

Tesis de Posgrado

Caracterización físico-química de la membrana de *Bacillus subtilis* frente al estrés osmótico : relevancia de los fosfolípidos aniónicos en la osmorrespuesta

López, Claudia S.

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

López, Claudia S.. (2002). Caracterización físico-química de la membrana de *Bacillus subtilis* frente al estrés osmótico : relevancia de los fosfolípidos aniónicos en la osmorrespuesta. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3515_Lopez.pdf

Cita tipo Chicago:

López, Claudia S.. "Caracterización físico-química de la membrana de *Bacillus subtilis* frente al estrés osmótico : relevancia de los fosfolípidos aniónicos en la osmorrespuesta". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3515_Lopez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.**

**Caracterización fisico-química de la membrana de *Bacillus subtilis* frente al estrés osmótico.
Relevancia de los fosfolípidos aniónicos en la osmorrespuesta.**

AUTOR: Lic. Claudia S. López.

DIRECTOR: Dr. Emilio A. Rivas.

Realizado en el Instituto de Biología Celular y Neurociencias Dr. E. De Robertis.

FACULTAD DE MEDICINA.

Y

Laboratorio de Microbiología del Departamento de Química Biológica.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

2002

3516

Dedico este trabajo

A mis viejos y a mi hermano quienes siempre confiaron en mi y como siempre digo me tuvieron fé!

A Alejandro, por nuestro gran amor y por ser un magnífico compañero.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a todos los que hicieron posible que este trabajo progresara y finalice.

Al CONICET por haber financiado mi beca de doctorado a lo largo de estos cuatro años.

Al Dr. Emilio Rivas por haberme iniciado en la investigación científica hace muchos años y por la dirección de esta tesis.

A la Dra. Carmen Sánchez-Rivas por haberme permitido realizar parte de esta tesis en su laboratorio.

Al Dr. Horacio Heras por su gran amistad, por su continuo interés en mi trabajo y mi persona y por el aporte que realizó a este trabajo.

Al Dr. Horacio Garda por su colaboración y dedicación en la mayoría de los ensayos de fluorescencia y por el tiempo y aporte que dedicó a este trabajo.

A todos los integrantes del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata que tuvieron que soportar mis largas horas de visitas en estos años y que hicieron que mis viajes continuos a La Plata sean un placer y no una obligación.

A la Dra. Delia Bernik por las discusiones enriquecedoras, por su amistad y por el tiempo que dedicó a este trabajo.

A mi compañera de laboratorio Cecilia. Porque pasamos mucho tiempo juntas a lo largo de estos años, en los cuales compartimos ideas, opiniones, alegrías, logros, fracasos, experiencias, broncas, medias lunas tostadas y porque no algún que otro sándwich de milanesa y por supuesto por las largas mateadas.

A la Dra. Sandra Verstraeten por su amistad y por las permanentes discusiones fructíferas acerca de la fluorescencia como metodología universal para descifrar todas las inquietudes de la ciencia.

A mis amigos, los de siempre y los que se han ido incorporando en años más recientes.

A mis compañeros del Instituto de Biología Celular y Neurociencias Diego, Alba, Leonardo, Marina, Hugo y Jimena por haberme sacado más de una vez de algún apuro y por su amistad.

A las chicas del laboratorio de Microbiología, las que ya no están Adriana y Marina y las que todavía siguen en la lucha Mariana y Sandra.

A las personas del laboratorio de Inmunología del Departamento de Química Biológica, por su colaboración y porque nunca mezquinaron su ayuda: Dr. Juan Fló, a Hebe, Caty, Rubén, Liliana y Fernanda.

A Susana, Rober y Mari.

RESUMEN.

La respuesta de las bacterias al estrés osmótico es actualmente de gran interés debido a los aspectos importantes de su aplicación. La mayoría de los estudios realizados en procariotas se han focalizado sobre la regulación genética y sobre aspectos fisiológicos de la adaptación a la alta osmolaridad. El comportamiento de las envolturas no ha sido prácticamente estudiado, sin embargo, existen diversas evidencias que sugieren que la composición de las envolturas celulares posee un rol importante durante el mecanismo de osmosensado. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar el efecto del estrés osmótico sobre la estructura y composición bioquímica y biofísica de las membranas de *Bacillus subtilis* YB886 utilizando diferentes enfoques como la bioquímica, espectroscopía de fluorescencia y biología molecular.

En esta tesis demostramos que se producen importantes variaciones en la composición de lípidos polares y de ácidos grasos (AG) durante la adaptación de *B. subtilis*. Entre los principales fosfolípidos presentes en la membrana de esta especie, se observó que cuando la bacteria es crecida en medios hipersalinos se produce una disminución en el contenido de fosfatidilglicerol de 40 a 31% y un aumento en el de cardiolipina de 24 a 46%. Además de las variaciones observadas a nivel del grupo polar de los lípidos, se determinó un cambio significativo en la composición de AG entre las diferentes condiciones de cultivo. Las células crecidas en el medio hipersalino presentan una marcada disminución en el contenido de AG saturados ramificados y un aumento en el de los saturados lineales. Asimismo, se observó un aumento en el contenido de los AG monoinsaturados, los cuales representan un 6% bajo condiciones normales de crecimiento y alcanzan un 18% en estrés osmótico.

Con el objetivo de caracterizar la estructura y dinámica de la membrana, se utilizaron diferentes técnicas espectroscópicas. Se determinó que en respuesta al estrés osmótico se produce un aumento en el empaquetamiento de los lípidos de las membranas, hecho que fue evidenciado por medio de las tres sondas fluorescentes utilizadas. No obstante, esta variación no se observó en los liposomas preparados con los lípidos extraídos a partir de las células, indicando que el aumento en el empaquetamiento de los lípidos depende de la presencia de las proteínas de membrana. En este trabajo también se determinó que en las membranas de *B. subtilis* otras propiedades físicas de la membrana, como la hidratación de la interfaz, cambia en función de la osmolaridad del medio exterior.

Además, se construyeron diversas cepas mutantes para la biosíntesis de fosfolípidos. Los resultados obtenidos demostraron la importancia de los lípidos aniónicos (cardiolipina y fosfatidilglicerol específicamente) en la adaptación al estrés osmótico en esta especie. Nuestros resultados indican que la interrupción del gen *cls2* provoca una deficiencia total en la síntesis de cardiolipina, sugiriendo que el producto del gen *cls2* es la principal cardiolipina sintasa en esta especie.

En esta tesis se demostró por primera vez los cambios biofísicos y bioquímicos que se producen en la membrana de *B. subtilis* en respuesta al estrés osmótico. Estos cambios serían indispensables para contrarrestar el desbalance osmótico presente entre las células y el medio externo.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, estrés osmótico, lípidos aniónicos, microviscosidad de la membrana, cardiolipina.

ABSTRACT.

Bacterial response to osmotic stress is of current and increasing interest due to the important aspects of its applications. Most of the studies on prokaryotes have centered on genetic regulation and physiological aspects of their adaptation to high osmolarity. The behavior of the envelopes has been practically unexplored; nevertheless, several evidences suggest that the cell envelope composition plays an important role during the osmosensing mechanism. The aim of the present work was to study the effect of osmotic stress on the biochemical and biophysical parameters of structure and composition of the *Bacillus subtilis* YB886 membrane using different approaches such as biochemistry, fluorescence spectroscopy and molecular biology.

In this thesis we demonstrated that there are important variations in membrane polar lipid composition and fatty acids (FA) during osmoadaptation in *B. subtilis*. Among the major phospholipids present in the *B. subtilis* membrane, a decrease in phosphatidylglycerol content from 40 to 31%, and an increase in cardiolipin content from 24 to 46% were observed when the bacteria were grown in hypersaline medium. In addition to the variations observed at the polar group level, the FA composition, in particular, showed a significant change between different growth conditions. Bacterial growth in hypertonic medium resulted in a remarkable decrease in the branched-chain saturated FA content, and an increase in straight-chain saturated FA. There was also a significant increase of unsaturated FA, which represented 6% in normal conditions and reached 18% during osmotic stress.

In order to characterize membrane structure and dynamics, different spectroscopic techniques were used. Bacteria growth in hyperosmotic media evoked an increase in the lipid packing in isolated whole membranes, fact that was evidenced by the three fluorescent probes used. However, this effect was not observed in liposomes prepared with the extracted bacterial lipids indicating that it was strongly dependent on the presence of membrane proteins. In this work we also indicate that in *B. subtilis* membranes, other physical properties as interface hydration change as a function of the external medium osmolarity.

In addition, several mutants for phospholipids biosynthesis were constructed. We demonstrated the importance of anionic lipids (cardiolipin and phosphatidylglycerol specifically) for the adaptation of this specie to osmotic stress. Our results indicated that the interruption in gene *cls2* resulted in a complete deficiency in cardiolipin synthesis, suggesting that *B. subtilis cls2* gene product to be the major cardiolipin synthase.

In our knowledge this is the first report about the biophysical and biochemical adaptation of the *B. subtilis* membranes to osmotic stress. These changes would be indispensable to counteract the osmotic imbalance between the cells and the external medium.

Keywords: *Bacillus subtilis*, osmotic stress, anionic lipids, membrane microviscosity, cardiolipin.

INTRODUCCIÓN:	
A.- Estrés Osmótico y Osmorregulación:	1
A.1.- Conceptos generales:	1
A.2.- Respuesta a estrés hiperosmótico:	3
A.3.- Acumulación de osmoprotectores:	3
A.4.- Mecanismo de osmosensado:	4
A.4.1.- Turgencia celular:	5
A.4.2.- Propiedades mecánicas de las envolturas celulares:	7
A.4.3.- Propiedades fisico-químicas de las membranas:	8
A.4.4.- Señal osmótica:	9
A.5.- La membrana citoplasmática como blanco del estrés osmótico:	10
B.- <i>Bacillus subtilis</i>:	11
B.1.- Características generales del género <i>Bacillus</i>:	11
B.2.- Esporulación:	12
B.3.- Estrés en <i>B. subtilis</i>:	13
B.3.1.- Respuesta general a estrés en <i>B. subtilis</i>:	13
B.3.2.- Estrés osmótico en <i>B. subtilis</i>:	14
OBJETIVOS:	18
MATERIALES Y MÉTODOS:	19
I.-Cepas y plásmidos utilizados:	19
II.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano:	20
II.1.- Crecimiento bacteriano:	20
II.2.- Toxicidad por deoxicolato de sodio:	20
II.3.- Ensayos de esporulación:	21
II.4.- Medios de cultivo:	21
Parte 1: Métodos Generales.	
III- Extracción lipídica:	22
IV.- Cromatografía en placa delgada:	24
IV.1.- Separación de lípidos polares:	24
IV.2.- Aislamiento de lípidos polares:	25
V.- Determinación de fósforo:	25
VI.- Determinación de azúcares:	25
VII.- Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos:	26

II

XXII.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):	41
XXIII.- Southern blot:	41
XXIV.- Primers utilizados:	42
XXV.- Construcción de cepas mutantes de <i>B. subtilis</i>:	43
XXV.1.- Gen <i>ywiE</i> (<i>cls1</i>):	43
XXV.2.- Gen <i>ywnE</i> (<i>cls2</i>):	43
XXV.3.- Gen <i>pgsA</i>:	43
XXVI.- Construcción de la cepa CL21:	44
XXVII.- Medición de actividad β galactosidasa:	45
 Capítulo 1. Envolturas: caracterización bioquímica.	
C.-Envolturas:	47
C.1.- Pared Celular:	47
C.1.1.- Peptidoglicano:	48
C.1.2.- Acidos teicoicos y lipoteicoicos:	49
C.2.- Membrana Citoplasmática:	51
C.2.1.- Lípidos:	52
C.2.2.- Fosfolípidos:	53
C.2.3.- Fosfolípidos en <i>Bacillus subtilis</i>: Biosíntesis.	54
C.2.4.- Acidos grasos en <i>Bacillus subtilis</i>: Biosíntesis.	57
 1.- Cambios producidos en las envolturas de <i>B. subtilis</i> como consecuencia del crecimiento bajo estrés osmótico.	61
1.1.- Caracterización del crecimiento de <i>B. subtilis</i> en un medio hipersalino:	61
1.1.1.- Curvas de crecimiento en respuesta a distintas concentraciones de NaCl presentes en el medio de cultivo:	61
1.1.2.- Morfología celular:	62
1.2.- Caracterización de los lípidos polares presentes en <i>B. subtilis</i> crecido en altas concentraciones salinas:	64
1.2.1.- Caracterización de los lípidos polares de <i>B. subtilis</i>:	64
1.2.1.1.- Cuantificación de los lípidos polares extraídos a partir de células enteras de <i>B. subtilis</i>:	65
1.2.1.2.- Fosfolípidos aniónicos:	67

1.2.1.3.- Cuantificación del glicolípido:	68
1.3.- Relación entre fosfolípidos y proteínas de membrana:	69
1.4.- Acumulación de glicerol como consecuencia del cambio en el metabolismo del PG:	70
1.5.- Composición de ácidos grasos en <i>B. subtilis</i> crecidos en altas concentraciones de NaCl:	71
1.6.- Composición de lípidos polares y de ácidos grasos en células de <i>B. subtilis</i> sometida a un shock osmótico:	73
1.6.1.- Lípidos polares:	73
1.6.2.- Ácidos grasos:	75
 Capítulo 2. Envolturas: caracterización fisico-química.	
D.- Características fisico-químicas de las bicapas lipídicas:	77
D.1.- Transición de fases:	78
D.2.- Fluidez de las membranas:	78
D.3.- Empaquetamiento lateral de lípidos:	79
D.4.- Estabilidad de las bicapas lipídicas:	80
D.5.- Formación de dominios lipídicos:	83
 2.- Espectroscopía de fluorescencia de membranas y liposomas de la cepa YB886 de <i>Bacillus subtilis</i> crecida bajo condiciones normales y de estrés osmótico.	
2.1.- Anisotropía del DPH y TMA-DPH:	84
2.1.1.- Anisotropía del DPH y del TMA-DPII: estado estacionario:	84
2.1.2.- Determinación de parámetros dinámicos del DPH y del TMA-DPH:	87
2.1.3.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario del DPII durante shock osmótico:	89
2.1.4.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario del DPH medido sobre células enteras:	90
2.2.- Propiedades de la interfaz lípido/agua:	92
2.2.1.- Propiedades de la interfaz en liposomas contruídos a partir de lípidos polares:	92
2.2.2.- Propiedades de la interfaz en liposomas contruídos	

a partir de lípidos totales:	96
2.2.3.- Incorporación del Laurdan en membranas aisladas:	99
2.2.4.- Propiedades de la interfaz en membranas aisladas:	100
2.2.5.- Propiedades de la interfaz en membranas aisladas de células sometidas a un shock osmótico:	104
2.3.- Ensayos de solubilización con detergentes:	106
2.4.- Permeabilidad a protones medida sobre liposomas contruídos a partir de lípidos totales:	108
2.4.1.- Ensayos de fluorescencia con naranja de acridina:	109
2.4.2.- Mediciones de dispersión luminosa o “light scattering” estático durante el proceso de permeabilidad a protones:	112
2.5.- Formación de dominios de cardiolipina:	113
2.5.1.- Puesta a punto sobre sistemas modelos de liposomas:	114
2.5.1.1.- Espectros de emisión de NAO en función de la concentración de la sonda:	114
2.5.1.2.- Determinación del potencial de superficie:	121
2.5.2.- Determinación de dominios de cardiolipina en muestras biológicas:	122
2.5.2.1.- Determinación de dominios de cardiolipina sobre liposomas de lípidos totales obtenidos de las cepas YB886 y CL2:	122
2.5.2.2.- Determinación de dominios de cardiolipina sobre membranas aisladas obtenidas de las cepas YB886 y CL2:	124
 Capítulo 3. Fosfolípidos aniónicos.	
E.- Fosfolípidos aniónicos:	127
E.1.- Rol de los fosfolípidos aniónicos:	127
E.2.- Características de la cardiolipina:	127
E.3.- Características bioquímicas de células mutantes para la biosíntesis de PG y de CL:	129
 3.- Construcción y caracterización bioquímica de cepas de <i>B. subtilis</i>	

mutantes para la biosíntesis de lípidos aniónicos:	131
3.1.- Construcción y caracterización bioquímica de cepas de <i>B. subtilis</i>	
mutantes para la biosíntesis de cardiolipina:	131
3.1.1.- Construcción de las cepas:	131
3.1.1.1.- Construcción de la cepa CL1, mutante para el gen <i>ywiE</i> :	132
3.1.1.2.- Construcción de la cepa CL2, mutante para el gen <i>ywnE</i> :	133
3.1.2.- Composición lipídica de las membranas de las cepas CL1 y CL2:	135
3.1.2.1- Composición fosfolipídica de las cepas CL1 y CL2:	135
3.1.2.2- Cuantificación del DGDG en las cepas CL1 y CL2:	138
3.1.3.- Crecimiento de la cepa CL2 en hiperosmolaridad:	138
3.1.3.1- Curvas de crecimiento de la cepa wt y CL2 en distintas concentraciones de NaCl:	138
3.1.3.2- Osmorresistencia determinada por crecimiento en placa de la cepa CL2:	140
3.1.4.- Composición fosfolipídica de la cepa CL2 crecida bajo condiciones de hiperosmolaridad:	140
3.1.5.- Cuantificación del DGDG en la cepa CL2 crecida bajo condiciones de hiperosmolaridad:	142
3.1.6.- Composición de ácidos grasos en condiciones de crecimiento normales y de hiperosmolaridad:	143
3.1.7.- Expresión del gen <i>cls2</i> :	143
3.1.7.1- Monitoreo de la actividad β -galactosidasa en la cepa CL2:	143
3.1.7.2- Monitoreo de la actividad β -galactosidasa en la cepa CL21:	145
3.1.8.- Caracterización físico-química de la membrana de la cepa CL2:	147
3.1.8.1.- Resistencia a sales biliares:	147
3.1.8.2.- Permeabilidad a protones: ensayos de fluorescencia con naranja de acridina:	149
3.1.8.3.- Propiedades de interfaz lípido/agua:	151

Capítulo 3:	
Fosfolípidos aniónicos:	177
a) Mutantes para la biosíntesis de cardiolipina:	
caracterización fisiológica, bioquímica y genética frente	
al estrés osmótico:	177
b) Mutantes para la biosíntesis de cardiolipina: caracterización	
físico-química:	179
c) Mutante para la biosíntesis de fosfatidilglicerol: caracterización	
fisiológica, bioquímica y genética:	181
Aportes y perspectivas de este trabajo:	183
Conclusiones:	184
Apéndice:	185
Bibliografía:	186

INTRODUCCIÓN GENERAL.

INTRODUCCIÓN GENERAL:

A.- Estrés Osmótico y Osmorregulación:

A.1.- Conceptos generales:

Los microorganismos habitan ambientes naturales y artificiales que poseen propiedades físico-químicas fluctuantes, incluyendo a la osmolaridad, la salinidad, la temperatura y el pH. En cuanto a la osmolaridad externa, los microorganismos deben mantener la hidratación citoplasmática que requiere el crecimiento y la supervivencia a pesar de las variaciones externas en la actividad de agua (a_w). Por ejemplo, las bacterias del suelo son capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo a la desecación, los patógenos de las vías urinarias toleran concentraciones y diluciones extremas del medio circundante, y los organismos utilizados en la industria toleran soluciones de nutrientes altamente concentradas así como la acumulación de productos metabólicos.

Las bacterias son capaces de responder tanto de una manera pasiva como activa a los cambios en la osmolaridad de su entorno. En la tabla 1 se detalla un resumen acerca de cómo ocurre este fenómeno en *Escherichia coli*, donde ha sido estudiado (Wood, 1999).

Se pueden considerar tres fases distintas como respuesta de las bacterias a un aumento en la osmolaridad extracelular: deshidratación (fase I), ajustes en la composición del citoplasma y rehidratación (fase II) y remodelado celular (fase III).

Las respuestas debidas a una disminución en la osmolaridad externa no han sido estudiadas en profundidad, pero al parecer también podrían dividirse en tres fases: ingreso de agua (fase I), exclusión del agua y cosolventes (fase II) y reacumulación de cosolventes citoplasmáticos con la concomitante remodelación celular (fase III).

Muchas de estas respuestas celulares que se disparan como consecuencia del estímulo osmótico (ya sea hiper o hipoosmótico) pueden ocurrir en forma paralela.

La membrana citoplasmática es altamente permeable al agua por lo tanto los desbalances impuestos entre la presión de turgencia (ver apéndice) y el gradiente osmótico a través de la pared celular son de corta duración. Los cambios producidos en la estructura, organización y composición celular que se producen debido a un flujo neto de agua a través de la membrana (columna de la izquierda) son modulados por cambios fisiológicos en la célula (columna de la derecha).

TABLA 1.

Estrés hiperosmótico:			
Fase	Cambio estructural	Duración aprox.	Cambio Fisiológico.
I	- Deshidratación celular. - Reducción del citoplasma por disminución en el a_w. - Aumento de la concentración macromolecular del citoplasma. - Alteraciones en la pared y membrana.	1-2 min.	- Interrupción de la mayoría de los transportes y de la respiración. - ΔpH transientemente aumentado. - Niveles de ATP aumentados en forma transiente.
II	- Reemplazo de los contraiones de los ácidos nucleicos. - Comienzo de la hidratación celular.	20-60 min.	- Exclusión de putrescina. - Acumulación de solutos compatibles. - Reducción de la respiración. (reducción en la tasa). - Restauración del $\Delta\mu_H^+$. - Restauración de niveles de ATP.
III	- Remodelado de la pared celular y nucleóide. - Reanudación de la síntesis de DNA y proteínas. - Reanudación del crecimiento y división celular.	1 hora o más.	- Expresión de los genes de osmorespuesta (ej. <i>proA</i>, <i>proU</i>). - Establecimiento del ciclo de ingreso y egreso de solutos osmocompatibles.

Estrés hipoosmótico:			
Fase	Cambio estructural	Duración aprox.	Cambio Fisiológico
I	- Hidratación celular. - Aumento del volumen citoplasmático por a_w elevado. - Disminución de la concentración macromolecular del citoplasma. - Alteraciones en la pared y membrana.	< 1 min.	- Apertura de canales.
II	- Reducción del tamaño celular. - Aumento de la concentración del citoplasma.	1-2 min.	- Colapso del $\Delta\mu_H^+$? - Exclusión de agua y cosolventes. (ver apéndice).
III	- Desconocido	10-20 min.	- Cierre de canales. - Restauración del $\Delta\mu_H^+$. - Reacumulación de cosolventes.

A.2.- Respuesta a estrés hiperosmótico:

Un microorganismo responde a una nueva situación fisiológica esencialmente en dos etapas:

- la primera etapa (Fases I y II) ocurre cuando el microorganismo, del cual se espera su desarrollo, es transferido a un nuevo ambiente. Los cambios que ocurren en esta etapa están asociados con ajustes termodinámicos a las nuevas condiciones y son comparativamente rápidos (salida y entrada de agua). Cuando la variación en el medio circundante involucra cambios en la actividad del agua, los ajustes termodinámicos involucran un estrés osmótico transiente. Este proceso de ajuste puede ser modificado por el microorganismo si este posee una fuente de energía apropiada.

- la segunda etapa de adaptación (Fase III) ocurre cuando los microorganismos han realizado los ajustes termodinámicos y entonces pueden crecer. Esta etapa involucra alteraciones en el metabolismo del microorganismo, cambios en la actividad y regulación enzimática y posibles cambios en las envolturas. Estos procesos son más complejos y más lentos que aquellos que ocurren en la primera etapa.

A.3.- Acumulación de osmoprotectores:

La modulación de la composición del citoplasma (en lo que respecta a cosolventes) debido al estrés osmótico es la única respuesta que revierte el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano. Los principios que gobiernan a este proceso y que ocurre en distintos géneros bacterianos (tanto en Gram positivos como en Gram negativos) son los siguientes:

- i) Aumento en la concentración de determinados solutos citoplasmáticos.
- ii) Existencia de una jerarquía en la preferencia de acumulación de los solutos en respuesta al estrés hiperosmótico. En particular, los cosolventes orgánicos de naturaleza zwitteriónica como la ectoína y glicin-betaina son seleccionados por su rol como osmoprotectores por sobre solutos inorgánicos como el K^+ . En la tabla 2 se muestran algunos de los solutos que son acumulados por diversos organismos en respuesta al estrés osmótico.
- iii) Osmoregulación del ingreso, eflujo, biosíntesis y/o catabolismo, requerida para la modulación de la concentración de estos solutos en el citoplasma.

Las enzimas y los genes responsables de la modulación de los niveles de osmoprotectores han sido identificados en diversos géneros bacterianos. No obstante, se conoce muy poco acerca del mecanismo por el cual las bacterias son capaces de sensar los

cambios osmóticos (o mecanismos osmosensoriales) y acerca de la selección de solutos osmoprotectores (Rübenhagen *et al.*, 2000, van der Heide & Poolman, 2000).

TABLA 2.

Osmoprotectores descritos (Yancey *et al.*, 1982, Csonka, 1989, Csonka & Hanson, 1991, Kempf & Bremer, 1998).

Soluto	Organismo	Modo de Acumulación
<u>Iones Inorgánicos:</u>		
Potasio.	<i>E. coli</i>	transporte.
	<i>B. subtilis</i>	transporte.
	<i>S. aureus</i>	transporte.
	<i>L. plantarum</i>	transporte.
<u>Aminoácidos:</u>		
Prolina.	<i>S. faecalis</i>	síntesis.
	<i>B. subtilis</i>	síntesis y transporte.
	<i>L. plantarum</i>	transporte.
	<i>S. aureus</i>	síntesis.
Glutamina	<i>E. coli</i>	transporte y síntesis.
	<i>S. oraniemburg</i>	transporte y síntesis.
<u>Azúcares:</u>		
Trealosa	<i>E. coli</i>	síntesis.
	<i>Rhizobium</i> sp.	síntesis.
	<i>M. xantus</i>	síntesis.
Ac. γ -amino butírico.	<i>K. pneumoniae</i>	transporte.
<u>Aminoácidos N-Metil sustituidos</u>		
Glicin-betaína	<i>L. plantarum</i>	transporte.
	<i>V. costicola</i>	transporte.
	<i>A. brasiliense</i>	transporte.
	<i>R. sphaeroides</i>	transporte y síntesis.
Taurinbetaina	<i>K. pneumoniae</i>	transporte.
<u>Alcoholes Polihídricos – Polioles</u>		
Glicerol	<i>Dunaliella</i> spp.	síntesis.
	<i>Ch. pyrenoidosa</i>	síntesis.
Glucosilglicerol	<i>Synechococcus</i> sp.	síntesis.

A.4.- Mecanismos de osmosensado:

Los quimiosensores son capaces de detectar los cambios en el ambiente extracelular gracias a la especificidad ligando-receptor. Entre estos cambios podemos mencionar tanto los

cambios en la concentración de nutrientes como las señales de origen biológico. Sin embargo, un osmosensor es capaz de detectar los cambios extracelulares en la actividad del agua (a_w) por medio de un osmosensado directo, o los cambios en la estructura celular por medio de lo que se denomina osmosensado indirecto. En contraste con los mecanismos quimiosensoriales, los osmosensoriales no están basados en la estereoespecificidad de las interacciones ligando-receptor que ocurren sobre sitios específicos en las moléculas del receptor. Los osmosensores serían macromoléculas capaces de sufrir cambios conformacionales y/u oligomerización en respuesta a cambios en la composición del solvente extracelular o debido a un estímulo mecánico. Con los conocimientos actuales acerca de este tema, se sugiere que los osmosensores se encontrarían localizados en la membrana citoplasmática y en el nucleóide bacteriano (Chang *et al*, 1998).

La activación osmótica de las proteínas de membrana podría ser llevada a cabo por medio de distintas vías: i) por los cambios en la presión de turgencia, ii) por deformación mecánica de la membrana, iii) por un estímulo mecánico originado en el exo o citoesqueleto de la célula, iv) por cambios en el estado de hidratación de las proteínas, v) por alteraciones en las propiedades físico-químicas de las membranas (como por ejemplo la interacción lípido-proteína), vi) por variaciones en la concentración del citoplasma y vii) por interacción directa de moléculas específicas con ciertas proteínas (Poolman *et al*, 2002).

A.4.1- Turgencia celular:

Los cambios ocurridos en la osmolaridad externa son capaces de disparar cambios en la estructura de la célula y/o en el flujo de agua a través de la superficie celular. La presión de turgencia (ver apéndice) es la diferencia en la presión hidrostática que balancea la diferencia de la concentración de osmolitos entre el exterior y el interior celular. En el caso de las células, las cuales pueden ser tratadas como si tuviesen dos compartimientos, se puede expresar a la presión de turgencia como:

$$\Delta P = P_i - P_e = \Pi_i - \Pi_o = RT (\text{Osm}_i - \text{Osm}_e) \quad (1)$$

donde P es la presión hidrostática, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta, Π la presión osmótica y Osm la osmolalidad (i del interior, e del exterior de la célula).

Los cambios impuestos sobre la presión de turgencia, dan lugar a un ΔP causando que el solvente fluya a través de la superficie celular de manera tal de reestablecer el equilibrio

descrito en la ecuación 1. Sobre la base de las mediciones realizadas acerca de la permeabilidad del agua a través de liposomas y de vesículas de membrana, se esperaría que el equilibrio se reestablezca segundos después de ocurrido el cambio osmótico. En el caso en el que el ΔP sea negativo la célula se plasmolisa.

Para un determinado organismo, por ejemplo *E. coli*, la variación de la presión de turgencia se modifica en respuesta a los cambios en la osmolalidad externa y puede disminuir desde 3 a 0.5 atm cuando la osmolalidad del medio de cultivo aumenta de 0.03 a 0.8 osm/kg. Si bien, una presión de turgencia de 0.5 atm es suficiente para permitir el crecimiento de *E. coli*, es probable que en el caso de bacterias Gram positivas este límite sea inferior, ya que las mismas poseen una pared celular de mayor grosor (Poolman *et al.*, 2002).

La presión de turgencia, al estar modulada por la interacción entre la pared celular y la membrana citoplasmática, estaría ejerciendo un estrés sobre la superficie celular. En el caso de una célula esférica de superficie delgada a la cual se le impone un cambio en la osmolaridad externa, la relación entre la presión de turgencia y el estrés impuesto (S), se establece la siguiente relación:

$$S = \Delta P (r / 2h) \quad (2)$$

donde r es el radio celular y h es el grosor de la capa superficial.

La envoltura celular de la mayoría de las bacterias es gruesa en relación a su radio de curvatura, no obstante, en el caso de células no esféricas (como *Bacillus subtilis*), el estrés impuesto sobre la superficie celular es más complejo y más difícil de ser comprendido con un simple modelo esférico.

En teoría, los osmosensores deberían ser capaces de detectar estos cambios producidos en la presión de turgencia. Este tipo de modelo ha sido propuesto para la quinasa de membrana KdpD, la cual es un componente de la transducción de señales que regula osmóticamente la expresión del operon *kdpFABC* de *E. coli* involucrado en el transporte de K^+ (Laimins *et al.*, 1981). En este modelo se asume que la turgencia se mantiene a través de la membrana citoplasmática. No obstante, existen evidencias que en las bacterias Gram negativas el citoplasma y el periplasma son isotónicos y, por lo tanto, la turgencia es mantenida principalmente a través del complejo membrana-pared celular y no solamente por medio de la membrana citoplasmática (Cayley *et al.*, 2000).

Si esto es así, la turgencia probablemente no sería la señal regulatoria primaria para los transportadores o para la transducción de señales de los componentes presentes en la

membrana citoplasmática. Finalmente, puesto que las vesículas de membrana y los sistemas de liposomas pueden resistir solamente bajas presiones en comparación con las células que contienen peptidoglicano, la incorporación funcional de proteínas sensoras en estos sistemas artificiales que responden a bajas turgencias debería presentar una actividad constitutiva. (Poolman *et al.*, 2002). Sin embargo, distintas clases de sistemas osmorregulados, incluyendo al transportador OpuA de *Lactococcus lactis* (Van der Heide & Poolman, 2000), al transportador BetP de *Corynebacterium glutamicum* (Rübenhagen *et al.*, 2000), ProP de *E. coli* (Racher *et al.*, 1999) y las quinasas KdpD y EnvZ de *E. coli* (Jung *et al.*, 2000, 2001), muestran una regulación funcional normal cuando se encuentran en las vesículas de membrana o cuando son incorporados en proteoliposomas, sugiriendo que la turgencia no es el estímulo principal. En conjunto, estos resultados sugieren que sería improbable que cualquier molécula osmosensora de la membrana citoplasmática bacteriana responda directamente a cambios en la turgencia celular.

A.4.2.- Propiedades mecánicas de las envolturas celulares:

Las propiedades mecánicas de las superficies celulares, así como las de las membranas fosfolipídicas, podrían ser descritas en principio en términos de su viscosidad y de su elasticidad (es decir la capacidad de deformarse de manera reversible). Por ejemplo, ha sido descrito que las paredes bacterianas son más rígidas, pero más elásticas que las membranas citoplasmáticas (Thwaites & Mendelson, 1991).

Asimismo, dichos autores postulan que las células que poseen superficies celulares de mayor tamaño experimentan un mayor estrés debido al cambio en la presión de turgencia que aquellas que poseen menor extensión superficial. Sin embargo aquellas que poseen una superficie celular de mayor grosor se contraerán y expandirán menos que aquellas que poseen superficies más delgadas.

En las bacterias Gram positivas la pared celular constituye la capa más externa y es dinámicamente variable y flexible. Además, ésta se encuentra íntimamente relacionada con la morfogénesis, la división celular, la segregación del genoma, la interacción entre la célula y el medio circundante y el movimiento de solutos hacia fuera y hacia adentro de la célula. Debido a sus propiedades físico-químicas, en particular a su limitada porosidad y a su alta concentración de grupos cargados, la pared puede bloquear el movimiento de solutos entre la membrana citoplasmática y el medio. Así como la pared celular es una estructura “rígida pero flexible” que da lugar al tamaño y forma de la célula, la membrana citoplasmática o protoplasmática actuaría como la estructura osmóticamente activa.

A.4.3- Propiedades físico-químicas de las membranas:

Son pocos los estudios realizados acerca del rol de la membrana en el mecanismo de activación de los transportadores de solutos osmoprotectores. Los únicos reportes publicados son los de OpuA de *L. lactis* (Van der Heide & Poolman, 2000; Van der Heide *et al.*, 2001), y del transportador BetP de *C. glutamicum* (Rübenhagen *et al.*, 2000). Para definir el mecanismo de osmosensado, las distintas proteínas fueron incorporadas en liposomas con diferente composición lipídica. De esta manera se variaron las propiedades físico-químicas de las membranas como la fluidez, ancho de la bicapa, carga de la cabeza polar, polaridad de la interfaz y/o la presión lateral. A partir de estos cambios se observó que la actividad óptima de OpuA y BetP se detecta en presencia de lípidos aniónicos compuestos principalmente de ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. En estos trabajos, se demostró que la fracción aniónica de los lípidos es de gran importancia para la activación osmótica de OpuA, mientras que la variación en la longitud de las cadenas parafínicas, la posición y la configuración del doble enlace presenta efectos menores. Por lo tanto, el ancho de la bicapa, aparentemente no sería de gran importancia para la regulación de la actividad de OpuA (Van der Heide *et al.*, 2001).

Se ha descrito que la presión local de la membrana medida a distintas profundidades de la misma no es uniforme, denominándose a este fenómeno perfil de presión lateral. Cálculos termodinámicos realizados estadísticamente sobre el equilibrio de perfiles de presión lateral en la membrana, predicen una redistribución de dicha presión cuando varían la longitud de las cadenas parafínicas, el grado, la posición y la configuración de la insaturación y la repulsión de los grupos polares (Cantor, 1999). Estos cambios en el perfil lateral influyen sobre la conformación y la actividad de las proteínas. Sin embargo, en los estudios mencionados acerca de la activación osmótica del transportador OpuA de *L. lactis* demostraron que es improbable que el estrés osmótico sea detectado debido a una perturbación en el perfil de presión lateral (van der Heide *et al.*, 2001). En contraste con estos resultados, la apertura de los canales mecanosensoriales (MscL) de *E. coli* se encontraría relacionada directamente con la variación que se produce en dicho perfil en respuesta al estrés osmótico. Aunque es altamente probable que este estímulo sea la clave que induce la activación de estos canales, serían necesarios otro tipo de estudios para comprobar esta teoría (Poolman *et al.*, 2002).

A.4.4- Señal osmótica:

Los resultados obtenidos hasta el presente acerca del mecanismo de osmosensado de las proteínas de membrana OpuA y BetP y de las quinasas KdpD y EnvZ indicarían que la primera señal que se produce en respuesta al estrés osmótico es el aumento en la concentración iónica de osmolitos intracelulares. Esta señal, no sería detectada directamente por las proteínas debido a cambios en la superficie de hidratación de la misma o por medio de uniones específicas de determinados iones, sino que serían las membranas, en las cuales se encuentran dichas proteínas, las que estarían actuando como mediador. Es probable que los cambios producidos en las concentraciones de iones intracelulares alteren a las interacciones específicas entre los lípidos cargados y las proteínas afectando consecuentemente su actividad (Poolman *et al.*, 2002).

Cuando se produce un aumento en la osmolalidad del medio exterior, el cambio inicial producido sobre la actividad de agua (a_w) del citoplasma depende de la elasticidad de la pared celular. Consecuentemente, cuando la turgencia es mayor que cero, el volumen citoplasmático disminuye como consecuencia del aumento en la osmolalidad externa y, por consiguiente, aumenta la concentración de iones (osmolitos) en el citoplasma. El aumento de esta concentración iónica presenta un umbral máximo, a partir del cual se producen interferencias en el funcionamiento de las macromoléculas y por lo tanto los microorganismos reemplazan a estos iones por osmolitos de naturaleza neutra como se ha mencionado previamente. Aparentemente, este aumento en la concentración de electrolitos en respuesta al cambio en la osmolalidad externa representaría una excelente señal osmótica para la activación del transporte de los solutos osmoreguladores.

En consecuencia, si OpuA es capaz de detectar los cambios en la osmolalidad externa por medio del aumento de la concentración iónica del citoplasma, los cambios en las interacciones electrostáticas sobre un limitado número de moléculas lipídicas y de residuos cargados de la proteína a nivel de la interfaz hidrofílica-hidrofóbica serían suficientes para la (in) activación del transportador (Poolman *et al.*, 2002). La construcción o aislamiento de mutantes del sistema de osmorregulación y/o la identificación de las regiones de la proteína que interaccionan específicamente con los lípidos aniónicos serían necesarios para elucidar la base estructural del osmosensado.

En conclusión, si bien los transportadores de solutos osmocompatibles (como OpuA y BetP) y las quinasas sensoras (como KdpD) aparentemente responden a los cambios que se producen en la concentración citoplasmática de osmolitos iónicos, los canales mecanosensoriales estarían detectando la tensión producida en la membrana. La transducción

de la señal osmótica desde las membranas hacia las proteínas se generaría a través de las alteraciones en la composición lipídica producidas durante el proceso de osmoadaptación. Esta potencial regulación por medio de los lípidos ha sido confirmada en los estudios obtenidos *in vitro* en proteoliposomas conteniendo al transportador OpuA, donde se observó que la activación del transportador en función de un gradiente osmótico a través de la membrana, puede ser alterada por el aumento en la proporción de lípidos aniónicos (van der Heide *et al.*, 2001).

A.5.- La membrana citoplasmática como blanco del estrés osmótico:

Diversas características tales como la carga neta, la capacidad de formar puentes hidrógeno, la hidratación de las cabezas polares de los fosfolípidos, el largo y el grado de insaturación de las cadenas parafínicas y la estructura que adopta cada fosfolípido, contribuyen a la interacción de los mismos con el solvente que los rodea y esto determina la estructura de fase de cada dispersión lipídica (Dowhan, 1997). Cada fosfolípido (y por supuesto cada mezcla de fosfolípidos) posee una predisposición particular de formar fases del tipo lamelar (L), que es característica de las membranas biológicas. También existen otros tipos de fases que incluyen principalmente a las hexagonales (H_{II}) o a las fases cúbicas.

La transición de fases, como por ejemplo de fase lamelar tipo gel (L_{β}) a fase lamelar tipo líquido cristalina (L_{α}) y de las fases lamelares a las fases hexagonales y viceversa, han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas en base a las temperaturas de transición y a las concentraciones lipídicas. Por otra parte, el comportamiento de las fases fosfolipídicas también se encuentra influenciada por la presencia de compuestos anfifílicos que se intercalan entre los fosfolípidos (como alcoholes, ácidos grasos, detergentes, anestésicos y péptidos) y por las propiedades del solvente (pH, fuerza iónica, y composición).

Si bien se han postulado ciertos roles fisiológicos a las fases no lamelares, la mayoría de las membranas bajo diversas circunstancias se encuentran en una fase lamelar líquido cristalina. No obstante, ciertos fosfolípidos aislados que se encuentran en las biomembranas naturales, poseen una baja predisposición a formar fases lamelares como por ejemplo el monoglucosildiacilglicerol de cloroplastos (Rivas & Luzzati, 1969) y de *Acholeplasma laidlawii* o la fosfatidiletanolamina de *Clostridium butyricum* y *E. coli* (Lindblom & Rilfors, 1992).

Una bicapa fosfolipídica planar representa un balance entre la tendencia intrínseca de cada monocapa a ser curvada (o curvatura intrínseca) y el requerimiento que poseen las cadenas parafínicas de cada monocapa en su relación al contacto con el solvente (o efecto

hidrofóbico). En una bicapa lipídica, en la cual existe una “frustración” en la curvatura intrínseca se crea una presión lateral dentro de la misma (Marsch, 1996). Tanto las interacciones del tipo electrostática como las de van der Waals, los factores estéricos y la hidratación de la cabeza polar, contribuyen a la presión lateral dentro de la bicapa. Se cree que la tensión intrínseca de la curvatura, y por lo tanto la presión lateral de la membrana, tendría un significado fisiológico sobre las proteínas asociadas o embebidas en la fase lamelar lipídica.

Por otra parte, la deshidratación de la membrana debida a una exposición de la misma a cosolventes que no pueden penetrarla influye en su estado físico, alterando la estructura lipídica y por consiguiente alterando la curvatura de la bicapa. Se especula que los compuestos denominados kosmotropos (ver apéndice) y las moléculas que se encuentran estéricamente excluidas de las bicapas, son capaces de aumentar la presión lateral de la membrana. Por lo tanto, un osmosensor debería de alguna manera estar diseñado para señalar dicha alteración.

Hamill y Martinac (2001) han descripto que las membranas sometidas a una deformación elástica impuesta por cambios en la osmolaridad externa, son capaces de resistir a una fuerza de compresión en área al menos diez veces superior que a una de volumen bajo las condiciones fisiológicas estudiadas. Como resultado de ello, un aumento en la osmolaridad externa haría disminuir el área de la membrana con el concomitante aumento del grosor de la misma.

B.- *Bacillus subtilis*:

B.1.- Características generales del género *Bacillus*:

Las bacterias del género *Bacillus* son bacilos Gram positivos, aeróbicos y formadores de esporas. Existen más de cincuenta especies descriptas sobre la base de una variedad de criterios taxonómicos tales como: metabolismo de carbohidratos, composición de la pared celular, contenido en ácidos grasos y contenido en G+C del ADN. En base a ellos se comprobó que *Bacillus* es uno de los géneros más heterogéneos. *Bacillus subtilis* pertenece al grupo II del género *Bacillus* con un 43% de contenido en G+C en el ADN (bajo contenido en G+C). Las especies pertenecientes al Grupo II del género *Bacillus* en el cual esta incluida *B. subtilis* se encuentran comúnmente en suelos, particularmente en aquellos con bajas concentraciones de nutrientes (Priest, 1993).

B.2.- Esporulación:

Los eventos que ocurren durante la esporulación han sido divididos en seis estadios morfológicos definidos por microscopía electrónica y asociados a cambios en propiedades fisiológicas y bioquímicas (Errington, 1993).

Dichos cambios se desarrollan en distintos estadios que transcurren en un período de aproximadamente 8 horas (designados t_0 - t_8). El inicio de la esporulación está determinado por una disminución en la concentración de nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo), un aumento en la densidad celular y una disminución en la concentración intracelular de guanidina trifosfato (GTP). Luego de la iniciación del proceso o estadio 0, el primer cambio morfológico observado denominado estadio II es el de una división celular especializada. En dicha división el septo producido se desarrolla en uno de los polos celulares dando lugar a una septación asimétrica. Durante los sucesivos estadios se produce el englobamiento de la preespora o estadio III y la formación del córtex de la espota durante el estadio IV. Dicho córtex está constituido por peptidoglicano que posee un menor grado de entrecruzamiento que el presente en la célula vegetativa. Por último, se forman las cubiertas (o coat) de la espota de naturaleza proteica con la subsecuente maduración de la misma (estadios V-VI). Debajo del córtex se encuentra la pared bacteriana y la membrana citoplasmática. La espota contiene una copia completa del genoma de la célula que la genera, pero se diferencia de ésta en el tamaño, la forma, los constituyentes bioquímicos y la actividad metabólica.

Los cambios bioquímicos y morfológicos, citados brevemente, son determinados a nivel genético por una sucesiva activación de genes involucrados en el fenómeno de la esporulación que han sido estudiados en diversos laboratorios (Errington, 1993, Kroos *et al.*, 1999). Durante este proceso se observa una síntesis y activación de diferentes factores sigmas que ha sido comparado a un proceso de diferenciación celular. Algunos factores son sólo activos en la célula madre y otros sólo son activos en la preespora. Esto implica que los factores sigmas (y los genes por ellos transcritos) se activan diferencialmente en el espacio y en el tiempo (Kroos *et al.*, 1999).

Las esporas son células diferenciadas altamente resistentes a diversos agentes químicos (solventes, ácidos, desinfectantes, etc.), físicos (como por ejemplo la luz ultravioleta y otro tipo de radiaciones, desecación, calor) y enzimáticos (lisozima, mutanolisina). Además, la característica de permanecer en este estado de latencia durante largos períodos de tiempo hasta que las condiciones del medio circundante sean las óptimas para el crecimiento, hace que este mecanismo sea de suma importancia en la supervivencia del microorganismo. El

éxito de perpetuarse dependerá de un eficiente mecanismo de germinación de la espora (Moir & Smith, 1990).

B.3.- Estrés en *B. subtilis*:

B.3.1.- Respuesta general al estrés en *B. subtilis*:

Desde hace mas de 15 años se comenzaron diversos estudios con el objetivo de analizar la respuesta de *B. subtilis* al estrés y al hambreado debido a condiciones desfavorables, ya que las mismas son similares a las condiciones en las que se encuentran los microorganismos en los ecosistemas naturales y por lo tanto su adaptación es indispensable para la supervivencia.

Los primeros estudios se realizaron mediante el uso de electroforesis en geles bidimensionales para visualizar cambios globales en la expresión genética (Hecker & Völker, 1990). Estos estudios revelaron que existen numerosas proteínas que son inducidas por distintos tipos de estrés como el calor, la salinidad, la presencia de etanol, el pH y el hambreado de glucosa, de oxígeno y de los fosfatos del medio de cultivo. Este perfil de inducción tan complejo sugiere que algunas de estas proteínas podrían tener una función protectora, no del todo específica, pero fundamental en respuesta al estrés independientemente del estímulo. De allí que dichas proteínas sean denominadas proteínas no específicas o generales de estrés (Hecker & Völker, 1998).

Posteriormente se demostró que la inducción de estas proteínas debido al estrés era mediada por el factor de transcripción alternativo sigma B (σ^B), también denominado factor sigma general de estrés en bacterias Gram positivas. Fueron W. G. Haldenwang y R. Losick los descubridores de σ^B en la década del 80. No obstante, su función fue desconocida hasta hace 10 años atrás. A principios de la década del 90 los laboratorios de W. G. Haldenwang y C. W. Price, de manera independiente, descubrieron que el operón *sigB* se inducía por el mismo estímulo que las proteínas generales de estrés (calor, salinidad, etanol o la entrada a la fase estacionaria de crecimiento), y que su inducción era llevada a cabo por el mismo factor σ^B (Benson & Haldenwang, 1993; Boylan *et al* 1993).

Hasta el presente han sido identificadas numerosas proteínas generales de estrés por medio de distintas técnicas como la secuenciación N-terminal, espectrometría de masa, mutagénesis por transposición y microarrays, entre otras. Estos estudios han dado lugar a la identificación de 125 genes que son dependientes del factor de transcripción σ^B (Petersohn *et al*, 2001; Price *et al.*, 2001). En estos estudios se observa que existe un gran número de proteínas (al menos 23) que poseen segmentos de transmembrana. Algunas de ellas, están

involucradas en el transporte de solutos compatibles o en la compensación de la osmolaridad impuesta por el estrés salino sobre la membrana y la pared celular.

B.3.2.- Estrés osmótico en *B. subtilis*:

Al igual que otros microorganismos, *B. subtilis* es capaz de sobrellevar los cambios producidos en la osmolaridad del entorno celular por medio de cambios en el contenido de solutos presentes en su citoplasma. Es capaz de acumular una diversa gama de solutos compatibles entre los que se encuentran iones y osmolitos de naturaleza orgánica. Se ha estimado que la presión de turgencia en *Bacillus subtilis* es de 19 atm., la cual es aproximadamente diez veces mayor a la descrita en otros organismos como *E. coli* (Wood *et al.*, 2001).

Un aumento en la osmolaridad externa de 0.4M NaCl provoca instantáneamente un flujo de potasio hacia el interior celular, incrementándose la concentración del mismo desde niveles basales a aproximadamente 350-650mM (Whatmore *et al.*, 1990). La incorporación de potasio al interior celular está mediada por dos sistemas de transporte, uno de alta afinidad (KtrAB) y otro de baja afinidad (KtrCD). A pesar de la importancia de este ión en la respuesta a corto plazo, altas concentraciones del mismo podrían interferir con las funciones normales de las células. Por lo tanto, éstas acumulan grandes cantidades de una variedad de compuestos orgánicos (los cuales no interfieren con la fisiología normal del microorganismo) reduciendo de esta manera la concentración del ión potasio dentro de la misma. Además se ha descrito que los canales mecanosensoriales (McsL y S) actúan como válvulas de salvataje para un rápido eflujo de osmolitos, cuando la turgencia aumenta por encima de un valor umbral (Blount & Moe, 1999).

B. subtilis es capaz de sintetizar prolina como osmoprotector bajo condiciones de estrés osmótico (Kempf & Bremer, 1998). La expresión de los genes que participan en esta síntesis (*proHJ*) se incrementa luego del shock osmótico. Estos genes son ortólogos de los genes *proBI* involucrados en la síntesis de prolina a partir del glutamato en condiciones normales de crecimiento (Bremer, 2002). Cuando la prolina se encuentra presente en el medio puede ser transportada por el transportador específico OpuE (von Blohn *et al.*, 1997) Fig 2.

La glicin-betaína, uno de los osmoprotectores más ampliamente utilizados por los microorganismos en la naturaleza, también es utilizada por *B. subtilis*. Para sintetizar este compuesto esta especie transporta colina desde el medio a través de dos transportadores (OpuB y OpuC). Una vez en el interior celular dos enzimas codificadas por el operón *gbsAB* sintetizan glicin-betaína a partir de colina (Boch *et al.*, 1994, 1996, 1997) (Fig. 2).

La gran variedad de habitats en los que se encuentra *B. subtilis* ofrece una amplia gama de solutos compatibles que son producidos y liberados al ecosistema. Entre ellos se encuentran los productos liberados por células sometidas a un estímulo externo, exudados de raíces y células muertas. *B. subtilis* es capaz de utilizar estos compuestos presentes en el medio como osmoprotectores incorporándolos por medio de 5 sistemas de transporte (OpuA a OpuE), la mayoría de los cuales poseen, simultáneamente, especificidad de sustrato y mecanismos de energía acoplados (Bremer, 2002).

Los distintos compuestos osmocompatibles utilizados por esta bacteria, además de los anteriormente mencionados, son: ectoína, prolina betaina, carnitina, homobetaina, crotonobetaina, etc (*Figura 1*).

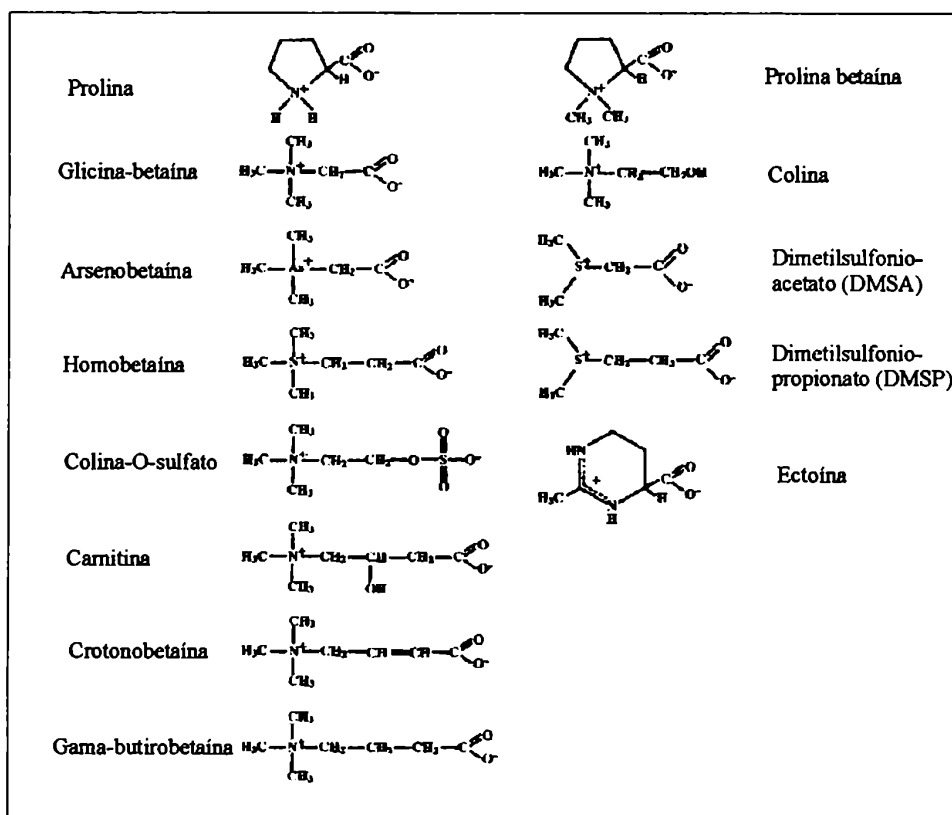


Figura 1: Osmoprotectores utilizados por *B. subtilis*. (Bremer, 2002).

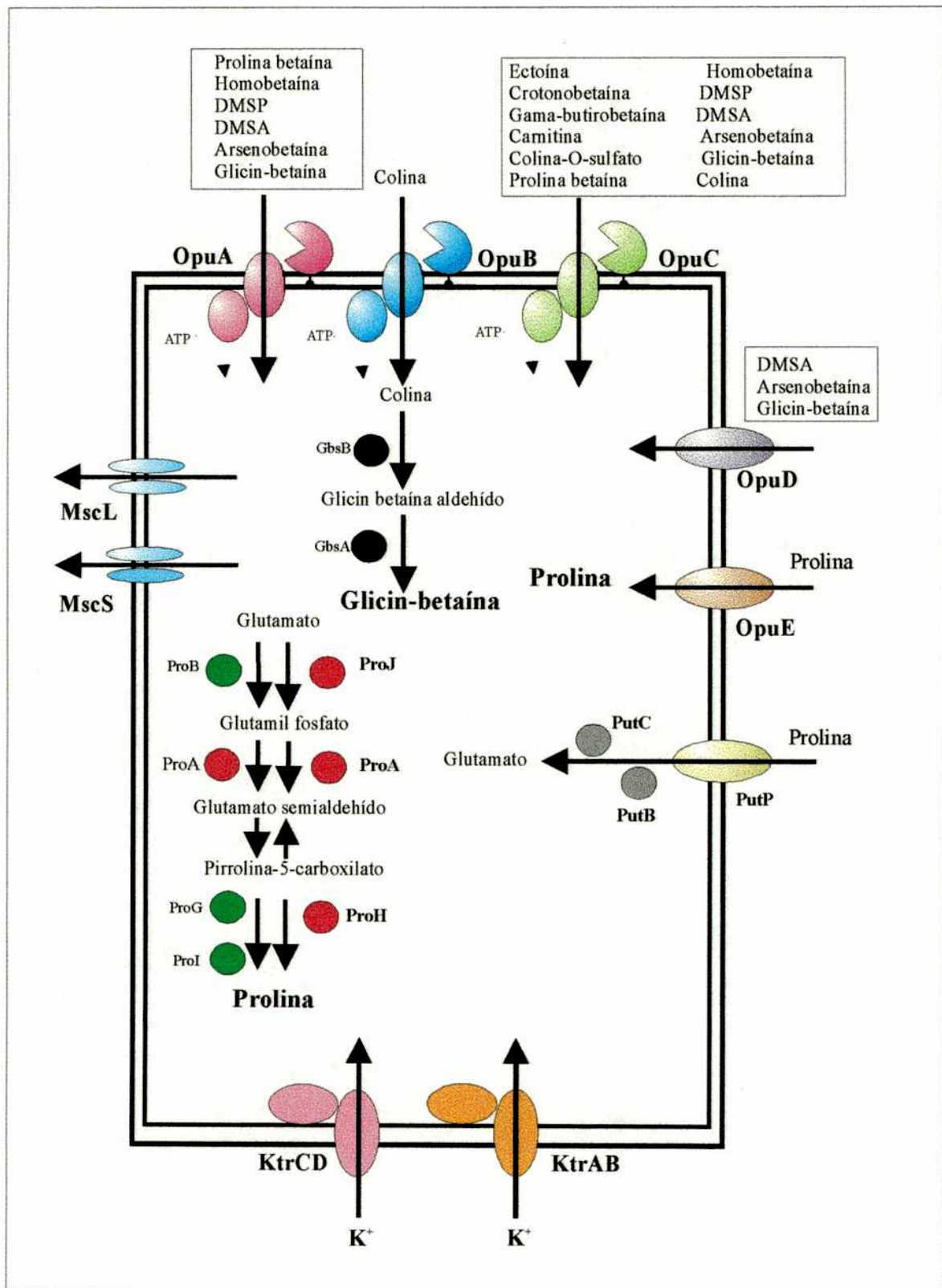


Figura 2: Transporte y síntesis de compuestos osmocompatibles en *B. subtilis*. Ver el texto para una descripción de los distintos elementos.

Sin embargo la respuesta de *B. subtilis* a la alta osmolaridad no está restringida a la acumulación de solutos compatibles. Curiosamente cuando esta bacteria crece en alta osmolaridad no esporula (Ruzal & Sánchez Rivas, 1994). La ausencia de dicho proceso estaría dada por la inhibición de la transcripción o la activación de alguno de los factores sigmas involucrados en la misma (Ruzal *et al.*, 1998).

Diversos genes son activados en condiciones de alta osmolaridad. Entre estos se encuentran *degUS* que controlan la síntesis de exoenzimas en fase estacionaria (Kunst & Rapaport, 1995; Ruzal & Sánchez Rivas, 1998) y *ftsH* que codifica para una proteasa de membrana y cuya cepa mutante es incapaz de crecer en alta sal (Deuerling *et al.*, 1997). Una cepa con una inactivación en el gen *sigM*, que codifica para el factor sigma M perteneciente a los sigmas de funciones extracitoplasmáticas (ECF), es sensible a alta sal (Horsburgh & Moir, 1999). Otro factor ECF, sigma W, estaría involucrado en la activación de la síntesis de proteínas durante el shock salino más que en el shock osmótico (Petersohn *et al.*, 2001).

Además, como se mencionó previamente, la síntesis de diversas proteínas implicadas en la respuesta a estrés salino (y general) es dependiente de σ^B . Una mutante para dicha proteína es sensible al shock osmótico. Sin embargo, una vez adaptada, puede crecer en un medio con alta osmolaridad. Estos resultados estarían sugiriendo que las proteínas sintetizadas son necesarias principalmente en esos primeros momentos luego del shock (Bremer, 2002).

Como se ha detallado, se conocen distintos mecanismos involucrados en la osmorrespuesta de *B. subtilis*, sin embargo, muy poco se conoce acerca del mecanismo de osmosensado. Si bien se cree que dicho proceso sería llevado a cabo por la membrana citoplasmática o por diversos componentes de la misma y por la pared celular, no existen evidencias al respecto en este microorganismo. Por este motivo en esta tesis el objetivo principal es el de determinar los cambios producidos en las características físico-químicas de las membranas de *B. subtilis* en respuesta al estrés hipersalino.

OBJETIVOS:

En *B. subtilis* se han realizado diversos estudios fisiológicos, genéticos y bioquímicos de la osmorrespuesta. En particular, se han descrito los diversos mecanismos genéticos involucrados en la osmorregulación y en la síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores. Sin embargo, no se han realizados estudios acerca de la función que desempeñan las membranas en el fenómeno de adaptación y osmosensado que se produce frente al estrés osmótico. Por este motivo, los objetivos de este trabajo fueron:

- ◆ Caracterizar los cambios bioquímicos que se producen en las membranas de *B. subtilis* en respuesta al aumento de la osmolaridad externa del medio de cultivo en las distintas fases de crecimiento celular.
- ◆ Estudiar diversas características físico-químicas de las membranas y de los liposomas obtenidos de las células de *B. subtilis* crecidas bajo condiciones de estrés.
- ◆ Construir mutantes para la síntesis de fosfolípidos aniónicos en esta especie y evaluar su rol en la osmorrespuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS:

I.-Cepas y plásmidos utilizados:

Para el estudio de la estructura, composición y función de las envolturas celulares en la adaptación al estrés osmótico se utilizaron las cepas de *B. subtilis* indicadas en la **Tabla 3.A**. Los distintos plásmidos utilizados están indicados en la **Tabla 3.B**. El clonado de genes se realizó en *E. coli* utilizando los plásmidos descriptos.

TABLA 3.A.

Cepas	Genotipo	Origen
<i>Bacillus subtilis</i> YB886 CL1 CL21 CL2 PGS1 SDB110 BFS219	<i>trpC2 metB5 SPβ (S) xin-1</i> YB886, <i>cls1</i> '-' <i>lacZ</i> YB886, <i>amy::(cls2</i> '-' <i>lacZ)</i> YB886, <i>cls2</i> '-' <i>lacZ</i> YB886, <i>pgsA</i> '-' <i>lacZ</i> <i>trpC pgsA</i> '-' <i>lacZ</i> <i>trpC cls2</i> '-' <i>lacZ</i>	Yasbin <i>et al</i> , 1980. Este trabajo. Este trabajo. Este trabajo. Este trabajo. Enviada por el Dr. Matsumoto. Enviada por el Dr. Stragier.
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(-lac-proAB) F'</i> (<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>)	Stock del laboratorio.

TABLA 3.B.

Plásmidos.	Características relevantes.	Origen.
pMutin4 pGEM-T® pEC20 pEC6 pCL29 pCL31	Plásmido integrativo, Amp ^R , Erm ^R . Vector de clonado pMutin4 con parte del gen <i>cls2</i> , Amp ^R , Erm ^R Plásmido integrativo Amp ^R , Cm ^R . pMutin4 con parte del gen <i>cls1</i> amplificado con primers C1 y C2, Amp ^R , Erm ^R . pEC6 con parte del promotor y secuencia codificante del gen <i>cls2</i> amplificado con primers C5 y C6, Amp ^R , Cm ^R .	Vagner <i>et al.</i> , 1998 Promega Enviado por el Dr. Stragier Enviado por la Dra. Martin-Verstraete. Este trabajo. Este trabajo.

II.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano:

II.1.- Crecimiento bacteriano:

Los cultivos utilizados para la caracterización bioquímica de las membranas se obtuvieron a partir de una dilución 1/50 de un cultivo crecido durante toda la noche en el medio correspondiente y suplementado con antibiótico según la cepa en estudio.

El crecimiento bacteriano de las distintas cepas se llevó a cabo en un baño con agitación (200-250 rev/min) para permitir una adecuada aireación, particularmente a altas densidades ($DO_{600} > 1.0$). Una vez que los cultivos alcanzaron la densidad óptima de crecimiento y el estadio fisiológico adecuado, los mismos fueron cosechados por centrifugación a 20.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet celular obtenido fue luego utilizado para las posteriores determinaciones. La densidad óptica de todos los cultivos en crecimiento fue determinada midiendo turbidez a 600nm.

Los medios de cultivo utilizados son el medio rico denominado LB (Luria-Bertani) y el mismo medio conteniendo 1.5 M NaCl fue utilizado para determinar la osmorrespuesta.

Los cultivos en LB de las cepas YB886, 8E, CL2, CL21 se dejaron crecer durante 16 hs a 37°C con agitación (fase estacionaria tardía). Cuando la cepa YB886 fue crecida en condiciones hiperosmóticas se incubó durante 32 horas aproximadamente para que las células llegaran al mismo estadio fisiológico que las cepas crecidas en condiciones normales. En el caso de la cepa CL2 crecida en hiperosmolaridad, el tiempo de incubación fue mayor (48 horas aproximadamente).

En los cultivos de las cepas CL1, CL2, y PGS1 se agregó al medio de cultivo eritromicina 1µg/ml como agente de selección ya que las mismas poseen resistencia a dicho antibiótico. En particular, en los cultivos de la cepa PGS1 se utilizó isopropiltiogalactósido (IPTG) como inductor de la transcripción del gen *pgsA*. Las distintas concentraciones de IPTG utilizadas se describen en cada uno de los experimentos.

II.2.- Toxicidad por deoxicolato de sodio:

Los ensayos de toxicidad por deoxicolato de sodio se realizaron a partir de una dilución 1/30 de cultivos crecidos durante toda la noche en el medio LB a 37°C. Las diluciones se realizaron en el medio LB fresco conteniendo distintas concentraciones de deoxicolato de sodio. El efecto tóxico del mismo fue analizado por el seguimiento de la densidad óptica celular (DO_{600nm}) alcanzada por los cultivos. Los datos fueron expresados normalizando la DO utilizando los valores obtenidos por los cultivos crecidos en ausencia del deoxicolato.

II.3.- Ensayos de esporulación:

Los ensayos de esporulación se realizaron en medio Schaeffer. Se crecieron los cultivos durante 48 horas con agitación a 37°C y se confirmó la esporulación por observación al microscopio óptico. Los cultivos se calentaron durante 10 minutos a 80°C para eliminar las células vegetativas. Finalizado el calentamiento, se realizaron varios lavados en agua para eliminar los restos celulares. La última resuspensión se realizó en agua medio donde se conservaron las esporas a -20°C y a -70°C.

Para determinar el porcentaje de esporulación se hicieron diluciones de los cultivos en solución fisiológica y luego se sembraron en placas para su posterior recuento en el medio LB (A). Las mismas muestras se calentaron durante 10 minutos a 80°C y posteriormente se sembraron en placas con en el mismo medio (B). El porcentaje de esporulación fue determinado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ esporulación} = (B/A) \times 100 \quad (1)$$

Donde A representa a los recuentos antes de calentar la muestra y B a los recuentos después de calentar la muestra.

II.4.- Medios de Cultivo:

LB: (medio Luria Bertani)

Triptona	20gr/litro
Extracto de levadura	10gr/litro
NaCl	10gr/litro

Cuando fue necesario se le agregó agar 1.5%.

Medio Schaeffer (medio de esporulación)

Caldo nutritivo	8gr/litro
MgSO ₄ -7H ₂ O 1M	1ml/litro
KCl 10 %	10ml/litro
MnCl ₂ 10mM	1ml/litro
CaCl ₂ 0.5M	1ml/litro
FeSO ₄ 1mM	1ml/litro

Cuando fue necesario se le agregó agar 1.5%.

GCHE

Buffer fosfato de potasio (pH 7)	100mM.
Citrato trisódico	3mM.
MgSO ₄ -7H ₂ O	3mM.
Citrato férrico de amonio	22mg/l
Casaminoácidos	0.1%
Glutamato de potasio (pH 7)	0.2%
Glucosa	1%
Requerimiento de aminoácidos por auxotrofias.	
L-Triptofano	0.004%
L-Metionina	0.004%

GE

Medio GCHE sin casaminoácidos.

TfbI.

Acetato de Potasio	30mM.
ClK	100mM.
Ca Cl ₂	10mM.
Mn Cl ₂	50mM.
Glicerol	15%.

pH=5,8 (ajustado utilizando ácido acético concentrado).

TfbII

MOPS	10mM.
Ca Cl ₂	75mM.
KCl	10mM.
Glicerol	15%.

pH=6,5 (ajustado utilizando KOH 3M)

Parte 1: Métodos Generales.

III.- Extracción Lipídica:

En este estudio es importante señalar que la composición lipídica puede estar afectada cuali y cuantitativamente por varios aspectos del cultivo, incluyendo la composición del

medio, las condiciones físicas de incubación y la edad del cultivo al momento de cosechar. Diversos aspectos del metabolismo microbiano son sensibles a la composición química del medio y los cambios en éste pueden producir alteraciones en las actividades intracelulares.

En el estudio de los lípidos microbianos, la elección del método de extracción es importante ya que los resultados posteriores dependerán de este primer paso. Desafortunadamente, es difícil establecer un método óptimo. Si la extracción es lo suficientemente drástica, también puede ser lo suficientemente rigurosa como para producir cambios en algunas de las sustancias que están siendo extraídas. Por otro lado, los métodos suaves empleados para minimizar estos cambios, posiblemente no lleven a cabo una extracción completa (O'Leary, 1967). Comprensiblemente, a medida que las moléculas se tornan más complejas, proveen más sitios para isomerización, oxidación, reducción e hidrólisis. Estos cambios no advertidos alteran las estructuras y su posterior análisis. Por este motivo, durante la extracción de los lípidos a partir de los cultivos celulares siempre se tuvo la precaución de trabajar bajo atmósfera de nitrógeno y se mantuvieron los extractos lipídicos totales a -20°C.

