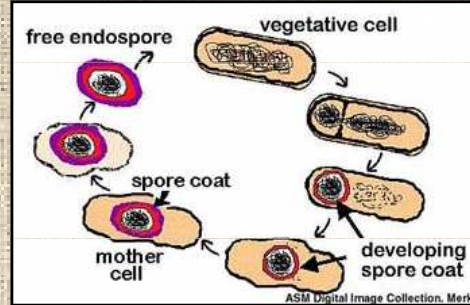
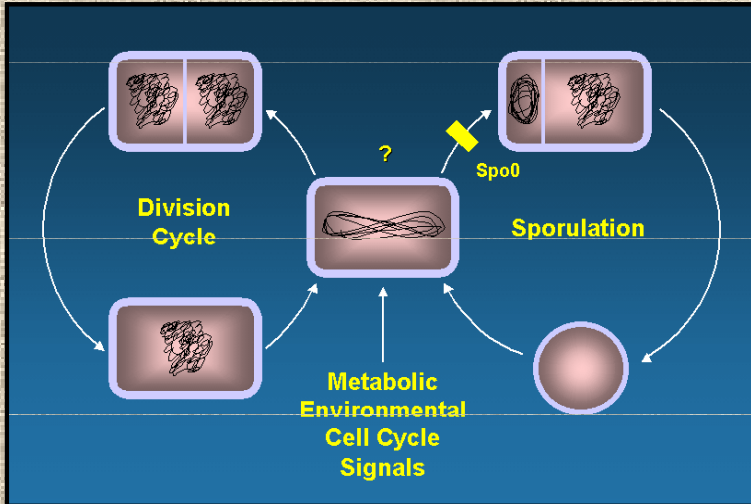
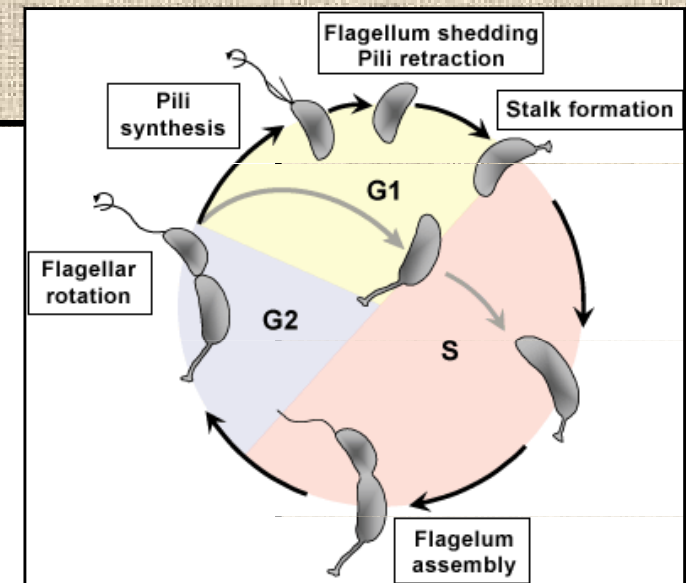
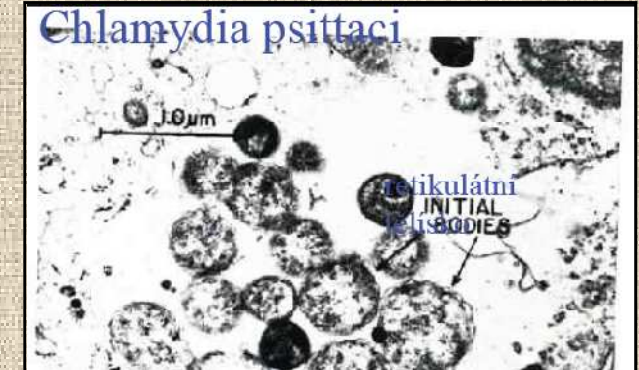


Růstové cykly bakterií



Tvorba spory



Růstové cykly bakterií

- jednoduché – střídají se 2 stádia
- ◆ rostoucí a klidové
- ◆ přisedlé a volné
- ◆ infekční a reprodukční
- komplexní s více než 2 vývojovými stádii
- ◆ myxobakterie
- růstové cykly vedoucí ke vzniku diferencovaných populací
- ◆ sinice - *Anabaena*

Buněčný cyklus
*Caulobacter
crescentus*

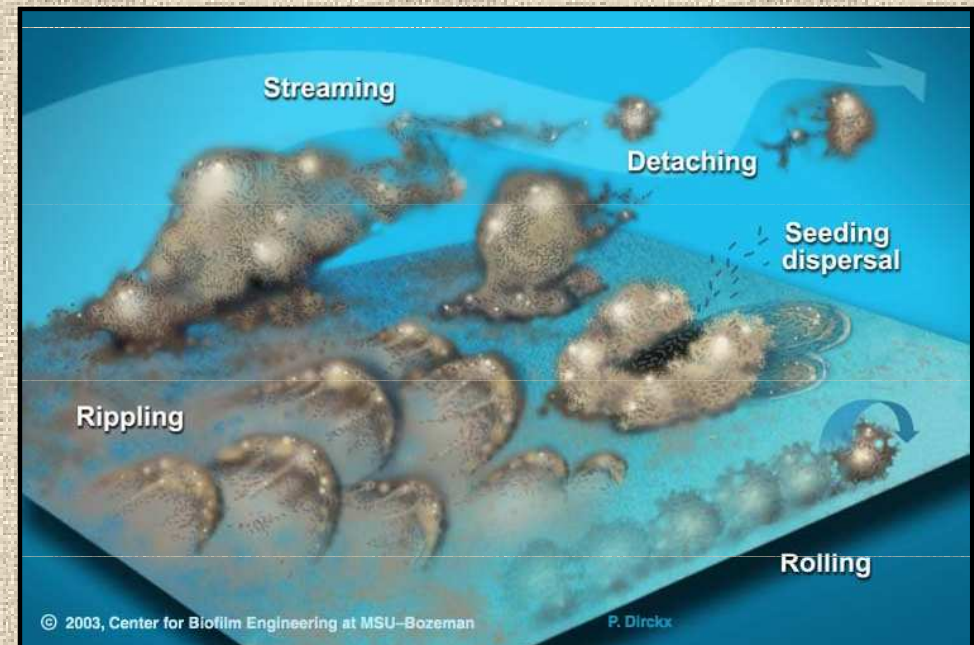
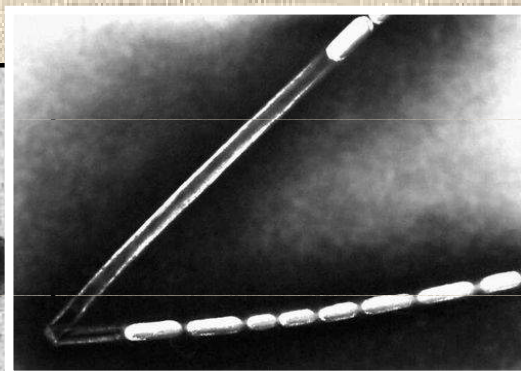
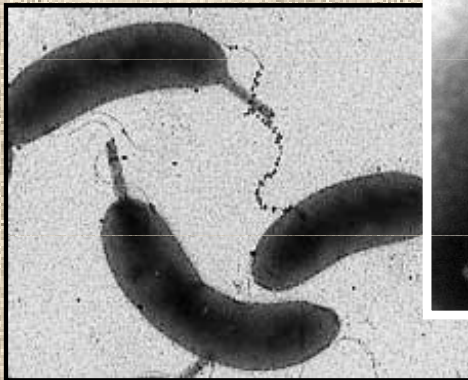
Růstové cykly bakterií II.

Střídání přisedlé a volné (plovoucí) formy života u prokaryot

Caulobacter crescentus

Sphaerotilus natans

Biofilm

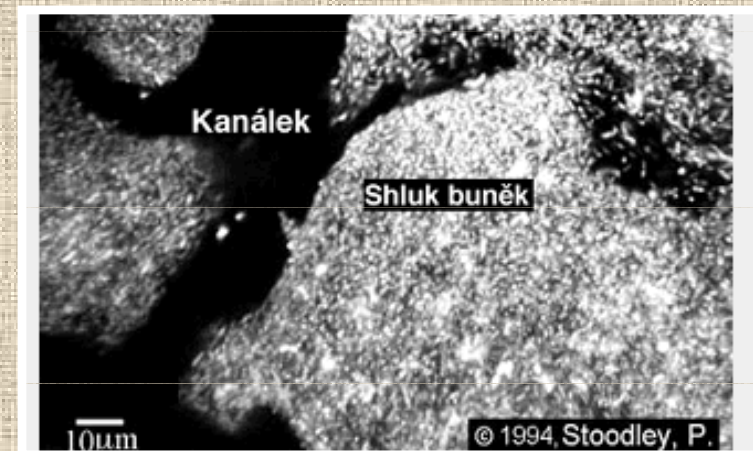
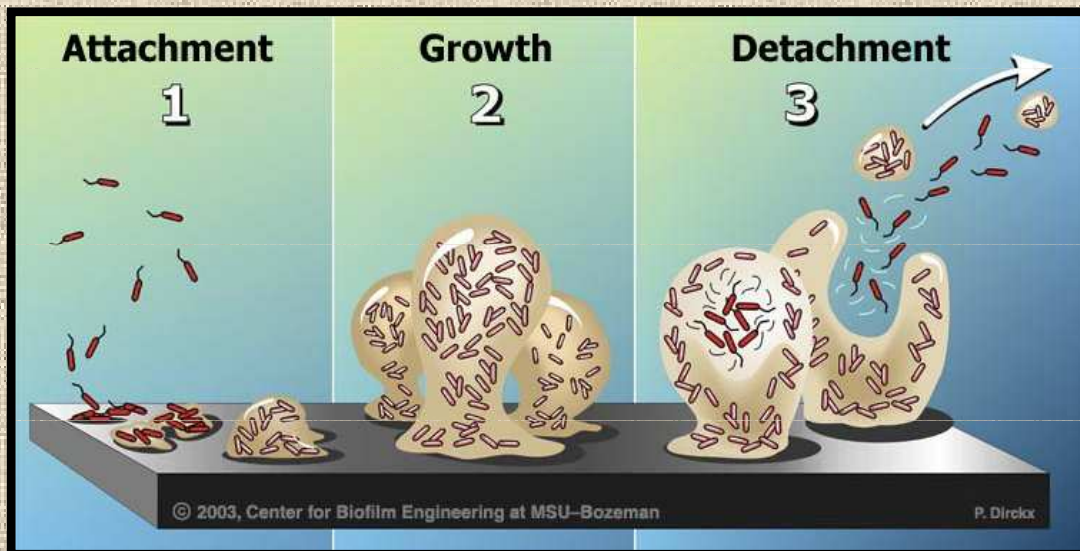
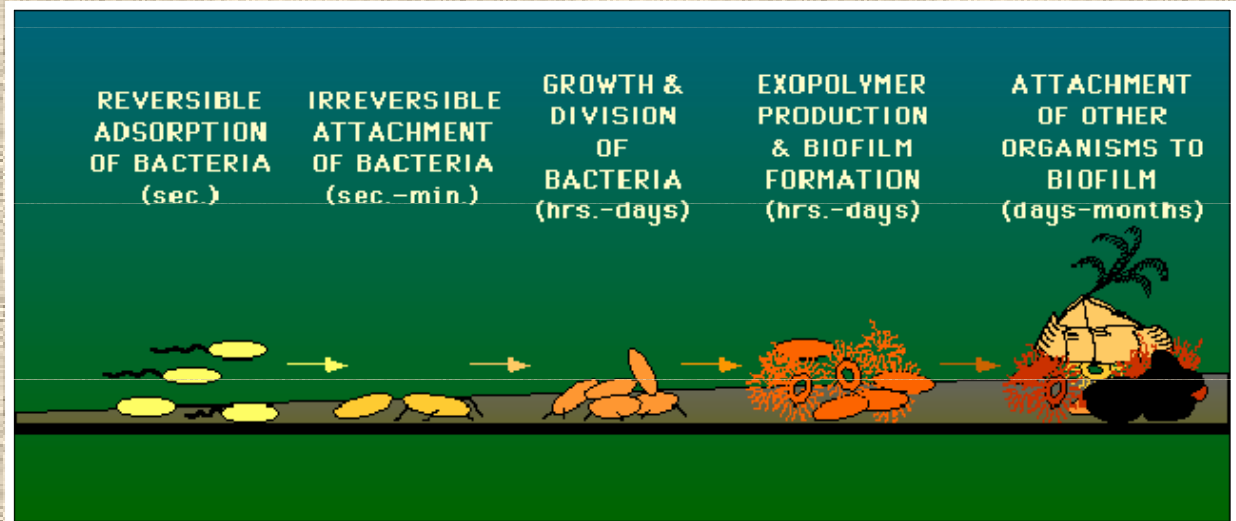


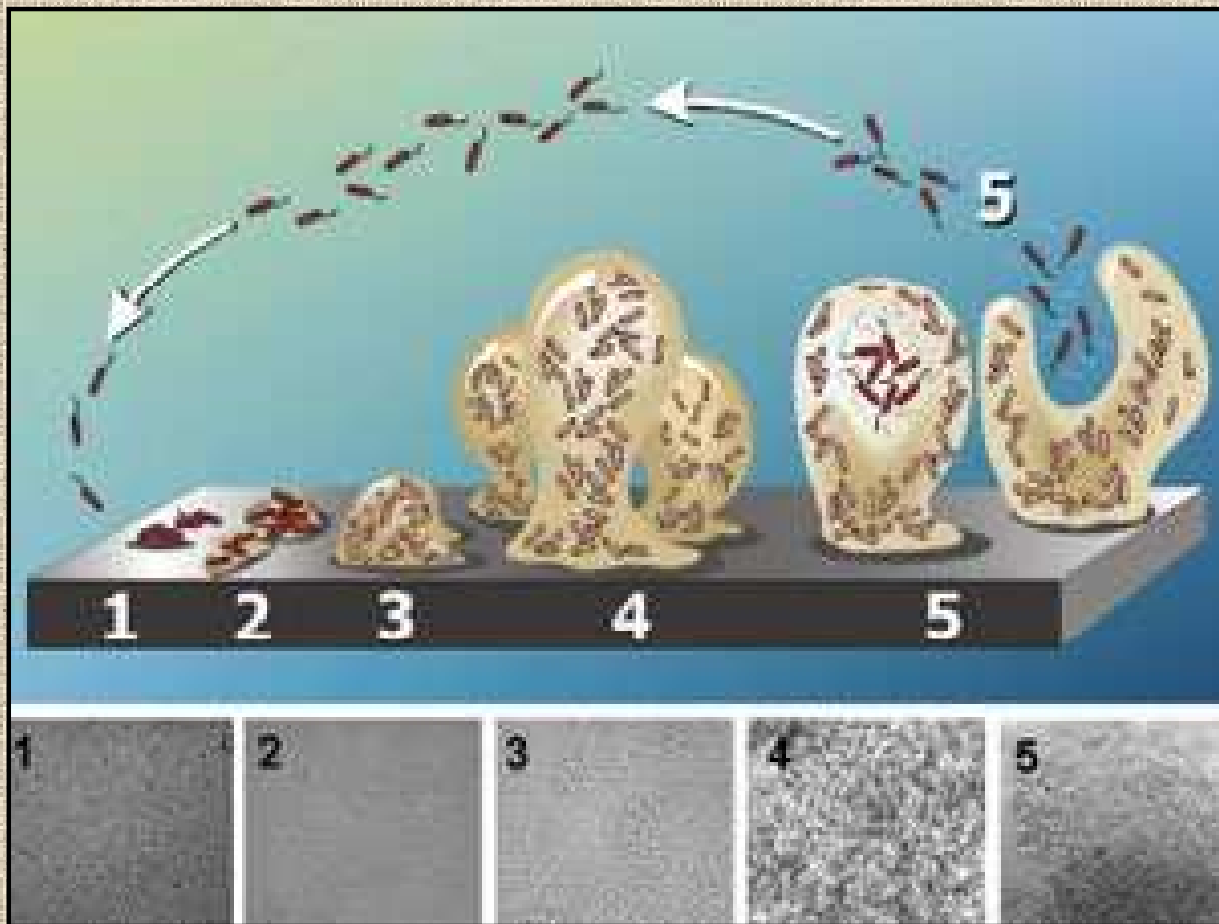
Biofilm

Tekuté prostředí

+ pevné povrchy

- přirozené prostředí, průmysl, těla živočichů, bioengineering, klinický materiál...





Složky biofilmu:
Bakteriální buňky a
jiné organismy uvnitř
matrix z polysacharidů

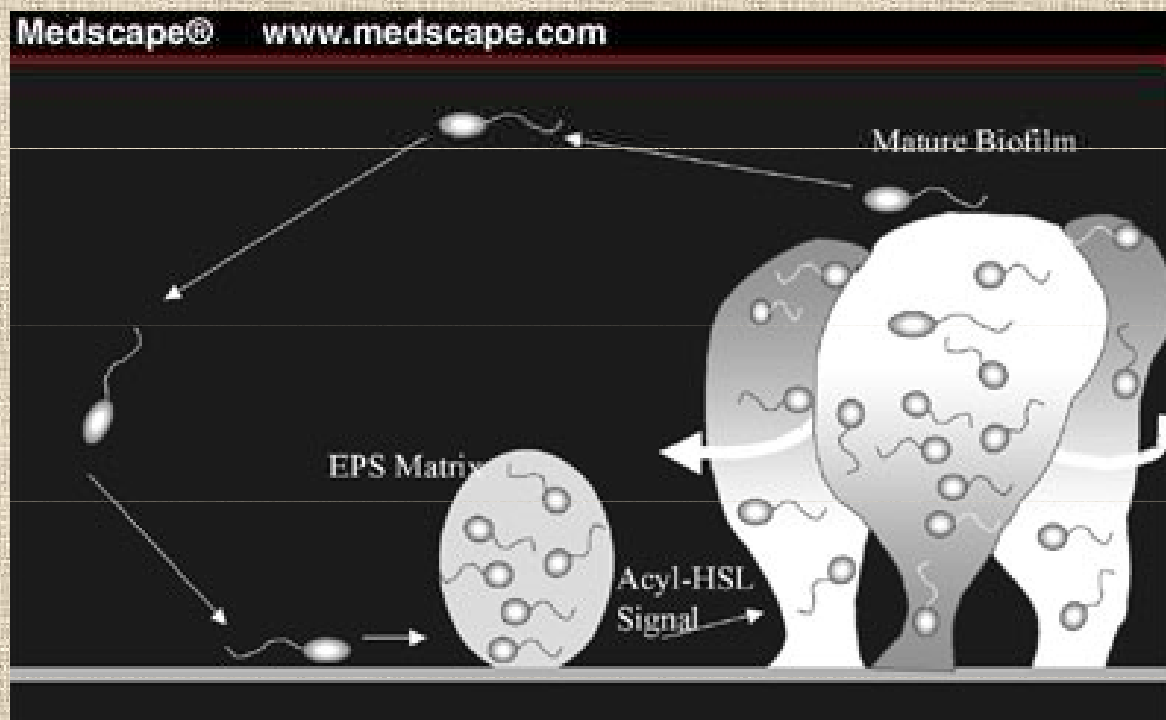
Biofilm / mikrokolonie:

husté mikrobiální populace vyvinuté z **volně plovoucích** (planktonických) buněk usazených na **vhodném povrchu** a formujících „hřibovité“ útvary s dutinkami, kanálky a stopkami. Je zodpovědný za 65% onemocnění západního světa.

Pseudomonas aeruginosa

formování biofilmu sestává z **pěti kroků**, během nichž je
exprese více jak **800 proteinů**

(tedy víc jak polovina proteomu tohoto druhu)
šest i vícenásobně zvýšená.



