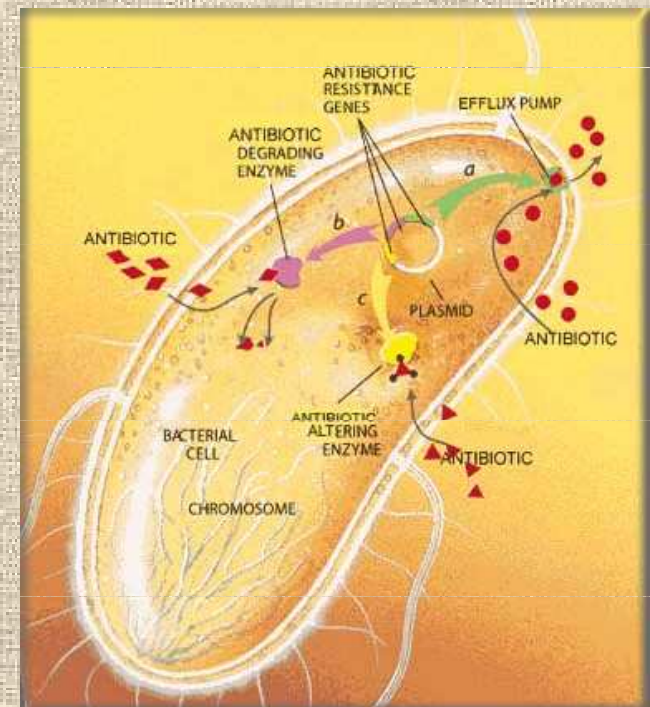
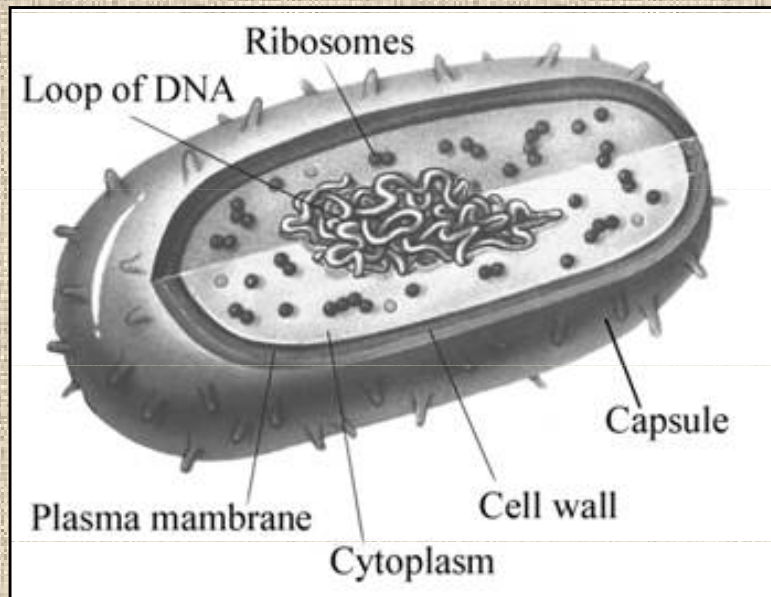


# Struktura prokaryotické buňky I.

## Buněčná stěna

## Cytoplazmatická membrána

## Genom

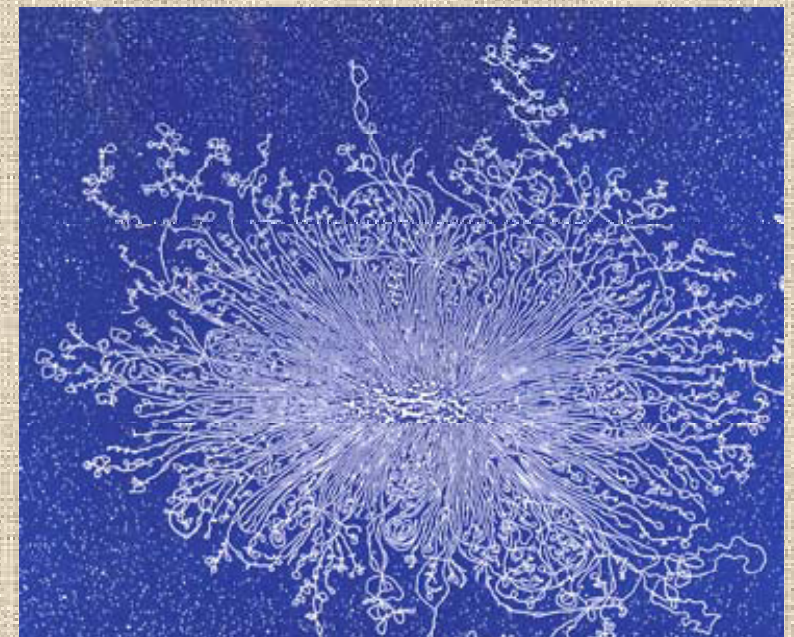
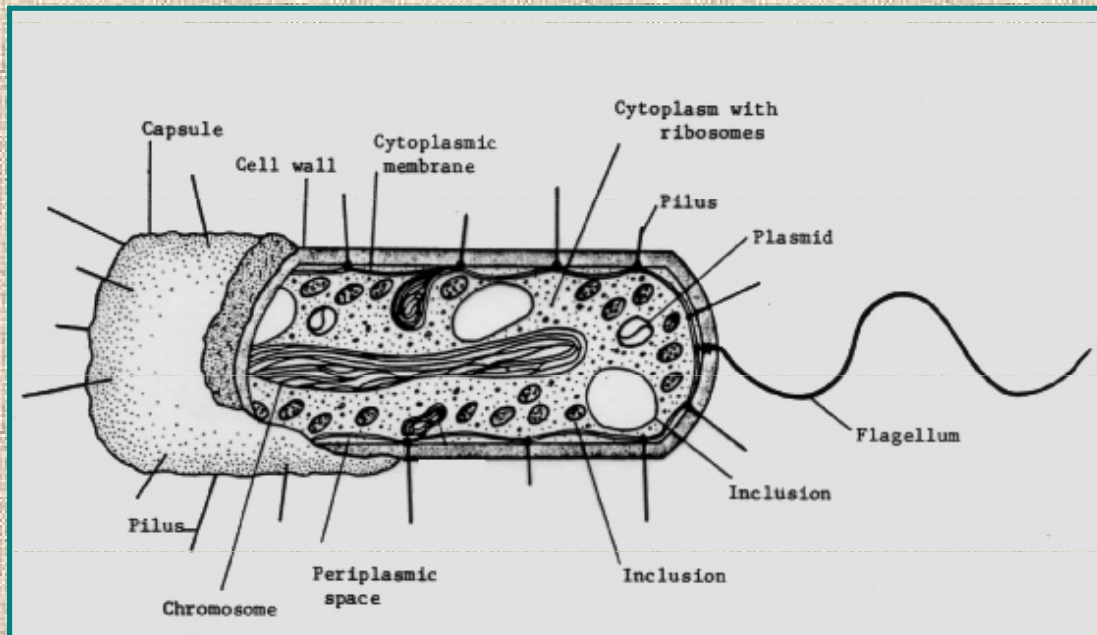


# Základní struktury

- Cytoplazmatická membrána
- Bakteriální chromozom
- Ribozómy
- Buněčná stěna - obvyklá

G<sup>+</sup> vs. G<sup>-</sup> !!

