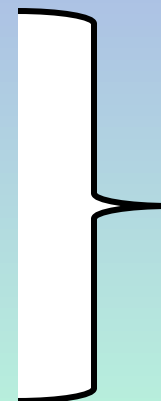


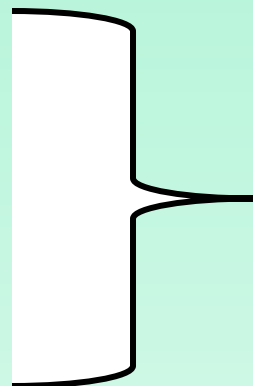
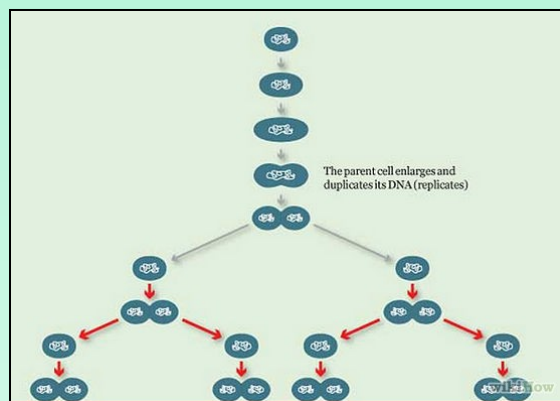
Bakteriální genom v populaci buněk

- Vztah mezi:

- krátkou **generační dobou**
- frekv. **mutace**
- přenos **mobil.genet.elementů a plazmidů**
 - vertikálně...horizontálně
 - i mezi rody....
- **množství buněk** v populaci

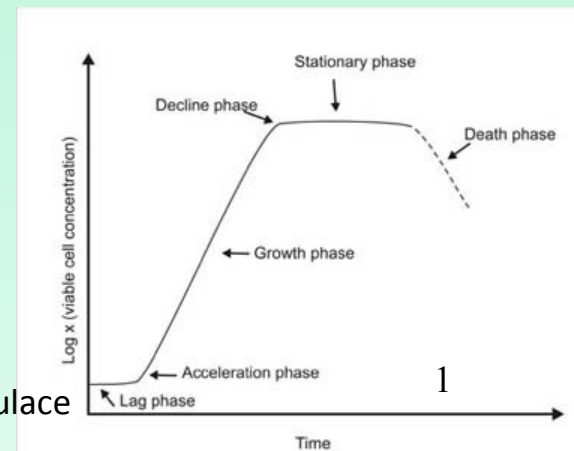


Význam pro mikrobiální technologie; Genetické inženýrství...



V průběhu 1h (a vycházíme-li z populace 10^8 CFU/ml??)

Dělení buněk



Růstová křivka populace

Bakteriální genom

- **Haploidní**

Páry bazí A-T, C-G:

- Některé bakterie – méně než 200 kbp
- Jiné 12 000 kbp



- První sekvenovaný:

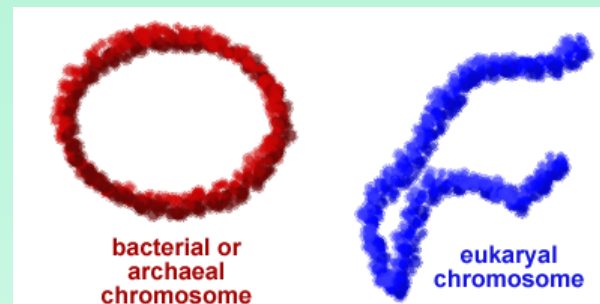
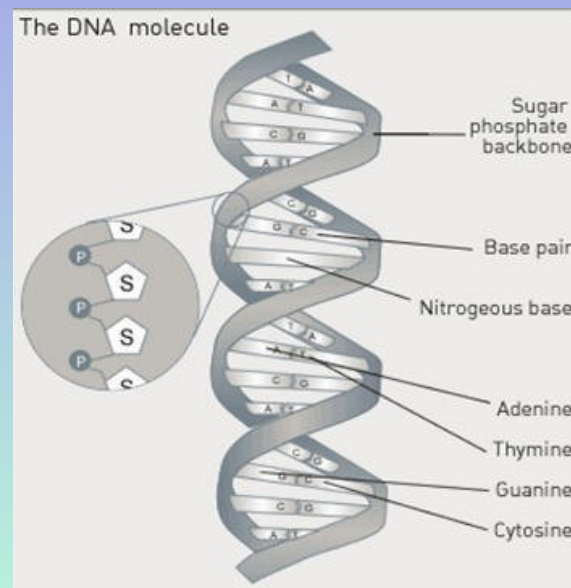
Haemophilus influenzae

(1995 by The Institute for Genomic Research)

Počet genů: 575 – 5500..

High coding densities....

(Člověk 3 mld bp a 23 000 genů)



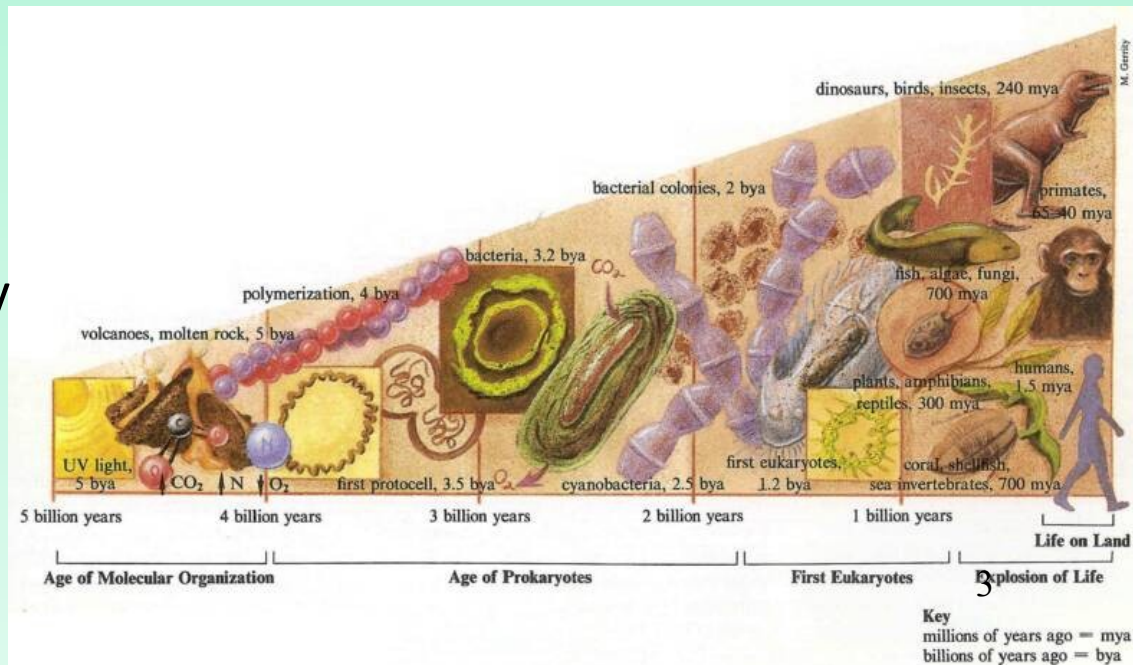
- Většinou cirkulární = replikace začíná i končí na jednom místě
- Reprodukce – asexuální = děti jsou klonem rodičů...
- Změna sekvence – rekombinací nebo mutacemi

Genom kóduje, ale vyvíjí se, mění se...

