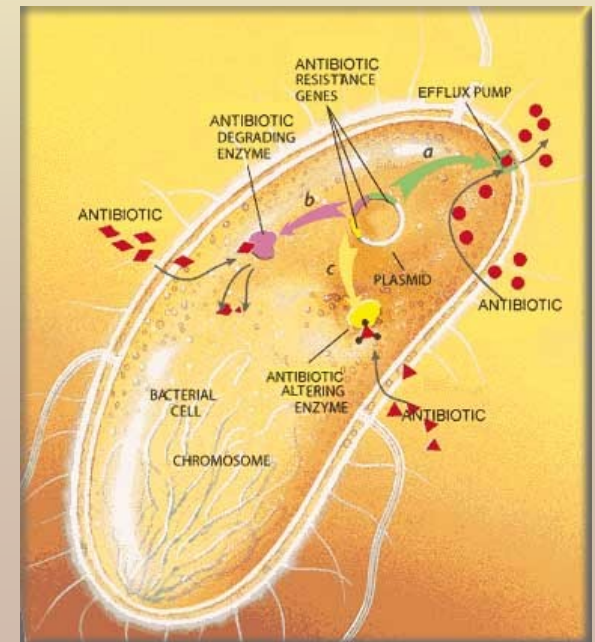
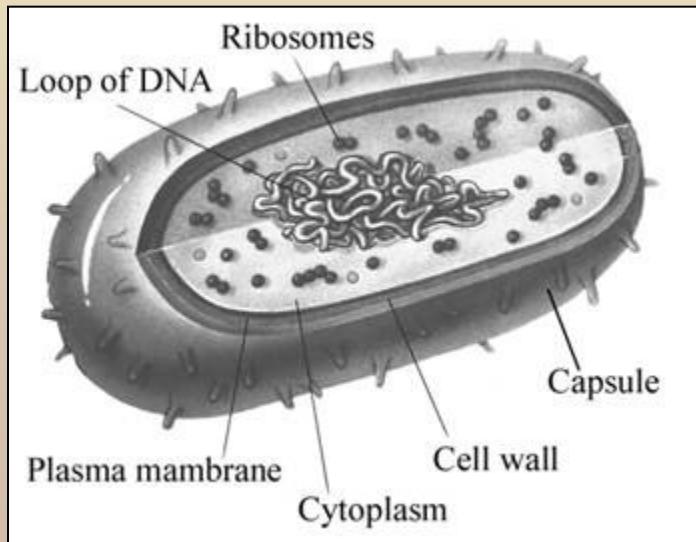


# Struktura prokaryotické buňky I.

## Buněčná stěna

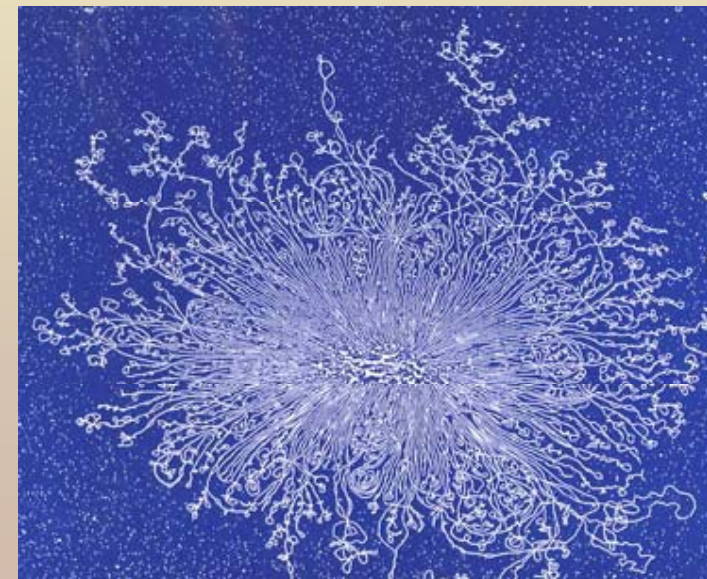
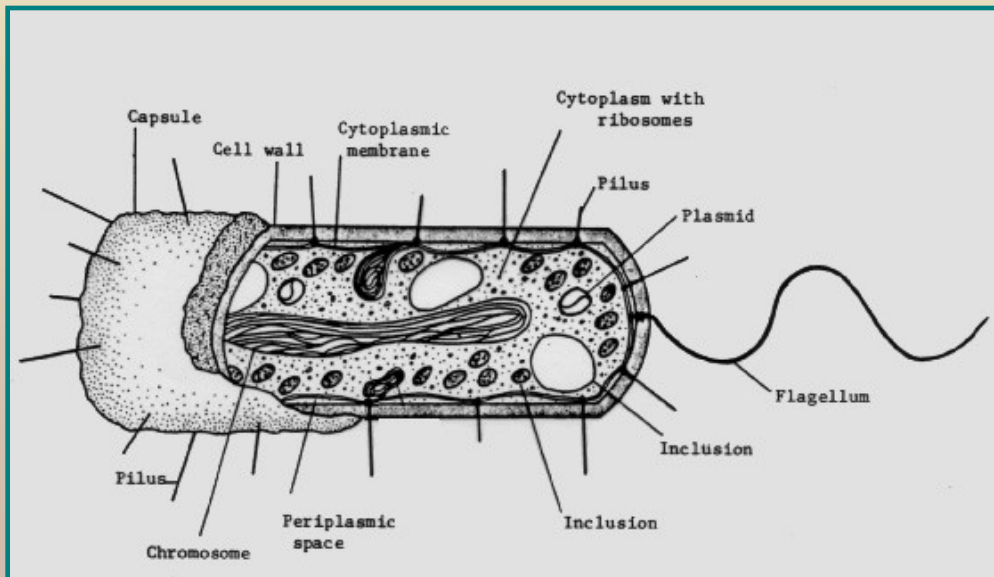
## Cytoplazmatická membrána

## Genom



# Základní struktury

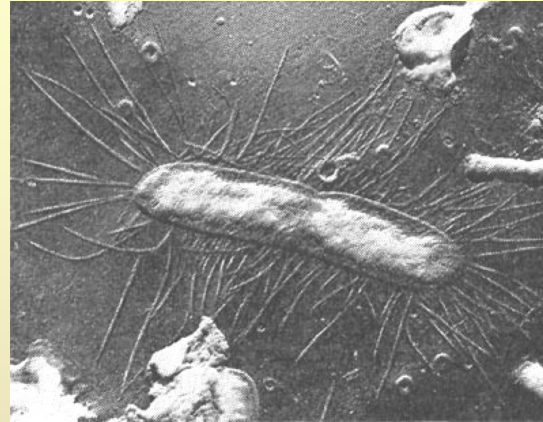
- Cytoplazmatická membrána
- Nukleoid
- Ribozómy
- Buněčná stěna - obvyklá



