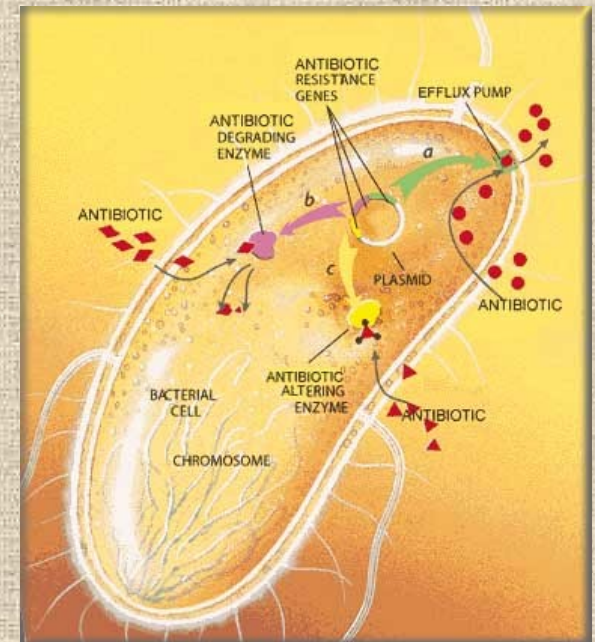
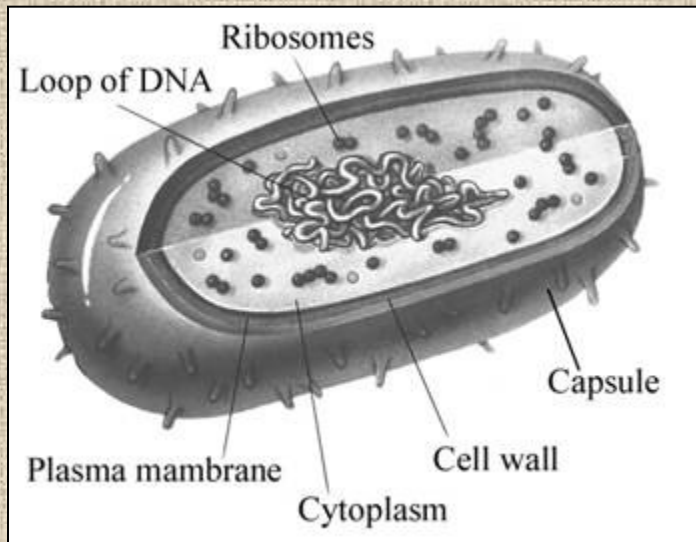


Struktura prokaryotické buňky I.

Buněčná stěna

Cytoplazmatická membrána

Genom

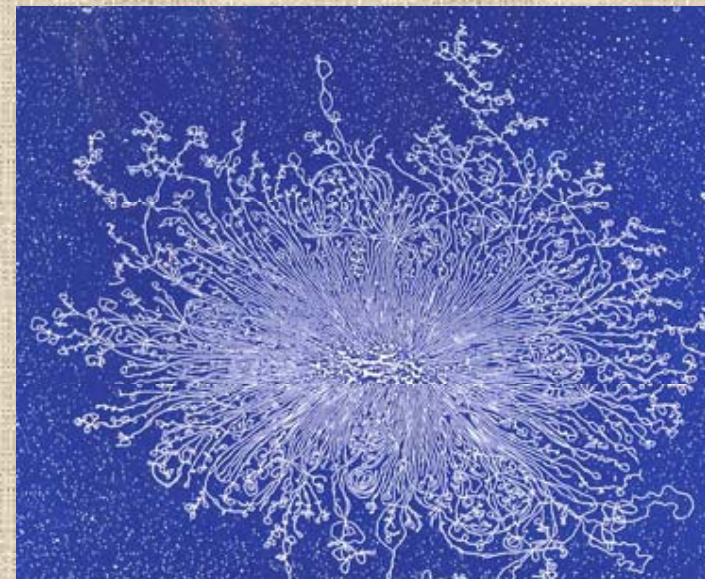
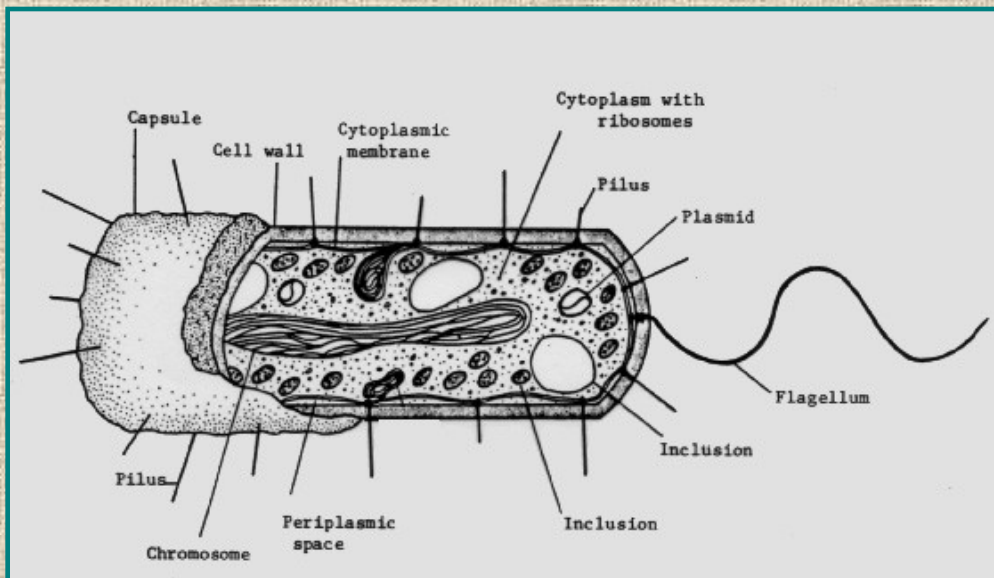


Základní struktury

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

G⁺ vs. G⁻ !!

