

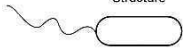


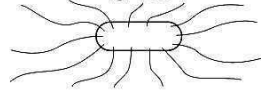
Protokol 6 Pohyb buňky

Úvod:

Pohyb je odpovědí na: gradient chemické látky, teplotu, světlo, gravitaci, kyslíkový gradient. Schopnost pohybu a jeho rychlost závisí na přítomnosti bičíků, počtu bičíků, lokalizaci bičíků (peritricha reagují nejpomaleji), viskozitě prostředí, gradientu koncentrace atraktantů a inhibičních látek, na paměti buňky (žádný pohyb nesmí trvat dlouho, pro správnou reakci musí buňka reagovat na aktuální podnět – krátkodobá paměť receptorů). Rozmezí rychlosti: 1-100 $\mu\text{m/s}$

Bičík

- semirigidní vláknitá struktura, globulární bílkovina flagelin, tloušťka 13-20nm
- vlákno je flagelárním antigenem, specifické bílkoviny; tvorba samouspořádáním
- začíná v cytoplazmatické membráně; proti eukaryotním bičíkům: jiná stavba, jiné bílkoviny, pohyb není vlnění, primární pohyb je rotační, donorem energie není ATP ale proud H^+ , hnací síla: protonmotivní síla (proud H^+) (*Vibrio Na⁺*)
- stavba: bazální tělísko (G- 4 kruhy, G+ 2kruhy), háček, vlákno
- bičíky snadno odstranitelné skleněnou tyčinkou
- při pohybu se bičíky nezamotají díky náboji; pohyb dopředu: proti směru hodinových ručiček, buňku tlačí před sebou, rozmotání bičíků: točení na místě
- chemotaxe: regulace MCP systémem – po vazbě atraktantu chemické modifikace proteinů membrány: de- a fosforylace a demethylace

Structure	Flagella Type	Example
	Monotrichous	<i>Vibrio cholerae</i>
	Lophotrichous	<i>Bartonella bacilliformis</i>
	Amphitrichous	<i>Spinillum serpens</i>
	Peritrichous	<i>Escherichia coli</i>

Rotor:

6-17 tis.otáček/min

Vlákno:

200-1 000 ot/min

Nerotuje konst.rychle

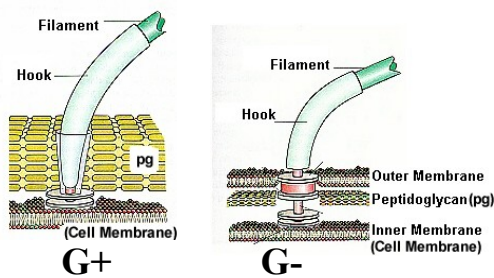
Průměrná rychlost:

20-90 $\mu\text{m/s}$

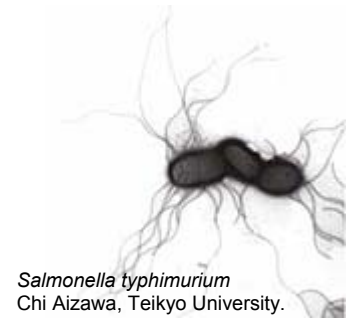
60x délka buňky/s

Gepard:

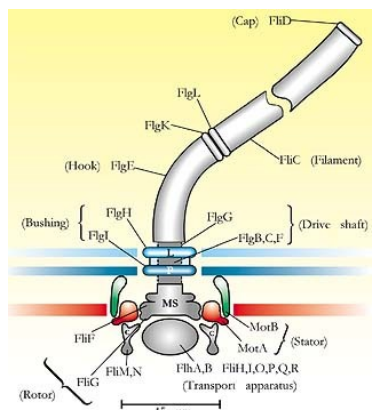
25x délka těla/s



Vibrio cholerae



Salmonella typhimurium
Chi Aizawa, Teikyo University.



Točivá síla je generována mezi **staturem** spojeným s rigidní konstrukcí buněčné stěny (k peptidoglykanu) a **rotorem** spojeným s flagelárním vláknem. Proteiny **MotA a MotB** tvoří složky statoru; **FliF, G, M, a N (MS a C kruhy)** jsou složkami rotoru.

FlgB, C, F, a G jsou hnací hřídeli (drive shaft). FlgH a I (**L a P kruhy**) jsou objímkami, které vedou hřídel vnější vrstvou buněčné stěny.

