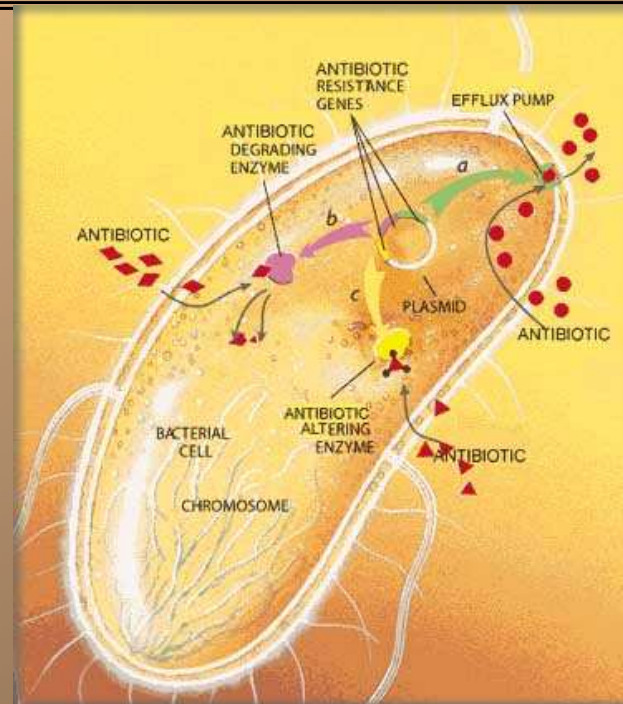
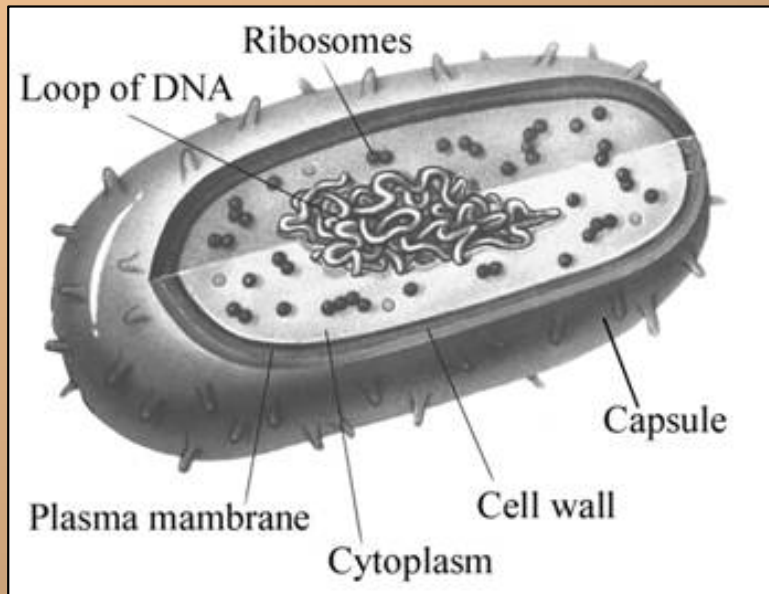
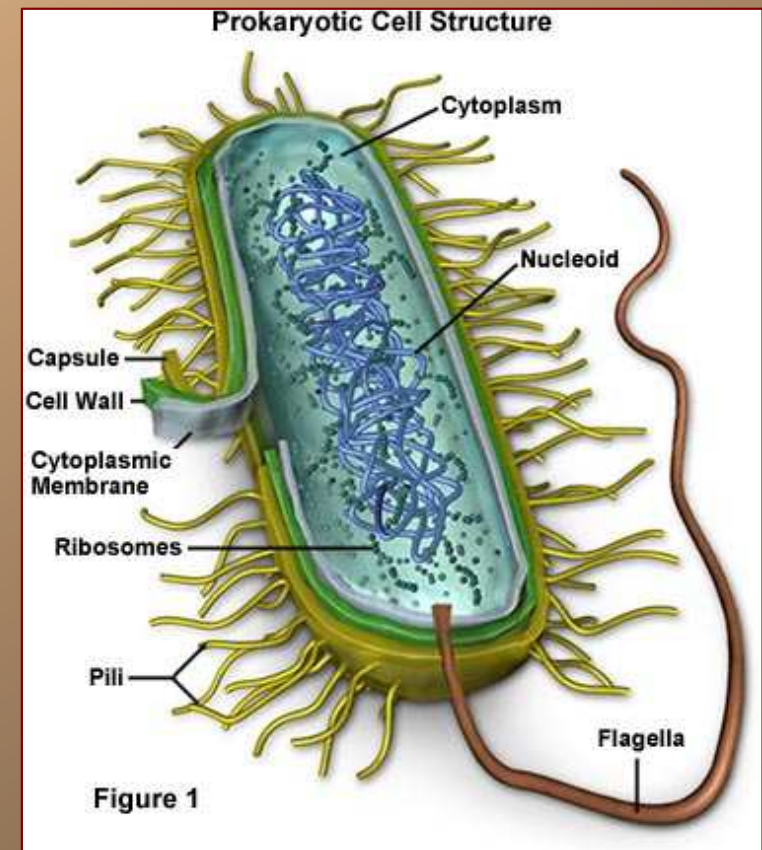
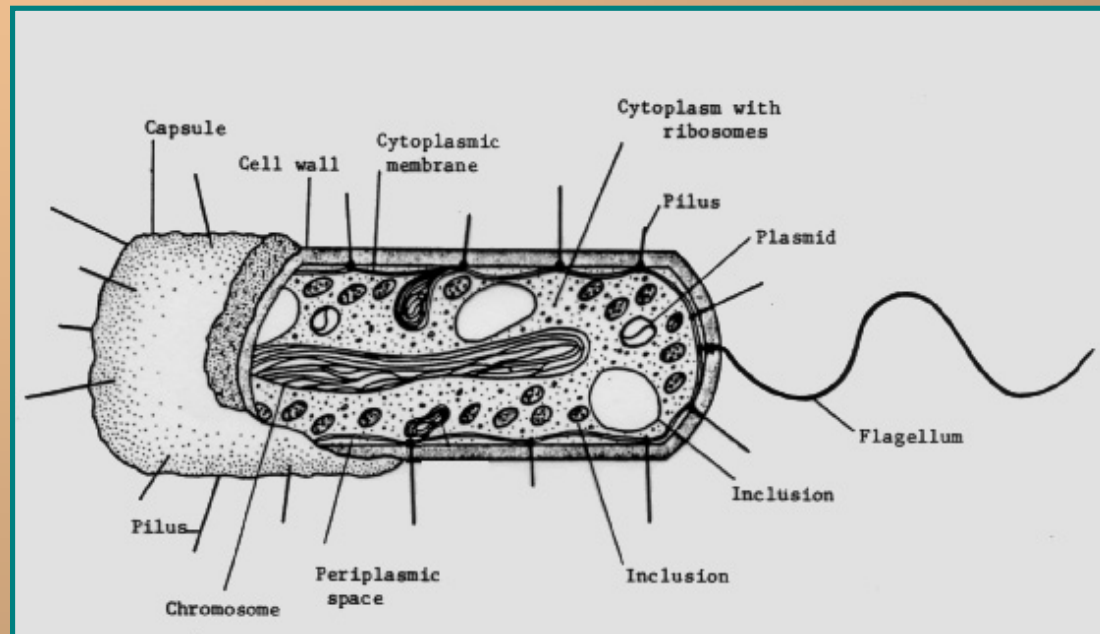


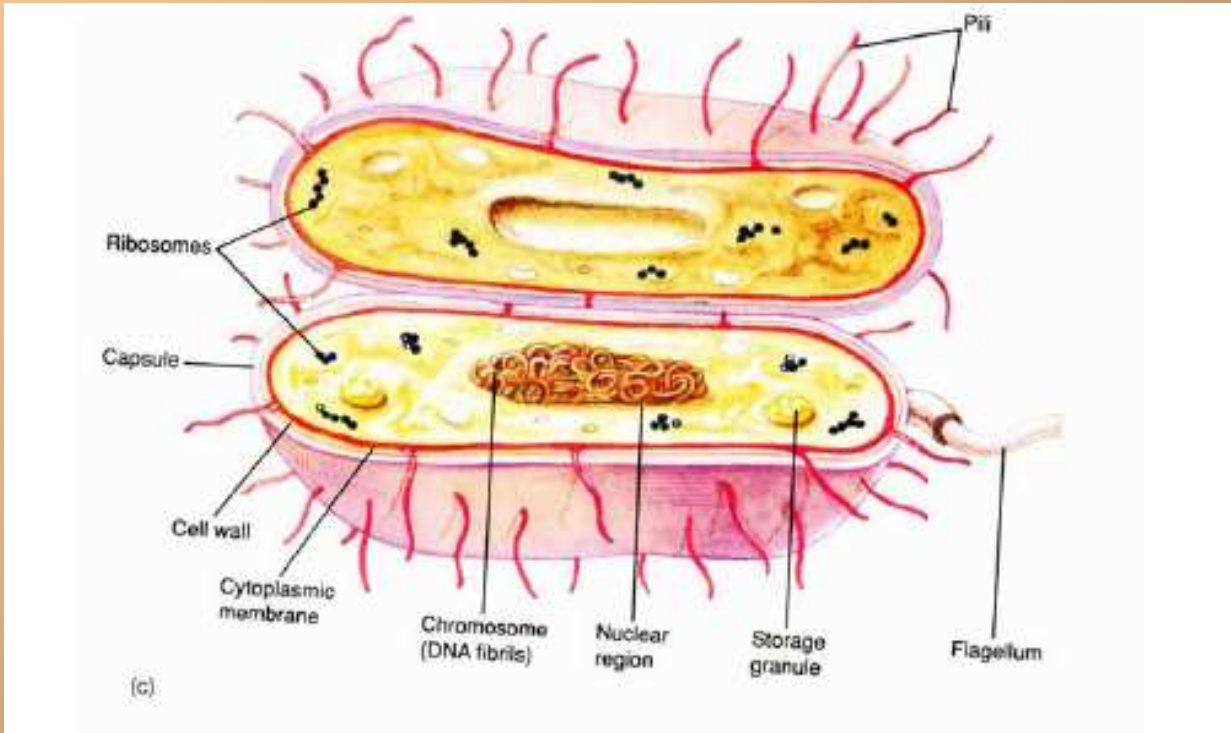
Struktura prokaryotické buňky



Základní struktury

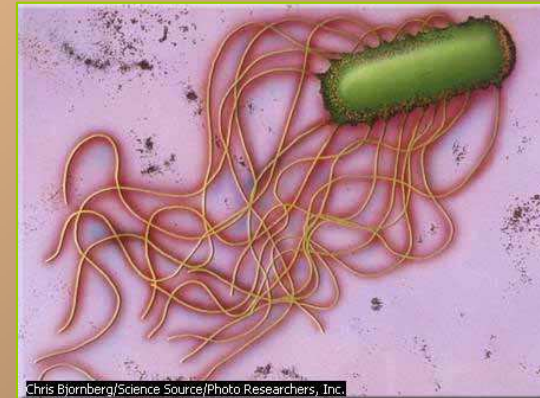
- Cytoplazmatická membrána
- Bakteriální chromozom
- Ribozómy
- Buněčná stěna





