

“La vida consiste en la habilidad de un sistema para mantenerse lejos del equilibrio, crecer y multiplicarse, con la ayuda de un continuo flujo de energía y de materia provistos por el medio ambiente”.



La estructura de la vida.

**** Las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos son compuestos orgánicos fundamentales: Estos se organizan en al menos dos componentes básicos comunes a todos los seres vivos: Los ácidos nucleicos y las membranas celulares. Esta unidad resultante recibe el nombre de célula.***

**** Los ácidos nucleicos, hechos de una mezcla de compuestos nitrogenados y carbohidratos, contienen el código estructural y funcional de la célula y eventualmente del organismo que la contiene. Estos ácidos, el desoxirribonucleico ([ADN](#)) y el Ribonucleico ([ARN](#)), poseen una estructura muy particular, capaz de contener información biológica en grupos llamados [genes](#) que se corresponden con el código genético.***

**** La membrana, constituida fundamentalmente por lípidos dispuestos en doble capa, constituye el límite de la célula, separando su materia orgánica del medio ambiente, permitiéndole intercambiar con éste materia y energía (metabolismo), manteniendo su medio interno relativamente constante (homeostasis).***

Objetivos:

**** Actualizar los conocimientos sobre las características estructurales de las membranas enfatizando lo referido a la composición química.***

**** Reconocer el comportamiento de los lípidos, fosfolípidos y ácidos grasos, componentes de las membranas en diferente tipo de organismos y establecer su relación con la función que desempeñan.***

**** Evaluar la participación de las moléculas citadas en la respuesta a cambios del medioambiente, en la comunicación celular y la detección de señales.***

MEMBRANAS BIOLÓGICAS, ESTUDIOS DE NIVEL ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

DOCENTES

Dra. MARÍA A. PERILLO: UNC , *Principios fisicoquímicos que explican la estructura de las biomembranas*

Dra SUSANA PASQUARÉ: UNS, *Fosfatidato fosfatasas nuevos jugadores en el metabolismo lipídico y en la señalización*

Dra. ANA L. VILLASUSO: UNRC, *Señalización celular basada en fosfolípidos- Fosfolipidologia*

Dra. DANIELA MEDEOT: UNRC, *Identificación y análisis cuantitativo de fosfolípidos y medición de actividad de una enzima involucrada en el metabolismo de lípidos*

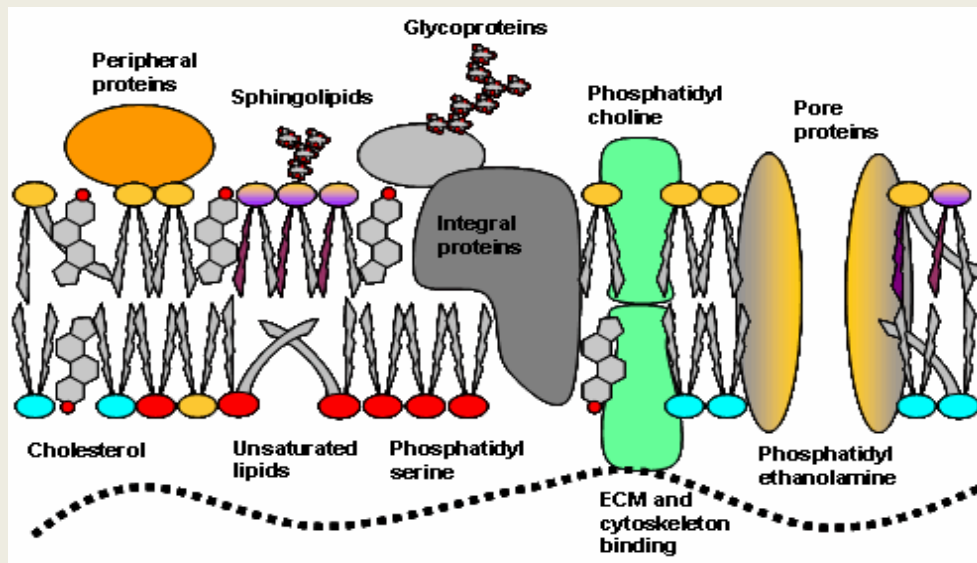
Dra. MIRTA GARCÍA: UNRC, *Estructura de las membranas: Componentes principales, fosfolípidos y ácidos grasos*



La vida requiere membranas. Su ocurrencia universal en los organismos vivos sugiere que las primeras formas de vida sobre el planeta también tenían membranas. (Hulbert, 2003 J Exp Biol 206, 2303)

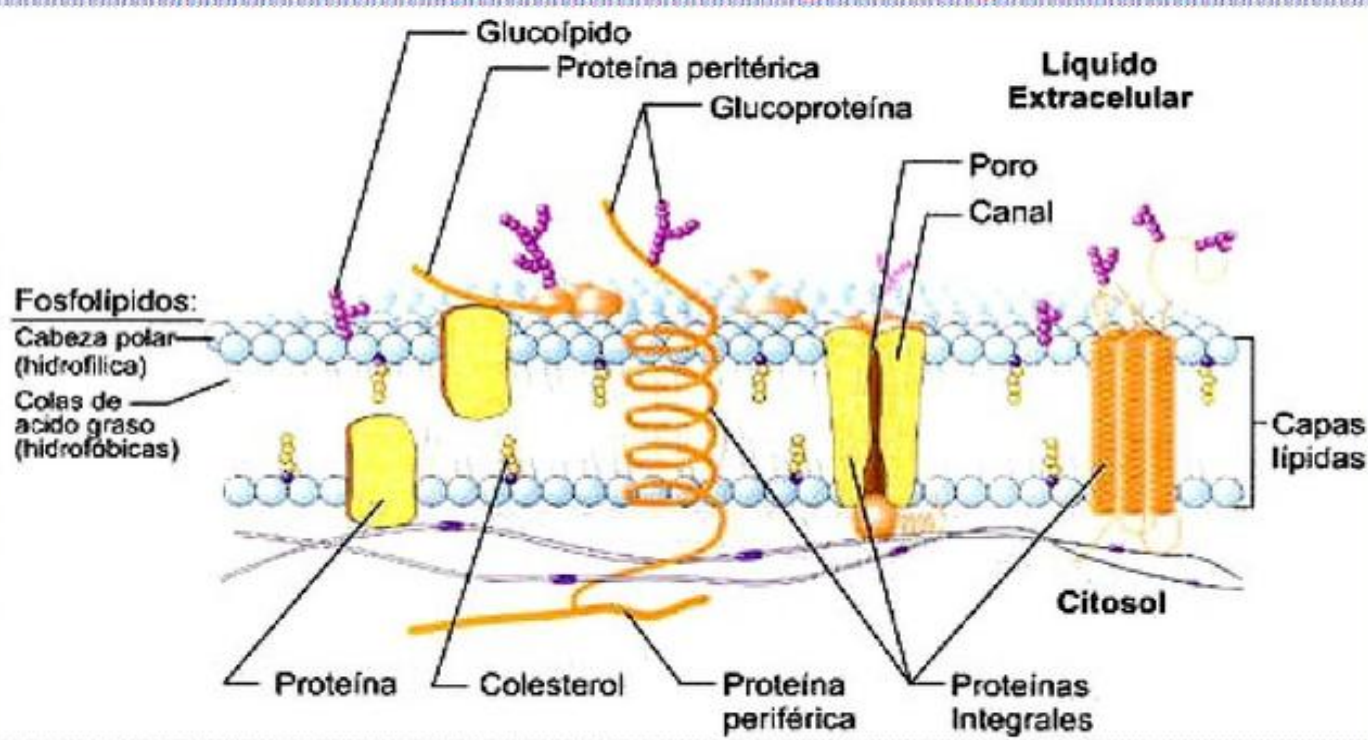


Molécula eterna



Estructura eterna

MEMBRANA CELULAR



Hidrógeno

Carbón

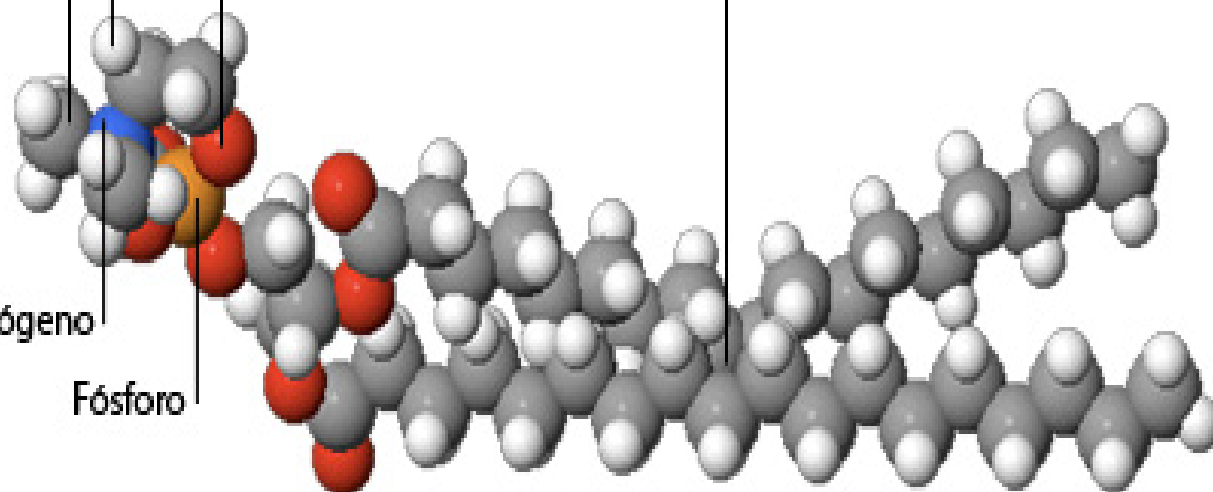
Oxígeno

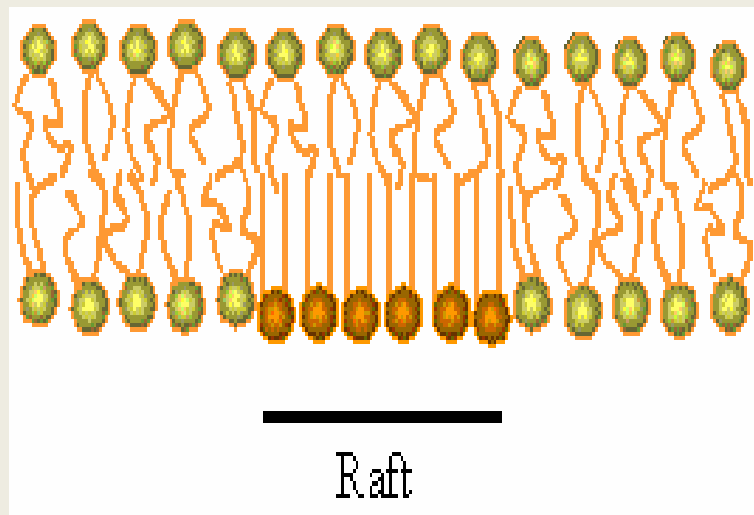
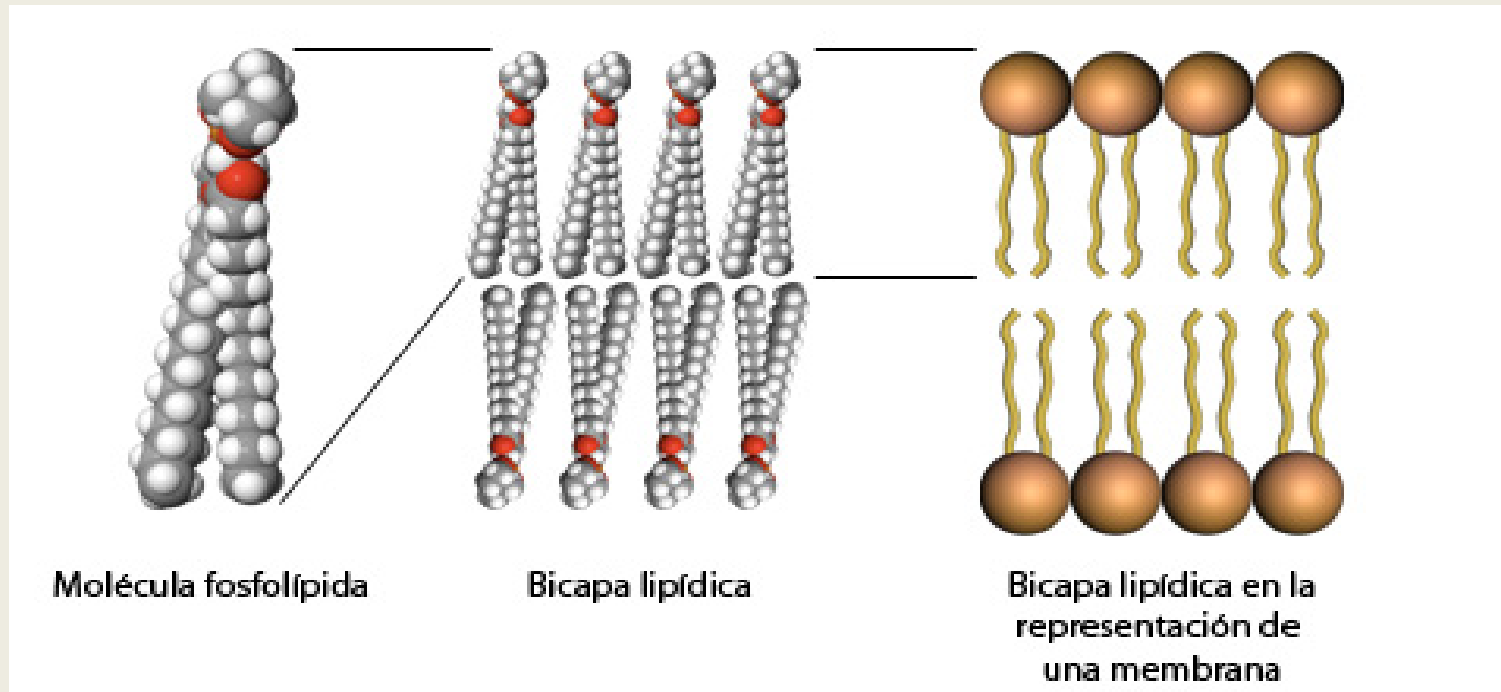
Doble cadena

Nitrógeno

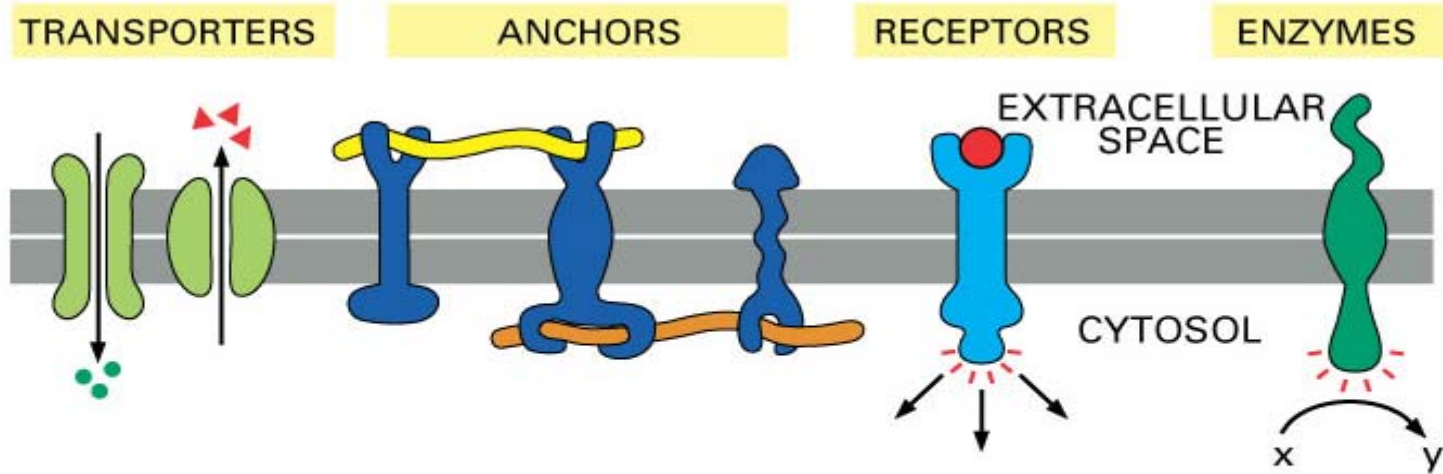
Fósforo

Cabeza polar



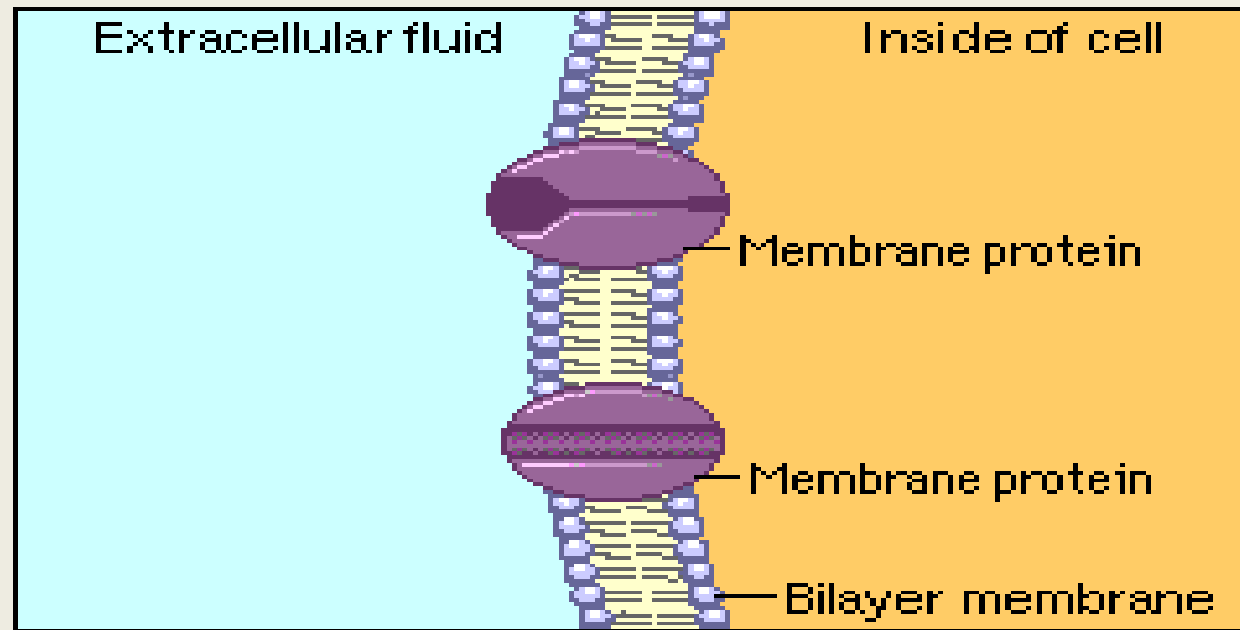


Lípidos rafts son dominios especializados de la membrana, complejos de esfingomielina , colocaliza con colesterol, se separa de los glicerolípidos. Los FA están extendidos y estrechamente empaquetados



http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/membrane_proteins.php

Figure 11-20 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)