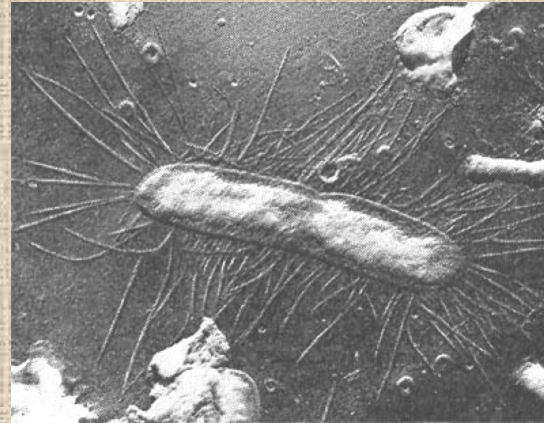
Bacteria vs. Archaea !!



Rozvinutý chromosom *E.coli*

Další struktury

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



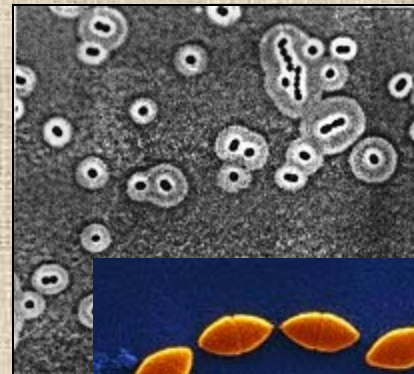
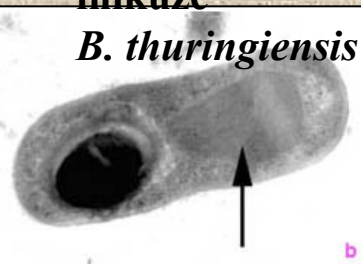
E.coli - fimbrie



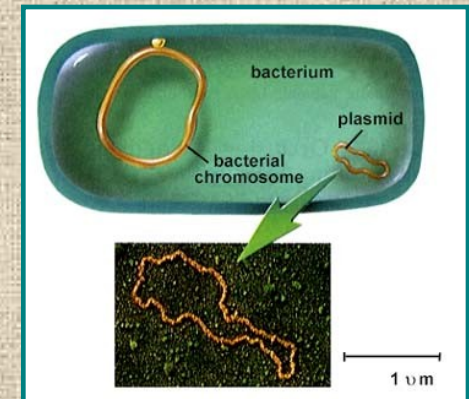
E.coli - bičičky



Parasporální
inkluzie
B. thuringiensis



Streptococcus pneumoniae



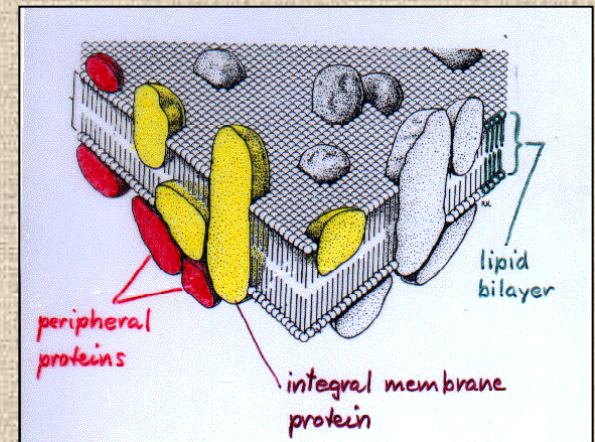
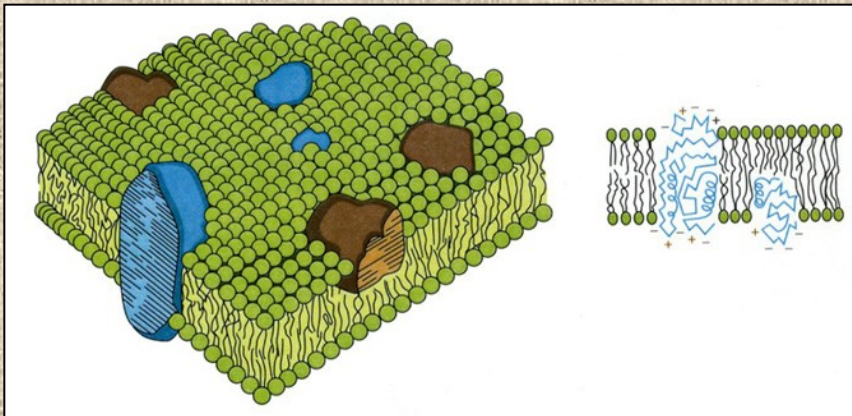
replikony

Cytoplazmatická membrána

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

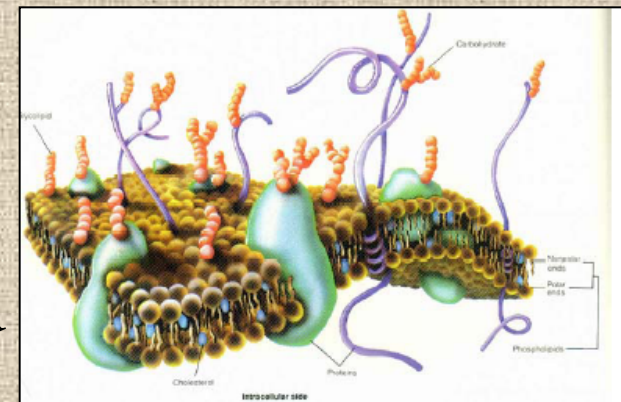
Archea - etherová v. !!

- Vnořené bílkoviny - mnoho proti Eucarya
- Semipermeabilní - transport



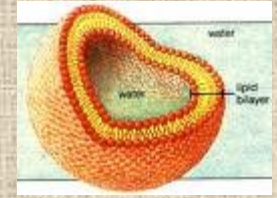
G- buňky cytoplazmatická membrána + vnější membrána!!