Pseudomonas aeruginosa

fáze vzniku biofilmu

Reversibilní přilnutí (attachment): buňky se **přechodně** fixují k substrátu a **povrchem indukovaná** genová exprese ústí do tvorby proteinového profilu zřetelně odlišného od planktonních buněk



Ireverzibilní přilnutí: u buněk dochází k reorientaci, shlukování, ztrátě pohyblivosti a aktivaci regulonu **quorum sensing**



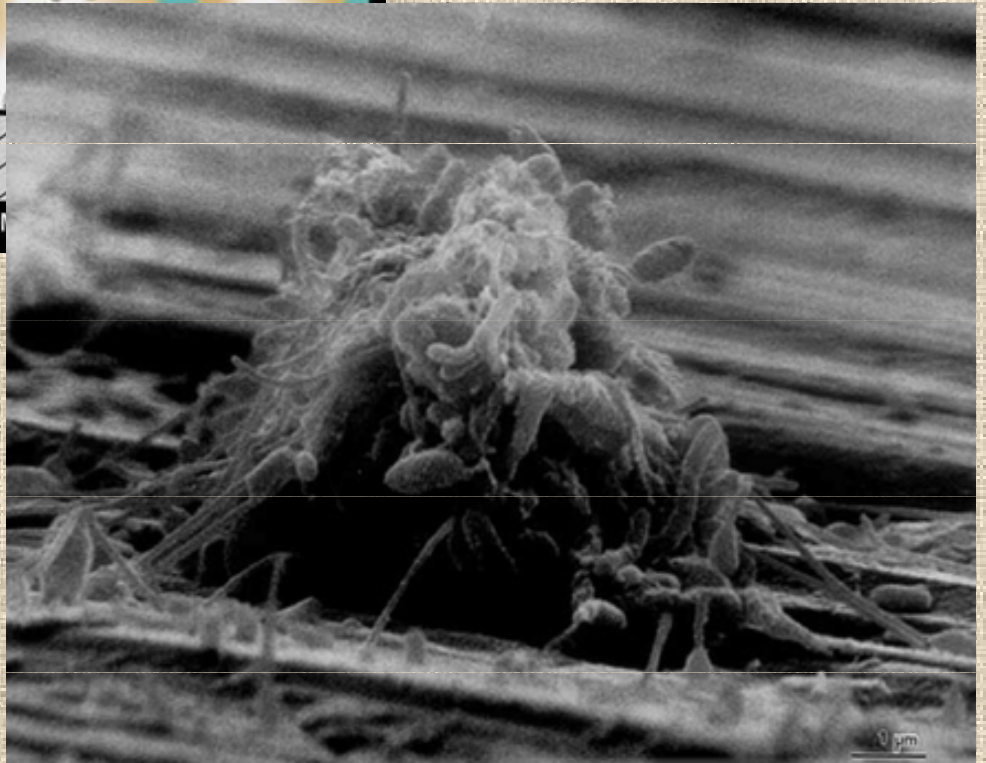
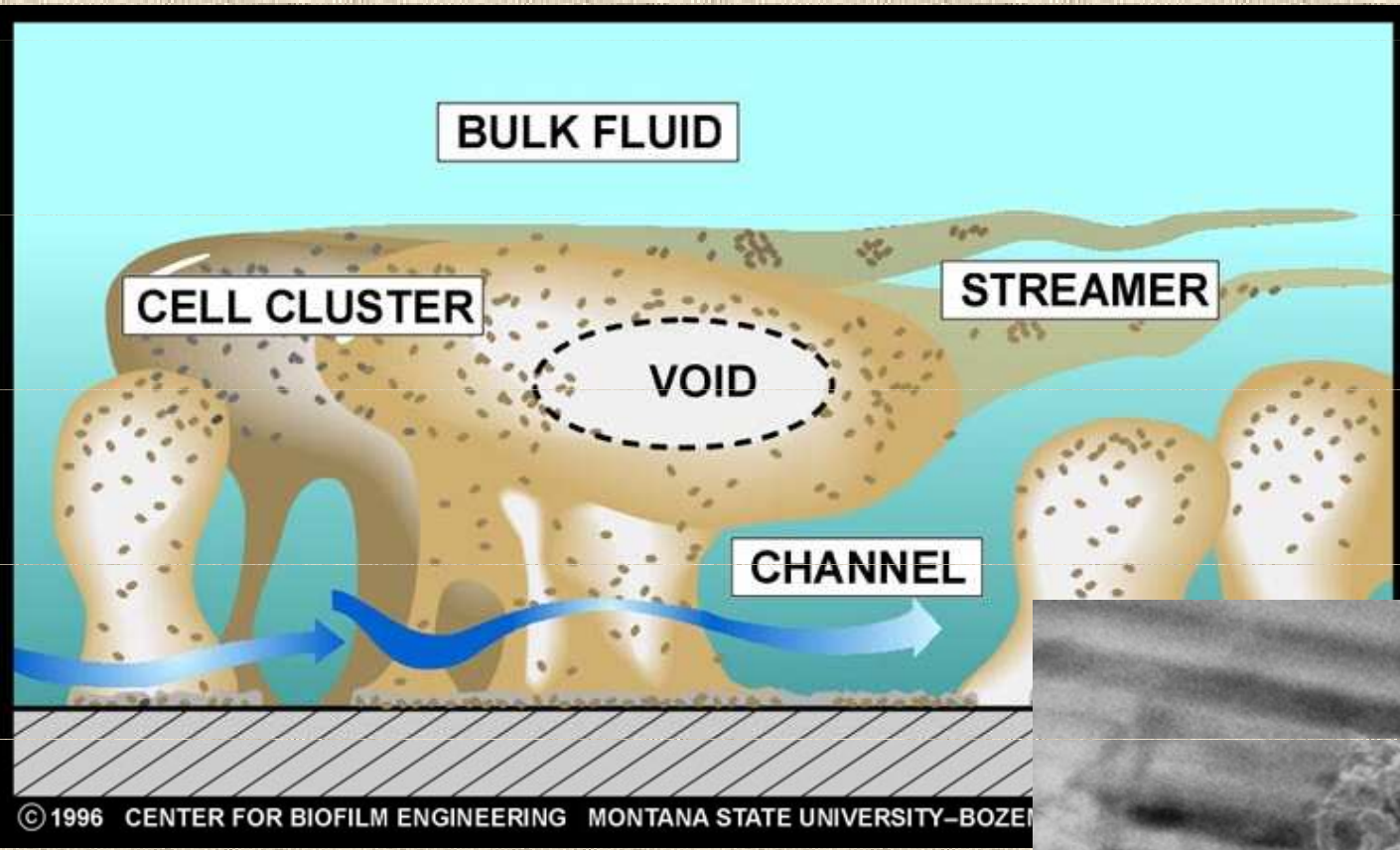
Maturace I: buněčné shluky jsou silnější a je aktivován rhl quorum sensing system



Maturace II: buněčné shluky dosahují maximální tloušťky s proteinovým profilem odlišným od planktonních buněk



Disperze: změna struktury shluků, **formování pórů a kanálků**.
Přítomnost pohyblivých i nepohyblivých buněk.



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

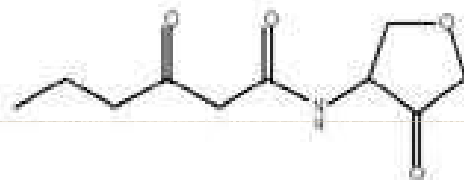
Spouštěcí podněty:

- Osmotický tlak
- Snížený obsah kyslíku
- Rostoucí hustota poulace - quorum sensing - malé mlk.

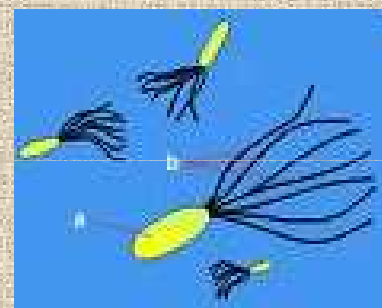
pro maturaci biofilmu a virulenci

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

Quorum - sensing - regulate luminiscence u *Vibrio fischeri*



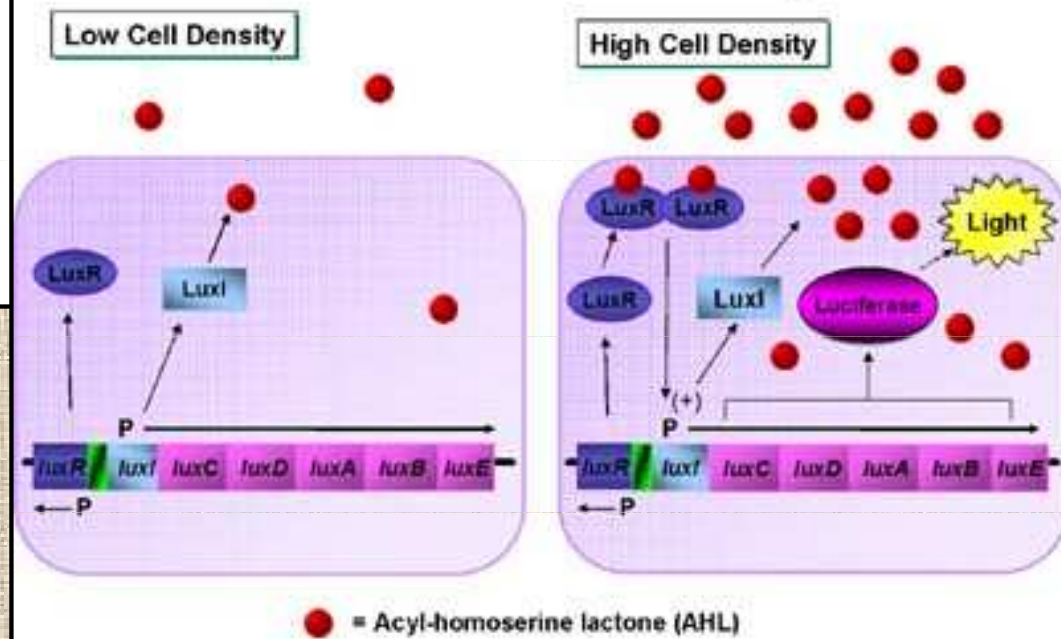
3-Oxo-hexanoyl homoserine lactone (3OC6HSL or VAI) is the acyl-homoserine lactone (AHL) produced by LuxI and recognized by LuxR in *Vibrio fischeri*

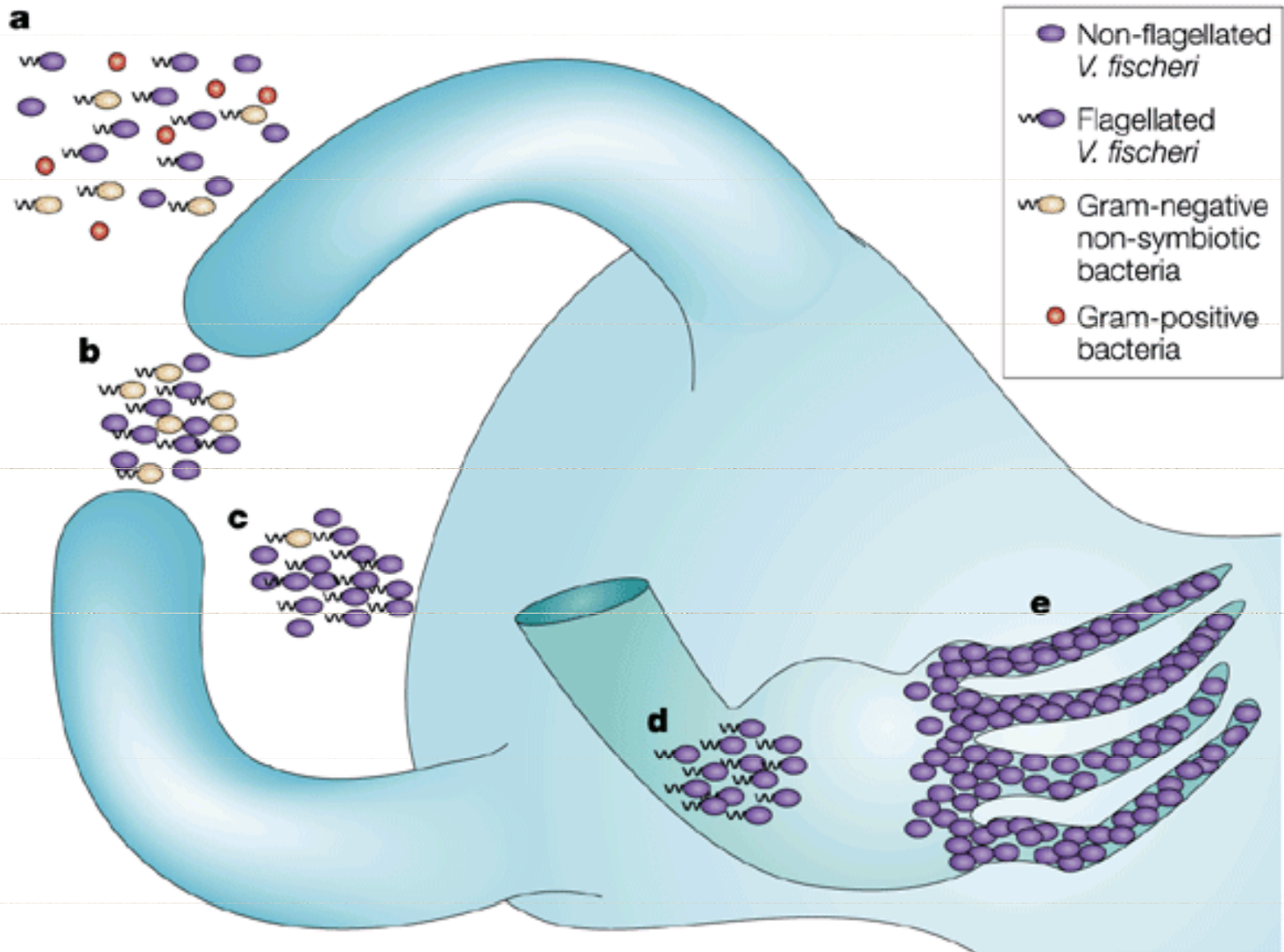


Quorum sensing discovered in the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, a symbiont of many marine animals as *Euprymna scolopes*



Quorum Sensing

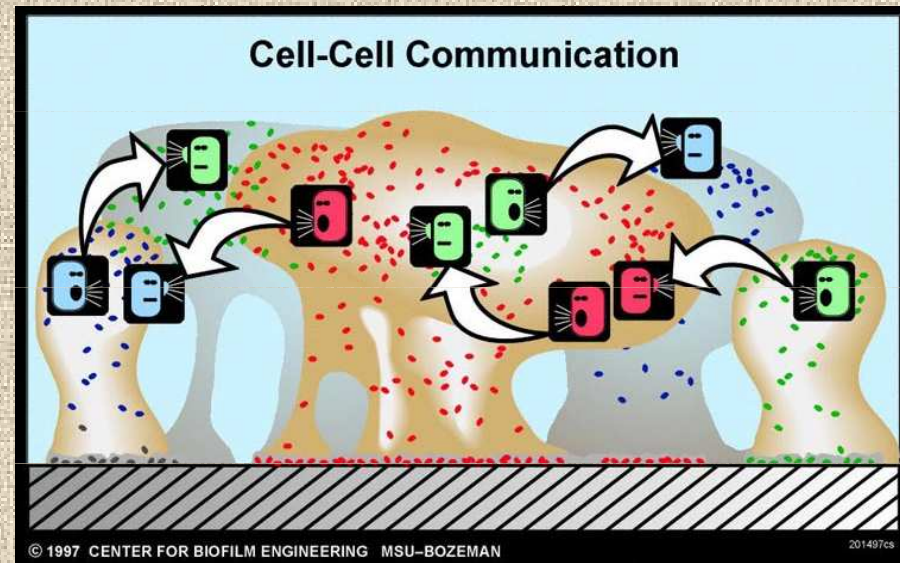




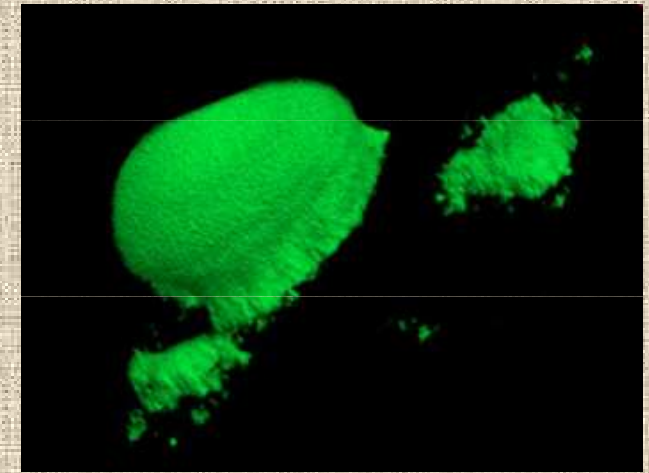
- This model depicts the progression of light-organ colonization as a series of steps, each more specific for symbiosis-competent *Vibrio fischeri*. a | In response to Gram-positive and Gram-negative bacteria (alive or dead) the bacterial peptidoglycan signal causes the cells of the ciliated surface epithelium to secrete mucus. b | Only viable Gram-negative bacteria form dense aggregations. c | Motile or non-motile *V. fischeri* out-compete other Gram-negative bacteria for space and become dominant in the aggregations. d | Viable and motile *V. fischeri* are the only bacteria that are able to migrate through the pores and into the ducts to colonize host tissue. e | Following successful colonization, symbiotic bacterial cells become non-motile and induce host-epithelial cell swelling. Only bioluminescent *V. fischeri* will sustain long-term colonization of the crypt epithelium.

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 RhlI/RhlR) systém



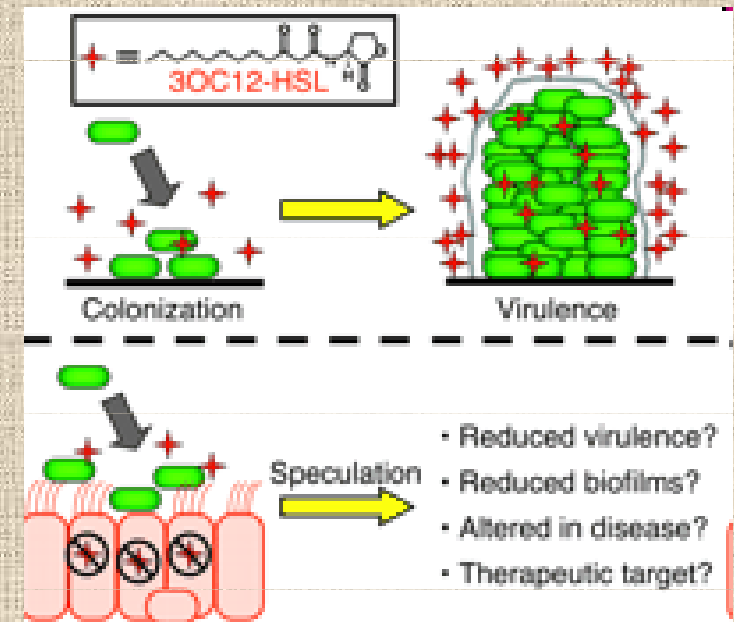
3D rekonstrukce dozrávání biofilmu
Pseudomonas aeruginosa

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

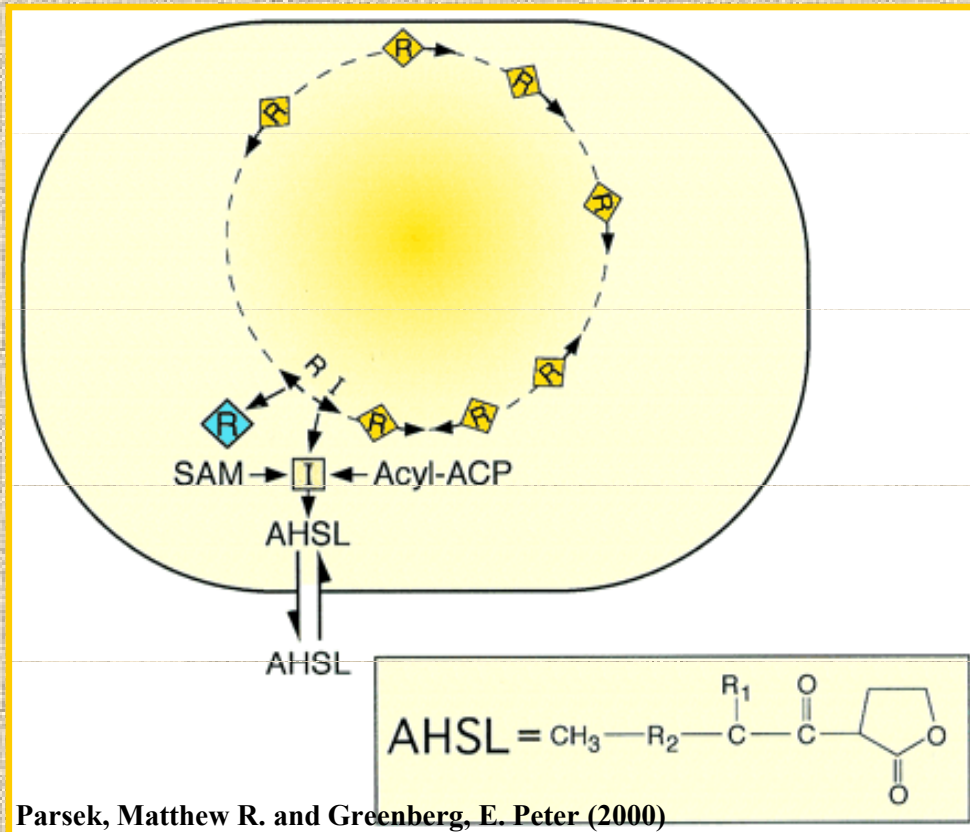
!!! **Ekonomika buňky: produkce extracelulárních signálů až nad určitou hustotou populace !!!**

- 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* regulováno 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

