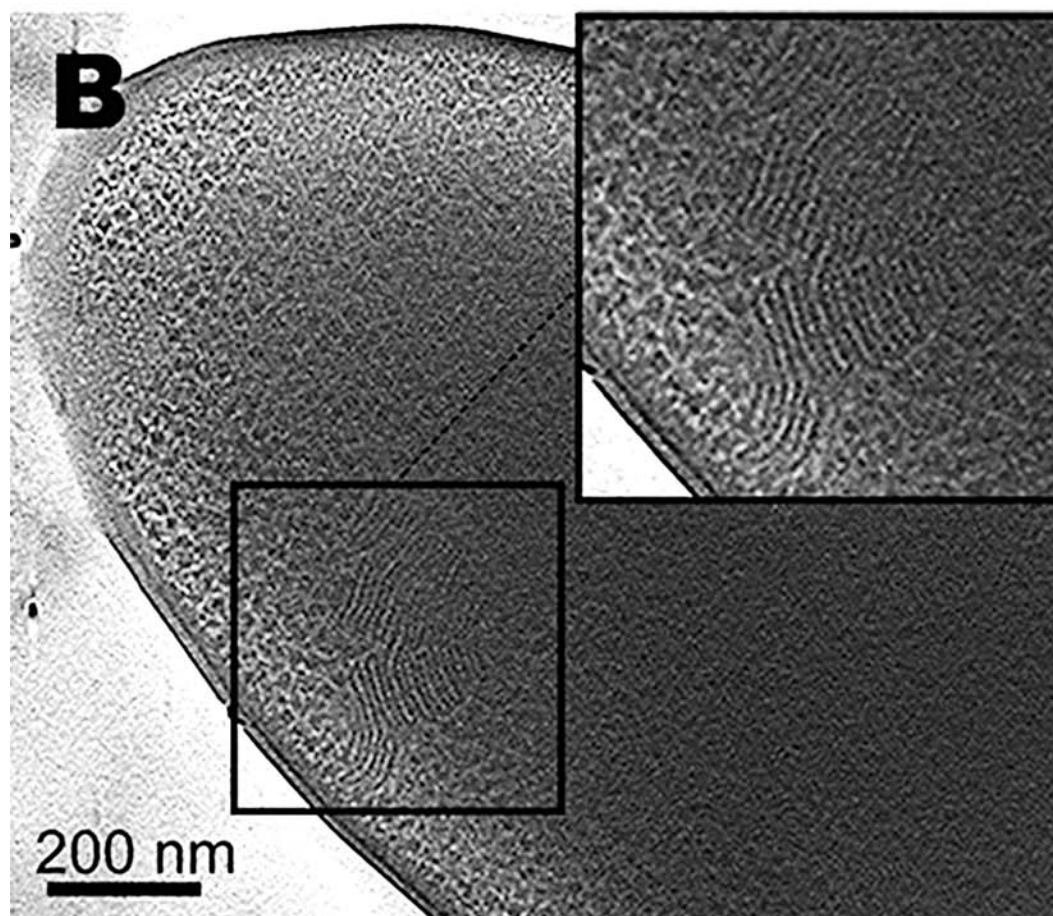
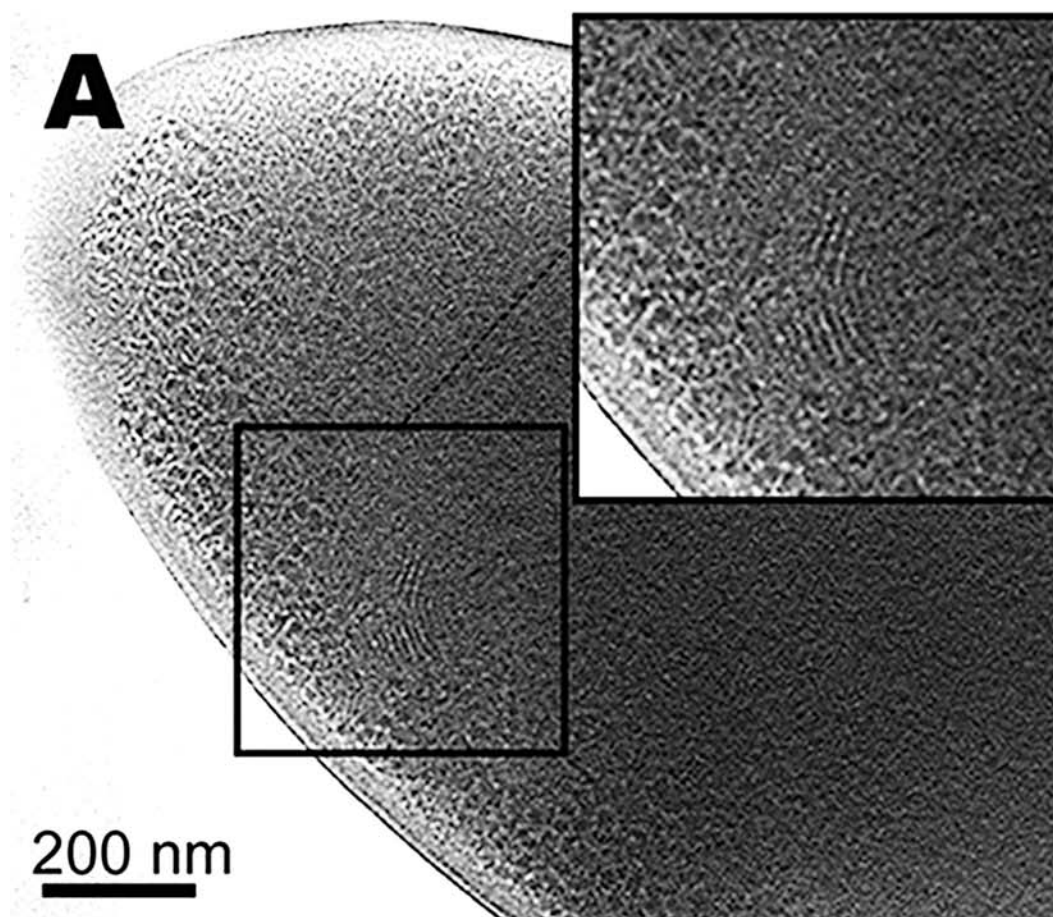
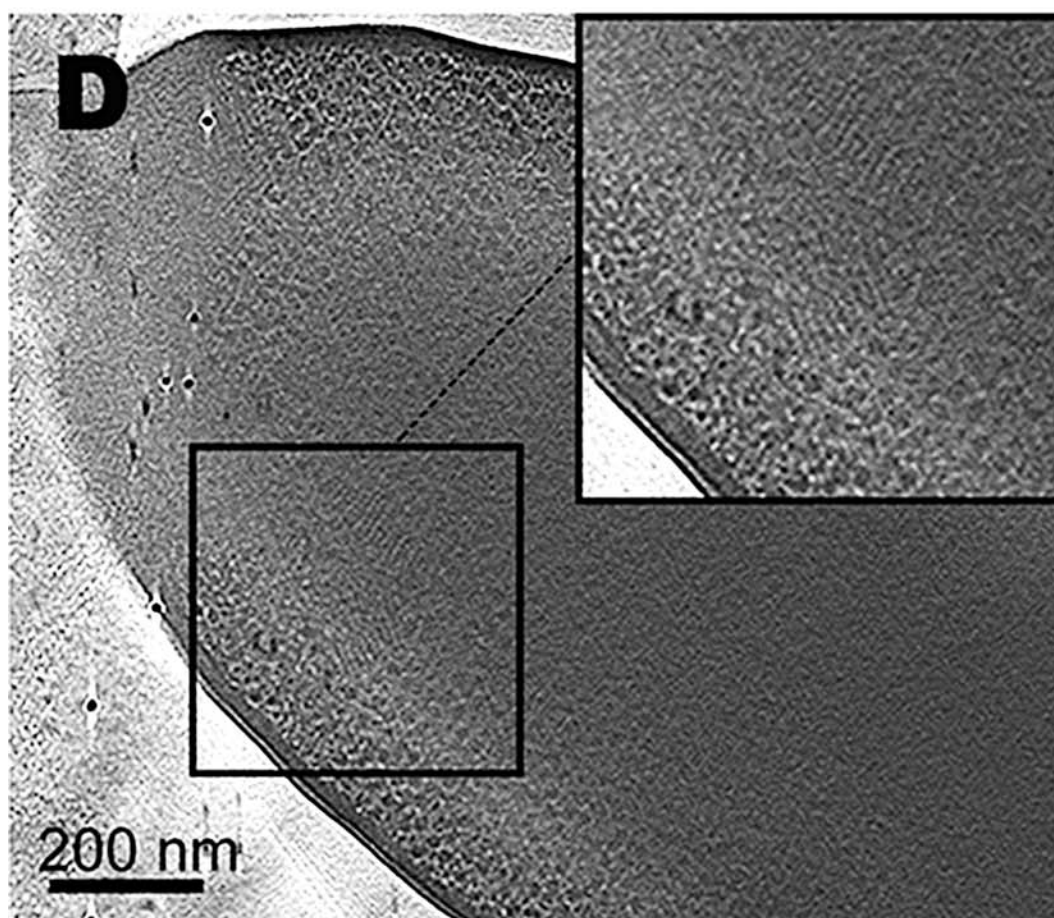
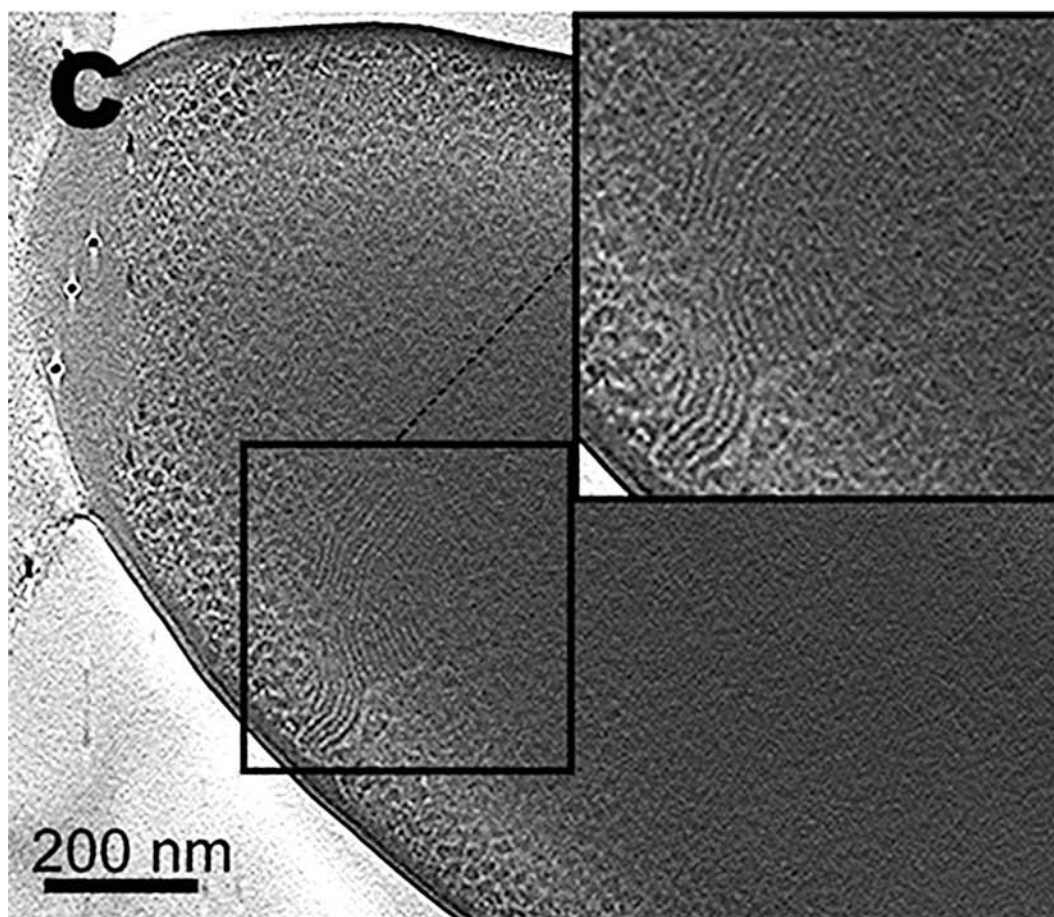


Figura 20. “Stacks” presentes en una célula *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> completa crioinmovilizada por PF y analizada por de CET a 200kV. Las series tomográficas se adquirieron con un tamaño de píxel de 0,85 nm. El tomograma ha sido filtrado con TomoEED. (A-D) Secciones de 2 nm del tomograma reconstruido. (C) La flecha blanca señala un posible punto de contacto entre la PM y una subunidad de un “Stack”. (E) Segmentación parcial del tomograma observado en (A-D). Lila: los “Stacks”; rojo: membrana externa; azul: peptidoglicano; color crema: PM. (A-E) Se observan cuatro “Stacks” distribuidos a lo largo de tres zonas periféricas del citoplasma y presentando cierta angulación respecto a la PM. Los dos “Stacks” de la izquierda comparten localización siendo contiguos, pero difieren en sus orientaciones respectivas. Los otros dos se observan aislados y cercanos a la PM.

De este modo, se pudo apreciar que los grupos de “Stacks” podían estar formados por más de cuatro “Stacks”, complementando la información obtenida a partir de las cuantificaciones en secciones de resina. Sin embargo, el campo de visión parcial en las bacterias completas procesadas por PF cuando son observadas en el Cryo-TEM no permitió determinar el número máximo de “Stacks” contiguos entre sí que podían formar estos grupos (Fig. 21A-D). Las Figuras 20E y 21E ilustran la segmentación de los “Stacks” observados en las secciones del tomograma de las Figuras 20A-D y 21A-D, respectivamente. Las segmentaciones confirman que los “Stacks” están organizados por subunidades en forma de discos ovalados y planos que se encuentran apiladas entre sí (ver vídeos de las segmentaciones en Material Suplementario, apartado 4.6 y 4.8).





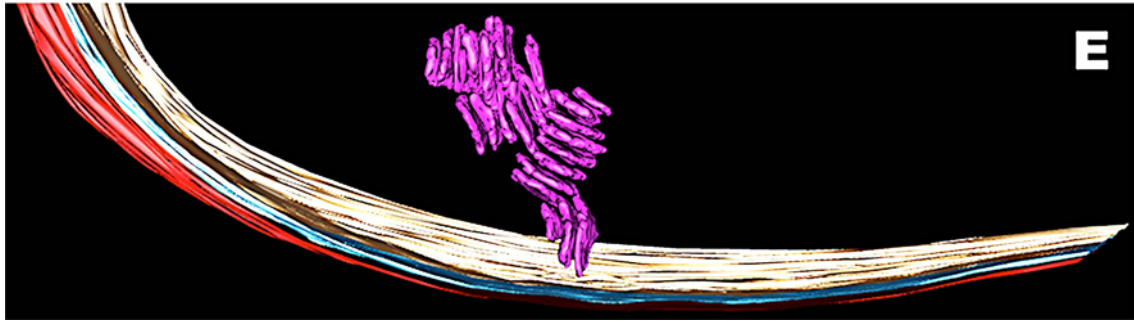


Figura 21. “Stacks” presentes en una célula *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> completa crioinmovilizada por PF y analizada por CET a 200kV. Las series tomográficas se adquirieron con un tamaño de píxel de 0,85 nm. El tomograma ha sido filtrado con TomoEED. (A-D) Secciones de 2 nm del tomograma. (E) Segmentación parcial del tomograma observado en (A-D). Lila: los “Stacks”; rojo: membrana externa; azul: peptidoglicano; color crema: PM. (A-E). Se observan “Stacks” contiguos en la misma localización periférica del citoplasma bacteriano difiriendo en sus orientaciones respectivas.

El análisis de tomogramas también destacó que cada disco plano que forma un “Stack” estaba claramente delimitado por una envuelta densa a los electrones de aspecto similar a una membrana lipídica como la PM. Con el fin de estudiar la semejanza entre la membrana que rodeaba las subunidades de los “Stacks” y la PM, se llevaron a cabo medidas del grosor de ambas obteniéndose los valores medios  $4,2 \pm 0,8$  nm and  $6 \pm 1,1$  nm, respectivamente. El valor medio de la PM obtenido se asemejó a los publicados previamente en otras bacterias (Hoffmann et al., 2008) y que se encuentra alrededor de 7 nm, indicando que la preservación de las membranas conseguida por la CF era adecuada. Cabe destacar el hecho de que los valores medios obtenidos de los dos tipos de membranas fueron mayores que los obtenidos a partir de secciones vítreas, descritos en el apartado anterior. Esta diferencia podría explicarse considerando que, aunque CEMOVIS proporciona una mejor resolución que las imágenes de Cryo-EM de bacterias completas, los artefactos inherentes a las secciones vítreas, principalmente compresión y “crevasses”, deforman diferencialmente la muestra dependiendo de su orientación con respecto a la dirección de corte (Al-Amoudi et al., 2005). Por lo tanto, se considera que los valores obtenidos a partir de las medidas en muestras crioinmovilizadas por PF son más cercanos a la realidad porque esta técnica permite la visualización de la ultraestructura celular en ausencia de los artefactos propios de la acción mecánica del corte. Después de analizar las diferencias entre el grosor de

ambos tipos de membrana obtenidas a partir de bacterias completas crioinmovilizadas por PF, se determinó un  $p$ -valor  $< 0,0001$ , que indicaba diferencias significativas entre ellas, señalando, probablemente una composición diferente entre ambas. Además, el análisis de los “Stacks” en su totalidad y su relación con la bacteria completa que permite esta técnica, reafirmó que no existía continuidad entre la envuelta que rodeaba los discos de los “Stacks” y la PM en ninguno de los casos analizados. Así pues, los resultados indicaban que los “Stacks” no eran invaginaciones de la PM, sino que se trataba de estructuras independientes, a diferencia de los sistemas de membrana descritos en la bibliografía presentes tanto en bacterias fotosintéticas como en bacterias nitrificantes (Niederman, 2006). Este tipo de sistemas de membrana también se ha analizado por CET en la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, observándose claramente una continuidad con la PM, además de una distribución de las lamelas paralela a la PM, a diferencia de la presentada por los “Stacks” (Konorty et al., 2008).

A pesar de que no se ha observado continuidad entre la membrana que rodea las subunidades de los “Stacks” y la PM, muy ocasionalmente parece detectarse algún contacto puntual entre ambas estructuras (Fig. 20C, flecha blanca segundo panel), que podría corresponder a algún tipo de anclaje molecular implicado en el posicionamiento de los “Stacks” en las zonas periféricas del citoplasma. Por otro lado, a partir de los tomogramas obtenidos no se pudo determinar si estos supuestos contactos físicos son reales o corresponden al ruido de fondo del tomograma, de manera que sería necesario realizar nuevos experimentos para comprobar su existencia.

El principal problema de los criotomogramas es que estos se caracterizan por una relación señal-ruido pobre, lo que dificulta la interpretación de los mismos. Esto se debe a varios factores: la baja dosis electrónica y el bajo contraste de las condiciones de adquisición de imágenes, el limitado rango de proyecciones para la obtención de las series de imágenes y el gran tamaño de la bacteria embebida en el hielo. De esta forma, se hace necesario el uso de técnicas de filtrado antes de la interpretación de los tomogramas (He and Fernández, 2010; Diebolder et al., 2012). Aún así, en nuestro caso el tamaño de píxel es

demasiado grande para analizar al detalle estos posibles conectores moleculares entre la PM y la membrana que rodea las subunidades de los “Stacks” y así poder diferenciarlos del ruido de fondo de los tomogramas. Este efecto se podría minimizar obteniendo nuevos tomogramas de “Stacks” en bacteria completa en las mismas condiciones técnicas pero a mayor aumento, lo que disminuiría el tamaño de píxel. Por otro lado, cabe mencionar que, como se ha comentado anteriormente, existen mejoras tecnológicas que poco a poco se están implementando en los cryo-TEM y que consiguen acercar la resolución de los tomogramas al límite de resolución del microscopio y que consisten en la instalación de una cámara DDD y/o de una placa de fase (“phase plate”) (Dai et al., 2014; Ramachandra et al., 2014).

La observación de los “Stacks” en las secciones de criotomogramas de bacteria completa podría recordar a la estructura del sistema de secreción IV bacteriano (T6SS). Este sistema está formado por tubos intracelulares altamente dinámicos, que se ensamblan y desensamblan en cuestión de segundos y en diferentes localizaciones celulares (Basler et al., 2012; Chang et al., 2014). Tanto los “Stacks” como el T6SS suelen localizarse en el citoplasma bacteriano, presentando cierta perpendicularidad respecto a la PM. A pesar de ello, el T6SS se puede diferenciar fácilmente de los “Stacks” porque suele presentar mayor longitud y menor grosor que las subunidades de los “Stacks”. Además, este sistema de secreción presenta una sección tubular y una clara conexión con la PM mediante una estructura basal, mientras que los “Stacks” observados en los tomogramas siempre se han observado como una pila de discos ovalados planos que presentan una membrana rodeando sus subunidades. Todos estos motivos demuestran claramente que no se trata de la misma estructura bacteriana.

En un intento de obtener más información sobre la envuelta que rodea las subunidades de los “Stacks”, se decidió llevar a cabo experimentos de CETOVIS, ya que esta técnica permite una mejora significativa de la resolución respecto al estudio de bacterias completas. Los tomogramas obtenidos presentaron las subunidades de los “Stacks” bien delimitadas por una membrana que mostraba el patrón de una bicapa lipídica, como confirmaron

los perfiles de densidad de la misma (Fig. 22A y C; ver vídeos de los tomogramas en Material Suplementario, apartados 4.9 y 4.11).

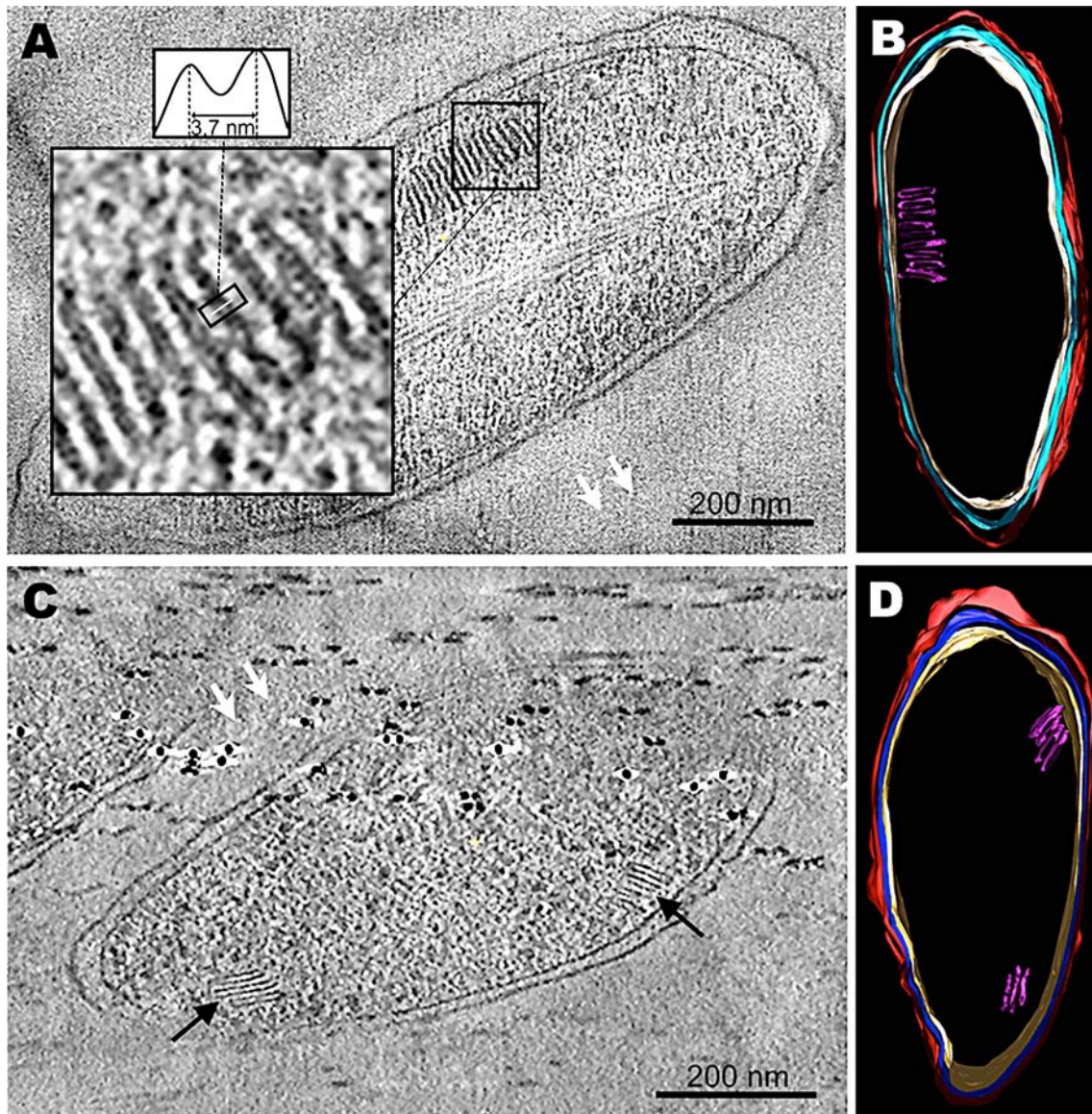


Figura 22. Análisis de los “Stacks” presentes en tomogramas obtenidos a partir de VIS de 50 nm de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> a 200kV (CETOVIS). Las series tomográficas se adquirieron con un tamaño de píxel de 0,71 nm. Los tomogramas fueron filtrados con TomoEED. (A y C) Secciones de 1 nm de dos tomogramas reconstruidos. (A) El área magnificada muestra un “Stack” cuyos discos aparecen rodeados por una membrana, que presenta un perfil con dos picos similar al de una bicapa lipídica (ver recuadro de perfil aplicado al punto indicado de una subunidad de la región ampliada de un “Stack”). (C) Se observan dos “Stacks” ocupando diferentes lugares en el citoplasma de la bacteria. Las flechas blancas indican la dirección de corte. (B y D) Segmentación de los tomogramas observados en (A) y (C), respectivamente. Lila: los “Stacks”; rojo: membrana externa; azul: peptidoglicano; color crema: PM.



Es interesante el hecho de que la PM de las bacterias observadas en los tomogramas obtenidos a partir de VIS no mostró el patrón de bicapa lipídica como sí hicieron las membranas que rodeaban las subunidades de los “Stacks”. Esto podría deberse a que los “Stacks” observados en VIS frecuentemente han sido seccionados en zonas distantes al plano central de la bacteria. De esta forma, la PM no se corta perpendicularmente, resultando en una obstrucción de la bicapa por la superposición de las regiones de los grupos fosfato (Hoffmann et al., 2008). Este hecho puso de manifiesto que la compresión inherente de las VIS afectaba significativamente las subunidades rodeadas por membranas de los “Stacks”, a diferencia de lo que se ha descrito que ocurre en otras estructuras más pequeñas, como los ribosomas (Pierson et al., 2011). Esta afectación de las membranas por la compresión durante la obtención de VIS también se hizo evidente cuando al realizar las medidas a partir de secciones vítreas se apreció un menor tamaño medio del ancho de las membranas y valores de desviación estándar mayores que los obtenidos a partir de medidas en bacteria completa crioinmovilizada por PF. Cabe destacar que las subunidades de los “Stacks” se observaron claramente delimitadas a lo largo de todo el eje Z, permitiendo una segmentación de las estructuras más precisa (Fig. 22B y D; ver vídeos de las segmentaciones en Material Suplementario, apartados 4.10 y 4.12), mejorando y corroborando las segmentaciones obtenidas hasta entonces. Sin embargo, una de las desventajas de los tomogramas de VIS respecto a los tomogramas de bacteria completa es que proporcionan baja información espacial debido a la restricción de grosor que existe para obtener VIS de buena calidad, y que está estimada en unos 50 nm (Dubochet et al., 2007). Asimismo, al tratarse de una estructura de tamaño considerable dentro del citoplasma bacteriano, el estudio de las secciones de 50 nm de la bacteria no aportó nueva información sobre la distribución espacial de los “Stacks” en el citoplasma y su relación con la PM.

Otro hecho remarcable fue que las subunidades apiladas de los “Stacks” mantenían entre ellas una distancia aparentemente constante. Se realizaron medidas de esta distancia entre subunidades a partir de tomogramas de células completas obteniéndose el valor medio  $5,2 \pm 1,3$  nm, lo que podría indicar la existencia de algún conector molecular entre ellas que las mantuviera

a esa distancia. Sin embargo, los análisis de las vistas XYZ de los tomogramas tanto de la bacteria completa como de VIS, no revelaron ningún tipo de característica estructural repetitiva de forma clara y consistente. Ello habría permitido aplicar la técnica de “subtomogram averaging” para la determinación estructural de estas posibles conexiones. Posiblemente, la obtención de nuevos tomogramas en las mismas condiciones pero a mayor aumento y, por lo tanto, disminuyendo el tamaño de píxel y mejorando la resolución, podría aportar más información al respecto y, si fuera el caso de detectarse algún tipo de patrón estructural repetitivo, aplicar “subtomogram averaging” para determinar su estructura molecular (Al-Amoudi et al., 2011; Saibil et al., 2012; Daum et al., 2013; Zanetti et al., 2013; Voortman et al., 2014).

Otra técnica que en futuros estudios podría aportar información estructural complementaria sobre los “Stacks” es el cryo-FIB-SEM. Esta técnica permite la obtención de secciones de entre 100 y 300 nm, de manera que puede proporcionar muestras de mayor grosor que las VIS a una buena resolución y sin la presencia de los artefactos mecánicos de corte (Marko et al., 2006; Rigort et al., 2010; Villa et al., 2013).

En el presente apartado se ha presentado un estudio ultraestructural por CET basado la combinación de los dos métodos de preparación de muestras en condiciones criogénicas más extendidos: el PF y las VIS. De esta forma, se consigue realizar un análisis a dos niveles distintos de resolución lo que proporciona información complementaria para la descripción de la nueva estructura bacteriana. La revisión bibliográfica nos ha permitido comprobar que esta combinación de métodos de CET se ha utilizado con anterioridad para el estudio de los quimiorreceptores (Zhang et al., 2004) y para el análisis de las capas que componen la envuelta bacteriana (Hoffmann et al., 2008 Zuber et al., 2008; Kishimoto-Okada et al., 2010). Sin embargo, la potencialidad de la combinación de ambas técnicas no se ha utilizado con anterioridad en el estudio de nuevas estructuras procariotas por CET, como es el caso de los “hami” (Moissl et al., 2005), de nuevas estructuras implicadas en la motilidad bacteriana (Murphy et al., 2008), de los “nanopods” (Shetty et al., 2011) y de los sistemas de secreción bacterianos III y VI (Basler et al., 2012; Chang et al.,

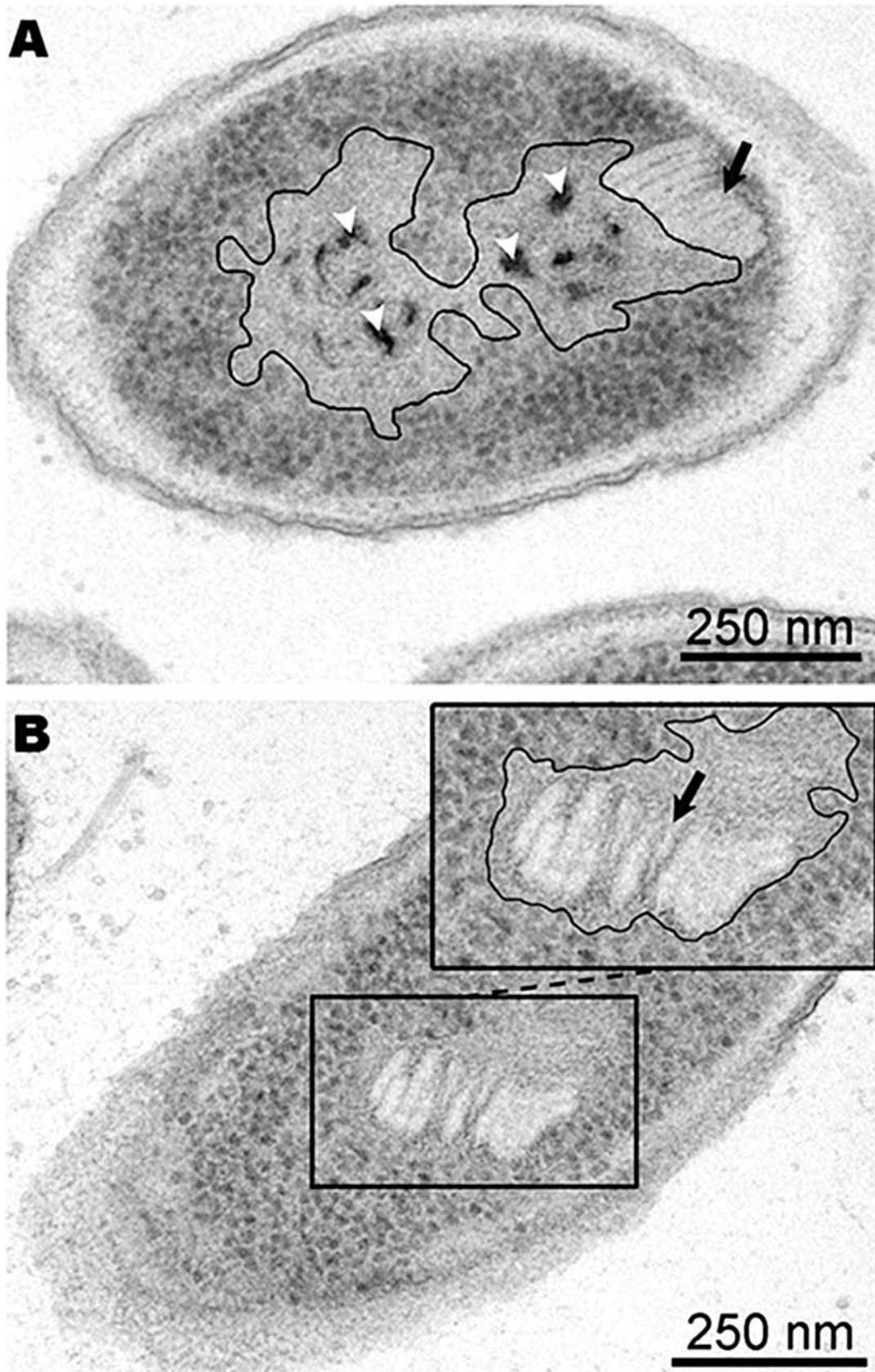
2014; Nans et al., 2014). Así pues, se puede concluir que el estudio de CET ha proporcionado una información completa, permitiendo una buena y detallada aproximación a la descripción de la estructura de los “Stacks”.