- Po několika miliardách let evoluce adaptace na všechny niky
- Adaptace a) evoluční; b) regulace metabolismu v daném momentě
➔ c) množení mutovaných b.s výhodnou mutací
- Adaptací buněčných struktur a metabolických drah
 - masa buněk, frekvence mutace a frekvenci přenosu genetické informace

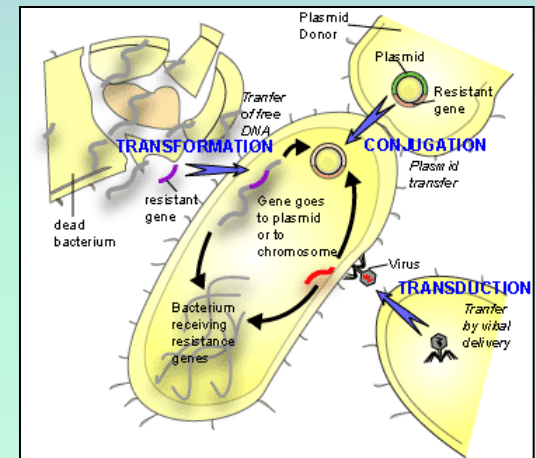
– vývoj struktur enzymů
- vývoj ochranných látek chránících proteiny a NK (unikátní chem.struktury

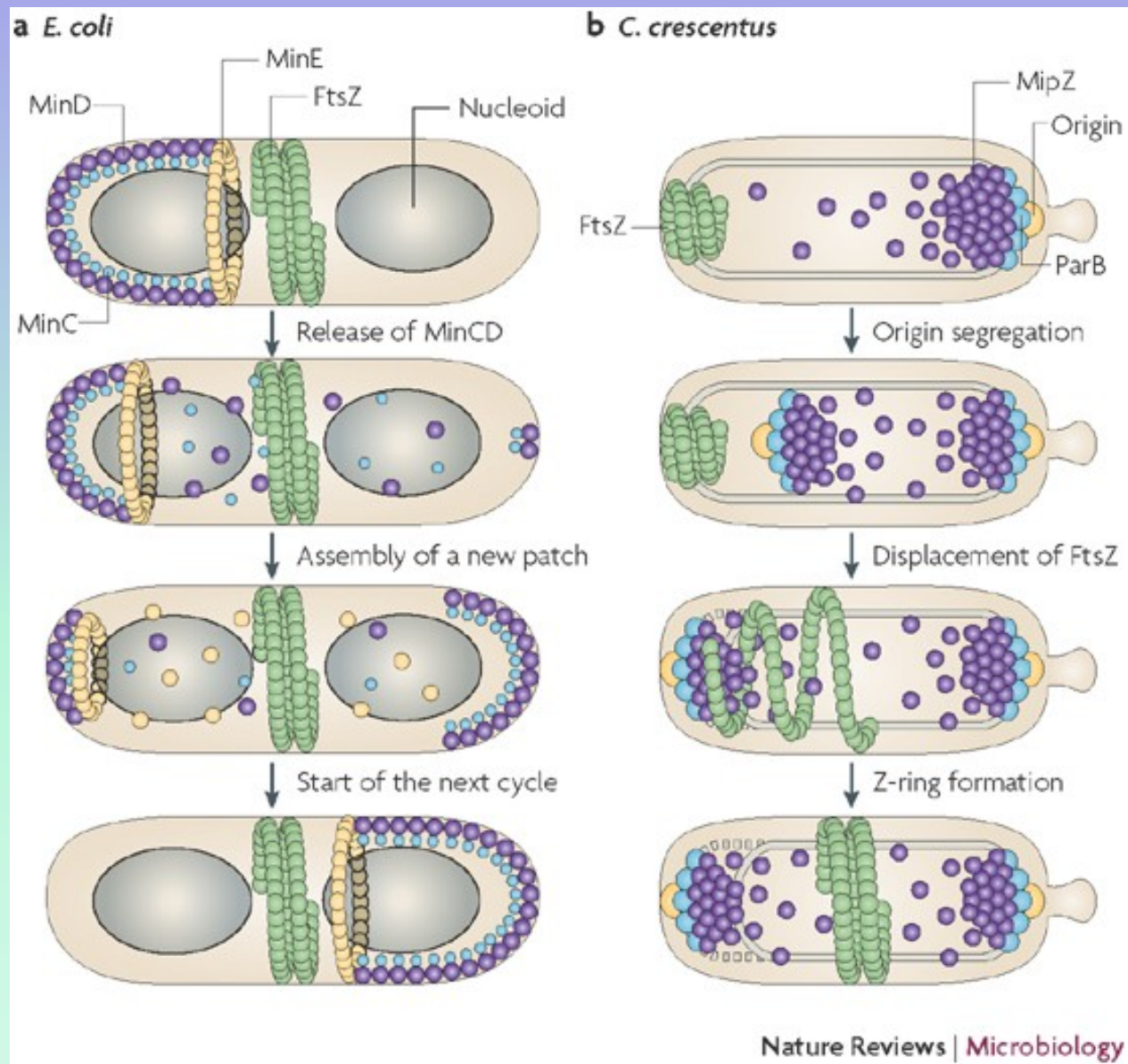
př: dipikolinová, HU proteiny
HS proteiny...)



Co genom kóduje?

- struktura (chem. povaha)
- funkce struktury, vektor dráhy – metabolické, signální...
- regulace procesů
 - buněčného dělení (binárního i asymetrického)
 - buněčného cyklu a diferenciaci buňky
 - polarizaci buňky a procesů
- Některé procesy shodné s eukaryoty
- Jiné unikátní pro bakterie
- Studie – zobrazovací techniky? Strukturní studie? In vivo? In vitro?



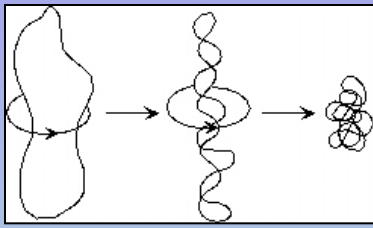


- Provázanost – elementy cytoskeletu a buněčná organizace, segregace NK a dělení buňky...

