

Prokaryotická buňka Buněčné struktury

Buněčné struktury se dělí na dvě základní skupiny: nepostradatelné pro metabolismus a dělení buňky (NK, CPL, ribosomy, membránové struktury) a postradatelné: organely pohybu, kapsuly, inkluze; buněčnou stěnu nemají např. rickettsie a mykoplazmata.

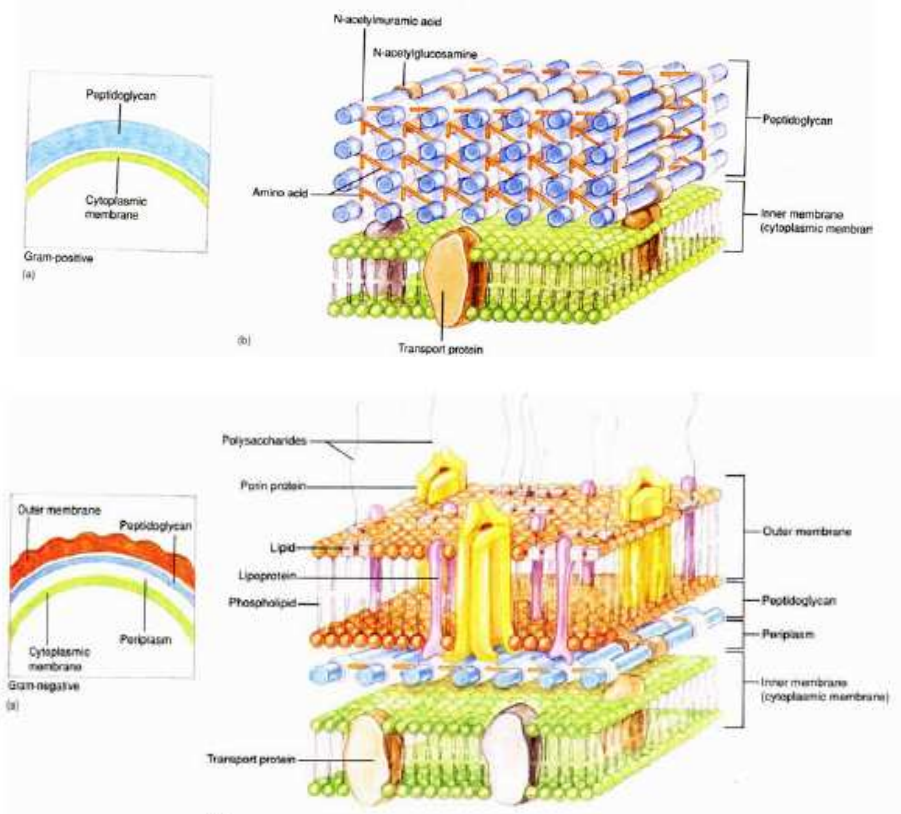
„Architektura“ buňky se liší v závislosti na prostředí a na životním cyklu. Strukturu podmiňuje genetická informace. Kódovaná genetická informace není přepisována vždy, buňka syntetizuje kódované struktury dle momentální potřeby. Základní charakteristiky prokaryotické buňky, které podmiňují syntézu a podobu vnitřních struktur:

- bakteriální buňka šetří energii (striktní regulační systémy pro maximum energie)
- množství syntetizovaných enzymů je charakteristické pro daný typ metabolismu (dle prostředí výskytu buněk, dle životního cyklu). Metabolické dráhy na plasmidech; dle dostupnosti a typu substrátu v prostředí: replikace plasmidu, zvýšení účinnosti transkripce, zvýšení počtu enzymů dané dráhy. Syntéza plazmidů energeticky náročná: po rozložení substrátu dochází i k rozložení plazmidů
- ekologická výhoda rychlosti buněčného dělení

Cytoplasmatická membrána:

Funkce cytoplasmatické membrány nahrazují funkce organel četnými membránovými procesy. Vzhledem k neustálému kontaktu s prostředím je místem neustálé výměny hmoty, energie a informace. Invaginace membrány splňují úlohu organel - pseudoorganely (mezozomy, tylakoidy sinic, chromatofory).

V případě gram pozitivních bakterií je cytoplasmatická membrána pod buněčnou stěnou. Gram negativní bakterie mají kromě cytoplasmatické membrány ještě vnější membránu. Mezi nimi je 2 nm tenká vrstva peptidoglykanu buněčné stěny a tím i dva periplazmatické prostory. G- buňky jsou tak chemicky odolnější.



G+

G-

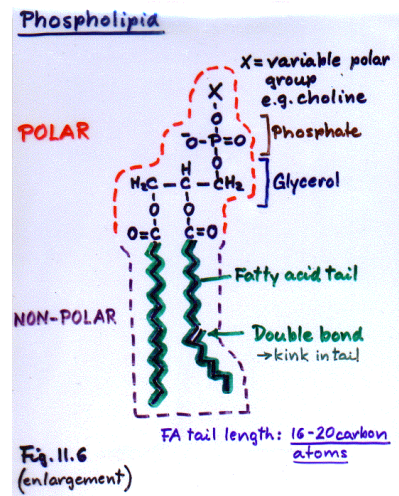
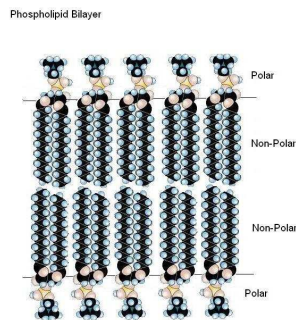
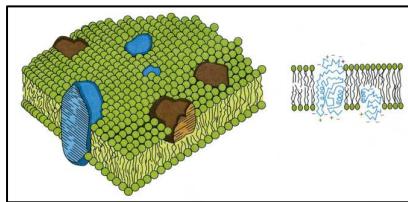
Chemicky:

- Fluidní vrstva fosfolipidů, které automaticky tvoří dvojvrstvu (jednoduchý řetězec, esterová vazba, glyceroldiester). Archea – etherová vazba.

Fosfolipid:

- 1) Fosfátová skupina vázaná na glycerol
- 2) 2 mastné kys.vázané na glycerol – 16-18C
 - nevětvené, nasycené (při vyšší teplotě více)
 - nenasycené (více při nižší teplotě)

Fosfolipidová dvojvrstva



Fluidní mozaikový model, rotační a laterální pohyb PL a bílkovin, dielektrikum.

Hydrofobní lipidická složka – nepolární. Složení MK závisí na teplotě. Při nižší teplotě zajistí tekutost vyšší počet nenasycených nebo větvených (*Bacillus*) MK nebo cyklopropan.