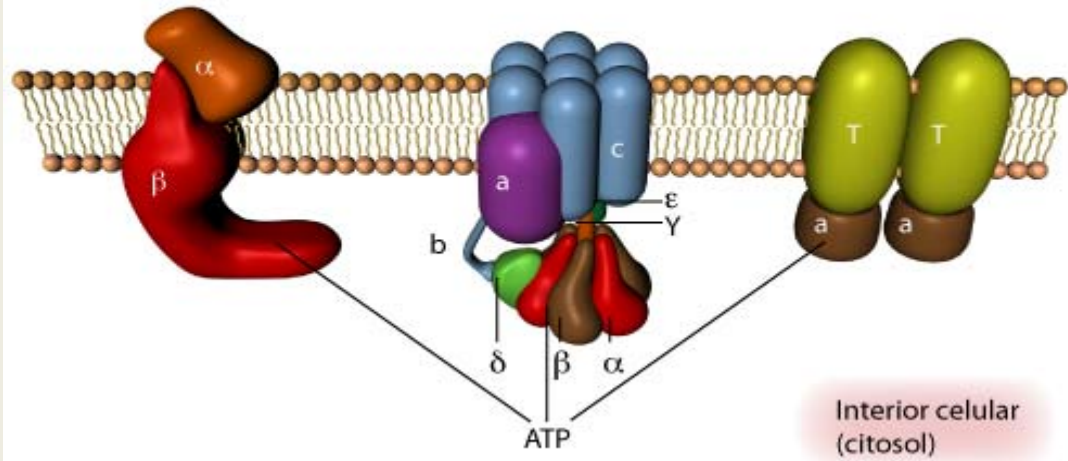
Permeabilidad selectiva

Exterior celular

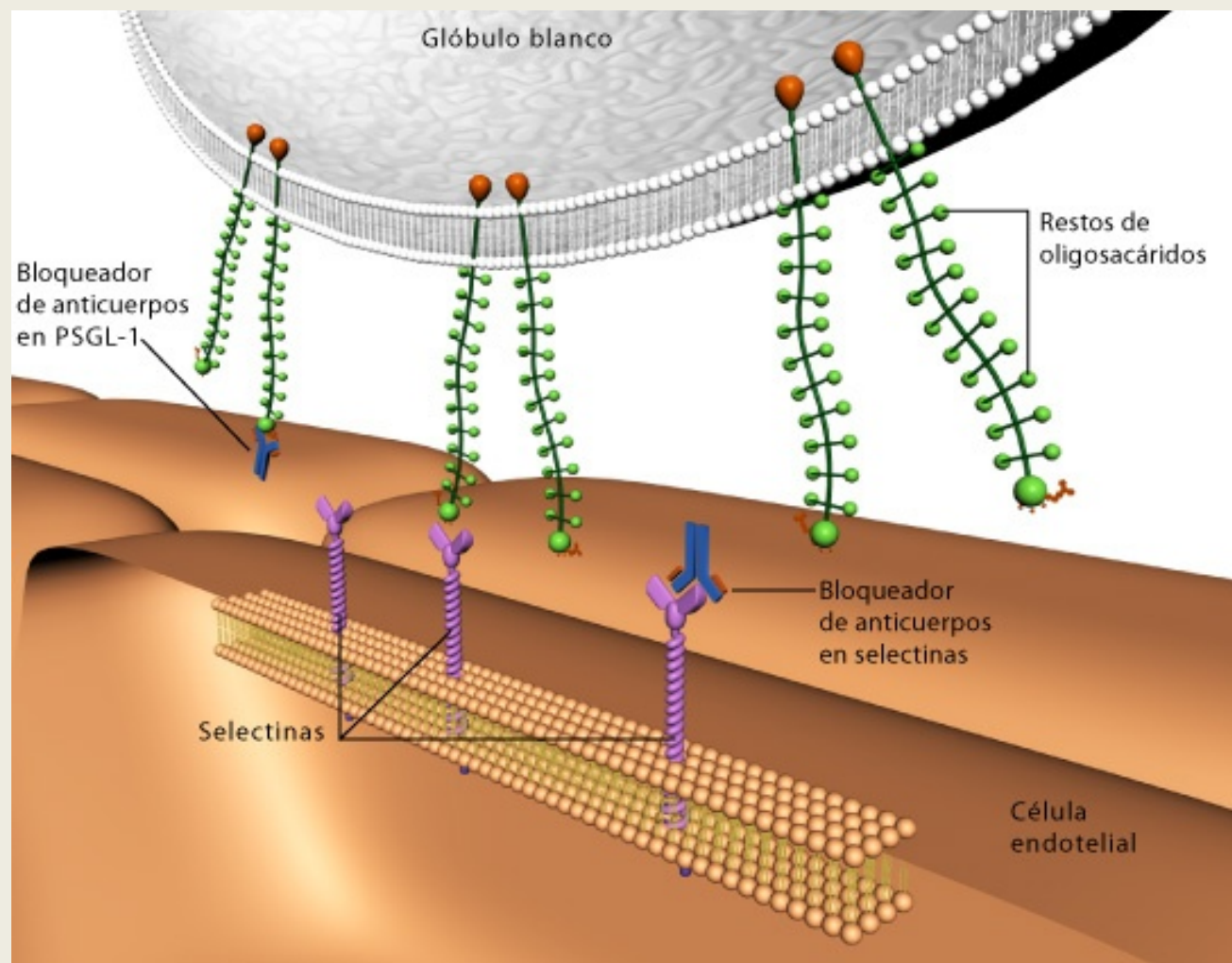
Bomba tipo P

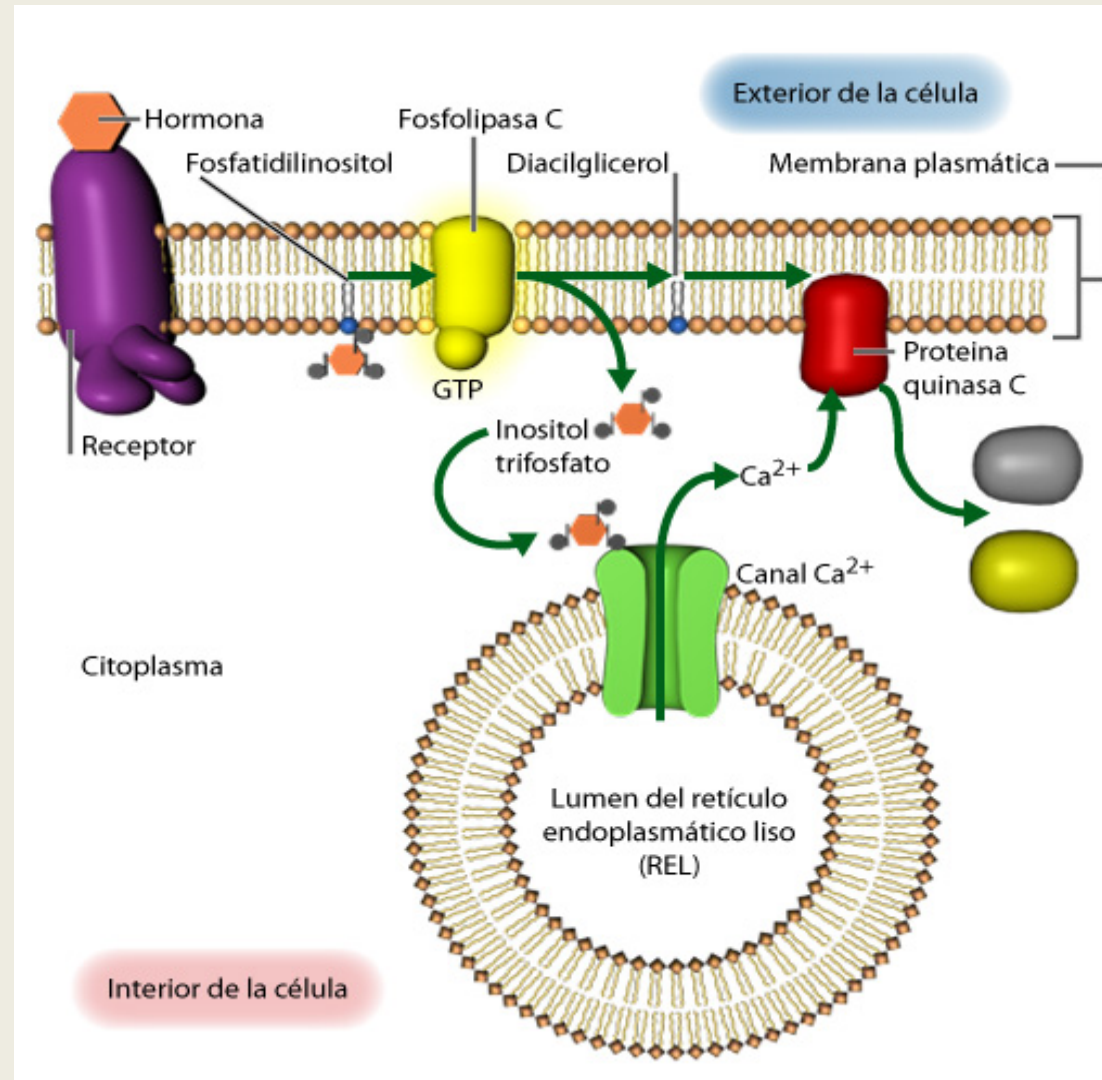
Bomba tipo F y V

Familia tipo ABC

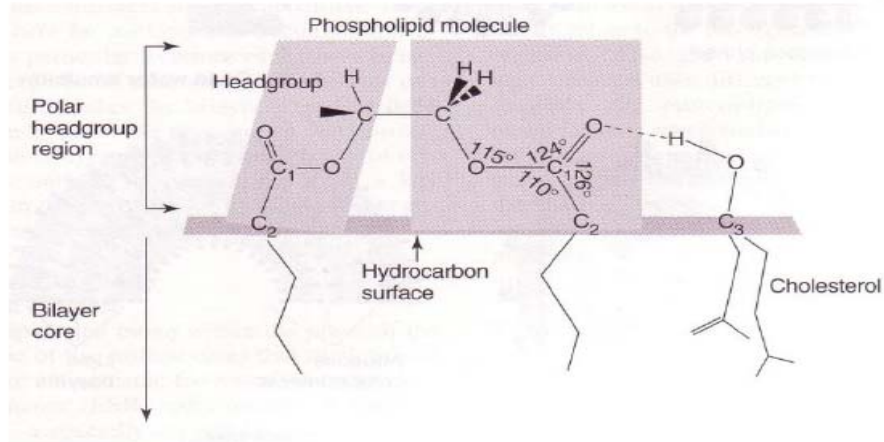
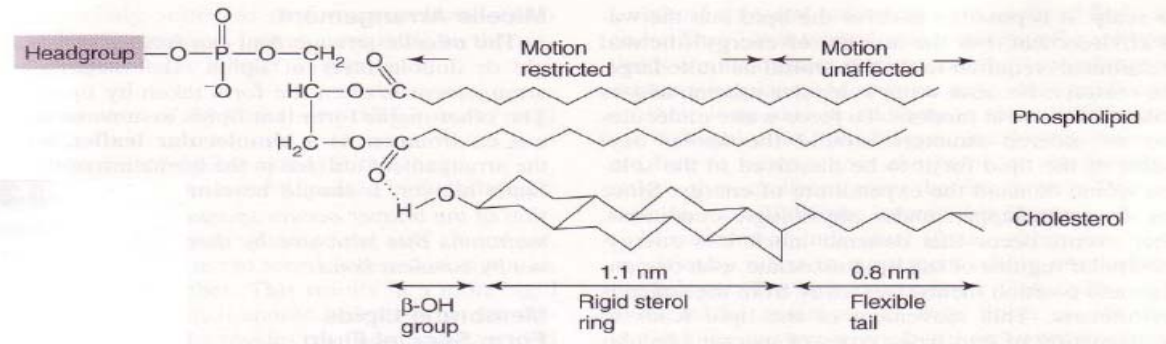
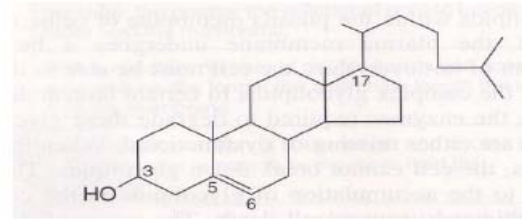
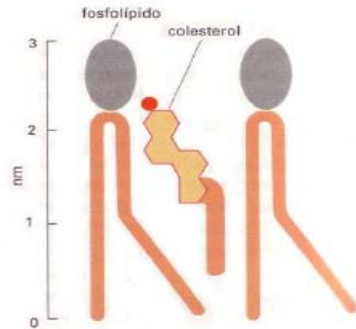
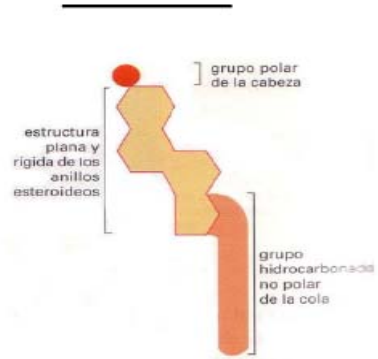


Interior celular (citósol)





Lípidos de las membranas biológicas

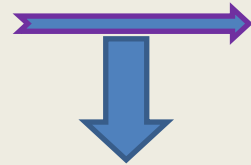


Origen de la vida

Biopolímeros, RNA

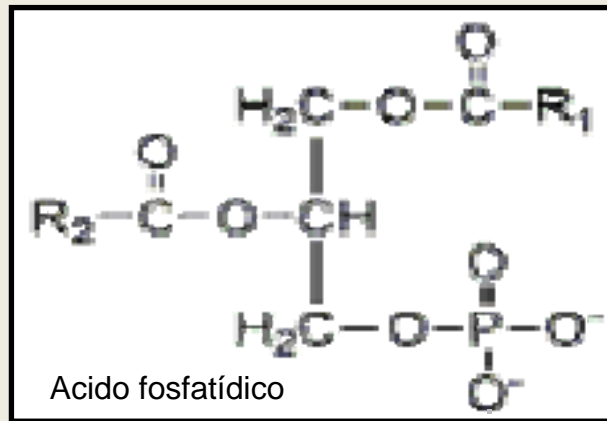
Las propiedades y el auto ensamblaje de los lípidos serían estructuras supramoleculares importantes para todos los procesos vitales. Los PL constituyen las membranas sin las cuales diferentes tipos de enzimas procesadoras del RNA no podrían haber llevado a cabo su actividad

Propiedades de lípidos de autoformación:
Estructura de bicapa



Mejoran reacciones sintéticas dependientes de E

Lípidos: funciones importantes a través de los dominios de la vida



Bacteria

Palmitato 16:0

Palmitoleato: 16:1 n7

Vaccenato 18:1 n7

Eucaria

Acidos grasos diversos y más insaturados

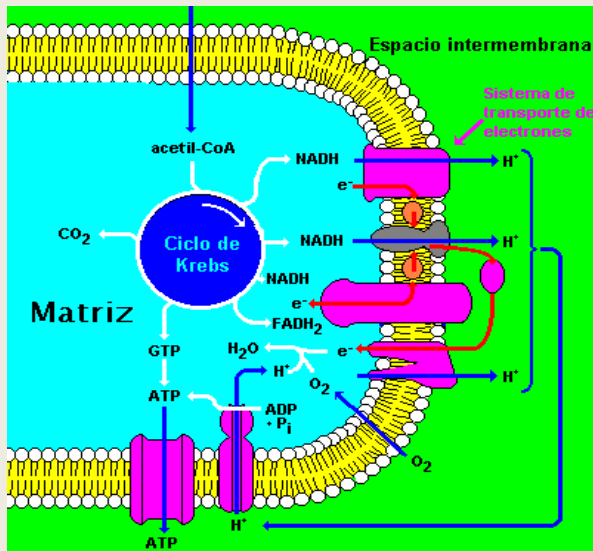
Docosahexaenoico 22:6 n3

Desaturasas

O^2 e^-

**AG esenciales
alimentos**

Velocidad metabólica asociada a membranas



El O₂ siempre se consume y se bombean protones

Requerimientos de E asociados a membrana:
Síntesis proteínas, consumo de O₂ no mitocondrial (desaturasas)