*Bacteria vs. Archaea !!*



Rozvinutý chromosom *E.coli*

# Další struktury

- Organely pohybu
- Fimbrie
- Plazmidy
- Kapsuly, slizy
- Inkluze



*E.coli* - fimbrie



*E.coli* - bičíky

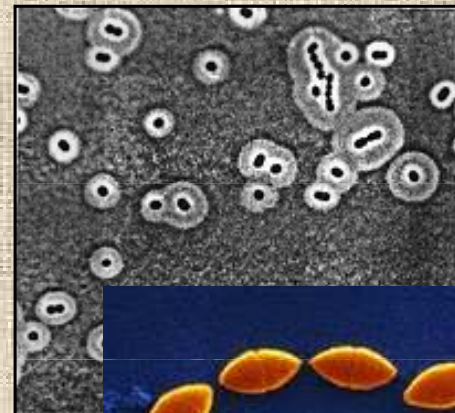


PHB



Parasporální  
inkluze

*B. thuringiensis*



*Streptococcus pneumoniae*

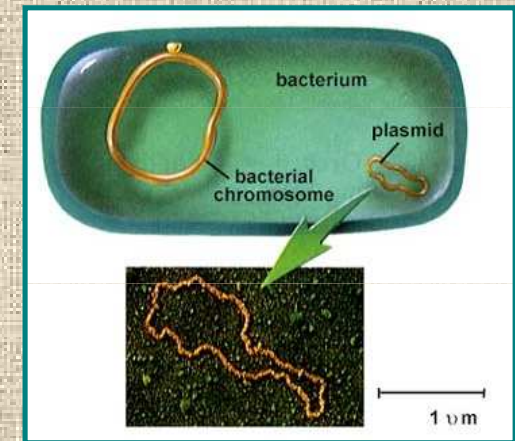


karboxyzómy



Síra

*Beggiatoa*



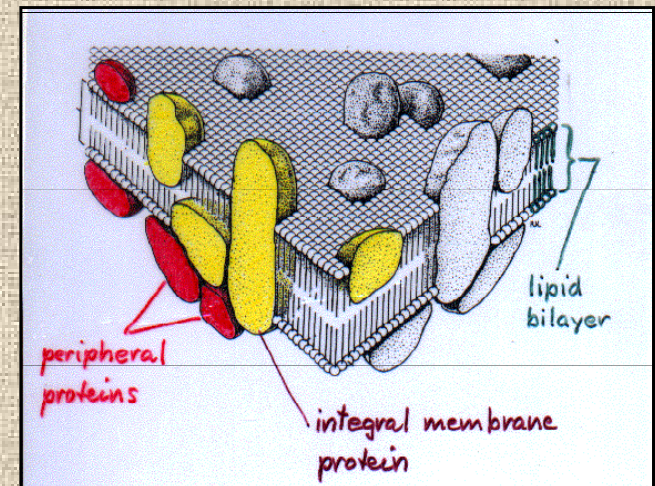
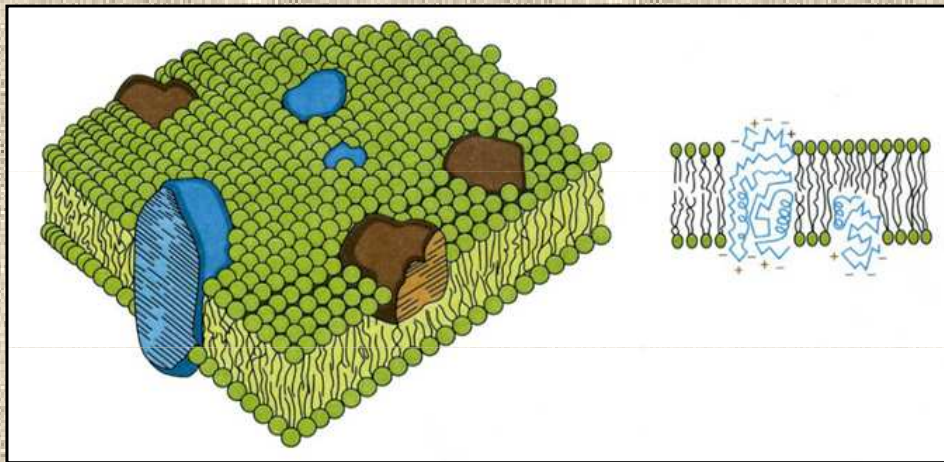
replikony

# Cytoplazmatická membrána

- Fluidní vrstva **fosfolipidů** (jednoduchý řetězec, esterová vazba, glyceroldiester)

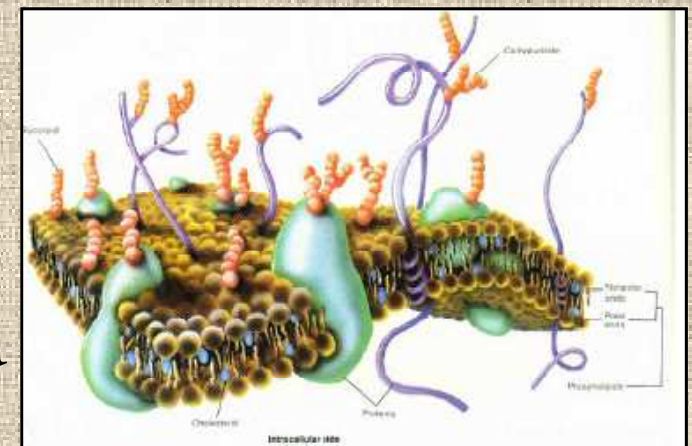
*Archea – etherová v. !!*

- Vnořené bílkoviny – mnoho proti Eucarya
- Semipermeabilní – transport



G- buňky cytoplazmatická membrána + vnější membrána!!

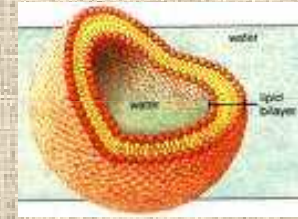
- Lipidy – složení do urč.míry podle výživy a typu prostředí
- Proteiny – integrální - hydrofobní vazby, cca 70%, uvolnění rozpouštědly; periferní – elstat.síly, H-můstky – pro uvolnění není nutno narušovat membránu
- Lipoproteiny – lipid do periplazmy
- Glykoproteiny a glykolipidy – orientovány cukernou složkou vně membrány
- Lipopolysacharidy G- - Ag
- Hopanoidy – lipidy u 50% bakt.  
- obdoba euk. sterolů



- 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) - **1 vrstevná, nebiologická!!**