- **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!!**

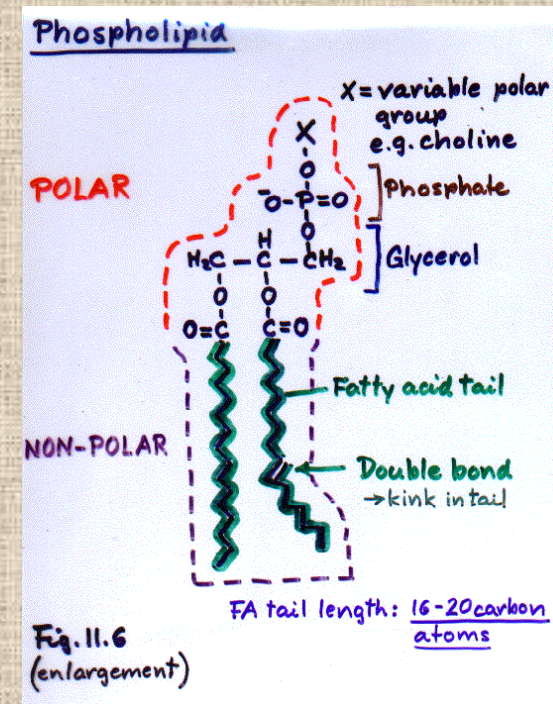
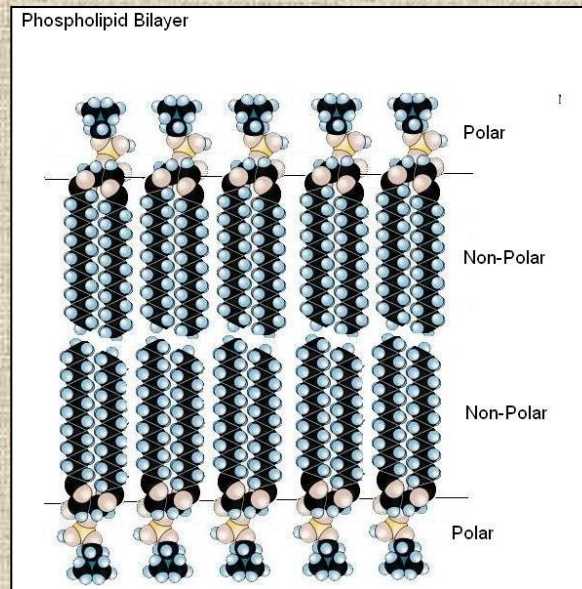
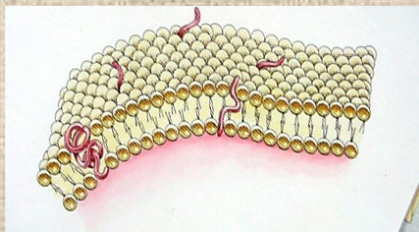
Fosfolipid



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

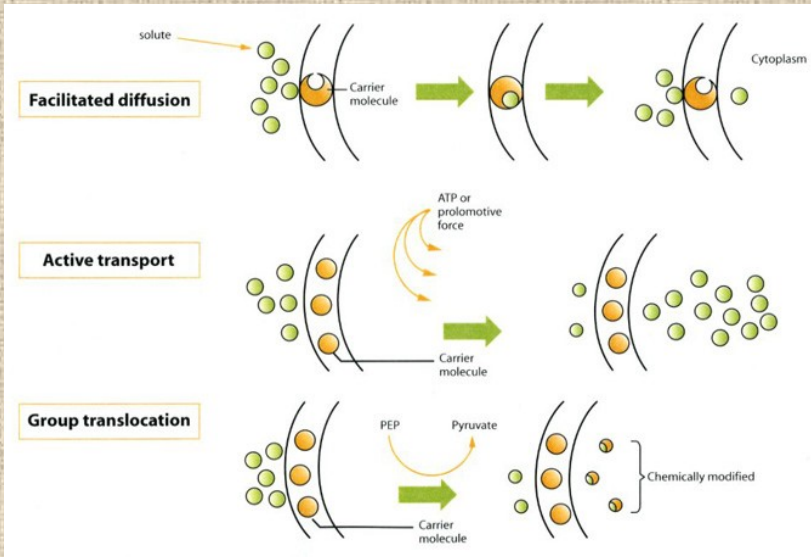
Závislost na teplotě nenasycené - zvyšují

- Hydrofobní složka - nepolární
- Negativní náboj

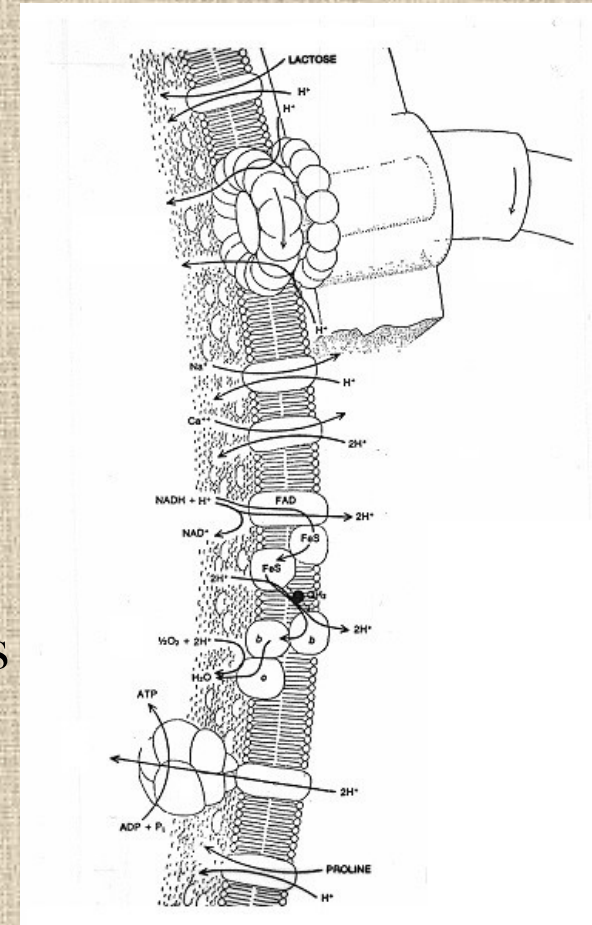


Funkce cytoplazmatické membrány

- 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 (O₂, CO₂, NH₃ – ne NH₄) 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 sírných 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,