Influencias sobre la actividad metabólica: tamaño y temperatura del cuerpo y la característica de cómo los organismos mantienen la temperatura corporal (ectotérmicos o endotérmicos)

Existe un factor o N^o pequeño de factores que influyen los procesos: Algo que marca el paso para el metabolismo

Membrana conductora

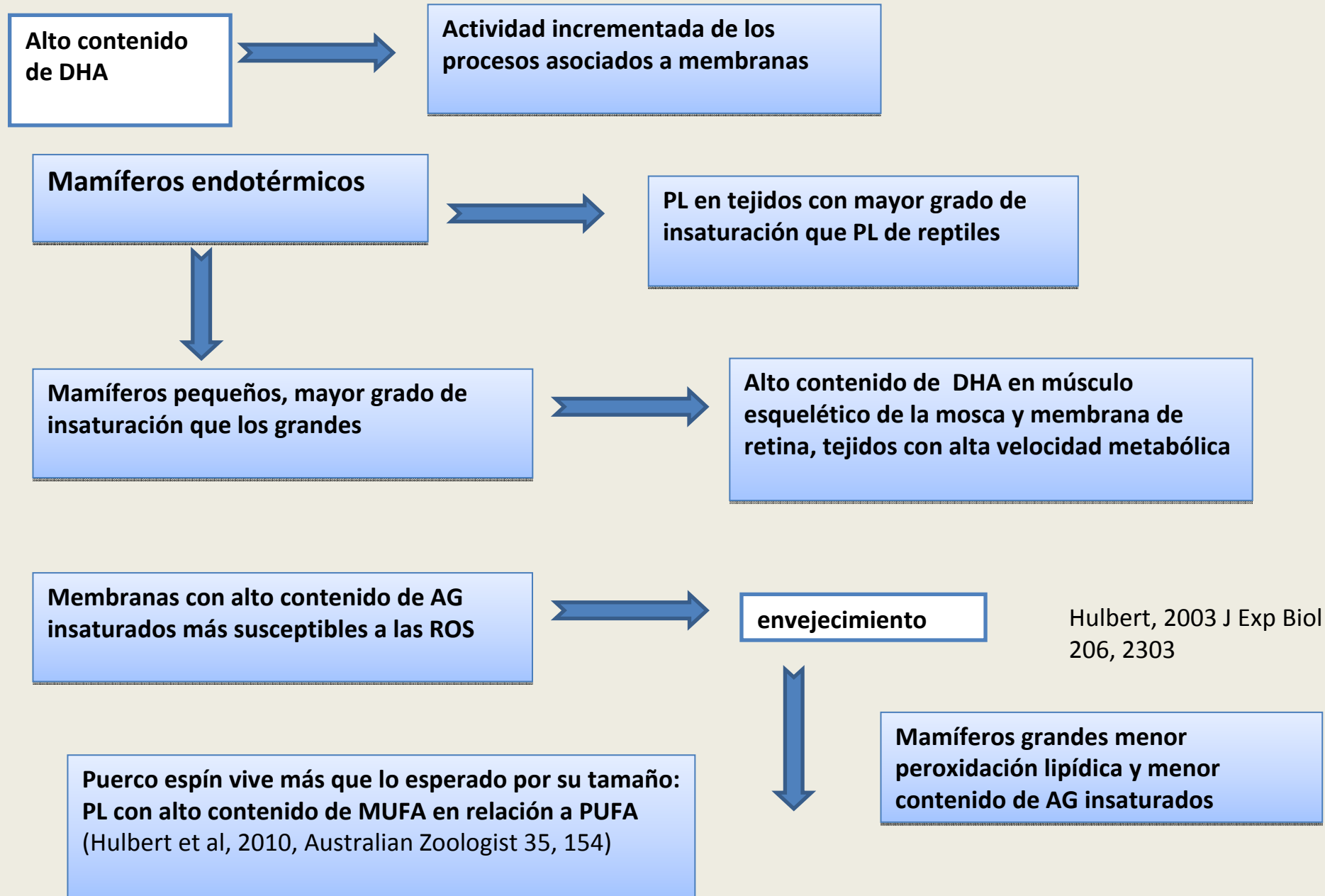
Cantidad de membrana

Composición de acilos
Monoins/PUFA = marcador de actividad metabólica

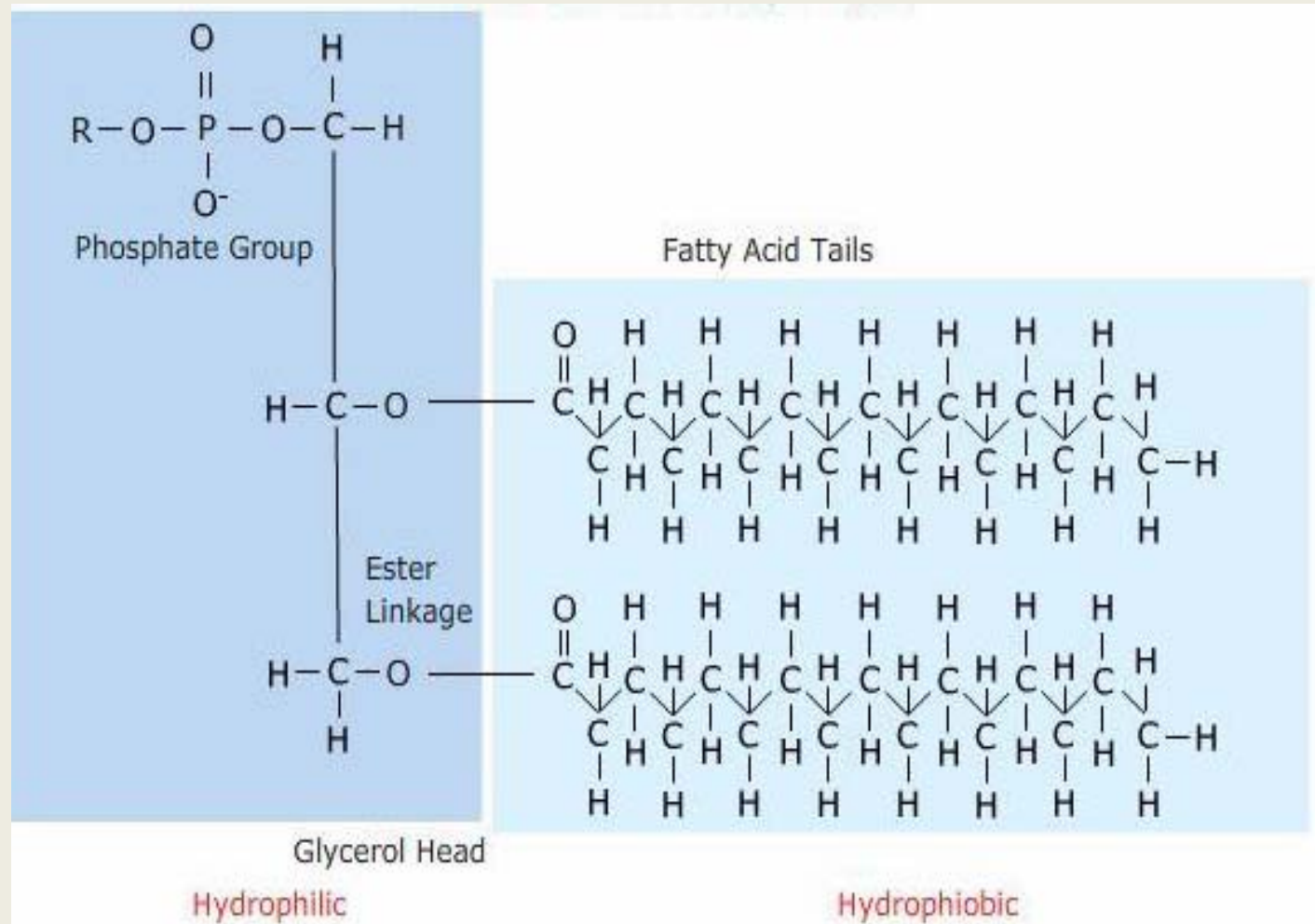
Soporte

Composición de acilos muy insaturados se relacionan con alta velocidad metabólica

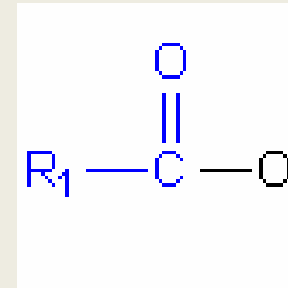
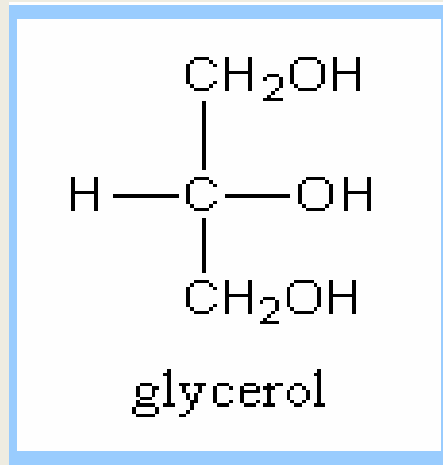
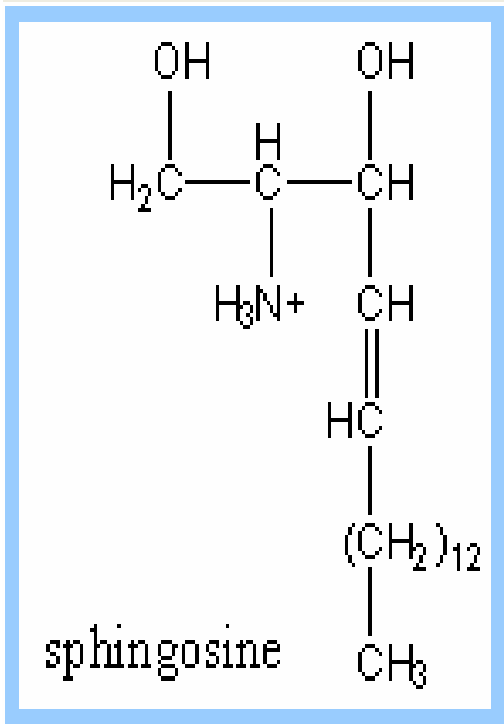
Variaciones en la composición de acilos de la membrana, influyen los procesos mediados por membranas



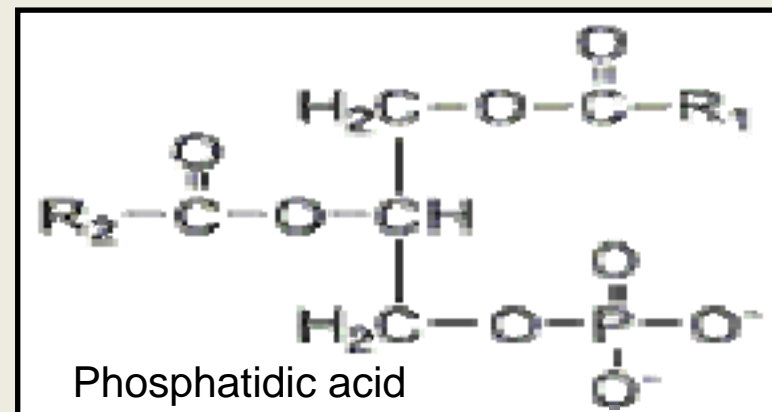
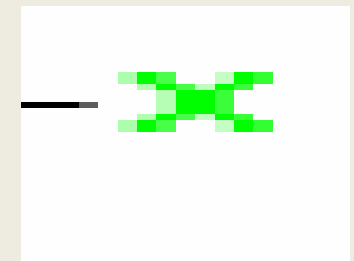
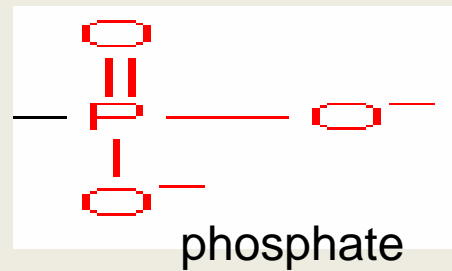
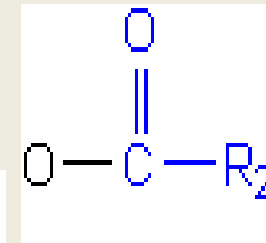
Estructura general de un fosfolípido



Cómo se forma un fosfolípido?



$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{-COO}^-$
fatty acid



Fosfolípido

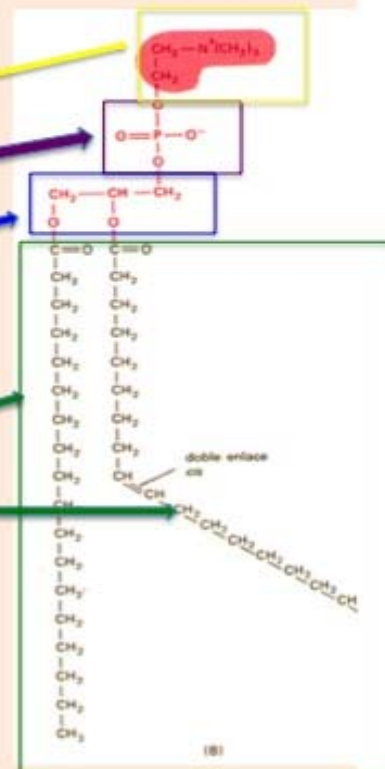
Estructura química básica.

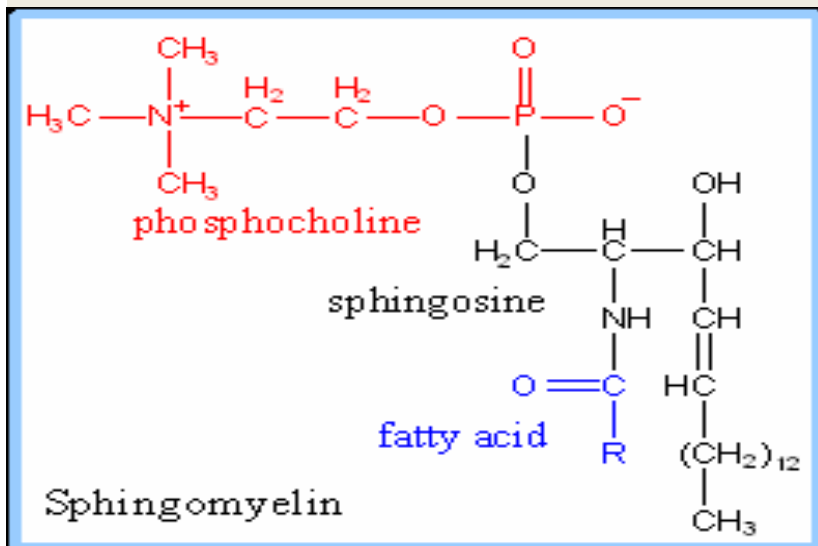
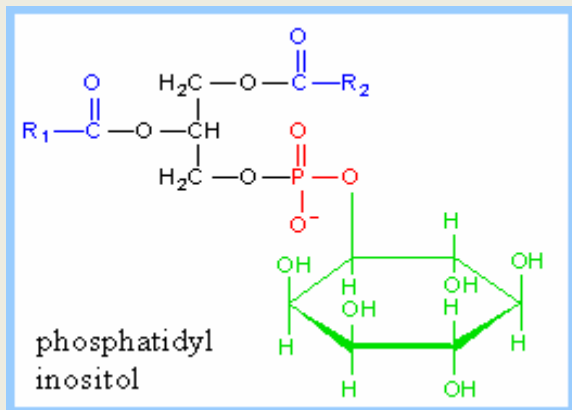
Colina, etanolamina,
inositol,...