Genetická informace

- Velikost genomu:
 - „specialisté“: ~1,5 MBp, „generalisté“ - ~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





Nukleoid

- Zpravidla **cirkulární DNA**

(lineární – *Borrelia*, *Streptomyces*, *Coxiella*; *Paracoccus denitrificans*)

2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*

3mlk DNA, 2 jsou lineární

- *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



A GFP-based bacterial biosensor with chromosomally integrated sensing cassette for quantitative detection of Hg(II) in environment....

- Architektonická organizace:
 - kondenzace do kompaktní struktury, HLP proteiny asociované s DNA, napomáhají skládání NK. Vysoce konzervované u eubakterií

- Superhelicita = nadšroubovicové vinutí

- **Relaxovaná podoba DNA – spotřeba ATP**

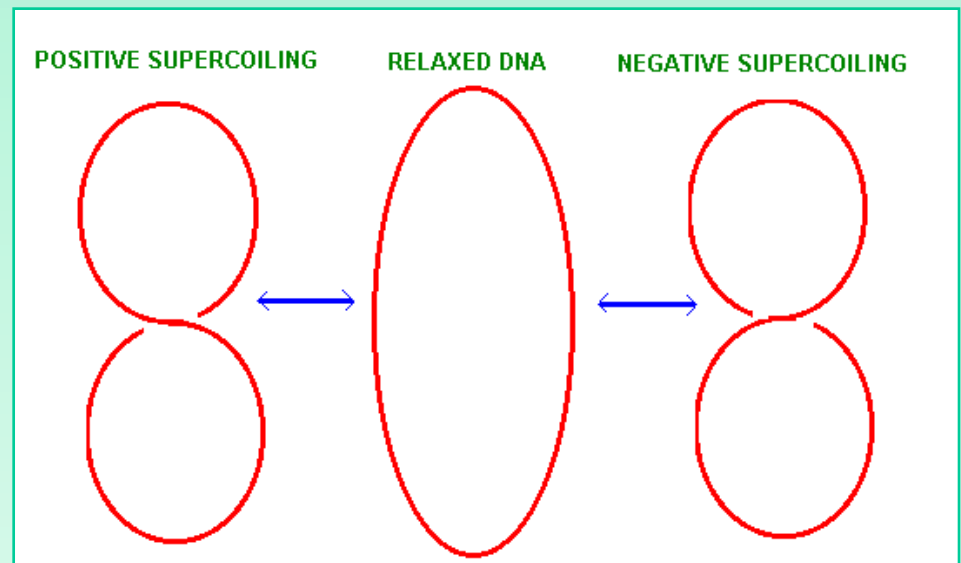
závity přitaženy:

- negativní s.

(fyziologický stav)

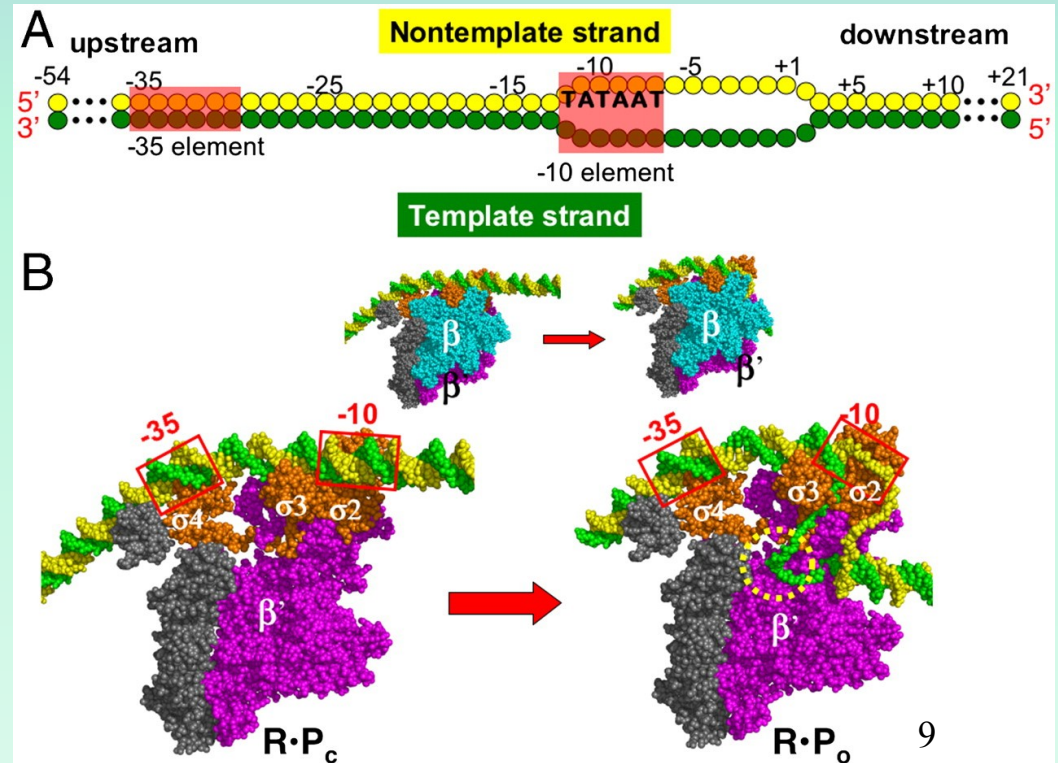
závity rozvolněny:

- pozitivní s.
- enzymy topoizomerázy
- inhibice kumarinová atb.

