

Vnější struktury bakteriálních buněk vs. buňky hostitele – adheze, invaze a remodelace hostitelských buněk

Jak jsou indukovány změny některých struktur bakteriální buňky, a jak tyto struktury působí na přestavbu buňky eukaryotické

Invaziny (OMP)

LPS – enterotoxin lipid A

Eukaryotický cytoskelet a jeho modifikace vlivem patogenů

Tendence – vždy vhodná nika pro přežití

Ovlivněn viry i bakteriálními patogeny

Regulace cytoskeletu vazbou na receptory či vstupem do buňky, a to:

- Bakteriální toxiny
- Aktin-regulující GTP-vázající malé proteiny

Cytoskelet hostitele slouží k:

- přilnutí, vstup do buněk, pohyb uvnitř a mezi buňkami, formování vakuol a remodelace, zábrana fagocytózy...

Patogenita bakterií a eukaryotický aktinový cytoskelet

a) Intracelulární patogeni

- hraje roli při změnách (pohybu buňky a pohlcení bakterie) euk.CM při fagocytóze
- a) interakcí bakteriálních produktů s receptory cytoplasmatické membrány za regulace cytoskeletu
- b) přímým vstupem produktů do buňky
- Intracelulární patogeni possess ligandy reagující s receptory a sekreční systém IV typu translokuje molekulyefektorů do cytoplasmy
- Takto bakterie svými produkty manipulují aktinový cytoskelet pro promote jejich proliferaci
- Stimulace polymerace aktinu a zvýšená fagocytóza bakterií!!
- Rychlé násobení počtu bakteriálních buněk ve tkáních

b) extracelulární patogeni

- Naopak, produkují substance vstupující do eukaryotické buňky a ničí síť aktinových vláken
- Tím zabrání pohlcení a natrávení eukaryotickou buňkou

Faktory **adheze** *Clostridium difficile* při přilnutí na lidské enetrocyty ve střevě

- Studium – monovrstva bněčných linií střevních buněk (střevní epiteliální Caco-2 a sliz produkující HT29-MTX), nikoli in vivo!
- Růst za zahřívání a v přítomnosti krve
- Mikroskopie: SEM
- Interakce bakterií s microvilli epitelu, silná vazba na buňky mukózní vrstvy
- Byly pozorovány hlavně dva povrchově-vazebné protejny 12 a 27kDa

Průchod salmonel epiteliálními buňkami

- Intracelulární parazity
- Vstup do vakuol, replikace
- V přítomnosti povrchů epiteliálních buněk se indukuje syntéza některých proteinů důležitých pro adherenci a invazi
- Indukce proteinů stimulována trypsinsenzitivními a nueraminidázaseenzitivními strukturami epitelu

Přestavba cytoskeletu provázející vstup salmonel epitelem

- Metodika: konfokální mikroskop, imunofluorescenční a elektronový
- Po vstupu do vakuol buňky salmonel obklopeny 5-10 um struktur cytoskeletu
 - rozsáhlými agregáty polymerizovaného aktinu, alfa-aktininu a tropomyosinu krátce po přichycení (20-60 min) a tato vlákna zmizela po internalizaci
 - tubulin rovněž agreguje..
 - studie: aplikace inhibitoru mikrofilament – cytochalasin D, který blokoval bakteriální internalizaci, ale nebránil akumulaci polymerizovaného aktinu

Salmonela po vazbě na povrch spouští přestavbu cytoskeletu

Přestavba cytoskeletu vlivem proteinu *Neisseria gonorrhoeae*

- Vstup do buněk tkáňové kultury po vazbě Opa (opacity outer membrane proteins) na proteoglykanové receptory
- Cytochalasin D – látka přerušující mikrofilamenta - opět blokoval vstup buněk
- Opět akumulace aktinových filament kolem buněk při jejich vstupu do hostitele

Možnosti studií funkce struktur OMP

- Známé sekvence genů pro invaziny
- Transformace modelových MO (př: *E. coli*) těmito geny
- Plasmid s genem fúzovaným s genem pro beta-laktamásu ve vedoucí sekvenci = *E. coli* (opa)
- Oproti netransformovaným *E. coli* adherovaly na buňky určitého epitelu
- Kinetika a stupeň invaze byly porovnatelné s hodnotami pro Opa+ *N. Gonorrhoeae*
- Metoda studia invaze: TEM
- Invaze inhibována: cytochalasin D
- TEM prokázala: buňky infikovaného epitelu vykazovaly dramatické snížení filamentů

LPS

Lipid A

- LPS = hlavní molekula buněč.povrchu G- bakterií
- Vně VM
- 3 domény - koncový O-polysacharid, jádro=oligosacharid a lipid A
- Lipid A – je esenciální pro přežití; endotoxin
 - chemické modifikace (v závislosti na vnějšku!!!)
 - tedy ovlivnitelný teplotou, pH...

Jádro – oligosacharid, několik glykoforem – 11 typů LPS

- Metody popisu chemické struktury:
 - tenkovrstevná chromatografie TLC, MS, (maldi, esi), radioizotopové značení

Biosyntéza, transport a modifikace lipidu A= remodelace struktury!

- Lipid A- fosfolipid na bázi glukosaminu
- Konstitutivně syntetizovaný
- Hydrofobní část LPS
- Příčina septického šoku, vliv na patogenitu – aktivuje IS
- Analýza strukturních genů pro lipid A
- Ale – chemická struktura modifikovatelná vnějšími faktory!!
- Modifikace lipidu A – strukturální změny – ekologická výhoda pro patogeny – strategie G-

Izolace a charakterizace lipidu A: fyziologie bakterií, mechanismy ATB rezistence, imunitní odpověď hostitele, vývoj ATB

LPS *Coxiella burnetii*

- Buňky fáze I a II !!! – S a R formy
- Chemické a imunochemické metody
- Vzácná D-glycero-D-manoheptóza
- Unikátní cukry, které se nenašly v jiných LPS nebo i jinde v přírodě
- (6-deoxy-3-C-methyl-L-gulosa = L-virenosa
a 3-C-(hydroxymethyl)-L-lyxosa)

Labilita vazeb v kyselém prostředí

LPS *Haemophilus influenzae*

- Extenzivní intra a interkmenová heterogenita glykoforem