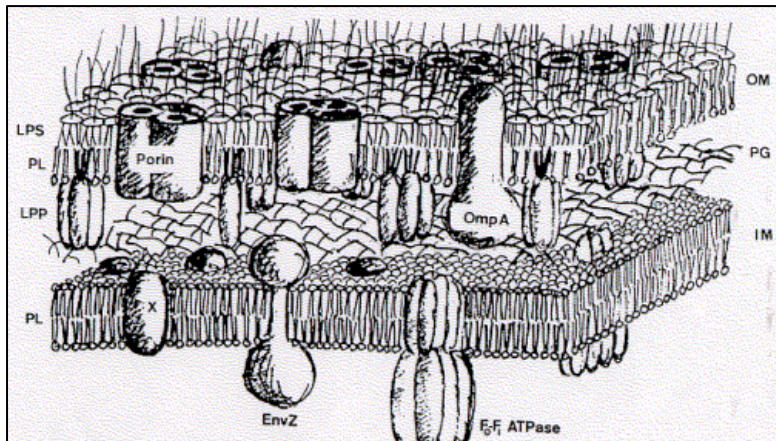
Negativní náboj fosfátové skupiny (vnějšího povrchu membrány)

Vnořené bílkoviny – mnoho proti Eucarya. Asymetrické uložení. Typy: poriny, receptory, enzymy, transportní proteiny. **1) Integrální, transmembránové (70%)** proteiny jsou těsně vázány hydrofobními vazbami a jsou tak uvolnitelné pouze organickými rozpouštědly, tenzidy. **2) Periferní (30%)** proteiny obvykle vázány na integrální elektrostatickými silami a vodíkovými můstky. Snadno oddělitelné. Glykoproteiny a glykolipidy orientovány sacharidovými řetězci vně membrány. Lipopolysacharidy membrán gramnegativních bakterií tak většinou vyčnívají sacharidovým řetězcem z vnější strany vnější membrány (antigenní složka) a lipoproteiny lipidickou částí do periplazmatického prostoru mezi vnější membránou a úzkou vrstvou peptidoglykanu. N- konec lipoproteinu kotven hydrofobními silami (Cystein + MK) do vnější membrány, kovalentně vázán v buněčné stěně.

Bílkoviny inkorporovány do membrány signální sekvencí, 3D struktura zaujmuta v membráně. Podle sekvencí aminokyselin v peptidu je určena jeho funkce. Podle afinity k lipidům jsou umístěny centrálně (70%) nebo periferně. Bílkoviny pevně vázané – enzymy (ATPáza, nukleáza, fosfatázy), transportéry, strukturální. Volné bílkoviny - fosfatázy

Inducibilní složky membrány existují, dokud existuje spouštěcí faktor syntézy. Bílkovinné spektrum proměnlivé.

Membránou obdány i některé typy **inkluzí** (glykogen, PHB, S, plyn, vakuoly, karboxyzomy).



G-

- fosfatidylglycerol – všechny bakterie
- fosfatidyletanolamin – G-
- fosfatidylcholin (lecitin) – u některých G-, ne u G+
- plasmalogeny – u některých anaerobů – glycerofosfolipidy s 1-alkenyl éterickou vazbou
- fosfolipidy - role chaperonů (*E. coli* – fosfatidyletanolamin – lacY)
- proteiny – větší procento než u eukaryotické b. – PBPs (syntéza peptidoglykanu, tvar buňky), ATP-áza, elektron-transportní řetězec

Model lipidické dvojvrstvy

- A space-filling representation of a lipid bilayer. This model was developed by H. Heller, M. Schaefer and K. Schulten. (H Heller, M Schaefer, & K Schulten, *Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid-crystal phases*, J. Phys. Chem. 97:8343-60, 1993.)

Hopanoidy

- lipidy, které obsahuje asi 50% známých bakterií
- obdoba eukar. sterolů
- diploptene [hop-22(29)-ene] from a *Desulfovibrio* strain

- Bariéra propustná pouze pro vodu a napolární látky do 100 Da. Odděluje vnitřní a vnější prostředí buňky, jako polopropustná membrána obsahuje četné transportní proteiny a kanály (specifický a nespecifický transport – poriny OmpF, OmpC). 80% molekul přenášeno aktivním transportem. Protichemická obrana.

- Je místem reakcí, které neprobíhají v roztoku, tedy tvorby a transformace energie (ze světla, z energie redukovaných molekul, transformace v energii ATP nebo energii pro pohyb či transport), sídlem elektrontransportního systému. Místem fotosyntézy, dýchacího řetězce. Nahrazuje funkce mitochondrií: membránově vázané enzymy, sídlo ATPázy. Vektorový metabolismus: orientace multienzymového komplexu, díky něj poté koncentrační gradient.

- Je sídlem místa, od kterého začíná replikace chromozomu a plazmidů – replikátor = místo vazby NK (funkce jaderné membrány). Sídlo DNA – polymerázy.

- Periplazmatický prostor – enzymy. Transformace substrátu pro přijetí do buňky, dotváření buněčné stěny - glykosidázy, postranlační pochody. Esterázy, transferázy, transpeptidázy.

- Místem syntézy a hydrolýzy fosfolipidů

- Místem syntézy složek buněčné stěny, pouzdra.

Invaginace:

- Mezozomy – 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 bílkoviny. Zodpovědné za architekturu přepážky, ta vzniká mezi mezozomem a místem připojení chromozomu. Chemiosmotické jevy nitrifikačních bakterií

- chromatofory fototrofů - purpurových siřných bakterií, cylindrické vezikuly zelených bakterií a vícevrstevné tylakoidy *Cyanobacteria* (sinic)– místo fotosyntézy, bakteriochlorofyl a karotenoidy.

Fotosyntetizující: mezozomy i chromatofory.

Nefotosyntetizující: jen mezozomy.

Náboj CM a b.s. je odlišný, ale proměnlivý v čase

Rychlost průniku látek membránou závisí na jejich velikosti a polaritě.

Adhezivní místa v b.s. - proti pohybu CM a b.s., *E.coli* cca 400, pro vazbu lipopolysacharidů a bílkovin, fágů. Díky adhezivním místům rychlý průchod látek z periplazmy do buňky.

V peptidoglykanu je vytvářen selektivní prostor díky tetrapeptidu a do vzniklých otvorů se vtlačí CM díky tlaku v buňce. Pro integritu jsou důležité ionty Mg^{2+} (vyvazuje je EDTA).

Póry – průchod nepolárních látek. Bílkovinný supramolekulární komplex.

- porin – malá bílkovina, 3 a více řetězců. Na základě primární struktury naskládány do útvarů nebo spojeny. Není energeticky náročné.
- Polyfunkční – vazba látek určitého typu, vazba virů, metabolismus
- OmpF – pozitivně nabitě molekuly, OmpA (specif. interakce s LPS), OmpC (kanál pro malé molekuly a fágy), protein E – PhoE (selektivní transport aniontů, fosfátu)
- LamB - s vyšší specifitou, rozeznává maltooligosaccharid

Syntéza CM:

Nikoliv de novo, ale inzercí.

Permeabilita membrány

- poměrně volně prostupují malé, nenabitě nebo hydrofobní molekuly (O_2 , CO_2 , NH_3 – ne NH_4) a voda
- ostatní – specifické mechanismy
- Msc channels – mechanosenzitivní – reagují na zvýšení turgoru buňky zvětšením velikosti póru – adaptace na osmotický stres - MscL – *E. coli*
- MIP channel (major intrinsic protein)
 - ◆ **Aqp – aquaporiny – voda a nenabitě látky, 1 protein, u někt. bakterií, *E. coli* - AqpZ**
 - ◆ **Glp – transport glycerolu**
 - ◆ **nalezeny pouze u některých archeí**

Vyjímky ve stavbě CM archeí:

Vzhledem k extrémním podmínkám výskytu se v jejich případě vyskytují některé výjimečnosti stavby membrány. Etherická vazba – glyceroldiether, tetraether

