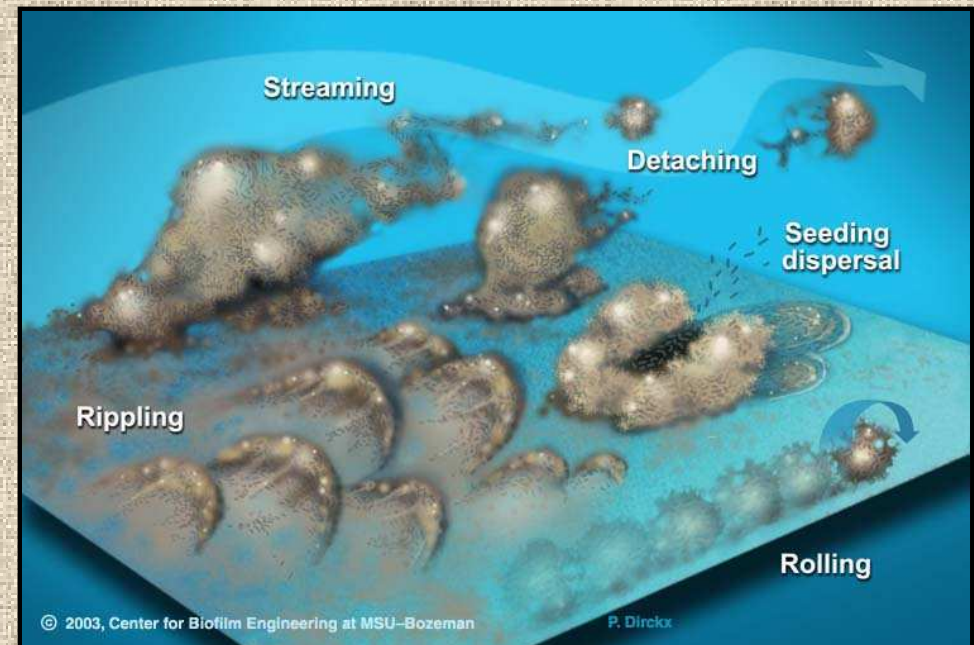
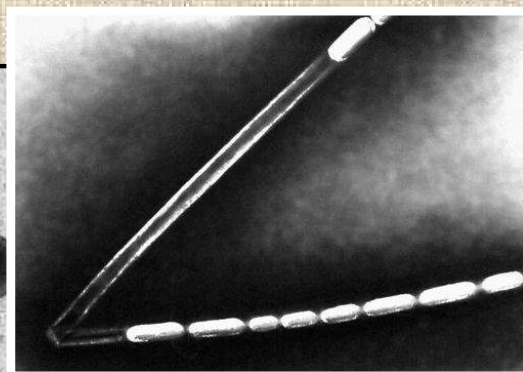
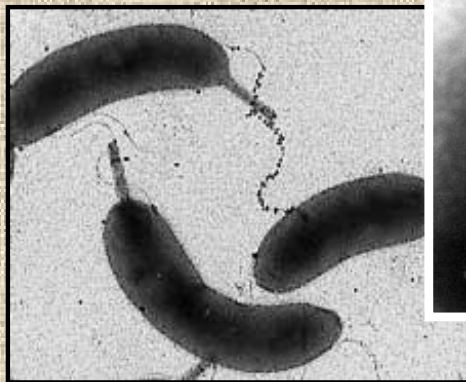


Střídání přisedlé a volné (plovoucí) formy života u prokaryot

Caulobacter crescentus

Sphaerotilus natans

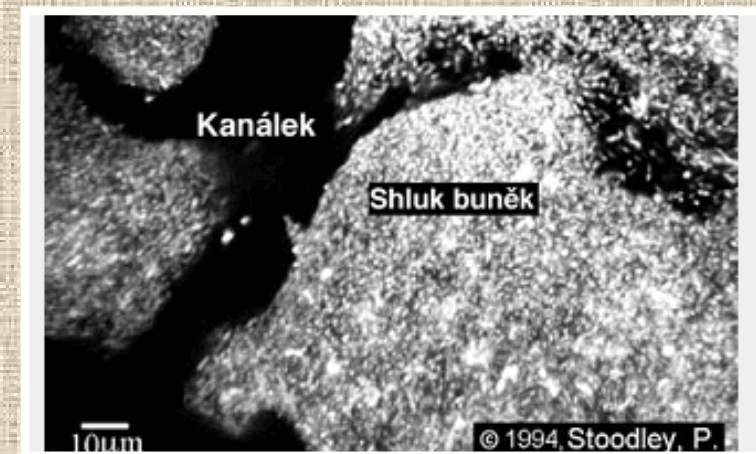
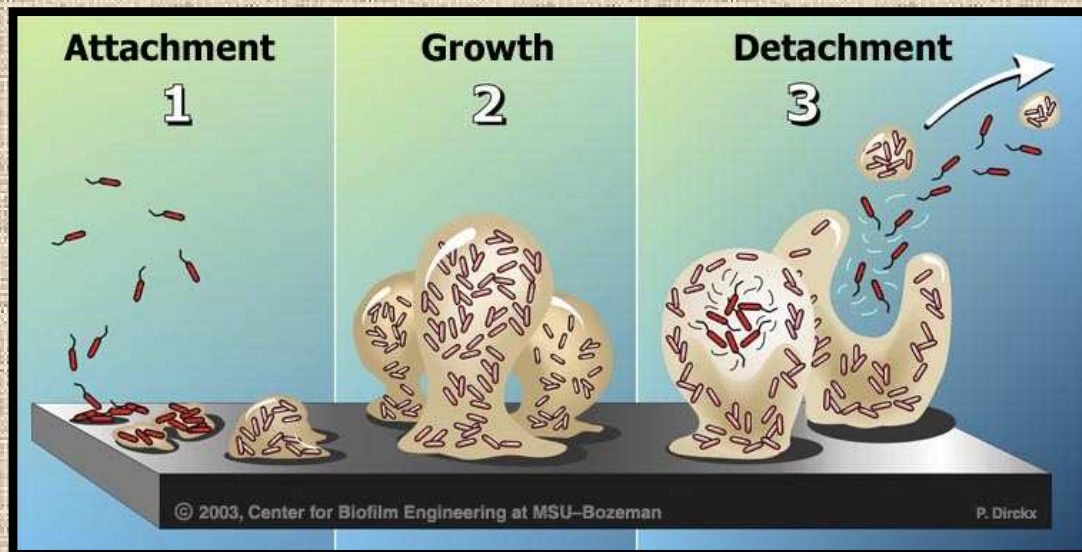
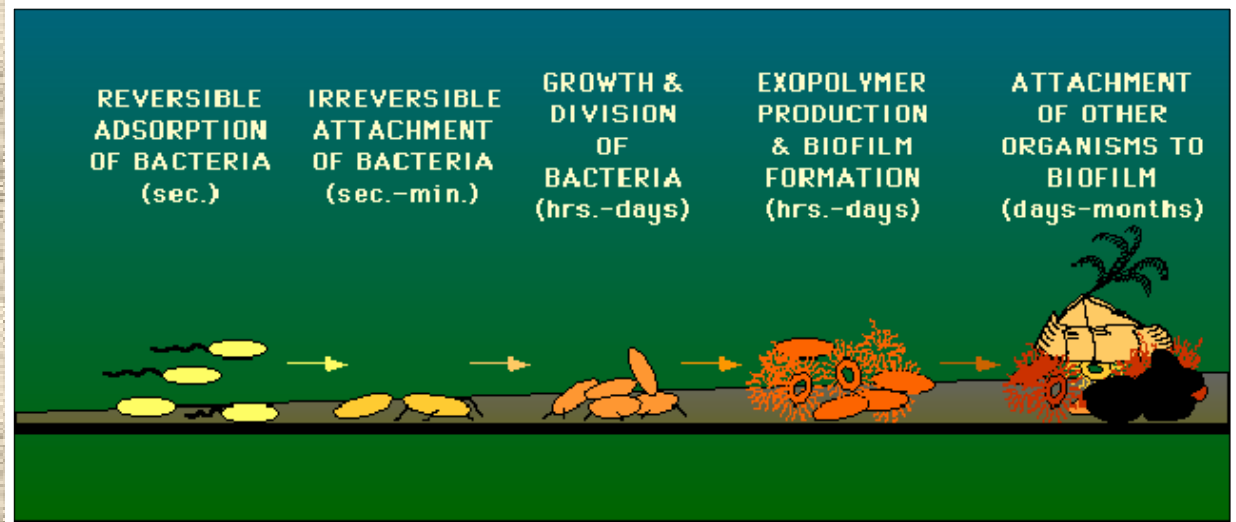
biofilmy

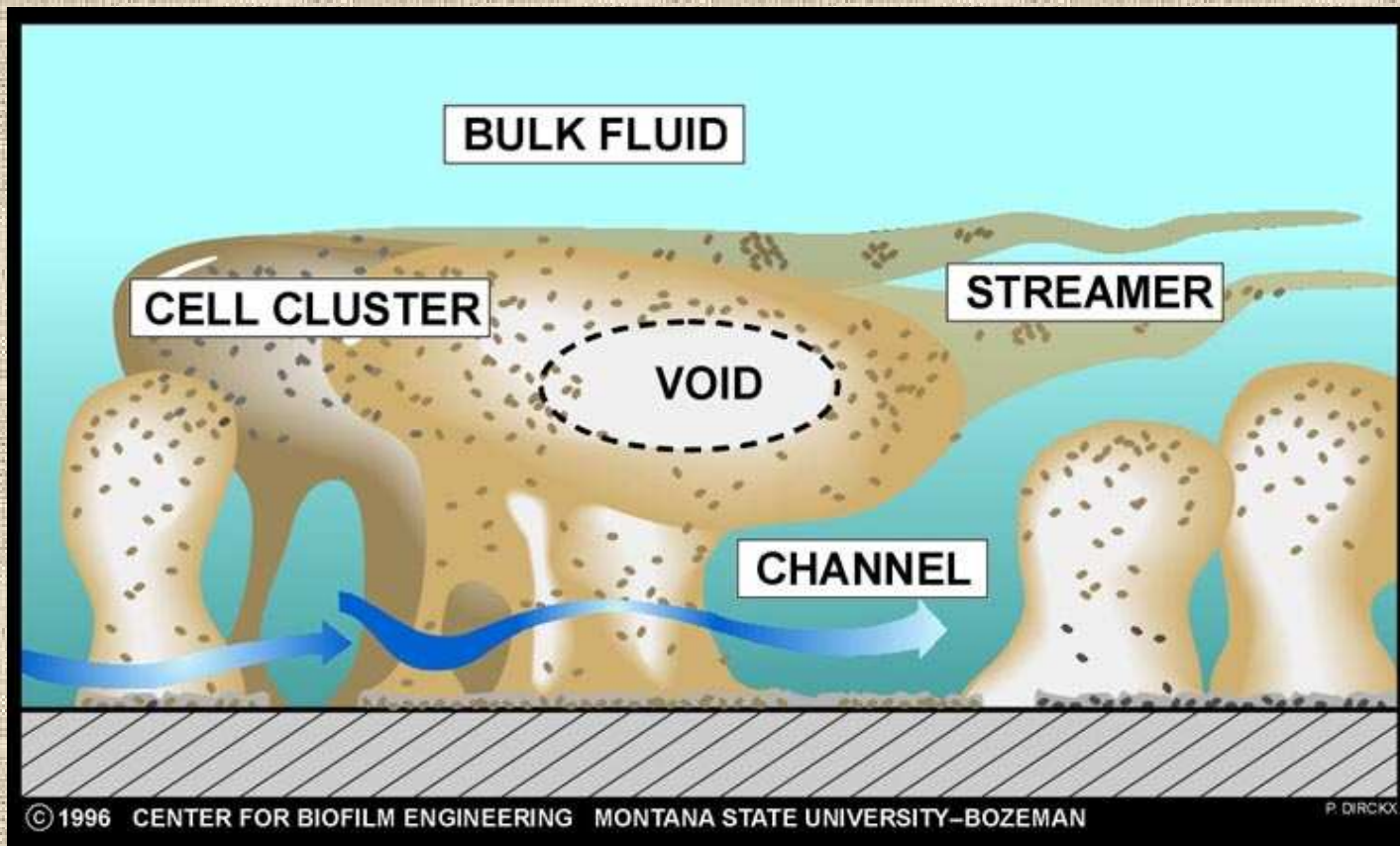


Biofilm

*Tekuté prostředí
a pevné povrchy*

- přirozené prostředí, průmysl, těla živočichů





- Vznik biofilmu – přizpůsobení přisedlému způsobu života:

Mechanismy adheze: adhesiny, fimbrie – curli, glykokalyx

Reverzibilní – van der Waalsovy síly – slabé vazby buňka-povrch

Irreverzibilní – chemická vazba (kovalentní, vodíková)

- přítomnost extracelulárních polymerů

Změna fenotypu - ustává syntéza bičíků, mukózní látky

Ps. aeruginosa – alginát

- Spouštěcí podněty:

Osmotický tlak

Snížený obsah kyslíku

Rostoucí hustota poulace - **quorum sensing** – malé mlk.