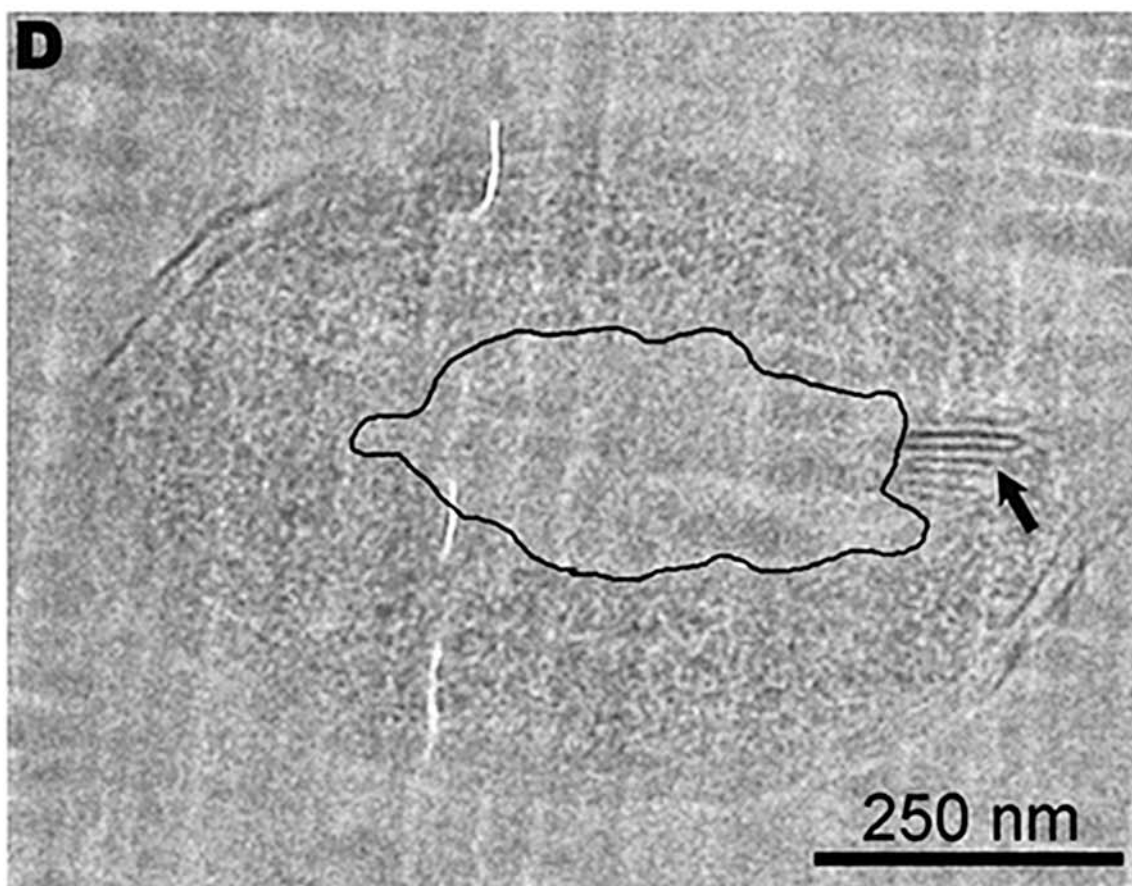
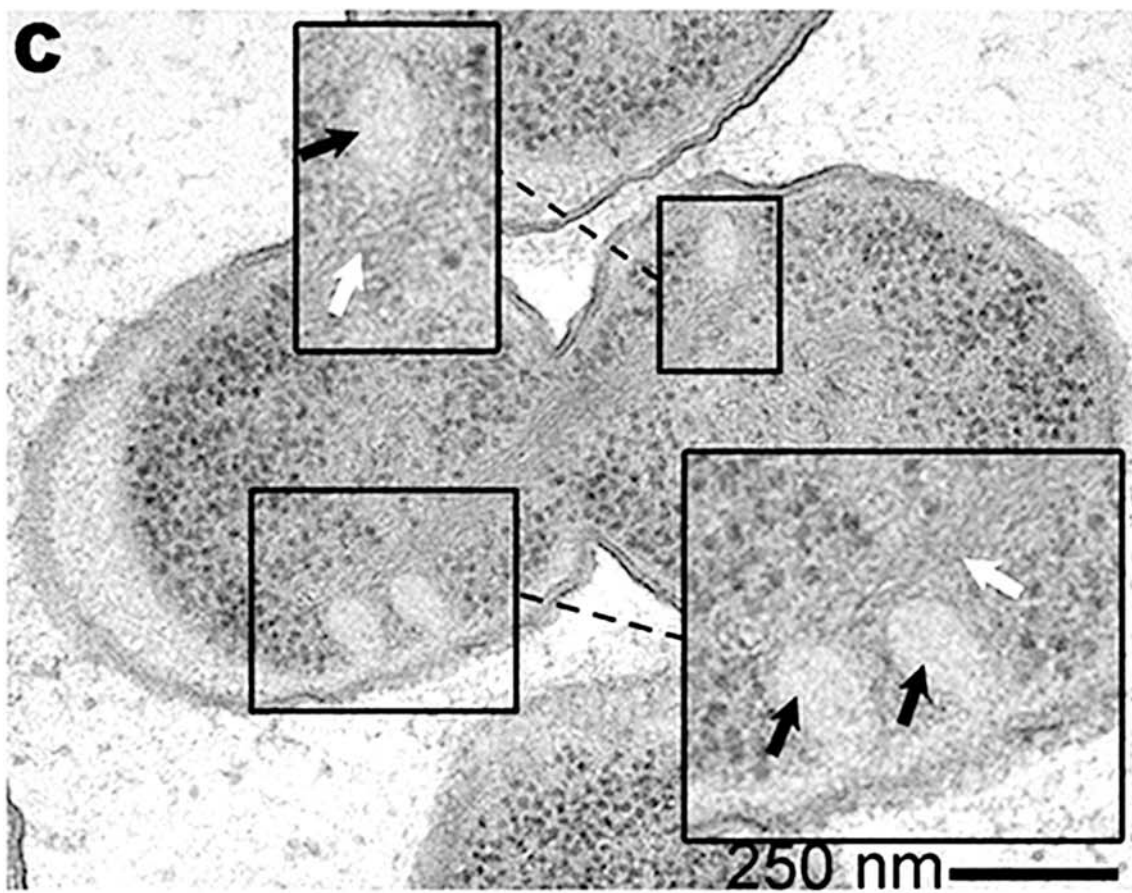
## **5. Estudio de la función de las nuevas estructuras citoplásmicas**

Una vez descritas y caracterizadas por primera vez estas nuevas estructuras bacterianas denominadas “Stacks”, surge de modo inmediato la pregunta ¿cuál es su función? En este capítulo se ha intentado abordar este aspecto, aunque nos hemos encontrado con varios hechos que han dificultado poder establecer la relación “estructura-función”. En primer lugar, estas estructuras se han detectado en una bacteria singular, por tratarse de una nueva especie, *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>, y por proceder de un ambiente extremo, como es la Antártida. Al no tratarse de un microorganismo modelo, como pudiera ser *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, las herramientas disponibles para determinar en qué procesos podrían estar implicados los “Stacks” han sido muy limitadas. En segundo lugar, como hemos repetido en apartados anteriores, estas nuevas estructuras sólo se visualizan en cantidad apreciable para su estudio, cuando la bacteria crece en medios sólidos y a 0°C, temperatura cercana a su límite inferior de crecimiento. El hecho de no poder estudiar los “Stacks” en un medio líquido y no poder obtener cultivos sincrónicos, también ha dificultado el poder relacionar su presencia con algún proceso asociado a una determinada fase del crecimiento bacteriano. De todos modos, y sin olvidar estas dificultades, pasamos a detallar y discutir los resultados de aquellos experimentos realizados con el objetivo de conocer la función de los “Stacks”.

El primer aspecto que destacó y que podría estar relacionado con la función de los “Stacks”, fue que las células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA durante 12 días a 0°C y procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON

mostraron una clara proximidad entre los “Stacks” y el nucleóide bacteriano (Fig. 23A; ver más imágenes en Material Suplementario, apartado 1.3).





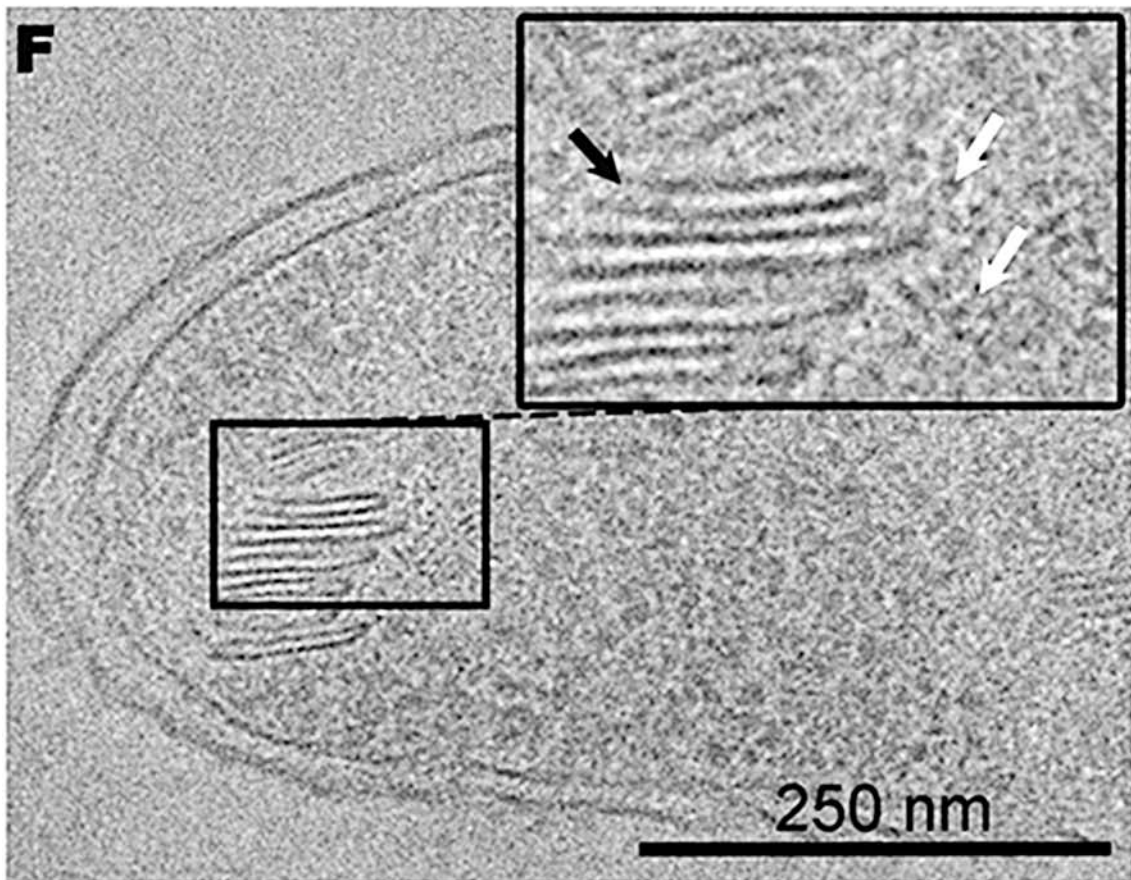
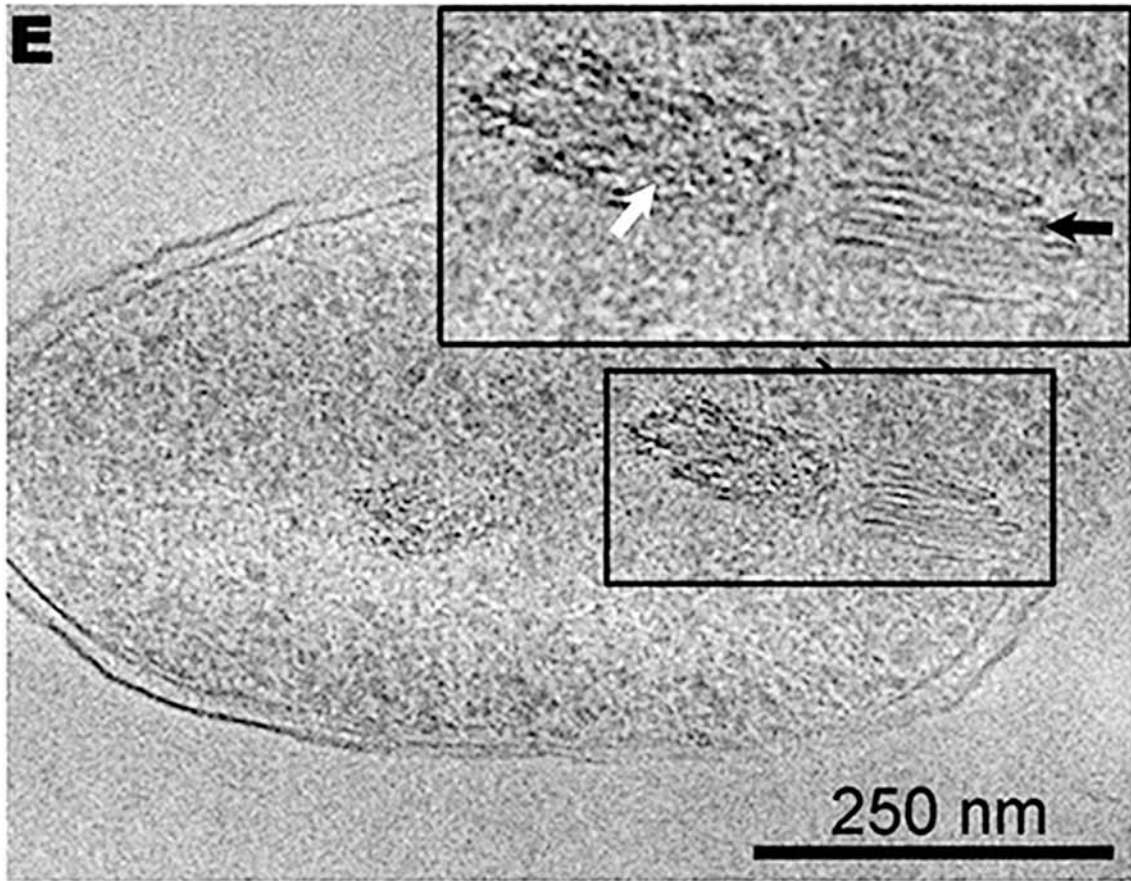


Figura 23. Análisis de la relación entre los “Stacks” y el DNA del cromosoma bacteriano en cultivos *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C durante 12 días. (A-C) Micrografías de secciones de EPON de 60 nm de muestras procesadas por HPF-FS. (A) Se observa un “Stack” (flecha negra) perpendicular a la PM y muy cerca del nucleoide bacteriano (área delimitada en negro). El nucleoide bacteriano presenta puntos oscuros correspondientes a acúmulos de polifosfato (cabezas de flecha blancas). (B) Se observa un “Stack” (flecha negra) embebido en el área del nucleoide (área delimitada en negro). (C) Se observa una célula de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en fase de septación y el DNA cromosómico se está distribuyendo entre las células hijas. En cada una de las células hijas se aprecian “Stacks” cerca de la PM y próximos al DNA (flechas blancas). (D-F) Micrografías de VIS de 50 nm (CEMOVIS). (D) Se observa un “Stack” (flecha negra) muy cercano a una zona libre de ribosomas correspondiente al área del nucleoide bacteriano (área delimitada). (E) Se observa un “Stack” (flecha negra) en los alrededores de microfibras de DNA localmente ordenadas (flecha blanca). (F) Muestra un “Stack” (flecha negra) muy próximo a microfibras de DNA (flechas blancas).

Como se observa en la Figura 23A, el “Stack” (flecha negra) está situado en la periferia del citoplasma y sus subunidades están muy próximas al área fibrilar correspondiente al nucleoide bacteriano (área marcada con contorno negro). En algunas ocasiones, los “Stacks” aparecían completamente rodeados por zonas que parecían corresponder al nucleoide bacteriano (Fig. 23B). También, ocasionalmente, se apreciaron “Stacks” en el citoplasma células que se encontraban en fase de septación y distribuyendo su nucleoide entre las células hijas. En algunas de las bacterias observadas en esta fase replicativa, se pudo observar como las microfibras de DNA se estaban distribuyendo entre ambas células a la vez que parecían contactar con “Stacks” cercanos a la PM de cada célula (Fig. 23C). Cabe también resaltar que la proximidad observada entre los “Stacks” y el DNA bacteriano, a menudo coincidía con la presencia de gránulos de polifosfato distribuidos en el área ocupada por el nucleoide. Los gránulos de polifosfato o volutina se han relacionado con numerosos procesos celulares y a pesar de que su biosíntesis, localización celular y sus funciones todavía no están definitivamente dilucidadas, sí podemos señalar que actúan como reserva de fosfato y de energía y pueden ser utilizados en el proceso de síntesis de nucleicos. (Fig. 23A) (Rao et al., 2009).

El análisis por cryo-TEM de las VIS de 50 nm reveló la misma relación entre el DNA bacteriano y los “Stacks” observada previamente en las secciones de EPON. La estructura del DNA visualizado a partir de VIS ha sido descrita en la bibliografía, observándose como zonas libres de ribosomas, como microfibras

localmente ordenadas y como microfibras menos ordenadas (Eltsov and Zuber, 2006). En el presente estudio, se pudieron observar “Stacks” en las proximidades de las zonas libres de ribosomas correspondientes al nucleóide bacteriano (Fig. 23D) y se consiguieron visualizar microfibras de DNA localmente ordenadas en las proximidades de los “Stacks” (Fig. 23E), así como también microfibras de DNA rodeando a los “Stacks” (Fig. 23F). La cercanía entre los “Stacks” y el nucleóide apuntó hacia una posible relación entre estas nuevas estructuras y los procesos de replicación y/o segregación del cromosoma bacteriano en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>.

Por otro lado, el análisis de los tomogramas procedentes de muestras procesadas por HPF-FS e inclusión en EPON, mostró que en los casos en que se observaban “Stacks” envueltos por microfibras de DNA, esta relación se mantenía a lo largo de todo el eje Z del tomograma, corroborando así la información obtenida mediante las observaciones previas en micrografías de secciones de EPON y de VIS (Fig. 24).

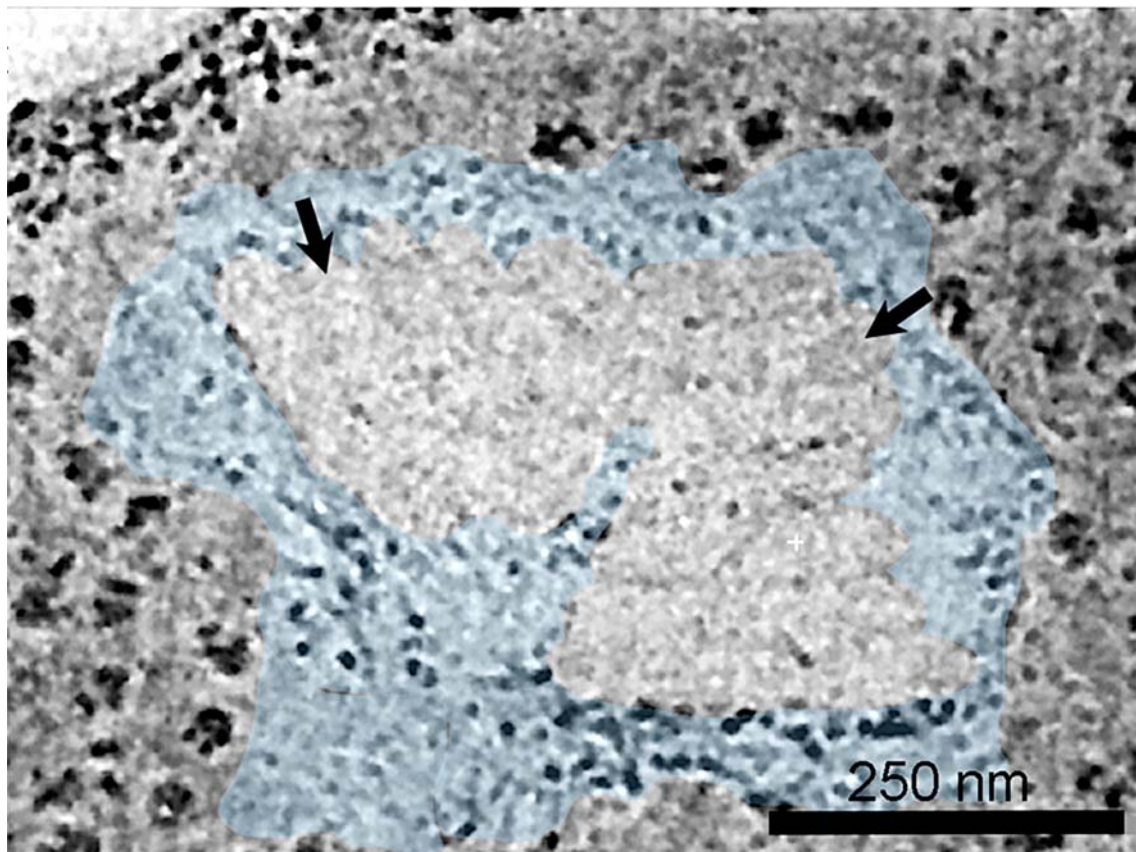




Figura 24. Análisis de la proximidad entre los “Stacks” y el DNA bacteriano en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> por tomografía (RT-ET). Se observan dos “Stacks” muy cercanos a la membrana y contiguos en una sección de 2 nm de un tomograma reconstruido a partir de una sección de 250 nm de EPON. Ambos “Stacks” se encuentran embebidos en la región del nucleóide (área coloreada de azul).

Como se ha comentado anteriormente, no se han encontrado unas condiciones de visualización de “Stacks” óptima en cultivos líquidos, por lo que no se han podido obtener cultivos sincrónicos que podrían haber establecido una relación clara entre la presencia de “Stacks” y una fase del ciclo celular. De todos modos, viendo la reiterada proximidad entre estas nuevas estructuras y el cromosoma bacteriano, se llevó a cabo una aproximación para estudiar esta posible relación. Para ello, se tomaron micrografías de secciones de EPON de células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas en TSA a 0°C a diferentes tiempos de incubación (6, 12 y 20 días). A partir de las micrografías de secciones de 60 nm de EPON de la muestra procesada por HPF-FS, se realizaron cuantificaciones del número de células bacterianas en fase de septación y del número de “Stacks” que se observaban en los distintos campos. Como las secciones se obtuvieron a partir de colonias y las células en una colonia se encuentran en distintas fases de crecimiento, se procedió a mezclar bien toda la biomasa de varias colonias justo antes de su criofijación, para tratar de que la muestra fuera representativa. Para las cuantificaciones se tuvieron en cuenta las células bacterianas que presentaban desde un septo incipiente hasta aquéllas que se observaban completamente septadas.

Como puede apreciarse en la Tabla 5, después de 6 y 12 días de incubación, el 8,83% y el 6,86% de las bacterias, respectivamente, se encontraban en proceso de septación. Sin embargo, únicamente a los 12 días de incubación, el porcentaje de “Stacks” contenidos de las células fue significativo (23,67%), mientras que a los 6 días no se detectó ninguno. Después de 20 días de incubación, el porcentaje de células septadas fue prácticamente inapreciable (0,21%), y el número de bacterias que contenían “Stacks” disminuyó significativamente, observándose sólo en el 2,55% de las células analizadas. Es importante tener en cuenta que en este estudio únicamente se evaluaron secciones de 60 nm de las bacterias, por lo que la cantidad de bacterias septadas y de “Stacks” cuantificados son una aproximación que puede

presentar desviaciones respecto a la cifra real existente. A pesar de las limitaciones del estudio, los resultados indican la existencia de alguna relación entre los “Stacks” y el tiempo de incubación, lo que lleva a pensar que participen en alguna fase de proceso de división bacteriana. Al mismo tiempo, el hecho de que entre 6 y 12 días el porcentaje de “Stacks” aumentase significativamente, mientras que el porcentaje de células septadas es similar, podría indicar que estas estructuras son dinámicas y se organizan o ensamblan en una fase avanzada del proceso de división celular bacteriana. Estos resultados son muy preliminares y no permiten en absoluto concluir cuál es la relación entre los “Stacks” y la dinámica del cromosoma bacteriano, así como tampoco se puede afirmar que se trate de estructuras dinámicas.

Tabla 5. Porcentajes de células bacterianas crecidas en TSA a 0°C a diferentes tiempos de incubación que presentan “Stacks” en el citoplasma y de células bacterianas en división (septación total o parcial).

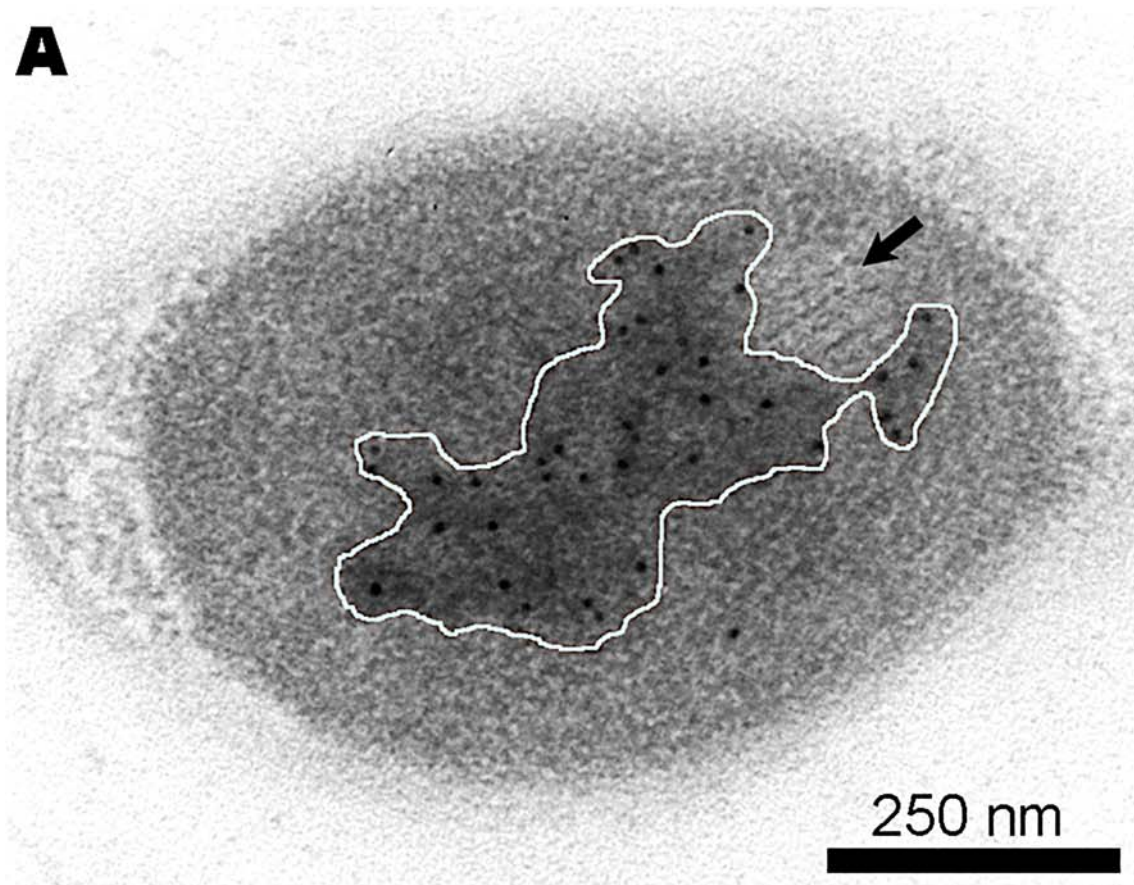
Tiempo de Incubación (días)	N Bacterias	% Bacterias con “Stacks”	% Bacterias en Septación
6	283	0	8,83
12	452	23,67	6,86
20	471	2,55	0,21

Con la finalidad de confirmar que los “Stacks” estaban próximos o totalmente rodeados de DNA y apoyar la posible relación entre los “Stacks” y algún proceso de la dinámica del cromosoma bacteriano, se llevaron a cabo inmunocitoquímicas marcando el DNA de doble cadena. Estos experimentos se realizaron a partir de muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivadas durante 12 días en TSA a 0°C. Las inmunocitoquímicas se llevaron a cabo en secciones de 60 nm de HM23 de muestras procesadas por HPF-FS, y en secciones de 60 nm de Tokuyasu, utilizando en ambos casos un anticuerpo monoclonal específico para marcar DNA de doble cadena y un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 12 nm. En el caso de las secciones de HM23, además, se amplificó la señal obtenida con un método de inmunomarcaje mediante permanganato de potasio, que permite la visualización de la

distribución de la cromatina en el interior del citoplasma bacteriano (Bohrmann and Kellenberger, 1994).

La observación de las micrográficas de ambas técnicas confirmó de nuevo la presencia de “Stacks” en la periferia del citoplasma y cercanos al nucleoide bacteriano, llegando en algunos casos a aparecer los “Stacks” parcial o totalmente envueltos por éste (Fig. 25A and 25B; ver más imágenes en Material Suplementario, apartados 3.1 y 3.2). El procesado de las muestras por Tokuyasu permite un mejor acceso de los anticuerpos hasta su diana ya que apenas existe inhibición física del marcaje. Esto es debido a que los reactivos del inmunomarcaje se aplican directamente sobre una sección de muestra sin incluir en ningún tipo de resina que pudiera dificultar el acceso a su diana (Griffiths et al., 1984). Sin embargo, tal y como hemos puntualizado anteriormente, al realizar una fijación química inicial la preservación estructural no es tan buena como en las muestras procesadas por HPF-FS e incluidas en resina Lowicryl. Es por este motivo que se realizó la detección de DNA sobre la muestra preparada por los dos métodos. Como se observa en las imágenes, no se apreciaron mejoras en la sensibilidad del marcaje del DNA en las muestras de Tokuyasu respecto a las de resina acrílica, mientras que la ultraestructura no se encontraba tan bien preservada como en las muestras procesadas por HPF-FS.

**A**



**B**

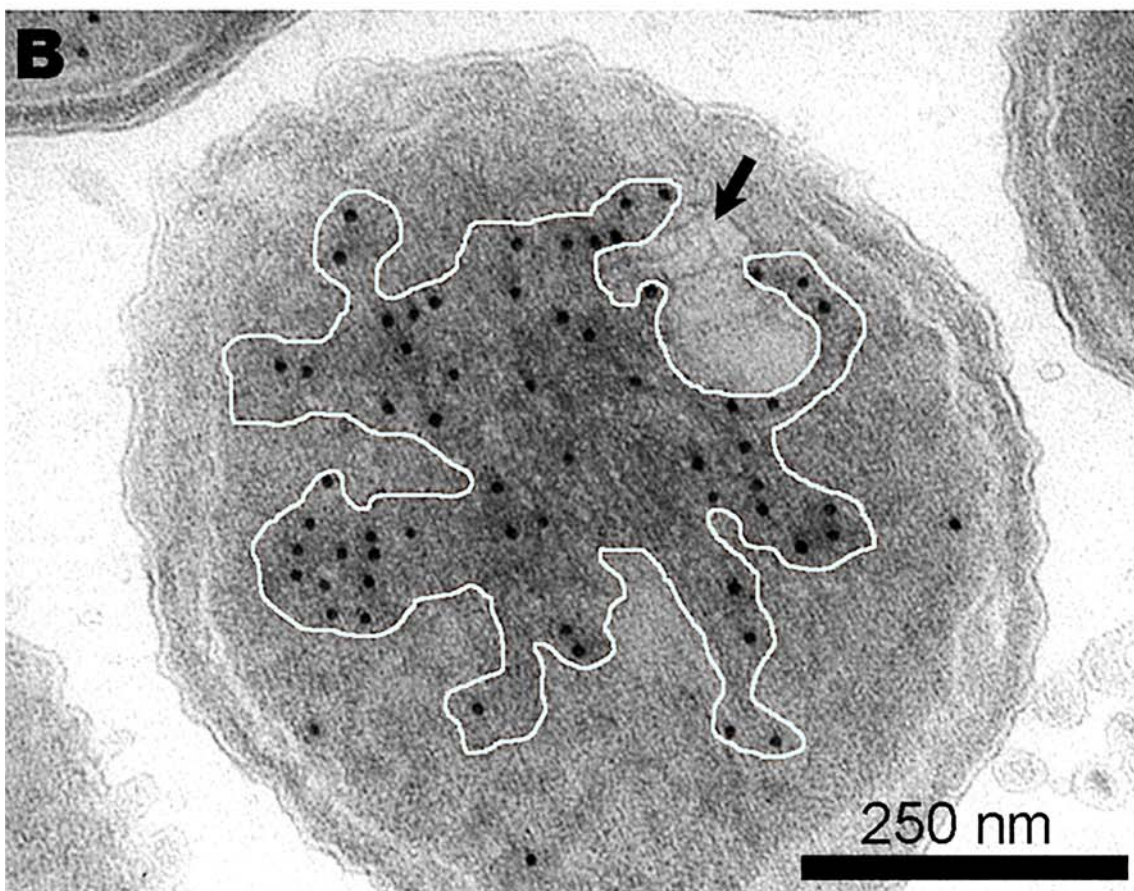


Figura 25. Estudio de la relación entre los “Stacks” y el DNA bacteriano por inmunocitoquímica para detectar DNA en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultivada en TSA a 0°C durante 12 días. (A) Inmunocitoquímica contra DNA en una sección de 60 nm de Lowicryl HM23 de muestras procesadas por HPF-FS. (B) Inmunocitoquímica contra DNA en una sección de 60 nm de Tokuyasu. (A-B) Las áreas delimitadas corresponden al nucleoide bacteriano, el cual queda claramente delimitado por el doble marcaje con oro coloidal y la precipitación de los anticuerpos primario y secundario debida al tratamiento con permanganato potásico. Se observan “Stacks” muy cerca y parcialmente embebidos en el la zona del nucleoide. Las flechas negras marcan los “Stacks”.

Por otro lado, se llevó a cabo otra aproximación del estudio de la relación entre los “Stacks” y el cromosoma bacteriano, basada en localizar alguna proteína involucrada en el proceso de replicación y segregación del cromosoma bacteriano, escogiéndose la proteína SeqA. Se trata de una proteína cuya distribución específica de macrodominios se encuentra muy conservada entre diferentes especies bacterianas, y se cree que es un elemento común de la organización cromosómica en bacterias (Dame et al., 2011). Concretamente, la proteína SeqA se encarga de secuestrar los orígenes de replicación hemimetilados de las copias del DNA y los hace migrar en direcciones opuestas de la célula llevándose a cabo la segregación del cromosoma, a lo que le sucede la septación (Newman and Crooke, 2000). Para el experimento de inmunocitoquímica sobre cortes de células sometidas a HPF-FS e inclusión en resina HM20, se utilizó, en primer lugar, la bacteria *E. coli* K12 como control positivo (Molina et al., 2008) y un anticuerpo policlonal anti-SeqA (Slater et al., 1995). Dado que se trata de una proteína conservada se pensó en la posibilidad de que el mismo anticuerpo anti-SeqA de *E. coli* pudiera marcar la proteína análoga en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>.

La observación de las micrografías de *E. coli* K12 mostró marcaje contra SeqA poco abundante, en zonas periféricas de la bacteria y, frecuentemente, las marcas de oro se localizaron cerca de estructuras que recordaban a los “Stacks” por la densidad a los electrones y la localización intracitoplásmica que presentaban, aunque no se observaron con la nitidez necesaria para confirmar que lo fueran (Fig. 26A).

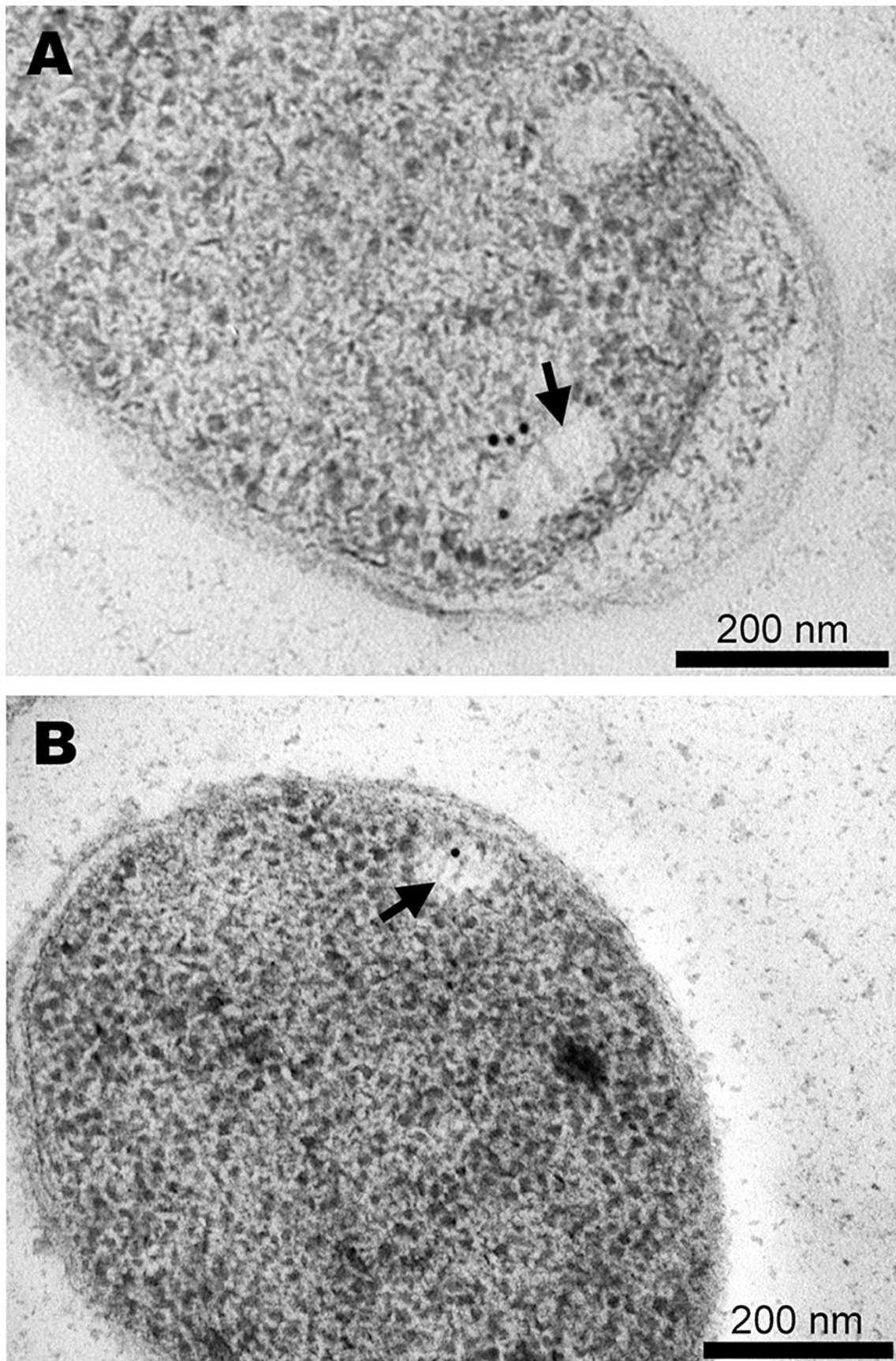


Figura 26. Estudio de la relación entre los “Stacks” y la división bacteriana por inmunocitoquímica de la proteína SeqA en cultivos de *E. coli* K12 y *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en TSA a 0°C durante 12 días. (A-B) Micrografías de TEM del proceso de

inmunocitoquímica contra SeqA en una sección de 60 nm de Lowicryl HM20 de muestras procesadas por HPF-FS. Las flechas negras apuntan las estructuras tipo “Stack”. (A) *E. coli* K12. Se observa marcaje de SeqA en la zona periférica de la bacteria y en la proximidad de una estructura que recuerda a un “Stack”. (B) *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. Se observa marcaje de SeqA en la zona periférica de las bacterias y en la proximidad de un “Stack”.