Syntéza CM - inzercí

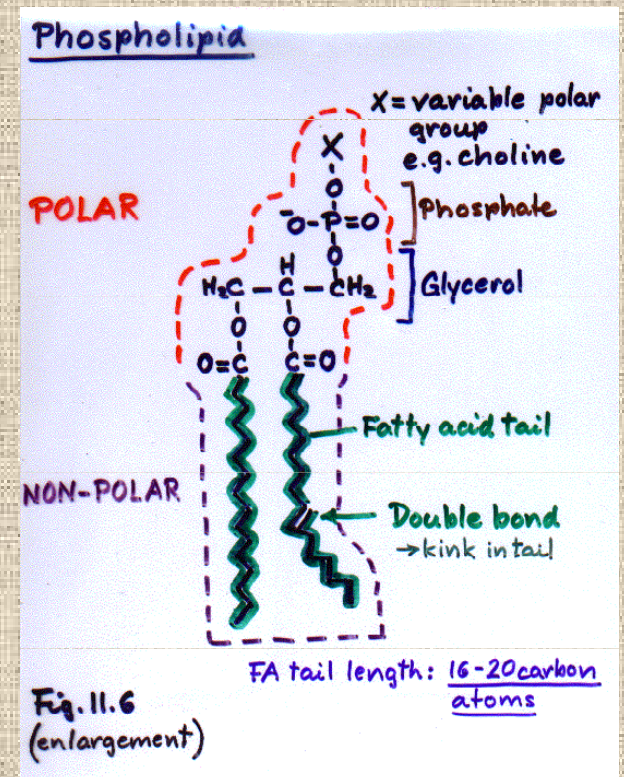
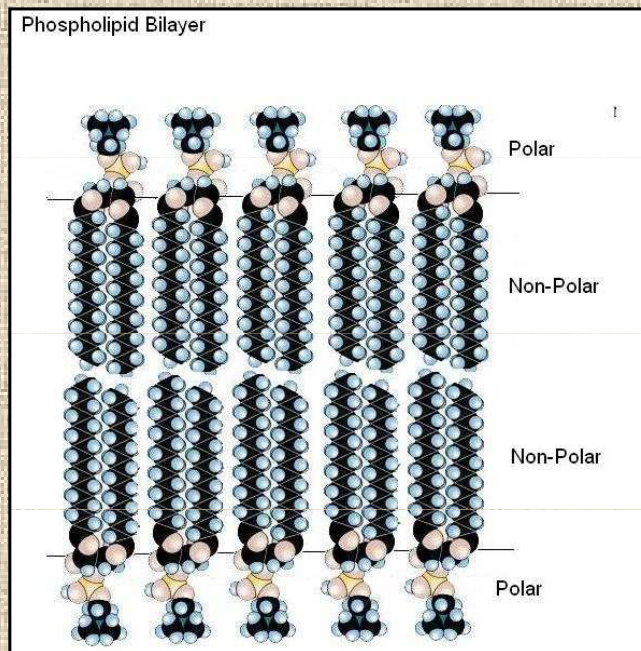
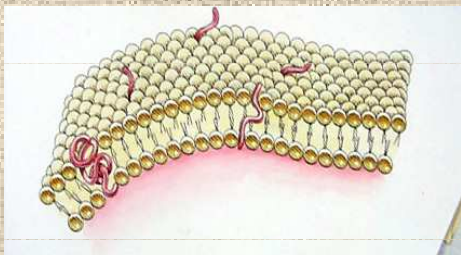
# Fosfolipid



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

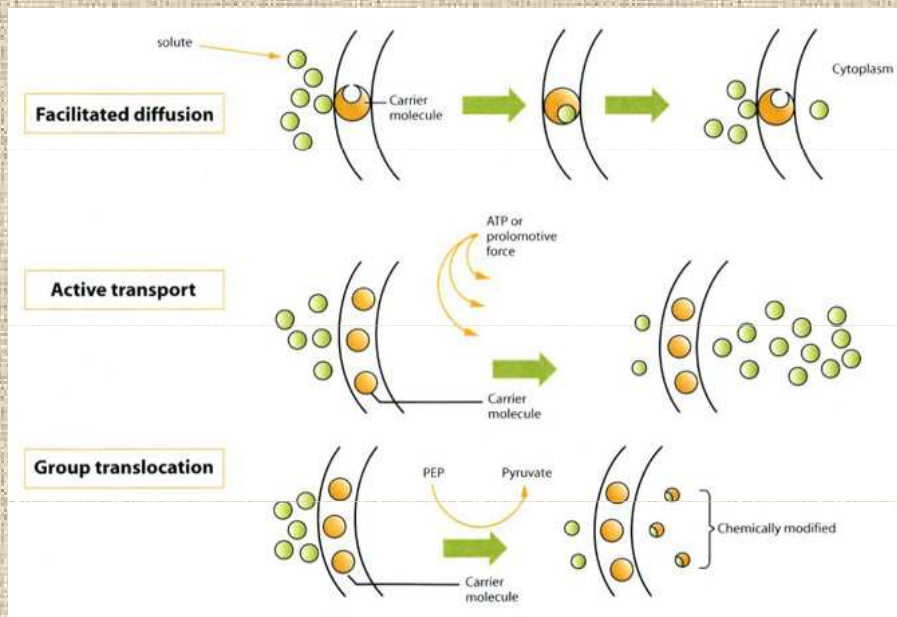
Závislost na teplotě      nenasycené – zvyšují

- Hydrofobní složka - nepolární
- Negativní náboj

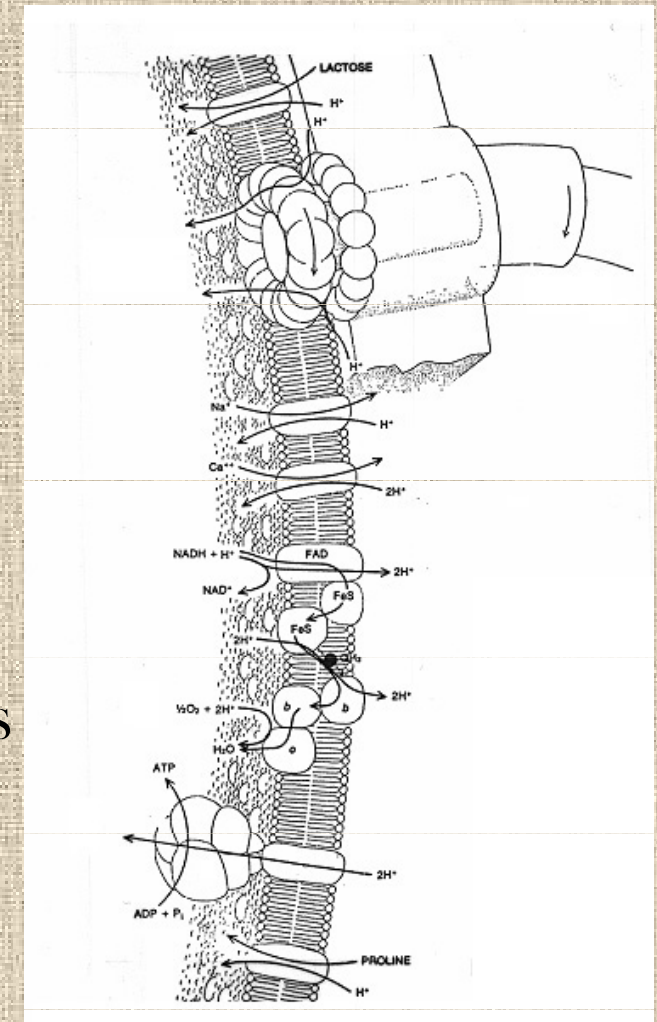


# Funkce cytoplazmatické membrány

- Bariéra
- Transport – schopnost akumulace  
80% mlk – aktivní příjem
- Tvorba a transformace energie –  
elektrontransportní systém



- Enzymy
- Vektorový  
Metabolismus
- Sídlo  
replikátoru
- Místem  
syntéz





## Permeabilita membrány

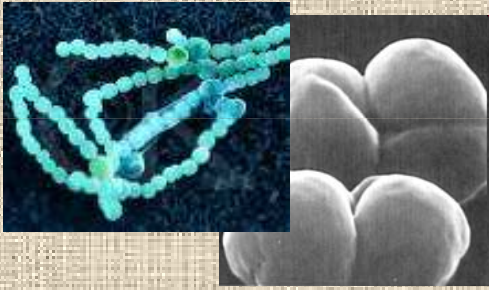
- poměrně volně prostupují malé, nenabitě nebo hydrofobní molekuly (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> - ne NH<sub>4</sub>) a voda
- ostatní - specifické mechanismy
- Msc channels - mechanosenzitivní - reagují na zvýšení turgoru buňky zvětšením velikosti póru - adaptace na osmotický stres - 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

# Mezozomy

- Deriváty membrány
- 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

# Chromatofory fototrofů

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



# Archea - extrémní podmínky:

- BS: 5 typů buněčné stěny

Nikdy klasický peptidoglykan

- CM:

Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy, větvené lipidy,

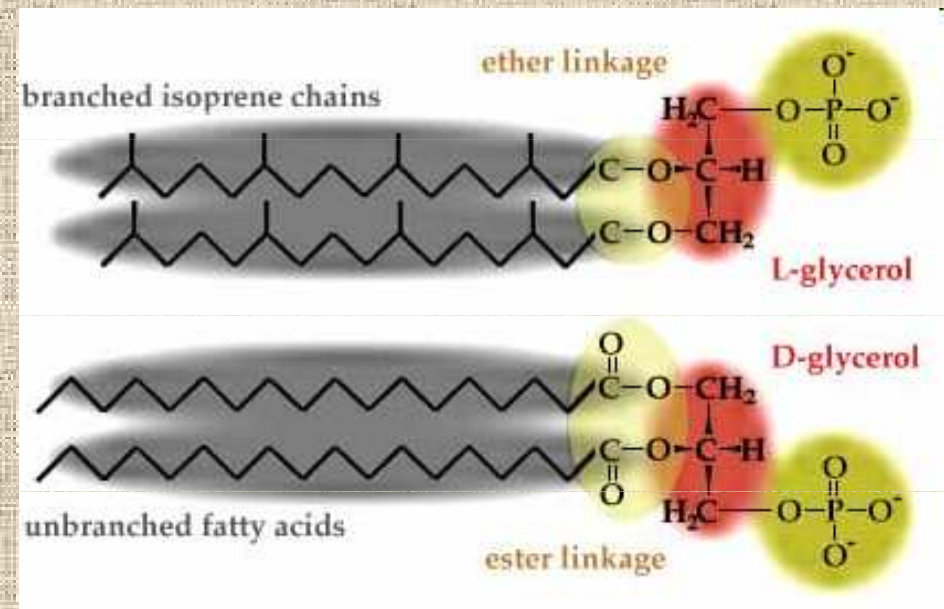
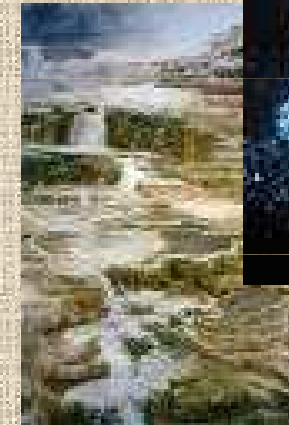
mnoho proteinů v membráně

Etherická vazba -

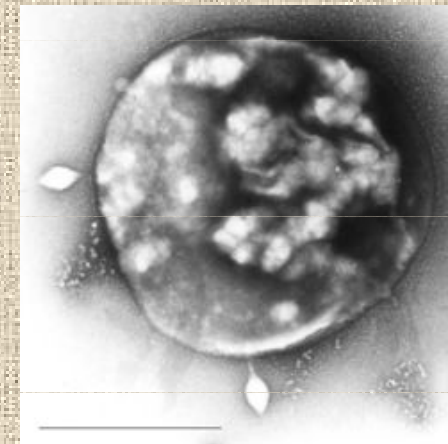
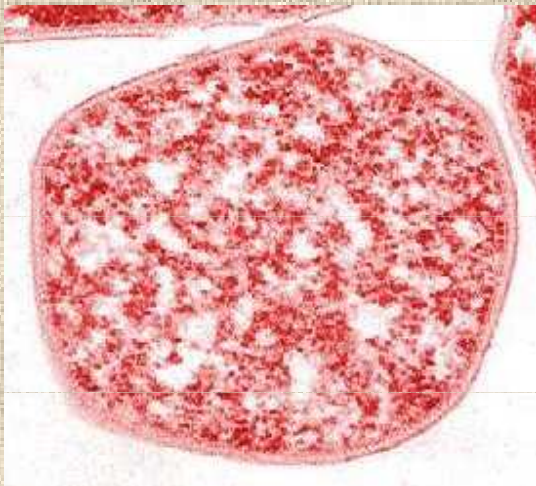
glyceroldiether, tetraether

= jiné chem.vlastnosti fosfolipidů

Nepřítomnost sterolů

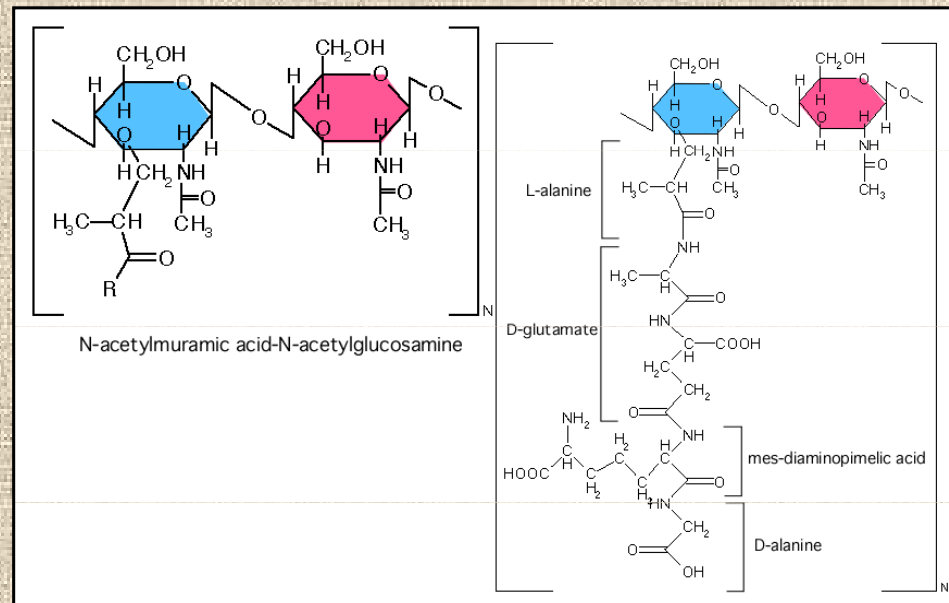


- Často jednovrstevná - diglycerol tetraether  
glycerolové jednotky na obou koncích MK = tvoří 1 vrstvu
- Lepší přizpůsobení extrémům
  - monolayer rezistentnější k narušení teplem
- Sulfolobus - 90°C a pH 2, větvené uhlovodíky a 2x tak dlouhé než u bakterií



# Buněčná stěna

- Peptidoglykan



Glykan - cukerná složka, NAG, NAM

N-acetylglukózámin+N-acetylmuramová k.,

$\beta$ -1,4-glykosidická vazba – kostra = opakování aminocukrů

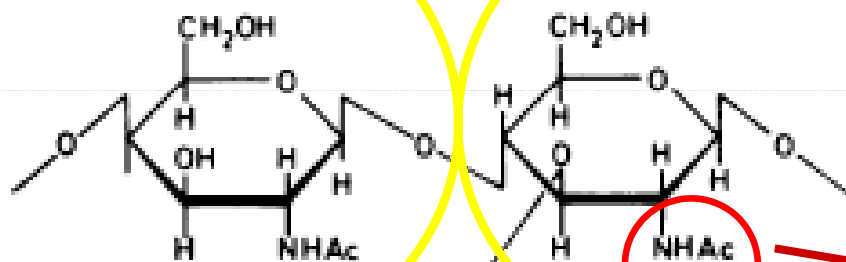
Peptid - tetrapeptid – L-ala – D-glu – R – D-ala

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

G<sup>+</sup> :R = lysin větš., tetrapeptidy spojeny pentapeptidem

G<sup>-</sup> :vždy DAP a meso-DAP, tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP

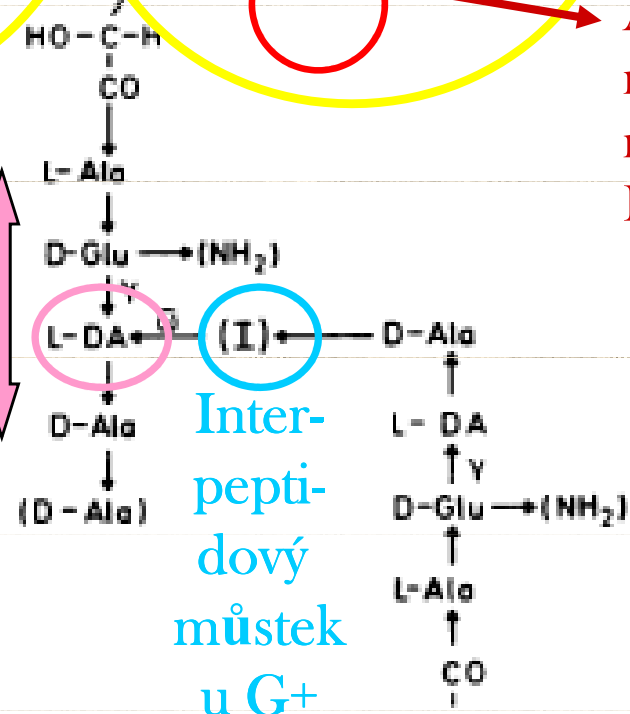
**Peptidoglykan** = uniformní disacharid  
 N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová



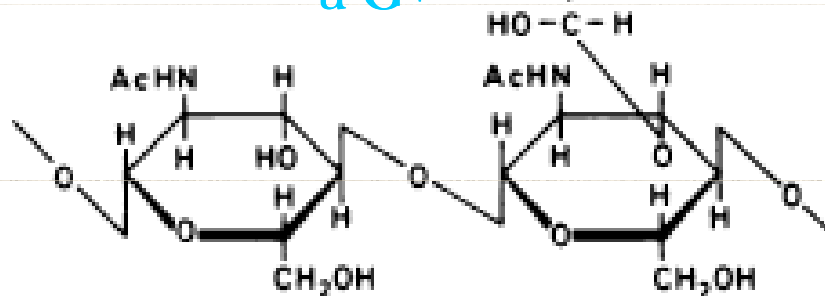
Vztah mezi tvarem buňky a počtem disacharidových jednotek v peptidoglykanu (10 - 65)

Acidorezistentní mykobakteria, nokardie..  
 nebarvitelné Gramem:  
 N-glykolylmuramová

Tetrapeptid L- a D-AMK  
 Spojení: rozdíl v pozici 3



Inter-peptidový můstek u G+



**CHEMOTAXONOMIE:**

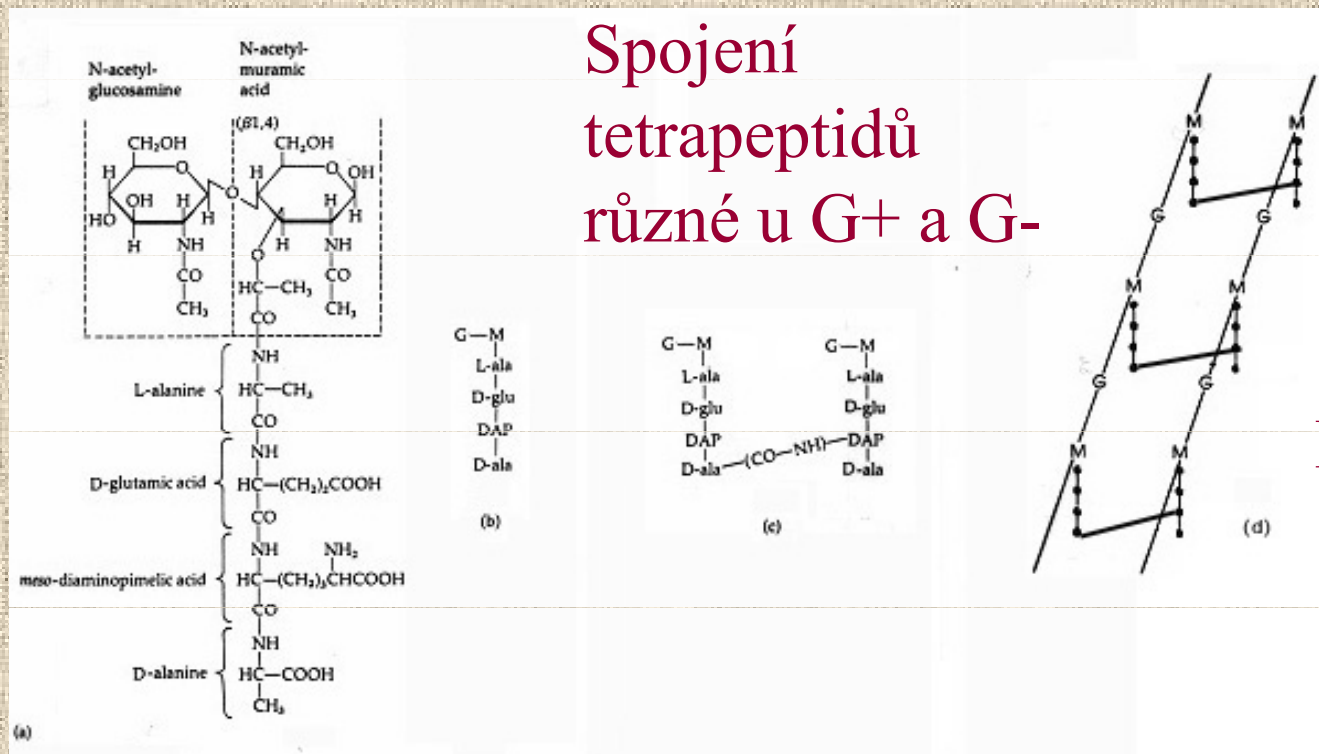
Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

*Micrococcaceae* - až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!