Typy pohybu:

taxe – pozitivní a negativní; chemotaxe, fototaxe, aerotaxe, magnetotaxe

- swimming motility – pohyb bičíky, plavání
- swarming motility – plazivý pohyb kolonií, bičíky, *Proteus*
- twitching motility – trhavý, skákavý pohyb
- gliding motility – klouzavý pohyb

Důvody pohybu bakterií

- ❖ nejčastější – pohyb ke zdroji živin – po koncentračním gradientu
- ❖ reakce na repelent
- ❖ shlukování buněk za účelem vytvoření plodnice - *Myxobacteria*

Závislost na prostředí:

MCP systém čeledi *Enterobacteriaceae* je urč. způsobem vyvinut u druhů žijících v prostředí bohatém na živiny, liší se tedy od systémů recepce např. u oceánských bakterií:

Vibrio furnissii – živí se chitinem, vykazuje, silná odpověď na nízké koncentrace oligosacharidů chitinu, nikoli na silné atraktans např. pro enterobakterie (aspartát).

Fotosyntetické *Chromatium* – přitahováno H_2S (donor elektronů), což je repelent pro většinu bakterií.

H. halobium přitahováno leucinem, což je repelent pro enterobakterie.

Rhodopseudomonas putida – chemoatraktantem jsou repelenty enterobakterií (benzoát)

MCP systém není ovlivněn růstovým cyklem buňky, není zahrnut v údržbě buňky, ale při zvýšené intenzitě růstu. – pohyb hraje roli při kompetici limitujících zdrojů.

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.

Aerotaxe:

Jedna z nejdříve popsaných taxí. (1883, Engelmann).

Fototaxe:

Fotokineze je snížení či zvýšení rychlosti odpovědi na změny intenzity světla.

Pozitivní fototaxe ve směru nižší intenzity světla. Sinice – velikost buňky umožňuje vnímat směr světla. Bakterie – fotofobní. Akumulace ve stinném prostředí.

Chemotaxe:

Pohyb bez atraktantu – střídání přímého a otáčivého, vrtivého. Náhodný.

Pohyb s atraktantem – nižší frekvence otáčení na místě

Bakterie disponuje pamětí na okamžitou koncentraci atraktantu: porovnává prostředí s předchozí koncentrací – ve směru zvyšující se koncentrace se **snižuje frekvence otáčení na místě**.

- Pozitivní (pohyb k atraktantu) a negativní – pozorování na Petriho misce
- Koncentrační gradient
- Chemoreceptory – v perioplazmě nebo na cytoplazmatické membráně

- Atraktanty:
 - cukry (odpověď už na 10^{-8} M koncentraci), aminokyseliny;
 - 20 chemoreceptorů
- Repelenty
 - bakt.odpadní produkty, inhibiční agens, barviva, chemické látky
 - 10 chemoreceptorů

Náplň cvičení:

- porovnat pohyb buněk *Micrococcus luteus* (pouze Brownův pohyb) s ostatními
- příprava nativního preparátu – Nomarského kontrast
- mikroskopie obarvených preparátů – fázový kontrast
- očkování do polotekutého media na misce i ve zkumavce

Mikroorganismy:

Bacillus cereus CCM 2010 - 4h a 16ti hodinová kultura; peritrichum

P. fluorescens CCM 2115T - 4h a 16ti hodinová kultura, monotrichum

Proteus vulgaris CCM 1799 - 4h a 16ti hodinová kultura, peritrichum

E. coli CCM 3954 - 4h a 16ti hodinová kultura peritrichum

Micrococcus luteus CCM 169 – pro srovnání nativního preparátu

Pozorování pohybu bičíku -

1) nativní preparát

- kapka suspenze buněk v mediu na podložní sklo, nepřekrývat krycí, pozorování objektivem 20, nezanořovat!! Nomarského kontrast. Pro vitalitu buněk je důležitý dostatek kyslíku (citlivější buňky se hýbou jen nahoře). Je nutno opatrně proošťovat na horní část kapky – dostatek O_2

- nesmí se pracovat se skleněnými předměty (krom sklíček), př: skleněná tyčinka bičíky ulamuje (na sklíčko opatrně nanášet umělohmotnou pasteurkou, opatrně překrývat krycím sklíčkem), práce s mladými kulturami 4-16hodin!! pozorování vždy z tekutého media

Barvení bičíků:

Závisí na způsobu kultivace. Kultivace buněk vhodná v tekutém mediu. Staré buňky odhazují bičíky.

Fixace, speciální barvicí metody pro světelný mikroskop. Barvička obsahuje mořidlo tanin, které se obalí kolem bičíku, jeho průměr se znásobí a zviditelní.