Por otro lado, las micrografías de la inmunocitoquímica contra SeqA en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> presentaron marcaje de SeqA con una distribución similar al observado en el control positivo, resultados que parecían validar la eficacia del anticuerpo en esta cepa. Cabe mencionar que el experimento de inmunomarcaje apenas presentó marcaje inespecífico del anticuerpo, ya que únicamente de forma muy ocasional se podía apreciar alguna bola de oro aislada en el exterior de las bacterias. Sin embargo, el marcaje de esta proteína en nuestras bacterias fue muy poco abundante y se limitó, principalmente, a unas pocas marcas de oro en las zonas periféricas de la bacteria. Aún así, el hecho de que estas localizaciones coincidan con las descritas anteriormente para esta proteína por estudios de fluorescencia (Sánchez-Romero et al., 2010) parece indicar que el marcaje es específico y que se trata de una proteína poco abundante en el citoplasma. En el marcaje de SeqA en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> también se observó marcaje de SeqA en la zona periférica de las bacterias y, en ocasiones, cercano a “Stacks” (Fig. 26B; ver imagen complementaria en Material Suplementario, apartado 3.3). Estos resultados podrían reforzar de algún modo esta posible relación entre los “Stacks” y la división bacteriana, aunque se necesitarían nuevos experimentos para confirmar esta hipótesis.

Otro aspecto importante del trabajo consistió en determinar si los “Stacks” eran exclusivos de la nueva bacteria Antártica *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, o si se trataba de unas estructuras presentes en otras bacterias. Cabría esperar que si los “Stacks” participasen en alguna fase de la replicación bacteriana, estos no serían exclusivos de la bacteria Antártica. Para ello, se eligieron tres especies bacterianas del género *Pseudomonas*; dos de ellas filogenéticamente muy relacionadas con *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>: *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> y *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup>, y una tercera especie, *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup>, considerada representante del grupo *fluorescens* dentro del género *Pseudomonas* y más

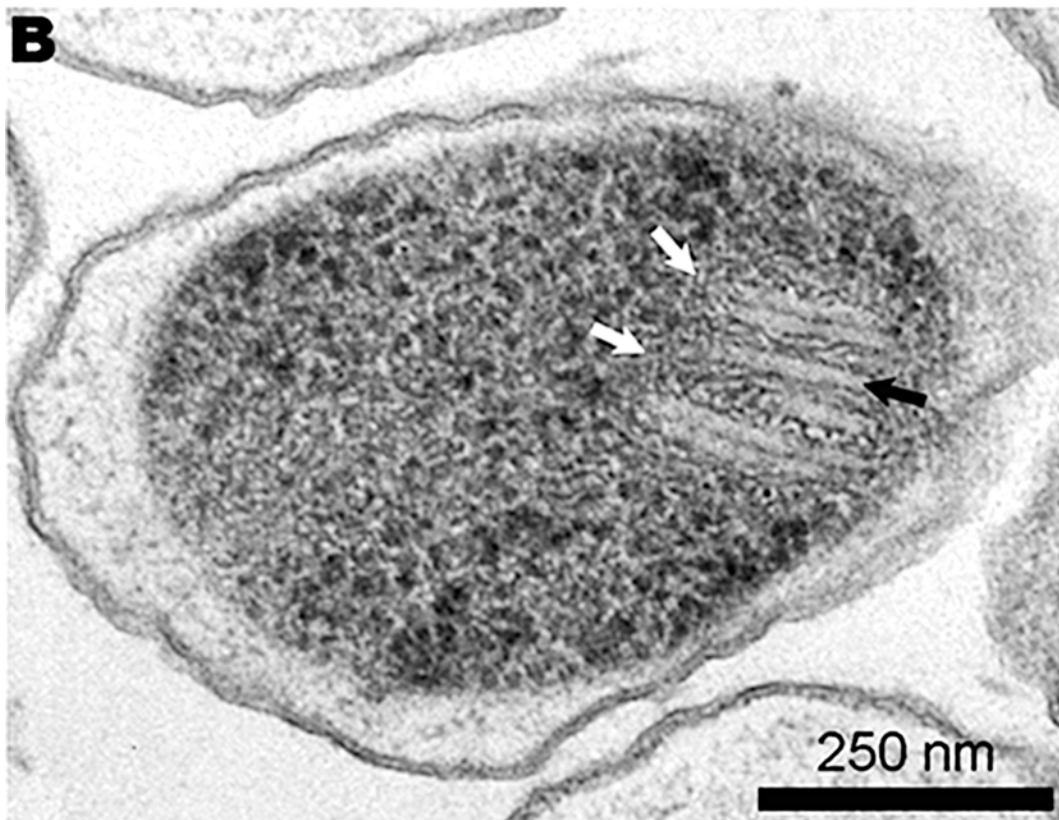
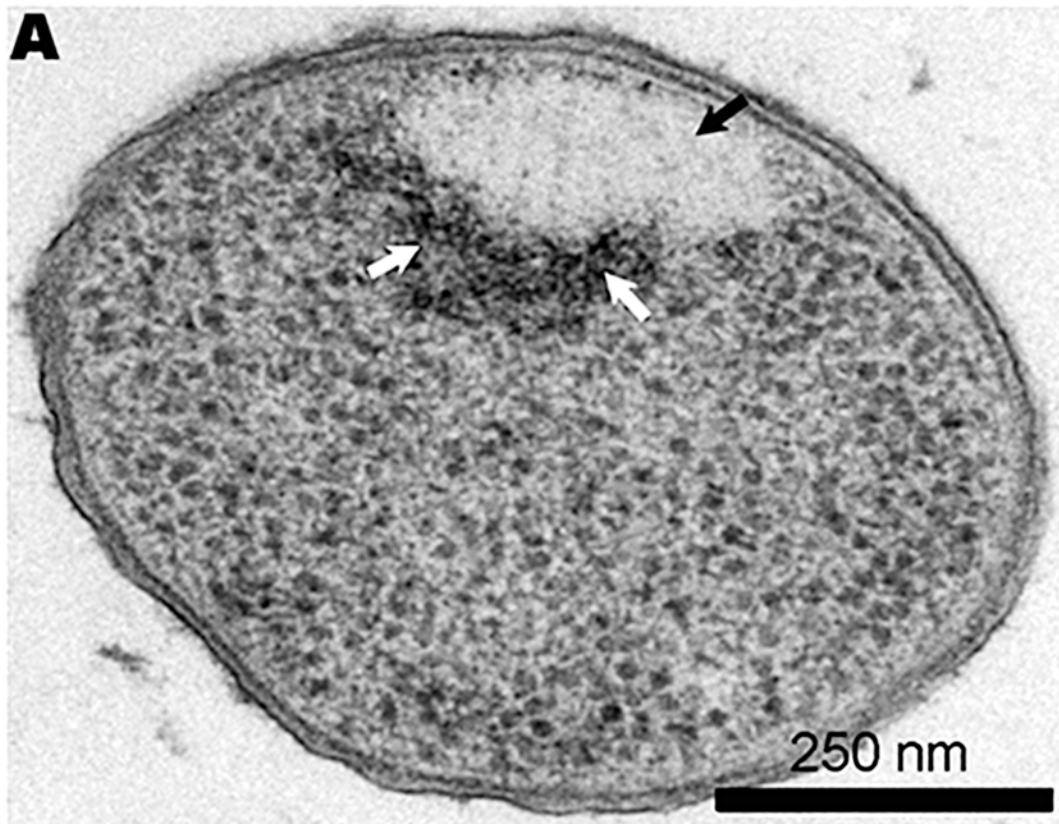
alejada filogenéticamente de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. En primer lugar, se determinó para cada cepa su rango de temperatura de crecimiento y, a continuación, se cultivaron en TSA durante 12 días a una temperatura cercana a su límite inferior de crecimiento, con la finalidad de intentar reproducir las condiciones de crecimiento a las que *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> producía “Stacks” con mayor frecuencia. Posteriormente, las diferentes muestras se procesaron por HPF-FS e inclusión en EPON y se observaron en el TEM.

Las micrografías mostraron que *P. psychrophila* y *P. fragi* incubadas a 0°C, así como *P. fluorescens* incubada a 4°C, contenían también “Stacks” en sus citoplasmas. De igual modo que en *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, los “Stacks” en estas especies se localizaban en la periferia del citoplasma y con una orientación similar respecto a la PM, observándose también proximidad entre los mismos y las microfibras de DNA, así como la presencia de gránulos de polifosfato en la zona (Fig. 27A, 27B and 27C). De este modo, se confirmó que los “Stacks” se tratan de unas estructuras presentes al menos, en diferentes especies bacterianas dentro del género *Pseudomonas*.

Un hecho sorprendente es que tratándose los “Stacks” de una estructura presente, al menos, en varias especies dentro del género *Pseudomonas*, no se haya descrito con anterioridad. En un principio, se podría relacionar su observación con un artefacto de la preparación de muestra, pero esta posibilidad ha quedado totalmente descartada por la observación de “Stacks” en reiteradas ocasiones mediante distintas técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión que mantienen la ultraestructura de la muestra en un estado muy cercano al natural. Otro posible motivo que podría explicar que los “Stacks” no se hayan descrito anteriormente, es que éstos podrían presentar una naturaleza dinámica, ensamblándose y desensamblándose en un período muy breve de tiempo. Si esto fuera cierto, el hecho de llevar a cabo un estudio en el que las cepas bacterianas se cultivaron a una temperatura cercana a su límite inferior de crecimiento, supondría que se ralentizaría tanto su crecimiento (Pietikäinen et al., 2005) como los procesos bacterianos, permitiendo que los procesos dinámicos se alarguen en el tiempo y que, por lo tanto, sea más sencillo captar las estructuras implicadas mediante la CF de las muestras. De



todas formas, se necesitarían experimentos adicionales para determinar la posible naturaleza dinámica de estas estructuras.



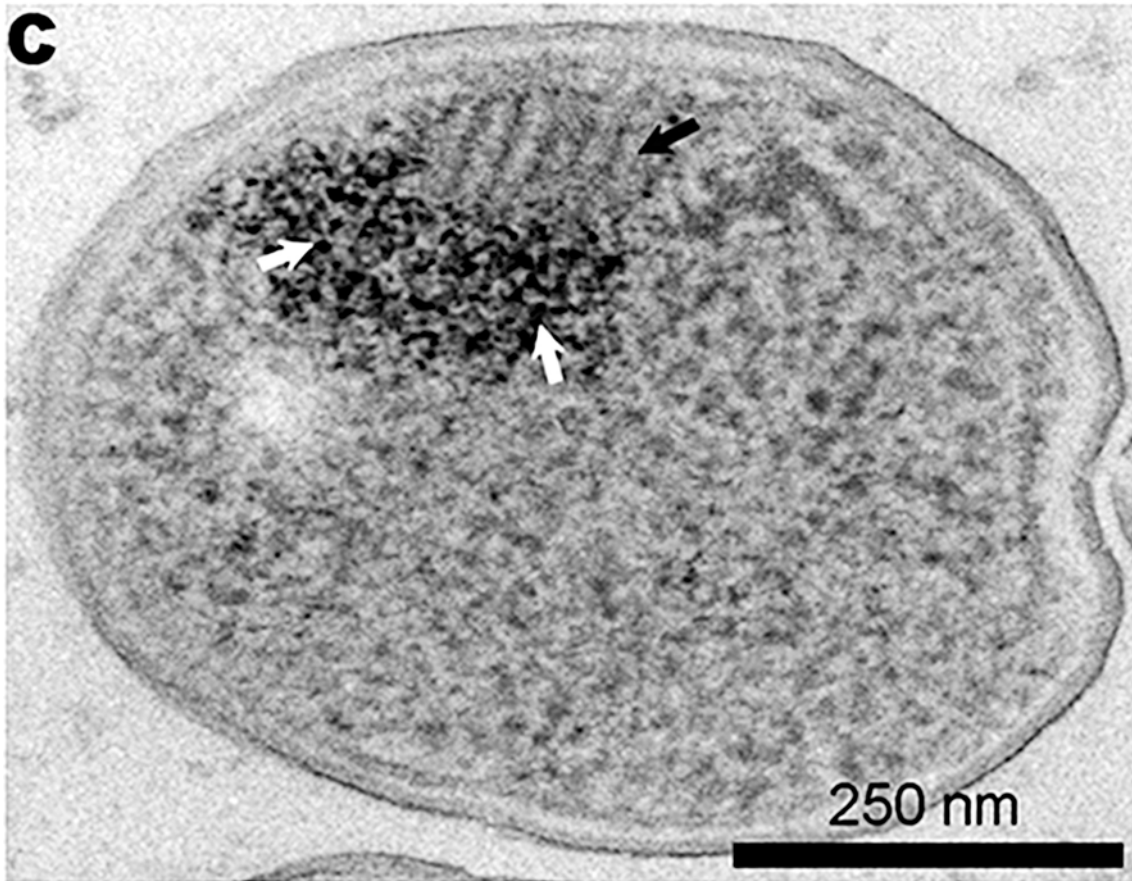


Figura 27. Micrografías de “Stacks” en diferentes especies bacterianas del género *Pseudomonas*, procesadas por HPF-FS. (A) *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup>. (B) *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup>. (C) *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup>. (A-C) Las secciones de EPON de 60 nm de las tres cepas muestran “Stacks” en el citoplasma, contiguos a la PM (flechas negras), y rodeados de material fibrilar que podría corresponder a DNA (flechas blancas).

Para obtener mayor información sobre la presencia de estas estructuras en otras especies, se realizó un estudio similar al anterior en dos especies bacterianas utilizadas ampliamente como modelos en estudios relacionados con la dinámica del cromosoma bacteriano: *Escherichia coli* W3310 y *Bacillus subtilis* ATCC6633. La observación de los “Stacks” en bacterias modelo permitiría aplicar herramientas disponibles relacionadas con el estudio de la dinámica del cromosoma bacteriano, para poder determinar la función de estos. Ambas cepas se cultivaron durante 12 días a una temperatura cercana a su límite inferior tolerado, que correspondió a 12°C en ambos casos. Seguidamente, las muestras se procesaron por HPF-FS e inclusión en EPON. Las micrografías mostraron que las dos especies bacterianas presentaban estructuras que podrían corresponder a “Stacks” en puntos del citoplasma

bacteriano. Sin embargo, este hecho no se puede afirmar definitivamente ya que no se apreciaron de forma nítida (Fig. 28).

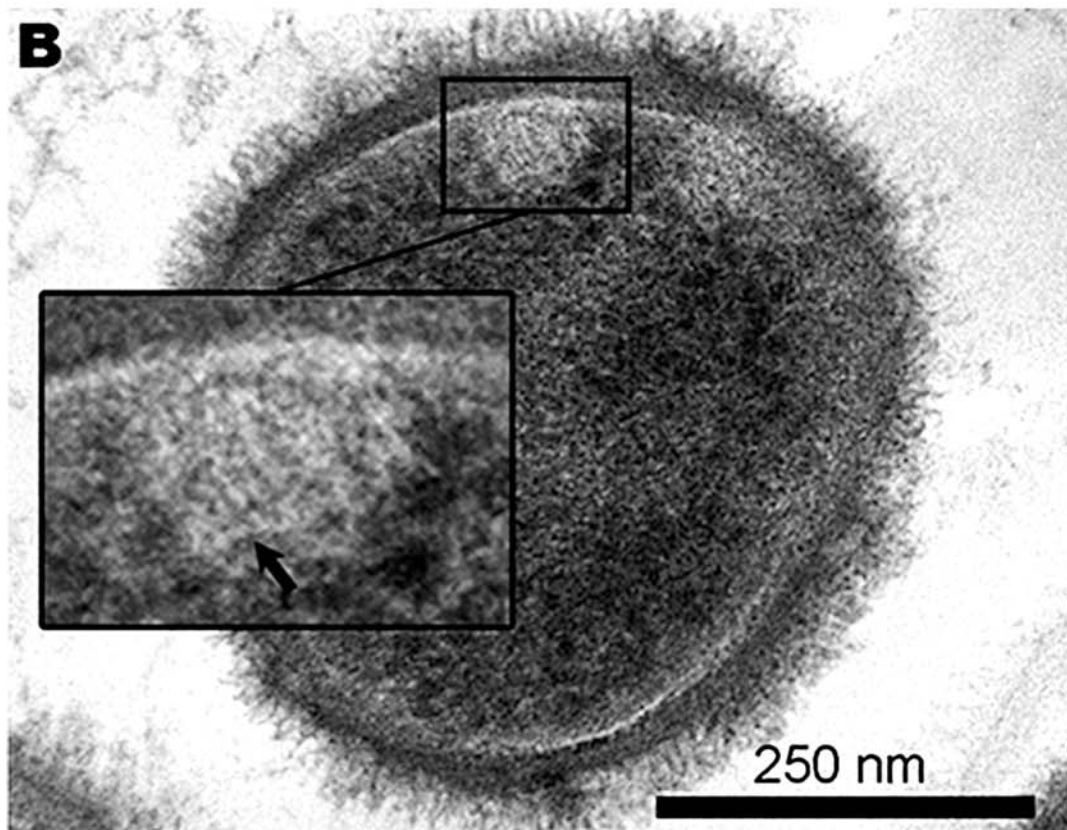
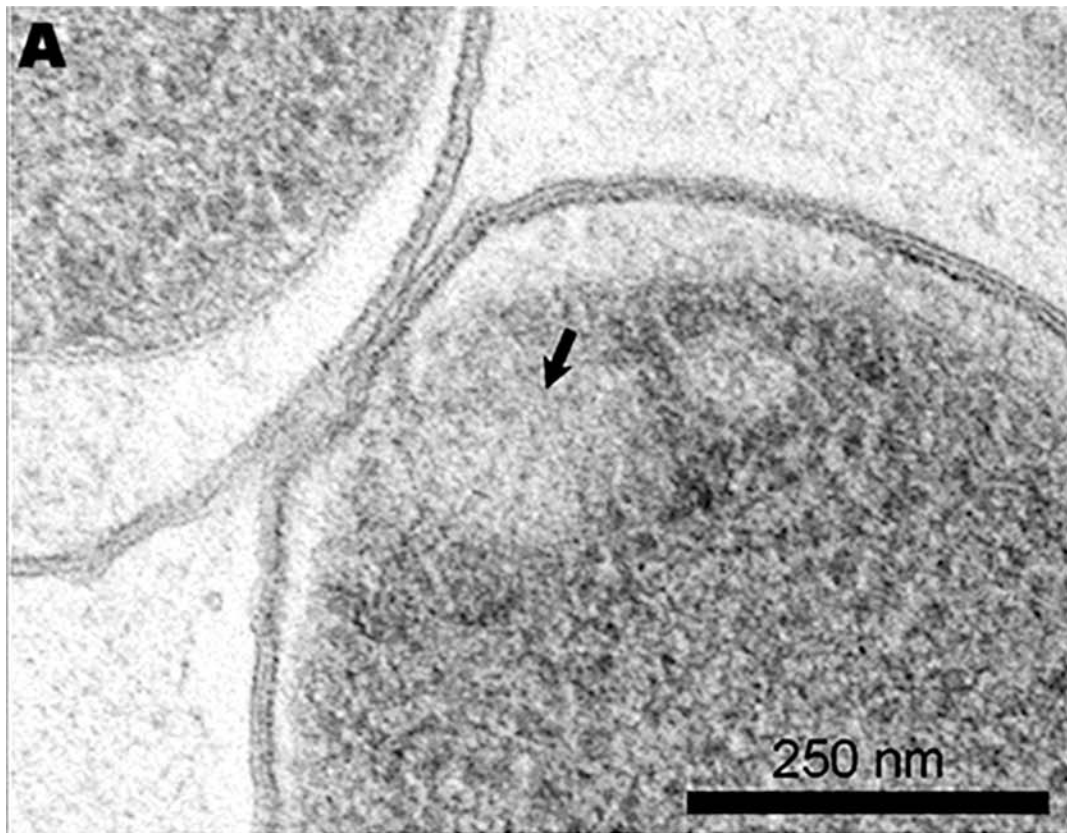


Figura 28. Micrografías de *E. coli* W3310 y *B. subtilis* ATCC6633 procesadas por HPF-FS, mostrando estructuras citoplasmáticas que recuerdan a los “Stacks”. (A-B) Secciones de EPON de 60 nm. (A) Célula de *E. coli* W3310 que presenta una estructura similar un “Stack” en su citoplasma (flecha negra). (B) Célula de *B. subtilis* ATCC6633 muestra también una estructura similar a un “Stack” (flecha negra). A pesar de la falta de definición, la localización próxima a la PM con una cierta inclinación respecto a la misma son detalles que coinciden también con los “Stacks”.

Además, cabe mencionar que la visualización de estas estructuras después de analizar varios cortes, fue esporádica, por lo que se necesitaría llevar a cabo experimentos adicionales para tratar de determinar unas condiciones que optimicen su visualización en estas bacterias modelo, lo cual facilitaría el estudio de su función.



## **V. CONCLUSIONES**



1. La caracterización mediante distintas técnicas de TEM y Cryo-TEM permite afirmar que la nueva bacteria Antártica *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> presenta en su citoplasma una estructura no descrita anteriormente en células procariotas, que no se corresponde con ningún tipo de inclusión, invaginación membranosa o estructura previamente identificada como componente del citoplasma bacteriano. El tipo de técnicas microscópicas utilizadas han permitido observar las células en unas condiciones cercanas a su estado natural, confirmando que no se trata de una estructura artefactual.
2. En secciones de 50 nm de muestras de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF-FS y dependiendo del plano de sección, se visualiza como una agrupación de subunidades alargadas y apiladas, o como una estructura ovalada. En ambos casos, esta estructura se localiza en la periferia de la célula y muy próxima a la PM y presenta una orientación entre 30° y 90° respecto a la misma. Esta nueva estructura se ha denominado "Stack". Las células pueden contener uno o varios "Stacks" simultáneamente, y en el caso de contener varios, estos pueden estar aislados en diferentes localizaciones del citoplasma o agrupados en una misma localización, pero difiriendo en sus orientaciones.
3. En células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por la técnica de Tokuyasu o procesadas por Criofractura, también se observan "Stacks", visualizados asimismo, como una agrupación de subunidades alargadas y apiladas cercana a la membrana.
4. La observación por Cryo-TEM de secciones vítreas de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> también muestra la presencia de "Stacks" como una agrupación de subunidades alargadas y apiladas cercana a la membrana.
5. En *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, el análisis de tomogramas obtenidos tanto a temperatura ambiente a partir de secciones de resina (ET), como por Cryo-TEM de células completas procesadas por PF (CET) o a partir de secciones vítreas (CETOVIS), han permitido determinar que esta nueva estructura



está formada tridimensionalmente por un número variable de discos ovalados planos apilados que presentan tamaño variable, grosor constante y una distancia entre los discos también constante.

6. Cada subunidad en forma de disco plano que integra un “Stack” se encuentra rodeada por una membrana con perfil de bicapa lipídica de grosor significativamente menor que el de la membrana plasmática y no se ha observado con ninguna de las técnicas utilizadas continuidad entre la membrana que rodea las subunidades y la membrana plasmática.
7. La observación de las micrografías después de utilizar varias técnicas y el análisis de los tomogramas, permite señalar que los “Stacks” se encuentran muy próximos a microfibras de DNA, y aparecen frecuentemente parcial o totalmente rodeados por el nucleoide bacteriano.
8. La estructura del “Stack” únicamente se observa en el citoplasma de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> en un porcentaje importante (23,67%) de células, cuando las muestras se incuban en unas condiciones muy concretas que son en TSA a 0°C durante 12 días. A esta temperatura de 0°C pero a tiempos de incubación más cortos o más largos, el porcentaje de células que presentan “Stacks” es muy inferior (menor del 3%). A temperaturas superiores de incubación en las que la velocidad de crecimiento es superior también disminuye mucho el porcentaje de células que contienen “Stacks”.
9. El “Stack” no es un estructura exclusiva de la bacteria antártica *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, sino que se detecta en otras especies del género *Pseudomonas*, presentando iguales características.

## ***VI. ABREVIATURAS***



AFS: criosustitución automática (“Automatic Freeze Substitution”)  
AND: “anisotropic nonlinear diffusion”  
ATP: adenosina trifosfato  
BHI: infusión de cerebro y corazón (“brain heart infusion”)  
CCD: “charge-coupled device”  
CEMOVIS: Criomicroscopía Electrónica de secciones vítreas (“Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections”)  
CET: Criotomografía Electrónica (“Cryo-Electron Tomography”)  
CETOVIS: Criotomografía Electrónica de secciones vítreas (“Cryo-Electron Tomography of Vitreous Sections”)  
CF: crioinmovilización o criofijación (“cryo-immobilization”/“cryo-fixation”)  
Cryo-FIB-SEM: “Cryo-Focused-Ion Beam scanning electron microscope”  
Cryo-TEM: criomicroscopio electrónico de transmisión (“cryo-transmission electron microscope”)  
CTF: función de transferencia de contraste (“contrast transfer function”)  
DDD: “direct detection devices”  
DMS: dimetilsulfuro  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico (“double stranded desoxyribonucleic acid”)  
dsDNA: ácido desoxirribonucleico de doble cadena (“double stranded desoxyribonucleic acid”)  
E-O: dirección este-oeste  
ET: Tomografía Electrónica (“Electron Tomography”)  
FEG: cañón de electrones de emisión de campo (“field emission gun”)  
FF: criofractura (“Freeze Fracture”)  
FS: criosustitución (“Freeze Substitution”)  
GA: glutaraldehído  
GN<sub>2</sub>: nitrógeno gas (“gas nitrogen”)  
HPF: crioinmovilización por congelación a alta presión (“High-Pressure Freezing”)  
HM: alta magnificación (“high magnification”)  
HT: alta tensión (“high tension”)  
IgG: inmunoglobulina G  
IgM: inmunoglobulina M

LaB<sub>6</sub>: hexaboruro de lantano  
MM: medio mínimo  
M<sub>r</sub>: masa relativa  
LM: baja magnificación (“low magnification”)  
LN<sub>2</sub>: nitrógeno líquido (“liquid nitrogen”)  
MUA: acetato de uranilo metanólico (“methanolic uranyl acetate”)  
N-S: dirección norte-sur  
NAO: “10-Nonyl Acridine Orange”  
OsO<sub>4</sub>: tetróxido de osmio  
PALM: “photoactivated localization microscopy”  
PFA: paraformaldehído  
PB: tampón fosfato (“phosphate buffer”)  
PBS: tampón fosfato salino (“phosphate buffer saline”)  
PF: “Plunge Freezing”  
PHA: poli-β-hidroxialcanoato  
PHB: poli-β-hidroxibutirato  
PHEM, tampón: 2 mM Hepes, 60 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2-7,6  
PM: membrana plasmática (“plasma membrane”)  
RT-ET: Tomografía Electrónica a temperatura ambiente (“Room-Temperature Electron Tomography”)  
RuO<sub>4</sub>: tetróxido de rutenio  
SD: desviación estándar (“standar deviation”)  
SIRT: “simultaneous iterative reconstruction technique”  
STORM: “stochastic optical reconstruction microscopy”,  
TEM: microscopio electrónico de transmisión (“transmission electron microscope”)  
TSA: triptona soja agar  
TSB: caldo de triptona y soja (“tryptone soy broth”)  
UA: acetato de uranilo (“uranyl acetate”)  
UV: ultravioleta  
VIS: secciones vítreas (“vitreous sections”)  
VOSCs: compuestos orgánicos volátiles de azufre  
WBP: “weighted back-projection”

2D: bidimensional

3D: tridimensional

$\lambda_{\text{emisión}}$ : longitud de onda de emisión

$\lambda_{\text{excitación}}$ : longitud de onda de excitación



**VII. MATERIAL**  
**SUPLEMENTARIO**

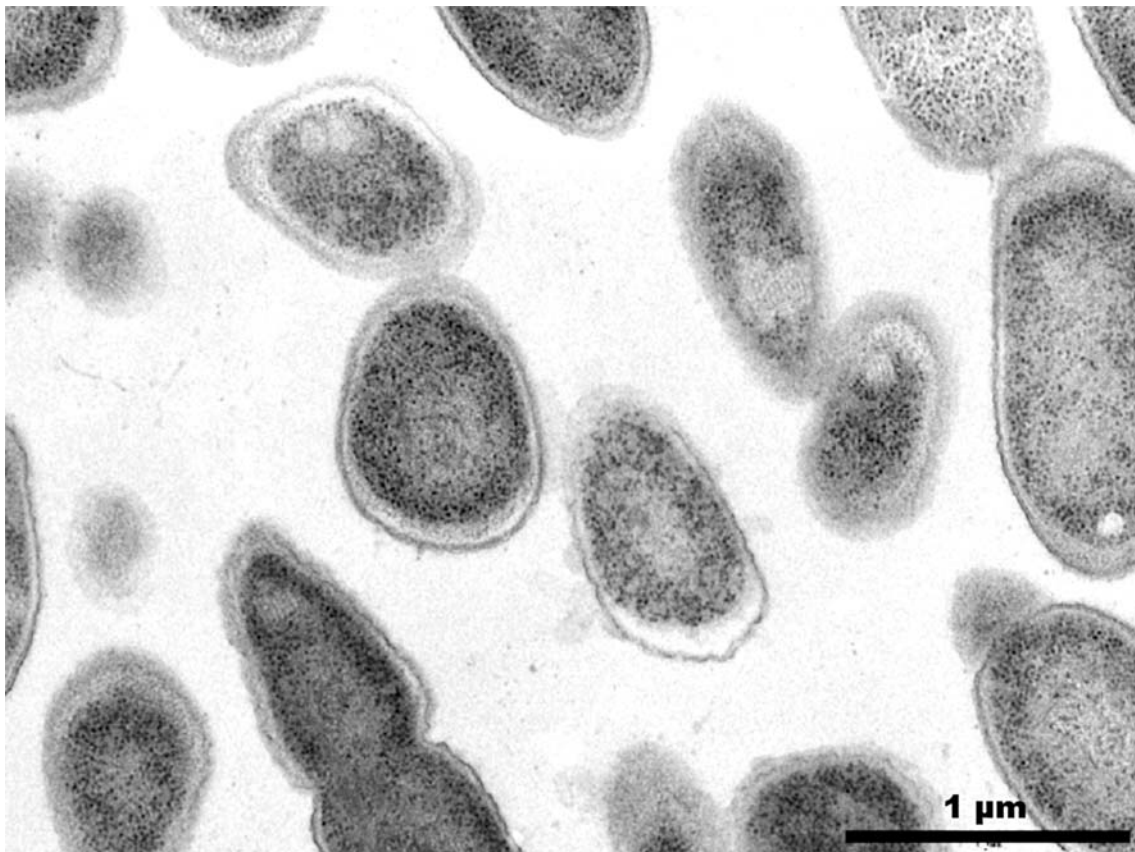


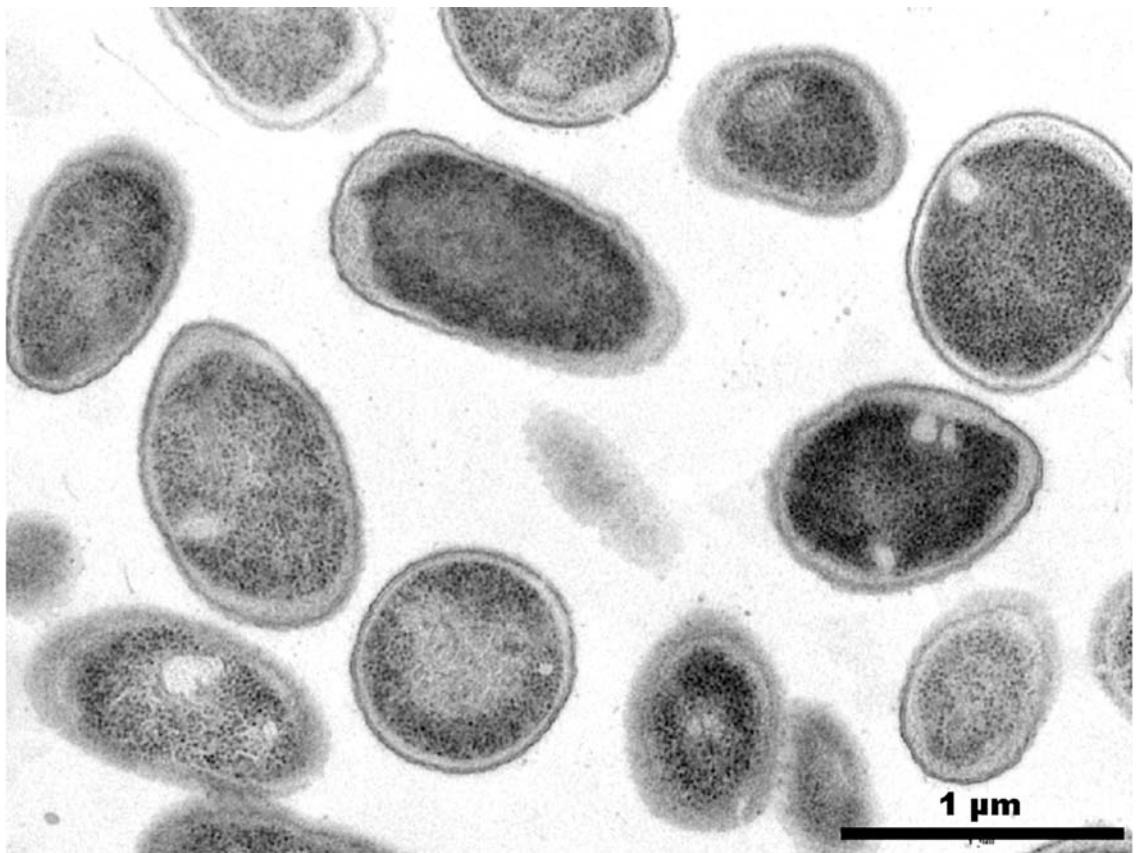
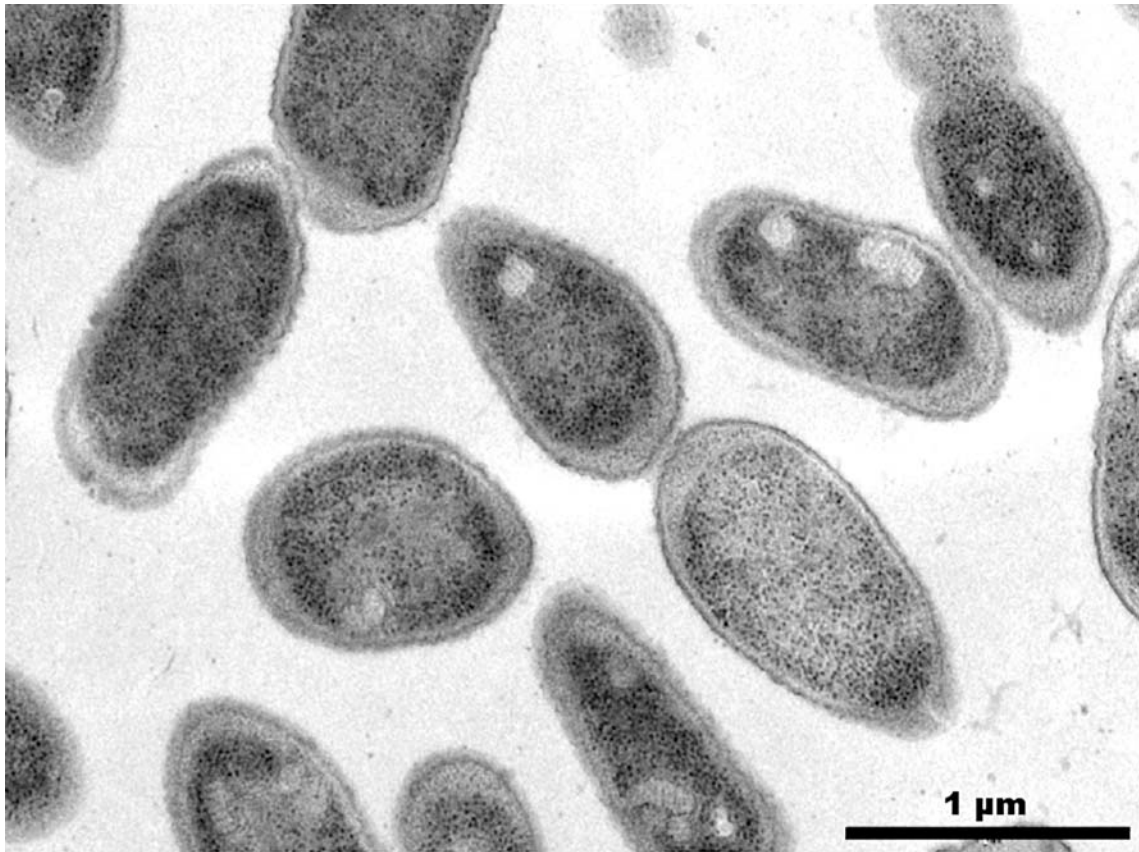


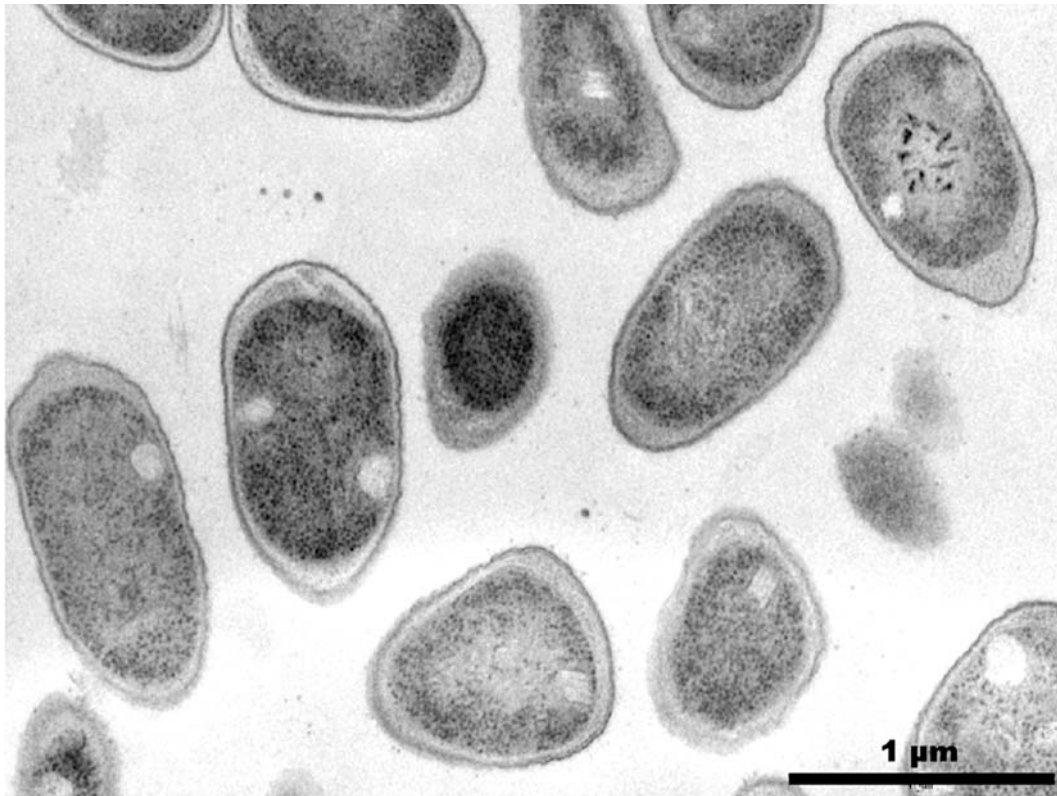
El capítulo Material Suplementario recoge más imágenes y vídeos para apoyar los resultados descritos en los distintos apartados.

