

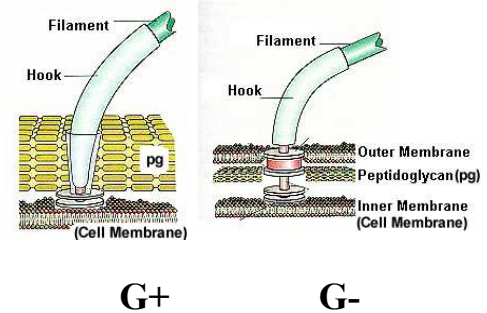
Protokol 6 Pohyb buňky

Úvod:

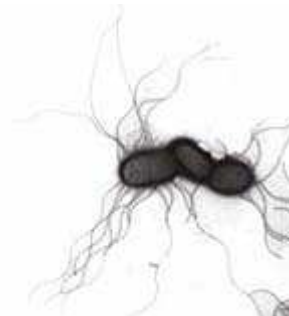
Pohyb je odpovědí na: gradient chemické látky, teplotu, světlo, gravitaci, kyslíkový gradient. Schopnost pohybu a jeho rychlost závisí na přítomnosti bičíků, počtu bičíků, lokalizaci bičíků (peritricha reagují nejpomaleji), viskozitě prostředí, gradientu koncentrace atraktantů a inhibičních látek, na paměti buňky (žádný pohyb nesmí trvat dlouho, pro správnou reakci musí buňka reagovat na aktuální podnět – krátkodobá paměť receptorů). Rozmezí rychlosti: 1-100 $\mu\text{m/s}$.

Bičík

- globulární bílkovina flagelin
- začíná v cytoplazmatické membráně
- proti eukaryotním bičíkům: jiná stavba, jiné bílkoviny, pohyb není vlnění, donorem energie není ATP ale proud H^+
- stavba: bazální tělísko (G- 4 kruhy, G+ 2kruhy), háček, vlákno
- vlákno je flagelárním antigenem, specifické bílkoviny
- tvorba samouspořádáním
- bičíky snadno odstranitelné skleněnou tyčinkou
- primární pohyb je rotační; hnací síla: protonmotivní síla (proud H^+) (*Vibrio Na⁺*)
- při pohybu se bičíky nezamotají díky náboji
- pohyb dopředu: proti směru hodinových ručiček, buňku tlačí před sebou
- rozmotání bičíků: točení na místě
- chemotaxe: regulace MCP systémem – po vazbě atraktantu chemické modifikace proteinů membrány: de- a fosforylace a demethylace
- umístění bičíku:



Structure	Flagella Type	Example
	Monotrichous	<i>Vibrio cholerae</i>
	Lophotrichous	<i>Bartonella bacilliformis</i>
	Amphitrichous	<i>Spirillum serpens</i>
	Peritrichous	<i>Escherichia coli</i>



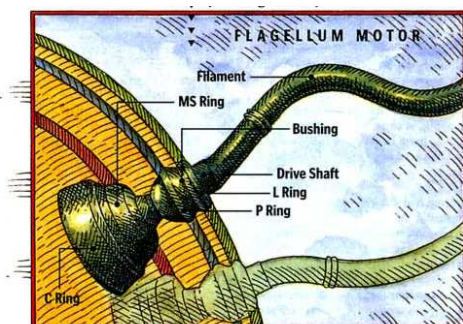
Salmonella typhimurium
Chi Aizawa, Teikyo University.