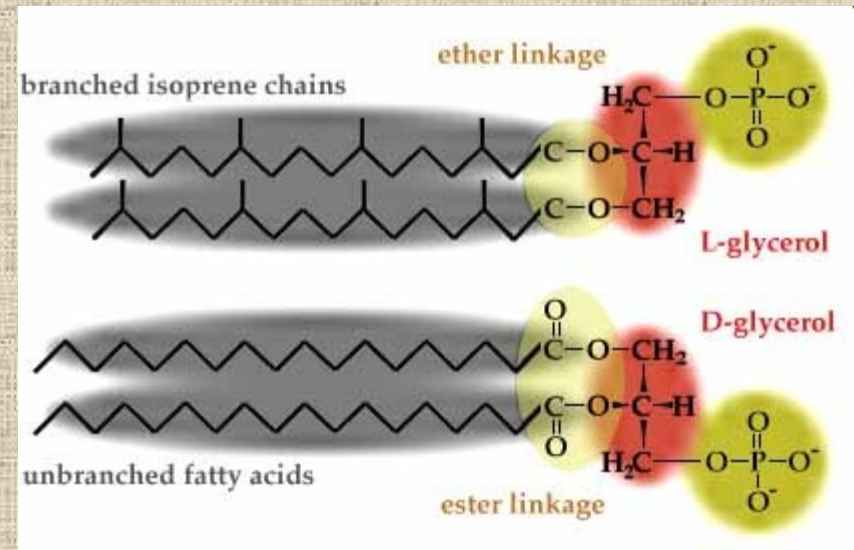
mnoho proteinů v membráně

Etherická vazba -

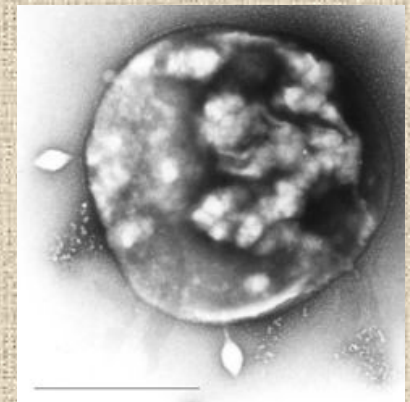
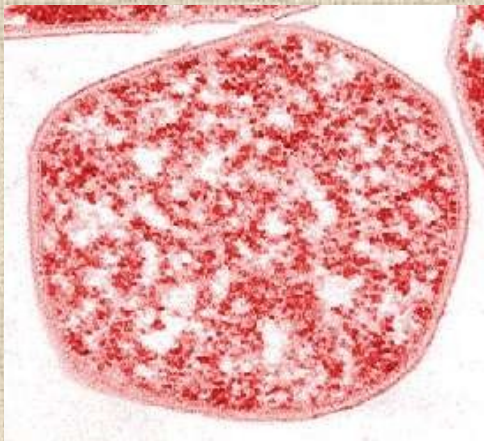
glyceroldiether, tetraether

= 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-acetylglukózamin+N-acetylmuramová k.,

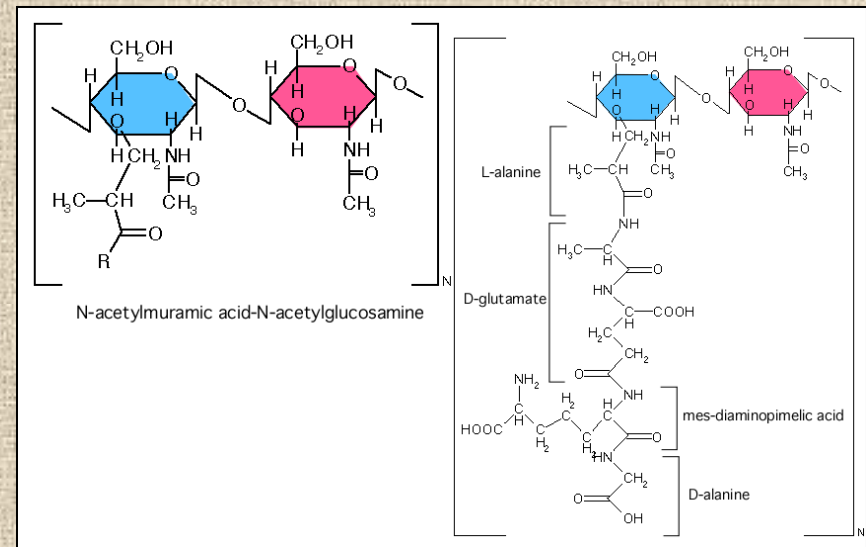
β -1,4-glykosidická vazba – kostra = opakování aminocukrů

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

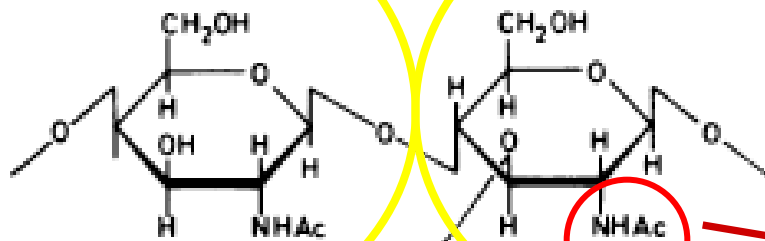
R = DAP - pouze v b.s., taxonomický znak u aktinobakterií, LL DAP, meso DAP

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

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



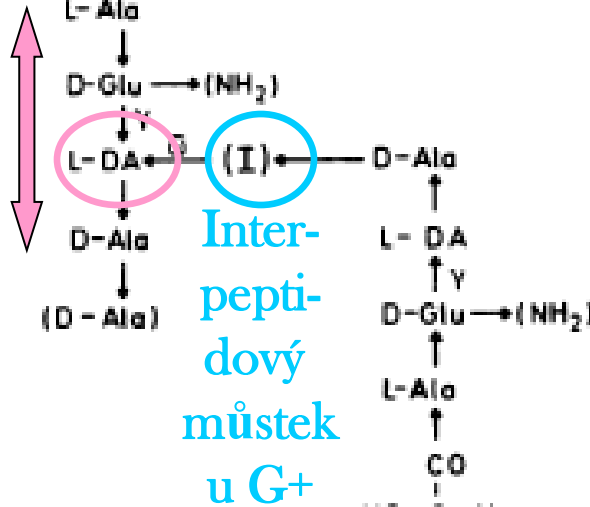
Peptidoglykan = uniformní disacharid
 N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová



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

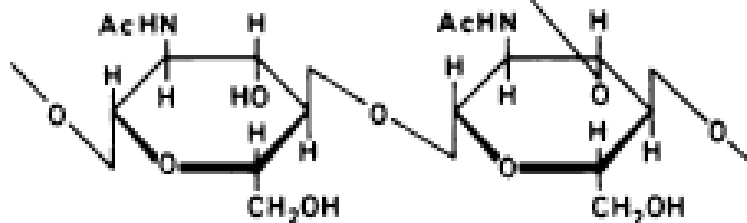


CHEMOTAXONOMIE:

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

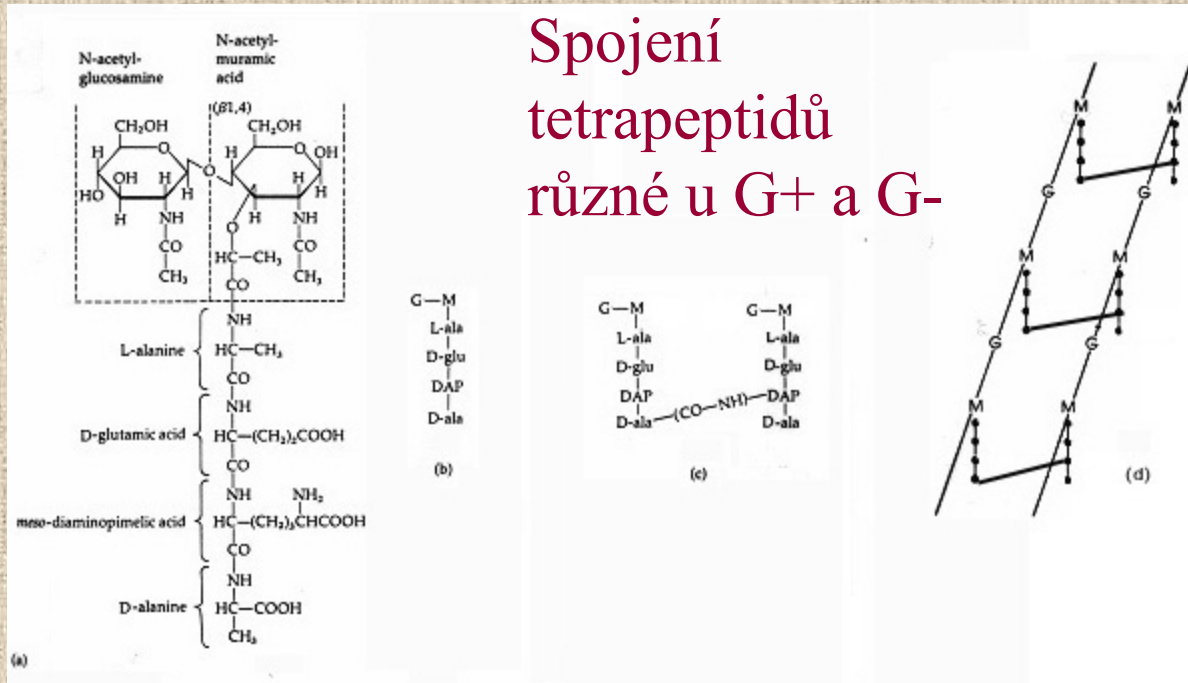
Micrococccaceae - až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina



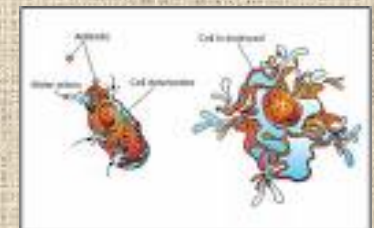
Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!

Spojení tetrapeptidů různé u G+ a G-



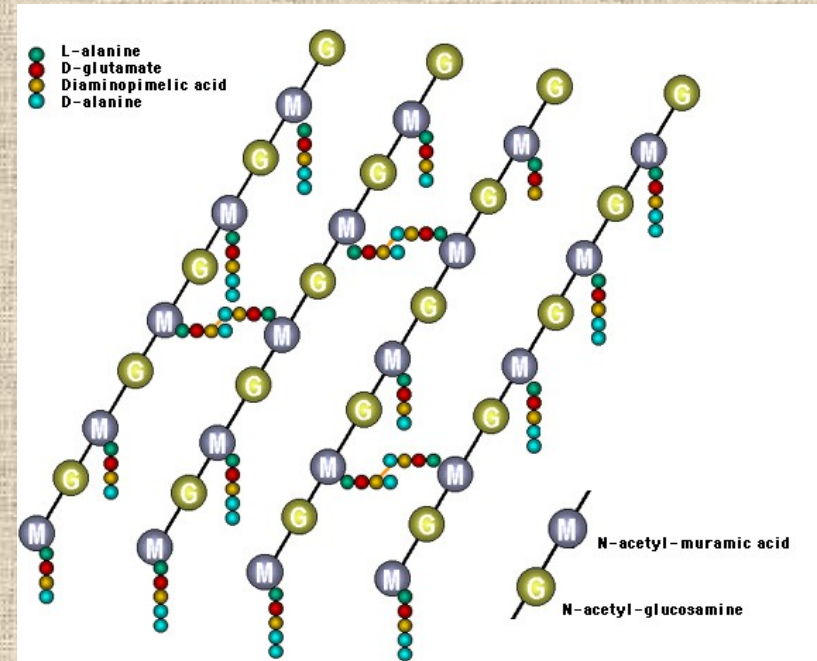
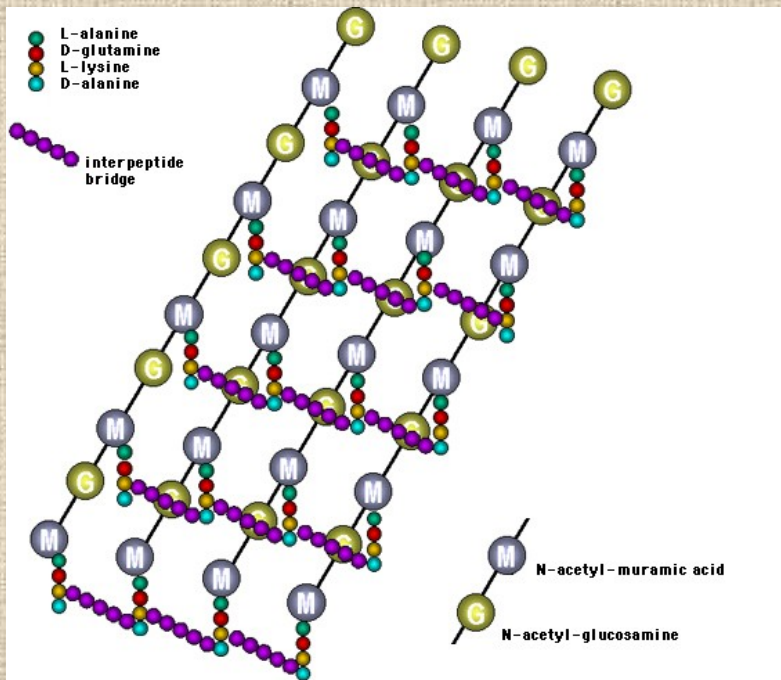
Polymer