• Často monolayer – diglycerol tetraether

glycerolové jednotky na obou koncích MK = tvoří 1 vrstvu

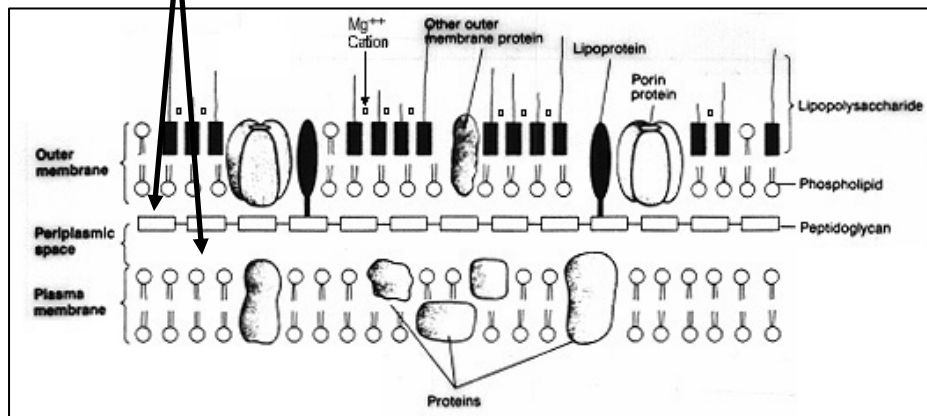
• Lepší přizpůsobení extrémům - monolayer rezistentnější k narušení teplem

Vnější membrána gramnegativních bakterií:

Fosfolipidová dvojvrstva, vně ční LPS, dovnitř LP.

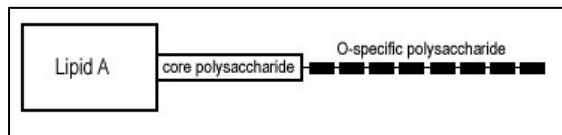
Bílkoviny konstitutivní: poriny OmpC, OmpF - F pily; OmpA (zakotvuje VM a PG, dále je receptorem F- pilusů); receptory fágů, proteázy.

Periplazmatické prostory pro enzymy (pro syntézu b.s., proteázy, peptidázy), u G- v obou prostorech enzymy (volné, ne ve váčcích oproti G+)



Vnější a vnitřní CM membrána se liší kvantitativními poměry fosfolipidů. Ve vnější membráně jich je méně a hlavně na vnitřní straně. Vně do prostředí ční lipopolysacharidy.

Lipopolysacharid (somat. antigen): **lipid A** (endotoxin) – **jádro** – specifický **cukerný zbytek**



- lipid A: P – Gln – Gln – P v hydrofobní vazbě na MK (fosfolipidy vnější membrány)
- jádro: společné pro příbuzné druhy, cca 10 monosacharidů
- specifický PS: až 100 monosacharidů, O-antigen
- strukturou (stericky) brání útoku protilátek
- dále zodpovědný za adhezi – lépe na inertních površích, nespecifické vazby na jiné bakterie (E. coli – pomocí 2mocných iontů nespecifická vazba mezi LPS a živočiš.tkání). Specifická vazba na lektin
- množství se může měnit

Lipoprotein – množství konstantní. S vnější membránou spojen hydrofobním N – koncem (lipofilní Cys), s PG spojen kovalentně, kotví tedy VM (stejně jako OmpA protein). 57 AMK
LP : bílkoviny : LPS = 1 : 2 : 2

V jedné vrstvě fosfolipidů je ethanolamin.

Antigenní vlastnosti CM: LPS + bílkoviny

Grampozitivní buňky:

Pouze jeden periplazmatický prostor, enzymy zde ve váčcích proti odplavení.

Cytoplazma

Komplex látek cytosolu, s ultrastrukturou (objevena polarizovaným světlem), prostředí protoplastu. Gel. Má funkce organel – vakuoly, peroxisomů. Je pojítkem pro intermediáty metabolismu.

Cirkulace cytoplazmy – aktivní pohyb – až 1/3 vyprodukovaného ATP přijde na proudění CPL, které je větší než u eukaryotní buňky. Tento energetický výdaj je vyvážen vysokou rychlostí reakcí právě díky pohybu CPL.

Obsahuje více než 50% proteinů – hlavně enzymy glykolýzy, pentózového cyklu, glyoxalátového a Krebsova cyklu, dehydrogenázy, proteázy, nukleázy, esterázy. Dále obsahuje regulační molekuly cAMP, GTP.

Struktury mohou vymizet v době nepotřeby.

V nebarveném preparátu je buňka průhledná.

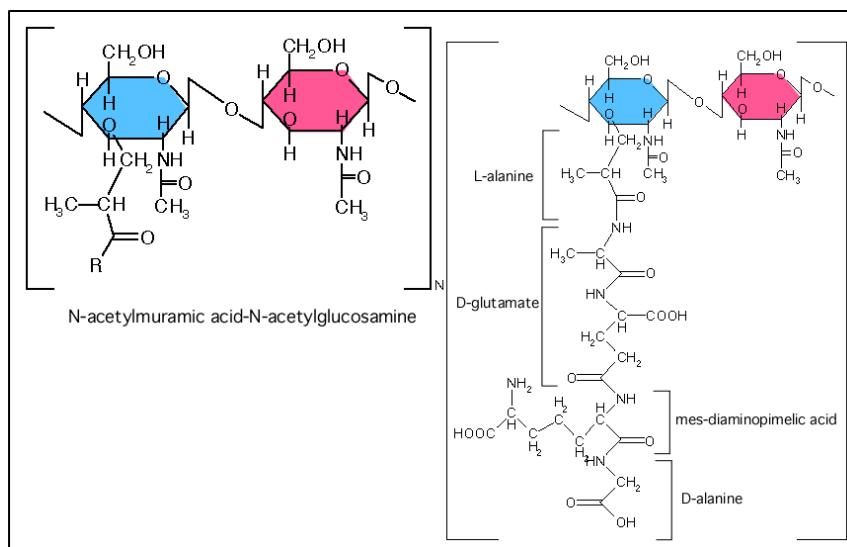
Buněčná stěna

Není esenciální strukturou, ale nese ekologickou výhodu. Není u mykoplazmat, intracel.parazitů a některých archeí.

Funkce: skelet buňky, odolnost chemická, osmotická, proti vysychání a světlu, tlaku. Kompenzuje přetlak 5 atm u G- a 25 atm u G+. Je polopropustná.

Je mohutným antigenním stimulans.

Chemická stavba:



Peptidoglykan

Glykan – cukerná složka, glykany NAG + NAM

N-acetylglukózamin+N-acetylmuramová k. spojeny β -1,4-glykosidickou vazbou. Kostra PG = opakování glykanů.