Další struktury

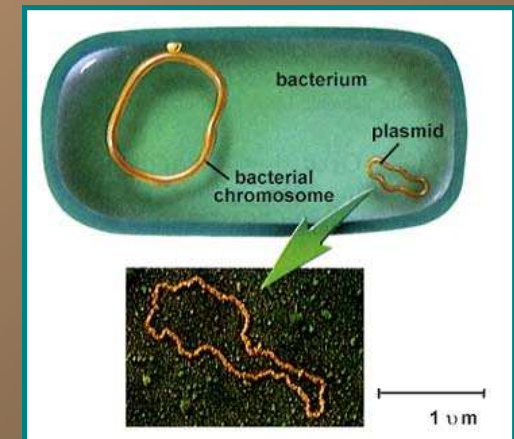
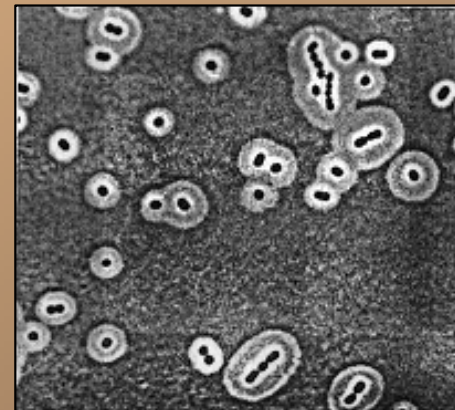
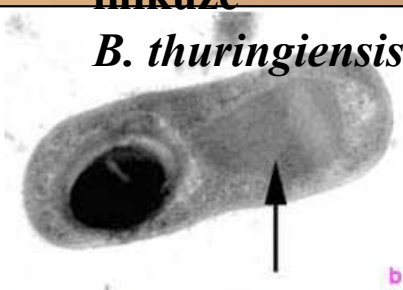
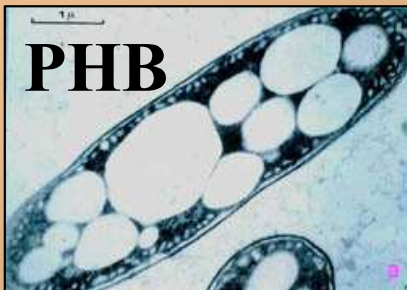
- Organely pohybu
- Plazmidy
- Kapsuly, slizy
- Inkluze



Chris Bjornberg/Science Source/Photo Researchers, Inc.

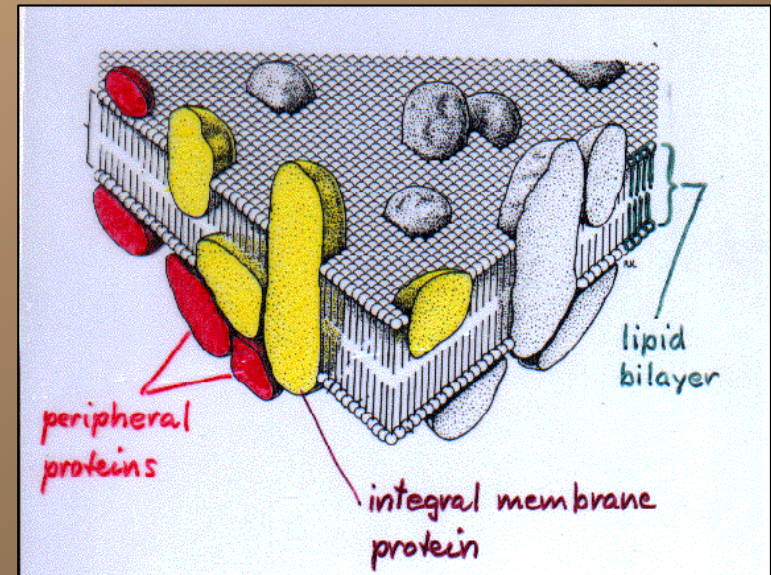
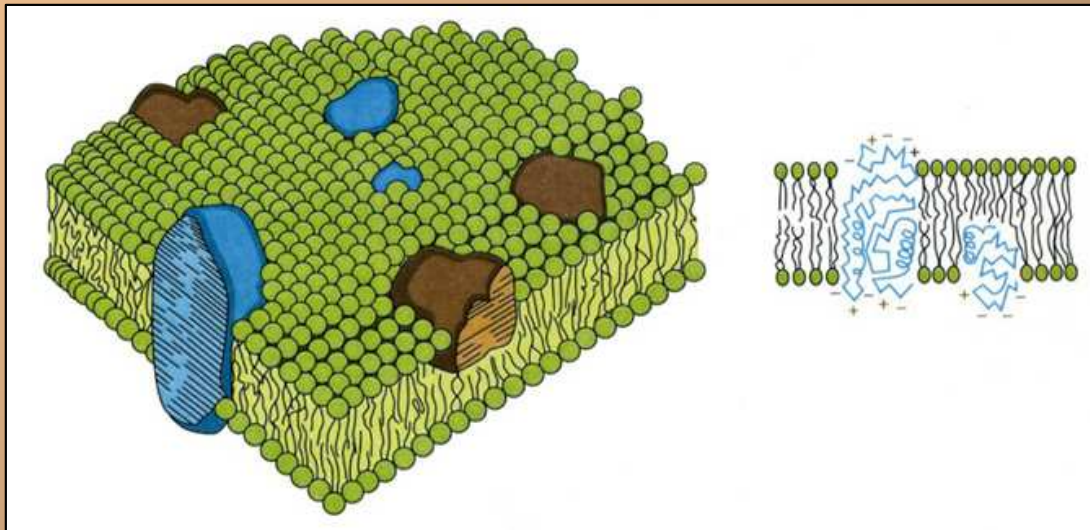
Parasporální
inkluzie

B. thuringiensis

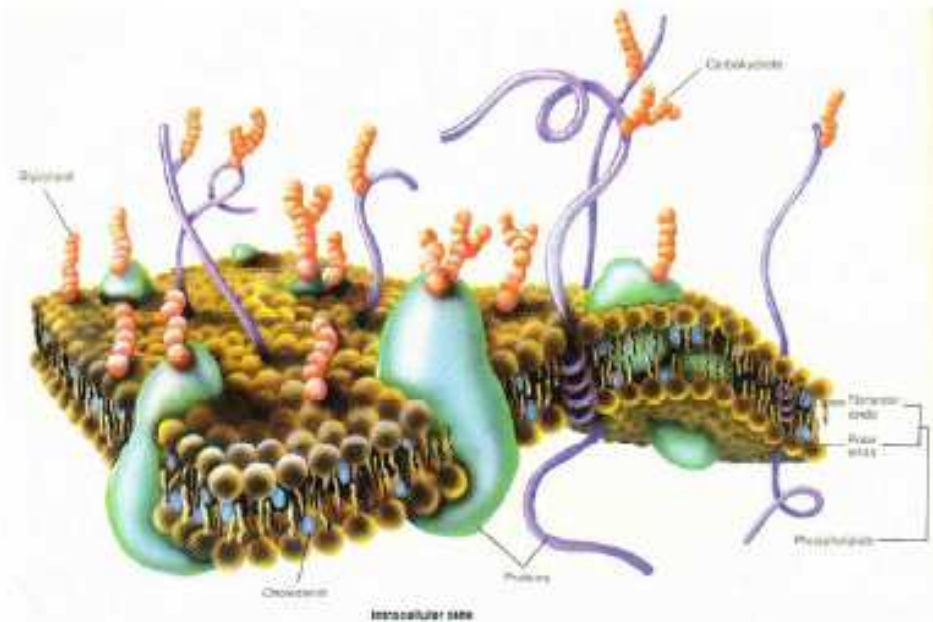


Cytoplazmatická membrána

- Fluidní vrstva fosfolipidů (jednoduchý řetězec, esterová vazba, glyceroldiester)
- (Archea – etherová v.)
- Vnořené bílkoviny – mnoho proti Eucarya
- Semipermeabilní – transport



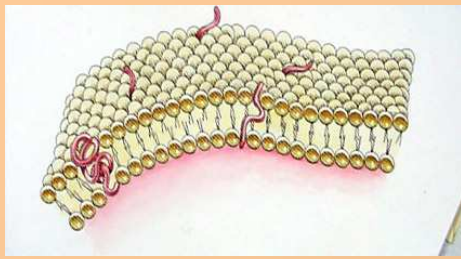
Lipidová dvojvrstva se začleněnými proteiny. Lipidová frakce je složitou směsí, složení se různí podle zdroje membrány a do určité míry i podle výživy a prostředí organismu, který biomembránu vytvořil. Zpravidla je ve vnější monomolekulární vrstvě jiný poměr fosfolipidů než ve vrstvě vnitřní. Asymetrické je i uložení a orientace membránových proteinů. Obecně platí, že glykoproteiny a glykolipidy jsou orientovány sacharidovými řetězci na vnější povrch membrány. Asymetrické je i uložení periferních proteinů.
Obsažené lipidy: fosfatidylethanolamin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, kardiolipin, sfingomyelin....