Rozvinutý nukleoid *E.coli*

# Další struktury

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



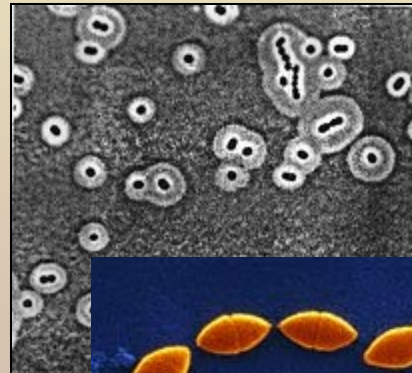
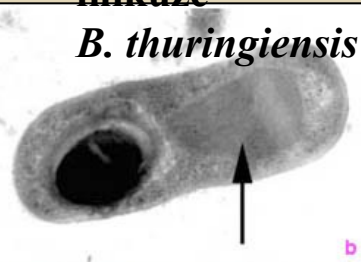
*E.coli* - fimbrie



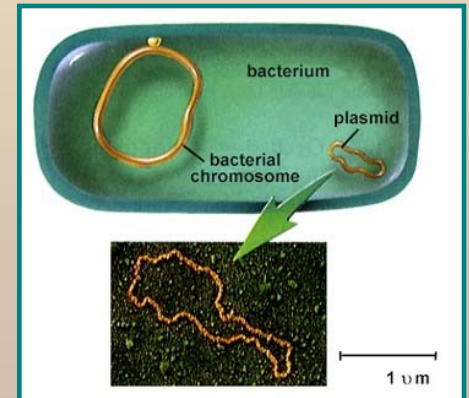
*E.coli* - bičičky

Parasporální  
inkluzie

*B. thuringiensis*



*Streptococcus pneumoniae*



replikony

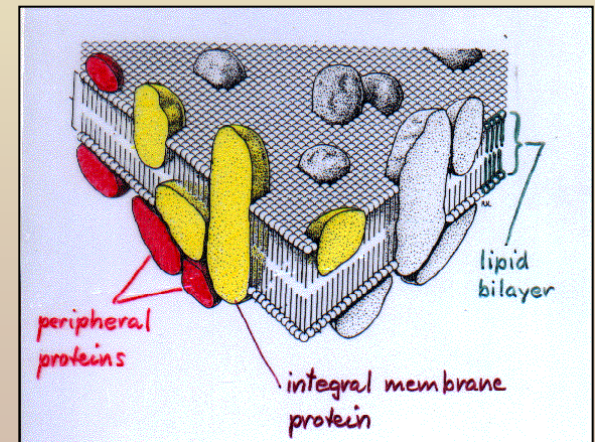
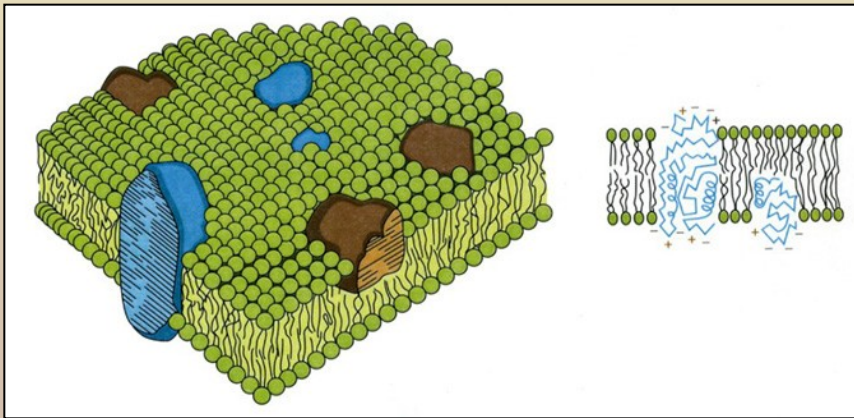
- Nejnovější studie:
  - **nukleoid** – geny pro rozdělování plazmidu (par loci), ATPázy  
ParA –transport (i proteinů)
    - biosenzory pro detekci látek
    - organizace – HLP (HU)  
(folding, domény, superhelicita)
  - **ribozom** – degradace při hladovění, 70S odolává, podjednotky 50S a 30S nikoli
  - **CM** – beta-barrel protein – VM G- bakt. (i mitoch.)  
cílové struktury hostitelských mitochondrií
  - **superantigeny patogenů** – imunostimulační exotoxiny,  
20 SAgs u *S. aureus*

# Cytoplazmatická membrána

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

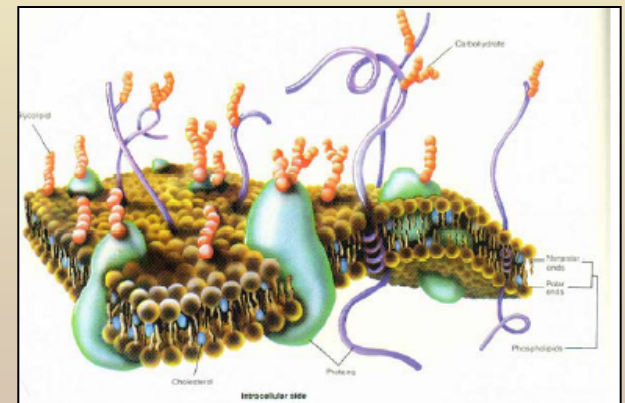
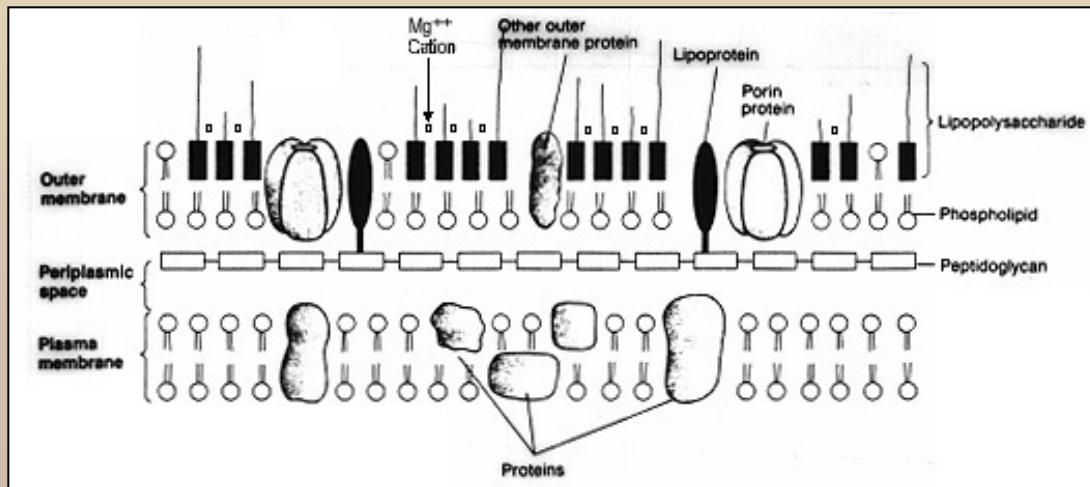
*Archea - etherová v. !!*