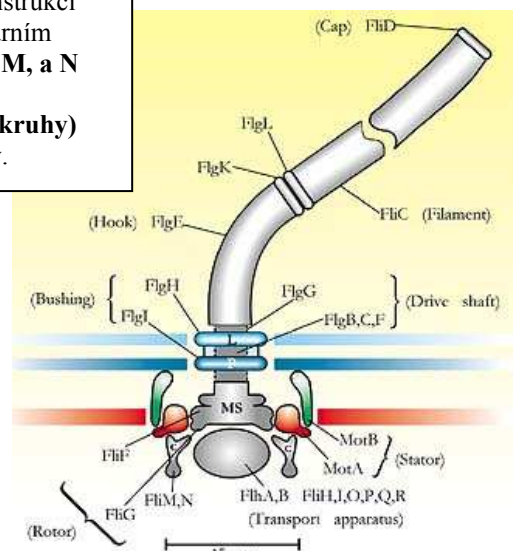
Vibrio cholerae

Točivá síla je generována mezi **staturem** spojeným s rigidní konstrukcí buněčné stěny (k peptidoglykanu) a **rotorem** spojeným s flagelárním vláknem. Proteiny **MotA** a **MotB** tvoří složky statoru; **FlhF**, **G**, **M**, a **N** (**MS** a **C kruhy**) jsou složkami rotoru.

FlgB, **C**, **F**, a **G** jsou hnací hřídeli (drive shaft). FlgH a I (**L** a **P kruhy**) jsou objímkami, které vedou hřídel vnější vrstvou buněčné stěny.



- Rotor:** 6-17 tis.otáček/min
- Vlákn:** 200-1 000 ot/min
- Nerotuje konst.rychle
- Průměrná rychlost:** 20-90 $\mu\text{m/s}$
- 60x délka buňky/s
- Gepard:** 25x délka těla/s



Typy pohybu:

taxe – pozitivní a negativní; chemotaxe, fototaxe, aerotaxe, magnetotaxe

Chemotaxe:

Pohyb bez atraktantu – střídání přímého a otáčivého, vrtivého. Náhodný.

Pohyb s atraktantem – nižší frekvence otáčení na místě

Bakterie disponuje pamětí na okamžitou koncentraci atraktantu: porovnává prostředí s předchozí koncentrací – ve směru zvyšující se koncentrace se **snižuje frekvence otáčení na místě**.

- Pozitivní (pohyb k atraktantu) a negativní – pozorování na Petriho misce
- Koncentrační gradient
- Chemoreceptory – v periplazmě nebo na cytoplazmatické membráně
- Atraktanty:
 - cukry (odpověď už na 10^{-8} M koncentraci), aminokyseliny;
 - 20 chemoreceptorů
- Repelenty
 - bakt.odpadní produkty, inhibiční agens, barviva, chemické látky
 - 10 chemoreceptorů

Závislost na prostředí:

MCP systém čeledi *Enterobacteriaceae* je urč.způsobem vyvinut u druhů žijících v prostředí bohatém na živiny, liší se tedy od systémů recepce např.u oceánských bakterií:

Vibrio furnissii – žíví se chitinem, vykazuje, silná odpověď na nízké koncentrace oligosacharidů chitinu, nikoli na silné atraktans např.pro enterobakterie (aspartát).

Fotosyntetické *Chromatium* – přitahováno H_2S (donor elektronů), což je repelent pro většinu bakterií.

H. halobium přitahováno leucinem, což je repelent pro enterobakterie.

Rhodospseudomonas putida – chemoatraktantem jsou repelenty enterobakterií (benzoát)

MCP systém není ovlivněn růstovým cyklem buňky, , není zahrnut v údržbě buňky, ale při zvýšené intenzitě růstu. – pohyb hraje roli při kompetici limitujících zdrojů.

Chemotaxe hraje roli u adherovaných buněk

Caulobacter – volné plovoucí buňky – není syntéza DNA, ani dělení, ale exprese MCP – podobných receptorů – silná chemotaxe. Pohyb za signály, dokud nenarazí na povrch bohatý na substrát – osídlení a iniciace buněčného dělení.

Aerotaxe:

Jedna z nejdříve popsaných taxí. (1883, Engelmann).

Fototaxe:

Fotokineze je snížení či zvýšení rychlosti odpovědi na změny intenzity světla.

Pozitivní fototaxe ve směru nižší intenzity světla. Sinice – velikost buňky umožňuje vnímat směr světla. Bakterie – fotofobní. Akumulace ve stinném prostředí.