Postup:

- a) opatrně připravíme nativní preparát na odmaštěné podložní sklíčko
- b) opatrně překryjeme krycím sklem
- c) vedle krycího sklíčka kapka barvičky
- d) prosajeme filtračním papírem
- e) pozorování pod imerzí

Barvička na barvení bičíků: roztok I (10 dílů) a II (1 díl), zamražený

Roztok I: 10ml 5% vod.roztoku fenolu, **2g taninu**, 10ml $Kal(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$

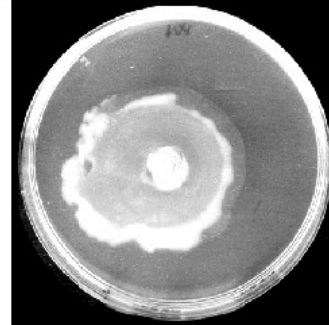
Roztok II: nasycený roztok **krystalové violeti** (12g) v ethanolu (10ml, 96%)

(Pozn: Elektronová mikroskopie - negativní barvení, otiskové preparáty po rychlém zmražení na $-150^\circ C$)

Agar na testování pohybu:

Obsahuje nízké množství agaru – je to polotekuté medium (nižší viskozita prostředí). Na polotekutý agar se očkuje vždy jen do středu misky, aby se rozrůstala 1 kolonie. Nejlépe kličkou, trochu zanořit do agaru. Pohyblivé kultury udělají rozrůstající se kruh, někdy vlnící se. Nepohyblivé rostou jen v místě vpichu do určité velikosti. Výsledky za 3-5 dní.

Složení do 100ml demineralizované vody:
yeast extract (0,1g), $K_2 HPO_3$ (0,01g), agar (0,2g). S miskou se nesmí hýbat.

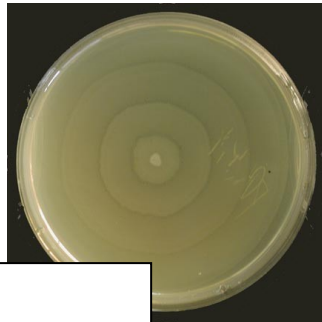


motility test medium, polotekuté
Pohyblivý kmen roste i mimo inokulaci – v celém mediu

Figure 1. A swarming colony of *S. liquefaciens* approx. 600 min after inoculation. The agar concentration is 0.6% (w/v) and the casamino acid concentration is 0.2% (v/v). The shading is due to the light source reflecting off of the surface of the mostly transparent culture.

Proteus mirabilis

- Solidní střed
- Povlak
- Konsolidovaná zóna
- Terasv



Dynamika růstu kolonie:

- Periodicita migrace
- Diferenciace plazivých buněk
- Lag perioda předcházející migraci
- Migrace plazivých buněk
- Dediferenciace
- Konsolidace

Regulace diferenciace

Impuls

pevná půda, viskozita prostředí
mechanická zábrana rotace bičků
chemotaxe – glutamin

Následek předání signálu

inhibice dělení
vlákna až 80 μm
hyperprodukce flagelinu: 5000 až 10000 bičků

Způsob šíření

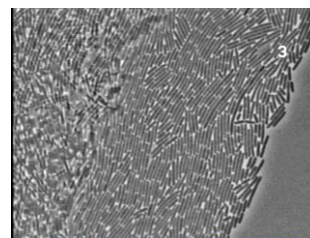
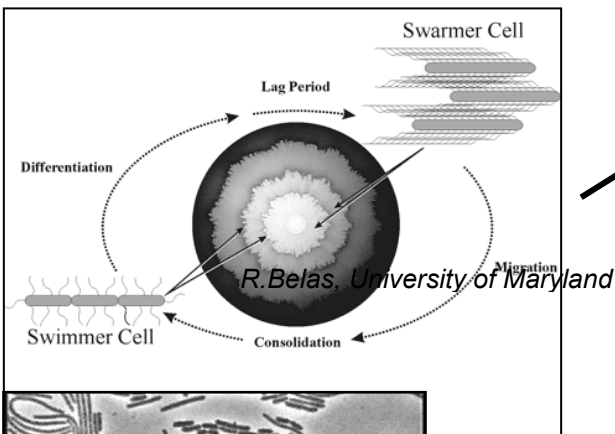
1. Posuvem

z konsolidovaného okraje kolonie, kde jsou buňky již diferencovány a lem je organizován