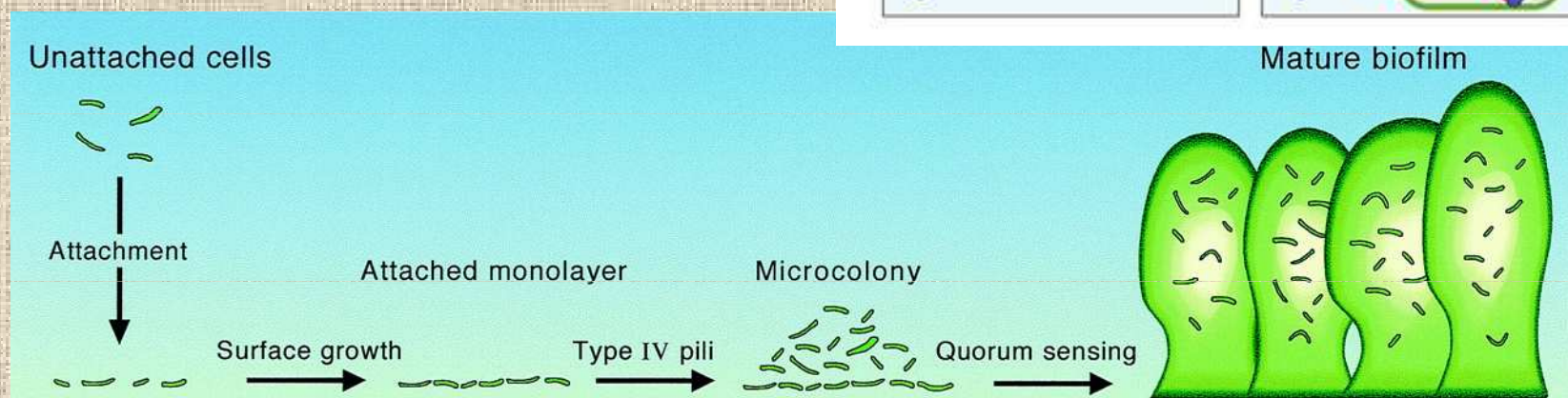
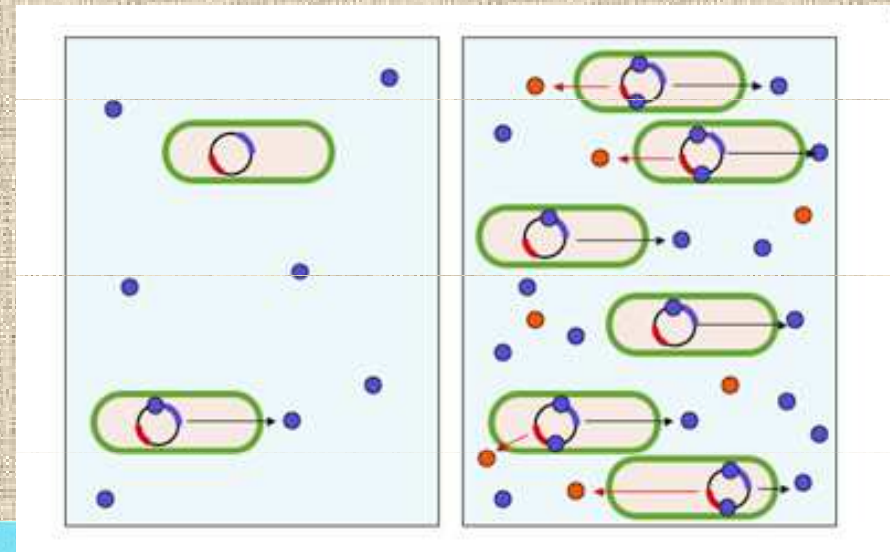
R_1 : H, OH, O

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

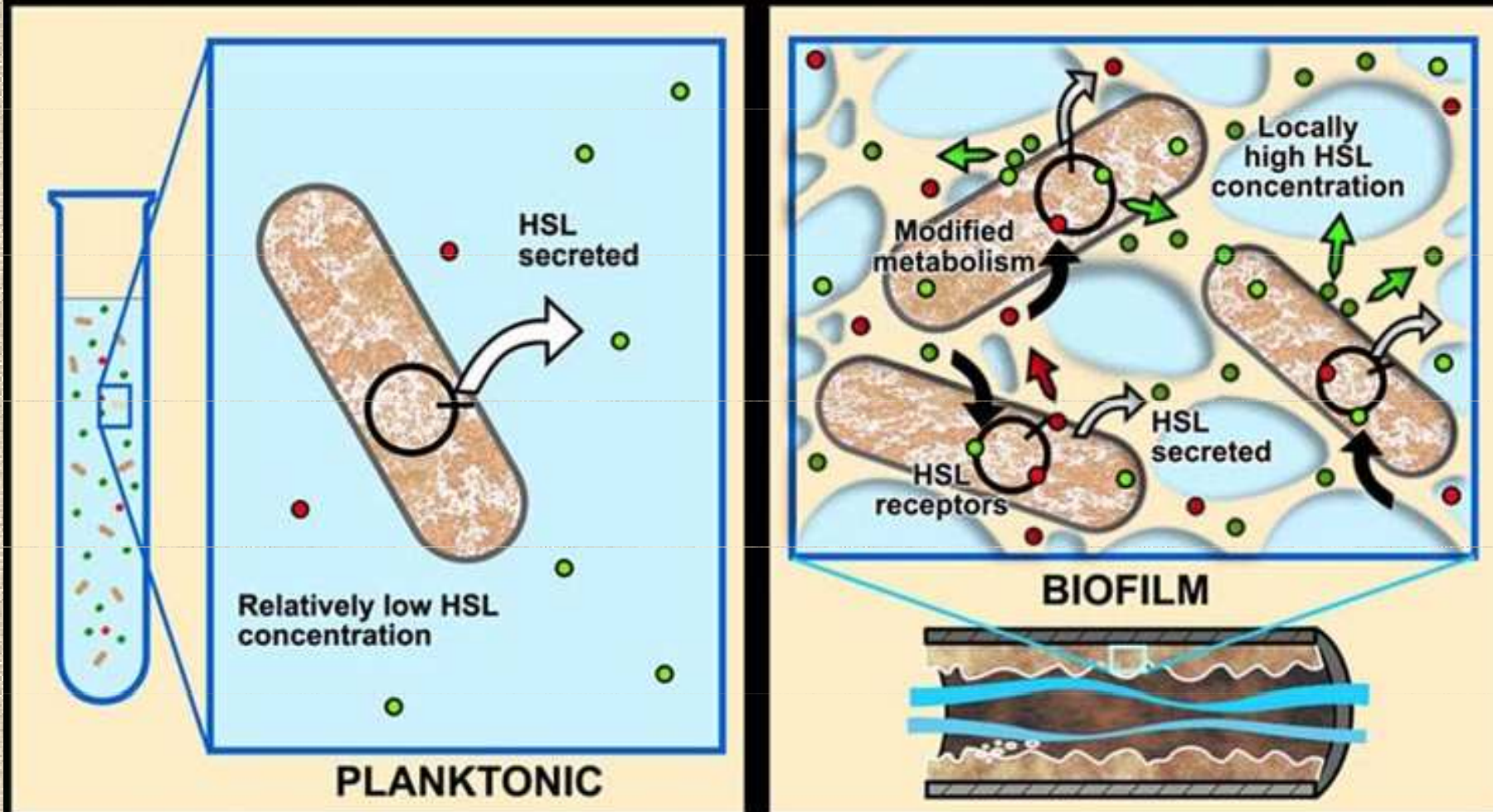
$(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2)$

- Žluté diamanty v kruhu: LuxR homology aktivované HSL signálem – jeho 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 jsou aktivovány různými formami ASHL po dosažení jejich určité koncentrace
- Kaskáda reakcí pro spuštění produkce sekundárních metabolitů: HCN, pyocyanin

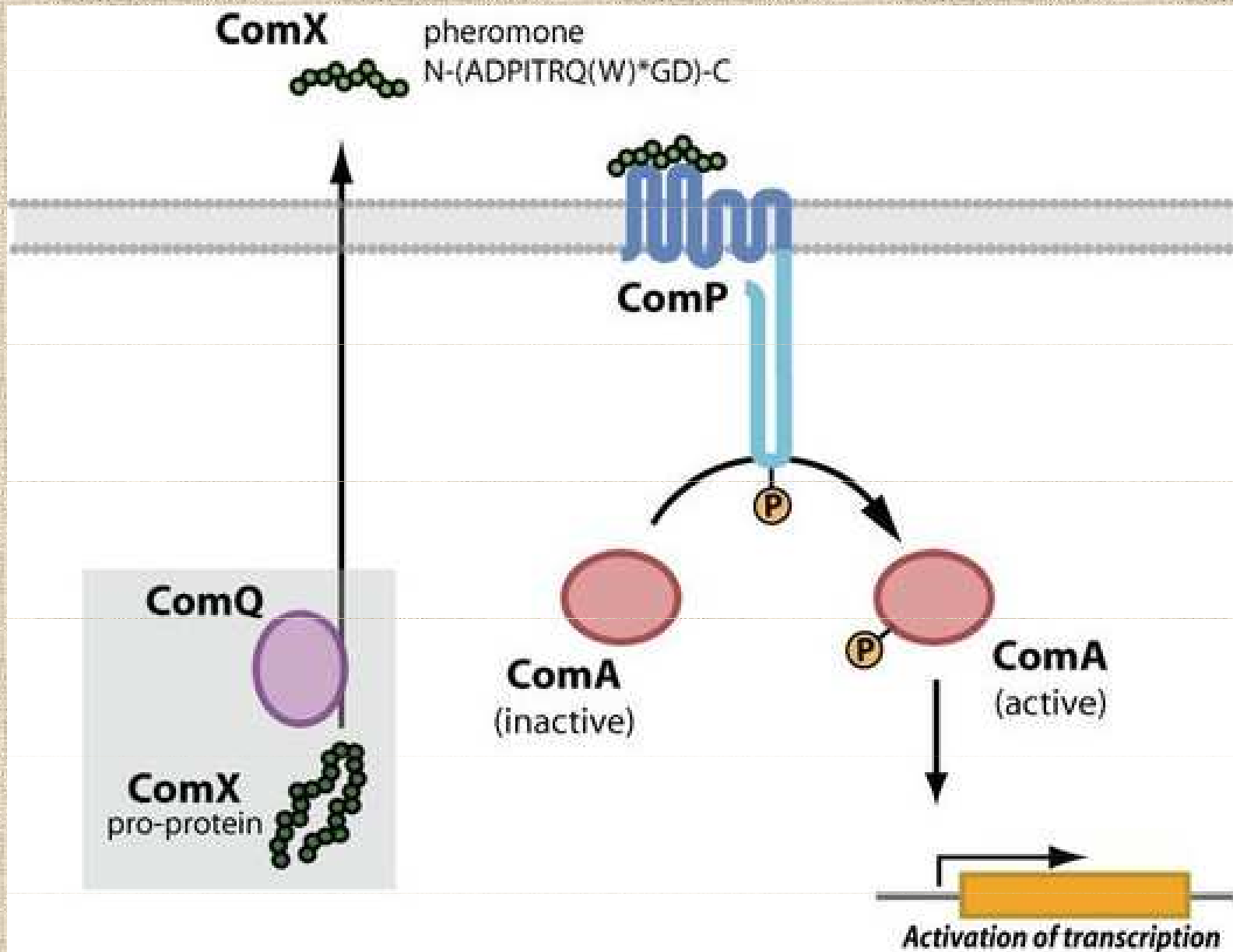


Quorum Sensing



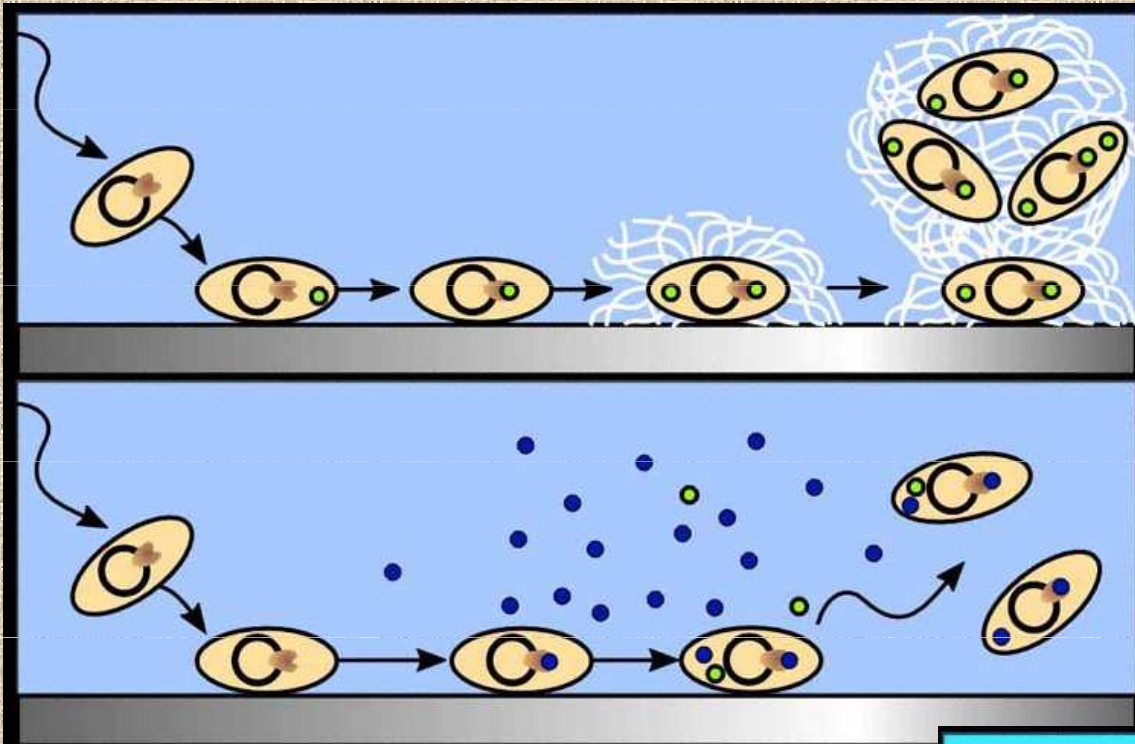
© 2004 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

- Acyl-homoserin lakton (G- bakterie) = autoinduktor (červený) a metabol.produkt od urč.koncentrace AHL (zelený)



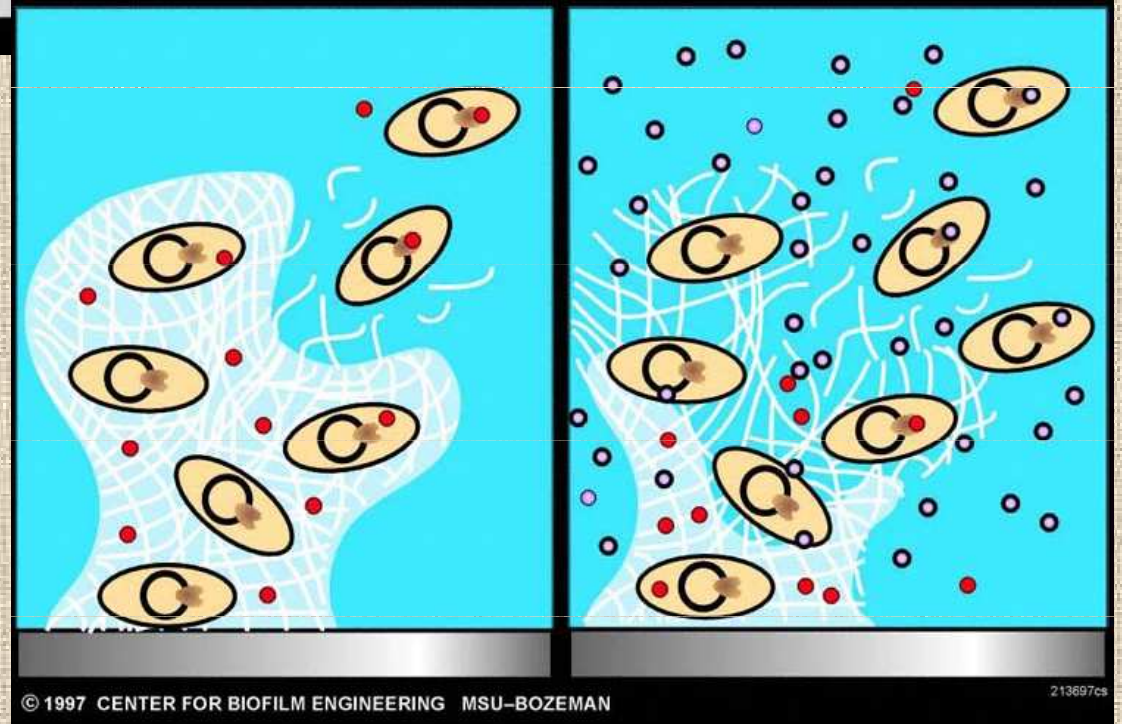
Quorum response in gram-positive bacteria.

Kontrola procesu tvorby biofilmu



© 1997 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

Zvýšení uvolňování
buněk ze zralého
biofilmu



© 1997 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

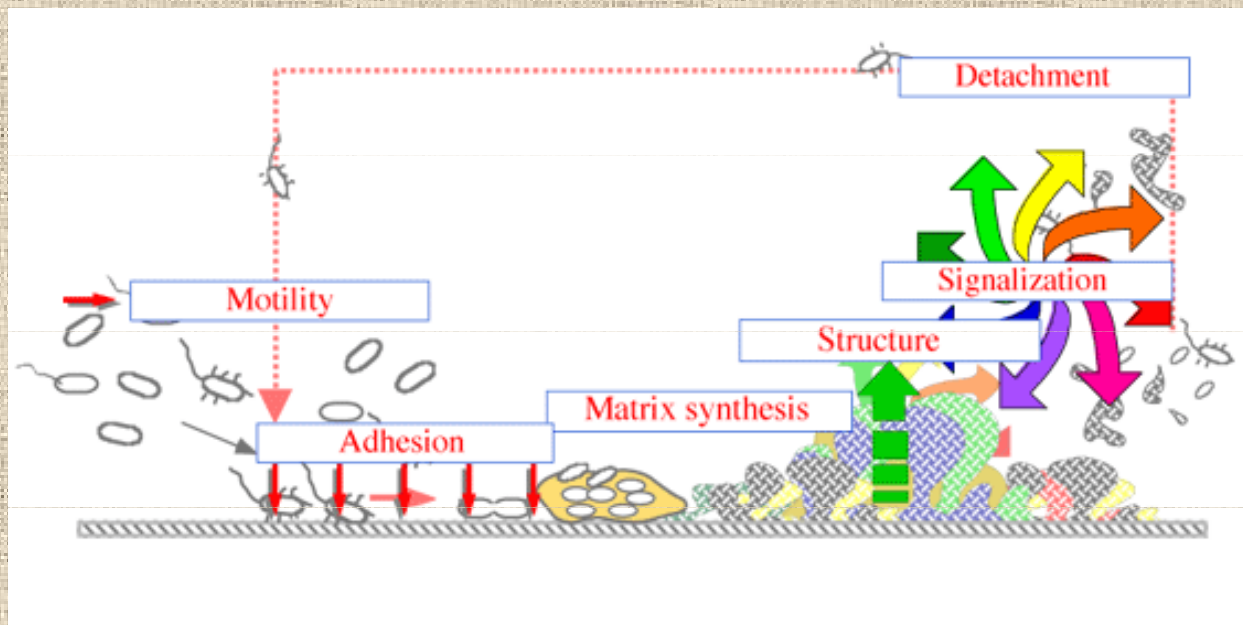
213697cs

- Upregulated proteins included those involved in anaerobic processes, denitrification, many efflux pumps, and some quorum sensing proteins. One major player they found upregulated was a known transcriptional regulator that turns on antibiotic resistance by inducing transcription of efflux pumps. Microbiologists have tended to define microbial physiology based on planktonic bacteria, but in nature bacteria exist almost exclusively in biofilms : the only time they are planktonic is when making the transition from one biofilm to another. If bacteria in biofilms are physiologically different from planktonic bacteria, then all the work done right back to Louis Pasteur has to be repeated. Within biofilms, cell-cell communication occurs through [quorum sensing](#), in which signaling molecules called autoinducers, specific for that species, are produced and exchanged among bacterial neighbors.