En este trabajo los extractos lipídicos totales obtenidos a partir de las distintas cepas fueron preparados de acuerdo a la técnica descrita por Rivas & Luzzati (1969). El pellet bacteriano fue resuspendido en 10 ml de isopropanol (para evitar la acción de posibles lipasas) y la muestra una vez homogeneizada se dejó extrayendo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la misma se centrifugó, el sobrenadante fue transferido a un tubo cónico y el pellet fue sometido a sucesivas extracciones: a) 1 volumen de isopropanol - cloroformo (1:1), b) 1 volumen de cloroformo - metanol (2:1) (con 0,84 ml HCl 6 N/l). El HCl se agregó para obtener una buena extracción del lisilfosfatidilglicerol que posee una carga positiva y además se encuentra en bajas cantidades y en las cepas utilizadas (Kent *et al.*, 1973).

En esta última etapa de extracción se dejó a la muestra en la mezcla de solventes durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizadas las tres etapas de extracción se juntaron los sobrenadantes y los mismos se llevaron a sequedad al vacío en evaporador rotatorio.

Finalmente, se resuspendió la muestra en 1 volumen de cloroformo - metanol (2:1) y se la lavó con 0,2 volúmenes de NaCl 0,9 % en 0,01 N HCl (Kent, Krag & Lennarz, 1973). Este lavado se repitió tres veces. La fase inferior (clorofórmica) se separó y se llevó a sequedad al vacío bajo corriente de nitrógeno.

IV.- Cromatografía en placa delgada:**IV.1.- Separación de Lípidos Polares:**

Para la separación y caracterización de los lípidos de la membrana de las distintas cepas estudiadas se utilizaron las siguientes placas:

- Cromatoplas (TLC) Silicagel 60 F/ ₂₅₄ Merck Art. 1.05714.
- Cromatoplas (HPTLC) Silicagel 60 / F ₂₅₄ Merck Art. 5628

Las placas cromatográficas fueron lavadas antes de su utilización mediante una precorrida en el sistema solvente cloroformo:metanol:agua (60:30:8) (v:v:v), para eliminar impurezas que interfieren en el frente del solvente. Asimismo, las placas fueron activadas previas a su utilización calentándolas durante 30 minutos a 100 ° C.

El solvente de desarrollo utilizado (luego de una optimización del mismo) fue: Cloroformo: Metanol : Acido acético (65:25:8) (v:v:v).

La identificación de los lípidos polares fue llevada a cabo por comparación cromatográfica con estándares de fosfolípidos purificados y/o con distintas soluciones reveladoras capaces de caracterizar aminolípidos y glicolípidos (ninhidrina y orcinol respectivamente).

El revelado de las placas se realizó primero por calentamiento durante 15 minutos a 110 °C para detectar las manchas ninhidrina positivas características de los aminolípidos, y luego por exposición a los vapores de yodo.

Revelados de fosfolípidos y glicolípidos:

Agente Revelador			
Lípido	Iodo	Ninhidrina	Orcinol
PG	+	-	-
PE	+	+	-
CL	+	-	-
LysPG	+	+	-
DGDG	+	-	+

Solución reveladora de orcinol: 200 mg de orcinol se diluyeron en 100 ml de H₂SO₄ al 75% y luego se roció la solución sobre la placa. La aparición de las manchas positivas para este agente revelador se obtuvo por calentamiento a 100° C durante 15 minutos.

Ninhidrina: La ninhidrina se agregó al solvente de desarrollo. (20mg aproximadamente).

IV.2.- Aislamiento de lípidos polares:

Los lípidos polares se separaron de los lípidos neutros utilizando TLC preparativas. El solvente de desarrollo utilizado fue Hexano:Eter etílico: Ac. acético (80:20:1) (v:v:v). Las fracciones correspondientes a los lípidos polares se rasparon de las placas y se extrajeron de la sílica utilizando Cloroformo: Metanol (2:1) (v:v). La suspensión resultante se agitó rápidamente y luego se filtró sobre papel de filtro embebido en Cloroformo: Metanol (2:1) (v:v) (Kates, 1986).

V.- Determinación de Fósforo: (Bartlett, 1959)

Se utilizó como patrón una solución de ácido fosfórico (100 mg Fósforo /l). La curva estándar se realizó utilizando las siguientes cantidades de fósforo 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg . Se agregaron 0,5 ml de H_2SO_4 10 N y se calentaron las muestras y los tubos de la curva estándar durante tres horas a 180 - 200 °C. Luego del calentamiento, se agregaron cuatro gotas de H_2O_2 (30 Vol) y se continuó la mineralización calentando otras tres horas a 180 - 200 °C. Una vez finalizada dicha mineralización se agregaron 2,5 ml de agua destilada, 200 μl de molibdato de amonio al 5% (p/v) y 150 μl del reactivo de Fiske. Se agitó la muestra hasta homogeneidad y luego se calentó durante 10 minutos a baño María. Una vez finalizada la reacción se midió la absorbancia a 830 nm.

Reactivo de Fiske: 3,42 gr $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 62,5 mg ácido amino-naftalen-sulfónico y 125 mg Na_2SO_3 se llevaron a 25 ml con agua destilada previamente gaseada con N_2 . Se agitó durante 15 minutos, calentando la solución los últimos 5 min. Finalmente, se filtró en papel seco y se volvió a gasear la solución con N_2 .

Este método fue utilizado para la medición del contenido de fósforo total en los extractos lipídicos, en las membranas aisladas y en las muestras obtenidas del raspado de las placas cromatográficas.

VI.- Determinación de Azúcares:

Método del fenol sulfúrico: (Christie, 1982).

Se utilizó como patrón una solución de glucosa (0,04 %). Las muestras se fraccionaron y se llevaron a un volumen final de 200 μl con agua destilada (al igual que los tubos de la

curva estándar). Se agregaron 200 µl de fenol acuoso al 5% (p/v) con rápida agitación y luego 1 ml de H₂SO₄ (c). En nuestro caso se utilizó un dispensador de muestras para que el agregado del H₂SO₄ sea rápido. Este paso es un factor importante de la técnica. Las muestras se homogeneizaron y se esperó durante 20 minutos hasta desarrollo del color. Luego se midió la absorbancia a 470 nm.

Este método fue utilizado para la medición de azúcares totales en los extractos lipídicos y en las muestras obtenidas del raspado de las placas cromatográficas.

VII.- Preparación de Esteres Metílicos de Ácidos Grasos:

VII.1.- Saponificación: (Wood & Folch, 1974).

Se tomaron alícuotas de aproximadamente 30 µg de fósforo lipídico y se llevaron a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. La saponificación se llevó a cabo agregando 2ml de KOH 10% preparado en etanol. El KOH fue previamente gaseado en nitrógeno (es importante que sea preparado en el momento de utilizar). Antes de comenzar la saponificación se verificó que el pH sea básico. Las muestras se calentaron durante 45 minutos a 80°C en un tubo bien cerrado para evitar que se evapore el solvente. Una vez finalizada la saponificación se agregó 1ml de agua destilada. Se realizaron luego varios lavados con 2 ml de hexano para descartar el insaponificable (fase superior). Las muestras se acidificaron con el agregado de 0,5 ml de HCl (c) y se verificó nuevamente el pH de la solución, que en este caso debe ser ácido. Se realizaron dos extracciones con hexano agitando vigorosamente. De esta manera, los ácidos grasos libres pasaron a la fase orgánica. Las muestras se llevaron a sequedad al vacío en un evaporador rotatorio para luego proceder a la transesterificación.

VII.2.- Transesterificación o metilación con sulfúrico metanol: (Wood & Folch, 1974).

Las muestras que se sometieron a la saponificación se llevaron a sequedad y se retomaron en 2ml de H₂SO₄ (2%) preparado en metanol. Se calentaron luego durante 120 minutos a 60 °C. Una vez finalizado el calentamiento se agregaron 2 ml de cloroformo y 0,67 vol. de agua destilada. La fase superior (acuosa) se descartó y la fase inferior (orgánica) se volvió a lavar con agua destilada. Finalmente se evaporó la muestra bajo atmósfera de N₂ y se resuspendió en hexano para ser inyectada en un cromatógrafo de gases.

VIII.- Cromatografía gaseosa:

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases GLC-FID HP6890 capillary GC (Hewlett Packard, Palo Alto CA) equipado con una columna Omegawax Capilar (30 m x 250 μ m, 25 μ m nominal) (Supelco 11090-02A, USA). La presión de He utilizada fue de 21.07 psi. El split utilizado fue de 50, con un flujo de He de 25ml/min y el flujo inicial del inyectado de la muestra fue de 0.5ml/min. Para la separación de los ésteres metílicos se utilizó la siguiente estrategia: 179 °C isotérmico durante 8 minutos, luego se fue aumentando la temperatura 3 °C/minuto hasta llegar a una temperatura final de 240 °C, y se finalizó el esquema manteniendo la temperatura constante durante 9 minutos. Se utilizó como estándar la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos de Supelco (Bacterial Acid Methyl Esters Mix n° catálogo 4780-U).

IX.- Determinación de glicerol: (Kates, 1972)

Se utilizó como patrón una solución de glicerol de 0,02 μ mol/ μ l. Se fraccionaron las muestras y se agregaron 100 μ l de H₂SO₄ 10 N y 500 μ l NaIO₄ 0,1 M. Se agitaron hasta homogeneidad y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en tubos con un buen cierre. Pasados los 5 minutos se agregaron 500 μ l de NaHSO₃ al 10% y se volvieron a homogeneizar. Luego se colocaron alícuotas de 500 μ l de las muestras procesadas en tubos con buen cierre y se agregaron 5 ml del reactivo del ácido cromotrópico al 0,18%. Los tubos se calentaron a baño María durante 135 minutos y luego del calentamiento se dejaron enfriar las muestras. Se leyó la absorbancia a 570 nm.

Solución del ácido cromotrópico: Se pesaron 90 mg del ácido cromotrópico, y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Luego la solución se diluye con 45 ml de H₂SO₄ 24N.

X.- Determinación de proteínas: (Método de Lowry).

La curva estándar se realizó utilizando seroalbúmina bovina (BSA) 1mg/ml. Se fraccionaron las muestras y se agregó 1ml de Reactivo C. Se agitaron bien las muestras y esperó al menos 10 minutos. Luego se agregaron 100 μ l del reactivo E y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación se leyó la densidad óptica a 750 nm.

Preparación de los reactivos:

Reactivo A: Solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N.

Reactivo B: Solución al 5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en tartrato de sodio 1%.

Reactivo C: 50 volúmenes de A + 1 volumen de B preparado en el momento.

Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al medio en agua destilada.

XI.- Purificación de membranas:

Se cosecharon los cultivos en la fase de crecimiento deseada (estacionario o exponencial) y se lavaron una vez con buffer A helado (manteniendo las muestras en baño de hielo) y se congelaron rápidamente a -70°C .

Para romper las células, la muestra se descongeló y se resuspendió en 5 ml de buffer B helado. Se agregaron bolitas de vidrio de 106 micrones (Sigma). La mezcla se sometió a repetidos ciclos de sonicación (5 x 30 seg) o hasta que se lisaran más del 50% de las células.

Las células rotas se diluyeron con 8 ml de buffer B y la mezcla se centrifugó a 8000 g por 10 minutos a 4°C . Se recogió el sobrenadante y se lo volvió a centrifugar a 100.000g durante 60 minutos a 4°C . El pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de buffer C y se lo centrifugó nuevamente a 100.000 g por 60 minutos a 4°C .

Los pellets de membrana se resuspendieron finalmente en 0.2ml de buffer C y se congelaron hasta su uso a -70°C . Es importante mencionar que para los ensayos de fluorescencia, una vez que un pellet de membrana fue descongelado no se lo volvió a utilizar.

Buffers utilizados:

Buffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1M KCl, 0.1 mM PMSF.

Buffer B: 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1mM MgCl_2 , 1mM β mercaptoetanol, 0.1mM PMSF.

Buffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1mM β mercaptoetanol, 0.1 mM PMSF.

XII.- Preparación de Liposomas:XII.1.- Preparación de Liposomas Multilamelares (MLV):

Las vesículas multilamelares se prepararon de acuerdo al método de Bangham y colaboradores (1965). Una solución en cloroformo-metanol (2:1, v/v) de la mezcla de lípidos totales y/o polares extraídos de las membranas de las distintas cepas se evaporaron bajo

atmósfera de nitrógeno hasta obtener un film. Los lípidos fueron resuspendidos luego por agitación (vortex) a temperatura ambiente en el buffer correspondiente a cada tipo de ensayo.

En las mediciones realizadas con las sondas DPH, TMA-DPH, Laurdan y R18 el buffer utilizado contenía sacarosa 0.25M; EDTA 1mM; pH 7.0. En las mediciones realizadas con NAO se utilizó agua grado MiliQ, y en las realizadas con AO se utilizó el buffer $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 120mM pH 7.0.

XII.2.- Preparación de Liposomas Unilamelares (LUV):

Las vesículas unilamelares se obtuvieron mediante la extrusión de vesículas multilamelares (MLV) por pasaje de al menos 13 veces a través de membranas de policarbonato de 100 nm de ancho de poro. Para tal fin se empleó un extrusor LIPOSOFAST (Vancouver, Canadá).

XIII.- Microscopía electrónica de transmisión:

Para el análisis mediante microscopía electrónica, las células se fijaron en glutaraldehído 25%, paraformaldehído 4% diluidos en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4) durante 6 horas. Luego se realizó una segunda fijación en tetróxido de osmio 1-2 % en el mismo buffer fosfato. Después de esta fijación se realizó un lavado en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4) durante 2 horas y posteriormente se hizo una tercera fijación en acetato de uranilo 5% (durante 4 horas). La deshidratación se realizó con distintas soluciones alcohólicas: 50%, 70%, 96% y 100%. Luego las muestras se trataron con óxido de propileno junto con la resina de inclusión (EMBED 812, resina epoxi) durante 3 días a 60°C. Finalmente, se realizaron los cortes para grillas de 70-90 nm y se empleó como coloración de contraste el citrato de plomo.

Parte 2: Espectroscopía de Fluorescencia:

XIV.- Preparación de las muestras:

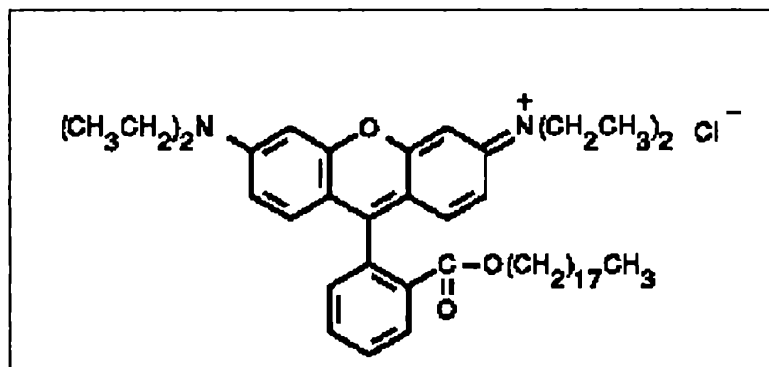
Para estos ensayos se utilizó una concentración de lípidos de 100 μ M (cuantificado por fósforo) tanto en los liposomas como en las membranas. Las membranas y la sonda se agregaron diluidas en un volumen igual, para que al mezclarlas la distribución de esta última sea homogénea. Se incubaron luego durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación permanente, para permitir una incorporación óptima de la sonda.

En el caso de los liposomas la sonda fue incorporada a la solución lipídica en cloroformo: metanol (2:1) (v:v) y se llevaron a sequedad conjuntamente. El film se resuspendió luego en el buffer utilizado en cada ensayo.

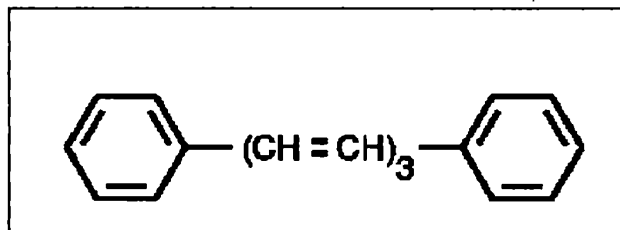
XIV.1.- *Sondas fluorescentes utilizadas:*

En la siguiente figura se pueden ver las respectivas estructuras de las sondas fluorescentes utilizadas en los distintos experimentos.

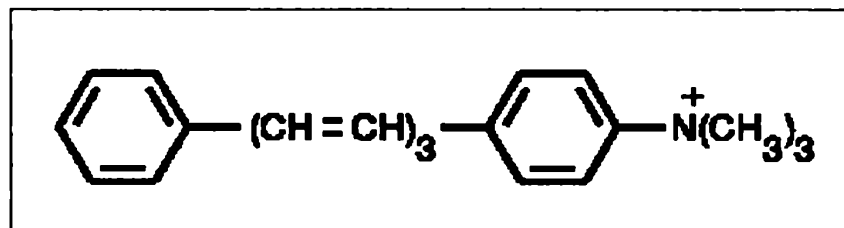
Octadecil Rodamina B (O-246 Molecular Probes)



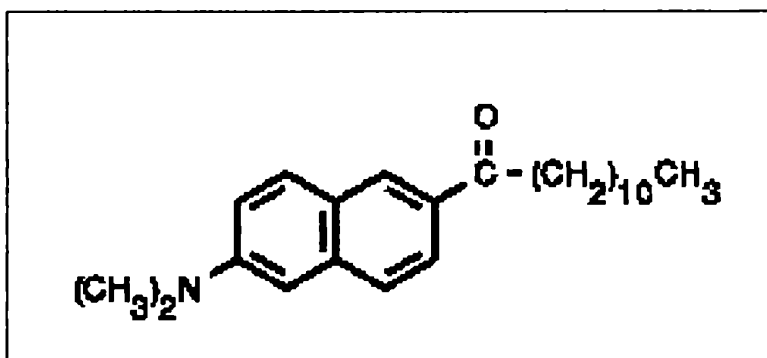
1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH) (D-202 Molecular Probes)



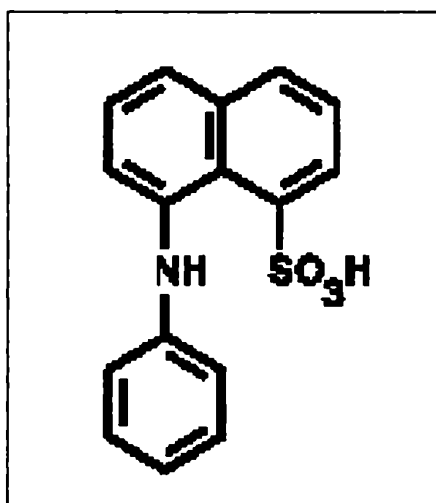
1-(4-trimetilamino fenil) – 6-fenil-1,3,5- hexatrieno-p-tolueno sulfato (TMA-DPH) (T-204 Molecular Probes)



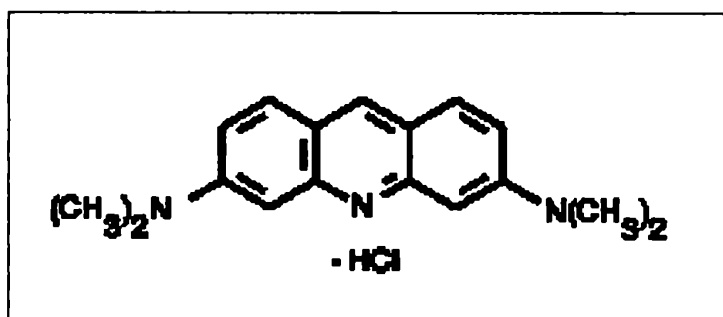
2-dimetilamino-6-lauroil naftaleno (Laurdan) (D-250 Molecular Probes)

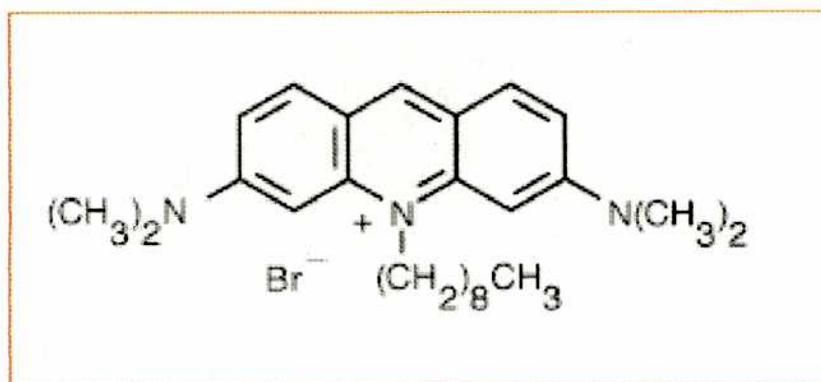


1- (ácido anilino naftaleno -8- sulfónico) (ANS) (A-47 Molecular Probes)



Naranja de acridina (AO) (A-1301 Molecular Probes)



Nonyl- acridine orange (NAO) (A-1372 Molecular Probes)**XIV.2.- Evaluación de la microviscosidad de membranas aisladas y liposomas:****XIV.2.1.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario:**

DPH (1,6-difenil- 1,3,5 hexatrieno). La sonda DPH fue utilizada con el propósito de estudiar la micorviscosidad de las membranas y liposomas obtenidos a partir de las distintas cepas, a través de la evaluación de los cambios en la anisotropía de fluorescencia (r_s) de la misma. El DPH es una sonda que se ubica en la porción hidrofóbica de la bicapa lipídica y se utilizó en una concentración 1/400 a partir de una solución madre de 6.2 mM preparada en metanol. Los valores de anisotropía de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación 425 nm y 355 nm respectivamente. Los cálculos de anisotropía de fluorescencia al estado estacionario se realizaron utilizando la siguiente ecuación:

$$r_s = (I_{//} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{//} + 2 G I_{\perp}) \quad (2)$$

En esta ecuación, r_s representa a la anisotropía de fluorescencia del DPH medida en el estado estacionario, $I_{//}$ a la intensidad de fluorescencia cuando el polarizador analizador se encuentra orientado en forma paralela al polarizador de excitación (I_{vv}) y $I_{\perp}$ a la intensidad de fluorescencia medida con el polarizador analizador orientado en forma perpendicular al polarizador de excitación (I_{vh}). El factor G es un factor de corrección ($G = I_{hv} / I_{hh}$) de la eficiencia de transmisión de la luz polarizada horizontal y verticalmente a través de los monocromadores. El valor es obtenido a partir de la relación entre las intensidades de fluorescencia de los componentes verticales y horizontales cuando la luz de excitación se encuentra polarizada en dirección horizontal (Lakowicz, 1999).

Se utilizaron suspensiones de membranas y de liposomas sin sonda para corregir las variaciones en las mediciones debidas a la turbidez de las muestras y a señales inespecíficas de fluorescencia. La absorbancia de las muestras medida a 360_{nm} nunca fue superior a 0.1.

TMA-DPH (1- (4-trimetilamino fenil) -6-fenil-1,3,5- hexatrieno -p- tolueno sulfato). Esta sonda al igual que el DPH fue utilizada con el propósito de estudiar la microviscosidad de las membranas y liposomas obtenidos a partir de las distintas cepas, a través de la evaluación de los cambios en la anisotropía fluorescencia (r_s) de la misma. A diferencia del DPH esta sonda queda anclada en la bicapa lipídica a nivel de a su cabeza polar.

Los cálculos de anisotropía de fluorescencia al estado estacionario se realizaron de acuerdo con la ecuación 2.

La sonda se utilizó en una concentración 1/800 a partir de una solución madre de 1.7 mM preparada en metanol. Los datos de anisotropía de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación de 425 nm y 355 nm respectivamente.

Se utilizaron suspensiones de membranas y de liposomas sin sonda para corregir las variaciones en las mediciones debidas a la turbidez de las muestras y a señales inespecíficas de fluorescencia. La absorbancia de las muestras medida 360_{nm} nunca fue superior a 0.1.

XVI.2.2.- Determinación de parámetros dinámicos de fluorescencia:

Los tiempos de vida de las sondas nos dieron información acerca del tiempo de correlación rotacional de los valores de anisotropía al estado estacionario. Se midieron los tiempos de vida del DPH y TMA-DPH mediante los métodos de diferencia de fase (τ_P) y de modulación sinusoidal (τ_M) de la intensidad de luz de excitación. La emisión de fluorescencia es dependiente de la excitación y por lo tanto se modula con la misma frecuencia circular ($\omega = 2\pi \times \text{frecuencia en Hz}$) que la excitación. El método de fase selecciona a los fluoróforos que decaen con tiempos de vida cortos dando valores de τ_P que son menores al tiempo de vida promedio y el método de modulación (τ_M) selecciona para especies que poseen tiempos de vida mayores y por consiguientes los valores de τ_M son mayores que el tiempo de vida promedio. En estas determinaciones se utilizó una longitud de onda de excitación de 361nm y se tomaron los valores de emisión de fluorescencia a través de un filtro (tipo KV389). La luz de excitación fue modulada en amplitud a 18 y 30 MHz y polarizada verticalmente. Los valores de τ_P y de τ_M se obtuvieron a partir de la modulación de la amplitud y de la fase de la luz emitida utilizando el polarizador orientado a

55°. Se utilizó 1,4-bis (5-phenyloxazol-2-yl)-benceno en etanol como estándar ya que se conoce su tiempo de vida ($\tau = 1.35$ nsecs.). La diferencia de fase de los componentes paralelo y perpendicular de la emisión de fluorescencia fue medida colocando a los polarizadores en posición vertical y horizontal para calcular el tiempo de correlación rotacional (τ_R) y la anisotropía límite (r_∞) (Lakowicz, 1999).

XVI.2.3.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario medida en células enteras:

DPH (1,6-difenil- 1,3,5 hexatrieno). La sonda DPH fue utilizada con el propósito de estudiar *in vivo* la microviscosidad de las membranas de las células de *Bacillus subtilis*.

El DPH fue utilizado en una concentración de 6 μ M a partir de una solución madre de 6.2 mM preparada en metanol. Los datos de anisotropía de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación 425 nm y 355 nm respectivamente. Los cálculos de anisotropía de fluorescencia al estado estacionario se realizaron utilizando las siguientes ecuaciones:

$$r_s = (I_{// \text{ corregido}} - G \times I_{\perp \text{ corregido}}) / (I_{//} + 2 \times G \times I_{\perp}) \quad (3)$$

$$I_{// \text{ corregido}} = I_{//} / A1 - I_{//} / A2 \quad (4)$$

$$I_{\perp \text{ corregido}} = I_{\perp} / A1 - I_{\perp} / A2 \quad (5)$$

En esta ecuación, r_s representa a la anisotropía de fluorescencia del DPH medida en el estado estacionario.

$I_{// \text{ corregido}}$ (4) es la intensidad de fluorescencia obtenida cuando el polarizador analizador se encuentra orientado en forma paralela al polarizador de excitación (I_{vv}). Esta intensidad de fluorescencia fue corregida midiendo la absorbancia a 420nm de las muestras en presencia y ausencia de sonda (A1 y A2 respectivamente).

$I_{\perp \text{ corregido}}$ (5) es la intensidad de fluorescencia medida con el polarizador analizador cuando el mismo se encuentra orientado en forma perpendicular al polarizador de excitación (I_{vh}). Esta intensidad de fluorescencia fue corregida midiendo la absorbancia a 420nm de las muestras en presencia (A1) y ausencia (A2) de sonda (Sbovodooba *et al.*, 1988)

XV.- Propiedades de la interfaz lípido-agua de las bicapas:

Laurdan (2-dimetilamino-6-lauroil naftaleno). En los experimentos en los cuales se determinó las propiedades de la interfaz de las bicapas (grado de hidratación, de empaquetamiento lateral y coexistencia de fases gel-líquido cristalino) se utilizó la sonda fluorescente Laurdan. Esta sonda se inserta en la bicapa lipídica quedando el grupo naftaleno (fluoróforo) ubicado próximo a esqueleto del glicerol de los fosfolípidos.

La sonda fue utilizada en una concentración 1/400 a partir de una solución madre de 1.3mM preparada en metanol. Los espectros de emisión se tomaron fijando la longitud de onda de excitación en 340nm y barriendo la emisión desde 350 a 520 nm. Los de excitación se obtuvieron fijando la longitud de onda de emisión en 440 nm y barriendo la excitación desde 300 a 420 nm.

Los espectros de la polarización generalizada de emisión (GP) se construyeron calculando el valor de la GP para cada longitud de onda de emisión como:

$$GP_{em} = (I_{410} - I_{340}) / (I_{410} + I_{340}) \quad (6)$$

Donde I_{410} y I_{340} son las intensidades obtenidas a cada longitud de onda de emisión desde 430 nm hasta 520 nm, utilizando una longitud de onda de excitación fija a 410 y 340 nm respectivamente.

La GP de excitación se construyó de una manera similar:

$$GP_{exc} = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}) \quad (7)$$

Donde I_{440} y I_{490} son las intensidades de fluorescencia obtenidas a cada longitud de onda de excitación desde 330 hasta 420 nm, utilizando una longitud de onda de emisión fija a 440 y 490 nm respectivamente (Parasassi *et al.*, 1990).

La incorporación del Laurdan en las membranas aisladas fue determinada por el aumento en la intensidad de fluorescencia utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación de 435 nm y 390 nm respectivamente. Estos experimentos se realizaron a 37°C.

Se utilizaron suspensiones de membranas y de liposomas sin sonda para corregir las variaciones en las mediciones debidas a la turbidez de las muestras y a señales inespecíficas de fluorescencia. La absorbancia de las muestras medida a 360_{nm} nunca fue superior a 0.1.

XVI.- Ensayos de estabilidad de liposomas y membranas:

R18 (octadecil rodamina B): Los ensayos de estabilidad de liposomas y membranas se realizaron utilizando la sonda R18 a una concentración final de 1.5mol % ya que a esta concentración la sonda se encuentra bajo condiciones de autoextinción.

Una sonda debe cumplir con ciertos requisitos para poder ser utilizada como marcador del proceso de solubilización. La misma no debe presentar migración en presencia de agentes líticos. Además, la propiedad de autoextinción debe ser sensible solamente a la concentración local de la sonda en la bicapa lipídica y al grado de empaquetamiento de los lípidos estudiados (Domecq *et al.*, 2001). Por consiguiente, debe ser capaz de detectar una dilución de los lípidos y/o desintegración de las membranas. La sonda R18 utilizada en los experimentos cumple con estos requisitos.

Los experimentos se realizaron a 5°, 10°, 25° y 37°C. Se utilizó una solución madre 3 mM preparada en etanol. Los valores de intensidad de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación 590 nm y 560 nm respectivamente.

Las curvas que se muestran en los resultados se realizaron midiendo el aumento de la emisión de fluorescencia en función del agregado de Tritón X-100 (5%) (p/v) como agente desestabilizador de membranas. El aumento en la intensidad de fluorescencia se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%F = (I_t - I_0) / (I_{\text{máx.}} - I_0) \quad (8)$$

En esta ecuación, %F representa el porcentaje de fluorescencia, I_0 a la intensidad de fluorescencia medida en ausencia de Tritón X-100, I_t a la intensidad de fluorescencia obtenida en presencia de Tritón X-100 medida en el tiempo t e $I_{\text{máx.}}$ a la máxima intensidad de fluorescencia alcanzada.

XVII.- Determinación de dominios de cardiolipina:

NAO (Nonyl-Acridine-Orange): En los experimentos en los que se determinó la formación de dominios de cardiolipina sobre sistemas modelos de liposomas y sobre las membranas y los liposomas obtenidos de las cepas YB886 y CL2 se utilizó la sonda NAO.

La sonda se agregó en distintas concentraciones como se aclara en los respectivos ensayos, a partir de una solución madre 5 mM preparada en etanol. Los espectros de emisión se obtuvieron fijando la longitud de onda de excitación en 430 nm y barriendo la emisión

desde 460 a 740nm. Estos espectros se obtuvieron realizando las mediciones a temperatura ambiente.

En los experimentos diseñados con sistemas modelos de liposomas unilamelares se utilizaron concentraciones conocidas de DPPC, PE, PG, PA y CL como se detalla en el pie de la figura correspondiente. Las membranas aisladas utilizadas en las mediciones fueron previamente sonicadas (3x30segs.) en agua grado MiliQ para asegurar de que las vesículas de membrana contengan en su interior dicho disolvente.

XVIII.- Determinación del potencial de superficie en liposomas:

ANS (ácido anilino naftaleno -8- sulfónico): La sonda ANS fue utilizada para establecer el potencial electrostático de superficie de los sistemas modelos de liposomas unilamelares utilizados en los experimentos de determinación de formación de dominios de cardiolipina.

La sonda fue utilizada en una concentración de 1μM a partir de una solución madre de 6.7 mM preparada en metanol. En estos ensayos se utilizó una concentración de lípidos de 0.5 mM (cuantificado por fósforo). Los datos de intensidad de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación de 465 nm y 380 nm respectivamente. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

La sonda se agregó a la solución acuosa que contenía la suspensión de los liposomas en estudio y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. En estos ensayos se consideró que la intensidad de fluorescencia obtenida fue proporcional al número de moléculas de ANS adsorbidas sobre la superficie de la vesícula. El potencial de superficie ($\Delta\psi_0$) detectado por dicha sonda fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta\psi_0 = (RT / F) \ln (f / f_0) \quad (9)$$

En esta ecuación, R es la constante de los gases (8.314 J/ °K mol), T la temperatura absoluta expresada en grados Kelvin (298° K), f la intensidad de fluorescencia medida en las distintas muestras, f_0 la intensidad de fluorescencia medida en liposomas formados únicamente por DPPC y F una constante de proporcionalidad (96500 cal / mol).

XIX.- Determinación de la permeabilidad a protones en liposomas:XIX.1.- Cinética de incorporación de naranja de acridina:

AO (naranja de acridina): La sonda AO se utilizó para realizar los experimentos de permeabilidad de protones en liposomas. La AO se utilizó a una concentración final de $1\mu\text{M}$ a partir de una solución madre de 5.4mM preparada en etanol. Los datos de intensidad de fluorescencia se obtuvieron utilizando como longitudes de onda de emisión y excitación 525 nm y 490 nm respectivamente. La AO se agregó a la concentración indicada en el buffer de estudio y se dejó que la misma se homogeneice en la solución. Estos experimentos se realizaron a 20°C pues las altas temperaturas no favorecen la dimerización de la sonda (Clerc & Barenholz, 1998).

Los buffers utilizados en este ensayo fueron:

- $120\text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.
- $0.4\text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 119.6\text{ mM Na}_2\text{SO}_4$, pH 7.
- $0.4\text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 119.6\text{ mM Li}_2\text{SO}_4$, pH 7.
- $0.4\text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 119.6\text{ mM K}_2\text{SO}_4$, pH 7.

Las primeras cinco determinaciones de intensidad de fluorescencia que se realizaron se utilizaron como control de 100% de fluorescencia (I_0). La medición de permeabilidad de protones comenzó con el agregado de la suspensión de liposomas construidos en el buffer $120\text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.

En estos ensayos se agregó la suspensión de liposomas ($50\mu\text{l}$) en el buffer en estudio diluida en un relación 1/500 para medir el proceso de permeabilidad de protones. Los ensayos se realizaron agitando permanente de las muestras.

El porcentaje de fluorescencia se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%F = I_0 / I_t \times 100 \quad (10)$$

En esta ecuación, %F representa al porcentaje de fluorescencia, I_0 a la intensidad de fluorescencia inicial medida en ausencia de la suspensión de liposomas e I_t a la intensidad de fluorescencia medida en presencia de la suspensión de liposomas en el tiempo t. En estos experimentos a medida que la sonda ingresa al liposoma en respuesta al gradiente de pH se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia de la misma debido a la formación de dímeros no fluorescentes en el interior del liposoma. La acumulación de la AO dentro de la vesícula en respuesta al gradiente de amonio sigue la ley de acción de masas según la siguiente ecuación:

$$[AO]_{\text{total}} = (1 - v) \times [AO]_{\text{exterior}} + v \times [AO]_{\text{interior}} \quad (11)$$

En esta ecuación, $[AO]_{\text{total}}$ representa la concentración de sonda total, $[AO]_{\text{exterior}}$ a la concentración de sonda fuera del liposoma, $[AO]_{\text{interior}}$ a la concentración de sonda dentro del liposoma y v a la fracción de volumen atrapada dentro del liposoma (Clerc y Barenholz, 1998).

La relaciones existentes entre la masa de AO dentro y fuera del liposoma fue calculada de acuerdo con la ecuación:

$$m_{\text{int.}} / m_{\text{ext.}} = (F_0 - F_{\infty}) / F_0 \quad (12)$$

En esta ecuación, $m_{\text{int.}}$ es la masa de AO dentro del liposoma, $m_{\text{ext.}}$ es la masa de AO fuera del liposoma, F_0 es la intensidad de fluorescencia medida antes de agregar la suspensión de liposomas y F_{∞} es la intensidad de fluorescencia alcanzada al finalizar el ensayo.

XIX.2.- Determinación de dispersión luminosa "Light scattering estático" en liposomas:

En forma paralela a los experimentos de permeabilidad de protones se hicieron mediciones de "light scattering" en estado estático para determinar si se producían variaciones en el tamaño de los liposomas a lo largo del ensayo. Los experimentos se realizaron midiendo la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) de la suspensión de liposomas en los distintos buffers. Para tal fin, se utilizaron como longitud de onda de emisión y excitación 550 nm. Los polarizadores de emisión y de excitación se colocaron en forma cruzada (vertical y horizontal respectivamente).

Parte 3: Técnicas de Biología Molecular.

XX.- Obtención y transformación de células competentes:

XX.1.- *B. subtilis*:

Las células competentes de *B. subtilis* se prepararon según el protocolo descrito por Kunst y Rapaport (1995). La cepa YB886 fue cultivada en el medio GCHE durante 16hs. a 37°C. Luego el cultivo fue diluido 1/10 en el medio GCHE fresco y se incubó a 37°C durante 4-5hs. hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento medida por la curva de $DO_{600\text{nm}}$. En ese momento, se efectuó una dilución en un volumen igual de medio GE y se lo

incubó durante 1 hora, momento en el cual se alcanza la competencia máxima. Una vez finalizada esta incubación se agregó glicerol (10% final) y se guardaron alícuotas de 100 µl a -70°C hasta su uso.

Para los ensayos de transformación se descongeló uno de los tubos conteniendo células competentes y se le agregó entre 5 a 10 µl de ADN plasmídico o cromosómico de interés. Las células se incubaron durante 25 min a 37°C y luego se les agregó 500 µl de LB. Posteriormente se continuó la incubación de las células durante 1 a 1.5 hs.

Las células transformadas de esta manera, fueron sembradas en placas de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado para cada caso.

XX.2.- *E. coli*:

Las células competentes de *E. coli* se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por Hanahan (1983) que permite una alta eficiencia de transformación. Un cultivo crecido durante aproximadamente 16hs fue diluido 1/60 en medio LB y crecido durante 3 a 4 hs a 37°C. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm a 4°C. El pellet celular luego fue resuspendido en solución TfbI fría y se lo mantuvo en hielo durante 5 min. A continuación, las células fueron centrifugadas al igual que en el paso anterior y el pellet fue resuspendido en 1 ml de TfbII. Se alicuotaron las células en tubos conteniendo 50 µl de la suspensión y fueron conservadas hasta su uso a -70°C.

Para los ensayos de transformación se tomaron 50 µl de células competentes y se les agregó de 5 a 10 µl del plásmido de interés. Se dejaron las células incubando durante 30 minutos en hielo. Luego se realizó un choque térmico a 42°C durante 90-120 segundos y se colocaron las células nuevamente en hielo durante 2 minutos. Finalmente, las células se diluyeron en 200 µl de LB líquido y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Una vez finalizada la incubación se hicieron diluciones en LB y se sembraron las células en placas de selección con el antibiótico adecuado.

XXI.- Manipulaciones de ADN:

Las extracciones de ADN cromosómico se realizaron básicamente como se describe en Bron (1990). Las extracciones de plásmidos fueron realizadas por la técnica de Birnboim & Doly (1979). Cuando se realizaron las extracciones de los plásmidos que fueron utilizados para transformar *B. subtilis* YB886 se utilizó el sistema de extracción de plásmidos de Qiagen (Qiagen Midi).

Las digestiones utilizando distintas enzimas de restricción y las ligaciones con ligasa T4 se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante (Gibco BRL o Promega).

XXII- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Las condiciones de reacción que fueron utilizadas para un volumen de muestra de 50µl fueron: buffer de *Taq* ADN Polimerasa (Promega o Gibco-BRL) 1X, MgCl₂ 2,5mM, 0,5U *Taq* ADN Polimerasa (Promega o Gibco-BRL), 10-50 ng de ADN templado y 0,2µM de cada cebador ("primer").

El esquema utilizado para la reacción fue el siguiente: un paso de desnaturalización inicial de 10 min. a 94°C seguido de 30 ciclos de 30seg de duración a 94°C, 60seg. a 50°C y 60seg. a 72°C. Cuando fue necesario, la temperatura del paso de apareamiento de las cadenas ("annealing") fue modificada a la temperatura indicada para cada primer. Cuando se amplificaron fragmentos de tamaños mayores a 1,5Kpb se aumentó el tiempo de apareamiento a 90seg.

Cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 0,8% ó 1% en buffer TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM pH=8,0). Después de la tinción del gel en una solución conteniendo bromuro de etidio 1µg/ml, los geles fueron examinados con luz UV y fotografiados con una película Polaroid 667 o analizados con un analizador de imágenes LAS1000-Fuji.

XXIII- Southern blot:

El ADN de cada cepa fue digerido con la enzima de restricción *Hind*III y sembrado en un gel de agarosa 0,6%. Una vez finalizada la corrida, el gel fue teñido en bromuro de etidio 1µg/ml y fotografiado. Posteriormente, el ADN fue depurinizado y desnaturalizado colocando el gel durante 10min en HCl 0,25M y durante 30min en NaOH 0,5N respectivamente. Luego, el ADN fue transferido a una membrana de nylon GeneScreenTM NEN[®] Life Science Products durante 90min por vacío en un Vacuum Blotter Bio Rad. Posteriormente el ADN fue fijado a la membrana colocando la misma durante 5 minutos bajo luz UV. La membrana fue prehibridada durante 2hs. a 50°C en la solución de prehibridación (SSC 5X [ClNa 43,8g/l, citrato de Na 22,05g/l], Denhardt's 5X [Ficoll 0,5g/l, Polivinilpirrolidona 0,5g/l, seroalbúmina bovina 0,5g/l], fosfato de sodio 25mM pH=7,0, SDS 0,5%). Una vez finalizada la prehibridación, esta solución fue descartada y se colocó la solución de hibridación (SSC 5X, Denhardt's 1X, fosfato de sodio 20mM pH=7,0, Polietilenglicol (PEG) 8000 5%, ADN de espermatozoos de salmón 120µg/ml y la sonda

correspondiente) y se incubó a 50°C durante 16 a 18hs. El ADN utilizado para bloquear la membrana y el de la sonda fueron desnaturalizados previamente hirviendo las muestras durante 10 minutos. Finalizada la hibridación, se realizaron varios lavados: dos veces durante 3 min. en SSC 2X/SDS 0,1% y dos en SSC 0,2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados finales durante 15min en SSC 0,16X/SDS 0,1% a 55°C.

El revelado fue realizado por quimioluminiscencia con Phototope®-Star CDP-STAR New England Bio Labs, según describe el fabricante utilizando las autorradiografías Kodak expuestas a distintos tiempos en un cassette Kodak Biomax MS.

La sonda utilizada fue marcada por "random primers" con el sistema BIOPRIME® DNA Labeling System (Gibco-BRL) como indica el fabricante, utilizando un fragmento del gen *clsI* amplificado por PCR utilizando los primers C1-C2.

XXIV.- Primers utilizados:

Los primers utilizados durante este trabajo para la detección y/o clonado de los genes descriptos están indicados a continuación.

TABLA 4.

Primer	Secuencia (5' a 3')
C1	5'-ATAAAGCTTAAAGGGAAAGCTGTTTAAG-3'
C2	5'-ATAGGATCCTCTCTGCTGATATATTC-3'
C5	5'-GGTTTTAAAGAATTCTGCCCCG-3'
C6	5'-TTTGGATCCTAATTCATCGCC-3'
PGS	5'-AAATCACACTAGCTAGAATCGC-3'
LZ	5'-AGTACAGCGCGGCTGAAATC-3'

Subrayadas se muestran las secuencias que corresponden a sitios de restricción en los siguientes primers: C1: *Hind*III, C2 y C6: *Bam*HI, C5: *Eco*RI.

XXV.- Construcción de cepas mutantes de *B. subtilis*:XXV.1.- Gen *ywiE* (cls1):

Se diseñaron dos primers (C1 y C2) que poseen complementariedad con el gen *ywiE* de *B. subtilis*. Se realizó una reacción de PCR para amplificar dicho gen a partir de ADN cromosómico aislado de la cepa YB886. Se comprobó que el fragmento amplificado era del tamaño esperado. Este fragmento fue posteriormente digerido con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y luego ligado con el plásmido pMutin4 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación obtenida fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* TG1, seleccionándose un clon que tenía la construcción deseada (plásmido pCL29).

Las células competentes de YB886 fueron transformadas utilizando este plásmido como se describe en el punto XX.1. Distintos clones fueron analizados por Southern blot seleccionándose aquel que poseía la construcción correcta (clon CL1).

XXV.2.- Gen *ywnE* (cls2):

El plásmido pEC20 construido por el Dr. P. Stragier fue utilizado para transformar células competentes de *B. subtilis*. Dicho plásmido es pMutin4 conteniendo parte del gen *ywnE* de *B. subtilis*. Luego de la transformación se analizaron distintos clones mediante PCR (utilizando los primers C5-LZ) y aquel que llevaba la construcción esperada fue seleccionado (clon CL2).

XXV.3.- Gen *pgsA*:

Para la construcción de una cepa de *B. subtilis* YB886 con una mutación en el gen *pgsA* se utilizó ADN cromosómico de la cepa SDB110 construida por el Dr. Matsumoto. En esta cepa el gen *pgsA*, clonado en el plásmido pMutin4, se encuentra bajo el control del promotor *Pspac*. Dicho promotor está controlado por el represor LacI y es por lo tanto regulable utilizando distintas concentraciones de IPTG. Asimismo, el gen *lacZ* está controlado por el promotor del gen *pgsA*.

Células competentes de YB886 fueron transformadas con ADN cromosómico de SDB110 y seleccionadas en placas de LB con eritromicina (1µg/ml.). Distintos clones fueron analizados por PCR (utilizando los primers PGS-LZ) y uno de ellos (PGS1) fue seleccionado para posteriores experimentos.

XXVI.- Construcción de la cepa CL21:

Un fragmento del gen *cls2* conteniendo parte de su promotor y de su secuencia codificante (desde la posición -143pb hasta la posición +460pb respecto al codón de inicio de la traducción) fue amplificado por PCR utilizando los primers C5 y C6 que poseen sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Posteriormente, dicho fragmento fue clonado en el plásmido pGEM-T (Promega) y amplificado en *E. coli* TG1. El plásmido obtenido fue digerido con las enzimas de restricción mencionadas y el fragmento de interés fue ligado al plásmido pEC6 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar *E. coli* TG1. Finalmente, se seleccionó un clon que llevaba al plásmido (pCL31) con la construcción correcta (**Figura 3**).

El plásmido pCL31 fue purificado y utilizado para transformar células competentes de *B. subtilis* YB886. La selección de las transformantes se realizó en placas de LB conteniendo cloramfenicol 5µg/ml. Un clon que llevaba la construcción correcta interrumpiendo el gen *amyE* fue seleccionado (cepa CL21). Para corroborar la interrupción en el gen *amyE* los distintos clones se incubaron en LB + Almidón (1%) y se dejaron crecer durante 16 horas. Luego se agregó lugol a las placas y se verificó que el clon elegido no presentaba halo de degradación de almidón.

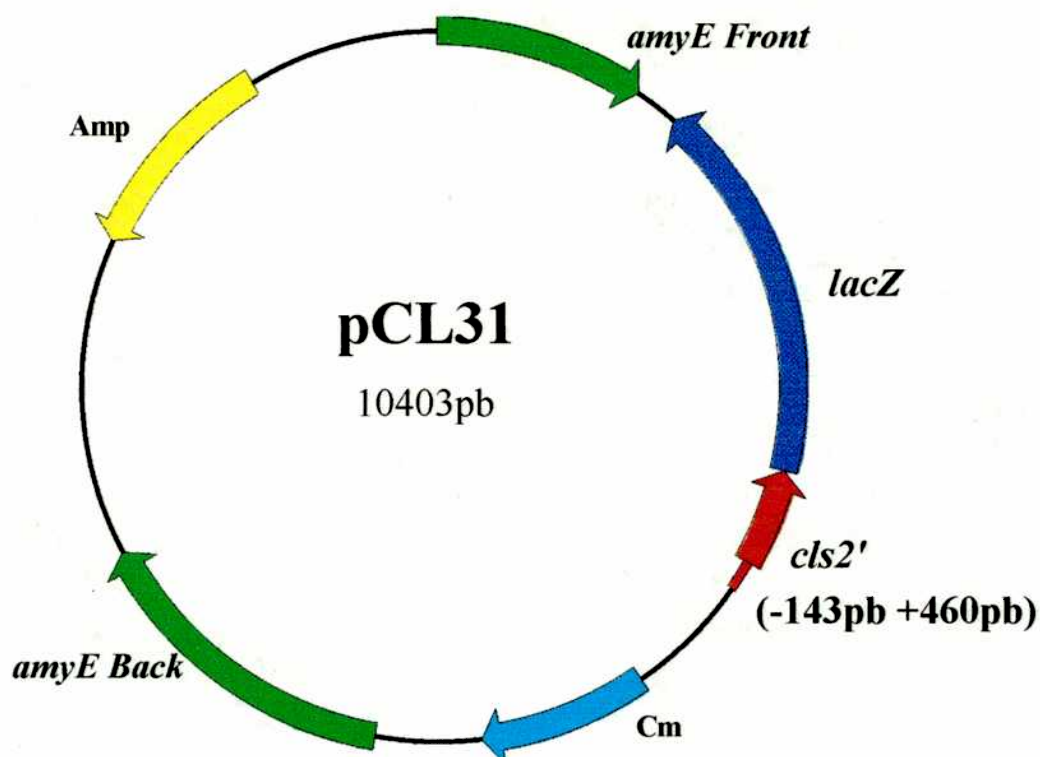


Figura 3: Plásmido pCL31. Se indican las características más relevantes: **Amp**, resistencia a ampicilina; **Cm**, resistencia a cloramfenicol; **amyE Back** y **amyE Front**, regiones 5' y 3' respectivamente del gen *amyE* de *B. subtilis*; **lacZ**, gen *lacZ* de *E. coli* con su propio ATG y con el sitio de unión a ribosomas del gen *sacB* de *B. subtilis*; **cls2'**: región del gen *cls2* de *B. subtilis* amplificada con los primers C5 y C6 que incluye desde la posición -143pb hasta +460pb respecto al codón de inicio de la traducción. El fragmento *cls2'* está clonado en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pEC6. pb: pares de bases.

XXVII.- Medición de actividad β galactosidasa:

Se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos de interés y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Luego, los pellets celulares se resuspendieron en buffer fosfato 25mM pH=8 y se los volvió a centrifugar. Posteriormente, las células se resuspendieron en 0.4 ml de buffer fosfato de Na 0.1M pH=7 conteniendo lisozima (5-10mg/ml). Se incubaron las muestras a 37°C durante 20-30 minutos y luego se les agregó deoxicolato de sodio (1% concentración final). Las muestras se homogeneizaron por agitación rápida para permitir que las células se lisen. El extracto obtenido se llevó a 0.8 ml con Buffer Z 2x y se preincubaron los tubos a 28-30 °C durante 10 minutos. Finalizada la incubación, se agregó 0.2 ml de

ONPG (4 mg/ml) preparado en buffer fosfato 0.1 M y los tubos se incubaron a 37°C hasta desarrollo de color. Una vez desarrollado el color se frenó la reacción agregando 0.5 ml de NaCO₃ 1M. La densidad óptica final fue medida a 420 nm.

Buffer Z (2X): Na₂HPO₄ 120 mM, NaHPO₄ 80mM, KCl 20mM, MgSO₄ 7H₂O 2mM y β-Mercaptoetanol 50mM.

La actividad específica se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$A_{\text{esp.}} = (1000 \times A_{420}) / (t \times A_{600}) \quad (13)$$

Donde A₄₂₀ es la absorbancia de las muestras medidas a 420nm, t es el tiempo de la reacción y A₆₀₀ es la densidad óptica de las células medida a 600nm.

C.- Envolturas:

La envoltura celular de las distintas especies del género *Bacillus* al igual que el resto de las bacterias Gram positivas consiste en una estructura multilaminar en la cual se encuentran la membrana citoplasmática, la pared celular y en algunas especies (por ejemplo *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*) una superficie proteica denominada "S layer".

La biogénesis de las envolturas es uno de los procesos biológicos fundamentales durante el crecimiento de los microorganismos, no obstante se sabe muy poco acerca de este mecanismo. A pesar de ello, es evidente que el ensamblaje de los componentes de las envolturas se produce sobre un templado provisto tanto por los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática como por el peptidoglicano de la pared. Por lo tanto, el ensamblaje de la envoltura celular no se lleva a cabo debido a una formación *de novo*, sino a la extensión a partir de la inserción de diversos componentes sobre un molde preexistente en la célula.

C.1.- Pared Celular:

La composición de la pared celular ha sido utilizada ampliamente como criterio taxonómico. La misma contribuye con la forma, la estabilidad celular, las características serológicas de las distintas especies y con la capacidad de adsorción de diversos bacteriófagos.

Las paredes de las especies Gram positivas están compuestas por peptidoglicano (30-70 % del total de la pared celular), polisacáridos, ácidos teicoicos y ácidos teicurónicos (Schleifer & Kandler, 1972). Estos últimos son polímeros aniónicos que le confieren a la pared celular propiedades amfifílicas y son específicos de las Gram positivas.

El peptidoglicano, también denominado mureína, es la capa rígida que compone las paredes de los organismos agrupados en el género *Bacteria* y que otorga la estabilidad física a las células. En las bacterias Gram positivas la pared se encuentra formada por varias capas de peptidoglicano. A diferencia de ello, las bacterias Gram negativas sólo poseen en su pared una única capa del mismo. Existen algunos microorganismos como los micoplasmas y ciertas bacterias halófilas que no poseen peptidoglicano como componente de la pared celular.

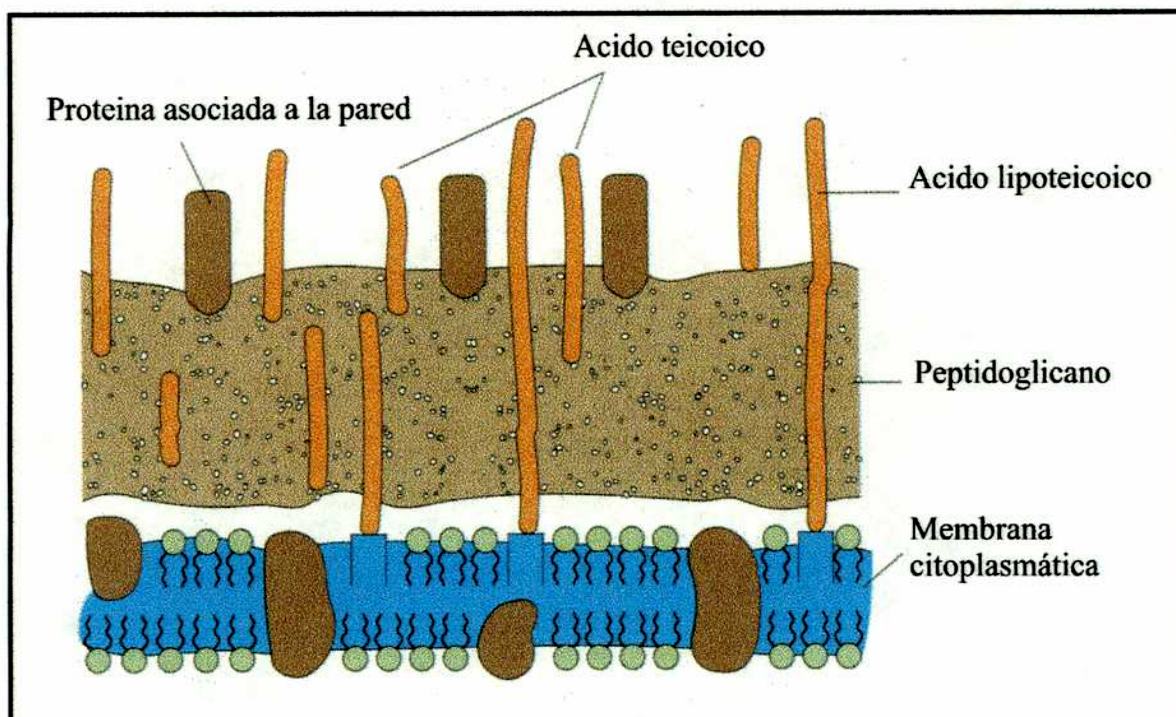


Figura 4: Esquema de la superficie de una bacteria Gram positiva. Se indican los distintos componentes.

Si bien la principal función de las envolturas celulares bacterianas es la de proteger el protoplasma o citoplasma, también es fundamental en diversos procesos vitales para la célula como el transporte de metabolitos y de iones, la transducción de señales y el pasaje de solutos entre el citoplasma y el medio circundante. Asimismo, diversos autores han descripto que la composición y la estructura de la pared celular varían con las condiciones de cultivo y en consecuencia, su porosidad y su capacidad intercambiadora de iones (Op den Camp, 1985; Wicken & Knox, 1975). Es posible además, que éstas variaciones afecten otras funciones celulares relacionadas como la secreción de proteínas y la autólisis.

C.1.1.- Peptidoglicano:

El peptidoglicano está compuesto por cadenas de glicanos lineales entrecruzadas con cadenas peptídicas. Los glicanos, compuestos por unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidos por uniones glicosídicas α 1-4.

En el peptidoglicano naciente (aún no entrecruzado) los grupos carboxílicos de cada residuo de ácido murámico forman una unión amida con el amino terminal de péptidos cortos. En la mayoría de las especies del género *Bacillus* este péptido está compuesto por cinco aminoácidos, cuyo residuo amino terminal es comúnmente la L-alanina. No obstante,

pueden estar presentes el ácido D-glutámico, el ácido meso-diaminopimélico o dos residuos de D-alanina (dímero). Los pentapéptidos pertenecientes a cadenas de glicanos adyacentes pueden entrecruzarse por medio de una enzima (transamidasa) formando una estructura macromolecular (Archibald *et al.*, 1993). Si bien la organización estructural básica de los componentes de la pared se encuentra bastante conservada, existen diferencias substanciales entre las distintas especies de microorganismos Gram positivos. La composición del péptido, en particular la identidad de los aminoácidos ubicados en la posición tres, varía entre los diferentes microorganismos. Los diferentes tipos de entrecruzamientos y la identidad del aminoácido ubicado en dicha posición han sido utilizados como un marcador taxonómico.

C.1.2.- Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:

Los polímeros aniónicos como los ácidos lipoteicoicos y teicoicos constituyen una porción importante de las paredes de la mayoría de las bacterias Gram positivas. Estos polímeros participan en las interacciones electrostáticas y determinan las propiedades polielectrolíticas de la pared que son requeridas para la viabilidad y la morfogénesis normal de la célula. Son capaces de concentrar cationes sobre la superficie celular y formar complejos con proteínas funcionales durante la división celular. Se considera que estos polímeros están involucrados en el recambio de la pared celular, probablemente mediante la regulación de diversas enzimas involucradas tanto en la autólisis como en la resíntesis del peptidoglicano.

Es importante mencionar que además de contener el peptidoglicano y los polímeros aniónicos, las paredes de las bacterias Gram positivas pueden contener proporciones substanciales de proteínas unidas en forma covalente o no con el complejo peptidoglicano-polímero aniónico, junto con polisacáridos neutros y cationes que forman parte de la estructura del polielectrolito.

Originariamente se describieron dos clases de polímeros aniónicos: los ácidos teicoicos, en los cuales la carga negativa es provista por grupos fosfodiéster en las unidades repetitivas del polímero, y los ácidos teicurónicos, en los cuales el residuo carboxílico del ácido urónico provee la carga negativa.

Las proporciones relativas de ambos tipos de polímeros pueden variar considerablemente con las condiciones de cultivo, generando cambios correspondientes de las propiedades químicas de la pared. En la mayoría de las condiciones de cultivo estudiadas, el polímero aniónico predominante en las paredes de *Bacillus* es el ácido teicoico. Existen

diferentes ácidos teicoicos, pero el más comúnmente observado es un polímero de glicerol fosfato (Archibald *et al.*, 1993).

Los ácidos teicoicos constituyen los antígenos de pared de las bacterias Gram positivas, poseen relevancia taxonómica y se encuentran unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared celular. Desde el punto de vista químico, como ha sido mencionado previamente, son polímeros constituidos por glicerol o por ribitol fosfato, los cuales a su vez pueden estar sustituidos por azúcares o aminoácidos (principalmente alanina).

La presencia de los ácidos teicoicos como componente de las paredes celulares fue establecida en 1960. Diez años después fueron descubiertos los ácidos lipoteicoicos, también denominados ácidos teicoicos de membrana o ácidos teicoicos del glicerol. Los ácidos lipoteicoicos se encuentran distribuidos mayoritariamente entre los microorganismos Gram positivos y hasta el presente no han sido descritos en los Gram negativos. Su biosíntesis es completamente diferente a la de los ácidos teicoicos y la misma se encuentra altamente relacionada con la síntesis y el recambio de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática (Lengeler *et al.*, 1999).

El principal componente que diferencia los ácidos lipoteicoicos de los ácidos teicoicos es la porción lipídica que se encuentran unida covalentemente a la cadena polar. Dicha porción lipídica que consiste normalmente en un glicolípido, un fosfoglicolípido o simplemente en un diacilglicerol, ancla a los ácidos lipoteicoicos en la membrana citoplasmática.

En *B. subtilis* los ácidos lipoteicoicos consisten en una cadena de poliglicerofosfatos de 24 a 33 unidades fosfodiéster unidas covalentemente por su parte terminal al lípido de anclaje y en algunos casos sustituidos por ésteres de alanina o grupos glicosídicos (galactosa, glucosa o N-acetilglucosamina). Cabe mencionar que la porción del poliglicerolfosfato es lo suficientemente extensa como para penetrar la capa de peptidoglicano y alcanzar la superficie bacteriana.

Distintos autores han detallado la relación existente entre los glicolípidos y fosfoglicolípidos presentes en las membranas citoplasmáticas y los ácidos lipoteicoicos de 33 especies Gram positivas incluyendo al género *Bacillus* (Koch *et al.*, 1983; Op den Camp, 1985). Con respecto al rol que cumplirían dichos polímeros aniónicos se ha descrito que la interacción de las bacterias con otras células y superficies es un evento complejo en el cual operan diversas fuerzas, tanto repulsivas como atractivas. Dentro de estas fuerzas se incluyen

las interacciones específicas con receptores celulares, la carga neta de superficie y la hidrofobicidad de la superficie celular.

El carácter hidrofóbico de las superficies bacterianas posee un rol importante en su interacción con otras superficies celulares así como con superficies inertes. Si bien la naturaleza de los componentes que otorgan la hidrofobicidad a la superficie bacteriana aún no ha sido identificada, se ha sugerido que los ácidos lipoteicoicos estarían involucrados en dicha hidrofobicidad (Op den Camp, 1985). Un ejemplo de ello son los ácidos lipoteicoicos presentes en *S. pyogenes* que en asociación con la proteína M de la pared celular son importantes en la adhesión de dicho microorganismo a la célula huésped y en la resistencia del mismo a la fagocitosis (Lengeler *et al.*, 1999).

C.2.- Membrana citoplasmática:

En lo que respecta a las membranas, se ha descripto que la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa no solamente como una barrera semipermeable excluyendo antibióticos potencialmente dañinos y enzimas hidrolíticas como la lisozima, sino que también constituyen el soporte de importantes enzimas metabólicas que se encuentran localizadas entre la membrana externa e interna (van Voorst & de Kruijff, 2000).

En las bacterias Gram positivas, en las cuales la membrana externa se encuentra ausente, la pared celular presenta propiedades de intercambio de iones y de permeabilidad que ofrecen un grado de protección, en algunos casos, análogo al provisto por la membrana externa de las Gram negativas.

La membrana citoplasmática cumple funciones metabólicas esenciales además de cumplir un rol como barrera física (encapsulando al citoplasma). Dicha variedad de funciones incluye la exclusión de compuestos tóxicos, el mantenimiento y la regulación de la presión de turgencia, contener enzimas asociadas a la membrana, el intercambio y procesamiento de información, la transducción de energía, la motilidad celular, el crecimiento, la diferenciación, y finalmente los procesos relaciones con la toma de nutrientes del medio exterior, además de la exportación de productos metabólicos y de los bloques de construcción de la síntesis de la pared.

La mayoría de las funciones celulares se encuentran de alguna manera conectadas a eventos de transporte y/o son dependientes de éstos. Esta característica es un reflejo de la marcada conservación de la mayoría de los principios fundamentales descriptos en los

transportes de membrana y para los procesos de sensado, desde las células procariotas hasta los mamíferos superiores.

La estructura de la membrana citoplasmática se encuentra gobernada principalmente por interacciones complejas entre la bicapa lipídica y las proteínas de membrana integrales y periféricas. Estas interacciones están en un estado dinámico, al cual se llega mediante diversos flujos asociados a las funciones de la membrana y a la movilidad de sus componentes individuales.

C.2.1.- Lípidos:

El rol de los lípidos es relevante en la estructura de las membranas citoplasmáticas. Los mismos intervienen sobre la modulación de actividades proteicas, la inserción de proteínas a la membrana, la endo y exocitosis, la formación de dominios, la señalización por medio de segundos mensajeros y el anclaje de proteínas a la superficie (van Voorst & de Kruijff 2000; Huijbregts *et al.*, 2000).

Dentro de la dinámica de las membranas se incluyen la cadena transportadora de electrones, la agregación de proteínas ligando-inducidas, la endocitosis mediada por receptores, el reciclaje, el movimiento celular y los cambios estructurales de las proteínas. Los lípidos no poseen un rol estático en dichos procesos celulares sino que son activos participantes que influyen en las propiedades de las proteínas asociadas a la membrana y sirven como precursores de importantes componentes celulares. No obstante, debido a que los lípidos no poseen actividad catalítica, uno de los mayores desafíos ha sido desarrollar enfoques alternativos para poder estudiar el rol específico de los mismos sobre las funciones celulares (Dowhan, 1997).

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos. Tienen diversas funciones biológicas como moléculas combustibles, como almacenes de energía altamente concentrada y como componentes de las membranas. A diferencia de las proteínas de membrana, prácticamente se desconoce el mecanismo de transporte de los lípidos sintetizados *de novo* y cómo ocurre la distribución de los mismos en la membrana.

Se considera que los lípidos constituyen los bloques de construcción de todas las biomembranas existentes en la naturaleza. Las variaciones en la composición de las cabezas polares y de las cadenas parafínicas de los mismos dan lugar a cientos de especies de lípidos diferentes. Esta diversidad apoya a lo expresado con anterioridad, sugiriendo que los lípidos además de cumplir un rol como barrera hidrofóbica entre el exterior y el interior celular,

poseen otra función celular. Se sabe que la naturaleza polar de la cabeza es importante en la interacción de dichos lípidos con las proteínas de membrana. Las cabezas acídicas del fosfatidilglicerol (PG), el ácido fosfatídico (PA), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI) dan lugar a interacciones electrostáticas con residuos de proteínas cargados positivamente (en particular con residuos de lisinas y argininas). Por su parte, las proteínas también afectan el comportamiento de los lípidos ya que la presencia de ciertas proteínas impide que se produzcan transiciones de fases a estructuras lipídicas no lamelares como las fases hexagonales, las cúbicas, etc (van Hoorst & de Kruijff, 2000).

La disminución local del pH de una membrana conteniendo lípidos acídicos podría favorecer un aumento de la protonación de las cadenas laterales proteicas cargadas negativamente facilitando de esta manera su inserción dentro de la bicapa. Asimismo, el tamaño de la cabeza polar es de gran importancia ya que cuanto mayor es su tamaño menor será el espacio disponible en la bicapa para la inserción de proteínas.

La diversidad de los lípidos puede racionalizarse en base a que la función de las proteínas integrales estaría modulada por la fluidez local de la membrana y/o por la composición de los lípidos que interaccionan con éstas. Estas funciones han sido descritas por medio de las observaciones que demostraron que ciertas proteínas integrales requieren un ambiente fosfolipídico fluido para su funcionamiento y que dichas funciones se encuentran inhibidas en el estado gel de la membrana (Cullis & De Kruijff, 1979).

C.2.2.- Fosfolípidos:

Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios en todas las membranas biológicas y en su mayoría son derivados del glicerol, por lo que se los denomina fosfoglicéridos. Un fosfoglicérido está constituido por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol fosforilado. La longitud y grado de saturación de las cadenas de los ácidos grasos en los lípidos de la membrana tienen un profundo efecto en la fluidez de la misma. Además, el largo de las cadenas de ácidos grasos debe corresponderse con los segmentos hidrofóbicos de las proteínas de membrana para lograr que las mismas se ubiquen correctamente.