**1. Micrografías de secciones de 60 nm de EPON de células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF-FS**

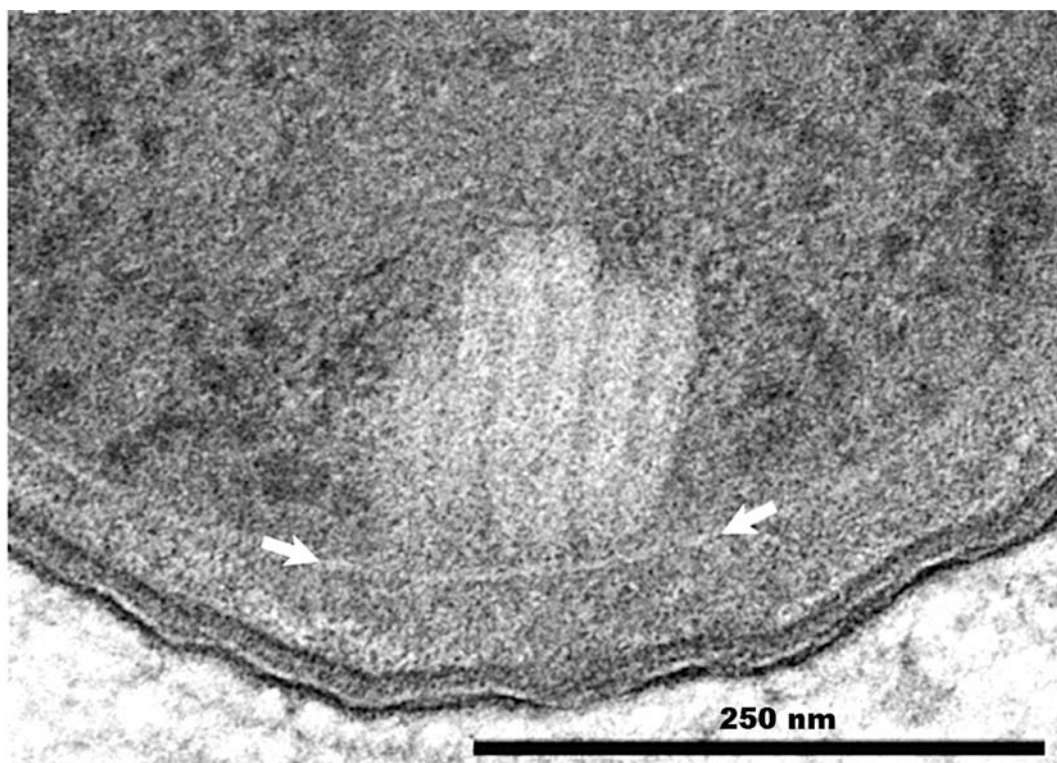
**1.1. Imágenes adicionales a Resultados, apartado 3 (complementan la Figura 12A).**

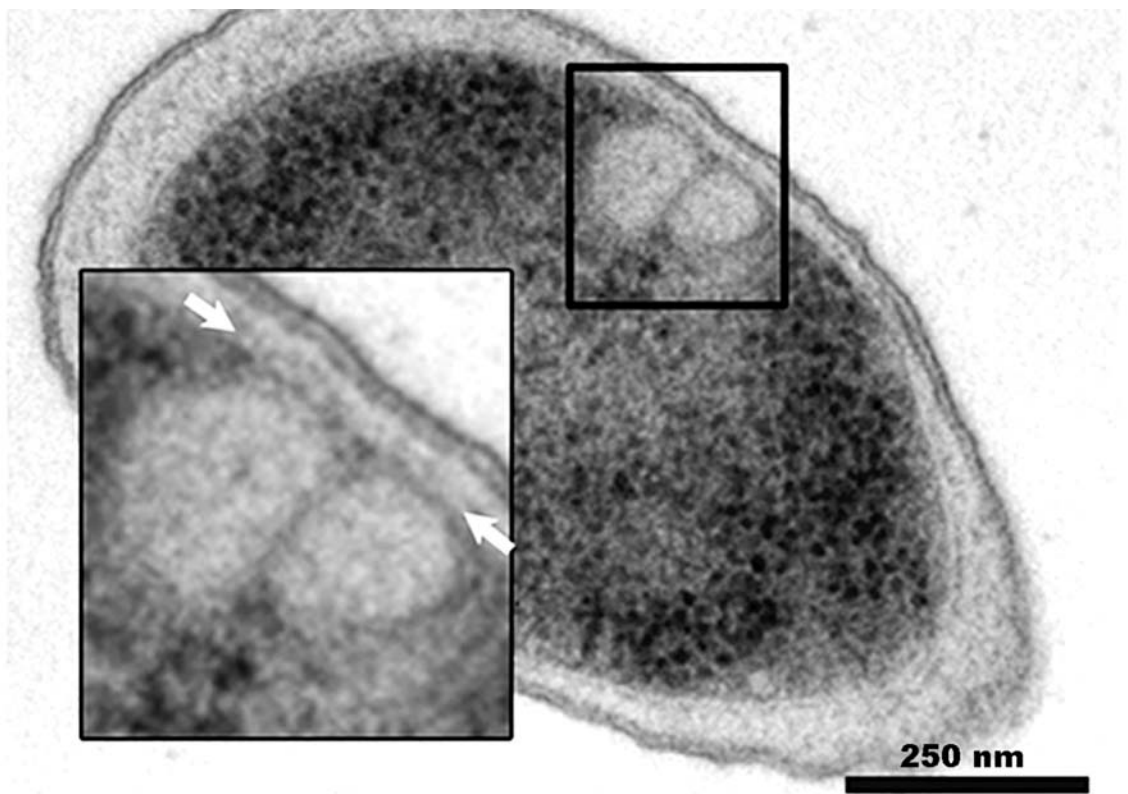
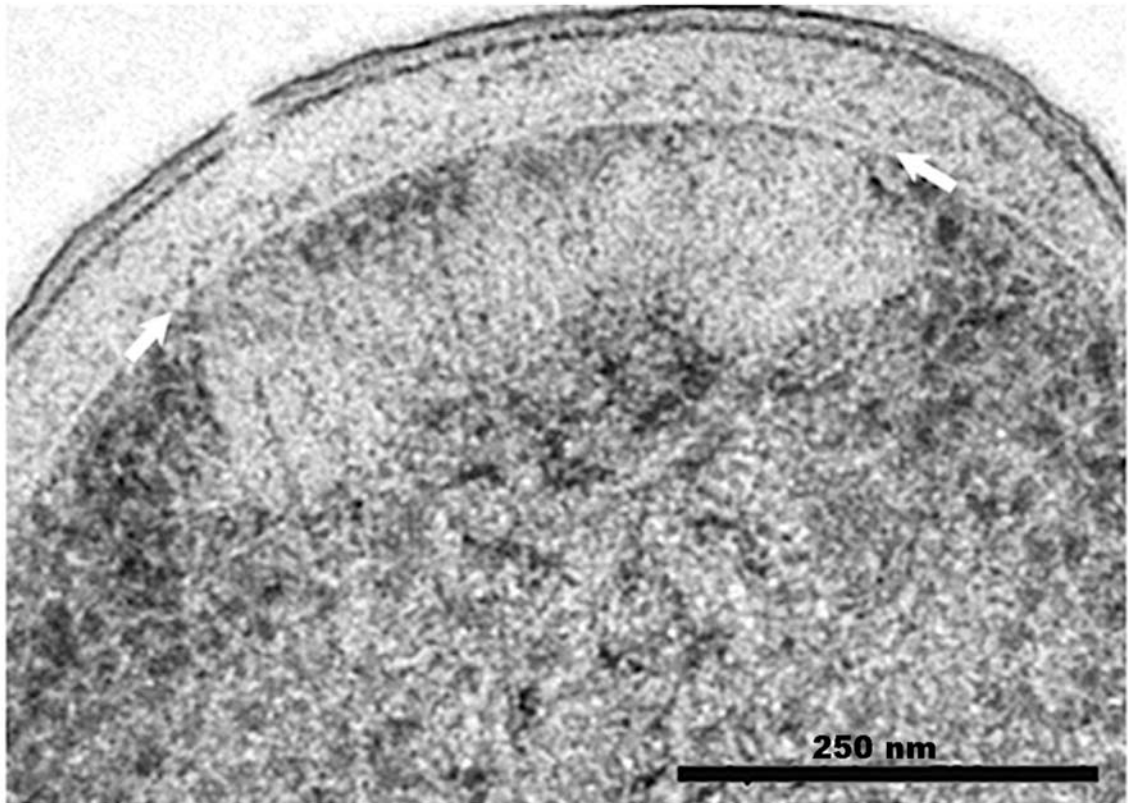


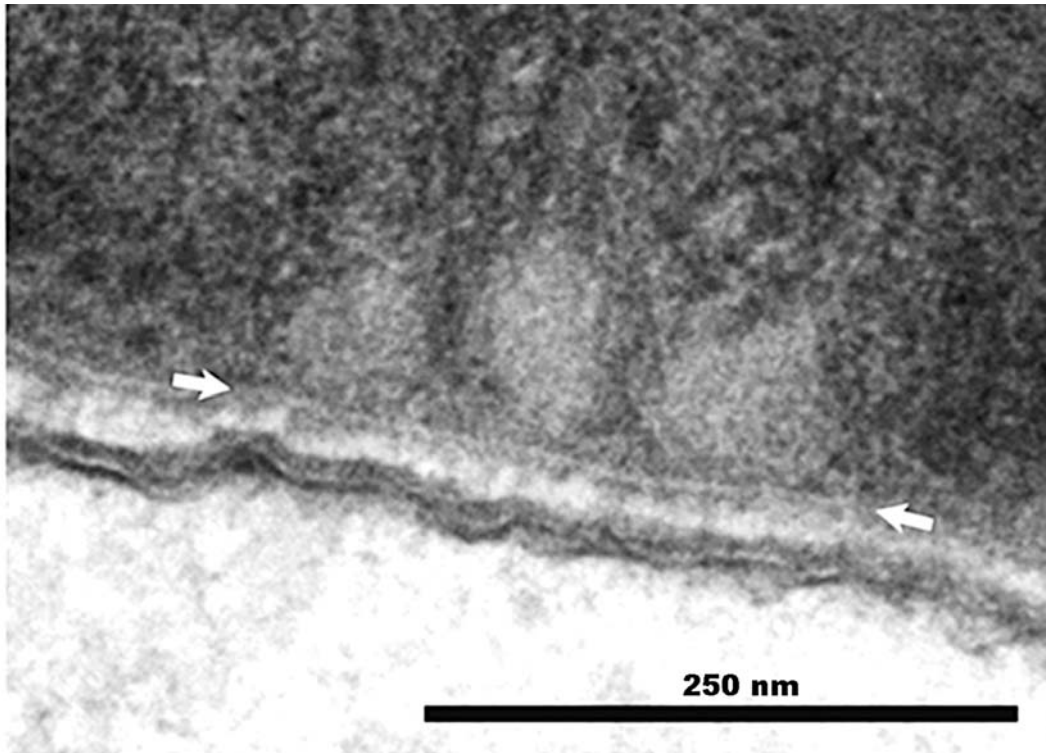




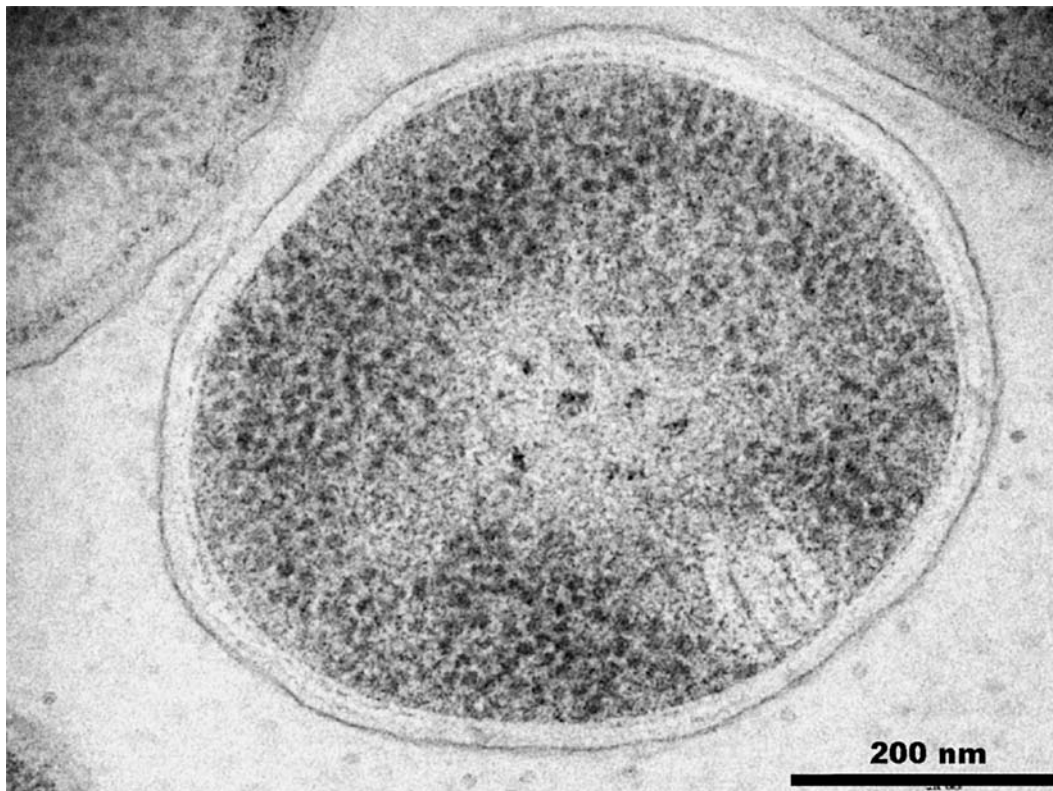
**1.2. Imágenes adicionales a Resultados, apartado 3**  
**(complementan la Figura 13E)**

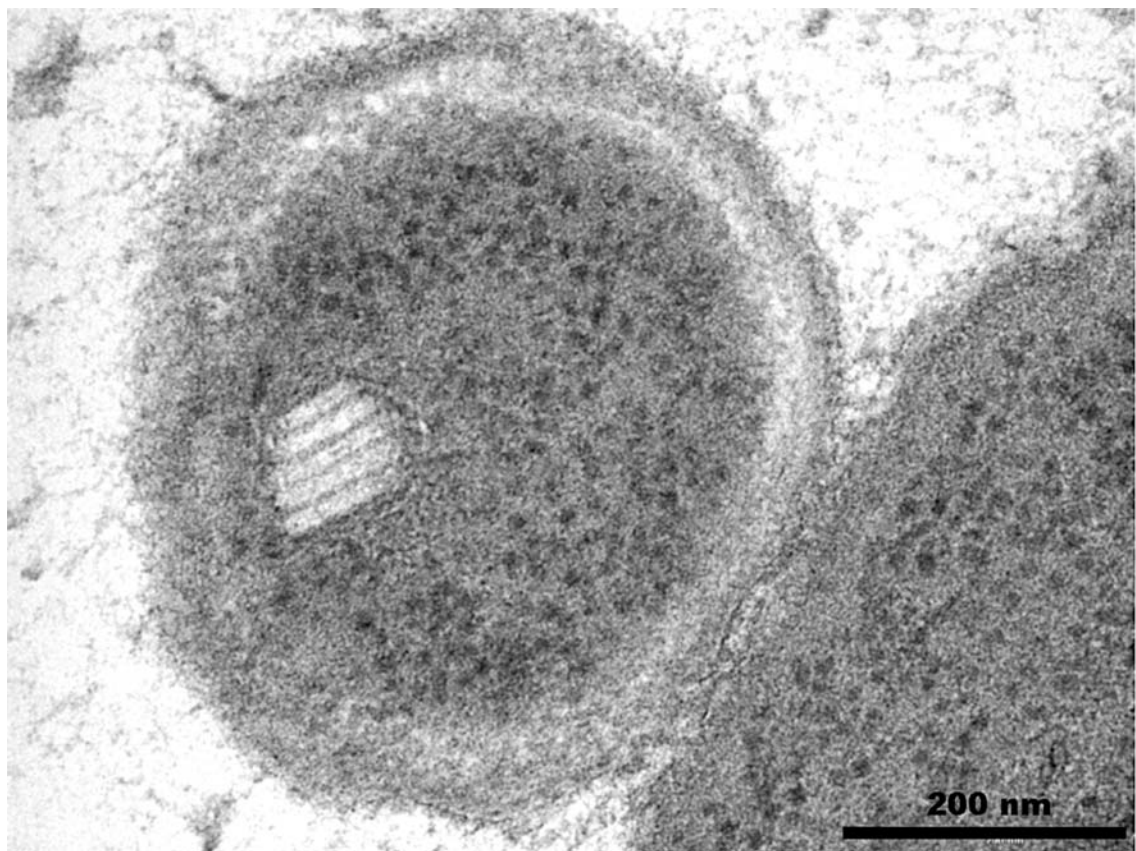
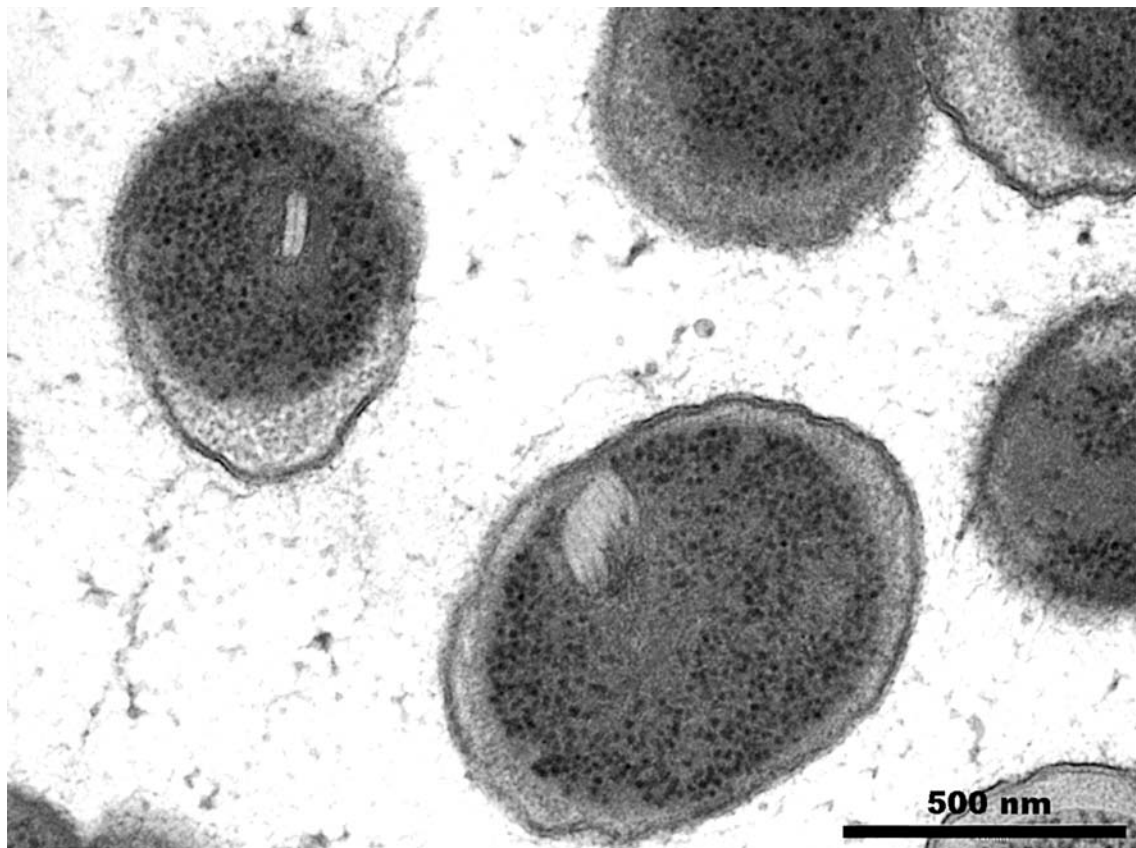


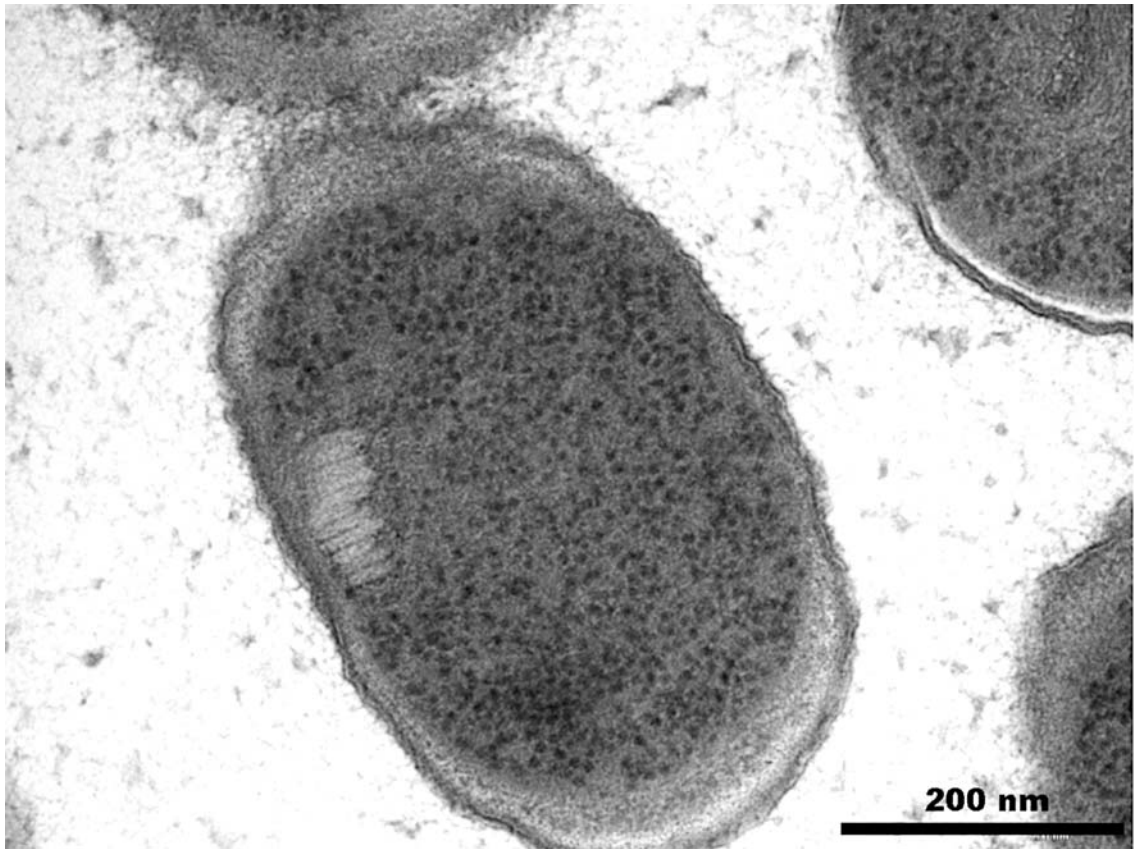




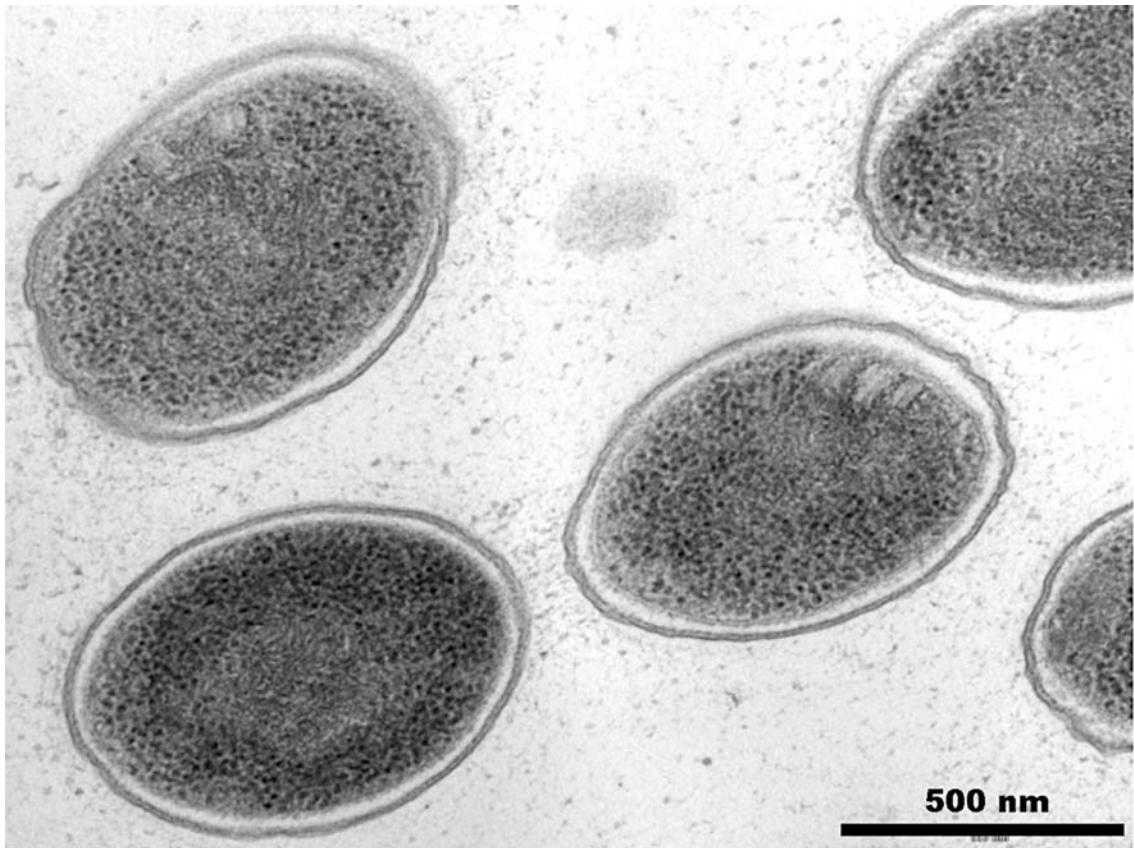
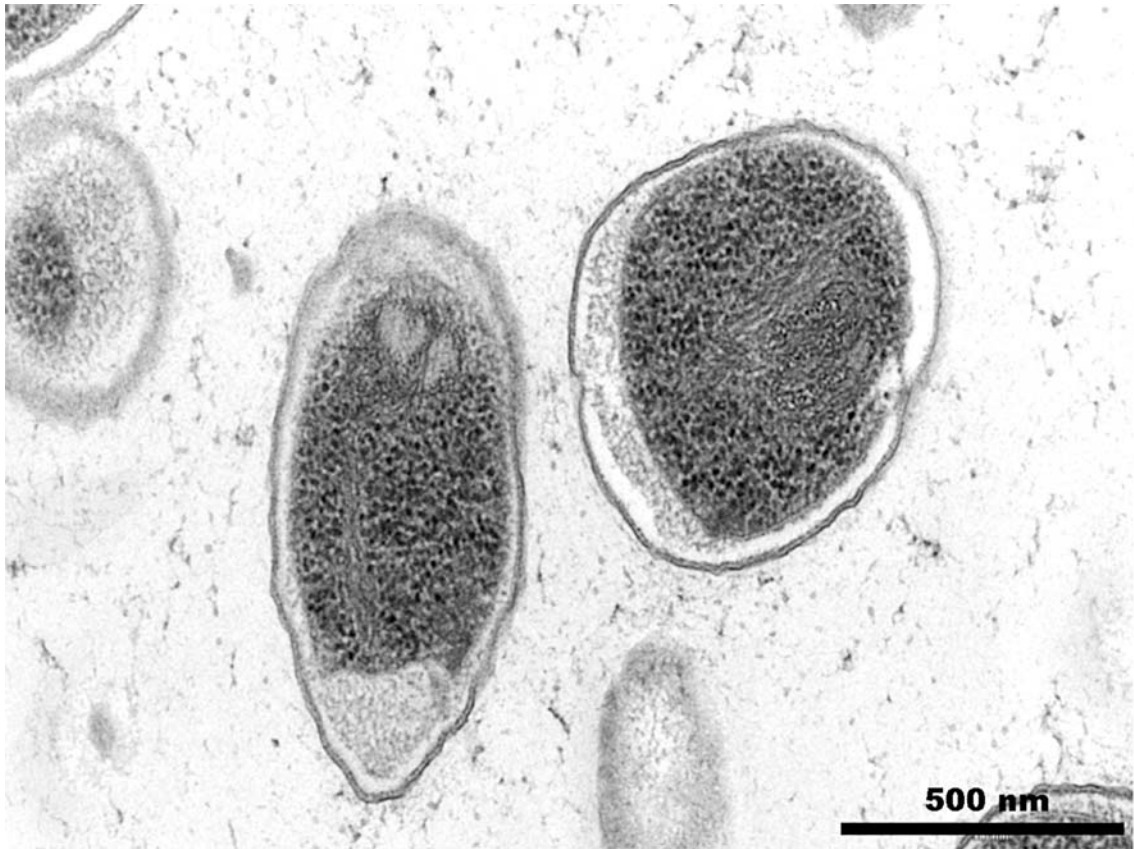
**1.3. Imágenes adicionales a Resultados, apartado 5**  
**(complementan las Figuras 23A-F)**

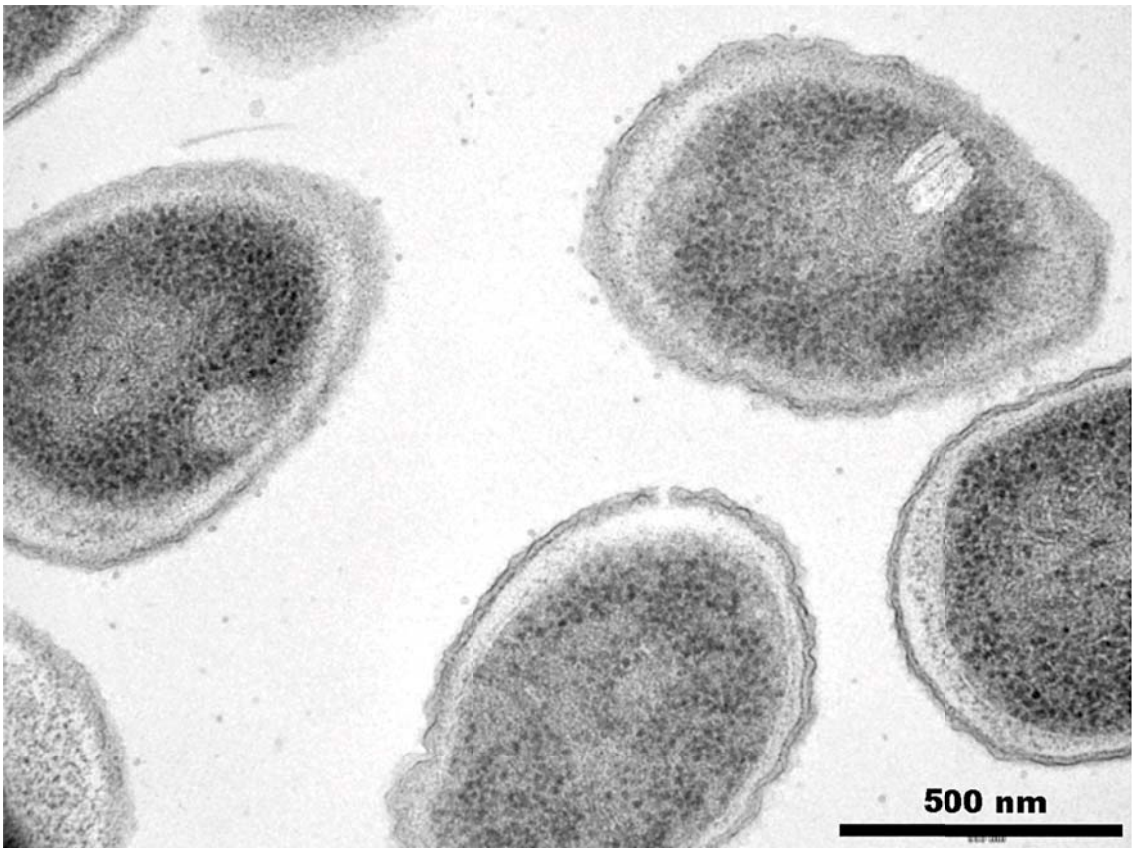
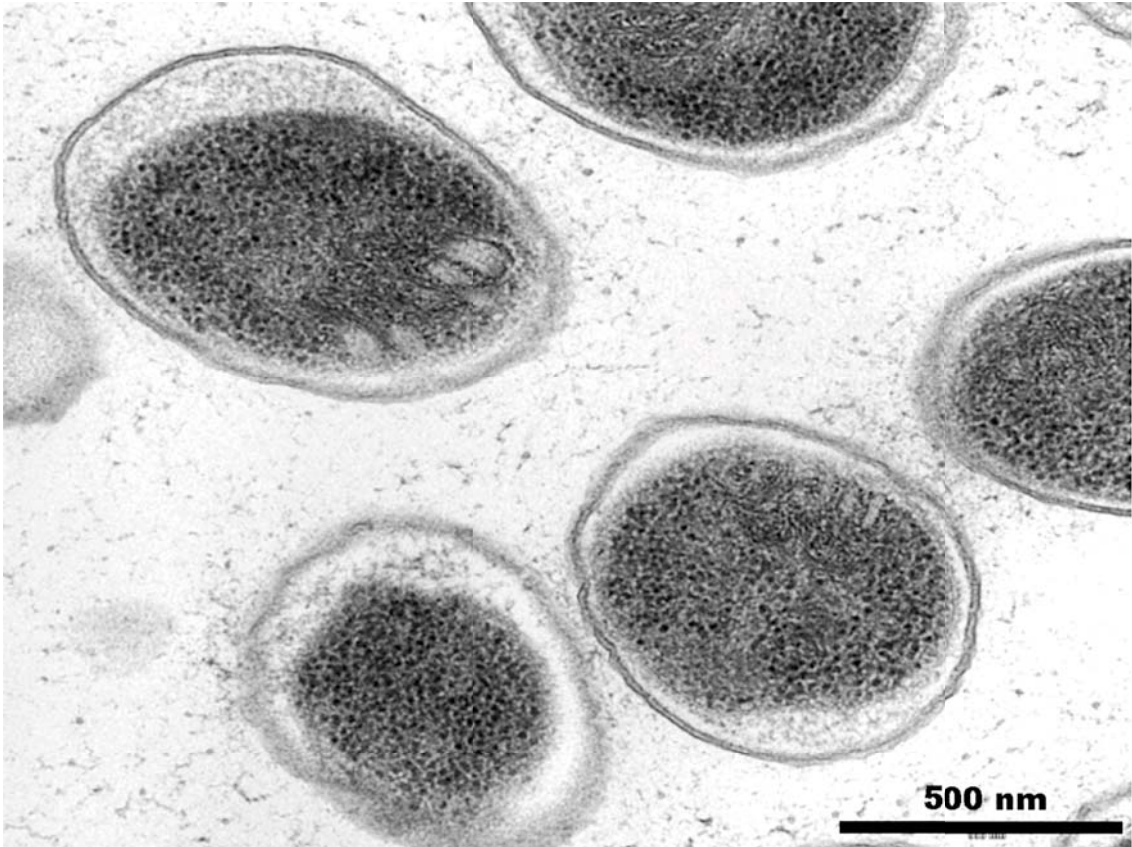