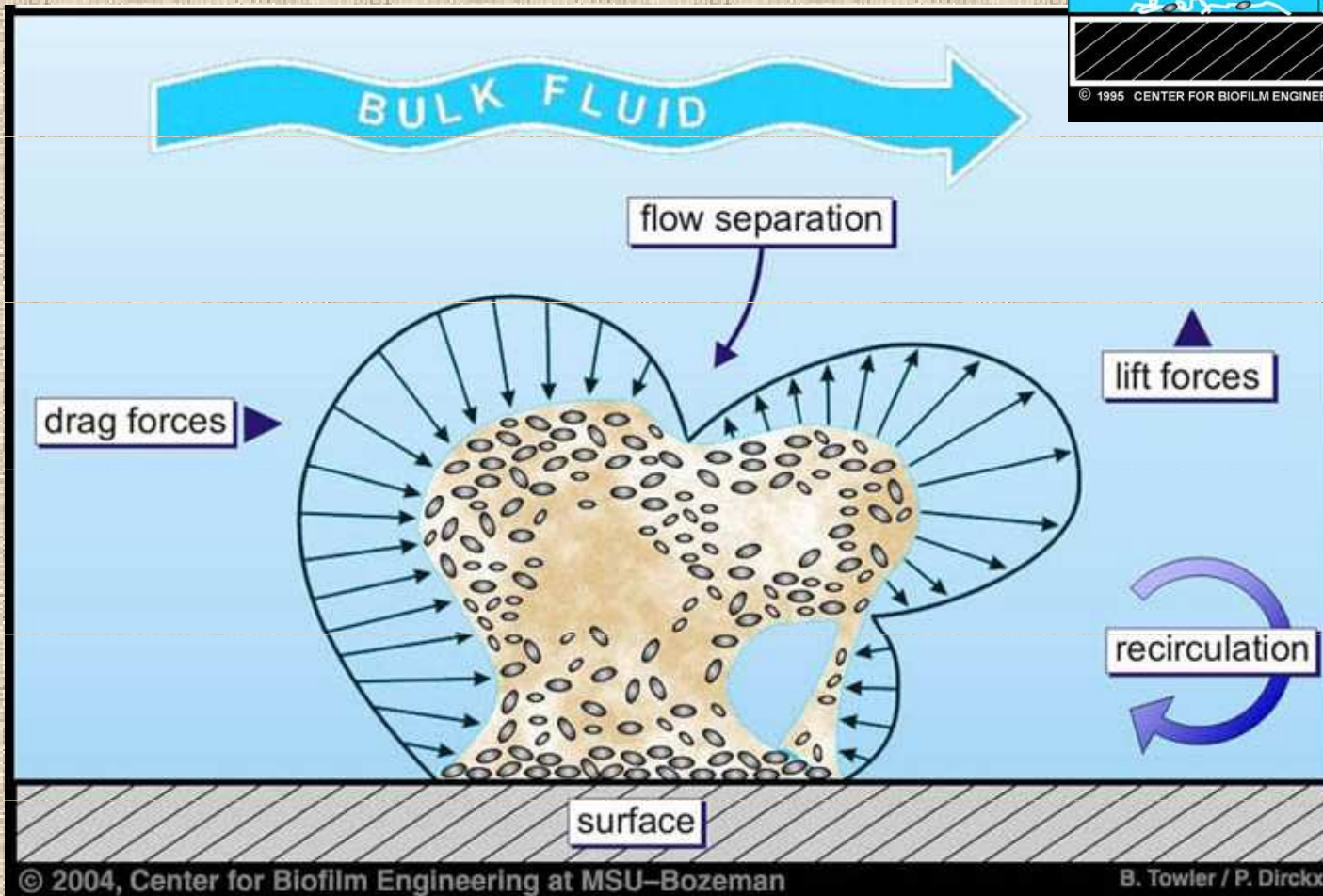
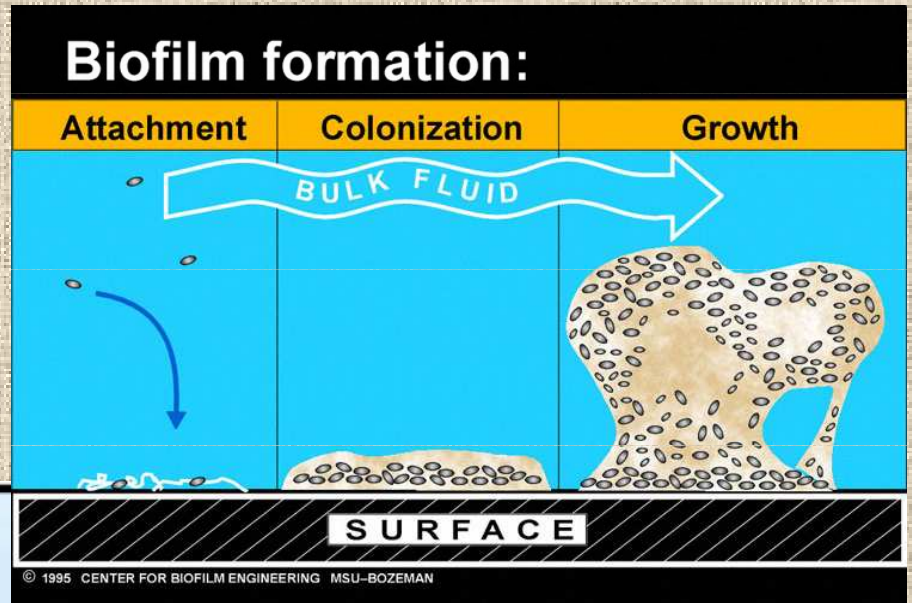
Terapie biofilmů:

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)

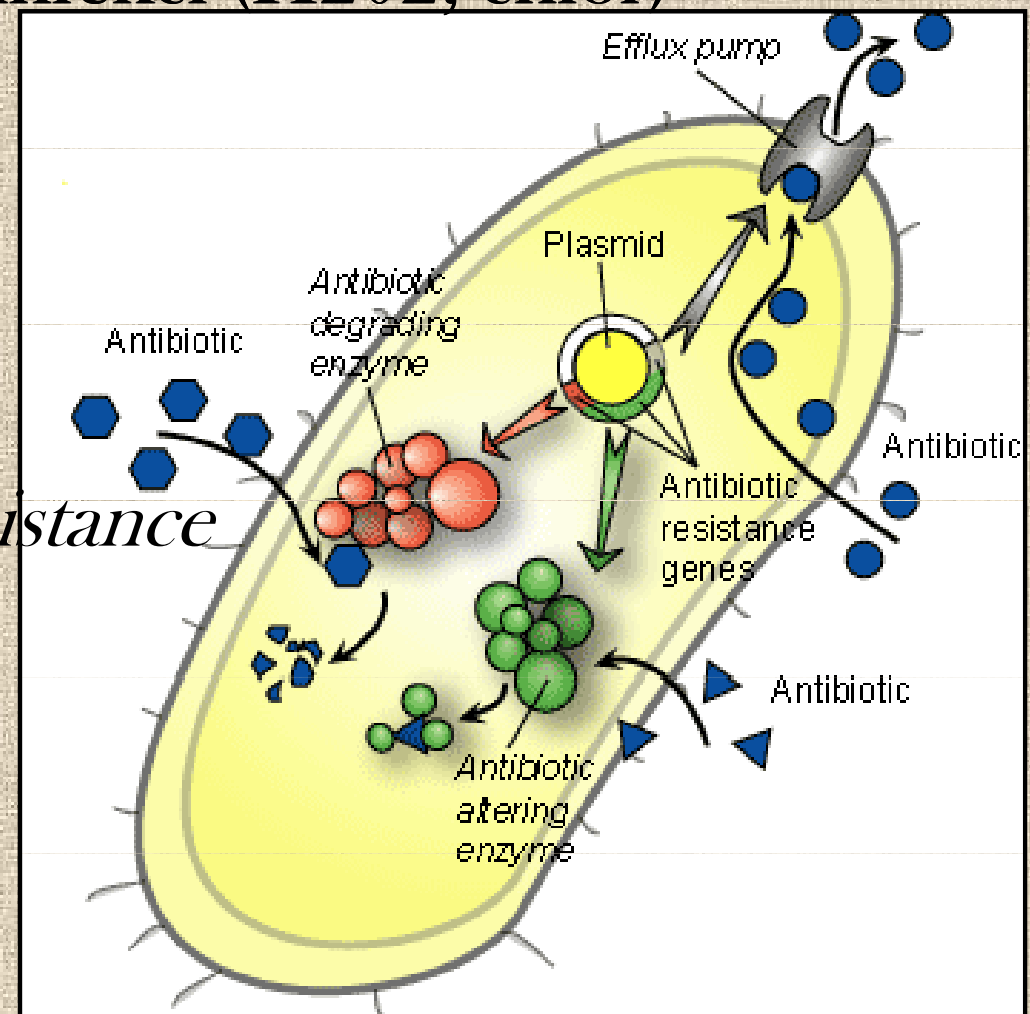
- omezená difúze
- sorpce ATB
- klidový stav, hladovění
- změna genotypu:

geny *mar* - *multiple ATB resistance*

- efflux systém
- enzymatická degradace
- modifikace cílových mlk

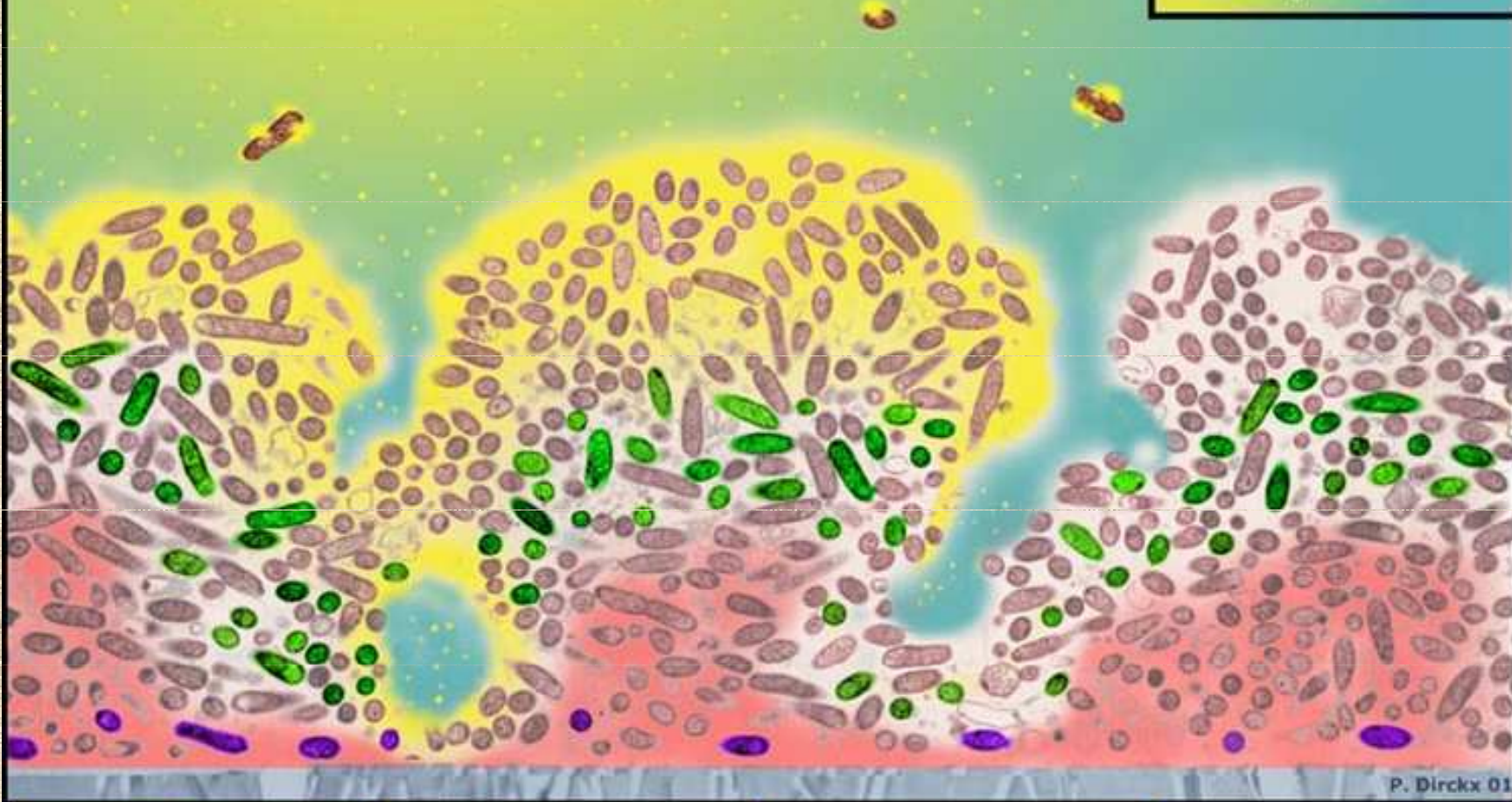
Speciální sigma faktory

Signální mechanismy



Mechanisms of Biofilm Tolerance

Antimicrobial
Depletion



P. Dirckx 01

**Slow
Penetration**

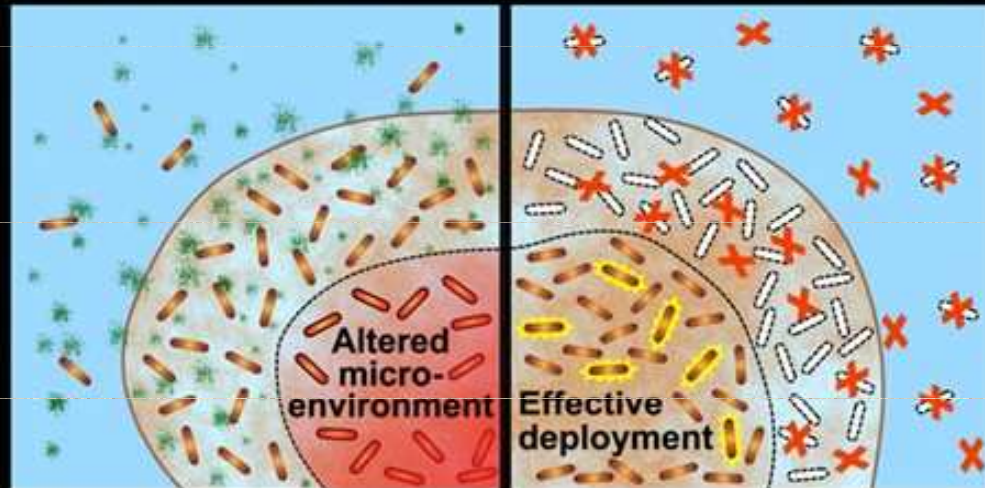
**Stress
Response**

**Altered
Microenvironment**

Persisters

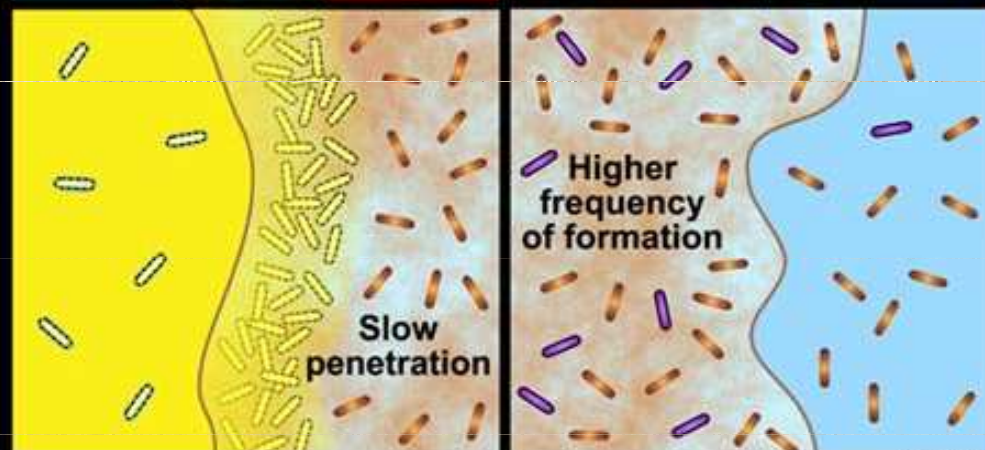
Biofilm multicellularity results in better bacterial defenses

Nutrient depletion creates zones of altered activity.

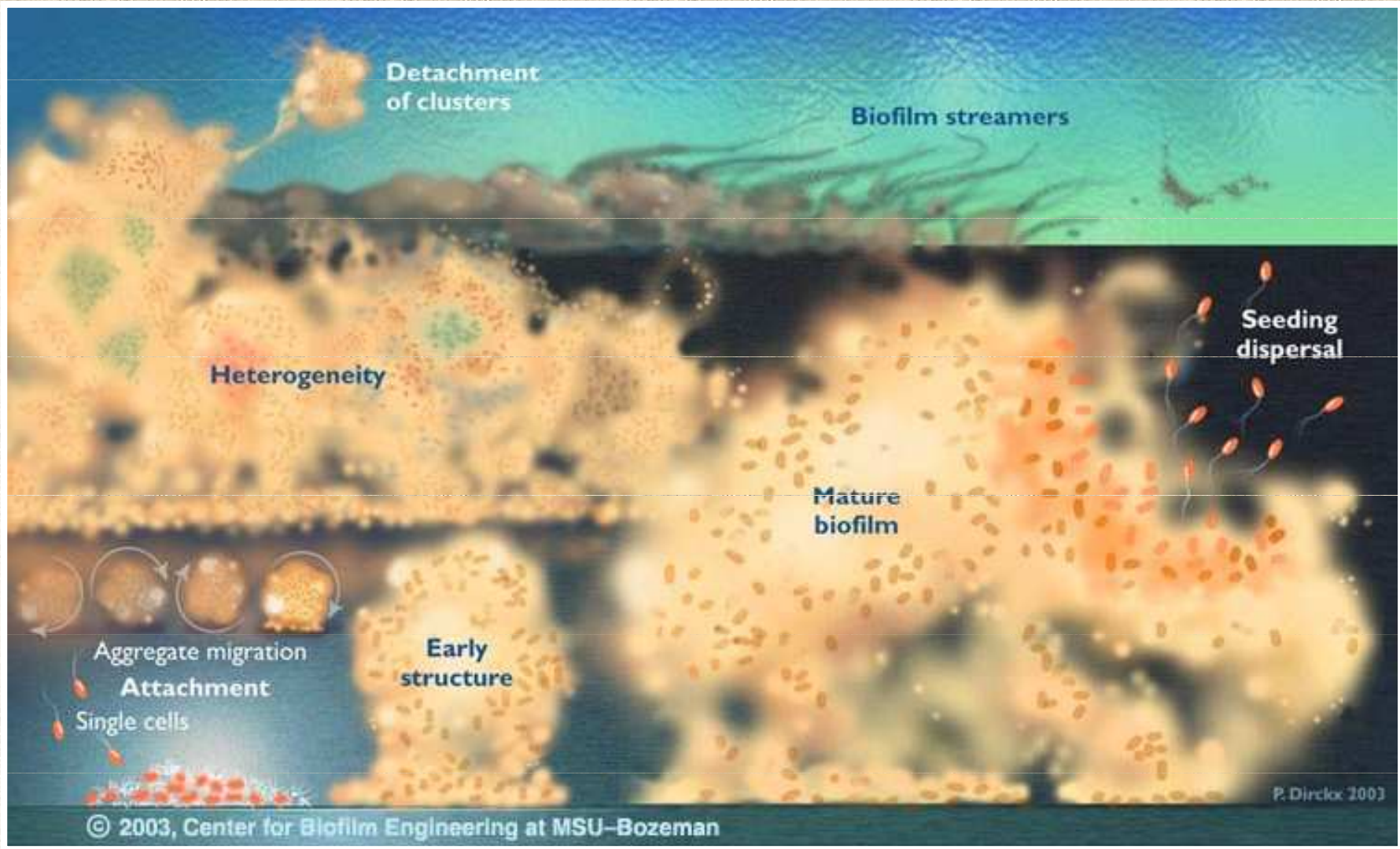


Inner layers of biofilm cells have more time to initiate stress response.

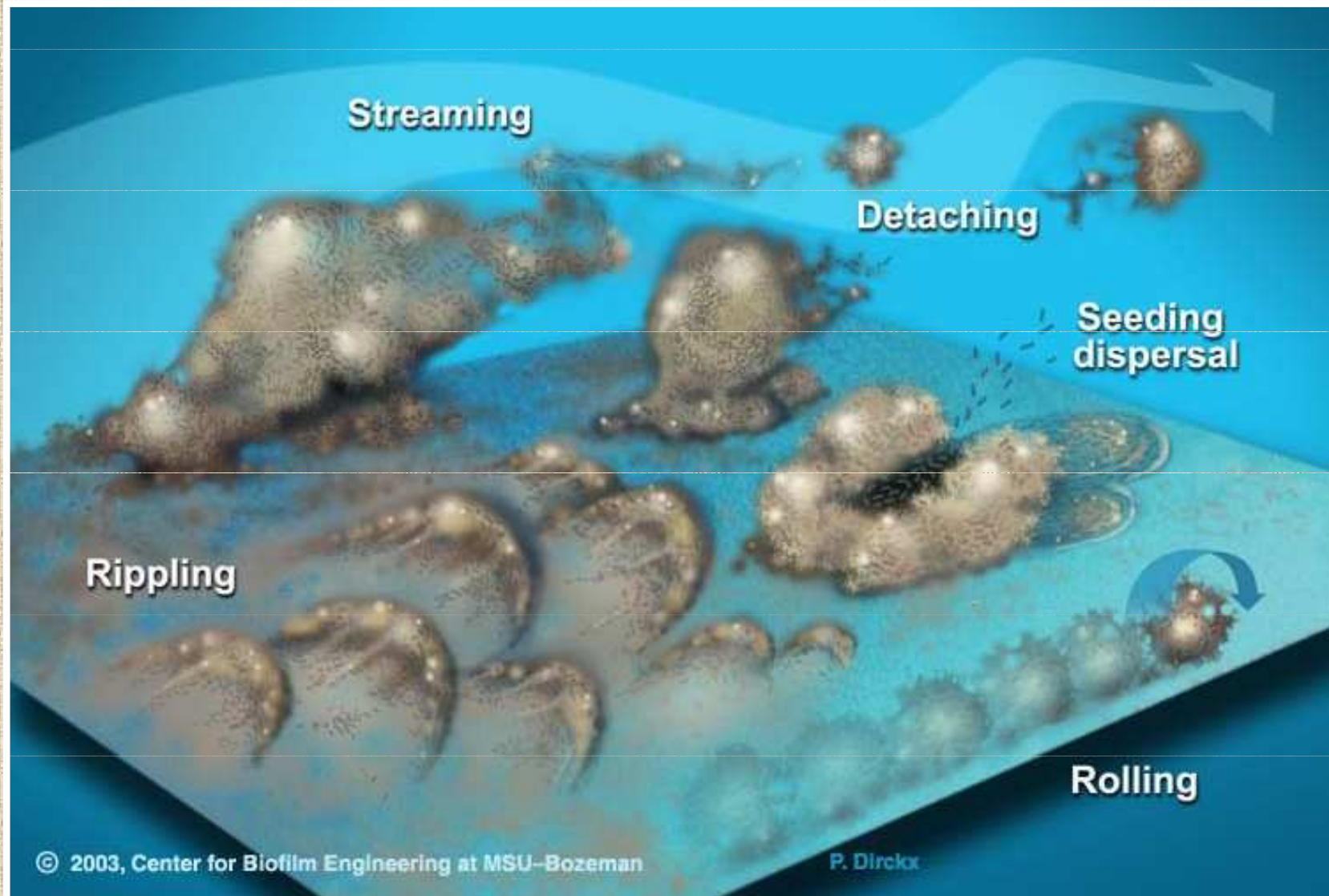
Outer layers of biofilm cells absorb damage.