- **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

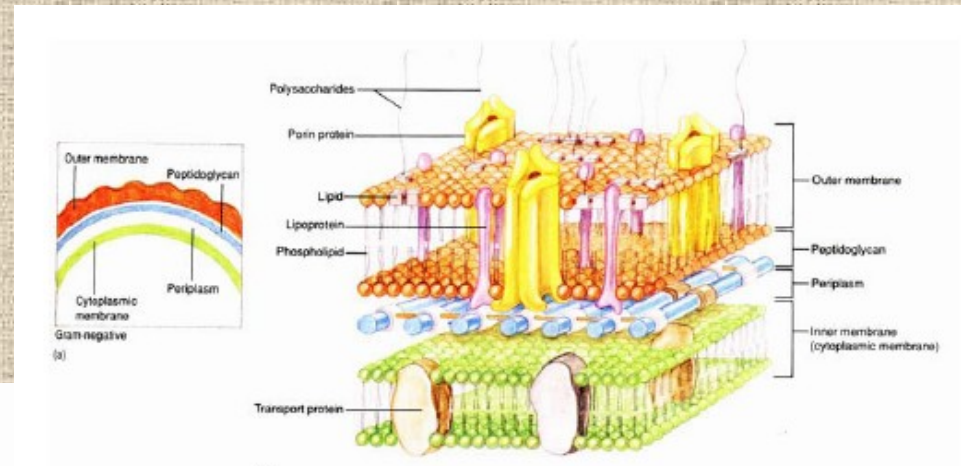
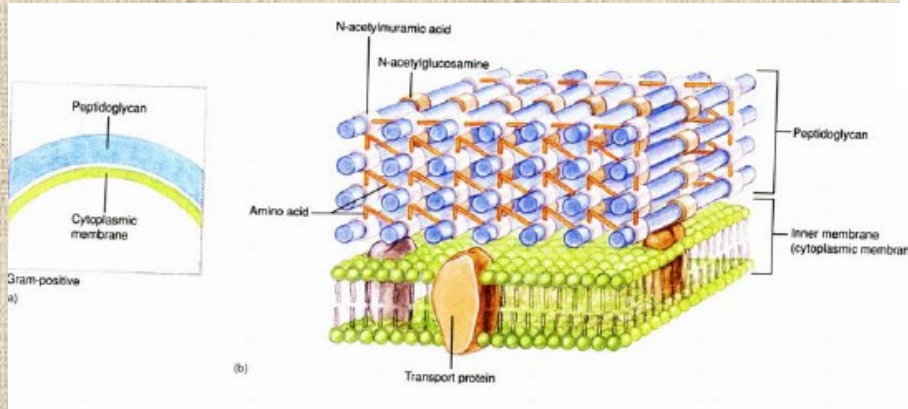
Buněčná stěna