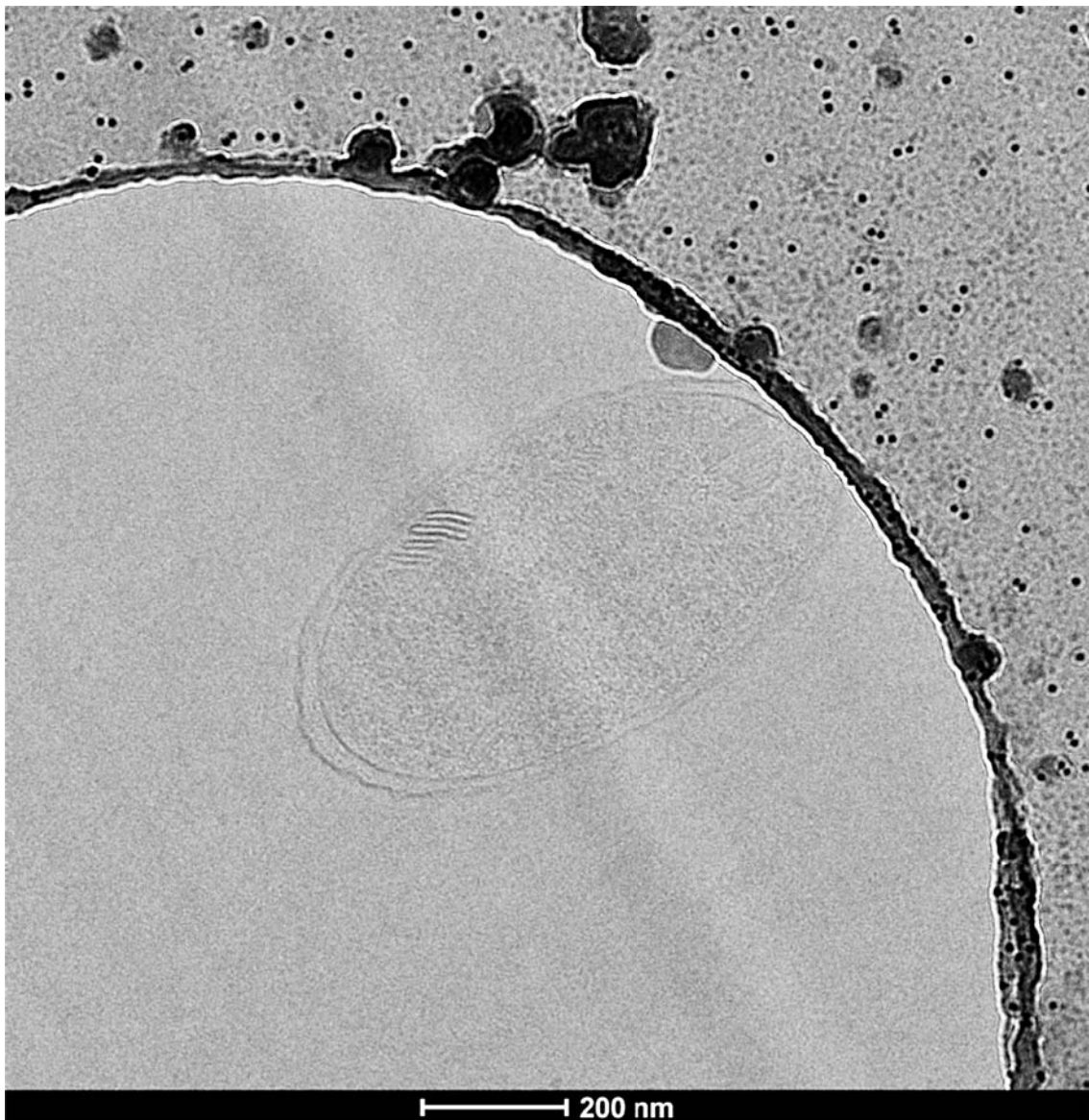




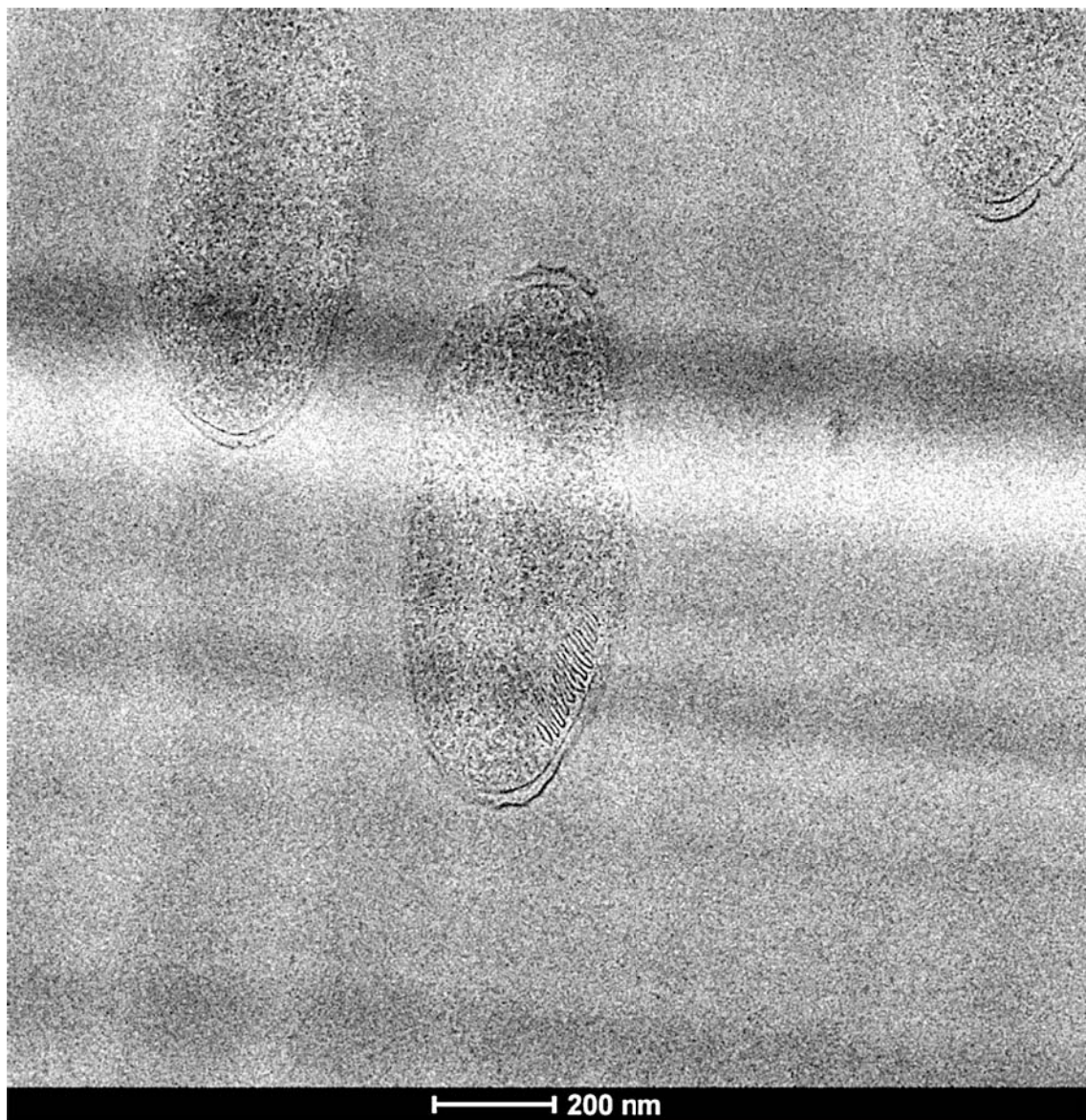


**2. Micrografías de secciones vítreas de células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> procesadas por HPF**

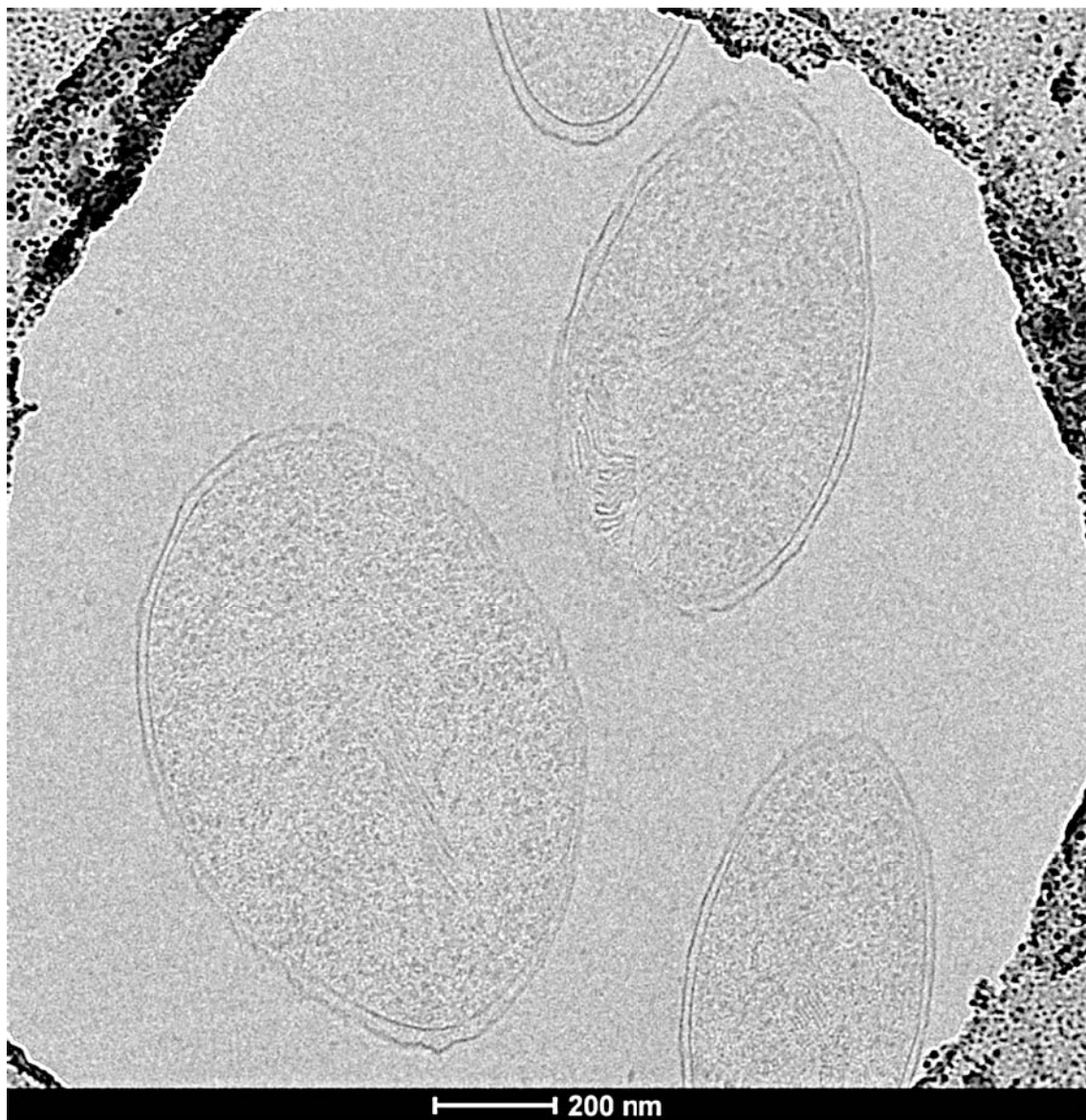
**2.1. Imágenes adicionales a las Figuras 13E y 13F de Resultados, apartado 3**





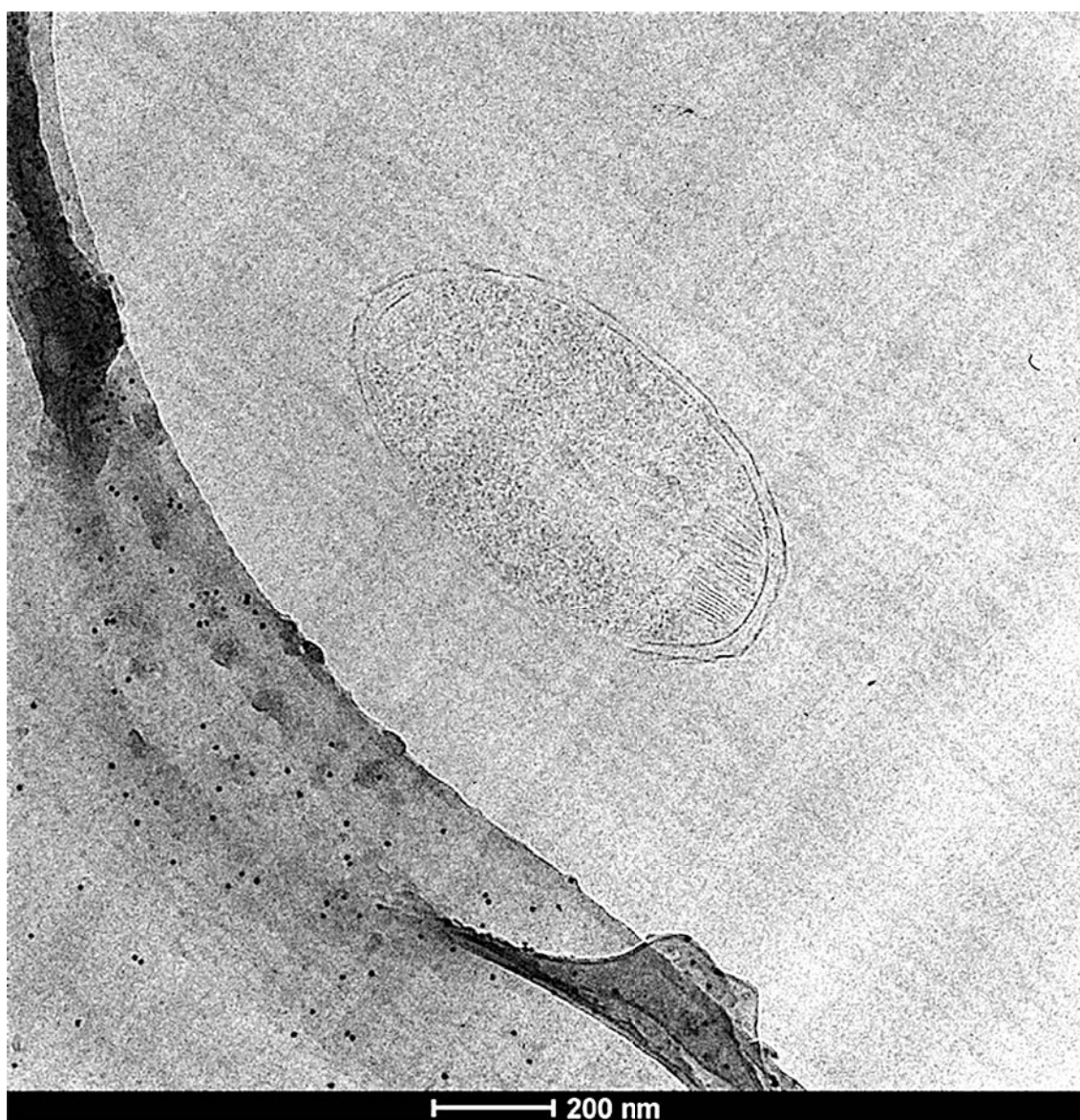






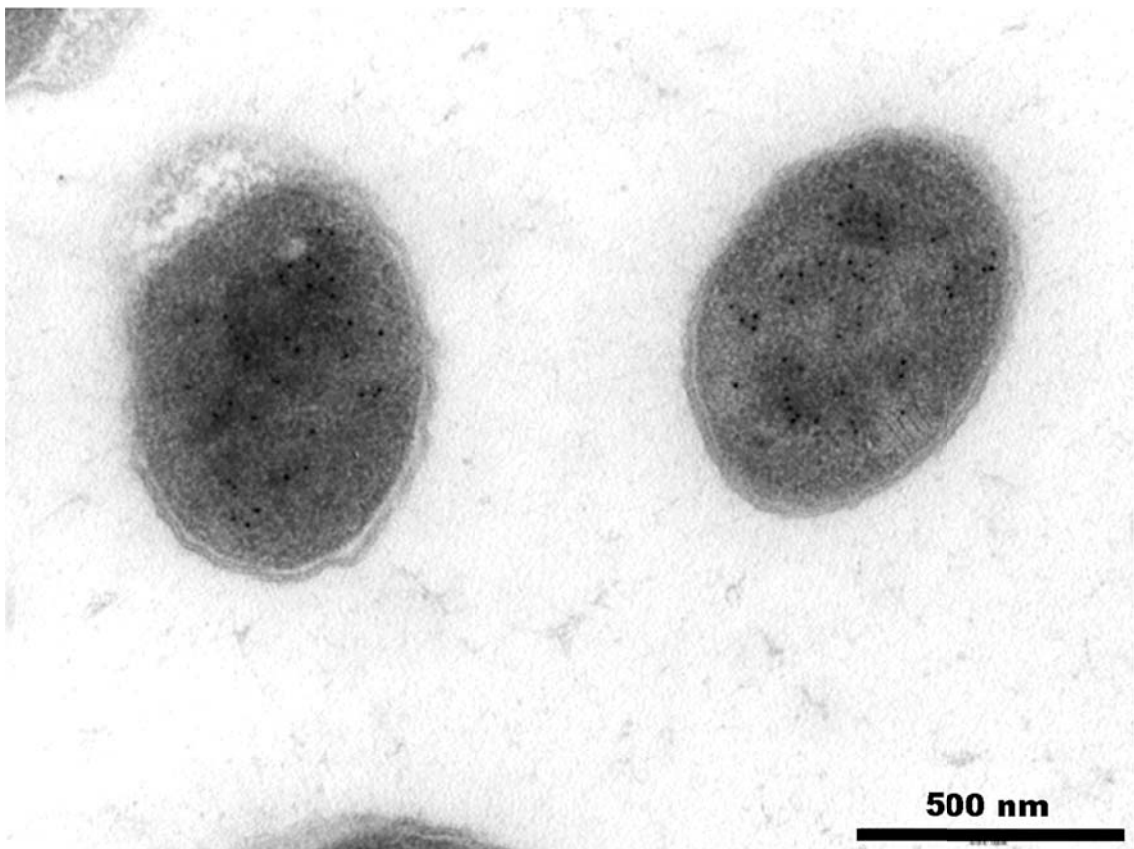


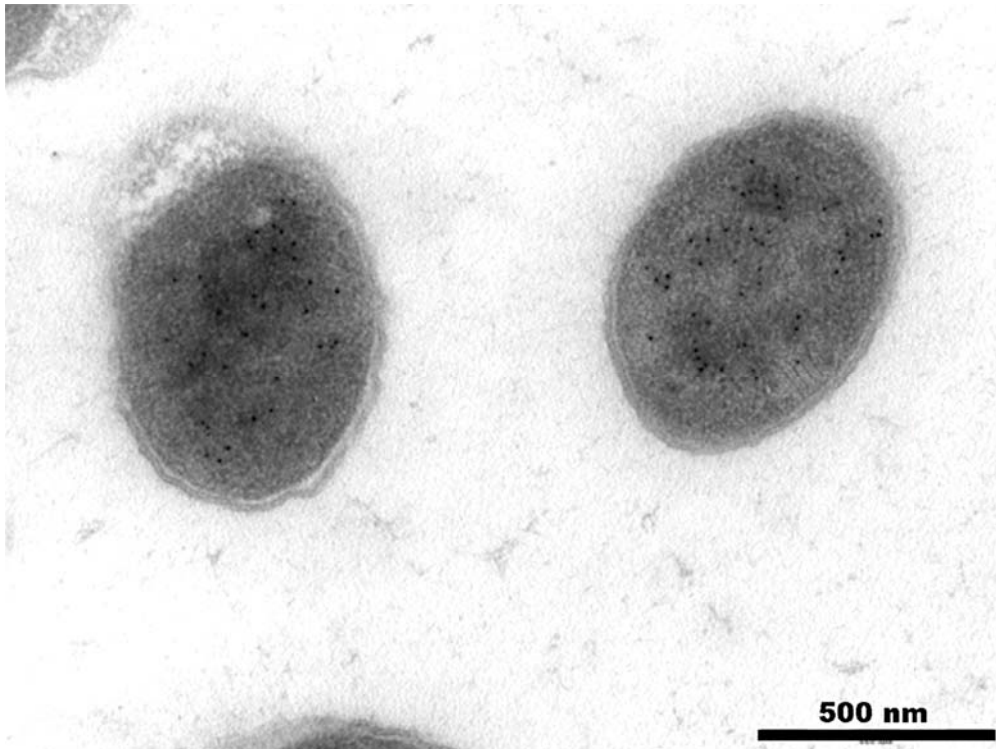




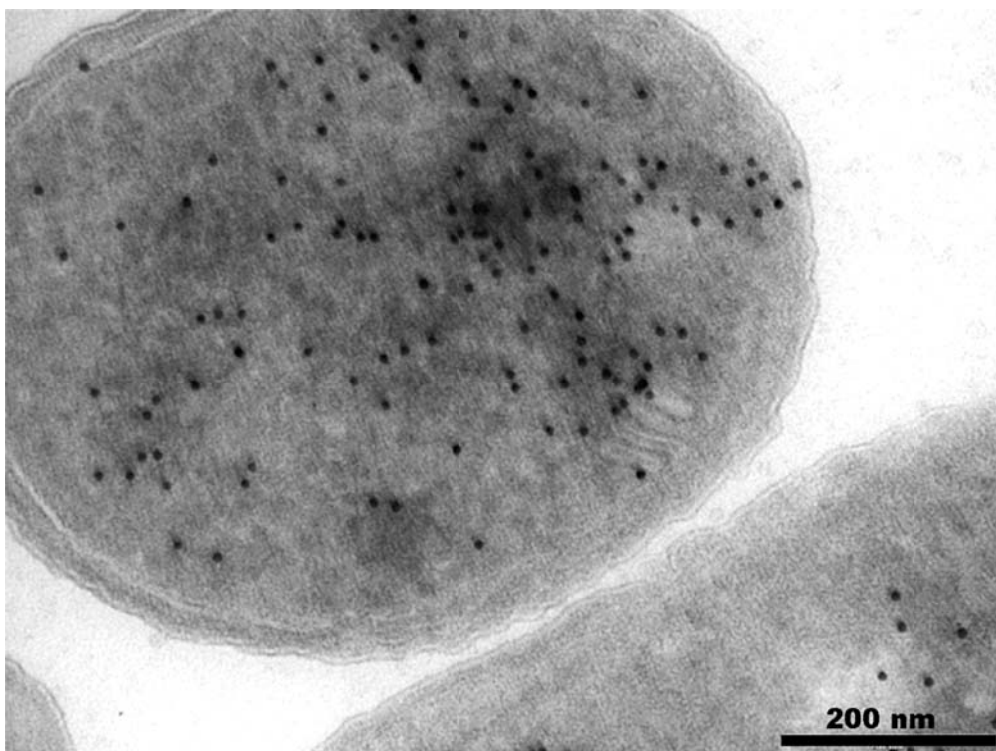
**3. Micrografías de inmunomarcaje en células de *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>**

**3.1. Marcaje de DNA en secciones de 60 nm HM23 de muestras procesadas por HPF-FS. Imágenes adicionales a la Figura 25A de Resultados, apartado 5.**

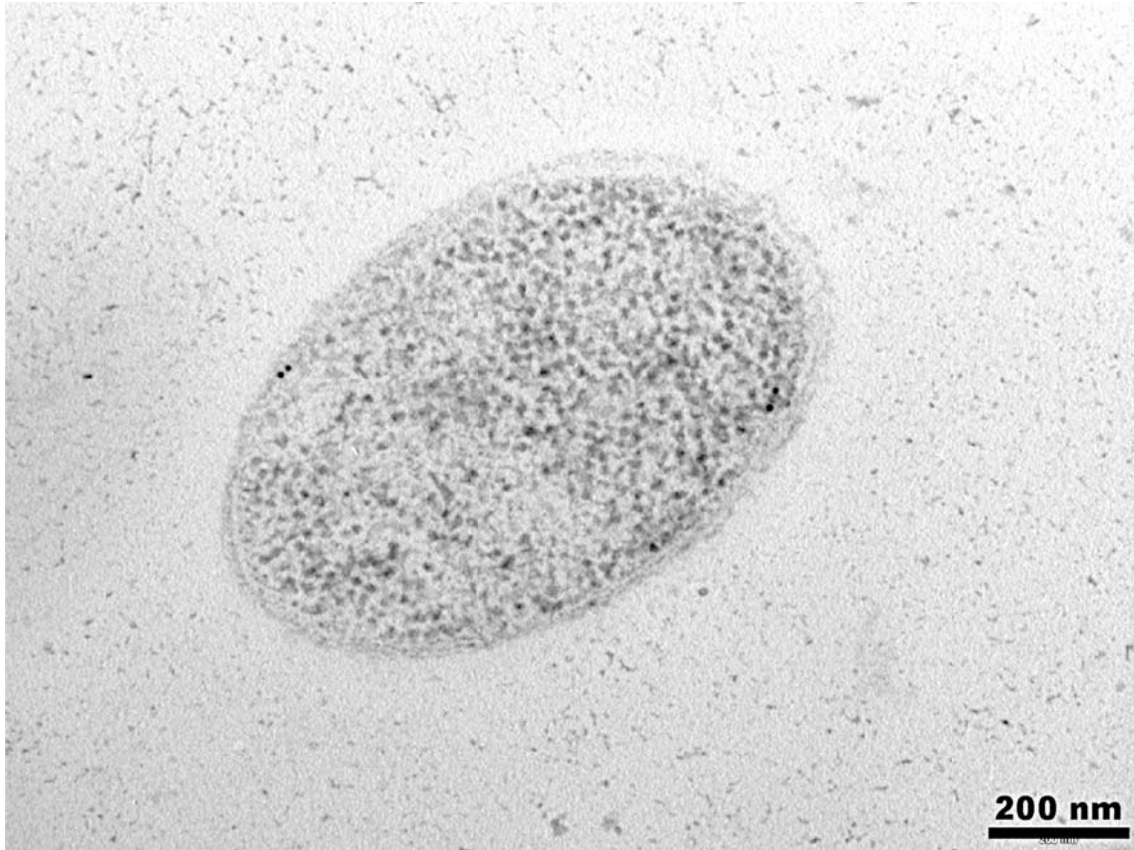




**3.2. Marcaje de DNA en secciones de 60 nm de muestras procesadas por Tokuyasu. Imagen adicional a la Figura 25B de Resultados, apartado 5.**



**3.3. Marcaje de SeqA en secciones de 60 nm de HM20 de muestras procesadas por HPF-FS. Imagen adicional a la Figura 26B de Resultados, apartado 5.**



**4. Vídeos**

Los vídeos referenciados en este apartado se encuentran en el CD-ROM adjuntado con la presente tesis. Los que están publicados, también se pueden visualizar en el link facilitado perteneciente a la revista PLOS ONE.

**4.1. Vídeo del tomograma de la Figura 16 de Resultados, apartado 4.1 (S1 en el CD-ROM)**

[www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s002](http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s002)

**4.2. Vídeo del tomograma de la Figura 17A-C de Resultados, apartado 4.1 (S2 en el CD-ROM)**

[www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s003](http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s003)

**4.3. Vídeo de la segmentación del tomograma S2, complementario a Figura 17D-F de Resultados, apartado 4.1 (S3 en el CD-ROM)**

[www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s004](http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s004)

**4.4. Vídeo del tomograma de la Figura 19A-B de Resultados, apartado 4.1 (S4 en el CD-ROM)**

[www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s005](http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0073297.s005)

**4.5. Vídeo del tomograma de la Figura 20A-D de Resultados, apartado 4.2 (S5 en el CD-ROM)**

- 4.6. Vídeo de la segmentación del tomograma S5, complementario a la Figura 20E de Resultados, apartado 4.2 (S6 en el CD-ROM)
- 4.7. Vídeo del tomograma de la Figura 21A-D de Resultados, apartado 4.2 (S7 en el CD-ROM)
- 4.8. Vídeo de la segmentación del tomograma S7, complementario a la Figura 21E de Resultados, apartado 4.2 (S8 en el CD-ROM)
- 4.9. Vídeo del tomograma de la Figura 22A de Resultados, apartado 4.2 (S9 en el CD-ROM)
- 4.10. Vídeo de la segmentación del tomograma S9, complementario a la Figura 22B de Resultados, apartado 4.2 (S10 en el CD-ROM).
- 4.11. Vídeo del tomograma de la Figura 22C de Resultados, apartado 4.2 (S11 en el CD-ROM)
- 4.12. Vídeo de la segmentación del tomograma S11, complementario a la Figura 22D de Resultados, apartado 4.2 (S12 en el CD-ROM)



## ***VIII. BIBLIOGRAFÍA***





- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., McDowell, A.W., 1984. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308, 32–36.
- Agulleiro, J.I., Fernández, J.J., 2011. Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics* 27, 582–583. doi:10.1093/bioinformatics/btq692
- Agulleiro, J.I., Garzón, E.M., García, I., Fernández, J.J., 2010. Vectorization with SIMD extensions speeds up reconstruction in electron tomography. *J. Struct. Biol.* 170, 570–575. doi:10.1016/j.jsb.2010.01.008
- Al-Amoudi, A., Castaño-Díez, D., Devos, D.P., Russell, R.B., Johnson, G.T., Frangakis, A.S., 2011. The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6480–6485. doi:10.1073/pnas.1019469108
- Al-Amoudi, A., Chang, J.-J., Leforestier, A., McDowell, A., Salamin, L.M., Norlén, L.P.O., Richter, K., Blanc, N.S., Studer, D., Dubochet, J., 2004. Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J.* 23, 3583–3588. doi:10.1038/sj.emboj.7600366
- Al-Amoudi, A., Díez, D.C., Betts, M.J., Frangakis, A.S., 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* 450, 832–837. doi:10.1038/nature05994
- Al-Amoudi, A., Dubochet, J., Gnaegi, H., Lüthi, W., Studer, D., 2003. An oscillating cryo-knife reduces cutting-induced deformation of vitreous ultrathin sections. *J. Microsc.* 212, 26–33.
- Al-Amoudi, A., Studer, D., Dubochet, J., 2005. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 150, 109–121. doi:10.1016/j.jsb.2005.01.003
- Allison, D.P., Daw, C.S., Rorvik, M.C., 1987. The construction and operation of a simple inexpensive slam freezing device for electron microscopy. *J. Microsc.* 147, 103–108.
- Bammes, B.E., Rochat, R.H., Jakana, J., Chen, D.-H., Chiu, W., 2012. Direct electron detection yields cryo-EM reconstructions at resolutions beyond 3/4 Nyquist frequency. *J. Struct. Biol.* 177, 589–601. doi:10.1016/j.jsb.2012.01.008

- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J., Mekalanos, J.J., 2012. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483, 182–186. doi:10.1038/nature10846
- Baumeister, W., Grimm, R., Walz, J., 1999. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol.* 9, 81–85.
- Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., Medalia, O., 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306, 1387–1390. doi:10.1126/science.1104808
- Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J.L., Segura, A., 2007. A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ. Microbiol.* 9, 1135–1145. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01236.x
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F., 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642–1645. doi:10.1126/science.1127344
- Bleck, C. k. e., Merz, A., Gutierrez, M. g., Walther, P., Dubochet, J., Zuber, B., Griffiths, G., 2010. Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Microsc.* 237, 23–38. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03299.x
- Bohrmann, B., Kellenberger, E., 1994. Immunostaining of DNA in electron microscopy: an amplification and staining procedure for thin sections as alternative to gold labeling. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 635–643. doi:10.1177/42.5.7512586
- Borgnia, M.J., Subramaniam, S., Milne, J.L.S., 2008. Three-dimensional imaging of the highly bent architecture of *Bdellovibrio bacteriovorus* by using cryo-electron tomography. *J. Bacteriol.* 190, 2588–2596. doi:10.1128/JB.01538-07
- Brandt, F., Etchells, S.A., Ortiz, J.O., Elcock, A.H., Hartl, F.U., Baumeister, W., 2009. The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell* 136, 261–271. doi:10.1016/j.cell.2008.11.016

- Briegel, A., Chen, S., Koster, A.J., Plitzko, J.M., Schwartz, C.L., Jensen, G.J., 2010. Correlated light and electron cryo-microscopy. *Methods Enzymol.* 481, 317–341. doi:10.1016/S0076-6879(10)81013-4
- Briegel, A., Dias, D.P., Li, Z., Jensen, R.B., Frangakis, A.S., Jensen, G.J., 2006. Multiple large filament bundles observed in *Caulobacter crescentus* by electron cryotomography. *Mol. Microbiol.* 62, 5–14. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05355.x
- Briegel, A., Ding, H.J., Li, Z., Werner, J., Gitai, Z., Dias, D.P., Jensen, R.B., Jensen, G.J., 2008. Location and architecture of the *Caulobacter crescentus* chemoreceptor array. *Mol. Microbiol.* 69, 30–41. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06219.x
- Brown, M.R.W., Kornberg, A., 2008. The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem. Sci.* 33, 284–290. doi:10.1016/j.tibs.2008.04.005
- Cannon, G.C., Bradburne, C.E., Aldrich, H.C., Baker, S.H., Heinhorst, S., Shively, J.M., 2001. Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5351–5361. doi:10.1128/AEM.67.12.5351-5361.2001
- Carlemalm, E., Villiger, W., Hobot, J.A., Acetarin, J.D., Kellenberger, E., 1985. Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *J. Microsc.* 140, 55–63.
- Carrión Fonseca, O., 2014. Caracterización de una nueva bacteria antártica, y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro [WWW Document]. TDX Tesis Dr. En Xarxa. URL <http://www.tdx.cat/handle/10803/283547>.
- Carrión, O., Miñana-Galbis, D., Montes, M.J., Mercadé, E., 2011. *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2401–2405. doi:10.1099/ijs.0.024919-0
- Chang, J.-J., McDowall, A.W., Lepault, J., Freeman, R., Walter, C.A., Dubochet, J., 1983. Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy. *J. Microsc.* 132, 109–123. doi:10.1111/j.1365-2818.1983.tb04714.x
- Chang, J., Liu, X., Rochat, R.H., Baker, M.L., Chiu, W., 2012. Reconstructing virus structures from nanometer to near-atomic resolutions with cryo-

- electron microscopy and tomography. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726, 49–90. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9\_4
- Chang, J.T., Schmid, M.F., Haase-Pettingell, C., Weigele, P.R., King, J.A., Chiu, W., 2010. Visualizing the structural changes of bacteriophage Epsilon15 and its *Salmonella* host during infection. *J. Mol. Biol.* 402, 731–740. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.058
- Chang, Y.-W., Chen, S., Tocheva, E.I., Treuner-Lange, A., Löbach, S., Søgaard-Andersen, L., Jensen, G.J., 2014. Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nat. Methods* 11, 737–739. doi:10.1038/nmeth.2961
- Chanzy, H., Franc, J.M., Herbage, D., 1976. High-angle electron diffraction of frozen hydrated collagen. *Biochem. J.* 153, 139–140.
- Chapman, G.B., Hillier, J., 1953. Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria I. Cellular division in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 66, 362–373.
- Charon, N.W., Goldstein, S.F., Marko, M., Hsieh, C., Gebhardt, L.L., Motaleb, M.A., Wolgemuth, C.W., Limberger, R.J., Rowe, N., 2009. The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J. Bacteriol.* 191, 600–607. doi:10.1128/JB.01288-08
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Hendrixson, D.R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E.I., Müller, A., Dobro, M.J., Jensen, G.J., 2011. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J.* 30, 2972–2981. doi:10.1038/emboj.2011.186
- Chiu, S.-W., Chen, S.-Y., Wong, H., 2008. Dynamic localization of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* and in the ectopic host bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6739–6745. doi:10.1128/AEM.01021-08
- Comolli, L.R., Baker, B.J., Downing, K.H., Siegerist, C.E., Banfield, J.F., 2008. Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon. *ISME J.* 3, 159–167. doi:10.1038/ismej.2008.99
- Comolli, L.R., Kundmann, M., Downing, K.H., 2006. Characterization of intact subcellular bodies in whole bacteria by cryo-electron tomography and spectroscopic imaging. *J. Microsc.* 223, 40–52. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01597.x

- Comolli, L.R., Luef, B., Chan, C.S., 2011. High-resolution 2D and 3D cryo-TEM reveals structural adaptations of two stalk-forming bacteria to an Fe-oxidizing lifestyle. *Environ. Microbiol.* 13, 2915–2929. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02567.x
- Comolli, L.R., Siegerist, C.E., Shin, S.-H., Bertozzi, C., Regan, W., Zettl, A., De Yoreo, J., 2013. Conformational transitions at an S-layer growing boundary resolved by cryo-TEM. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 52, 4829–4832. doi:10.1002/anie.201300543
- Cope, G.H., Williams, M.A., 1968. Quantitative studies on neutral lipid preservation in electron microscopy. *J. R. Microsc. Soc. G. B.* 88, 259–277.
- Cope, G.H., Williams, M.A., 1969a. Quantitative studies on the preservation of choline and ethanolamine phosphatides during tissue preparation for electron microscopy. I. Glutaraldehyde, osmium tetroxide, Araldite methods. *J. Microsc.* 90, 31–46.
- Cope, G.H., Williams, M.A., 1969b. Quantitative studies on the preservation of choline and ethanolamine phosphatides during tissue preparation for electron microscopy. II. Other preparative methods. *J. Microsc.* 90, 47–60.
- Costerton, J.W., 1979. The role of electron microscopy in the elucidation of bacterial structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 33, 459–479. doi:10.1146/annurev.mi.33.100179.002331
- Dai, W., Fu, C., Khant, H.A., Ludtke, S.J., Schmid, M.F., Chiu, W., 2014. Zernike phase-contrast electron cryotomography applied to marine cyanobacteria infected with cyanophages. *Nat. Protoc.* 9, 2630–2642. doi:10.1038/nprot.2014.176
- Dame, R.T., Kalmykova, O.J., Grainger, D.C., 2011. Chromosomal macrodomains and associated proteins: implications for DNA organization and replication in gram negative bacteria. *PLoS Genet.* 7, e1002123. doi:10.1371/journal.pgen.1002123
- Danev, R., Glaeser, R.M., Nagayama, K., 2009. Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* 109, 312–325. doi:10.1016/j.ultramic.2008.12.006

- Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H.D., Kühlbrandt, W., 2013. Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15301–15306. doi:10.1073/pnas.1305462110
- Deptuch, G., Besson, A., Rehak, P., Szelezniak, M., Wall, J., Winter, M., Zhu, Y., 2007. Direct electron imaging in electron microscopy with monolithic active pixel sensors. *Ultramicroscopy* 107, 674–684. doi:10.1016/j.ultramic.2007.01.003
- Diebolder, C.A., Koster, A.J., Koning, R.I., 2012. Pushing the resolution limits in cryo electron tomography of biological structures. *J. Microsc.* 248, 1–5. doi:10.1111/j.1365-2818.2012.03627.x
- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Koster, A.J., Baumeister, W., 1992. Towards automatic electron tomography. *Ultramicroscopy* 40, 71–87. doi:10.1016/0304-3991(92)90235-C
- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Baumeister, W., 1993. Towards automatic electron tomography II. Implementation of autofocus and low-dose procedures. *Ultramicroscopy* 49, 109–120. doi:10.1016/0304-3991(93)90217-L
- Diestra, E., Fontana, J., Guichard, P., Marco, S., Risco, C., 2009. Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 165, 157–168. doi:10.1016/j.jsb.2008.11.009
- Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., Carballido-López, R., 2011. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* 333, 225–228. doi:10.1126/science.1203466
- Dubochet, J., 2007. The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. *Methods Cell Biol.* 79, 7–21. doi:10.1016/S0091-679X(06)79001-X
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129–228.
- Dubochet, J., Adrian, M., Schultz, P., Oudet, P., 1986. Cryo-electron microscopy of vitrified SV40 minichromosomes: the liquid drop model. *EMBO J.* 5, 519–528.