Peptid – na kys. N-acetylmuramové je tetrapeptid – L-ala – D-glu – R – D-ala

R = DAP – (pouze v b.s., taxonomický znak u aktinobakterií), LL DAP, meso DAP, L-lys, L-orn

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

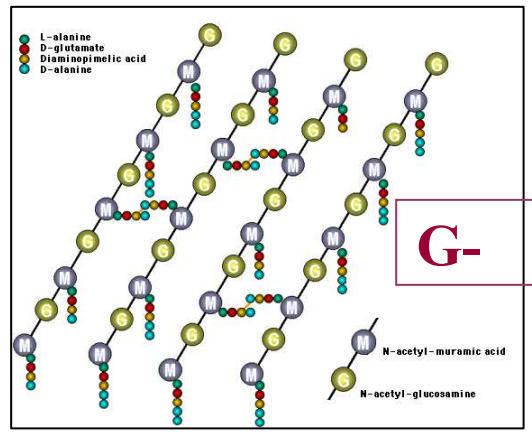
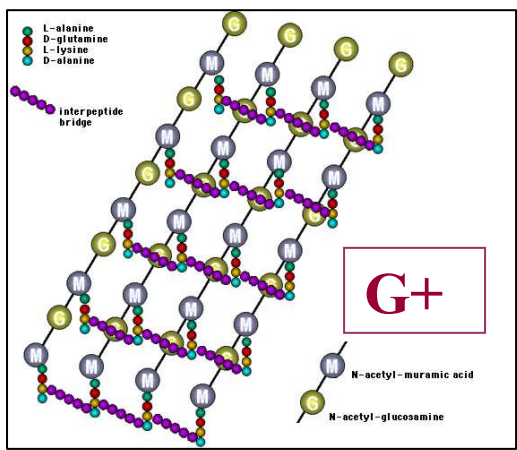
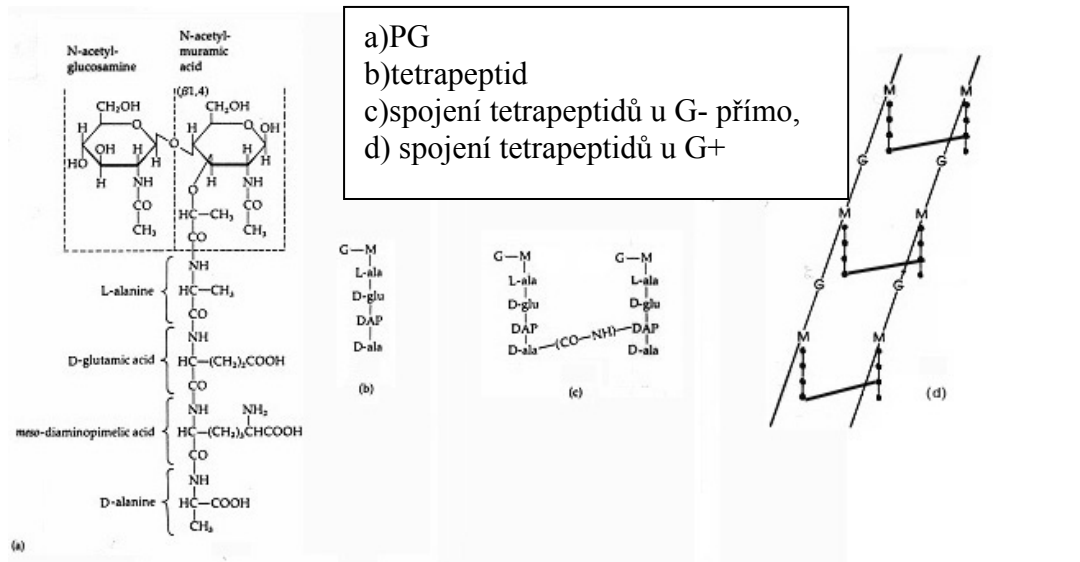
G- :vždy DAP a meso-DAP, tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP

Struktura tetrapeptidu druhově specifická.

Teichoové kyseliny – polymery glycerol- a ribitolfosfátu s glykosidicky vázanými cukry.

Lipidy – jen u mykobakterií, nokardií, korynebakterií. Lipidy estericky vázány na PG, udělují jiné vlastnosti b.s.

Bílkoviny – kovalentně na povrchu, mikropouzdro nad sacharidovou vrstvou, antigenní vl.



- 40 nm PG
- 90% peptidoglykanu
- 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 perioplazmatické 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 aktinomycety, mykobakteria – meso-DAP
- streptomycety – LL-DAP
- *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysine

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*

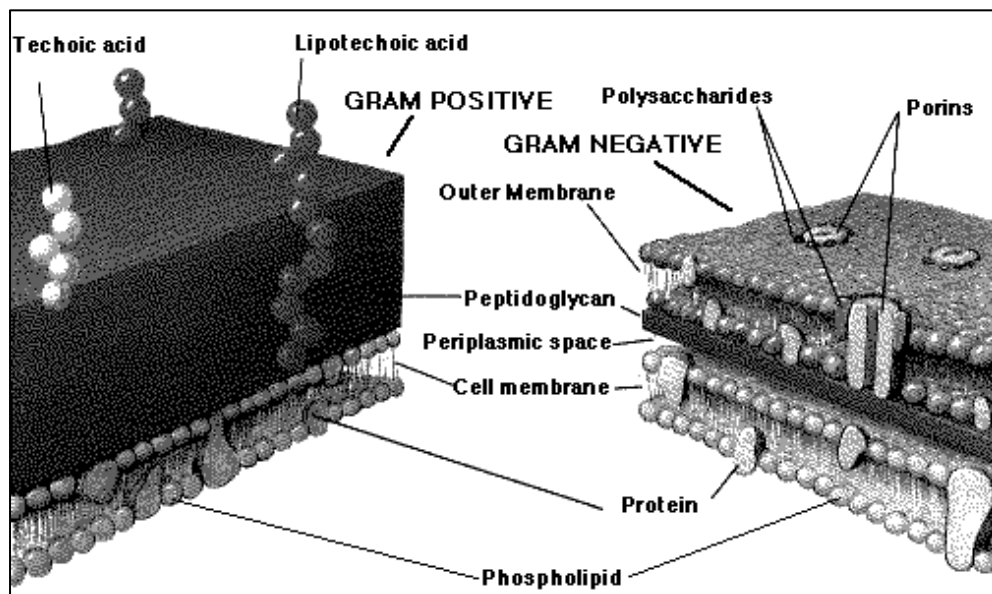
■ IV. Ser-Ala2-3, *A. atrocyaneus*

■ V. Thr-Ala2, *A. citreus*

■ VI. Ala-Glu, *A. nicotianae*, *A. creatinoliticus*, *A. uratoxydans*, *A. protophormiae*

■ VII. Glu, *A. sulfureus*

Enzym lysozym hydrolyzuje β – 1,4- glykosidickou vazbu; penicilin blokuje syntézu buněčné stěny – transpeptidázovou reakcí (spojení D-ala a DAP v tetrapeptidu). Vznikají sféroplasty. Pokud se tyto i množí = stabilní L-formy.



Glykosidická vazba je velice pevná a mechanicky odolná. Rozbití – ultrazvukem, chemicky, tepelně.

Teichoové kyseliny vycházejí z CM přes buněčnou stěnu, mají Ag vlastnosti. Řetězců je několik 1000. Spolu s tetrapeptidem působí proti skluzu vrstev. Jsou provlečeny oky PG. Mají 45 typů - podle jejich určení se bakterie chemotaxonomicky řadí do druhů. Typy – glycerolteichoové, ribitolteichoové kys. Při snížení obsahu fosfátů v prostředí nahrazeny teikuronovými kyselinami.

Barvení buněčné stěny

FAME profil – char.pro jednotlivé rody, druhy až kmeny, závislý na kultivaci

peptidoglykan neobsahují chlamydie

Peptidoglykan a pseudopeptidoglykan

peptidoglykan

N-acetylmuramová kys.

N-acetylglukózamin

b - 1,4 glykos. vazba

pseudopeptidoglykan

N-acetyltalosamino- uronová kys.

L-aminokyseliny

místo D

b - 1,3 vazba

Ztráta buněčné stěny: blokem syntézy základních stavebních kamenů vně membránu nebo blokem stavby buněčné stěny vzniká protoplast - kulatý útvar v hypertonickém prostředí Př. 3M sacharóza (CM je polotuhá). V izotonickém prostředí není dostatečný tlak na membránu, buňka však vydrží díky transportu cukrů, AMK, iontů vně.