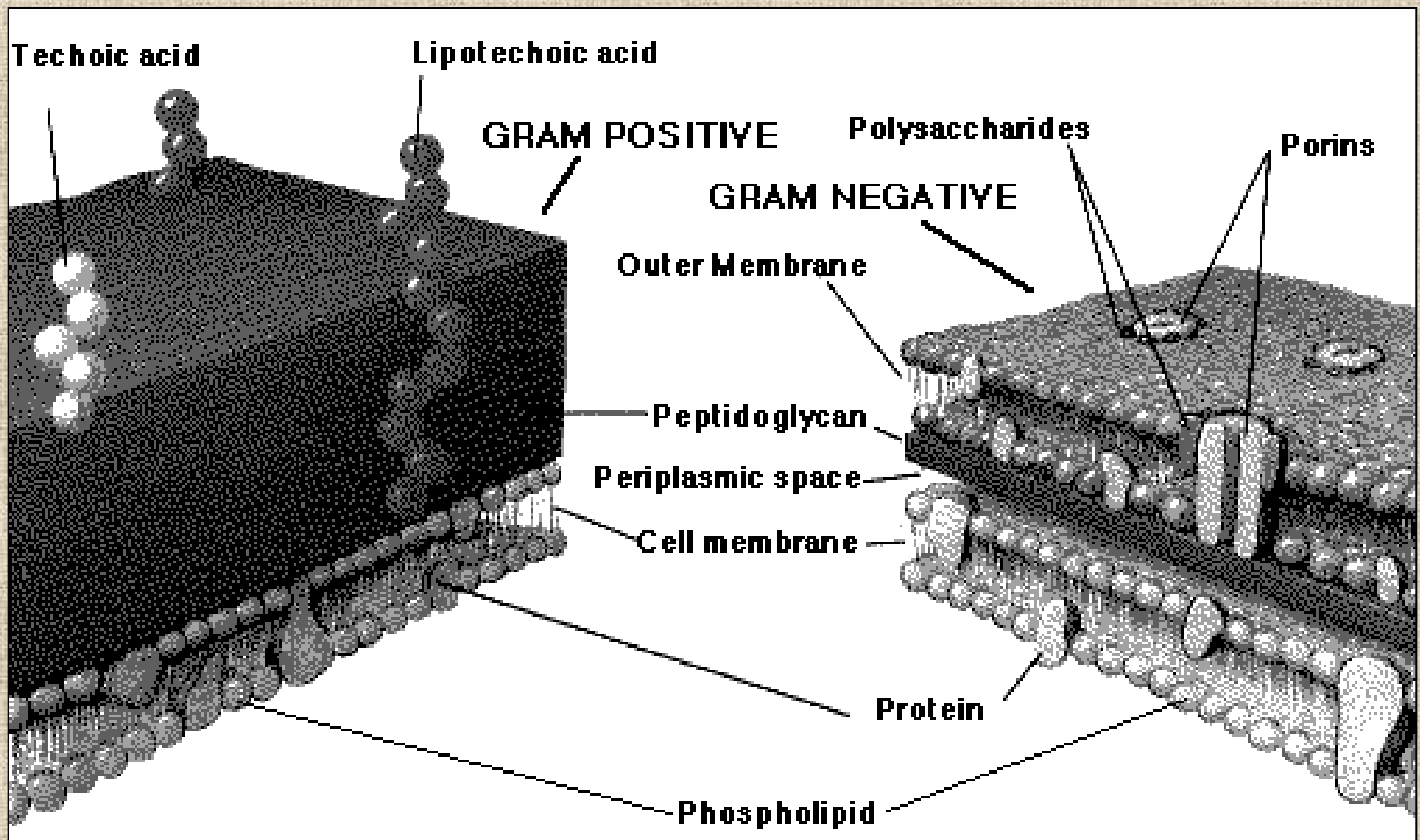
G+ vs. G-

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

- schopnost vazby protonů a iontů Ca^{2+} , 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 kmeny, 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 aktinomyceity, mykobakteria – meso-DAP

■ streptomyceity – LL-DAP

■ *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysin

Interpeptidový můstek peptidoglykanu

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

- *Arthrobacter* – „globiformis“ group – A3a - L-amino kyseliny (L-alanin, L-treonin nebo L-serin)

- „nicotianae“ group - dikarboxylové aminokyseliny (glutamová nebo asparagová)

- I. Ser-Thr-Ala, *A. oxydans*, *A. polychromogenes*

- II. Ala-Thr-Ala, *A. aurescens*, *A. ilicis*, *A. ureafaciens*, *A. histidinovorans*, *A. nicotinovorans*

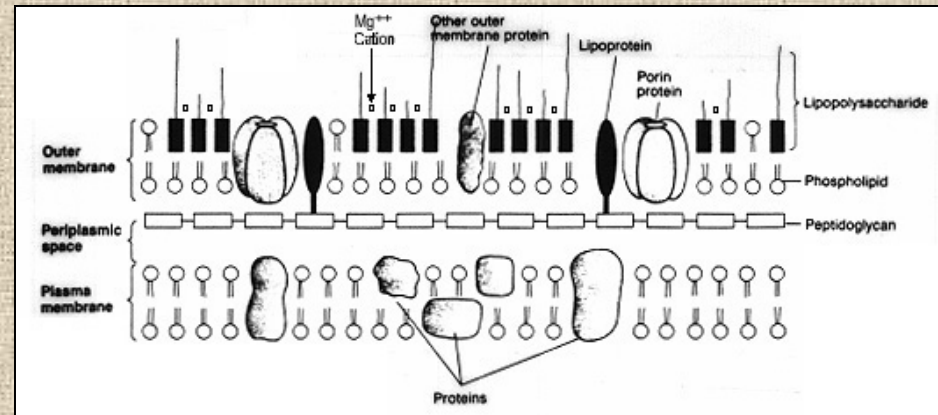
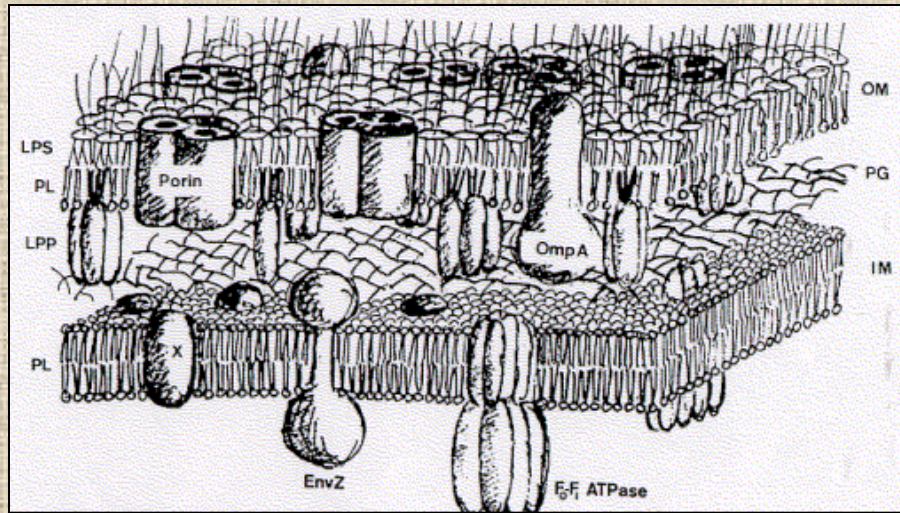
- III. Ala¹-4, *A. globiformis*, *A. pascens*, *A. ramosus*, *A. crystallopoietes*

- IV. Ser-Ala²-3, *A. atrocyaneus*

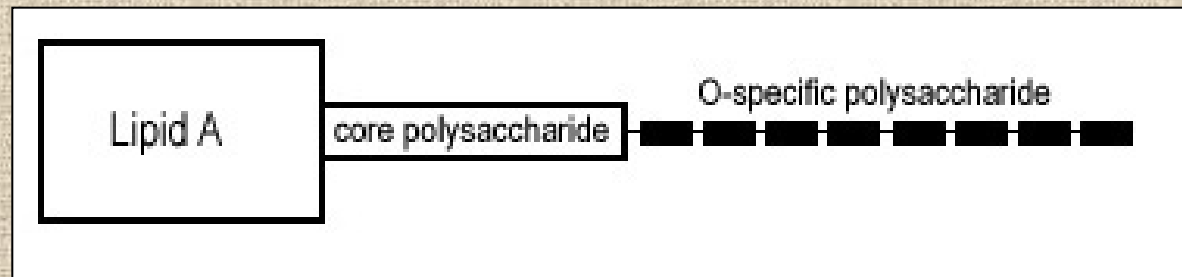
- V. Thr-Ala², *A. citreus*

- VI. Ala-Glu, *A. nicotianae*, *A. creatinolyticus*, *A. uratoxydans*, *A. protophormiae*