## Spojení tetrapeptidů různé u G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup>



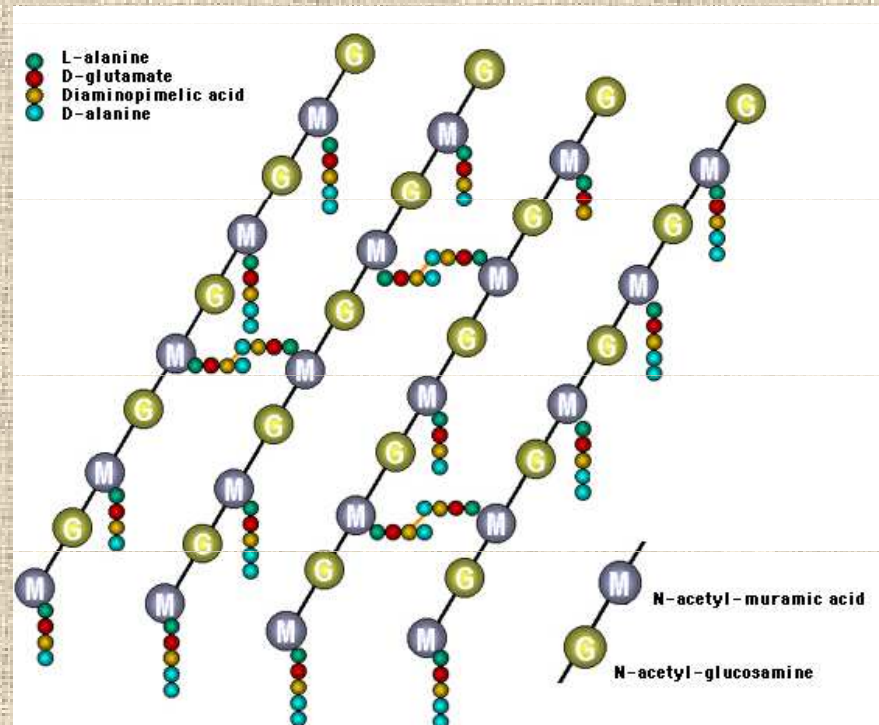
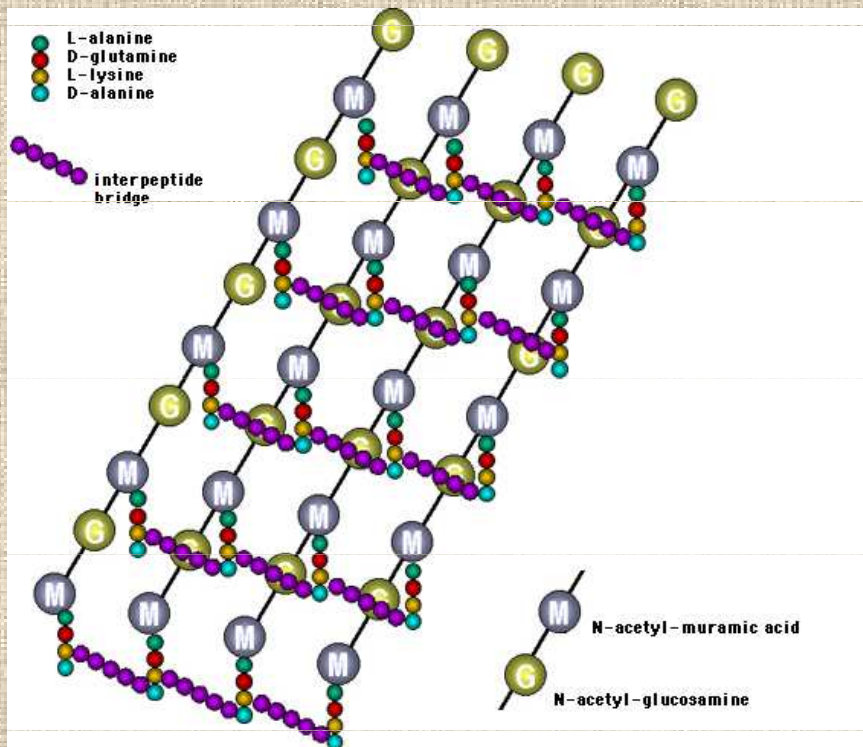
- Lysozym – štěpí vazbu mezi aminocukry;  
= působí na hotovou stěnu
- Penicilin – brání spojení tetrapeptidů  
= působí při syntéze stěny
- Bacitracin - cyklický polypeptid blokující defosforylaci fosfolipidu, potřebného pro transportní funkci během výstavby *buněčné stěny*.





# Peptidoglykan

G+



G-

G+ : tetrapeptidy spojeny pentapeptidem

G- : tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP

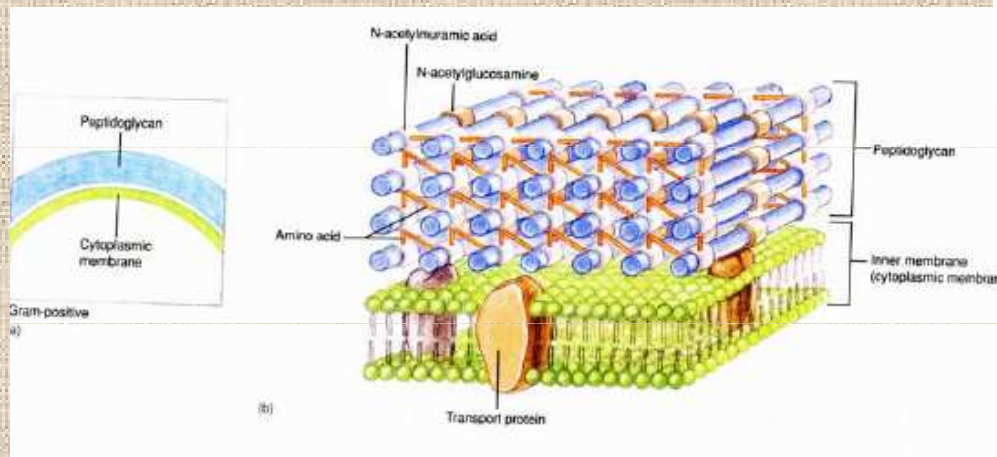
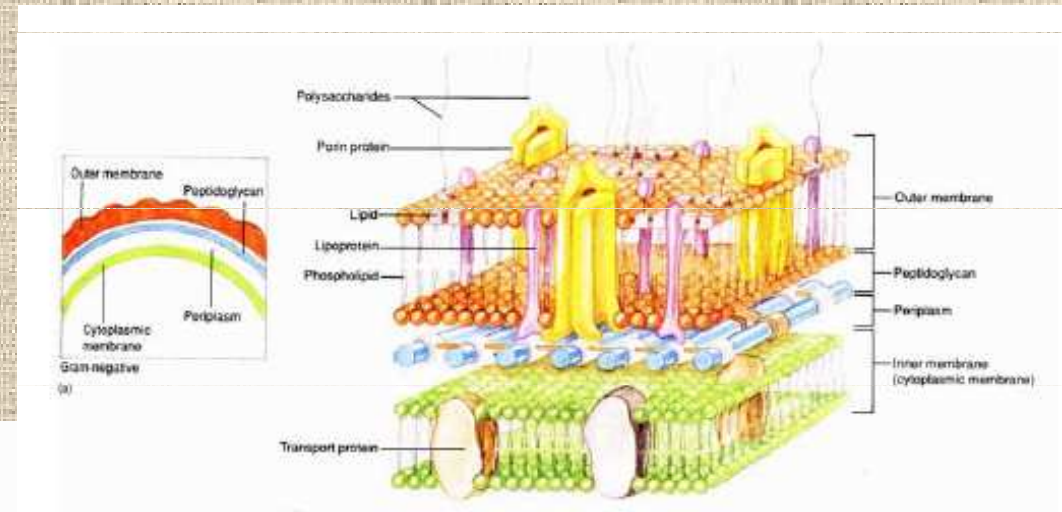
# Buněčná stěna