Fosfato

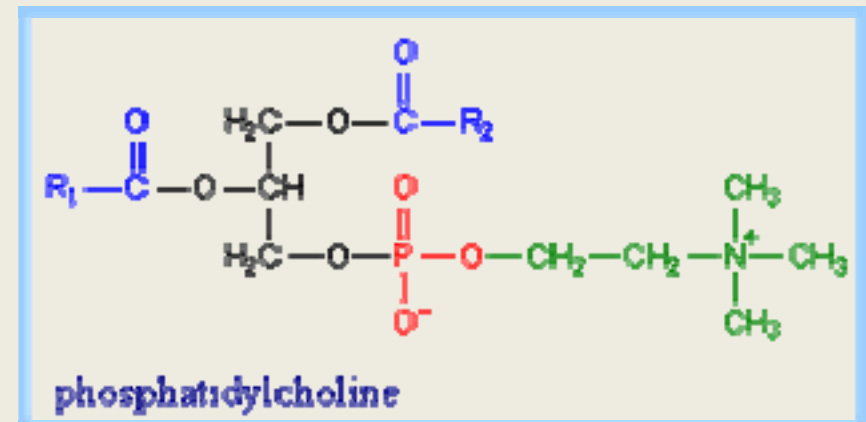
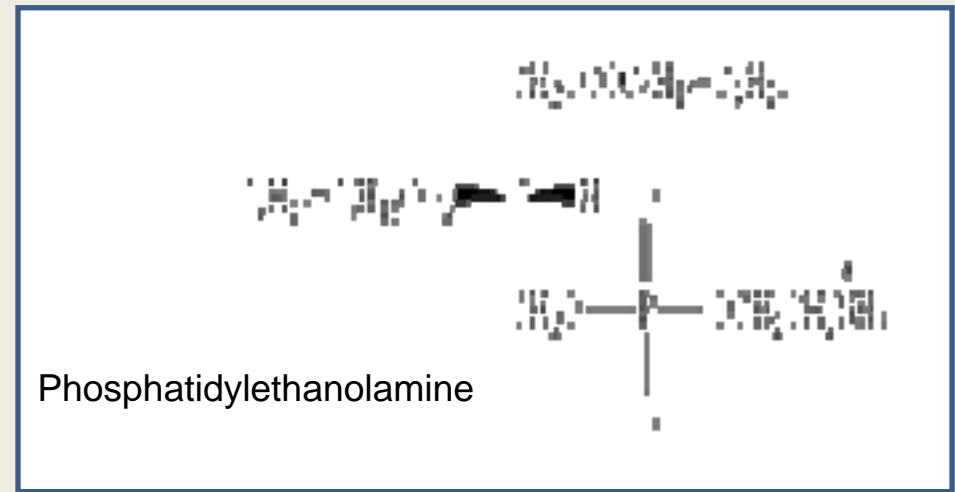
Glicerol

Ácidos grasos

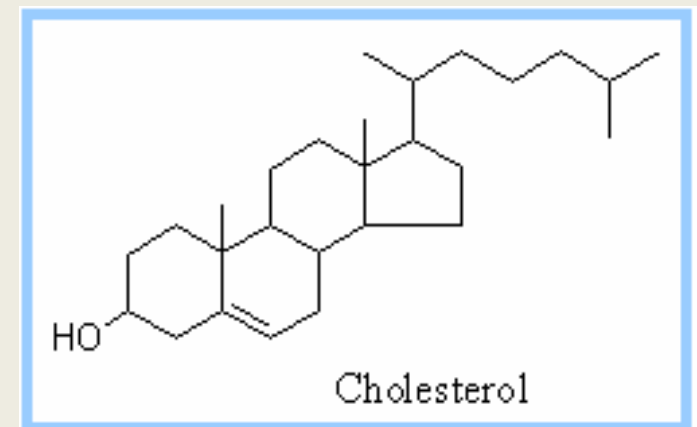
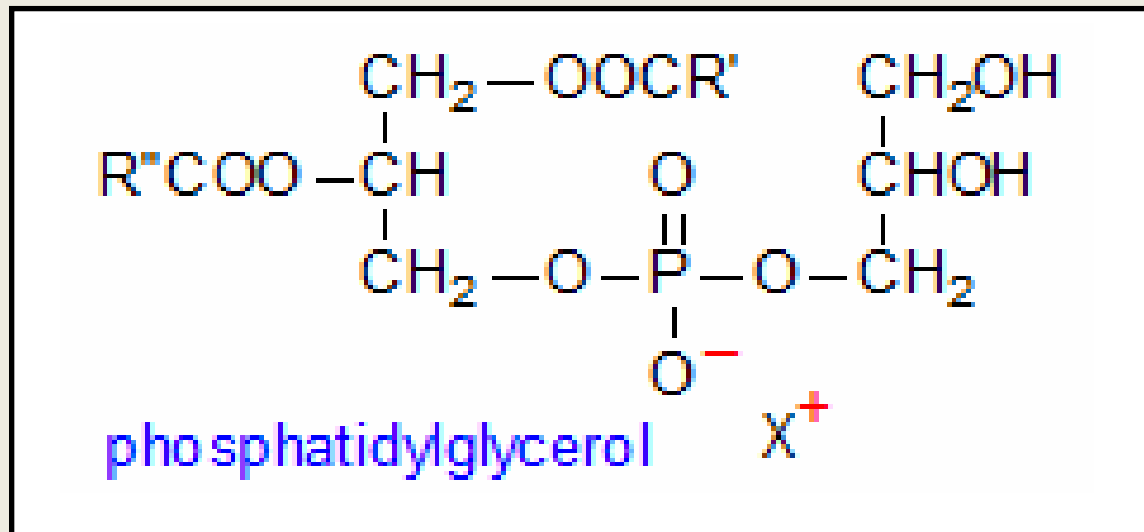
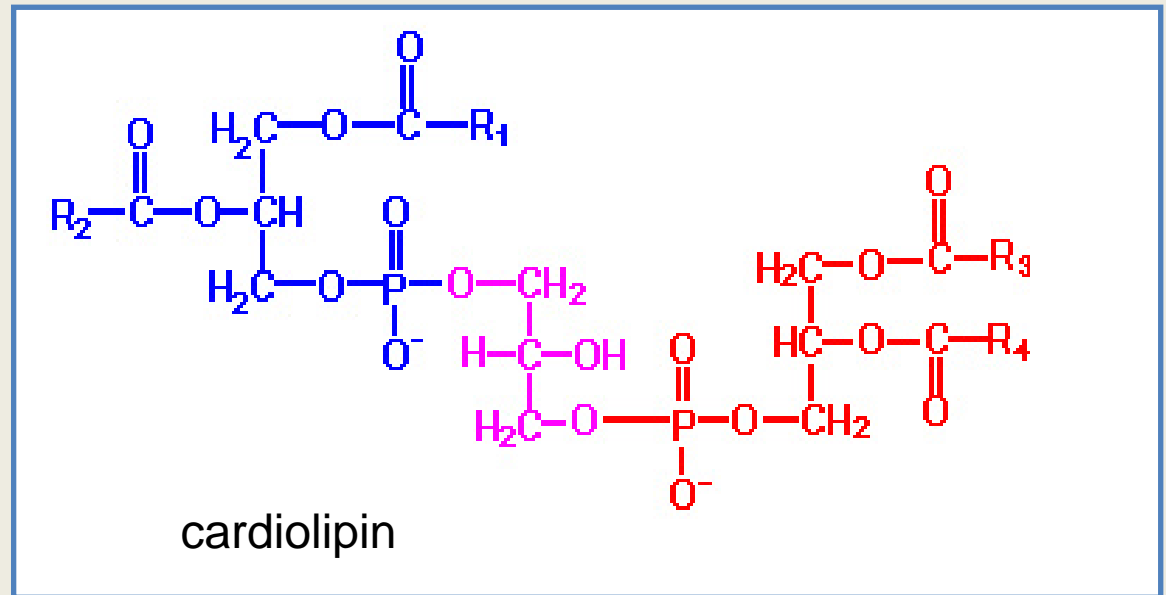