“Persister” cells may be present in higher numbers.



Heterogenita struktury biofilmu



Biofilms Impact . . .



Teeth

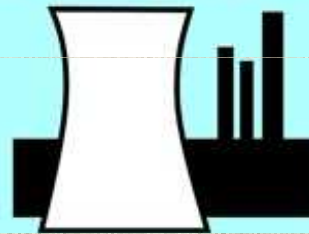


Drinking Water



Oil Recovery

Cooling Water

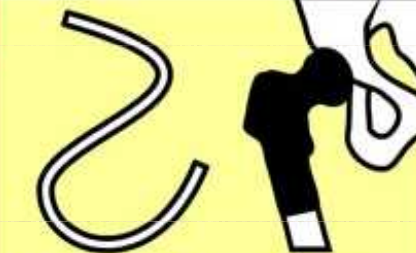


Food Processing

Ship Hulls



Paper Manufacturing



Medical Implants

Biofilm v lidském těle:

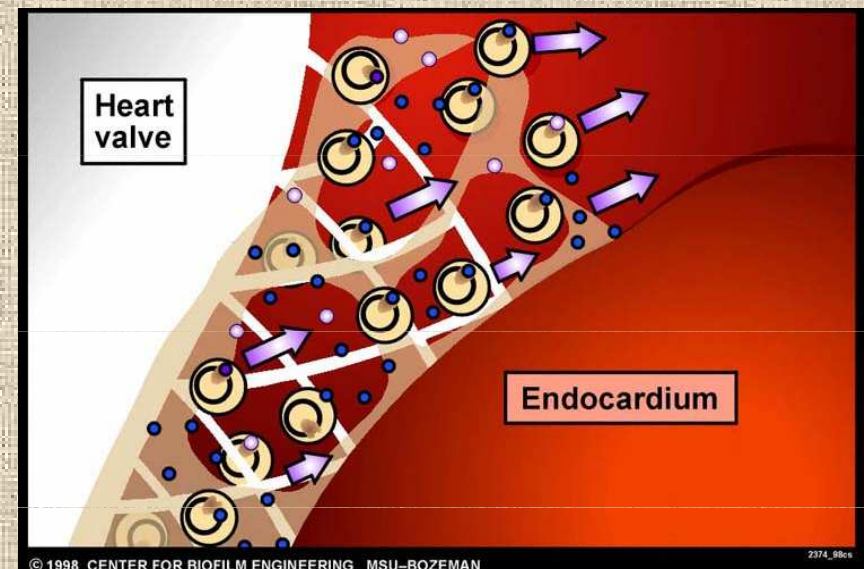
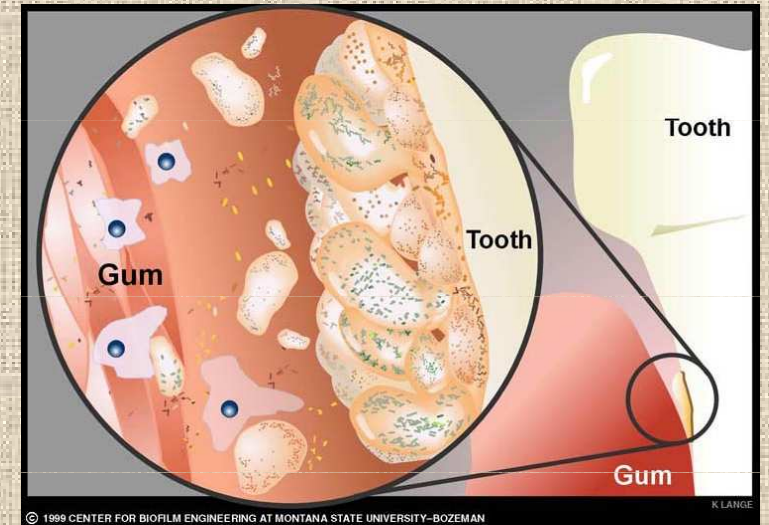
Zubní povlak

Infekce ran; vředy

Chronické infekce – dýchací cesty, ušní inf.

cyst.fibróza, chronická obstrukční plicní nemoc; otitis
media

Močové cesty...



Biofilm a medicína

Cévy - arteriální, žilní, močové

Dýchací a dializační přístroje

Umělé chlopně

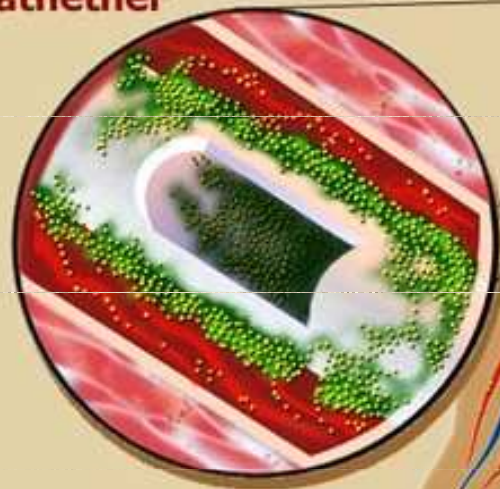
Kontaktní čočky

Děložní tělísko

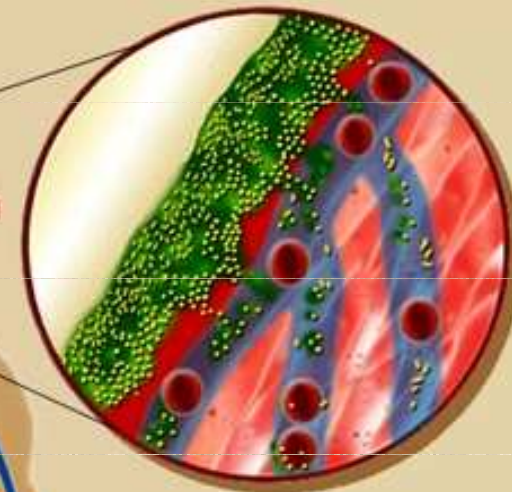
Sites of **Primary** and **Secondary** Biofilm Infection

**SITES OF
PRIMARY
INFECTION:**

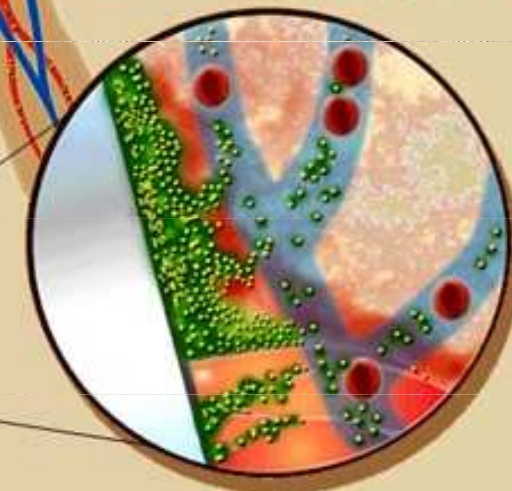
**Subvenous
catheter**



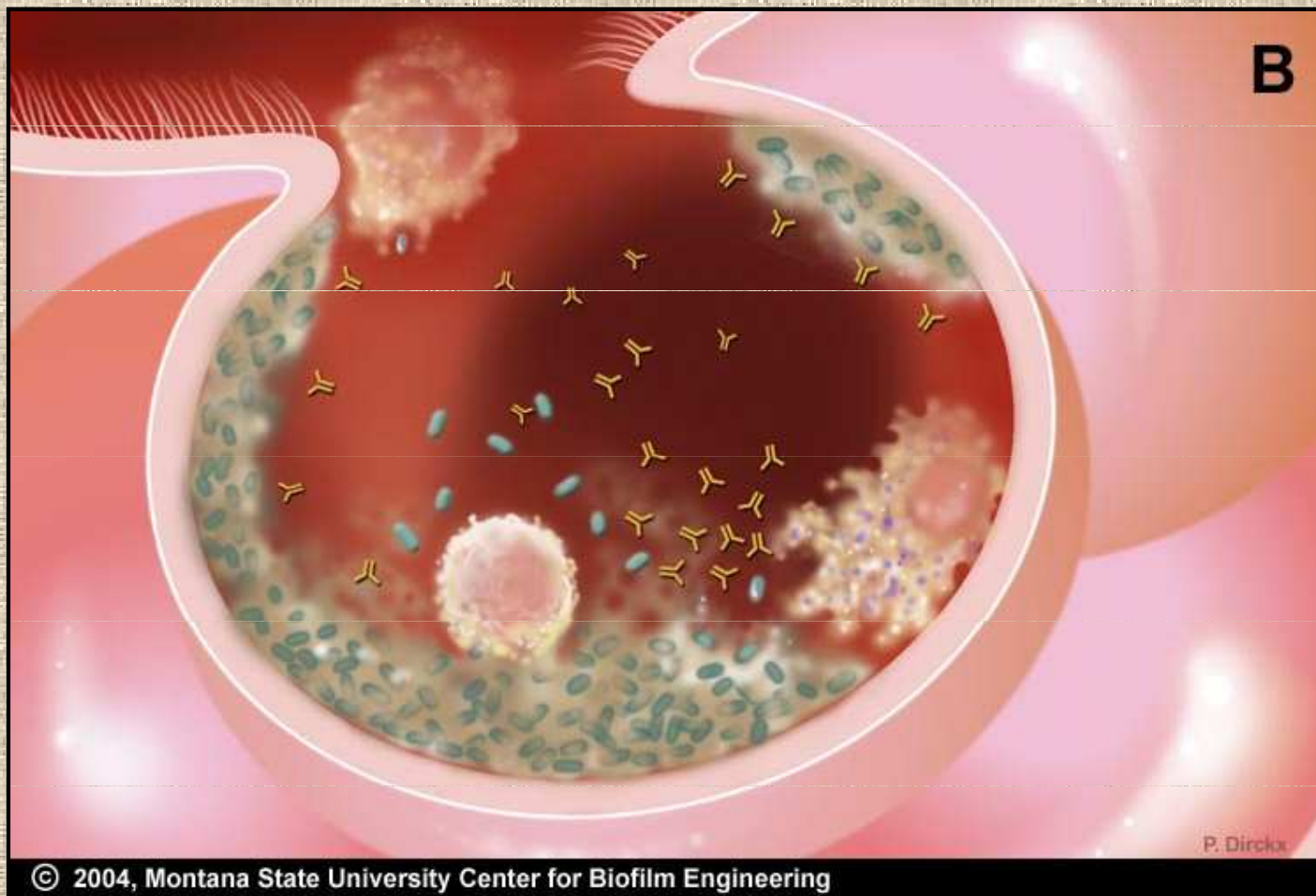
Mouth



Artificial hip implant



- Imunokomprimování – kolonizace alveol
- Biofilm nespouští imunitní odpověď
- Až kalcifikace alveol



Examples of Medically Important Biofilms

- Following implantation of endoprostheses, catheters, cardiac pacemakers, shunt valves, etc. these foreign bodies are covered by matrix proteins of the macro-organism such as fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or laminin. Staphylococci have proteins on their surfaces with which they can bind specifically to the corresponding proteins, for example the clumping factor that binds to fibrinogen and the fibronectin-binding protein. The adhering bacteria then proliferate and secrete an exopolysaccharide glycocalyx: the biofilm matrix on the foreign body. Such biofilms represent **foreign body-associated infection foci**.
- Certain oral streptococci (*S. mutans*) bind to the proteins covering tooth enamel, then proceed to build a glucan matrix out of sucrose. Other bacteria then adhere to the matrix to form plaque (Fig. 3.14), the precondition for destruction of the enamel and formation of **caries** (see p. 243f.).
- Oral streptococci and other bacteria attach to the surface of the cardiac valves to form a biofilm. Professional phagocytes are attracted to the site and attempt, unsuccessfully, to phagocytize the bacteria. The frustrated phagocytes then release the tissue-damaging content of their lysosomes (see p. 23), resulting in an inflammatory reaction and the clinical picture of **endocarditis**.

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*

Experiment:

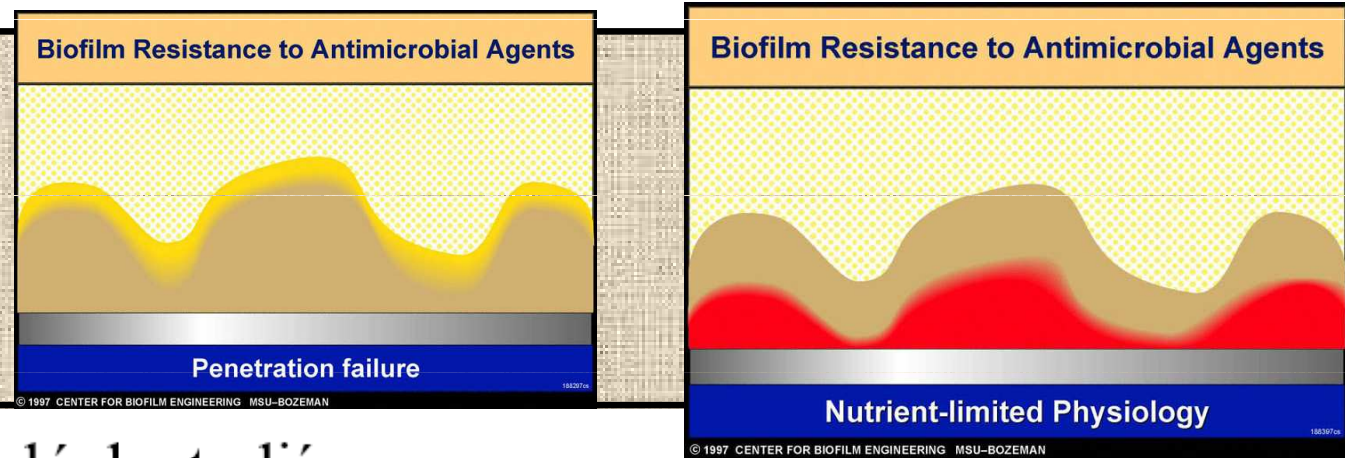
Pseudomonas aeruginosa – alginát

- 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**

Výhody přisedlých 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

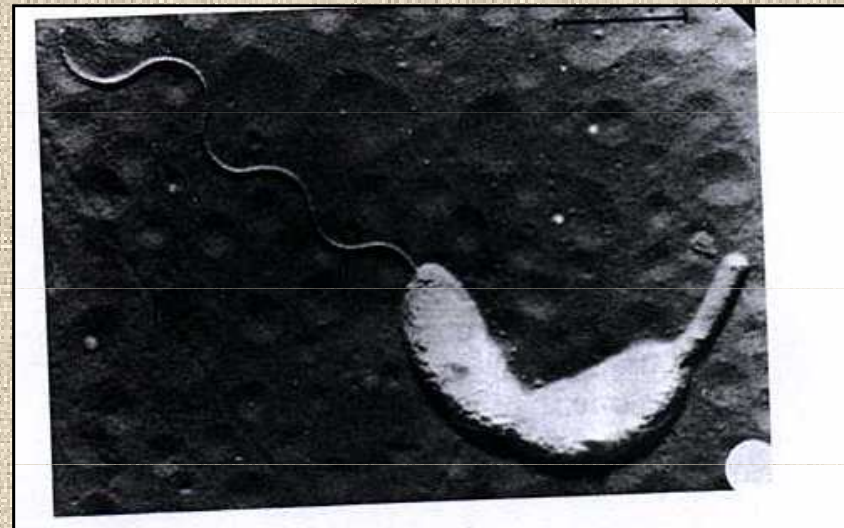
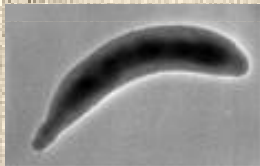


Nevýhody přisedlých stadií

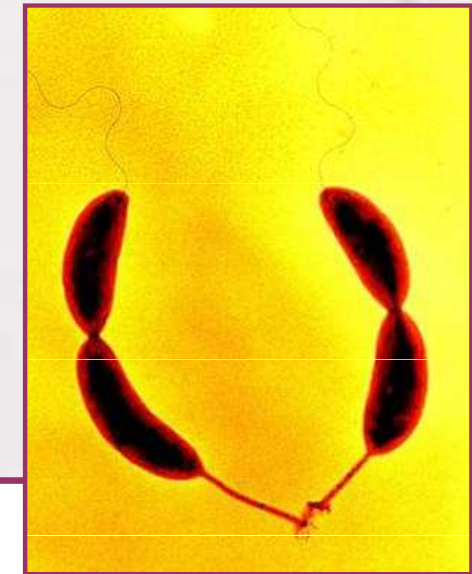
- sedimentace, vyčerpání živin a neschopnost kolonizovat nové, vhodnější prostředí
- konzumace substrátu (částic) zooplanktonem
- vznik gradientů – živiny, kyslík

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

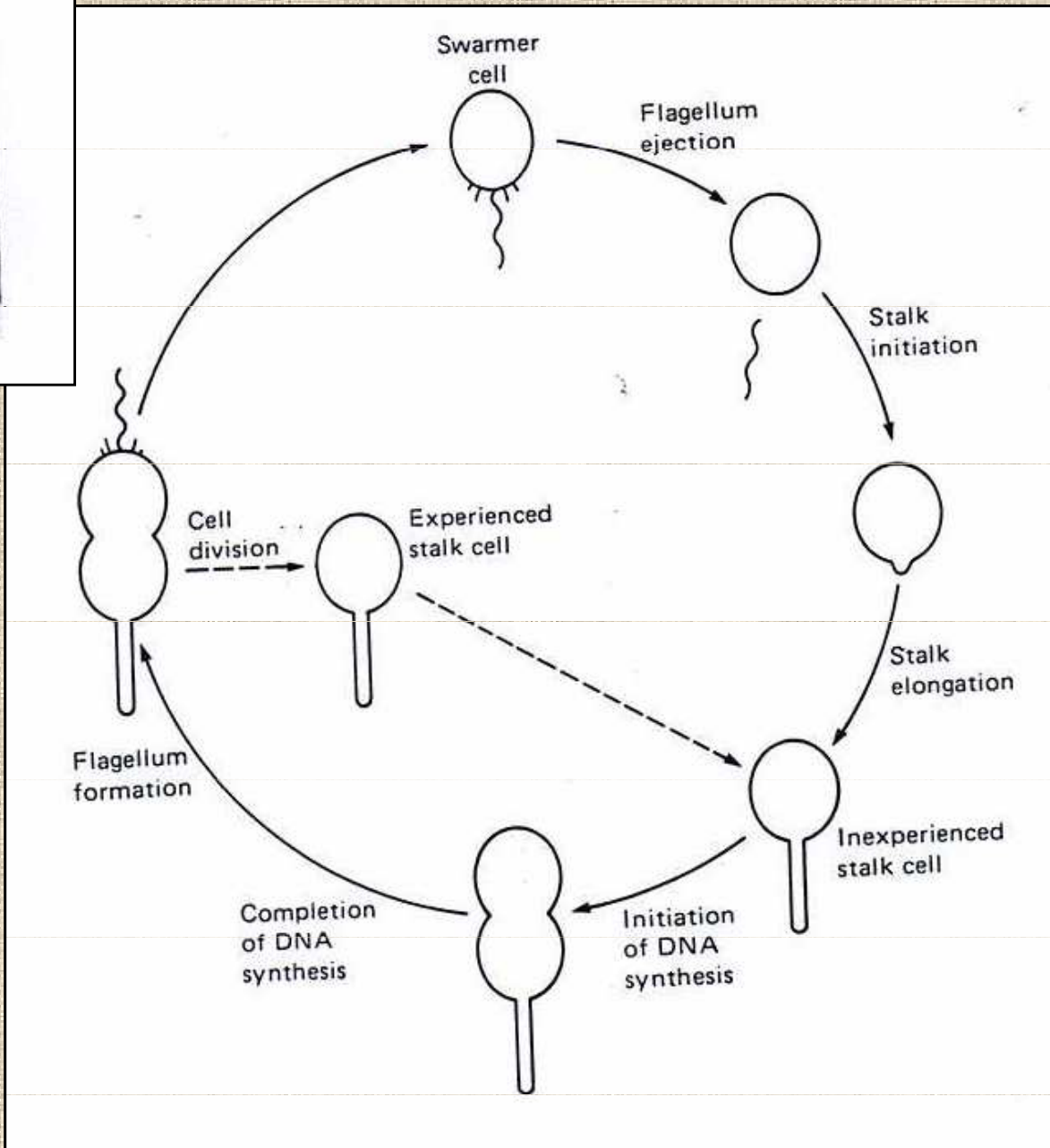
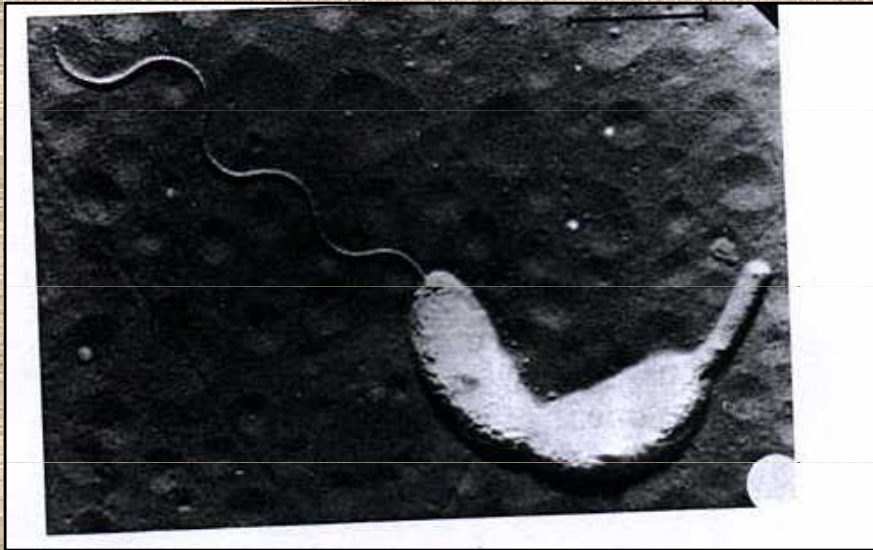


Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*

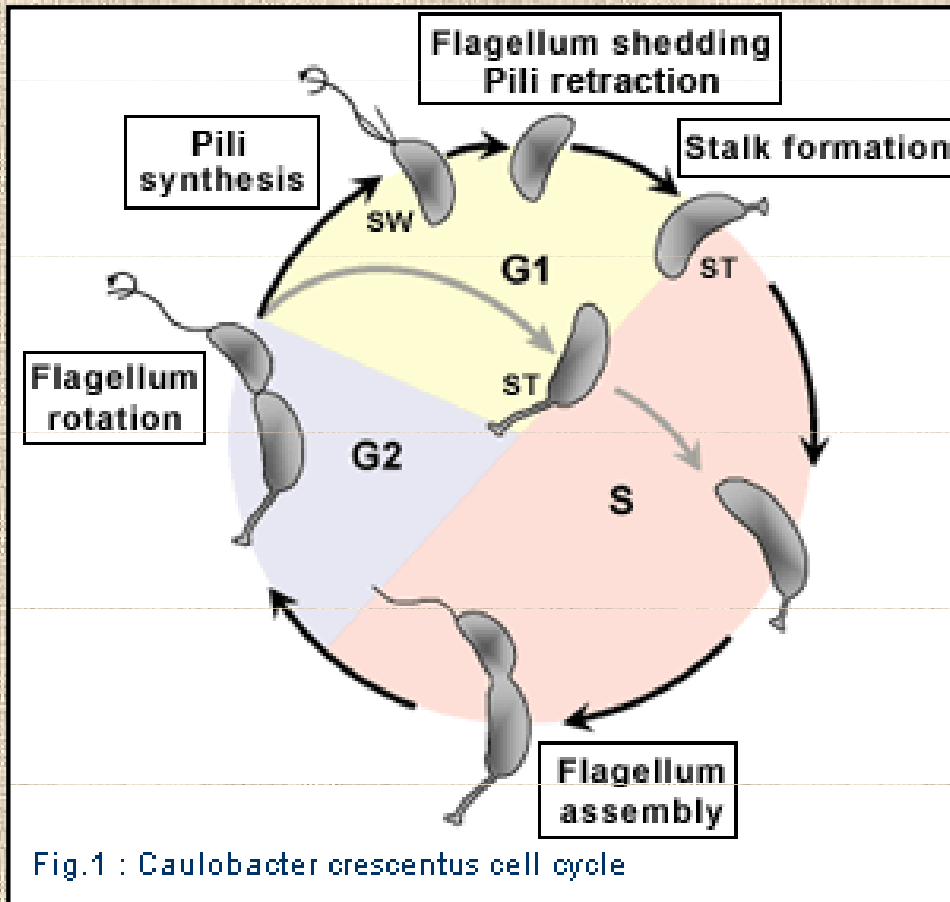


Stádia růstového cyklu

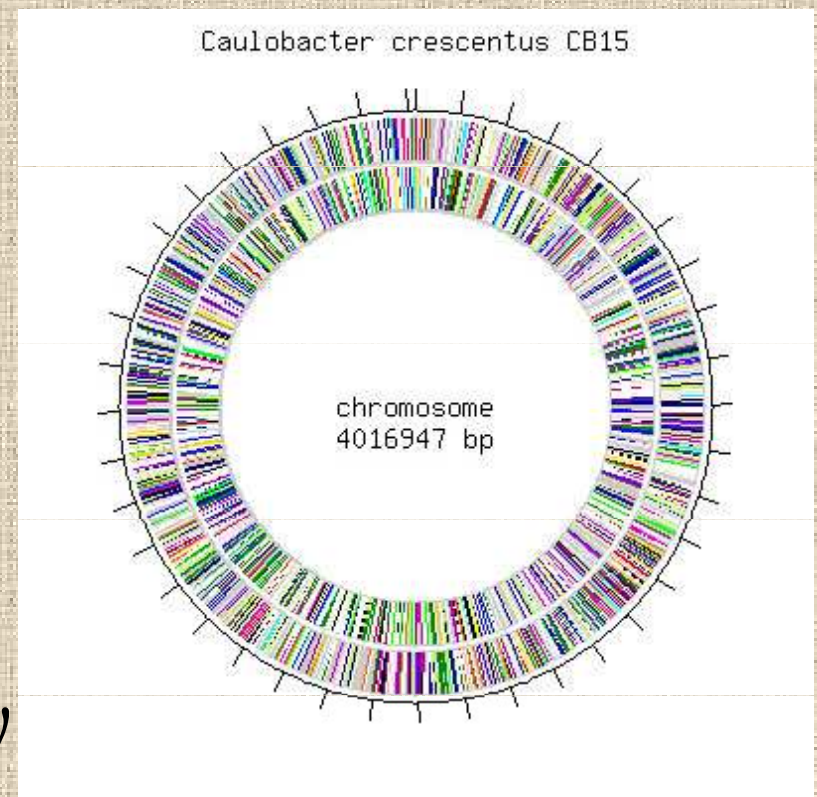
- 1. bičíkaté, volné stádium (swarmer cell) – nerostoucí, nepodléhá dělení
 - ◆ bičíkatá dceřinná buňka
- 2. stélkaté přisedlé stádium – reprodukční
 - ◆ „nezkušená buňka“ – ještě se nedělila (inexperienced cell)
 - ◆ „zkušená buňka“ – již „vyprodukovala“ dceřinnou pohyblivou buňku



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

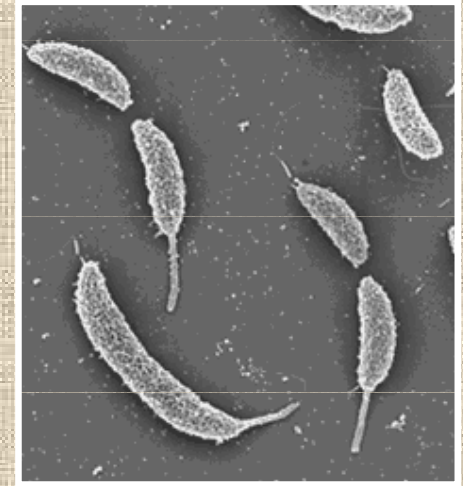


- Každé buněčné dělení je asymetrické – vznikají dvě morfologicky odlišné buňky



Plovoucí bičíkatá buňka se nereplikuje

Pro replikaci buňky nutné
přisednutí na místo s vhodným
substrátem a diferenciaci
ve stélkatou buňku.
Poté iniciace replikace DNA.



Během proměny dochází k odhození a
nahrazení bičíku a pilusů polární stélkou, která přichytí
buňku k podkladu

Nezralá stélkatá buňka se prodlužuje

Reproduktivní stélkatá buňka replikuje DNA, vznik dceřinné buňky,
syntéza nového bičíku na pólu proti stélce.

Každá morfologická změna je kontrolována dokončením
specifických kroků buněčného cyklu – uzlové body.

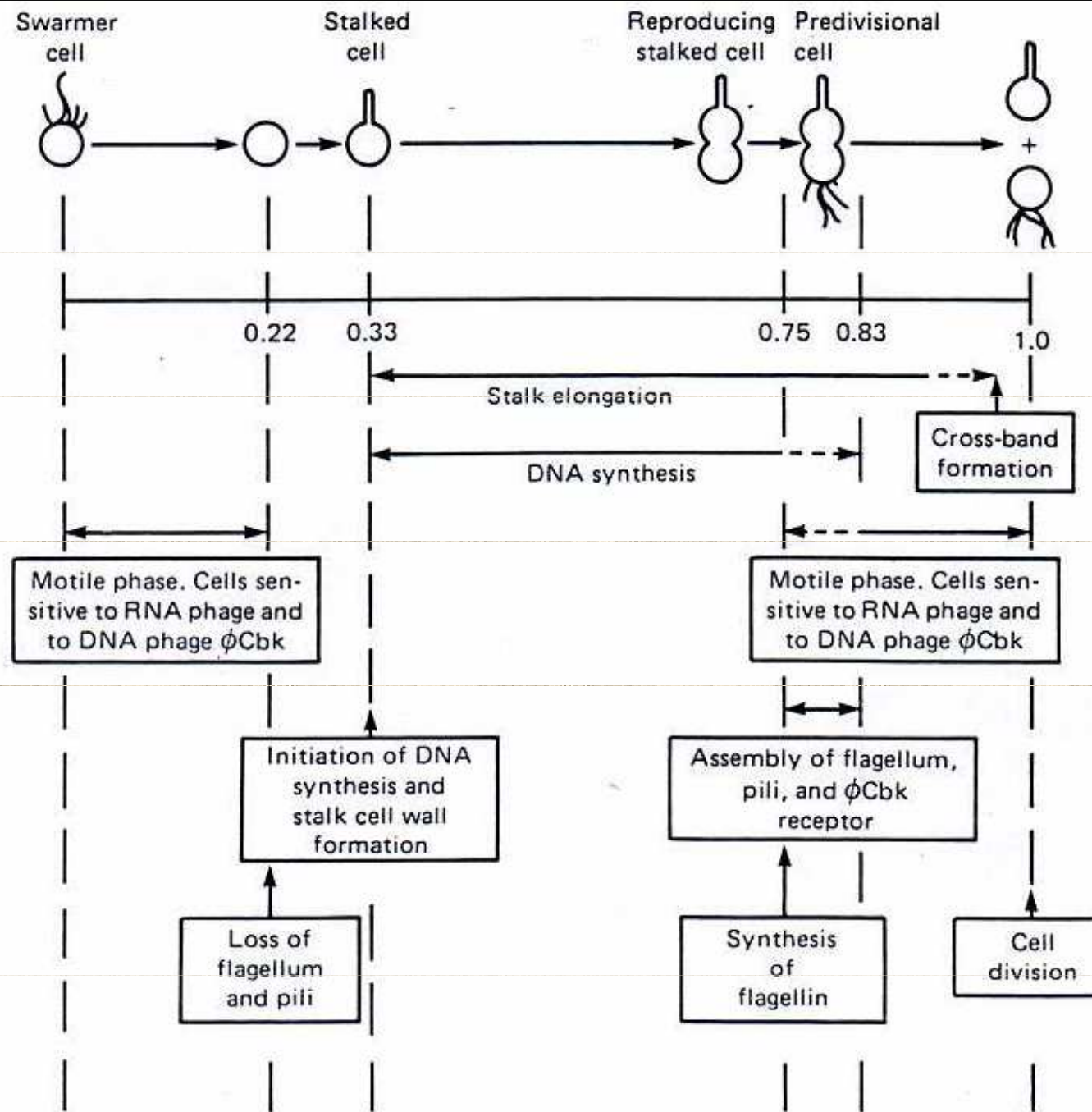
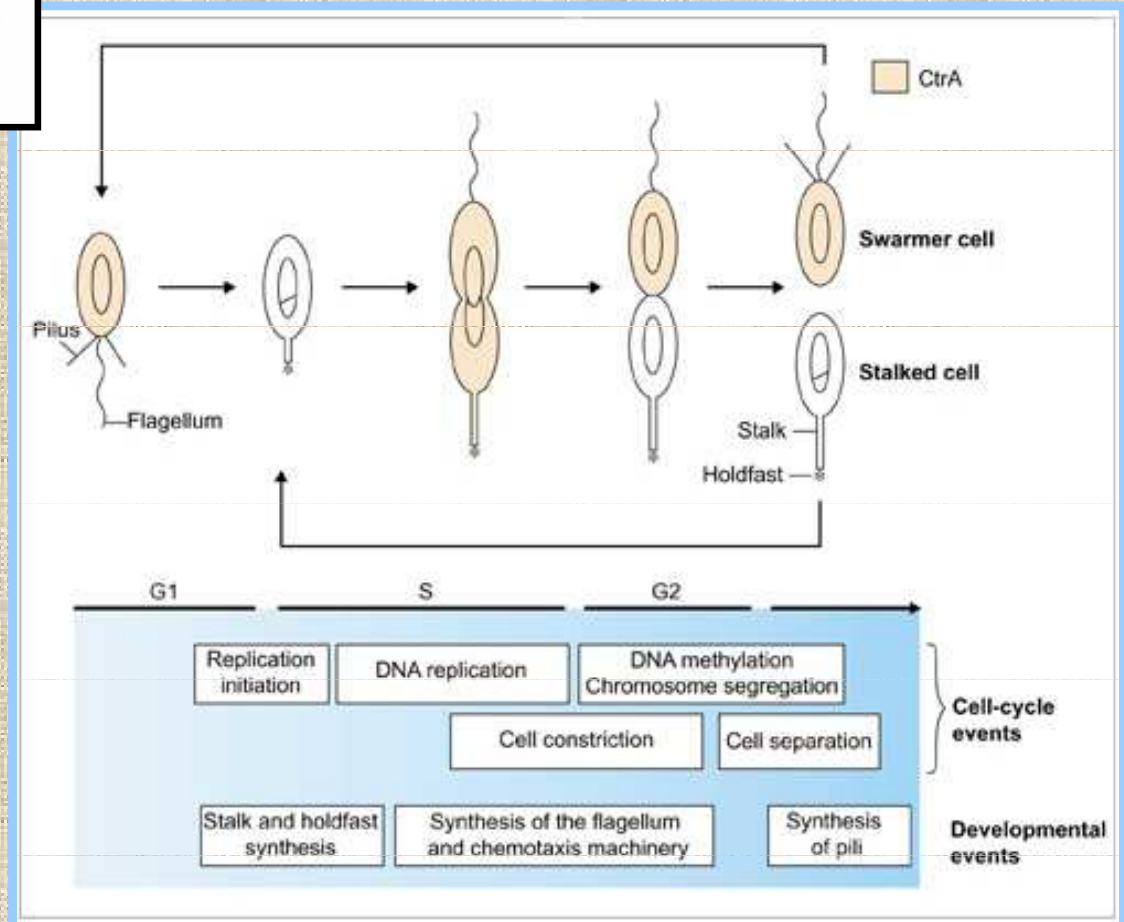
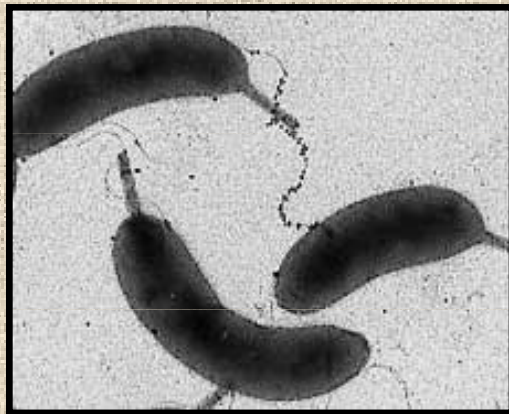
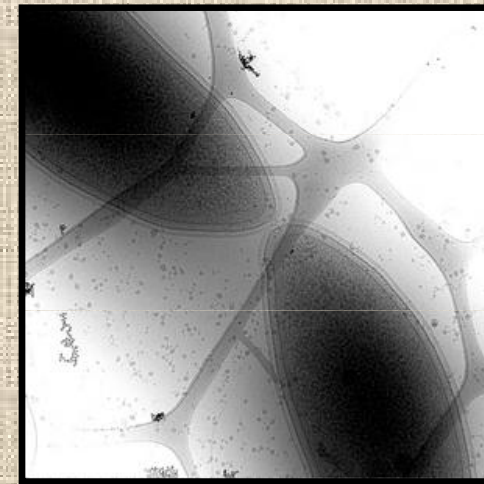
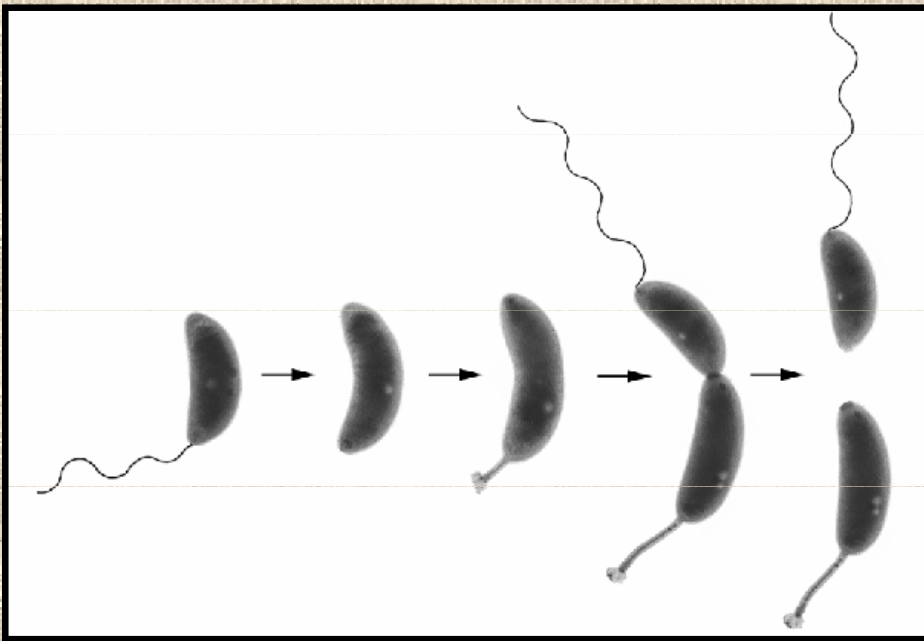


Fig. 13. Schematic diagram illustrating various developmental and biosynthetic events as a function of the cell cycle of *Caulobacter crescentus*. The numbers are fractions of a complete (1.0) cell cycle. (From Dworkin, 1985.)