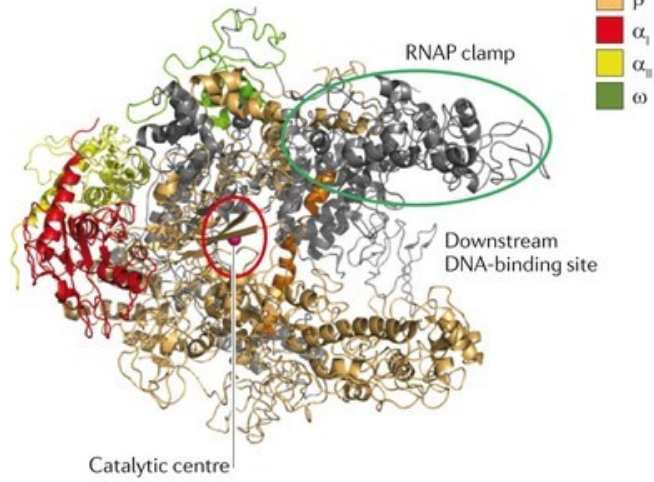


Transkripce

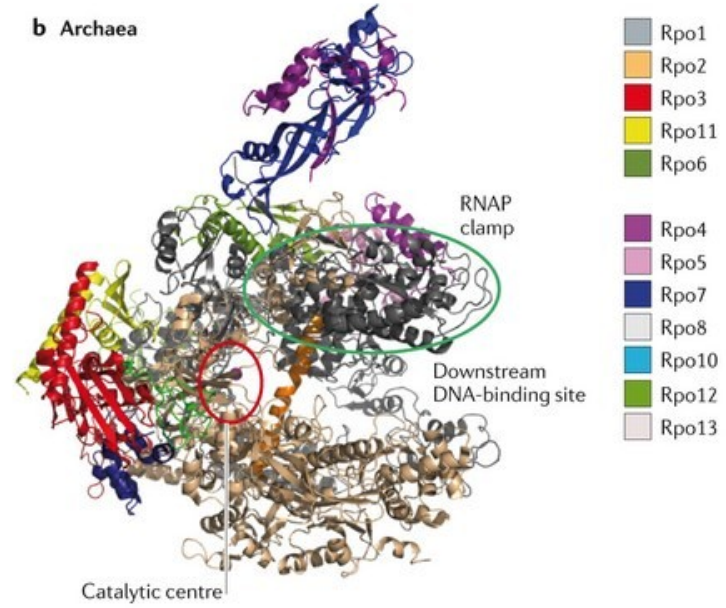
- RNA-polymeráza – 5 proteinů (1 z nich σ faktor)
- Syntéza 1 mRNA trvá 1 min, nejsou postranskripční úpravy
- Různá hladina mRNA = různá hladina proteinů
- Evolučně konzervované, podobná eukaryotické
- Kryo-elektronová mikroskopie
- Jak se liší od archeální?



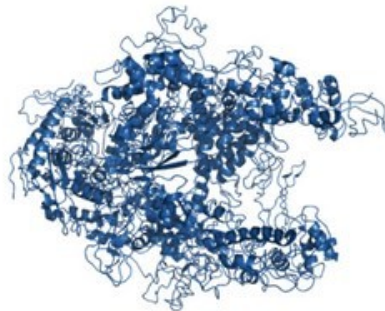
a Bacteria



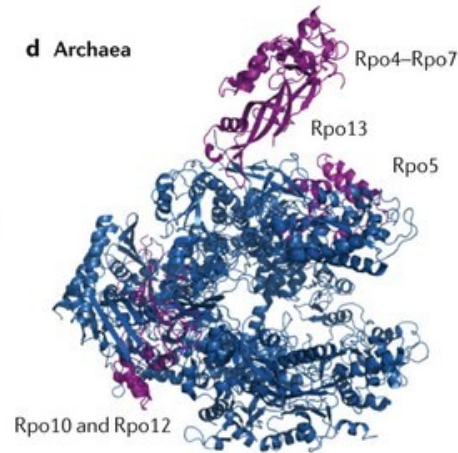
b Archaea



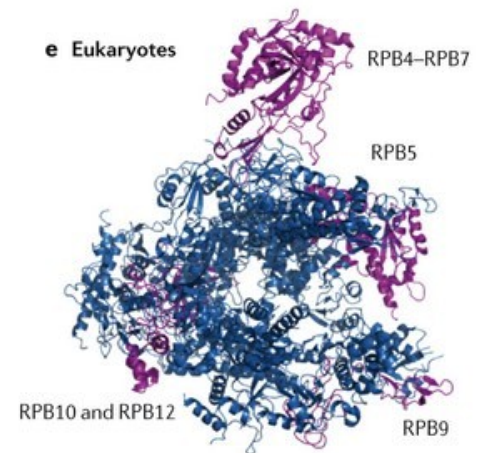
c Bacteria



d Archaea

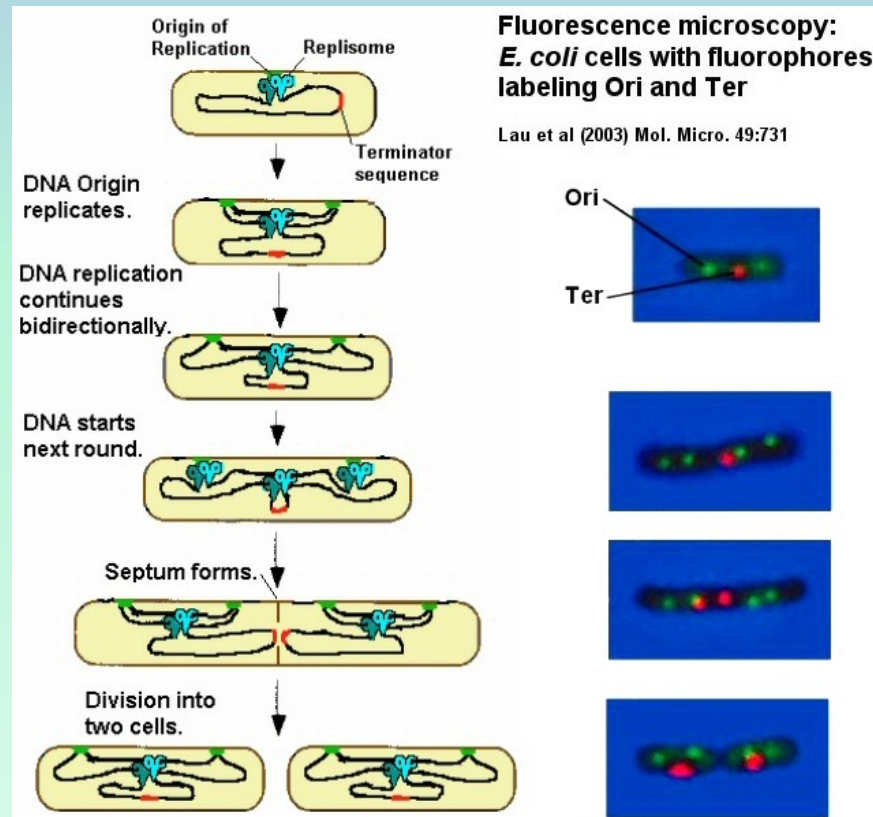
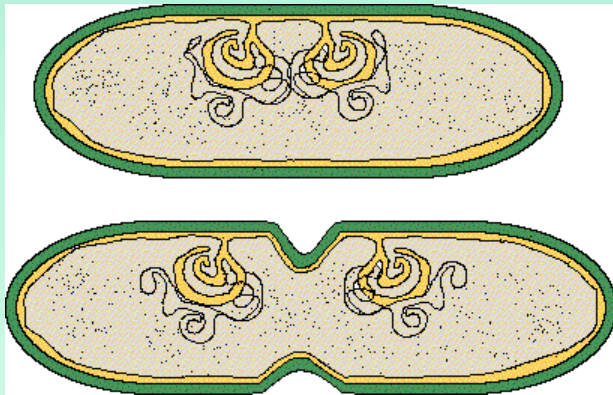