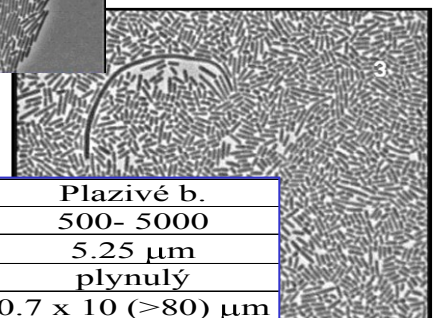
2. Volným putováním

z populace vegetativních buněk, kde začíná diferenciace

Cyklus diferenciace



Uspořádané diferencované buňky na okraji kolonie



	Plovoucí b.	Plazivé b.
Počet bičků	1 - 10	500- 5000
Délka bičků	0.75 μm	5.25 μm
Pohyb	víření	plynulý
Buňka	0,7 x 2 μm	0.7 x 10 (>80) μm
Počet chromosomů	1-2	mnoho

Bacterial swarming and cell differentiation

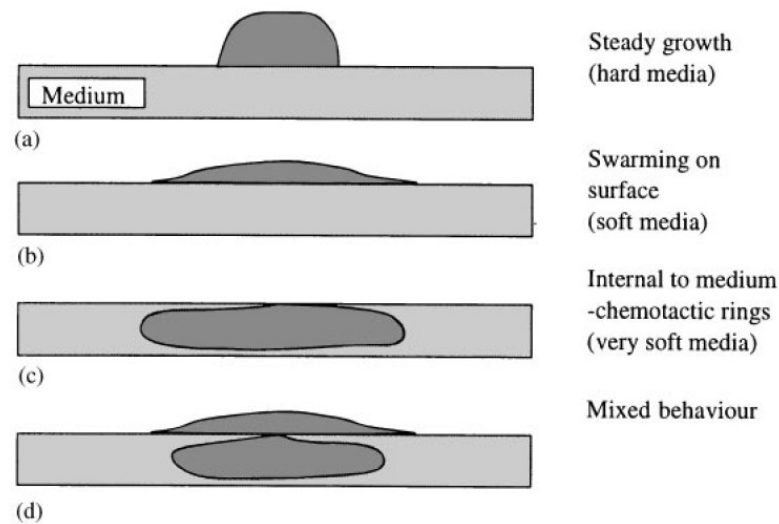


Fig. 1. Cross-sections illustrating different methods of colony expansion for *S. liquefaciens*: (a) displays steady growth on hard media in which fluid is unavailable to the bacteria. (b) occurs when the bacteria are able to extract fluid from the media in order to swarm, and (c) is observed with very soft media for which the bacteria can swim in fluid channels within the media itself. (d) can occur for media of intermediate hardness between (b) and (c)

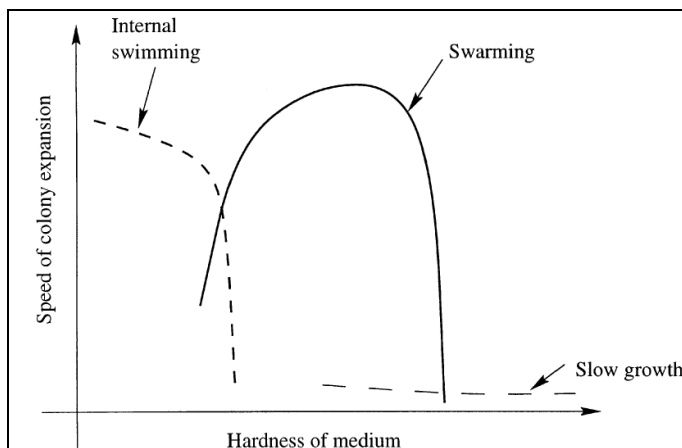


Fig. 2. A bifurcation diagram depicting the varying strategies for bacterial colony expansion from experimental observations. Here, we show the effect of varying the hardness of the medium (achieved by varying the agar concentration) and keeping the available nutrients fixed. Note that the curves overlap, and the bacterial colony can "select" either mechanism, or sometimes both

Bees a kol. (2000): The interaction of thin-film, bacterial swarming and cell differentiation in colonies of *Serratia liquefaciens*. *J. Math. Biol.*, 40: 27-63

www.maths.gla.ac.uk/~mab/papersub.html
www.nysaes.cornell.edu/pp/faculty/hoch/movies/
www.rowland.harvard.edu/labs/bacteria/index.html
http://www.rowland.harvard.edu/labs/bacteria/projects_filament.html
<http://www.aip.org/pt/jan00/berg.htm>
www.medmicro.wisc.edu/.../research/index.html
www.buddycom.com/bacteria/gnr/gnrgluox.html