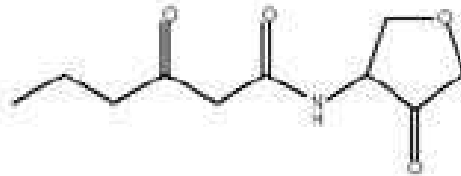
- pro maturaci biofilmu a virulenci

např: acyl-homoserin lakton (G-), malé peptidy (G+)

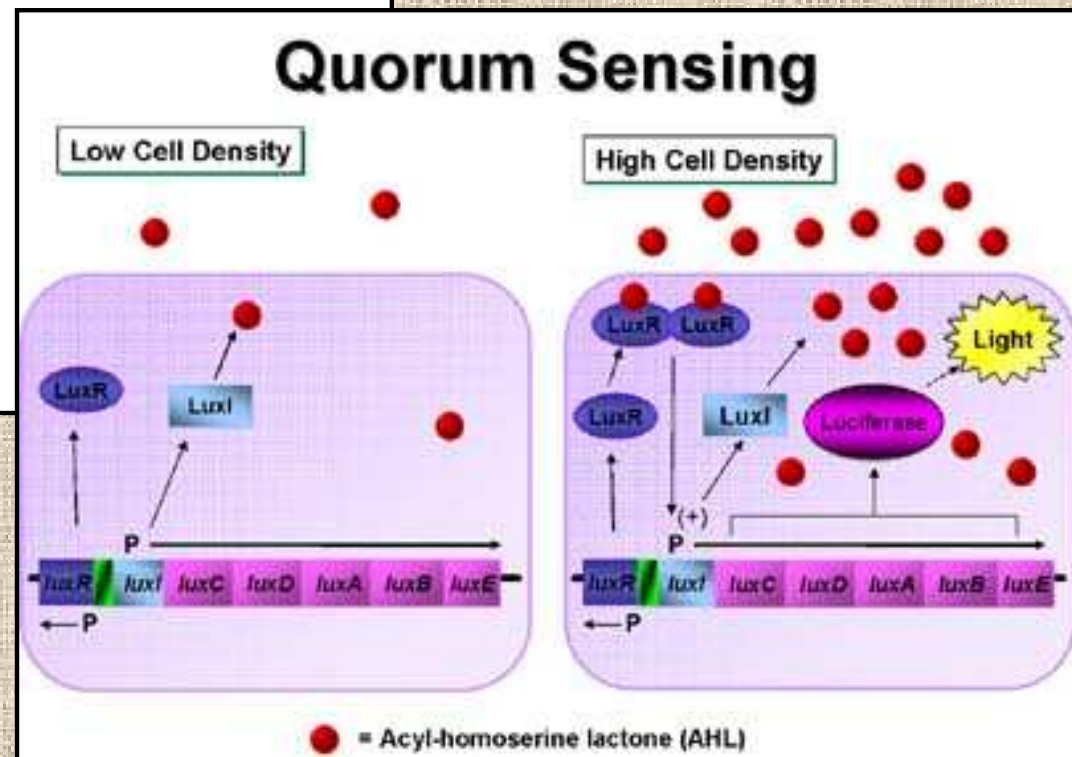
Quorum – sensing - regulace luminiscence u *Vibrio fischeri*



Quorum sensing was first discovered in the 1970s in the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, a facultative symbiont of marine animals (such as *Euprymna scolopes*)

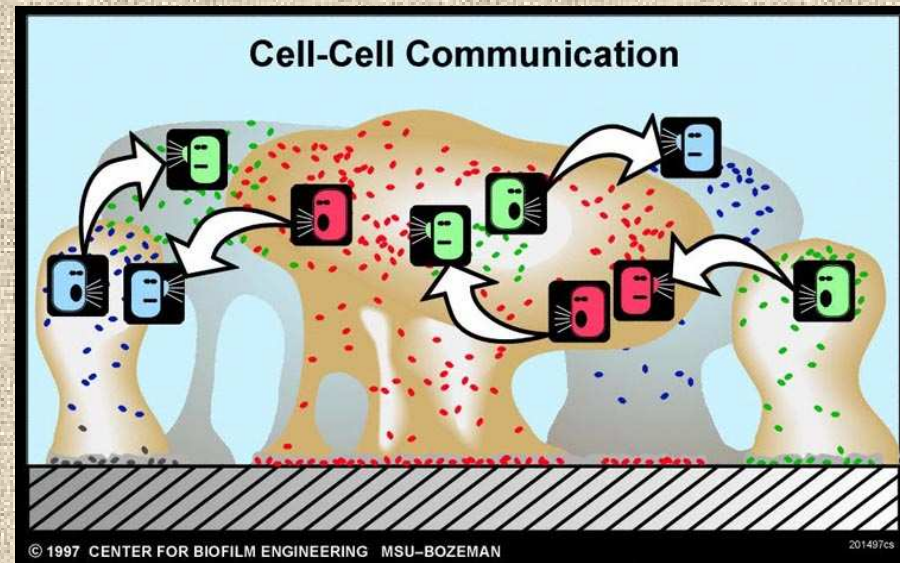


3-Oxohexanoyl homoserine lactone (3OC6HSL or AHL) is the acyl-homoserine lactone (AHL) produced by LuxI and recognized by LuxR in *Vibrio fischeri*



Quorum - sensing

- Soustava malých organických molekul, které jsou buňkou tvořeny v závislosti na koncentraci jich samotných v prostředí
- Buňka tak reaguje na hustotu populace
- Kaskáda reakcí po vazbě na receptor spouští syntézu sekundárních metabolitů a komunikaci v rámci bakt. společenstva
- Vnitrodruhová organizace komunity



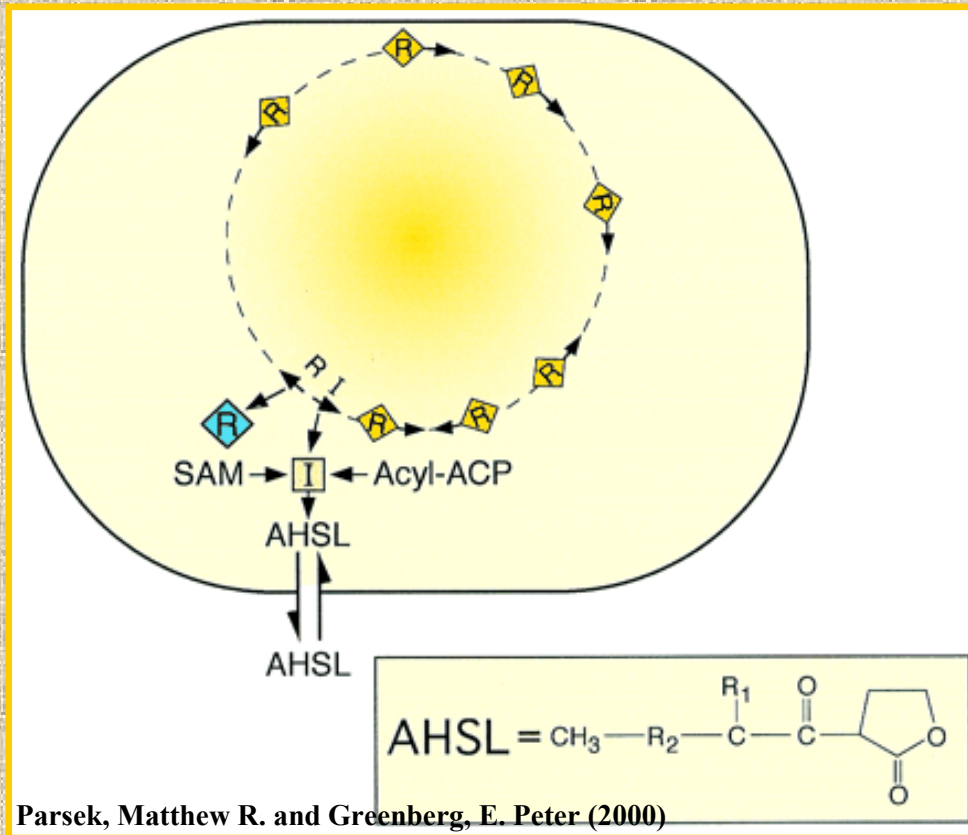
P. aeruginosa: **acyl-homoserin lakton**

(LasI/LasR and RhII/RhlR) systém

- Monitorování hustoty populace
- Specifické receptory a syntetázy (Lux I)
- Různé LuxI produkují různé formy ASHL
- Liší se v **R1 a R2** pozicích postr. Řetězce
- Koncentrace ASHL v buňce dána koncentrací těchto molekul v prostředí
- Význam pro ekologii buněk ale i virulenci

- Ekonomie buňky: produkce extracelulárních signálů až nad určitou hustotou populace
- Načasování rozmístění faktorů virulence v hostiteli je kritický bod – patogen se může hromadit bez vykazování faktorů virulence
- Více než 4% z téměř 6 000 genů *P. aeruginosa* jsou regulována pomocí quorum - sensing

Acyl-homoserin lakton (AHSL) quorum-sensing cyklus



Parsek, Matthew R. and Greenberg, E. Peter (2000)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8789-8793

- I = acyl-HSL syntetáza (LuxI homolog)
- LuxR konformace

AHSL

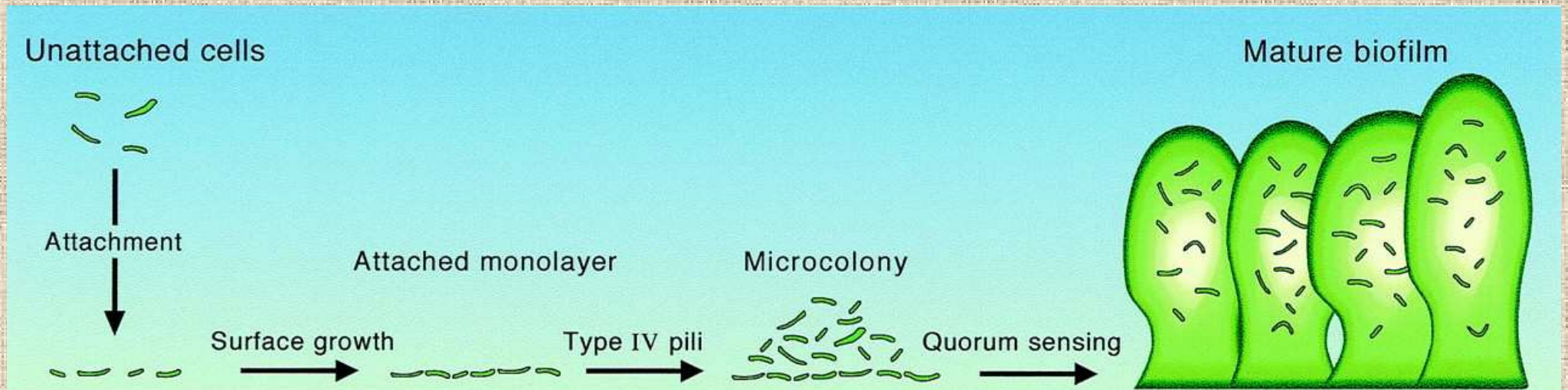
R_1 : H, OH, O

R_2 : $(\text{CH}_2)_{2-14}$

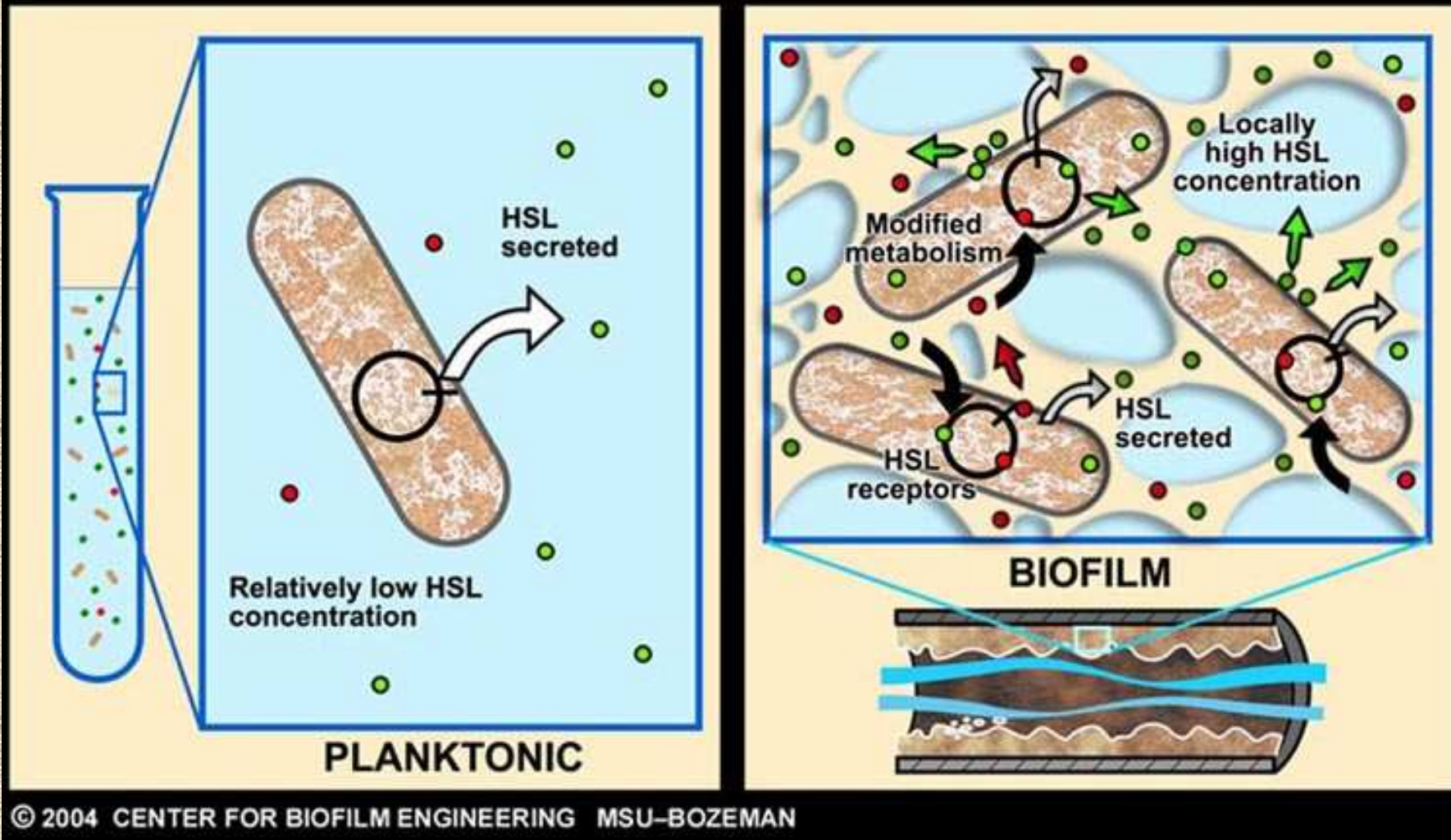
$(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2)$

- Žluté diamanty v kruhu: LuxR homology aktivované HSL signálem – difuze do a ven z b.
- Šipky: *qsc* genes.
- Substrát pro HSL syntázu je acetylovaný acyl-karyl protein (Acyl-ACP) a *S*-adenosylmethionine (SAM).