- Vnořené bílkoviny - mnoho proti Eucarya
- Semipermeabilní - transport

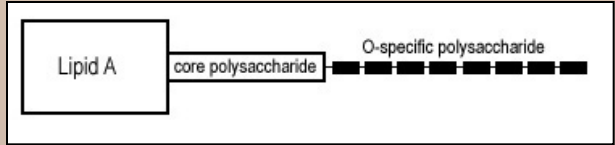
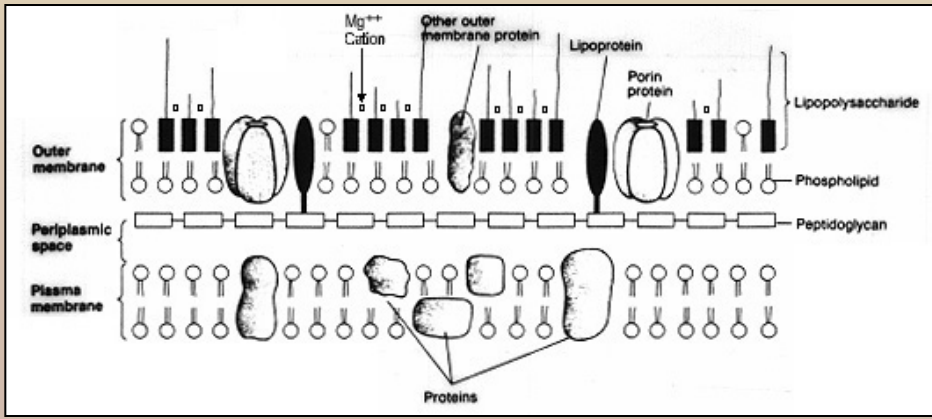
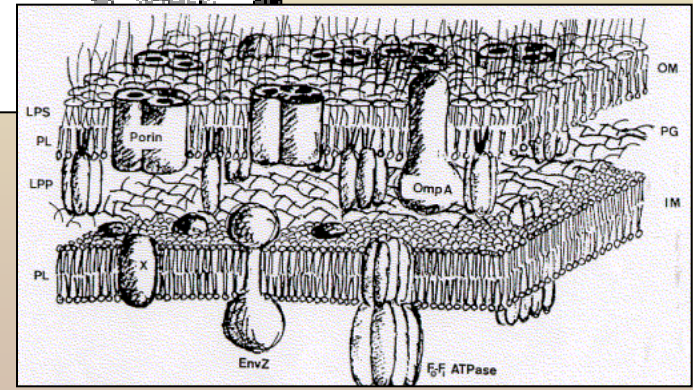
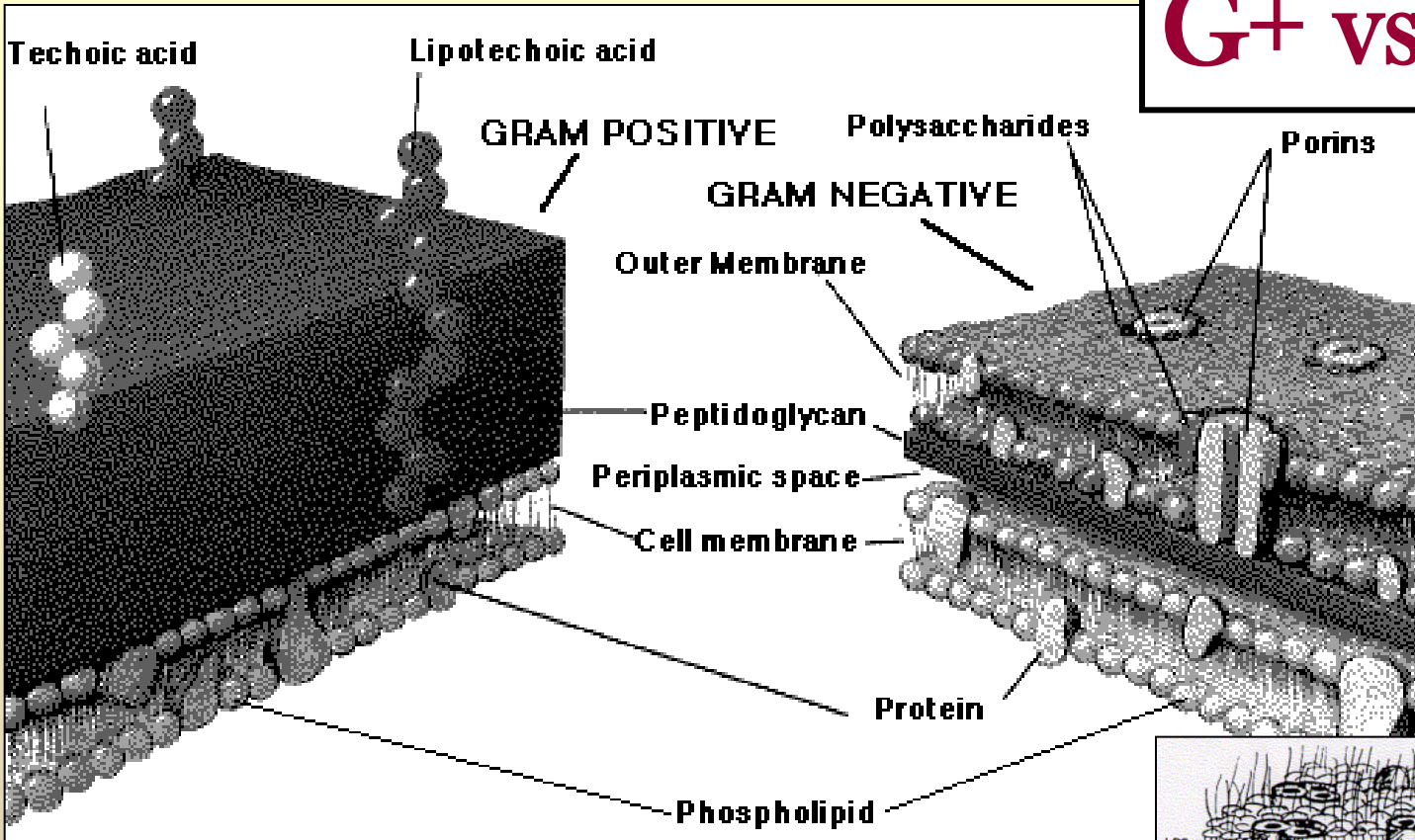


G- buňky cytoplazmatická membrána + vnější membrána!!