e Eukaryotes



Replikace

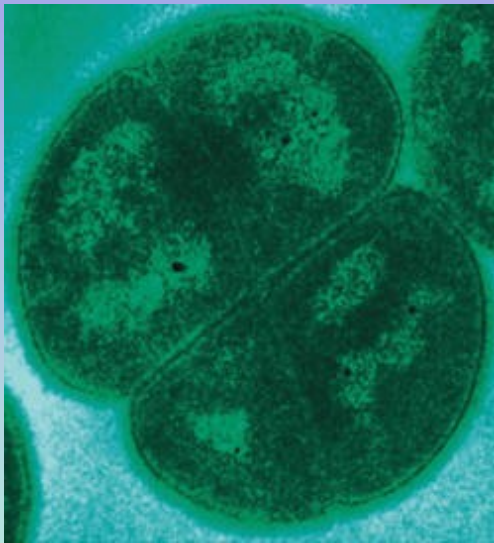
- Replikátor na CM, dva komplexy DNA polymerázy (dvojice) se pohybují od směrem od sebe...
- Prodlužování buňky
- Nová replikace ještě před úplným rozdělením buňky..
- Srov.s buňkou eukaryotickou?
 - mitóza...



Jak bakteriální buňky transportují proteiny a DNA?

- Několik mechanismů transportu
 - proteinových komplexů, vezikulů a NK
- **Prostorově i časově regulováno** – tato všestrannost zabezpečuje morfologickou potažmo fyziologickou diferenciaci v procesu buněčného cyklu!
- Buněčná organizace v buňce:
 - a) statická** – skupina proteinů precizně lokalizovaná, proměny jen na bázi podjednotek (integrální membr.proteiny...)
 - b) proměnlivá** – díky cytoskeletu a pohybu proteinů „diffusion-and-capture“ (Rudner, 2002), síť dynamických interakcí
- Velká úloha **polymerizačních proteinů** – pohyb a lokalizace MML

Zvláštnosti genomu některých bakterií

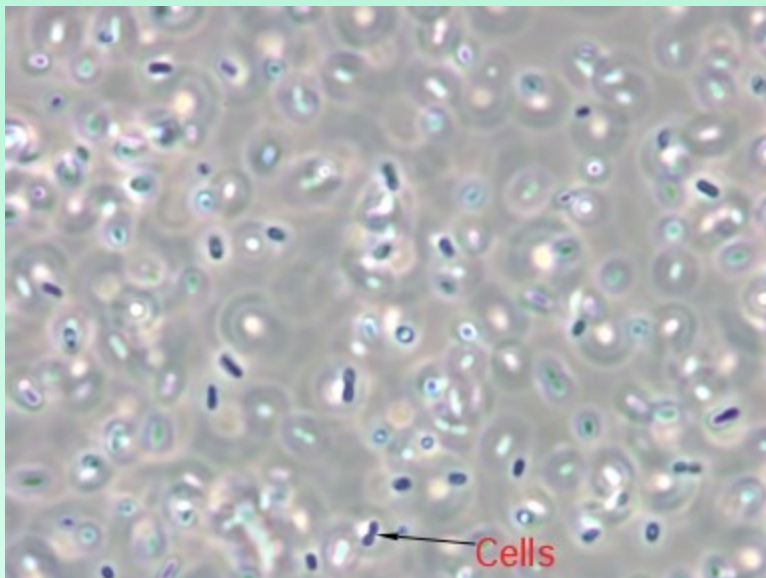


Deinococcus radiodurans

- *Objeven* 1956 (Arthur W. Anderson) – maso po radiaci...
- Přežil radiaci, která je 3000x silnějš než hodnota, která by usmrtila člověka
- Ionizující záření – zlomy obou řetězců NK
- Reparace
- 2 lineární chromozomy, megaplazmid a malý plazmid
- Důvod odolnosti: Tetrády?? Dvojitý genom??

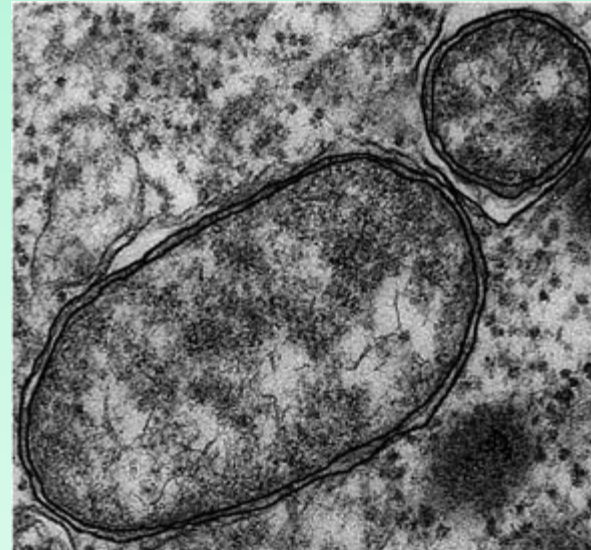
Azotobacter vinelandii

- Schopen fixace dusíku
- Metabolizuje mnoho uhlovodíků, org.kys a alkoholů
- Počet chromozomů závisí na fázi buněčného cyklu
- Exponenciální fáze: 2-4 kopie
- Stacionární fáze – 50-100



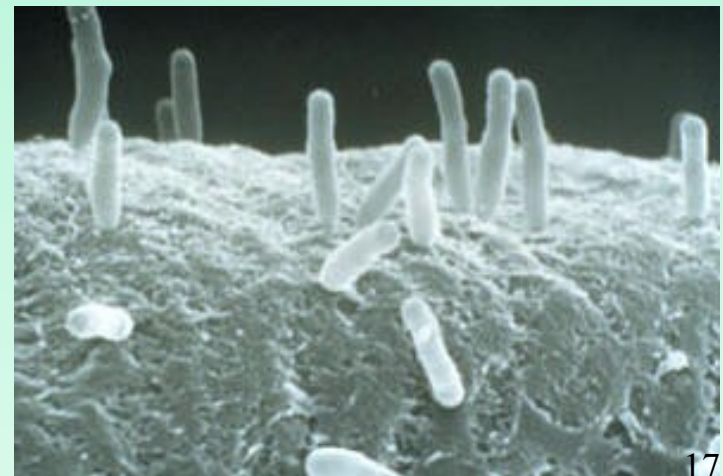
Buchnera spp.