První protoplasty byly získány u druhu *Bacillus licheniformis*. Protoplast se nikdy nemnoží, ale roste. Protoplast nemá b.s. Pro start buněčného cyklu musí být signál z buněčné stěny. Protoplast může mít vyšší nebo stejnou metabolickou aktivitu

Sféroplast popsán poprvé u rodu *Bacillus*. Má necelou 1/3 b.s., kdy může být přítomen signál pro stavbu b.s. I sféroplast má rychlejší metabolismus. Reverze je jednoduchá, odstraněním bloku syntézy b.s. U řady bacilů je sféroplast geneticky kódovaný = stabilní L-formy = fixovaný sféroplast. Po vysetí na Petriho misku tvoří specifický útvar – jakoby vakuolizované části kolonie, s voštinatou strukturou (buňka vypadá jako včelí plástve, geneticky kódovaná mutace). Od nich dále reverze, okolí těchto buněk již klasický vzhled. Pro udržení L-formy nutno přeočkovat jehlou z místa pravých sféroplastů.

Systém u pneumokoků Pplo – pleuropneumonia-like organisms. Mají méně než 1/3 buněčné stěny, ale jsou schopny růstu. Zásah ATB složitý – jen těch, co nepůsobí práve na b.s.

Působení ATB na b.s.: 1) blok syntézy prekurzorů, 2) blok přenosu prekurzorů b.s. přes CM lipofilním přenašečem, 3) blok transferu prekurzorů do PG (vankomycin) 4) inhibice regenerace přenašeče C55 lipidu – defosforylací (bacitracin) 5) blok spojení tetrapeptidů, které původně pentapeptidem (odštěpení Ala z koncového dipeptidu D-ala – D-ala)

Vyjímky ve stavbě buněčné stěny: acidorezistentní bakterie, mykoplasmata, archea

Acidorezistence:

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 (striktní)
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 neobarví 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
- 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
- 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)

Ribosomy

Supramolekulární komplexy nukleových kyselin (rRNA, mRNA, tRNA) ne-histonových bílkovin spojených pomocí iontů. Spojení nevyžaduje energii. Počet: závisí na růstové rychlosti, rozmezí 100 – 30 000, i 70 000. Závislost na koncentraci Mg²⁺ iontů. Pro

bazální metabolismus je nutný minimální počet ribozomů. Tvoří 40% hmotnosti sušiny buňky a 80% celkové RNA, jejich proteiny jsou většinou proteiny při analýze bakt. proteomu.

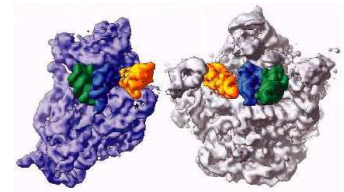
Umístění v buňce: vždy volné a to ze 60% u jádra a ze 30% u CM (translace proteinů pro transport a strukturních proteinů pro CM -)

Podjednotky: malá (16S + 21 mlk bílkovin, 1540 nukleotidů) a velká (5S + 23S a 34 mlk bílkovin, 2900 nukleotidů).

S... Svedbergovy jednotky sedimentace.

Součet 50+30S = 70S souvisí s konformací.

Obě podjednotky mají charakteristický tvar – zjištěný podle řezů. Podjednotky spojeny pouze při translaci; v buňce je tedy v každém okamžiku směs ribosomů s podjednotkami spojenými (15%) a oddělenými (15%) s ribosomy tvořícími spojený komplex s mRNA (70%). Aktivní ribozom je tvořen oběma podjednotkami, mRNA, iniciačním faktorem IF a limitujícím faktorem Mg^{2+} iontů. Spojení jednotek závisí na metabolismu a koncentraci Mg^{2+} iontů.

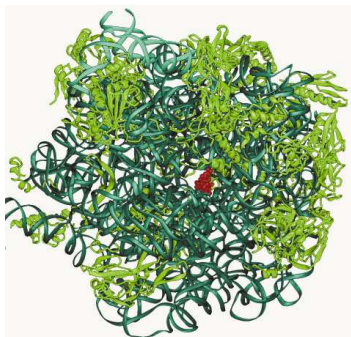


Iniciační komplex: 30S+50S+mRNA+GTP+IF+tRNA^{fMet} + kodon

Rozpad: stopkodon a terminační faktor nebo snížení koncentrace Mg^{2+} iontů (možnost rozložit komplex mimo zásah z vnějšku, oproti jiným supramolekulárním komplexům).

Setkání mRNA a aktivované aminokyseliny, nasednutí polyribozomu (na jedné mRNA více ribozomů cca po 10 – 20 kodonech, jejich vzdálenost klesá se vzrůstající rychlostí proteosyntézy). Vysoká rychlost proteosyntézy např. při využívání substrátu – syntéza množství enzymů zrychluje využití substrátu. Afinity ribozomu ovlivňuje frekvenci nasednutí na mRNA. Zvyšuje rychlost proteosyntézy. Přenos peptidů přes CM v primární struktuře, konec řetězce umožní průchod. Postranlační úpavy nascentní bílkoviny mimo protoplast - v periplasmě nebo za buněčnou stěnou.

Látky ovlivňující činnost ribozomu: antibiotika (streptomycin, tetracyklin, chloramfenikol, erytromycin) působící selektivně na ribozomy prokaryotické buňky vzhledem k odlišné stavbě ribozomu od buňky eukaryotické. Jiné působení na ribozomy archeí a bakterií. U archeí je – větší rezistence na Kan a Ery. Antibiotikum působící na velkou podjednotku: chloramfenikol – váže se na místo pro enzym peptidyltransferázu blízko skupiny akceptoru tRNA; clindamycin – interferuje se substrátem a fyzicky brání narůstání peptidického řetězce. Makrolidy erythromycin, clarithromycin and roxithromycin se váží do místa výstupu nascentních proteinů a blokují tak jejich přenos. Je zajímavé, že ani jedno z těchto antibiotik neovlivňuje velkou podjednotku ribozomů bakterie *Haloarcula marismortui*.



Umístění erytromycinu (červený) ve velké podjednotce ribozomu.
RNA – tmavě zelená.
Proteiny – světle zelená.

Genetická informace

- Chromozom
- Plazmidy – (integrované = epizomy)
- Transpozony, IS
- Bakteriofágy

••Přenos – transformace, konjugace, transdukce

Bakteriální chromozom:

Nukleoid: $M_r = 2,5 \cdot 10^9$, průměrně $4 \cdot 10^6$ nukleotidů (*E. coli*)

Nukleoid = protaminy + nukleové kyseliny + dvojmocné kationty

Ultrastruktura bakt. jádra – smyčky – u *E. coli* asi 50 – stericky usnadňují práci enzymům, urychlení enzymatických reakcí. Velikost smyček je různá a počet závisí na druhu. Smyčky – transkripce. Replikace – rozpletení.

Start replikace může předbíhat oddělení buněk – ekologická výhoda – v jedné buňce může být start např. čtyř buněk..

Prokaryota vždy haploidní – 1 alela.