Por otra parte, la combinación de las cadenas parafinicas y el tamaño de la cabeza polar determinan la forma del fosfolípido. Por ejemplo, un fosfolípido como la di-oleil-fosfatidilcolina (DOPC) y el di-oleil-fosfatidiglicerol (DOPG) tienden a organizarse en bicapas (o fase lamelar) ya que el área ocupada por la cabeza polar es similar a la ocupada por los ácidos grasos. Sin embargo, algunos detergentes y lisofosfolípidos tienden a organizarse en micelas con los ácidos grasos ocupando el centro de las mismas, puesto que

en este caso el área ocupada por la cabeza polar excede a la de los ácidos grasos. Por otra parte, fosfolípidos con cabezas polares pequeñas tienden a organizarse en estructuras no lamelares del tipo hexagonal (H_{II}). También es importante la composición del medio en el que se encuentran los fosfolípidos ya que por ejemplo la cardiolipina (CL) que normalmente se comporta como un lípido que forma fases lamelares, es capaz de adoptar una estructura de fase hexagonal (H_{II}) ante la presencia de iones divalentes.

Sin embargo, a pesar de lo mencionado en párrafos anteriores, una membrana biológica se encuentra compuesta por fosfolípidos capaces de formar diferentes estructuras y a lo largo de la cual se insertan proteínas para formar una bicapa. El punto de transición de una bicapa a una estructura no lamelar está regulada fisiológicamente por una modulación en la composición de la misma. No obstante, esta adaptación influiría sobre la presión lateral de la membrana (por ejemplo por un aumento en el grado de insaturación de los lípidos) (Cantor, 1997). Los cambios que podrían producirse en la presión lateral debido al cambio en su composición lipídica interferirían con cambios conformacionales y por consiguiente funcionales de las proteínas inmersas en la bicapa.

C.2.3.- Fosfolípidos en *Bacillus subtilis*: Biosíntesis.

Los fosfolípidos predominantes en la mayoría de las especies del género *Bacillus* han sido descritos por Bishop y colaboradores (1967) y Op den Kamp y colaboradores (1969) y por nuestro laboratorio (López *et al.*, 1998). Ellos son: fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina (PE) y difosfatidilglicerol o cardiolipina. Existen algunas diferencias en la composición de fosfolípidos dentro del género, estando ausente generalmente la fosfatidilcolina (PC) (Op den Kamp *et al.*, 1969). En algunas especies de *Bacillus* se encuentran presentes fosfolípidos de naturaleza básica que tendrían el rol de mantener el pH en la membrana (Gould & Lennarz 1970), como el lisilfosfatidilglicerol (LysPG). La composición lipídica (en particular la de lípidos polares) puede ser afectada cuali y cuantitativamente por diversos factores del cultivo, incluyendo la composición del medio, las condiciones físicas y el tiempo de incubación al momento de cosechar (Op den Kamp *et al.*, 1969; Gould & Lennarz, 1970; Rusell N. J. *et al.* 1995).

Además de la presencia de los fosfolípidos mencionados, dentro del género *Bacillus* también se ha descrito la presencia de glicolípidos, en particular diglucosildiacylglicerol y monoglucosildiacylglicerol (Brundish *et al.*, 1965; Bishop *et al.*, 1967; Op den Kamp *et al.*, 1969) (**Figura 5**).

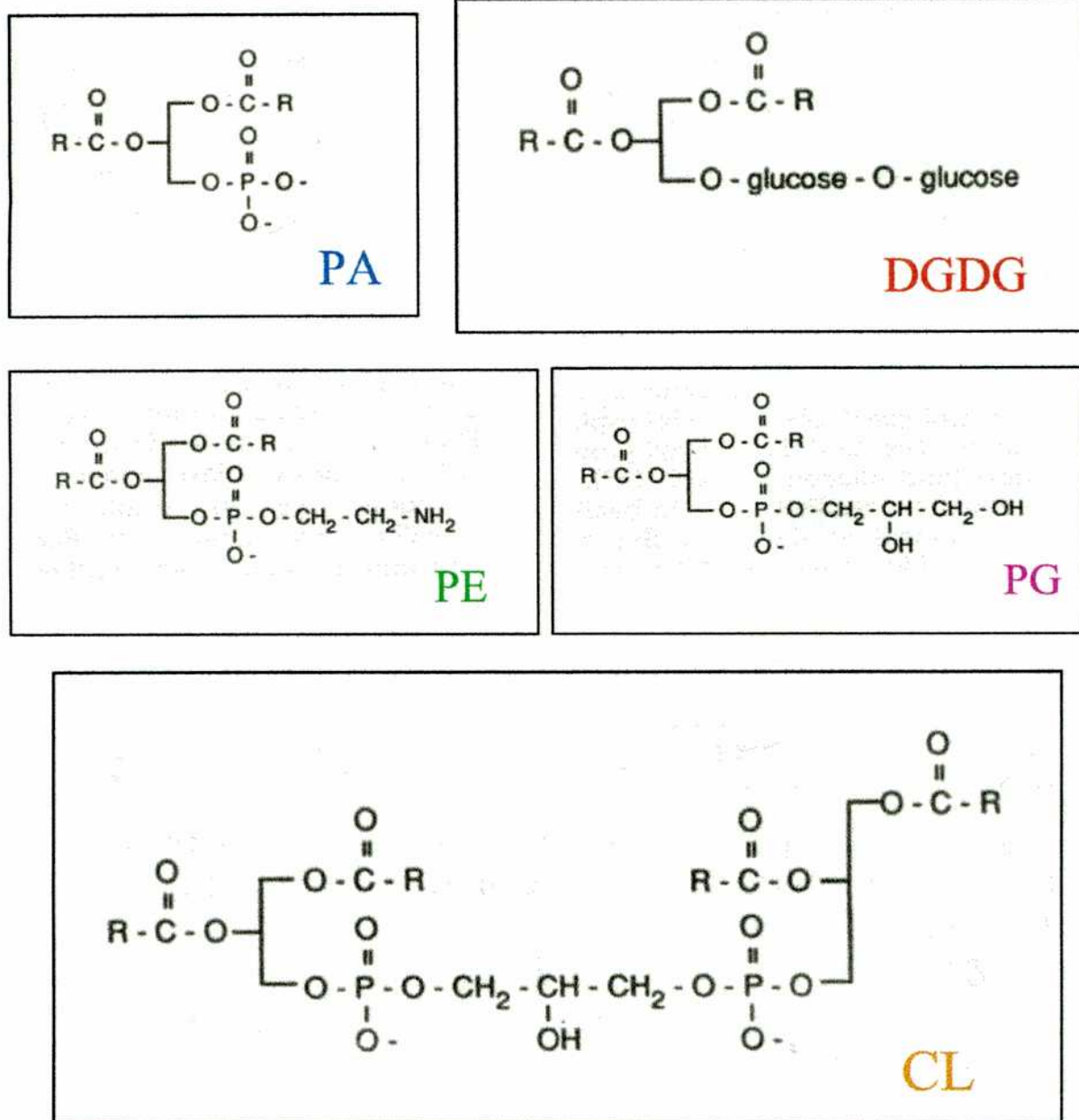


Figura 5: Estructura de los principales fosfolípidos y del glicolípido. PA: ácido fosfatídico; PE: fosfatidiletanolamina; PG: fosfatidilglicerol; CL: cardiolipina; DGDG: diglucosildiacylglicerol. No se muestra la estructura del lisilfosfatidilglicerol el cual se sintetiza a partir de la transferencia de una molécula de lisina al fosfatidilglicerol.

Existen evidencias de que la biosíntesis de la mayoría de los lípidos bacterianos se lleva a cabo por mecanismos similares a los encontrados en plantas o animales. Sin embargo, ciertas vías aún siguen siendo exclusivas de los microorganismos. No es sencillo hacer generalizaciones acerca de la naturaleza única o universal de los mecanismos de biosíntesis de los lípidos microbianos. Actualmente se está tratando de establecer la identidad de varios de estos lípidos, y de las vías por las cuales dichas sustancias son sintetizadas. El grupo de

lípidos microbianos que ha recibido la mayor atención en lo que respecta a su biosíntesis es el de los fosfátidos o fosfolípidos.

En la biosíntesis de los fosfolípidos mayoritarios de *B. subtilis*, el fosfatidilglicerol es importante puesto que es uno de los intermediarios claves en la biosíntesis de los demás fosfolípidos (**Figura 6**).

El fosfatidilglicerol sirve como precursor biosintético en al menos tres reacciones: i) formación de aminoacil fosfatidilglicerol; ii) síntesis de cardiolipina, y fosfoglicolípidos (en alguna especie) y iii) transferencia de sn-glicerol-1 fosfato no acilado hacia sustancias no lipídicas durante la síntesis de ácidos lipoteicoicos. El diacilglicerol resultante de la última reacción, puede ser utilizado para la síntesis de fosfatidilglicerol u otros lípidos (Op den Camp, 1985).

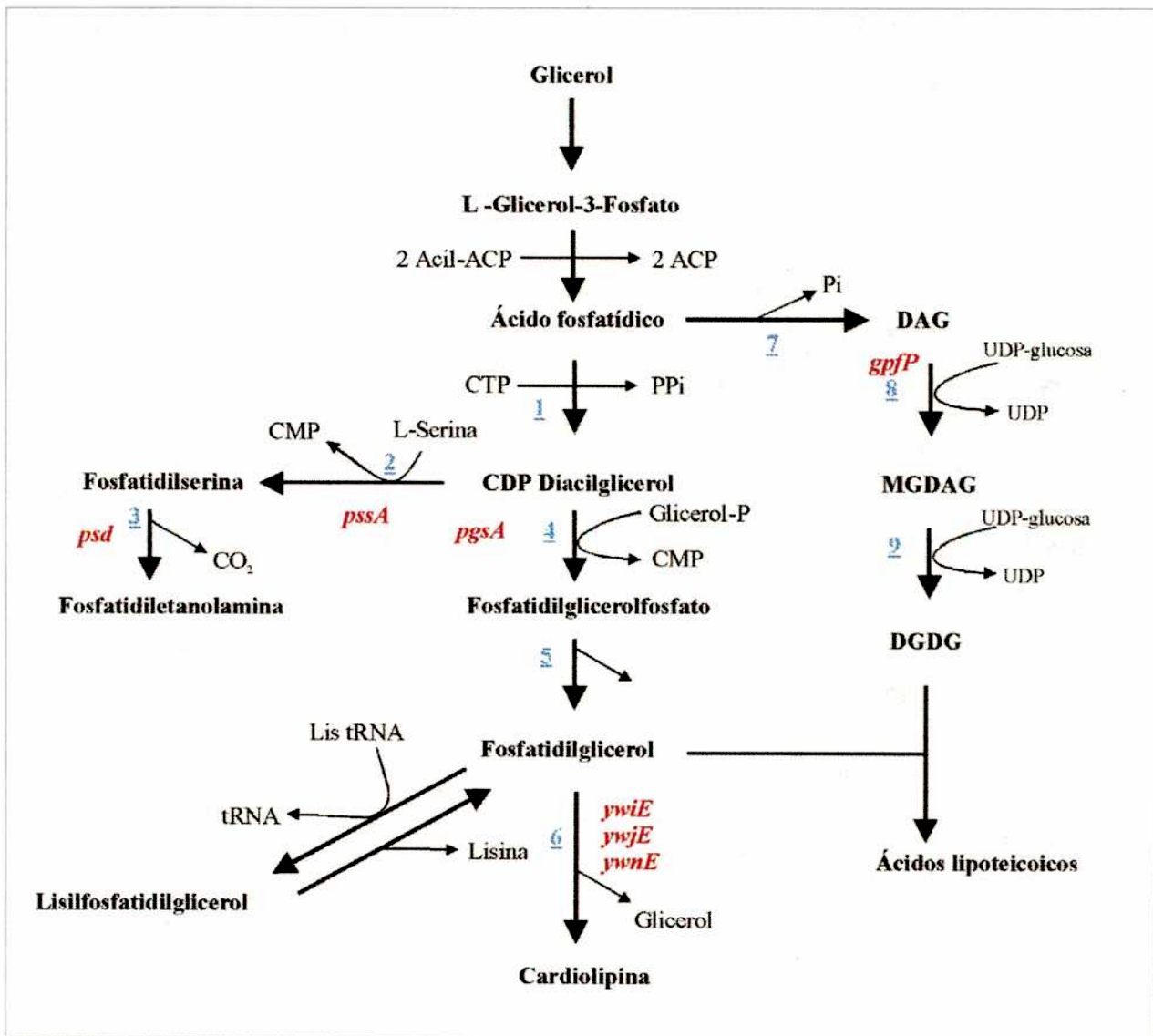


Figura 6: Biosíntesis de fosfolípidos en *B. subtilis*.

CDP: citidina difosfato; **CTP:** citidina trifosfato; **ACP:** proteína transportadora de acilo; **CMP:** citidina monofosfato; **UDP:** uridina difosfato; **PPi:** pirofosfato; **Pi:** fósforo inorgánico; **DAG:** diacilglicerol; **MGDAG:** monoglucosildiacilglicerol; **DGDG:** diglucosildiacilglicerol; **tRNA:** ácido ribonucleico de transferencia; **Lis tRNA:** ácido ribonucleico de transferencia cargado con una molécula de lisina. Se indican los genes que codifican (o codificarían) las enzimas involucradas en cada paso metabólico en esta especie.

C.2.4.- Ácidos grasos en *Bacillus subtilis*: Biosíntesis.

En lo que respecta a la composición de ácidos grasos del género *Bacillus* se sabe que los ácidos grasos insaturados son generalmente minoritarios siendo los ácidos grasos ramificados los principales constituyentes de las membranas citoplasmáticas (Kaneda, 1963; de Mendoza *et al.*, 1993). Los ácidos grasos mayoritarios son los ramificados de las series anteiso C15 e iso C17. Los ácidos grasos ramificados que poseen un grupo metilo en la antepenúltima posición pertenecen a la serie anteiso y los que la presentan en la penúltima posición a la serie iso.

De las especies de *Bacillus* estudiadas por Kaneda en 1967, al menos 22 contienen ácidos grasos saturados iso y anteiso como componentes mayoritarios de los lípidos (60-90 % del total de ácidos grasos). Estos ácidos grasos ramificados también se encuentran presentes en algunas especies de microorganismos Gram negativos y en organismos superiores (plantas, hongos patógenos, etc). Es importante señalar que la composición de ácidos grasos de las bacterias incluyendo al género *Bacillus* es significativamente diferente a la de los organismos superiores pues ninguna posee ácidos grasos poliinsaturados (exceptuando al género *Mycobacterium*).

Las funciones de los ácidos grasos ramificados han sido estudiadas desde diferentes enfoques:

- i)- como sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos
- ii)- como componentes que contribuyen a la fluidez de los fosfolípidos, y
- iii)- como contribuciones conformacionales globales a la estructura de la membrana

El mantenimiento de las propiedades fluidas de los lípidos de la membrana es importante en el crecimiento de los microorganismos y este fenómeno es regulado por la composición de ácidos grasos.

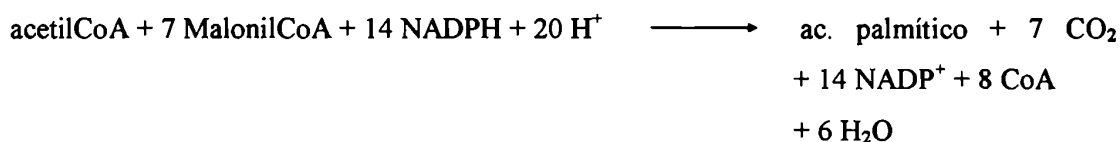
Es importante destacar que los puntos de fusión de los ácidos grasos ramificados son generalmente más bajos que los ácidos grasos lineales con el mismo número de átomos de carbono. En particular los puntos de fusión de las series anteiso son de 25 a 30 °C menores que los de las series normales. En cambio, los puntos de fusión de las series iso, son solamente un poco menores que los correspondientes a las series normales. Por otra parte, es

altamente probable que las metil ramificaciones jueguen un rol importante en la interacción entre los grupos hidrofóbicos de otros componentes de la membrana, como las proteínas o los glicopéptidos, para formar estructuras transitorias requeridas para su funcionamiento.

La formación de ácidos grasos ramificados tiene una importante relación con el metabolismo de los aminoácidos. La existencia de diversas cadenas ramificadas y la posible variación en las proporciones de varios de los componentes ramificados, pueden ser significativas como indicadores de distintos mecanismos metabólicos y han sido utilizados en muchos casos como identificación taxonómica de las especies bacterianas.

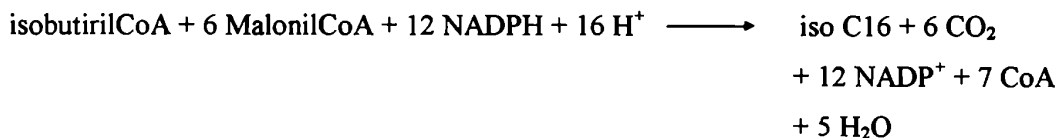
En la mayoría de los organismos, la síntesis *de novo* de los ácidos grasos es llevada a cabo por condensaciones repetidas de malonilcoenzima A (CoA) con acetilCoA catalizadas enzimáticamente por la ácido palmítico sintasa.

La reacción puede ser expresada por la siguiente ecuación:



Las sintasas de ácidos grasos en el género *Bacillus* son diferentes de las ácido palmítico sintasas. Las cadenas iniciadoras en el caso de *Bacillus* son ramificadas y cuando estos microorganismos son crecidos en medios convencionales se utilizan los ésteres de acilCoA ramificados de cadenas cortas en vez de acetilCoA. Por lo tanto, en este caso, los ácidos grasos producidos son los pertenecientes a la serie iso C 14 y C 16, iso C 15 y C 17 y anteiso C 15 y C 17.

La reacción puede ser representada de la siguiente manera:



La concentración de malonil CoA presente en el citoplasma de la célula determina el largo de la cadena de los ácidos grasos sintetizados. Es importante destacar que en este proceso de extensión de la cadena hidrocarbonada no existen diferencias entre la sintasa de ácidos grasos ramificados y la sintasa de ácidos grasos lineales.

En bacterias, los ácidos grasos insaturados son sintetizados por una vía aeróbica involucrada en la directa desaturación de los ácidos grasos saturados, o por una vía anaeróbica que involucra la elongación de ácidos grasos insaturados de cadena mediana. En las especies del género *Bacillus*, son sintetizados por la vía aeróbica. Los ácidos grasos monoinsaturados más comunes en la naturaleza son los isómeros $\Delta 9$, y en algunas especies de *Bacillus* también han sido descritos ácidos grasos inusuales como los isómeros $\Delta 5$, $\Delta 8$ y $\Delta 10$ (Kaneda, 1977).

Existen diversos factores que afectan las proporciones de las series de ácidos grasos ramificados y pueden clasificarse en tres grupos (*Figura 7*)

- i)- la concentración relativa de las tres cadenas iniciadoras hacia la síntesis de ácidos grasos en la etapa C.
- ii)- la disponibilidad de las cadenas iniciadoras de las vías endógenas (vía **A1** y **B**) y exógenas (vías **A2**, **B** y **D**).
- iii)- la concentración de la cadena de extensión (dador **C2**)

El factor i) es característico de cada ácido graso sintasa y es un valor fijo para cada microorganismo. Los factores ii) e iii) son variables y dependen tanto de las condiciones fisiológicas del microorganismo como del medio de cultivo.

La mayor parte de los ácidos grasos del género *Bacillus* esterifican a los fosfolípidos de las membranas. Las propiedades de los fosfolípidos dependen de la distribución de los ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 del glicerol, del fosfoderivado en la posición 3 y del estado físico de los ácidos grasos. El mecanismo por el cual los ácidos grasos son incorporados preferencialmente en una u otra posición en los fosfolípidos es aún desconocida. Sin embargo, se requieren cadenas ramificadas de ácidos grasos de C14 y C15 en la posición 2 de los fosfolípidos para obtener un crecimiento bacilar normal (O'Leary, 1967).

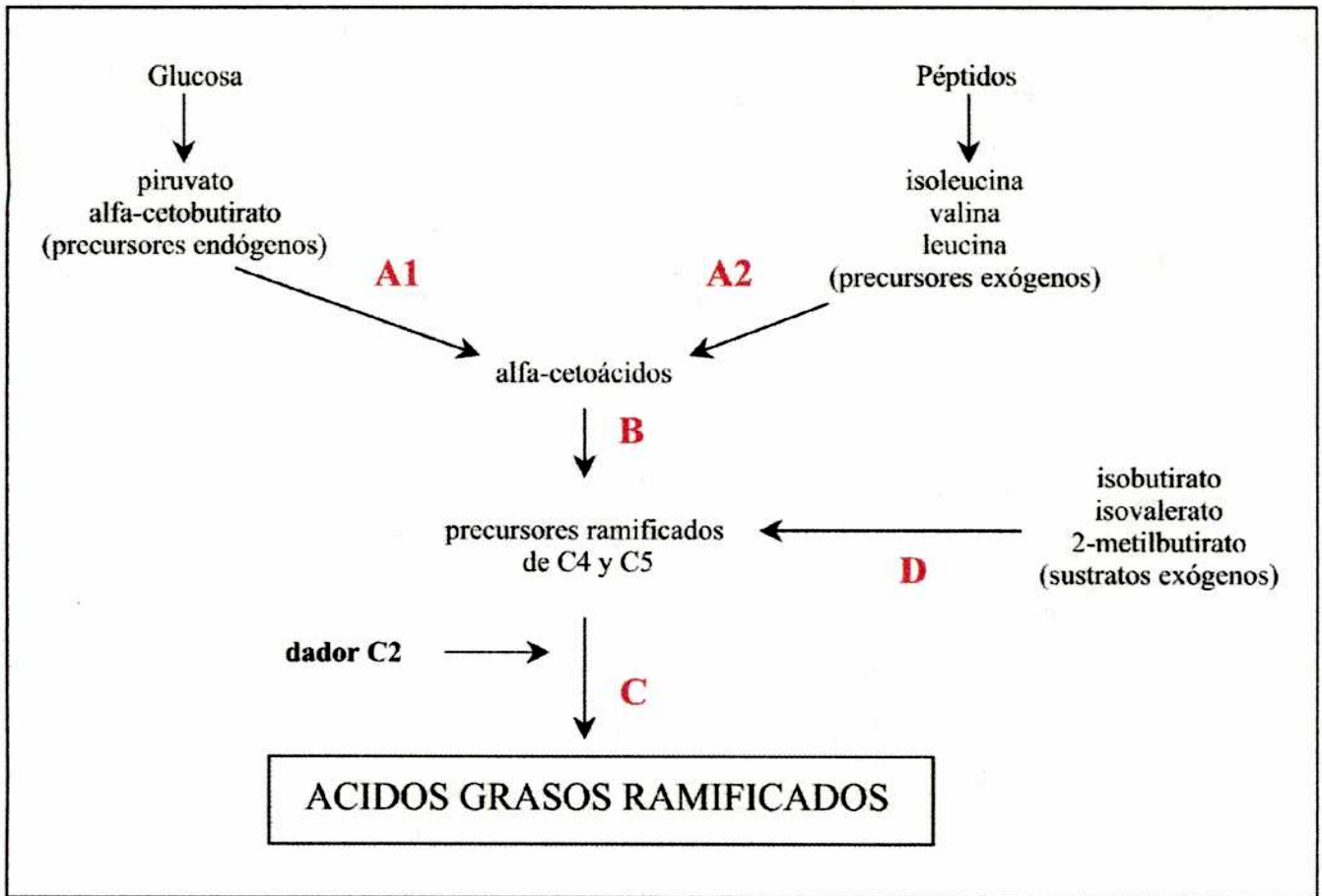


Figura 7: Esquema de la vía involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos ramificados en *B. subtilis*.

RESULTADOS.

1.- Cambios producidos en las envolturas de *B. subtilis* como consecuencia del crecimiento bajo estrés osmótico.

Se ha descrito que la composición de las membranas de *B. subtilis* varía con las condiciones de crecimiento, al igual que lo observado en otros microorganismos (Op den Kamp *et al*, 1969). Los cambios producidos en la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos permitiría mantener a la membrana citoplasmática en líquido-cristalina en respuesta al estrés impuesto.

Los experimentos que se detallan a continuación constituyen los resultados obtenidos durante la caracterización morfológica y bioquímica de las células de *B. subtilis* crecidas bajo condiciones normales, (en el medio de cultivo LB) y de estrés osmótico (en el mismo medio suplementado con NaCl).

1.1.- Caracterización del crecimiento de *B. subtilis* en un medio hipersalino:

1.1.1.- Curvas de crecimiento en respuesta a distintas concentraciones de NaCl presentes en el medio de cultivo:

Una de las primeras evidencias que indicaban que bajo condiciones de estrés osmótico se producían modificaciones morfológicas en cultivos de *B. subtilis* fue la observación de una extensa filamentación celular (López *et al.*, 1998). La sensibilidad diferencial a antibióticos y la capacidad de ser lisado por bacteriófagos virulentos o temperados que presenta este microorganismo cuando se cultiva en un medio hipersalino, nos condujo a pensar que se podría producir algún cambio en la composición de las envolturas bajo estas condiciones de crecimiento.

Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa salvaje YB886 de *B. subtilis* utilizando distintas concentraciones de NaCl para determinar si existían cambios en el tiempo de duplicación.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8**.

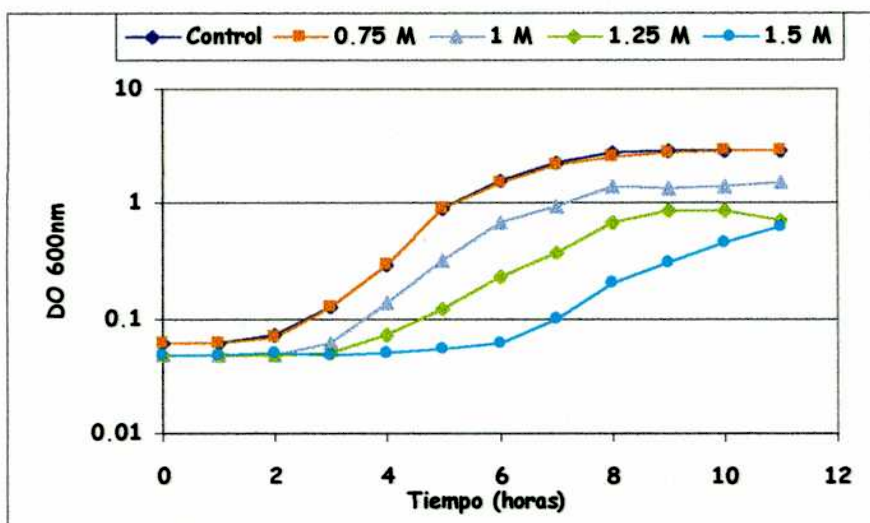


Figura 8: Curvas de crecimiento de la cepa de *B. subtilis* YB886. La densidad óptica fue medida a 600 nm. Las distintas curvas representan el crecimiento de *B. subtilis* en el medio de cultivo LB suplementado con distintas concentraciones molares de NaCl. **Control:** medio LB sin adición de NaCl.

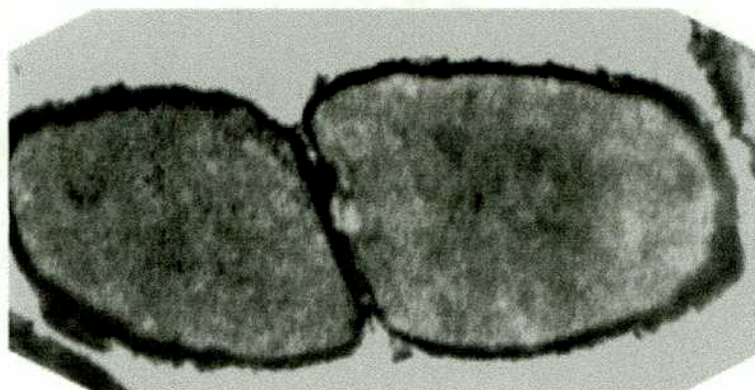
El aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo trae aparejado una demora en el crecimiento del microorganismo. En el medio conteniendo 0.75M de NaCl no se observan diferencias respecto al control; sin embargo, a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio de cultivo se observan diferencias significativas. En las curvas de 1.25 y 1.5M NaCl las demoras en la iniciación del crecimiento celular van de 3 a 4 horas respectivamente. Además de la demora en la iniciación del crecimiento, a altas concentraciones de NaCl se observa un aumento en el tiempo de duplicación de las células. La densidad óptica final alcanzada por las células crecidas en NaCl ($DO_{600nm} = 0.8-2.0$) es menor a la obtenida en los cultivos controles.

1.1.2.- Morfología celular:

A partir de estos primeros resultados se realizó un estudio morfológico de las células crecidas bajo las condiciones normales y de estrés por medio de la microscopía electrónica de transmisión.

Mediante esta técnica pudimos observar que durante el crecimiento de *B. subtilis* bajo condiciones de estrés osmótico se desarrolla en este microorganismo un septo de división celular ubicado de manera asimétrica (**Figura 9**).

A



B

Septo de división asimétrico



Septo de división
asimétrico

Figura 9: Microscopía electrónica de transmisión de la cepa YB886 crecida bajo condiciones normales y de estrés osmótico. A células crecidas en medio LB (control) aumento 50.000 y B células crecidas en LB+1.5M NaCl aumento 12.000.

Si bien la formación del septo es esencial durante las primeras etapas de esporulación (como ha sido detallado en la introducción general de esta tesis) bajo las condiciones de crecimiento estudiadas el porcentaje de esporulación determinado es menor al 1% (Ruzal & Sánchez-Rivas, 1994). Este resultado estaría indicando que cuando *B. subtilis* es crecido bajo condiciones de estrés osmótico el fenómeno de esporulación es capaz de iniciarse, pero no puede completarse debido a que un/os factor/es aún no identificados, detiene/n a la célula en el estadio II de esporulación (Ruzal *et al.*, 1998)

Asimismo, se observó que el crecimiento en medios hipersalinos induce un engrosamiento de la pared celular en comparación con el control crecido en condiciones normales. Este cambio podría ser uno de los factores que impiden que el microorganismo sea infectado por bacteriófagos y que el mismo sea resistente a una serie de enzimas hidrolíticas como la lisozima.

1.2.- Caracterización de los lípidos polares presentes en *B. subtilis* crecido en altas concentraciones salinas:

A partir de las curvas de crecimiento observadas en la **Figura 8** se decidió realizar el crecimiento de *B. subtilis* en el medio LB como control y el mismo medio suplementado con 1.5M de NaCl como condición de estrés. Esta última condición es la más estricta que permite el crecimiento del microorganismo. Los cultivos se realizaron en agitación permanente a 37°C hasta que los mismos llegaban a las distintas fases de crecimiento testeadas.

1.2.1.- Caracterización de los lípidos polares de *B. subtilis*:

Durante el desarrollo de este trabajo fue necesario poner a punto la separación de los lípidos polares de *B. subtilis* utilizando distintos tipos de placas cromatográficas y distintos sistemas solventes de desarrollo. Las condiciones de separación utilizadas son las que se detallan en materiales y métodos y en el pie de la **Figura 10**. Como se observa en esta figura se logró optimizar la separación de los lípidos polares mayoritarios en *B. subtilis*. En el sistema solvente descripto los fosfolípidos, los aminolípidos y el glicolípido presentes en esta cepa se separan en su totalidad.

Los fosfolípidos presentes en esta cepa de *B. subtilis* son los mismos que han sido identificados en otras especies del género *Bacillus*: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), lisilfosfatidilglicerol (LysPG) y cardiolipina (CL). Además de estos fosfolípidos, la cepa en estudio contiene un glicolípido (diglucosildiacilglicerol) en su membrana. Estos resultados concuerdan con los publicados por Bishop y colaboradores (1967) y por Op den Kamp y colaboradores (1969) en otras cepas de esta especie. Asimismo, en esta figura se puede observar que el perfil de lípidos de las bacterias crecidas bajo condición de estrés es similar al observado en el control.

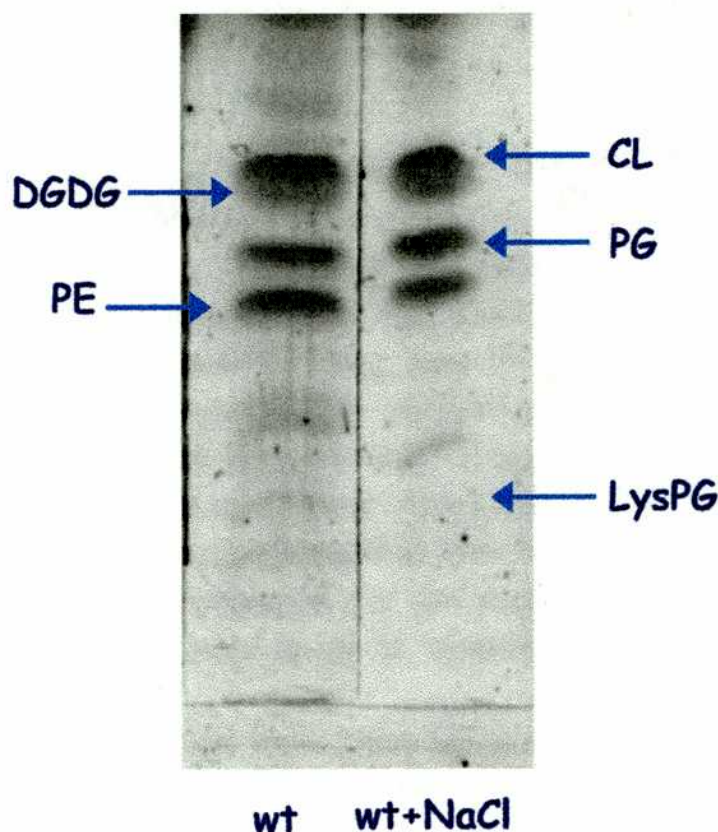


Figura 10: HPTLC: Patrón de lípidos polares. HPTLC Silicagel 60 / F₂₅₄ Merck Artículo n° 5628. Sistema solvente de desarrollo Cloroformo: Metanol: Ac. Acético (65:25:5; v:v:v). **CL:** cardiolipina, **DGDG:** diglucosildiacilglicerol, **PG:** fosfatidilglicerol, **PE:** fosfatidiletanolamina y **LysPG:** lisilfosfatidilglicerol.

wt: cepa salvaje crecida en LB (fase estacionaria).

wt+NaCl: cepa salvaje crecida en LB+1.5M NaCl (fase estacionaria).

1.2.1.1.- Cuantificación de los lípidos polares extraídos a partir de células enteras de *B. subtilis*:

Los fosfolípidos y el glicolípido se cuantificaron separando de las placas las manchas que fueron identificadas con distintas soluciones reveladoras (vapores de yodo, ninhidrina y orcinol). Las mismas fueron luego cuantificadas realizando determinaciones de fósforo y de azúcares como se detalla en Materiales y Métodos.

La composición de los lípidos polares se analizó durante la fase estacionaria, la fase exponencial y una hora después de que las células ingresaron en la fase estacionaria de crecimiento. En la **Figura 11** se pueden ver los resultados obtenidos para la cepa salvaje durante estas fases cuando las células fueron crecidas en el medio LB y en el medio hipersalino.

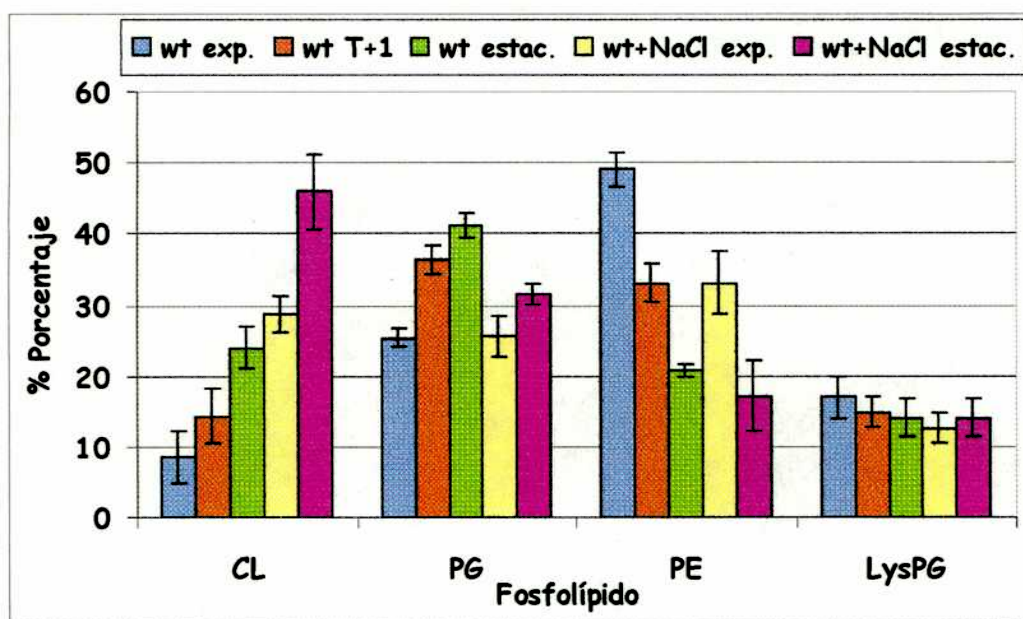


Figura 11: Composición porcentual de los fosfolípidos extraídos a partir de células enteras de *B. subtilis* en distintas fases de crecimiento crecidas en medio normal y en medio hipersalino. Los datos representan el promedio y el desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. **wt exp.:** cepa wt cosechada en la fase exponencial de crecimiento. **wt T+1:** cepa wt cosechada una hora después de que las células ingresaron a fase estacionaria. **wt estac.:** cepa wt cosechada en la fase estacionaria. **wt+NaCl exp.:** cepa wt crecida en presencia de 1.5M NaCl y cosechada en la fase exponencial. **wt+NaCl estac.:** cepa wt crecida en presencia de 1.5M NaCl y cosechada en la fase estacionaria.

Como se puede observar en esta figura existe un incremento gradual en el porcentaje de CL y de PG en la membrana de la cepa YB886 crecida bajo condiciones normales a medida que las células ingresan a la fase estacionaria de crecimiento. Por otra parte, existe una marcada disminución en el contenido de PE, probablemente debido a la variación en el metabolismo fosfolipídico que estaría favoreciendo la acumulación de fosfolípidos aniónicos (PG y CL) (*Figura 6*).

Cuando *B. subtilis* se creció bajo condiciones de hipersalinidad, se observó una importante variación en los porcentajes de CL y de PG en las fases analizadas. La CL es el fosfolípido mayoritario de la membrana celular en la fase estacionaria en el medio hipersalino. A diferencia de ello, y como fue previamente descripto, el PG es el fosfolípido mayoritario cuando la cepa es crecida en el medio LB en esta fase. La CL aumenta desde un 25% en LB a un 45% en LB+1.5M NaCl.

Del mismo modo, cuando se estudia la composición de la membrana de las células de la fase exponencial crecidas en el medio hipersalino se observa que la CL aumenta de un 8% a un 28% en respuesta al estrés. La disminución determinada en el porcentaje de PE en esta

misma fase en presencia de NaCl indicaría que el metabolismo de este fosfolípido se altera bajo las condiciones de estudio.

No se observan diferencias en el contenido de LysPG en ambas condiciones de crecimiento y en las distintas fases estudiadas. Resultados similares fueron descritos en *Staphylococcus aureus* donde se describe la estabilidad en el contenido de LysPG en las membranas celulares independientemente de las condiciones de crecimiento y del tiempo de incubación (Gould & Lennarz, 1970).

En conjunto, estos resultados estarían indicando que existe un cambio en el metabolismo del PG en *B. subtilis* como consecuencia del crecimiento hipersalino, siendo éste fosfolípido uno de los principales componentes del metabolismo lipídico de esta especie (Figura 6). Consecuentemente se produce un cambio en las proporciones de sus derivados.

1.2.1.2.- Fosfolípidos aniónicos:

Recientemente, diversos trabajos han estudiado la importancia de los lípidos aniónicos en la actividad de varias proteínas involucradas en la respuesta a estrés osmótico en distintos microorganismos: la quinasa KdpD de *E. coli* (Stallkamp *et al.*, 1999), el transportador de betaína BetP de *Corynebacterium glutamicum* (Rübenhagen *et al.*, 2000) y el transportador OpuA de *Lactococcus lactis* (van der Heide & Poolman, 2000).

Para determinar si en las condiciones de crecimiento estudiadas existen variaciones en el contenido total de fosfolípidos aniónicos, se compararon los valores obtenidos para cada fase (Tabla 5).

Cepa y condición de crecimiento	Fase de crecimiento	Σ PG + CL
wt	exponencial	33.93 $\pm$ 5.09
wt	T+1	50.64 $\pm$ 5.76
wt	estacionaria	65.28 $\pm$ 4.66
wt + NaCl	exponencial	54.34 $\pm$ 5.50
wt + NaCl	estacionaria	77.50 $\pm$ 5.71

Tabla 5: Concentración de fosfolípidos aniónicos en las membranas de *B. subtilis* crecidas a distintas fases de crecimiento en medio normal y en medio hipersalino.

Cuando se comparan los valores obtenidos en esta tabla se observa que existe una tendencia a aumentar la concentración de fosfolípidos aniónicos en *B. subtilis* a medida que las células ingresan a la fase estacionaria de crecimiento.

Estudios previos realizados en la misma cepa demostraron que su osmorresistencia depende de la fase de crecimiento (Ruzal & Sánchez-Rivas, 1994). En particular, en ese trabajo se demostró que las células que se encuentran en la fase exponencial son más sensibles a la presencia de NaCl, que las que se encuentran en la fase estacionaria.

Por otra parte, cuando se comparan los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento de ambas condiciones, se observa un aumento de 1.5 veces en los fosfolípidos aniónicos cuando las células son crecidas bajo condiciones de estrés. A diferencia de ello, durante la fase estacionaria sólo existe un aumento de 1.2 veces en dichos fosfolípidos entre ambas condiciones.

Los resultados presentados en la **Tabla 5** acerca de la composición de fosfolípidos aniónicos, estarían indicando que los mismos cumplirían un rol durante el crecimiento en alta osmolaridad en esta especie. El análisis de esta hipótesis se determinará en el capítulo 3 de esta tesis.

1.2.1.3.- Cuantificación del glicolípido:

La cuantificación del diglucosildiacildiglicerol (DGDG) presente en las condiciones de crecimiento estudiadas se muestran en la **Figura 12**.

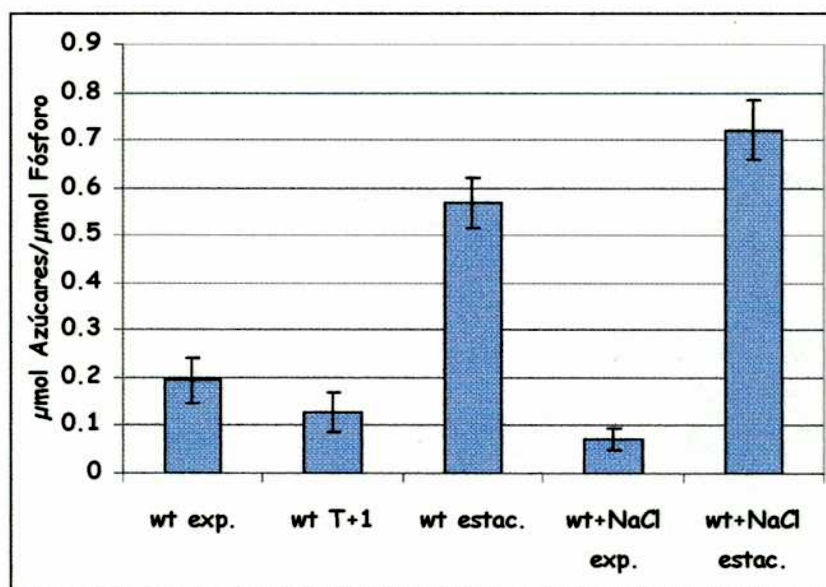


Figura 12: Relación glicolípido/fosfolípido presentes en las membranas de *B. subtilis* crecidas en medio normal y en medio hipersalino en distintas fases de crecimiento. Las referencias son las mismas que las de la **Figura 11**.

Como se puede observar en esta figura, existe una tendencia a aumentar la concentración del DGDG a medida que las células de *B. subtilis* ingresan a la fase estacionaria en condiciones normales y de hipersalinidad.

El DGDG está involucrado, al igual que el PG, en la biosíntesis de los ácidos lipoteicoicos de la pared bacteriana. Sin embargo, es el DGDG el que se encuentra comprometido en el anclaje de los mismos a la membrana y este resultado podría estar relacionado con el aumento del grosor observado en la pared celular de *B. subtilis* (**Figura 9 B**) y en la resistencia determinada a diversas enzimas hidrolíticas durante el crecimiento en hipersalinidad.

Un aumento similar en la proporción de glicolípidos ha sido descrito en las membranas de *Saccharomyces cerevisiae* crecidas bajo estrés por NaCl (Sharma *et al.*, 1996)

1.3.- Relación entre fosfolípidos y proteínas de membrana:

Para determinar si se producen variaciones en la relación entre fosfolípidos y proteínas se aislaron membranas de *B. subtilis* y se determinó el contenido de proteínas y de fósforo lipídico en las diferentes condiciones de crecimiento.

Cepa	μg Proteína / μg Fósforo Lipídico
wt	40.7 ± 10.6
wt + NaCl	30.3 ± 11.8

Tabla 6: Relaciones fósforo lipídico/proteínas de membrana. Los datos representan el promedio y el desvío estándar de cinco determinaciones independientes.

Los resultados de la **Tabla 6** indican que no se observan diferencias significativas en la relación fosfolípidos/proteínas de membrana entre wt y wt + NaCl. Sin embargo, es importante mencionar que se observan diferencias en los perfiles de las proteínas de membrana obtenidos mediante geles de poliacrilamida entre ambas condiciones de crecimiento. Recientemente, varios laboratorios han descrito que diversos genes que codifican para proteínas de membrana se inducen en diferentes condiciones de estrés. (Petersohn *et al.*, 1999, Price *et al.*, 2001).

1.4.- Acumulación de glicerol como consecuencia del cambio en el metabolismo del PG:

Como fue previamente descripto, un aumento en la osmolaridad externa del medio de cultivo en *B. subtilis* es capaz de producir instantáneamente un flujo de potasio hacia el interior celular, incrementándose la concentración citoplasmática del mismo. Puesto que concentraciones elevadas de iones pueden interferir con el metabolismo normal de las células, éstas acumulan grandes cantidades de osmolitos celulares. Estos osmolitos no interfieren con la fisiología normal del microorganismo y de esta manera las células son capaces de reducir la concentración de K^+ por exclusión del exceso del mismo.

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los fosfolípidos de *B. subtilis* crecida bajo estrés indican que existe un aumento en la concentración de cardiolipina en las membranas. Este aumento se produciría debido a que parte del PG que se encuentra en la membrana plasmática se convierte en CL con la concomitante producción de glicerol. El glicerol ha sido descripto como un osmolito compatible que es capaz de acumularse en distintos microorganismos. Con el objetivo de determinar si en las condiciones de crecimiento estudiadas *B. subtilis* es capaz de utilizar al glicerol como osmolito compatible, se determinó su concentración citoplasmática.

Cepa	$\mu\text{mol Glicerol}/ 10^3 \text{ UFC}$
wt	$9.2 \cdot 10^{-7}$
wt+NaCl	$4.5 \cdot 10^{-7}$

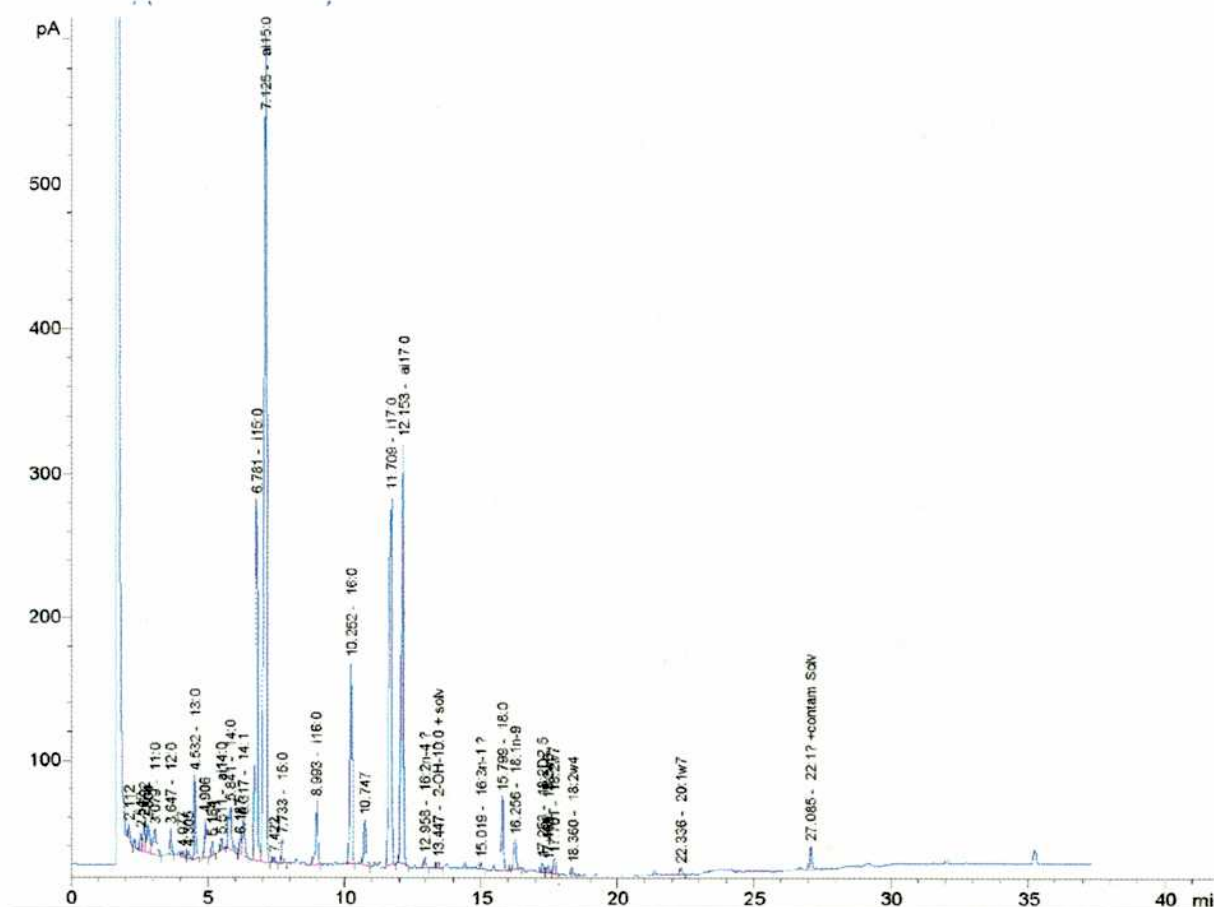
Tabla 7: Determinación de glicerol citoplasmático en la fase estacionaria de crecimiento. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Estos resultados indican que el glicerol formado a partir del PG de la membrana no es acumulado en el citoplasma bacteriano como resultado del cambio en la osmolaridad externa del medio de cultivo. Sin embargo, no se puede descartar que parte del glicerol generado como consecuencia del metabolismo del PG haya sido derivado a glicerol- 3- fosfato. Estudios realizados en células mutantes de *B. subtilis* que acumulan esta molécula poseen deficiencias en la esporulación, observándose además la presencia de septos de división asimétricos y engrosamientos de la pared celular (Oh *et al.*, 1973). Estos resultados son similares a los descriptos previamente en este capítulo.

1.5.- Composición de ácidos grasos en *B. subtilis* crecidos en altas concentraciones de NaCl:

En el género *Bacillus* los ácidos grasos ramificados son los principales constituyentes de las membranas citoplasmáticas (Kaneda, 1963; de Mendoza *et al.*, 1993). En particular los pertenecientes a las series iso y anteiso C15 y C17. El siguiente objetivo de este trabajo fue determinar si existen variaciones en la composición de ácidos grasos en respuesta a la fase de crecimiento y al estrés osmótico.

Se ensayaron cuatro técnicas diferentes para hidrolizar y metilar los ácidos grasos que se encuentran esterificando a los lípidos totales obtenidos de los diferentes cultivos estudiados. Finalmente, se optó por el método de la saponificación en KOH alcohólico seguido por la metilación en H₂SO₄-metanol, pues es el método que presenta menos impurezas en la corrida cromatográfica (ver Materiales y Métodos). En la **Figura 13** se observa el perfil característico de ácidos grasos obtenido.



Coincidentemente con los estudios realizados por otros investigadores (Kaneda, 1967), los ácidos grasos ramificados de isomería iso-C₁₅ y anteiso-C₁₅ son las especies mayoritarias cuando la cepa salvaje es crecida bajo condiciones normales y de estrés (*Figura 13* y datos no mostrados).

El reagrupamiento de los ácidos grasos de acuerdo al tipo de estructura que conforman (saturados lineales, saturados ramificados, monoinsaturados y poliinsaturados) permite comparar la contribución relativa de cada uno de éstos a la composición global de los ácidos grasos de la membrana de las muestras estudiadas (*Tabla 8*).

Ácidos Grasos	wt exp.	wt T+1	wt estac.	wt+NaCl exp.	wt+NaCl estac.
Σ Sat. lineales.	27.23 ± 7.86	15.96 ± 2.61	15.24 ± 2.15	22.20 ± 1.42	34.06 ± 5.08
Σ Sat. ramificados	61.60 ± 7.92	54.52 ± 1.48	80.59 ± 4.84	68.21 ± 2.15	48.74 ± 10.08
Σ Monoins.	8.88 ± 1.29	4.17 ± 0.98	4.84 ± 1.48	9.36 ± 0.65	14.72 ± 4.94
Σ Poliinsat.	0.54 ± 0.31	0.172 ± 0.08	1.38 ± 0.72	0.41 ± 0.08	3.52 ± 1.13
iso/anteiso	0.92	2.41	1.58	0.95	0.99

Tabla 8: Composición global porcentual de ácidos grasos presentes en las membranas de *B. subtilis* crecidas a distintas fases de crecimiento en medio normal y en medio hipersalino. Los datos representan el promedio y el desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. Sat. lineales: ácidos grasos saturados lineales; Sat. ramificados: ácidos grasos ramificados (iso y anteiso); Monoins.: ácidos grasos monoinsaturados; Poliinsat: ácidos grasos poliinsaturados. iso/anteiso: relación entre los ácidos grasos de la serie iso respecto a los anteiso.

A partir de los resultados de esta tabla, se observa que existe una dependencia en la composición de ácidos grasos en las células de *B. subtilis* con respecto a la fase de crecimiento en la que se encuentran.

En LB, a medida que las células ingresan a la fase estacionaria se produce una disminución de los ácidos grasos lineales y de los monoinsaturados y un aumento en los saturados ramificados.

Cuando se comparan los valores obtenidos en la fase exponencial de ambas condiciones de crecimiento (wt exp. y wt+NaCl exp.) se observa que no existen diferencias significativas en el porcentaje de los ácidos grasos. A diferencia de esto, en la fase estacionaria se produce un

aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados lineales y monoinsaturados y una marcada disminución en el de los ácidos grasos ramificados (en particular aquellos pertenecientes a la serie iso) en respuesta a la alta salinidad. Estos cambios podrían estar estrechamente relacionados con variaciones de fluidez al nivel de la membrana citoplasmática.

Durante el crecimiento en hiperosmolaridad en la fase exponencial sólo se producen alteraciones en el porcentaje de lípidos polares y no en el de ácidos grasos. Sin embargo, en fase estacionaria se determinó un acentuado cambio no sólo en los porcentajes de lípidos polares sino también en el de los ácidos grasos (**Figura 11** y **Tabla 8**).

En los experimentos que se detallan en el próximo capítulo se realizan los ensayos utilizando membranas y lípidos obtenidos a partir de cultivos crecidos hasta la fase estacionaria, puesto que es en este estadio donde se producen las mayores variaciones en el contenido de los distintos componentes de la membrana.

1.6.- Composición de lípidos polares y de ácidos grasos en células de *B. subtilis* sometida a un shock osmótico:

1.6.1.- Lípidos polares:

Con el propósito de observar si se producían cambios en la composición de las membranas de *B. subtilis* frente a un shock osmótico, se analizó la composición de fosfolípidos y ácidos grasos durante distintos tiempos de incubación en presencia de 1.5M de NaCl en el medio de cultivo.

En esta parte del trabajo y a diferencia a los ensayos antes mencionados, los cultivos se crecieron hasta que los mismos llegaron a fase exponencial (aproximadamente DO_{600nm} 0.8-1.0). En ese momento se agregó NaCl hasta una concentración final de 1.5M. Luego, se tomaron muestras a distintos tiempos para cuantificar los lípidos polares y los ácidos grasos a partir de "pellets" celulares.

En la **Figura 14** se observan los porcentajes de los distintos fosfolípidos obtenidos en las distintas muestras. En estos ensayos se utilizó como control a los valores obtenidos para la cepa YB886 en la fase exponencial.

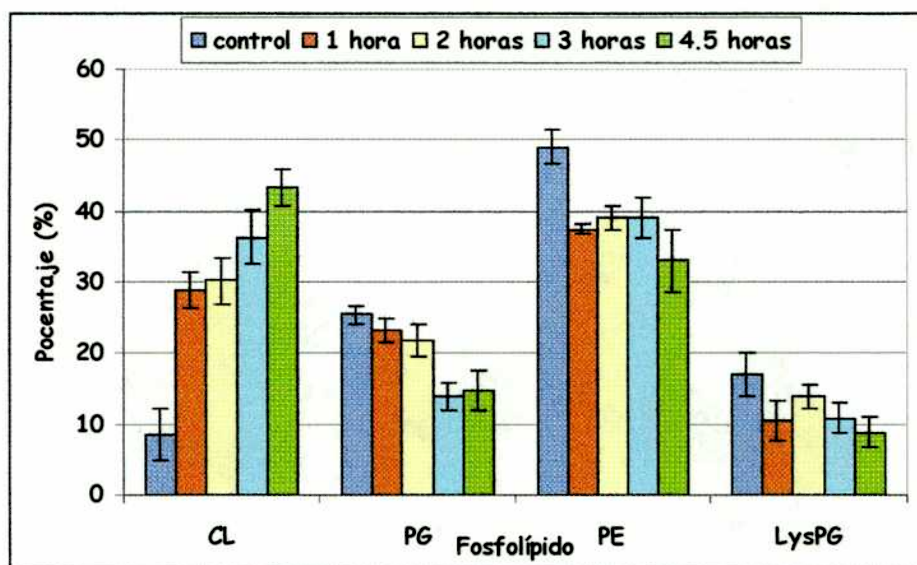


Figura 14: Composición porcentual de los fosfolípidos extraídos a partir de células enteras de *B. subtilis* sometidas a un shock osmótico durante distintos tiempos. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. **Control:** cepa YB886 crecida hasta la fase exponencial, **1, 2, 3 y 4.5 horas:** cepa YB886 crecida hasta fase exponencial y sometida durante 1, 2, 3 y 4.5 horas respectivamente a un shock osmótico con 1.5M NaCl.

El shock osmótico impuesto a las células en crecimiento dió como resultado un aumento neto en el porcentaje de CL a expensas de una disminución del PG. Estos resultados concuerdan con los mencionados en párrafos anteriores cuando los cultivos fueron crecidos desde un comienzo en LB+1.5M NaCl (*Figura 11*).

Estos resultados indicarían que una de las respuestas de las membranas de *B. subtilis* al estrés, es el cambio en la composición de fosfolípidos y en particular un aumento de CL. Además, la disminución detectada en el porcentaje de la PE posiblemente estaría relacionada con el cambio general observado en la biosíntesis de fosfolípidos. El LysPG sólo presenta diferencias significativas cuando las células se encuentran sometidas al shock osmótico por tiempos largos (4.5 horas).

La cuantificación del glicolípido (DGDG) se presenta en la **Figura 15**.

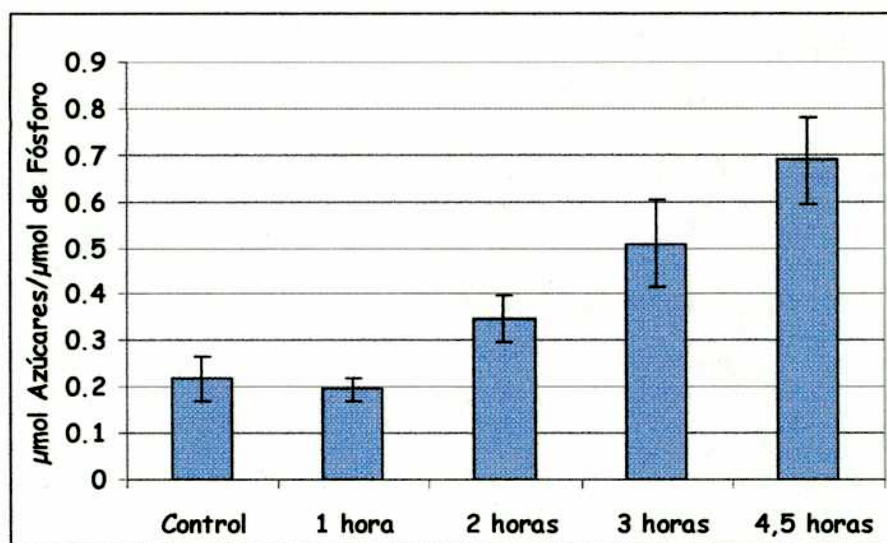


Figura 15: Relación glicolípido / fosfolípido durante el shock osmótico. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. Las referencias son las mismas que las de la Figura 14.

Se observa que existe una tendencia a aumentar la concentración del DGDG cuanto mayor es el tiempo de incubación en presencia de NaCl. El mismo tipo de resultado se obtuvo cuando las células fueron crecidas desde un principio en hipersalinidad (**Figura 12**). Aparentemente este aumento en el DGDG estaría relacionado con los cambios en la pared celular mencionados previamente.

1.6.2.- Ácidos grasos:

En la **Tabla 9** se presenta la composición de ácidos grasos durante el shock osmótico.

Ácidos Grasos	Control	1 hora	2 horas	3 horas	4.5 horas
Σ Sat.lineales	27.23 ± 7.86	54.33 ± 4.86	53.31 ± 5.56	54.48 ± 3.54	58.41 ± 7.32
Σ Sat. ramificados	61.60 ± 7.92	42.55 ± 3.54	43.18 ± 8.30	42.03 ± 4.45	38.01 ± 3.36
Σ Monoins.	8.88 ± 1.29	3.02 ± 1.05	3.4 ± 1.12	3.38 ± 1.33	3.42 ± 0.99
Σ Poliinsat.	0.54 ± 0.31	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
iso/anteiso	0.92	0.32	0.32	0.31	0.28

Tabla 9: Composición global porcentual de ácidos grasos durante el shock osmótico. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de dos determinaciones independientes. Las referencias son las mismas que se observan en la Tabla 8.

A partir de estos resultados se puede concluir que en respuesta a un shock osmótico se produce una disminución en el porcentaje de ácidos grasos ramificados y un aumento de los saturados lineales. En particular, a medida que aumentan las horas en las que las células se enfrentan al shock osmótico, disminuye la proporción de ácidos grasos ramificados pertenecientes a la serie iso. Con respecto a los ácidos grasos insaturados se observa que se produce una disminución tanto en los mono como en los poliinsaturados.

Claramente los principales cambios que se producen en las membranas de *B. subtilis* ante un shock osmótico (aumento de CL, de DGDG, de ácidos grasos lineales, y una disminución de los ramificados) se producen durante las primeras horas posteriores al mismo. Estas variaciones serían fundamentales para la adaptación de *B. subtilis* al estrés osmótico.

D.- Características físico-químicas de las bicapas lipídicas:

La bicapa lipídica que forma parte de la membrana celular constituye el elemento estructural básico de la misma. Define los límites celulares y constituye una barrera que previene el pasaje no deseado de compuestos desde y hacia el exterior celular. Esta bicapa que está compuesta por diferentes moléculas anfifílicas, presenta propiedades de permeabilidad que son cruciales para mantener una determinada composición química de iones y de moléculas orgánicas en el interior celular.

En el estudio de modelos convencionales se considera que la membrana es una estructura fluida que permite que los distintos componentes que la integran pueden movilizarse lateralmente. La fluidez de la membrana es una propiedad física que depende principalmente de dos componentes: uno dinámico, que se encuentra relacionado con la velocidad del movimiento de las moléculas que forman parte de la bicapa y otro con el estado físico en el que se encuentran los lípidos. La relación entre ambos componentes varía según las condiciones de estudio. Desde el punto de vista biológico, es fundamental para la viabilidad celular que exista un alto grado de movilidad lateral molecular en la bicapa.

Las mediciones de anisotropía y determinaciones de espectros de fluorescencia, han sido utilizadas para el estudio de los cambios físicos que se producen en las membranas. Entre las ventajas de la utilización de sondas fluorescentes se encuentran: la alta sensibilidad (los experimentos suelen ser realizados utilizando muestras diluidas), la capacidad de otorgar información sobre estructuras en sistemas de membranas modelos y biológicas o en células vivas y la posibilidad de obtener imágenes de las vesículas o membranas celulares en estudio (Bagatolli *et al.*, 2000).

La estructura de la fase lipídica, la fluidez, el grado de empaquetamiento lateral, el orden lipídico, el grado de hidratación de la interfaz, la permeabilidad específica e inespecífica y la formación de dominios de membrana, son las principales características físicas de las membranas. Las variaciones en algunas de estas propiedades dependerán de la composición lipídica y proteica presentes en la muestra en estudio. Estas propiedades pueden ser modificadas por diversos factores como la temperatura, la presencia de iones y el pH del medio en el que se encuentran las muestras. La presencia de cationes puede producir cambios en el grado de hidratación de las bicapas y, en algunos casos inducir la formación de poros sobre las mismas (Fernandez Murga *et al.*, 1999).

Una membrana biológica contiene alrededor de 10^9 moléculas de distintas especies entre las que se encuentran los lípidos neutros, fosfolípidos, polipéptidos y proteínas. El sistema en su conjunto se mantiene debido a propiedades cooperativas y colectivas que presentan las moléculas. Es decir, que los distintos componentes no pueden ser evaluados individualmente sino en su conjunto. Una consecuencia de este fenómeno cooperativo es entre otros la transición de fases.

D.1.- Transición de fases:

Durante el proceso de transición de fases existe una temperatura denominada de transición (T_m) que involucra un cambio estructural en la bicapa lipídica desde una fase gel ordenada y condensada, hacia otra líquido-cristalina más fluida y desorganizada o viceversa. Este proceso, típicamente cooperativo, ha sido estudiado experimentalmente por medio de distintas técnicas como la calorimetría, resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fluorescencia y difracción de rayos X (Mouritsen & Jorgensen, 1994).

El valor absoluto de la T_m dependerá no sólo de la cabeza polar de los fosfolípidos, sino también de la composición de ácidos grasos presentes en la bicapa. La presencia de lípidos neutros (como el colesterol) influye en el valor absoluto de la T_m . Los ácidos grasos saturados provocan un aumento en la T_m en comparación con los insaturados. Asimismo, los ácidos grasos ramificados, principales componentes de las membranas bacterianas, influyen sobre el valor absoluto de la T_m , como se ha mencionado previamente.

La caracterización física de un sistema lipídico en base a su T_m es posible solamente en sistemas puros, es decir en sistemas que contienen un solo tipo de fosfolípido, o en determinadas mezclas binarias. En mezclas más complejas como lo son las membranas biológicas, no siempre se determina una T_m definida. En distintos estudios realizados en *Micrococcus lysodeikticus* (Ashe & Steim, 1971) y en *Lactobacillus plantarum* (Linders *et al.*, 1997) se detectó una transición de fase por debajo de 0°C . Por otra parte, en *Yersinia enterocolitica* se detectó una transición de fase de -3° , -1° y de 1°C cuando el microorganismo fue crecido a 5° , 22°C y 37°C respectivamente (Abbas & Card, 1980).

D.2.- Fluidez de las membranas:

La anisotropía de fluorescencia ha sido utilizada con el propósito de determinar la fluidez de sistemas modelos de liposomas y de membranas biológicas. Esta técnica posee distintas características que han favorecido su aplicación: una base teórica simple y, principalmente su alta sensibilidad. Esta última característica permite realizar los

experimentos a partir de suspensiones diluidas de membranas las cuales contienen solamente trazas de la sonda (generalmente las relaciones entre la sonda y los lípidos son de 1/100 a 1/2000). Su utilización en soluciones diluidas se fundamenta en el alto coeficiente de extinción molar que poseen las sondas.

La anisotropía de fluorescencia es una técnica que presenta importante ventajas respecto a la resonancia magnética nuclear (RMN) y la resonancia de spin electrónico (ESR). La misma puede ser calculada sencillamente en sistemas complejos como las membranas biológicas. Además, la señal obtenida es altamente sensible, de fácil reproducibilidad y los resultados son simples de interpretar.

A lo largo de los últimos años, el DPH y el TMA-DPH han sido las sondas más utilizadas para estimar la microviscosidad de las membranas y la temperatura de transición de fases de las mismas (Lakowicz, 1999). Ambas sondas se incorporan espontáneamente en una región definida de la bicapa lipídica. La anisotropía de fluorescencia característica de cada sonda estará directamente relacionada con la microviscosidad de la región en la que se ubica. En estado gel el DPH se localiza paralelo a las cadenas parafínicas de los lípidos, mientras que en estado líquido-cristalino puede adoptar varias orientaciones. La localización del TMA-DPH esta determinada por la ubicación de su cabeza polar que normalmente se encuentra en la interfaz lípido/agua.