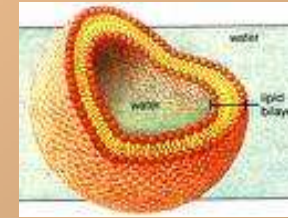
Membránové proteiny: integrální - těsná vazba k membráně hydrofobními vazbami, od membrány mohou být odděleny pouze činidly, která membrány rozrušují (org. rozpouštědla, tenzidy...), někdy pouze za denaturačních podmínek. Pokud protein membránu překlenuje, jedná se o tzv. transmembránový protein.

periferní - k povrchu membrány se obvykle přidružují vazbou na integrální proteiny elektrostatickými silami a vodíkovými můstky. Od membrány se dají oddělit relativně mírnými postupy, které membránu neporušují.

Poměr proteinů a lipidů v membráně se značně liší podle funkce membrány. Většina membrán je alespoň z jedné poloviny z proteinů. Membránové proteiny uskutečňují velké množství specifických procesů, typických pro membrány, a tak se mnoho procesů vyskytuje pouze v membránách.



Fosfolipid

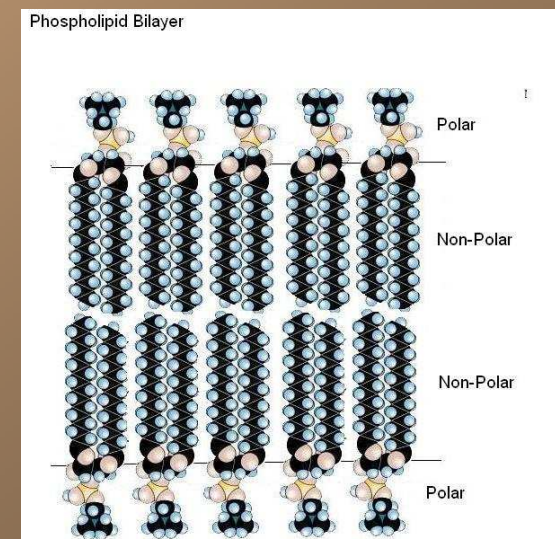
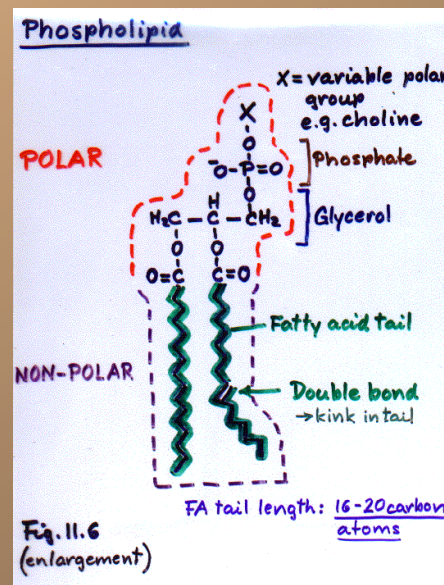


- 1) Fosfátová skupina vázaná na glycerol
- 2) 2 mastné kys. vázané na glycerol – 16-18C
 - nevětvené, nasycené – tekutost membrány

Závislost na teplotě

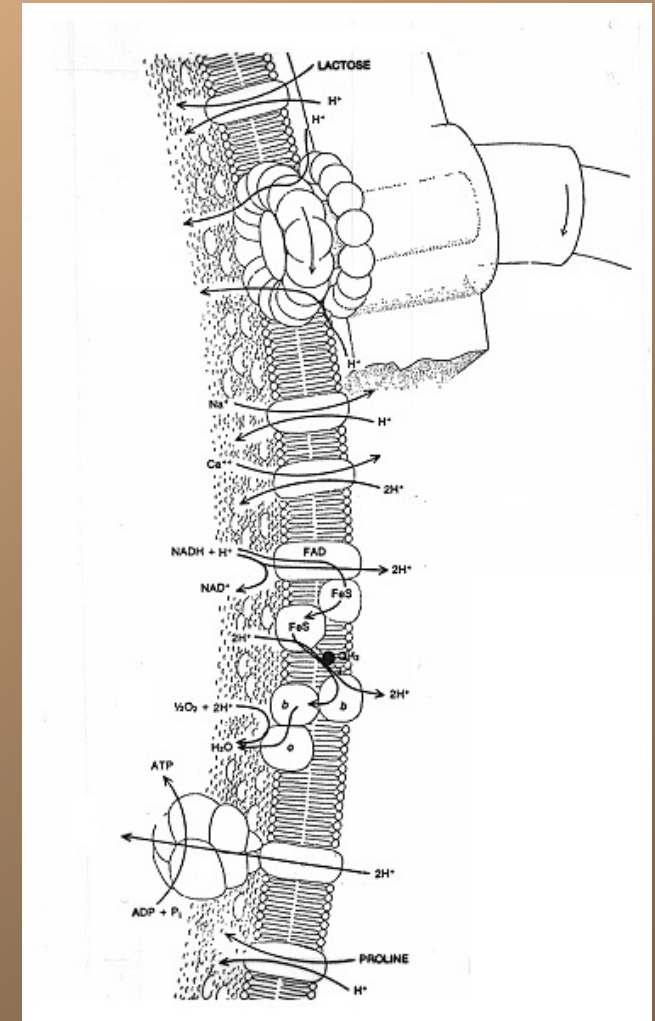
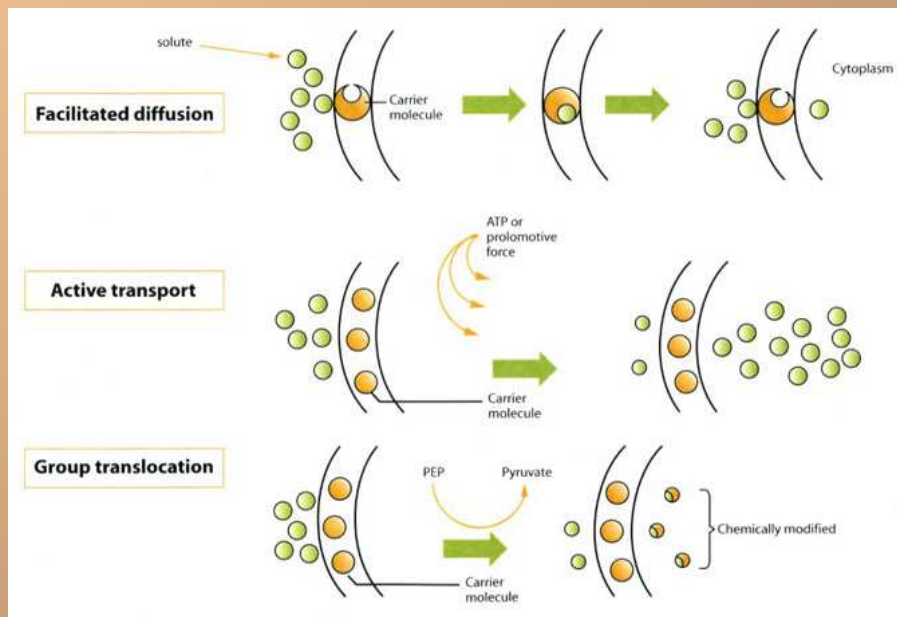
nenasycené – tuhost, méně fluidní

- **Hydrofobní složka - nepolární**
- **Negativní náboj**



Funkce cytoplazmatické membrány

- Bariéra – propustná pro vodu
a malé ionty (do 100 Da)
- Transport – schopnost akumulace
80% mlk - aktivní
- Tvorba energie – elektrontransportní
systém



Mezozomy

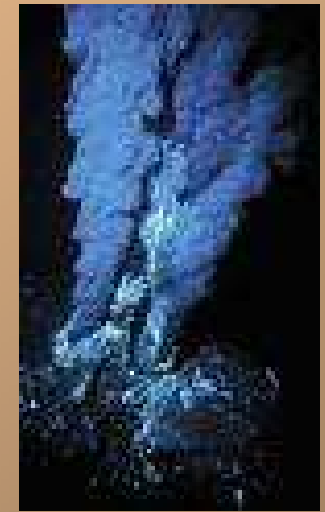
- Vážou chromozomy, duplikují se dělením
- deriváty CM, viditelné po lehkém obarvení CM. Počet závisí na metabolické aktivitě. Sídla enzymů membrány – DNA polymeráza na 1-4 místech VM, lokalizace respiračního řetězce. Sídlo ATPázy, replikátoru. Mohou být vyplněny periplazmatickými bílkovinami. Zodpovědné za architekturu přepážky, ta vzniká mezi mezozomem a místem připojení chromozomu.