•Zpravidla cirkulární DNA

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

2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*

•Průměr: $5 \cdot 10^{-15}$ g DNA

•0.58 Mbp *Mycoplasma genitalium*

•4.4 Mbp *Mycobacterium tuberculosis E. coli*

•Vazba na CM – mezozomy, dělení

•Replikace předchází dělení buňky – dělení buňky je delší proces

•Histon-like proteins – 4 druhy protaminů – zřejmě přibližují úseky NK; působí při iniciaci replikace. Př: HU dimer, gyrázy, methylázy, reparační enzymy, enzymy replikace, transkripce; regulátory

•G+C obsah (melting point):

28% (*Clostridium*) - 72% (*Sarcina*).

•Frekvence mutace

•NCBI – databáze sekvenovaných genomů

Pojmy: superhelicita, číslo vinutí, iontová síla, topoizomerázy

Funkční úseky: 4 400 genů – asi 100 genů pro RNA, zbytek pro proteiny. Nejvíce genů pro intermed.metabolismus (hl. degradace). Dále pro syntézu a modifikaci makromolekul, transport.

Plasticita bakteriální buňky spočívá ve změně enzymatické výbavy na úrovni jednoho kroku – regulací frekvence iniciace transkripce (probíhá v intervalech). Rychlost zahájení transkripce již regulována není.

•Plazmidy: doplňková genet. informace:

Autonomní replikon.

Získán konjugací, transdukcí a transformací (chemickou, elektrotransformací) kompatibilních buněk

F-plazmidy (fertilní)

Rezistence, - ATB, těžké kovy (Hg^{2+} redukována na Hg^0 – nerozpustné ve vodě, eflux Cd, Ag, Sd, As, Bi, Pb...), UV

Metabolické dráhy (bioremediace), degradace a oxidace inertních a tox.látek

- Přenos konjugací, transformací
- Bakteriociny (ne- i konjugativní) – bílkoviny působící na příbuzné druhy (s receptory)
- Kódování faktorů virulence: adheziny, toxiny
hemolyziny, enterotoxiny
- Ti –tumorindukující plazmidy
- Restriktivně modifikační systémy
- Kryptické, fazmidy, kosmidy
- 5-10% informace genomu
- Genetické inženýrství - vektory

Inkluze

Zásobní látky nebo produkty metabolismu nebo uložení nepotřebné látky z vnějšku a prozatím bez funkce (kvasinky a stafylokoky hromadí vitamíny).

Bez membrány nebo s membránou - není biologická – není to dvojrůžstva fosfolipidů. Je jednovrstevná, tvořená bílkovinou + lipidem nebo bílkovinou + polysacharidem.

a) obdané membránou – 1 vrstva fosfolipidů (až na plyn.vakuoly)

Glykogen - 160 – 300 nm, rozpustný polymer glukózy s α -1,4-vazbami a α -1,6 větvením na každém 8-10tém monomeru. Může tvořit až 50% sušiny. Ve světelném mikroskopu není viditelný. Může a nemusí mít membránu. Barvení lugolovým roztokem. Počet: 1-10. Bakteriální glykogen je silně větvený. Slouží jako pohotová rezerva.

PHB – kyselina polyhydroxymáselná – viditelná ve světelném mikroskopu, může tvořit až 60% sušiny, má membránu. Je to odpadní produkt metabolismu uhlíkatých látek. Vyskytuje se u aerobů: *Bacillus*, *Pseudomonas*

Uvedené dvě skupiny látek jsou osmoticky a iontově neaktivní, vyskytují se v buňce při nadbytku zdrojů uhlíku a nedostatku zdrojů dusíku

Síra – zdroj energie pro chemolitotrofní sírné bakterie a zdroj elektronů v procesu fotosyntézy u fototrofních sírných bakterií – zelených a purpurových (tyto přijímají energii transformací slunečního záření). Amorfní.

Plynové vakuoly – plyny vznikají při metabolismu. Množství plynu závisí na teplotě a viskozitě. Nadlehčení buňky. Buňka reguluje množství v závislosti na intenzitě metabolismu. Membrána je z jedné vrstvy bílkovin.

Karboxizómy – protáhlé cisterny, s enzymy Calvinova cyklu, vznik CO_2 , syntéza hexózy u autotrofních, chemolitotrofních a fotolitotrofních. Za vhodných podmínek je vyšší počet (1-10), nedělí se

Chlorobiové váčky – zásobárny pigmentů – bakteriochlorofyl a karotenoidy. Jen zásobárna, nikoli reakce a vazba světla. Přenášeny do chromatoforů, kde vlastní fotosyntéza. Počet: 2-10

b) bez membrány

Glykogenová granula – 20 – 100 nm, jedna buňka je může mít pouze s nebo bez membrány, ale v rámci rodu lze obojí zároveň.

Polyfosfátová granula – volutin - komplex za silné energetické dotace při nadbytku ATP (možnost uložení velkého množství energie). Až 500 molekul, nerozpustný ve vodě, vazba vyžaduje ATP. Nikdy není zdrojem energie, jen fosforu. Počet: 1 – mnoho, podle metabolismu. Vysoký počet je v době před přechodem do klidového stadia (známka sporulace)

Krystaly – produkty metabolismu (oxalacetát)

Parasporální inkluze = bílkovina vznikající při sporulaci. Je to zbytkový materiál nespotřebovaný při vzniku spor. Bioinsekticidy – *Bacillus thuringiensis* – na moučné červy, i selektivní působení (až na druhy)

Pigmenty

Produkty primárního i sekundárního metabolismu. Produkovány v závislosti na stanovišti.

Využívají se při metabolismu – při fotosyntéze nebo mají protektivní účinek či jiný ekologický význam (inhibiční účinky). Pokud jsou produktem primárního metabolismu – jsou bezpodmínečně potřeby (bakteriochlorofyl, karotenoidy).

Protektivní účinek – absorbuje světlo o určité vlnové délce, jsou syntetizovány až v rámci sekundárního metabolismu.

Buňka může produkovat endo- (protektivní) i exopigmenty různých barev.

Řada pigmentů vzniká nadprodukcí látek. Příklad: kolonie *Azotobacteria* na manitolové půdě po týdnu zčernají (zprostředka) – na základě nadprodukce tryptofanu

Lokalizace (podle své úlohy): v cytoplazmě, v CM u fototrofů, v periplazmatickém prostoru, (v buněčné stěně u kvasinek), jako exopigmenty – ekologický význam (inhibiční agens, ATB).

Nejčastěji: karotenoidy – endopigmenty u většiny buněk

Bakteriochlorofyly a,b,c,d – anaerobní prostředí

Prodigiozin – extracelulární, mikrobicidní účinek – bakterie a plísně

Fenaziny – extracelulární, sek. metab., mikrobicidní účinek – bakterie a plísně (*Erwinia*)

Melaniny – hnědé, černé, tmavě červené. Produkty sekundárního metabolismu, nadprodukcí aromatických kyselin – tyrosin (*Azotobacter*). V závislosti na době kultivace.

Anthokyany – sek. metab., barva závisí na pH, u 5 druhů bakterií

Příklad: *Micrococcus flavocianus* – žlutý endopigment a fialový exopigment. Na MPA jen žlutý endop. Na glukozóvkvasničním agaru – oba pigmenty.