- Nízká hustota populace produkuje určitou kvantitu ASHL molekul
- Různé transkripční faktory *gsc* genů jednotlivých cyklů aktivovány různými formami ASHL po dosažení jejich urč.koncentrace
- Kaskáda reakcí pro spuštění produkce sekundárních metabolitů: HCN, pyocyanin

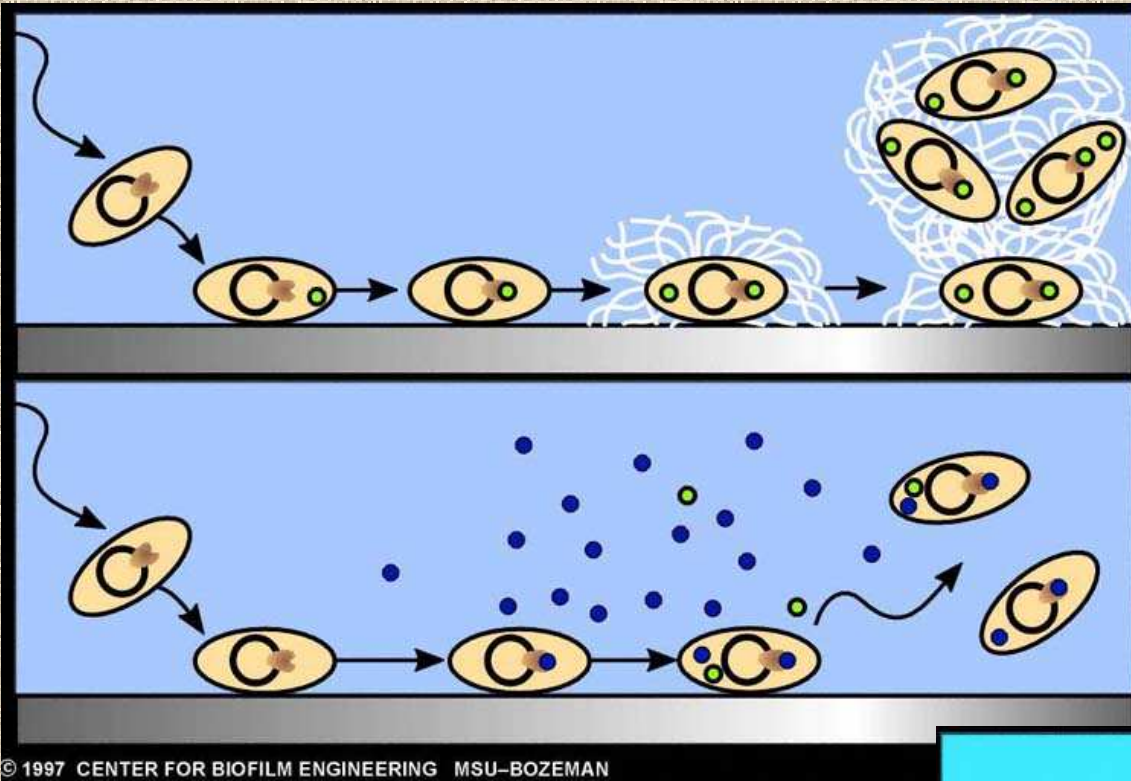


Quorum Sensing

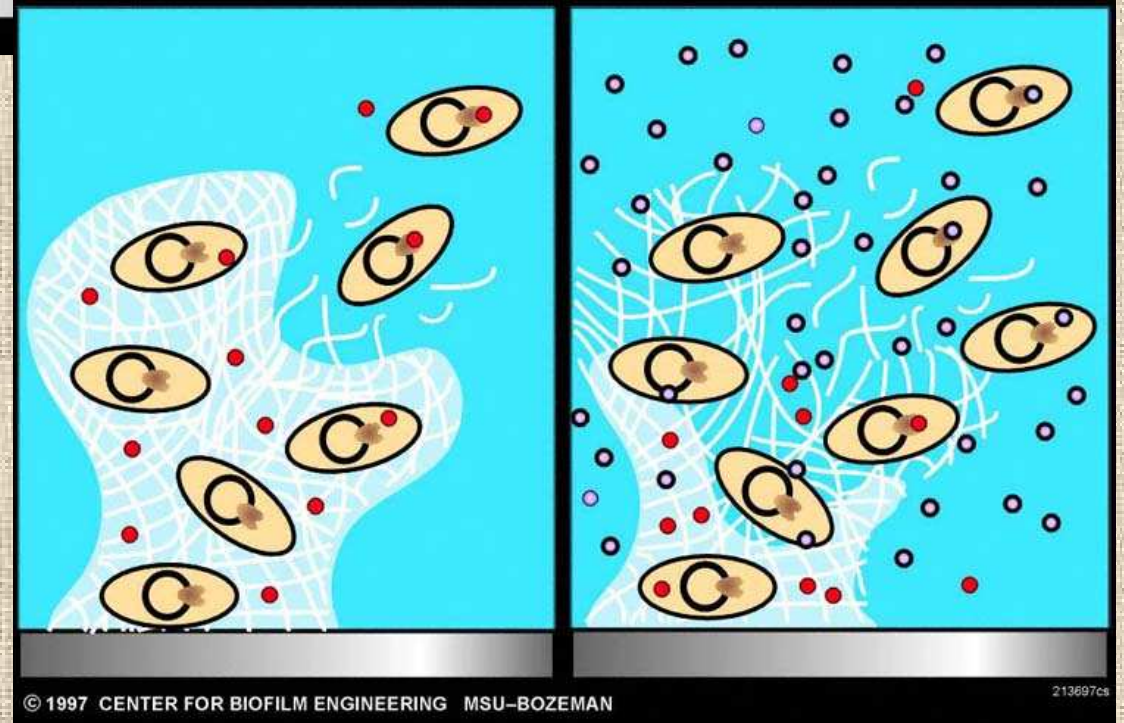


- Acyl-homoserin lakton (G- bakterie)

- *Kontrola procesu tvorby biofilmu*



- *Zvýšení uvolňování buněk ze zralého biofilmu*

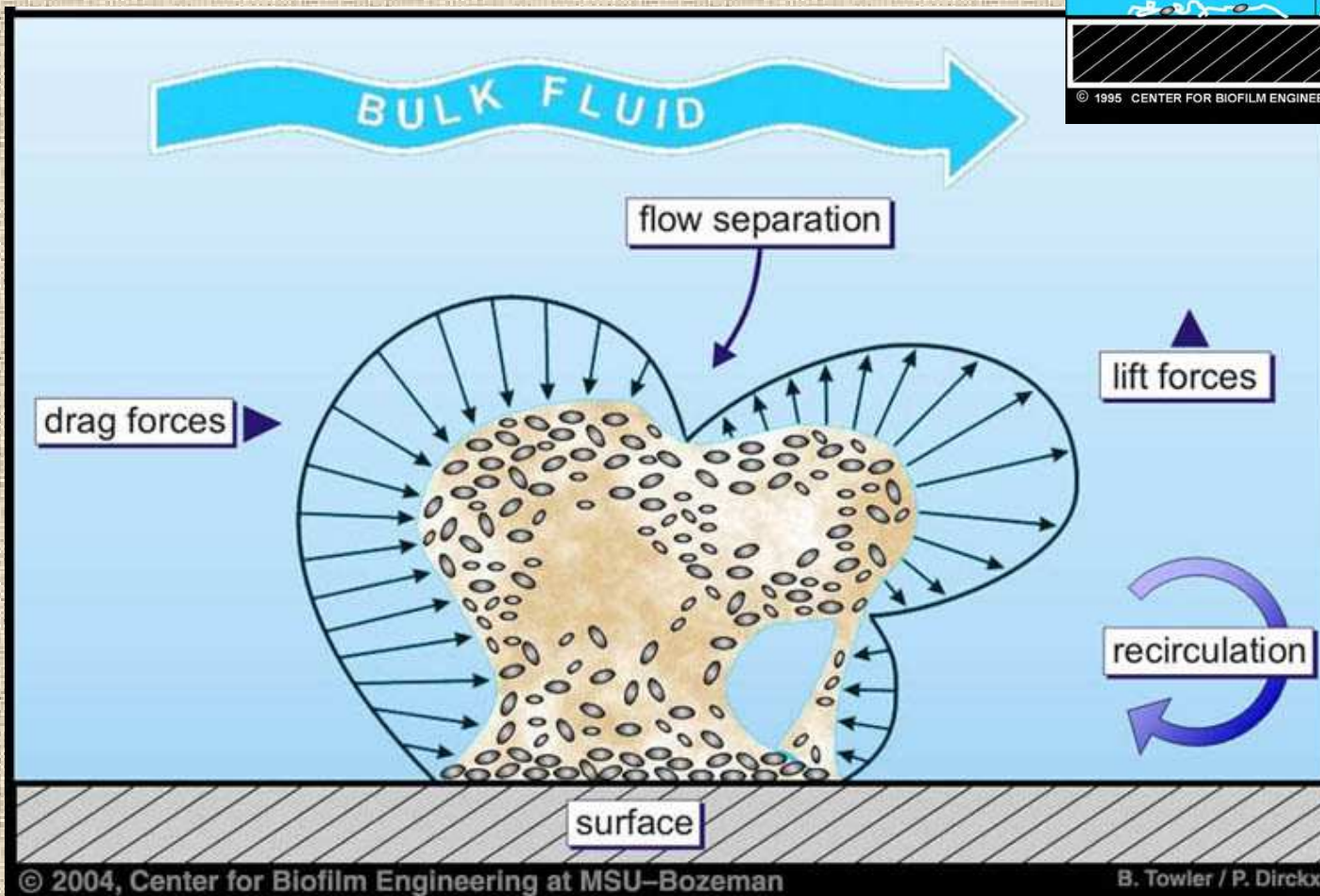
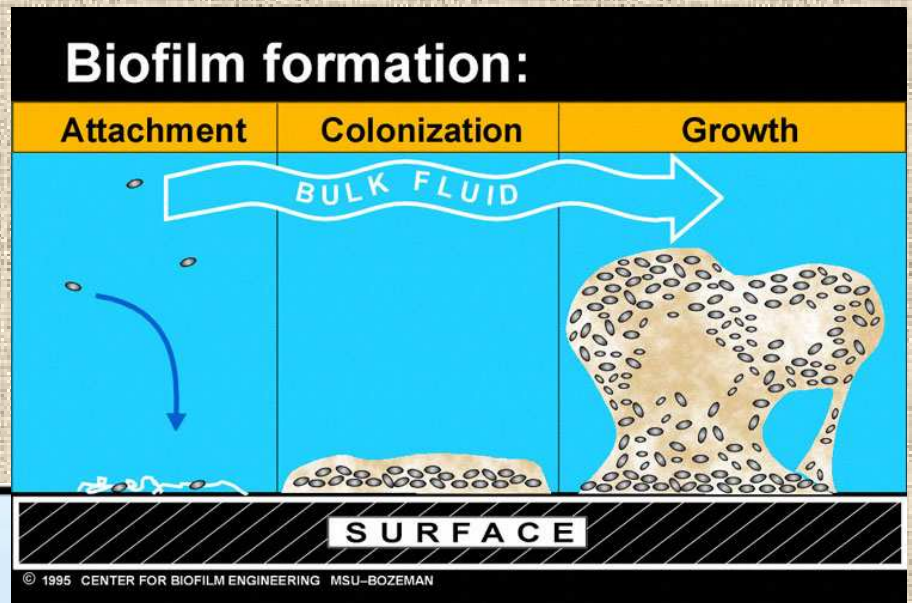


- **Zásah při terapii biofilmů:**

Studium mutací genů *gsc*:

**= Studium narušení formování
biofilmů – ty pak přístupnější
ATB a dezinfekci**

- *Hydrodynamické síly*
- *Turbulentní proudění*



- Zvláštnosti biofilmu

Přenos genů mezi buňkami až 1 000x větší

Vyšší rezistence k ATB a dezinfekci (H₂O₂, chlor)