- Vnitrobuněční symbionti mšic (mutualismus)
- velikost genomu – 7x menší než genom *E. coli* !!
- 640 kbp
- Chromozom + 2 plazmidy
- Počet chromozomů však závisí na vývojovém stadiu mšice



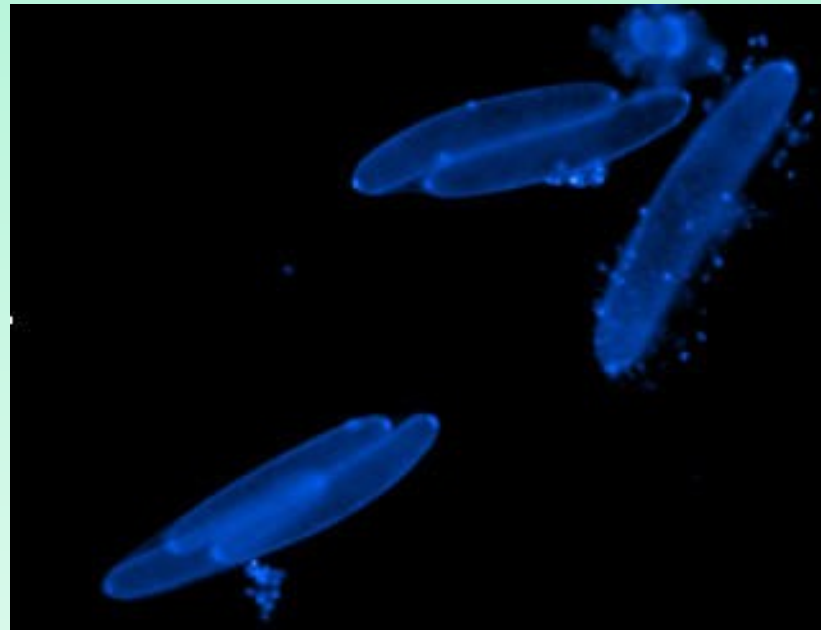
Agrobacterium tumefaciens

- Gramnegativní, pohyblivé
- Nádory rostlin
- Přírodní genetický inženýr transformující svou DNA do buněk rostlin
- 5,7 Mbp
- 1 cirkulární + 1 lineární chromozom a 2 plazmidy
- Tumor Inducing plasmid – zodpovědný za virulenci

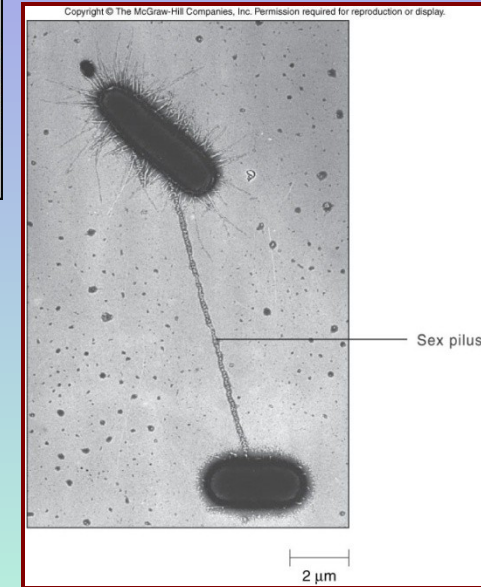
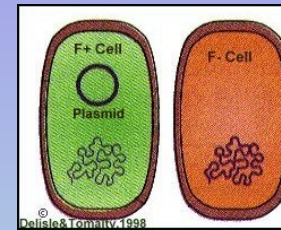


Epulopiscium spp.

- Střevní symbionti rybek *Acanthuridae*.
- Některé buňky delší než 0,5 mm!
- DAPI barvení NK
- real-time PCR –tisíce kopií genomu??
- Adaptace vzhledem k velikosti buněk??



Plazmidy

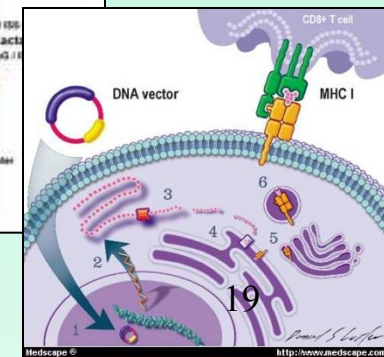
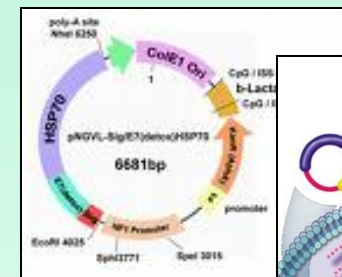


- **Doplňková genet. informace:**
 - F-plazmidy (fertilitní)
 - Rezistence, - ATB, těžké kovy, UV
 - Metabolické dráhy (bioremediace)
 - Přenos konjugací, transformací
 - Bakteriociny (ne- i konjugativní)
 - Kódování faktorů virulence: adheziny, toxiny
hemolyziny, enterotoxiny
 - Ti –tumorindukující plazmidy
 - Kryptické, fazmidy, kosmidy

- **5-10% informace genomu**

- **Genetické inženýrství – vektory**

- 100x menší než nukleoid



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)

Ribozom

- Přítomnost antibiotik v prostředí?
- Okamžik buněčného cyklu?
- Hladovění buněk – degradace ribozomů...

Zdroje

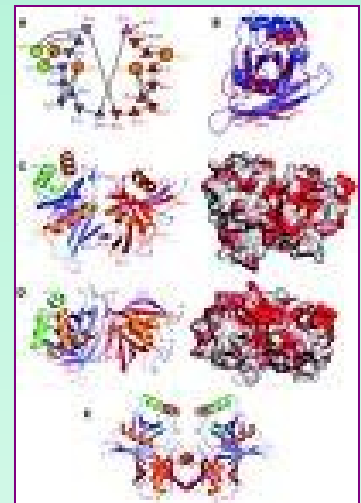
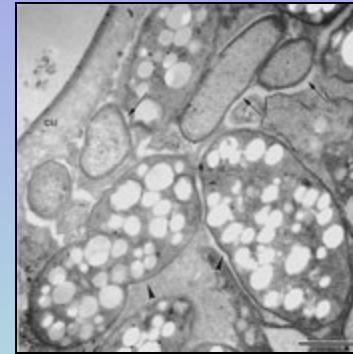
- http://canalbq.spb.pt/docs/CanalBQ_0009-18-26.pdf
- focosi.immunesig.org/physiobacteria.html
- www.bact.wisc.edu/
- <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaeamm.html>
- H Heller, M Schaefer, & K Schulten, *Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid-crystal phases*, J. Phys. Chem. 97:8343-60, 1993
- <http://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-genomes>
- <http://pbil.univ-lyon1.fr/R/pdf/bgs.pdf>
- <http://www.tigr.org>
- <http://www.jgi.doe.gov>
- <http://www.ornl.gov>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Inkluze