Struktury vně buněčné stěny

Fce: ochrana před fagocytózou, protilátkami, před vysycháním, detergenty. Vazba na povrch předmětů, tvorba biofilmu

Pouzdro = kapsula

= S vrstva z bílkovin

= sliz (slouží i k pohybu, silně hydratovaná vrstva, antigenní vlastnosti, adheze)

= polysacharidové povrchy

Pouzdro = kapsula

Přítomna u téměř všech zástupců *Enterobacteriaceae*.

zřetelně odděluje buňku, má antigenní vlastnosti, znemožňuje detekovat somatický antigen. Jsou jimi charakteristické virulentní kmeny. Jeden druh může mít až 60 druhů kapsulových antigenů. Působí proti fágům, protilátkám a fagocytóze, dále jako ochranná vrstva. Opouzdřené kmeny jsou odolnější proti vlivům prostředí a proti první vlně imunitní odpovědi. Míra virulence: formy S, M a R (pneumokoky).

Je to vrstva dobře organizovaného materiálu, který nelze snadno odmýt z buněčného povrchu. Mikrokapsula – do 0,2 nm, syntetizována stále, není geneticky kódována, překrývá antigen buněčné stěny a má své vlastní antigenní vlastnosti. Složena z bílkovin, lipidů a polysacharidů. Průkaz – ne mikroskopicky, pouze serologicky. Není to bariéra proti průniku živin. Důkaz u vitální buňky: barvením tuku . terčíky v mikrokapsule + tukové kapénky v buňce.

Makrokapsula – je geneticky kódovaná, složena z polysacharidů, bílkovin nebo celulózy. Je minimálně dvakrát tlustší než buňka. Průkaz prostý: téměř jednotné složení – převažuje buď pouze bílkovina nebo pouze polysacharid. Lipidy jen do 1%.

Streptococcus – polysacharid

Bacillus anthracis – bílkovinná složka kyseliny poly-D-glutamové

Bacillus – k. glutamová

S-formy, které přešly v drsné kolonie R-formy = ireverzibilní (avirulentní pneumokok).

S-formy, které přešly v mukózní M-formy: reverzibilní; směsi virulentních buněk.

Tvorba pouzdra ovlivněna složením media, prostředím.

S-vrstva – jeden druh bílkoviny, druhově specifické, monovrstva. pravidelně organizovaná vrstva proteinů a glykoproteinů na povrchu bakt. buňky

Sliz – řídký, spojuje více buněk, snadno odstranitelný, difúzní neorganizovaný materiál, nejčastěji polysacharid. Může sloužit k pohybu. Ve vlhkém prostředí.

Glykokalyx – netvoří se v laboratorních podmínkách za dostatku živin. Je to síťovina z vláken polysacharidů a glykoproteinů, umožňuje adherenci, která je málo (za pomoci kationtů, Př: zub) až vysoce (za pomoci lektinů, Př: uretra) specifická. Kationty umožňují spojení stejně nabitých buněk a povrchů, elektrostatické síly.

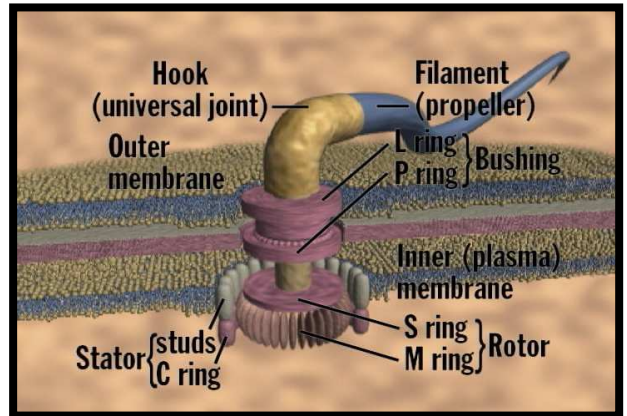
Pochvy – geneticky kódované, výhradně z polysacharidů. Chemické složení je druhově specifické, stejně tak zbarvení. Glukóza + kyselina glukuronová u rodu *Sphaerotilus*, u jiných rodů např. fukóza. Někdy obsaženy hydroxidy kovů – v malém množství (dávají zbarvení. Často Fe, Mn, Cu; závisí na druhu). Přisedlé mikroorganismy. Trubkovitý tvar. Až několik mikrometrů. Bakterie se v trubce mohou pohybovat. Pochvy mohou být zbarvené. Pouze mechanická funkce.

Př: *Sphaerotilus*, *Leptothrix*

Vláknité útvary na povrchu buňky

Bičík

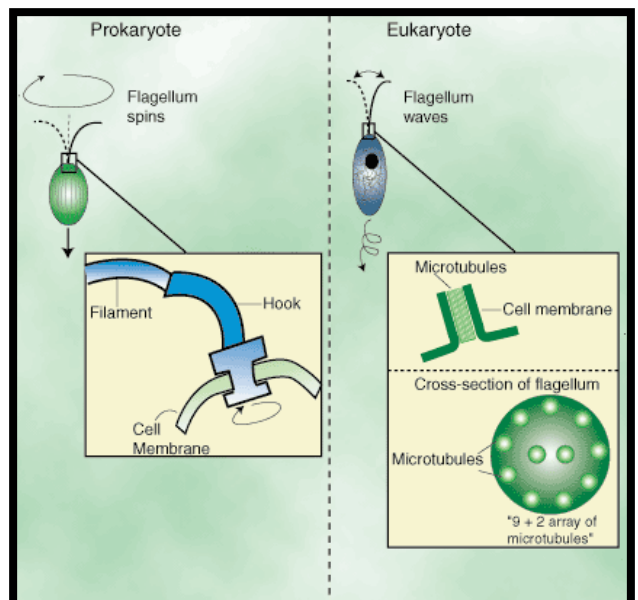
- flagelární antigen, tvořen specif. bílkovinami, nemůže být zakryt kapsulárním ani somatickým antigenem
- začíná v CM (oproti fimbriím, kt. jsou strukturou B.S.)
- supramolekulární komplex, několik řetězců bílkovin
- globulární bílkovina flagelin(tvoří jej více jak 4 vlákna oproti fimbriím), molekul.hmotnost flagelinu větší než pilinu
- komponenty bičíku: bičíkové vlákno (jen to je antigenem) a bazální tělísko - háček, osa, rotory (bazální těl. zůstává po odstranění bičík. vlákna, to je do 20 až 30 min dosyntetizováno)
- **G+** : zakotvení do CM a B.S.: bazální tělísko, 2 disky – jeden v CM, druhý v periplazmat. prostoru, B.S. kluzné ložisko-tam se otáčí osa, háček pro ohyb
- **G-** : B.S. ne tak pevná, navíc vnější membrána, L pruh v peptidoglykanu buněčné stěny a P pruh ve vnější membráně (vzdálenost dána příbuzností)



Průměr 13-20 nm.

Rychlost pohybu 1-100μm/s za atraktantem.