- **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



# G+ vs. G- !!



- 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**



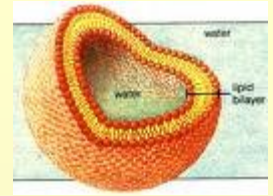
- Biogeneze membrán – **proteiny Omp58** (např. protein vnější membrány BamA)

Obdoba u eukaryot:

- Beta – barrelové proteiny
  - **VM u G- bakt.** (**BAM** komplex v periplazmě) a v **mitochondriích** eukaryot (**SAM** v cytosolu = tím pádem cíl bakteriálních toxinů a efektorových proteinů)

Porovnání se strukturně shodnými organelami eukaryot – evoluční studie, modely patogeneze!!

# Fosfolipid

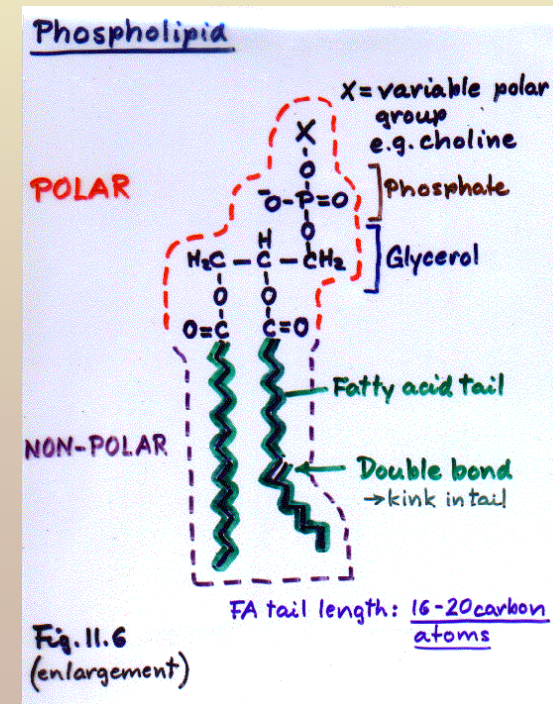
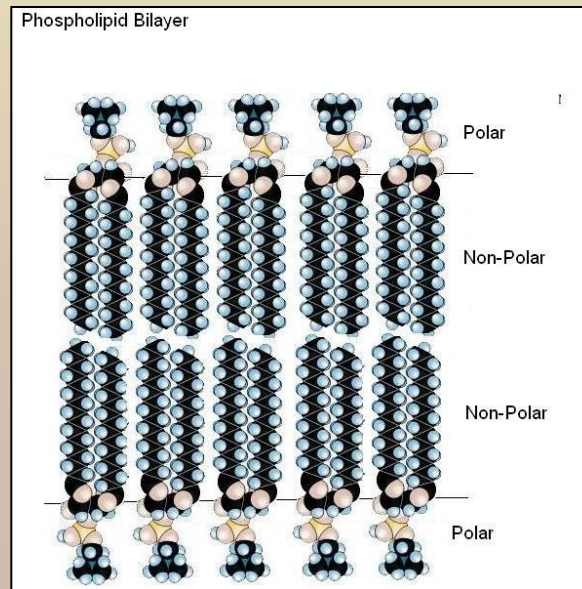
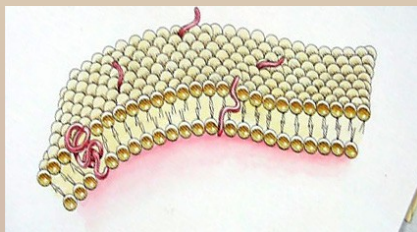


- 1) Fosfátová skupina vázaná na glycerol
- 2) 2 mastné kys.vázané na glycerol - 16-18C
  - nevětvené, nasycené - snižují fluiditu

Závislost na teplotě

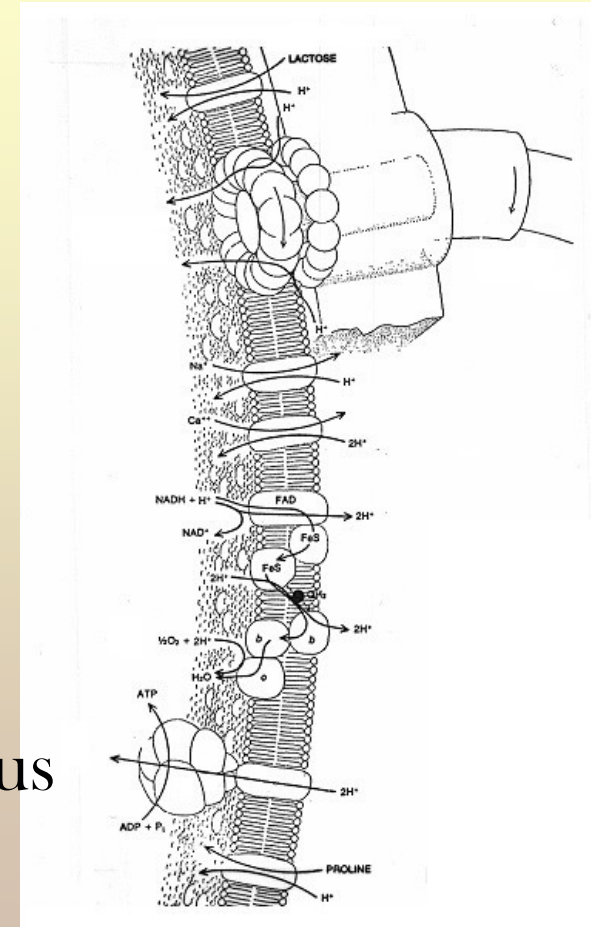
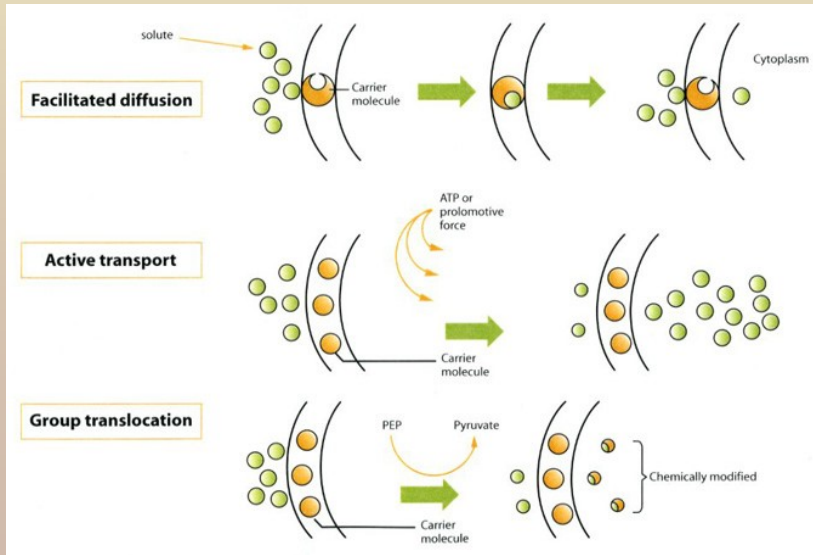
nenasycené - zvyšují

- 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

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

# Příklady adaptability bakteriální buňky - transformace struktur membrány

## A) biogeneze membrány

Př: *Helicobacter pylori* – při kolonizaci vkládání do VM nebo sekrece z VM těchto složek: LPS a OM proteiny (pro adhezi a imunostimulaci)

- změny, remodelace OM profilu!!!