Náplň cvičení:

- porovnat pohyb buněk *Micrococcus luteus* (pouze Brownův pohyb) s ostatními
- příprava nativního preparátu – Nomarského kontrast
- mikroskopie obarvených preparátů – fázový kontrast

Mikroorganismy:

Bacillus cereus CCM 2010

P. fluorescens CCM 2115T

Proteus vulgaris CCM 1799

E. coli CCM 3954

Sphaerotilus natans CCM 2349

Micrococcus luteus CCM 169 – pro srovnání nativního preparátu

POZOROVÁNÍ BIČÍKŮ

Pozorování pohybu bičíku -

1) nativní preparát

- kapka suspenze buněk v mediu na podložní sklo, nepřekrývat krycí, pozorování objektivem 20, nezanořovat!! Nomarského kontrast. Pro vitalitu buněk je důležitý dostatek kyslíku (citlivější buňky se hýbou jen nahoře). Je nutno opatrně proostřovat na horní část kapky – dostatek O₂.

Barvení bičíků:

Závisí na způsobu kultivace. Kultivace buněk vhodná v tekutém mediu. Staré buňky odhazují bičíky.

Fixace, speciální barvicí metody pro světelný mikroskop. Barvička obsahuje mořidlo tanin, které se obalí kolem bičíku, jeho průměr se znásobí a zviditelní.

Postup:

- opatrně připravíme nativní preparát na odmaštěné podložní sklíčko
- opatrně překryjeme krycím sklem
- vedle krycího sklíčka kapka barvičky
- prosajeme filtračním papírem
- pozorování pod imerzí

Barvička na barvení bičíků: roztok I (10 dílů) a II (1 díl), zamražený

Roztok I: 10ml 5% vod.roztoku fenolu, 2g taninu, 10ml Kal (SO₄)₂ · 12 H₂O

Roztok II: nasycený roztok krystalové violeti (12g) v ethanolu (10ml, 96%)

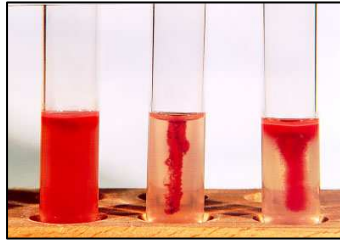
(Pozn: Elektronová mikroskopie - negativní barvení, otiskové preparáty po rychlém zmražení na -150 °C)

Agar na testování pohybu:

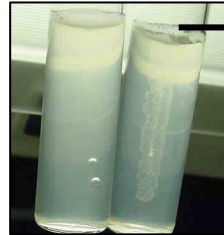
Obsahuje nízké množství agaru – je to polotekuté medium (nižší viskozita prostředí). Na polotekutý agar se očkuje vždy jen do středu misky, aby se rozrůstala 1 kolonie. Nejlépe kličkou, trošku zanořit do agaru. Pohyblivé kultury udělají rozrůstající se kruh, někdy vlnící se. Nepohyblivé rostou jen v místě vpichu do určité velikosti. Výsledky za 3-5 dní.

Složení do 100ml demineralizované vody: yeast extract (0,1g), K₂HPO₃ (0,01g), agar (0,2g).

S miskou se nesmí hýbat.



motility test medium, polotekuté
Pohyblivý kmen roste i mimo inokulaci – v celém mediu



Nonmotile *Bacillus anthracis* is on the right. Growth is a single line of growth that does not deviate from the original inoculum stab. Note the diffuse cloud of motility in the positive control on the left. Motile *Bacillus* species with diffuse growth throughout the tube is on left.