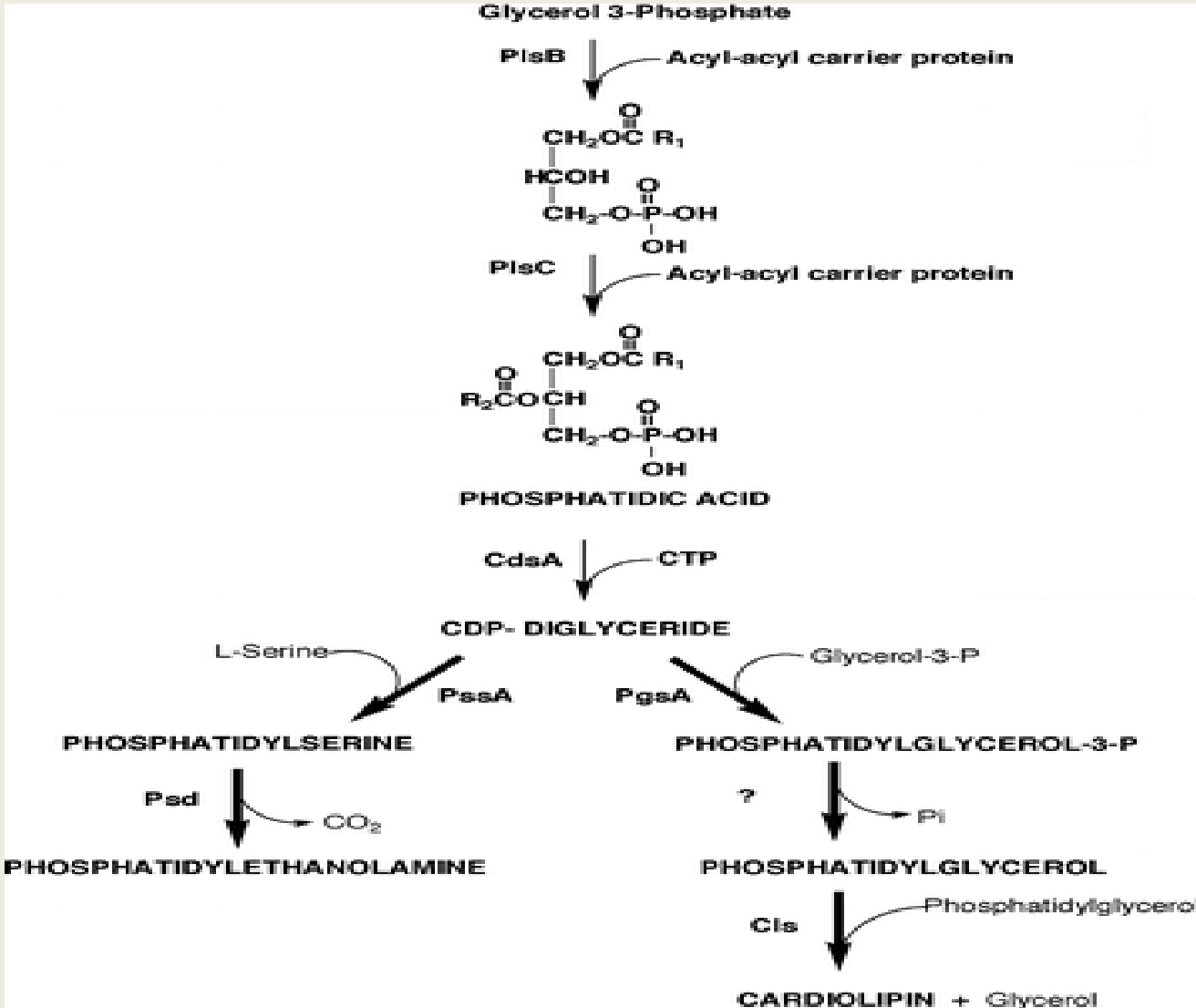
Fosfolípidos zwiteriónicos

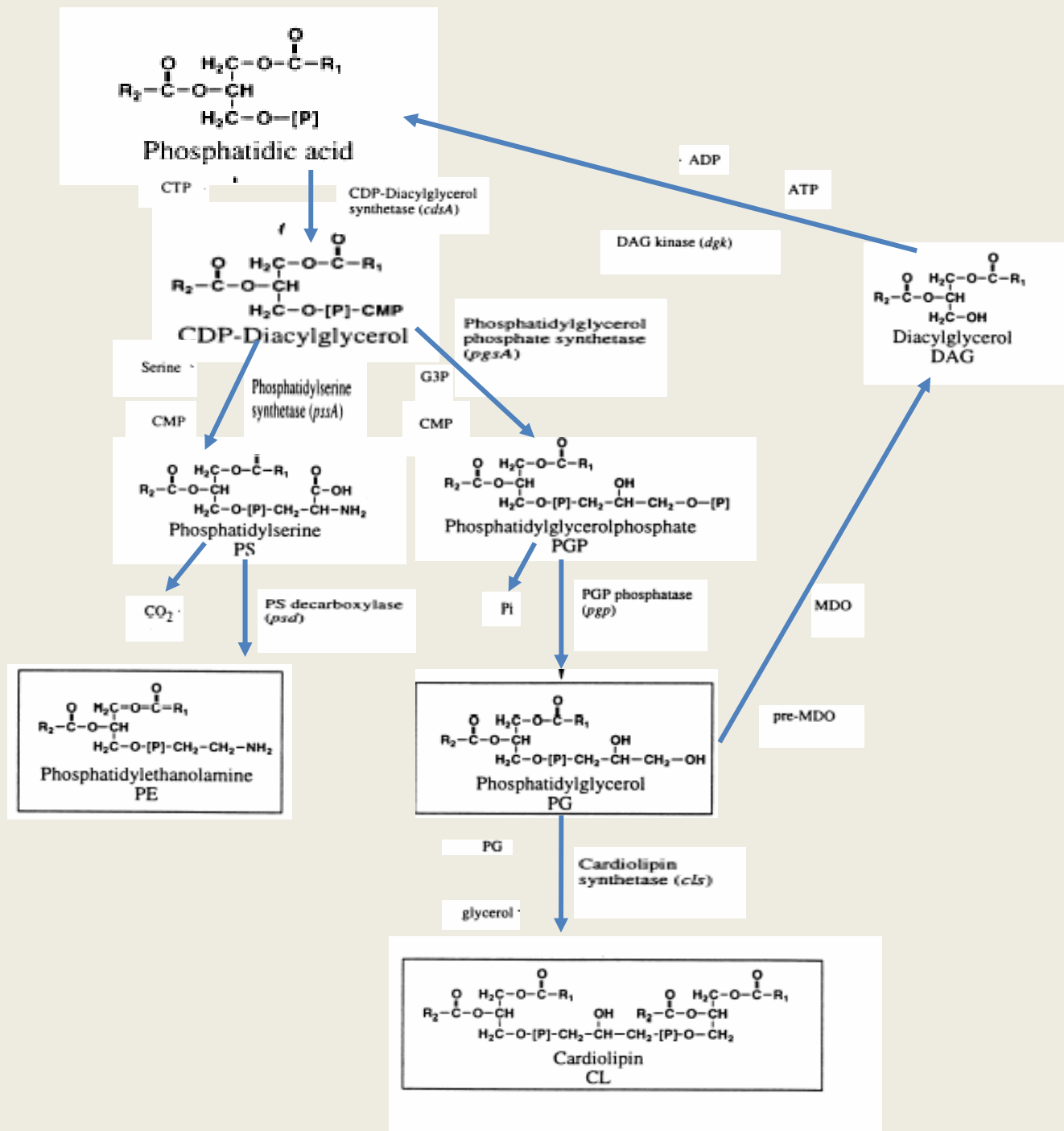


Fosfolípidos aniónicos



Phospholipids biosynthesis Gram negative bacteria E. coli





70% Zwitterionic PHOSPHATIDIC ACID **30% Anionic**



Mutaciones letales



Mutaciones viables con defecto en transporte solutos



Mutación letal, supresor de mutación crecimiento normal



Reducción de PE, células filamentosas



Ca⁺² y Mg⁺²
Soporta crecimiento



Variación Z/A = función de lípidos



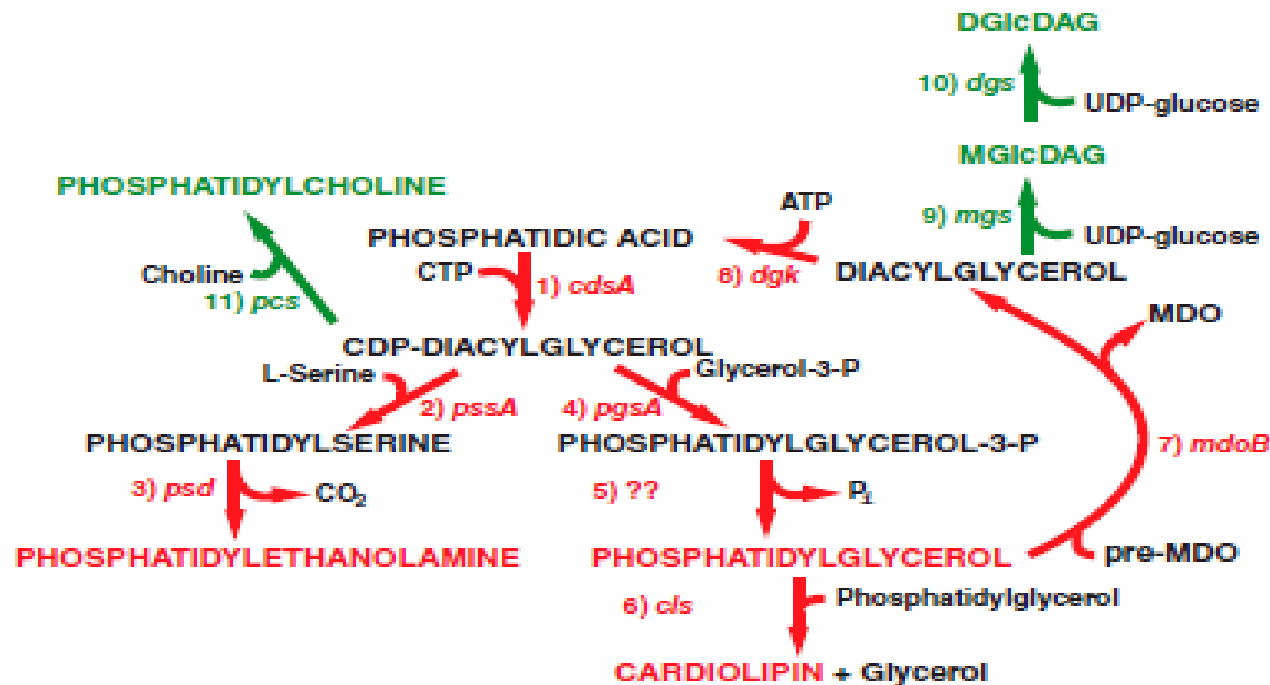
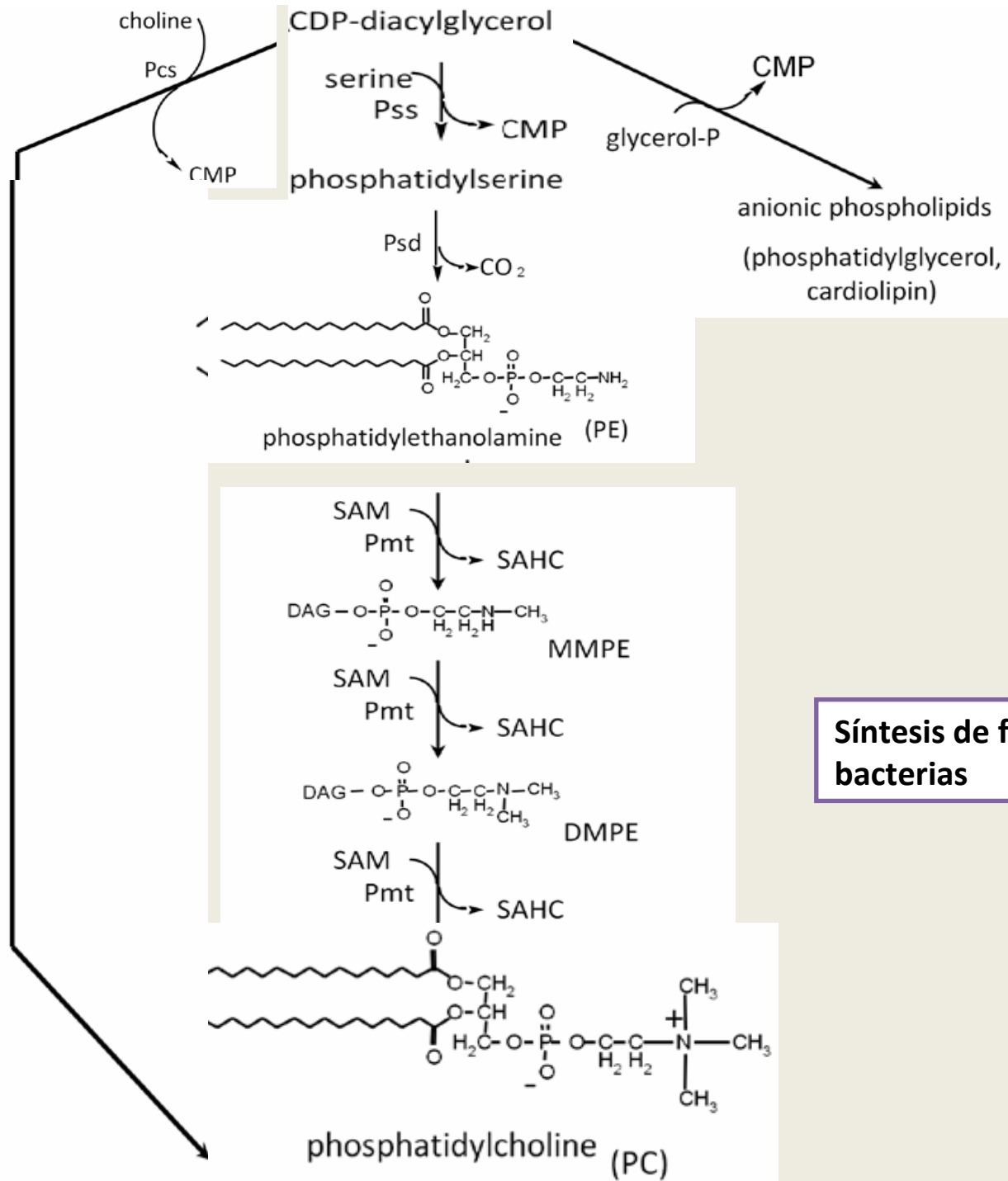
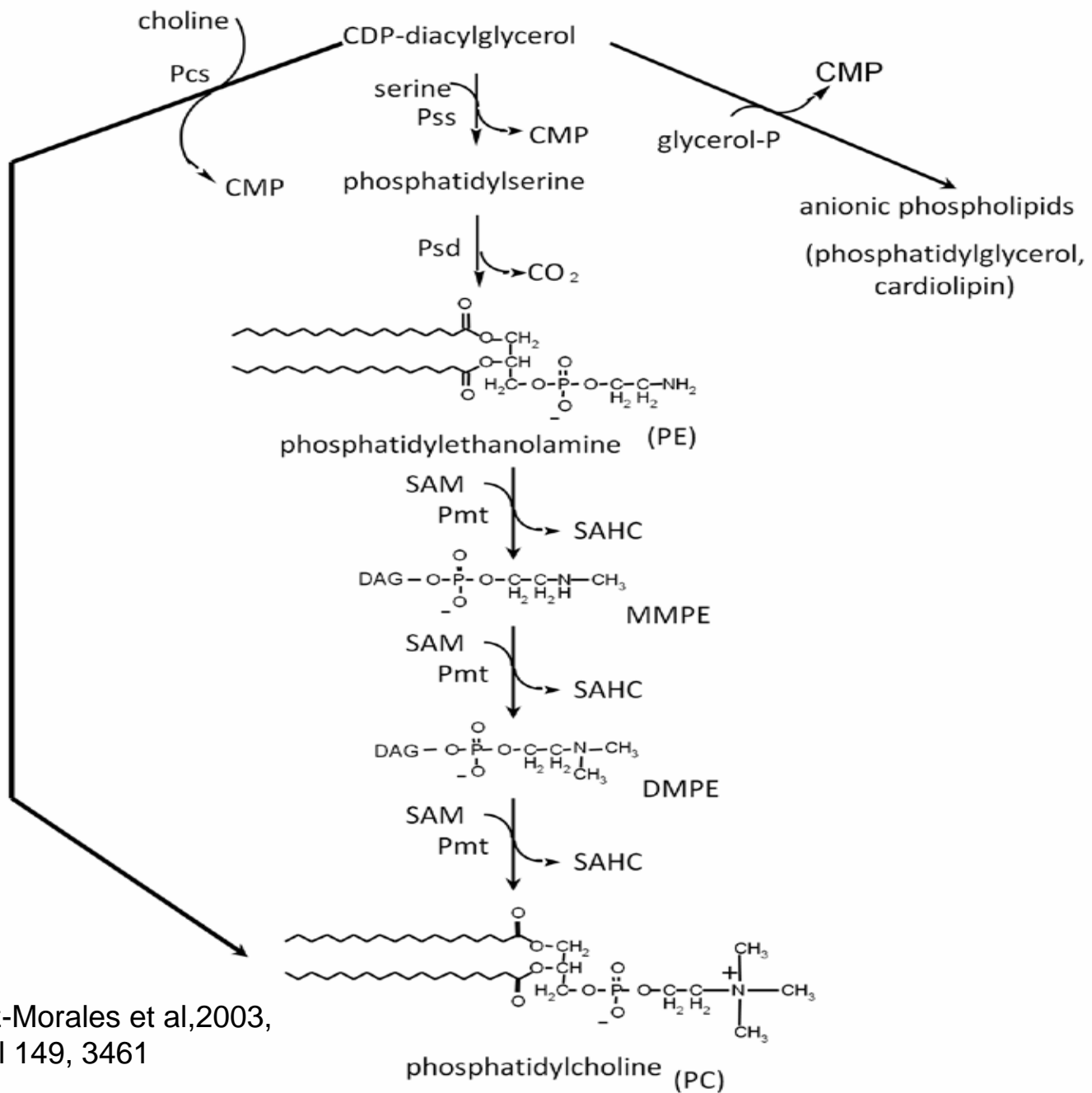


FIGURE 1. Pathway for synthesis of native and foreign lipids in *E. coli*. The following enzymes are indicated with their respective genes (from *E. coli* (17) unless indicated otherwise): 1, CDP-diacylglycerol synthase; 2, phosphatidylserine synthase; 3, phosphatidylserine decarboxylase; 4, PGP synthase; 5, PGP phosphatase; 6, CL synthase; 7, PG, pre-MDO (membrane-derived oligosaccharide) *sn*-glycerol-1-P transferase; 8, diacylglycerol kinase; 9, MGlcDAG synthase (*Acholeplasma laidlawii*) (19); 10, DGlcDAG synthase (*A. laidlawii*) (20); 11, PC synthase (*Legionella pneumophila*) (29). The X in phosphatidic acid is an OH and is in the position that changes depending on the downstream pathway. The lipids in black (~5% of total phospholipids) and red are native to *E. coli*. The lipids in green are foreign lipids introduced into *E. coli* carrying the indicated genes.



Síntesis de fosfatidilcolina en bacterias



Martínez-Morales et al, 2003,
Microbiol 149, 3461

**AG ≠ largo de cadena y ≠ de insaturación
= variedad de PL**

Regulación enzimática

**Funciones? ≠ función de barrera o
viabilidad celular**

Características

1.- 5% de PE y 25% de PG
se pierden por generación

Ciclo análogo al de
PI de eucariotas

3.- Recambio de PE y + **DAG**
PG decoración de
MDO con E amina P

dgk esencial en baja
osmolaridad

2.- LPS decorado con E
amina P y E amina PPI

Acido fosfatídico

4.- PE sustrato para formación de
PC en algunas bacterias Gram
negativas

5.- Metilasa clonada y
expresada en E. coli, PC no
afectó a E. coli

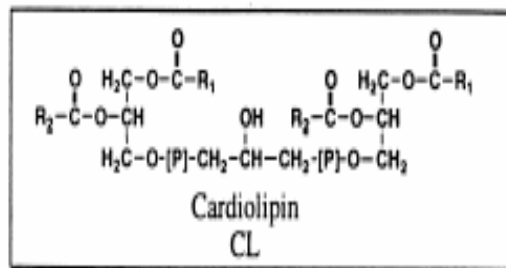
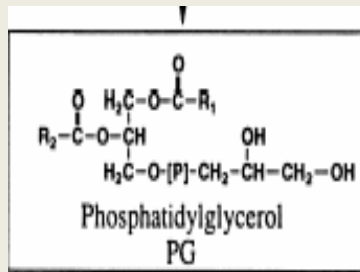
E.coli

PE = 70-80%

PG = 20-25%

CI = 5%

Funciones de PL aniónicos



1.- Requeridos para asociación de membranas y activación de proteínas citoplasmáticas

Variaciones entre 3 y 20% y sólo se modifica el crecimiento y no la viabilidad celular



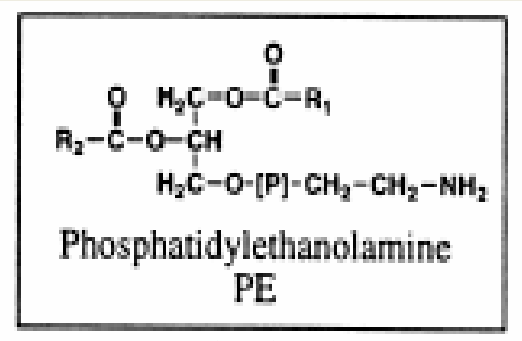
3.- Iniciación de la replicación del DNA. Se necesita concentración crítica de PL aniónicos para formar el sitio de unión proteína DNA

2.- No compromete la integridad de las membranas pero sí otras funciones, por ej MDO, lipoproteínas

4.- Topoisomerasas y DNA de una hebra tienen afinidad por PI aniónicos

5.- In vitro, participan en la translocación de proteínas

Funciones PL zwitteriónicos



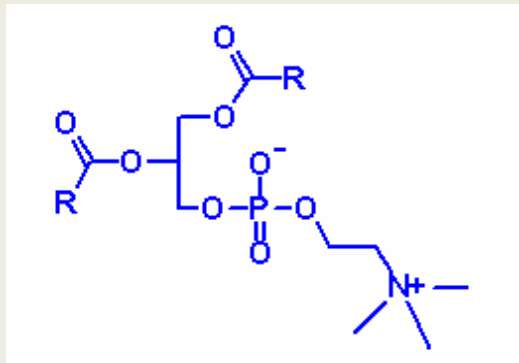
En membranas de células eucariotas, bacterias gram negativas y gram positivas

Grupo cabeza pequeño, puede unir hidrógenos a través de los grupos amina ionizables

Crítico para el crecimiento de E. coli

Da las condiciones para el empaquetamiento de las membranas y no puede ser sustituido por los otros PL

Participa en el transporte de solutos y no lo sustituye PC



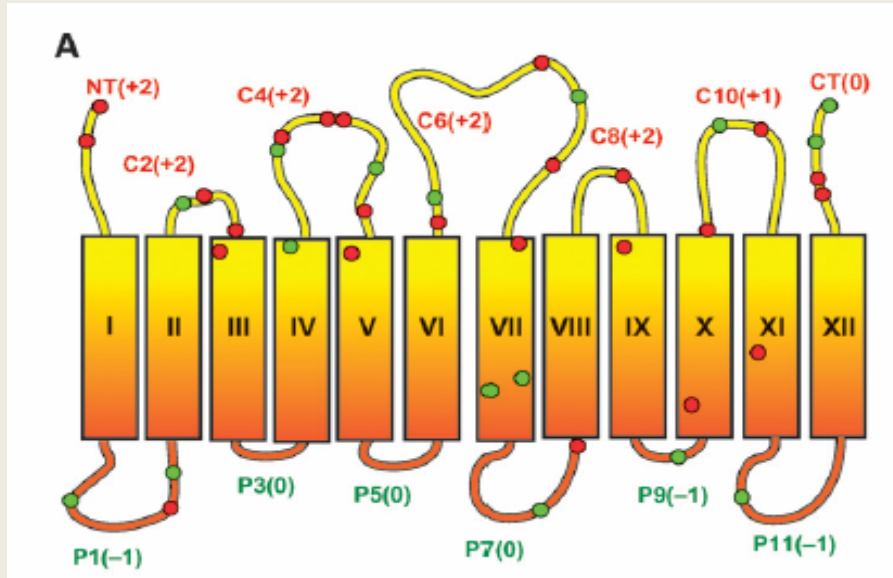
Forma vesículas

Phosphatidylcholine

PC

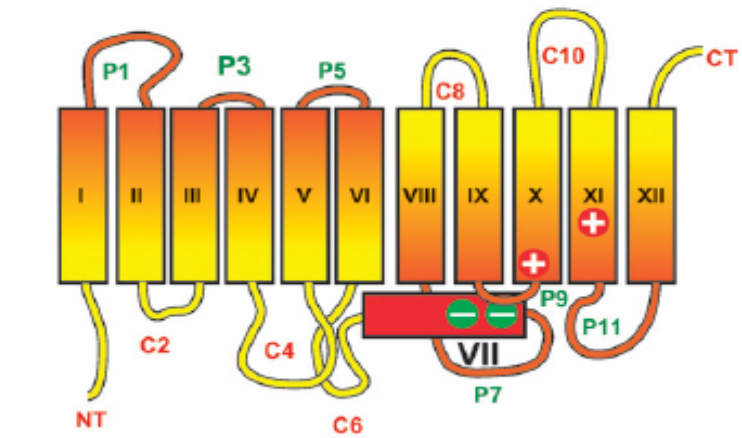
Organización topológica de Lactosa permeasa (LacY) como función de la composición de lípidos

Transporta solutos, se acopla al transporte de sustratos, protones y cationes

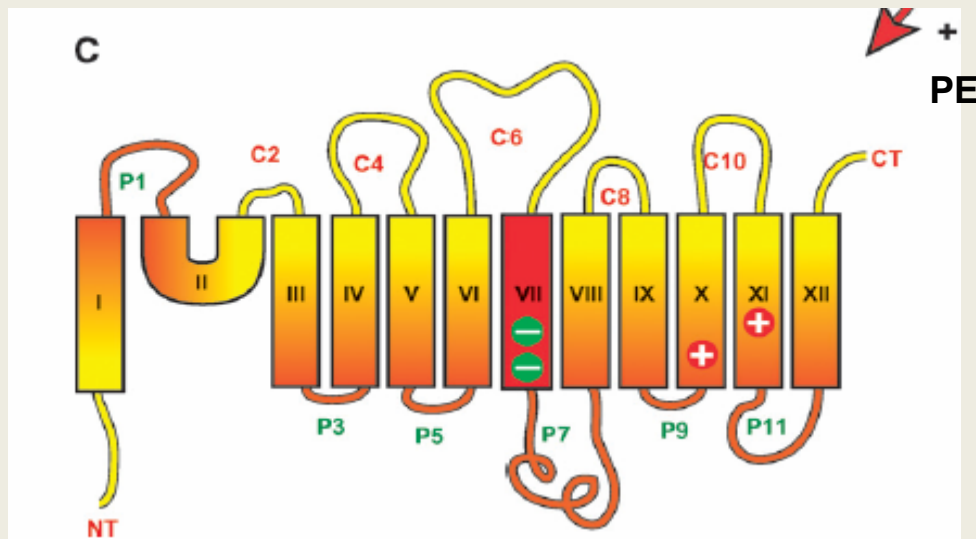


+ PE

N terminal invertido respecto a C terminal TM VII no atraviesa membrana



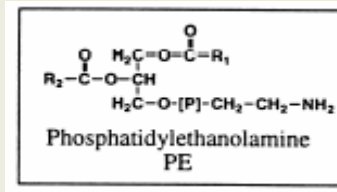
- PE



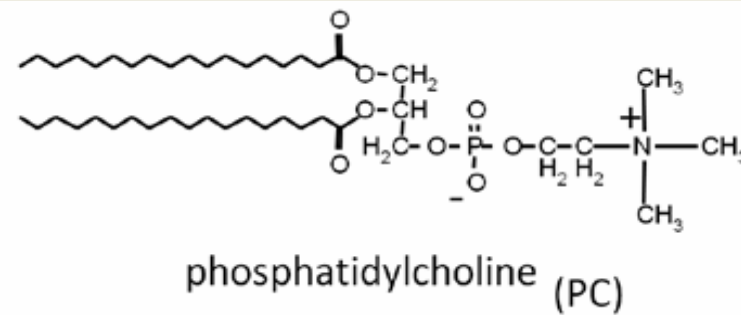
La organización de los dominios de membrana es dinámico y sujeto a cambios en las propiedades de la misma luego de alcanzar un estado plegado completo