→ neúčinnost vakcín

- cílená léčba – zasažení mechanismů transportu, které více konzervované – beta-barrely, LP, LPS a alterace permeability

- genomy minimalistů – neexprimují vše

## **B) nadprodukce struktur při nedostatku S**

### Lipoproteiny v CM mají různé role

- rezistence na ATB, adheze, sekrece, signalizace, vazba substrátu – SBP proteiny – pro transport peptidů, cukrů a kovů.

Př. hladovění na železo – stafylokoky –

železem regulované SBP proteiny

nadprodukovávají, aby se buňka vyrovnala s nepříznivým prostředím

## C) modifikace složek membrán patogenů či buněčných parazitů (větš.proteiny)

**proč: zefektivnění přenosu a zvýšení schopnosti přežití v různých buňkách eukaryot (nebo prokaryot)**

- Studie na velmi úspěšném patogenu *Yersinia* – musí se přizpůsobit dvěma prostředím – buňkám vektoru a buňkám hostitele!!! A zároveň vykazuje úspěšný přenos
- Př: v čeledi enterobakterií proteiny Ail, OmpX, PagC, Lom.

konkrétně **Ail** – (fce: inhibice komplementu a zánětu, adheze bakt.buňky na host.tkáň) – shift ve stavbě homologů způsobil proměnu z enterobakterie na systémového patogena!!

# 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)

# Buněčná stěna

- Peptidoglykan

Glykan - cukerná složka, NAG, NAM

N-acetylglukózamin+N-acetylmuramová k.,

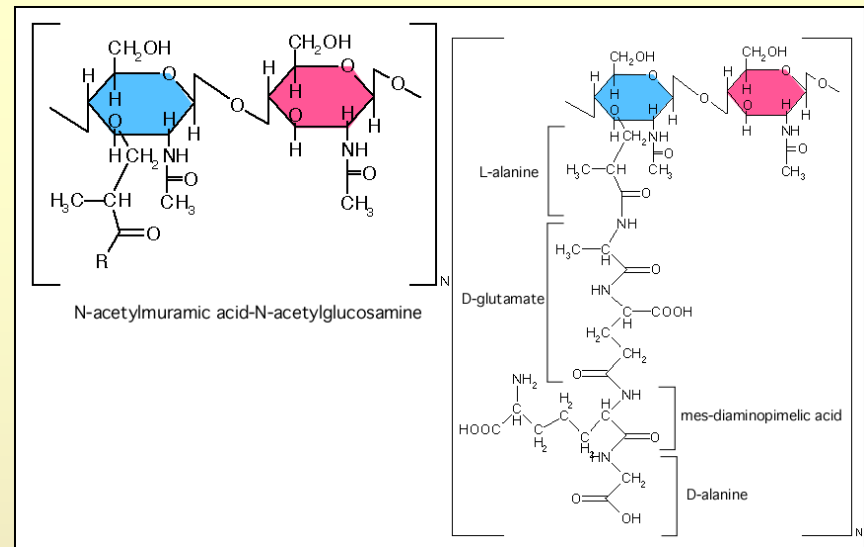
$\beta$ -1,4-glykosidická vazba – kostra = opakování aminocukrů

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

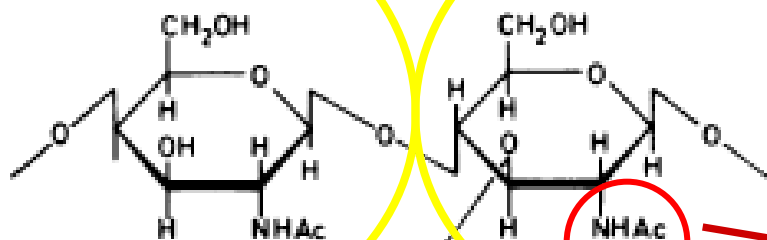
R = DAP - pouze v b.s., taxonomický znak u aktinobakterií, LL DAP, meso DAP

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

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



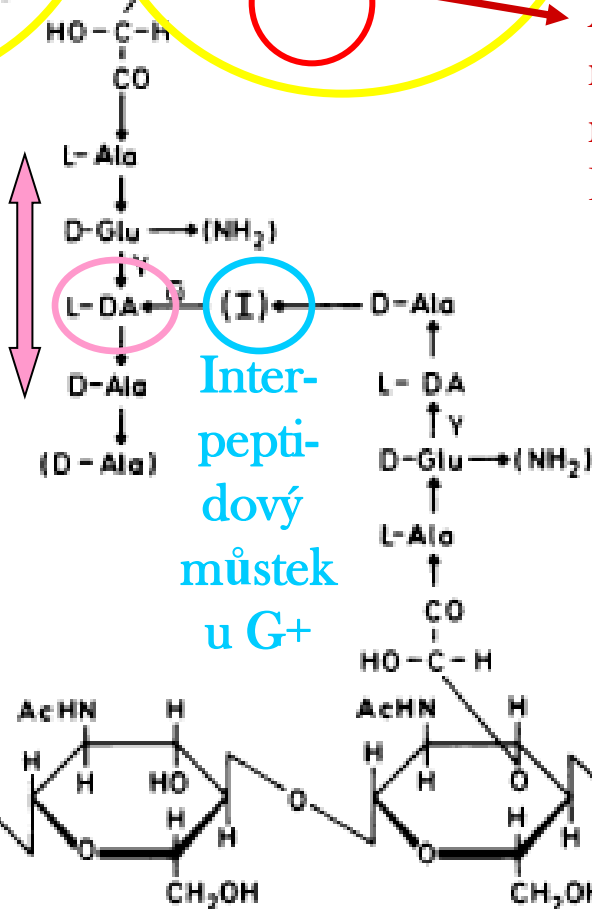
**Peptidoglykan** = uniformní disacharid  
 N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová



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



### CHEMOTAXONOMIE:

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

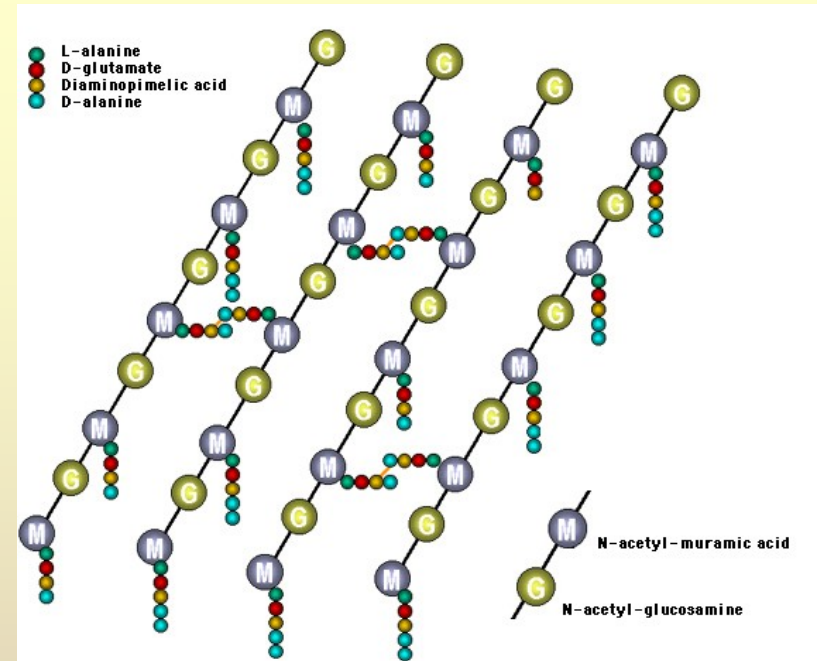
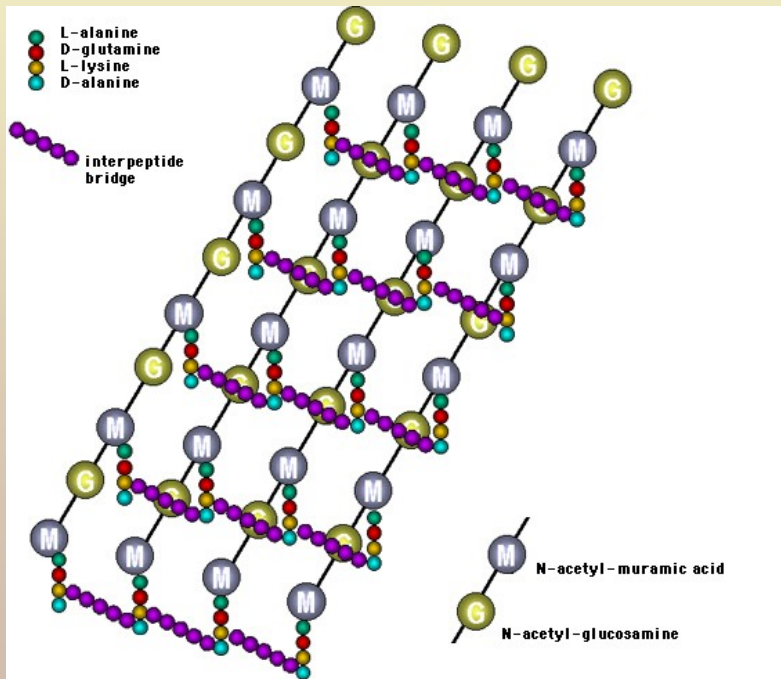
*Micrococcaceae* - až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!

# Peptidoglykan

G+

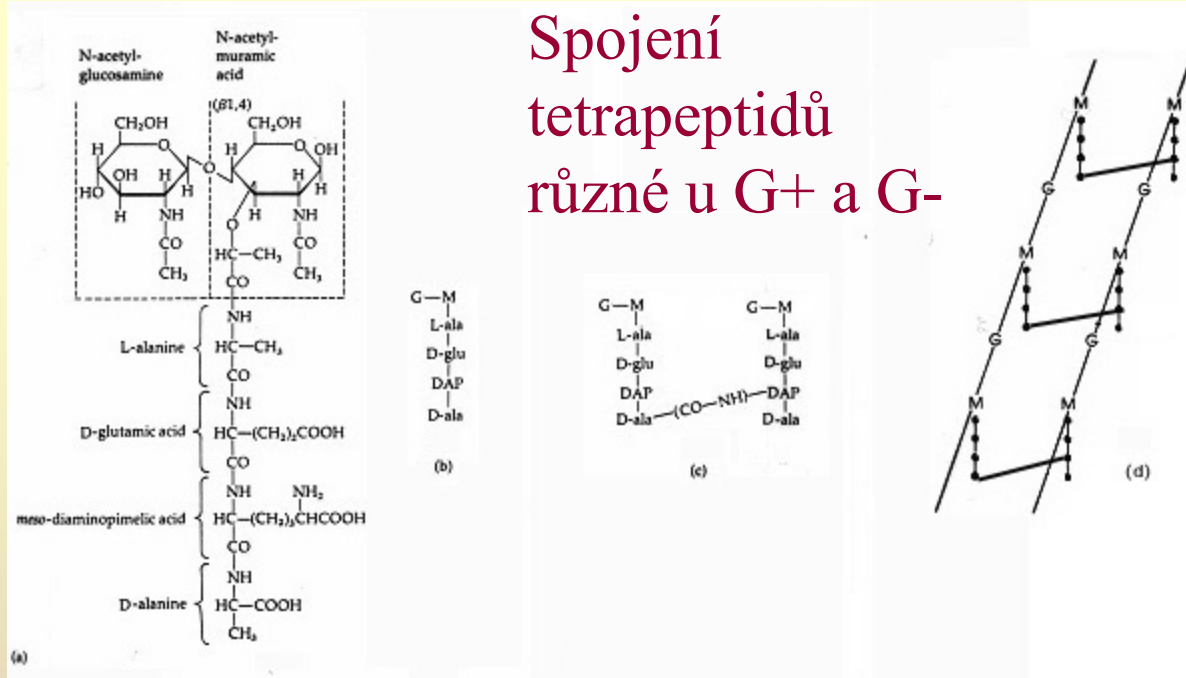


G-

G+ : tetrapeptidy spojeny  
pentapeptidem

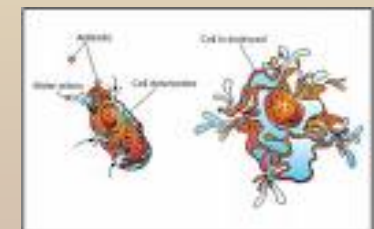
G- : tetrapeptidy spojeny přímo  
D-ala na DAP

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



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*.