D.3.- Empaquetamiento lateral de lípidos:

El grado de empaquetamiento lipídico depende del orden de las cadenas parafínicas. Cuando las cadenas se encuentran rígidamente ordenadas, los grupos polares están más próximos entre sí. Esto permite que un menor número de moléculas de solvente sean capaces de penetrar en la bicapa (Harris *et al.*, 2002). Los cambios en el orden de los fosfolípidos no debe confundirse con el denominado “parámetro de orden” calculado a partir del decaimiento del valor absoluto de la anisotropía resuelta en el tiempo, la cual se refiere específicamente al movimiento de las sondas fluorescentes en la bicapa (Lakowicz, 1999).

El Laurdan es una sonda de gran utilidad en estos estudios debido a que es altamente sensible a la presencia y a la movilidad de los dipolos del solvente que la rodean. Además, puesto que la presencia y la movilidad de las moléculas de agua presentes en la bicapa dependen del movimiento de los lípidos, el Laurdan puede ser utilizado para estudiar cambios de fases en membranas (Parasassi & Gratton, 1995).

El Laurdan se ubica en la interfaz hidrofílica-hidrofóbica de la bicapa y tiene la propiedad de presentar diferentes espectros de excitación y de emisión según la fase lipídica,

dando información sobre la fase gel y la fase líquido-cristalina (Parasassi & Gratton, 1995). La polarización generalizada (GP, parámetro de fluorescencia al estado estacionario) relaciona estos cambios espectrales. El parámetro de la GP de excitación (GP_{exc}) es sensible a la dinámica del estado excitado de la sonda y es opuesto al parámetro de la GP de emisión (GP_{em}) que detecta conformaciones del estado basal de la misma (Bagatolli *et al.*, 1999). Aparentemente, los cambios observados en estos parámetros representan la diferencia en el contenido y en el grado de movilidad de las moléculas de agua que se encuentran al nivel del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos. Por lo tanto, el efecto de moléculas polares que se encuentren rodeando a la sonda podría ser influenciado por la penetración de agua a través de los grupos polares de los fosfolípidos presentes en la membrana.

D.4.- Estabilidad de las bicapas lipídicas:

La mayor parte del conocimiento actual acerca de la estabilidad, composición, estructura y función de las membranas biológicas se ha logrado estudiando la formación de suspensiones isotrópicas termodinámicamente estables (micelas mixtas), formadas entre las distintas especies químicas que componen a las membranas y distintos detergentes (Lichtenberg, 1985). Sin embargo, a pesar del uso extensivo de esta técnica se conoce muy poco acerca del mecanismo de solubilización propiamente dicho. Se ha descrito que dicho proceso depende de varios factores físico-químicos característicos de las bicapas, como: el grado de empaquetamiento de los lípidos, el estado de fase de las bicapas, la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos de la muestra en estudio, la presencia de proteínas, la composición iónica del medio utilizado y la naturaleza del detergente (Hoyrup *et al.*, 2001).

Se denomina “solubilización” a la transformación que se produce desde las estructuras lamelares de la bicapa a estructuras micelares. Esta definición no es trivial puesto que la disrupción de estructuras lamelares por la acción de detergentes involucra diversos estadios. La mayoría de los estudios realizados sobre la estabilidad de las bicapas lipídicas en presencia de detergentes, han sido realizados utilizando lípidos puros o mezclas binarias, ya que estos sistemas representan un modelo de solubilización de membranas celulares (López O. *et al.*, 1998).

Los distintos estadios que involucran este proceso se pueden resumir de la siguiente manera:

- Estadio 1: Producido durante los primeros agregados de detergente sobre la bicapa. En este estadio López O. y colaboradores (1998) describieron que el agregado de bajas concentraciones de detergente (menores a la concentración micelar crítica, CMC) provoca un

leve aumento en el tamaño de los liposomas debido a que el detergente se particiona en la bicapa.

- Estadio 2: Aumentos de la concentración del detergente en la solución inducen la formación de micelas mixtas. Es decir que aparecen fenómenos de coexistencia de estructuras lamelares y micelares en la suspensión. En este estadio, las membranas se encuentran saturadas con moléculas de detergente. En las micelas mixtas detergente-lípido-proteína, las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana se encuentran rodeadas por las micelas del lípido y del detergente.

- Estadio 3: En este estadio se observa la coexistencia de micelas mixtas, fragmentos de vesículas y agregados intermedios.

- Estadio 4: Se produce la solubilización total de los liposomas o membranas con la consecuente formación de micelas mixtas. Estas micelas estarían formadas por lípidos, detergentes y proteínas (usualmente una molécula proteica por micela) (Calbiochem, 1997).

En la **Figura 16** se esquematiza el proceso de solubilización sobre una membrana biológica debida a la acción de detergentes.

Estos cuatro estadios han sido confirmados por experimentos realizados en distintos laboratorios mediante ensayos de turbidez determinados por el método dinámico de dispersión luminosa ("dynamic light scattering"), por espectroscopia de fluorescencia y por microscopia electrónica de criofractura (Lichtenberg, 1985, López O. *et al.*, 1998, Domecq *et al.*, 2001).

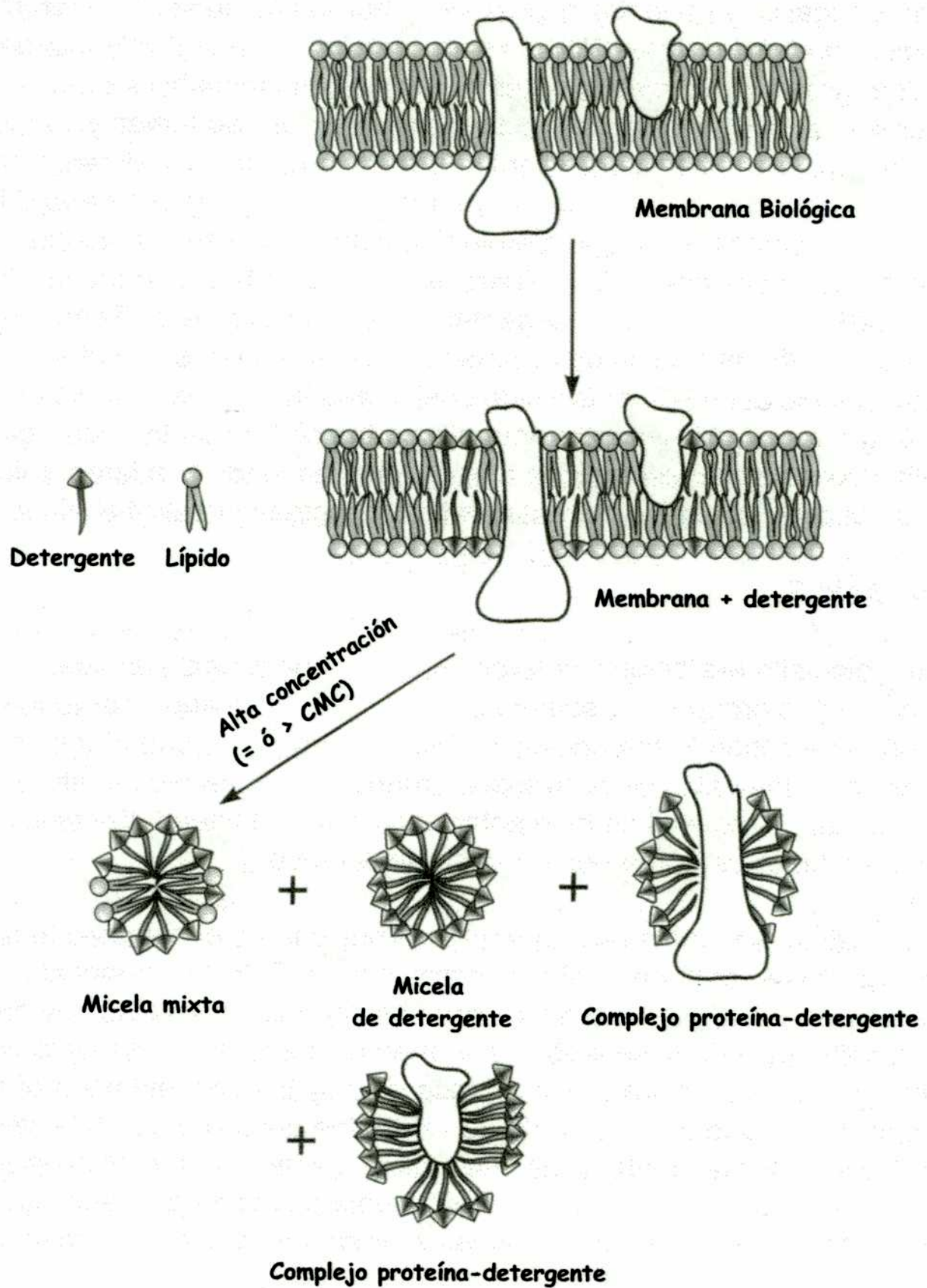


Figura 16: Solubilización de una membrana biológica. CMC: concentración micelar crítica

D.5.- Formación de dominios lipídicos:

Las propiedades dinámicas de los lípidos en las membranas biológicas han recibido una gran atención desde que el modelo de “mosaico fluido” fue propuesto por Singer y Nicholson (1972). Siguiendo este modelo, se postuló que las membranas biológicas poseen propiedades físicas homogéneas, denominadas estados de fase homogéneamente fluidos. Sin embargo, años más tarde comenzaron a tener relevancia estudios acerca de la capacidad de modular la fluidez de la membrana debido a la separación de dominios conteniendo lípidos agrupados en distintas fases. En particular, ahora se sabe que las propiedades dinámicas de las bicapas pueden afectar el funcionamiento de las proteínas y la difusión de las moléculas a través de las membranas (Parasassi *et al.*, 1993). Además, existen evidencias de que la organización lateral de la bicapa lipídica no es azarosa u homogénea sino que está estructurada en términos de dominios lipídicos (Mouritsen & Jorgensen, 1994).

La formación de dominios es un fenómeno dinámico que puede ser caracterizado como un tipo de separación de fases a nanoescala. La amplia escala de tamaños en los cuales persisten estos dominios varía desde nanómetros hasta el tamaño de una célula (Rodgers & Glaser, 1991). El tamaño promedio y la escala temporal en la cual se forman los dominios lipídicos está fuertemente relacionada con la composición del sistema en estudio, la temperatura y la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Edidin, 1997).

En las membranas biológicas, la generación de dominios trae aparejada la formación de sectores de la bicapa enriquecidos en determinados fosfolípidos. Esta separación ocurriría como resultado de una pérdida de miscibilidad entre los lípidos.

Diversos resultados obtenidos en estudios experimentales y teóricos demostraron que los dominios lipídicos a pequeña escala (denominados “rafts”), poseen un rol importante como unidades regulatorias de una gran variedad de funciones biológicas que tienen lugar en o están asociadas a membranas. Se ha determinado que la heterogeneidad de la bicapa lipídica y la formación de micro-dominios son importantes para la actividad de diversas enzimas y proteínas asociadas a la membrana como la fosfolipasa A2 y citocromo *c* (Kaasgaard *et al.*, 2002). Recientemente, se ha demostrado la heterogeneidad de la distribución de fosfolípidos en las membranas de micobacterias (Christensen *et al.*, 1999) y de *E. coli* (Mileykovskaya & Dowhan, 2000) mediante microscopía de fluorescencia.

2.- Espectroscopía de fluorescencia de membranas y liposomas de la cepa YB886 de *Bacillus subtilis* crecida bajo condiciones normales y de estrés osmótico.

Como se ha descrito, *B. subtilis* responde al aumento en la osmolaridad del medio de cultivo mediante cambios en la composición de su membrana citoplasmática. Entre dichos cambios se encuentran las variaciones en la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos.

Estudios físico-químicos realizados en células de *E. coli* crecidas bajo condiciones de estrés térmico han demostrado que el mecanismo de adaptación no produce cambios en la fluidez de las membranas a pesar de las variaciones que se producen en la composición de la misma. A partir de estos resultados Sinensky denominó a este proceso “adaptación homeoviscosa” (Sinensky, 1974). Sin embargo, en el mismo tipo de experimentos realizados sobre *B. subtilis* se encontró que la fluidez de las membranas aumentaba en forma lineal con la temperatura de crecimiento y que por el contrario a lo observado en *E. coli*, la fluidez no se mantiene constante (Reizer *et al.*, 1985). Esto llevó a Sinensky y Cossins a modificar el concepto original de adaptación homeoviscosa por el de “eficacia homeoviscosa” (Cossins & Sinensky, 1984)

2.1.- Anisotropía del DPH y TMA-DPH:

Con el propósito de comprobar si en las células de *B. subtilis* se aplica el concepto de adaptación “eficacia homeoviscosa” en respuesta a estrés osmótico, se procedió a caracterizar físico-químicamente las membranas y los liposomas de la cepa de *B. subtilis* YB886.

Los experimentos se realizaron sobre liposomas unilamelares contruídos a partir de lípidos totales y de lípidos polares.

2.1.1.- Anisotropía del DPH y del TMA-DPH: estado estacionario:

Durante el estudio de la adaptación de *B. subtilis* al estrés osmótico se investigó si las variaciones observadas en la composición de la membrana, producían cambios en la microviscosidad de las mismas. Con este propósito se utilizó un par de sondas fluorescentes (DPH y TMA-DPH) las cuales poseen características espectroscópicas similares, pero se ubican en distintas zonas de la bicapa lipídica.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia al estado estacionario (r_s) se realizaron utilizando las sondas DPH y TMA-DPH. Las sondas se encuentran extremadamente diluidas

en el medio para evitar que se produzcan alteraciones en las bicapas durante la determinación experimental (ver Materiales y Métodos). Este tipo de mediciones en estado estacionario, permite determinar si existen variaciones en el orden lipídico de las muestras estudiadas. El comportamiento termotrópico de las membranas y de ambos tipos de liposomas fue determinado en un intervalo de temperatura entre 2° y 65°C.

En las *Figuras 17 y 18* se puede observar que el incremento de la temperatura produce una disminución gradual de la anisotropía (r_s) del DPH y del TMA-DPH en las membranas y en los liposomas de ambas muestras.

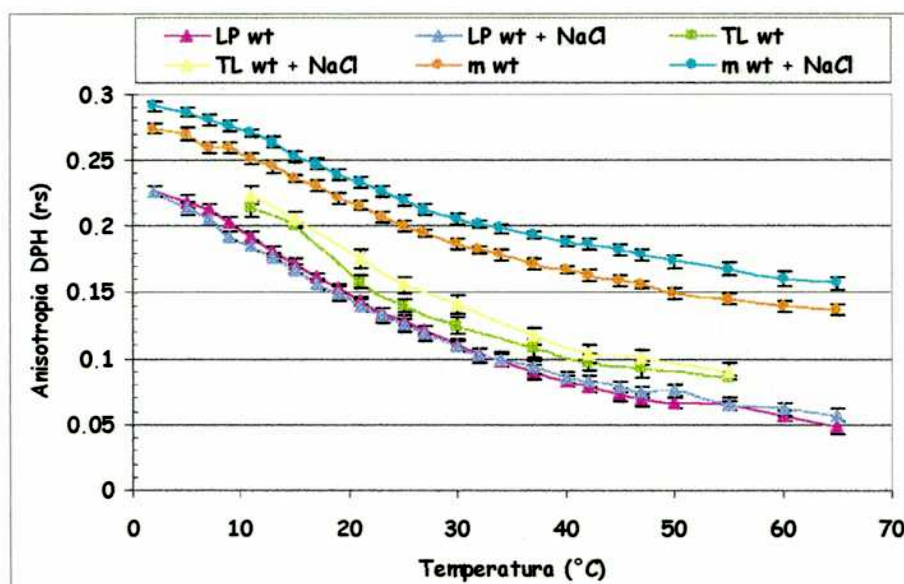


Figura 17: Anisotropía del DPH medida en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. **LP:** lípidos polares, **TL:** lípidos totales, **m:** membranas aisladas.

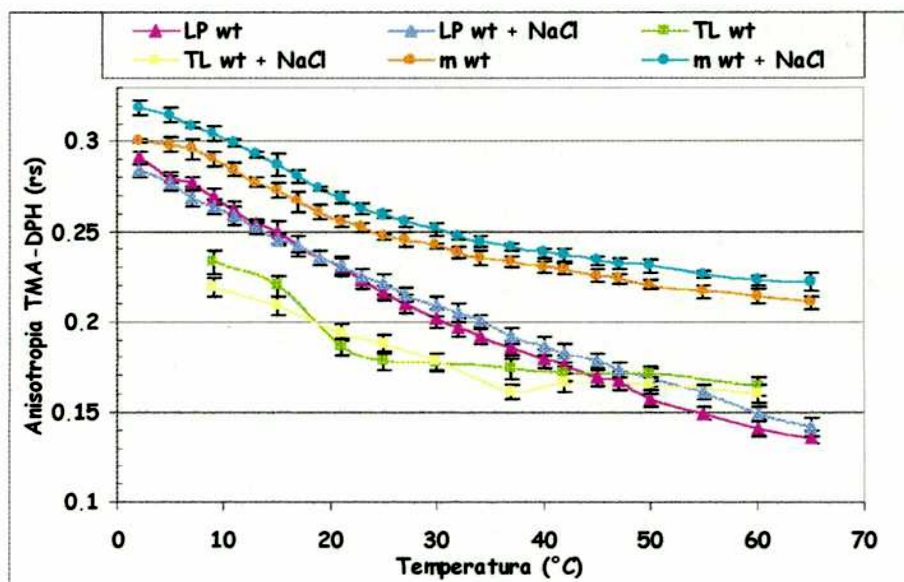


Figura 18: Anisotropía del TMA-DPH medida en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. LP: lípidos polares, TL: lípidos totales, m: membranas aisladas.

En las figuras no se observan diferencias significativas entre los liposomas contruídos a partir de los lípidos polares de ambas muestras ni con el DPH ni con el TMA-DPH en el rango de temperaturas estudiado. Asimismo, se puede observar que la anisotropía del TMA-DPH es mayor que la del DPH indicando que la primer sonda se encuentra ubicada en un ambiente de mayor microviscosidad.

El incremento de la temperatura produjo sobre los liposomas de lípidos polares una disminución gradual en la r_s del DPH de 0.226 a 0.048 para el control (wt) y de 0.227 a 0.057 para la cepa crecida bajo estrés (wt+NaCl). Para el TMA-DPH la disminución fue de 0.291 a 0.136 para wt y de 0.284 a 0.142 para wt+NaCl. En ninguno de los casos se observó un cambio brusco en las pendientes de las curvas indicando una ausencia de transición termotrópica de fases.

El cambio de la temperatura produjo también una disminución gradual en la r_s del DPH sobre los liposomas de lípidos totales de 0.214 a 0.086 para el control y de 0.224 a 0.090 para wt+NaCl. Para la sonda TMA-DPH la disminución fue de 0.233 a 0.164 para wt y de 0.219 a 0.160 para wt+NaCl. Al igual que en el caso de los lípidos polares no se observó un cambio brusco en las pendientes de las curvas descartando de esta manera una transición de fases.

El DPH estaría ubicado en estos liposomas en un ambiente más rígido en comparación con los liposomas de lípidos polares, los cuales poseen menores valores absolutos de r_s . Por otra parte, a temperaturas entre 10° y 40°C el microambiente que rodea a las moléculas del

TMA-DPH parecería estar menos ordenado en los liposomas de lípidos totales que en el de los lípidos polares. Sin embargo, a altas temperaturas, el microambiente alrededor del TMA-DPH se encontraría más empaquetado en los lípidos totales que en los polares, ya que el valor de la r_s se mantiene sin cambios en función de la temperatura.

Las **Figuras 17 y 18** muestran que existen diferencias significativas entre las membranas aisladas de ambas muestras tanto para el DPH como para el TMA-DPH. Las membranas de wt+NaCl son las que poseen mayores valores absolutos de r_s . Asimismo, al igual que con los resultados obtenidos en los liposomas, se observa que la sonda TMA-DPH se encuentra ubicada en un ambiente de mayor microviscosidad.

El incremento de la temperatura produjo un descenso gradual en los valores del r_s de las dos sondas en ambas membranas. En el caso del DPH de 0.274 a 0.137 para wt y de 0.291 a 0.157 para wt+NaCl. En el caso de TMA-DPH los valores fueron de 0.300 a 0.211 para wt y de 0.319 a 0.222 para las membranas de wt+NaCl.

El efecto de las proteínas de membrana sobre la microviscosidad de las bicapas queda en evidencia al comparar ambas figuras, ya que los valores de r_s obtenidos para las membranas del control y de la cepa crecida bajo estrés osmótico, son mayores que los obtenidos para los respectivos liposomas en todo el rango de temperaturas estudiado. El mismo tipo de resultados fué descrito en *B. stearothermophilus* (Reizer *et al.*, 1985). Estas diferencias en los valores absolutos podrían ser atribuidos a la adaptación fisiológica de la fluidez de las membranas al estrés osmótico.

En conjunto, estos resultados indicarían que bajo las condiciones de crecimiento hiperosmótico existe un aumento de la microviscosidad de las membranas en *B. subtilis*.

2.1.2.- Determinación de parámetros dinámicos del DPH y del TMA-DPH:

Puesto que desde el punto de vista teórico se sabe que la anisotropía determinada al estado estacionario (r_s) depende de la velocidad y del modo de rotación de la sonda y del tiempo de vida de la misma (Lakowicz, 1999), se procedió a determinar dichos parámetros en las muestras en estudio.

En la **Tabla 10** se observan los resultados obtenidos al estudiar el comportamiento de ambas sondas desde el punto de vista dinámico. En la misma se muestran los valores determinados para wt y wt+NaCl de la anisotropía límite (r_∞), del tiempo de correlación rotacional (τ_R) y de los tiempos de vida obtenidos por demodulación (τ_M) y por cambio de fase (τ_P).

La anisotropía límite es un parámetro relacionado con el orden de la bicapa lipídica, mientras que el tiempo de vida es indicativo de la polaridad del entorno de las sondas.

Muestra	Cepa y condición de crecimiento	Sonda	τ_P (nseg.)	τ_M (nseg.)	τ_R (nseg.)	r_∞
Lípidos Totales.	wt LB	DPH	4.9 ± 0.5	5.9 ± 0.4	1.5 ± 0.1	0.020 ± 0.004
	wt + NaCl	DPH	4.7 ± 0.8	5.7 ± 0.7	1.5 ± 0.2	0.016 ± 0.005
	wt LB	TMA-DPH	2.3 ± 0.1	2.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.083 ± 0.021
	wt + NaCl	TMA-DPH	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.114 ± 0.020
Lípidos Polares.	wt LB	DPH	5.8 ± 0.1	6.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.048 ± 0.007
	wt + NaCl	DPH	5.8 ± 0.1	6.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.021 ± 0.008
	wt LB	TMA-DPH	2.3 ± 0.1	2.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.082 ± 0.010
	wt + NaCl	TMA-DPH	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.114 ± 0.008
Membranas	wt LB	DPH	5.0 ± 0.1	5.9 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.093 ± 0.012
	wt + NaCl	DPH	5.4 ± 0.1	6.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.140 ± 0.010
	wt LB	TMA-DPH	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.7	0.9 ± 0.5	0.176 ± 0.035
	wt + NaCl	TMA-DPH	3.2 ± 0.1	3.7 ± 0.7	0.9 ± 0.5	0.190 ± 0.027

Tabla 10: Tiempos de vida y comportamiento rotacional del DPH y TMA-DPH. Las mediciones se realizaron a 37°C (temperatura de crecimiento). En la tabla se indica el promedio de tres determinaciones independientes obtenidas utilizando la longitud de onda de excitación modulada a 18 y 30 MHz. nseg: nanosegundos

No se observan diferencias significativas en el tiempo de vida del DPH y del TMA-DPH en ambos tipos de liposomas de cada muestra y tampoco entre las distintas condiciones de crecimiento (wt y wt+NaCl). No obstante, en todas las muestras los valores obtenidos para el τ_M fueron mayores a los obtenidos para el τ_P . Esto indicaría que existe heterogeneidad en la emisión de fluorescencia de ambas sondas, que podría ser atribuido a la presencia de subpoblaciones de sonda que se encontrarían ubicadas en microambientes con polaridades diferentes.

Por otra parte, los valores del τ_P obtenidos para las membranas aumentan en la muestra de la cepa crecida bajo condiciones de estrés. Este aumento determinado en el tiempo de vida de las sondas indicaría que existe una disminución en el grado de hidratación a nivel de la interfaz lipido-proteína (medido por el TMA-DPH) y en la zona más profunda de la bicapa (medido por el DPH).

La velocidad de rotación de estas sondas no cambia en función de la condición de crecimiento con excepción del DPH embebido en las membranas aisladas, en las cuales la sonda aparentemente rotaría en forma más lenta en wt+NaCl. Estos resultados estarían relacionados con el aumento en el grado de empaquetamiento de las membranas observado cuando las células son crecidas bajo condiciones de estrés osmótico (ver **Figuras 17 y 18**).

La anisotropía límite medida sobre los liposomas de lípidos totales no fue afectada por las condiciones de cultivo. En el caso de los liposomas de lípidos polares se observa que existe una disminución en el r_{∞} del DPH y un leve aumento en el del TMA-DPH debido a la condición de crecimiento (wt+NaCl). Estos resultados indicarían que el crecimiento en NaCl daría lugar a una diferencia en el orden de los lípidos entre las zonas externas e interna de la bicapa en los liposomas de lípidos polares.

Estos resultados son opuestos a los obtenidos en las membranas en las cuales el r_{∞} , aumenta principalmente en la región sensada por el DPH.

En resumen, los altos valores de polarización y de r_{∞} observados en las membranas de wt+NaCl indicarían que el movimiento de las moléculas de la sonda serían más estrictos, y por lo tanto se podría asumir que existe un aumento en el orden de los lípidos, especialmente en la zona más profunda de la bicapa (sensada por el DPH) y una disminución en el grado de hidratación de la misma.

2.1.3.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario del DPH durante el shock osmótico:

Para determinar si el cambio en el empaquetamiento de los lípidos se produce rápidamente en el microorganismo se hicieron estudios de estado estacionario con DPH en membranas de células sometidas a un shock osmótico durante 3 horas.

Las células fueron crecidas en el medio LB hasta que llegaron a una densidad óptica (600nm) de 0.8-1.0 (fase exponencial de crecimiento). Se centrifugaron y luego se resuspendieron en el medio LB suplementado con NaCl 1.5M dejándolas crecer durante 3 horas.

Los resultados que se muestran en la **Figura 19** claramente indican que una vez que las células fueron enfrentadas al shock osmótico se producen cambios en el empaquetamiento de los lípidos estando éstos en un estado de menor fluidez respecto al control.

Cabe destacar que los cambios de lípidos y ácidos grasos observados en esta condición de crecimiento son similares a los obtenidos en la cepa crecida desde el principio en 1.5M de NaCl (ver resultados del Capítulo 1).

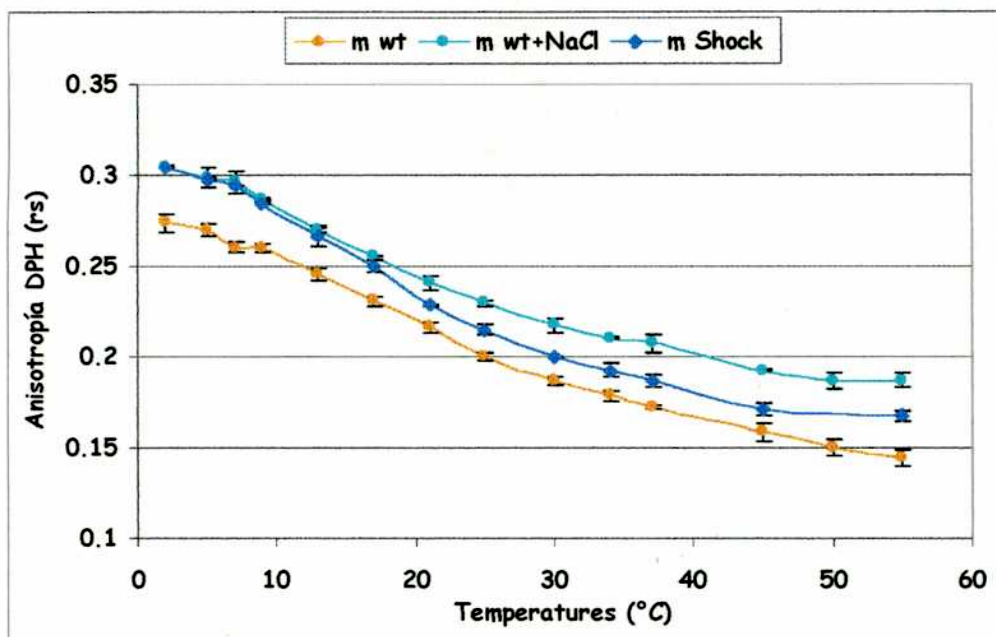


Figura 19: Anisotropía del DPH en función de la temperatura. Los datos representan el promedio y el desvío estándar de al menos tres determinaciones independientes. m: membranas aisladas.

2.1.4.- Anisotropía de fluorescencia al estado estacionario del DPH medido sobre células enteras:

Se intentaron marcar células enteras con la sonda DPH con el propósito de determinar la anisotropía al estado estacionario de la sonda sobre células enteras. Svobodová & Svoboda (1988) demostraron que los valores de anisotropía de las células de *B. subtilis* marcadas *in vivo* era diferente de las obtenidas en membranas y en liposomas de lípidos totales.

Previamente al marcado se determinó la toxicidad del DPH sobre los cultivos en crecimiento. Para ello se hicieron curvas de crecimiento y se controló la densidad óptica alcanzada por los cultivos en presencia de la sonda. De esta manera se determinó que la sonda no presenta toxicidad sobre las células a concentraciones menores de 6μM ya que no se observan diferencias significativas entre las curvas de crecimiento obtenidas utilizando el medio de cultivo con y sin DPH (no se muestran estos resultados).

La sonda se agregó al medio de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento para asegurar que la misma sea incorporada en las membranas de las células en división. Para la puesta a punto de estos ensayos se determinó la anisotropía del DPH a distintos tiempos de

incubación. En la **Figura 20** se observan los parámetros de r_s determinados a distintos tiempos de incubación de las células en presencia de DPH.

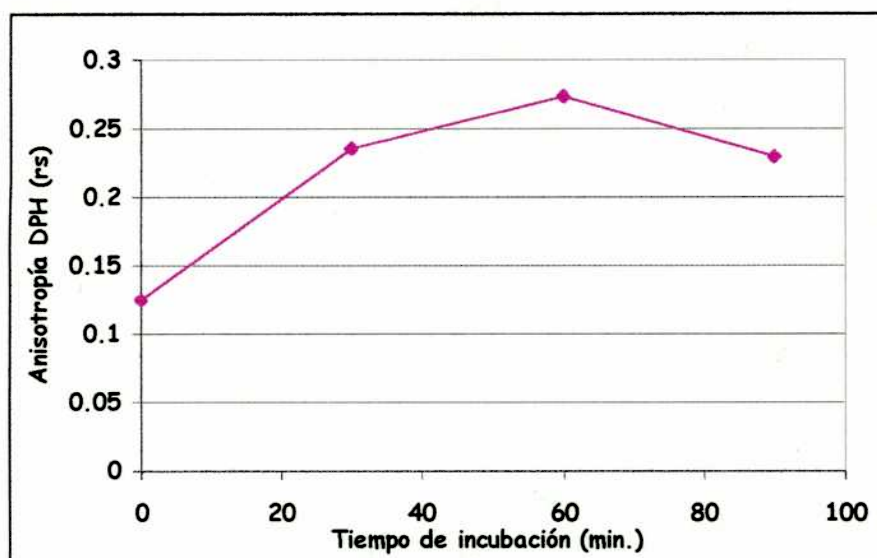


Figura 20: Anisotropía del DPH en células enteras crecidas en LB suplementado con $6\mu\text{M}$ de DPH medida a distintos tiempos de incubación. Los valores corresponden a un experimento representativo de los ensayos realizados.

Los resultados indican que la r_s del DPH varía significativamente en función del tiempo de incubación de las células en presencia de la sonda. Si bien es altamente probable que la misma sea metabolizada por el microorganismo, esto no explicaría las diferencias observadas en la anisotropía del DPH. Lo que podría estar ocurriendo en estos ensayos es que a tiempos cortos de incubación existiría una población de la sonda incorporada en la pared bacteriana dando menores valores absolutos de anisotropía. Por otra parte, a tiempos más largos de incubación existiría una mezcla de poblaciones de sonda incorporadas tanto en la pared como en la membrana. Teniendo en cuenta estos resultados es imposible distinguir los valores de anisotropía obtenidos de la población de sonda presente únicamente en la membrana.

La reproducción de estos ensayos fue dificultosa y por ello finalmente se decidió estudiar la anisotropía de las distintas sondas fluorescentes utilizando membranas aisladas como fue descripto previamente. Si bien lo ideal hubiese sido marcar protoplastos obtenidos a partir de las células crecidas en los distintos medios de cultivo, la formación de los mismos traía aparejado un cambio muy importante a nivel de la composición de los fosfolípidos y de los ácidos grasos (no se muestran estos experimentos) haciendo más complicada aún la interpretación de dichos resultados.

2.2.- Propiedades de la interfaz lípido/agua:

El Laurdan es una sonda que se ubica en la interfaz hidrofílica-hidrofóbica de las bicapas lipídicas y tiene la ventaja de exhibir características particulares en sus espectros de emisión y de excitación dependiendo de la fase lipídica (Parasassi *et al.*, 1994). En una bicapa lipídica, la emisión de fluorescencia del Laurdan depende principalmente del empaquetamiento de los lípidos, el cual afecta la cantidad y movilidad del agua de hidratación de la interfaz modificando por consiguiente la tasa de relajación bipolar.

Si bien el espectro de excitación del Laurdan también es sensible a la fase en la que se encuentran los lípidos, su dependencia con el empaquetamiento aún no es clara. Ha sido descrito que dicho espectro se encuentra influenciado por la capacidad que poseen los lípidos de establecer interacciones bipolares con moléculas de Laurdan no excitadas (Bagatolli *et al.*, 1999).

Los corrimientos que se producen en los espectros del Laurdan, debido a diversos factores, se cuantifican comúnmente con lo que se denomina polarización generalizada (GP). La GP es una medición del estado estacionario de la sonda Laurdan y en particular la GP obtenida a partir de los espectros de emisión (GP_{exc}) da información sobre los cambios espectrales obtenidos durante la emisión de fluorescencia de la sonda y es indicativa de la relajación bipolar y del empaquetamiento de los lípidos. Asimismo, la GP ha sido ampliamente utilizada para determinar la coexistencia de fases (gel y líquido cristalina) en las bicapas lipídicas (Parasassi *et al.*, 1993).

El espectro de excitación y de emisión del Laurdan y la dependencia de los parámetros de excitación (GP_{exc}) y de emisión (GP_{em}) en función de la longitud de onda fueron medidos a cuatro temperaturas diferentes (10°, 25°, 37° y 50°C) en liposomas contruidos a partir de lípidos totales y lípidos polares y en membranas aisladas de la cepa salvaje crecida bajo condiciones normales (wt) y de estrés osmótico (wt+NaCl). El objetivo de estos ensayos fue el de determinar si los cambios producidos en la composición de la membrana de *B. subtilis* provocan cambios en el comportamiento de fase, la hidratación y el grado de empaquetamiento lateral de los lípidos.

2.2.1.- Propiedades de la interfaz, en liposomas contruidos a partir de lípidos polares:

Los espectros de emisión del Laurdan obtenidos con los liposomas de lípidos polares de wt y wt+NaCl presentan predominantemente una banda azul a ~ 430nm, siendo dicha banda característica de bicapas lipídicas que se encuentran en fase gel o líquido ordenada (**Figura**

21). El mismo tipo de resultados se obtienen cuando se estudian membranas ricas en colesterol. También se observa una banda roja en el espectro de excitación a 380 nm y una disminución en la intensidad de dicha banda a medida que aumenta la temperatura de incubación. Resultados similares fueron descritos por Nichols y colaboradores (2000) en el microorganismo *Shewanella gelidimarina* crecido bajo condiciones de estrés salino y de temperatura. Esta dependencia de la intensidad de la banda roja del espectro de excitación observada en función de la temperatura de incubación podría atribuirse a diferencias en el grado de empaquetamiento de los lípidos y/o a la polaridad del entorno del Laurdan. El mismo tipo de fenómeno ha sido descrito en experimentos realizados utilizando sistemas modelos de liposomas (Parasassi & Gratton 1995).

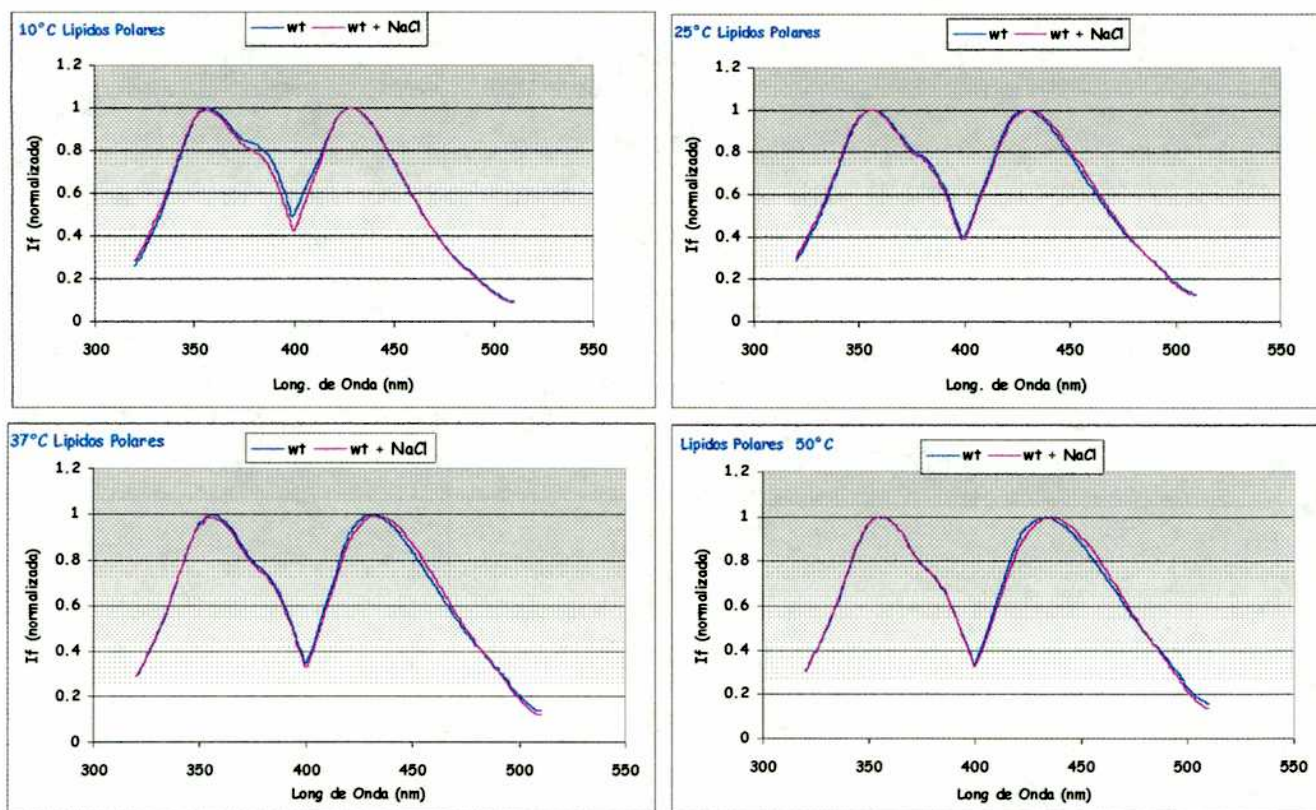


Figura 21: Espectros de emisión y excitación del Laurdan obtenido a partir de liposomas de lípidos polares medidos a distintas temperaturas. Los espectros que se muestran son un experimento representativo de los ensayos realizados. If (normalizada): intensidad de fluorescencia normalizada.

El parámetro de GP se determinó en función de la longitud de onda para determinar si se producen variaciones en la relajación bipolar y en el empaquetamiento de los lípidos polares debido a la condición de crecimiento. Los valores de GP_{exc} y GP_{em} obtenidos en los liposomas de lípidos polares se muestran en la **Figura 22**.

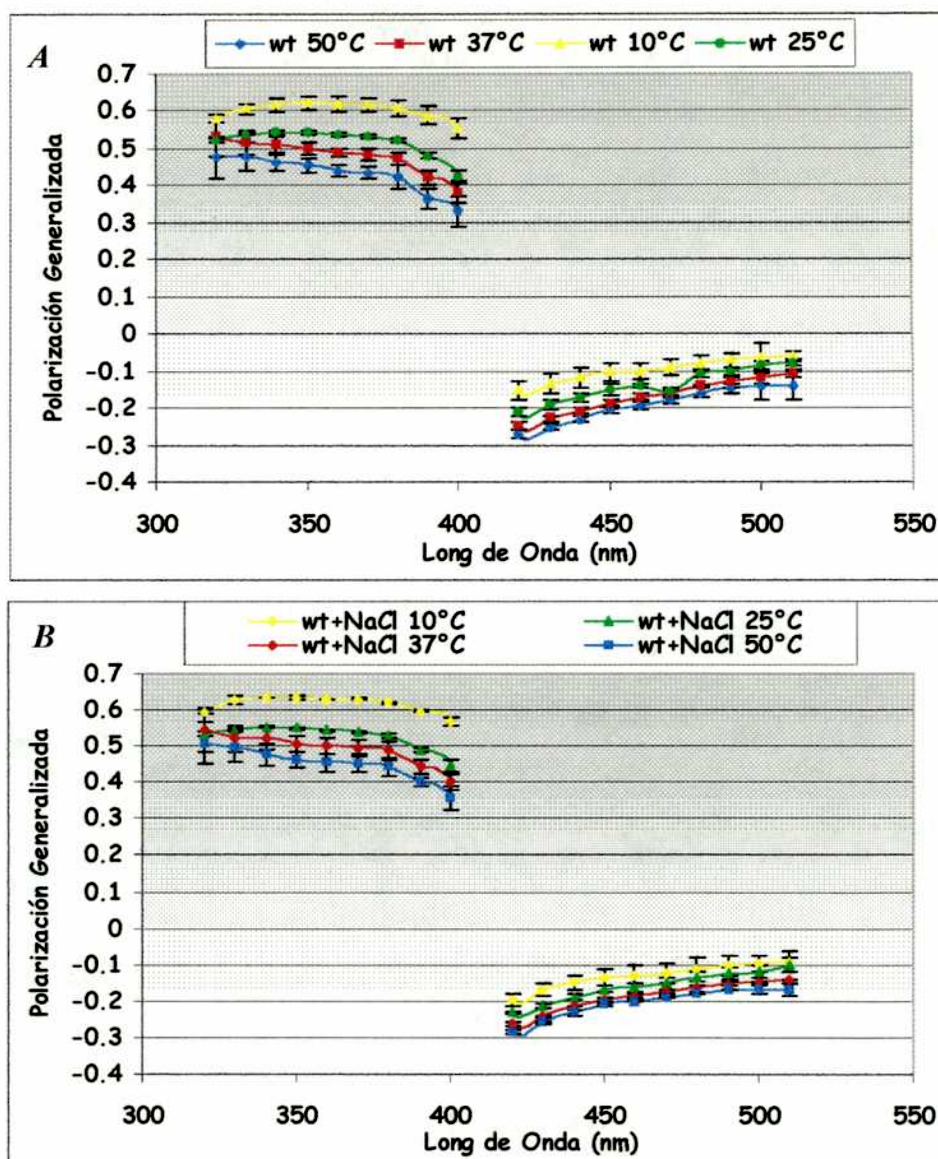


Figura 22: Polarización generalizada del Laurdan medida sobre liposomas de lípidos polares a distintas temperaturas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes medidos sobre liposomas unilamelares construidos a partir de lípidos polares. **A:** liposomas de la cepa wt crecida bajo condiciones normales. **B:** liposomas de la cepa wt crecida bajo condiciones de estrés osmótico.

En dicha figura se observa que la dependencia del parámetro de GP en función de la longitud de onda cambia en forma gradual a medida que varía la temperatura de incubación obteniéndose una pendiente negativa para la GP_{exc} y una positiva en el caso de la GP_{em} . Estas pendientes son más pronunciadas a mayores temperaturas donde se observa que los espectros del Laurdan son similares entre wt y wt+NaCl (**Figura 21**).

Los valores absolutos obtenidos de los parámetros de GP_{em} y GP_{exc} disminuyen en función del aumento de la temperatura; no obstante, no se observan cambios bruscos en dichos valores indicando que no existe una transición de fase gel a líquido cristalina, ni la

coexistencia de ambos tipos de fases (Parasassi *et al*, 1993). Contrariamente a los resultados obtenidos en membranas aisladas (2.2.4), a 10° y a 25°C los lípidos polares de ambas muestras presentan una fase similar a la observada en membranas artificiales en estado gel. No obstante, a 37 y 50°C el comportamiento observado para estas muestras es el observado para lípidos en fase líquido ordenada (Parasassi *et al*, 1994).

No se observaron diferencias significativas entre ambas muestras (wt y wt+NaCl) cuando los parámetros de GP_{exc} y de GP_{em} fueron graficados en función de la temperatura (Figura 23). Estos resultados indicarían que no existen cambios significativos en el contenido de agua entre los liposomas de lípidos polares de ambas muestras (Bagatolli *et al*, 1999). El mismo tipo de resultados se obtuvo en los estudios dinámicos con DPH y TMA-DPH, ya que no se observan cambios en los tiempos de vida de ambas sondas (Tabla 10).

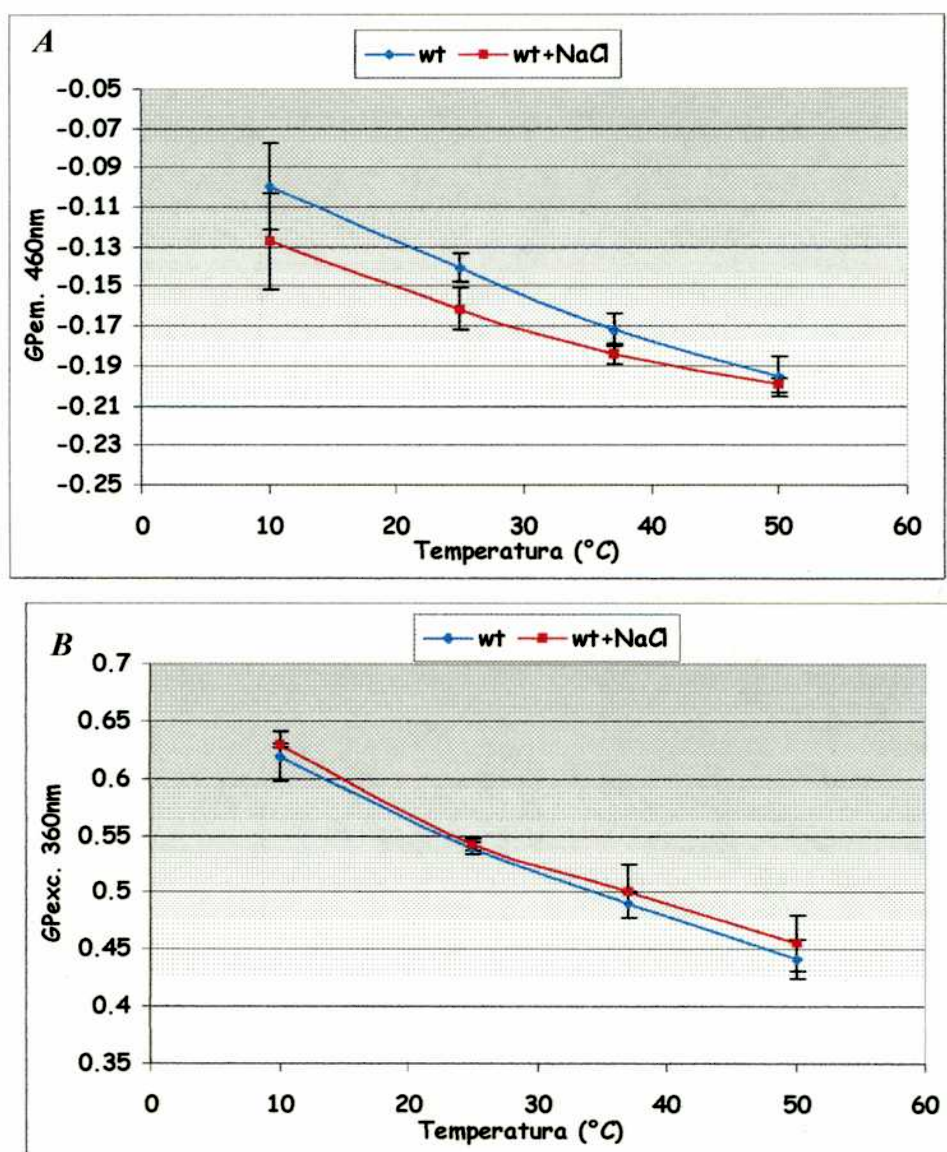


Figura 23: Polarización generalizada del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres

determinaciones independientes. **A:** polarización generalizada de emisión medida a 460nm. **B:** polarización generalizada de excitación medida a 360nm.

2.2.2.- Propiedades de la interfaz en liposomas contruídos a partir de lípidos totales:

En la **Figura 24** se observan los espectros de excitación y emisión del Laurdan medido sobre liposomas de lípidos totales determinados a 10°, 25°, 37° y 50°C.

De manera opuesta a lo obtenido en los liposomas de lípidos polares, la banda roja del espectro de excitación a 380nm es levemente mayor en los liposomas de wt+NaCl (esto se observa a las cuatro temperaturas estudiadas). También se observa que a temperaturas mayores de 25°C existe un leve corrimiento del espectro de wt+NaCl hacia el azul si se lo compara con los espectros de wt. Este fenómeno podría atribuirse a un cambio en la hidratación de la membrana (Bagatolli *et al*, 1999).

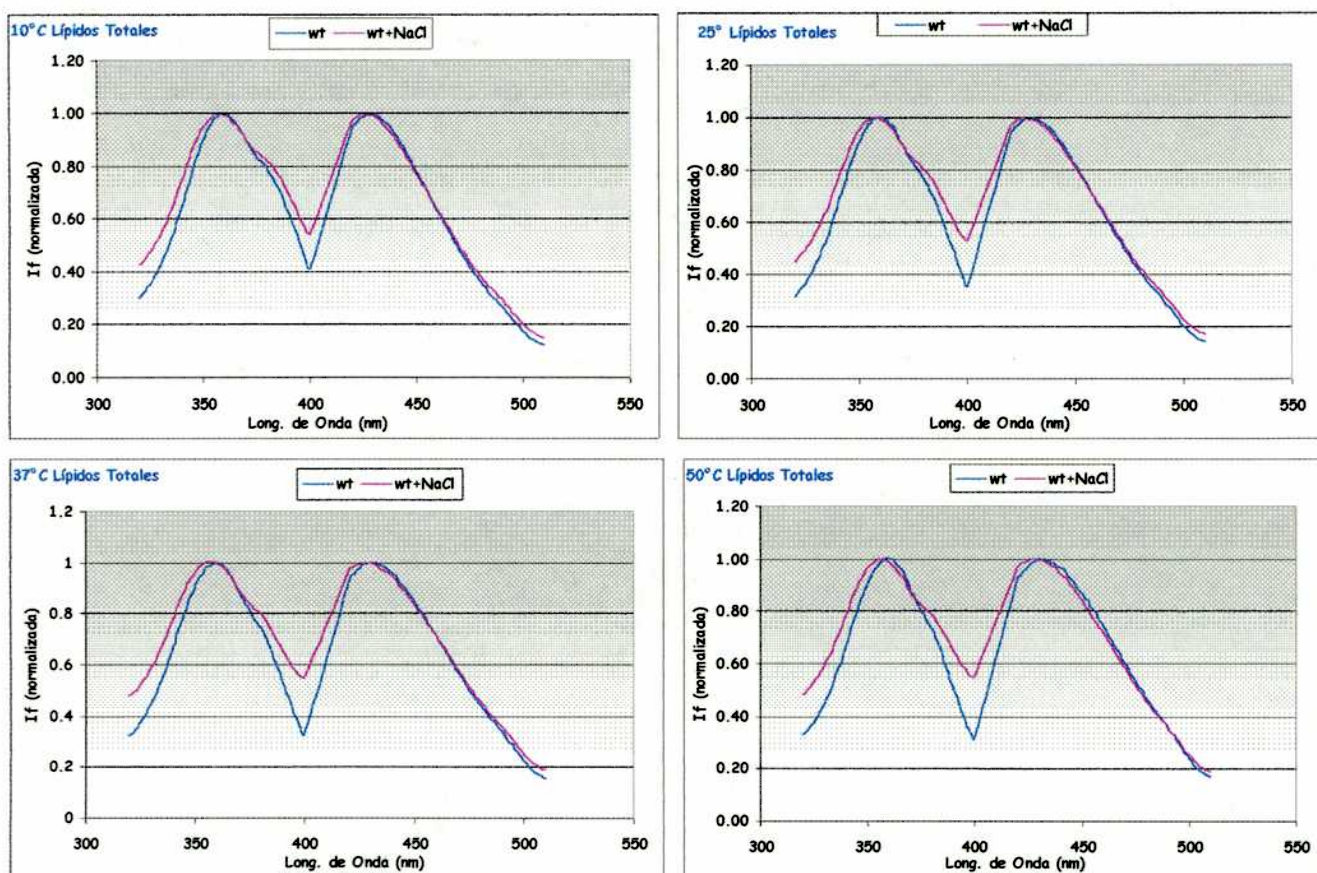


Figura 24: Espectros de emisión y excitación del Laurdan obtenido a partir de liposomas de lípidos totales medidos a distintas temperaturas. Los espectros que se muestran son un experimento representativo de los ensayos realizados. If (normalizada): intensidad de fluorecencia normalizada.

En la **Figura 25** se observa la dependencia del parámetro de polarización generalizada en función de la longitud de onda de los liposomas construidos a partir de lípidos totales de las muestras wt y wt+NaCl. En todo el rango de temperaturas estudiado (10-50°C), ambas muestras se encuentran en una fase líquida ordenada. Además, el patrón de la GP_{em} y de la GP_{exc} obtenidos en la muestra wt+NaCl (en todas las temperaturas estudiadas) presenta un comportamiento bifásico. En esta figura se puede observar que existe una leve pendiente positiva en el extremo azul de la GP_{em} . El mismo tipo de resultados han sido descriptos por González Baró y colaboradores (2000) cuando moléculas externas como el fenitrotión son agregados a liposomas de lípidos polares.

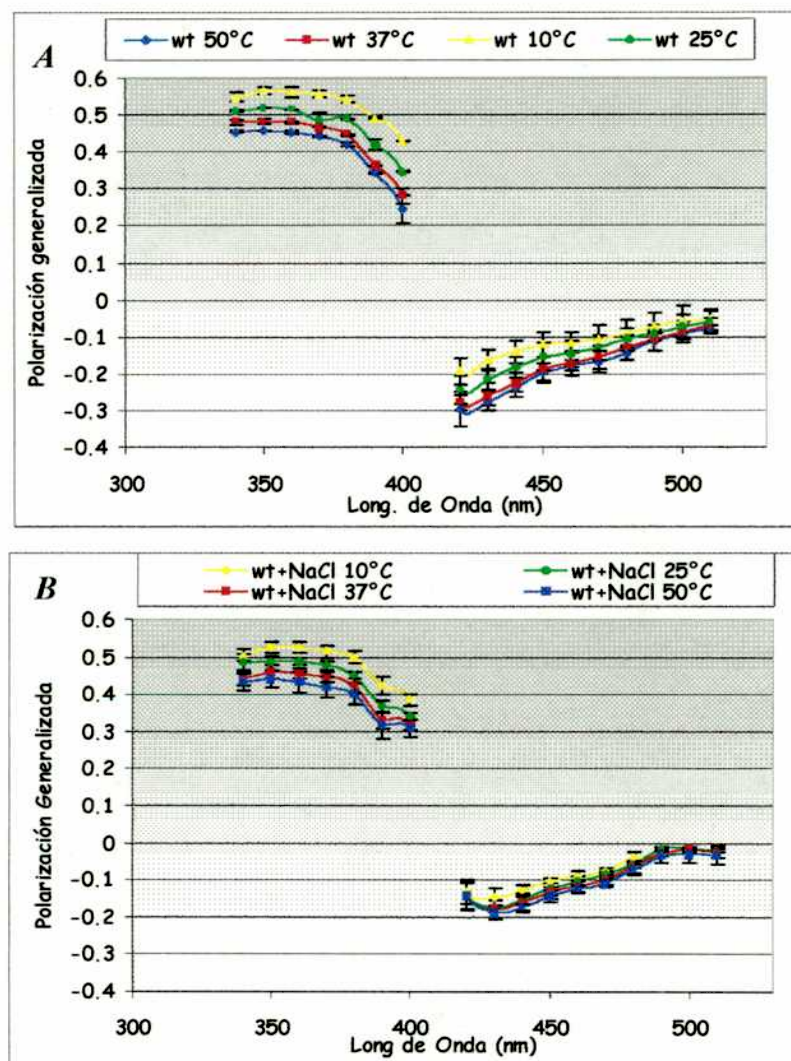


Figura 25: Polarización generalizada del Laurdan medida sobre liposomas de lípidos totales a distintas temperaturas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes medidos sobre liposomas unilamelares construidos a partir de lípidos totales. **A:** liposomas de la cepa wt crecida bajo condiciones normales. **B:** liposomas de la cepa wt crecida bajo condiciones de estrés osmótico.

La fluorescencia de Laurdan otorga información acerca de la heterogeneidad lateral de las membranas, por lo tanto el comportamiento bifásico de la GP_{em} podría estar indicando la presencia de distintos dominios lipídicos con diferentes propiedades. Sin embargo, sería necesaria mayor información para confirmar este fenómeno.

El parámetro de GP_{exc} graficado en función de la temperatura muestra diferencias significativas entre ambas muestras en todo el rango de temperaturas estudiado (**Figura 26**).

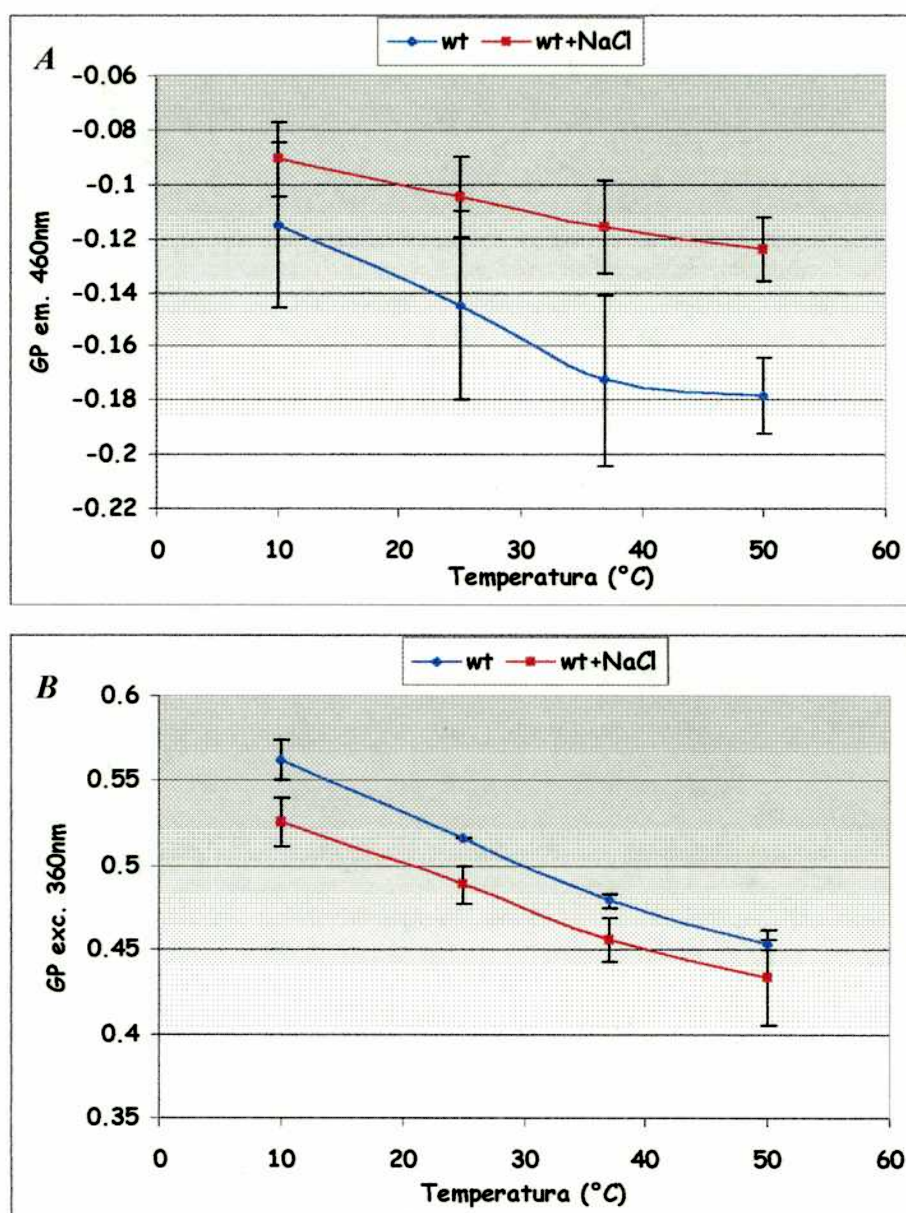


Figura 26: Polarización generalizada del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. **A:** polarización generalizada de emisión medida a 460nm. **B:** polarización generalizada de excitación medida a 360nm.

Los resultados indican que la muestra wt+NaCl posee menores valores absolutos de la GP_{exc} indicando un aumento en la relajación dipolar de la sonda o un aumento en la hidratación de los lípidos. Puesto que no se observan diferencias significativas en los valores de tiempos de vida de las sondas DPH y TMA-DPH en estos liposomas y por lo tanto en el grado de hidratación de los mismos, podríamos concluir que el aumento en el grado de hidratación detectado únicamente por el Laurdan se produce a nivel de la interfaz lípido-agua. Por otra parte, no se observan cambios abruptos en los valores de GP indicando la ausencia de transición de fases en ambas muestras (Parasassi & Gratton, 1995).

Como se muestra en la **Figura 26**, cuando en las muestras wt y wt+NaCl se encuentran presentes los lípidos neutros existe una menor variación en los valores absolutos de la GP_{ex} en función de la temperatura comparado con las variaciones obtenidas para las membranas y liposomas de lípidos polares.

En el género *Bacillus* y en procariotas en general, se han descrito componentes neutros en las membranas bacterianas tales como isoprenoides (incluyendo al β -caroteno), fiteno y tetrahidrobacterioruberina (Clejan & Krulwich, 1988). Sin embargo, la caracterización de los mismos no fue desarrollada durante el transcurso de este trabajo.

2.2.3.- Incorporación del Laurdan en membranas aisladas:

Se determinó la incorporación de la sonda Laurdan en membranas aisladas de la cepa salvaje crecida bajo condiciones normales y de estrés osmótico. Dicha incorporación se realizó determinando el aumento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo (**Figura 27**).

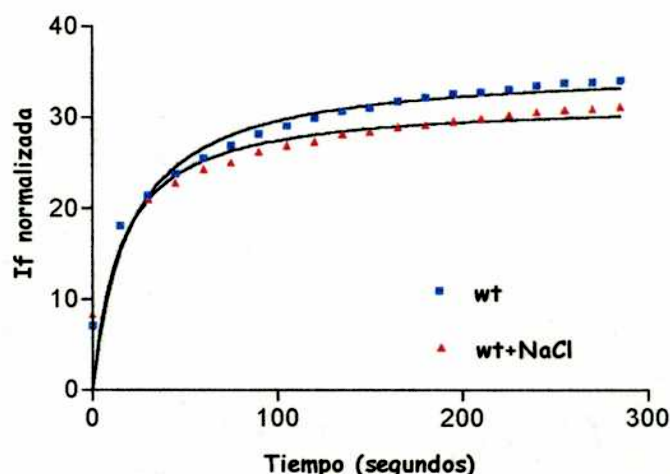


Figura 27: Incorporación del Laurdan sobre membranas aisladas. Las curvas representan un experimento representativo de los ensayos realizados. If: intensidad de fluorescencia (normalizada).

En esta figura se observa que luego de 3 minutos de incubación a 37°C la intensidad de fluorescencia alcanza un “plateau” indicando que la sonda ha sido incorporada completamente en las membranas. Asimismo, no se observan diferencias significativas en el grado de marcación y en el proceso de incorporación de la sonda entre las muestras.

2.2.4.- Propiedades de la interfaz en membranas aisladas:

En la **Figura 28** se observan los espectros de excitación y emisión del Laurdan determinados a 10°, 25°, 37° y 50°C. Dichos espectros no muestran diferencias significativas entre las membranas de wt y wt+NaCl. Los espectros de emisión presentan una banda azul a ~430nm de manera similar a los resultados obtenidos con los distintos tipos de liposomas. Sin embargo, la banda roja del espectro de excitación a 380nm es más pronunciada en las membranas que en los liposomas de lípidos totales y de lípidos polares. El aumento observado en la intensidad de la banda roja del espectro de excitación de las membranas aisladas podría atribuirse a diferencias en el grado de empaquetamiento de los lípidos y/o a la polaridad del entorno del Laurdan en comparación con los resultados obtenidos para los liposomas.

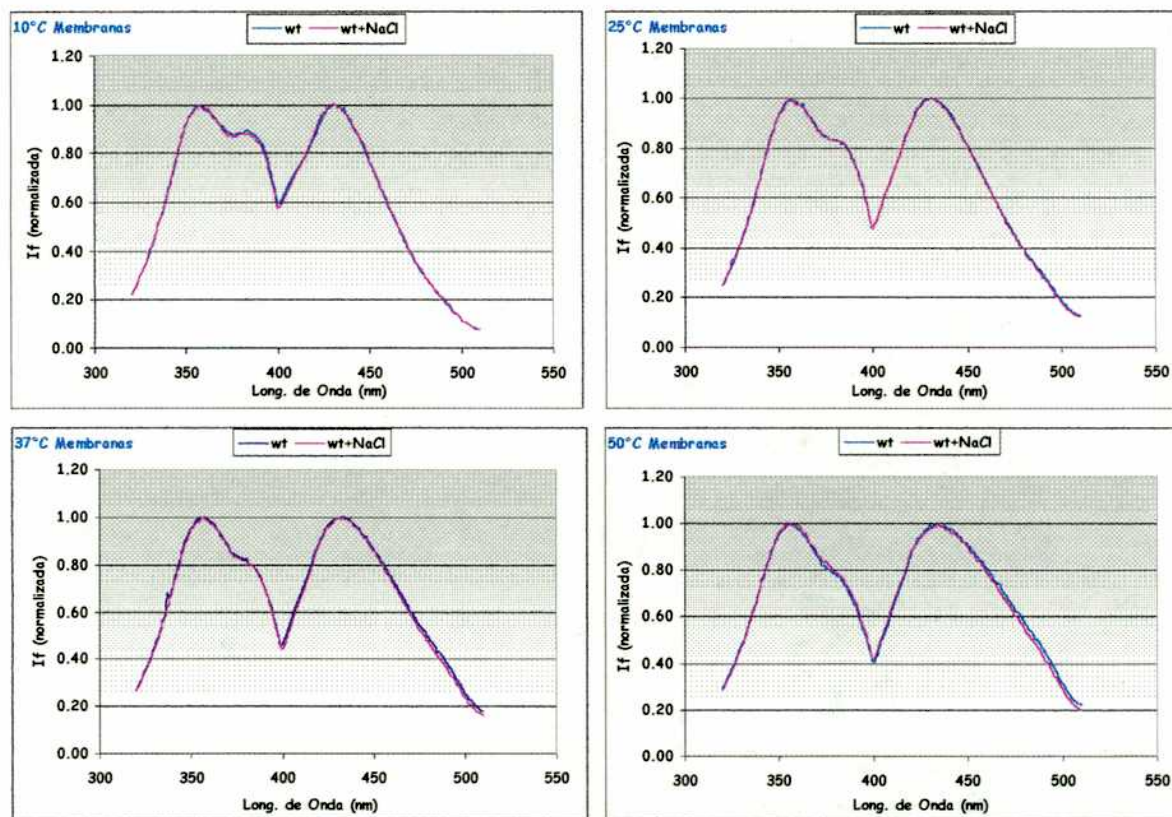


Figura 28: Espectros de emisión y excitación del Laurdan obtenido a partir de membranas aisladas medidos a distintas temperaturas. Los espectros que se muestran constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. If (normalizada): intensidad de fluorescencia normalizada.

La dependencia de la longitud de onda con los parámetros de excitación (GP_{exc}) y emisión (GP_{em}) del Laurdan en membranas aisladas fueron medidos en el mismo rango de temperaturas que para los liposomas y los resultados se observan en la **Figura 29**.