Polimorfismo lipídico: Lípidos de las membranas biológicas existen en múltiples estados de fases. El estado de bicapa es el que predomina, las fases lipídicas no bicapa se relacionan a eventos transitorios como cambios en las condiciones ambientales. Los comportamientos de fases de las membranas son características de los lípidos correspondientes

PE, cabeza polar pequeña: favorece estructura no bicapa, estado hexagonal reverso H_{II} ,

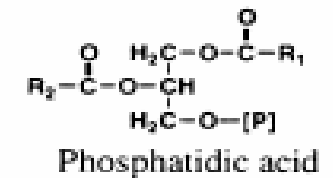
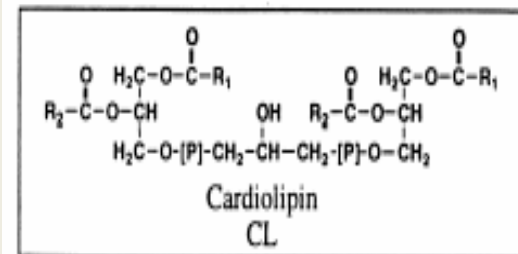


Fase H_{II} se favorece con alta temperatura, ácidos grasos cis insaturados y por el colesterol



PC, fase lamelar, bicapa, sólo forma no bicapas bajo condiciones extremas

CL, PA con cationes divalentes, monoglucosil DAG, forman estructuras no bicapa bajo condiciones fisiológicas



Algunos organismos alteran sus mezclas de bicapa no bicapa en respuesta a condiciones ambientales

Bacterias Gram negativas nodulantes de maní

Table 1. Effect of NaCl and temperature on phospholipids composition of *Bradyrhizobium* SEMIA

PL	28°C					
	B medium			B medium + NaCl		
	mg PL.g wet wt ⁻¹ × 10	Bq.g wet wt ⁻¹	DL %	mg PL.g wet wt ⁻¹ × 10	Bq.g wet wt ⁻¹	DL %
PC	12.0 ± 1.7	4993 ± 548	43.7	19.9 ± 3.5*	7973 ± 595**	50.2
DMPE	1.3 ± 0.5	270 ± 120	2.9	1.8 ± 0.9	320 ± 180	1.9
PG	4.8 ± 1.1	945 ± 112	10.1	8.9 ± 1.3*	1343 ± 33***	8.9
PE	9.7 ± 2.3	2205 ± 37	24.4	13.0 ± 1.9*	2890 ± 20***	21.4
CL	2.3 ± 0.2	702 ± 175	6.6	3.8 ± 1.1*	1090 ± 320	6.1
PA	0.6 ± 0.2	138 ± 23	1.2	0.9 ± 0.1	160 ± 32	0.9
NI	11.7 ± 4.1	994 ± 322	11.1	13.3 ± 3.2	1316 ± 366	10.6

37°C					
B medium			B medium + NaCl		
mg PL.g wet wt ⁻¹ × 10	Bq.g wet wt ⁻¹	DL %	mg PL.g wet wt ⁻¹ × 10	Bq.g wet wt ⁻¹	DL %
7.7 ± 2.6*	3208 ± 483***	54.6	7.6 ± 1.4*	5170 ± 653*	57.1
ND	127 ± 52	2.3	1.8 ± 0.9	204 ± 22	2.0
1.6 ± 0.2*	453 ± 138*	6.4	1.9 ± 0.3***	723 ± 207	6.8
4.3 ± 0.4*	797 ± 175**	19.0	3 ± 0.5***	1232 ± 167***	15.5
4.7 ± 0.8*	183 ± 60**	3.1	2.6 ± 1.0	813 ± 177	7.0
0.5 ± 0.2	72 ± 15	1.8	0.3 ± 0.1	85 ± 23	1.0
9.4 ± 1.4	743 ± 169	12.7	10.1 ± 1.3	1024 ± 177	10.5

^a *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 was grown in B medium and harvested at late exponential phase. [1-¹⁴C]acetate, sodium salt (37 KBq mL⁻¹) was added when Bq/g wet wt was measured. Values represent means ± S.E.M. of three independent experiments.

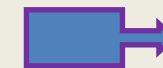
DL distribution of label. ND no detected, NI no identified, PL phospholipids, PC Phosphatidycholine, DMPE dimethylphosphatidylethanolamine, PG phosphatidylglycevol, PE phosphatidylethanolamine, CL cardiolipin, PA phosphatidic acid.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ related to 28°C in B medium.

Conclusiones

NaCl: Incrementa marcado de PL individuales y disminuye Z/A

T: Disminuye marcado de PL Individuales y disminuye Z/A



**Por aumento de PL
aniónicos: respuesta
para estabilizar la
membrana**

Ambos estreses: PC  **PE**  **Marcado total y Z/A sin cambios**

PE  **PC**

Estreses aplicados producen cambios a nivel de PL los que serían respuestas adaptativas del organismo para sobrevivir.

Se identifican genes involucrados en la síntesis de fosfatidilcolina, y se aísla una mutante en el gen *pmtA* de SEMIA 6144

Objetivo: elucidar papel de PC en bacteria de vida libre y en la simbiosis con planta de maní

Fig. 1. Determination of Pmt and Pcs activities. The Pmt activity (a) was performed according to de Rudder *et al.* (1997) using *S*-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine (SAM) as a radiolabelled substrate. The Pcs activity (b) was determined according to Martínez-Morales *et al.* (2003) using the substrates [methyl-¹⁴C]choline and CDP-diacylglycerol. Bacterial lipids formed *in vitro* were extracted according to Bligh & Dyer (1959) and analysed by TLC. Each lane in the figure is derived from different TLCs developed in parallel. (1) *Sinorhizobium meliloti* 1021, (2) *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110spc4, (3) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; MMPE, monomethylphosphatidylethanolamine; DMPE, dimethylphosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

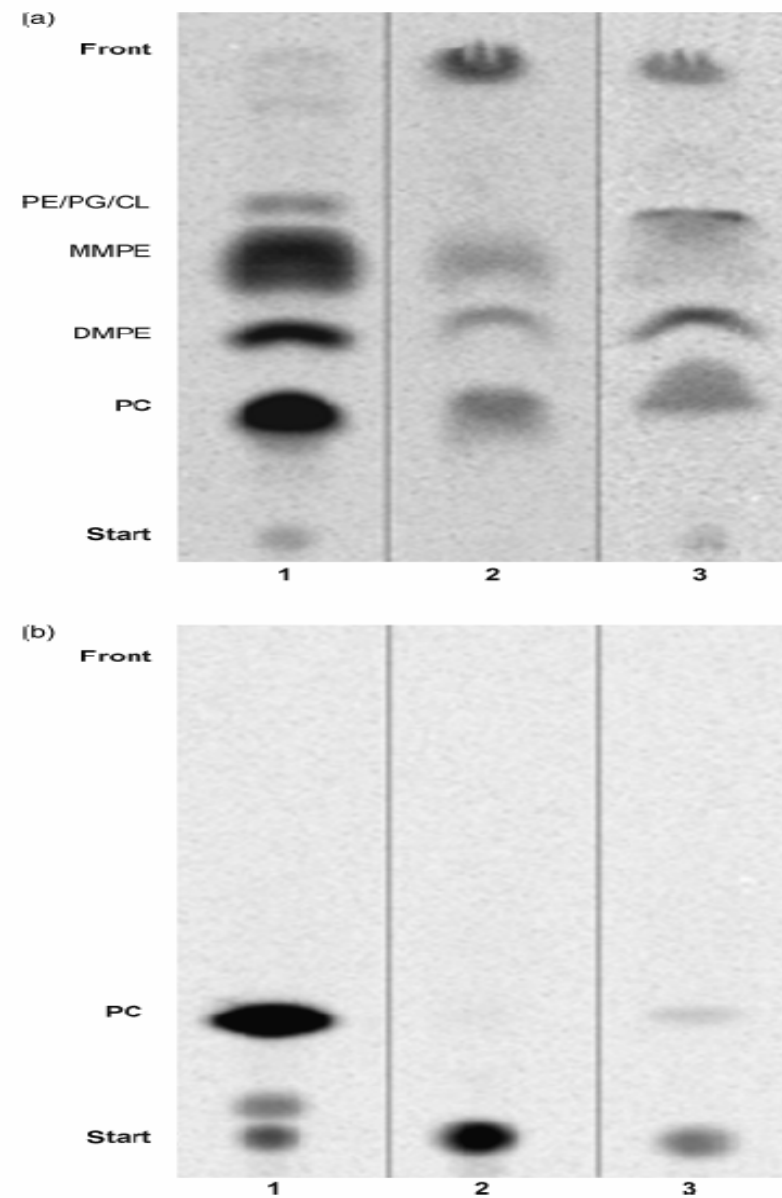


Table 2. Membrane lipid composition of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 wild type, *pmtA*-deficient mutant (DBM13), DBM13 complemented with plasmid pDBM07 and DBM13 harbouring the vector pBBR1MCS-5

Lipid labelled (% of total $^{14}\text{C} \pm \text{SD}$)				
	SEMIA 6144 wild type	<i>pmtA</i> - deficient mutant	<i>pmtA</i> -deficient mutant \times pDBM07	<i>pmtA</i> -deficient mutant \times pBBR1 MCS-5
PA	2.4 \pm 1.0	1.3 \pm 0.4	3.3 \pm 1.3	2.0 \pm 0.6
PC	47.6 \pm 3.9	24.8 \pm 3.8	56.6 \pm 2.5	25.0 \pm 3.9
PG	7.0 \pm 2.3	7.2 \pm 1.1	6.4 \pm 0.1	7.2 \pm 2.2
PE	27.5 \pm 6.5	57.6 \pm 5.2	20.1 \pm 1.4	56.4 \pm 8.0
CL	13.4 \pm 3.3	5.3 \pm 0.7	9.6 \pm 2.2	5.8 \pm 0.7
UL	4.1 \pm 0.7	3.0 \pm 0.6	3.9 \pm 0.5	3.6 \pm 0.5

Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144 strains were grown in B⁻ medium. [1- ^{14}C]acetate, sodium salt (37 kBq mL⁻¹) was added. Aliquots of the total lipid extracts were analysed by TLC and the fractions were quantified by radioactivity measured in a liquid scintillation counter (Beckman LS 60001 C). Values represent means \pm SD of three independent experiments. PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; CL, cardiolipin; UL, unidentified lipid(s) migrating with the solvent front.

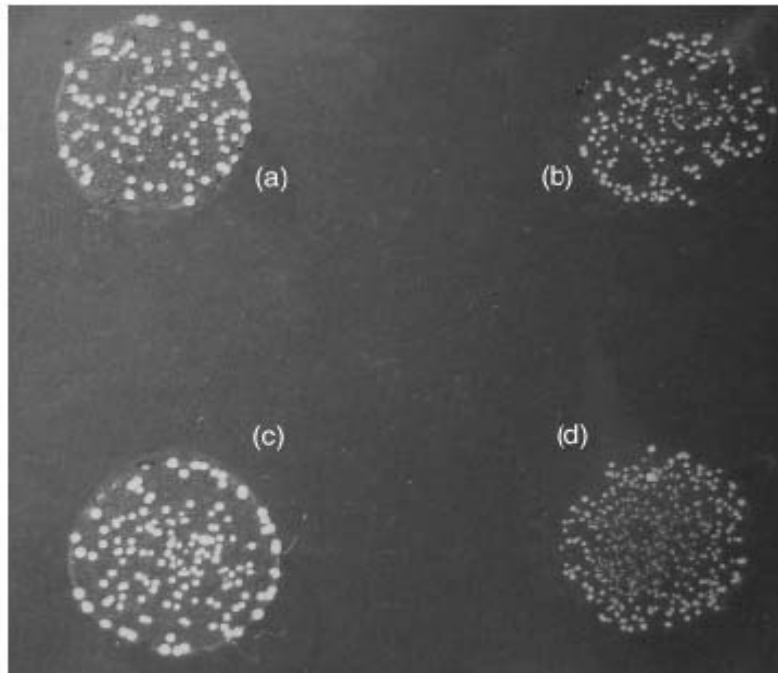


Fig. 2. Size of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 wild-type and DBM13 colonies. The strains were grown on YEM medium for 72 h. (a) SEMIA 6144 wild type, (b) DBM13, (c) DBM13 × pDBM07 and (d) DBM13 × pBBR1MCS-5.

Table 3. Average size of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 wild type and DBM13 cells

Strain	Size (μm)
SEMIA 6144 wild type	2.31 ± 0.38
SEMIA 6144 <i>pmtA</i> -deficient mutant (DBM13)	1.86 ± 0.25
DBM13 × pDBM07	2.25 ± 0.37
DBM13 × pBBR1MCS-5	1.48 ± 0.16

Cells were examined under the Axiophot (Carl Zeiss) light microscope. The images were acquired with a Canon PC1089 Powershot G6 7.1-megapixel digital camera (Canon Inc., Japan) and processed with the AXIOVISION 4.1 software (Carl Zeiss).

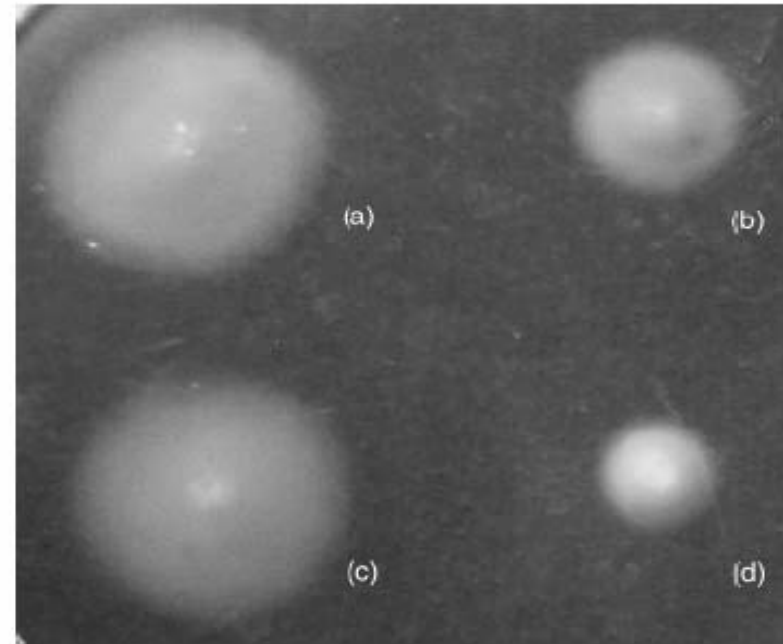


Fig. 3. Swimming motility of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 strains. The assay was performed at 28 °C on YEM swim plates (0.3% agar). (a) SEMIA 6144 wild type, (b) DBM13, (c) DBM13 × pDBM07 and (d) DBM13 × pBBR1MCS-5. Similar results were obtained in three independent experiments.

Mutante deficiente en *pmtA*, PE es el PL más abundante. PE tiene el grupo cabeza más pequeño que PC puede sufrir transición bicapa no bicapa. Estos cambios pueden llegar a modificaciones en la estructura de α hélice transmembrana alterando el empaquetamiento de esas hélices. Como consecuencia fenómenos asociados a membrana como la motilidad pueden estar afectados. La disminución en CL puede ser responsable de la disminución del tamaño.