# 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

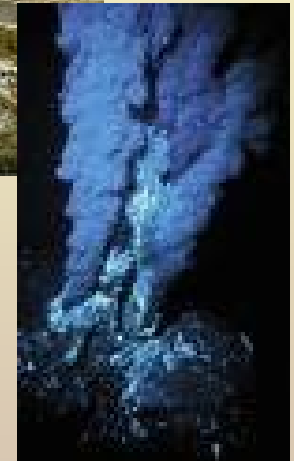
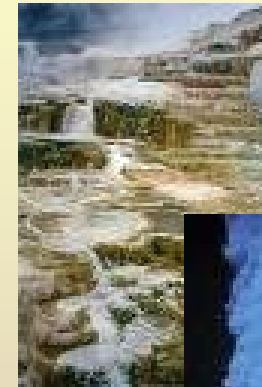
■ *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysin

# *Bacteria vs. Archaea !!*



## *Archea -* *extrémní podmínky:*

**strukturní shody  
ale rozdílné chemické složení**



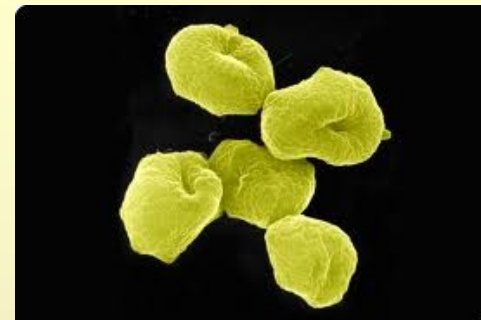
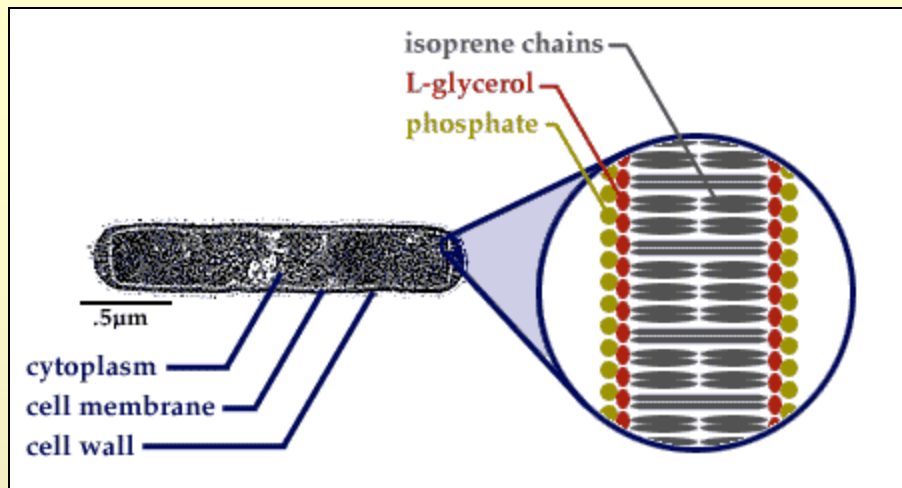
- ---- rozdílná citlivost na ATB

- PEPTIDOGLYKAN

**5 typů buněčné stěny**

- tRNA archeí podobná eukaryotické





## Cytoplazmatická membrána

Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy, větvené lipidy, mnoho proteinů v membráně

### FOSFOLIPID:

(1) chiralita glycerolu (L-glycerol; dáno enzymy)

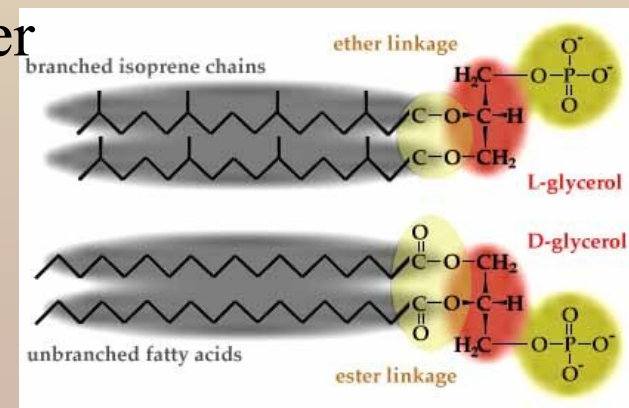
(2) etherové vazby - glyceroldiether, tetraether

= jiné chem.vlastnosti fosfolipidů

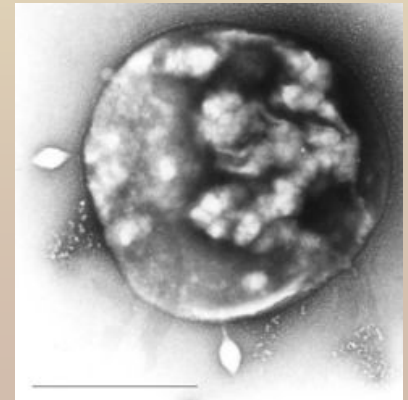
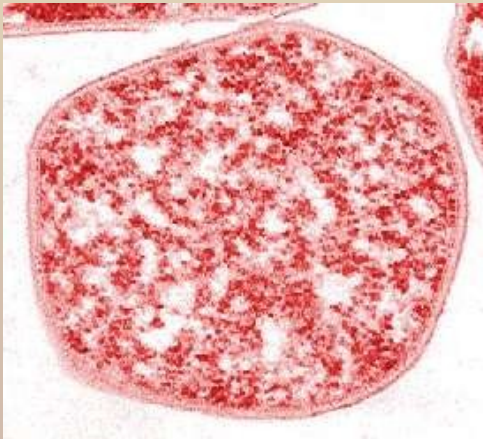
(3) řetízky isoprenoidů namísto MK