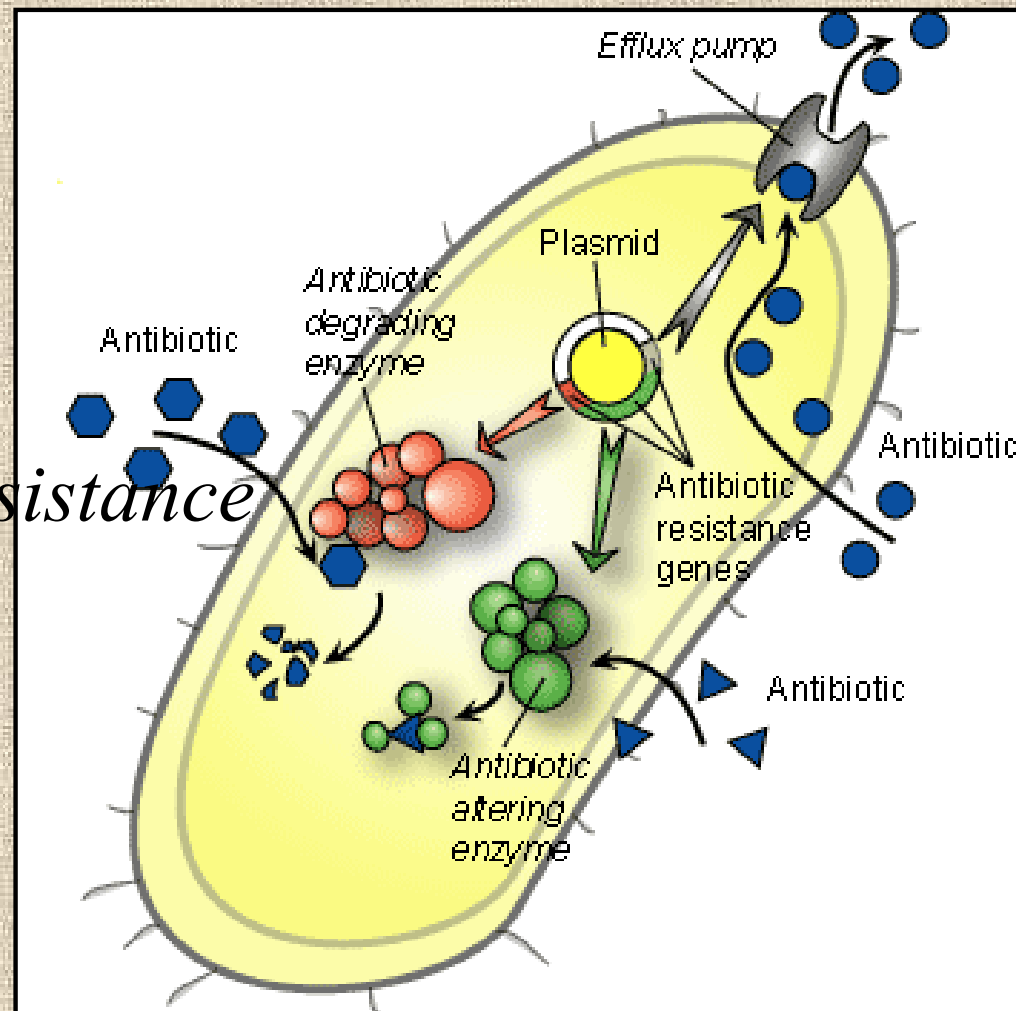
- omezená difúze
- sorpce ATB
- klidový stav, hladovění
- změna genotypu:

geny mar – multiple ATB resistance

- efflux systém
- enzymatická degradace
- modifikace cílových mlk

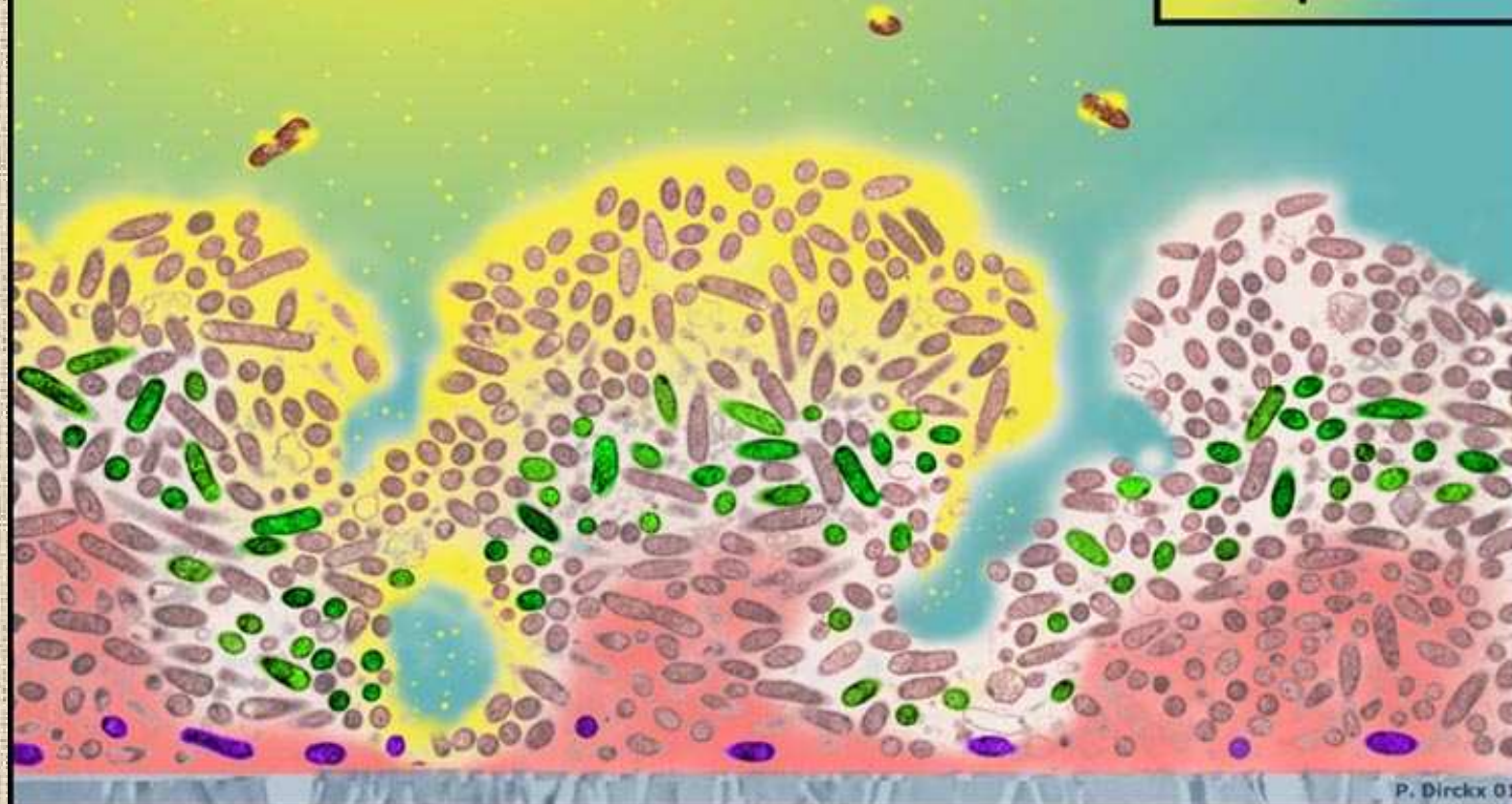
Sigma faktory

Signální mechanismy



Mechanisms of Biofilm Tolerance

Antimicrobial
Depletion



P. Dirckx 01

Slow
Penetration

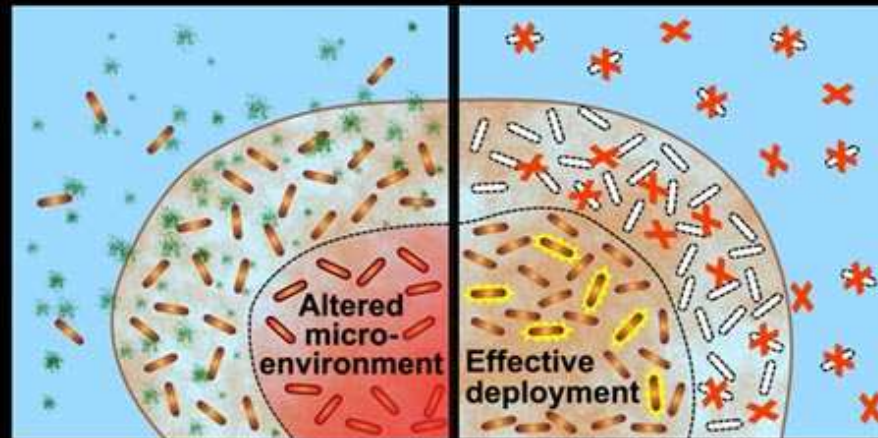
Stress
Response

Altered
Microenvironment

Persisters

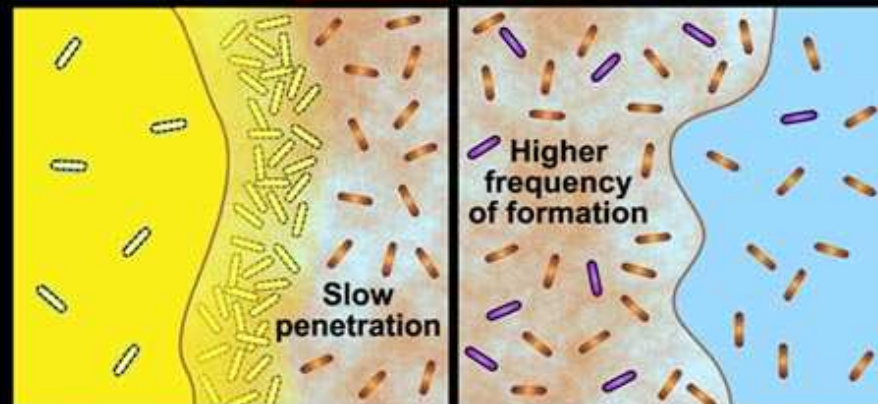
Biofilm multicellularity results in better bacterial defenses

Nutrient depletion creates zones of altered activity.

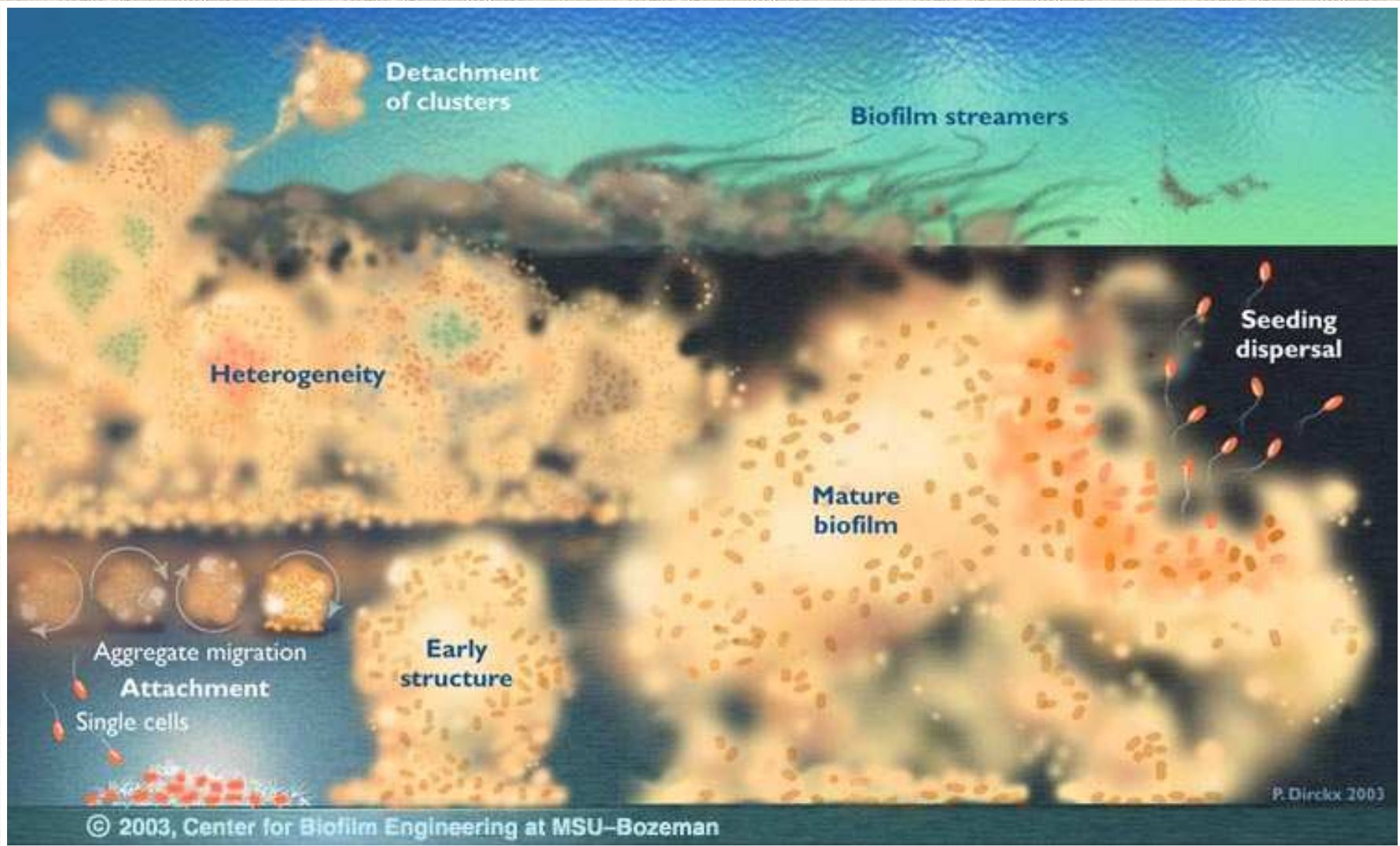


Inner layers of biofilm cells have more time to initiate stress response.