Chromatofory

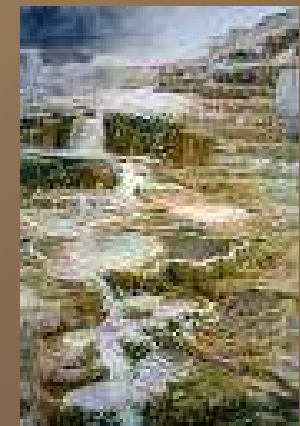
- Chromatofory purpurových siřných bakterií,
- Cylindrické vezikuly zelených bakterií a vícevrstevné tylakoidy *Cyanobacteria* (sinic) – místo fotosyntézy



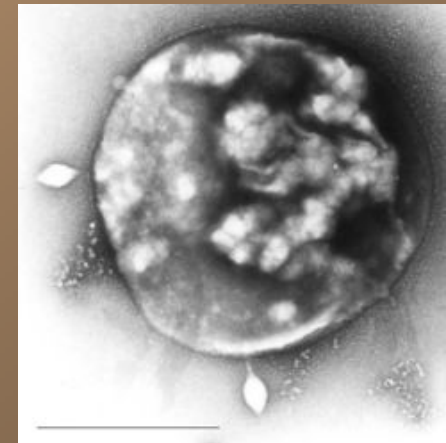
Archea – extrémní podmínky:



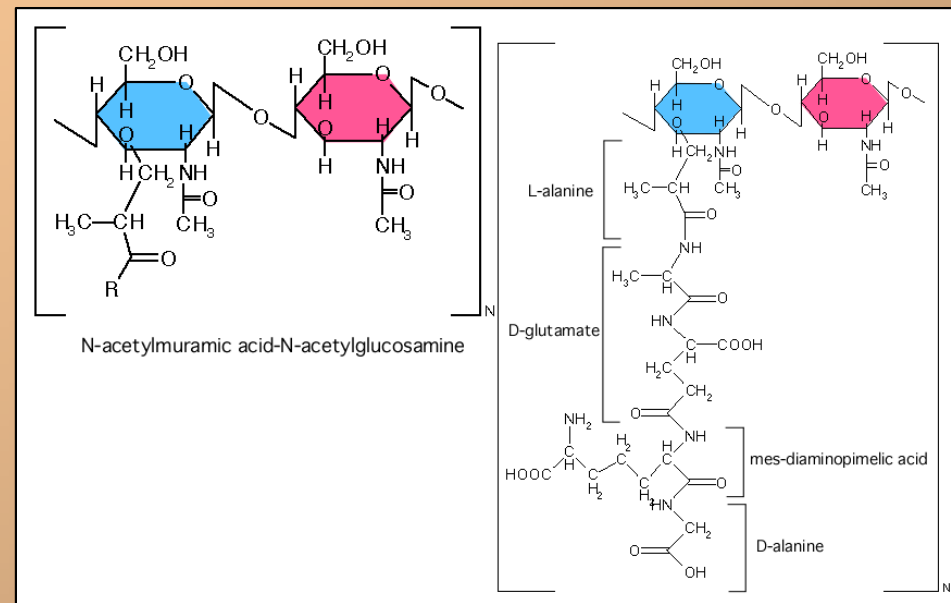
- Nikdy klasický peptidoglykan
- 5 typů buněčné stěny
- Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy
- Větvené lipidy, mnoho proteinů
- Etherická vazba – glyceroldiether, tetraether
- Nepřítomnost sterolů



- Často **monolayer** – diglycerol tetraether
glycerolové jednotky na obou koncích MK = tvoří 1 vrstvu
- **Lepší přizpůsobení extrémům**
 - monolayer rezistentnější k narušení teplem
- Sulfolobus – 90°C a pH 2, větvené uhlovodíky a 2x tak dlouhé než u bakterií



Buněčná stěna



- Peptidoglykan

Glykan – cukerná složka, NAG, NAM

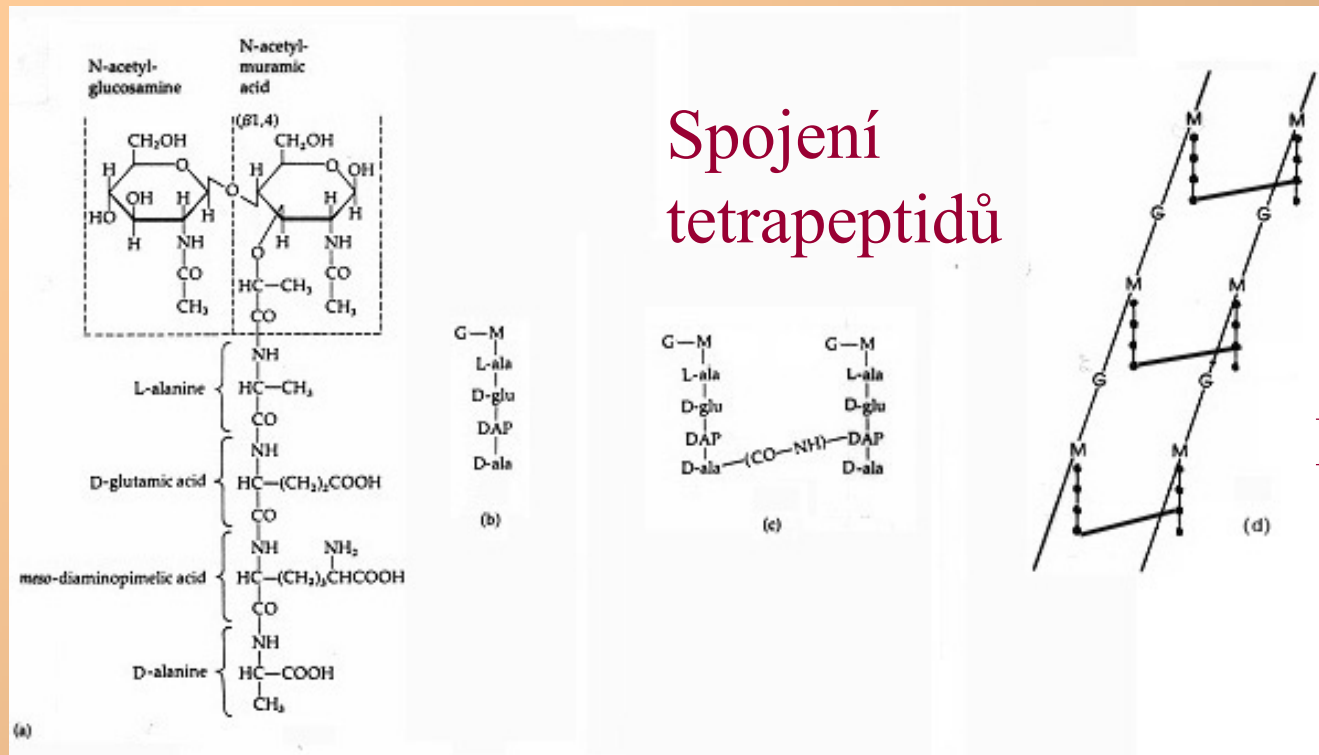
N-acetylglukózámin+N-acetylmuramová k.,
 β -1,4-glykosidická vazba

Peptid – tetrapeptid – L-ala – D-glu – R – D-ala

R = DAP – pouze v b.s., taxonomický znak u aktinobakterií, LL DAP, meso DAP

G+ :R = lysin větš., tetrapeptidy spojeny pentapeptidem

G- :vždy DAP a meso-DAP, tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP



Polymer

• **Kostra – opakování aminocukrů**

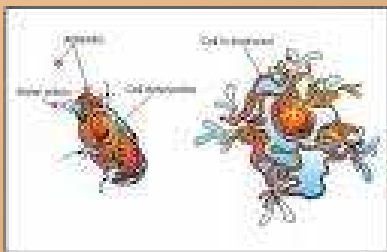
N – acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kys.

• Na N-acetylmuramové kys. – **tetrapeptid**

• Spojení tetrapeptidů, **rozdílná kys.v pozici č.3**

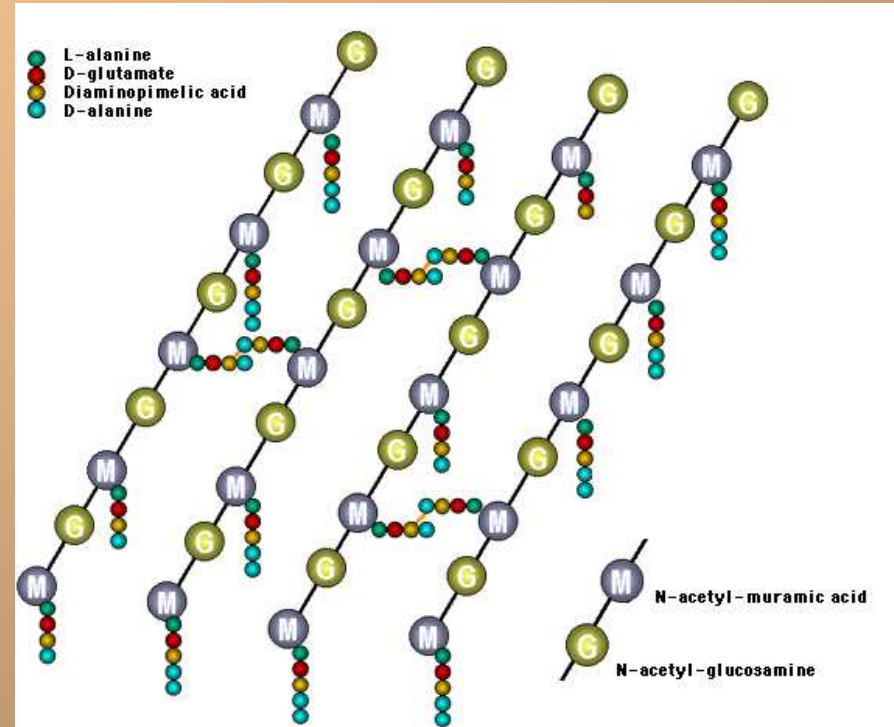
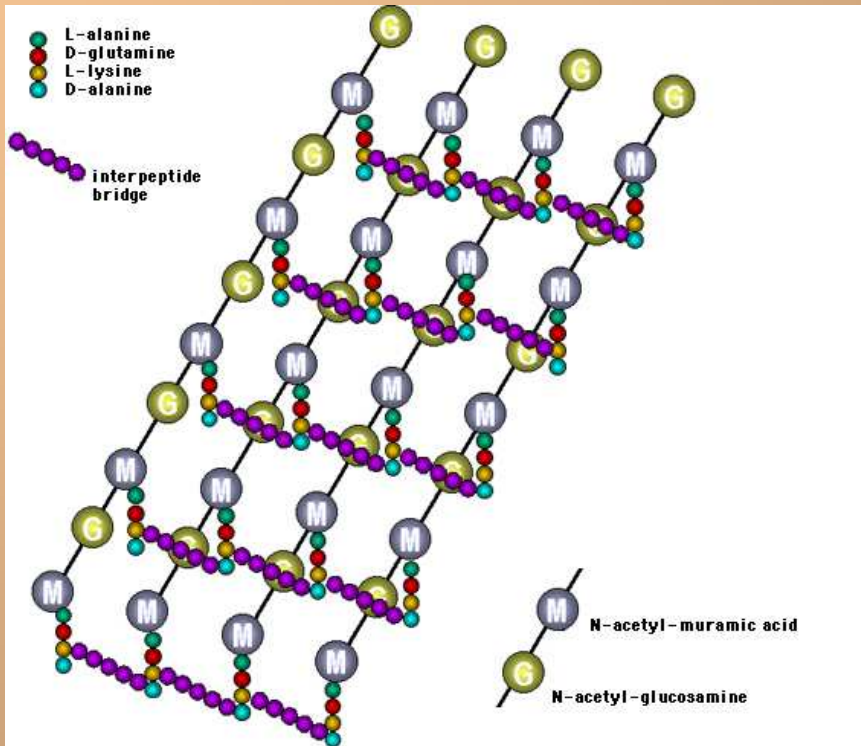
• **Lysozym** – štěpí vazbu mezi aminocukry;