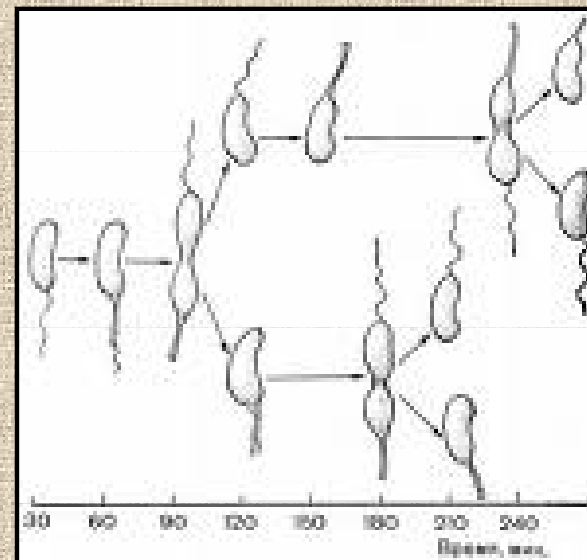
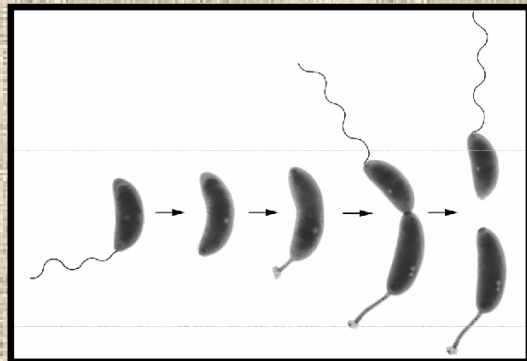


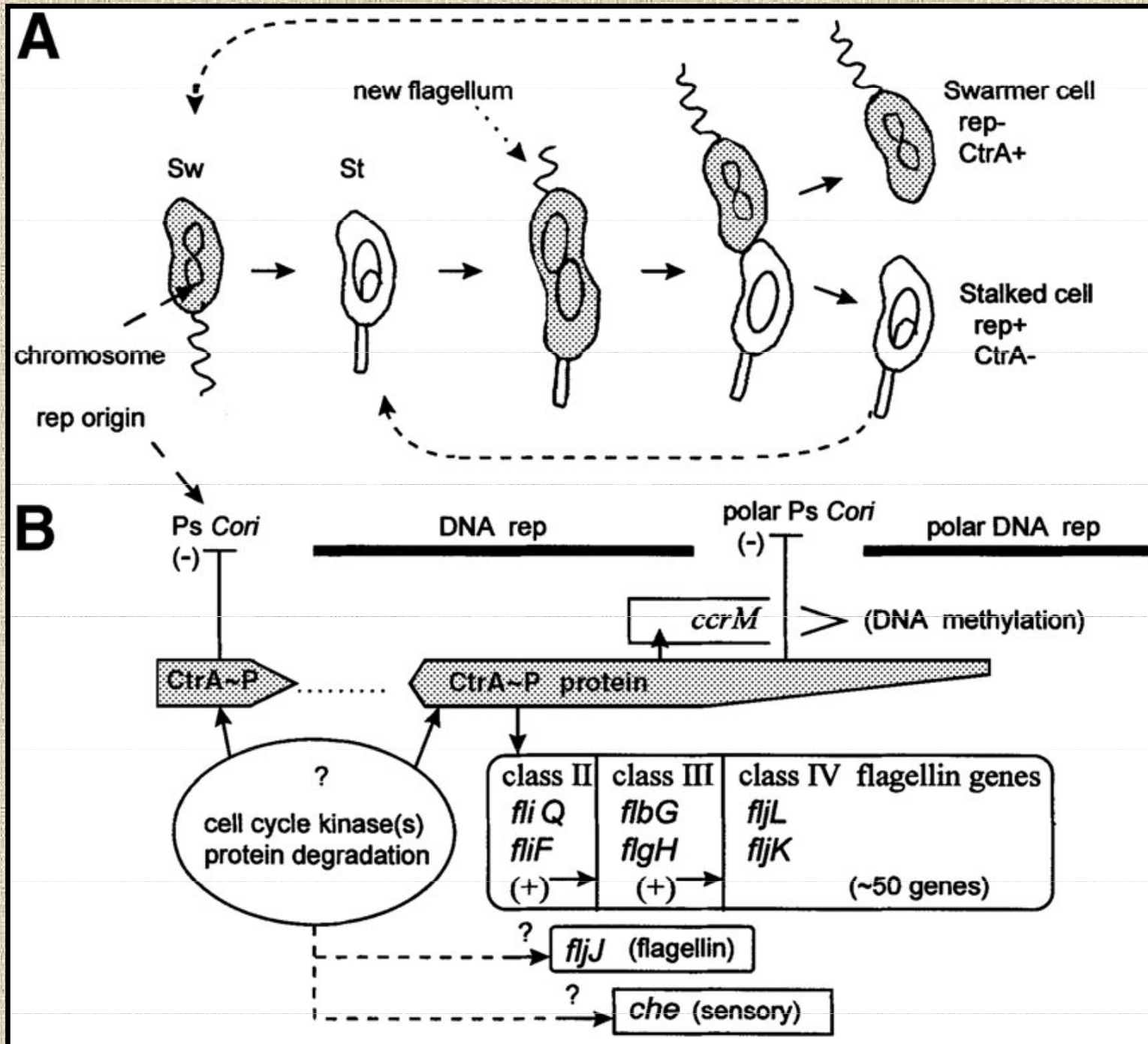
- Chemotaxe hraje roli u adherovaných buněk

- *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.



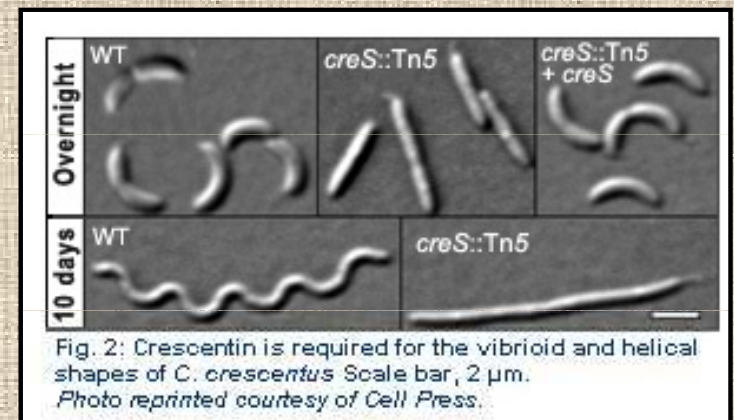


- Několik esenciálních transdukčních proteinů mění v průběhu cyklu buněk *Caulobacter* svou vnitrobuněčnou lokaci



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.



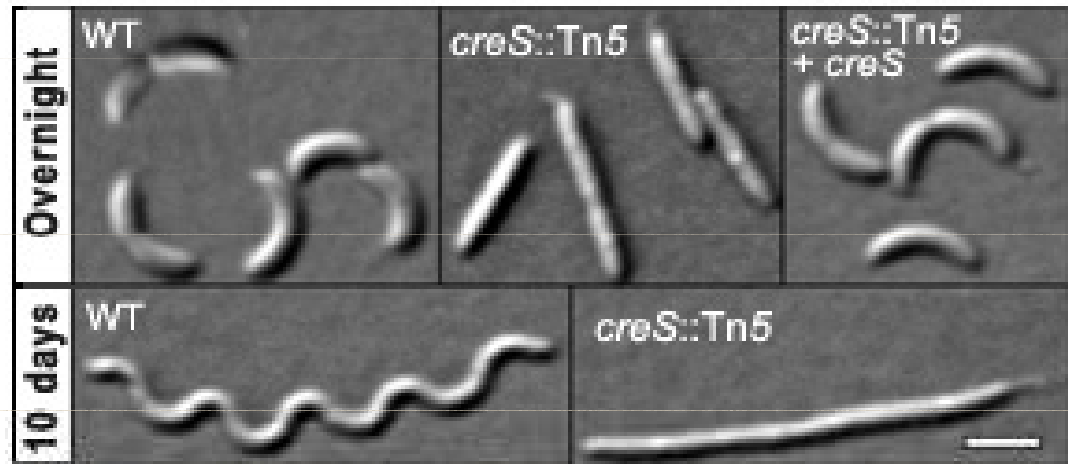


Fig. 2: Crescentin is required for the vibrioid and helical shapes of *C. crescentus*. Scale bar, 2 μ m.

Photo reprinted courtesy of Cell Press.

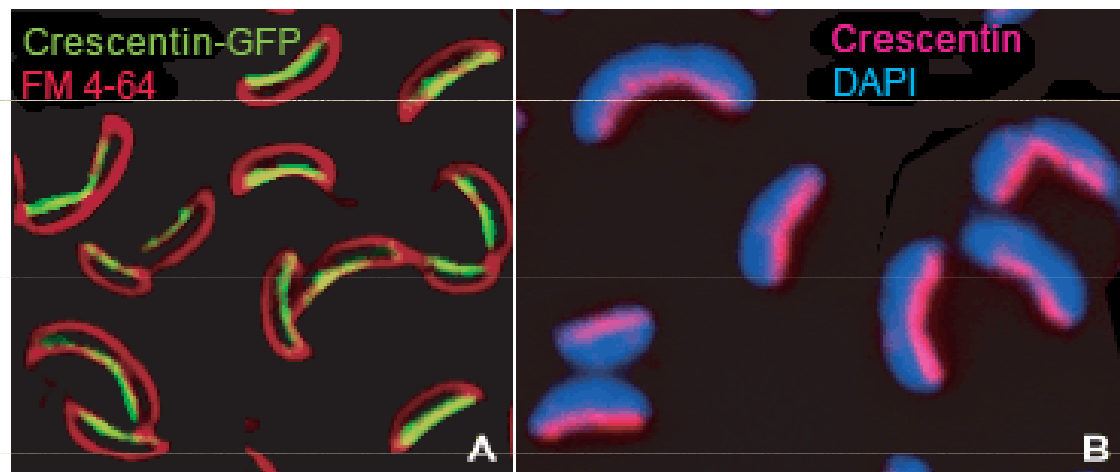
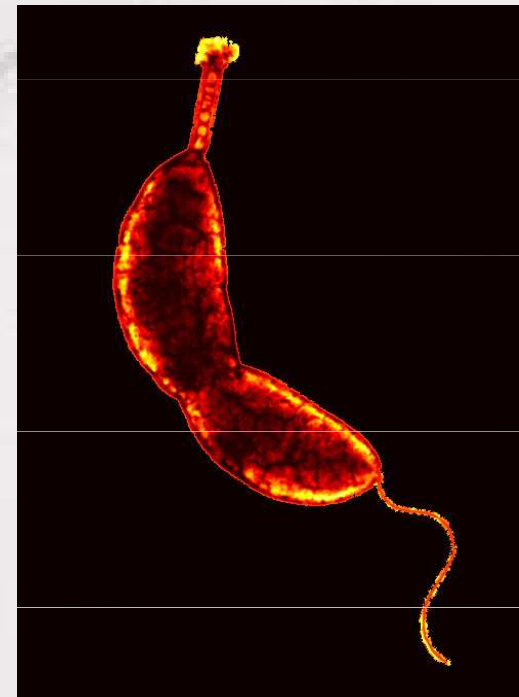


Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings.

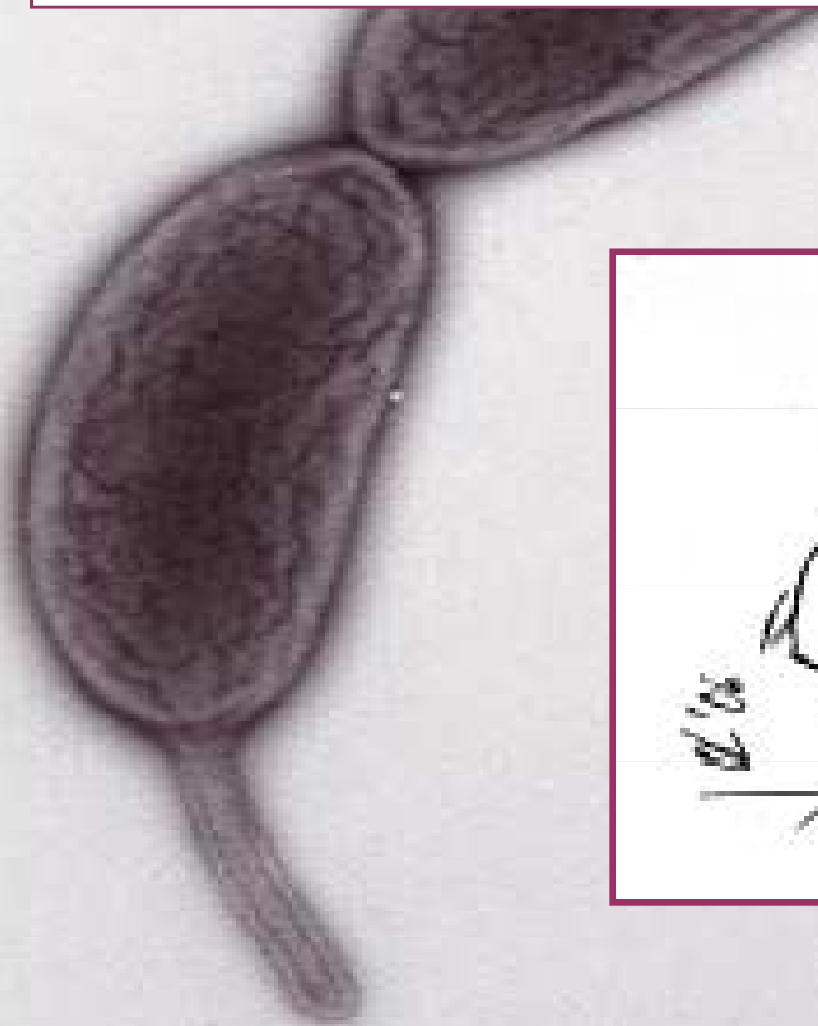
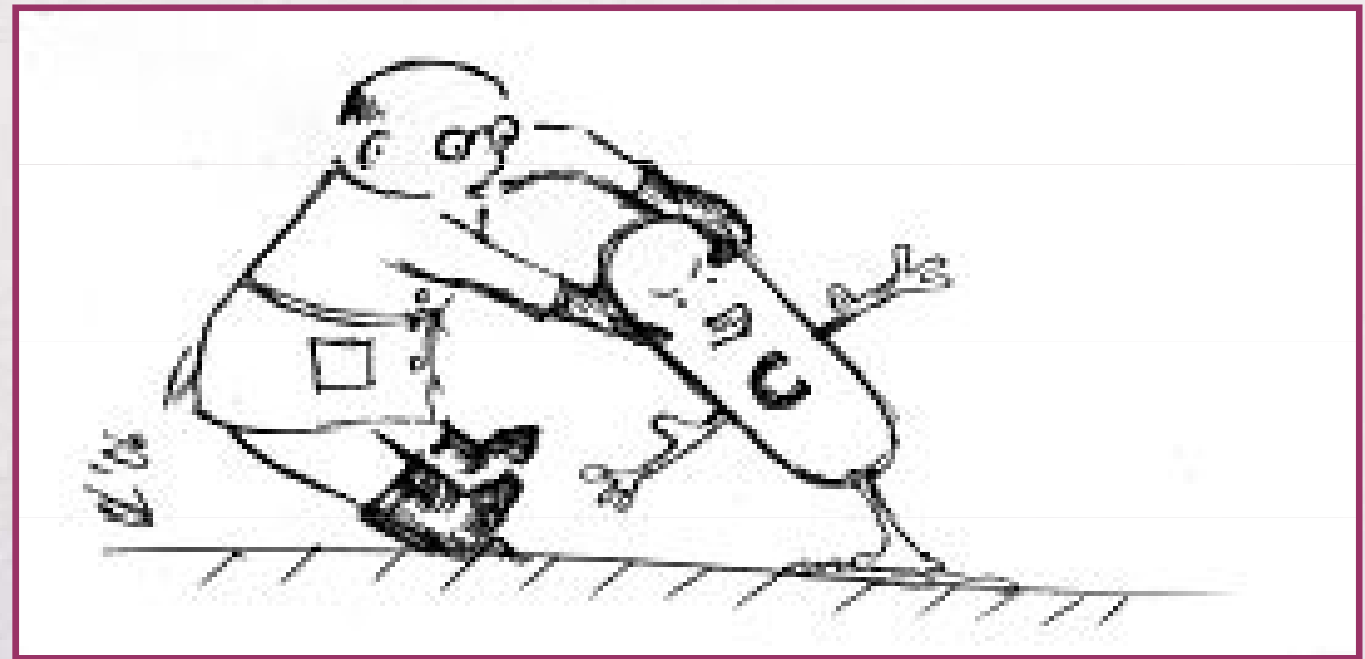
Photo reprinted courtesy of Cell Press.



Zvláštnosti růstového cyklu

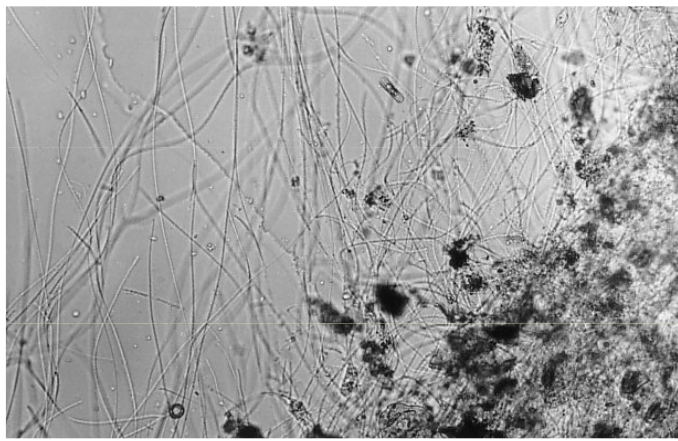
- růstová stádia se nutně střídají, žádné není alternativou, která se nemusí realizovat (viz klidová stádia)
- mateřská buňka je v jistém slova smyslu „nesmrtelnou buňkou“, která produkuje velké množství dceřinných buněk (na rozdíl od konvenčního dělení, kde nelze striktně odlišit mateřskou a dceřinnou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

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

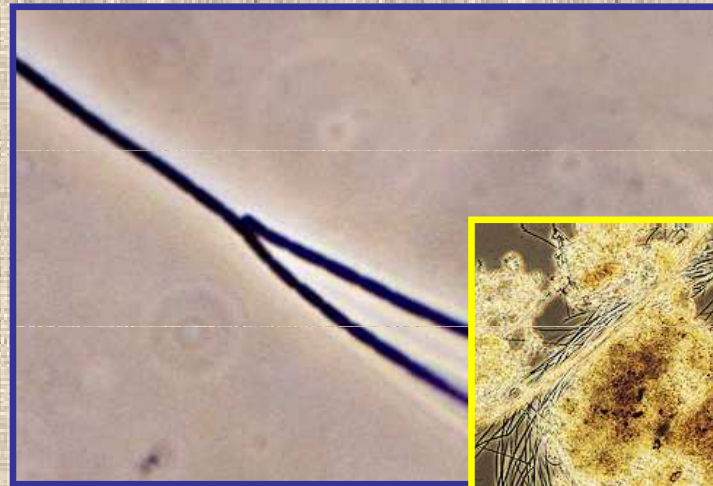


Sphaerotilus natans

G- tyčky, medium 12



- Tekoucí vody
- Papírenské vody
- Kaly
- Aktivované kaly



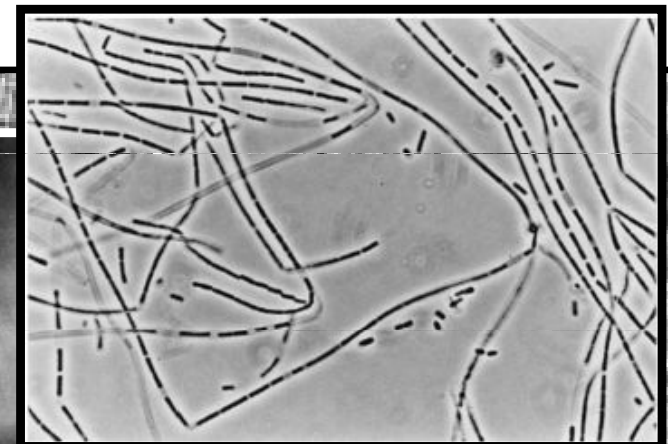
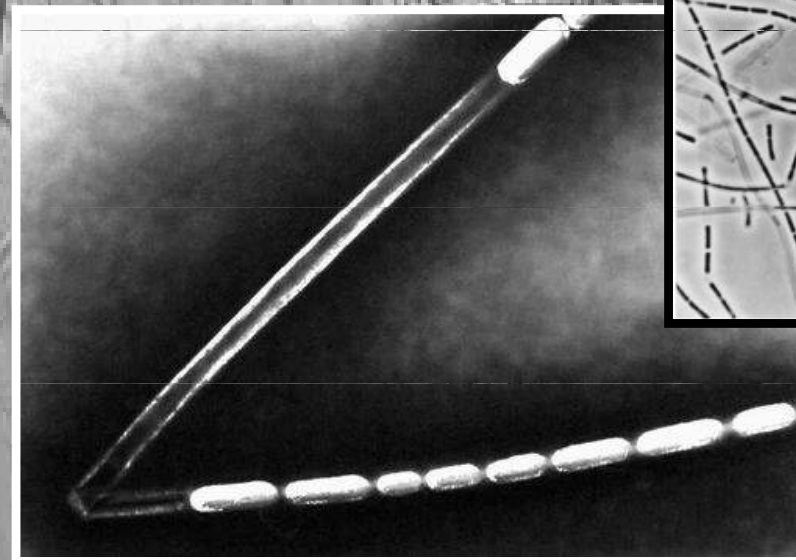
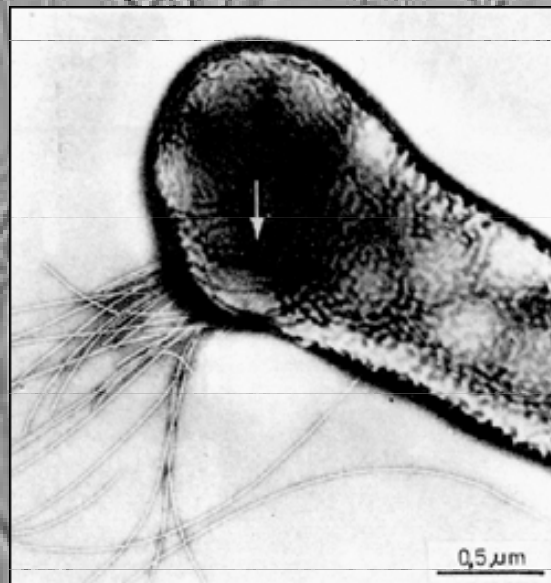
– problém sedimentace