- Zásobní látky
- Produkty metabolismu
- uložené nepotřebné látky

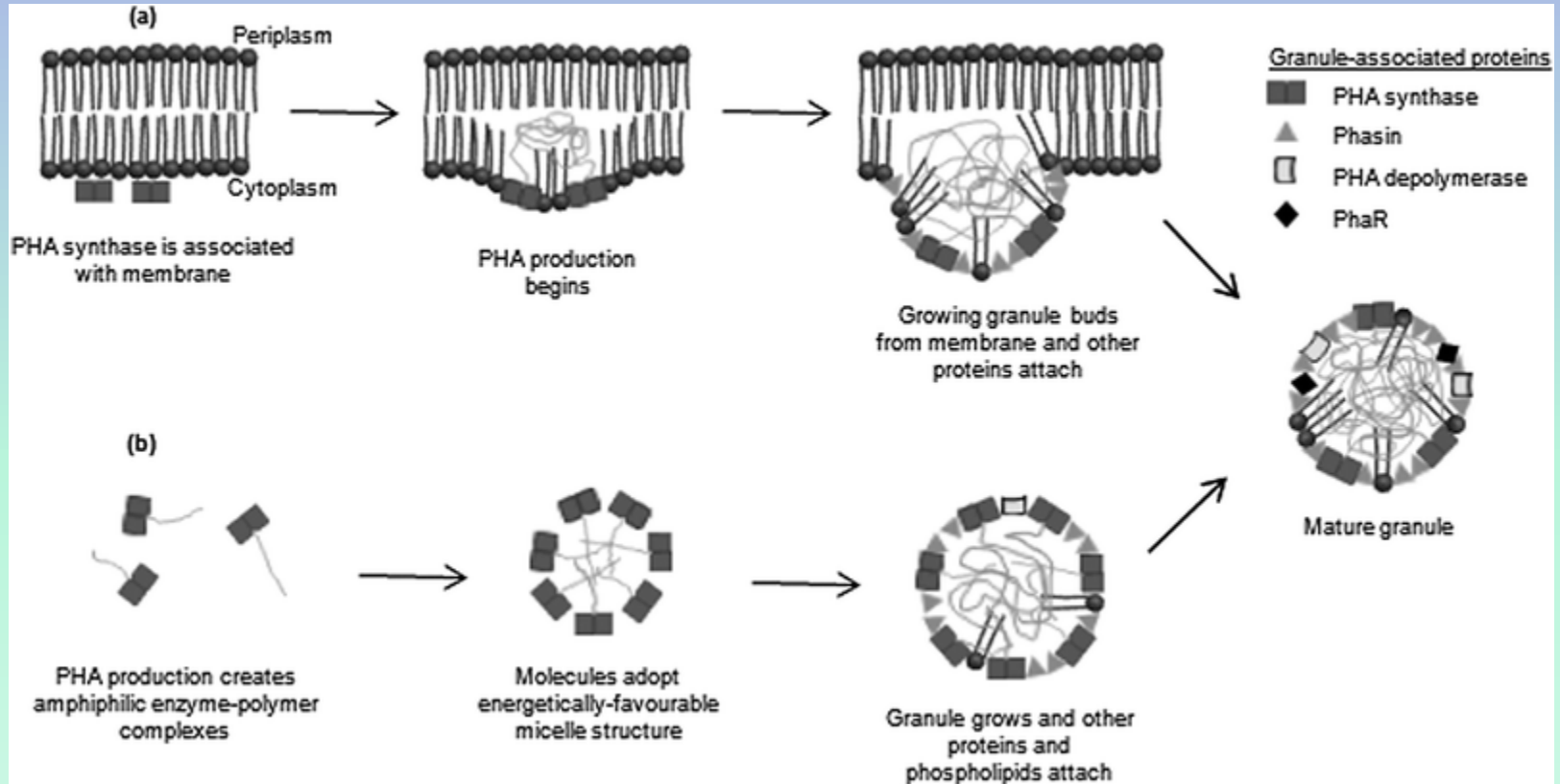
- Bez membrány nebo s membránou
----- **není dvojvrstvou fosfolipidů.**

Membrána jednovrstevná



fenaziny

Př: 2 modely formování inkluzí PHA

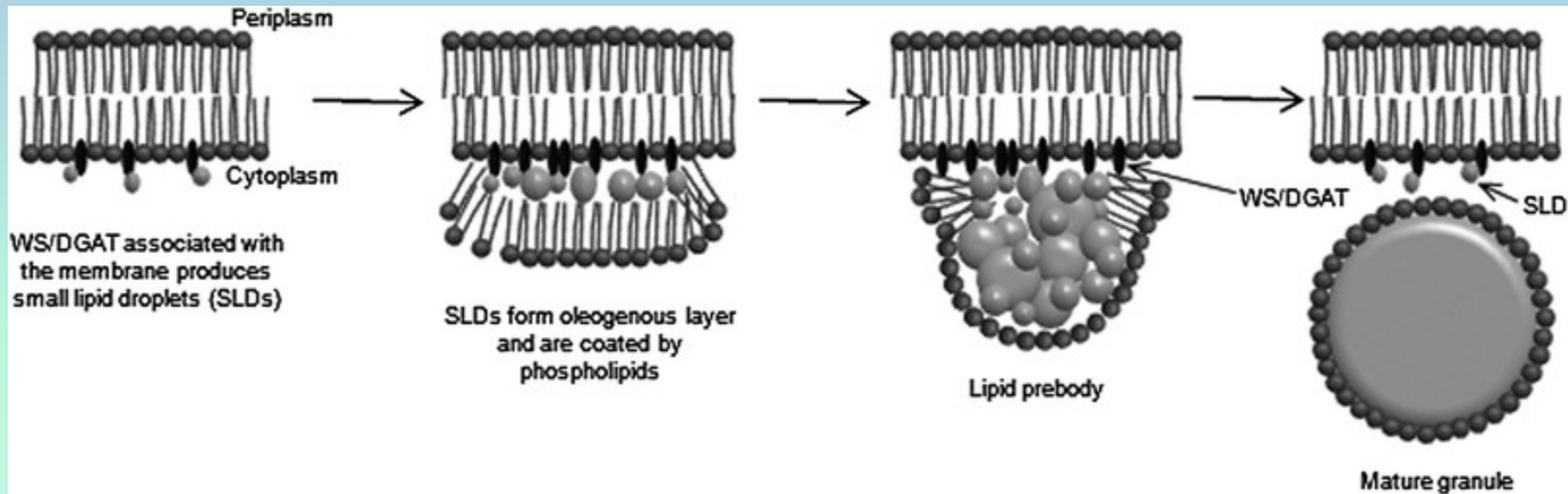


amphiphilic properties of the synthase-polymer complex cause aggregation of growing polymer chains. These aggregations grow with continued polymerisation, and begin to take the form of a spherical micelle/nanoparticle

The two proposed mechanisms for PHA granule production. (a) The budding model, in which early PHA synthesis is associated with the cytoplasmic side of the membrane. (b) The micelle model, in which PHA synthase is initially dispersed within the cytoplasm.