• **Penicilin** – brání spojení tetrapeptidů

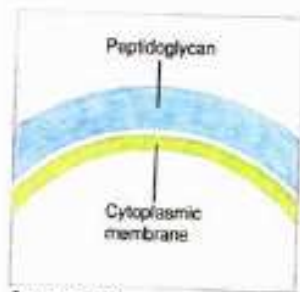


Peptidoglykan

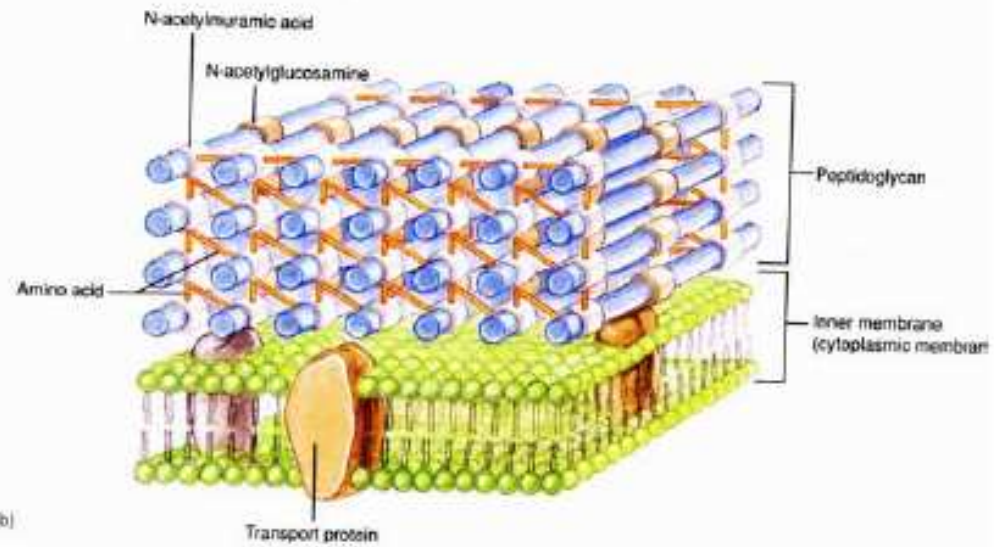
G+



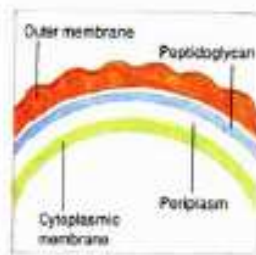
G-



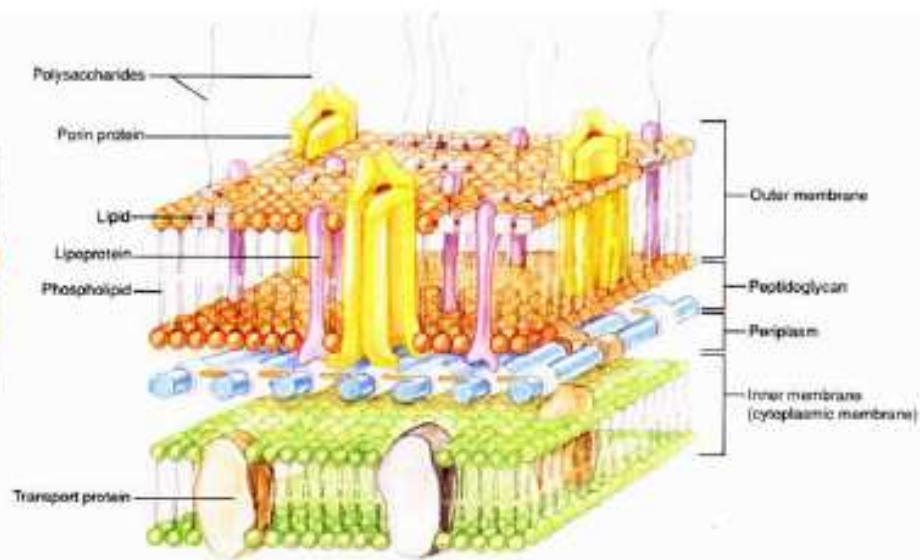
Gram-positive
(a)



(b)



Gram-negative
(a)



(b)

Buněčná stěna G+ X G-

- **40 nm**
- **90%** peptidoglykanu **G+**
- Mezi polymerem je voda
- **Teikoové a teikuronové kyseliny – 10%**
 - schopnost vazby protonů a iontů Ca^{2+} , Mg^{2+}
- Lugolův roztok fixuje barvivo, org.rozpouštědlo dehydratuje a barvivo vázáno, nedobarvují se

- **2 nm**
- **10%** PG
- **2 periplazmatické prostory**

Význam struktury peptidoglykanu v taxonomii bakterií

■ diaminopimelové kyseliny

■ přítomny pouze v buněčné stěně – průkaz z celé buňky

■ G- buněčná stěna jednotného charakteru, bez DAP nebo stopy meso-DAP

G+

■ přítomnost či nepřítomnost DAP charakteristická

■ např. nokardioformní aktinomyceety, mykobakteria – meso-DAP

■ streptomyceety – LL-DAP

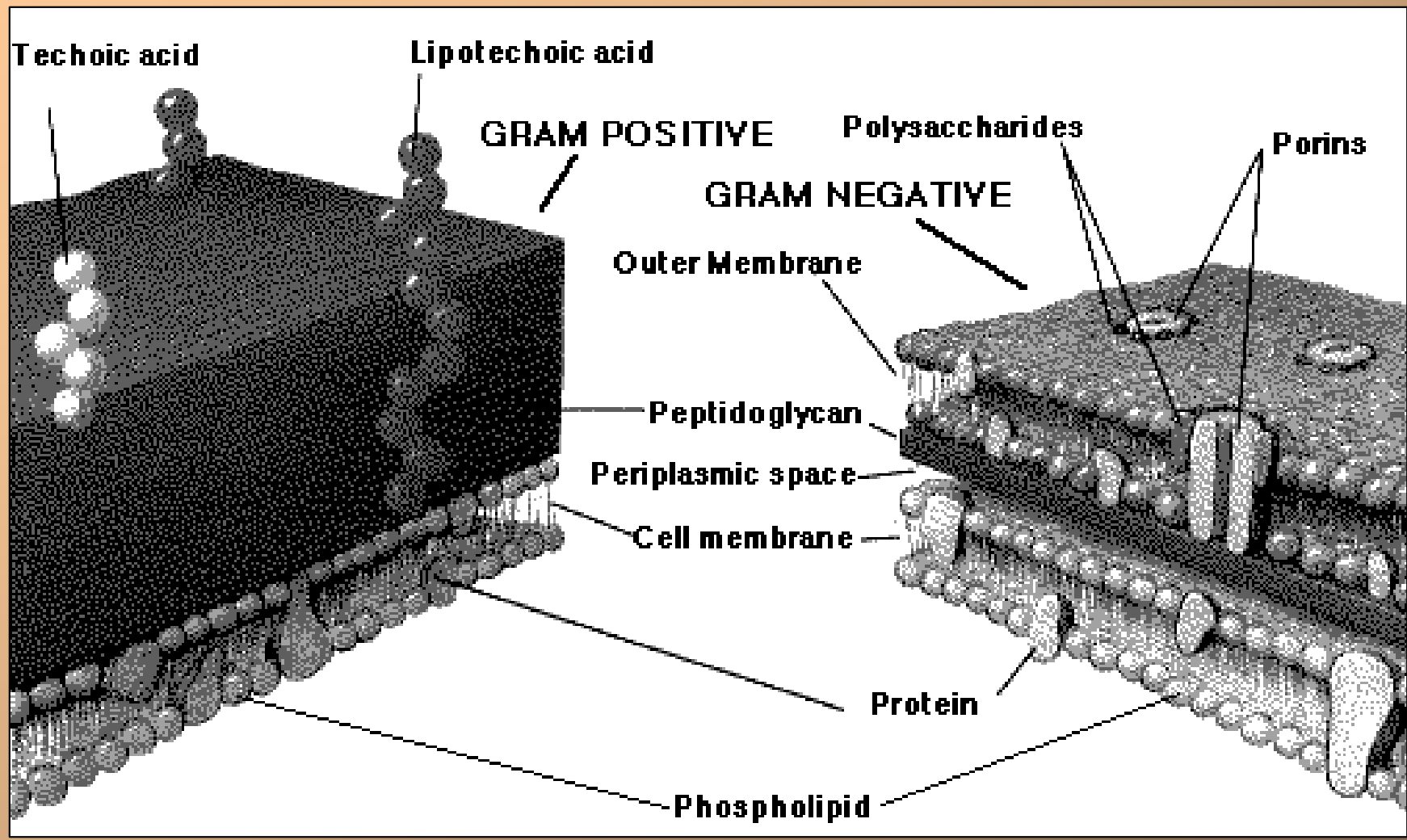
■ *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysin

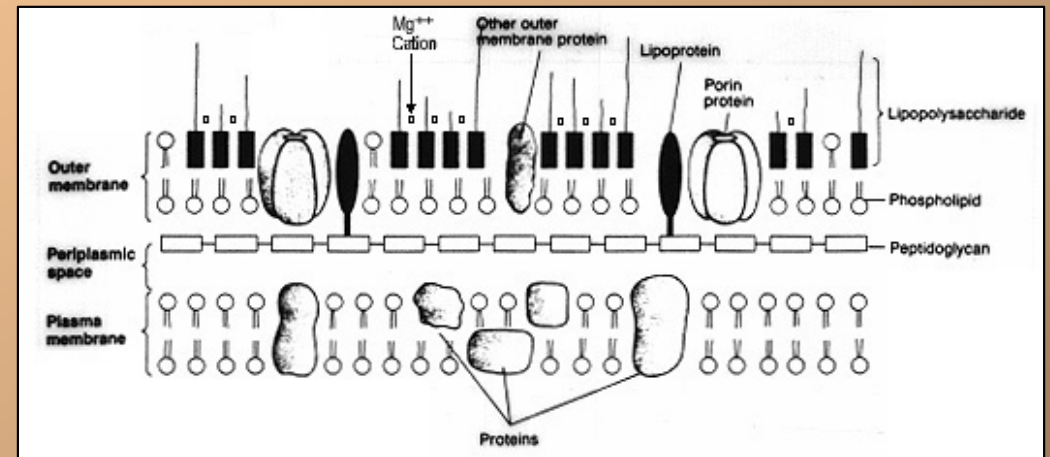
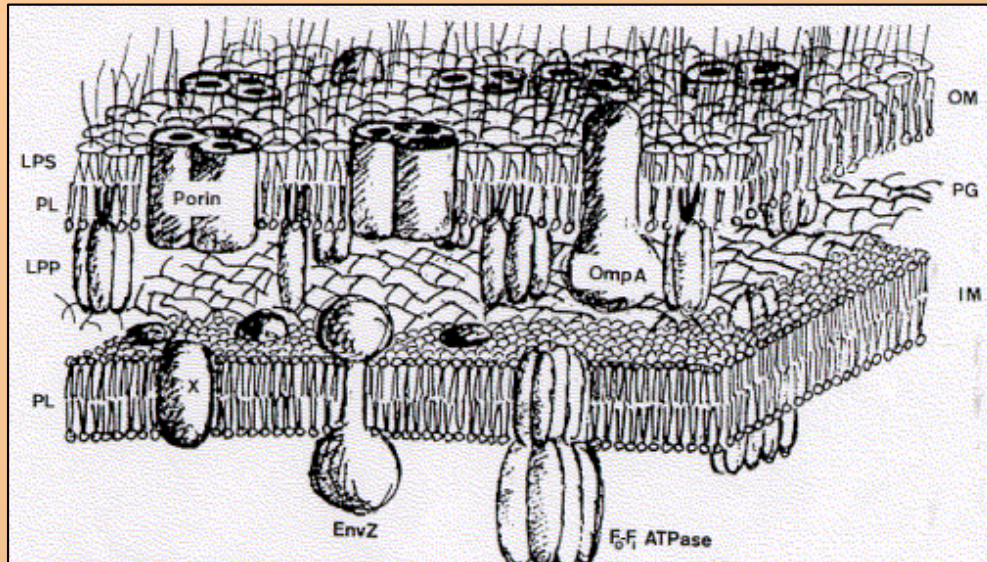
Interpeptidový můstek peptidoglykanu

- *Micrococcaceae* – rodově, skupinově až druhově charakteristická struktura interpeptidového můstku
- *Micrococcus* – D-asparagová kyselina – A4a

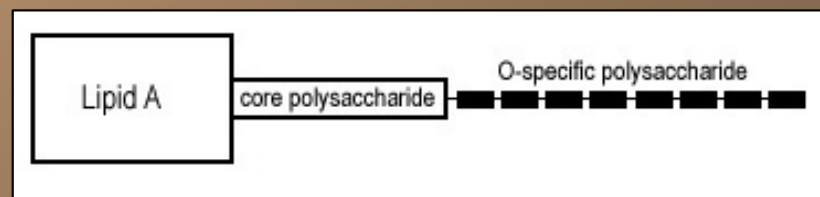
- *Arthrobacter* – „globiformis“ group – A3a - L-amino kyseliny (L-alanin, L-treonin nebo L-serin)
- „nicotianae“ group - dikarboxylové aminokyseliny (glutamová nebo asparagová)

- I. Ser-Thr-Ala, *A. oxydans*, *A. polychromogenes*
- II. Ala-Thr-Ala, *A. aurescens*, *A. ilicis*, *A. ureafaciens*, *A. histidinovorans*, *A. nicotinovorans*
- III. Ala1-4, *A. globiformis*, *A. pascens*, *A. ramosus*, *A. crystallopoietes*
- IV. Ser-Ala2-3, *A. atrocyaneus*
- V. Thr-Ala2, *A. citreus*
- VI. Ala-Glu, *A. nicotianae*, *A. creatinolyticus*, *A. uratoxydans*, *A. protophormiae*
- VII. Glu, *A. sulfureus*

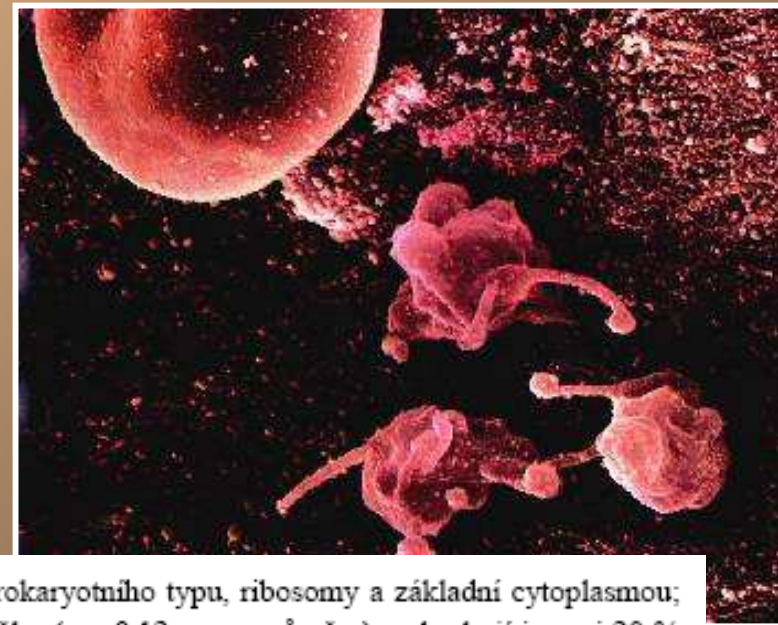
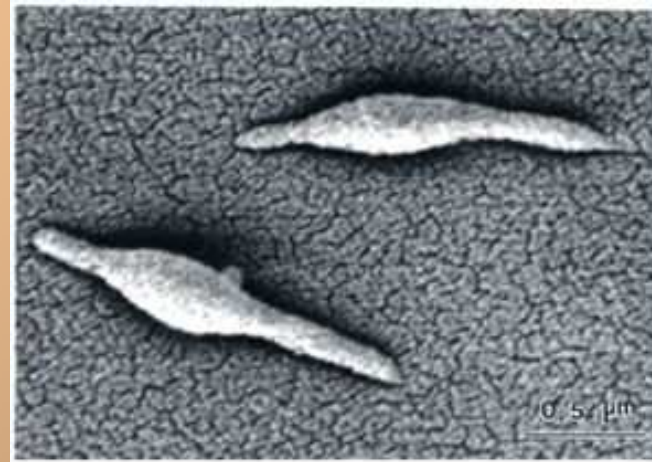




LPS lipopolysaccharide; PL phospholipid; LPP Brown's lipoprotein; X generic integral membrane protein; EnvZ regulatory protein of the ompF - ompC operon; F₀F₁-ATPase ATP synthase of electron transport chain; IM inner membrane; OM outer membrane; PG peptidoglycan; OmpA outer membrane protein A. (by Lukas Buehler, 1989)



- Mykoplazmata
- Protoplasty
- Sféroplasty



Mykoplazmata jsou tvořena pouze plazmatickou membránou, chromozomem prokaryotního typu, ribosomy a základní cytoplasmou; postrádají pevnou buněčnou stěnu ostatních prokaryot. Jsou to nejmenší živé buňky (cca 0,12 μm v průměru) a obsahují jen asi 20 % DNA ve srovnání s *E. c.* Tato genetická informace se blíží minimálnímu množství nezbytnému k zajištění základního metabolického vybavení pro život buňky.