(4) větvení isoprenoidu

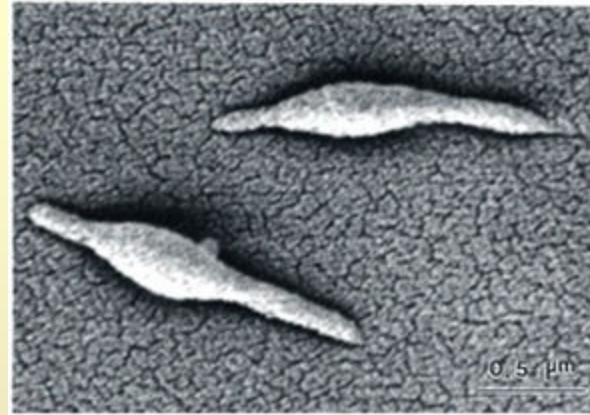
**Nepřítomnost sterolů**



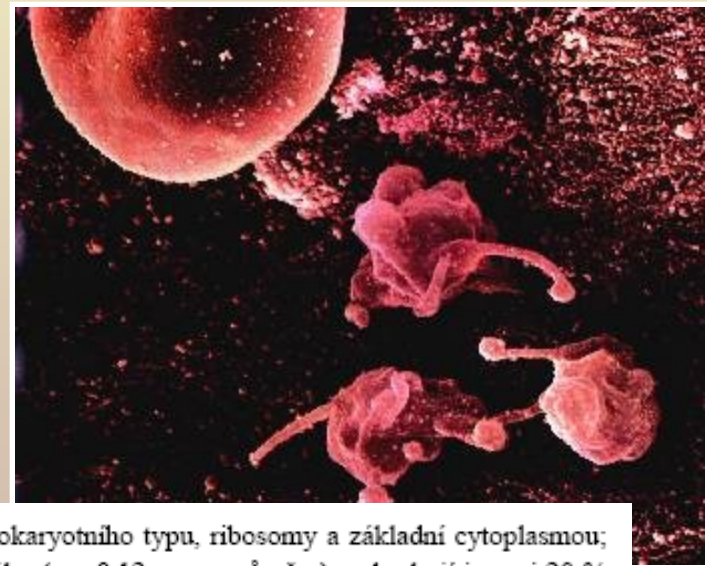
- Často jednovrstevná - diglycerol tetraether glycerolové jednotky na obou koncích MK = tvoří 1 vrstvu
- Lepší přizpůsobení extrémům
  - monolayer rezistentnější k narušení teplem
- Sulfolobus - 90°C a pH 2, větvené uhlovodíky a 2x tak dlouhé než u bakterií



- 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  $\mu\text{m}$  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

# 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 (strikní)  
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 CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O

Produkce karotenoidních pigmentů

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

# Uspořádání buněčných struktur v cytoplazmě

- Na **prostorové orientaci** má podíl:
  - účast enzymů ATPáz ParA (transport NK, proteinů)
  - gradient membrány
- **Mobilizace struktur** – řízeno IR zářením, které generuje exclusion zone (EZ) water
- Specifické **interakce molekul** přítomných v obrovském množství za maximální hustoty cytoplazmy
- **Polarizace struktur cytoplazmy** – dáno actinovými centry a organizací cytoplazm.membrány

# Buněčné struktury

- Trvalé
- Pozměněné např. při vstupu do hostitelské b.  
(remodelace proteinů intracelulárních patogenů)
- Remodelace struktur při buněčném dělení

**Složení a 4D závisí na buněčném stadiu**

**Metody studia:**

**X-ray crystallography**

**TEM**

- Publikace 70 léta – řada struktur jako artefakty!!

# Genetická informace

- Velikost genomu:

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

- Složky genomu:

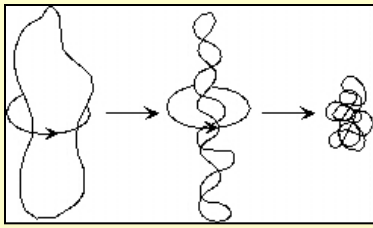
Chromozom - 1-2 **Replikony** - obojí kružnicové i lineární

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

Mobilní elementy: transpozony, inzerční sekvence

Bakteriofágy

- Způsoby přenosu - transformace, konjugace, transdukce



# Bakteriální chromozóm

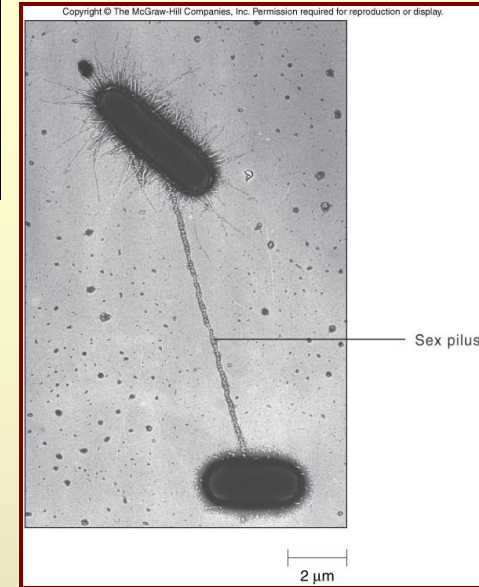
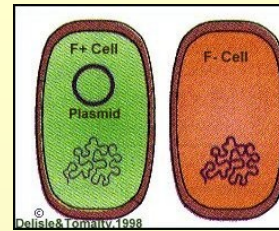
- Zpravidla cirkulární DNA 3mlk DNA, 2 jsou lineární  
(lineární – *Borrelia*, *Streptomyces*, *Coxiella*; *Paracoccus denitr.*  
2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*)
- *E. coli* –  $4,7 \cdot 10^6$  nukleotidů
- Průměrná hmotnost:  $5 \cdot 10^{-15}$  g DNA
- **0.58 Mbp** *Mycoplasma genitalium*
- **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
- Architektonická organizace:
  - kondenzace do kompaktní struktury, HLP proteiny asociované s DNA, napomáhají skládání NK. Vysoce konzervované u eubakterií (HU protein)
  - topologická organizace do domén, specifická superhelicitu domén

# Využití bakteriálních nukleoidů

- Modelové MO
- Integrace biosenzorů do NK – stabilita, vysoké množství biosenzorů (mnoho buněk v buněčné mase = citlivost)

# Plazmidy



- Doplňková genet. informace:

F-plazmidy (fertilní)

Rezistence, - ATB, těžké kovy, UV

Metabolické dráhy (bioremediace)

Přenos konjugací, transformací

Bakteriociny (ne- i konjugativní)

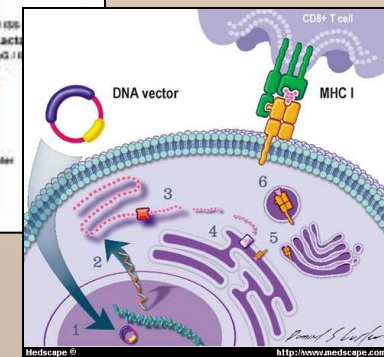
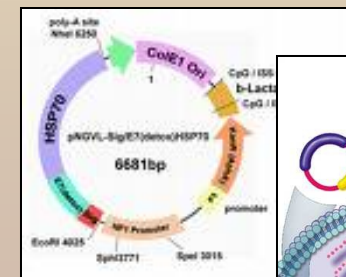
Kódování faktorů virulence: adheziny, toxiny  
hemolyziny, enterotoxiny

Ti – tumorindukující plazmidy

Kryptické, fazmidy, kosmidy

- 5-10% informace genomu

- Genetické inženýrství - vektory





- Rozdělování plazmidů:
  - geny pro tento děj na plazmidech i na nukleoidu
  - ATPáza ParA – přesun plazmidů

# Ribozómy

- Proteosyntéza *RNA - Bacteria vs. Archaea !!*
- 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 )

# Kvantitativní a kvalitativní analýzy ribozomů

- V reálném čase až 72 000 ribozomů
- Studie s antibiotiky (zábrana sloučení podjednotek 30S a 50S, zábrana vazby tRNA - aminoglykosidy)
- Iniclace degradace ribozomů při hladovění buňky – volné podjednotky 30 a 50S jsou náchylnější pro degradaci než celistvý 70S

- [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