- Dubochet, J., Lepault, J., 1984. Cryo-electron microscopy of vitrified water. *J de Physique* 45, 85–97.
- Dubochet, J., McDowell, A.W., 1984. Frozen hydrated sections, in: *Science of Biological Specimen Preparation*. pp. 147–152.
- Dubochet, J., Zuber, B., Eltsov, M., Bouchet-Marquis, C., Al-Amoudi, A., Livolant, F., 2007. How to “read” a vitreous section. *Methods Cell Biol.* 79, 385–406. doi:10.1016/S0091-679X(06)79015-X
- Eltsov, M., Dubochet, J., 2005. Fine structure of the *Deinococcus radiodurans* nucleoid revealed by cryoelectron microscopy of vitreous sections. *J. Bacteriol.* 187, 8047–8054. doi:10.1128/JB.187.23.8047-8054.2005
- Eltsov, M., Zuber, B., 2006. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. *J. Struct. Biol.* 156, 246–254. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.007
- Erickson, H.P., 1997. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.* 7, 362–367. doi:10.1016/S0962-8924(97)01108-2
- Escaig, J., 1982. New instruments which facilitate rapid freezing at 83 K and 6 K. *J. Microsc.* 126, 221–229. doi:10.1111/j.1365-2818.1982.tb00379.x
- Fernández, J.J., 2009. TOMOBFLOW: feature-preserving noise filtering for electron tomography. *BMC Bioinformatics* 10, 178. doi:10.1186/1471-2105-10-178
- Fernández, J.J., Li, S., 2003. An improved algorithm for anisotropic nonlinear diffusion for denoising cryo-tomograms. *J. Struct. Biol.* 144, 152–161.
- Fernández, J.J., Li, S., 2005. Anisotropic nonlinear filtering of cellular structures in cryoelectron tomography. *Comput. Sci. Eng.* 7, 54–61. doi:10.1109/MCSE.2005.89
- Fernández, J.J., Li, S., Lučić, V., 2007. Three-dimensional anisotropic noise reduction with automated parameter tuning: application to electron cryotomography, in: Borrajo, D., Castillo, L., Corchado, J.M. (Eds.), *Current Topics in Artificial Intelligence, Lecture Notes in Computer Science*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 60–69.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., Gober, J.W., 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 51, 1321–1332. doi:10.1111/j.1365-2958.2003.03936.x



- Fontana, J., López-Iglesias, C., Tzeng, W.-P., Frey, T.K., Fernández, J.J., Risco, C., 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* 405, 579–591. doi:10.1016/j.virol.2010.06.043
- Frangakis, A.S., Hegerl, R., 2001. Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *J. Struct. Biol.* 135, 239–250. doi:10.1006/jsbi.2001.4406
- Frank, J. (ed), 2006. *Electron tomography: methods for three-dimensional visualization of structures in the cell.* Springer, Berlin.
- Frigaard, N.-U., Voigt, G.D., Bryant, D.A., 2002. *Chlorobium tepidum* mutant lacking bacteriochlorophyll c made by inactivation of the bchK gene, encoding bacteriochlorophyll c synthase. *J. Bacteriol.* 184, 3368–3376. doi:10.1128/JB.184.12.3368-3376.2002
- Fu, C., Johnson, J.E., 2012. Structure and cell biology of archaeal virus STIV. *Curr. Opin. Virol.* 2, 122–127. doi:10.1016/j.coviro.2012.01.007
- Fu, C.-Y., Wang, K., Gan, L., Lanman, J., Khayat, R., Young, M.J., Jensen, G.J., Doerschuk, P.C., Johnson, J.E., 2010. In vivo assembly of an archaeal virus studied with whole-cell electron cryotomography. *Struct. Lond. Engl.* 1993 18, 1579–1586. doi:10.1016/j.str.2010.10.005
- Fukuda, Y., Nagayama, K., 2012. Zernike phase contrast cryo-electron tomography of whole mounted frozen cells. *J. Struct. Biol.* 177, 484–489. doi:10.1016/j.jsb.2011.11.018
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503–507. doi:10.1126/science.1068793
- Galway, M.E., Heckman, J.W., Hyde, G.J., Fowke, L.C., 1995. Advances in high-pressure and plunge-freeze fixation. *Methods Cell Biol.* 49, 3–19.
- Gan, L., Chen, S., Jensen, G.J., 2008. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18953–18957. doi:10.1073/pnas.0808035105
- Gan, L., Jensen, G.J., 2012. Electron tomography of cells. *Q. Rev. Biophys.* 45, 27–56. doi:10.1017/S0033583511000102
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z., Mitchison, T., 2011. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis

- machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* 333, 222–225. doi:10.1126/science.1203285
- Gilbert, P., 1972. Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections. *J. Theor. Biol.* 36, 105–117. doi:10.1016/0022-5193(72)90180-4
- Gitai, Z., 2005. The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* 120, 577–586. doi:10.1016/j.cell.2005.02.026
- Grandfield, K., Palmquist, A., Engqvist, H., 2012. High-resolution three-dimensional probes of biomaterials and their interfaces. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* 370, 1337–1351. doi:10.1098/rsta.2011.0253
- Griffith, J., Mari, M., De Mazière, A., Reggiori, F., 2008. A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 9, 1060–1072. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00753.x
- Griffiths, G., McDowall, A., Back, R., Dubochet, J., 1984. On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J. Ultrastruct. Res.* 89, 65–78.
- Grimm, R., Singh, H., Rachel, R., Typke, D., Zillig, W., Baumeister, W., 1998. Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophys. J.* 74, 1031–1042. doi:10.1016/S0006-3495(98)74028-7
- Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., Steven, A.C., 2003. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302, 1396–1398. doi:10.1126/science.1090284
- Gruska, M., Medalia, O., Baumeister, W., Leis, A., 2008. Electron tomography of vitreous sections from cultured mammalian cells. *J. Struct. Biol.* 161, 384–392. doi:10.1016/j.jsb.2007.10.008
- Guerrero-Ferreira, R.C., Wright, E.R., 2013. Cryo-electron tomography of bacterial viruses. *Virology* 435, 179–186. doi:10.1016/j.virol.2012.08.022
- Hayles, M.F., de Winter, D.A.M., Schneijdenberg, C.T.W.M., Meeldijk, J.D., Luecken, U., Person, H., de Water, J., de Jong, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., 2010. The making of frozen-hydrated, vitreous lamellas from cells for cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 172, 180–190. doi:10.1016/j.jsb.2010.07.004

- Hess, S.T., Girirajan, T.P.K., Mason, M.D., 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 91, 4258–4272. doi:10.1529/biophysj.106.091116
- Heuser, J.E., 2011. The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 60 Suppl 1, S3–29. doi:10.1093/jmicro/dfr044
- He, W., Cowin, P., Stokes, D.L., 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* 302, 109–113. doi:10.1126/science.1086957
- He, W., Fernández, J.J., 2010. Electron Tomography, in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester.
- He, W., Ladinsky, M.S., Huey-Tubman, K.E., Jensen, G.J., McIntosh, J.R., Björkman, P.J., 2008. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. *Nature* 455, 542–546. doi:10.1038/nature07255
- Heymann, J.B., Cardone, G., Winkler, D.C., Steven, A.C., 2008. Computational resources for cryo-electron tomography in Bsoft. *J. Struct. Biol.* 161, 232–242. doi:10.1016/j.jsb.2007.08.002
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Pitzko, J.M., Engelhardt, H., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3963–3967. doi:10.1073/pnas.0709530105
- Humbel, B.M., Marti, T., Muller, M., 1983. Improved structural preservation by combining freeze substitution and low temperature embedding. *Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb* 16, 585–594.
- Humbel, B.M., Muller, M., 1985. Freeze substitution and low temperature embedding, in: *In the Science of Biological Specimen Preparation for Microscopy and Microanalysis*. Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and Wolosewick, J.J., pp. 175–183.
- Iancu, C.V., Ding, H.J., Morris, D.M., Dias, D.P., Gonzales, A.D., Martino, A., Jensen, G.J., 2007. The structure of isolated *Synechococcus* strain WH8102 carboxysomes as revealed by electron cryotomography. *J. Mol. Biol.* 372, 764–773. doi:10.1016/j.jmb.2007.06.059

- Ingerson-Mahar, M., Briegel, A., Werner, J.N., Jensen, G.J., Gitai, Z., 2010. The metabolic enzyme CTP synthase forms cytoskeletal filaments. *Nat. Cell Biol.* 12, 739–746. doi:10.1038/ncb2087
- Jarrell, K.F., McBride, M.J., 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 466–476. doi:10.1038/nrmicro1900
- Jendrossek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191, 3195–3202. doi:10.1128/JB.01723-08
- Jensen, G.J., Briegel, A., 2007. How electron cryotomography is opening a new window onto prokaryotic ultrastructure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 260–267. doi:10.1016/j.sbi.2007.03.002
- Jiménez, N., Vocking, K., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Post, J.A., Verkleij, A.J., 2009. Tannic acid-mediated osmium impregnation after freeze-substitution: A strategy to enhance membrane contrast for electron tomography. *J. Struct. Biol.* 166, 103–106. doi:10.1016/j.jsb.2008.12.009
- Jin, L., Milazzo, A.-C., Kleinfelder, S., Li, S., Leblanc, P., Duttweiler, F., Bower, J.C., Peltier, S.T., Ellisman, M.H., Xuong, N.-H., 2008. Applications of direct detection device in transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 161, 352–358. doi:10.1016/j.jsb.2007.10.007
- Jones, L.J., Carballido-López, R., Errington, J., 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104, 913–922.
- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H., Rachel, R., 2008. *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch. Microbiol.* 190, 395–408. doi:10.1007/s00203-008-0402-6
- Kellenberger, E., Johansen, R., Maeder, M., Bohrmann, B., Stauffer, E., Villiger, W., 1992. Artefacts and morphological changes during chemical fixation. *J. Microsc.* 168, 181–201.
- Khursigara, C.M., Wu, X., Subramaniam, S., 2008. Chemoreceptors in *Caulobacter crescentus*: trimers of receptor dimers in a partially ordered

- hexagonally packed array. *J. Bacteriol.* 190, 6805–6810. doi:10.1128/JB.00640-08
- Kim, H.Y., Schlichtman, D., Shankar, S., Xie, Z., Chakrabarty, A.M., Kornberg, A., 1998. Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.* 27, 717–725.
- Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J., Iwasaki, K., 2010. Comparison of the envelope architecture of *E. coli* using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 59, 419–426. doi:10.1093/jmicro/dfq056
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., Jensen, G.J., 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* 311, 242–245. doi:10.1126/science.1123231
- Koning, R.I., Koster, A.J., 2009. Cryo-electron tomography in biology and medicine. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 191, 427–445. doi:10.1016/j.aanat.2009.04.003
- Konorty, M., Kahana, N., Linaroudis, A., Minsky, A., Medalia, O., 2008. Structural analysis of photosynthetic membranes by cryo-electron tomography of intact *Rhodospseudomonas viridis* cells. *J. Struct. Biol.* 161, 393–400. doi:10.1016/j.jsb.2007.09.014
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116, 71–76. doi:10.1006/jsbi.1996.0013
- Kudryashev, M., Cyrklaff, M., Wallich, R., Baumeister, W., Frischknecht, F., 2010. Distinct in situ structures of the *Borrelia flagellar* motor. *J. Struct. Biol.* 169, 54–61. doi:10.1016/j.jsb.2009.08.008
- Kürner, J., Frangakis, A.S., Baumeister, W., 2005. Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* 307, 436–438. doi:10.1126/science.1104031
- Ladinsky, M.S., Pierson, J.M., McIntosh, J.R., 2006. Vitreous cryo-sectioning of cells facilitated by a micromanipulator. *J. Microsc.* 224, 129–134. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01674.x

- Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., 2013. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 77, 497–526. doi:10.1128/MMBR.00021-13
- Lengyel, J.S., Milne, J.L.S., Subramaniam, S., 2008. Electron tomography in nanoparticle imaging and analysis. *Nanomed.* 3, 125–131. doi:10.2217/17435889.3.1.125
- Lieber, A., Leis, A., Kushmaro, A., Minsky, A., Medalia, O., 2009. Chromatin organization and radio resistance in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *J. Bacteriol.* 191, 1439–1445. doi:10.1128/JB.01513-08
- Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Sapiro, G., Subramaniam, S., 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455, 109–113. doi:10.1038/nature07159
- Liu, J., Lin, T., Botkin, D.J., McCrum, E., Winkler, H., Norris, S.J., 2009. Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *J. Bacteriol.* 191, 5026–5036. doi:10.1128/JB.00340-09
- Liu, J., McBride, M.J., Subramaniam, S., 2007. Cell surface filaments of the gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* revealed by cryo-electron tomography. *J. Bacteriol.* 189, 7503–7506. doi:10.1128/JB.00957-07
- Li, Z., Jensen, G.J., 2009. Electron cryotomography: a new view into microbial ultrastructure. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 333–340. doi:10.1016/j.mib.2009.03.007
- Li, Z., Trimble, M.J., Brun, Y.V., Jensen, G.J., 2007. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* 26, 4694–4708. doi:10.1038/sj.emboj.7601895
- Lucić, V., Förster, F., Baumeister, W., 2005. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 833–865. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074112
- Luft, J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409–414.
- Madigan, M.T., Martinko, Brock, T.D., 2006. Brock biology of microorganisms. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Marko, M., Hsieh, C., Moberlychan, W., Mannella, C.A., Frank, J., 2006. Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative

- to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples. *J. Microsc.* 222, 42–47. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01567.x
- Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J., Mannella, C., 2007. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 4, 215–217. doi:10.1038/nmeth1014
- Marko, M., Leith, A., Hsieh, C., Danev, R., 2011. Retrofit implementation of Zernike phase plate imaging for cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* 174, 400–412. doi:10.1016/j.jsb.2011.01.005
- Masich, S., Ostberg, T., Norlén, L., Shupliakov, O., Daneholt, B., 2006. A procedure to deposit fiducial markers on vitreous cryo-sections for cellular tomography. *J. Struct. Biol.* 156, 461–468. doi:10.1016/j.jsb.2006.05.010
- Mastrorade, D.N., 1997. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J. Struct. Biol.* 120, 343–352. doi:10.1006/jsbi.1997.3919
- Matias, V.R.F., Al-Amoudi, A., Dubochet, J., Beveridge, T.J., 2003. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 6112–6118.
- McDonald, K., Morphew, M.K., 1993. Improved preservation of ultrastructure in difficult-to-fix organisms by high pressure freezing and freeze substitution: I. *Drosophila melanogaster* and *Strongylocentrotus purpuratus* embryos. *Microsc. Res. Tech.* 24, 465–473. doi:10.1002/jemt.1070240603
- McDowall, A.W., Chang, J.J., Freeman, R., Lepault, J., Walter, C.A., Dubochet, J., 1983. Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J. Microsc.* 131, 1–9.
- McDowall, A.W., Chang, J.J., Freeman, R., Lepault, J., Walter, C.A., Dubochet, J., 1983. Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J. Microsc.* 131, 1–9.
- McMullan, G., Clark, A.T., Turchetta, R., Faruqi, A.R., 2009. Enhanced imaging in low dose electron microscopy using electron counting. *Ultramicroscopy* 109, 1411–1416. doi:10.1016/j.ultramic.2009.07.004

- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., Baumeister, W., 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 298, 1209–1213. doi:10.1126/science.1076184
- Mercogliano, C.P., DeRosier, D.J., 2007. Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 160, 70–82. doi:10.1016/j.jsb.2007.06.010
- Meryman, H.T., 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion (Paris)* 47, 935–945. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x
- Milazzo, A.-C., Cheng, A., Moeller, A., Lyumkis, D., Jacovetty, E., Polukas, J., Ellisman, M.H., Xuong, N.-H., Carragher, B., Potter, C.S., 2011. Initial evaluation of a direct detection device detector for single particle cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 176, 404–408. doi:10.1016/j.jsb.2011.09.002
- Milazzo, A.-C., Leblanc, P., Duttweiler, F., Jin, L., Bouwer, J.C., Peltier, S., Ellisman, M., Bieser, F., Matis, H.S., Wieman, H., Denes, P., Kleinfelder, S., Xuong, N.-H., 2005. Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy. *Ultramicroscopy* 104, 152–159. doi:10.1016/j.ultramic.2005.03.006
- Milazzo, A.-C., Moldovan, G., Lanman, J., Jin, L., Bouwer, J.C., Klienfelder, S., Peltier, S.T., Ellisman, M.H., Kirkland, A.I., Xuong, N.-H., 2010. Characterization of a direct detection device imaging camera for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* 110, 744–747. doi:10.1016/j.ultramic.2010.03.007
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., 2009. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 2084–2091. doi:10.1016/j.bbamem.2009.04.003
- Milne, J.L.S., Subramaniam, S., 2009. Cryo-electron tomography of bacteria: progress, challenges and future prospects. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 666–675. doi:10.1038/nrmicro2183
- Mlouka, A., Comte, K., Castets, A.-M., Bouchier, C., Tandeau de Marsac, N., 2004. The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. *J. Bacteriol.* 186, 2355–2365.



- Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H., Huber, R., 2005. The unique structure of archaeal “hami”, highly complex cell appendages with nanograppling hooks. *Mol. Microbiol.* 56, 361–370. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04294.x
- Molina, F., Sánchez-Romero, M.A., Jiménez-Sánchez, A., 2008. Dynamic organization of replication forks into factories in *Escherichia coli*. *Process Biochem., Metabolic Engineering* 43, 1171–1177. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.017
- Moor, H., Bellin, G., Sandri, C., Akert, K., 1980. The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. *Cell Tissue Res.* 209, 201–216.
- Murk, J.L. a. N., Posthuma, G., Koster, A.J., Geuze, H.J., Verkleij, A.J., Kleijmeer, M.J., Humbel, B.M., 2003. Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. *J. Microsc.* 212, 81–90.
- Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Jensen, G.J., 2006. In situ structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. *Nature* 442, 1062–1064. doi:10.1038/nature05015
- Murphy, G.E., Matson, E.G., Leadbetter, J.R., Berg, H.C., Jensen, G.J., 2008. Novel ultrastructures of *Treponema primitia* and their implications for motility. *Mol. Microbiol.* 67, 1184–1195. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06120.x
- Nagayama, K., Danev, R., 2009. Phase-plate electron microscopy: a novel imaging tool to reveal close-to-life nano-structures. *Biophys. Rev.* 1, 37–42. doi:10.1007/s12551-008-0006-z
- Nans, A., Saibil, H.R., Hayward, R.D., 2014. Pathogen–host reorganization during *Chlamydia* invasion revealed by cryo-electron tomography. *Cell. Microbiol.* 16, 1457–1472. doi:10.1111/cmi.12310
- Newman, G., Crooke, E., 2000. DnaA, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, is located at the cell membrane. *J. Bacteriol.* 182, 2604–2610.
- Nicastro, D., Schwartz, C., Pierson, J., Gaudette, R., Porter, M.E., McIntosh, J.R., 2006. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science* 313, 944–948. doi:10.1126/science.1128618

- Nickell, S., Kofler, C., Leis, A.P., Baumeister, W., 2006. A visual approach to proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 225–230. doi:10.1038/nrm1861
- Niederman, R.A., 2006. Structure, function and formation of bacterial intracytoplasmic membranes, in: Shively, J.M. (Ed.), *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, pp. 193–227.
- Nitta, K., Kaneko, Y., 2004. Simple plunge freezing applied to plant tissues for capturing the ultrastructure close to the living state. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 53, 677–680.
- North, A.J., Bardsley, W.G., Hyam, J., Bornslaeger, E.A., Cordingley, H.C., Trinnaman, B., Hatzfeld, M., Green, K.J., Magee, A.I., Garrod, D.R., 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 23), 4325–4336.
- Nudelman, F., With, G. de, Sommerdijk, N.A.J.M., 2010. Cryo-electron tomography: 3-dimensional imaging of soft matter. *Soft Matter* 7, 17–24. doi:10.1039/C0SM00441C
- Palade, G.E., Porter, K.R., 1954. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *J. Exp. Med.* 100, 641–656.
- Patla, I., Volberg, T., Elad, N., Hirschfeld-Warneken, V., Grashoff, C., Fässler, R., Spatz, J.P., Geiger, B., Medalia, O., 2010. Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nat. Cell Biol.* 12, 909–915. doi:10.1038/ncb2095
- Paul, T.R., Beveridge, T.J., 1992. Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J. Bacteriol.* 174, 6508–6517.
- Paul, T.R., Beveridge, T.J., 1994. Preservation of surface lipids and determination of ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by freeze-substitution. *Infect. Immun.* 62, 1542–1550.
- Pease, D.C., Porter, K.R., 1981. Electron microscopy and ultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 91, 287s–292s.
- Pierson, J., Fernández, J.J., Bos, E., Amini, S., Gnaegi, H., Vos, M., Bel, B., Adolfsen, F., Carrascosa, J.L., Peters, P.J., 2010. Improving the technique of vitreous cryo-sectioning for cryo-electron tomography:

- Electrostatic charging for section attachment and implementation of an anti-contamination glove box. *J. Struct. Biol.* 169, 219–225. doi:10.1016/j.jsb.2009.10.001
- Pierson, J., Vos, M., McIntosh, J.R., Peters, P.J., 2011. Perspectives on electron cryo-tomography of vitreous cryo-sections. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 60 Suppl 1, S93–100. doi:10.1093/jmicro/dfr014
- Pietikäinen, J., Pettersson, M., Bååth, E., 2005. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 49–58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
- Pilhofer, M., Ladinsky, M.S., McDowell, A.W., Jensen, G.J., 2010. Bacterial TEM: new insights from cryo-microscopy. *Methods Cell Biol.* 96, 21–45. doi:10.1016/S0091-679X(10)96002-0
- Plitzko, J.M., Rigort, A., Leis, A., 2009. Correlative cryo-light microscopy and cryo-electron tomography: from cellular territories to molecular landscapes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 83–89. doi:10.1016/j.copbio.2009.03.008
- Pontefract, R.D., Bergeron, G., Thatcher, F.S., 1969. Mesosomes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 97, 367–375.
- Ramachandra, R., Bouwer, J.C., Mackey, M.R., Bushong, E., Peltier, S.T., Xuong, N.-H., Ellisman, M.H., 2014. Improving signal to noise in labeled biological specimens using energy-filtered TEM of sections with a drift correction strategy and a direct detection device. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* 20, 706–714. doi:10.1017/S1431927614000452
- Rao, N.N., Gómez-García, M.R., Kornberg, A., 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 605–647. doi:10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039
- Richter, T., Biel, S.S., Sattler, M., Wenck, H., Wittern, K.-P., Wiesendanger, R., Wepf, R., 2007. Pros and cons: cryo-electron microscopic evaluation of block faces versus cryo-sections from frozen-hydrated skin specimens prepared by different techniques. *J. Microsc.* 225, 201–207. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01732.x
- Riehle, U., Hoehli, M., 1973. The theory and technique of high pressure freezing, freeze etching techniques and applications. Benedetti EL,

- Favard P (eds). ed. Société Française de Microscopie Electronique, Paris.
- Rigort, A., Bäuerlein, F.J.B., Leis, A., Gruska, M., Hoffmann, C., Laugks, T., Böhm, U., Eibauer, M., Gnaegi, H., Baumeister, W., Pitzko, J.M., 2010. Micromachining tools and correlative approaches for cellular cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.* 172, 169–179. doi:10.1016/j.jsb.2010.02.011
- Roth, J., Bendayan, M., Carlemalm, E., Villiger, W., Garavito, M., 1981. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 29, 663–671.
- Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3, 793–795. doi:10.1038/nmeth929
- Saibil, H.R., Seybert, A., Habermann, A., Winkler, J., Eltsov, M., Perkovic, M., Castaño-Díez, D., Scheffer, M.P., Haselmann, U., Chlanda, P., Lindquist, S., Tyedmers, J., Frangakis, A.S., 2012. Heritable yeast prions have a highly organized three-dimensional architecture with interfiber structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14906–14911. doi:10.1073/pnas.1211976109
- Saier, M.H., 2013. Microcompartments and protein machines in prokaryotes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23, 243–269. doi:10.1159/000351625
- Salje, J., Zuber, B., Löwe, J., 2009. Electron cryomicroscopy of *E. coli* reveals filament bundles involved in plasmid DNA segregation. *Science* 323, 509–512. doi:10.1126/science.1164346
- Sánchez-Romero, M.A., Busby, S.J.W., Dyer, N.P., Ott, S., Millard, A.D., Grainger, D.C., 2010. Dynamic distribution of SeqA protein across the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *mBio* 1. doi:10.1128/mBio.00012-10
- Sani, M., Houben, E.N.G., Geurtsen, J., Pierson, J., de Punder, K., van Zon, M., Wever, B., Piersma, S.R., Jiménez, C.R., Daffé, M., Appelmelk, B.J., Bitter, W., van der Wel, N., Peters, P.J., 2010. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog.* 6, e1000794. doi:10.1371/journal.ppat.1000794

- Santarella-Mellwig, R., Pruggnaller, S., Roos, N., Mattaj, I.W., Devos, D.P., 2013. Three-dimensional reconstruction of bacteria with a complex endomembrane system. *PLoS Biol* 11, e1001565. doi:10.1371/journal.pbio.1001565
- Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Pitzko, J.M., Schüler, D., 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* 440, 110–114. doi:10.1038/nature04382
- Schlimpert, S., Klein, E.A., Briegel, A., Hughes, V., Kahnt, J., Bolte, K., Maier, U.G., Brun, Y.V., Jensen, G.J., Gitai, Z., Thanbichler, M., 2012. General protein diffusion barriers create compartments within bacterial cells. *Cell* 151, 1270–1282. doi:10.1016/j.cell.2012.10.046
- Schmid, M.F., Paredes, A.M., Khant, H.A., Soyer, F., Aldrich, H.C., Chiu, W., Shively, J.M., 2006. Structure of *Halothiobacillus neapolitanus* carboxysomes by cryo-electron tomography. *J. Mol. Biol.* 364, 526–535. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.024
- Schwarz, H., Humbel, B.M., 1989. Influence of fixatives and embedding media on immunolabelling of freeze-substituted cells. *Scanning Microsc. Suppl.* 3, 57–63; discussion 63–64.
- Shetty, A., Chen, S., Tocheva, E.I., Jensen, G.J., Hickey, W.J., 2011. Nanopods: a new bacterial structure and mechanism for deployment of outer membrane vesicles. *PLoS ONE* 6, e20725. doi:10.1371/journal.pone.0020725
- Shih, Y.-L., Le, T., Rothfield, L., 2003. Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7865–7870. doi:10.1073/pnas.1232225100
- Shih, Y.-L., Rothfield, L., 2006. The bacterial cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 70, 729–754. doi:10.1128/MMBR.00017-06
- Shimoni, E., Müller, M., 1998. On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device. *J. Microsc.* 192, 236–247.
- Shin, S.-H., Comolli, L.R., Tscheliessnig, R., Wang, C., Nam, K.T., Hexemer, A., Siegerist, C.E., De Yoreo, J.J., Bertozzi, C.R., 2013. Self-assembly of

- “S-bilayers”, a step toward expanding the dimensionality of S-layer assemblies. *ACS Nano* 7, 4946–4953. doi:10.1021/nn400263j
- Shively, J.M., Bryant, D.A., Fuller, R.C., Konopka, A.E., Stevens Jr., S.E., Strohl, W.R., 1988. Functional Inclusions in prokaryotic cells, in: K.W. Jeon and M. Friedlander (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 35–100.
- Simon, R.D., 1971. Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 265–267.
- Slater, S., Wold, S., Lu, M., Boye, E., Skarstad, K., Kleckner, N., 1995. *E. coli* SeqA protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* 82, 927–936.
- Srivastava, P., Demarre, G., Karpova, T.S., McNally, J., Chattoraj, D.K., 2007. Changes in nucleoid morphology and origin localization upon inhibition or alteration of the actin homolog, MreB, of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 189, 7450–7463. doi:10.1128/JB.00362-07
- Stempak, J.G., Ward, R.T., 1964. An improved staining method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 22, 697–701.
- Steven, A., Belnap, D., 2005. Electron microscopy and image processing: an essential tool for structural analysis of macromolecules. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Editor. Board John E Coligan AI Chapter 17, Unit 17.2. doi:10.1002/0471140864.ps1702s42
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A., Eggli, P., 2001. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J. Microsc.* 203, 285–294.
- Studer, D., Hennecke, H., Müller, M., 1992. High-pressure freezing of soybean nodules leads to an improved preservation of ultrastructure. *Planta* 188, 155–163. doi:10.1007/BF00216809
- Studer, D., Humbel, B.M., Chiquet, M., 2008. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem. Cell Biol.* 130, 877–889. doi:10.1007/s00418-008-0500-1
- Studer, D., Klein, A., Iacovache, I., Gnaegi, H., Zuber, B., 2014. A new tool based on two micromanipulators facilitates the handling of ultrathin

- cryosection ribbons. *J. Struct. Biol.* 185, 125–128.  
doi:10.1016/j.jsb.2013.11.005
- Studer, D., Michel, M., Wohlwend, M., Hunziker, E.B., Buschmann, M.D., 1995. Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. *J. Microsc.* 179, 321–332.
- Subramaniam, S., 2005. Bridging the imaging gap: visualizing subcellular architecture with electron tomography. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 316–322.  
doi:10.1016/j.mib.2005.04.012
- Swulius, M.T., Chen, S., Jane Ding, H., Li, Z., Briegel, A., Pilhofer, M., Tocheva, E.I., Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Sandkvist, M., Jensen, G.J., 2011. Long helical filaments are not seen encircling cells in electron cryotomograms of rod-shaped bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 650–655. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.062
- Tang, H., Braun, T.F., Blair, D.F., 1996. Motility protein complexes in the bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 261, 209–221.  
doi:10.1006/jmbi.1996.0453
- Taylor, K.A., Glaeser, R.M., 1974. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* 186, 1036–1037.
- Taylor, K.A., Glaeser, R.M., 1976. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *J. Ultrastruct. Res.* 55, 448–456.  
doi:10.1016/S0022-5320(76)80099-8
- Thomas, D., Morgan, D.G., DeRosier, D.J., 2001. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J. Bacteriol.* 183, 6404–6412. doi:10.1128/JB.183.21.6404-6412.2001
- Ting, C.S., Hsieh, C., Sundararaman, S., Mannella, C., Marko, M., 2007. Cryo-electron tomography reveals the comparative three-dimensional architecture of *Prochlorococcus*, a globally important marine cyanobacterium. *J. Bacteriol.* 189, 4485–4493. doi:10.1128/JB.01948-06
- Tokuyasu, K.T., 1973. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* 57, 551–565. doi:10.1083/jcb.57.2.551
- Van den Bergh, B.A., Swartzendruber, D.C., Bos-Van der Geest, A., Hoogstraate, J.J., Schrijvers, A.H., Boddé, H.E., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 1997. Development of an optimal protocol for the

- ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. *J. Microsc.* 187, 125–133.
- Van Dorssen, R.J., Vasmel, H., Amesz, J., 1986. Pigment organization and energy transfer in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: II. The chlorosome. *Photosynth. Res.* 9, 33–45. doi:10.1007/BF00029729
- Van Harreveld, A., Crowell, J., 1964. Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation. *Anat. Rec.* 149, 381–385. doi:10.1002/ar.1091490307
- Vanhecke, D., Asano, S., Kochovski, Z., Fernández-Busnadiego, R., Schrod, N., Baumeister, W., Lučić, V., 2011. Cryo-electron tomography: methodology, developments and biological applications. *J. Microsc.* 242, 221–227. doi:10.1111/j.1365-2818.2010.03478.x
- Vanhecke, D., Graber, W., Studer, D., 2008. Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing. *Methods Cell Biol.* 88, 151–164. doi:10.1016/S0091-679X(08)00409-3
- Villa, E., Schaffer, M., Plitzko, J.M., Baumeister, W., 2013. Opening windows into the cell: focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 771–777. doi:10.1016/j.sbi.2013.08.006
- Voortman, L.M., Vulović, M., Maletta, M., Voigt, A., Franken, E.M., Simonetti, A., Peters, P.J., van Vliet, L.J., Rieger, B., 2014. Quantifying resolution limiting factors in subtomogram averaged cryo-electron tomography using simulations. *J. Struct. Biol.* 187, 103–111. doi:10.1016/j.jsb.2014.06.007
- Walther, P., Ziegler, A., 2002. Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water. *J. Microsc.* 208, 3–10. doi:10.1046/j.1365-2818.2002.01064.x
- Wang, Q., Mercogliano, C.P., Löwe, J., 2011. A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. *Struct. Lond. Engl.* 19, 147–154. doi:10.1016/j.str.2010.12.002
- White, D.L., Andrews, S.B., Faller, J.W., Barnett, R.J., 1976. The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by x-ray photoelectron spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 436, 577–592.