Taxonomický význam

- Barvení buněčné stěny
- FAME profil – char.pro jednotlivé rody, druhy až kmeny, závislý na kultivaci
 - celobuněčný, ale hlavně z CM

Acidoresistentní bakterie

Buněčná stěna:

- Obsah lipidických látek – hl. mykolové kyseliny (3-OH mastné kyseliny s dlouhým C řetězcem na pozici 2). Délka řetězce specifická.
- Př: mykobakterie, nokardioformní aktinomycety, korynebakterie
- Mykolyl-arabinogalaktan tvoří lipidickou bariéru – brání penetraci kyseliny
- Odbarvování 1) kyselým alkoholem (strikní)
2) slabou kyselinou (2. stupeň)

Ziehl – Neelsenovo barvení

- tepelně fixovaný preparát
- převrstvit Ziehl – Neelsenovým karbolfuchsinem (koncentrovaným)
- zahřívat do výstupu par 3-5 min
- oplachovat kyselým alkoholem max. 15 sec
- dobarvit metylenovou modří
- opláchnout vodou

Modifikace acidorezistentního barvení (částečně a slabě acidorezistentní bakterie)

- kyselý alkohol je nahrazen 1% kyselinou chlorovodíkovou

Mycobacterium

acidorezistence 1.stupně – po 1.obarvení bazickým barvivem (fuchsin) se již neodbarví kyselinou ani alkoholem

- Mykolové kyseliny s 60-90C

- rezistence vůči pronikání barviv, ATB, vysychání, fagocytóze

- Barvení za horka – lipidy nepropouští barvivo, a nepravidelně (nerovnoměrně)

- Gramovo barvení – vůbec nebo špatně

- Peptidoglykan:

- amidické skupiny na glutamátu i na meso-DAP, opakování peptidických podjednotek

- přítomnost 2 typů mezopeptidového spojení

- (D-ala + meso-DAP, meso-DAP + DAP – 70%, pouze zde)

- N-glykolylmuramová kyselina místo N-acetylmuramové

Mycobacterium

- Hydrofobní buněčná stěna

- problém s transportem Fe (siderofory – chelatizují Fe)
- exocheliny – extracelulární
- mykobaktiny – uvnitř buňky

- Pomalý růst – 3-9 týdnů

- zpomalení transportu přes hydrofobní povrch
- RNA-pol – nižší reakční rychlost, (pomalejší syntéza RNA)
- nízký poměr RNA/DNA – pomalejší syntéza proteinů

Mycobacterium

- Metabolismus

Využívání různých typů uhlovodíků
(halogenované, degradace polutantů)

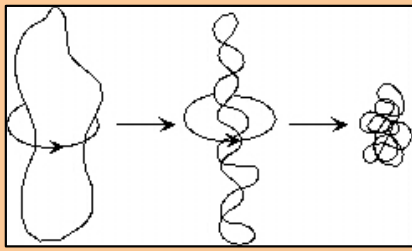
Růst na CO₂ a H₂O

Produkce karotenoidních pigmentů

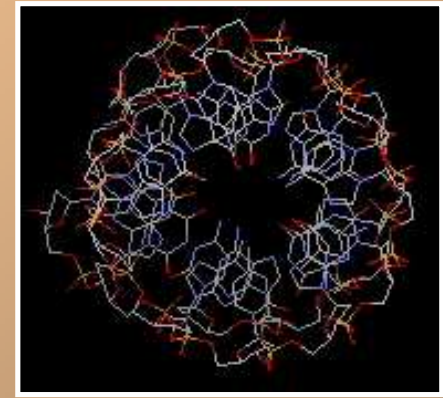
- bez nich – TBC
- fotochromogenní – jen na světle (*M. kansasii*)
- skotochromogenní – *M. gordonae* (pigment i ve tmě)

Genetická informace

- Chromozom
 - Plazmidy – (integrované=epizomy)
 - Transpozony, IS
 - Bakteriofágy
-
- Přenos – transformace, konjugace, transdukce



Bakteriální chromozóm



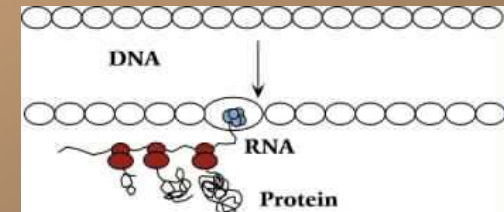
- Zpravidla cirkulární DNA

(lineární – *Borrelia*, *Streptomyces*, *Coxiella*;

2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*

- *E. coli* – $4,7 \cdot 10^6$ nukleotidů

- Průměr: $5 \cdot 10^{-15}$ g DNA



- **0.58 Mbp** *Mycoplasma genitalium*

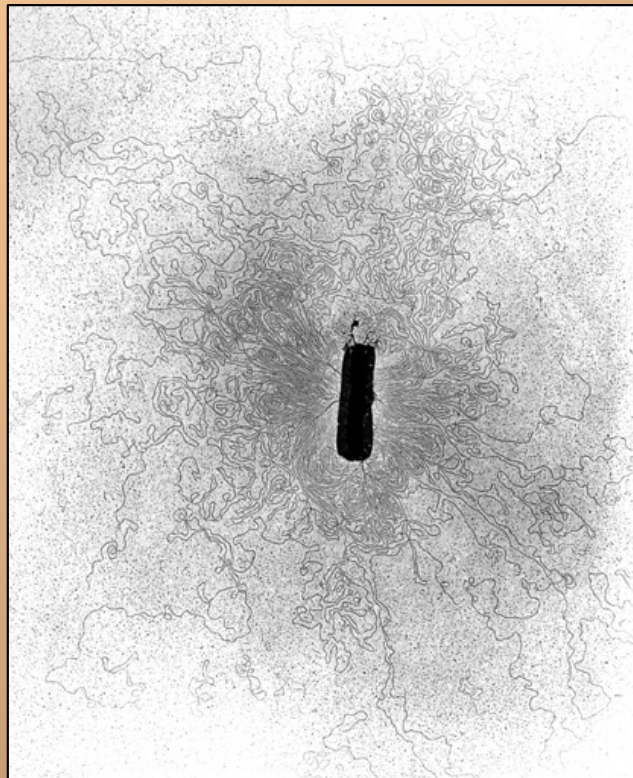
- **4.4 Mbp** *Mycobacterium tuberculosis* *E. coli*

- Vazba na **CM** – **mezosomy**, dělení

- Replikace předchází dělení buňky

- Histon-like proteins

- G+C obsah (melting point):
28% (*Clostridium*) - 72% (*Sarcina*).
- Frekvence mutace
- NCBI – databáze sekvenovaných genomů



E. coli is "gently lysed"
the chromosomal DNA leaks....

Plazmidy

- Doplňková genet. informace:

F-plazmidy (fertilní)

Rezistence, - ATB, těžké kovy, UV

Metabolické dráhy (bioremediace)

Přenos konjugací, transformací

Bakteriociny (ne- i konjugativní)

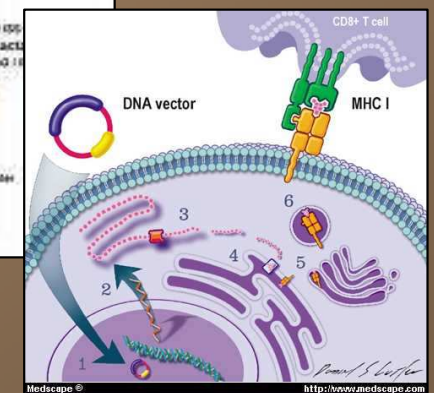
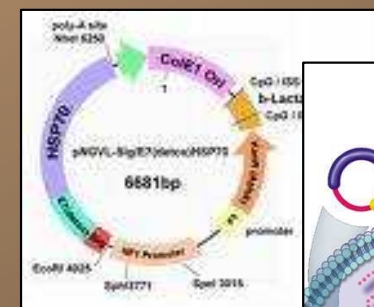
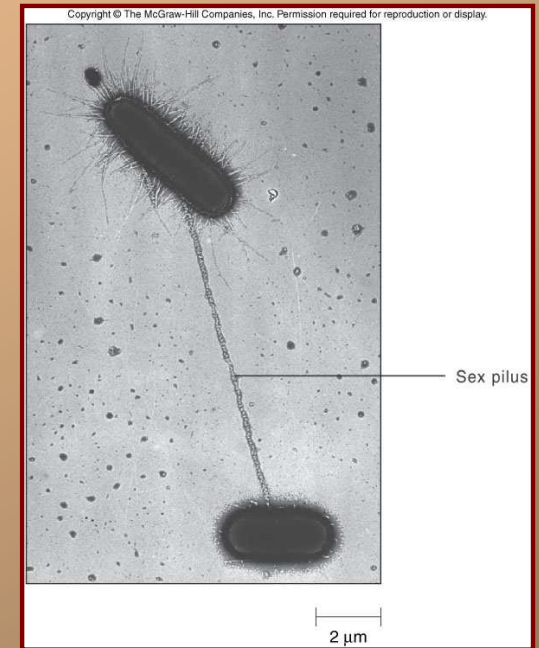
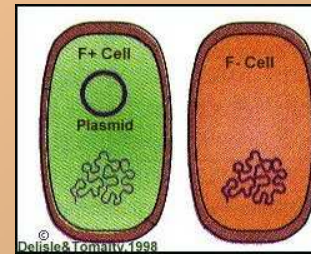
Kódování faktorů virulence: adheziny, toxiny
hemolyziny, enterotoxiny

Ti –tumorindukující plazmidy

Kryptické, fazmidy, kosmidy

- 5-10% informace genomu

- Genetické inženýrství - vektory



Ribozómy

- Proteosyntéza
- 2 podjednotky –
Mg + energie – podmínka funkce
- rRNA + proteiny
- 70S = 30S + 50S (Svedbergovy jednotky)
(sedimentaci vedle hmotnosti ovlivňuje i konformace)
 - 30S.....1540 nukleotidů, 21 proteinů
 - 50S.....2900 nukleotidů, 34 proteinů
- Selektivní působení ATB pouze na bakteriální ribozomy – jiné cílové místo
- Archea – odlišnosti, větší resistance (Kan, Ery)
(Proteosyntéza je inhibována anisomycinem)

Struktury vně buňky

- **Kapsuly – mikro a makro**
 - dobře organizované, rigidní
- **Slizy** - polysacharidy
 - lépe odstranitelné, difúzní, neorganizované
- **S – vrstvy**
 - pravidelně organizované proteiny a GP