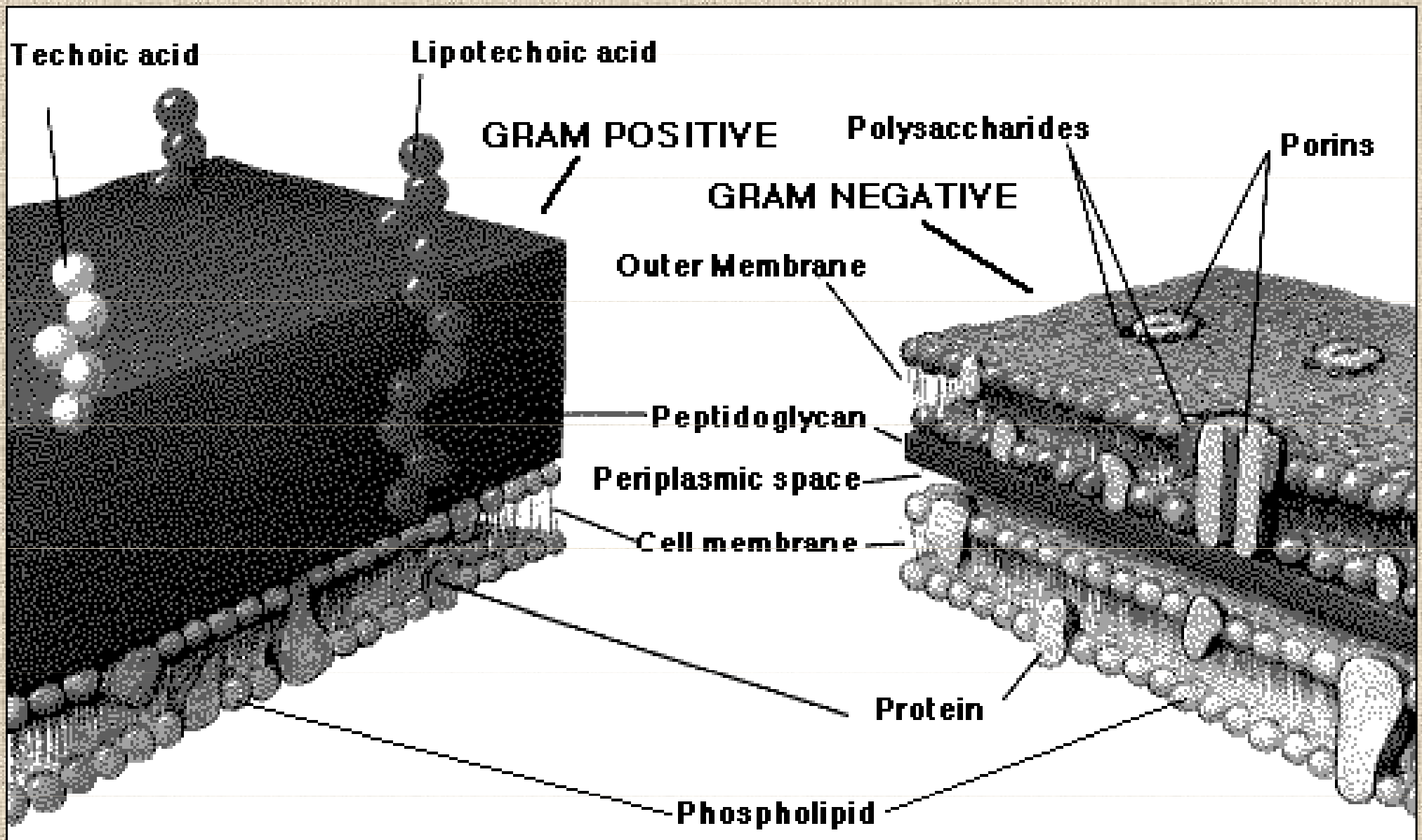
G<sup>+</sup> vs. G<sup>-</sup>

- 40 nm
- 90% peptidoglykanu
- Teikoové a teikuronové kyseliny - 10%

- schopnost vazby protonů a iontů  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

- 2 nm
- 10% PG
- 2 periplazmatické prostory





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

# Taxonomický význam

- Barvení buněčné stěny
- Chemotaxonomie složek stěny a membrány
- FAME profil mastných kyselin – char.pro jednotlivé rody, druhy až kmény, závislý na kultivaci
  - celobuněčný, ale hlavně z CM

## 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

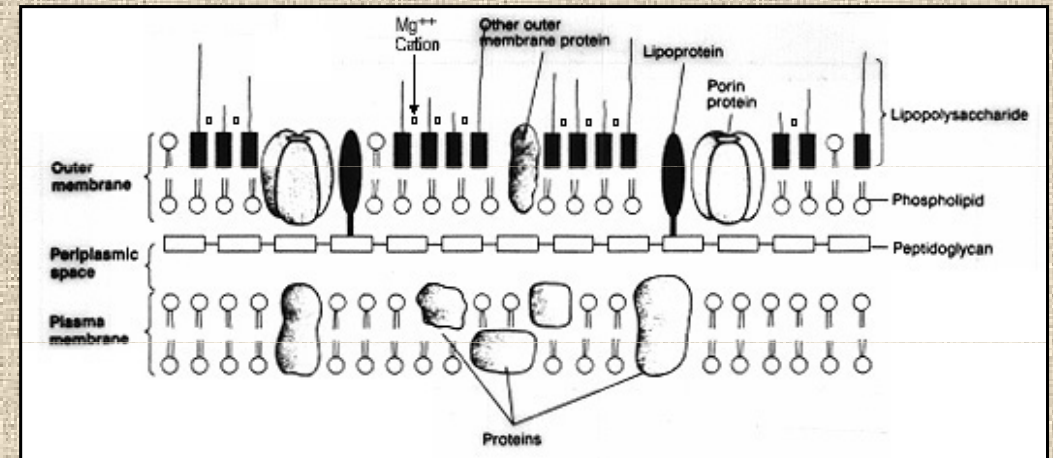
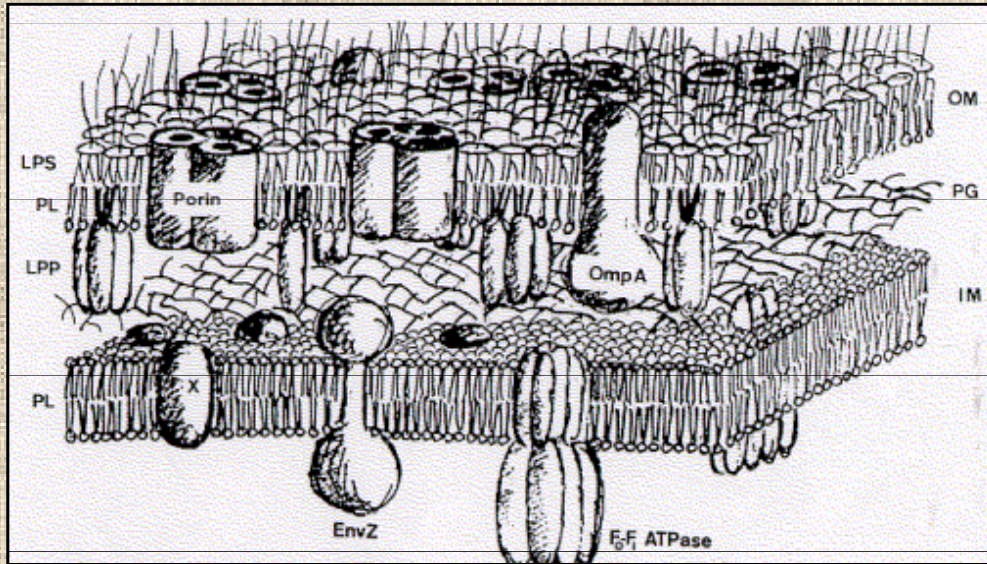
■ streptomycety – LL-DAP

■ *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysin

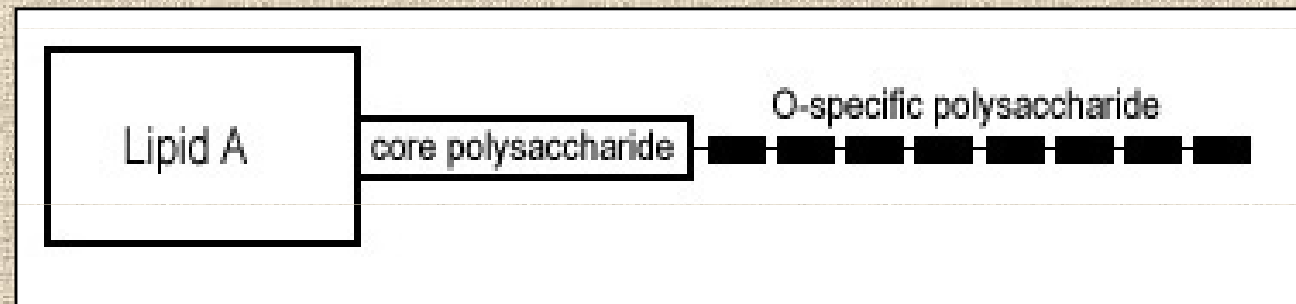
## Interpeptidový můstek peptidoglykanu

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

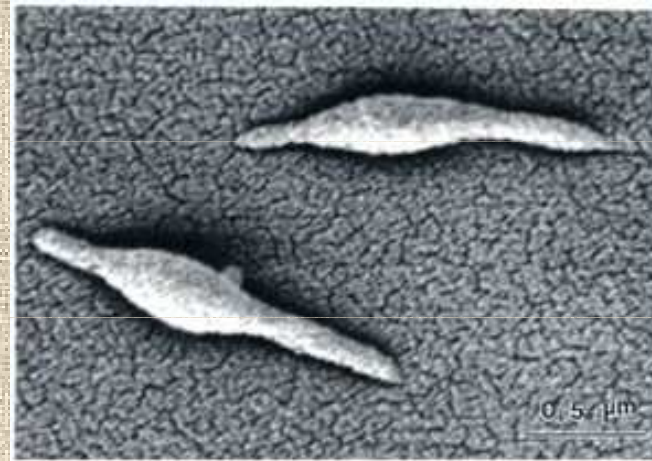
- *Arthrobacter* – „globiformis“ group – A3a - L-amino kyseliny (L-alanin, L-treonin nebo L-serin)
- „nicotianae“ group - dikarboxylové aminokyseliny (glutamová nebo asparagová)
  