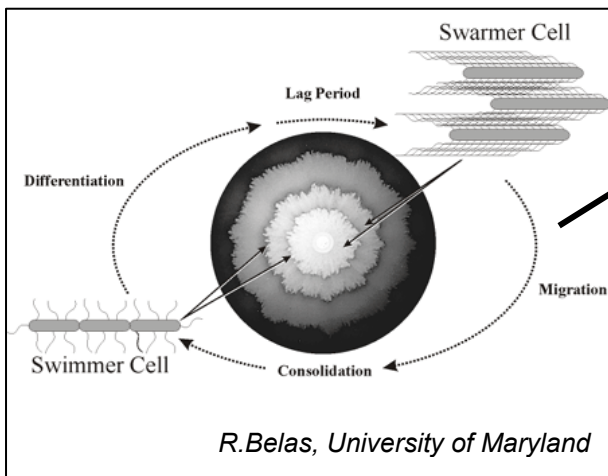
Proteus mirabilis
•Solidní střed
•Povlak
•Konsolidovaná zóna
•Terasv



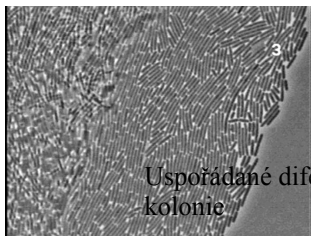
Dynamika růstu kolonie:
Periodicita migrace
•Diferenciace plazivých buněk
•Lag perioda předcházející migraci
•Migrace plazivých buněk
Dediferenciace
•Konsolidace

Regulace diferenciace
Impuls
pevná půda, viskozita prostředí
mechanická zábrana rotace bičků
chemotaxe – glutamin
Následek předání signálu
inhibice dělení
vlákna až 80 μm
hyperprodukce flagelinu: 5000 až 10000 bičků

Způsob šíření
1. Posuvem
z konsolidovaného okraje kolonie, kde jsou buňky již diferencovány a lem je organizován
2. Volným putováním
z populace vegetativních buněk, kde začíná diferenciace



Cyklus diferenciace



Uspořádané diferencované buňky na okraji kolonie

	Plovoucí b.	Plazivé b.
Počet bičků	1 - 10	500 - 5000
Délka bičku	0.75 μm	5.25 μm
Pohyb	víření	plynulý
Buňka	0,7 x 2 μm	0.7 x 10 (>80) μm
Počet chromosomů	1-2	mnoho

Swimmers;
plovoucí (vegetativní) buňky

Swarmers;
plazivé buňky

Bacterial swarming and cell differentiation

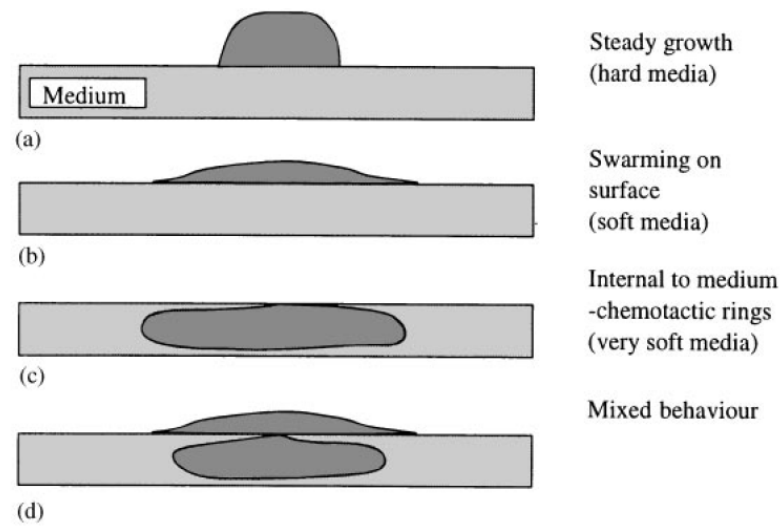


Fig. 1. Cross-sections illustrating different methods of colony expansion for *S. liquefaciens*: (a) displays steady growth on hard media in which fluid is unavailable to the bacteria. (b) occurs when the bacteria are able to extract fluid from the media in order to swarm, and (c) is observed with very soft media for which the bacteria can swim in fluid channels within the media itself. (d) can occur for media of intermediate hardness between (b) and (c)