- Wikström, M., Kelly, A.A., Georgiev, A., Eriksson, H.M., Klement, M.R., Bogdanov, M., Dowhan, W., Wieslander, A., 2009. Lipid-engineered *Escherichia coli* membranes reveal critical lipid headgroup size for protein function. *J. Biol. Chem.* 284, 954–965. doi:10.1074/jbc.M804482200
- Wyffels, J.T., 2001. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, Fourth Edition, by M. A. Hayat. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* 7, 66. doi:10.1017.S1431927601010066
- Zanetti, G., Prinz, S., Daum, S., Meister, A., Schekman, R., Bacia, K., Briggs, J.A., 2013. The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes. *eLife* 2, e00951. doi:10.7554/eLife.00951
- Zhang, P., Bos, E., Heymann, J., Gnaegi, H., Kessel, M., Peters, P.J., Subramaniam, S., 2004. Direct visualization of receptor arrays in frozen-hydrated sections and plunge-frozen specimens of *E. coli* engineered to overproduce the chemotaxis receptor Tsr. *J. Microsc.* 216, 76–83. doi:10.1111/j.0022-2720.2004.01395.x
- Zhang, X., Sherman, D.M., Sherman, L.A., 2014. The uptake hydrogenase in the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece sp.* strain PCC 7822 protects nitrogenase from oxygen toxicity. *J. Bacteriol.* 196, 840–849. doi:10.1128/JB.01248-13
- Zhao, X., Norris, S.J., Liu, J., 2014. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 4323–4333. doi:10.1021/bi500059y
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffé, M., 2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* 190, 5672–5680. doi:10.1128/JB.01919-07

## ***XIX. PUBLICACIONES***



Delgado L, Martínez G, López-Iglesias C, Mercadé E (2014) Cryo-Electron Tomography of Plunge-Frozen whole bacteria and Vitreous Sections to analyze the recently described bacterial cytoplasmic structure, the Stack. *Journal of Structural Biology* (en revisión).

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*. DOI: 10.1371/journal.pone.0073297.



# 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>1</sup>, Carmen López-Iglesias<sup>1</sup>, Elena Mercadé<sup>2\*</sup>

**1** Crio-Microscòpia Electrònica, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** 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 replica, or cryoelectron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS) 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; carmenli@ccit.ub.edu (CLL)

## Introduction

For many years, bacterial cytoplasm was thought to be a homogeneous compartment containing macromolecules and few structures of interest in comparison with eukaryotic cells. In most prokaryotes, when the cytoplasm is visualized by conventional transmission electron microscopy (TEM), it is only possible to observe irregular areas with a fibrous appearance corresponding to the nucleoid and a large amount of small granules scattered throughout the rest of the cytoplasm that correspond to ribosomes. In some prokaryotes, inclusions and vesicles involved in several physiological processes are also observed. To date, the main cytoplasmic structures described are: a) gas vesicles composed entirely of a protein shell characteristic of aquatic photosynthetic bacteria [1]; b)

polyhedral bodies called carboxysomes containing an enzyme needed for carbon fixation in autotrophic bacteria and similar enzymatic inclusions found in other bacteria [2,3,4]; c) storage granules that may or may not be surrounded by a membrane and which serve to store inorganic or organic compounds [5]; d) magnetosomes, membrane-bound iron-containing crystals present in some aquatic bacteria that respond to magnetic fields [6]; and e) amplified membranous structures that may or may not be continuous with the cell membrane, and which are visualized in photosynthetic and chemoautotrophic bacteria and are involved in processes of energy production [7,8].

Recent improvements in imaging techniques have allowed researchers to reassess bacterial architecture. Bacteria are no longer viewed as static and homogeneous cells, and the task of deciphering the structure, function and spatial organization of

molecular machines inside the fluid architecture of bacterial cells has emerged as a new challenge [9,10]. Improvements in technical procedures and software have brought TEM studies closer to the native hydrated and three-dimensional (3D) state of biological specimens. The cryoimmobilization of specimens by rapid cooling followed by freeze substitution (FS) and TEM observation of sections of resin-embedded samples at room temperature, or freeze fracture (FF) and TEM observation of replica, or cryoelectron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS) has avoided chemical fixation followed by room temperature dehydration and is far less likely to create artifacts [11]. Another step forward in the understanding of the 3D architecture and organization of bacterial cells and intracytoplasmic structures has been the study of 3D-reconstructions from tilt series. In electron tomography, a feature from a sample is imaged in the TEM at several angles by tilting the holder supporting the specimen-containing grid. In tomography, the sample can be an isolated specimen that does not need to be sectioned, or a structure inside a section. Specimen sectioning is frequently needed to analyze bacterial cytoplasmic structures, because the acquisition of high-quality TEM images is limited by sample thickness. Electron tomography can be performed using tilt series acquired at room temperature from sections obtained after cryoimmobilization by high-pressure freezing (HPF), FS, and resin embedding. The same 3D-reconstruction strategy can also be applied to tilt series acquired under cryoconditions (-170°C), on plunge-frozen samples or cryosections of high-pressure frozen samples. In recent years, many bacterial cells and known bacterial structures have been reanalyzed with improved TEM techniques, providing a new and more accurate view of the complex ultrastructure of prokaryotic cells [12,13,10].

The major technological advances in TEM have also opened up fresh opportunities for discovering new bacterial structures. New bacteria from unknown habitats constitute a particularly interesting subject of analysis in the quest for unusual features of prokaryotic cells [14,15]. Here we report the use of different TEM and cryo-TEM techniques for the structural examination of the new Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> [16], revealing a cytoplasmic structure that, to our knowledge, has not been described before.

## Materials and Methods

### Cell growth

Studies were performed mainly with *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> (LMG 25555) isolated from marine sediment collected from Deception Island (Antarctica) and characterized by our group as a new species [16]. For most observations, using different techniques, samples of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> were grown for 12 days at 0°C on tryptone soy agar (TSA, Oxoid) according to the manufacturer's specifications. Other experimental growing conditions were also tested, such as growing the strain on TSA for 6, 20 and 30 days at 0°C, or on TSA at 4°C, 15°C, 27°C at different times. Other growth media were also assayed such as BHI agar (Difco), Marine agar (Difco) or liquid minimal medium MM1 (g l<sup>-1</sup>: glucose, 20; yeast extract, 0.1; NaNO<sub>3</sub>, 7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2;

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.018; trace elements, 1ml). *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> and *Pseudomonas fragi* DSM 3456<sup>T</sup> were grown on TSA (Oxoid) for 12 days at 0°C. *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> was grown on TSA (Oxoid) for 12 days at 10°C.

### High-Pressure Freezing (HPF)

HPF for samples to be freeze substituted was performed on colonies of *P. deceptionensis* grown on TSA plates which were transferred to 1.5 mm diameter and 200 µm depth planchettes without addition of cryoprotectants, immediately cryoimmobilized using a Leica EMPACT High-Pressure Freezer (Leica Microsystems, Vienna, Austria) and then stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) until being freeze substituted [17].

HPF for samples to be cryosectioned was performed on colonies resuspended in 30% dextran (Fluka) in 0.01 M phosphate buffer saline (PBS). The suspensions were introduced into 350 µm inner diameter copper tubes and ultrarapid frozen using a Leica EMPACT High-Pressure Freezer (Leica Microsystems, Vienna, Austria). The copper tubes were stored in LN<sub>2</sub> until further use for cryosectioning.

### Freeze Substitution (FS)

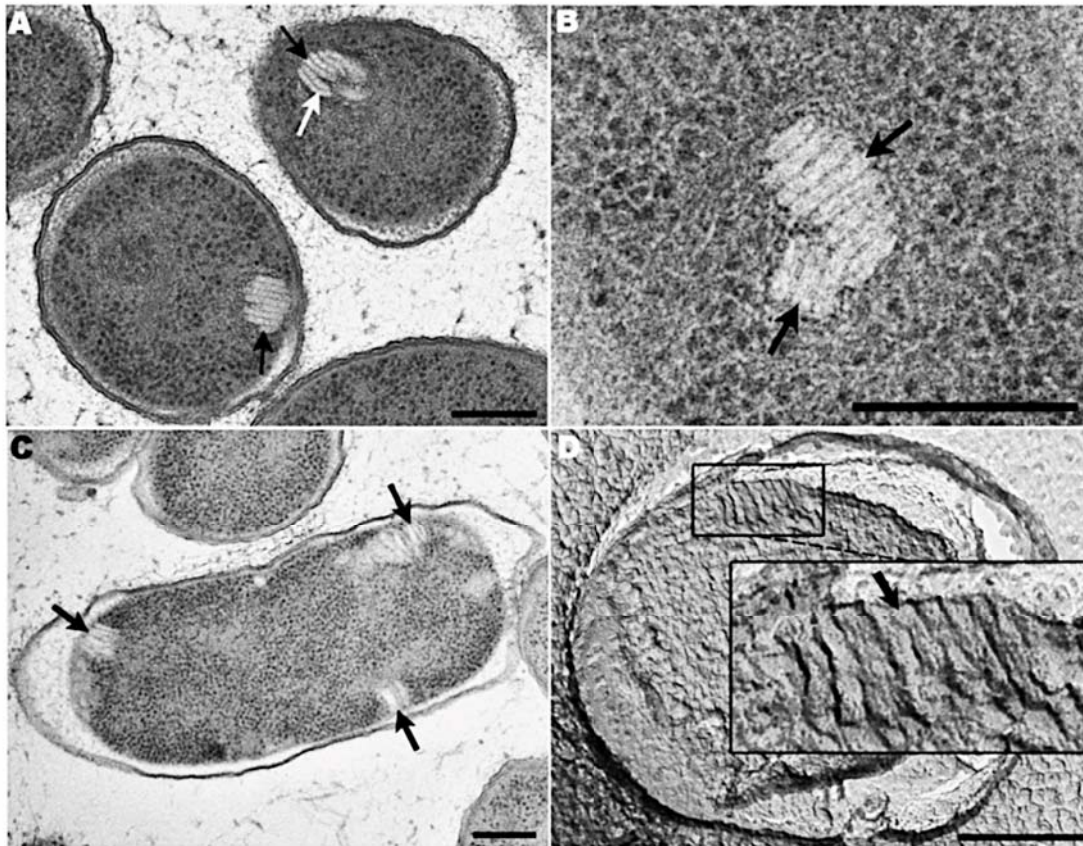
Planchettes containing the frozen samples were transferred, under LN<sub>2</sub>, to cryotubes containing the FS medium at -90°C in an EM AFS (Leica Microsystems, Vienna, Austria). For epoxy resin embedding, we used three different FS media with anhydrous acetone containing: 1. 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) (EMS, Hatfield, USA) and 0.25% glutaraldehyde (GA) (EMS, Hatfield, USA); 2. 1% OsO<sub>4</sub>, 0.1% uranyl acetate (UA) (EMS, Hatfield, USA) and 1% water [18]; and 3. 2% OsO<sub>4</sub> and 0.1% GA. Samples were freeze substituted at -90°C for 48 h and warmed up to 4°C at a 5°C/h slope. Once the samples reached 4°C, they were kept at this point for 2 h and were transferred in darkness to room temperature for 2 h. The samples freeze substituted in 2% OsO<sub>4</sub> and 0.1% GA were treated with an osmium-mediated tannic acid impregnation [19] (tannic acid, EMS, Hatfield, USA). All samples were infiltrated and embedded in Epon-812 resin (EMS, Hatfield, USA).

For acrylic resin embedding, samples were freeze substituted in 2% UA in acetone containing 1% water at -90°C for 1 hour, warmed up 20°C per hour until -50°C and kept at this temperature for 2 h. After several acetone rinses, samples were infiltrated with Lowicryl HM23 resin (EMS, Hatfield, USA) and polymerized under ultraviolet light for 48 h at -50°C followed by 48 h at 22°C [20].

### Room temperature sectioning

Sections of 60 nm in thickness were obtained using a UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria), a 45° diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) and a clearance angle of 6°. Epon sections were mounted on formvar coated 200 mesh copper grids and stained with aqueous or methanolic 2% UA and lead citrate. Lowicryl sections were mounted on formvar coated 200 mesh gold grids and stored until the immunolabeling process.

Sections of 250 nm in thickness were obtained in the same conditions as the ultrathin sections to perform electron



**Figure 1. TEM micrographs of organized structures (stacks) located in the cytoplasm of TSA-grown cultures of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>.** (A–C) 60 nm Epon sections of samples processed by HPF-FS. (A) Elongated clustered parallel sticks located perpendicular to the PM (black arrows). Most sticks are visualized as straight units, but a slight curvature is observed in some of them (white arrow). (B) Two contiguous and differently oriented stacks in the bacterial cytoplasm (black arrows). (C) Three stacks perpendicular to the PM at different locations within the cytoplasm of a cell (black arrows). (D) A replica micrograph from a propane cryoimmobilized, FF and shadowed sample. A stack is observed perpendicular to the PM and comprised by about 8 sticks (see black arrow in the magnified area). Scale bars = 250 nm.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g001

tomographic studies. Sections were mounted on 200 mesh copper grids and stained with aqueous or methanolic 2% UA. Fiducial markers were then attached to both faces of the sections by successively floating them on drops of protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles (CMC, University of Utrecht, The Netherlands) 1:500 in 0.01 M PBS and distilled water.

#### Tokuyasu technique for cryosectioning

*P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> colonies were collected with a loopful, resuspended in a chemical fixative containing 2.5% GA in 0.1 M PHEM pH 6.9 [0.06 M PIPES (Calbiochem), 0.025 M Hepes (Calbiochem), 0.01 M EGTA (Calbiochem), 0.002 M MgCl<sub>2</sub>

(Amresco)] and fixed for 2 h at room temperature. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 10 min and rinsed with 0.1 M PHEM. Pelleted cells were carefully resuspended in 12% gelatine (Merck) in 0.1 M PHEM, incubated for 5–10 min at 37°C, centrifuged to obtain a pellet and immediately placed on ice until the gelatine was hardened. Then, the pellet was cut into small pieces, which were infiltrated with 2.3 M sucrose (Fluka) in 0.1 M PHEM on a rotating wheel overnight at 4°C. Then, the small pieces were mounted onto sample pins and frozen in LN<sub>2</sub>. Pins with frozen samples were transferred to a pre-cooled (-100°C) EM FC6 cryoultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria) covered with a homemade



**Table 1.** Number of sticks per stack (N) observed in 170 stacks from Epon sections of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells processed by HPF-FS.

N	Frequency	%
1	4	2.35
2	20	11.76
3	27	15.88
4	28	16.47
5	26	15.29
6	24	14.12
7	15	8.82
8	14	8.24
9	3	1.76
10	5	2.94
11	1	0.59
12	2	1.18
14	1	0.59

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.t001

**Table 2.** Mean values of length and width of the sticks according to different TEM techniques.

	Mean Length	SD	Mean Width	SD
HPF + FS + Epon	93.71	26.22	15.88	2.25
FF	75.03	11.54	13.59	2.14
HPF + FS + HM23	85.85	22.46	12.81	1.69
Tokuyasu	85.49	19.04	14.13	1.73
CEMOVIS	76.35	23.68	12.09	3.17

(SD) Standard deviation; (HPF + FS + Epon) High-pressure freezing, freeze substitution and Epon; (FF) Freeze-fracturing; (HPF + FS + HM23) High-pressure freezing, freeze-substitution and HM23 Lowicryl; (CEMOVIS) Cryoelectron microscopy of vitreous sections.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.t002

**Table 3.** Number of stacks per 60 nm cell section (N) observed in 452 cells from Epon ultrathin sections of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> processed by HPF-FS.

N	Frequency	%
0	347	76.77
1	72	15.93
2	27	5.97
3	4	0.89
4	2	0.44

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.t003

anticontamination glove box as explained below for vitreous sectioning.

Squared block faces with side measures ranging from 260 to 300 µm were trimmed using glass knives. Then, the temperature was lowered until -120°C and 60 nm cryosections were cut with a 35° diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland)

with a clearance angle of 6° and at cutting speeds between 0.3 and 1 mm/s. Ribbons were picked-up with a 1:1 mixture of 2% methyl cellulose (25 centipoises, Sigma-Aldrich) and 2.3 M sucrose and next, thawed and stored on formvar coated 200 mesh nickel grids (EMS, Hatfield, USA) at 4°C until the immunolabeling process.

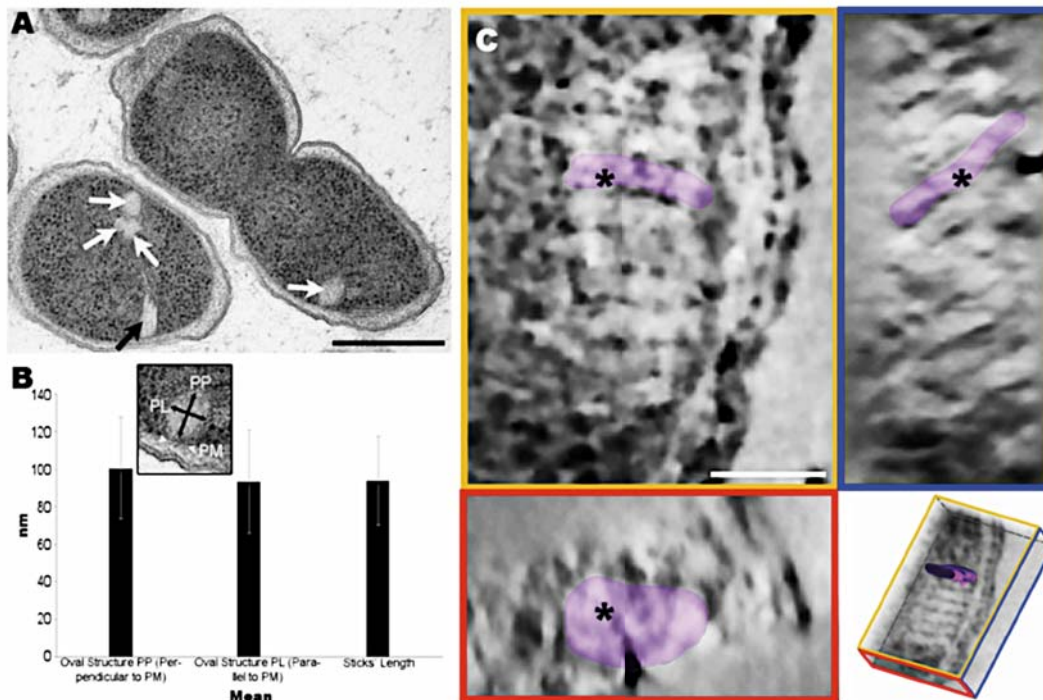
**Vitreous cryosectioning**

For vitreous cryosectioning, copper tubes coming from the HPF and stored in LN<sub>2</sub> were transferred to a pre-cooled (-150°C) FC6 cryoultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria) covered with a homemade anticontamination glove box [21]. An influx of dry nitrogen gas, dry sodium hydroxide pellets and dry silica gel balls was used to reduce the relative humidity within the chamber to values close to 0%. Squared block faces with side measures between 80 and 100 µm were trimmed from the copper tubes in black uniform areas from the sample, using a 45° cryotrim diamond blade (Diatome, Biel, Switzerland). Then, 50 nm sections were cut with a 25° diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) with a clearance angle of 6° and at cutting speeds between 0.3 and 100 mm/s. Ribbons of vitreous sections were attached to Quantifoil® carbon coated 200 mesh copper grids by electrostatic charging using the CRION (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Once charged, the grids supporting the attached vitreous sections were transferred to grid boxes and stored in LN<sub>2</sub> until being observed.

**DNA Immunolabeling**

The grids containing Lowicryl HM23 ultrathin sections were rinsed in 0.01 M PBS and 0.05 M glycine (Amresco) in 0.01 M PBS. They were then incubated with blocking buffer by successively floating them on drops of 5% and 1% bovine serum albumin (BSA) in 0.01 M PBS solutions for 10 and 1 min, respectively. The grids were incubated 30 min at room temperature with monoclonal Mouse IgM Anti-ds-DNA antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA, clone AC-30-10) diluted 1/10 in blocking buffer (1% BSA in 0.01 M PBS). After four washes on drops of 0.25% Tween 20 in 0.01 M PBS for 4 min and 1% BSA in 0.01 M PBS for 1 min, sections were incubated with IgM anti-mouse coupled to 12 nm diameter colloidal gold particles (Jackson, West Grove, USA) 1/30 diluted in blocking buffer for 15 min and rinsed with water. The grids were then rinsed in 0.01 M PBS, fixed in 1% GA in 0.01 M PBS and rinsed abundantly in distilled water. They were stained with 1% potassium permanganate and 1% UA in water for 15 min [22]. As a control for non-specific binding of the colloidal gold-conjugated antibody, the primary antibody was omitted.

Tokuyasu sections were incubated in 2% gelatine in 0.1 M PHEM for 30 min at 37°C and rinsed in 0.15 M glycine in 0.1 M PHEM. Then, the grids were incubated with blocking buffer by successively floating them on drops of 10% and 1% fetal bovine serum (FBS) in 0.1 M PHEM solutions for 10 and 2 min, respectively. They were incubated with monoclonal Mouse IgM Anti-DNA (Novus Biologicals, Littleton, USA, clone AC-30-10) 1/10 diluted in blocking buffer (1% FBS in 0.1 M PHEM) for 1 h. After eight washes with drops of 0.2% FBS in 0.1 M PHEM for 2 min and 1 with 1% FBS in 0.1 M PHEM for 2 min, sections



**Figure 2. TEM analysis of oval structures observed in *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> TSA-grown cultures processed by HPF-FS.** (A) A 60 nm Epon section showing a stack (black arrow) and oval structures (white arrows). Scale bar = 250 nm. (B) Graph comparing the oval structure measurements (PP, PL) and the length of the sticks. The error bars correspond to standard deviation values (SD) (PP). Perpendicular; (PL) Parallel; (PM) Plasma membrane. (C) 4 nm tomogram slices from the XYZ views of a bbif-filtered tomogram reconstructed from 250 nm Epon sections. The asterisks correspond to the same point through the different views XYZ. The XY view (top-left image) reveals a stack perpendicular to the PM, in which one clustered unit has been colored. The YZ view (top-right image) shows the same stack in which sticks are distributed obliquely within the section. The dyed unit corresponds to the one colored before. The XZ view (bottom-left image) shows the same dyed stick observed as an oval structure. The bottom right picture corresponds to a scheme of the view's distribution in the tomogram where the highlighted unit has been segmented. Scale bar = 50 nm.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g002

were incubated with goat anti-mouse IgM coupled to 12 nm diameter colloidal gold particles (Jackson, West Grove, USA), 1/30 diluted in blocking buffer for 30 min. They were rinsed in 0.1 M PHEM, fixed with 1% GA in 0.1 M PHEM and abundantly rinsed with water. The grids were then stained with 2% uranyl oxalate [2% UA and 0.15 M oxalic acid (Fluka); pH 7] and 0.4% UA in 2% methylcellulose.

**Freeze Fracture (FF)**

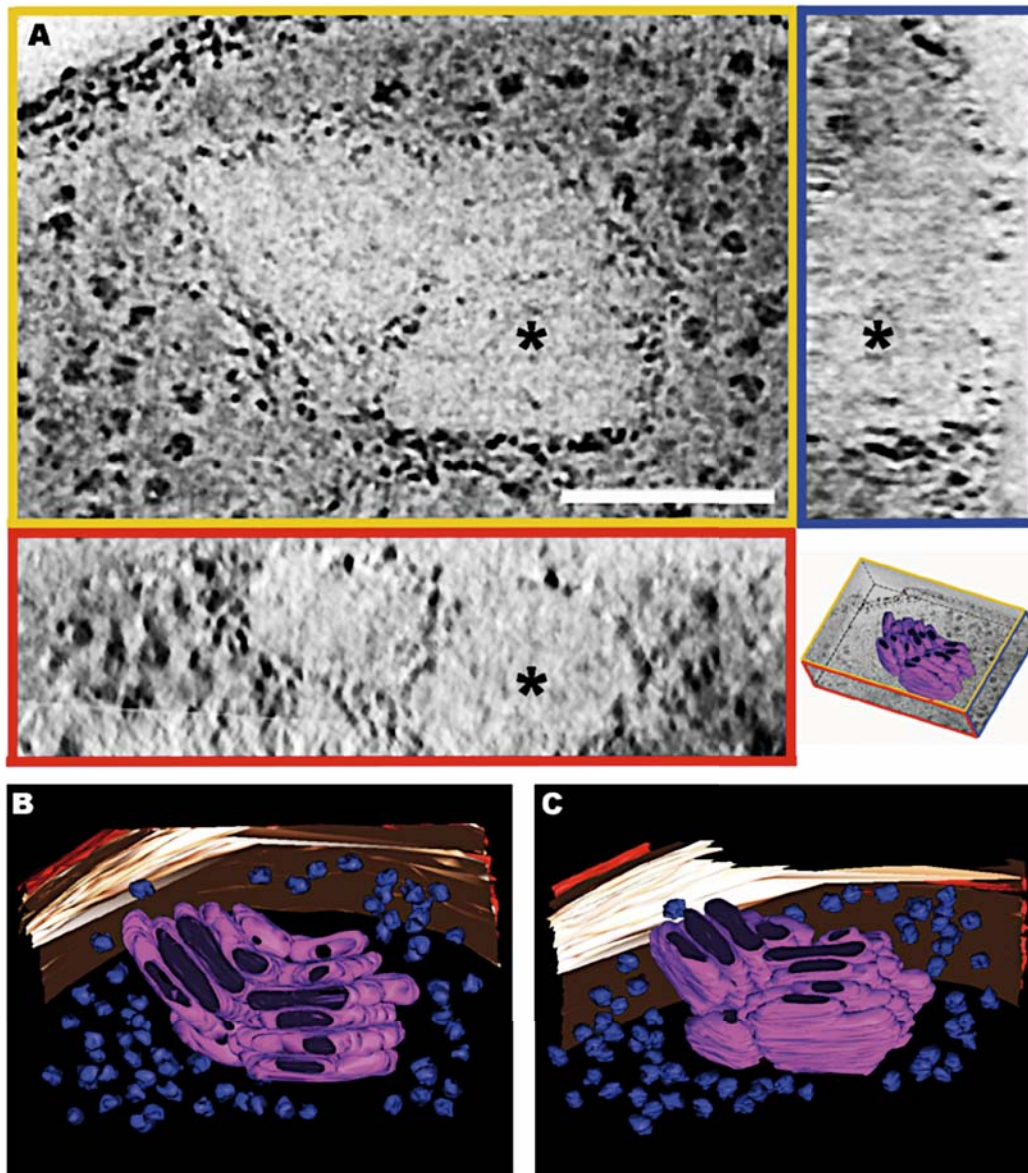
TSA-grown cultures of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> were sandwiched between two copper platelets using a 400 mesh gold grid as spacer and directly frozen by plunging in liquid propane at -189°C and fractured at -100°C and 10<sup>-7</sup> mbar in a Bal-Tec BAF-060 freeze-etching system (Leica Microsystems, Vienna, Austria). The fracture was followed by freeze etching at

-100°C for 2 min. The replicas were obtained by unidirectional shadowing of the exposed surface with 2 nm of Pt/C at 45° and 20 nm of C at 90° and were then floated on household bleach for 3 h, washed with distilled water and, finally, mounted on formvar coated 200 mesh copper grids.

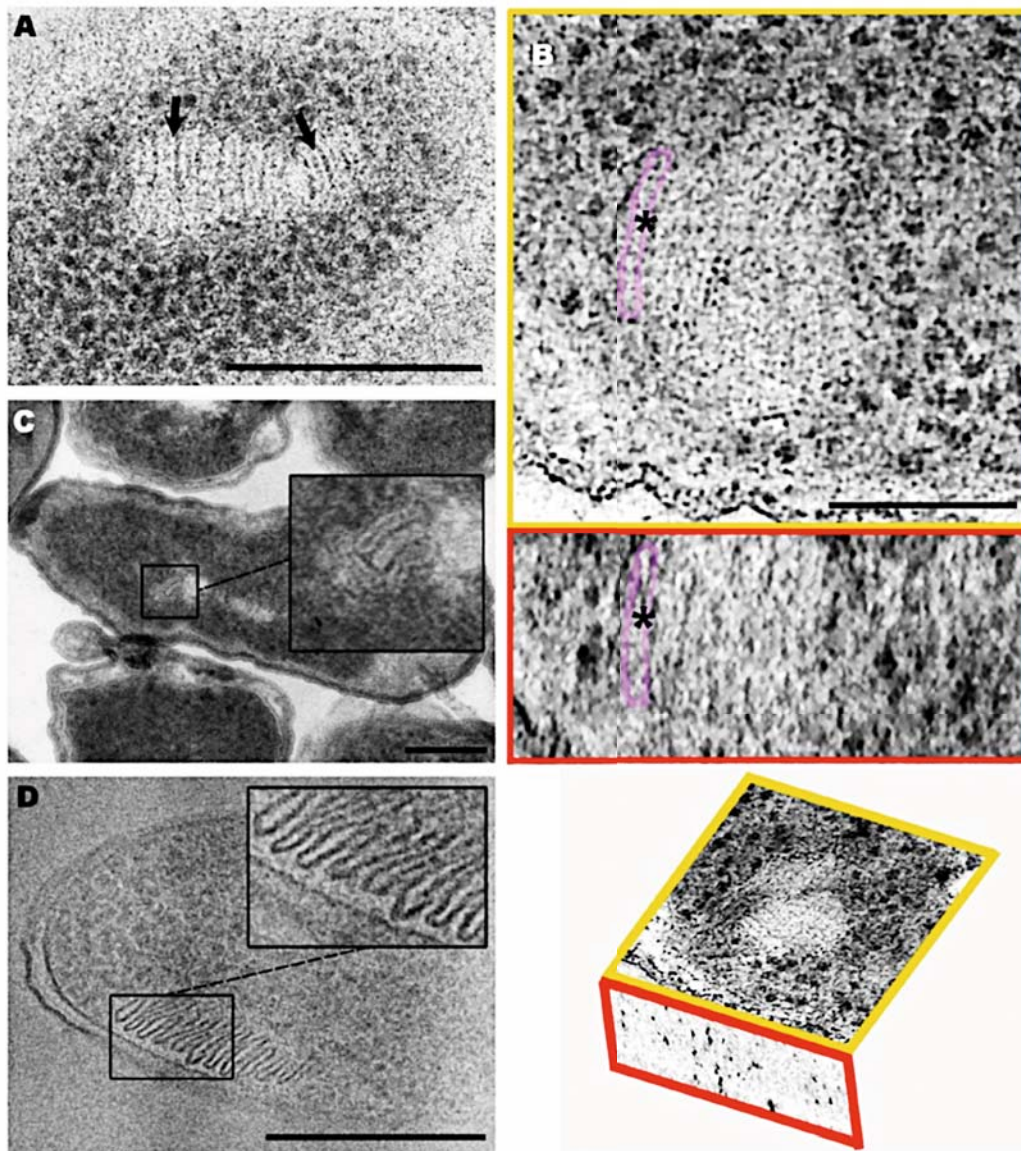
**Imaging**

Sections and replicas were observed in a Tecnai Spirit microscope (EM) (FEI, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a LaB<sub>6</sub> cathode. Images were acquired at 120 kV and room temperature with a 1376 x 1024 pixel CCD camera (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

Electron tomography studies of semithin sections were performed at 120 kV, using the Tecnai Spirit EM described before or at 200 kV using a Tecnai F20 EM (FEI, Eindhoven,



**Figure 3. 3D visualization of stacks observed in *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells after HPF-FS.** (A) 2 nm tomogram slices from the XYZ views of a bbif-filtered tomogram reconstructed from a 250 nm Epon section. The asterisks correspond to the same point through the different views. Scale bar = 100 nm. The XY view (top-left image) shows a peripheral portion of the cytoplasm of a cell where two contiguous stacks can be visualized. The YZ view (top right image) shows the clustered stacks from the stack on the right in the XY view. The XZ view (bottom left image) reveals two stacked units as oval structures. The bottom right picture corresponds to a scheme of the view's distribution in the tomogram. (B–C) Two different views from the segmentation of the tomogram observed in (A), which reveal the 3D structure of the stacks within the tomogram as groups of oval discs. In red, the outer membrane; in cream-color, the PM; in blue, the ribosomes; and in pink, the discs.  
doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g003



**Figure 4. TEM and Cryo-TEM analysis of stacks of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>.** (A) A 60 nm Epon section from a sample processed by HPF-FS. A stack is visualized composed by clustered discs transversally cut, each of which is delimited by a membrane-like structure (black arrows). Scale bar = 250 nm. (B) 1.5 nm tomogram slices from the XYZ views of a blow-filtered tomogram reconstructed from 250 nm Lowicryl HM23 sections. The asterisks correspond to the same point through the different views. The XY (top image) and the XZ (middle image) views show flat clustered discs transversally cut and perpendicularly distributed to the PM in a fragment of a cell. A membrane-like structure is observed surrounding each flat disc, one of which has been colored in both views. The bottom picture is a scheme of the view's distribution in the tomogram. Scale bar = 100 nm. (C) A 60 nm Tokuyasu section. Stacked discs are also observed well delimited by a membrane-like structure (see magnified squared area). Scale bar = 250 nm. (D) A 50 nm vitreous cryosection micrograph (CEMOVIS). Clustered discs are observed clearly delimited by a membrane (see squared area). Scale bar = 250 nm.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g004

The Netherlands) equipped with a field emission gun and a 4096x4096 pixel CCD Eagle camera (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Double axis tilt series were collected using the Xplore3D (FEI, Eindhoven, The Netherlands) acquisition program. The angular tilt range was typically set from -60° to +60° with a 1.5-2° tilt increase.

Vitreous cryosections were transferred to Tecnai F20 using a cryoholder (Gatan, Warrendale, USA). Images were taken at 200 kV, at a temperature ranging from -175 to -170°C and using low-dose imaging conditions with the 4096x4096 pixel CCD Eagle camera. Electron diffraction was used to check whether water was vitreous or crystalline; crystalline sections were discarded.

### Statistical analysis

The one-factor ANOVA test was used to analyze measurements of stacks. Significance was set at  $P < 0.05$ . The analyses have been carried out using Statgraphics software (version 5.1).

### Postprocessing of images and 3D Reconstructions

Micrographs from vitreous cryosections were denoised using the ImageJ 4.5.3 software by applying sequentially a 2.0-pixel-radius Median filter and a 2.0-sigma-radius Gaussian Blur filter.

The tilt series from Epon and Lowicryl sections were aligned using 10 nm gold fiducial markers on the two surfaces of the sections using the IMOD 4.5.3 software [23]. Then, the individual aligned series from dual axis tomography were separately reconstructed by the simultaneous iterative reconstruction technique (SIRT) using the Tomo3D package, version of April 2012 [24,25]. Tomograms were combined into dual axis tomograms using the IMOD package and denoised using the bilateral filtering (bbf) included in the Bsoft 1.8.2 software [26] or the Tomoblow software version of July 2011 [27]. Finally, dual axis tomograms were analyzed using IMOD (xyz slicer).

### Results

*Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> is a new bacterium isolated from marine sediment collected on Deception Island, in the Antarctic area. The cells of this species have been described as rod-shaped, catalase- and oxidase-positive, and motile by means of a polar flagellum. Moreover, *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> is a psychrotolerant strain able to grow at temperatures ranging from -4 to 34°C. A sample of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> grown on TSA plates at 0°C for 12 days was frozen by HPF without addition of cryoprotectants, and then freeze-substituted, Epon-embedded and sectioned for observation by TEM. The 60 nm sections revealed a highly organized structure located in the bacterial cytoplasm, which was unlike any cytoplasmic inclusion or structure reported to date. These structures, observed in two dimensions in the bacterial sections, comprised assemblies of a variable number of elongated parallel sticks, in most cases perpendicular to the plasma membrane (PM) (Figure 1A, black arrows). Most of the clustered sticks were straight, but some were slightly curved

(Figure 1A, white arrow). Henceforth, we have used the term "stack" to refer to each complete assembly of stick-like shapes.

To study the stacks in greater detail, we first counted the sticks in each one. This was done with 170 stacks observed in micrographs of Epon sections of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. A total of 854 sticks were counted, with a mean value of 5.02 per stack. However, a significant dispersion was observed, with sticks ranging from one to 14 per stack (Table 1). From the same micrographs we measured the length and width of 59 sticks (Table 2, first row). The mean length was  $93.71 \pm 26.22$  nm, but the values ranged widely from 39.65 to 160.59 nm. In contrast, stick width was much more homogeneous, with a mean value of  $15.88 \pm 2.25$  nm.