Fluidez de membranas y su papel en la percepción de señales del medioambiente

Fluidez de la membrana: desorden molecular y movimientos moleculares en una capa lipídica



Anisotropía de la polarización de fluorescencia

Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

Modulación de fluidez de membrana

Efectos de cambios en la temperatura: si baja la temperatura, decrece la fluidez, si aumenta la temperatura produce fluidización de las membranas

Estrés osmótico: estrés hiperosmótico decrece la fluidez = baja temperatura

Efectos de la insaturación de los ácidos grasos: relacionado con las desaturasas

Synechocystis: 4 genes *desA*, *desB*, *desC* and *desD*, 4 desaturasas AG con 4 dobles enlaces

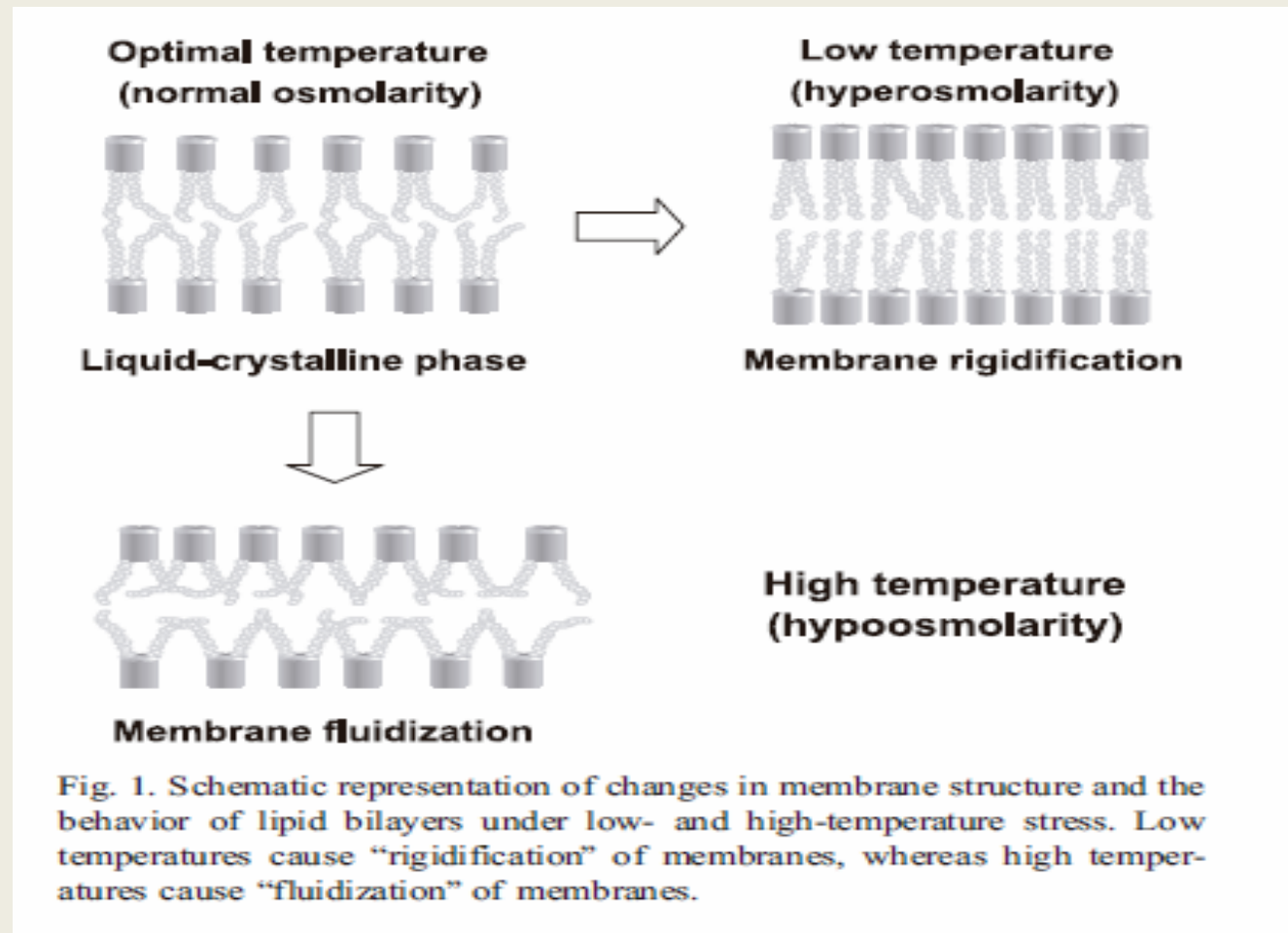
Cyanobacterias: se puede alterar el N° de dobles enlaces en los FA alterando los genes que codifican FA desaturasas

Synechococcus: 1 gen *desC*, 1 desaturasa AG con 1 doble enlace

Inactivación de *desA* y *desD* decrecimiento en fluidez de membrana, no se aclimatan a bajas temperaturas

Genes inducibles por frío, a medida que agregan dobles enlaces se mantiene la fluidez, para compensar el decrecimiento en fluidez, evita transición a fase gel

Introducción del *desA* de *Synechocystis* lleva a la formación de AG diinsaturados, se aclimatan a bajas temperaturas



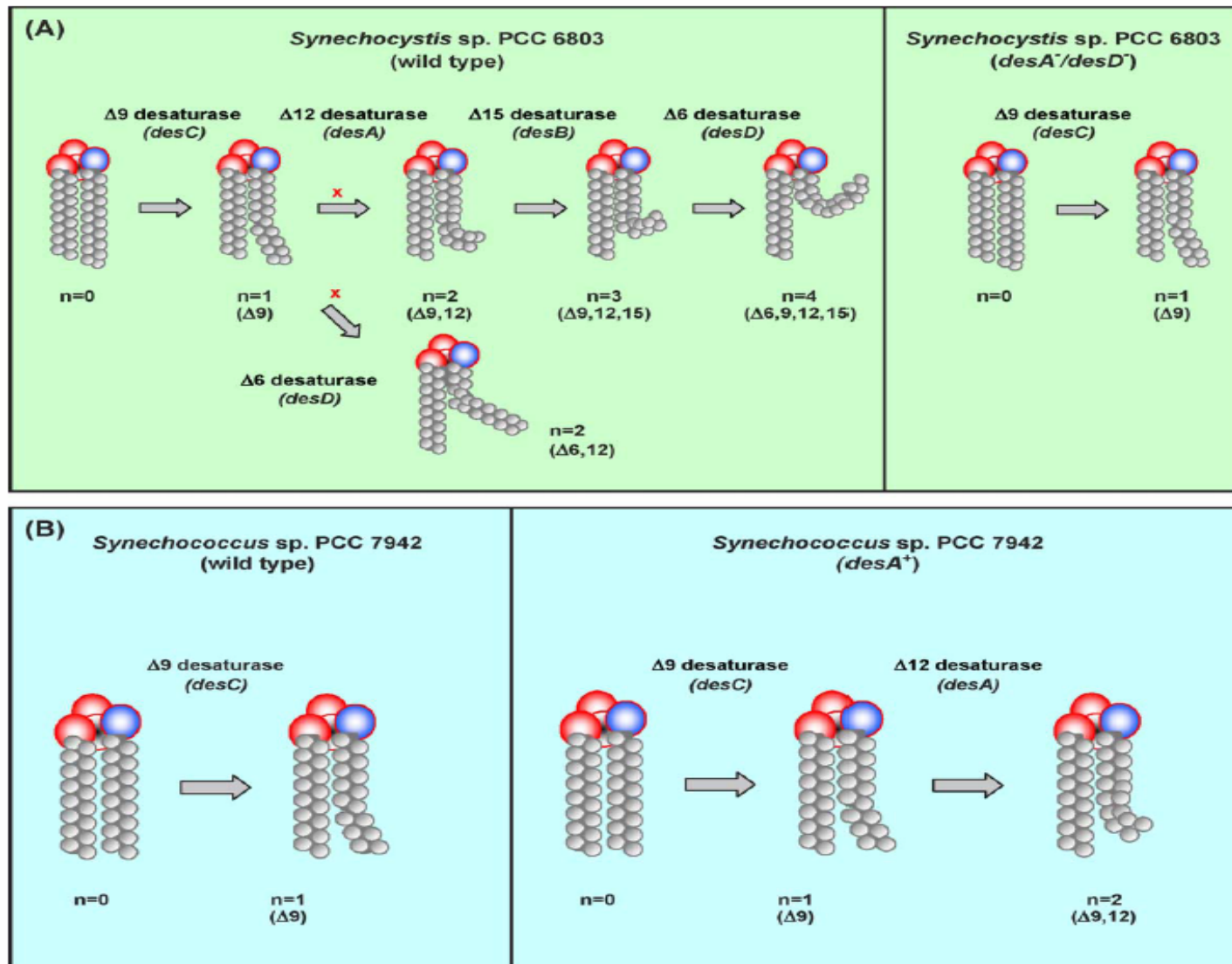


Fig. 2. Desaturation of polar glycerolipids in cyanobacterial cells. (A) Desaturation in wild-type cells of *Synechocystis* is catalyzed by four acyl-lipid desaturases, with formation of C18:4 fatty acid (left panel). Site-directed mutagenesis of the *desA* and *desD* genes (shown by daggers) prevents the synthesis of polyunsaturated fatty acids and only mono-unsaturated fatty acids are produced (right panel). The molecular species of lipids in *Synechocystis* are mainly C18 with minor levels of C16 at the *sn*-1 position and C16:0 at the *sn*-2 position. Desaturation occurs exclusively at the *sn*-1 position. *n*=0, 1, 2, 3, 4 corresponds to the number of double bonds in the fatty-acyl chains. (B) Desaturation in wild-type cells of *Synechococcus* is catalyzed only by the acyl-lipid $\Delta 9$ -desaturase and only mono-unsaturated fatty acids are produced (left panel). Transformation of this strain with the *desA* gene for the $\Delta 12$ -desaturase of *Synechocystis* leads to enhanced formation of di-unsaturated fatty acids (right panel). In *Synechococcus*, most of the molecular species are C16 with minor levels of C18 at the *sn*-1 position and C16:0 at the *sn*-2 position. Desaturation occurs at the *sn*-1 and *sn*-2 positions.

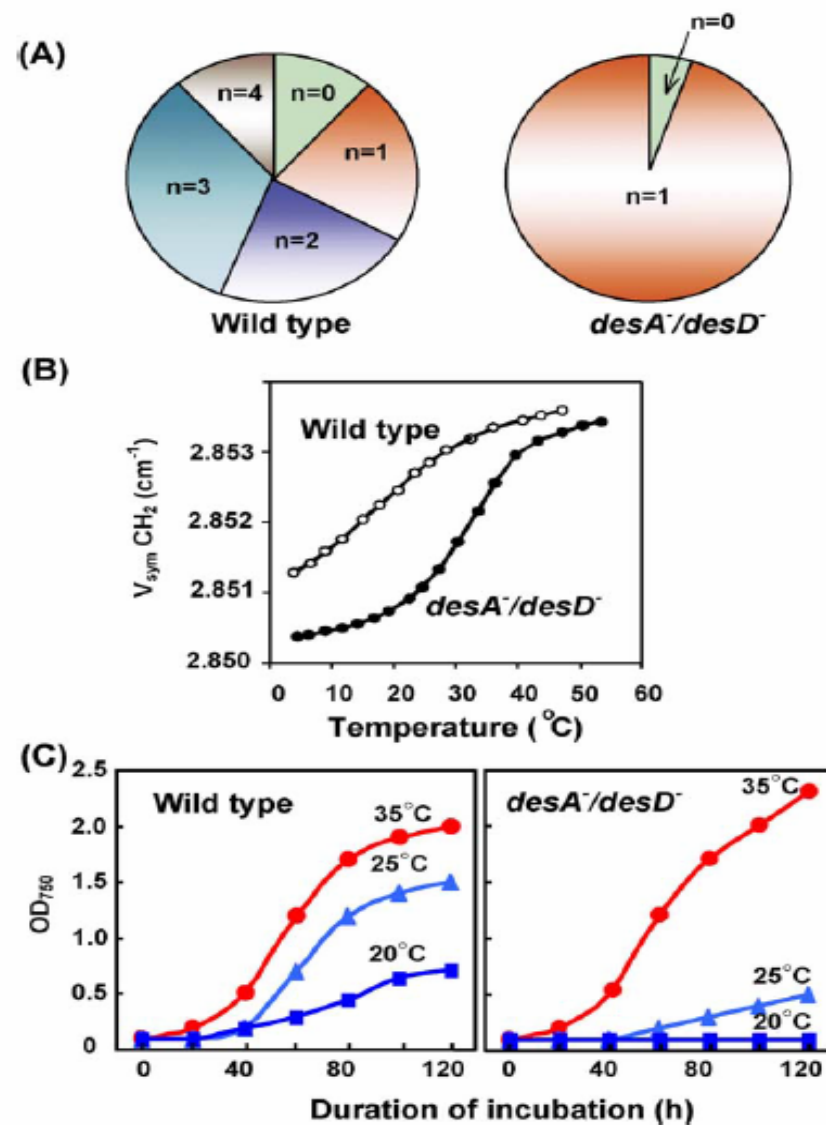
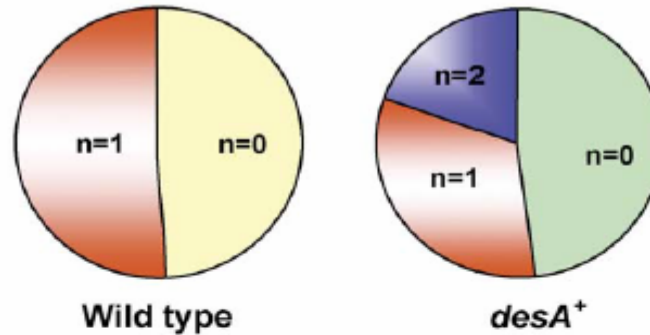


Fig. 3. Site-directed mutagenesis of the *desA* and *desD* genes of *Synechocystis* leads to enrichment of membrane lipids with mono-unsaturated fatty acids (A). As a result, the membrane fluidity decreases, as monitored by FTIR spectroscopy (B). The mutant strain *desA⁻/desD⁻* is unable to acclimate to low temperatures, as demonstrated by growth curves of wild-type and mutant cells at 35, 25 and 20 °C (C). OD₇₅₀—optical density of cells measured at 750 nm.

(A)



(B)

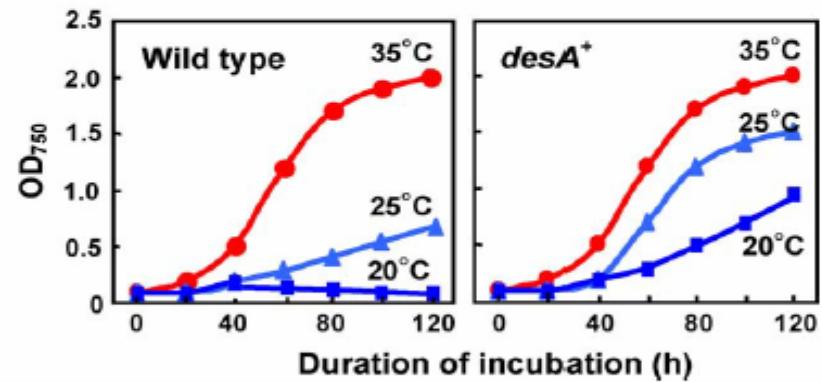


Fig. 4. Transformation of *Synechococcus* sp. PCC 7942 with the *desA* gene for the $\Delta 12$ desaturase of *Synechocystis* leads to enrichment of membrane lipids with di-unsaturated fatty acids (A). The transformed cells, *desA*⁺, are able to acclimate to low temperatures, in contrast to wild-type cells which are unable to do so, as demonstrated by growth curves for wild-type and transformed cells at 35, 25 and 20 °C (B). OD₇₅₀—optical density of cells measured at 750 nm.

Efecto de temperatura y salinidad sobre composición y grado de insaturación de ácidos grasos de un rizobio nodulante de maní

Table 1 Effect of temperature and salinity stress on the incorporation of [¹⁴C]acetate into phospholipids of *Bradyrhizobium* TAL1000

PL (%)	Growth condition			
	28 °C	28 °C + NaCl	37 °C	37 °C + NaCl
PtdCho	44.5 ± 2.9	45.7 ± 2.2	49.4 ± 2.6*	54.0 ± 4.0*
DMPtdEtn	9.90 ± 1.5	9.70 ± 0.9	10.9 ± 1.4	10.8 ± 1.7
LPtdEtn	0.88 ± 0.3	2.50 ± 1.3	3.60 ± 0.9*	2.50 ± 0.9*
PtdEtn	13.7 ± 1.7	13.5 ± 2.0	7.60 ± 2.4*	8.10 ± 2.7*
Ptd ₂ Gro	4.20 ± 0.3	3.90 ± 0.1	3.00 ± 0.8*	4.10 ± 0.3
PtdGro	17.5 ± 1.1	15.4 ± 1.9	18.2 ± 1.5	12.4 ± 0.5*
NL	9.30 ± 3.5	9.60 ± 3.1	7.80 ± 3.0	9.00 ± 1.8

Values represent means ± SEM of three independent experiments

PL phospholipids, *PtdCho* phosphatidylcholine, *DMPtdEtn* Dimethyl phosphatidylethanolamine, *LPtdEtn* lysophosphatidylethanolamine, *PtdEtn* Phosphatidylethanolamine, *Ptd₂Gro* cardiolipin, *PtdGro* phosphatidylglycerol, *NL* neutral lipids

* Difference from control (28 °C) value statistically significant at *P* < 0.05 level

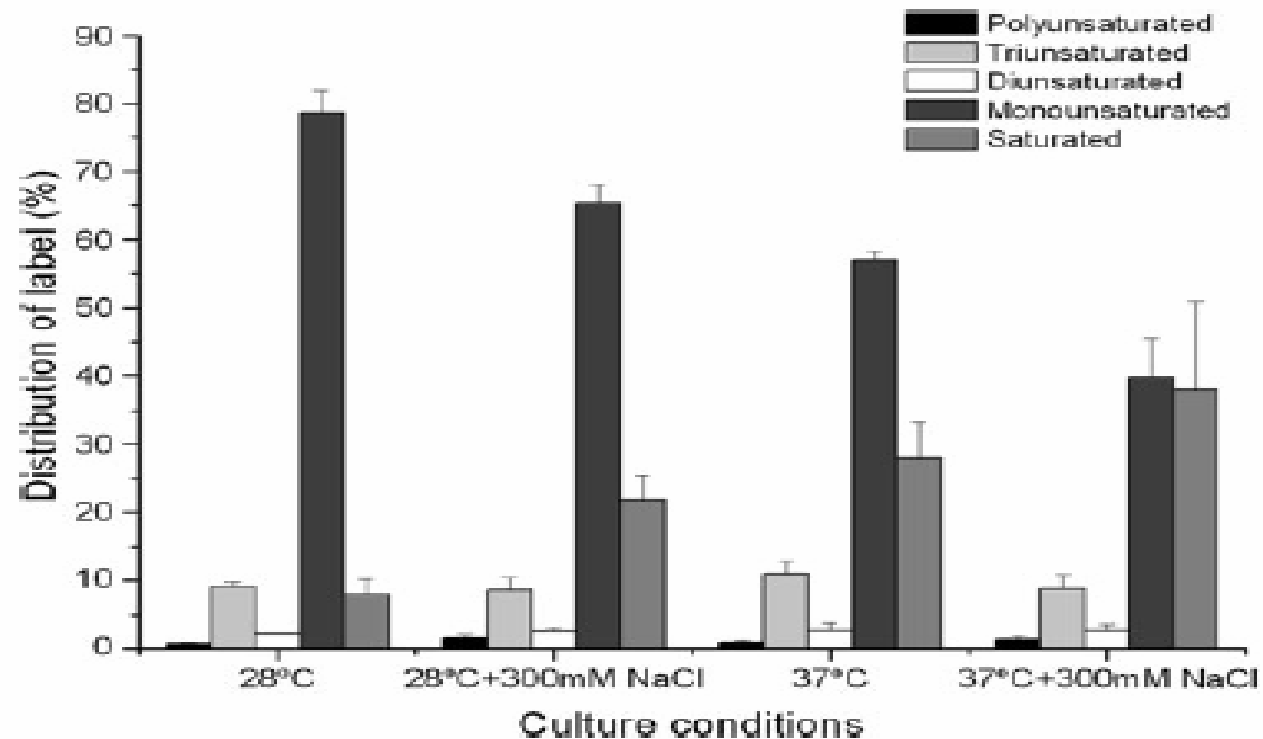


Fig. 2 Effect of NaCl and temperature on incorporation of [1-¹⁴C]acetate in fatty acids of *Bradyrhizobium* TAL1000. FAMES were prepared from total lipids, and separated according to unsaturation degree using TLC plates impregnated with 10% AgNO₃. Results are expressed as the percentage of total radioactivity incorporated in each FA fraction. Values represent means ± SEM from three independent experiments