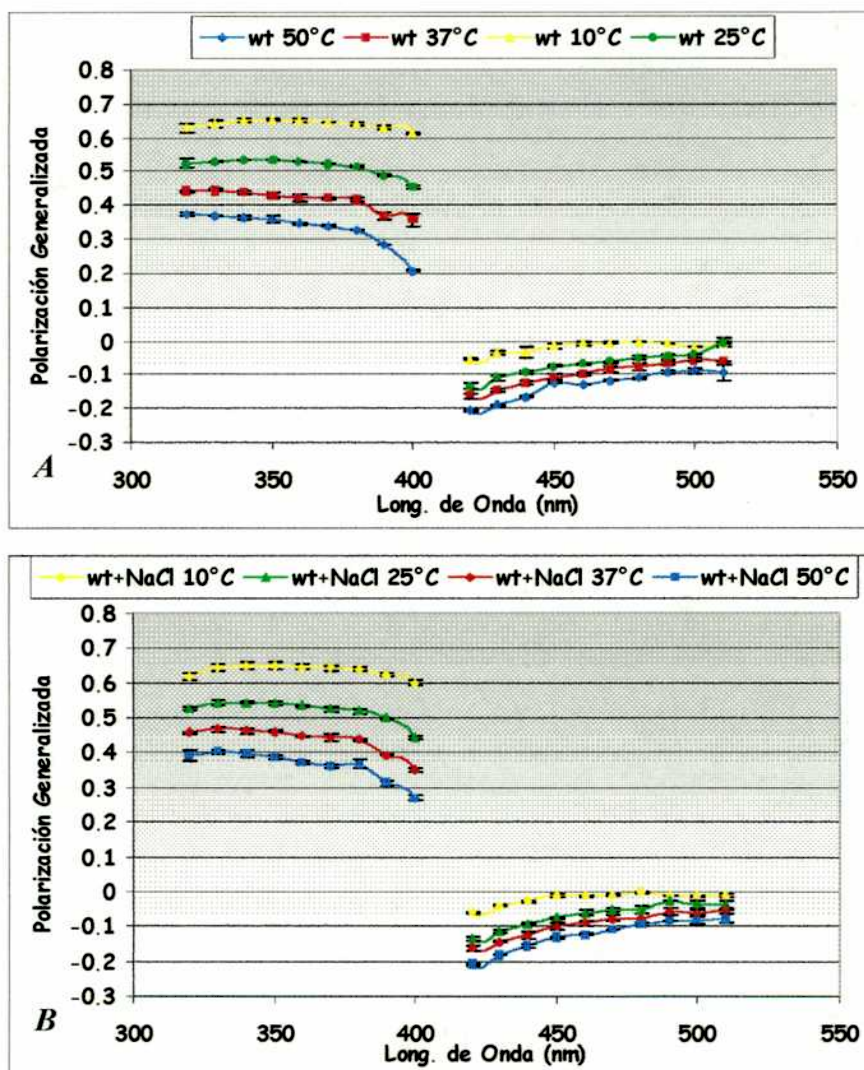


Figura 29: Polarización generalizada del Laurdan medida sobre membranas aisladas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes medidos sobre membranas aisladas. **A:** membranas aisladas de la cepa wt crecida bajo condiciones normales. **B:** membranas aisladas de la cepa wt crecida bajo condiciones de estrés osmótico.

En las membranas aisladas estudiadas de wt y de wt + NaCl a 10°C los patrones de la GP_{exc} y de la GP_{em} son similares a los observados en membranas ricas en colesterol. El mismo tipo de resultado fue descrito en los liposomas. A partir de 25°C la dependencia de la GP en función de la longitud de onda varían en forma gradual hacia una pendiente negativa para GP_{exc} y positiva para la GP_{em} (**Figura 29**). Este comportamiento observado en ambas muestras es característico de membranas que se encuentran en una fase líquida ordenada.

El parámetro de la GP_{exc} graficado en función de la temperatura (*Figura 30*) demuestra que existen diferencias significativas entre ambas muestras a 37°C (temperatura de crecimiento de los cultivos) y a 50°C, siendo las membranas de la cepa crecida bajo condiciones de estrés las que poseen mayores valores de GP_{exc} . Esto indicaría que existe una disminución en el grado de hidratación de las membranas de la muestra wt+NaCl apoyando los resultados obtenidos en los estudios dinámicos con DPH y TMA-DPH (*Tabla 10*).

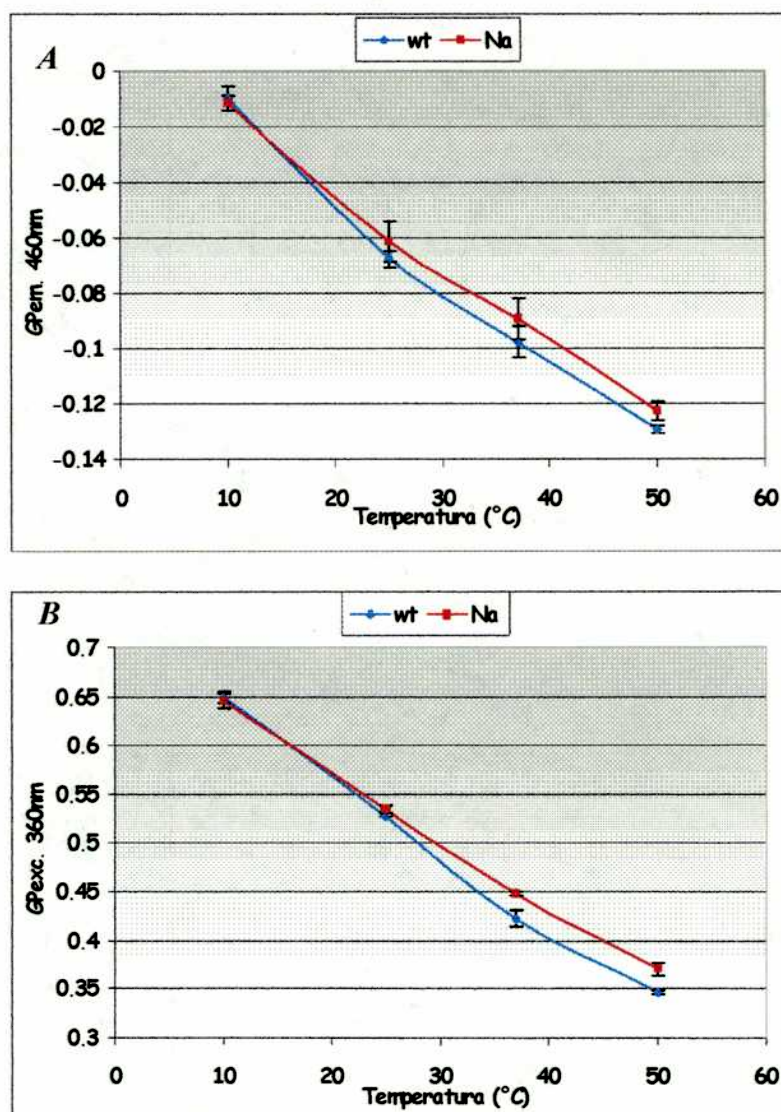


Figura 30: Polarización generalizada del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. **A:** polarización generalizada de emisión medida a 460nm. **B:** polarización generalizada de excitación medida a 360nm.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las tres sondas estudiadas, podríamos concluir que la disminución en el grado de hidratación de las membranas se produce desde la

cabeza polar de los lípidos hacia el interior de la misma ya que estas sondas son capaces de sensar a la misma a distintos niveles de profundidad.

Por otra parte, altos valores en la GP_{exc} estarían indicando un menor grado de movilidad de la sonda o lo que es similar, un mayor grado de empaquetamiento en los lípidos de esta muestra. Este cambio en el grado de empaquetamiento lateral de los lípidos en la muestra wt+NaCl podría estar evitando que las moléculas de agua penetren con mayor facilidad en la bicapa lipídica en comparación con la muestra crecida bajo condiciones normales.

En resumen, los resultados obtenidos a partir del Laurdan indicarían que las membranas aisladas de *B. subtilis* presentan una mayor dependencia en los valores del parámetro de la GP_{exc} en función de la temperatura si se comparan estos resultados con los obtenidos para ambos tipos de liposomas (Tabla 11).

Muestra	ΔGP_{exc}	
	wt	wt+NaCl
Membranas	47%	43%
Liposomas Lípidos totales	19%	17%
Liposomas Lípidos polares	29%	27%

Tabla 11: Cálculo de la ΔGP_{exc} calculada a 360nm para ambos tipos de muestras en el rango de temperaturas 10-50°C.

En esta tabla se observa que las membranas de wt y las de wt+NaCl presentan una mayor variación del parámetro GP_{exc} del Laurdan. Estos resultados indicarían que las proteínas que se encuentran formando parte de la bicapa mantienen a las membranas más sensibles a la temperatura en comparación con las vesículas libres de proteínas. Resultados similares fueron descritos por D'Antuono y colaboradores (2000).

Ha sido ampliamente descrito que las características dinámicas de los lípidos se encuentran afectadas directamente por la presencia de proteínas. Asimismo, en experimentos de reconstitución de proteoliposomas ha sido demostrado que existe un efecto modulador de las proteínas integrales de membrana sobre el estado físico de los lípidos que forman parte de la misma (Lakowicz, 1999).

Como fue previamente descrito, no existen diferencias significativas en la relación fofolípidos/proteínas entre las membranas de wt+NaCl y de wt, sin embargo existen diferencias significativas en los perfiles de las proteínas de membrana. Estos resultados junto

con los obtenidos con el Laurdan indicarían que ciertas proteínas presentes en las membranas de *B. subtilis* crecidas en un medio hiperosmótico serían las responsables del comportamiento físicoquímico observado en las mismas.

2.2.5.- Propiedades de la interfaz en membranas aisladas de células sometidas a un shock osmótico:

Se estudiaron las membranas de la cepa salvaje crecida hasta la fase exponencial de crecimiento y sometida a un shock osmótico durante 3 horas.

Se determinó el parámetro de GP del Laurdan en función de la longitud de onda a 10°, 25°, 37° y 50°C (*Figura 31*).

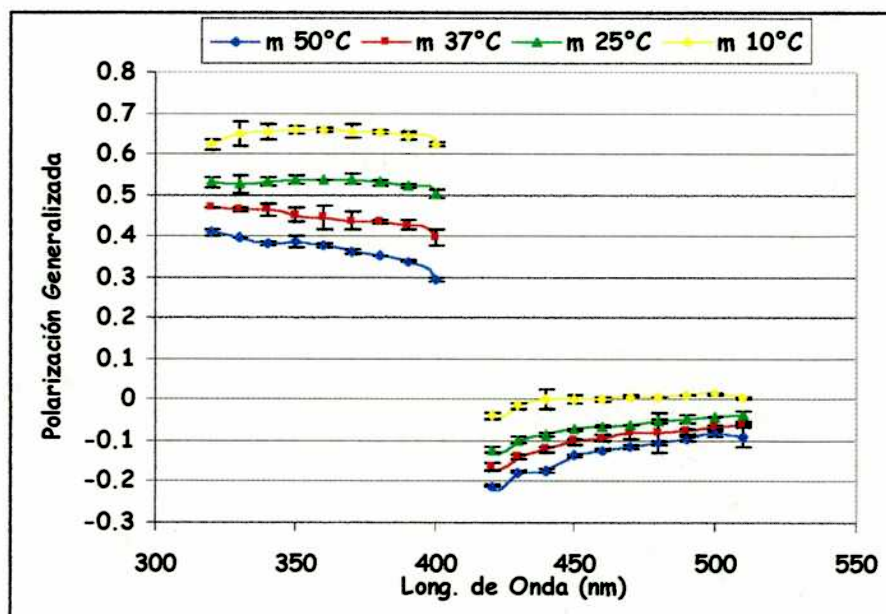


Figura 31: Polarización generalizada del Laurdan medida sobre membranas aisladas de células sometidas a un shock osmótico durante tres horas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes medidos sobre membranas aisladas de células crecidas hasta fase exponencial y luego sometidas a un shock osmótico durante 3 horas.

Al igual que en las membranas aisladas de wt y wt+NaCl, a 10°C los patrones de la GP_{exc} y de la GP_{em} son similares a los descritos para membranas ricas en colesterol. Sin embargo, a partir de 25°C la dependencia de la GP es característica de membranas que se encuentran en fase líquida ordenada.

En la *Figura 32* se comparan los datos del parámetro de la GP_{ex} graficado en función de la temperatura con los obtenidos para las membranas de wt y wt+NaCl.

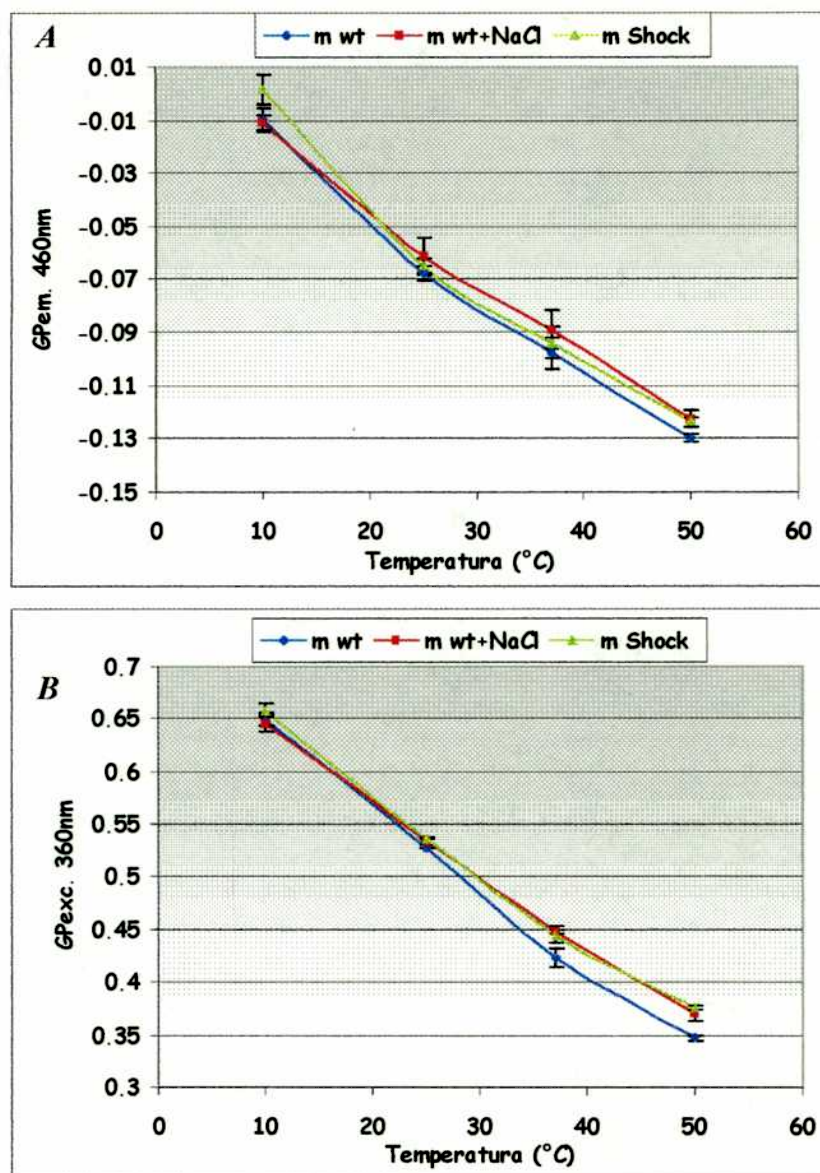


Figura 32: Polarización generalizada del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. **A:** polarización generalizada de emisión medida a 460nm. **B:** polarización generalizada de excitación medida a 360nm.

En esta figura se observa que las membranas de las células sometidas a un shock osmótico durante tres horas presentan valores similares de GP_{exc} a los obtenidos a 37° y 50°C en las membranas de wt+NaCl, es decir, mayores a los obtenidos para wt.

Por lo tanto, a igual que en las membranas de wt+NaCl, estos valores estarían indicando un mayor grado de empaquetamiento lateral de los lípidos en esta muestra y un menor grado de hidratación en comparación con el control. El mismo tipo de resultado fue obtenido utilizando DPH como sonda fluorescente (ver **Figura 19** de este Capítulo).

En conjunto estos resultados estarían indicando que el crecimiento en hiperosmolaridad y el enfrentamiento de las células a un shock osmótico provoca un aumento en el grado de empaquetamiento lateral de los lípidos de las membranas. A partir de estos resultados se puede concluir que algunas características físicoquímicas de las membranas de *B. subtilis* como la fluidez y el grado de hidratación varían en función de la osmolaridad externa. Estas variaciones serían indispensables en las células para contrarrestar el desbalance osmótico entre éstas y el medio que las rodea.

2.3.- Ensayos de solubilización con detergentes:

Con el propósito de determinar la estabilidad de las preparaciones de liposomas y membranas se realizaron ensayos de solubilización utilizando como detergente al Tritón X-100.

El proceso de solubilización realizado en estos ensayos fue determinado utilizando la sonda fluorescente octadecil rodamina B (R18) (Domecq *et al*, 2001). Esta sonda fluorescente se inserta en la bicapa lipídica y presenta el fenómeno de autoextinción de fluorescencia a determinadas concentraciones. En los experimentos realizados se utilizó una concentración de 1.5mol%. La adición del detergente al medio donde se encuentran las membranas o liposomas provoca una disminución en la autoextinción de la sonda pues la misma se particiona entre el solvente y la bicapa lipídica. Este proceso fue determinado por un aumento en la intensidad de fluorescencia de la R18 en función del aumento de la concentración del detergente.

Se estudiaron los procesos de solubilización tanto de membranas como de liposomas preparados a partir de lípidos totales y de lípidos polares de la cepa salvaje crecida bajo condiciones normales y de estrés osmótico.

El proceso de solubilización en estos ensayos implica la transformación de estructuras lamelares en micelas mixtas la cual es llevada a cabo mediante distintos estadios como fue detallado en la introducción de este capítulo.

En la **Figura 33** se puede observar que las intensidades de fluorescencia (normalizadas) muestran un cambio abrupto de pendiente a una determinada concentración de Tritón X-100. Este cambio corresponde al momento en el que las bicapas pierden la disposición lamelar para transformarse en micelas mixtas detergente/lípido (y proteínas en el caso de las membranas).

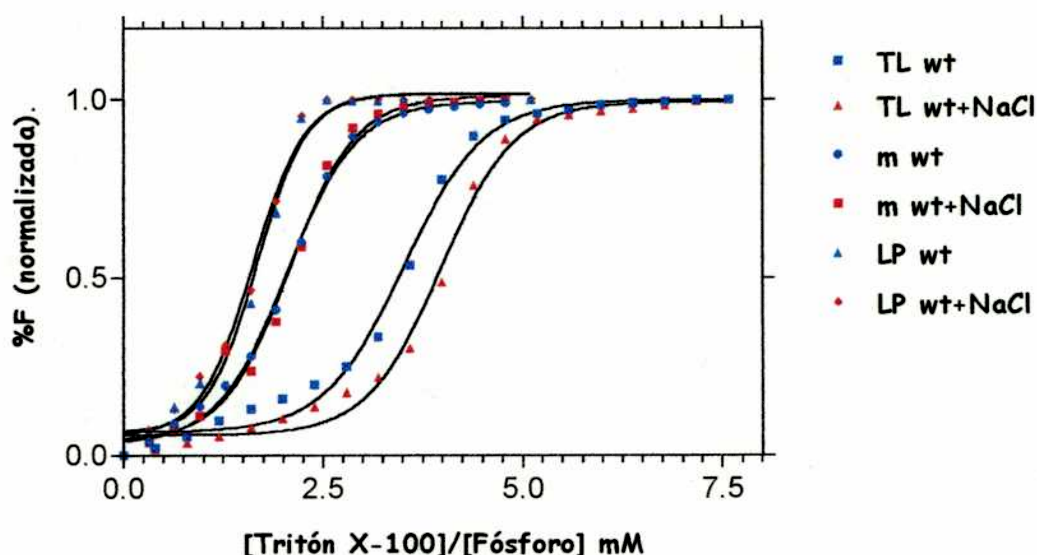


Figura 33: Ensayos de solubilización con Tritón X-100. Las curvas representan un experimento representativo de los ensayos realizados. %F: representa el porcentaje de fluorescencia normalizada (ver Materiales y Métodos). TL: liposomas de lípidos totales; LP: liposomas de lípidos polares y m: membranas aisladas.

La intersección que se obtiene entre las curvas extrapoladas del “plateau” superior y la porción lineal de las mismas fue denominada como el punto lítico de los liposomas y/o membranas. A esta relación detergente/fósforo lipídico, los liposomas y las membranas se solubilizan y se transforman en micelas mixtas. En la **Tabla 12** se muestran los valores obtenidos a partir de dicha extrapolación.

Muestra	Condición de crecimiento	[Tritón X-100]/ [Fósforo] mM
Lípidos totales	wt	4.50 ± 0.20
	wt+NaCl	5.20 ± 0.10
Lípidos polares	wt	2.70 ± 0.30
	wt+NaCl	2.50 ± 0.32
Membranas	wt	3.16 ± 0.23
	wt+NaCl	3.22 ± 0.30

Tabla 12: Determinación de los puntos líticos de los liposomas y membranas de wt y wt+NaCl. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres muestras independientes.

A pesar de que ha sido descripto que la CL estabiliza la configuración lamelar de los liposomas (Shibata *et al.*, 1994) no existen diferencias significativas durante la solubilización

de las membranas y de los liposomas contruídos a partir de lípidos polares entre las muestras wt y wt+NaCl indicando que el aumento en CL observado en las muestras de wt+NaCl no afecta a la solubilización por Tritón X-100.

No obstante, en los liposomas contruídos a partir de lípidos totales se observan diferencias significativas. Estos resultados estarían indicando que se necesita adicionar una mayor cantidad de detergente en los liposomas de la cepa crecida bajo estrés para poder completar el proceso de solubilización. Las diferencias observadas podrían atribuirse a la presencia de los lípidos neutros que estarían de alguna manera estabilizando la estructura de la bicapa. No obstante, como no se han caracterizado los lípidos neutros de esta cepa no se puede realizar un análisis con mayor profundidad.

Los patrones de disminución de la extinción de fluorescencia y el porcentaje inicial de dicha extinción son útiles ya que ponen en evidencia la presencia de cambios estructurales dentro de la membrana (Domecq *et al.*, 2001). No obstante, no se observaron diferencias significativas ni entre los patrones de disminución de la extinción de fluorescencia ni en el porcentaje de la misma en las distintas muestras (no se muestran los resultados). Estos resultados coinciden con los obtenidos con las otras sondas fluorescentes que tampoco fueron capaces de detectar cambios estructurales o de transición de fases.

2.4.- Permeabilidad a protones medida sobre liposomas contruídos a partir de lípidos totales:

Diversos estudios realizados con liposomas contruídos a partir de lípidos de membranas de distintos organismos, han demostrado que tanto en el dominio Bacteria como en el Arquea, la permeabilidad a los protones se mantiene constante en función del cambio en la temperatura de crecimiento. En general los H^+ son los iones más utilizados en la transducción de energía en ambos dominios (van der Vossberg *et al.*, 1995). La permeabilidad de la membrana a los H^+ es un parámetro importante para la viabilidad celular y a partir de ello, van der Vossberg y colaboradores (1999) proponen la “adaptación homeoviscosa de la permeabilidad”. La misma indica que las bacterias ajustan su composición lipídica en respuesta a diversos factores externos para mantener constante la permeabilidad de la membrana a los protones. Dichos autores demuestran que las células de *B. subtilis* son capaces de mantener constante la permeabilidad de sus membranas frente a los protones cuando las células son crecidas a distintas temperaturas.

La sonda utilizada en los experimentos de permeabilidad a protones fue la naranja de acridina (AO). Esta sonda es sensible a pequeñas variaciones de pH, es hidrosoluble y,

cuando es incorporada dentro de liposomas cuyo interior posee un pH bajo ésta no fluoresce. Teniendo en cuenta estas propiedades, diversos investigadores utilizaron a la AO para las determinaciones de gradientes de pH, utilizando el fenómeno de autoextinción que presenta la misma (Clerc & Barenholz, 1998). La acumulación de AO en el interior de los liposomas provocaría la agregación de la misma dando lugar a variaciones en sus características espectrales. También se ha observado la formación de agregados no fluorescentes en solución (Clerc & Barenholz, 1998).

Experimentalmente, el gradiente de pH de transmembrana se logró utilizando diversas concentraciones de sulfato de amonio que dieron lugar a diferencias entre el pH externo e interno del liposoma. Es importante mencionar que el coeficiente de permeabilidad del amonio es once órdenes de magnitud mayor que el coeficiente de permeabilidad del ión sulfato y que el gradiente de pH impuesto por el gradiente de amonio es estable y constante.

Los liposomas se construyeron en una solución conteniendo 120mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7 y las soluciones externas utilizadas para generar el gradiente de amonio fueron las siguientes: a) 0.4mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6mM Na_2SO_4 pH 7, b) 0.4mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6mM Li_2SO_4 pH 7 y c) 0.4mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6mM K_2SO_4 pH 7. Asimismo, se utilizó la solución en la que fueron construídos los liposomas (120mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7) como control de ausencia de gradiente. El objetivo de usar tres sales distintas como Na_2SO_4 , Li_2SO_4 y K_2SO_4 fue determinar posibles diferencias en el proceso de permeabilidad debidas al contraión utilizado.

2.4.1.- Ensayos de fluorescencia con naranja de acridina:

Con el propósito de determinar si bajo condiciones de estrés osmótico se cumple el fenómeno de adaptación homeoviscosa de la permeabilidad se realizaron ensayos de permeabilidad a protones sobre liposomas unilamelares construídos a partir de lípidos totales.

Se determinó la condición experimental óptima con respecto a la concentración de sonda utilizada. Puesto que en estos ensayos se debe medir la disminución de la fluorescencia en función del gradiente de amonio impuesto sobre los liposomas no debe existir autoextinción de la sonda en solución debido a la formación de dímeros no fluorescentes.

En la **Figura 34 A** se observa la fluorescencia de la sonda medida en función de su concentración en cada una de las soluciones utilizadas en los ensayos de permeabilidad. En la **Figura 34 B** se presentan los valores de fluorescencia de la sonda en función del tiempo en las distintas soluciones utilizadas.

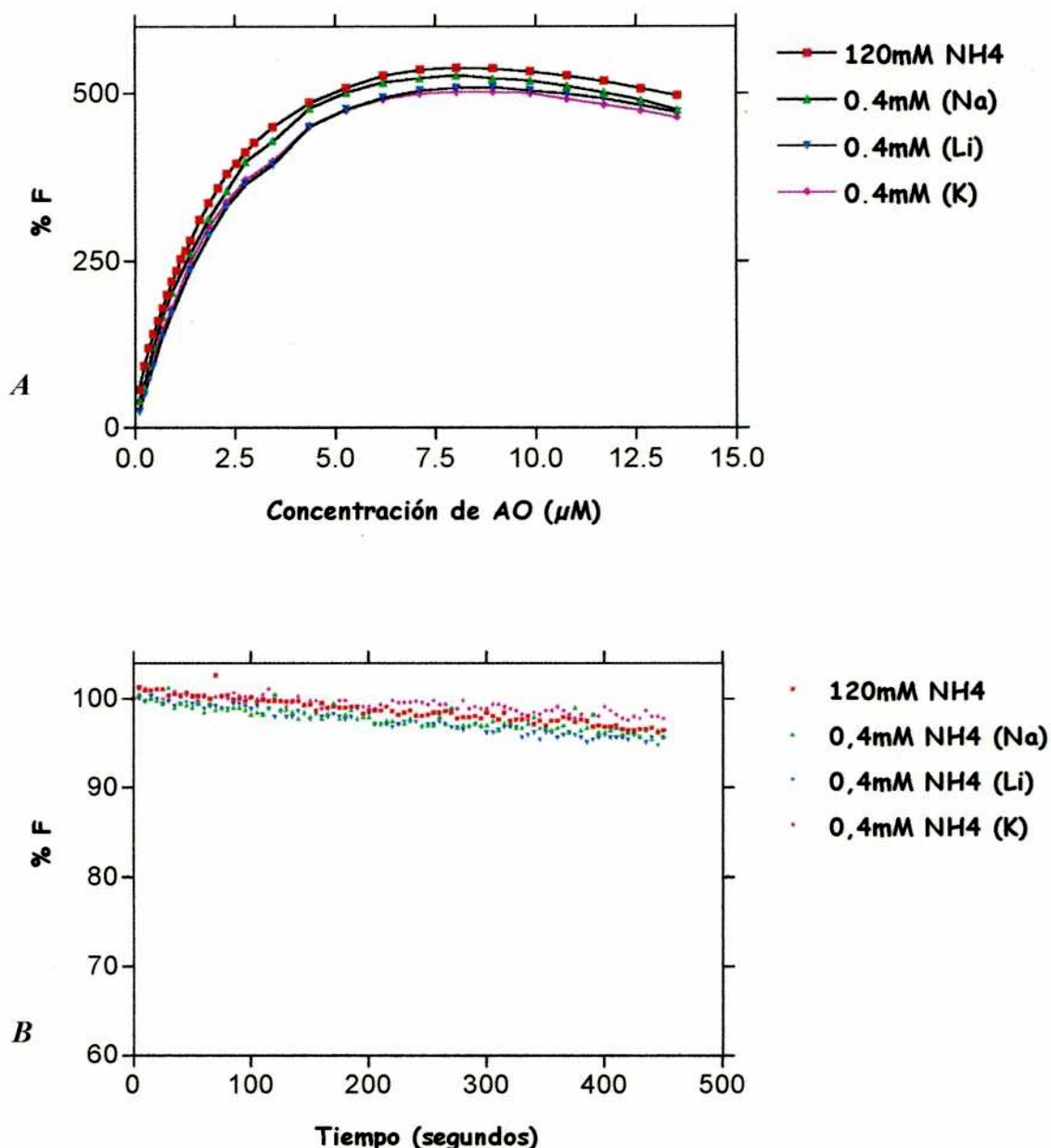


Figura 34: A: Intensidad de fluorescencia de AO en función de la concentración de la sonda. B: Porcentaje de fluorescencia de la sonda en función del tiempo. Los resultados que se muestran en esta figura constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. %F: representa el porcentaje de fluorescencia (ver materiales y métodos). Las soluciones utilizadas fueron: a) 120 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7, b) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Na_2SO_4 pH 7, c) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Li_2SO_4 pH 7, d) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM K_2SO_4 pH 7. Entre paréntesis se encuentra el contraión utilizado en el ensayo.

Como se puede observar en la **Figura 34 A** se necesitan concentraciones elevadas de la sonda (del orden de $20\mu\text{M}$) para inducir el fenómeno de autoextinción, se utilizó entonces una concentración de sonda de $1\mu\text{M}$ para trabajar bajo condiciones óptimas. Asimismo, la **Figura 34 B** muestra que la intensidad de fluorescencia de la sonda no varía en función del

tiempo en cada una de las distintas soluciones utilizadas, descartando fenómenos de interacción inespecífica y "fotobleaching" de la sonda.

En la **Figura 35 A y B** se observan las curvas de extinción de fluorescencia de la sonda AO en función del gradiente de amonio externo impuesto sobre los liposomas. Como se mencionó en párrafos anteriores, la extinción de la fluorescencia se debe a que la sonda pasa del medio externo hacia el interior del liposoma formando dentro del mismo dímeros y agregados que no fluorescen.

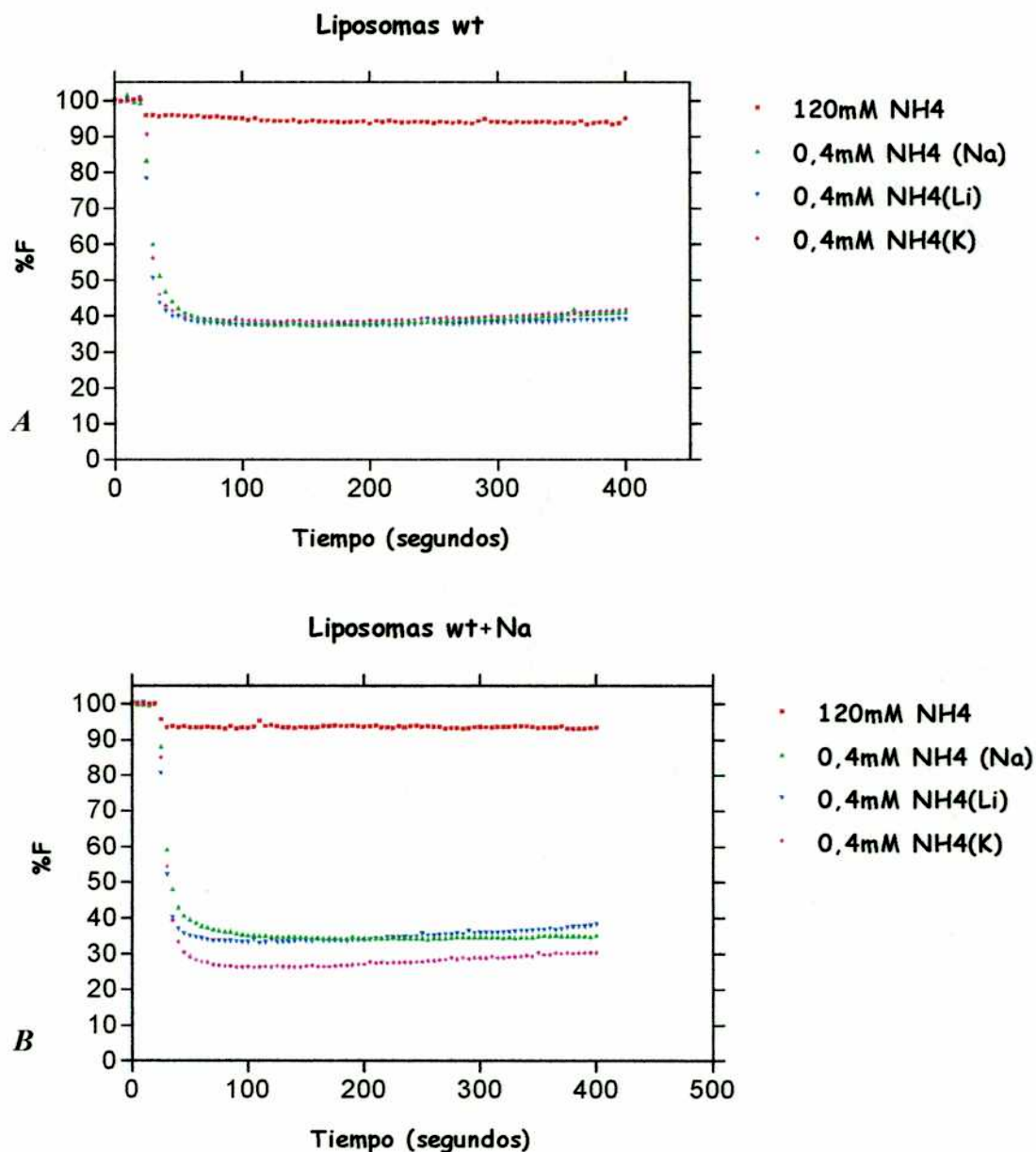


Figura 35: Permeabilidad a protones sobre liposomas de lípidos totales. A: Liposomas de wt. B: Liposomas de wt+NaCl. Los resultados que se muestran en esta figura constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. %F: representa el porcentaje de fluorescencia (ver materiales y métodos). Las soluciones utilizadas fueron: a) 120 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7, b) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +

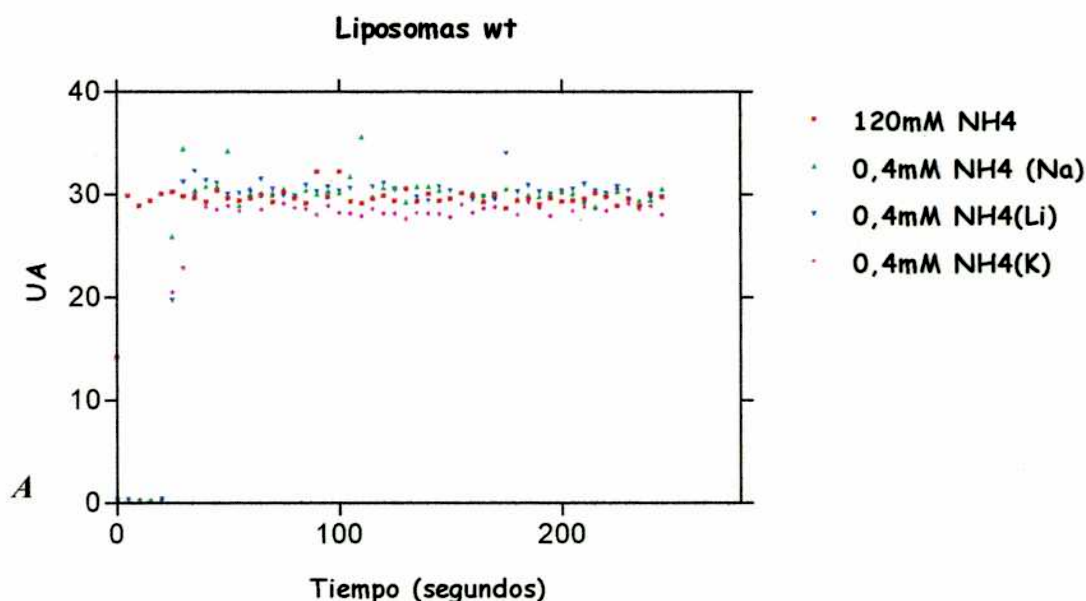
119.6 mM Na_2SO_4 pH 7, c) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Li_2SO_4 pH 7, d) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM K_2SO_4 pH 7. Entre paréntesis se encuentra el contraión utilizado en el ensayo.

De estos resultados se infiere que las células de *B. subtilis* crecidas bajo condiciones normales y de estrés osmótico son capaces de mantener constante la permeabilidad de sus membranas a los protones. No existen diferencias significativas entre las muestras de wt y wt+NaCl cumpliendo con el requerimiento de la teoría de adaptación homeoviscosa de la permeabilidad.

La ausencia de cambios observados en la permeabilidad de las membranas de las células de *B. subtilis* crecidas en hiperosmolaridad indicaría que dicho parámetro es esencial para la viabilidad celular y de la membrana como fue demostrado por van der Vossberg y colaboradores (1995). Por otra parte, se puede observar que una vez llegado al equilibrio en la concentración de amonio a ambos lados de la bicapa, la fluorescencia se mantiene constante en función del tiempo indicando que los liposomas son estables bajo las condiciones estudiadas.

2.4.2.- Mediciones de dispersión luminosa o "light scattering" estático durante el proceso de permeabilidad a protones:

Se ha descrito que durante el proceso de permeabilidad y al llegar al estado de equilibrio pueden producirse cambios en el tamaño de los liposomas (Domecq *et al.*, 2001). Esta posibilidad se analizó realizando determinaciones de "light scattering" a lo largo de los distintos ensayos (*Figura 36*).



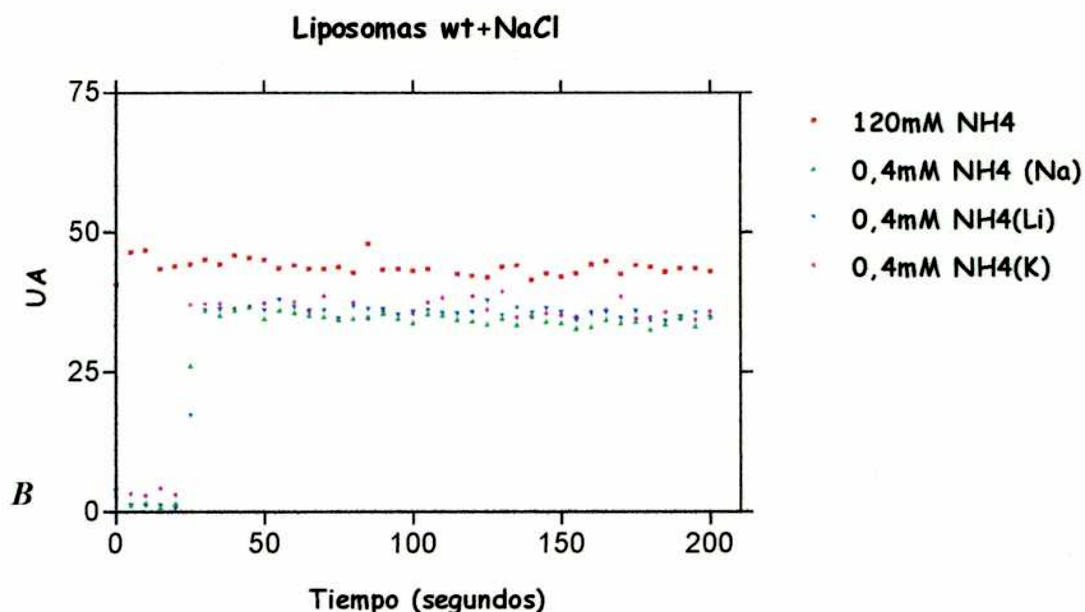


Figura 36: “Light scattering” estático medido en función del tiempo durante los ensayos de permeabilidad de protones. **A:** Liposomas de wt. **B:** Liposomas de wt+NaCl. Los resultados que se muestran en esta figura constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. AU: unidades arbitrarias de fluorescencia (ver materiales y métodos). Las soluciones utilizadas fueron: a) 120 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7, b) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Na_2SO_4 pH 7, c) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Li_2SO_4 pH 7. d) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM K_2SO_4 pH 7.

No se observan diferencias significativas entre wt y wt+NaCl ni entre las distintas soluciones utilizadas (**Figura 36 A y B**). Estos resultados indican que no se producen cambios en el tamaño de los liposomas durante el proceso de permeabilidad. Además no se observan diferencias en los tamaños de los liposomas entre wt y wt+NaCl.

Los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad indican que el cambio en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos producido durante el crecimiento en estrés osmótico, no influiría sobre la permeabilidad de protones de los liposomas de *B. subtilis*.

El mismo tipo de experimento se intentó realizar utilizando membranas aisladas de los cultivos crecidos bajo las distintas condiciones de crecimiento. Sin embargo, se producía un gran aumento de fluorescencia al agregar las suspensiones de membrana durante el ensayo y por lo tanto fue imposible determinar la permeabilidad de protones en estas condiciones. Aparentemente se produciría algún tipo de interacción inespecífica entre la sonda y las membranas.

2.5.- Formación de dominios de cardiolipina:

Trabajos realizados en distintos laboratorios describieron el uso de la sonda fluorescente Nonyl-Acridine Orange (NAO) con el propósito de observar la formación de

dominios de cardiolipina sobre membranas de células eucariotas (Gallet *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1994,) y procariotas (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Dichos autores otorgan un rol preponderante no sólo a la carga neta negativa que presenta la cardiolipina sino también a la estructura que la misma es capaz de adoptar sobre la bicapa lipídica.

En el Capítulo 1 de esta tesis se ha mencionado que la concentración de cardiolipina en respuesta al estrés aumenta en un 50% aproximadamente. Por esta razón, se decidió determinar si, debido a este cambio, se inducía la formación de dominios de cardiolipina en las muestras en estudio.

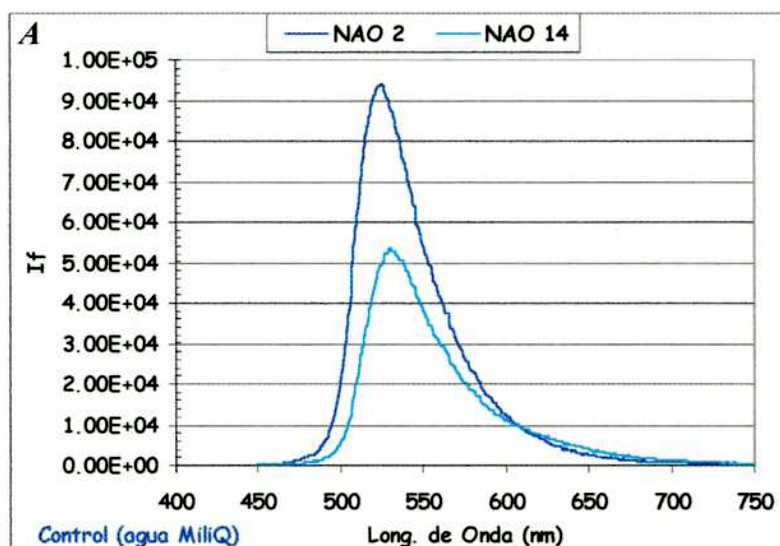
2.5.1.- Puesta a punto sobre sistemas modelos de liposomas:

2.5.1.1.- Espectros de emisión de NAO en función de la concentración de la sonda:

Para la puesta a punto de esta técnica, se utilizaron sistemas modelos de liposomas unilamelares contruídos utilizando concentraciones y relaciones de fosfolípidos conocidas. Los ensayos se realizaron utilizando agua grado MiliQ para asegurar que los fosfolípidos se encuentren cargados y que no exista apantallamiento de cargas debido a la presencia de iones en las soluciones.

En los ensayos se utilizaron como fosfolípidos aniónicos ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) al 10, 20 y 40 mol% y 90, 80 y 60 mol% fosfatidilcolina (PC) respectivamente. Además, se utilizó como control adicional fosfatidiletanoamina (PE).

En la **Figura 37** se muestran los controles de fluorescencia de la sonda en agua (**Figura 37 A**), en liposomas de PC donde la carga neta es cercana a cero (**Figura 37 B**) y en liposomas compuestos por 40mol% PE y 60mol% PC (**Figura 37 C**).



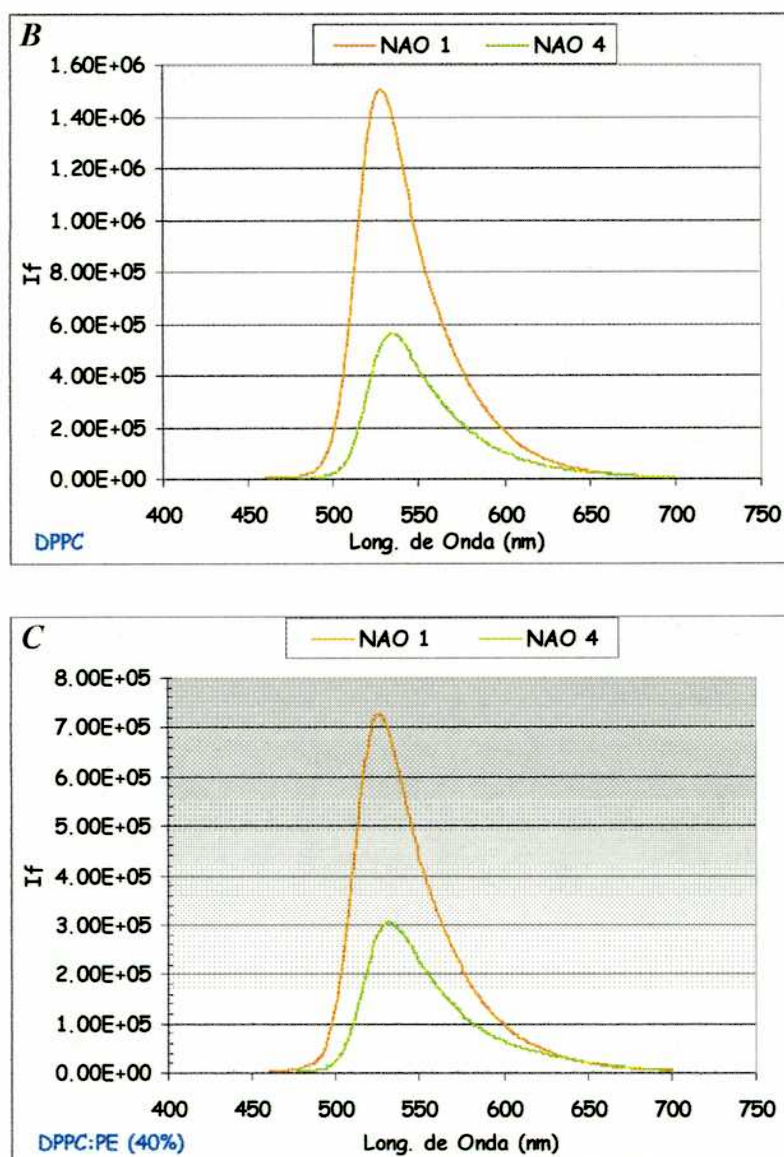
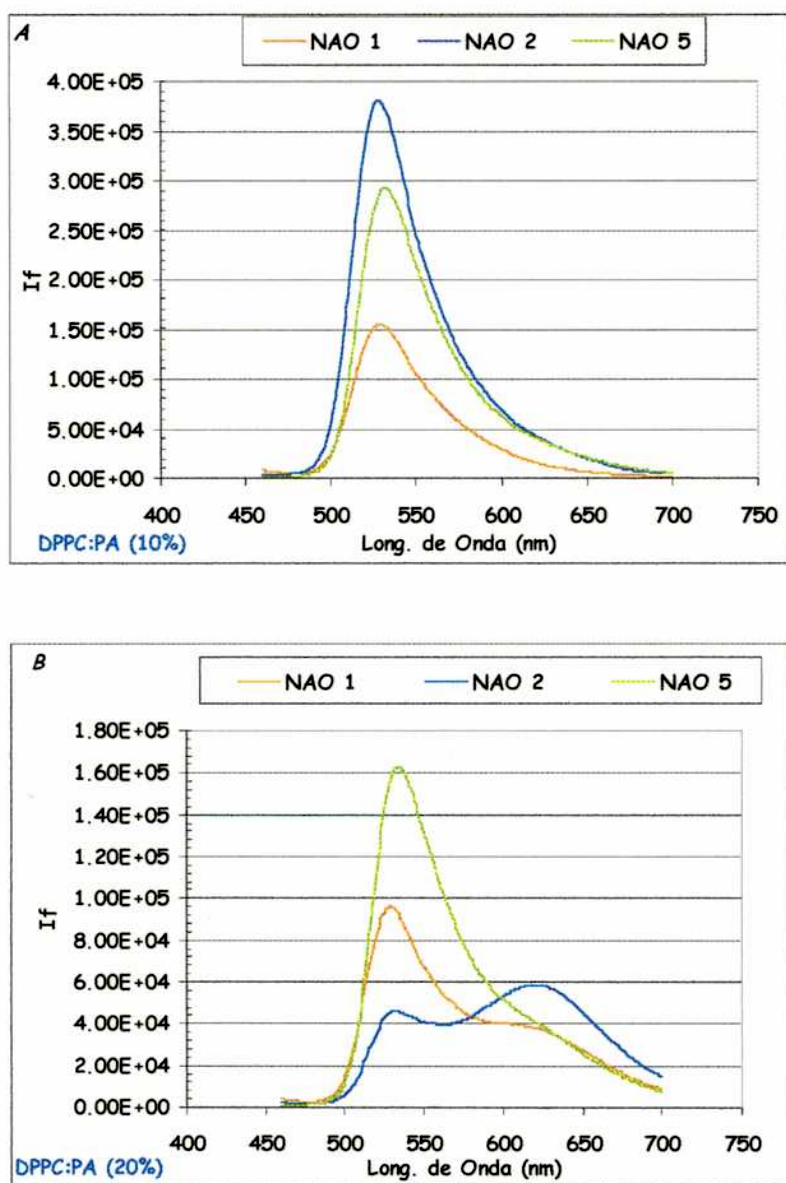


Figura 37: Espectros de emisión de NAO. A: Control de fluorescencia en agua. B: DPPC 100mol%. C: DPPC:PE 60:40 mol%. Los espectros que se muestran en las figuras constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. I_f representa la intensidad de fluorescencia de emisión. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 1: 2.5 μ M; NAO 2: 5 μ M; NAO 4: 10 μ M; NAO 14: 35 μ M.

En las tres figuras se observa que solamente se encuentra presente el pico de emisión del monómero (~530nm) y no se observa la aparición de la banda correspondiente al dímero fluorescente (~630nm) el cual ha sido descrito durante la formación de dominios de cardiolipina. Asimismo, se determinó que a altas concentración de sonda (NAO 4) se induce un fenómeno de extinción de fluorescencia posiblemente debido a la formación de multímeros no fluorescentes.

Los resultados obtenidos con los liposomas indican que la formación de dímeros fluorescentes de NAO es independiente de la presencia de una superficie de adsorción donde la sonda pueda insertarse.

En la **Figura 38** se representan los resultados obtenidos utilizando como sistema modelo al PA. Cuando dicho fosfolípido se encuentra a 10 mol% no se observa la formación del dímero fluorescente, sin embargo cuando se aumenta la concentración del fosfolípido a 20 y 40mol% se observa la banda de emisión del dímero fluorescente (~630nm).



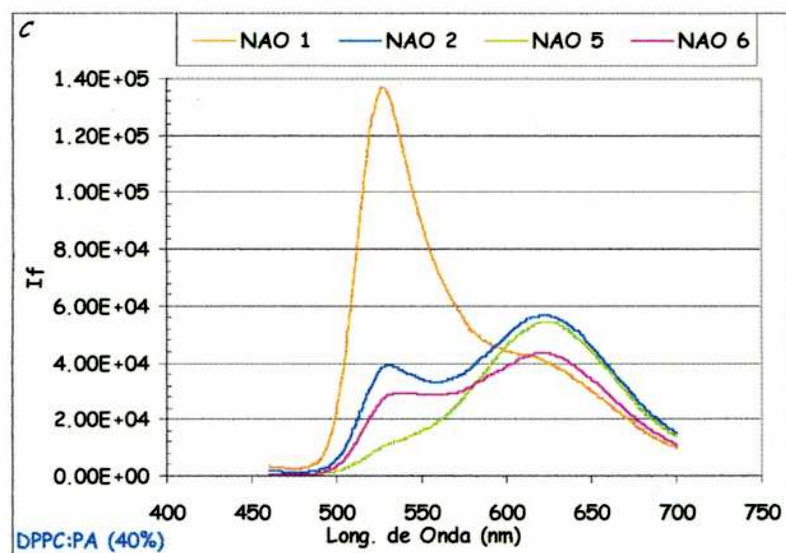
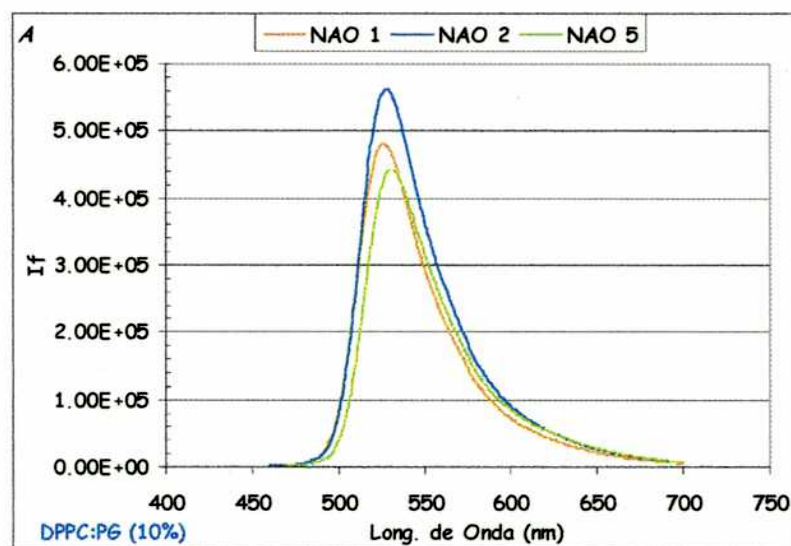


Figura 38: Espectros de emisión de NAO en liposomas compuestos por PA y PC. **A:** DPPC:PA (90:10 mol%). **B:** DPPC:PA (80:20 mol%). **C:** DPPC:PA (60:40 mol%). Los espectros que se muestran en las figuras constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. If: representa la intensidad de fluorescencia de emisión. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 1: 2.5 μ M; NAO 2: 5 μ M; NAO 5: 12 μ M y NAO 6: 15 μ M.

En los liposomas conteniendo 20 mol% de PA aparece la banda del monómero y la del dímero fluorescente en la misma curva a determinada concentración (NAO 2). Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de la sonda (NAO 5) la banda del dímero comienza a disminuir y reaparece la banda de emisión del monómero. Este fenómeno podría atribuirse a la formación de multímeros no fluorescentes sobre la superficie del liposoma y en solución. El mismo fenómeno se observa en los liposomas conteniendo 40mol% de PA.

La **Figura 39** representa los ensayos obtenidos utilizando PG como fosfolípido cargado negativamente.



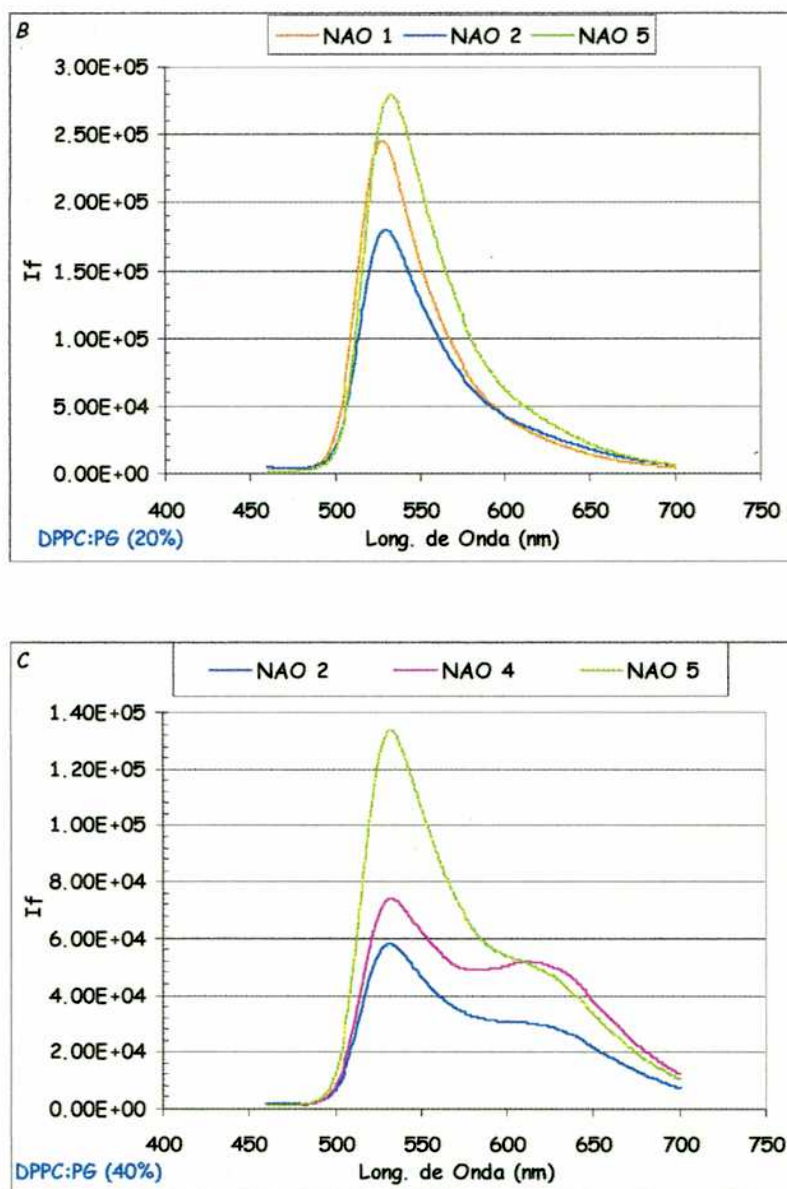
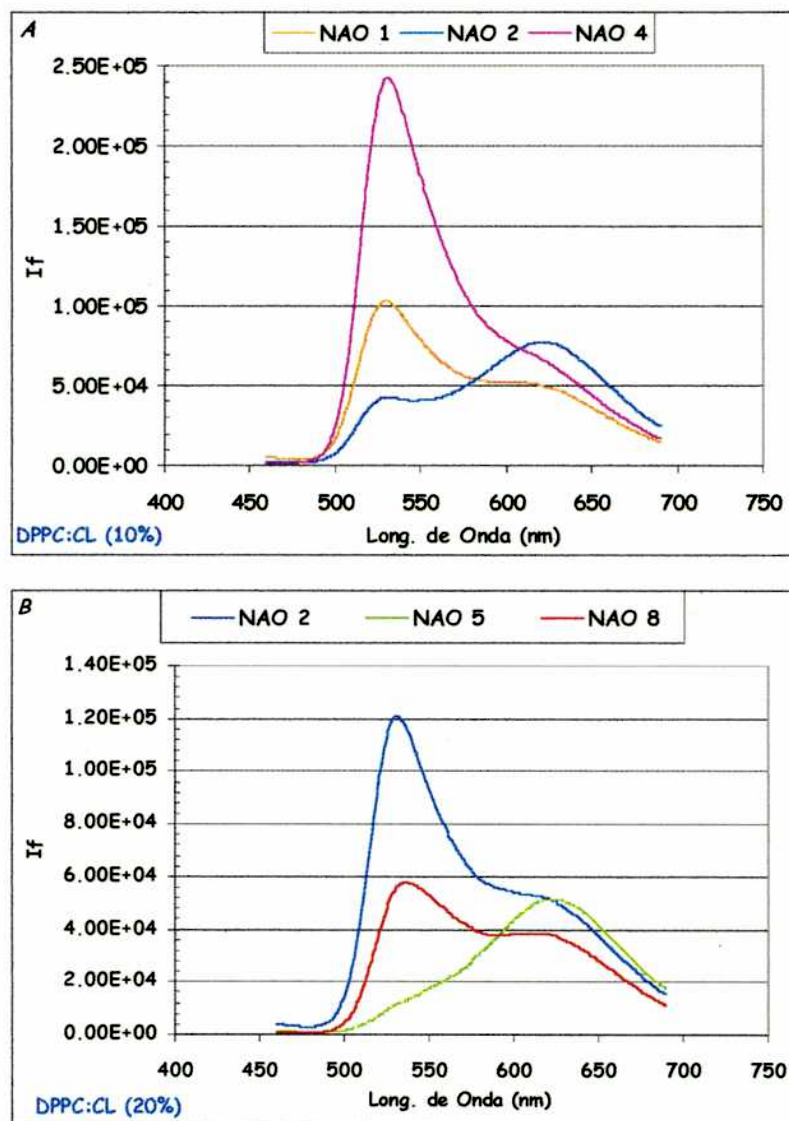


Figura 39: Espectros de emisión de NAO en liposomas compuestos por PG y PC. **A:** DPPC:PG (90:10 mol%). **B:** DPPC:PG (80:20 mol%). **C:** DPPC:PG (60:40 mol%). Los espectros que se muestran en las figuras constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 1: 2.5 μ M; NAO 2: 5 μ M; NAO 4: 10 μ M y NAO 5: 12 μ M.

En los liposomas conteniendo 10mol% y 20mol % de PG (**Figura 39 A y B**) sólo se observa la banda de emisión de fluorescencia del monómero. Sin embargo, cuando la concentración de PG es de 40mol% (**Figura 39 C**) comienza a aparecer la banda de emisión del dímero, incluso a bajas concentraciones de sonda (NAO 2). Además, al igual que en los liposomas que contienen PA, el aumento de la concentración de la sonda induce la desaparición del dímero.

En la **Figura 40** se observan los ensayos obtenidos utilizando a la CL como fosfolípido cargado negativamente. En los liposomas conteniendo 10mol% de CL (**Figura 40 A**) se observa la formación del dímero aún a bajas concentraciones de sonda (NAO 1). A medida que aumenta la concentración de CL en la bicapa, la formación de dímero es más evidente. Cuando los liposomas contienen 20mol% de CL (**Figura 40 B**) a determinadas concentraciones de la sonda (NAO 5 y 6) prácticamente no existe la banda del monómero siendo predominante la banda del dímero fluorescente. Este fenómeno había sido mencionado previamente en los liposomas que contienen 40 mol% de PA y ocurre cuando se utilizan determinadas concentraciones de sonda. A medida que aumenta la concentración de la misma, la banda del dímero comienza a desaparecer y reaparece con mayor intensidad la del monómero. El mismo tipo de fenómeno se observa en los liposomas que coentienen 40mol% de CL.



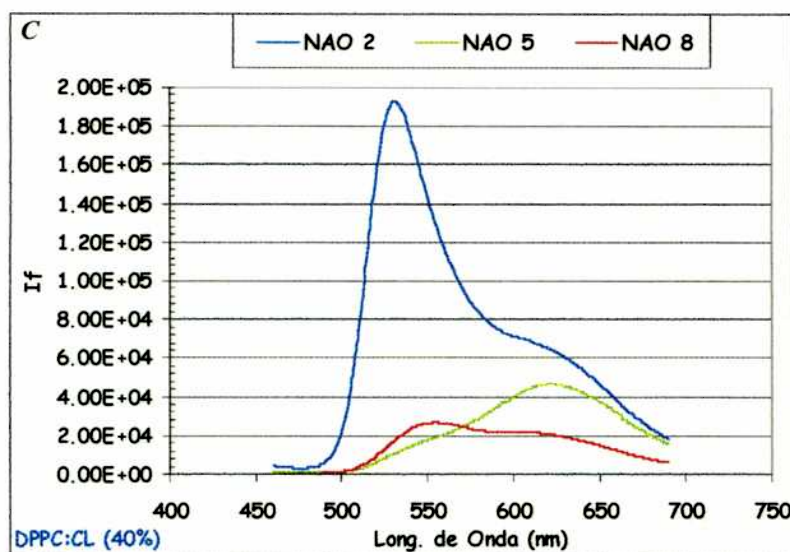


Figura 40: Espectros de emisión en liposomas de CL:PC. **A:** DPPC:CL (90:10 mol%). **B:** DPPC:CL (80:20 mol%). **C:** DPPC:CL (60:40 mol%). Los espectros que se muestran en las figuras constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. If: intensidad de fluorescencia. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 1: 2.5 μ M; NAO 2: 5 μ M; NAO 4: 10 μ M; NAO 5: 12 μ M; y NAO 8: 20 μ M.

A partir de estos resultados se puede concluir que la presencia de CL contribuye con la aparición del dímero fluorescente (a 630nm) de la sonda NAO sobre la superficie de la bicapa puesto que en los experimentos realizados a bajas concentraciones de sonda (2.5 μ M) y de fosfolípidos aniónicos (10 mol% lípido cargado) se determinó la presencia de la banda de emisión del dímero solamente en los liposomas conteniendo CL. No obstante, la formación de dicho dímero fluorescente no es específica de la presencia de la CL. Los resultados obtenidos con el PA y el PG demuestran que estos fosfolípidos también son capaces de inducir la formación del dímero.

Recientemente, se postuló que la CL formaría una especie de cavidad hidrofóbica en la bicapa (Mileykovskaya *et al.*, 2001) que permitiría a la sonda insertarse en la misma. Los resultados que se mostraron en este capítulo indicarían que la CL estaría formando dichas estructuras hidrofóbicas. No obstante, otros fosfolípidos como PA y PG también serían capaces de formar esos dominios hidrofóbicos que permiten la dimerización de la sonda. Además, se comprobó que es importante determinar la óptima concentración de sonda que se utilizará en los ensayos ya que se pueden obtener resultados erróneos debido a que no siempre se observa aparición de la banda de emisión del dímero.

2.5.1.2.- Determinación del potencial de superficie:

Para determinar si la carga neta presente en los liposomas era fundamental para la diferencia observada en los espectros de emisión de la sonda NAO, se realizaron ensayos de carga neta de superficie utilizando las mismas mezclas de fosfolípidos.

En la **Figura 41** se encuentran los resultados obtenidos utilizando la sonda fluorescente ácido anilino naftaleno -8- sulfónico (ANS). Como se puede observar no existen diferencias significativas entre los valores de potencial de superficie determinados para los liposomas de PG y CL. Sólo existen leves diferencias con los liposomas de PA cuando los mismos están compuestos por 40mol% de fosfolípido cargado negativamente. Además, se observan diferencias entre los valores obtenidos para los liposomas de fosfolípidos aniónicos y los liposomas contruïdos conteniendo PE.

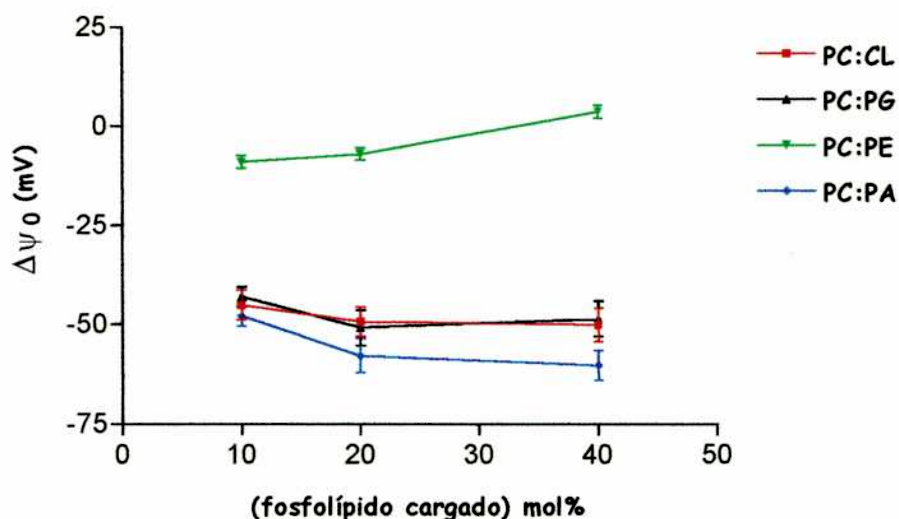


Figura 41: Potencial de superficie medido sobre liposomas modelos. El potencial de superficie fue medido sobre liposomas contruïdos a partir de las distintas composiciones molares de los fosfolípidos cargados y PC. $\Delta\Psi_0$: potencial de superficie en milivolts (mV).

A partir de estos resultados se puede concluir que la diferencia observada en la formación del dímero fluorescente en los liposomas que contienen PA, PG y particularmente CL no se debe a la presencia de una carga neta diferencial entre los mismos. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, la formación del dímero de la sonda sería debido a la formación de “estructuras” hidrofóbicas en la superficie de la bicapa y no a la carga superficial que presenten los liposomas.