- I Ser-Thr-Ala, *A. oxydans*, *A. polychromogenes*
- II. Ala-Thr-Ala, *A. aurescens*, *A. ilicis*, *A. ureafaciens*, *A. 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*



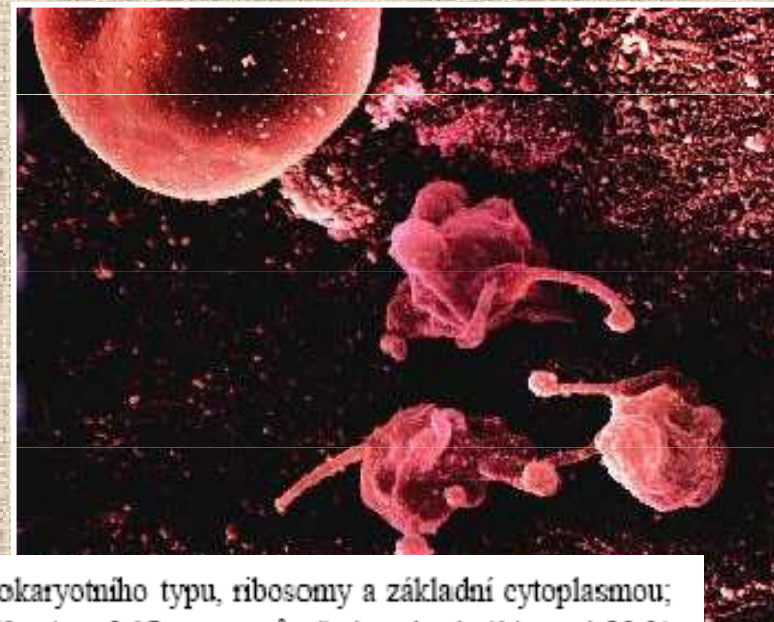
LPS lipopolysaccharide; PL phospholipid; LPP Brown's lipoprotein;  
 X generic integral membrane protein; EnvZ regulatory protein of the ompF -  
 ompC  
 operon; F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase ATP synthase of electron transport chain; IM inner  
 membrane;  
 OM outer membrane; PG peptidoglycan; OmpA outer membrane protein A.  
 (by Lukas Buehler, 1989)



- Mykoplazmata
- bez b.s.



- 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.



**Tab. 1 – Klasifikace mykoplazmat**

Říše:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Firmicutes</i>
Třída:	<i>Mollicutes</i>
Řád:	<i>Mycoplasmatales</i>
Čeleď:	<i>Mycoplasmataceae</i>
Rod:	<u><i>Mycoplasma</i></u>
Druh:	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma hominis</i> pg <i>Mycoplasma penetrans</i> <i>Mycoplasma fermentans</i> a další
Rod:	<u><i>Ureaplasma</i></u>
Druh:	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (dříve <i>Ureaplasma urealyticum</i> biovar 2) <i>Ureaplasma parvum</i> (dříve <i>Ureaplasma urealyticum</i> biovar 1)

**Během evoluce se objevily mnohonásobné redukce velikosti genomu a byl pozměněn i genetický kód. Celkové tempo evoluce je necharakteristicky vysoké. Jediným předpokládaným významem redukce velikosti genomu je evoluce Mollicutes na striktní parazity, jejichž velká část metabolické mašinerie zakrněla.**

nejmenší známý mikroorganismus schopný samostatného života

- netvoří peptidoglykan
- V.S., D. S.
- *M. hominis* vyvolává lidskou primární atypickou pneumonii (PAP) a je označované jako PPLO (pleuropneumonia-like organism)
- Studium genomu

<http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=304611>

**Tab. 2 – Přehled chorob vyvolaných jednotlivými druhy mykoplazmat**

Organismus	Choroba
<i>M. pneumoniae</i>	široké spektrum onemocnění horních i dolních cest dýchacích – od asymptomatických infekcí přes většinou mírné tracheobronchitidy až po těžké atypické pneumonie (7–18 %)
<i>M. hominis</i>	primární kolonizace sliznic mužského i ženského genitálu (u 20–50 % dospělých), uretritidy (spíše sekundární agens), pyelonefritidy, pánevní zánětlivá choroba (PID – pelvic inflammatory disease), poporodní horečka, možná úloha u meningitid novorozenců
<i>M. genitalium</i>	primární agens negonokokové uretritidy (urethritis nongonorrhoeica) – nebývá spojena se sexuální promiskuitou, pánevní zánětlivá choroba
<i>M. penetrans</i>	asociovaná ve 20–40 % s infekcí HIV/AIDS u homosexuálních mužů, výskyt i u HIV neinfikovaných
<i>M. fermentans</i>	zjištěno u osob postižených syndromem Války v zálivu; v synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou a v kostní dřeni leukemiků
<i>U. urealyticum</i>	primární agens negonokokové uretritidy, u mužů se izoluje u prostatitid, u žen při abortech a porodech mrtvých plodů, u kongenitálních nákaz novorozenců. Také u neplodnosti obou pohlaví se uvažuje o této etiologii.

# Acidoresistentní bakterie nebarvitelné Gramem

## 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

# *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 CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O

Produkce karotenoidních pigmentů

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

# Genetická informace

- Velikost genomu:

„specialisté“:  $\sim 1,5$  MBp, „generalisté“ -  $\sim 4 - 8$  MBp

- Složky genomu:

Chromozom - 1-2

Replikony - obojí kružnicové i lineární

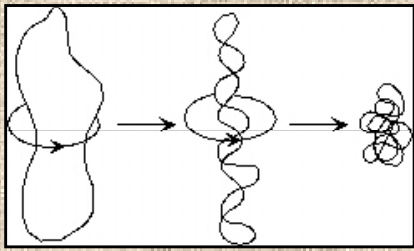
Plazmidy - (integrované=epizomy) - 0-n; F, R, Ti, Col

Mobilní elementy: transpozony, inzerční sekvence

Bakteriofágy

- Způsoby přenosu - transformace, konjugace, transdukce





# Bakteriální chromozóm

- Zpravidla cirkulární DNA 3mlk DNA, 2 jsou lineární  
(lineární – *Borrelia*, *Streptomyces*, *Coxiella*; *Paracoccus denitr.*  
2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*
- *E. coli* –  $4,7 \cdot 10^6$  nukleotidů
- Průměrná hmotnost:  $5 \cdot 10^{-15}$  g DNA
- **0.58 Mbp** *Mycoplasma genitalium*
- **4.4 Mbp** *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*
- Vazba na **CM** – **mezosomy**, dělení
- Replikace předchází dělení buňky
- Vazba cca  $10^5$  mlk histon-like proteins - flexibilita

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



# Ribozómy

- Proteosyntéza
- 2 podjednotky -  
Mg + energie (ATP, GTP) - 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 )

*RNA - Bacteria vs. Archaea !!*

- [focosi.immunesig.org/physiobacteria.html](http://focosi.immunesig.org/physiobacteria.html)
- [www.bact.wisc.edu/](http://www.bact.wisc.edu/)
- <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaeamm.html>
- 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