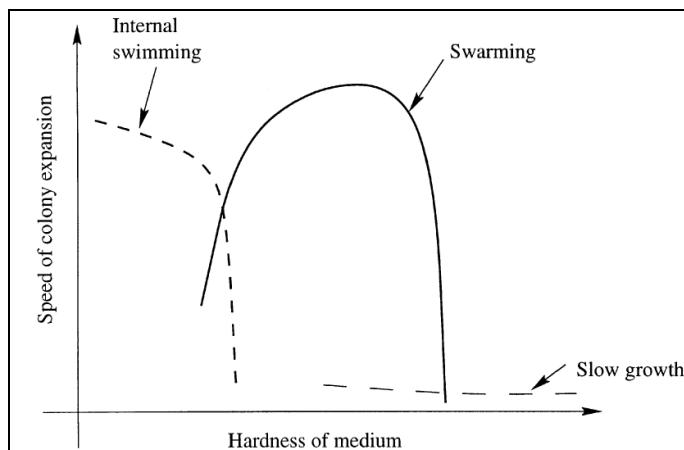


Fig. 2. A bifurcation diagram depicting the varying strategies for bacterial colony expansion from experimental observations. Here, we show the effect of varying the hardness of the medium (achieved by varying the agar concentration) and keeping the available nutrients fixed. Note that the curves overlap, and the bacterial colony can “select” either mechanism, or sometimes both

Bees a kol. (2000): The interaction of thin-film, bacterial swarming and cell differentiation in colonies of *Serratia liquefaciens*. *J. Math. Biol.*, 40: 27-63

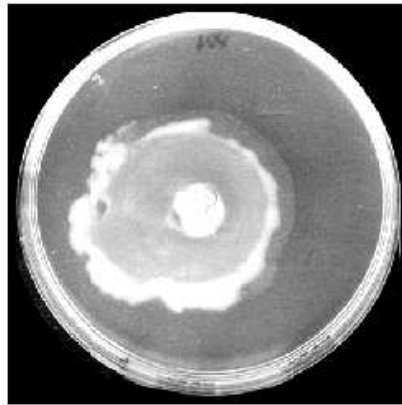


Figure 1. A swarming colony of *S. liquefaciens* approx. 600 min after inoculation. The agar concentration is 0.6% (w/v) and the casamino acid concentration is 0.2% (v/v). The shading is due to the light source reflecting off of the surface of the mostly transparent culture.

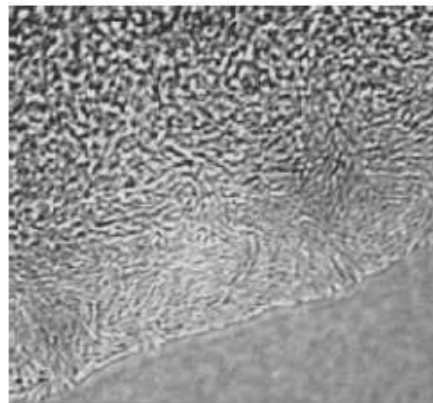


Figure 2. Close-up of the edge of a swarming colony. A monolayer of long, fast moving swarmer cells is visible at the edge of the colony.