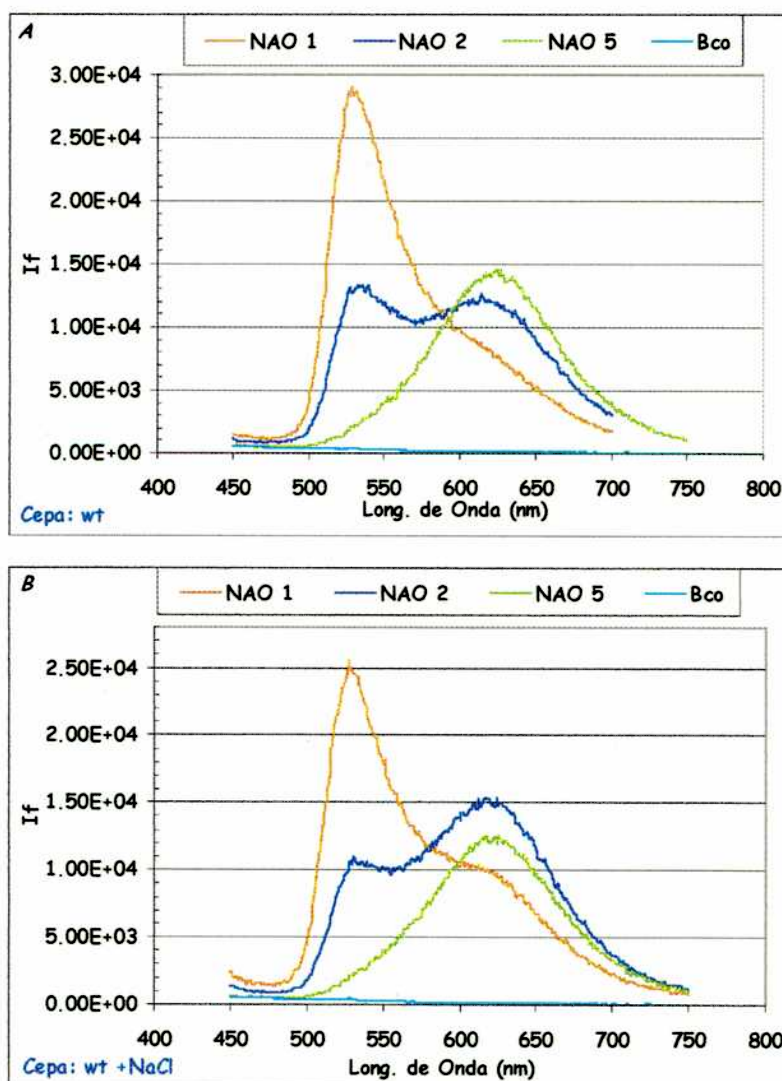
2.5.2.- Determinación de dominios de cardiolipina en muestras biológicas:

2.5.2.1.- Determinación de dominios de cardiolipina sobre liposomas de lípidos totales obtenidos de las cepas YB886 y CL2:

Se realizaron ensayos utilizando liposomas contruídos a partir de lípidos totales de la cepa salvaje de *B. subtilis* y de una cepa mutante para la biosíntesis de cardiolipina (CL2) con el propósito de determinar si en liposomas contruídos con lípidos provenientes de muestras biológicas complejas era capaz de observarse la formación del dímero de NAO.

Se contruyó una cepa mutante para la biosíntesis de cardiolipina para determinar la contribución de este fosfolípido aniónico durante la adaptación a altas concentraciones salinas. Su caracterización bioquímica se describe más adelante. En estos ensayos la cepa mutante fue utilizada como control ya que no posee cardiolipina en su membrana.

En la **Figura 42 A** y **B** se muestran los resultados obtenidos en liposomas de la cepa salvaje y en la **Figura 42 C** y **D** los obtenidos para la cepa mutante. Al igual que en los liposomas modelo los ensayos se realizaron utilizando agua grado MiliQ.



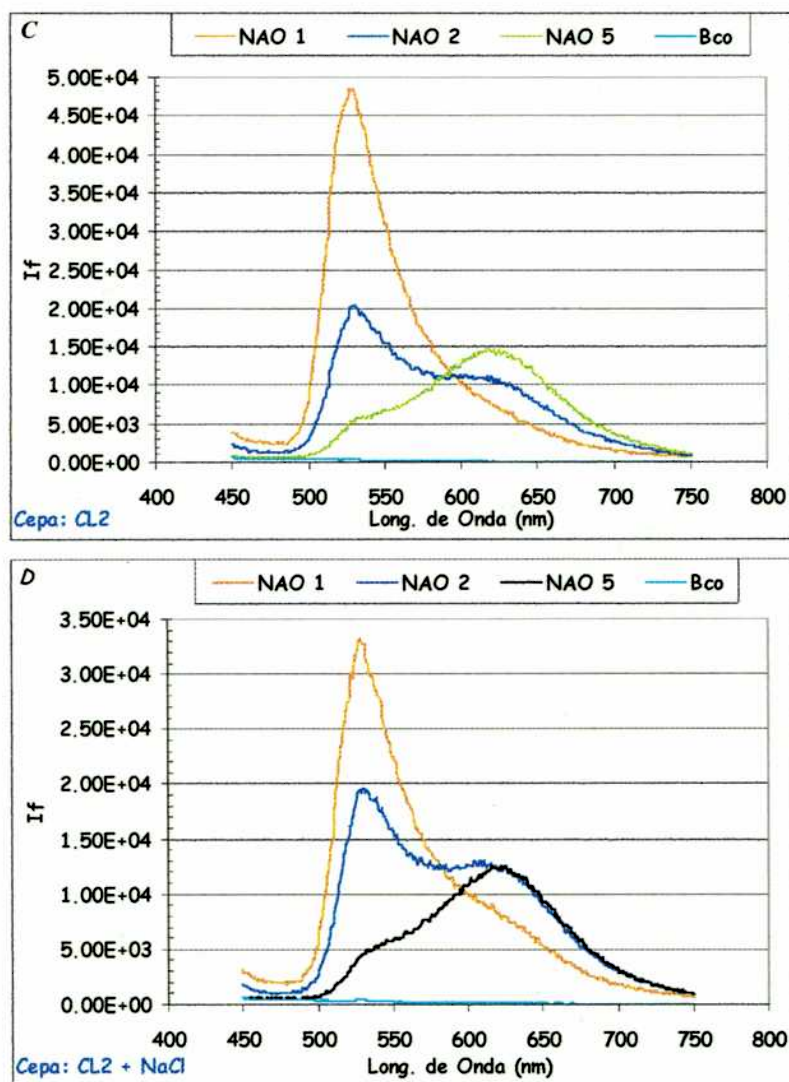


Figura 42: Espectros de emisión de NAO en función de la concentración de la sonda. A: cepa wt crecida bajo condiciones normales. B: cepa wt crecida en 1.5M de NaCl. C: cepa CL2 crecida bajo condiciones normales. D: cepa CL2 crecida en 1.5M de NaCl. Los espectros que se muestran en las figuras constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 1: 2.5 μ M; NAO 2: 5 μ M; NAO 5: 12 μ M. Se incluye un blanco de liposomas sin marcar.

Para la cepa salvaje tanto en los liposomas de wt como en los de wt+NaCl se observa la formación del dímero (~630nm). Ambos tipos de liposomas presentan un comportamiento similar frente a las distintas concentraciones de sonda ensayadas independientemente de la composición que presentan los mismos. Sin embargo, en las curvas correspondientes a NAO 2 la banda del dímero es más importante en wt+NaCl donde la concentración de cardiolipina es de 46% en comparación con wt que posee un 23% de la misma.

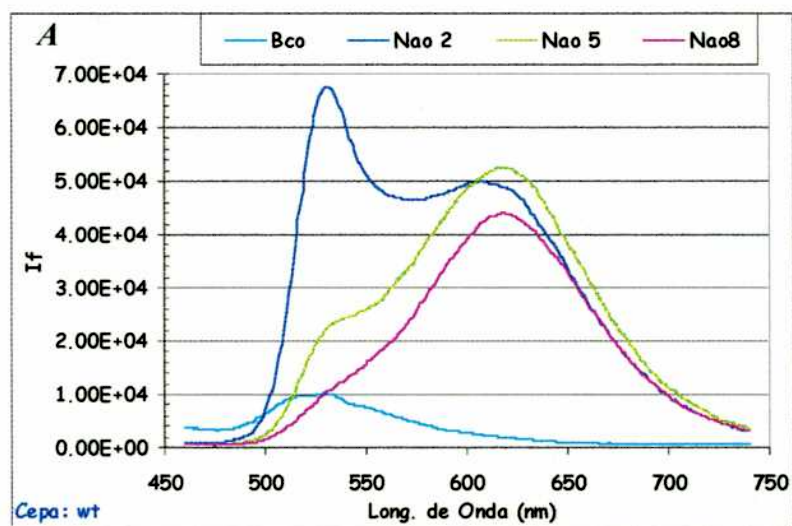
En el caso de la cepa mutante para la biosíntesis de CL se observa la aparición de la banda del dímero tanto bajo condiciones normales como de estrés osmótico. Este resultado

concuera con los obtenidos con los sistemas modelos de liposomas y estaría indicando que no es necesaria la presencia de CL en la bicapa lipídica para inducir la formación del dímero fluorescente. Es importante destacar que esta cepa contiene como único fosfolípido aniónico al PG en un 75% bajo condiciones normales y en un 83% bajo condiciones de estrés (la caracterización bioquímica de esta cepa se presenta en otro capítulo de esta tesis).

En resumen, se puede concluir que la presencia de cardiolipina en los lípidos de membrana de *B. subtilis* no es necesaria para la formación de dímeros fluorescentes de NAO. No obstante, se puede inferir que en la cepa mutante CL2 la elevada concentración de PG este generando los dominios hidrofóbicos mencionados por Mileykovskaya y colaboradores (2001).

2.5.2.2.- Determinación de dominios de cardiolipina sobre membranas aisladas obtenidas de las cepas YB886 y CL2:

Se realizaron ensayos utilizando membranas aisladas de la cepa salvaje y de la cepa mutante para la biosíntesis de cardiolipina (CL2) para determinar si al igual que lo observado en *E. coli* (Mileykovskaya & Dowhan, 2000), en las membranas de *B. subtilis* era capaz de observarse la formación del dímero de NAO.



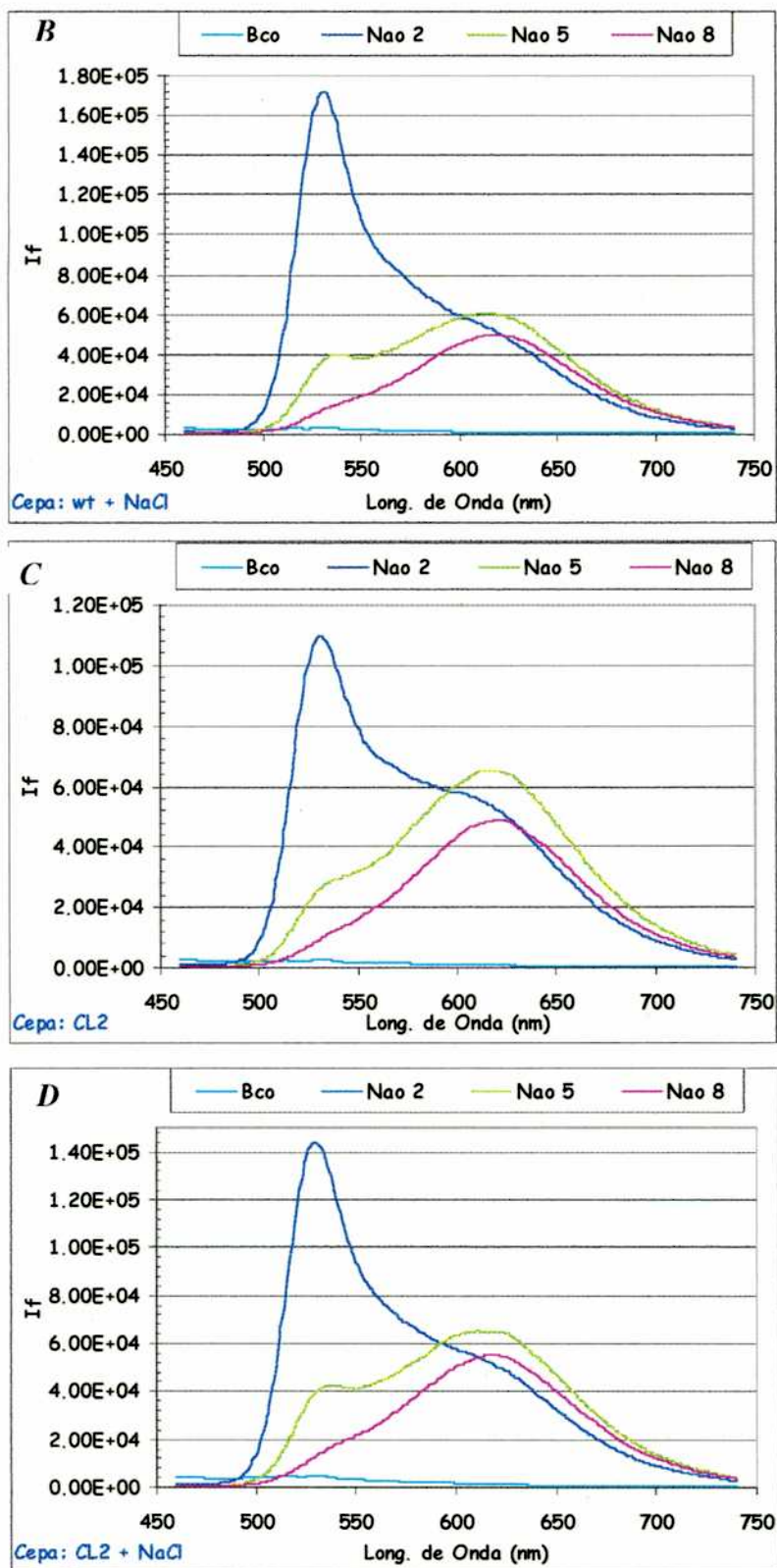


Figura 43: Espectros de emisión de fluorescencia de NAO en función de la concentración de la sonda. A: cepa wt crecida bajo condiciones normales. B: cepa wt crecida en 1.5M de NaCl. C: cepa CL2 crecida bajo condiciones normales. D: cepa CL2 crecida en 1.5M de NaCl. Los espectros representan un experimento representativo de los ensayos realizados. If: intensidad de fluorescencia. Concentraciones utilizadas de sonda: NAO 2:2.5 μ M; NAO 5: 12 μ M; NAO 8: 20 μ M; Bco: blanco de membranas sin marcar.

En la **Figura 43 A y B** se pueden ver los resultados obtenidos con las membranas de la cepa salvaje crecida bajo ambas condiciones de crecimiento. En comparación con los resultados obtenidos con los liposomas, es necesario agregar una mayor cantidad de sonda sobre las membranas para observar la aparición de la banda de emisión del dímero. A determinadas concentraciones de sonda (NAO 5) en la muestra wt el pico del dímero es más importante que el del monómero comparado con la muestra wt+NaCl. Este fenómeno puede deberse al cambio en la composición de proteínas que se produce durante la adaptación al estrés pues no se descarta una interacción inespecífica de la sonda con las proteínas de membrana.

En la **Figura 43 C y D** se presentan los resultados obtenidos con las membranas de la cepa mutante CL2. Al igual que con los liposomas, el dímero es capaz de formarse aún en ausencia de CL en la membrana. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para la cepa salvaje se observa que los espectros correspondientes a la misma condición de crecimiento (wt vs CL2 y wt+NaCl vs CL2+NaCl) son similares entre sí. En ambos casos, a determinadas concentraciones de sonda, el pico del dímero es más importante que el del monómero en las muestras crecidas bajo condiciones normales respecto a las crecidas bajo condiciones de estrés. No obstante, no se puede descartar que el aumento en el grado de empaquetamiento de las membranas de wt+NaCl (**Figuras 17, 18 y 32B**) no esté afectando la inserción de la sonda en la bicapa o la formación de los dímeros sobre la superficie de la misma. En la mutante para la biosíntesis de cardiolipina, también se determinó que existe un aumento en el empaquetamiento de las membranas cuando las células se crecen bajo condiciones de estrés osmótico (ver **Capítulo 3** de esta tesis) y quizá este cambio sea el que provoque las variaciones observadas en la formación del dímero.

Estos resultados, en conjunto con aquellos obtenidos a partir de los sistemas modelo de liposomas, reafirman observaciones previas realizadas por distintos laboratorios los cuales utilizan como sistema modelo a la membrana mitocondrial. En estos trabajos se indica que la dimerización de la sonda NAO se produce principalmente debido a interacciones hidrofóbicas (Septinus *et al.*, 1983) y que la adsorción de la misma es independiente de la presencia de la CL y de su carga negativa (Keij *et al.*, 2000). Asimismo, los experimentos presentados en este capítulo sugieren que otros fosfolípidos aniónicos (como el PG) serían capaces de formar dominios hidrofóbicos en la superficie de las bicapas que permiten la dimerización de la sonda.

INTRODUCCIÓN.

E.- Fosfolípidos aniónicos.

E.1.- Rol de los fosfolípidos aniónicos:

Los principales fosfolípidos aniónicos que se encuentran en las membranas bacterianas son el fosfatidilglicerol (PG) y la cardiolipina (CL). Ambos desempeñan un rol importante en distintos procesos biológicos como la transducción energética, el transporte de solutos, el transporte de proteínas, la transducción de señales y la motilidad celular (Matsumoto, 2001). Estos procesos biológicos serían llevados a cabo debido a la contribución de las propiedades físico-químicas de los lípidos aniónicos a su estado de fase y a su interacción con las proteínas. Se ha demostrado que la CL es un factor importante en el mantenimiento de la actividad de diversas proteínas integrales de membrana como las NADH deshidrogenasas, el complejo citocromo *bc1*, la ATP sintasa, la citocromo *c* oxidasa, y diversas proteínas "carrier" (Mc Auley *et al.*, 1999). La interacción más conocida es el requerimiento de cardiolipina que presenta la proteína citocromo *c*. Luego de una extensiva purificación, la enzima contiene al menos una molécula de CL fuertemente unida y la misma no puede ser removida sin la consecuente destrucción de la actividad enzimática.

Además de la interacción específica de la CL y el PG con proteínas integrales de membrana, estos lípidos desempeñan un rol crucial en la adsorción de una gran variedad de péptidos y proteínas solubles sobre la superficie de la bicapa lipídica.

Estudios bioquímicos y genéticos realizados con mutantes de biosíntesis de estos fosfolípidos en *E. coli* demostraron que los fosfolípidos aniónicos se encuentran involucrados en procesos celulares como la activación de complejos inactivos de la proteína iniciadora de la replicación (DnaA-ADP), la iniciación de la replicación de OriC y la traslocación a través de la membrana interna de las proteínas dependientes de SecA (Dowhan, 1997)

E.2.- Características de la cardiolipina:

La CL es el único fosfolípido que posee una estructura dimérica, resultado de la condensación de dos moléculas de fosfatidilglicerol, contiene cuatro cadenas parafinicas y dos cargas negativas. Cada grupo fosfato posee un protón ácido, no obstante estos fosfatos poseen diferentes constantes de acidez ($pK_1 = 2.8$ y $pK_2 > 7.5$). La acidez débil que presenta el segundo fosfato se debe probablemente a la formación estable a nivel intramolecular de puentes hidrógenos con el grupo central 2'-hidroxilo de la misma molécula.

En lo que respecta a la estructura de fase adoptada por la CL existen evidencias considerables acerca del polimorfismo que presenta este fosfolípido. Entre éstas se encuentran la fase lamelar y la hexagonal. Esta última está favorecida en presencia de cationes divalentes (Vasilenko *et al.*, 1982), a bajos pH y a altas concentraciones iónicas. A diferencia de ello, la presencia de proteínas y de polilisinas, estabilizan la fase lamelar. La inducción de la fase hexagonal debida a la concentración iónica y al bajo pH indica la importancia de las cargas de las cabezas polares en el comportamiento de fase (Tocanne & Teissie, 1990). No obstante, la relevancia biológica del polimorfismo que puede adoptar la CL es aún desconocido.

La presencia de CL induciría la formación de estructuras locales del tipo no-lamelar dentro de las membranas biológicas. Estas estructuras podrían estar involucradas en la dinámica propia de la bicapa, en el movimiento transmembrana de determinadas proteínas y en la dinámica de formación de sitios de contacto en la membrana. Sin embargo, Schlame y colaboradores (Schlame *et al.*, 2000) postulan que la mayoría de las moléculas de CL presentes en las membranas biológicas deben encontrarse bajo una conformación lamelar ya que ésta es fundamental para la viabilidad celular. No obstante, Mileykovskaya & Dowhan (2000) postulan que la formación de estructuras no lamelares se produce en regiones de las membranas donde existe un aumento en el radio de curvatura como ocurre cerca de los polos celulares. En particular, estos autores plantean que la cardiolipina se localizaría preferentemente en los sitios donde se forman los septos de división celular puesto que la formación de estructuras no lamelares favorecerían este proceso.

La CL se encuentra únicamente en las membranas de algunas bacterias y en las mitocondrias. Ambos tipos de membranas poseen un diseño particular que les permite generar el potencial electroquímico necesario para el transporte de sustratos y para la síntesis de ATP. Si bien, durante décadas la función de la cardiolipina en la membrana citoplasmática ha sido desconocida (Schlame *et al.*, 2000) reciente la identificación de los genes que codifican para las enzimas involucradas en su biosíntesis y la consecuente generación de células mutantes (en bacterias y en levaduras) han proporcionado una poderosa herramienta para lograr comprender tanto su biosíntesis como su función (Dowhan, 1997; Matsumoto, 2001).

La vía biosintética de la CL es similar a otras vías de biosíntesis de fosfolípidos, y sus pasos involucran intermediarios comunes. No obstante, la fase final de su biosíntesis es diferente en eucariotas y en procariotas. La cardiolipina sintasa de procariotas cataliza una transesterificación en la cual la porción fosfatidil de un fosfatidilglicerol es transferida a un

grupo 3'-hidroxilo libre de otro fosfatidilglicerol. A diferencia de ello, en las células eucariotas la cardiolipina sintasa une un grupo fosfatidil activado de un fosfatidil-CMP a un fosfatidilglicerol. Si bien la CL sintasa de los organismos eucariotas es una enzima mitocondrial y por consiguiente derivada filogenéticamente de un procariota ancestral, aparentemente la transición de bacteria a mitocondria habría involucrado una transición del mecanismo de reacción enzimático. Hasta el presente se desconoce la razón por la cual ocurrió esta transición.

E.3.- Características bioquímicas de células mutantes para la biosíntesis de PG y de CL:

Una mutación en el gen *pgsA* que codifica para la enzima involucrada en la biosíntesis de PG en *E. coli* produce inviabilidad en ese microorganismo. Sin embargo, dicha viabilidad puede recuperarse si las células no poseen la principal lipoproteína de *E. coli* denominada Lpp (Kikuchi *et al.*, 2000). La síntesis de Lpp consume una cantidad equimolar de PG con el propósito de modificar la lipoproteína. Resultados recientes demostraron que en ausencia de PG la acumulación de Lpp no modificada provoca anomalías en la membrana celular y por lo tanto la lisis de las células. Esta lisis ocurriría como resultado de la unión de Lpp con el peptidoglicano (Susuki *et al.*, 2002). Observaciones realizadas *in vitro* demostraron que frente a la ausencia de PG y de CL *E. coli* acumula ácido fosfatídico (PA) (Kikuchi *et al.*, 2000) el cual sería capaz de reemplazar a dichos fosfolípidos en diversos procesos biológicos como el de la reactivación de los complejos DnaA-ADP antes mencionados (Castuma *et al.*, 1993).

Recientemente, Matsumoto (2001) postuló que debido a que los fosfolípidos aniónicos no son esenciales para la viabilidad de las células de *E. coli*, se podría agrupar al rol fisiológico que presentan dichos fosfolípidos en dos grupos:

- i) aquellos que actúan como sustratos de reacciones enzimáticas dependientes de la cabeza polar de los fosfolípidos.
- ii) aquellos que pueden ser reemplazados en parte o completamente por otros fosfolípidos que contengan una carga neta negativa.

La sensibilidad a la temperatura observada en la mutante de *E. coli* sugeriría que en estas células existen funciones específicas de cabezas polares desconocidas hasta el presente, que requieren de PG a temperaturas mayores de 40°C. Esta sensibilidad sería dependiente de la presencia de PG ya que células mutantes para la biosíntesis de CL no son sensibles a altas temperaturas. En este caso el PA aparentemente no podría reemplazar dichas funciones. El

PG es utilizado como el precursor en la síntesis del oligosacárido presente en la membrana de *E. coli*, siendo este componente fundamental en el mantenimiento de la osmolaridad del periplasma celular (Matsumoto, 2001).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la interrupción de los genes que codifican para PG y para CL no produce un fenotipo letal sobre las células, sin embargo se observa que las funciones mitocondriales de las mismas se encuentran comprometidas (Chang *et al.*, 1998). Estos resultados indicarían que dichos lípidos aniónicos son indispensables para la organela. Aparentemente, en levaduras la presencia de al menos uno de estos fosfolípidos es fundamental y sus funciones podrían ser reemplazadas entre ellos.

3.- Construcción y caracterización bioquímica de cepas de *B. subtilis* mutantes para la biosíntesis de lípidos aniónicos:

3.1.- Construcción y caracterización bioquímica de cepas de *B. subtilis* mutantes para la biosíntesis de cardiolipina:

En el **Capítulo 1** se demostró que el crecimiento en hiperosmolaridad y el shock osmótico al cual son sometidas las células de *B. subtilis* conducen a un aumento en la síntesis de CL. Con el propósito de investigar si este fosfolípido es fundamental para el crecimiento de *B. subtilis* en alta osmolaridad, se decidió construir una cepa mutante para la enzima CL sintasa, involucrada en su biosíntesis.

A partir de la secuenciación completa del genoma de *B. subtilis* se determinó que existen tres genes homólogos al gen que codifica para la enzima CL sintasa (*cls*) de *E. coli*. Dichos genes son *ywnE* (*cls2*), *ywiE* (*cls1*) y *ywjE*.

Matsumoto y colaboradores (1999) han descrito que en la cepa Marburg de *B. subtilis*, sólo el gen *ywnE* estaba implicado en la síntesis de CL. Sin embargo, recientemente se realizaron análisis de “microarrays” de ADN y se detectó que el gen *ywiE* se inducía durante el estrés por NaCl y por etanol (Price *et al.*, 2001, Petersohn *et al.*, 2001). Finalmente se describió que dicho gen posee un promotor reconocido por el factor σ^B , implicado en la respuesta a estrés en esta especie (Petersohn *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta estos resultados contradictorios se decidió construir las cepas mutantes para los genes *ywiE* y *ywnE* en el contexto genético YB886 (cepa salvaje control en esta tesis) para evaluar su rol en la síntesis de CL durante el crecimiento en alta osmolaridad.

3.1.1.- Construcción de las cepas:

La estrategia utilizada para obtener las distintas cepas mutantes (ver Materiales y Métodos) tuvo dos objetivos fundamentales: interrumpir el gen en estudio para analizar su fenotipo frente al estrés osmótico y determinar la actividad transcripcional del mismo. Para obtener las cepas deseadas se clonaron fragmentos de los genes *ywiE* y *ywnE* en el plásmido integrativo pMutin-4 dando origen a los plásmidos pCL29 y pEC20 correspondientes. El plásmido pMutin-4 lleva el gen *lacZ* (sin su promotor) que fue utilizado como gen reportero de la actividad transcripcional. Este vector, además, no replica en *B. subtilis*, por lo tanto cuando se transforma esta especie, el mismo se pierde o recombina con el cromosoma bacteriano. Esta recombinación homóloga sólo ocurre cuando se ha clonado en el plásmido

algún gen (o secuencia de ADN) que posee una región homóloga en el cromosoma bacteriano. En este caso, la recombinación se efectuó por medio de los fragmentos correspondientes a los genes *ywiE* (*cls1*) y *ywnE* (*cls2*) presentes en los plásmidos pCL29 y pEC20 respectivamente dando como resultado las cepas CL1 y CL2.

Luego de realizadas las construcciones y transformaciones correspondientes, se procedió a comprobar que las cepas tenían interrumpidos los genes de interés mediante las técnicas que se describen a continuación.

3.1.1.1.- Construcción de la cepa CL1, mutante para el gen *ywiE*:

En la **Figura 44 A** se muestra la construcción cromosómica realizada en la cepa CL1.

Construcción en cepa CL1

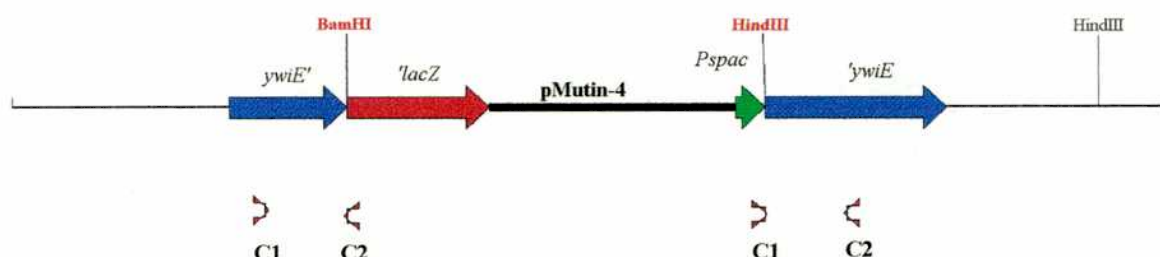


Figura 44 A: Construcción presente en el cromosoma de la cepa CL1. Se indican los distintos elementos producto de la integración del plásmido pCL29 en el cromosoma de la cepa YB886 dando origen a la cepa CL1. *ywiE'*: indica que dicho gen está interrumpido en su extremo 3'; *'lacZ*: indica que el gen *lacZ* no posee su propio promotor y por lo tanto su transcripción depende del gen *ywiE*; *Pspac*: promotor inducible por IPTG; *'ywiE*: parte 3' de dicho gen. Se indican también la ubicación de los "primers" utilizados para el clonado y construcción de la sonda para el análisis por Southern Blot (C1 y C2). Por simplicidad sólo se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* (los sitios en color rojo fueron generados durante esta construcción)

Para confirmar la construcción de esta cepa se realizó un ensayo de Southern Blot con ADN cromosómico extraídos de las cepas CL1 y YB886 (control) digeridos con la enzima de restricción *HindIII*. Como sonda se utilizó un fragmento amplificado con los "primers" C1 y C2 como se detalla en Materiales y Métodos.

En la **Figura 44 B** se observa que en la cepa CL1 se detecta una señal que corresponde a un fragmento de aproximadamente 1.5 Kpb producto de la inserción del plásmido pCL29 en el cromosoma de la cepa YB886 (comparar líneas 1 y 2). Como se observa en la **Figura 44 A** este fragmento se origina al generarse un nuevo sitio de restricción para la enzima *Hind*III durante la construcción de esta cepa.

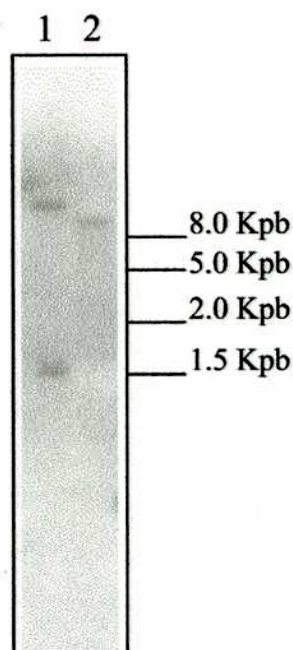


Figura 44 B: Southern Blot para verificar la construcción de la cepa CL1. El ADN cromosómico de cada cepa se digirió con la enzima *Hind*III y el Southern Blot se realizó como se describe en Materiales y Métodos. **Línea 1:** cepa CL1; **línea 2:** cepa salvaje YB886. Se indican los marcadores de peso molecular. Kpb (kilopares de bases).

3.1.1.2.- Construcción de la cepa CL2, mutante para el gen *ywnE*:

En la **Figura 45 A** se describe la construcción presente en la cepa CL2. Para verificar la misma se realizó un ensayo de PCR donde se utilizaron los “primers” C5 y LZ. El “primer” LZ es complementario al gen *lacZ* presente en el plásmido integrado en las cepas CL2 y BFS219 (control positivo de la reacción). Esta última no es isogénica a la cepa YB886 utilizada en este trabajo y fue construida con el mismo plásmido pEC20 en el contexto genético de la cepa 168 por el Dr. P. Stragier.

En la **Figura 45 B** se observa la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 1.3 Kpb) sólo en las cepas CL2 y Bfs219, mientras que el mismo está ausente en la cepa YB886. Los otros fragmentos de diferentes tamaños que se observan en

todas las cepas son productos espurios de la reacción de PCR debido a amplificaciones inespecíficas.

Construcción en cepa CL2

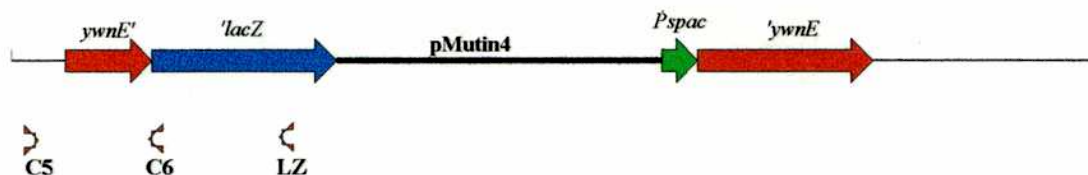


Figura 45 A: Construcción presente en el cromosoma de la cepa CL2. Se indican los distintos elementos producto de la integración del plásmido pEC20 en el cromosoma de la cepa YB886 dando origen a la cepa CL2. *ywnE'*: indica que dicho gen está interrumpido en su extremo 3'; *'lacZ*: indica que el gen *lacZ* no posee su propio promotor y por lo tanto su transcripción depende del gen *ywnE*; *Pspac*: promotor inducible; *'ywnE*: parte 3' de dicho gen. Se indican también los "primers" utilizados para el posterior análisis por PCR (C5 y LZ). y el "primer" C6 que fue utilizado para la construcción de la cepa CL21.

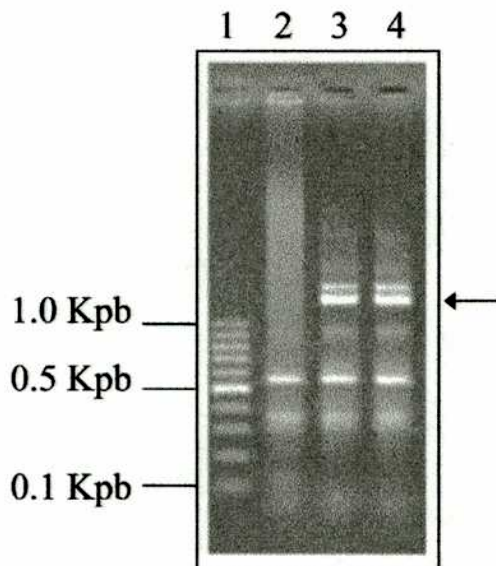


Figura 45 B: Verificación de la cepa CL2 mediante PCR. El ADN cromosómico de las distintas cepas fue utilizado en una reacción de PCR con los "primers" C5 y LZ como se describe en Materiales y Métodos. Los fragmentos fueron resueltos en un gel de agarosa 1.2%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: cepa salvaje YB886; línea 3: cepa CL2; línea 3: cepa Bfs219. Se indican las posiciones de algunos marcadores de peso molecular. Kpb (kilopares de bases). La flecha indica la posición del fragmento esperado (aprox. 1.3 Kpb).

Como se observa en las **Figuras 44 B** y **45 B**, las cepas CL1 y CL2 poseen las construcciones esperadas para los genes de interés. Por simplicidad se utilizará *cls1* para referirse al gen *ywiE* y *cls2* para referirse al gen *ywnE*.

Una vez confirmado esto, se procedió a estudiar la composición lipídica de las distintas cepas con el objetivo de determinar cual/es es/son los genes involucrado/s en la biosíntesis de CL.

3.1.2.- Composición lipídica de las membranas de las cepas CL1 y CL2:

3.1.2.1.- Composición fosfolipídica de las cepas CL1 y CL2:

El análisis de la composición de lípidos polares de la cepa CL1, la cual posee interrumpido el gen *cls1*, se muestra en la **Figura 46**. En esta figura se observa que la cepa CL1 presenta el mismo perfil lipídico que la cepa salvaje, incluyendo la presencia de CL.

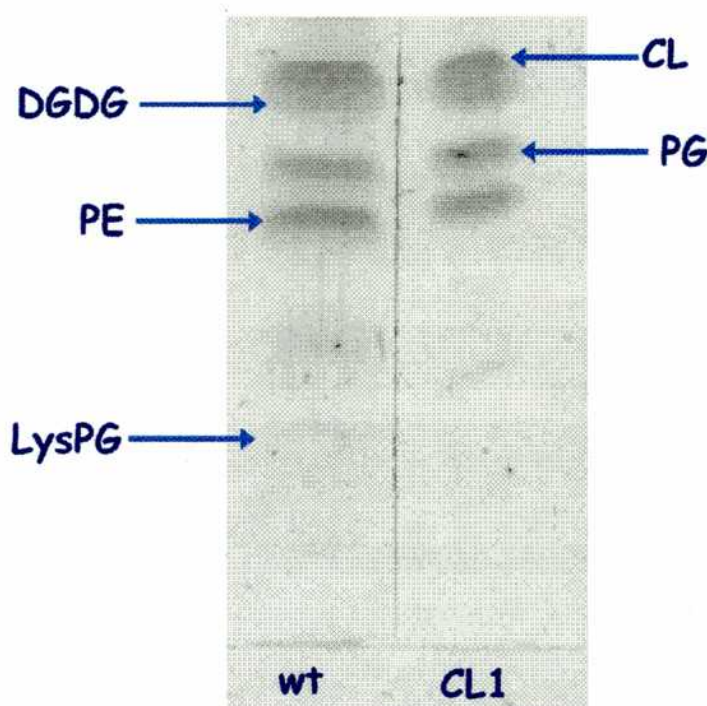


Figura 46: HPTLC: Patrón de lípidos polares. HPTLC Silicagel 60 / F₂₅₄ Merck Artículo n° 5628. Sistema de solvente de desarrollo Cloroformo: Metanol: Ac. Acético (65:25:5; v:v:v). wt: cepa salvaje, CL1: cepa mutante para el gen *cls1*.

A pesar de que no se observaron diferencias en el perfil de lípidos polares entre ambas cepas se procedió a la cuantificación de los mismos (**Figura 47**).

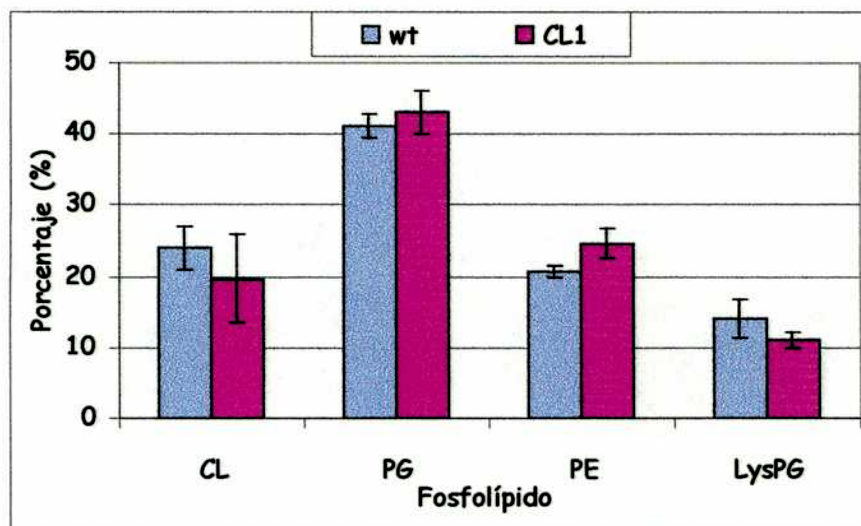


Figura 47: Composición porcentual de los fosfolípidos de la cepas wt y CL1. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

No existen diferencias significativas entre los porcentajes de los fosfolípidos de la cepa salvaje y los de la cepa mutante CL1. Estos resultados indicarían que el gen *cls1* no es fundamental para la biosíntesis de CL.

Cuando se analizó el perfil de los lípidos polares presentes en la cepa CL2, la cual posee interrumpido el gen *cls2*, se observó una ausencia total de CL (**Figura 48**).

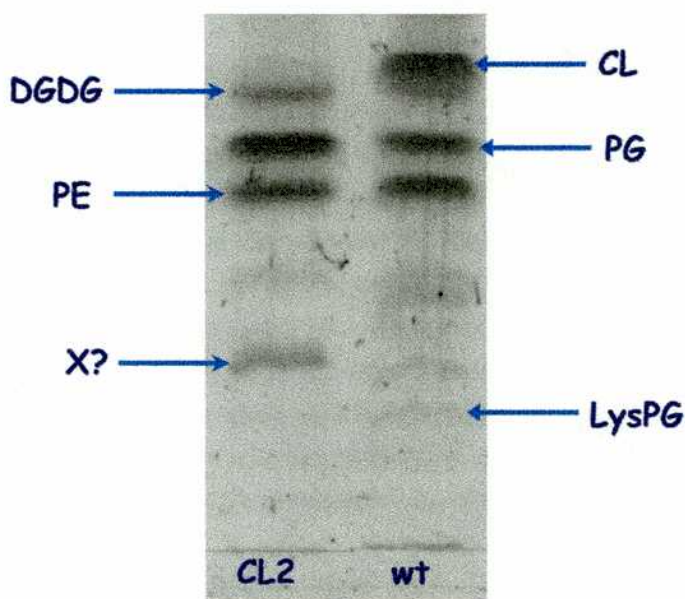


Figura 48: HPTLC: Patrón de lípidos polares. HPTLC Silicagel 60 / F₂₅₄ Merck Artículo n° 5628. Sistema solvente de desarrollo Cloroformo: Metanol: Ac. Acético (65:25:5; v:v:v). X? Mancha ninhidrina positiva y fósforo negativo. wt: cepa salvaje, CL2: cepa mutante para el gen *cls2*.

Con el propósito de conocer la contribución porcentual de los fosfolípidos presentes en la cepa CL2 se procedió a la cuantificación de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 49**.

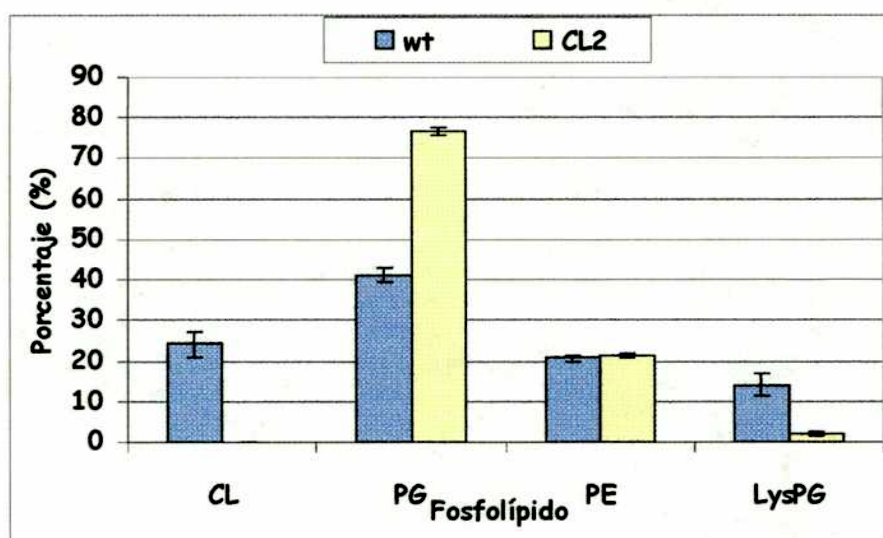


Figura 49: Composición porcentual de los fosfolípidos de la cepas wt y CL2. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En esta figura se observa que en las membranas de la cepa CL2 se produce un aumento importante en el contenido de PG. Dicho lípido constituye aproximadamente el 77% de los fosfolípidos totales, siendo el único de naturaleza aniónica presente en la membrana de la cepa mutante. A diferencia de los resultados obtenidos en mutantes de *E. coli* (Nishijima *et al.*, 1988), en *B. subtilis* no se observa acumulación de ácido fosfatídico (PA) cuando el gen responsable de la biosíntesis de CL se encuentra interrumpido.

En resumen, estos resultados indicarían que la interrupción del gen *cls2* daría lugar a una deficiencia total en la síntesis de la CL. Esto sugeriría que en *B. subtilis* el producto del gen *cls2* sería el principal responsable de la actividad CL sintasa de acuerdo a lo observado por Matsumoto y colaboradores (1999) en la cepa Marburg.

Con respecto a los fosfolípidos de naturaleza zwitteriónica, no existen diferencias significativas en el porcentaje de la PE. Sin embargo, se observa que el porcentaje de LysPG disminuye en la cepa CL2 en comparación con el control. Aparentemente, el metabolismo del mismo estaría alterado como consecuencia de la variación en el metabolismo lipídico debido a la ausencia de CL.

3.1.2.2.- Cuantificación del DGDG en las cepas CL1 y CL2:

Se procedió a la cuantificación del diglucosildiacilglicérido (DGDG) con el objetivo de investigar si el cambio producido en el metabolismo de fosfolípidos debido a la interrupción de los genes *cls1* y *cls2* afectaba a la contribución porcentual de este glicolípido.

Cepa	μmoles Glucosa/μmoles Fósforo
wt	0.57 ± 0.07
CL1	0.52 ± 0.04
CL2	0.32 ± 0.03

Tabla 13: Relación glicolípido/fosfolípido en las distintas cepas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En la cepa CL2 existe una disminución en el contenido del DGDG en comparación con la cepa salvaje. Este resultado está indicando que en esta cepa se generaría una alteración en el metabolismo del DGDG debido al aumento relativo de PG o a una disminución en la concentración del precursor de este glicolípido.

A partir de los resultados obtenidos en las **Figuras 46 y 47** y en la **Tabla 13** se puede concluir que los lípidos polares de la cepa CL1 no presentan diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje, por lo tanto no se continuó el estudio de la misma.

3.1.3.- Crecimiento de la cepa CL2 en hiperosmolaridad:

3.1.3.1.- Curvas de crecimiento de la cepa wt y CL2 en respuesta a distintas concentraciones de NaCl:

Para determinar si la cepa CL2 era capaz de crecer en presencia de NaCl en el medio de cultivo se realizaron las distintas curvas de crecimiento que se muestran en la **Figura 50**.

Cuando ambas cepas fueron crecidas en presencia de 0.75M y de 1M de NaCl no se detectaron diferencias en las curvas de crecimiento (**Figura 50 A y B**). Sin embargo, cuando al medio de cultivo se le adicionó 1.25M de NaCl (**Figura 50 C**) la cepa CL2 presentó un retraso en el crecimiento de aproximadamente 5 horas en comparación con la cepa salvaje.

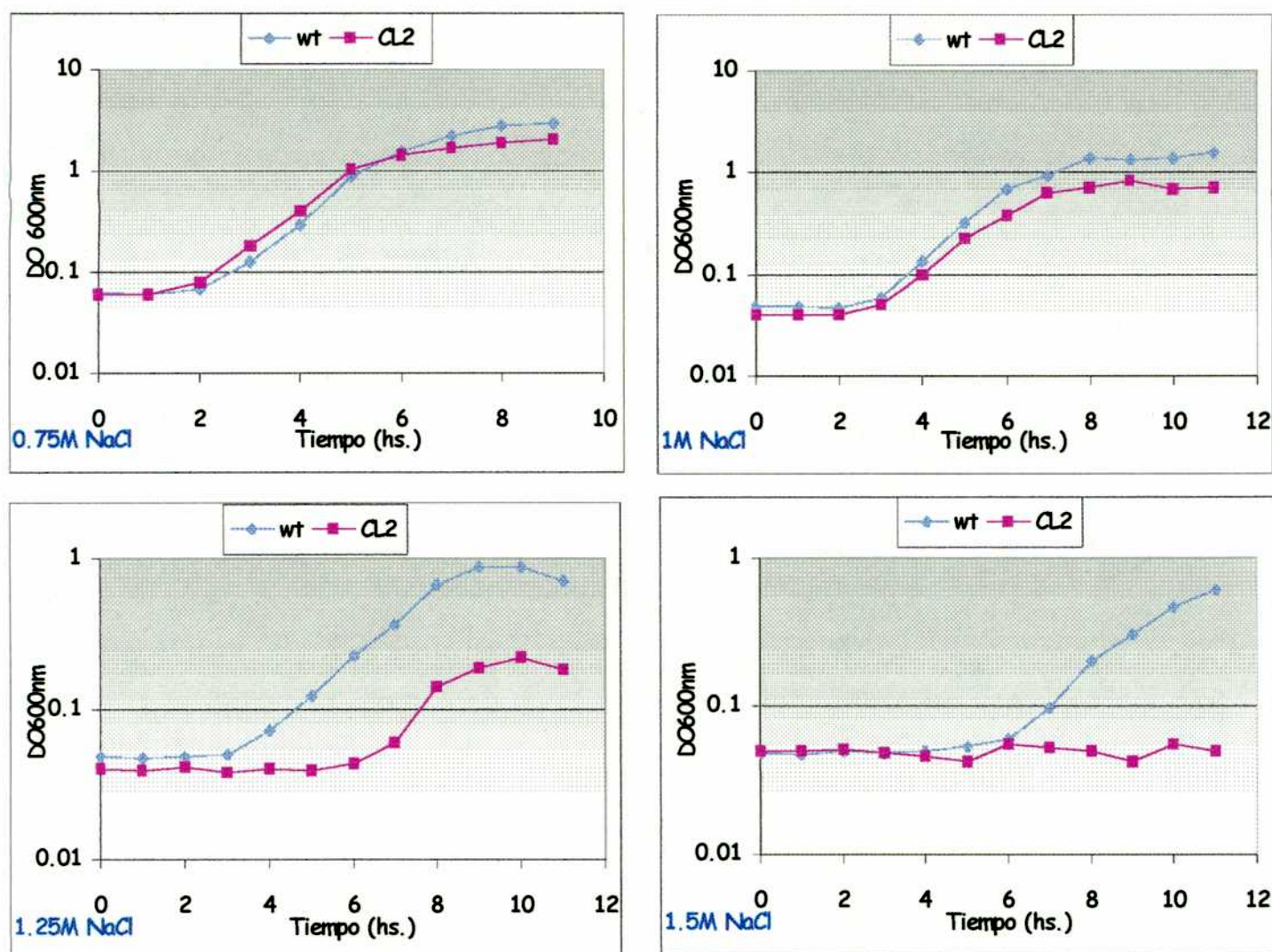


Figura 50: Curvas de crecimiento de las cepas wt y CL2 en presencia de NaCl. Las distintas curvas representan el crecimiento de ambas cepas en el medio de cultivo LB suplementado con distintas concentraciones de NaCl. **A:** 0.75M NaCl, **B:** 1M NaCl, **C:** 1.25M NaCl y **D:** 1.5M NaCl.

Asimismo, cuando se agregó 1.5M NaCl no se detectó el crecimiento de la cepa CL2 durante las primeras 10 horas de incubación (**Figura 50 D**). Luego de este extenso lag esta cepa comenzó a crecer. Sin embargo, la densidad óptica final alcanzada fue menor que la obtenida para la cepa salvaje.

Estos resultados estarían indicando la importancia de la CL en el proceso de adaptación de *B. subtilis* a altas concentraciones salinas. Sin embargo, este fosfolípido no sería fundamental para el crecimiento de esta especie en hiperosmolaridad.

3.1.3.2.- Osmorresistencia de la cepa CL2:

Con el propósito de determinar si existe una relación entre la osmorresistencia observada en la entrada en fase estacionaria de *B. subtilis* y la presencia de la CL en la membrana, se realizaron ensayos de osmorresistencia de la cepa salvaje y de la cepa mutante (CL2).

En estos ensayos los cultivos de ambas cepas fueron crecidos en el medio LB y luego sembrados en placas de LB, LB + 1M NaCl y LB + 1.5M NaCl. El sembrado en placa se realizó cuando las células se encontraban en la fase exponencial del crecimiento y cuando habían ingresado a la fase estacionaria de crecimiento (T+1). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 14**.

Fase de crecimiento	Porcentaje de Osmorresistencia	
	1 M NaCl	1.5 M NaCl
wt exponencial	5%	1.5%
wt T+1	94%	80%
CL2 exponencial	8%	1%
CL2 T+1	99%	84%

Tabla 14: Osmoresistencia en placa de las cepas wt y CL2. Los valores representan un experimento representativo de los ensayos realizados.

Luego de incubar las placas durante 48 horas a 37°C no se observaron diferencias entre ambas cepas, ni en el tiempo de crecimiento ni en la morfología de las colonias. Estos resultados indicarían que la CL no sería importante para resistir al estrés osmótico cuando las células se encuentran al inicio de la fase estacionaria. En ambas cepas se observa que en el estadio T+1 la osmorresistencia es mayor que en fase exponencial confirmando los resultados descriptos por Ruzal y Sánchez Rivas (1994) en la cepa salvaje.

3.1.4.- Composición fosfolipídica de la cepa CL2 crecida bajo condiciones de hiperosmolaridad:

Como fue demostrado previamente la cepa CL2 es capaz de crecer en medios con alta osmolaridad. Con el objetivo de determinar si durante este crecimiento esta cepa era capaz de sintetizar CL por una vía alternativa diferente del producto del gen *cls2*, se analizaron los lípidos de los cultivos crecidos en el medio LB + 1.5M NaCl.

El análisis del patrón de fosfolípidos indica que la cepa CL2 no es capaz de sintetizar CL por una vía independiente al gen *cls2* cuando es crecida en hipersalinidad (*Figura 51*).

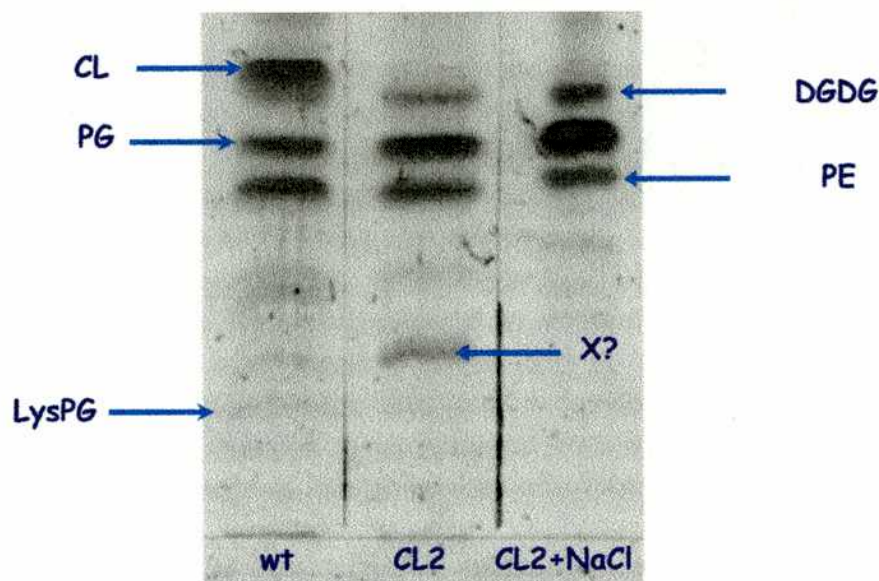


Figura 51: HPTLC: Patrón de lípidos polares de la cepa CL2 crecida en LB y de la cepa CL2 crecida en LB + 1.5M NaCl. HPTLC Silicagel 60 / F₂₅₄ Merck Artículo n° 5628. Sistema solvente de desarrollo Cloroformo: Metanol: Ac. Acético (65:25:5; v:v:v). wt: cepa salvaje crecida en LB, CL2: cepa CL2 crecida en LB, CL2+NaCl: cepa CL2 crecida en LB + 1.5M NaCl.

La cuantificación de los lípidos polares de la cepa CL2 crecida bajo condiciones normales y de hiperosmolaridad se muestra en la *Figura 52*.

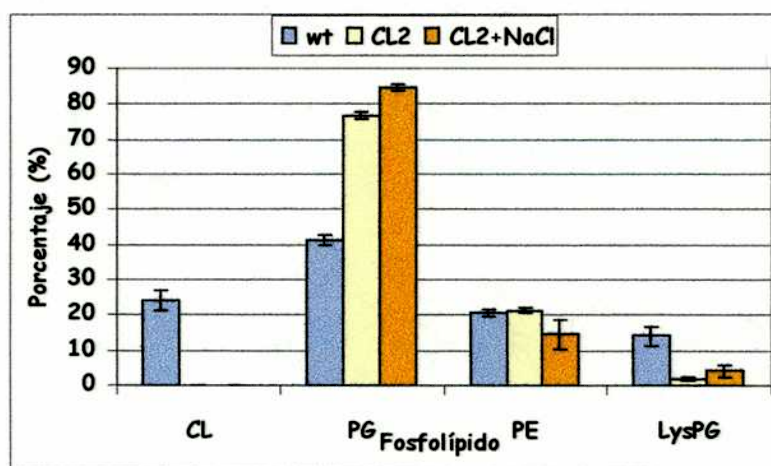


Figura 52: Composición porcentual de los fosfolípidos de la cepa CL2 crecida bajo condiciones normales y de hiperosmolaridad. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En cuanto al porcentaje de la PE y del LysPG no se observan diferencias significativas entre las condiciones de crecimiento.

indicando que la misma no fue incorporada al interior del liposoma. Estos resultados estarían relacionados con el aumento en el grado de empaquetamiento lateral de los lípidos de esta muestra (ver sección 3.1.8.3). Sin embargo, no se puede descartar que el proceso de permeabilidad sea más lento en estos liposomas y que sean necesarios tiempos largos de incubación (mayores a los utilizados en el ensayo) para llegar al equilibrio de gradientes.

Con el propósito de descartar posibles cambios en el tamaño de los liposomas debido al proceso de permeabilidad, se realizaron mediciones de "light scattering" estático en las distintas muestras. No se observaron variaciones en el tamaño de los liposomas a lo largo de los ensayos ni en la muestra CL2 ni en CL2 + NaCl. Tampoco se observaron diferencias entre los distintos buffers utilizados (datos no mostrados).

Por otra parte, los valores de "scattering" obtenidos con los liposomas de CL2 + NaCl siempre fueron mayores a los de CL2. Esto indicaría que los liposomas construidos con los lípidos de la cepa mutante crecida en medio hipersalino tendrían un mayor tamaño.

En conjunto, los resultados presentados indicarían que los cambios producidos en la membrana de la cepa CL2 debido a la ausencia del producto del gen *cls2* afecta la permeabilidad de protones y probablemente la estabilidad de las membranas y los liposomas (**Figuras 57 y 58 A**). Resultados similares fueron descriptos por Shibata y colaboradores (1994) en sistemas modelos de liposomas en ausencia de CL.

3.1.8.3.- Propiedades de interfaz lípido/agua:

La sonda fluorescente Laurdan fue utilizada para estudiar las propiedades de las interfaces de los liposomas y de las membranas de la cepa CL2 crecida bajo condiciones normales y de hipersalinidad.

3.1.8.3.1.- Propiedades de la interfaz en liposomas construídos a partir de los lípidos totales:

En la **Figura 16** se observan los espectros de excitación y emisión del Laurdan medido sobre liposomas de lípidos totales determinados a 10°, 25°, 37° y 50°C.

Los resultados observados en esta figura muestran que existe un incremento en el porcentaje de PG en la cepa CL2 crecida en hipersalinidad. Esto indicaría que existe una tendencia a aumentar el porcentaje de los fosfolípidos aniónicos en las membranas de *B. subtilis* en respuesta al estrés osmótico. Al encontrarse bloqueada la biosíntesis de CL en la cepa CL2, el PG se acumula en la membrana citoplasmática de estas células. Este aumento de PG cuando la cepa CL2 es crecida en presencia de 1.5M de NaCl, sugeriría que en ciertas reacciones específicas dependientes de las cabezas polares de los fosfolípidos, el PG reemplaza a la CL como ha sido descrito en *E. coli* (Matsumoto, 2001). Este reemplazo no modifica la carga neta de las membranas pues ambos fosfolípidos poseen una sola carga negativa a pH fisiológico.

3.1.5.- Cuantificación del DGDG en la cepa CL2 crecida bajo condiciones de hiperosmolaridad:

Se cuantificó la concentración del DGDG en la cepa CL2 crecida en el medio de cultivo LB y en LB+1.5M NaCl para determinar si el crecimiento en alta salinidad afectaba la concentración de glicolípido presente en la membrana.

Cepa y condición de crecimiento	µg de azúcares / µmol de fósforo
wt	0.57 ± 0.05
wt + NaCl	0.72 ± 0.06
CL2	0.32 ± 0.03
CL2 + NaCl	0.50 ± 0.02

Tabla 15: Relación glicolípido/fosfolípido en las cepas wt y CL2 crecidas en LB y en LB + 1.5M NaCl. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. wt: cepa wt crecida en LB, wt+NaCl: cepa wt crecida en LB+ 1.5M de NaCl, CL2: cepa CL2 crecida en LB, CL2+NaCl: cepa CL2 crecida en LB + 1.5M de NaCl.

En esta tabla se observa que existe un aumento en la concentración del DGDG cuando las células de ambas cepas son crecidas en el medio hipersalino. El mismo tipo de resultados fue descrito en *Saccharomyces cerevisiae* crecida en condiciones de estrés por NaCl (Sharma *et al.*, 1996).

3.1.6.- Composición de ácidos grasos en condiciones de crecimiento normales y de hiperosmolaridad:

En la **Figura 53** se observa la composición porcentual de los ácidos grasos que esterifican los lípidos de la cepa CL2 crecida en LB y en LB + 1.5M NaCl.

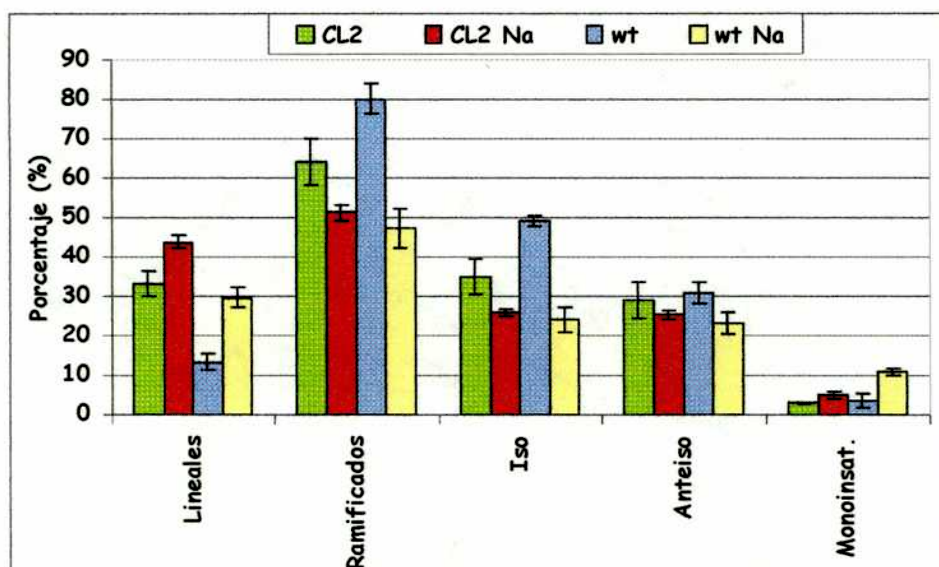


Figura 53: Composición global porcentual de ácidos grasos. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En esta figura se observa que en la cepa CL2 crecida en LB existe un aumento en el porcentaje de ácidos grasos lineales y una disminución en el de los ramificados (en particular aquellos que pertenecen a la serie iso) en comparación con la cepa salvaje. Bajo condiciones de estrés estas diferencias están más acentuadas.

Si se comparan los valores de ambas cepas crecidas en hiperosmolaridad se observa una tendencia a aumentar los ácidos grasos lineales y disminuir los ramificados en respuesta este estrés.

Estas variaciones en las cadenas parafínicas de los lípidos podrían estar produciendo cambios en la microviscosidad de las membranas de CL2.

3.1.7.- Expresión del gen *cls2*:

3.1.7.1.- Análisis de la actividad β -galactosidasa en la cepa CL2:

Se analizó la actividad del promotor perteneciente al gen *cls2* con el propósito de determinar si existen variaciones en la transcripción del gen debida al crecimiento en hipersalinidad. Para ello se cultivó a esta cepa en LB con distintas concentraciones de NaCl

y a distintos tiempos se tomaron muestras para medir la DO600nm y la actividad β -galactosidasa.

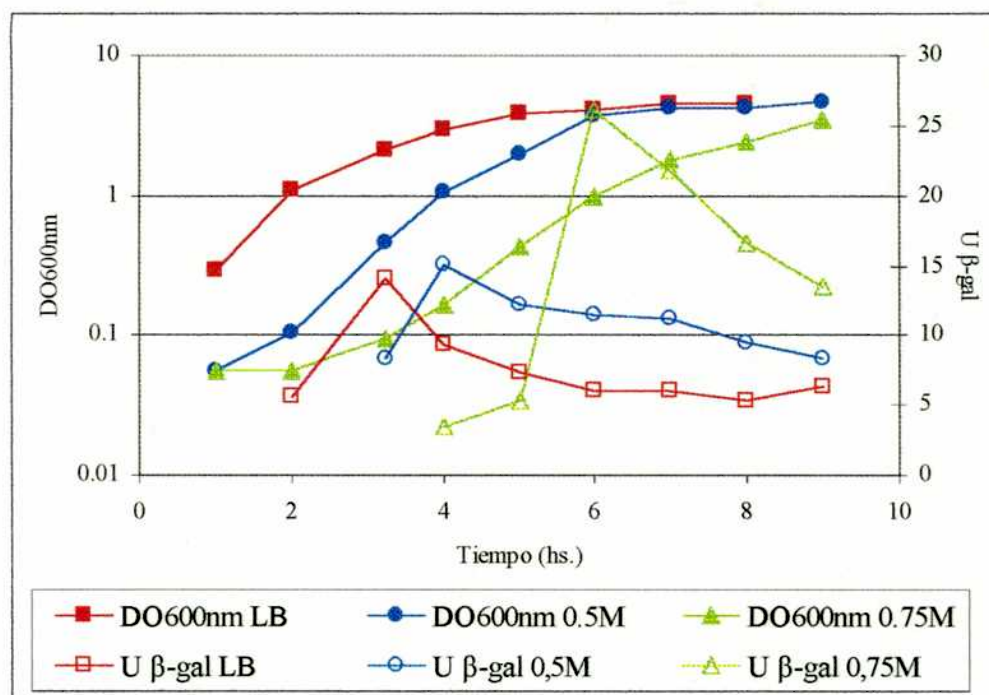


Figura 54. Actividad β -galactosidasa de la cepa CL2. Las curvas que se muestran constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. **LB:** medio LB, **0.5M:** medio LB + 0.5M NaCl. **0.75M:** medio LB + 0.75M NaCl, **U β -gal:** unidades de β -galactosidasa.

Cuando esta cepa fue crecida en los distintos medios se observó un aumento en la inducción del gen a medida que las células ingresan a la fase estacionaria. Esta inducción es aún más marcada en los cultivos crecidos en medio LB + 0.75M NaCl. Si bien esta activación de la transcripción coincide con la entrada en la fase estacionaria de crecimiento, esta inducción sería de 1.5 a 2 veces mayor que la obtenida en el control (LB).

Estos resultados estarían indicando que existe un aumento en la expresión del gen *cls2* bajo condiciones de estrés hipersalino. No obstante, dicha expresión sería de mayor importancia cuando las células ingresan a fase estacionaria de crecimiento.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos en este experimento es la concordancia con los datos bioquímicos que se presentaron en el **Capítulo 1** (ver **Figura 11**), en los cuales se demostró que cuando *B. subtilis* ingresa a la fase estacionaria se produce un aumento en la concentración de CL.

3.1.7.2.- Análisis de la actividad β -galactosidasa en la cepa CL21:

Como se ha descrito en la sección anterior, analizamos la transcripción del gen *cls2* en la cepa CL2. En esa cepa el gen se encuentra interrumpido (**Figura 45 A**) por lo tanto es incapaz de sintetizar CL. Con el propósito de evaluar la transcripción del gen *cls2* en un contexto salvaje y evaluar la importancia de la expresión de la CL sintasa sobre su propio promotor, se decidió construir la cepa CL21.

Dicha construcción se realizó utilizando el plásmido pEC6 (como se describe en Materiales y Métodos) obteniéndose el plásmido pCL31. Este último no posee un origen de replicación para bacterias Gram positivas, por lo tanto cuando se transforma *B. subtilis* el plásmido se pierde o se recombina con el cromosoma bacteriano. Esta recombinación puede darse entre el fragmento del gen clonado con el gen cromosómico (en este caso *cls2*) o por medio de las partes del gen *amyE* (que codifica para la enzima α -amilasa) que flanquean la construcción *cls2*'-'*lacZ* con el gen *amyE* cromosómico.

El segundo evento fue el que se buscó (**Figura 55**). El mismo fue identificado debido a que las colonias transformadas (cloramfenicol resistentes) no presentaban halo degradación del almidón.

El clon obtenido luego del evento de recombinación (clon CL21) fue utilizado para detectar la actividad β -galactosidasa bajo distintas condiciones de crecimiento (**Figura 56**).