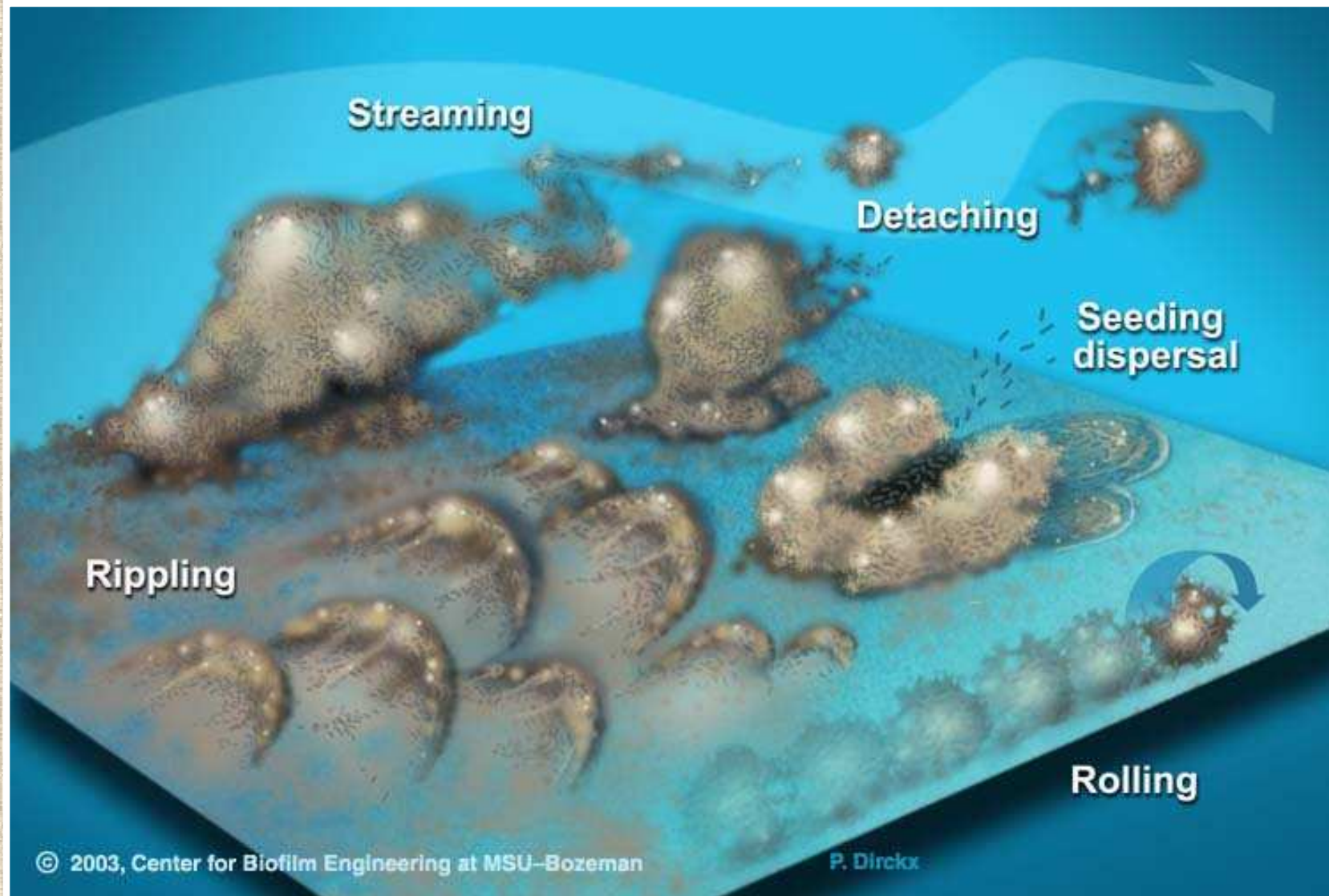
Outer layers of biofilm cells absorb damage.



"Persister" cells may be present in higher numbers.



Heterogenita struktury biofilmu



Biofilms Impact . . .



Teeth



Drinking Water



Oil Recovery

Cooling Water

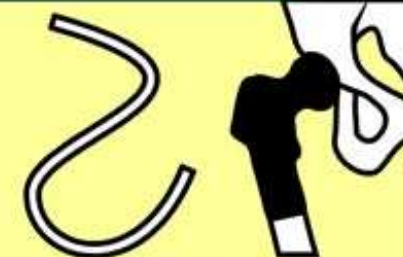


Food Processing

Ship Hulls



Paper Manufacturing



Medical Implants

Biofilm a medicína

- Zubní povlak
- Zdroj infekce:

Cévký – arteriální, žilní, močové

Dýchací a dializační přístroje

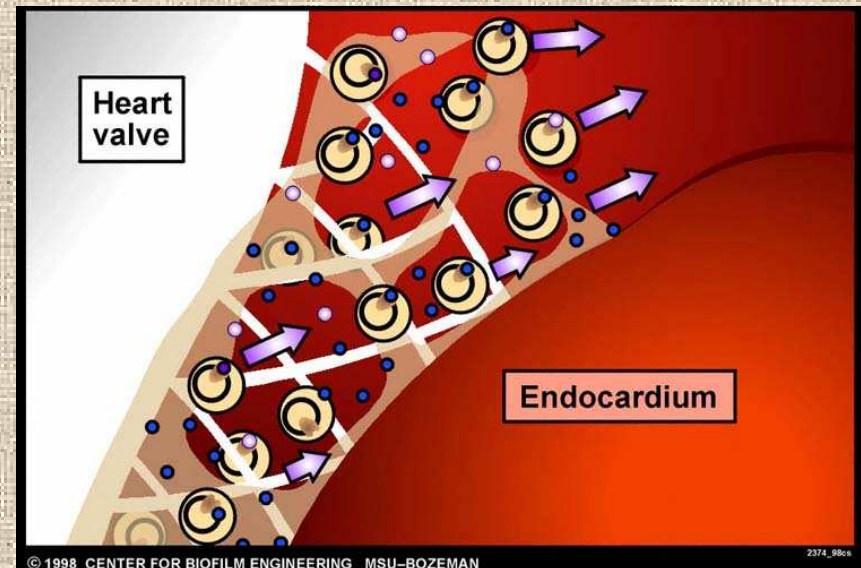
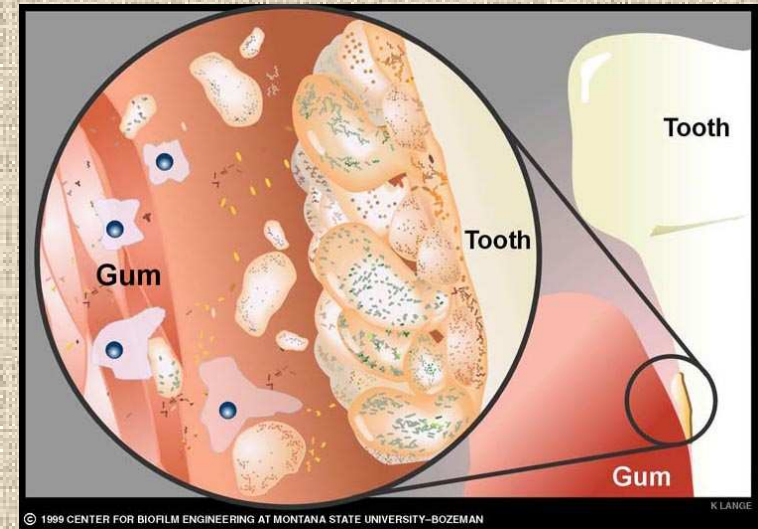
Umělé chlopně

Kontaktní čočky

Děložní tělíško

Chronické infekce

cyst.fibróza, chronická obstrukční plicní nemoc



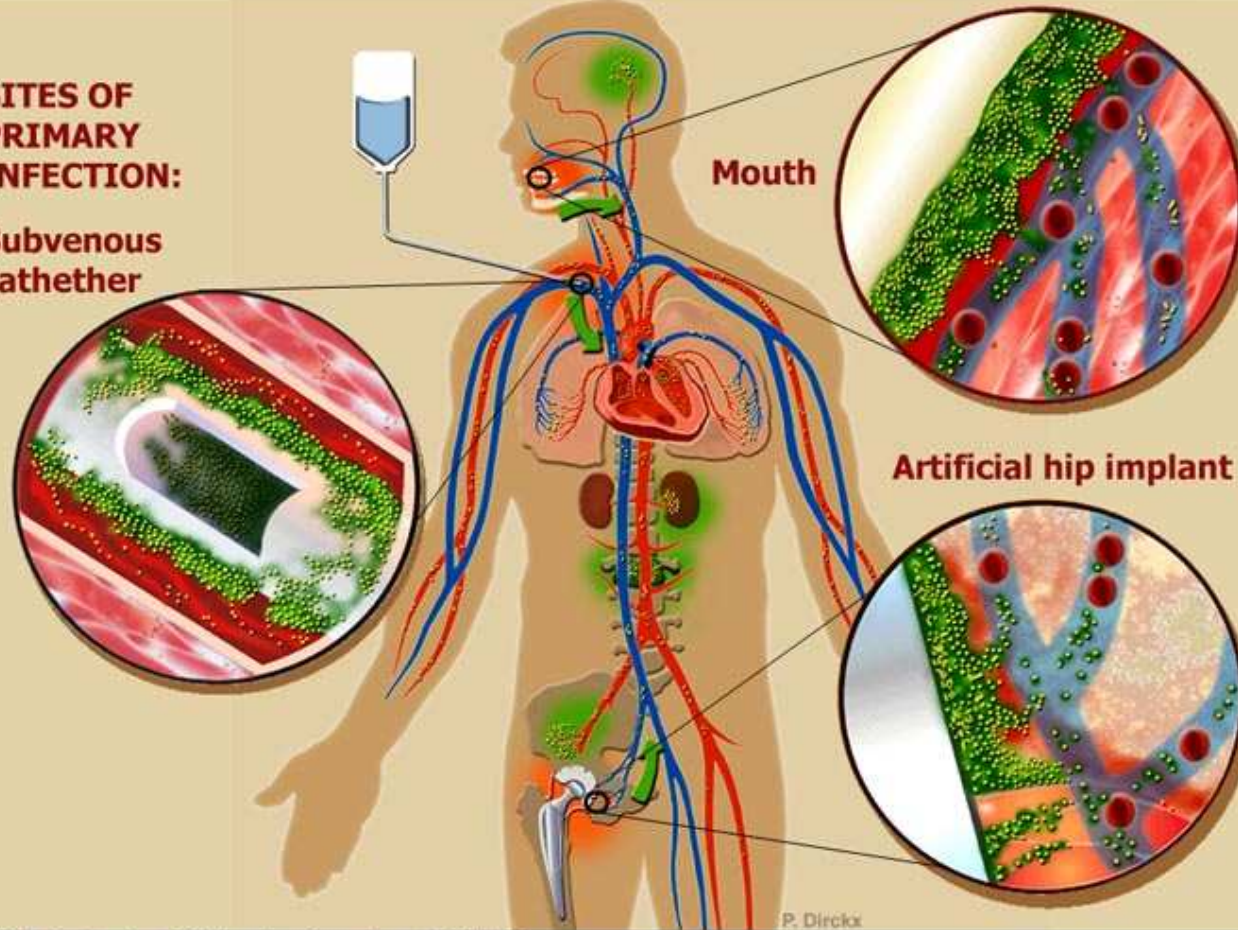
Sites of **Primary** and **Secondary** Biofilm Infection

**SITES OF
PRIMARY
INFECTION:**

**Subvenous
catheter**

Mouth

Artificial hip implant



- *Imunokomprimovaní – kolonizace alveol*
- *Biofilm nespouští imunitní odpověď*
- *Až kalcifikace alveol*



Laboratoř

Vlastnosti buněk

Experiment:

Escherichia coli kultivace v tekutém mediu

statická - planktonicky

kontinuální - v povlaku

Selekce mutanty se záměnou jediné
aminokyseliny v regulační bílkovině
hyperprodukce *curli*

J.Schroda

Experiment:

Pseudomonas aeruginosa – alginát

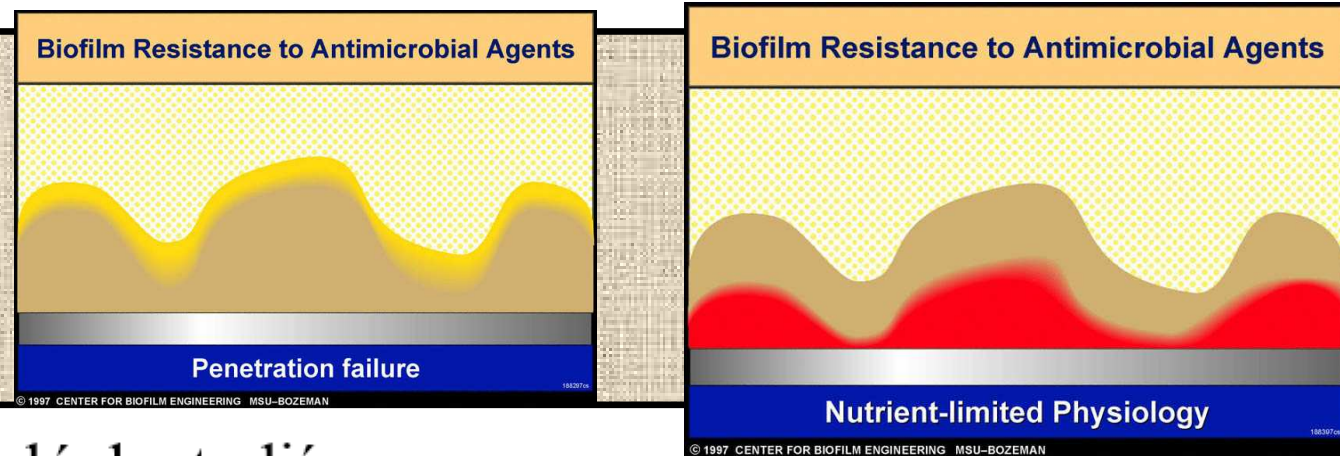
- označení genu pro syntézu alginátu
β-galaktozidázovým operonem - *indikační gen*
→ současně se syntézou alginátu se syntetizuje
i β-galaktozidáza → štěpení laktosy v půdě →
barevný indikátor → změna barvy
- Hyperprodukce β-galaktozidázy = hyperprodukce
alginátu

Závěr: Při tvorbě biofilmu nadprodukce
alginátu se zvýšenou rychlostí

J.Schroda

Výhody přisedých stadií

- lepší dostupnost a využitelnost substrátu
- ◆ adsorpce makromolekul a malých hydrofobních molekul na povrch
- ◆ lepší využitelnost koncentrovaných živin
- ochrana před inhibičními účinky antibakteriálních látek (antibiotika, chlor, těžké kovy)
- ochrana před bakteriofágy a parazitickými bakteriemi



Nevýhody přisedých stadií

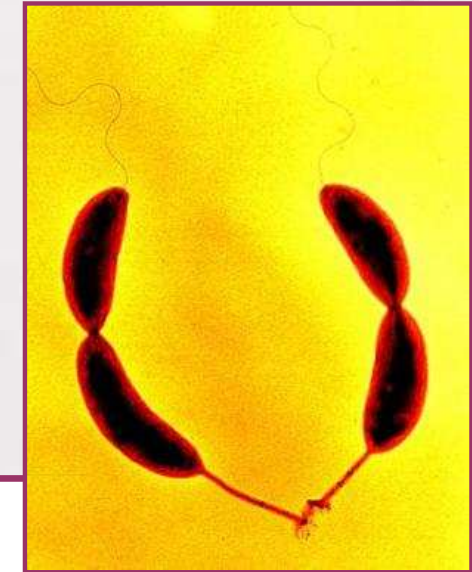
- sedimentace, vyčerpání živin a neschopnost kolonizovat nové, vhodnější prostředí
- konzumace substrátu (částic) zooplanktonem
- vznik gradientů – živiny, kyslík

Přisedlé bakterie

- pučení – pupen je syntetizován de novo, včetně buněčné stěny
- stélka – neživá struktura vylučovaná buňkou a rostoucí z buňky
- prostéka – prodloužení buňky, obsahuje plazmatickou membránu a buněčnou stěnu
- ◆ u kaulobakterů může být až 10x delší než buňka



Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*



Stádia růstového cyklu

- 1. bičíkaté, volné stádium (swarmer cell) – nerostoucí, nepodléhá dělení
 - ◆ bičíkatá dceřinná buňka
- 2. stélkaté přisedlé stádium – reprodukční
 - ◆ „nezkušená buňka“ – ještě se nedělila (inexperienced cell)
 - ◆ „zkušená buňka“ – již „vyprodukovala“ dceřinnou pohyblivou buňku

- Životní cyklus závisí na jednotlivých krocích buněčné diferenciace a asymetrického dělení
- 3 700 genů

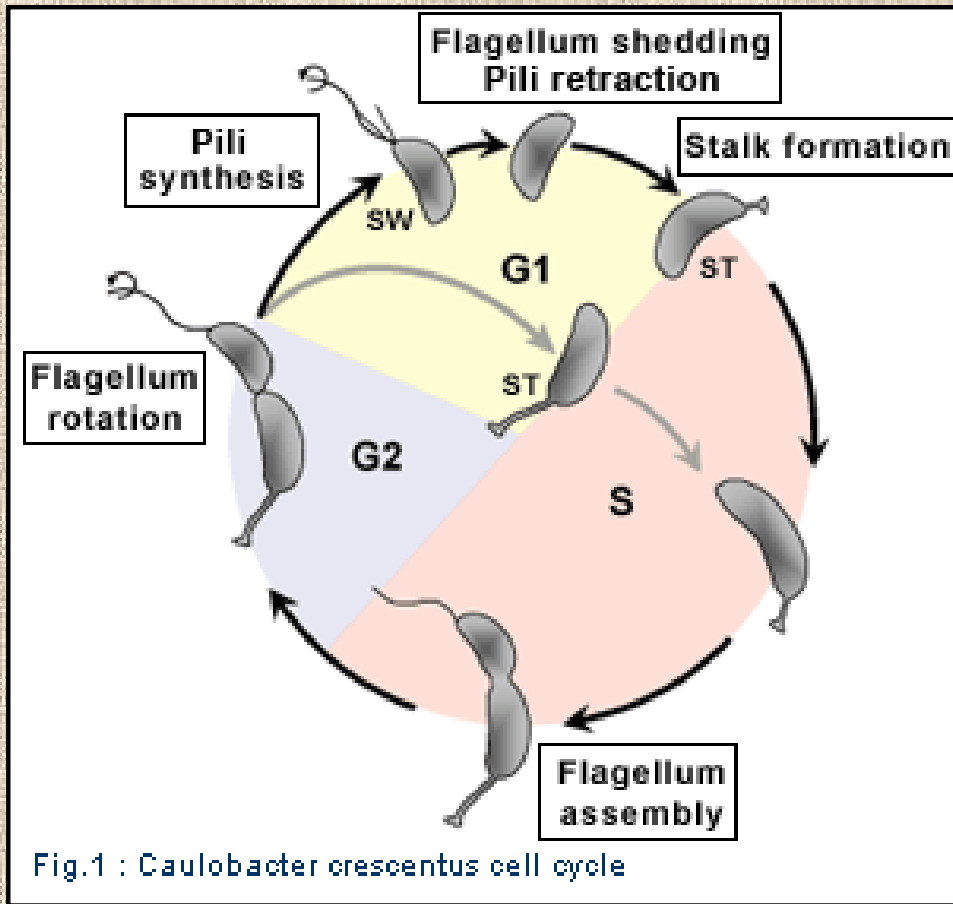
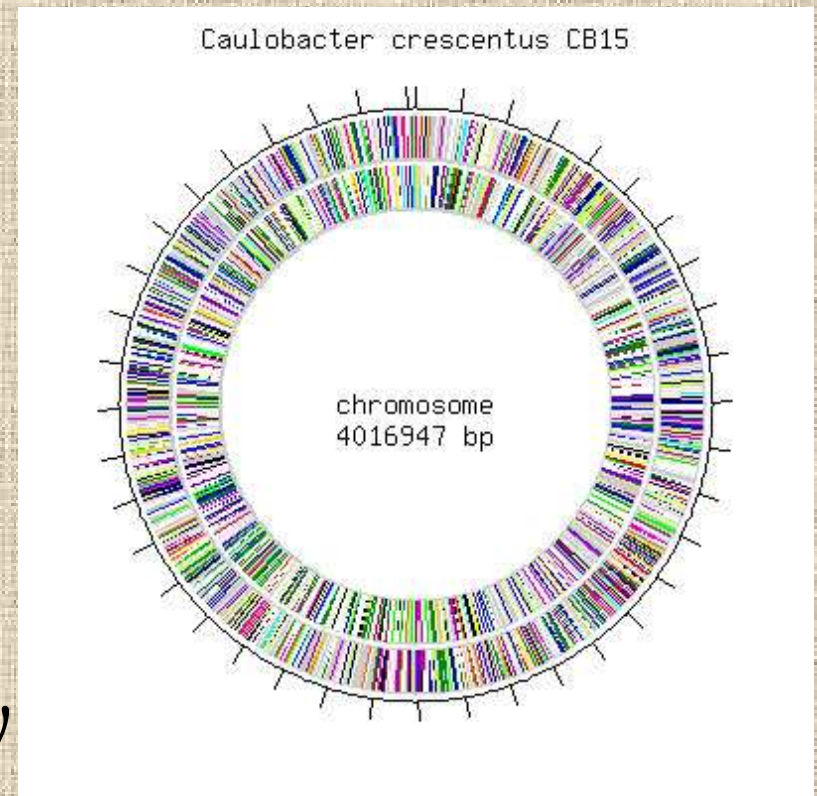


Fig.1 : *Caulobacter crescentus* cell cycle

- Každé buněčné dělení je asymetrické – vznikají dvě morfologicky odlišné buňky



Plovoucí bičíkatá buňka se **nereplikuje**

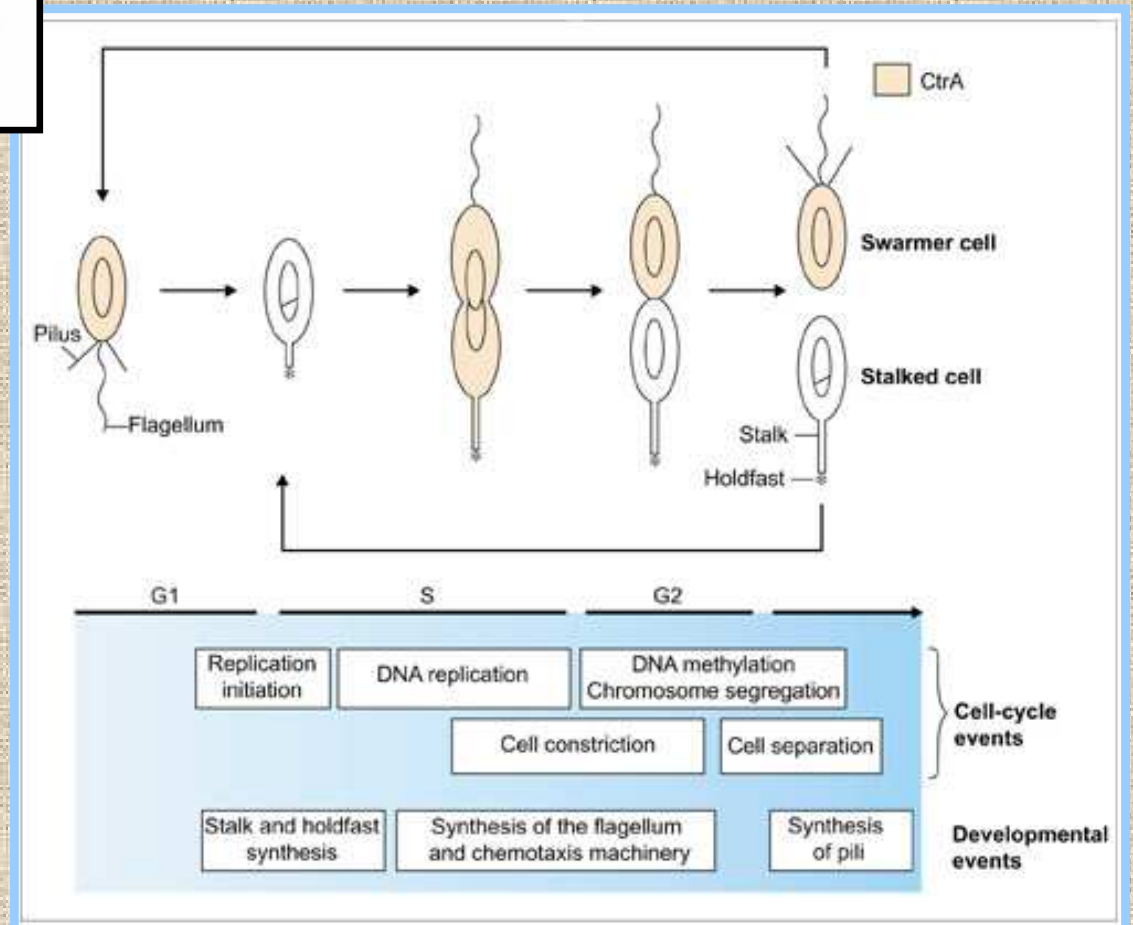
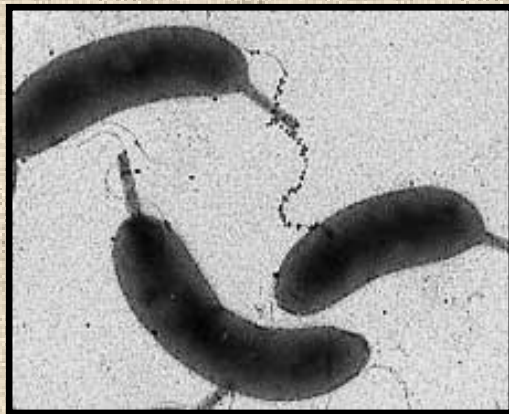
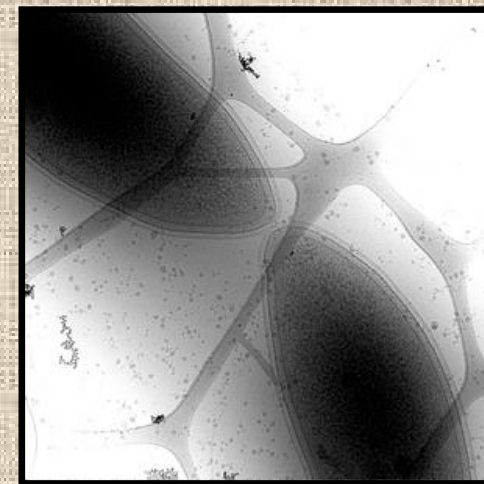
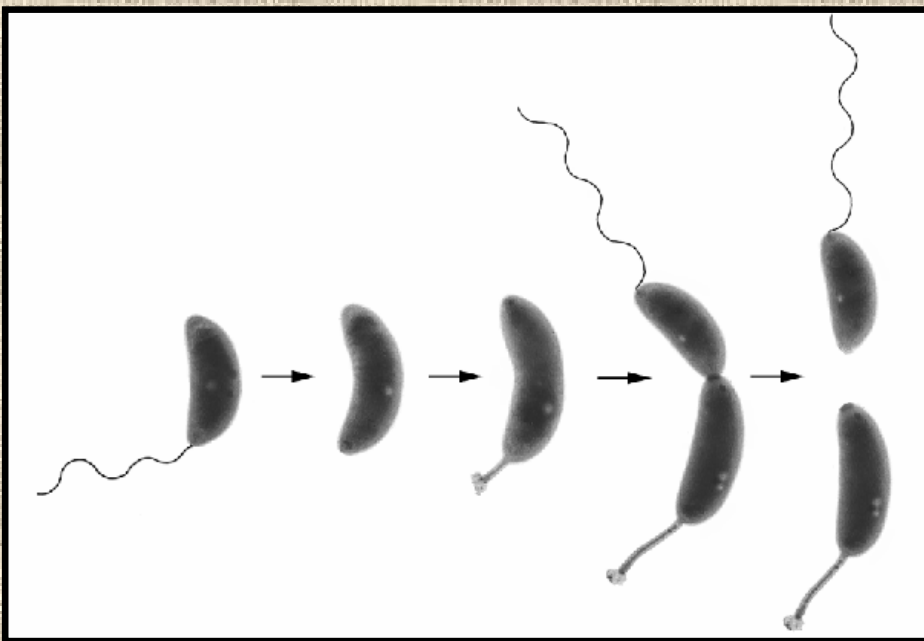
Pro replikaci buňky nutné
přisednutí a diferenciaci
ve stélkatou buňku.
Poté **iniciace replikace DNA.**