Glykokalyx = kapsuly a slizy

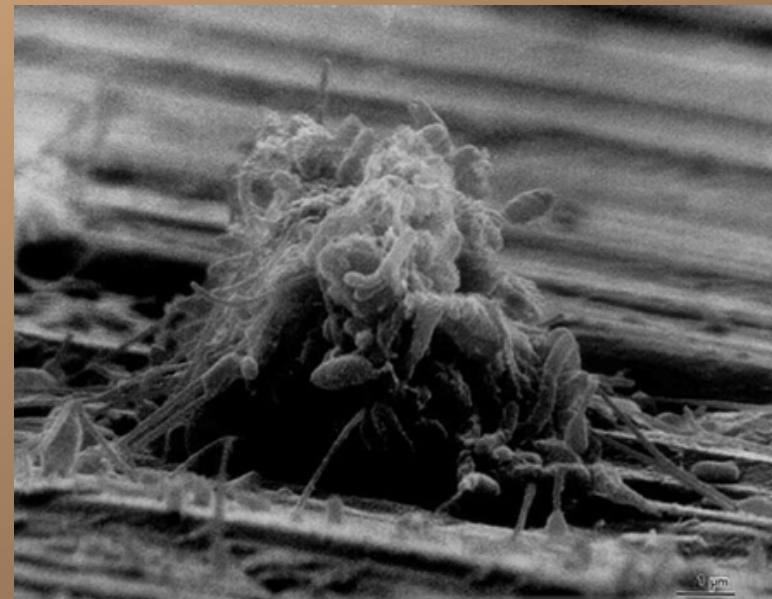
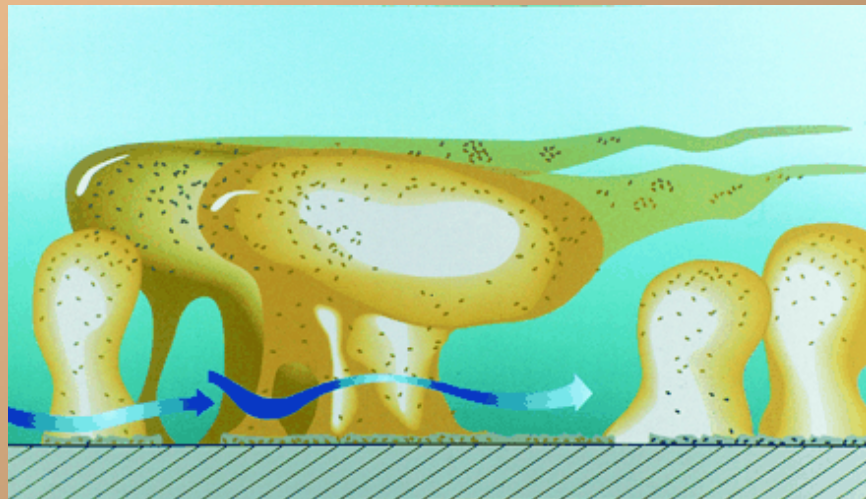
- *Bacillus* – kyselina glutamová
- *Bacillus anthracis* – poly-D-glutamová

- **Fce:**

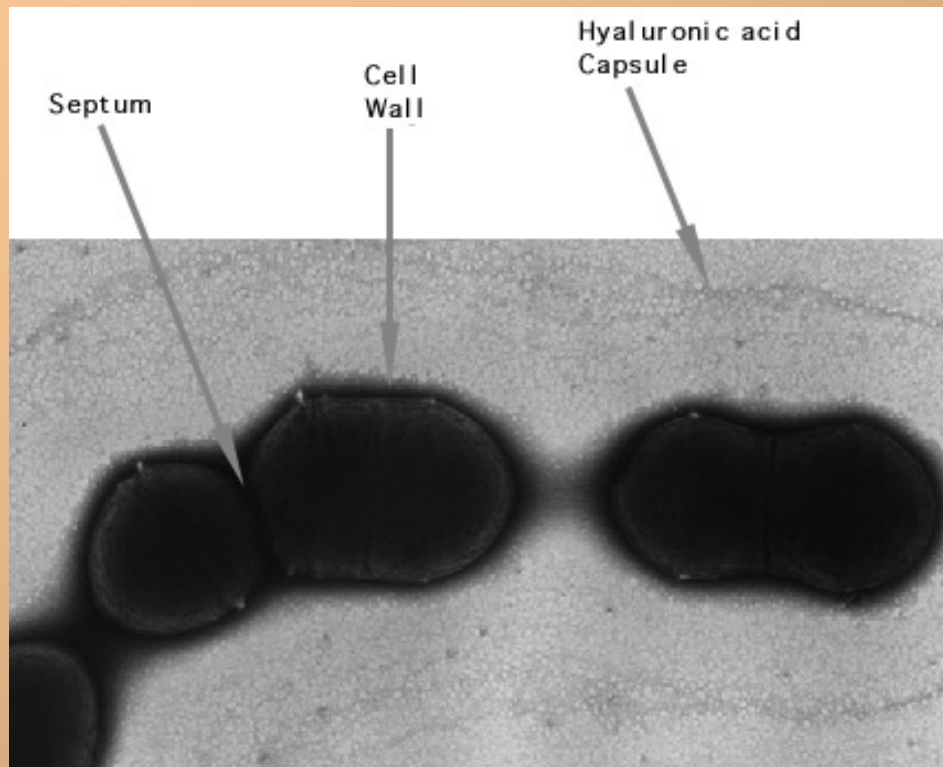
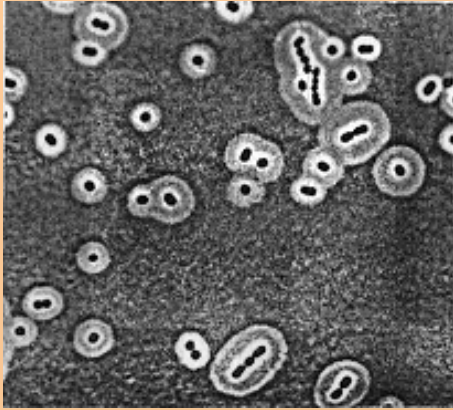
ochrana před vysycháním, fagocytózou, detergenty

vazba na předměty

biofilm



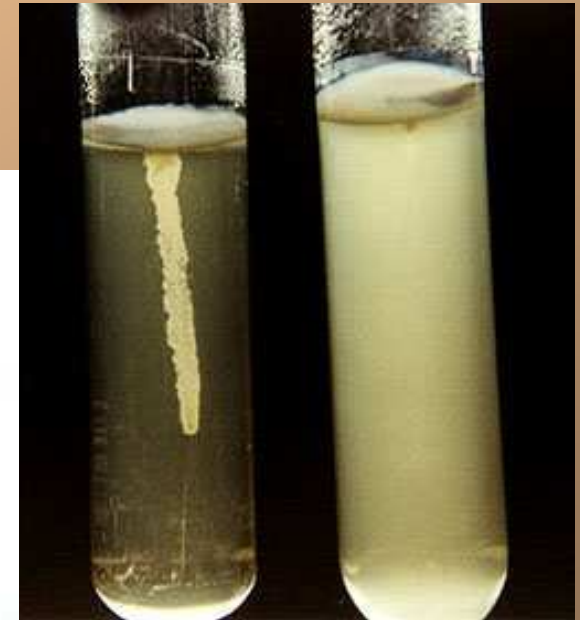
Kapsula - virulence



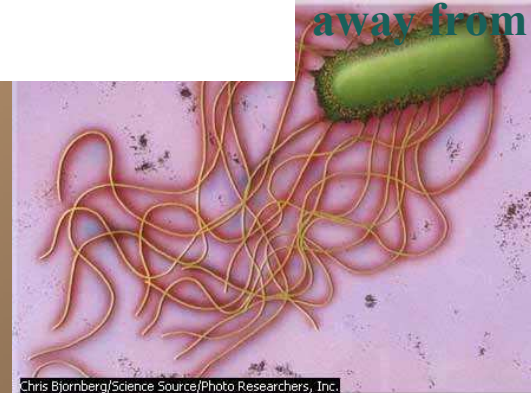
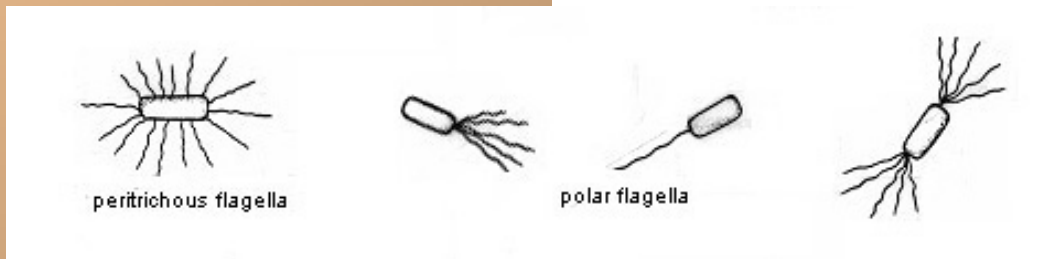
Bacillus anthracis
poly-D-glutamát

Negativní barvení - *Streptococcus pyogenes*
TEM (28,000X).

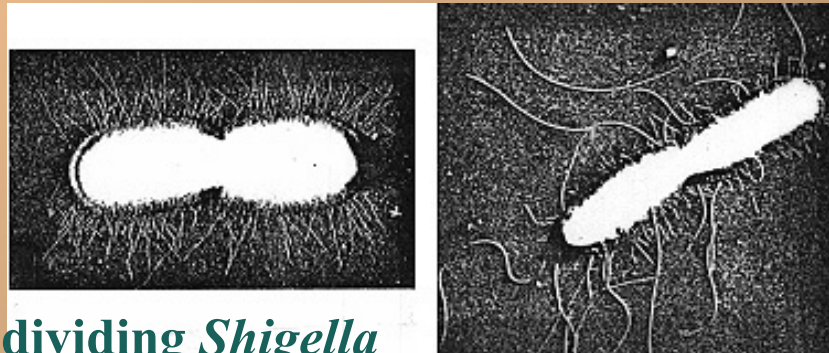
Kapsula – kys. hyalurnová



motility test medium
 (semi-soft medium,
 if the bacteria are
 motile, they will swim
 away from the line)



Pilli



dividing *Shigella*

Salmonella displaying
both its peritrichous f
lagella and its fimbriae

- focosi.immunesisig.org/physiobacteria.html
- www.bact.wisc.edu/