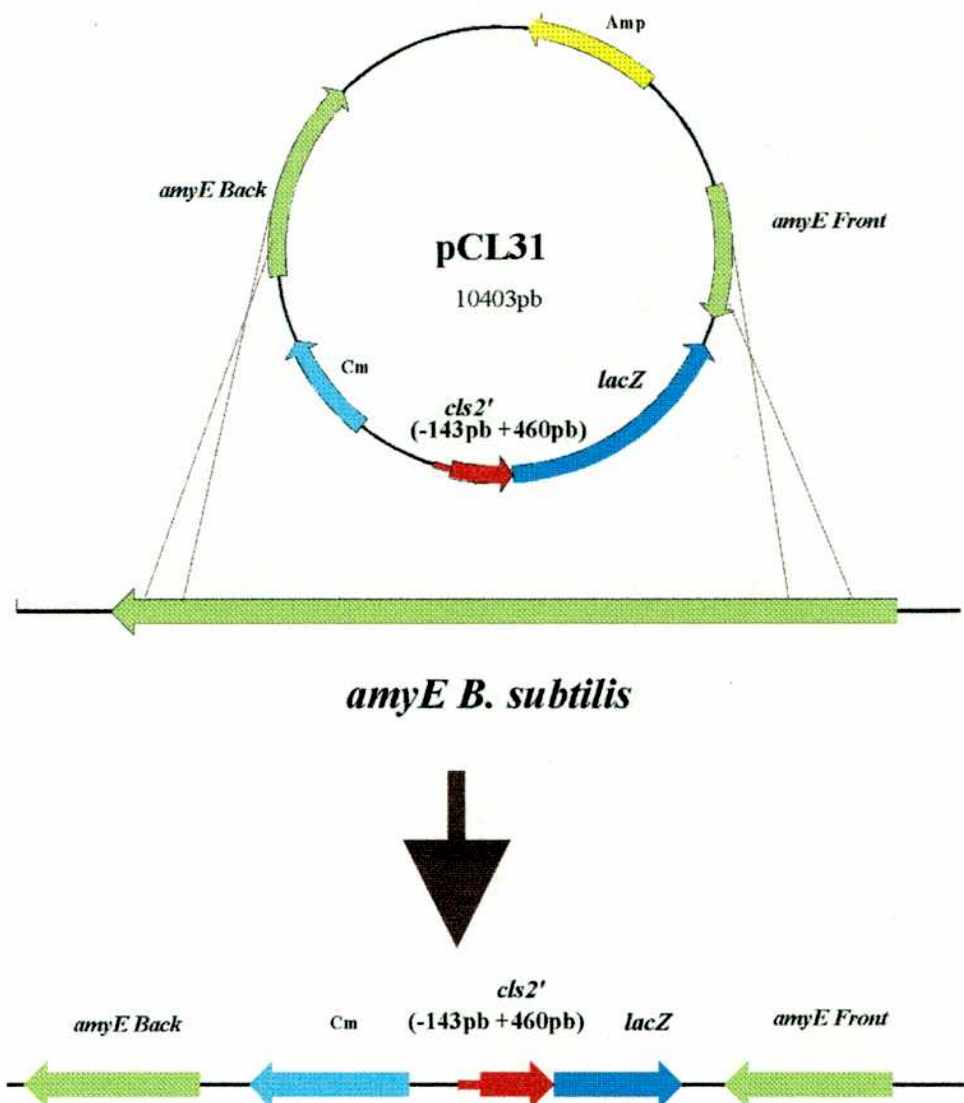


Figura 55: Construcción de la cepa CL21 *amyE* (*cls2':lacZ*). Se muestra el plásmido pCL31 y los eventos de recombinación homóloga con el gen *amyE* presente en el cromosoma de *B. subtilis*. La descripción de los elementos involucrados se encuentra en el pie de **Figura 3** de Materiales y Métodos.

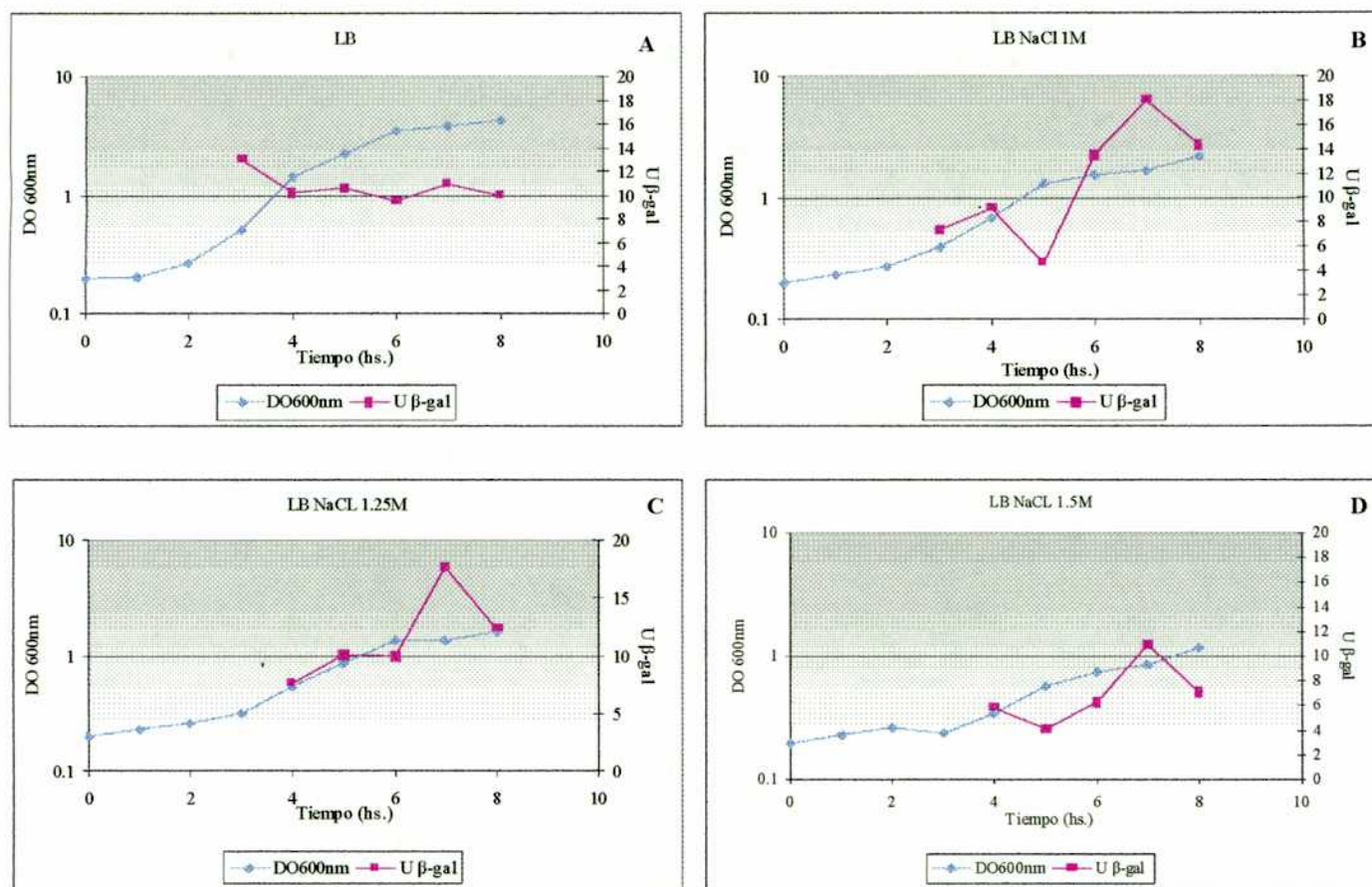


Figura 56: Actividad β-galactosidasa de la cepa CL21. Las curvas que se muestran constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. **A:** medio LB, **B:** medio LB+1M NaCl, **C:** medio LB + 1.25M NaCl, **D:** medio LB + 1.5M NaCl.

Los valores obtenidos en esta figura indicarían que existe una activación del gen *cls2* debido a la presencia de NaCl principalmente en la fase estacionaria del crecimiento (**Figura 56 B y C**). Esta activación sería aproximadamente 1.5 veces mayor que la observada en el control durante el mismo estadio de crecimiento (**Figura 56 A**). Un aumento en la concentración de NaCl (**Figura 56 D**) no mostró un consecuente incremento en la actividad específica.

En conjunto, estos resultados son similares a los observados en la cepa CL2 (contexto mutante) (**Figura 54**) indicando que la inducción observada del gen *cls2* sería independiente de la presencia de la proteína codificada por el mismo.

3.1.8.- Caracterización físico-química de la membrana de la cepa CL2:

3.1.8.1.- Resistencia a sales biliares:

Las sales biliares son moléculas anfifílicas en las cuales el número de grupos hidroxilos y su posición estereoespecífica determinan el grado de hidrofilicidad relativa de la

sal biliar y por consiguiente su concentración micelar crítica (CMC). Dichos compuestos pueden solubilizar fosfolípidos y formar con ellos agregados termodinámicamente estables (micelas en forma de discos). En estudios realizados en sistemas modelos de liposomas se determinó que la solubilización de vesículas fosfolípidicas por medio de la acción de sales biliares, es un proceso independiente de la cabeza polar de los fosfolípidos (Herrmann *et al.*, 2000). No obstante, dichos autores demostraron que la solubilización es dependiente de la composición de ácidos grasos (en particular de la longitud de las cadenas parafinicas de los lípidos).

Por otra parte, en estudios realizados en *Lactobacillus reuteri* se describió que la presencia de sales biliares en el medio de cultivo induce cambios en las propiedades de barrera de las membranas, incluyendo pérdida de material intracelular (Valdez *et al.*, 1997).

Para determinar si las variaciones observadas a nivel de la composición de la membrana de la mutante CL2 podrían afectar su sensibilidad a la presencia de sales biliares en el medio de cultivo, se crecieron las cepas salvaje y CL2 en medio LB suplementado con distintas concentraciones de deoxicolato de sodio. La acción de esta sal biliar es similar a la de un detergente aniónico, siendo su CMC del orden de 2-6 mM (Bhairi, 1997).

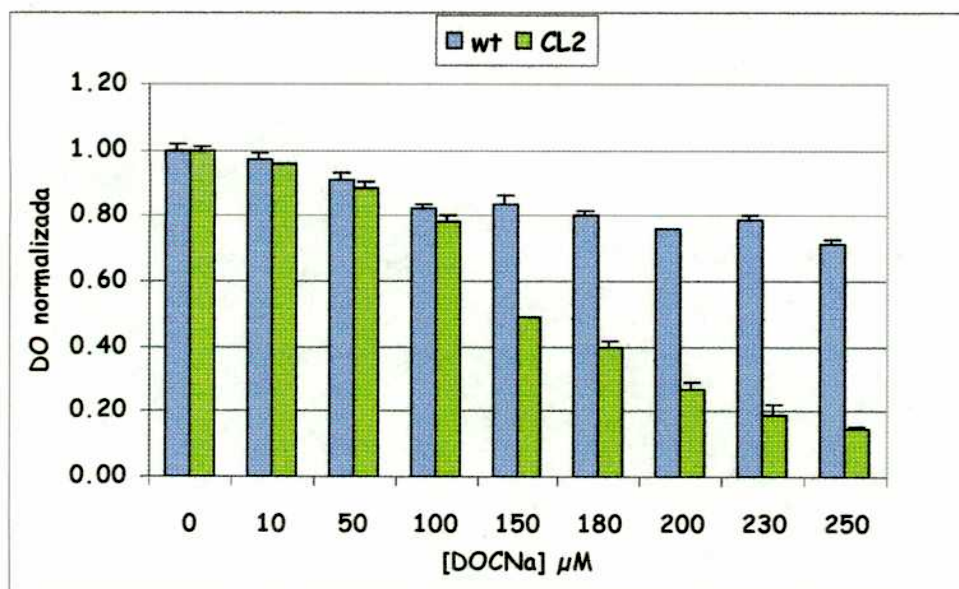


Figura 57: Sensibilidad a deoxicolato de sodio. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes. DO: densidad óptica medida a 600nm normalizada.

Los resultados que se muestran en la **Figura 57** indican que la membrana de la cepa CL2 es más sensible a la acción del deoxicolato de sodio. Este aumento en la sensibilidad podría atribuirse a la ausencia de CL ya que ha sido descrito que dicho fosfolípido

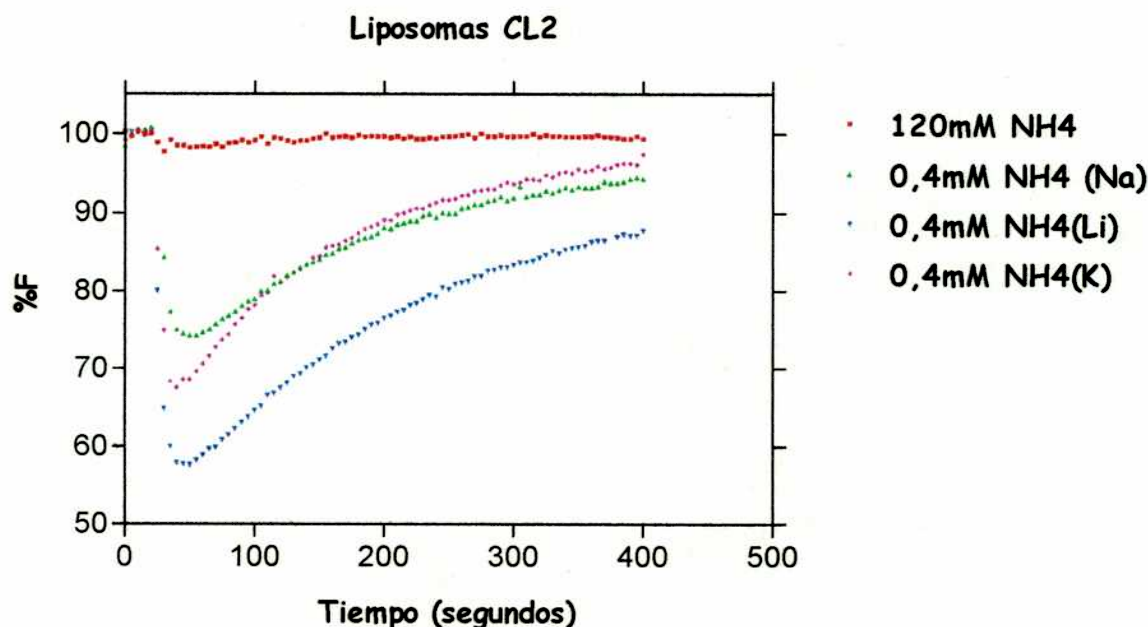
estabiliza la estructura lamelar de las bicapas lipídicas (Shibata *et al.*, 1994). Sin embargo, no se puede descartar que las variaciones observadas estén influenciadas por cambios en el coeficiente de partición del deoxicolato entre el medio acuoso y la pared celular.

A partir de los resultados obtenidos se podría concluir que las sales biliares se agregarían formando estructuras dentro de las membranas de las células de CL2, afectando de esta manera la función de barrera de la membrana.

3.1.8.2.- Permeabilidad a protones: ensayos de fluorescencia con naranja de acridina:

Se realizaron ensayos de permeabilidad a protones en liposomas contruídos a partir de los lípidos totales extraídos de la cepa CL2 crecida en LB y en LB+1.5M NaCl. El objetivo de estos experimentos fue el de determinar si la ausencia de CL afectaba al fenómeno de permeabilidad. En la **Figura 58 A y B** se observan las curvas de extinción de fluorescencia de la sonda AO en función del gradiente de amonio externo impuesto sobre los liposomas provenientes de la cepa CL2.

A.



B.

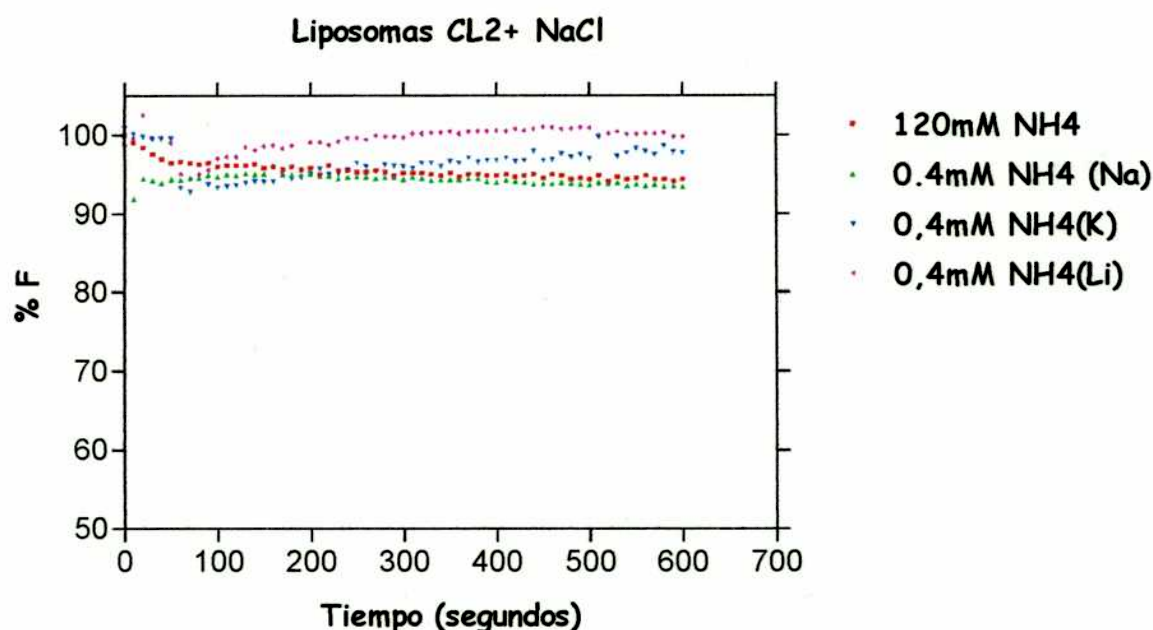


Figura 58: Permeabilidad de protones. Los resultados que se muestran en esta figura constituyen un experimento representativo de los ensayos realizados. %F: representa el porcentaje de fluorescencia. Las soluciones utilizadas fueron: a) 120 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7; b) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Na_2SO_4 pH 7; c) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM Li_2SO_4 pH 7; d) 0.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 119.6 mM K_2SO_4 pH 7. Entre paréntesis se encuentra el contraión utilizado en el ensayo.

Los resultados que se muestran en la **Figura 58 A** indicarían que los liposomas de CL2 presentan una permeabilidad a los protones que varía en función de la composición iónica del medio. Extrapolando las curvas de disminución de fluorescencia en estos liposomas se observa que la velocidad con la cual se llega al equilibrio de gradientes de pH también depende de la composición del medio. Resultados similares fueron descriptos por Burnham y colaboradores (1982). El orden de estas velocidades fue $\text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. Por otra parte, los liposomas de CL2 son inestables una vez alcanzado el equilibrio de gradientes. Este fenómeno queda en evidencia debido al aumento constante de la intensidad de fluorescencia de la sonda. El aumento en el porcentaje de fluorescencia se produce por una pérdida gradual de la sonda desde el interior del liposoma. El porcentaje de pérdida calculado a partir de esta figura sigue el siguiente orden: $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \sim \text{Li}^+$.

Estos resultados indicarían que los distintos contraiones utilizados durante el ensayo poseen efectos cualitativamente distintos sobre las propiedades de la membrana de CL2.

En la **Figura 58 B** se observa que los liposomas de la cepa CL2 crecida en hipersalinidad, son insensibles al gradiente de amonio impuesto sobre los mismos. No se detectó una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia de la sonda AO

indicando que la misma no fue incorporada al interior del liposoma. Estos resultados estarían relacionados con el aumento en el grado de empaquetamiento lateral de los lípidos de esta muestra (ver sección 3.1.8.3). Sin embargo, no se puede descartar que el proceso de permeabilidad sea más lento en estos liposomas y que sean necesarios tiempos largos de incubación (mayores a los utilizados en el ensayo) para llegar al equilibrio de gradientes.

Con el propósito de descartar posibles cambios en el tamaño de los liposomas debido al proceso de permeabilidad, se realizaron mediciones de “light scattering” estático en las distintas muestras. No se observaron variaciones en el tamaño de los liposomas a lo largo de los ensayos ni en la muestra CL2 ni en CL2 + NaCl. Tampoco se observaron diferencias entre los distintos buffers utilizados (datos no mostrados).

Por otra parte, los valores de “scattering” obtenidos con los liposomas de CL2 + NaCl siempre fueron mayores a los de CL2. Esto indicaría que los liposomas construidos con los lípidos de la cepa mutante crecida en medio hipersalino tendrían un mayor tamaño.

En conjunto, los resultados presentados indicarían que los cambios producidos en la membrana de la cepa CL2 debido a la ausencia del producto del gen *cls2* afecta la permeabilidad de protones y probablemente la estabilidad de las membranas y los liposomas (**Figuras 57 y 58 A**). Resultados similares fueron descritos por Shibata y colaboradores (1994) en sistemas modelos de liposomas en ausencia de CL.

3.1.8.3.- Propiedades de interfaz lípido/agua:

La sonda fluorescente Laurdan fue utilizada para estudiar las propiedades de las interfaces de los liposomas y de las membranas de la cepa CL2 crecida bajo condiciones normales y de hipersalinidad.

3.1.8.3.1.- Propiedades de la interfaz en liposomas construidos a partir de los lípidos totales:

En la **Figura 16** se observan los espectros de excitación y emisión del Laurdan medido sobre liposomas de lípidos totales determinados a 10°, 25°, 37° y 50°C.

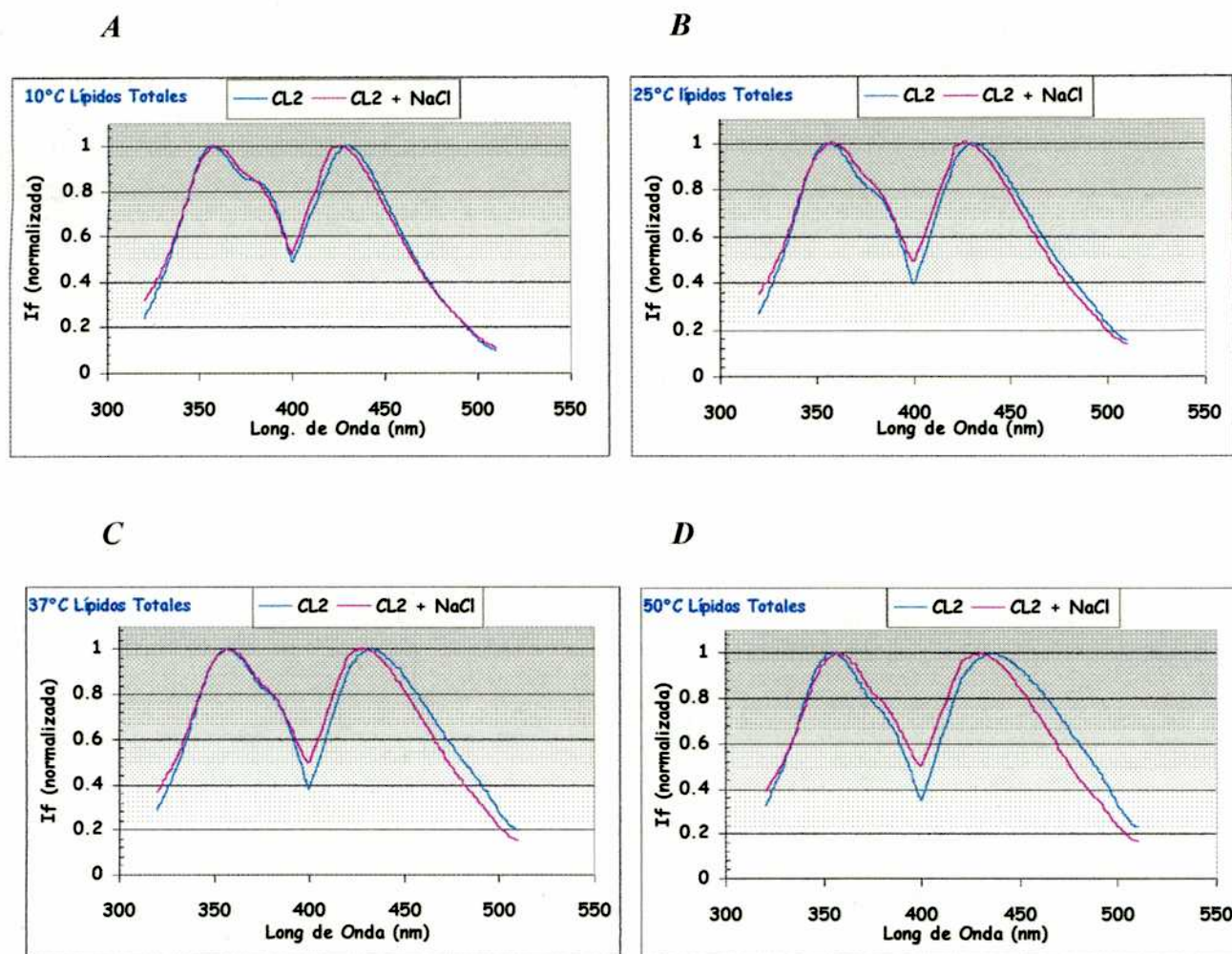
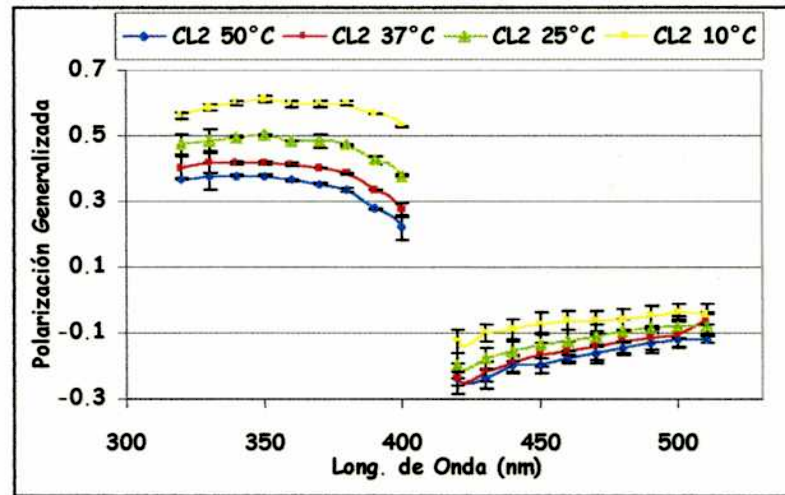


Figura 59: Espectros de emisión y excitación del Laurdan obtenido a partir de liposomas de lípidos totales medidos a distintas temperaturas. Los espectros que se muestran en esta figura son un experimento representativo de los ensayos realizados. If (normalizada): intensidad de fluorescencia normalizada.

En estos espectros se observa que la banda roja del espectro de excitación a 380nm es mayor en los liposomas de CL2 a bajas temperaturas (**Figura 59 A**). En todas las temperaturas estudiadas existe un corrimiento del espectro de emisión de CL2 + NaCl hacia menores longitudes de onda. El mismo tipo de resultados fue obtenido cuando la cepa salvaje fue crecida en hipersalinidad (**Figura 24** del capítulo 2). Este corrimiento en el espectro podría atribuirse a un cambio en la hidratación de la interfaz de la membrana (Bagatolli *et al*, 1999).

En la **Figura 60** se muestra la dependencia del parámetro de polarización generalizada (GP) en función de la longitud de onda a las temperaturas de ensayo.

A



B

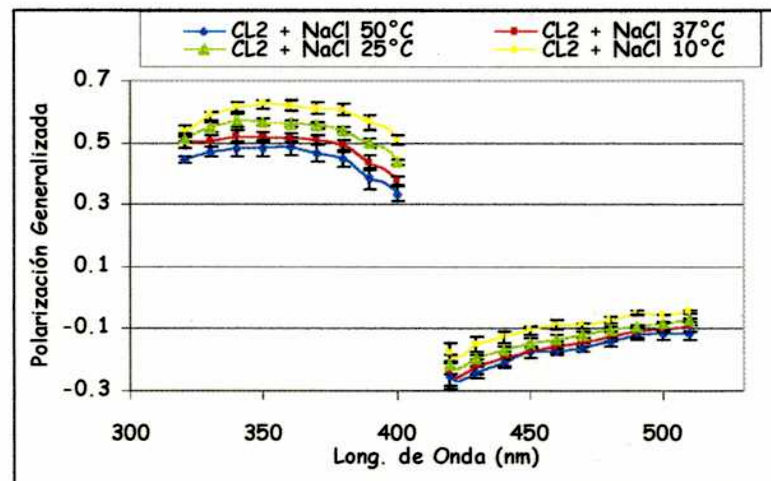


Figura 60: Polarización generalizada del Laurdan medida sobre liposomas de lípidos totales a distintas temperaturas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

Los cambios observados en la GP en función de la longitud de onda fueron graduales, presentando una pendiente negativa y positiva para la GP_{em} y GP_{exc} respectivamente. Estos resultados indican que los lípidos de ambas muestras se encuentran en una fase líquida ordenada. No obstante, los valores absolutos de la GP_{exc} de los liposomas de la muestra CL2 analizados a 25° 37° y 50°C son menores que los de CL2 + NaCl. Esto indicaría que existe un mayor grado de movilidad de la sonda o lo que es similar, un menor grado de empaquetamiento de los lípidos en esta muestra. No se observan cambios bruscos en los valores de GP descartando transición o coexistencia de fases (Parasassi *et al*, 1993).

Cuando el parámetro de GP_{exc} fue graficado en función de la temperatura (**Figura 61**) se observan diferencias significativas en el grado de empaquetamiento y de hidratación de los lípidos de la cepa CL2 comparado con el de la cepa salvaje.

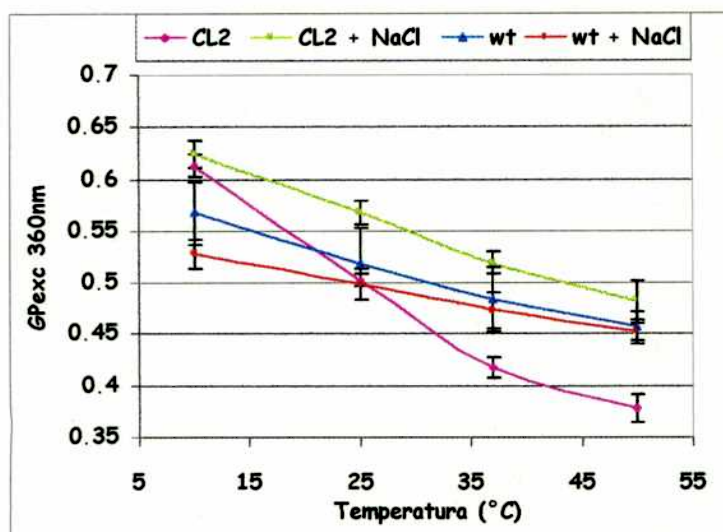


Figura 61: Polarización generalizada de excitación del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

La muestra CL2 + NaCl presenta valores absolutos de GP_{exc} mayores que el resto de las muestras. Esto indica que el grado de hidratación de la interfaz de estos liposomas es menor en todo el rango de temperaturas estudiado.

El grado de hidratación calculado a la temperatura de crecimiento (37°C) presenta el siguiente orden: CL2 > wt ~ wt + NaCl > CL2 + NaCl, siendo los liposomas de CL2 los que poseen un mayor grado de hidratación. El grado de empaquetamiento lateral de los lípidos seguiría el orden inverso siendo los lípidos de la muestra CL2 los que poseen un menor grado de empaquetamiento.

El ΔGP_{exc} calculado a partir de los valores absolutos indica que los lípidos de la cepa CL2 crecida en LB presentan una mayor dependencia de la GP_{exc} en función de la temperatura (*Tabla 16*). Estos resultados estarían relacionados con la composición en lípidos y en ácidos grasos que presenta esta muestra.

Muestra	ΔGP_{ex}
CL2	38%
CL2 + NaCl	23%
wt	19%
wt + NaCl	17%

Tabla 16: ΔGP_{exc} calculado a 360nm para ambas cepas en el rango de temperaturas 10-50°C.

3.1.8.3.2.- Propiedades de la interfaz en membranas aisladas:

En la **Figura 62** se observan los espectros de excitación y emisión del Laurdan determinados a 10°, 25°, 37° y 50°C.

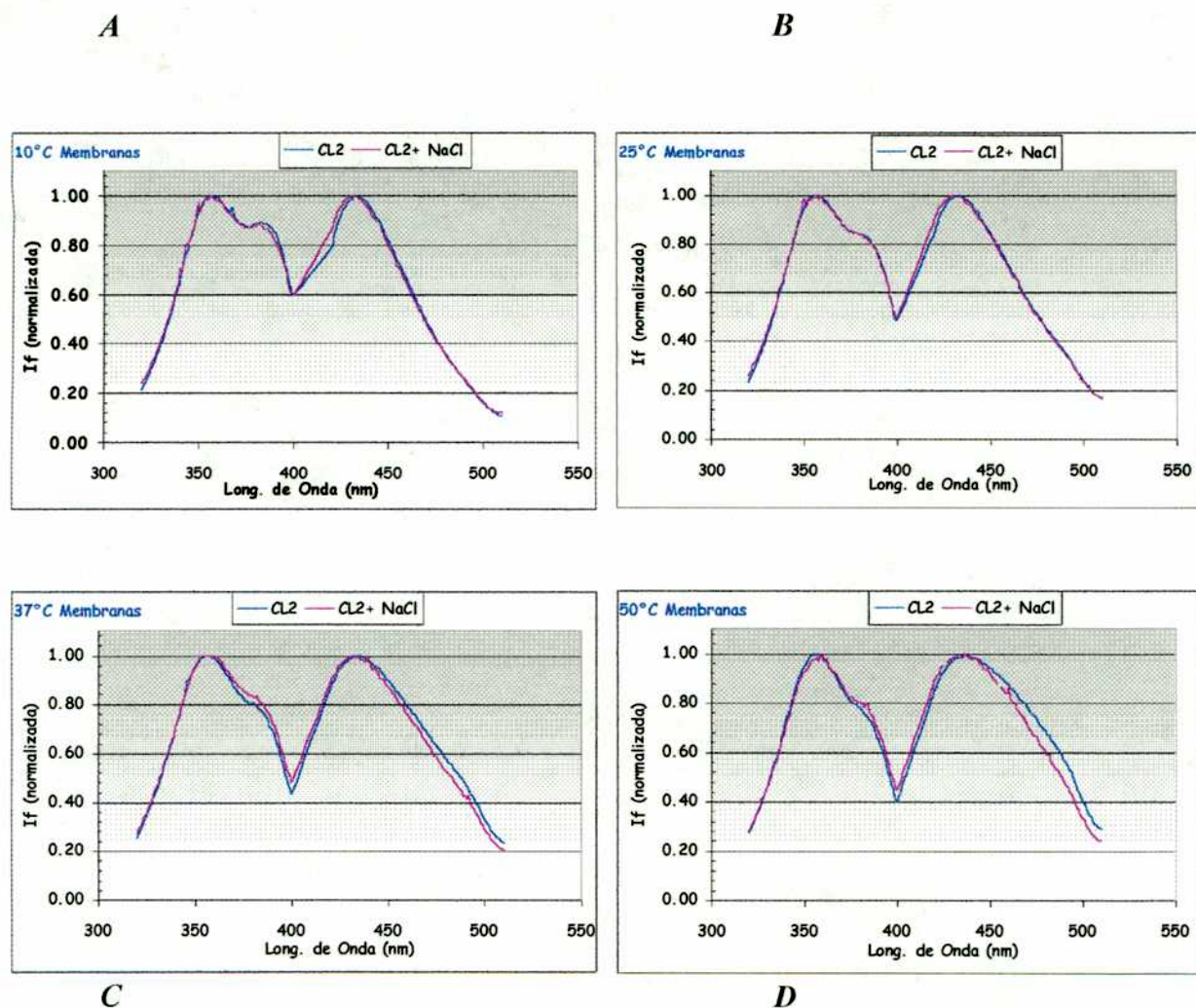
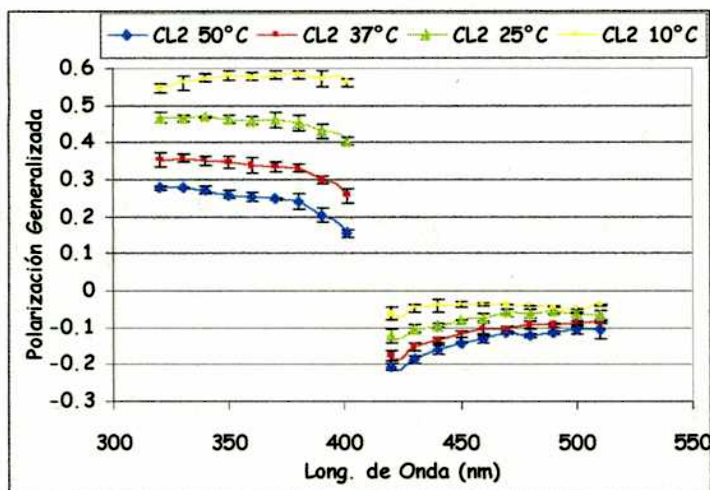


Figura 62: Espectros de emisión y excitación del Laurdan obtenido en membranas aisladas medidos a distintas temperaturas. Los espectros de esta figura son un experimento representativo de los ensayos realizados. If (normalizada): intensidad de fluorescencia normalizada.

Los espectros de emisión de las membranas presentan una banda azul a ~430nm al igual que los obtenidos en los liposomas. Sin embargo, la banda roja del espectro de excitación a 380nm es más pronunciada en las membranas que en los liposomas. Este aumento podría atribuirse a diferencias en el grado de empaquetamiento de los lípidos y/o a la polaridad del entorno del Laurdan. Además, a 37° (**Figura 62 C**) y 50°C (**Figura 62 D**) se observa un leve corrimiento del espectro de emisión en las membranas de la muestra CL2 + NaCl hacia menores longitudes de onda. El mismo tipo de resultados se obtuvo en los liposomas como se representa en la **Figura 59**.

En la **Figura 63** se muestra la dependencia del parámetro de polarización generalizada (GP) en función de la longitud de onda estudiado a cuatro temperaturas diferentes (10°, 25°, 37° y 50°C)

A.



B

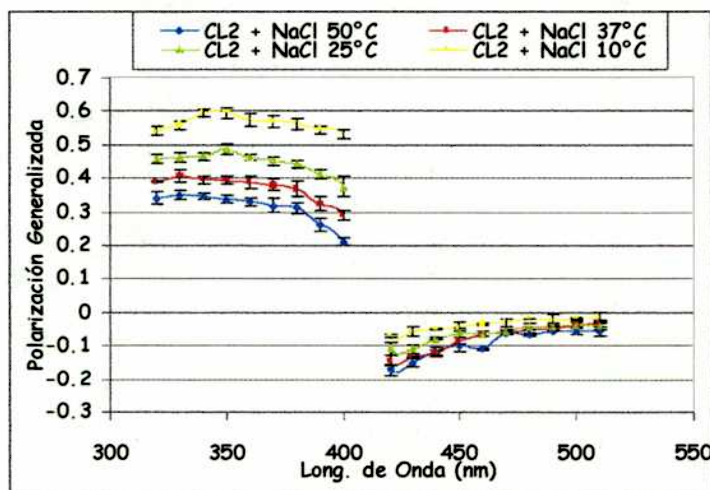


Figura 63: Polarización generalizada del Laurdan a distintas temperaturas medida sobre membranas aisladas. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

La representación de la GP en función de la longitud de onda indican que las membranas de las muestras CL2 y de CL2 + NaCl se encuentran en una fase líquida ordenada, descartando además la existencia de transiciones o coexistencia de fases. Los valores absolutos de la GP_{exc} de las membranas de CL2 obtenidos a 37° y 50°C son menores que los de CL2 + NaCl. Esto indicaría que existe un menor grado de empaquetamiento en los lípidos de las membranas de la muestra CL2.

Al graficar el parámetro de GP_{exc} en función de la temperatura (**Figura 64**) se advierten diferencias significativas en el grado de empaquetamiento y de hidratación de las membranas entre la cepa CL2 y la cepa salvaje.

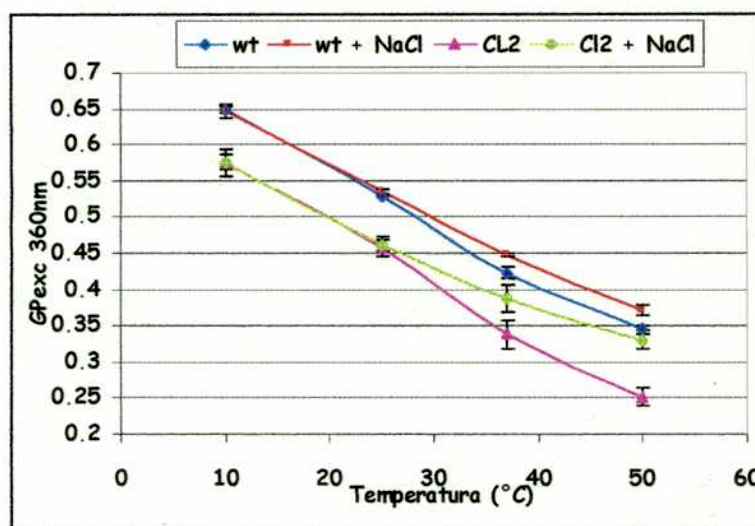


Figura 64: Polarización generalizada de excitación del Laurdan determinada a una única longitud de onda en función de la temperatura. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En todo el rango de temperaturas estudiado los valores de GP_{exc} del Laurdan en las membranas de la cepa CL2 fueron menores a los obtenidos para la cepa salvaje, indicando que en las membranas de la cepa mutante existe una mayor relajación dipolar de la sonda (Parassasi & Gratton 1995). El grado de hidratación de las membranas a la temperatura de crecimiento (37°C) seguiría el siguiente orden: CL2 > CL2 + NaCl > wt > wt + NaCl. Las membranas de la cepa CL2 crecida en medio LB son las que poseen el mayor grado de hidratación y por consiguiente el menor grado de empaquetamiento lateral de los lípidos.

El ΔGP_{exc} calculado a partir de los valores absolutos indica que las membranas de la cepa CL2 crecida en LB presentan una mayor dependencia del parámetro de la GP_{exc} en función de la temperatura (**Tabla 17**).

Muestra	ΔGP_{ex}
CL2	56%
CL2 + NaCl	43%
wt	47%
wt + NaCl	43%

Tabla 17: ΔGP_{exc} calculado a 360nm para ambas cepas en el rango de temperaturas 10-50°C.

Los valores calculados para el $\Delta G P_{exc}$ de las membranas de ambas cepas crecidas en hiperosmolaridad son similares y presentan una menor dependencia de este parámetro con la temperatura en comparación con los respectivos controles. Estos resultados estarían relacionados con el aumento en el grado de empaquetamiento lateral previamente descripto. Comparando estos valores con los obtenidos con los liposomas libres de proteínas (**Tabla 16**) se puede inferir que las proteínas confieren a las membranas una mayor sensibilidad a la temperatura. Resultados similares fueron descriptos previamente por D'Antuono y colaboradores (2000) en membranas y liposomas de papila renal en ratas.

3.2.- Construcción y caracterización bioquímica de una cepa de *B. subtilis* mutante para la biosíntesis de fosfatidilglicerol:

3.2.1.- Construcción y análisis de la cepa PGS1 de *B. subtilis*:

En *B. subtilis* existe un gen homólogo al gen *pgsA* de *E. coli* que codifica para la enzima fosfatidilglicerolfosfato sintasa involucrada en la biosíntesis de PG.

Para poder analizar el rol del gen *pgsA* en el crecimiento de *B. subtilis* en hipersalinidad, se construyó la cepa PGS1. Para ello se transformó la cepa YB886 con ADN cromosómico de la cepa SDB110 construida por el Dr. Matsumoto. En esta cepa el gen *pgsA* se encuentra bajo el control del promotor *Pspac*, el cual responde al represor LacI y por lo tanto a IPTG. La construcción se realizó de manera tal que el gen *lacZ* (gen reportero) se encuentra bajo el control del promotor del gen *pgsA* permitiendo la medición de su actividad transcripcional. Es importante mencionar que la cepa SDB110 no es isogénica a YB886, por lo que fue necesario transferir la mutación a este último contexto genético.

En la **Figura 65** se muestra un esquema de la construcción presente en el cromosoma de la cepa PGS1. Para confirmar esto se realizó un ensayo de PCR con los ADN cromosómicos de las cepas PGS1, SDB110 y YB886 con los primers PGS y LZ, cuya ubicación se indica en la figura. El primer LZ posee complementariedad con el gen *lacZ* presente sólo en las cepas donde el plásmido pMutin4 está integrado. Como se observa en la **Figura 66**, sólo se obtiene la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 850pb) en las cepas PGS1 y SDB110 donde está presente la construcción deseada.

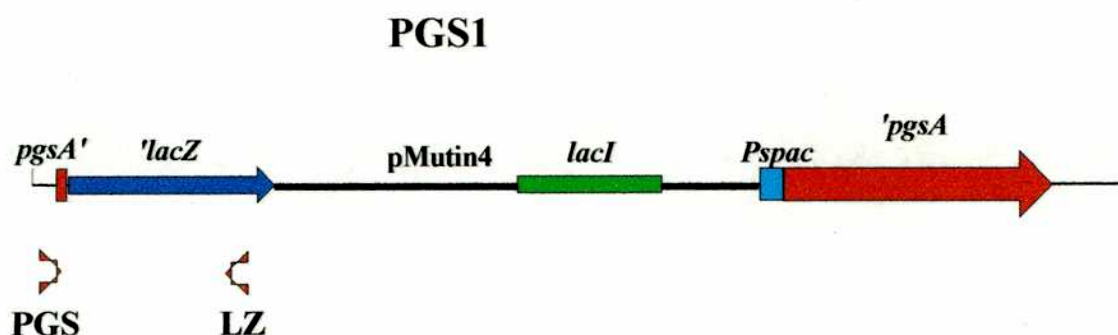


Figura 65: Construcción presente en el cromosoma de la cepa **PGS1**. Se indican los distintos elementos presentes en esta cepa: *pgsA''lacZ*, indica el promotor del gen *pgsA* y el gen *lacZ* bajo su control; *lacI*, gen que codifica para el represor LacI presente en el plásmido pMutin-4 (que también se muestra en la figura); *Pspac* '*pgsA*', promotor inducible *Pspac* que controla al gen estructural *pgsA*. Se muestran también la posición de los "primers" PGS y LZ utilizados en el análisis de PCR.

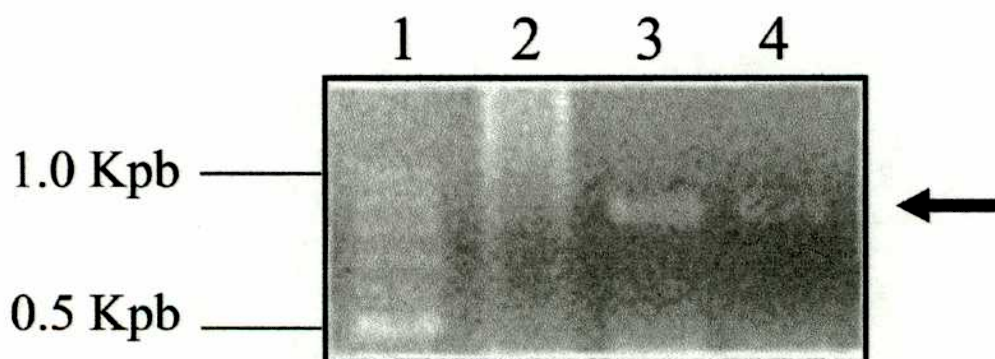


Figura 66: Análisis por PCR de la cepa **PGS1**. El ADN cromosómico de cada una de las cepas fue utilizado como templado en una reacción de PCR con los primers PGS y LZ como se describe en Materiales y Métodos. Los fragmentos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: cepa YB886; línea 3: cepa PGS1; línea 4: cepa SDB110. Se indican la posición de algunos marcadores de peso molecular. Kpb (kilopares de bases). La flecha indica el fragmento del tamaño esperado (850pb).

Una vez que se corroboró que la cepa PGS1 tenía la construcción deseada, realizamos un análisis de la dependencia de la presencia de IPTG en el medio de cultivo para su crecimiento. La cepa SDB110 en ausencia de este inductor no es viable (Matsumoto *et al.*, 1999) indicando la importancia de la presencia de PG en las membranas de esta cepa de *B. subtilis*.

Como se ha mencionado previamente, el promotor *Pspac* está regulado por el represor LacI. En presencia de IPTG este represor es incapaz de unirse a los sitios de unión presentes en dicho promotor y por lo tanto el gen *pgsA* puede ser transcrito. Para comprobar esta regulación, se creció la cepa PGS1 con distintas concentraciones de IPTG (*Figura 67*).

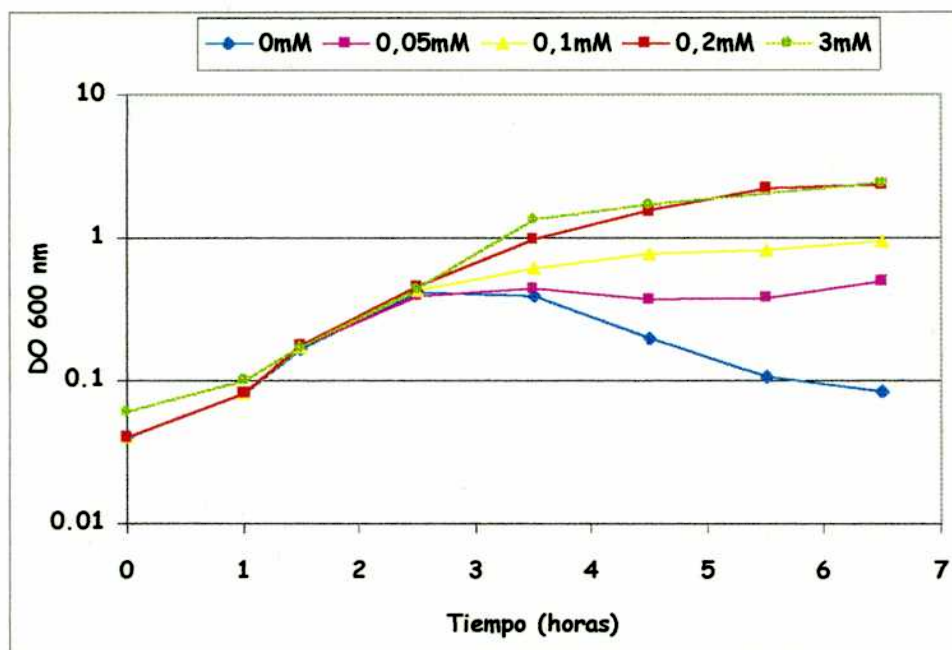


Figura 67: Curvas de crecimiento de la cepa PGS1 en LB suplementado con distintas concentraciones de IPTG. Las curvas de esta figura son las obtenidas en un experimento representativo. Un cultivo de 16hs. en LB con 1mM de IPTG fue lavado, resuspendido en LB e incubado durante 1.5 hs. Al cabo de dicho período a cada cultivo se le agregó la concentración de IPTG indicada. La DO fue registrada a 600nm.

En esta figura se observa claramente que la cepa PGS1 depende de la presencia de IPTG en el medio de cultivo para poder crecer.

Una observación importante que se realizó fue que después de 8hs. de incubación sin el inductor (IPTG) el cultivo volvía a crecer, indicando que el gen *pgsA* podría expresarse a pesar de la presencia del represor LacI.

3.2.2.- Composición lipídica de las membranas de la cepa PGS1:

3.2.2.1.- Caracterización de los lípidos polares de la cepa PGS1:

En la **Figura 68** se muestra el perfil lipídico de la cepa PGS1 crecida en el medio LB suplementado con distintas concentraciones de IPTG.

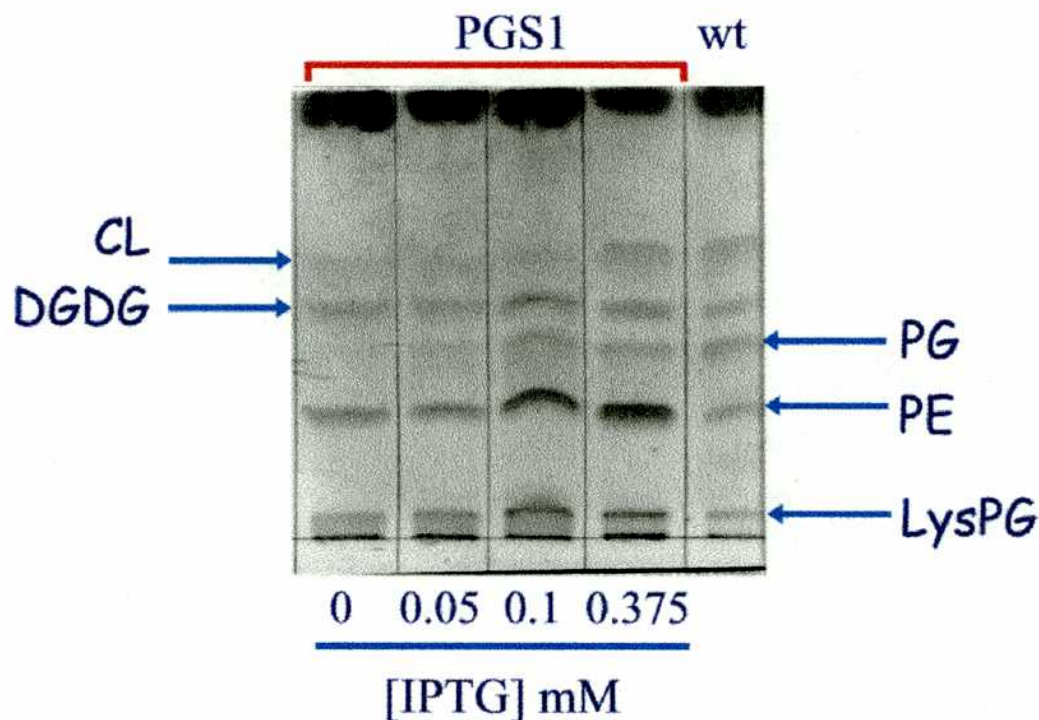


Figura 68: HPTLC: Patrón de lípidos polares. HPTLC Silicagel 60 / F₂₅₄ Merck Artículo n° 5628. Sistema de solvente de desarrollo Cloroformo: Metanol: Ac. Acético (65:25:5; v:v:v).

En esta figura se observa que aparecen con mayor intensidad las bandas correspondientes a PG y a CL a medida que aumenta la concentración de IPTG en el medio de cultivo. La cuantificación de los lípidos polares determinados durante la entrada en fase estacionaria de crecimiento (T+1) se muestra en la **Figura 69**.

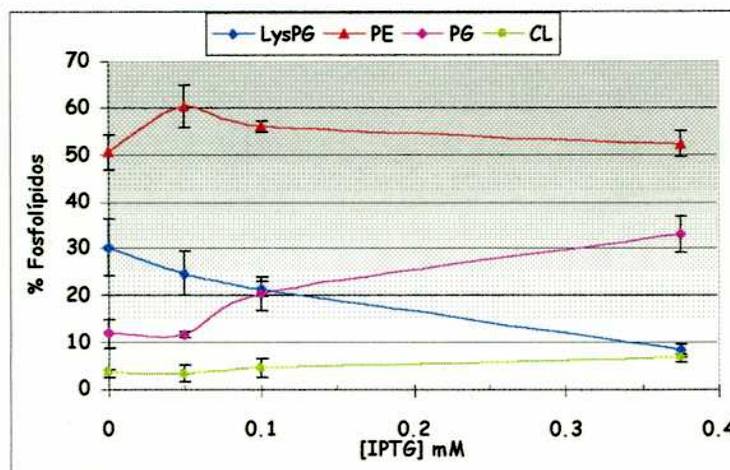


Figura 69: Composición porcentual de los fosfolípidos de la cepa PGS1 en el estadio T+1. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

En esta figura se comprueba que un aumento en la concentración de IPTG va acompañado por un incremento en el contenido de PG y de CL en la membrana de la cepa PGS1. Además, se observa que la relación PG/LysPG va aumentando en función del contenido de IPTG presente en el medio. El porcentaje de la PE aumenta levemente a bajas concentraciones de IPTG pero luego su valor se mantiene invariable (alrededor del 50% del total de fosfolípidos).

La contribución del DGDG a la membrana de PGS1 se muestra en la **Figura 70**.

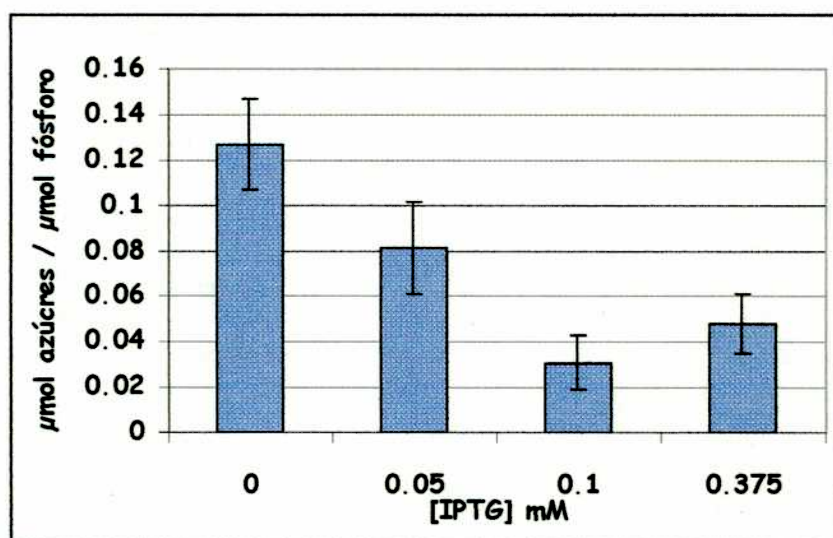


Figura 70: Relación glicolípido/fosfolípidos de la cepa PGS1. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de tres determinaciones independientes.

Los valores que se muestran en esta tabla indicarían que a bajas concentraciones de fosfolípidos aniónicos (0 mM IPTG) se acumularía el DGDG en las membranas de PGS1.

Además se observa que a medida que aumenta el porcentaje de estos fosfolípidos se produce una disminución en el contenido del glicolípido. Estos resultados estarían relacionados con el desplazamiento del metabolismo de los lípidos de membrana, hacia la biosíntesis de fosfolípidos aniónicos.

3.2.2.2.- Composición de ácidos grasos de la cepa PGS1:

Se analizó la contribución porcentual de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Como se observa en la **Figura 71** no existen diferencias significativas en la composición de ácidos grasos de la cepa PGS1 en función de la concentración de IPTG.

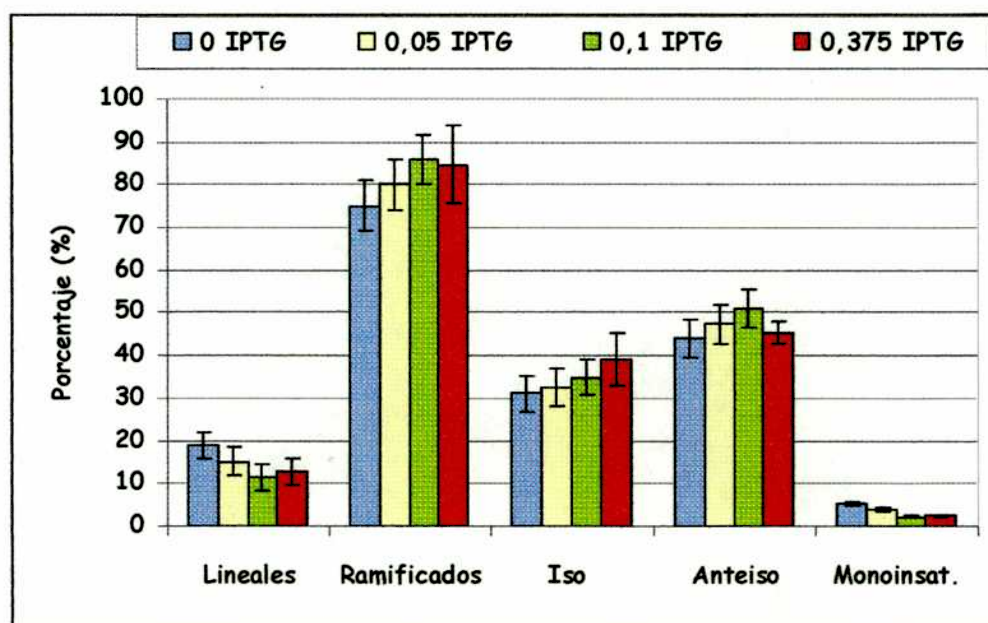


Figura 71: Composición global porcentual de ácidos grasos de PGS1. Los valores representan el promedio y el desvío estándar de dos determinaciones independientes.

3.2.3.- Determinación de la osmorresistencia de la cepa PGS1:

Como se ha descrito anteriormente, la cepa PGS1 es absolutamente dependiente de IPTG para su crecimiento y el contenido de PG (y de CL) puede ser modulado cambiando las concentraciones del inductor (**Figura 68**).

Para evaluar el rol del PG en la osmorresistencia de *B. subtilis*, se realizaron ensayos donde las células de la cepa PGS1 fueron crecidas en LB conteniendo distintas concentraciones de IPTG hasta la fase T+1 y luego fueron sembradas en los medios LB y LB + 1.5M NaCl conteniendo IPTG. En estos ensayos debieron ser tenidos en cuenta distintos controles: por una parte se tuvo que discriminar la inhibición del crecimiento debida al estrés

osmótico de aquella inhibición producto de la pérdida de viabilidad provocada por la ausencia del inductor y, por otra parte, se tuvo en cuenta la observación de la aparición de células que crecían independientemente de la presencia del inductor. Debido a estos controles, los cultivos crecidos en ausencia o en presencia de 0.05mM IPTG fueron sembrados en placas de LB con 0mM, 0.05mM y 0.375mM de IPTG.

Estos controles permitieron determinar que la tasa de reversión (colonias que crecían aún en ausencia de IPTG respecto al total) es de aproximadamente 0.5%.

Como se observa en la **Tabla 7** cuando se realizaron los ensayos de osmorresistencia en placa en el estadio T+1, se detectó que esta cepa es osmosensible a bajas concentraciones de IPTG.

[IPTG] mM	Porcentaje de Osmorresistencia
0	0.16%
0.050	1.5%
0.375	59.6%

Tabla 18: Osmorresistencia de la cepa PGS1 en función de la concentración de IPTG. Los valores de esta tabla son los de un experimento representativo y corresponden a los recuentos obtenidos en placas de LB y LB+1.5M NaCl suplementadas con 0.375mM de IPTG.

No fue posible realizar ensayos de adaptación a medios conteniendo diferentes concentraciones de NaCl como se realizó con la cepa CL2. Cuando se intentó crecer la cepa PGS1 en LB + NaCl sin IPTG, la misma no creció y no era posible diferenciar el efecto del estrés osmótico del efecto de la pérdida de viabilidad. Además, si se dejaba el cultivo varias horas esperando la adaptación, se observaba la aparición de revertantes. En conjunto, estos resultados no permitieron un real análisis del experimento.

Se realizó un análisis de los resultados de osmorresistencia obtenidos en comparación con los observados en la **Tabla 19**, donde se analiza la contribución porcentual de CL y de PG en las membranas de PGS1 en función de la concentración de IPTG. De este análisis se deduce que cuando la bacteria sintetiza bajas cantidades de fosfolípidos aniónicos (Σ PG + CL) no puede resistir el estrés osmótico impuesto sin importar si se encuentra en la fase de crecimiento óptima para ello. Además, se observa que a medida que aumenta la concentración de estos fosfolípidos en la membrana el porcentaje de osmorresistencia de las células de PGS1 es claramente mayor, y comparable al observado en la cepa salvaje

control YB886. Si bien, no se puede concluir que en la mutante PGS1 de *B. subtilis* el mejoramiento en la osmoresistencia sea debido exclusivamente a la presencia de fosfolípidos aniónicos, es notable la correlación entre la concentración de éstos y la osmorresistencia. Estos resultados apoyarían a los obtenidos por van der Heide y colaboradores (2001), los cuales demostraron recientemente que la presencia de los fosfolípidos aniónicos es fundamental para el mecanismo de osmosensado en las membranas de *Lactococcus lactis*.

[IPTG] mM	Σ PG + CL
0	15.39 $\pm$ 3.93
0.050	15.08 $\pm$ 2.59
0.100	25.04 $\pm$ 5.65
0.375	39.71 $\pm$ 4.73

Tabla 19: Contribución porcentual de los fosfolípidos aniónicos en la cepa PGS1.

3.2.4.- Análisis del promotor del gen *pgsA* durante el crecimiento en NaCl:

Como se ha descrito previamente, en la construcción de la cepa PGS1 el promotor del gen *pgsA* controla la transcripción del gen *lacZ*. Para determinar cómo se transcribe este promotor durante el crecimiento en hipersalinidad se creció la cepa PGS1 en LB con distintas concentraciones de NaCl. A distintos tiempos se tomaron muestras para la medición de β -galactosidasa. Todos los ensayos fueron realizados en presencia de 0.375mM de IPTG, que en nuestras condiciones permitía la síntesis de PG a niveles similares a los de la cepa salvaje.

Cuando se analizó la transcripción del promotor en LB, se observó que presenta una pequeña inducción cuando las células ingresan a la fase estacionaria (**Figura 72**). Sin embargo, cuando el análisis se llevó a cabo en cultivos con concentraciones crecientes de NaCl, se detectó una inducción de la transcripción. Dicha inducción fue de aproximadamente 2 a 3 veces con respecto al control y, es más marcada cuando las bacterias ingresan a la fase estacionaria de crecimiento.

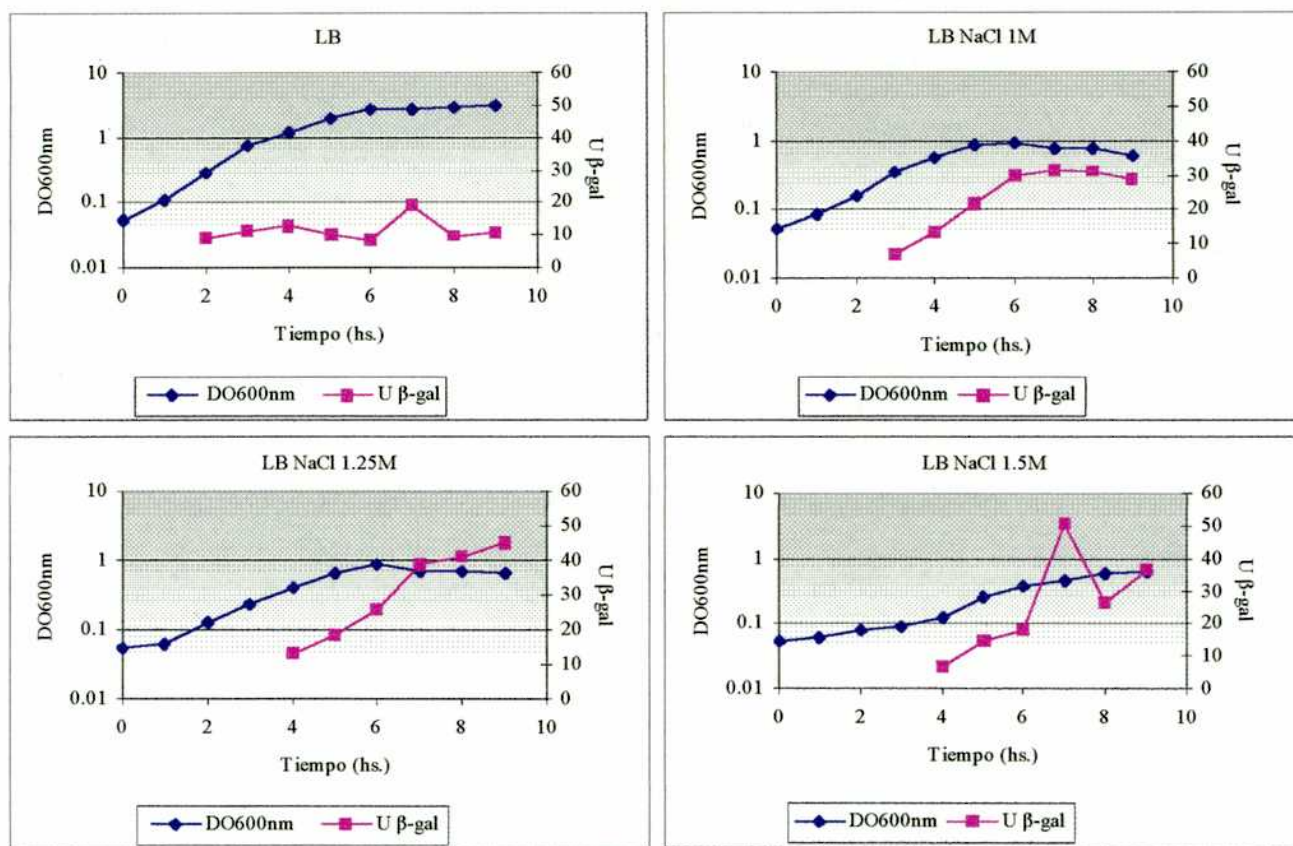


Figura 72: Síntesis de β -galactosidasa a partir del promotor del gen *pgsA* en distintas condiciones de cultivo. Un cultivo de 16hs en LB 0.375mM de IPTG se diluyó en cada uno de los medios indicados. A distintos tiempos se tomaron muestras para determinar la DO600nm y la actividad β -galactosidasa.

En conjunto los resultados presentados en este análisis de la cepa PGS1 demuestran que el PG tiene un rol relevante en la viabilidad celular y el mismo está más acentuado cuando la bacteria crece en presencia de NaCl. Asimismo, la mayor inducción observada en el promotor del gen *pgsA* en presencia de altas concentraciones de NaCl está directamente correlacionada con el aumento en las concentraciones de PG y CL observados cuando la bacteria crece en un medio hipersalino.

DISCUSIÓN:

Capítulo 1:

Membranas: Caracterización bioquímica de las membranas de las células de *B. subtilis* crecidas en medio hipersalino:

a) Cambios morfológicos.