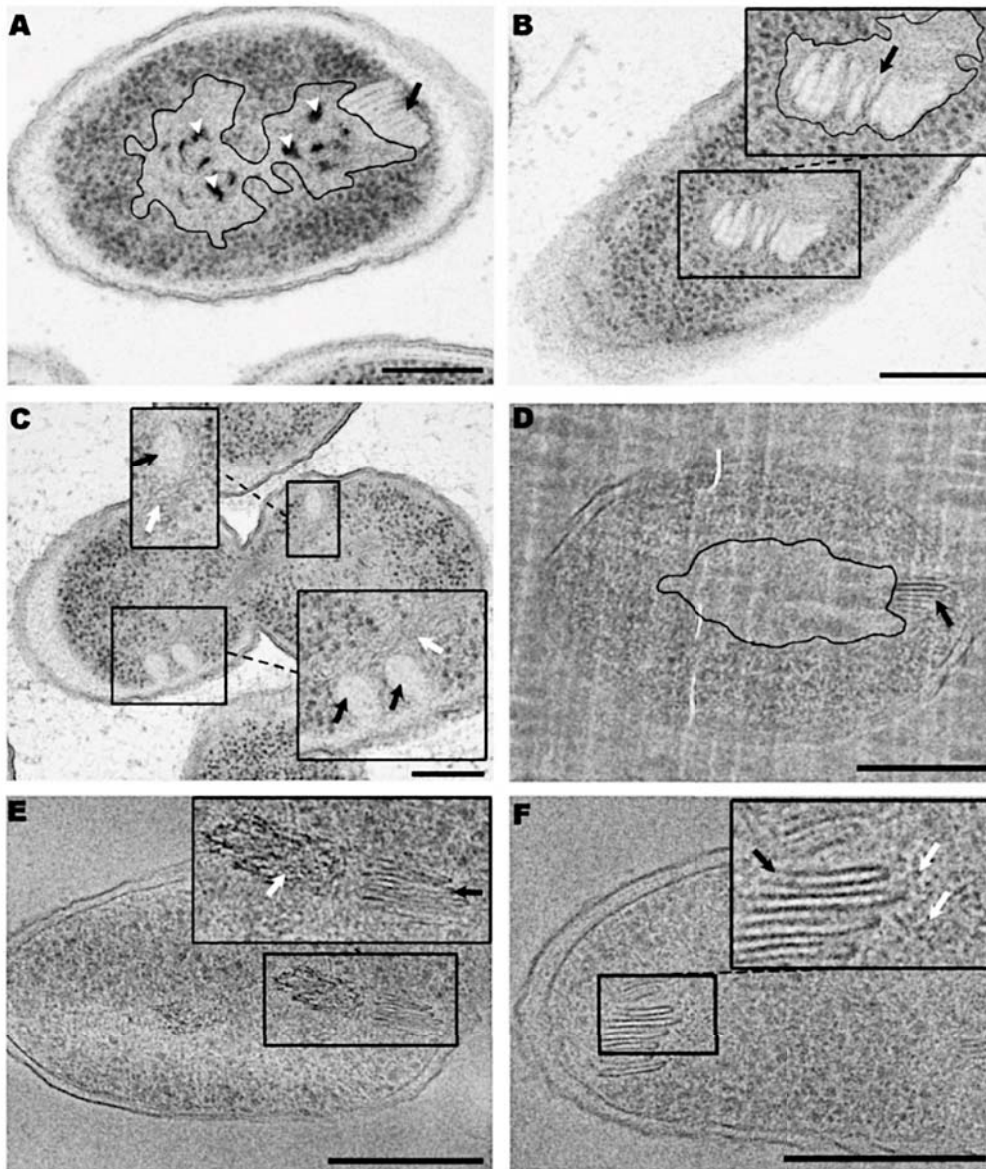
Interestingly, stacks were only frequently observed in *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells grown under specific growth conditions (on TSA plates for 12 days at 0°C): 23.23% of 452 *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells counted from Epon ultrathin sections showed stacks in their cytoplasm. In contrast, when using shorter or longer incubation times or higher incubation temperatures, stacks were found only sporadically. Furthermore, we rarely observed stacks in cells grown in liquid media and, therefore, we were unable to determine whether the presence of stacks was related to a certain stage of the growth curve.

Micrographs of the strain also revealed that *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells seemed to contain one or more stacks at the same time. Most *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells observed in Epon ultrathin sections showed one or two stacks (Table 3). The quantifications suggested that each cell may contain at least between one and four stacks, although obviously this is not a definitive measurement of the total number since only 60 nm cell sections were visualized.

When more than one stack appeared simultaneously in the cytoplasm, TEM observation of Epon sections showed that the stacks were variable positioned: either close together (Figure 1B, black arrows) or scattered in different locations (Figure 1C, black arrows), the former being observed twice as frequently.

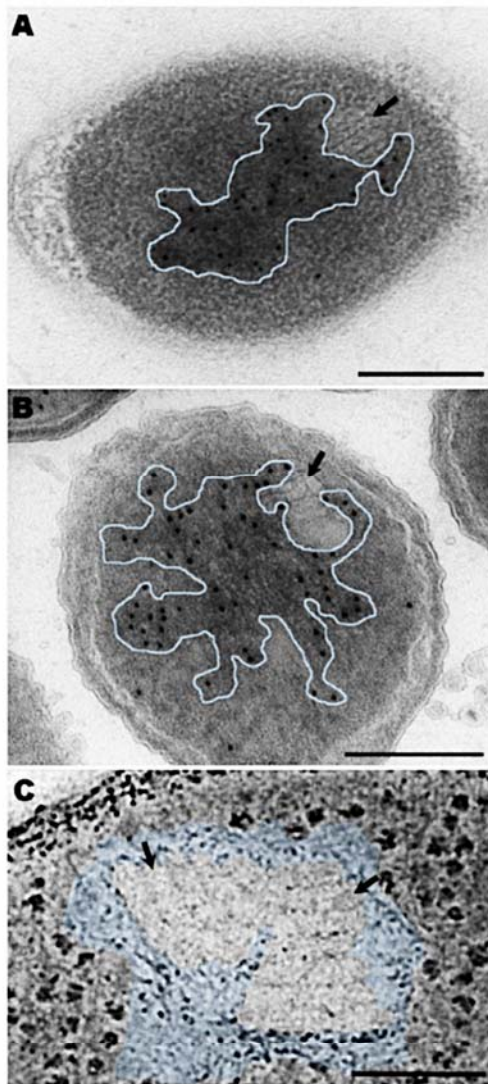
Stacks were also observed after FF, which provided a replica of the rough fractured surfaces after ultra rapid freezing, in this case by plunge freezing in propane without any addition of chemical fixatives or cryoprotectants. The fracture of the frozen sample at -100°C was performed inside a high vacuum to avoid water condensation and keep all the cellular components in place. This technique was used to confirm that the stacks were not artifacts produced by the FS process, fixatives, or changes in temperature. Figure 1D depicts a clearly visible stack after FF, containing several parallel sticks perpendicular to the PM with a mean length of  $75.03 \pm 11.53$  nm and a mean width of  $13.59 \pm 2.13$  nm (Table 2, second row), which were similar to the values in samples obtained after HPF-FS and Epon-embedding.

Some *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells grown for 12 days at 0°C and processed by HPF-FS and Epon embedding also presented oval structures (Figure 2A, white arrows), which were observed at similar cytoplasmic locations and frequencies as the stacks, and also with a perpendicular orientation to the PM. We took two measurements of each of these oval structures: one perpendicular and another parallel to the PM



**Figure 5. Study of the proximity between stacks and DNA observed in TSA-grown cultures of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells.** (A–C) TEM micrographs of 60 nm Epon sections of samples processed by HPF-FS. (A) A stack (black arrow) perpendicular to the PM and very close to the bacterial nucleoid (outlined area). The bacterial nucleoid shows dark spots, corresponding to poly P granules (white arrow heads). (B) A stack (black arrow) embedded in the nucleoid area (outlined area) is shown. (C) A *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> dividing cell distributing its DNA between its daughter cells is observed, in which stacks (black arrows) are visualized very close to the DNA (white arrows). (D–F) Cryo-TEM micrographs of 50 nm vitreous cryosections (CEMOVIS). (D) A stack (black arrow) is observed very close to a ribosome free area (RFA), corresponding to the nucleoid area (outlined area). (E) A stack (black arrow) is placed in the vicinities of a locally ordered arrangement of DNA microfibers (white arrow). (F) A stack (black arrow) is visualized very close to DNA microfibers (white arrows). Scale bars = 250 nm.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g005



**Figure 6. TEM immunolabeling and tomographic studies analyzing the proximity between stacks and DNA in TSA-grown cultures of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>.** (A) DNA immunolabeling on 60 nm HM23 Lowicryl sections from samples processed by HPF-FS. (B) DNA immunolabeling on a 60 nm Tokuyasu sections. (A–B) Stacks were observed very close to and partially embedded in to the gold-labeled nucleoid area (see black arrows pointing stacks and outlined areas corresponding to the nucleoids). (C) A 2 nm tomogram slice of a bbif-filtered tomogram reconstructed from a 250 nm Epon section of a sample processed by HPF-FS. Two contiguous stacks are observed (black arrows) embedded in the nucleoid area (see colored area). Scale bars = 250 nm.  
doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g006

(Figure 2B). A total of 155 oval structures were measured, revealing a mean perpendicular length of  $100.57 \pm 27.01$  nm and a mean parallel length of  $93.26 \pm 27.21$  nm, values similar to those of the sticks (Figure 2B). Given the similarities in location, frequency and size between the oval structures and sticks, we wondered whether they could correspond to different 2D views of the same structure, that is, whether the stick shapes observed in the stacks may represent transversal sections of flattened oval structures.

Semithin sections of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells grown on TSA at 0°C for 12 days and processed by HPF-FS and Epon embedding were further explored by 3D electron tomography. Dual-axis tilt series from 250 nm Epon sections were acquired in the TEM at 120 kV, each tilt series being reconstructed using the Tomo3D software. Tomograms corresponding to each series were combined with the IMOD software and the final dual-axis tomogram was obtained (Movie S1). Figure 2C shows the XY, ZY and XZ tomogram slices from a point within the dual-axis tomogram observed in Movie S1 (the point is marked by an asterisk through the different views). The XY view (top left image) shows a stack composed of 10 elongated parallel sticks with a perpendicular orientation to the PM. The YZ view (top right image) shows an oblique orientation of the same flat structures within the semithin section. Finally, the XZ view (bottom left image) reveals oval structures like those observed in the ultrathin sections. This result confirms that the stick and oval shapes were in fact different 2D projections of the same structure, and in 3D the stacks consisted of groups of parallel oval discs. Henceforth, the units composing the stacks will be referred to interchangeably as "discs" or "sticks".

The reconstruction observed in Movie S2 was performed in the same conditions as in Movie S1, but using tilt series captured at 200 kV. Figure 3 shows the XY, ZY and XZ tomogram slices from the same point (the point is marked by an asterisk through the different views) of the double-axis tomogram presented in Movie S2 (A), and two views of its segmentation (B and C). The XY view in Figure 3A (top left image) clearly shows two contiguous stacks at an angle of 130° to each other. Both are located near the boundaries of the cell PM and the one on the left is perpendicular to the PM. In the YZ view, the stack shown appears as a pile of flat structures oriented perpendicularly to the surface (top right image). The XZ view (bottom left image) shows two oval structures corresponding to the frontal views of two flat discs. The tomogram segmentation from the dual-axis tomogram observed in Movie S3 and Figure 3B and 3C confirm the presence of two contiguous stacks, one on the right and one on the left, formed by parallel oval discs. In the segmentation process, the outer membrane is colored red, the PM cream, ribosomes blue, and the oval discs of the stacks are pink.

In the TEM observations of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> Epon sections, discs were frequently surrounded by a membrane-like structure (Figure 4A, black arrows). To shed more light on the composition of this membrane, new samples were processed by HPF-FS and Lowicryl HM23 embedding or by the Tokuyasu method. Both techniques have been reported to improve membrane visualization, the latter clearly distinguishing lipid membranes.

Lowicryl HM23 sections allowed the visualization of stacked structures with similar dimensions to those previously described using other techniques. We measured 90 sticks, obtaining a mean length of  $85.85 \pm 22.46$  nm and a mean width of  $12.81 \pm 1.69$  nm (Table 2, third row). To study the membrane-like structures surrounding the discs, we analyzed tomograms from 250 nm Lowicryl HM23 sections reconstructed from tilt series acquired at 200 kV (Movie S4). Figure 4B shows the XY and XZ tomogram slices from the same point within the tomogram presented in Movie S4 (the point is marked by an asterisk through the different views). The XY view shows a stack perpendicular to the PM, with discs surrounded by membrane-like structures (highlighted in top image of Figure 4B), which also appear in the XZ view (middle image of Figure 4B showing the same highlighted structure as in the XY view).

The Tokuyasu technique also revealed the presence of stacks in the cytoplasm of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells, which appeared as elongated sticks (Figure 4C, squared area). After measuring 28 sticks, a mean length of  $85.49 \pm 19.04$  nm and a mean width of  $14.13 \pm 1.73$  nm were obtained (Table 2, fourth row). The micrographs revealed that the sticks were delimited by a white membrane-like structure with a similar electron density to the PM.

Cryoelectron microscopy of vitreous sections (CEMOVIS) was also performed in *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cultures grown on TSA at 0°C for 12 days to study the strain ultrastructure in a close-to-native state. The images of 50 nm vitreous cryosections showed stacks distributed perpendicularly to the PM, coinciding with the previous descriptions using other techniques. We measured 95 sticks, obtaining a mean length of  $76.35 \pm 23.68$  nm and a mean width of  $12.09 \pm 3.17$  nm, similar to the values obtained with other methods (Table 2, fifth row). Vitreous cryosections also revealed that the discs were delimited by a membrane-like structure that seemed to have a similar electron density to the PM of the cell (Figure 4D).

The perpendicular orientation of the stacks in close proximity to the PM, together with the similarities in the membranous structures identified by HPF-FS and Lowicryl HM23 embedding, the Tokuyasu method, and CEMOVIS, suggested that the stacks might be invaginations from the PM. Nevertheless, none of the techniques showed any continuity between disc membranes and the PM. Furthermore, when both membranous structures were clearly visualized, the PM appeared straight and uninterrupted, without any visible connections with the membrane surrounding the stacks (Figure 4D and Figure S1). In addition, we took 170 measurements of PM and disc membrane thickness from 34 bacteria. All the measurements were done on micrographs of vitreous cryosections, since this technique creates the fewest distortions at a molecular level. Mean values were  $4.45 \pm 1.25$  nm for the PM of the cell and  $3.38 \pm 0.98$  nm for the membrane surrounding the discs. After applying a one-factor ANOVA test between the two series of data, a p-value of 0.0000 was obtained, indicating significant differences between them. This result supported the idea that stacks were independent structures rather than invaginations of the PM.

Interestingly, stacks observed near the periphery of HPF-FS Epon-embedded cells grown at 0°C for 12 days frequently

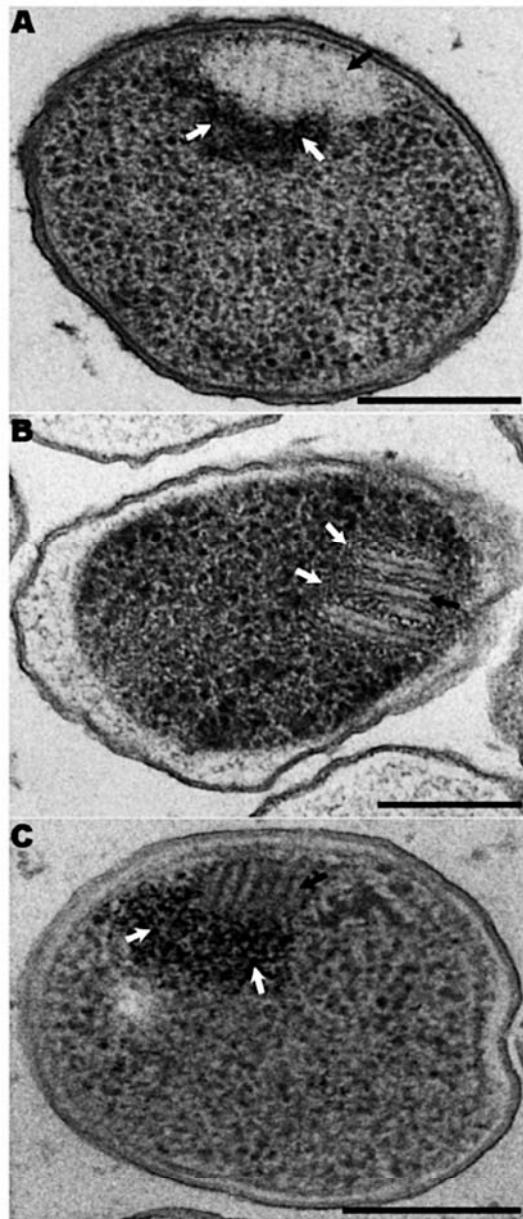
appeared very close to DNA microfibers from the nucleoid (Figure 5A, nucleoid outlined and stack marked by black arrow), in some cases being completely embedded (Figure 5B, nucleoid outlined and stack marked by black arrow). In cells observed dividing and distributing their DNA among daughter cells, stacks were also visualized very close to the DNA fibers (Figure 5C, DNA microfibers marked by white arrows and stacks by black arrows). Inorganic polyphosphate (Poly P) granules were commonly observed in nucleoid areas located close to a stack (Figure 5A, white arrow heads).

The same proximity between DNA and stacks described in Epon sections was observed in vitreous cryosections. Stacks were localized next to ribosome-free areas (RFA), corresponding to the bacterial nucleoid (Figure 5D, nucleoid outlined and stack marked by black arrow). Furthermore, locally ordered arrangements of DNA and DNA microfibers were observed very close to the stacks (Figure 5E and Figure 5F, DNA marked by white arrows and stacks by black arrows).

To study the hypothetical relation between DNA microfibers and stacks in more detail, DNA immunolabeling and tomographic studies were performed on samples of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> TSA-grown at 0°C for 12 days. Immunolabeling experiments were performed in HM23 and Tokuyasu sections using a specific antibody for labeling double stranded DNA. In the HM23 sections, we also amplified the signal obtained with a DNA staining method using potassium permanganate, which allows the chromatin distribution within the bacterial cytoplasm to be visualized. The micrographs again revealed stacks at the periphery of the cytoplasm, contiguous to or partially embedded in DNA microfibers (Figure 6A and Figure 6B, black arrows mark the stacks and the nucleoid is outlined in blue). Electron tomographic studies of Epon sections of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells also showed stacks completely embedded in DNA microfibers along the Z-axis (see Movie S2 and Figure 6C, black arrows mark the stacks and the nucleoid is colored in blue).

As the stacks appeared to be novel structures, we wanted to study whether their presence was exclusive to the new Antarctic bacterium *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> or whether they were general bacterial structures. We chose three bacterial species within the *Pseudomonas* genus, two of which, *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> and *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup>, are closely related to *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>, and another one, *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup>, is phylogenetically more distant. The range of growth temperatures was determined for each species in order to reproduce slow-growing conditions. The samples were then processed by HPF-FS and Epon-embedding and imaged with TEM. Micrographs revealed that *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> and *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup> incubated at 0°C and *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> incubated at 4°C for 12 days all had stacks in their cytoplasm. In these three bacteria, the stacks were also found perpendicular to the PM, and close to DNA microfibers presenting inorganic polyphosphate, as previously described for *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> (Figure 7A, 7B and 7C, respectively; stacks marked by black arrows and DNA microfibers by white arrows).





**Figure 7. Stacks visualized in different *Pseudomonas* species from samples processed by HPF-FS.** (A–C) 60 nm Epon sections. (A) *P. psychrophila* DSM 17535<sup>T</sup> TSA-grown culture. (B) *P. fragi* DSM 3456<sup>T</sup> TSA-grown culture. (C) *P. fluorescens* ATCC 13430<sup>T</sup> TSA-grown culture. (A–C) The three strains show stacks perpendicularly distributed to the PM (see black arrows) very close to DNA microfibers (see white arrows). Scale bars = 250 nm.

doi: 10.1371/journal.pone.0073297.g007

## Discussion

Thanks to the great advances in TEM and Cryo-TEM methodologies [28,29,30], we were able to visualize and analyze an unusual intracytoplasmic structure in the new Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup>. To our knowledge, this structure has not been described before and does not correspond to any of the inclusions, membrane formations or other structures previously identified as components of bacterial cytoplasm. Depending on the technique used and the plane of the sample section, the new structure was visualized as a set of stacked parallel sticks of variable length, or as oval structures normally perpendicular to the cytoplasmic membrane. Tomograms then showed that these new structures are composed of a variable number of discs of various sizes, each one surrounded by a membrane-like envelope. We have used the term "stacks" to describe these structures.

When analyzing bacterial structures by TEM, a risk to be born in mind is the possible generation of artifacts that may be confused with structural elements, or lead to a misinterpretation of the structure. This has happened in the past when using conventional TEM techniques such as chemical fixation and room temperature dehydration. Two of the most common artifacts reported have been mesosomes, consisting of foldings of the PM in contact with the nucleoid, and rope-like DNA fibrils, which accumulate in the cytoplasm [31,32,33]. We initially observed stacks in *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells processed by HPF-FS and Epon embedding, an approach known to allow good preservation of all components of bacterial cells, although it cannot unambiguously establish whether the ultrastructure is completely preserved at the molecular level. To confirm the existence of these new structures we used the main techniques currently available for thin-section analysis. We were also able to visualize stacked sticks or discs in samples processed by HPF-FS followed by Lowicryl HM23 resin embedding, and in tomography of plastic sections, Tokuyasu cryosections, and vitreous cryosections (CEMOVIS) [34,35,36,37,30]. The new structures were also observed with the FF technique, which offers a complementary perspective to thin-section analysis [38].

Although CEMOVIS is now accepted as the best method for preserving and analyzing bacterial structures, other techniques can provide complementary information [39]. Notably, there was little difference in the visualization of stacks among techniques, which gave very similar mean values of stick length and width (though the length showed greater variability). In addition, the tomograms demonstrated that the stacked structures were in fact not composed of stick-shaped forms, as initially observed, but flat discs.

The HM23, Tokuyasu and vitreous sections confirmed that the discs comprising each stack are surrounded by a membrane-like structure, although its composition could not be unequivocally assessed with these techniques. The membrane observed with CEMOVIS presented a similar profile to the cytoplasmic membrane, but significant differences in the mean width indicated variations in composition or structure. In Tokuyasu cryosectioning, which outperforms other techniques

with regard to membrane visibility, the white staining of the discs membrane resembled that of cell lipid envelopes, which may indicate that this membrane is lipid in nature. The presence of a membrane surrounding the discs was also suggested by the FF-TEM analysis, although its appearance did not correspond to the cell bilayer membrane structure, since no characteristic globular intramembranous proteinaceous particles were seen attached to the fractured stick surfaces. Thus, our data suggest that the stacks are surrounded by a membrane that is not continuous with the PM, but we cannot yet confirm its composition or nature.

These observations ruled out the possibility that the newly described structures are artifacts, such as the case of mesosomes. The latter appear when bacteria are chemically fixed before any other process, causing certain membrane lipids to diffuse and assemble in the mesosome structure [40], a controversy eventually resolved by CEMOVIS and FS studies [41]. In our study, even the Tokuyasu technique (which also starts with a chemical fixation) preserved the stacks, since the state created by the chemical fixation was maintained throughout the subsequent low temperature procedures.

Two other significant features of the stacks are their variability and the fact that they were only visualized with frequency when the strain was grown at temperatures near the minimum required for growth ( $-4^{\circ}\text{C}$  in the case of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>). These structures varied in the number of stacks per cell, the number of discs in each stack, the size of the discs and the location of the stacks within the cell. Such variability suggests that they may be dynamic structures that are required to localize certain molecules in a particular place to perform a particular cellular function.

The fact that the stacks were mainly observed at  $0^{\circ}\text{C}$  may be associated with the slow growth of *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> at this temperature, which may prolong dynamic processes, making it easier to capture the temporary structures involved. In addition, TEM and Cryo-TEM based on cryoimmobilization by HPF allowed us to fix cells in terms of milliseconds and thus reveal specific cellular moments when structures are quickly assembled in the place where their function is required, to be then dismantled once their function is fulfilled. Since the stacks were not visualized in samples processed by conventional preparation for TEM or in rapid-growing cells, we hypothesize that they may constitute a kind of dynamic structure that would have been untraceable before the use of slowed-down growth cultures and cryopreparation techniques.

Despite their variability, an interesting finding is that the stacks observed in most of the preparations were embedded in or very close to DNA fibers. This was clearly visualized in Epon sections from samples processed by HPF-FS and in vitreous cryosections (CEMOVIS), the latter technique providing the best observations of the bacterial DNA structure without aggregation artifacts [42]. This suggests a possible relationship between these new structures and certain processes involved in the bacterial chromosome dynamics. However, we were unable to analyze this correlation, for two main reasons. Firstly, we could not visualize stacks in sections from cells grown on liquid media, which would have allowed us to use the cell synchronization methods required for the study of chromosome

dynamics and cell cycles in bacteria [43,44,45,46]. Secondly, we have not yet found a way of displaying these structures frequently enough in model bacteria, such as *E. coli* or *B. subtilis*, to perform studies of this kind (data not shown).

It should be emphasized that stacks are not exclusive to the new Antarctic bacterium *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup>. We have visualized them clearly in other species of the *Pseudomonas* genus, where they were structurally very similar, seen only in slow-growing cells, and also observed close to DNA fibers.

To sum up, applying TEM cryotechniques to study the new Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1<sup>T</sup> and other bacteria in slow-growing conditions, we have demonstrated the existence of a new cytoplasmic structure, which for the moment can be described as a set of stacked membranous discs arranged perpendicularly to the PM but not continuous with it. This interesting new structure merits further cryoelectron tomography studies to define its configuration more precisely. Furthermore, once the conditions for its visualization in model bacteria are identified, it will be possible to explore if it is associated with chromosome dynamics [47].

### Supporting Information

**Figure S1. TEM visualization of stacks from *P. deceptionensis* M1<sup>T</sup> cells processed by HPF-FS.** (A–D) 60 nm Epon sections. The PM is observed straight and uninterrupted and no continuity with stacks is observed in any case. Scale bars = 250 nm. (TIF)

**Movie S1. A dual-axis tomogram from a 250 nm Epon section.** The tilt series were acquired at 120 kV and the tomogram was filtered with bbif (Bsoft). A stack composed by 10 discs is observed perpendicular to the PM. (ZIP)

**Movie S2. A dual-axis tomogram from a 250 nm Epon section.** The tilt series were acquired at 200 kV and the tomogram was filtered with bbif (Bsoft). Two contiguous stacks displaced at an angle of  $130^{\circ}$  from each other are visible. Both are located close to the PM, and one of them is oriented perpendicular to the PM. Each stack is observed as a cluster of oval discs. (ZIP)

**Movie S3. Segmentation of the tomogram presented in Movie S2.** The 3D structure of the stack is revealed within the tomogram as a group of oval flat discs. In red, the outer membrane; in cream-color, the PM; in blue, the ribosomes; and in pink, the discs. (ZIP)

**Movie S4. A dual-axis tomogram from a 250 nm Lowicryl HM23 section.** The tilt series were acquired at 200 kV and the tomogram was filtered with Tomobflow. Flat clustered discs are visible perpendicularly distributed to the PM in a fragment of a cell.

(ZIP)

**Acknowledgements**

We thank Peter Peters and Jason Pierson (NKI-AVL) for helping us to develop vitreous cryosectioning in our laboratory, José Jesús Fernández (CNB) and José María Seguí (COMAV) for their help in tomography and Martin Rios (UB) for statistical support.

**References**

- Walsby AE (1994) Gas vesicles. *Microbiol Rev* 58: 94–144. PubMed: 8177173.
- Shively JM, Ball F, Brown DH, Saunders RE (1973) Functional Organelles in Prokaryotes: Polyhedral Inclusions (Carboxysomes) of *Thiobacillus neapolitanus*. *Science* 182: 584–586. doi:10.1126/science.182.4112.584. PubMed: 4355679.
- Parsons JB, Dinesh SD, Deery E, Leech HK, Brindley AA et al. (2008) Biochemical and Structural Insights into Bacterial Organelle Form and Biogenesis. *J Biol Chem* 283: 14366–14375. doi:10.1074/jbc.M709214200. PubMed: 18332146.
- O'Connell JD, Zhao A, Ellington AD, Marcotte EM (2012) Dynamic Reorganization of Metabolic Enzymes into Intracellular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 89–111. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155841. PubMed: 23057741.
- Shively JM (1974) Inclusion bodies of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 28: 167–187. doi:10.1146/annurev.mi.28.100174.001123. PubMed: 4372937.
- Bazylinski DA, Frankel RB (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol* 2: 217–230. doi:10.1038/nrmicro842. PubMed: 15083157.
- Drews G (1992) Intracytoplasmic membranes in bacterial cells: organization, function and biosynthesis. In *Prokaryotic Structure and Function*. S Mohan, C Dow and JA Coles editors. New York: Cambridge University Press. pp. 249–274.
- Niederman RA (2006) Structure, Function and Formation of Bacterial Intracytoplasmic Membranes. JM Shively. *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*. Microbiology Monographs. Berlin Heidelberg: Springer Verlag pp. 193–227.
- Gital Z (2005) The New Bacterial Cell Biology: Moving Parts and Subcellular Architecture. *Cell* 120: 577–586. doi:10.1016/j.cell.2005.02.026. PubMed: 15766522.
- Milne JLS, Subramaniam S (2009) Cryo-electron tomography of bacteria: progress, challenges and future prospects. *Nat Rev Microbiol* 7: 666–675. doi:10.1038/nrmicro2183. PubMed: 19668224.
- Steinbrecht RA, Zierold K (1987) Cryotechniques in biological electron microscopy. RA Steinbrecht/K Zierold. Springer-Verlag p. 328.
- Downing KH, Sui H, Comolli LR, Holman H-Y (2004) Electron Tomographic Studies of Bacterial Structure and Function. *Microsc Microanal* 10: 1184–1185. doi:10.1017/S1431927604882953.
- Jensen GJ, Biegel A (2007) How electron cryotomography is opening a new window onto prokaryotic ultrastructure. *Curr Opin Struct Biol* 17: 260–267. doi:10.1016/j.sbi.2007.03.002. PubMed: 17398087.
- Moissl C, Rachel R, Biegel A, Engelhardt H, Huber R (2005) The unique structure of archaeal "hami", highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Mol Microbiol* 56: 361–370. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04294.x. PubMed: 15813730.
- Shetty A, Chen S, Tocheva EI, Jensen GJ, Hickey WJ (2011) Nanopods: A New Bacterial Structure and Mechanism for Deployment of Outer Membrane Vesicles. *PLOS ONE* 6: e20725. doi:10.1371/journal.pone.0020725. PubMed: 21687732.
- Carrión O, Miñana-Galbis D, Montes MJ, Mercadé E (2011) *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2401–2405. doi:10.1099/ijs.0.024919-0. PubMed: 21062736.
- Frias A, Manresa A, Oliveira E de, López-Iglesias C, Mercadé E (2010) Membrane Vesicles: A Common Feature in the Extracellular Matter of Cold-Adapted Antarctic Bacteria. *Microb Ecol* 59: 476–486. doi:10.1007/s00248-009-9622-9. PubMed: 20127086.
- Walther P, Ziegler A (2002) Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water. *J Microsc* 208: 3–10. doi:10.1046/j.1365-2818.2002.01064.x. PubMed: 12366592.
- Jiménez N, Vocking K, van Donselaar EG, Humbel BM, Post JA et al. (2009) Tannic acid-mediated osmium impregnation after freeze-substitution: A strategy to enhance membrane contrast for electron tomography. *J Struct Biol* 166: 103–106. doi:10.1016/j.jsb.2008.12.009. PubMed: 19162195.
- Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng W-P, Frey TK, Fernández JJ et al. (2010) Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* 405: 579–591. doi:10.1016/j.viro.2010.06.043. PubMed: 20655079.
- Pierson J, Fernández JJ, Bos E, Amini S, Gnaegi H et al. (2010) Improving the technique of vitreous cryo-sectioning for cryo-electron tomography: Electrostatic charging for section attachment and implementation of an anti-contamination glove box. *J Struct Biol* 169: 219–225. doi:10.1016/j.jsb.2009.10.001. PubMed: 19822214.
- Bohmann B, Kellenberger E (1994) Immunostaining of DNA in electron microscopy: an amplification and staining procedure for thin sections as alternative to gold labeling. *J Histochem Cytochem* 42: 635–643. doi:10.1177/42.5.7512586. PubMed: 7512586.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR (1996) Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *J Struct Biol* 116: 71–76. doi:10.1006/j.sbi.1996.0013. PubMed: 8742726.
- Agulleiro JJ, Fernandez JJ (2011) Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics* 27: 582–583. doi:10.1093/bioinformatics/btq692. PubMed: 21172911.
- Agulleiro JJ, Garzón EM, García I, Fernández JJ (2010) Vectorization with SIMD extensions speeds up reconstruction in electron tomography. *J Struct Biol* 170: 570–575. doi:10.1016/j.jsb.2010.01.008. PubMed: 20085820.
- Heymann JB, Cardone G, Winkler DC, Steven AC (2008) Computational resources for cryo-electron tomography in Bsoft. *J Struct Biol* 161: 232–242. doi:10.1016/j.jsb.2007.08.002. PubMed: 17869539.
- Fernandez JJ (2009) TOMOBFLOW: feature-preserving noise filtering for electron tomography. *BMC Bioinformatics* 10: 178. doi:10.1186/1471-2105-10-178. PubMed: 19523199.
- Studer D, Humbel BM, Chiquet M (2008) Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol* 130: 877–889. doi:10.1007/s00418-008-0500-1. PubMed: 18795316.
- Pierson J, Vos M, McIntosh JR, Peters PJ (2011) Perspectives on electron cryo-tomography of vitreous cryo-sections. *J Electron Microsc* (Tokyo) 60 Suppl 1: S93–100. doi:10.1093/jmicro/dfr014. PubMed: 21844602.
- Fernandez JJ (2012) Computational methods for electron tomography. *Micron* 43: 1010–1030. doi:10.1016/j.micron.2012.05.003. PubMed: 22658288.
- Graham LL, Beveridge TJ (1990) Evaluation of freeze-substitution and conventional embedding protocols for routine electron microscopic processing of eubacteria. *J Bacteriol* 172: 2141–2149. PubMed: 2108131.
- Robinow C, Kellenberger E (1994) The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol Rev* 58: 211–232. PubMed: 7521510.
- Silva MT, Sousa JCF, Polónia JJ, Macedo MAE, Parente AM (1976) Bacterial mesosomes: Real structures of artifacts? *Biochim Biophys Acta Biomembr* 443: 92–105. doi:10.1016/0005-2736(76)90493-4.
- Tokuyasu KT (1973) A Technique for Ultracryotomy of Cell Suspensions and Tissues. *J Cell Biol* 57: 551–565. doi:10.1083/jcb.57.2.551. PubMed: 4121290.
- Carlemalm E, Villiger W, Hobot JA, Acetarin J-D, Kellenberger E (1985) Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *J Microsc* 140: 55–63. doi:10.1111/j.1365-2818.1985.tb02660.x. PubMed: 3912508.

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: LD CL-I EM. Performed the experiments: LD OC GM. Analyzed the data: LD CL-I EM. Contributed reagents/materials/analysis tools: LD OC GM CL-I EM. Wrote the manuscript: LD CL-I EM.

## Stacks: New Bacterial Cytoplasmic Structures

36. Studer D, Michel M, Müller M (1988) High pressure freezing comes of age. *Scan Microsc Suppl* 3: 253–268; discussion 268–9 doi: 10.1080/02827588809382513. PubMed: 2694271.
37. Al-Amoudi A, Chang JJ, Leforestier A, McDowall A, Salamin LM et al. (2004) Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J* 23: 3583–3588. doi:10.1038/sj.emboj.7600366. PubMed: 15318169.
38. Heuser JE (2011) The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 60 Suppl 1: S3–29. doi: 10.1093/jmicro/dfr044. PubMed: 21844598.
39. Bleck CKE, Merz A, Gutierrez MG, Walther P, Dubochet J et al. (2010) Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Microsc* 237: 23–38. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03299.x. PubMed: 20055916.
40. Ebersold HR, Cordier JL, Lüthy P (1981) Bacterial mesosomes: method dependent artifacts. *Arch Microbiol* 130: 19–22. doi:10.1007/BF00527066. PubMed: 6796029.
41. McDowall AW, Chang JJ, Freeman R, Lepault J, Walter CA et al. (1983) Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J Microsc* 131: 1–9. doi:10.1111/j.1365-2818.1983.tb04225.x. PubMed: 6350598.
42. Eltsov M, Zuber B (2006) Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. *J Struct Biol* 156: 246–254. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.007. PubMed: 16978880.
43. Helmstetter CE, Cummings DJ (1963) Bacterial synchronization by selection of cells at division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50: 767–774. doi:10.1073/pnas.50.4.767. PubMed: 14077509.
44. Helmstetter CE, Eenhuis C, Theisen P, Grimwade J, Leonard AC (1992) Improved bacterial baby machine: application to *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174: 3445–3449. PubMed: 1592802.
45. Lovett ST, Segall AM (2004) New views of the bacterial chromosome. *EMBO Rep* 5: 860–864. doi:10.1038/sj.embor.7400232. PubMed: 15319779.
46. Ferullo DJ, Cooper DL, Moore HR, Lovett ST (2009) Cell cycle synchronization of *E. coli* using the stringent response, with fluorescence labeling assays for DNA content and replication. *Methods* 48: 8–13. doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.010. PubMed: 19245839.
47. Fridman K, Mader A, Zwerger M, Elia N, Medalia O (2012) Advances in tomography: probing the molecular architecture of cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 736–742. doi:10.1038/nrm3453. PubMed: 23047735.