Table 2 Effects of temperature and salinity stress on fatty acid composition of two peanut-nodulating rhizobia

Fatty acid type (%)	Strain	Growth condition			
		28 °C	28 °C + NaCl	37 °C	37 °C + NaCl
Saturated					
Stearic acid (18:0)	TAL1000	12.6 ± 1.5	14.6 ± 1.6*	24.0 ± 2.7*	29.0 ± 0.9*
	SEMIA6144	1.40 ± 0.3	1.66 ± 0.3	2.00 ± 0.6	2.16 ± 0.9
Palmitic acid (16:0)	TAL1000	8.40 ± 1.7	9.30 ± 1.5	20.0 ± 2.3*	16.1 ± 1.8*
	SEMIA6144	11.0 ± 1.2	12.6 ± 2.7	18.6 ± 3.9*	19.7 ± 3.5*
Unsaturated					
Palmitoleic acid (16:1n-7)	TAL1000	ND	ND	ND	ND
	SEMIA6144	0.42 ± 0.0	0.90 ± 0.4	0.65 ± 0.2	0.56 ± 0.2
<i>cis</i> -vaccenic acid + oleic acid (18:1)	TAL1000	63.3 ± 5.4	55.8 ± 2.7	8.20 ± 0.4*	4.30 ± 0.0*
	SEMIA6144	84.0 ± 2.2	82.4 ± 2.9	73.5 ± 3.4*	68.5 ± 6.8*
Eicosatrienoic acid (20:3)	TAL1000	6.30 ± 1.9	9.20 ± 1.2	15.8 ± 1.6*	19.0 ± 4.7*
	SEMIA6144	ND	ND	ND	ND
Cyclopropane					
19:0 _{cyclo}	TAL1000	3.40 ± 0.7	3.85 ± 0.3	10.0 ± 1.5*	14.5 ± 1.7*
	SEMIA6144	ND	ND	ND	ND
Others	TAL1000 ^a	6.70 ± 1.6	7.10 ± 0.8	23.2 ± 2.6*	17.1 ± 1.9*
	SEMIA6144	1.10 ± 0.0	2.55 ± 0.7	5.00 ± 0.2	5.30 ± 1.3
US ^b	TAL1000	3.3	2.7	0.5	0.5
	SEMIA6144	7.0	6.1	3.6	3.1

Lipids were extracted, and fatty acids of total lipid were converted to methyl esters and analyzed by GC, as described in the text

Percentage of each fatty acid is relative to total fatty acids defined as 100%. Values represent means ± SEM of three independent experiments

ND not detected

^a Correspond to two peaks of retention times of 36 min and 37.4 min. Such peaks could correspond to FA of more than 18 carbon atoms

^b Ratio between sum of unsaturated and sum of saturated fatty acids

* Difference from control (28 °C) value statistically significant at $P < 0.05$ level

Conclusiones

Cepas de rizobios nodulantes de maní modifican sus FA para adaptarse a condiciones ambientales

TAL 1000, de crecimiento rápido, es más eficiente que SEMIA 6144, de crecimiento lento

El mecanismo más importante para mantener las propiedades físicas de las membranas fue la modificación del grado de insaturación

TAL 1000 altera el contenido de 19:0cyclo para su tolerancia a altas temperaturas mientras que SEMIA 6144 acorta la longitud de las cadenas de sus FA

La composición de FA de rizobios puede ser determinante a la hora de preparar formulaciones comerciales con los mismos
Paulucci et al, 2011 Lipids 46, 435

Objetivo

Verificar si se producen cambios metabólicos a nivel de lípidos ocasionados por la edad o por un agonista muscarínico como carbacol

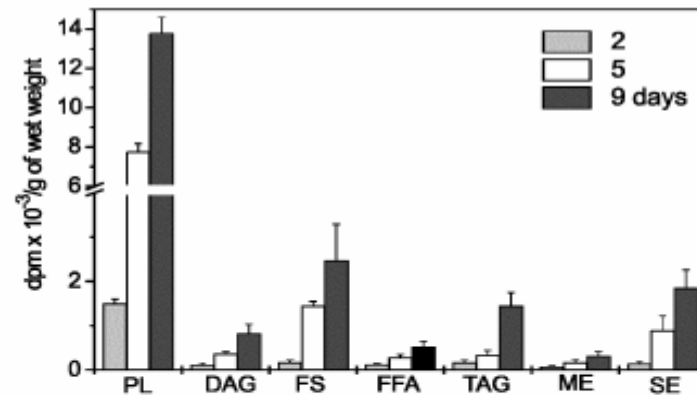


Fig. 1. Incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate into lipids during growth of *T. cruzi* epimastigote forms. The parasites were incubated with $[2-^{14}\text{C}]$ acetate (0.4 Ci ml^{-1} , added at inoculation time) and harvested after the indicated days. Lipids were extracted and separated by TLC. Radioactivity was measured by Liquid Scintillation. Results are expressed as $\text{dpm} \times 10^{-3}/\text{g}$ of wet weight. Values represent means \pm S.E.M. of three independent experiments. PL; phospholipids, DAG: diacylglycerols, TAG: triacylglycerols, FS: free sterols, FFA: free fatty acids, ME: methyl esters, SE: sterol esters.

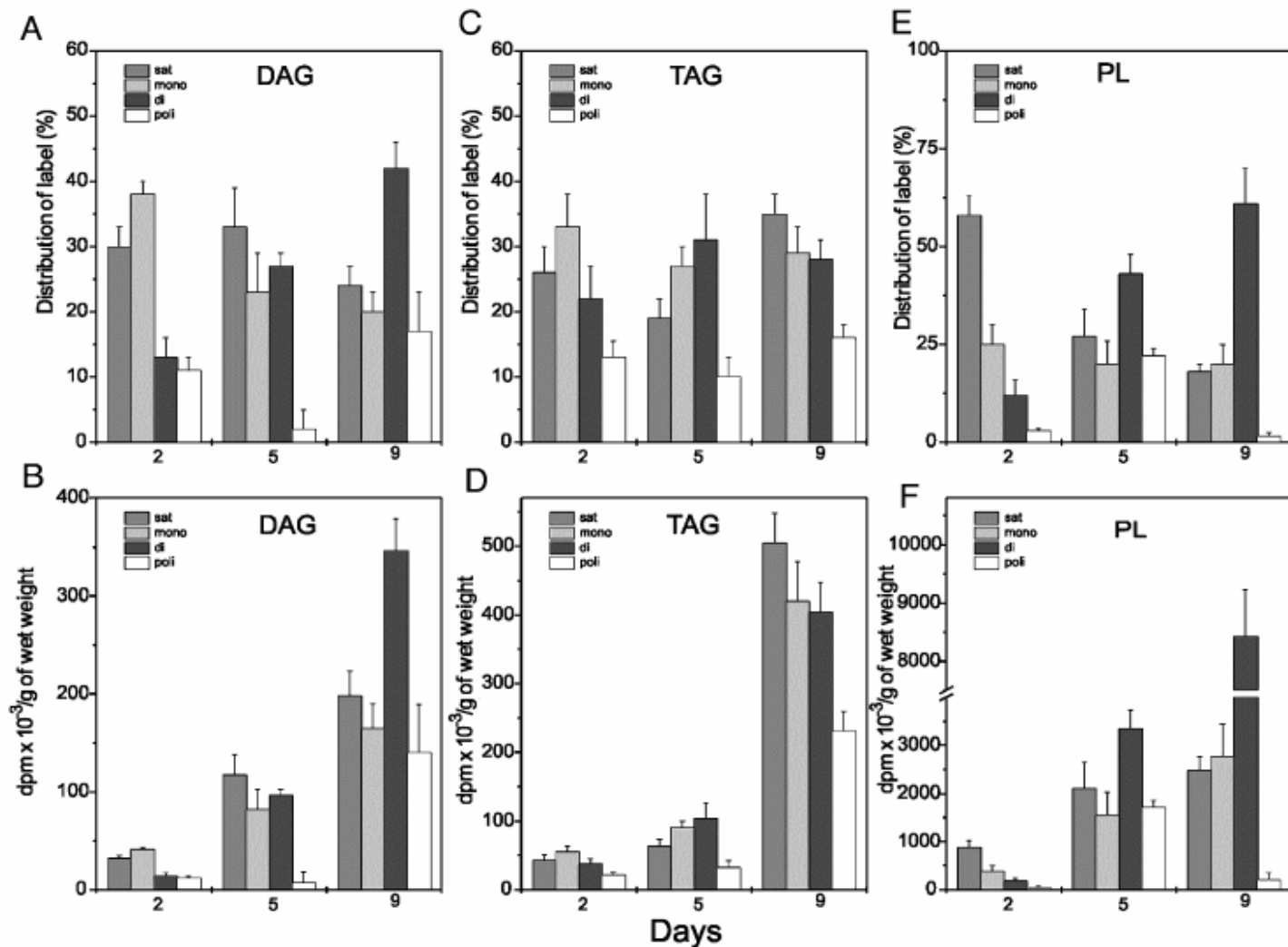


Fig. 2. Incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate in fatty acids of *T. cruzi* lipids. After the indicated days in culture, lipids were extracted from epimastigotes and separated by TLC. Fatty acid methyl esters were prepared from DAG (A and B), TAG (C and D) and PL (E and F) and separated according to unsaturation degree by using TLC plates impregnated with 4% AgNO_3 . Results are expressed as percentage of the total radioactivity incorporated in each of the fatty acid fractions of each lipid (upper panels) and as $\text{dpm} \times 10^{-3}/\text{g}$ of wet weight (lower panels). Values represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments.

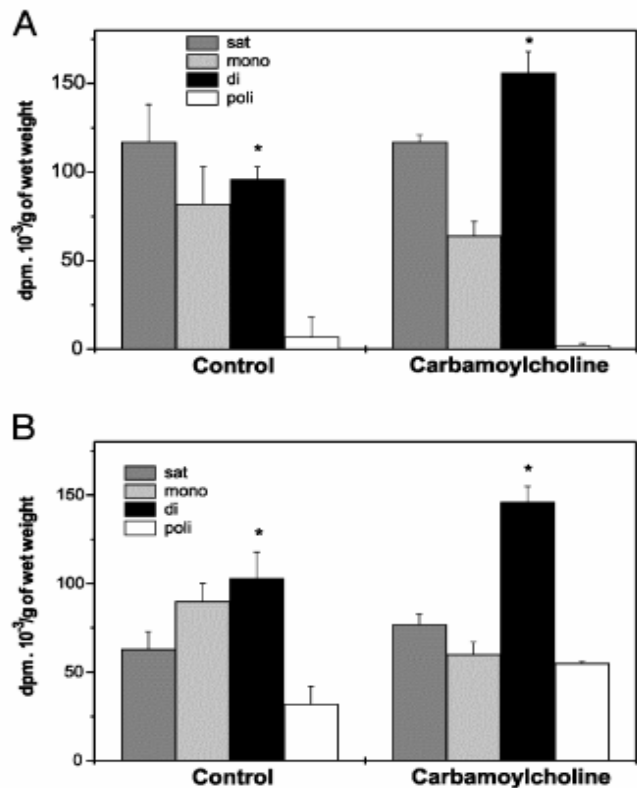


Fig. 3. Effects of carbamoylcholine on the incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate into fatty acids of *T. cruzi* DAG and TAG. Parasites were incubated for 5 days with $[2-^{14}\text{C}]$ acetate (0.4 Ci ml^{-1}) in the presence or absence of carbamoylcholine ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$, added from inoculation time). Lipids were extracted and separated by TLC. Fatty acids methyl esters of DAG (A) and TAG (B) were prepared and separated on TLC plates containing AgNO_3 . Results are expressed as $\text{dpm} \times 10^{-3}/\text{g}$ of wet weight and represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments * $P < 0.05$.

Conclusiones:

El parásito sintetiza ácidos grasos saturados e insaturados, principalmente 18:2, los incorpora a PL y NL. 18:2 varía con la edad del cultivo. Carbacol provoca cambios en el marcado de 18:2 en fracciones de lípidos como DAG y TAG.

18:2 puede intervenir en procesos de señalización como hace 20:4 en mamíferos?

Objetivos:

Realizar estudios bioquímicos de desaturasas de *T. cruzi* para ahondar en su papel en la adaptación del parásito a cambios en la concentración del suero fetal bovino y así modular el grado de insaturación de FA de sus PL

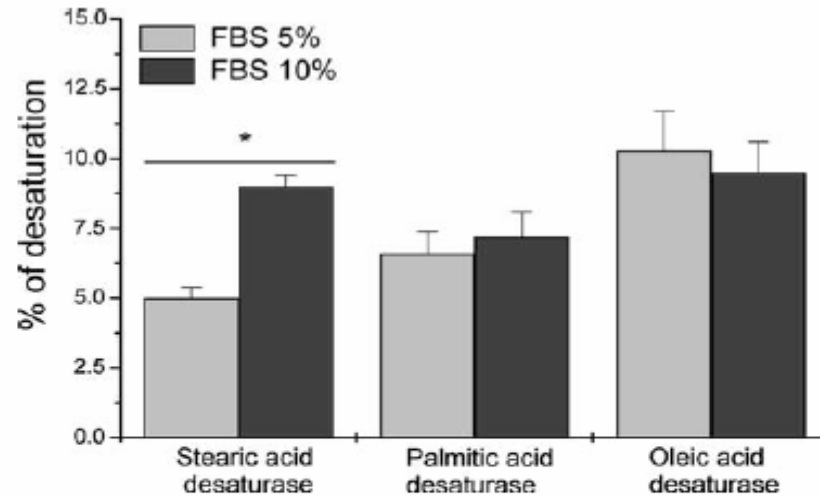


Fig. 1 Effect of fetal bovine serum (FBS) concentration on *T. cruzi* desaturase activities. Parasites were grown with 5 or 10% FBS and harvested at the logarithmic phase of growth (5 days). Δ^9 Desaturase was determined using $[1-^{14}\text{C}]$ palmitic acid or $[1-^{14}\text{C}]$ stearic as substrate. Δ^{12} Desaturase was assayed using $[1-^{14}\text{C}]$ oleic acid as substrate. Results are expressed as percent of desaturation \pm SEM, $n = 4$, * $P < 0.05$, t test

Table 1 Effect of fetal bovine serum concentration on *T. cruzi* desaturase activities in different fractions

Fatty acids transformation	Specific activity (pmol/min/mg of protein)					
	Stearic acid		Palmitic acid		Oleic acid	
	5% FBS	10%	5% FBS	10%	5% FBS	10%
Cell fractions						
Supernatant 25,000g	65 ± 11	222 ± 37	ND	ND	ND	ND
Supernatant 105,000g	34.8 ± 2.2	123.0 ± 7.6	ND	ND	ND	ND
Pellet 105,000g	206 ± 10	538 ± 27	141 ± 15	155.9 ± 4.5	7.84 ± 0.94	8.82 ± 0.88

Cell fractions were obtained by differential centrifugation from *T. cruzi* epimastigotes grown with either 5 or 10% of FBS. Values are means ± SEM of three separate experiments

ND not determined

Conclusiones:

Δ9 desaturasa participa en la respuesta de *T. cruzi* para la adaptación a condiciones ambientales y esta enzimas puede ser un blanco terapéutico que puede mejorar el diseño de drogas terapéuticas contra el mal de Chagas

Clonamos un gene que codifica una posible desaturasa de *Bradyrhizobium* TAL 1000 y *Ensifer meliloti* y determinamos su función por expresión heteróloga en *E.coli*. Demostramos así la presencia de una ruta aeróbica en estas bacterias simbióticas Paulucci et al (datos no publicados)

Evaluamos la respuesta al estrés por temperatura y salinidad de la cepa DBM 13, mutante de SEMIA 6144, deficiente en PC. Se afectaron la viabilidad y la distribución de PL ante el estrés por temperatura. El gen *pmtA* parece no estar involucrado en la respuesta de *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 Medeot et al (datos no publicados)

La enzima Δ^9 de *T. cruzi* fue clonada, secuenciada y sobreexpresada en *E. coli*. La funcionalidad de la enzima fue determinada usando sustratos radioactivos agregados al medio de cultivo Woelke et al (datos no publicados)