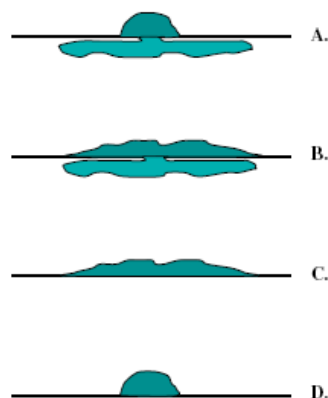
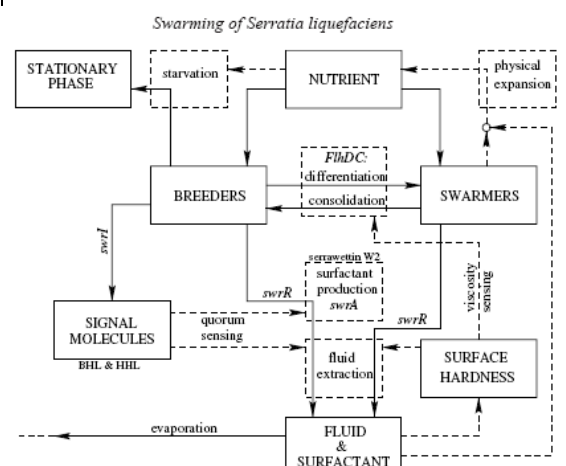
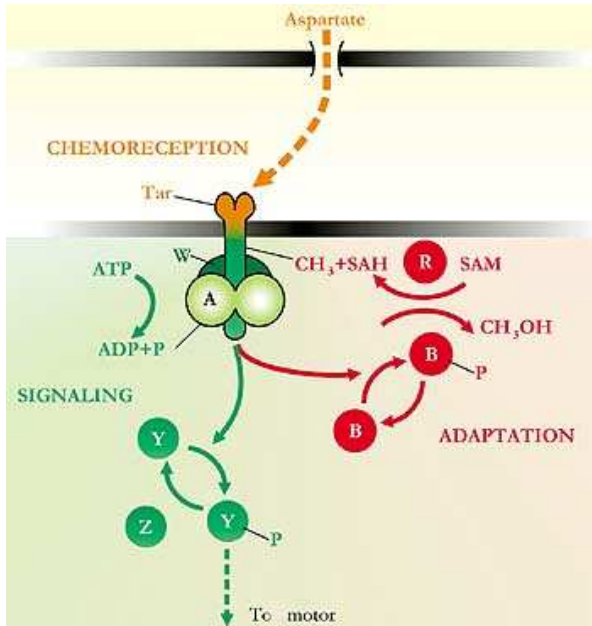


Figure 5. Different morphologies of the colony under different growth conditions quantified by the agar concentration (ac). (a) Diffuse submerging with well-packed non-swarming colony on surface; very soft surface, $ac < 0.4\%$. (b) Diffuse submerging with swarming colony on surface; soft surface, $0.4\% < ac < 0.6\%$. (c) Swarming colony on surface only; intermediate surface hardness, $0.6\% < ac < 1.2\%$. (d) Well-packed non-swarming colony on surface; hard surface, $1.2\% < ac$.



Bees a kol. (2002): Quantitative effects of medium Hardness and Nutrient Availability on the swarming motility of *Serratia liquefaciens*. Bulletin of mathematical Biology. 64: 565-587



Chemotaxis

This diagram shows some of the components required for chemotaxis toward the **amino acid aspartate**. Information flows from the outside of the cell (shown at the top) by way of **porins**, the periplasmic space, and the cytoplasmic membrane, to the inside of the cell (shown at the bottom), and then to the **flagellar motors** (not shown). Dashed arrows indicate **physical displacement of chemicals by diffusion**. Solid arrows indicate **chemical modifications of proteins**—phosphorylation or methylation. The cytoplasmic components, all Che proteins (**CheW**, **CheA**, **CheR**, **CheB**, **CheY**, **CheZ**), are identified by their fourth letter only. The receptor complex consists of two molecules of **Tar**, two of **W**, and two of **A**, with Tar spanning the cytoplasmic membrane. **Chemoreception** is depicted in orange, **signaling** in green (for “go”), **adaptation** in red (for “stop”). Tar is a protein required for taxis toward aspartate and away from certain repellents. **ATP** is adenosine triphosphate, the phosphate donor. **SAM** is S-adenosylmethionine, the **methyl donor**. The other chemicals shown are ADP, adenosine diphosphate; SAH, S-adenosylhomocysteine; CH₃, the methyl group; CH₃OH, methanol; and P, inorganic phosphate.

www.maths.gla.ac.uk/~mab/papersub.html

www.nysaes.cornell.edu/pp/faculty/hoch/movies/

www.rowland.harvard.edu/labs/bacteria/index.html

http://www.rowland.harvard.edu/labs/bacteria/projects_filament.html

<http://www.aip.org/pt/jan00/berg.htm>

www.medmicro.wisc.edu/.../research/index.html

www.buddycom.com/bacteria/gnr/gnrgluox.html