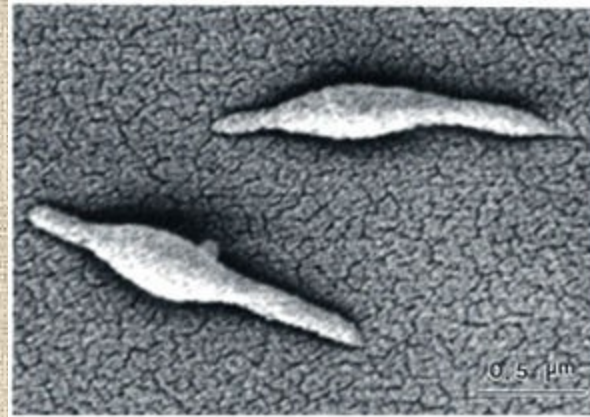
- VII. Glu, *A. sulfureus*



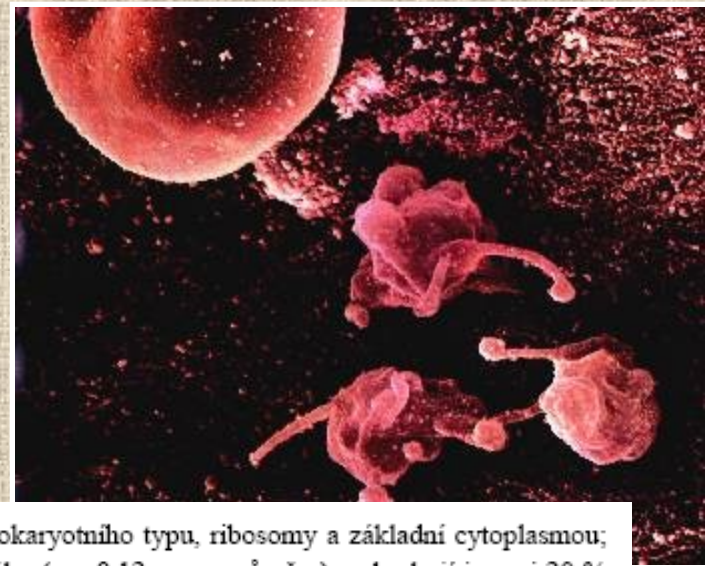
LPS lipopolysaccharide; PL phospholipid; LPP Brown's lipoprotein;
 X generic integral membrane protein; EnvZ regulatory protein of the ompF -
 ompC
 operon; F₀F₁-ATPase ATP synthase of electron transport chain; IM inner
 membrane;
 OM outer membrane; PG peptidoglycan; OmpA outer membrane protein A.
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



- Mykoplazmata
- 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 mašinérie 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

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 neodbarví kyselinou ani alkoholem

- Mykolové kyseliny s 60-90C

- rezistence vůči pronikání barviv, ATB, vysychání, fagocytóze

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

- Gramovo barvení - vůbec nebo špatně

- Peptidoglykan:

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

- přítomnost 2 typů mezopeptidového spojení

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

- N-glykolylmuramová kyselina místo N-acetylmuramové

Mycobacterium

- Hydrofobní buněčná stěna

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

- Pomalý růst – 3-9 týdnů

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

Mycobacterium

- Metabolismus

Využívání různých typů uhlovodíků
(halogenované, degradace polutantů)

Růst na CO₂ a H₂O

Produkce karotenoidních pigmentů

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

Genetická informace

- Velikost genomu:

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

- Složky genomu:

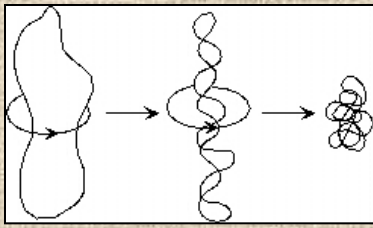
Chromozom - 1-2 **Replikony** - obojí kružnicové i lineární

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

Mobilní elementy: transpozony, inzerční sekvence

Bakteriofágy

- Způsoby přenosu - transformace, konjugace, transdukce

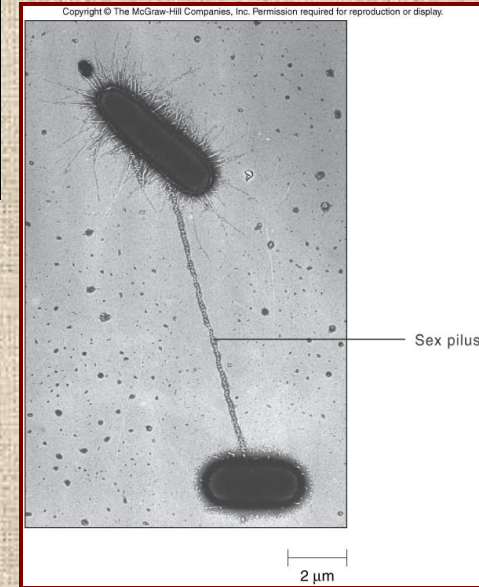
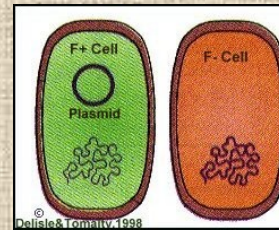


Bakteriální chromozóm

- 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** – **mezozomy**, 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

Plazmidy



- Doplňková genet. informace:

F-plazmidy (fertilní)

Rezistence, - ATB, těžké kovy, UV

Metabolické dráhy (bioremediace)

Přenos konjugací, transformací

Bakteriociny (ne- i konjugativní)

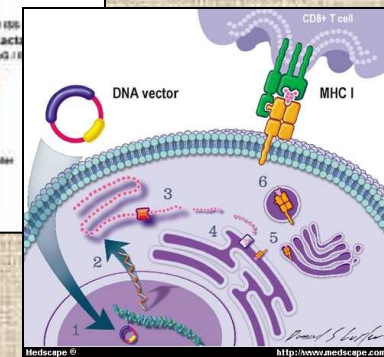
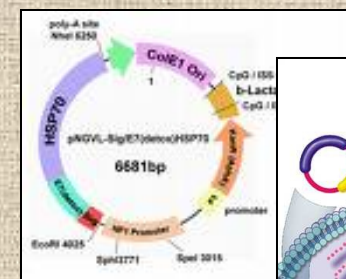
Kódování faktorů virulence: adheziny, toxiny
hemolyziny, enterotoxiny

Ti – tumorindukující plazmidy

Kryptické, fazmidy, kosmidy

- 5-10% informace genomu

- Genetické inženýrství - vektory



Ribozómy

- Proteosyntéza
- 2 podjednotky -
Mg + energie (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
- 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