Los resultados que se mostraron en el primer capítulo de esta tesis indican que el aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo, genera deficiencias en el crecimiento de *B. subtilis*. Desde el punto de vista fenotípico, se observó que si bien las células son capaces de adaptarse a elevadas concentraciones salinas, éstas crecen formando filamentos. Asimismo, los estudios realizados mediante microscopía electrónica demostraron en estas condiciones se produce una septación asimétrica y que las paredes de las células son más gruesas respecto al control. Algunos de estos cambios podrían relacionarse con la necesidad de poseer una barrera más eficaz frente al estrés. La resistencia diferencial de las células crecidas en hipersalinidad a la acción de enzimas hidrolíticas de la pared apoyarían estos resultados.

b) Composición bioquímica de las membranas de *B. subtilis* en distintas fases de crecimiento y condiciones de cultivo.

En este trabajo se utilizaron cultivos de *B. subtilis* crecidos en elevadas concentraciones salinas (1.5M NaCl) para estudiar el fenómeno de adaptación de las membranas durante dicho crecimiento. La caracterización de los lípidos polares presentes en la cepa YB886 de *B. subtilis* fue estudiada en el medio LB con y sin NaCl en distintas fases de crecimiento (exponencial, estacionario temprano y estacionario tardío). Durante esta caracterización se comprobó que la composición lipídica y la de ácidos grasos dependía de ambos factores (estadio del crecimiento y salinidad).

Se determinó que a medida que las células ingresan a la fase estacionaria de crecimiento se produce un aumento gradual en el porcentaje de los fosfolípidos aniónicos (PG y CL). Resultados similares fueron descritos por Short y White (1971) en *Staphylococcus aureus*. Se observó también una importante disminución en el contenido de la PE, la cual podría atribuirse a la variación en el metabolismo fosfolipídico que estaría favoreciendo la acumulación de fosfolípidos aniónicos. Por otra parte, no se observan diferencias significativas en el contenido del LysPG. Este resultado es acorde a los obtenidos por Gould y Lennarz (1970) con relación a la estabilidad del contenido en LysPG en las membranas celulares de *S. aureus*. Dichos autores demuestran que, independientemente de

las condiciones de crecimiento y del tiempo de incubación, la concentración de este aminofosfolípido se mantiene constante debido a que las velocidades del anabolismo y del catabolismo de este fosfolípido son similares.

Los resultados obtenidos en hiperosmolaridad demostraron que la CL se acumula en las membranas de *B. subtilis* en respuesta al estrés salino en la fase exponencial y en la fase estacionaria de crecimiento. En la fase estacionaria, este aumento de CL va acompañado por una disminución en la concentración de PG. A diferencia de ello, durante la fase exponencial el porcentaje de PG se mantiene constante y se produce una apreciable disminución en el contenido de PE. Estos resultados indicarían que el metabolismo lipídico se encuentra alterado en respuesta al crecimiento en hipersalinidad. La acumulación de CL ha sido descrita en otros microorganismos en distintos tipos de estrés como cambios en el pH del medio de cultivo *Mesorhizobium loti* (Correa *et al.*, 1999), en la temperatura de crecimiento en *Lactobacillus acidophilus* (Fernández Murga, 1997), por hambreado por oleato, glicerol y por la adición de antibióticos al medio de cultivo en *Staphylococcus aureus* (Short & White, 1971).

El aumento en la concentración de CL durante el crecimiento de *B. subtilis* en hipersalinidad podría estar relacionado con la regulación de la conducción lateral de iones en la membrana citoplasmática. Kanemasa y colaboradores (1972) han sugerido que los cambios en la concentración de CL a nivel de la membrana actuarían como una especie de barrera contra el elevado nivel iónico o que los mismos podrían contribuir con los procesos de transporte activo y de estabilización de la membrana. Por otra parte, basados en el pKa de uno de los grupos fosfatos de la CL (anormalmente alto), otros autores proponen que dicho lípido actuaría a pH fisiológico como una cavidad, donde los protones se acumularían en la bicapa (Mileykovskaya *et al.*, 2001). La porción del glicerol de la CL sería la responsable de la conducción lateral de estos protones.

La CL se sintetiza a partir de dos moléculas de PG y se produce como resultado de esta síntesis la liberación de una molécula de glicerol. El glicerol ha sido descrito como un metabolito osmocompatible que puede ser acumulado durante la adaptación de diferentes microorganismos al estrés osmótico (Blomberg & Adler, 1989; André *et al.*, 1991). Sin embargo en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo no se observó dicha acumulación en el citoplasma de *B. subtilis*. Este resultado concuerda con trabajos previos donde se demuestra que *B. subtilis* acumula principalmente prolina y glicin-betaína en respuesta a un aumento en la osmolaridad externa (Kempf & Bremer, 1998). El glicerol resultante de la biosíntesis de CL podría ser transformado en glicerol-3-fosfato. Se ha

descrito que un aumento en la concentración citoplasmática de esta molécula está relacionado con fenómenos de septación anormal y de inhibición de la esporulación en mutantes para el metabolismo del glicerol en *B. subtilis* (Oh *et al.*, 1973). Ambas observaciones han sido descritas en *B. subtilis* durante el crecimiento en hiperosmolaridad (López *et al.*, 1998; Ruzal & Sánchez-Rivas, 1994). Sin embargo, no se puede descartar que el glicerol sea utilizado para la formación de los precursores de los ácidos lipoteicoicos que componen la pared celular.

Con respecto al diglucosildiacilglicerol presente en esta cepa, se observó un aumento en la concentración del mismo durante el crecimiento en hipersalinidad. El mismo tipo de resultados fue descrito por Sharma y colaboradores (1996) en células de *Saccharomyces cerevisiae* crecidas bajo estrés por NaCl. Tanto el DGDG como el PG se encuentran involucrados en la biosíntesis de los ácidos lipoteicoicos que están asociados a la pared celular de *B. subtilis*. Sin embargo, el DGDG es el que estaría involucrado en el anclaje de los mismos a la membrana celular. El aumento de este glicolípido podría relacionarse con el aumento observado en el grosor de la pared celular y de la resistencia a enzimas hidrolíticas.

En el estudio realizado sobre la composición de ácidos grasos de *B. subtilis* se determinó que existe una dependencia en la composición de los mismos con respecto a la fase de crecimiento celular. Cuando las células fueron crecidas en el medio LB, se observó que a medida que las mismas ingresan a la fase estacionaria, se produce una disminución en la concentración de los ácidos grasos saturados lineales y de los monoinsaturados. Asimismo, se detectó una disminución en los ácidos grasos saturados ramificados durante la fase estacionaria temprana y un aumento de los mismos durante la fase estacionaria tardía. Los ácidos grasos mayoritarios en los distintos estadios estudiados fueron los ramificados anteiso e iso de C15 y de C17. Estos resultados confirman que la composición de ácidos grasos se ve altamente influenciada por la fase de crecimiento al igual que lo descrito por Weber y colaboradores (2001) en otra cepa de *B. subtilis*.

Cuando las bacterias crecen en el medio hipersalino se determinó que se produce un aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados lineales y una importante disminución en el de los ácidos grasos ramificados, a medida que las células ingresan a la fase estacionaria de crecimiento. Además, se detectó un leve aumento en el porcentaje de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

En la fase exponencial de crecimiento no se observan diferencias significativas en el porcentaje de ácidos grasos entre las células crecidas en condiciones normales y de hipersomolaridad. Esto sugeriría que la principal diferencia que se produce en las

membranas de *B. subtilis* durante esta fase es el cambio en el porcentaje de lípidos polares y no en el de ácidos grasos.

Por el contrario, las células crecidas hasta la fase estacionaria en presencia de NaCl presentan cambios en ambos componentes de la membrana. Aparentemente sólo el cambio en los lípidos polares sería importante durante las primeras fases de crecimiento y luego tendría mayor relevancia la variación de dichos lípidos y la de ácidos grasos. Si bien la entrada a la fase estacionaria provocaría un cambio en el patrón de ácidos grasos, la presencia de NaCl influiría sobre el mismo.

El aumento en ácidos grasos monoinsaturados que se observa en respuesta al crecimiento en hipersalinidad podría estar relacionado con la ausencia de esporulación observada bajo estas condiciones de crecimiento. La iniciación de la esporulación en *B. subtilis* se encuentra controlada por el factor de transcripción Spo0A, que es activado por fosforilación a través de un mecanismo denominado “phosphorelay” el cual es dependiente de la actividad de una o más quinasas. Strauch y colaboradores (1992) describieron que una de estas quinasas (KinA) se inhibe *in vitro* en presencia de determinados ácidos grasos. Dentro de los inhibidores más potentes se menciona a los ácidos grasos monoinsaturados que se encuentran en la configuración *cis* y que poseen un largo de cadena de entre 16 a 20 átomos de carbono. Uno de ellos es el *cis* 9 octadecenoico (18:1 ω9) que bajo las condiciones de hipersalinidad llega a triplicar el valor normal. Sin embargo, no podemos afirmar que este sea el único factor que impediría una normal esporulación en medios hipersalinos ya que distintas proteínas involucradas en la activación de diversos factores sigma que participan en los distintos estadios de la esporulación están anclados en la membrana del septo.

La composición de los ácidos grasos insaturados que se muestra en este trabajo es diferente a la descripta por Aguilar y colaboradores (1998) en otra cepa de *B. subtilis*. Dichos autores postulan que en esta especie solamente existe un único gen (*des*) que codifica para la enzima Δ5 desaturasa (Des), responsable de la síntesis del ácido graso 18:1 ω13. No obstante, durante el estudio de ácidos grasos por cromatografía gaseosa que se realizó en este trabajo, se analizaron diversos patrones y comprobamos que bajo las condiciones utilizadas, los tiempos de retención del 18:1 ω9 y del 18:1 ω13 son diferentes descartando de esta manera algún error en la interpretación de nuestros resultados. La diferencia observada podría deberse a que se estudiaron distintas cepas y a que las mismas fueron crecidas en diferentes medios de cultivo como ha sido descripto previamente (Kaneda, 1963; Klein *et*

al., 1999). Además, recientemente se demostró que *B. subtilis* es capaz de sintetizar cuatro especies de ácidos grasos monoinsaturados diferentes dependiendo de la composición del medio, la temperatura y la fase de crecimiento. Si bien este trabajo demuestra que la síntesis de todos estos ácidos grasos es estrictamente dependiente de la presencia de la enzima Des, los mismos difieren en el largo de la cadena, el patrón de ramificación y la posición del doble enlace. A partir de estos resultados Weber y colaboradores (2001) cuestionan si realmente la enzima Des actúa como una desaturasa específica para la posición $\Delta 5$.

c) “Shock” osmótico: caracterización bioquímica de las membranas.

Los estudios que se realizaron durante un shock osmótico demostraron que se produce un aumento en la concentración de CL en la membrana de *B. subtilis*, al igual que durante el crecimiento en hipersalinidad. Estos resultados indicarían que una de las primeras respuestas de las membranas de *B. subtilis* al estrés hipersalino es el cambio en la composición de fosfolípidos aniónicos. Asimismo, se observa una disminución de PE y de LysPG a tiempos largos de incubación. Esto sugeriría que el metabolismo fosfolipídico se encuentra alterado como consecuencia del shock osmótico y corrobora la inducción en la biosíntesis de CL. Esta inducción provocaría una disminución en la concentración de los precursores de los otros fosfolípidos que afectaría la concentración de los mismos en la membrana. Con respecto a la composición de los ácidos grasos, se observó una disminución en el porcentaje de los saturados ramificados y un aumento en el de los saturados lineales. Cuanto mayor es el tiempo de incubación en presencia de NaCl menor es la proporción de ácidos grasos ramificados pertenecientes a la serie iso. A diferencia de los resultados obtenidos durante el crecimiento en hipersalinidad, durante el shock osmótico se determinó que se produce una disminución en la concentración de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Estos cambios en la composición de ácidos grasos podrían atribuirse a la adaptación de las membranas a la alta osmolaridad y serían necesarios para mantener la membrana en fase líquida ordenada.

Los cambios observados en la composición de la membrana de las células de *B. subtilis* en respuesta al shock por NaCl (aumento de CL, de DGDG, de los ácidos grasos lineales y la disminución de los ramificados) son similares a los cambios observados debido al crecimiento en hipersalinidad. En conjunto, estos resultados estarían indicando que estos cambios serían fundamentales para la adaptación de *B. subtilis* al estrés osmótico.

Capítulo 2:

Membranas: caracterización físico-química:

a) Determinación de la microviscosidad y de orden lipídico de las membranas de *B. subtilis* durante el crecimiento en alta osmolaridad.

Desde el punto de vista teórico, se esperaría que el aumento observado en la concentración de ácidos grasos saturados lineales y la disminución de los ramificados en respuesta al estrés salino, provoque un aumento en el grado de empaquetamiento de la bicapa. No obstante, puesto que también se detectó un aumento en la concentración de los ácidos grasos monoinsaturados en respuesta al estrés, éstos inducirían una disminución en la microviscosidad de la bicapa. Asimismo, se detectaron cambios importantes en la composición de los lípidos polares en respuesta al crecimiento en hipersalinidad que provocarían consecuencias opuestas sobre el empaquetamiento y la movilidad de los lípidos de la membrana de *B. subtilis*. El aumento observado en la concentración de CL contribuiría a aumentar el grado de empaquetamiento de las membranas. Recientemente, Mileykovskaya y colaboradores (2001) demostraron que este fosfolípido de naturaleza aniónica estaría organizado en la bicapa formando agrupamientos con características hidrofóbicas. Asimismo, diversos estudios han demostrado que un incremento de la concentración de CL en la membrana aumentaría el orden lipídico y por consiguiente la estabilidad de las mismas (Hoch, 1992; Shibata *et al.*, 1994). Por el contrario, el aumento detectado en la concentración del glicolípido durante el crecimiento en hipersalinidad tendría el efecto opuesto ya que se ha demostrado que este tipo de lípidos provoca un efecto desestabilizador en las bicapas lipídicas (Rivas & Luzzati, 1969). No obstante, se sabe que la fluidez y las propiedades funcionales de las membranas biológicas son una consecuencia de la colaboración entre las proteínas y los lípidos presentes en las bicapas. Con excepción de anillo lipídico que se encuentra en contacto directo con las proteínas, las características dinámicas de los dominios lipídicos se encuentran indirectamente afectados por la presencia de las proteínas. Por ello, las características dinámicas de las membranas son parcialmente similares a las observadas en los liposomas contruidos con los extractos lipídicos (Shinitzky & Barenholz 1978).

En esta tesis se estudió la microviscosidad y el grado de empaquetamiento lateral de las membranas y de los liposomas de *B. subtilis* mediante la espectroscopía de fluorescencia utilizando tres sondas fluorescentes (DPH, TMA-DPH y Laurdan) las cuales se ubican en distintas zonas de la bicapa lipídica.

Los resultados obtenidos indicaron que no existe transición de fases en las membranas de *B. subtilis*. Tampoco se observan estas transiciones ni en los liposomas construidos a partir de lípidos totales ni en los de lípidos polares. Resultados similares fueron descriptos en células de *B. subtilis* sometidas a un estrés térmico (Herman *et al.*, 1994). Las características fluorescentes del Laurdan estudiadas en esta tesis indicaron que las membranas y los liposomas se encuentran en un estado de fase líquido-ordenado descartándose además la coexistencia de fases. Como fue previamente descripto en *B. stearothermophilus* crecido a diferentes temperaturas (Reizer *et al.*, 1985), los resultados obtenidos con las distintas sondas indican que las proteínas aumentan la microviscosidad de los lípidos de las membranas de *B. subtilis* en comparación con los liposomas libres de proteínas. En efecto, no se observaron diferencias en la microviscosidad de los liposomas de lípidos totales y polares debido a la condición de crecimiento.

Los estudios dinámicos realizados con las sondas DPH y TMA-DPH indicaron que las membranas de las células crecidas en hipersalinidad presentan una disminución en el grado de hidratación a nivel de la interfaz hidrofílica-hidrofóbica de la bicapa (estimado por el TMA-DPH y confirmado por el Laurdan) y en la zona más profunda de la bicapa (medido por el DPH). En cuanto a la velocidad de rotación de estas sondas, solamente se determinaron diferencias en el DPH ubicado en las membranas. Los valores obtenidos sugerirían que la sonda rotaría más lentamente en las membranas de las células crecidas en hipersalinidad. Este resultado estaría relacionado con el aumento determinado en el orden lipídico (detectado mediante el estudio de la anisotropía del estado estacionario y dinámico de las sondas DPH y TMA-DPH) y en el grado de empaquetamiento lateral (detectado con el Laurdan) en las membranas durante el estrés osmótico.

La anisotropía límite medida sobre los liposomas de lípidos polares indicaría que la presencia de NaCl provocaría una diferencia en el orden de los lípidos entre las zonas externas e interna de la bicapa. Sin embargo, estos resultados son opuestos a los obtenidos en las membranas ya que se observó que la anisotropía límite aumenta especialmente en la región que es sensada por el DPH. No obstante, si bien el crecimiento en hipersalinidad afecta en menor medida a las mediciones de anisotropía límite realizadas con la sonda TMA-DPH en las membranas respecto a los liposomas libres de proteínas, es importante destacar que el efecto detectado en el orden lipídico y el empaquetamiento medido mediante el DPH y el Laurdan es totalmente opuesto. Por lo tanto podría concluirse que la presencia de las proteínas en las membranas es el principal factor responsable del aumento en el

empaquetamiento y orden lipídico de las membranas de las células de *B. subtilis* crecidas en hipersalinidad.

En conjunto estos resultados sugerirían que el aumento en el contenido del glicolípido y en los ácidos grasos monoinsaturados durante el estrés osmótico, contribuirían a la disminución en el orden lipídico y en el empaquetamiento observado en los lípidos polares (detectado mediante la anisotropía límite del DPH) y en los lípidos totales (detectado mediante la GP_{exc} del Laurdan). No obstante, los resultados obtenidos con la sonda TMA-DPH indicaron que se produce un aumento en el orden lipídico durante el crecimiento en hipersalinidad. Esto podría atribuirse a que esta sonda catiónica estaría particionándose diferencialmente en agrupaciones de fosfolípidos cargados negativamente como la CL, cuya proporción es mayor bajo condiciones de estrés.

Se obtuvieron distintos valores de polarización generalizada del Laurdan en los dos tipos de liposomas y en las membranas aisladas obtenidas a partir de ambas condiciones de crecimiento. Esto podría deberse a los cambios descritos en la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos debidos al crecimiento en hipersalinidad. Ambos componentes estarían afectando el grado de empaquetamiento de la bicapa y por consiguiente su grado de hidratación.

En conclusión, se podría afirmar que el aumento determinado en el grado de empaquetamiento de los lípidos bajo condiciones de estrés apoyaría la teoría de la “eficacia homeoviscosa” demostrando que el cambio producido en la composición de la membrana en *B. subtilis*, se produciría con el propósito de mantenerla en una fase líquida ordenada necesario para la viabilidad celular. Finalmente, los resultados mostrados en esta tesis indicarían que las propiedades físicas de las membranas de *B. subtilis* varían debido a un aumento en la osmolaridad externa del medio de cultivo. Además, confirman la variación de las características físico-químicas de las bicapas debida a la interacción de los lípidos con las proteínas de la membrana. A pesar de que no se observan diferencias cuantitativas en la relación fosfolípidos / proteínas como consecuencia del aumento en la osmolaridad del medio de cultivo, se observaron cambios en el perfil de las proteínas de membrana. Estas variaciones, junto con las obtenidas en la composición de lípidos polares y de ácidos grasos, estarían contribuyendo a la adaptación biológica de las propiedades físicas de las membranas al estrés osmótico.

b) Estabilidad de liposomas y membranas frente a la acción de Tritón X-100.

En los ensayos de estabilidad realizados mediante la solubilización con Tritón X-100 sólo se observan diferencias significativas entre los liposomas de lípidos totales extraídos de

las células crecidas bajo ambas condiciones de cultivo. Se necesitó utilizar una mayor concentración de detergente en los liposomas de las células crecidas en hipersalinidad para poder completar el proceso de solubilización. Estas diferencias podrían atribuirse a los lípidos neutros, los cuales estarían estabilizando la estructura de la bicapa de estos liposomas. Además, los resultados indican que las membranas presentan una mayor sensibilidad a la acción de detergentes que los liposomas. Estudios realizados en sistemas modelos de liposomas detectaron que el proceso de solubilización se encuentra influenciado por el estado de la fase lipídica (Domecq *et al.*, 2001), siendo la fase gel la más sensible a la acción de los detergentes. Los resultados obtenidos con la GP_{exc} del Laurdan indican que las membranas aisladas poseen un mayor grado de empaquetamiento que los liposomas de lípidos totales y como consecuencia de ello, las mismas serían más sensibles a la acción del Tritón X-100.

c) Permeabilidad de protones en liposomas.

Dentro de los ensayos realizados para caracterizar físico-químicamente a las membranas de *B. subtilis* crecidas bajo estrés salino, se estudió el proceso de permeabilidad de protones a través de las bicapas. El objetivo de estos ensayos fue el de comprobar la teoría de la “adaptación homeoviscosa de la permeabilidad” propuesta por van der Vossberg y colaboradores (1999). Dicha teoría postula que los microorganismos son capaces de ajustar su composición lipídica en respuesta a diversos factores externos manteniendo constante la permeabilidad de la membrana a los protones. Estos autores, demostraron que las células de *B. subtilis* mantienen constante esta permeabilidad independientemente de la temperatura a la cual son crecidas las células. Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que cuando de *B. subtilis* es crecida en medios hiperosmóticos también es capaz de mantener constante la permeabilidad a los protones, indicando que dicho parámetro es importante para la viabilidad celular.

d) Estudios de la formación de dominios de cardiolipina:

Otro de los objetivos que fueron planteados en esta tesis fue el de demostrar si el crecimiento en hipersalinidad era capaz de inducir la formación de dominios de cardiolipina. Estudios realizados en diversos laboratorios utilizaron a la sonda fluorescente Nonyl-Acridine Orange (NAO) para determinar la formación de dichos dominios (Gallet *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1994, Mileyskenskaya & Dowhan, 2000). Estos trabajos postularon que la carga neta negativa que presenta la cardiolipina y la estructura que adopta en la bicapa es fundamental para la formación de los dímeros fluorescentes de la sonda. A diferencia de estos trabajos, que en general se realizaron utilizando concentraciones fijas de la sonda,

Septinus y colaboradores (1983) señalaron la importancia de la concentración de la sonda sobre la forma de los espectros de emisión. En particular, dichos autores demuestran que la formación del dímero fluorescente es dependiente de la concentración utilizada y de las interacciones hidrofóbicas que se producen entre las moléculas de la sonda.

Los resultados obtenidos en este trabajo durante la puesta a punto de esta técnica demostraron que la formación del dímero no depende exclusivamente de la presencia de una superficie en la cual la sonda pueda adsorberse. Se utilizaron liposomas conteniendo distintos fosfolípidos aniónicos como PA, PG y CL y se observó que la presencia de fosfolípidos cargados negativamente era fundamental para la formación del dímero. Sin embargo, se determinó que para la formación del mismo no es necesaria la presencia de CL en la bicapa ya que se observa la banda de emisión del dímero en los liposomas conteniendo PA y PG. Únicamente se observó la presencia del dímero dependiente de la presencia de CL a bajas concentraciones de sonda ($2.5\mu\text{M}$) y de fosfolípidos aniónicos (10mol%). La formación del dímero en todas las condiciones estudiadas no se debió a cambios en la carga neta superficial ($\Delta\Psi_0$) de los liposomas, ya que los valores obtenidos de $\Delta\Psi_0$ son los mismos independientemente del fosfolípido utilizado. Recientemente, se postuló que la CL sería capaz de formar una especie de cavidad hidrofóbica en la bicapa, permitiendo que los protones se ubiquen en la superficie de la membrana (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Los resultados que se obtuvieron en esta tesis utilizando bajas concentraciones de CL, indicarían que este fosfolípido estaría formando dichas estructuras hidrofóbicas que permiten la formación del dímero únicamente en estos liposomas. Puesto que la CL posee cuatro cadenas de ácidos grasos y su cabeza sería al parecer compacta, es posible que el sistema de anillos de la NAO se acomode entre las moléculas de CL favoreciendo a las interacciones directas entre estos anillos para la formación de dímero (Mileykovskaya *et al.*, 2001).

Para determinar si el comportamiento de la sonda era similar en muestras biológicas, se determinaron los espectros de emisión de NAO en liposomas y membranas de las células de *B. subtilis* crecidas en condiciones normales y de hipersalinidad. Se determinó que aún a bajas concentraciones de sonda ($2.5\mu\text{M}$), la banda de emisión del dímero es capaz de formarse en las membranas y los liposomas de la cepa crecida bajo ambas condiciones de crecimiento. Además, el resultado más importante que fue el ensayo control realizado con una cepa incapaz de sintetizar CL demostró que la aparición de dicha banda era independiente de la presencia de dicho fosfolípido.

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo demostraron por primera vez que en un microorganismo la presencia de CL en las membranas y la carga neta de superficie

no son fundamentales para permitir la formación del dímero de NAO. Aparentemente, la formación de dominios hidrofóbicos sobre las bicapas sería el único factor que estaría relacionado con el proceso de dimerización de la sonda. Estas observaciones indican que la NAO es capaz de dimerizarse esencialmente debido a interacciones hidrofóbicas y que la adsorción de la misma no es debida a la carga neta de la CL acorde a lo descrito utilizando como modelo a la membrana mitocondrial (Septinus *et al.*, 1983; Keij *et al.*, 2000).

Capítulo 3:

Fosfolípidos aniónicos.

a) Mutantes para la biosíntesis de cardiolipina: caracterización fisiológica, bioquímica y genética frente al estrés osmótico.

El análisis efectuado sobre los cambios en la composición lipídica de las membranas de *B. subtilis* frente al estrés salino, revela un aumento importante en la concentración de cardiolipina. Para determinar si el cambio en la concentración de este fosfolípido es importante para el crecimiento en altas salinidad se construyeron diversas cepas mutantes del metabolismo de fosfolípidos. Se consideraron esencialmente a los genes responsables de la síntesis de la cardiolipina (*cls*) y de la fosfatidilglicerolfosfato sintasa (*pgs*). *B. subtilis* posee tres genes homólogos al gen de *E. coli* que codifica para la enzima cardiolipina sintasa (*cls*), los mismos son *ywnE* (*cls2*), *ywiE* (*cls1*) y *ywjE*.

Estudios realizados utilizando la cepa Marburg de *B. subtilis* indicaron que el gen *ywnE* era el único implicado en la síntesis de cardiolipina (Matsumoto *et al.*, 1999). Sin embargo, los análisis obtenidos a partir de "microarrays" de ADN detectaron que el gen *ywiE* es el que se induce durante el estrés por NaCl y por etanol (Price *et al.*, 2001, Petersohn *et al.*, 2001). Este gen posee un promotor que es reconocido por el factor sigma B (σ^B), el cual está involucrado en la respuesta al estrés en esta especie (Petersohn *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta estos resultados contradictorios, se construyeron las cepas mutantes para los genes *cls1* (cepa CL1) y *cls2* (cepa CL2) en el contexto genético salvaje de referencia (YB886) y se evaluó su rol en la síntesis de cardiolipina.

El análisis de la composición de lípidos polares de la cepa CL1 no presentó diferencias significativas respecto de la cepa salvaje, indicando que el gen *cls1* no cumple ningún rol en la biosíntesis de cardiolipina.

El análisis del perfil lipídico de la cepa CL2 mostró una ausencia total de cardiolipina y reveló que en esta cepa el único fosfolípido aniónico es el PG, el cual constituye el 77% de

los fosfolípidos totales. A diferencia de lo obtenido en mutantes de *E. coli* (Nishijima *et al.*, 1988), no se detectó la acumulación de ácido fosfatídico (PA) debido a la ausencia de CL. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de la PE en comparación con la cepa salvaje. No obstante, se determinó que el porcentaje de LysPG se encontraba disminuído, lo que sugiere que el metabolismo de este fosfolípido estaría alterado como consecuencia de la ausencia de CL.

Los resultados obtenidos con la cepa CL2 indicarían que en *B. subtilis* el producto del gen *cls2* sería el único responsable de la actividad cardiolipina sintasa confirmando los resultados obtenidos en la cepa Marburg de *B. subtilis* (Matsumoto *et al.*, 1999).

En los ensayos de osmorresistencia realizados en medio sólido se determinó que no existen diferencias en el crecimiento y en la morfología de las colonias entre las cepas analizadas. También se comprobó que la fase estacionaria es el estadio de mayor resitencia al estrés salino en esta mutante como fuera descrito por Ruzal y Sánchez Rivas (1994) en la cepa salvaje YB886. Estos resultados sugieren que la cardiolipina no sería importante para resistir el estrés osmótico cuando las células se encuentran en dicho estadio. Sin embargo, los ensayos de adaptación a medios hipersalinos mostraron diferencias significativas. A bajas concentraciones de NaCl (0.75 y 1M) la cepa mutante se adapta y crece de manera similar a la cepa salvaje. A altas concentraciones de NaCl la situación es diferente pues la cepa CL2 presenta un retraso en el crecimiento de 5 horas en 1.25M NaCl y de 10 horas en 1.5M NaCl y alcanza un menor crecimiento que la cepa salvaje. Esto indicaría que la presencia de CL sería importante para la adaptación de *B. subtilis* a altas concentraciones salinas aunque no tendría un rol tan importante para el crecimiento.

Puesto que la cepa CL2 es capaz de crecer en medios hiperosmóticos, se determinó si la cardiolipina puede sintetizarse por una vía alternativa al producto del gen *cls2* en esas condiciones. El análisis de la composición lipídica demostró que la cepa es incapaz de sintetizar CL por una vía independiente al gen *cls2*. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el contenido de los fosfolípidos no aniónicos en esta cepa, pero si se determinó un aumento significativo en el porcentaje de PG y del DGDG en esta cepa cuando es crecida en hipersalinidad. Un aumento en la concentración de glicolípidos también fue descrito durante el crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones de estrés por NaCl (Sharma *et al.*, 1996).

Estos resultados confirman que el producto del gen *cls2* es el único responsable de la síntesis de cardiolipina en *B. subtilis* y señalarían la tendencia existente en la mutante CL2 a aumentar la concentración de los fosfolípidos aniónicos en respuesta al estrés osmótico. Este

aumento en el porcentaje de PG sugeriría que en determinadas reacciones específicas que son dependientes de las cabezas polares de los fosfolípidos, este fosfolípido reemplazaría a la CL. En *E. coli* se demostró que los fosfolípidos aniónicos se encuentran involucrados en diversos procesos celulares como la activación de complejos inactivos de la proteína iniciadora de la replicación a partir de OriC (Croque, 2001) y la translocación de las proteínas dependientes de SecA a través de la membrana interna (Dowhan, 1997). Asimismo, en mutantes para la cardiolipina sintasa (gen *cdr1*) de *Saccharomyces cerevisiae* también se ha demostrado que el PG es capaz de compensar la ausencia de la CL (Jiang *et al.*, 2000).

Los ensayos de actividad transcripcional realizados con la cepa CL2 mostraron un aumento en la expresión del gen *cls2* bajo condiciones de estrés hipersalino. No obstante, se determinó que dicha expresión es dependiente de la fase de crecimiento, siendo más importante cuando las células ingresan a fase estacionaria. Este resultado concuerda con los datos bioquímicos presentados en este trabajo donde se demostró que a medida que las células de *B. subtilis* ingresan a la fase estacionaria se produce un aumento en la concentración de CL. Resultados similares fueron obtenidos en una cepa donde se estudió la transcripción del gen *cls2* en un contexto salvaje sugiriendo que la regulación de este gen es independiente de la presencia de la proteína codificada por el mismo.

El análisis de la composición de ácidos grasos mostró que la cepa CL2 crecida en el medio de cultivo LB, aumenta el porcentaje de ácidos grasos lineales y disminuye el de los ramificados en comparación con la cepa salvaje. Además, se determinó que estas diferencias están más acentuadas bajo condiciones de estrés. El estudio de la composición de ácidos grasos de ambas cepas (CL2 y salvaje) crecidas en hiperosmolaridad indicaría que en *B. subtilis* existe una tendencia a aumentar los ácidos grasos lineales y disminuir los ramificados en respuesta al estrés.

b) Mutantes para la biosíntesis de cardiolipina: caracterización físico-química.

En la cepa salvaje estos cambios producían un aumento en la microviscosidad de la membrana. Para verificar si en la cepa CL2 se producía el mismo tipo de efecto se midió el grado de empaquetamiento lateral utilizando la sonda fluorescente Laurdan.

En el estudio de liposomas de lípidos totales y de membranas de la cepa CL2, los valores de polarización generalizada del Laurdan indicaron que los lípidos y las membranas de esta cepa crecida bajo condiciones normales y de estrés se encuentran en una fase líquida ordenada. No obstante, se determinó que existe un menor grado de empaquetamiento de los lípidos de las células crecidas en el medio LB. Al igual que los resultados obtenidos para la

cepa salvaje, se descartó la transición y la coexistencia de fases en los liposomas y en las membranas.

El grado de hidratación de la interfaz hidofílica-hidrofóbica calculado a la temperatura de crecimiento (37°C) seguiría en los liposomas el siguiente orden $CL2 > wt \sim wt + NaCl > CL2 + NaCl$ y en las membranas $CL2 > CL2 + NaCl > wt > wt + NaCl$. Esto indicaría que los liposomas y la membrana de la cepa CL2 crecida en medio normal LB son los que poseen un mayor grado de hidratación o lo que es similar un menor empaquetamiento lateral.

La composición lipídica y de ácidos grasos observada en la cepa CL2 crecida en hiperosmolaridad sería uno de los principales factores que estarían provocando la diferencia en el empaquetamiento lateral de los liposomas y de las membranas. En estas muestras se esperaría que la ausencia de CL influyera sobre el ordenamiento lipídico debido a la estructura particular que presenta este fosfolípido. Sin embargo, los resultados obtenidos con las membranas sugieren, que sería la presencia de las proteínas el factor fundamental para determinar las características físicas de estas. Estos resultados serían los primeros en demostrar la influencia de la CL en la microviscosidad de las membranas bacterianas.

Entre los estudios de la caracterización físico-química de las membranas de la cepa CL2, se realizaron ensayos de permeabilidad a protones con el objetivo de determinar si la ausencia de CL afectaba a este parámetro. Los resultados sugieren que los liposomas de esta cepa crecida en el medio normal LB, presentan una permeabilidad diferencial a protones dependiente de la composición iónica del medio. Una de las posibles explicaciones sería la diferencia en el grado de solvatación de los iones disociados cuando los mismos se encuentran en la interfaz lípido-agua. Otra posibilidad estaría relacionada con las constantes de unión de los distintos iones al PG, las cuales siguen el orden relativo $Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$ (Tocanne & Teissie, 1990). Se observó que la velocidad con la que se llegó al equilibrio era dependiente de la composición del medio tal como fue previamente descrito en sistemas modelos de liposomas (Burnham *et al.*, 1982). Asimismo, se determinó que la ausencia de CL en estos liposomas, provoca un aumento en la inestabilidad de los mismos, de acuerdo con el postulado que la CL estabiliza la estructura lamelar de las bicapas lipídicas (Shibata *et al.*, 1994).

Cuando se estudiaron a los liposomas de la cepa CL2 crecida en hipersalinidad, se demostró que los mismos no responden al gradiente de amonio impuesto, pues no se detectó ninguna disminución significativa en la intensidad de fluorescencia de la sonda naranja de acridina.

Se ha descripto que en los fosfolípidos aniónicos como PG, PI, PA y CL el sitio de unión de los cationes es el grupo fosfato. En el caso particular del PG se sabe que los iones monovalentes son capaces de penetrar entre las cabezas polares dependiendo de la fase en la que se encuentra este fosfolípido (Tocanne & Teissie, 1990). Las observaciones realizadas con el Laurdan indicaron que los liposomas compuestos por lípidos de la cepa CL2 crecida en condiciones normales presentan un menor grado de empaquetamiento que los obtenidos con la cepa crecida en hipersalinidad. Esta variación sería la responsable de la diferencia observada en la permeabilidad de protones en la cepa CL2 crecida bajo condiciones normales y de estrés.

c) Mutante para la biosíntesis de fosfatidilglicerol: caracterización fisiológica, bioquímica y genética.

Como se ha demostrado, la mutante CL2 es capaz de crecer en medios hipersalinos pese a la ausencia de CL. Sin embargo, se produce un aumento en la concentración de PG indicando que los fosfolípidos aniónicos (PG o CL) son importantes para el crecimiento en alta salinidad. Con el propósito de determinar si efectivamente la presencia de estos fosfolípidos es fundamental para las células y para el crecimiento en alta salinidad, se construyó la mutante PGS1. En esta cepa el gen *pgsA* se encuentra bajo el control del promotor *Pspac*, el cual es reprimible por el represor LacI y por lo tanto inducible por IPTG. Los estudios realizados con esta mutante demostraron que la viabilidad de esta cepa depende de la presencia del inductor en el medio de cultivo. Esto sugeriría que la presencia de lípidos aniónicos es fundamental para la viabilidad de *B. subtilis*. El mismo tipo de resultados se observó en mutantes del gen *pgsA* de *E. coli*. No obstante, en esta especie se determinó que la viabilidad celular se recupera cuando existe una segunda mutación en el gen que codifica para la principal lipoproteína de la membrana externa (Lpp) de *E. coli* (Kikuchi *et al.*, 2000). Resultados recientes demostraron que la acumulación de esta lipoproteína provoca anomalías en la membrana celular y como consecuencia de ello se produce la lisis de las células (Suzuki *et al.*, 2001). En el caso de *B. subtilis* no se puede descartar que la ausencia de viabilidad observada en la cepa PGS1 se deba a alguna causa similar. Las lipoproteínas de *B. subtilis* se encuentran presentes en la membrana, pero se conoce muy poco acerca de su biosíntesis.

A medida que aumenta la concentración del inductor en el medio de cultivo se produce un incremento en la concentración de PG y de CL en la membrana de esta cepa. Los valores alcanzados en el contenido de PG son similares a los de la cepa salvaje, sin embargo el de CL es menor. El porcentaje de DGDG también fue afectado por las distintas concentraciones

de IPTG, determinándose que a medida que aumenta el porcentaje de los fosfolípidos aniónicos se produce una disminución en el contenido del glicolípido. Esto estaría relacionado con los cambios que se producen en el metabolismo de fosfolípidos, los cuales estarían favoreciendo la síntesis de lípidos aniónicos.

La importancia de los fosfolípidos aniónicos quedó en evidencia en los ensayos de osmorresistencia realizados en la cepa PGS1. Se determinó que a bajas concentraciones de IPTG esta cepa es osmosensible en el estadio T+1. Cuando se correlacionaron los valores obtenidos de osmorresistencia con los de la contribución porcentual de CL y de PG en las membranas de PGS1, se concluyó que cuando la bacteria sintetiza bajas concentraciones de fosfolípidos aniónicos, la misma no es capaz de resistir el estrés osmótico independientemente de la fase de crecimiento en la que se encuentra. Claramente a medida que aumenta la concentración de dichos fosfolípidos la osmorresistencia de las células de PGS1 es mayor.

A diferencia de los ensayos que se realizaron con la cepa CL2, no fue posible realizar experimentos de adaptación a hipersalinidad en la cepa PGS1, puesto que cuando se intentó crecer a la misma en LB + NaCl y sin IPTG, no se observó crecimiento durante largos tiempos de incubación. Por lo tanto fue difícil diferenciar el efecto del estrés osmótico de aquel debido a la pérdida de viabilidad. Además, la alta tasa de reversión o supresión de la mutación no permitió realizar una correcta interpretación de los resultados.

En cuanto a la actividad transcripcional del promotor del gen *pgsA* se observó que la misma presenta una pequeña inducción a medida que las células ingresan a la fase estacionaria. Esto concuerda con los resultados bioquímicos presentados en el primer capítulo donde se demostró que el porcentaje de este fosfolípido varía en función de la fase de crecimiento. El mismo análisis realizado en cultivos en presencia de NaCl, mostró una inducción de la transcripción, siendo ésta de aproximadamente 2 a 3 veces que en el medio LB. Además, se confirmó que la inducción se produce cuando las bacterias ingresan a la fase estacionaria de crecimiento.

En conjunto estos resultados demostrarían el rol relevante del PG en la viabilidad celular el cual es aún mayor cuando la bacteria es crecida en presencia de NaCl.

Por primera vez, en este trabajo se demostró que cuanto mayor es el contenido de fosfolípidos aniónicos en las membranas de las células de *B. subtilis*, mayor es la osmorresistencia de las mismas. Sin embargo, puesto que se conocen diversos mecanismos involucrados en la resistencia a la alta salinidad no se puede concluir que el aumento

observado en la osmorresistencia sea exclusivamente debido a la presencia de fosfolípidos aniónicos.

Aportes y perspectivas de este trabajo:

En esta tesis se demostró la importancia de los fosfolípidos aniónicos en la adaptación de *B. subtilis* al crecimiento en alta salinidad. Además se observaron diversos cambios fisicoquímicos (fluidez, hidratación interfacial, grado de empaquetamiento lateral de lípidos) que se producen en las membranas en respuesta a dicho estrés. Los cambios observados en las membranas de *B. subtilis* durante el crecimiento en alta osmolaridad serían importantes para contrarrestar la diferencia osmótica entre la célula y el medio exterior y/o para transmitir las señales necesarias para la activación de las proteínas osmosensoras involucradas en la osmorrespuesta.

En este aspecto se ha descripto que la actividad de osmosensado de la proteína OpuA de *L. lactis* se encuentra regulada por diversas características físico-químicas de las membranas como ser la hidratación de la misma, el grado de empaquetamiento y la composición de fosfolípidos (van der Heide & Poolman, 2000; van der Heide *et al.*, 2001). En *C. glutamicum* y en *E. coli* también se han analizado la importancia de dichos parámetros en la activación de las proteínas BetP y ProP respectivamente (Rübenhagen *et al.*, 2000; Racher *et al.*, 1999). Todos estos trabajos fueron realizados utilizando proteoliposomas y en los mismos se ha comenzado a dilucidar si el osmosensor detecta los cambios fisicoquímicos que se producen en la membrana como consecuencia del aumento de la osmolaridad externa o detecta directamente este cambio en la osmolaridad. En este aspecto nuestros resultados contribuyen a entender cuál es el estado físico-químico de la membrana durante el estrés osmótico en *B. subtilis* y qué tipo de cambios se producen en esta.

En base a estos resultados sería interesante determinar la actividad de los transportadores del tipo Opu en las membranas de las distintas cepas crecidas bajo condiciones de estrés. Además, sería importante analizar si el transporte de prolina (como osmoprotector) a través de OpuE, se encuentra alterado como consecuencia de las variaciones físico-químicas observadas en las membranas de la cepa salvaje y de las distintas cepas mutantes.

CONCLUSIONES:

- Se demostraron que se producen cambios morfológicos en las células de *B. subtilis* como consecuencia de un aumento en la osmolaridad externa del medio de cultivo.
- Se determinó que la composición de lípidos polares y de ácidos grasos varía en función de la fase de crecimiento celular y de la osmolaridad del medio de cultivo. En particular, se observó un aumento en la concentración de los fosfolípidos aniónicos en función de ambos parámetros.
- Se observó que los cambios producidos en las membranas de *B. subtilis* en respuesta al estrés osmótico y a un shock osmótico son similares (aumento de CL, de DGDG, de los ácidos grasos saturados lineales y disminución de los ramificados).
- Se determinó por primera vez en esta especie, que los cambios en la composición lipídica en respuesta al crecimiento en hipersalinidad traen aparejados un aumento en la microviscosidad de las membranas de *B. subtilis* (demostrado por medio del estudio de parámetros estáticos y dinámicos de diversas sondas fluorescentes). Además, se confirmó que las características fisico-químicas de las bicapas dependen de la interacción de los lípidos con las proteínas de la membrana como había sido descrito en diversos modelos.
- Se determinó que la permeabilidad a los protones no se altera como consecuencia de estos cambios bioquímicos de membrana demostrando que dicho parámetro es importante para la viabilidad celular.
- A diferencia de lo observado en otros laboratorios, se demostró que la formación de los dímeros de la sonda 10-N-nonyl acridine orange no depende de la presencia de cardiolipina en las membranas ni de la carga neta superficial de las mismas. De esta manera se comprobó que esta sonda no puede ser utilizada para cuantificar la formación de dominios de cardiolipina en las membranas de *B. subtilis*.
- Se demostró que el gen *cls2* es el único responsable de la actividad cardiolipina sintasa en *B. subtilis*. Además, se presentaron evidencias de que la presencia de cardiolipina es importante para la adaptación y no para el crecimiento de *B. subtilis* en alta salinidad.
- La cuantificación de la actividad transcripcional del gen *cls2* mostró un aumento en la expresión del mismo bajo condiciones de estrés salino confirmando los datos bioquímicos obtenidos durante la caracterización de las membranas.
- La caracterización fisico-química de las membranas de la mutante para la síntesis de cardiolipina demostraron la influencia de este fosfolípido sobre la microviscosidad de las membranas.
- Se demostró que la viabilidad de las células de *B. subtilis* depende de la presencia de los fosfolípidos aniónicos (en particular de PG), siendo mayor esta dependencia cuando las células crecen en un medio hipersalino. Estos resultados confirman la importancia de estos fosfolípidos en la respuesta al estrés osmótico.



Claudia S. López



Apéndice:

Para una mejor comprensión de los distintos términos utilizados en la Introducción General de esta Tesis, definiremos con detalle a alguno de ellos.

Soluto compatible: es un cosolvente citoplasmático cuyos niveles pueden ser modulados en un gran rango sin interferir con las funciones celulares.

Cosolvente: es un soluto que afecta significativamente las propiedades del agua como solvente, dando como resultado una solución no ideal.

Osmoprotector: son compuestos que estimulan el crecimiento bacteriano en medios que poseen altas osmolalidades.

Respuesta osmoreguladora: es un proceso fisiológico que mitiga ajustes pasivos que ocurren en la estructura celular causados por cambios en la osmolalidad extracelular.

Osmosensor: es un “dispositivo” que detecta cambios en la actividad de agua extracelular (osmosensado directo) o cambios resultantes en la composición y estructura de la célula (osmosensado indirecto).

Osmotolerancia: es el rango de osmolalidad del medio externo que permite el crecimiento bacteriano.

Presión de turgencia: (ΔP) es la diferencia de presiones hidrostáticas que balancea a la presión osmótica (u osmolalidad).

Kosmotropo: son cosolventes que estabilizan las conformaciones nativas de macromoléculas biológicas. El glicerol, glicina y betaina son algunos de ellos.

BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas C. A. & Card G. L. (1980). Biochim. Biophys. Acta. Vol 602: 469-476. The relationships between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica*.
- Andre L, Hemming A, Adler L. (1991). FEBS Lett. Vol. 286:13-7. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺).
- Aguilar P. S., Cronan Jr. J. E. & de Mendoza D. (1998). J. Bacteriol. Vol. 180: 2194-2200. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipids desaturase.
- Archibald A. R., Hancock I. C. & Harwood C. R. (1993). Cell wall structure, synthesis and turnover. Cap 27, *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria., Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Editores A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick. American Society for Microbiology
- Ashe G. B. & Steim J. M. (1971). Biochim. Biophys. Acta Vol. 233: 810-814. Membrane transitions in Gram-negative bacteria.
- Bagatolli L., Gratton E., Khan T. K. & Chong P. L. G. (2000). Biophys. J. Vol. 79: 416-425. Two photon fluorescence microscopy studies of bipolar tetraether giant liposomes from Thermoacidophilic Archeabacteria *Sulfobolus acidocalcaricus*.
- Bagatolli L., Parasassi T., Fidelio G. & Gratton E. (1999) Photochem. Photobiol. 557-564. A model for the interaction of 6-Lauroyl-2-(N,N- dimethylamino) naphtalene with lipid environments: implications for spectral properties).
- Bangham A. D., Standish M. M. & Watkins J. C. (1965). J. Mol. Biol. Vol. 13: 238-252. Difussion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.
- Bartlett G. P. (1959). J. Biol. Chem. Vol. 234: 466-468. Phosphorous assay in column chromatography.
- Benson A. K. & Haldenwang W. G. (1993). J. Bacteriol. Vol. 175: 2347-2356, Regulation of σ^B levels and activity in *Bacillus subtilis*.
- Bhairi S. M. (1997). Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Ed. Calbiochem-Novabiochem Corporation.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
- Bishop D. G., Rutberg L. & Samuelson B. (1967). Eur. J. Biochem. Vol. 2: 448-453. The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*.
- Blomberg A. & Adler L. (1989). J. Bacteriol. Vol. 171: 1087-1092. Roles of glycerol and glycerol-3 phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Blount P. & Moe P. C. (1999). Trends Microbiol. Vol. 7: 420-427. Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function.
- Boch J., Kempf B. & Bremer E. (1994) J. Bacteriol. Vol. 176: 5364-5371. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine exogenously provided proline.
- Boch J., Kempf B., Schmid R. & Bremer E. (1996) J. Bacteriol. Vol. 178: 5121-5129. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes.
- Boch J., Nau-Wagner G., Kneip S. & Bremer E. (1997) Arch. Microbiol. Vol. 168: 282-289. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine.

- Boylan S. A., Redfield A. R., Brody M. S. & Price C. W. (1993). J. Bacteriol. Vol. 175: 7931-7937. Stress induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*.
- Bremer E. (2002). Adaptation to changing osmolarity. Capítulo 27, *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Eds. A. L. Sonenshein *et al.* ASM Press. Washington DC.
- Bron S. (1990) Plasmids p. 75-136. En Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Harwood C. R. and Cutting S. M. (eds.) J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Brundish D. E., Shaw N. & Baddiley J. (1965). Bioch. J. 95: 21c-22c. The occurrence of glycolipids in Gram positive bacteria.
- Burnham C., Munzesmeier C., Rabon E. & Sachs G. (1982). Biochem. Biophys. Acta. Vol 685: 260-272. Ion pathways in renal brush border membrane.
- Calbiochem®. (1997). Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation.
- Cantor R. S. (1997). J. Phys. Chem. Vol. 101:1723-1725. Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function.
- Castuma C. E., Crooke E. & Kornberg A. (1993). J. Biol. Chem. Vol. 268: 24665-24668. Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator of replication in *E. coli*.
- Cayley D. S., Guttman H. J. & Record M. T. (2000). Biophys. J. Vol. 78: 1748-1764. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *E. coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress.
- Chang G., Spencer R. H., Lee A. T., Barclay M. T. & Rees D. C. (1998). Science Vol. 282: 2220-2226. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel.
- Chang S. C., Heacock P. N., Clancey C. J. & Dowhan W. (1998). J. Biol. Chem. Vol. 273: 9829-9836. The PEL1 gene (renamed PGS1) encodes the phosphatidylglycerolphosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Christensen H., Garyton N. J., Horobin R. W., Minnikin D. E. & Barer M. R. (1999). Mol. Microbiol. Vol. 31: 1561-1572. Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes.
- Christie W. W. (1982). Lipid Analysis (Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids) second edition. Pergamon Press.
- Clerc S. & Barenholz Y. (1998) Anal. Biochem. Vol. 259: 104-111. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe.
- Clejan S. & Krulwich T. A. (1988). Biochim Biophys. Acta Vol. 946: 40-48. Permeability studies of lipid vesicles from alkalophilic *Bacillus firmus* showing opposing effects of membrane isoprenoid and diacylglycerol fractions and suggesting a possible basis for obligate alkaliphily.
- Correa, O. S., Rivas, E.A. and Barneix, A.J. (1999). Current. Microbiol. Vol. 38, 329-334. Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*.
- Cossins A. R. & Sinensky M. (1984): Adaptation of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids. Physiology of Membrane Fluidity, Vol II (M. Shnitzy, ed.). CRC Press, Boca Raton (Florida)
- Csonka L. & Hanson A. (1991). Annu. Rev. Microbiol. 45: 569-606. Prokariotic osmoregulation: Genetics and physiology.
- Csonka L. (1989). Microbiol. Rev. 121-147. Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress.

- Cullis P. R. & de Kruijff B. (1979). Biochim. Biophys. Acta. Vol. 559: 399-420. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes.
- D'Antuono C., Fernández-Tomé M. C., Sterin-Speziale N. & Bernik D. L. (2000). Arch. Biochim. Biophys. Vol. 382: 39-47. Lipid-protein interactions in rat renal subcellular membranes: A biophysical and biochemical study.
- Deuerling E., Mogk A., Richter C., Purucker M. & Schumann W. (1997) Mol. Microbiol. Vol 23: 921-933. The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion.
- de Mendoza D., Grau R. & Cronan Jr J. E. (1993). Biosynthesis and function of membrane lipids. Cap 28. *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria., Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Editores A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick. American Society for Microbiology.
- Domecq A., Disalvo E. A. & Bernik D. L. (2001). Drug Del. Vol. 8: 1-6. A stability test of liposome preparations using steady-state fluorescent measurements.
- Dowhan W. (1997) Annu. Rev. Biochem. Vol. 66: 199-232. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids?
- Edidin M. (1997). Curr. Opin. Struc. Biol. Vol. 7: 528-532. Lipid microdomains in cell surface membranes.
- Errington J. (1993). Microbiol. Rev. 57: 1-33. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis.
- Fernández Murga M. L. (1997). Tesis de doctorado. *Lactobacillus acidophilus*: actividad biológica y daño celular durante la conservación en frío.
- Fernández Murga M. L., Bernik D., Font de Valdez G & Disalvo A. (1999). Arch. Biochim. Biophys. Vol. 364: 115-121. Permeability and stability properties of membranes formed by lipids extracted from *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures.
- Gallet P. F., Maftah A., Petit J. M., Denis-Gay M. & Julien R. (1995). Eur. J. Biochem. Vol. 228: 113-119. Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-Nonyl-Acridine orange.
- González-Baró M. R., Garda H. & Pollero R. (2000). Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1468: 304-310. Effect of fenotrothion on dipalmitoyl and 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine bilayers.
- Gould R. M. & Lennarz W. J. (1970). J. Bacteriol. Vol. 104:1135-1144. Metabolism of phosphatidylglycerol and lysylphosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*.
- Hamill O. P. & Martinac B. (2001). Physiol. Rev. Vol. 81: 685-740. Molecular basis of mechanotransduction in living cells.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Harris F. M., Best K. B. & Bell J. (2002) Biochim. Biophys. Acta. En prensa. Use of Laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipids order.
- Hecker M. & Völker U. (1990). FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 74: 197-213. General stress proteins in *Bacillus subtilis*.
- Hecker M. & Völker U. (1998). Mol. Microbiol. 29: 1129-1136. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon.
- Herman, P.; Konopásek, I.; Plásek, J. & Svobodová, J. (1994). Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1190: 1-8. Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes.

- Herrmann A. Wüstner D., & Müller P. (2000). J. Lipid Res. 41:395-404. Head group-independent interaction of phospholipids with bile salts: a fluorescence and EPR study.
- Hoch F.L. (1992) Biochim. Biophys. Acta Vol. 1113: 71-133. Cardiolipin and biomembrane function.
- Horsburgh M. J. & Moir A. (1999) Mol. Microbiol. Vol. 32: 41-50. σ^M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentration of salt.
- Hoyrup P., Davidsen J. & Jorgensen K. (2001). J. Phys. Chem. B[®]. Vol. 105: 2649-2657. Lipid membrane partitioning of lysolipids and fatty acids: effects of membrane phase structure and detergent chain.
- Huijbregts R. P. H., de Kroon A. I. P. M. & de Kuijff B (2000). Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1469: 43-61. Topology and transport of membrane lipids in bacteria.
- Jiang F., Ryan M. T., Schlame M., Zhao M., Gu Z., Klingenberg M., Pfanner N. & Greenberg M. L. (2000). Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function.
- Jung K., Veen M. & Altendorf K. (2000). J. Biol. Chem. Vol. 275: 40142-40147. K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*.
- Jung K., Hamann K. & Revermann A. (2001). J. Biol. Chem. Vol. 276: 40896-40902. K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*.
- Kaasgaard T., Mouritsen O. G. & Jorgensen K. (2002). FEBS Lett. Vol. 515: 29-34. Lipid domain formation and ligand-receptor distribution in lipid bilayer membranes investigated by atomic force microscopy.
- Kaneda T. (1963). J. Biol. Chem. Vol. 238: 1222-1228. Biosynthesis of branched chain fatty acids. I Isolation and identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* (ATCC 7059).
- Kaneda T. (1967). J. Bacteriol. Vol. 93: 894-903. Fatty acids in the genus *Bacillus*. I iso- and anteiso-fatty acids as characterict constituents of lipids in 10 species.
- Kaneda, T. (1977). Bacteriol. Rev. 41: 391-418. Fatty acids in the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference.
- Kanemasa Y., Yoshioika T. & Hayashi H. (1972). Bioch. Biophys. Acta Vol. 280: 444-450. Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl.
- Kates M. (1972). Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. (De. by Work T. S. & Work E.) North- Holland Publishing Co. Amsterdam pp 372-374.
- Kates M. (1986). Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. Elsevier New York.
- Kempf B. & Bremer E. (1998). Arch. Microbiol. Vol. 170: 319-330. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high osmolality environments.
- Kent C., Kragg S. S. & Lennarz W. J. (1973). J. Bacteriol. 874-883. Procedure for the isolation of mutants of *Bacillus subtilis* with defective cytoplasmic membranes.
- Keij J. F., Bell-Prince C. & Steinkamp J. A. (2000). Cytometry Vol. 39: 203-210. Staining of mitochondrial membranes with NAO, mitofluorgreen and mitotracker green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs.

- Kikuchi S., Shibuya I. & Matsumoto K. (2000). J. Bacteriol. Vol. 182: 371-376. Viability of an *Escherichia coli* *pgsA* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin.
- Klein W., Weber M. H. W. & Marahaiel M. A. (1999). J. Bacteriol. Vol. 191: 5341-5349. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperature.
- Koch U., Haas R. & Fischer W. (1984). Eur. J. Bioch. Vol.133: 523-530. The role of lipoteichoic acid and biosynthesis in membrane lipid metabolism growing *Staphylococcus aureus*.
- Kroos L., Zhang B., Ichikawa H. & Yu Y. T. N. (1999) Mol. Microbiol. Vol. 31: 1285-1294. Control of sigma factor activities during *Bacillus subtilis* sporulation.
- Kunst F. & Rapoport G. (1995) J. Bacteriol. Vol. 177: 2403-2407. Salt stress in an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*.
- Laimins L. A., Rhoads D. B. & Epstein W. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 78: 464-468. Osmotic control of *kdp* operon expression in *E. coli*.
- Lakowicz J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition. Kluwer Academics / Plenum Publishers, New York. Chapter 11. pp 321-345.
- Lengeler J., Drews G. & Schlegel H. G. (1999). Biology of the Prokaryotes. Blackwell Science, Thieme Stuttgart, New York.
- Lichtenberg D. (1985) Biochim. Biophys. Acta Vol. 821: 470-478. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants.
- Lindblom G. & Rilfors L. (1992) Adv. Colloid Interface Sci., Vol. 41: 101-125. Nonlamellar phases formed by membrane lipids.
- Linders L. J. M., Wolkers W. F., Hoekstra A. F. & van't Riet K. (1997). Cryobiology Vol. 35: 31-40. Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*.
- López O., de la Maza A., Coderch L., López-Iglesias C., Wehrli E. & Parra J. L. (1998). FEBS Lett. Vol. 426: 314-318. Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100.
- López, C.S.; Heras, H.; Ruzal, S.M.; Sánchez-Rivas, C. & Rivas, E.A. (1998). Current Microbiol. Vol. 36: 55-61. Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium.
- Mc Auley K. E., Fyfe P. K., Ridge J. P., Isaacs N. W., Codgell R. J. & Jones M. R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96: 14706-14711. Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein.
- Marsch D. (1996) Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1286: 183-223. Lateral pressure in membranes.
- Matsumoto K. (2001). Mol. Microbiol. Vol. 39: 1427-1433. Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids.
- Matsumoto K., Takahashi H., Harashima R. & Hara H. (1999). Membrane lipid synthesis in *Bacillus subtilis* Marburg. 10th International Conference on Bacilli. Baveno, Italy.
- Mileykovskaya E. & Dowhan W. J. Bacteriol. (2000) 182: 1172-1175. Visualization of phospholipids domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange.
- Mileykovskaya E., Dowhan W., Birke R. L., Zheng D. Lutterodt L. & Haines T. H. (2001). FEBS Lett. Vol. 507: 187-190. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces.
- Moir A. & Smith D. A. (1990). Annu. Rev. Microbiol. Vol. 44: 531-533. The genetics of bacterial spore germination.

- Mouritsen O. G. & Jorgensen K. (1994). Chem Phys. Lipids. Vol. 73: 3-25. Dynamic order and disorder in lipids bilayers.
- Nichols, D.S.; Olley, J.; Garda, H.; Brenner, R.R. & McMeekin, T.A. (2000). Appl. Environ. Microbiol. Vol. 66: 2422-2429. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*.
- Nishijima S., Asami Y., Uetake N., Yamagoe S., Ohta A. & Shibuya I. (1988). J. Bacteriol. 170: 775-780. Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis.
- Oh Y. K., Freese E. B. & Freese E. (1973). J. Bacteriol. Vol. 113: 1034-1045. Abnormal septation and inhibition of sporulation by accumulation of L- α -glycerophosphate in *Bacillus subtilis* mutants.
- O'Leary W. (1967). The chemistry and metabolism of microbial lipids. The World Publishing Company.
- Op den Camp H. J. M. (1985). (Tesis de doctorado, Universidad de Nijmegen. Nijmegen, The Netherlands). Lipoteichoic acids of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. Structure, biosynthesis and biological properties.
- Op den Kamp, J. A. F.; Redai, I. & van Deenen, L.L.M. (1969). J. Bacteriol. Vol. 99: 298-303. Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*.
- Oren A. (1999). Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 63: 334-348. Bioenergetic aspects of halophilism.
- Padan E. & Krulwich T. A. (2000). Bacterial stress responses. Capítulo 8: Sodium stress. ASM Press Washintong, DC.
- Parasassi T., Loeiro M., Raimondi M., Ravagnan P. & Gratton E. (1993). Biochim. Biophys. Acta Vol. 1153: 143-154. Absence of lipid-gel phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types.
- Parasassi, T.; Di Stefano, M.; Loiero, M.; Ravagnan, G. & Gratton, E. (1994). Biophys. J. Vol. 66: 120-132. Influence on phospholipid bilayers phase domains detected by Laurdan fluorescence.
- Parasassi T. & Gratton E. (1995). J. Fluorescence 5: 59-69. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence.
- Petersohn A., Antelmann H., Gerth U. & Hecker M. (1999). Microbiology Vol. 145: 869-880. Identification and transcriptional analysis of new members of the σ^B regulon in *Bacillus subtilis*.
- Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J. D., Völker U. & Hecker M. (2001). J. Bacteriol. Vol. 183: 5617-5631. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*.
- Petit J. M., Huet O., Gallet P. F., Maftah A., Ratinaud N. H. & Julien R. (1994). Eur. J. Biochem. Vol. 220: 871-879. Direct analysis and significance of cardiolipin tranverse distribution in mitochondrial inner membranes.
- Poolman B., Blount P., Folgering J. H. A., Friesen R. H. E., Moe P. C. & van der Heide T. (2002). Molecular Microbiology. Vol. 44 (4): 889-902. How do membrane proteins sense water stress?
- Price C. W., Fawcett P., Ceremonie H., Su N., Murphy C. K. & Youngman P. (2001). Mol. Microbiol. Vol. 41: 757-774. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*.
- Priest F. G. (1993). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washintong, D.C.
- Racher K. I., Voegelé R. T., Marshall E. V., Culham D. E., Wood J. M., Jung H. *et al.* (1999). Biochemistry Vol. 38: 1676-1684. Purification and reconstitution of an

- osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts.
- Reizer, J.; Grossowicz, N & Barenholz, Y. (1985). Biochim. Biophys. Acta Vol. 815: 268-280. The effect of growth temperature on the thermotropic behaviour of the membrane of a thermophilic *Bacillus*: composition-structure-function relationships.
 - Rivas E. & Luzatti V. (1969). J. Mol. Biol. Vol. 41: 261-275. Polymorphisme des lipides polaires et des galactolipides de chloroplastes des maïs, en presence d' eau.
 - Rodgers W. & Glaser M. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 88: 1364-1368. Characterization of lipid domains in erythrocyte membranes.
 - Rübenhagen R., Rönsch H., Jung H. & Krämer R. (2000) J. Biol. Chem. Vol 275: 735-741. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes.
 - Rusell N. J., Evans R. I., Ter Steeg R. I., Hellemons J., Verheul A. & Abee T. (1995). Int. J. Food Microbiol. Vol. 28: 255-261. Membranes as target for stress adaptation.
 - Ruzal S. M. & Sánchez-Rivas C. (1994). Can. J. Microbiol. Vol. 40: 140-144. Physiological and genetic characterization of the osmotic stress response in *Bacillus subtilis*.
 - Ruzal S. M., López C. S., Rivas E. A. & Sánchez-Rivas C. (1998). Curr. Microbiol. Vol.36: 75-79. Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*.
 - Ruzal S. M. & Sánchez-Rivas C. (1998). Curr. Microbiol. Vol. 37: 368-372. In *Bacillus subtilis* DegU~P is a positive regulator of the osmotic response.
 - Schleifer K. H. & Kandler O. (1972). Bac. Rev. Vol. 36: 407-477. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.
 - Septinus M., Seiffert W. & Zimmermann H. W. (1983). Histochemistry Vol. 79: 443-456. Hydrophobic acridine dyes for fluorescence staining of mitochondria in living cells.
 - Sharma S. Ch., Raj D., Forouzandeh M. & Bansal M. P. (1996). Applied. Biochem. Biotechnol. Vol. 56: 189-195. Salt-induced changes in lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.
 - Shibata A., Ikawa K., Shimooka T. & Terada H. (1994). Biochim. Biophys. Acta Vol. 1192: 71-78. Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin.
 - Short S. A. & White D. C. (1971). J. Bacteriol. Vol. 108: 219-226. Metabolism of phosphatidylglycerol, lysylphosphatidylglycerol, and cardiolipin of *Staphylococcus aureus*.
 - Sinensky M. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 71: 522-525. Homeoviscous adaptation-A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*.
 - Singer S. J. & Nicholson G. L. (1972). Science Vol. 175: 720-731. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane.
 - Stallkamp I., Dowhan W., Altendorf K. & Jung K. (1999) Arch. Microbiol. Vol. 172: 295-302. Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*.
 - Strauch M., de Mendoza D. & Hoch H. (1992). Mol. Microbiol. Vol. 6: 2909-2917. Cis unsaturated fatty acids specifically inhibits a signal transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*.
 - Svobodová J. & Svoboda P. (1988). Folia Microbiol. Vol. 33: 161-169. Membrane fluidity in *Bacillus subtilis*. Physical change and biological adaptation.

- Tocanne J. F. & Teissié J. (1990). Biochim. Biophys. Acta Vol. 1031: 111-142. Ionization of phospholipids of protons in membrane model systems.
- Thwaites J. J. & Mendelson N. H. (1991). Adv. Microb. Physiol. Vol. 32: 174-221. Mechanical behaviour of bacterial cell walls.
- Vagner V., Dervyn E. & Ehrlich S. D. (1998). Microbiology. Vol. 144: 3097-3104. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*.
- Valdez G. F., Taranto M. P., Lorca G. L., Oliver G. & Ruiz Holgado A. P. (1997). J. Dairy Sci. Vol. 80: 1955-1958. Influence of bile on β -galactosidase activity and cell viability of *Lactobacillus reuterii* when subjected to freeze-drying.
- van der Heide T. & Poolman B. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 97: 7102-7106. Osmoregulated ABC transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane.
- van der Heide T., Stuart M. C. A. & Poolman B. (2001). EMBO J. 20: 7022-7032. On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine.
- van der Vossberg J. L. C. M., Driessen A. J., M., da Costa M. S. & Konnings W. N. (1999). Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1419: 97-104. Homeostasis of the membrana proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatura.
- van der Vossberg J. L. C. M., Ubbink-Kok T., Elkerink M. G. L., Driessen A. J., M. & Konnings W. N. (1995). Mol. Microbiol. Vol. 18: 925-932. Ion permeability of the cytoplasmic membrana limits the maximum growth temperatura of bacteria and archea.
- van Voorst F. & de Kruijff B (2000). Biochem. J. Vol. 347: 601-612. Role of lipids in the traslocation of proteins across membranes.
- Vasilenko I, De Kruijff B, Verkleij AJ. (1982). Biochim. Biophys. Acta Vol. 684: 282-306. Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by ^{31}P -NMR and freeze-fracture techniques. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} and temperature.
- von Blohn C., Kempf B., Kappes R. M. & Bremer E. (1997) Mol. Microbiol. Vol. 25: 175-187. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B.
- Weber M. H. W., Klein W., Muller L., Niess U. M. & Marahiel M. (2001). Mol. Microbiol. Vol. 39: 1321-1329. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock.
- Whatmore A. M., Chudek J. A. & Reed R. H. (1990). J. Gen. Microbiol. Vol. 136: 2527-2535. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*.
- Wicken A. J. & Knox K. W. (1975). Infect. Inmun. Vol. 11: 973-981. Characterization of group N *Streptococcus* lipoteichoic acid.
- Wood D. & Folch L. (1974). Lipids Vol. 9: 979-986. Lipids of cultured hepatoma cells. VI. Effect of serum and lipid upon cellular and media neutral lipids.
- Wood J. (1999). Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 63: 230-262. Osmosensing by bacteria: Signals and membrane-based sensors.
- Wood J. M., Bremer E., Csonka L. N., Kraemer R., Poolman B., van der Heide T. & Smith L. (2001). Comp. Biochem. Physiol. Part A Vol. 130: 437-460. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria.
- Yancey P., Clarck M., Hand S., Bowlus R. & Somero G. (1982). Science Vol 217. Living with water stress. Evolution of osmolyte systems.

- Yasbin R., Fields P. & Anderson P. (1980). Gene Vol. 12: 155-169. Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed of their natural prophages.