Během proměny dochází k
nahrazení bičíku a pilusů **polární stélkou**

Nezralá stélkatá buňka se **prodlužuje**,
syntéza **nového bičíku** na pólu proti stélce.

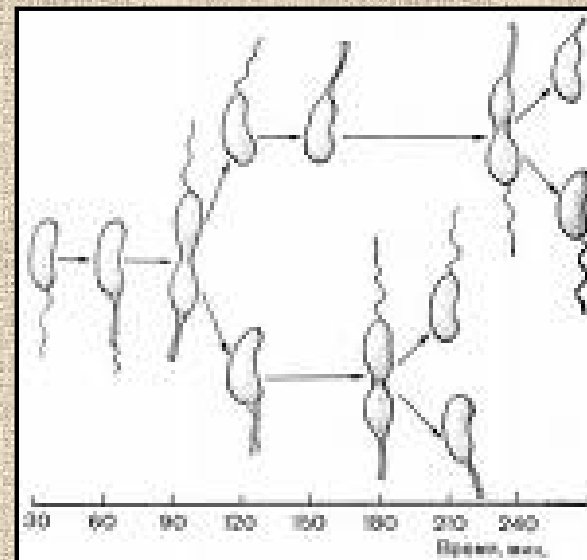
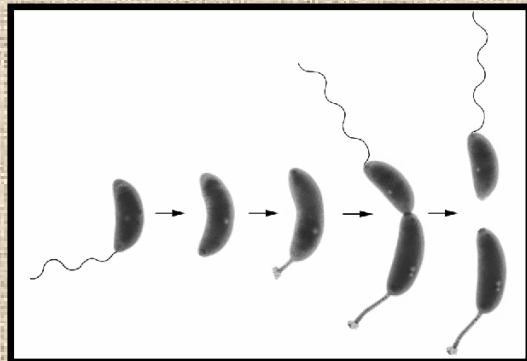
Každá morfologická změna je kontrolována dokončením
specifických kroků buněčného cyklu.

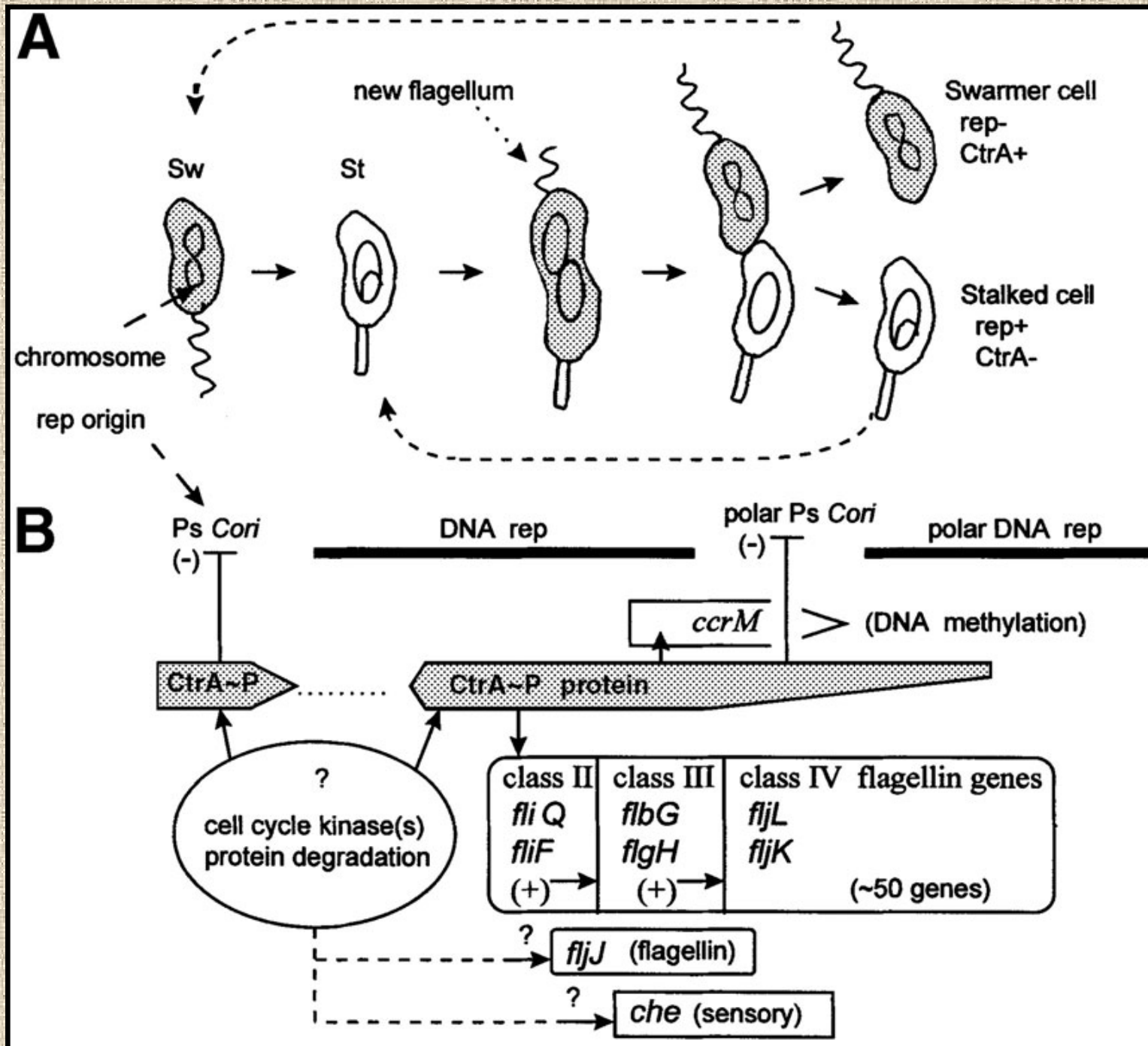


- Chemotaxe hraje roli u adherovaných buněk

- *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.



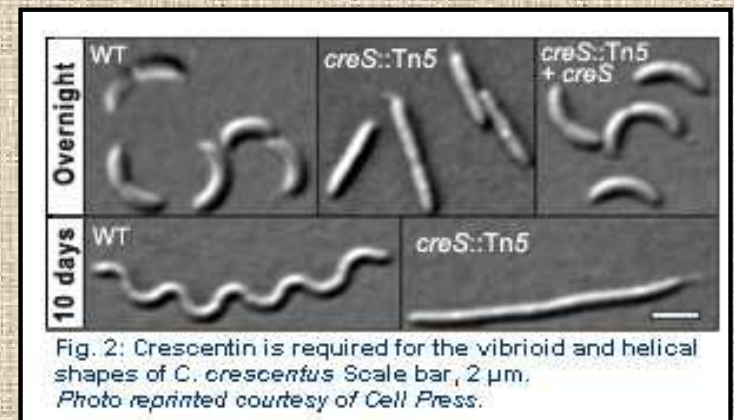


- Některé esenciální transdukční proteiny mění v průběhu cyklu buněk *Caulobacter* svou vnitrobuněčnou lokaci



Asymetrické umístění regulátorů cyklu –
= regulační systém přenosu signálů

- Strukturální analogy aktinu (MreB)
 - předurčení tvaru buněk *C. crescentus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*
- Protein buněčného dělení: FtsZ, je protipólem tubulinu (bakterie tedy vlastní struktury vláknitého cytoskeletu)
- Crescentin – podobný intermediálním filamentům – helixy a zakřivení *Caulobacter* – asymetrické samouspořádávání molekuly – tvar b.



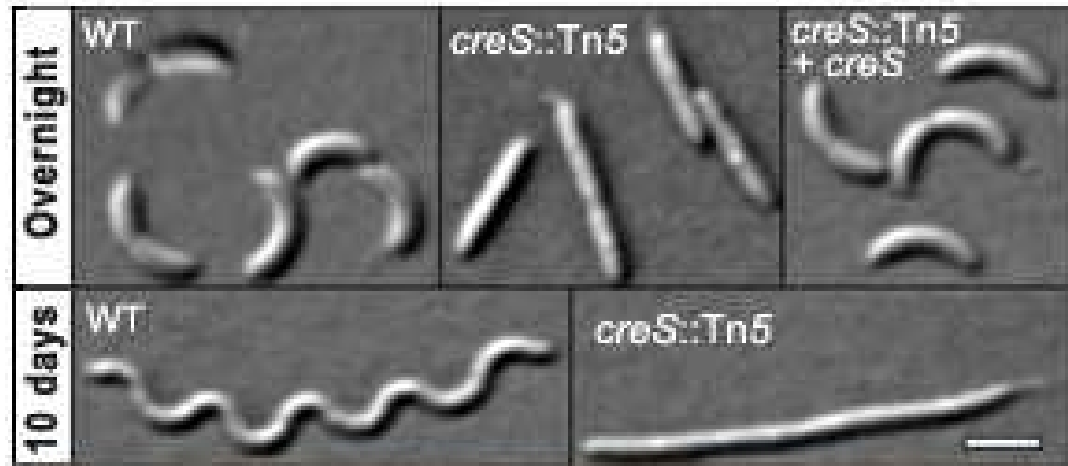


Fig. 2: Crescentin is required for the vibrioid and helical shapes of *C. crescentus*. Scale bar, 2 μ m.

Photo reprinted courtesy of Cell Press.

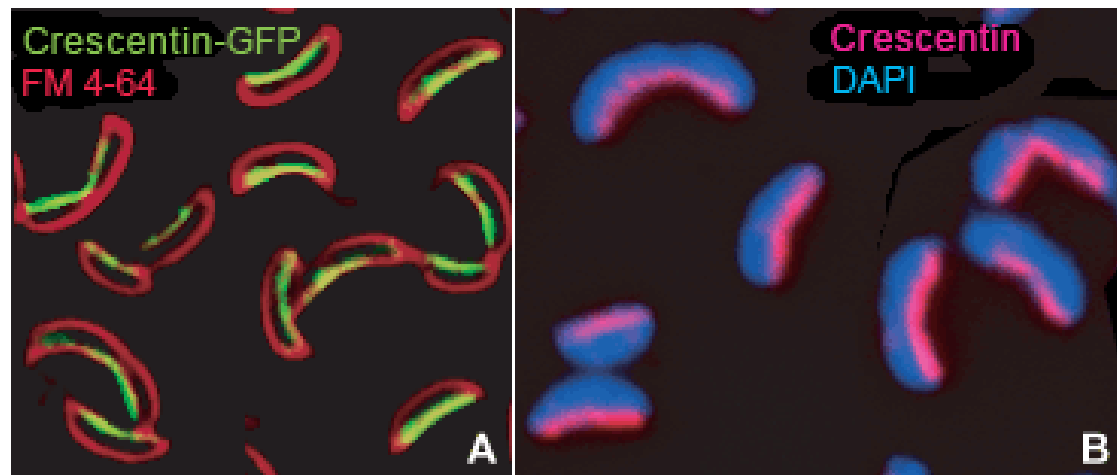
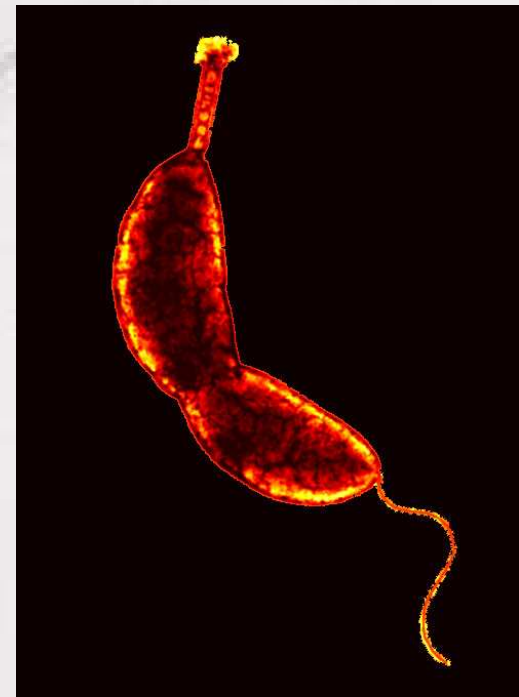


Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings.