-  Degradace pochev – bacillus - enzym

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

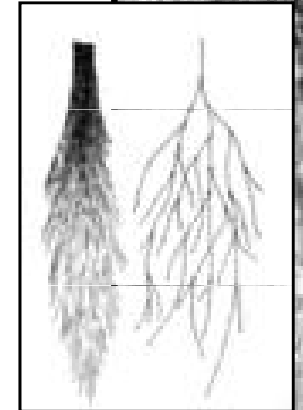
Životní cyklus *Sphaerotilus natans*

- 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**

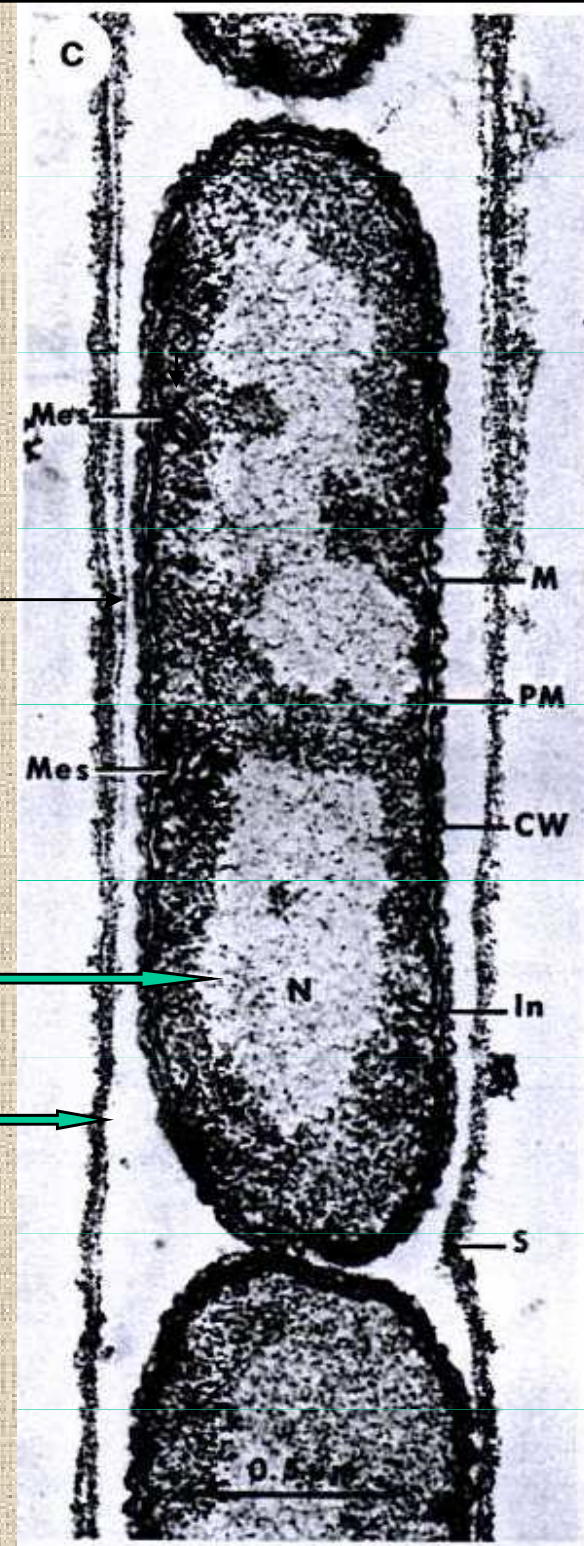
Sphaerotilus natans

mesozóm

buněčná stěna

jaderný materiál

pochva



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

Sphaerotilus natans

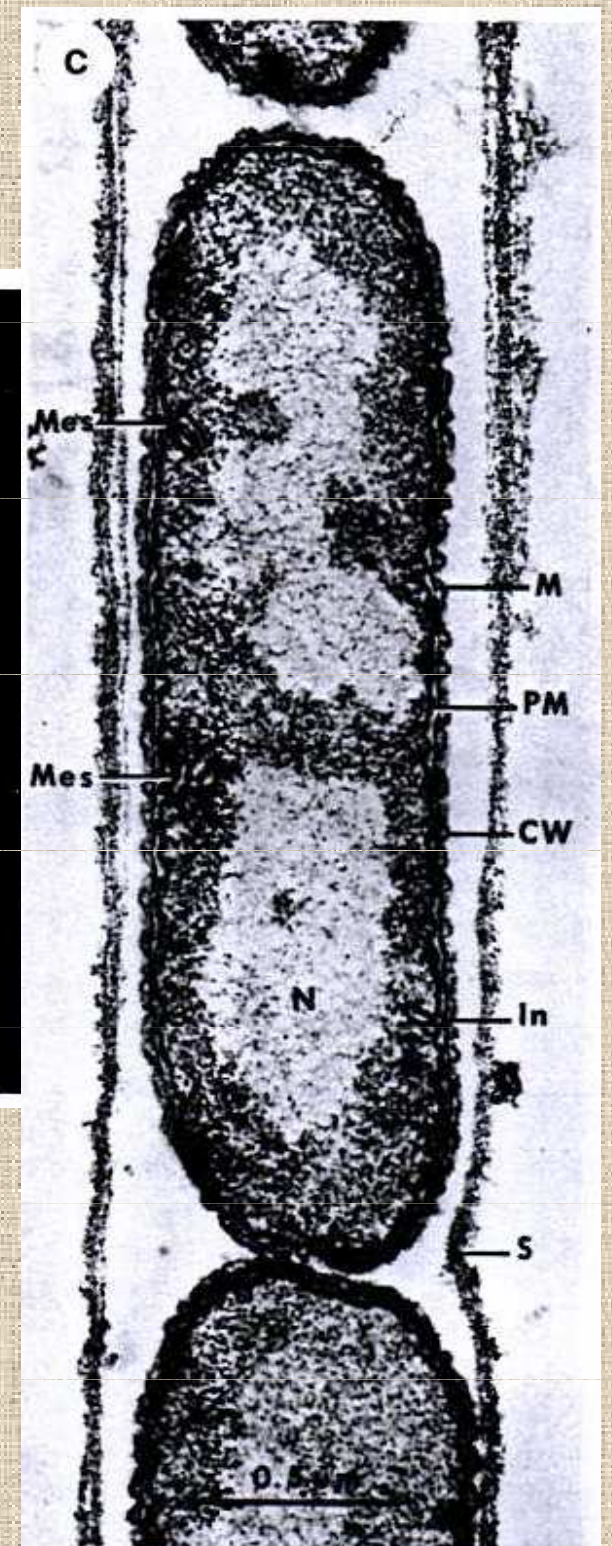
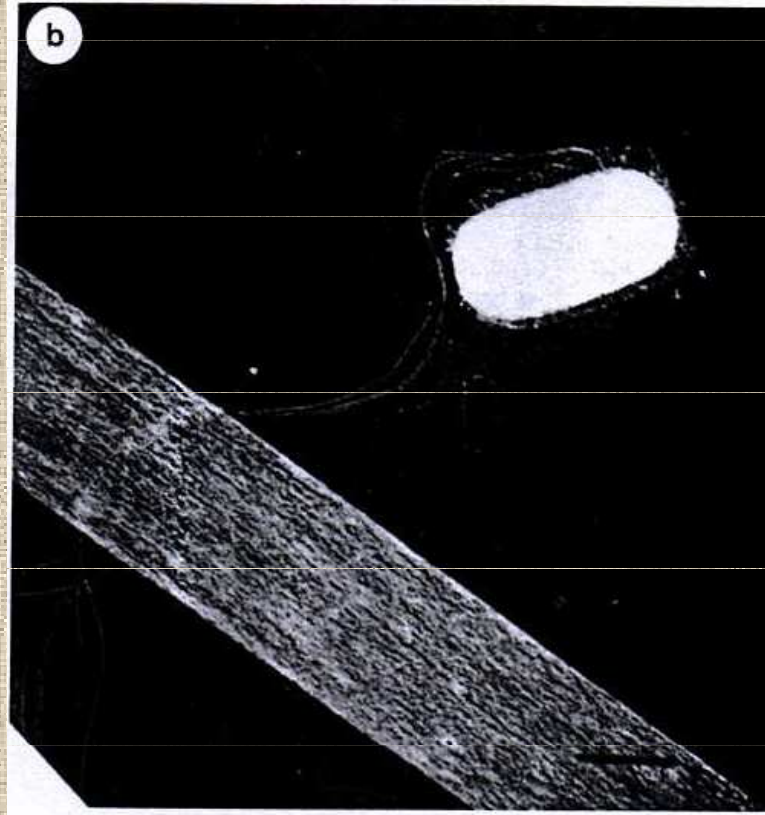
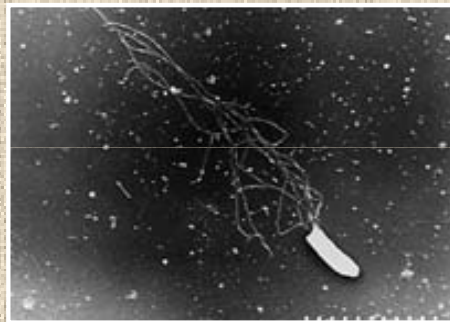
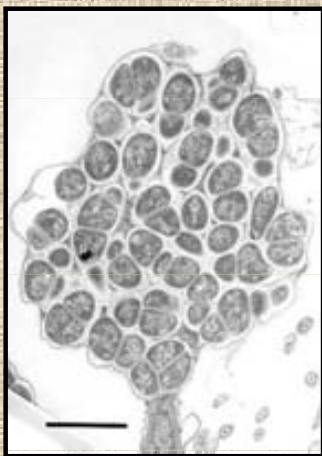


Fig. 14. *Sphaerotilus natans*. (A) Phase contrast photomicrograph illustrating free cells, sheathed cells, and empty sheaths. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (B) Electron micrograph of a swarmer cell and an empty sheath. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (C) Electron micrograph of a thin section of sheathed cells. S, sheath; CW, cell wall; P, peptidoglycan layer; In, intrusion of plasma membrane; Mes, mesosome; N, nucleoplasm. (From Hoeniger et al., 1973.)

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

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

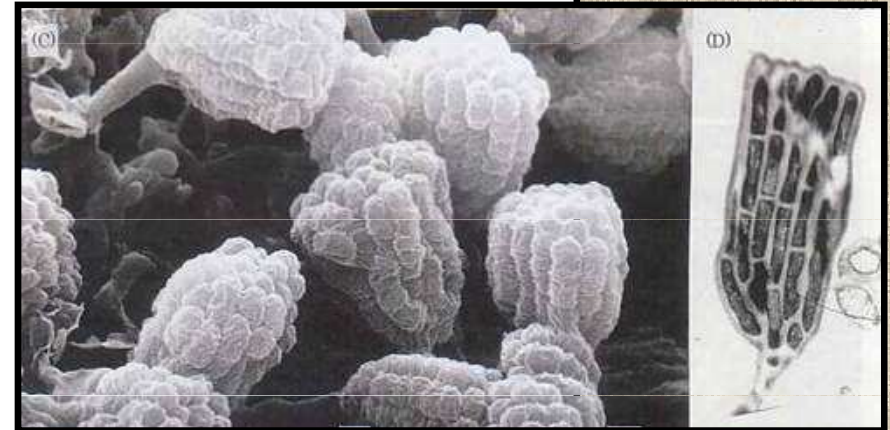


- Sporangium: 10 μm
- Zoospory v řetězcích nebo ve dvojicích
- Uvolněné z mycelia dlouho přežívají

Micromonosporaceae, Actinoplanes sp.

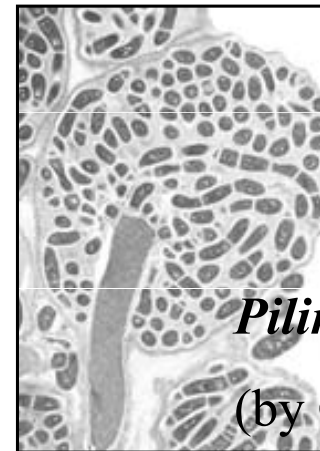
Pilimelia

- 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)

Příbuzný rod s *Actinoplanes*
Sporangia s typickými řetízky spor

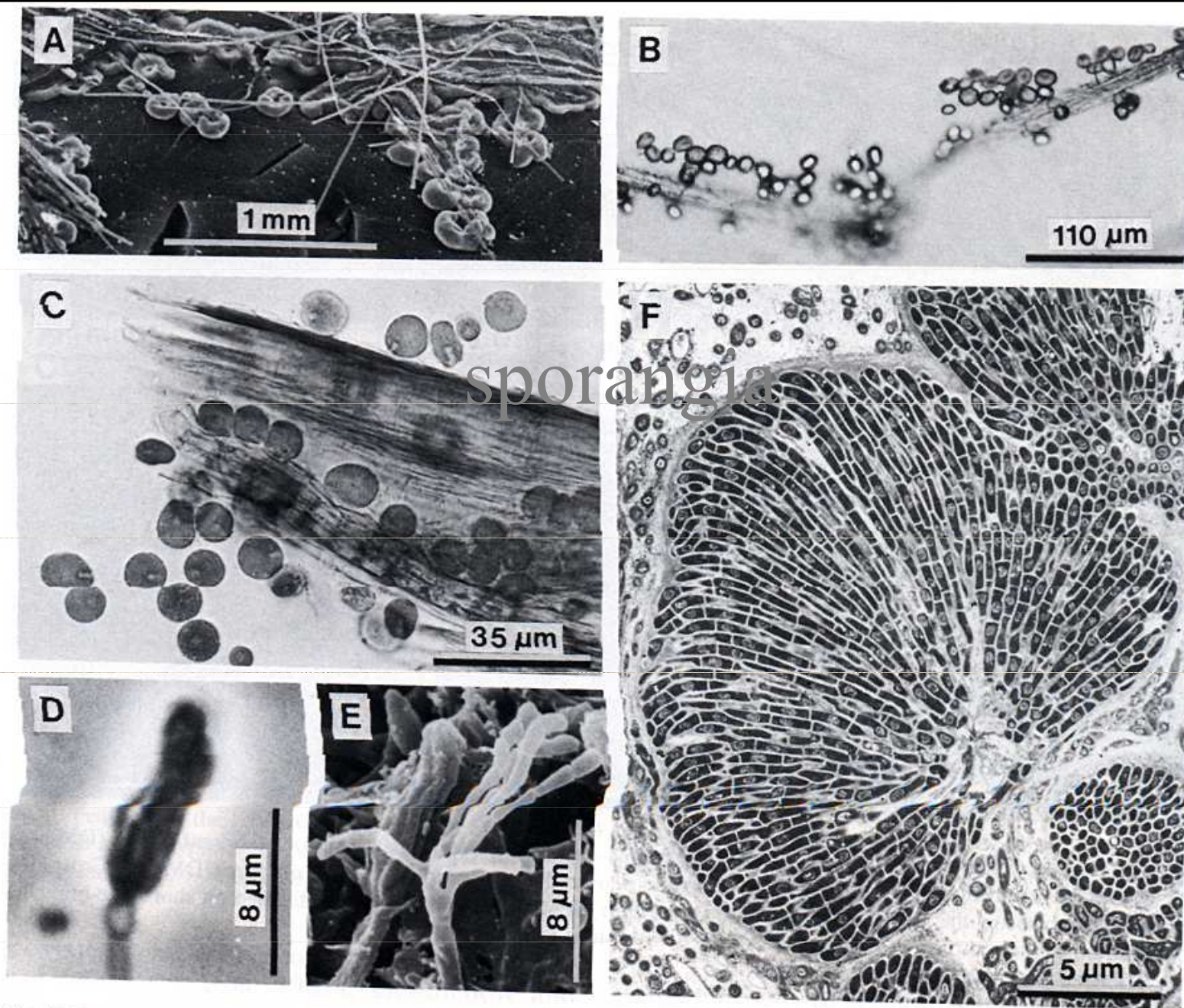


Fig. 7. Features of the genus *Pilimelia*. (A) Compact, small colonies on agar medium; hairs added as natural substrate (SEM). (B) Bundles of sporangia formed on hair (LM). (C) Globose to pyriform sporangia with internal columella; structure of the colonized part of the hair was destroyed (LM). (D) Cylindrical sporangium with an annulus at the base (PHACO). (E) Penicillate conidiophore with bacilliform conidia; the sporangium behind it has parallel-arranged sporogenous hyphae (SEM). (F) Section of a campanulate sporangium with branched spore chains (TEM). (C and D from Vobis et al., 1986; E from Vobis, 1987; F from Vobis, 1984; with permission.)

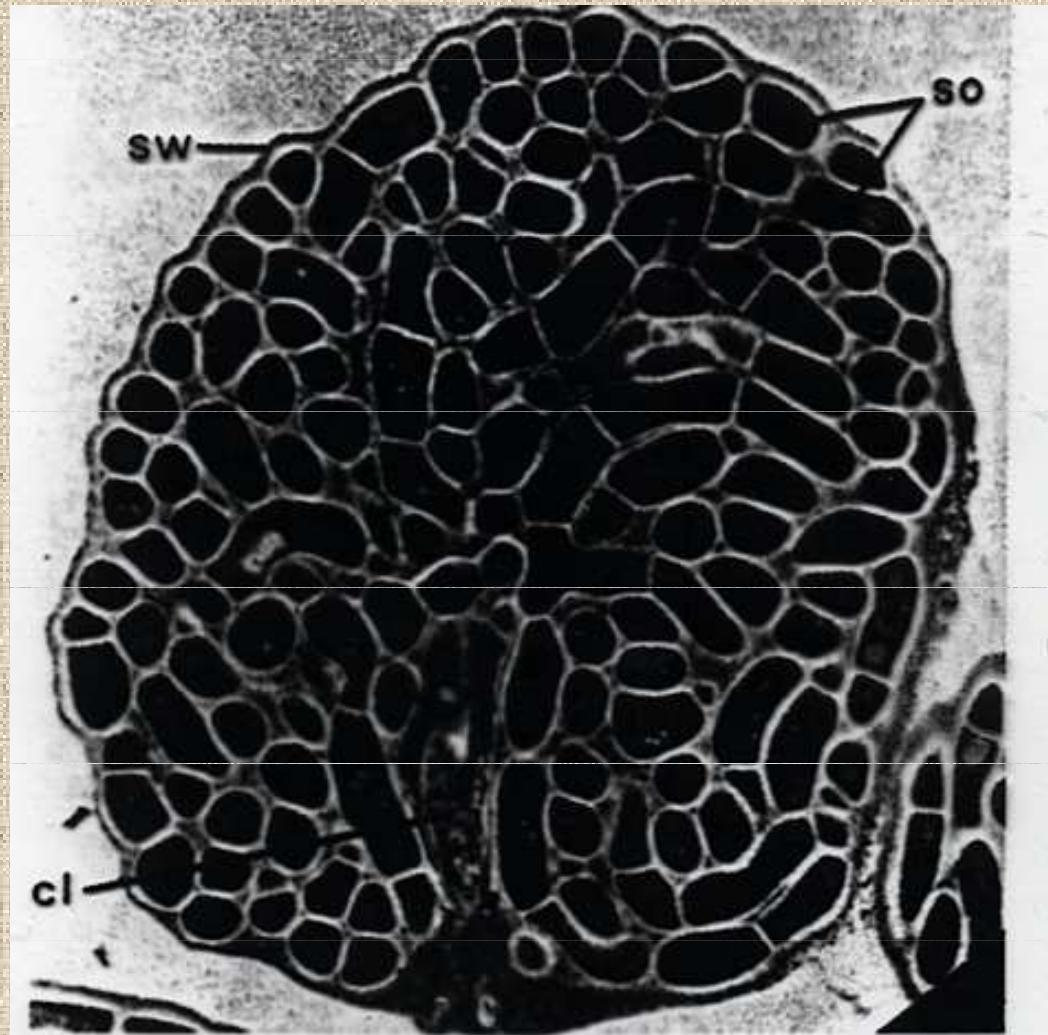


Fig. 18. Electron micrograph of a thin section of a sporangium of the actinoplanete genus *Pilimelia*, illustrating the arrangement of the spore chains. sw, sporangial wall; cl, columella; sp, spore. (From Vobis, 1984.)

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