- délka bičíku několikanásobně větší než délka buňky
- buňky lze snadno odstranit sklem (pipeta, tyčinka)



Pohyb buňky – odpověď na prostředí. Taxe – chemo-, geo-, foto-. Aerotaxe – ve směru gradientu kyslíku. Intenzita odpovědi závisí na počtu bičíků, na teplotě a viskozitě prostředí.

pohyb:

- primární pohyb je rotační, u eukaryot ATP donor E, u prokaryot gradient H⁺ iontů
- H⁺ ionty letí ven, otočí bičík, ten se nemůže vrátit (rotace tedy vždy jedním směrem), ve směru hodinových ručiček, buňka se taky točí a pohyb směřuje dopředu
- více bičíků se díky stejnému náboji nezamotá, díky toku H⁺ se točí stejným směrem
- nepravidelný pohyb, nikdy přímočarý

vnější faktory ovlivňující pohyb:

- magnetické pole Země (zvl. struktury – magnetosomy, popsané u *Aquaspirillum*, od dvou do několika desítek, uvnitř či ve středu buňky, málo v blízkosti jádra)
- chemotaxe (odpověď na změny ve vnějším prostředí, funguje i při \uparrow c živin, negativní chemotaxe od barviva, rychlost pohybu uměrná koncentraci barviva)
- fototaxe (odpovědí na světlo je pohyb \uparrow rychlosti než při chemotaxi)

vnitřní faktory ovlivňující pohyb

- počet bičíků
- lokalizace bičíků na buněčném povrchu (nejpomaleji reagují peritrichia, efekt rychlý u vibrií, v = několik mikrometrů za sekundu)
- dostatek redukčních ekvivalentů

Uspořádání: taxonomický znak

1) polárně


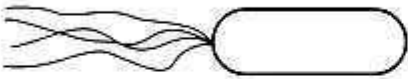

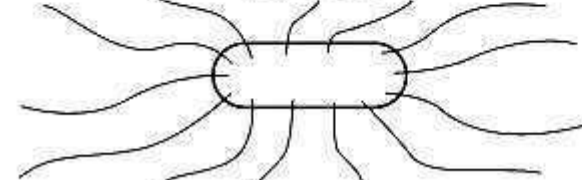
– monotricha (*Pseudomonas*): pohyb dopředu: proti směru hodinových ručiček.

Otáčení buňky: po směru hodinových ručiček.

- amfitricha (*Spirillum*)

- lofotricha (*Spirillum*)

2) po celém povrchu – peritricha (*Proteus vulgaris*, *Agrobacterium*). Pokud pohyb dopředu: shloučení bičíků a pohyb proti směru hodinových ručiček. Díky náboji se nezamotají. Rozpletení – kroucení buňky na místě. „Chce-li“ se buňka pohybovat jedním směrem, namotá bičíky, které jsou ve směru pohybu, na sebe a je tlačena bičíky druhé strany

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

Pozorování pohybu bičíku - důležitý dostatek kyslíku

– v temném poli a intenzivním světle

- Fixace – speciální batvicí metody pro světelný mikroskop, mořidlo tanin se obalí kolem bičíku, průměr se znásobí a zviditelní.

Fázový kontrast

- v elektronové mikroskopii negativní barvení
- otiskové preparáty po rychlém zmražení na -150 C

Pohyb bičíku:

Rotace kolem vlastní osy – pouze u prokaryot

Motor – celý bičík

Poháněn protonmotivní silou – protonmotive force (pmf) – protony přes membránu.

Výjimka: Alkalifilní bacily – pohyb iontů Na⁺

Stavba:

Vždy bazální tělísko – u G- 4 kruhy (2 v PG a dva ve vnější membráně)

G+ - 2 kruhy v CM

Háček (hook)

Vlastní vlákno

Tvorba:

Samouspořádávání – molekuly flagelinu jsou středem vlákna transportovány na konec, vazba na konci bez enzymů, dosyntetizuje se vždy do stejné délky. Geny na stavbě: je jich asi 40, popsáno však jen 20. Př: HAP 1, 2, 3...

Regulace:

po koncentračním gradientu živin – regulována délka přímého a otáčivého pohybu. Mechanismus regulace pomocí MCP systému.

***E.coli*: MCP systém – methyl – accepting chemotaxis protein.**

Protein je řízen methylačním procesem. Systém je vázán na CM, vnitřní část proteinu v cytoplazmě, vnější ční ven. Na vnitřní část proteinu se váží enzymy cytosolu (proteiny ChE, ChA), na vnější se váže atraktant. Protein ChA je schopen autofosforylace v případě, že na MCP není navázán atraktant. Po vazbě atraktantu předává protein ChA fosfátovou skupinu proteinu CheB a tento protein=enzym způsobuje demethylaci MCP systému. Protein CheB předává fosfátovou skupinu proteinu CheY a ten způsobí pohyb bičíku (otáčení). MCP+atraktant je dobrým substrátem pro protein CheP, což je methyltransferáza, methyluje tento komplex, navázaných 4 až 5 methylových skupin poté nestimuluje CheA k autofosforylaci = pohyb bičíku. Žádný pohyb nesmí trvat dlouho, pro správnou reakci na aktuální podnět.

Swarming – plazivý pohyb

Gliding – klouzavý – myxobakterie – vznik plodnic

Pomocné látky pohybu – slizy, surfaktanty

PILI - fimbrie

slouží k přenosu DNA konjugací, k přichycení fágů, různě velké, typicky u G-

- struktura B.S
- křehké, lámavé, různé morfologické typy – mnoho druhů
- duté, vždy nepohyblivá trubička
- jen G-, několik set

stavba:

- 3, 4 nebo 5 vláken stočených do spirály
- pilin - rodově i druhově specifický, lineární sekvence proteinových podjednotek

rozměry:

- kratší než bičík, nejdelší je maximum podélné osy buňky, Ø2-8 nm, délka 0,1 – několik nm, 3-5 molekul
- na celém povrchu či jen na určité části buňky

Hemaglutinace

- a. inhibována manosou (MSHA)
- b. neovlivněna (MRHA)

fce :

- uchycení k povrchům (adheze k nenabitým povrchům: G- drží lépe na podložním sklíčku lehkou jemnou vazbou)
- kontakt bakteriofága,
- twitching motility

I.

- kódované chromozomálně-specifická adherence
- specifická kolonizace u symbiontů, parazitů a patogenů(koregulace s tvorbou toxinu u *Vibrio cholerae* O1, *E.coli* – uropatogenní P pilus, adherentnce fimbrie + enterotoxin *E. coli* –obojí kódováno plazmidem)

II.

sex fimbrie - kódované konjugativním plazmidem u donora DNA – 1ks, můstek pro plazmid (F pilus u *E.coli*, konjugativní plazmidy salmonel)

barvení : kys.fosfowolframová zachová podobu f., kys. osmičelová – f. ztlustí a zkrátí

SPINY

100-200nm , u vodních organismů zvětšují povrchu, umožňují nadnášení ve vodě

www.focosi.immunesig.org/physibacteria.html

www.sedin.org/mol_museum.html

www.arn.org/mm/mm_movies.htm - animace, pohyb bičíku

web.indstate.edu/thcme/micro/flagella.html

<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n4/abs/nrmicro1644.html>

http://images.google.com/imgres?imgurl=http://www.biology.usu.edu/courses/biol3300-0-stark/Biol3300/images/flagella.jpg&imgrefurl=http://www.biology.usu.edu/courses/biol3300-stark/Biol3300/practicesets.htm&h=219&w=214&sz=6&hl=en&start=50&sig2=0f1y2zN4CBW7MZFdmQVOeg&um=1&tbnid=rtltWN92uRim7M:&tbnh=107&tbnw=105&ei=EAAUR8fXM4WQwAHuqqBb&prev=/images%3Fq%3Dflagella%2B%26start%3D36%26ndsp%3D18%26svnum%3D10%26um%3D1%26hl%3Den%26rlz%3D1B2GGFB_enCZ221CZ221%26sa%3DN

<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2001/life-sciences/LS6.html>

Zkratky:

CM- cytoplasmatická membrány

PL – fosfolipid

PG – peptidoglykan

LPS - lipopolysacharid

MK – mastné kyseliny

NK – nukleová kyselina

b.s. – buněčná stěna

PHB – polyhydroxymáselná kyselina