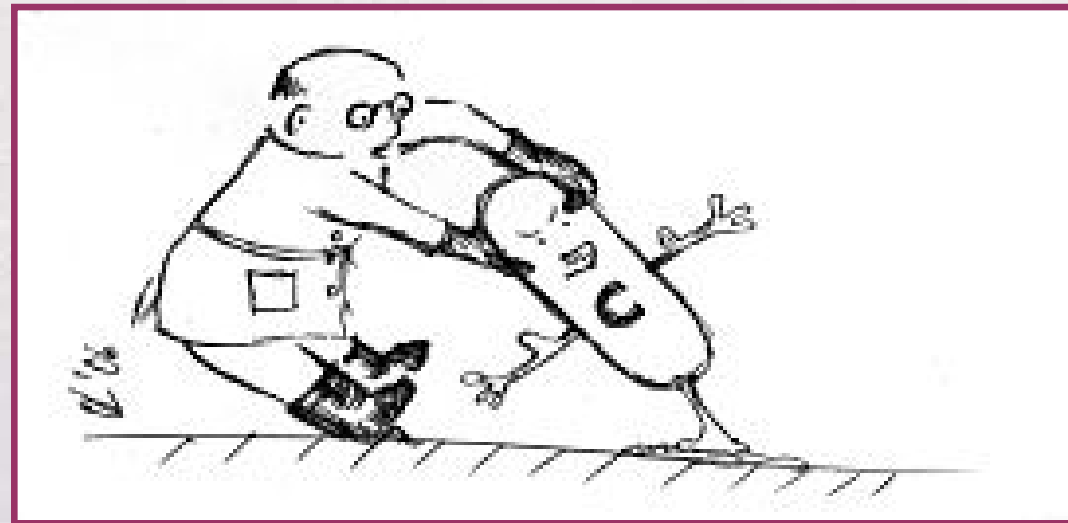
Photo reprinted courtesy of Cell Press.

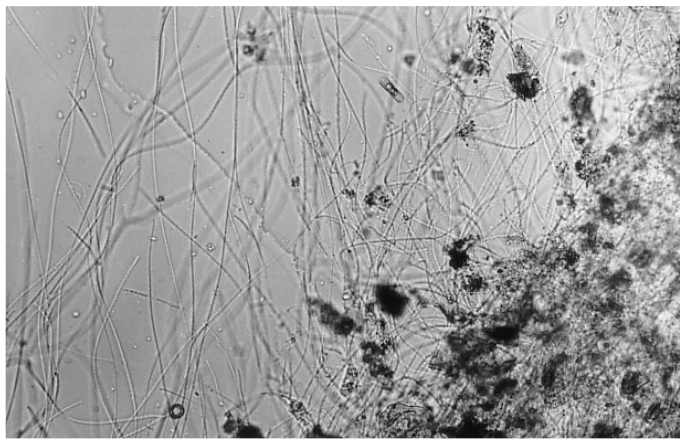


Zvláštnosti růstového cyklu

- růstová stádia se nutně střídají, žádné není alternativou, která se nemusí realizovat (viz klidová stádia)
- mateřská buňka je v jistém slova smyslu „nesmrtelnou buňkou“, která produkuje velké množství dceřinných buněk (na rozdíl od konvenčního dělení, kde nelze striktně odlišit mateřskou a dceřinnou buňku)

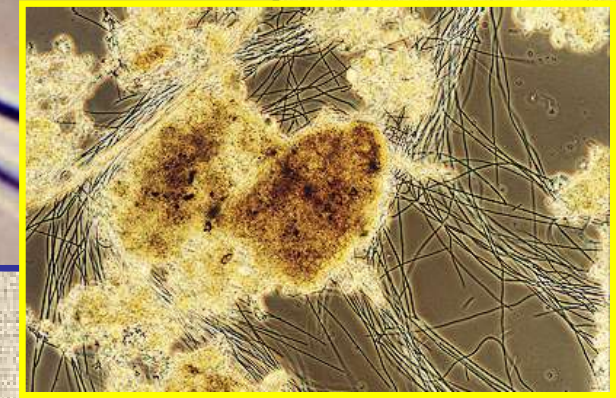
- *Caulobacter crescentus* je modelovým organismem pro studium diferenciace u prokaryot
- velmi intenzivně studován
- genom





Sphaerotilus natans

- Tekoucí vody
- Papírenské vody
- Kaly
- Aktivované kaly

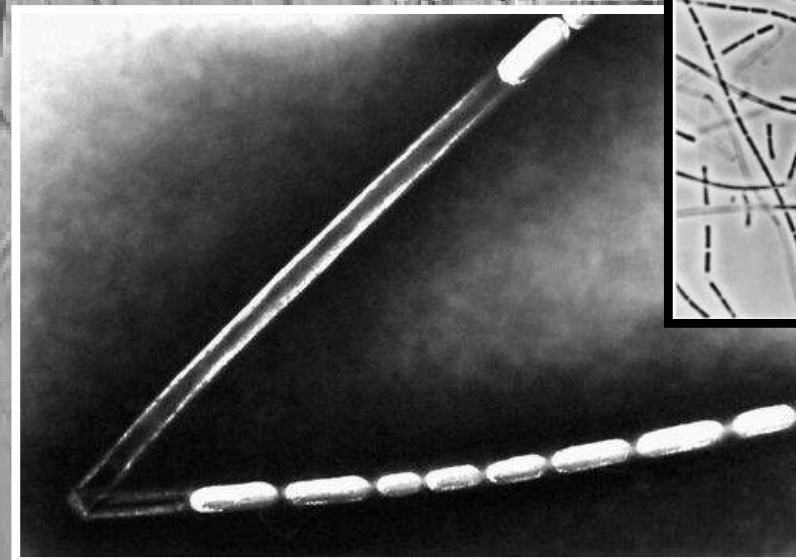
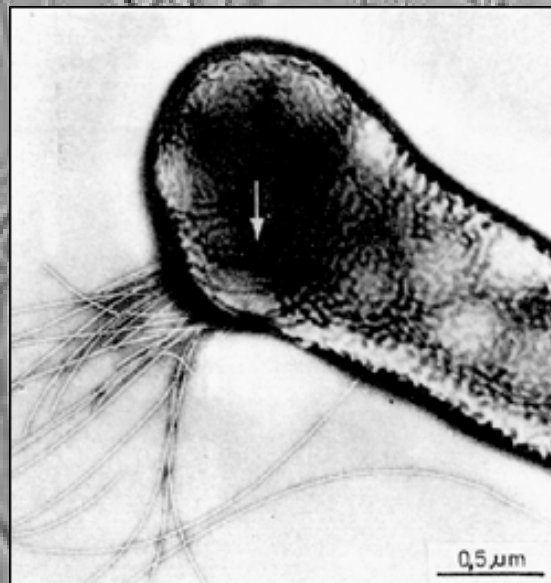


-  Degradace pochev – bacillus - enzym

Some of the cells are irregularly curved, and some have thick ellipsoidal spores (arrows). From Takeda *et al.*

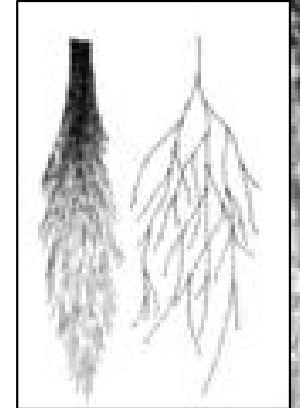
Životní cyklus *Sphaerotilus natans*

- není zdaleka tak podrobně prozkoumán, jako životní cyklus rodu *Caulobacter*
- střídání přisedlé a volné životní formy
- volné buňky – bičíkaté, pohyblivé G-tyčky
- přisedlé stadium – vláknitá pochva, která uzavírá tyčkovité nepohyblivé buňky a je jedním koncem (stopka, holdfast) přichycena k pevnému podkladu



Sphaerotilus natans

- volné buňky najdou vhodné životní prostředí
- přichytí se k podkladu
- odhodí bičík
- začnou tvořit pochvu
- dělí se uvnitř pochvy
- z pochvy se uvolňují dceřinné pohyblivé buňky



- **V prostředí s nízkou koncentrací kyslíku**
- **Dokáže využít široké zdroje org.látek: polysacharidy, polyalkoholy, org.kyseliny**

Pochva

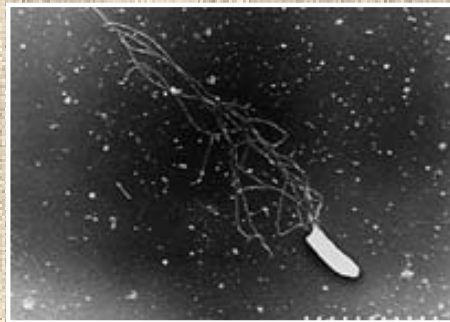
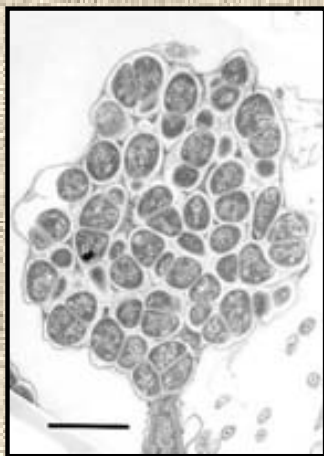
- trubicovitý útvar, který se nikdy nedotýká buněk, často uzavřená
- může obsahovat oxidy železa nebo manganu
- funkce – přichycení k pevným povrchům a zachycování živin pro buňky, ochrana proti predátorům (prvoci, *Bdelovibrio*)

Výskyt

- Sphaerotilus*
- ◆v pomale tekoucích vodách znečištěných odpadem
- ◆na čističkách – problematický vláknitý organismus

Střídání volného a přisedlého stadia u *Actinoplanes* a příbuzných rodů

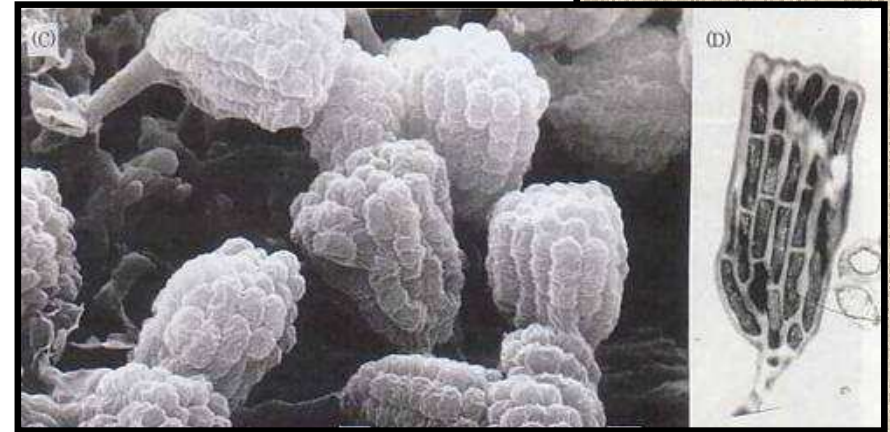
- přisedlé stadium – vegetativní mycelium, množící se
- volné stadium – bičíkaté spory, které se tvoří ve sporangiu (zoospory)
- *Actinoplanes* – patří mezi aktinomycety, kromě těchto 2 stadií se uplatňuje komplexní růstový cyklus



Micromonosporaceae, Actinoplanes sp.

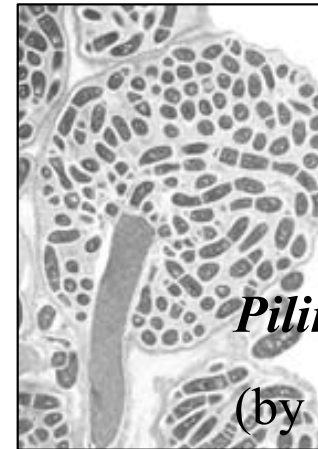
Pilimelia

- vlasy, chlupy, kůže hadů
- není známa jako dermatofyt
- běžně v půdě



Výskyt

- půda a spadané listí
- rostlinný a živočišný odpad
- jezera, rybníky, řeky
- primárně prostředí se střídavým vysycháním
- rozšířeny celosvětově – tropy, pouště ...



Pilimelia columellifera

(by G. Vobis)

www.yale.edu/jacobswagner/research.htm

<http://www.sciencedaily.com/releases/2006/04/060411222211.htm>

biology.kenyon.edu/.../Chap11/Chapter_11_A.html

<http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/16/8789>

Děkuji za pozornost