Př: Syntéza triacylglycerolu a vznik inkluze

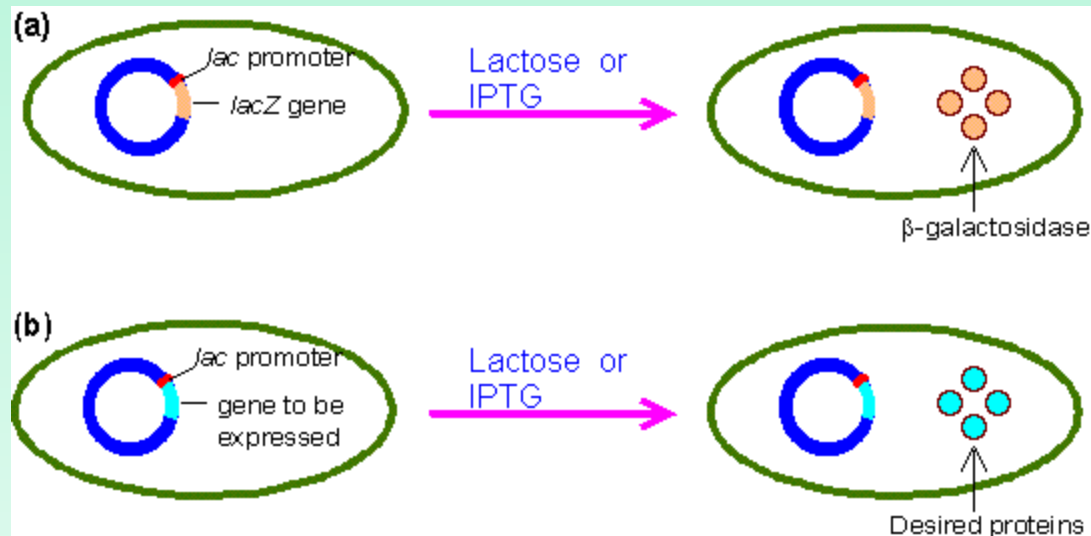
Mycobacterium, Rhodococcus, Nocardia a Streptomyces



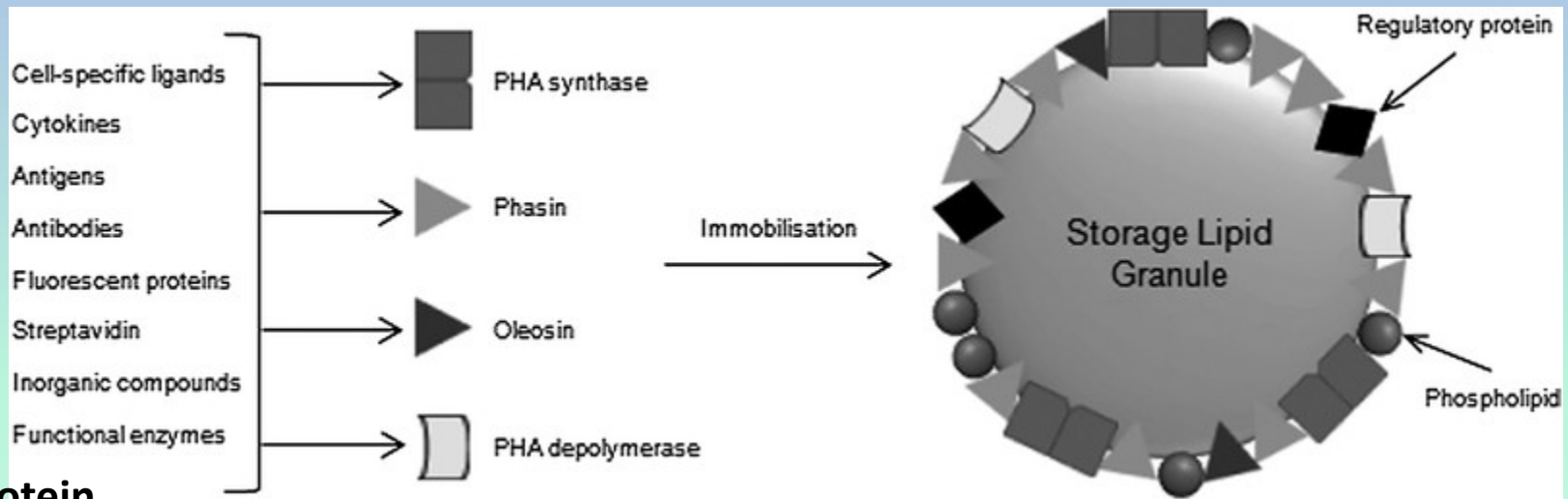
The mechanism of TAG and WE formation in bacteria. The key enzyme, WS/DGAT, remains in the cytoplasmic side of the cell membrane throughout the process, in contrast to PHA synthase, which becomes incorporated in the boundary layer of the granule.

Funkce a podoba

- V cytoplazmě v podobě granul nebo kapének
- Svým charakteristickým vzhledem uvnitř buněk **napomáhají identifikaci**
- **Produkcce rekombinantních proteinů „zabalení“ a stabilizace proteinů nahromadění**

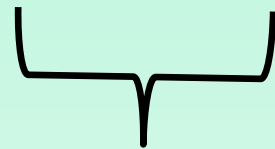


Imobilizace molekul v inkluzích



protein
of interest

granule-associated
proteins



fusion protein

Following growth in conditions suitable for
PHA synthesis...

- Rozvoj využití inkluzí jako **katalyzátorů v průmyslu a biotechnologiích „surové inkluze“**

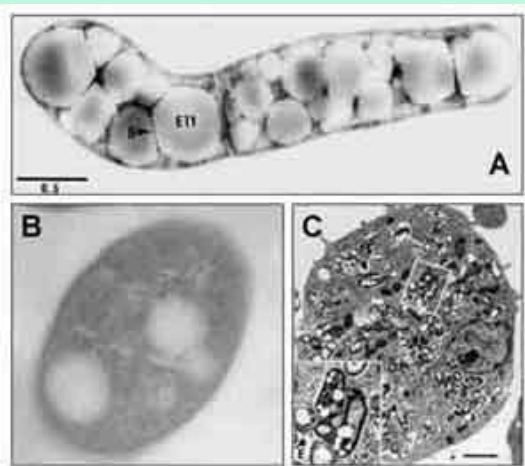
- **Aktivita enzymů je v nich vysoká!**

- Inkluze jsou **snadno odstranitelné**

- **Výhoda:**

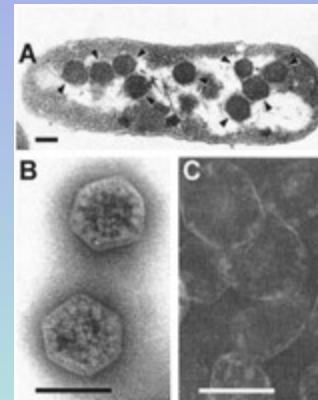
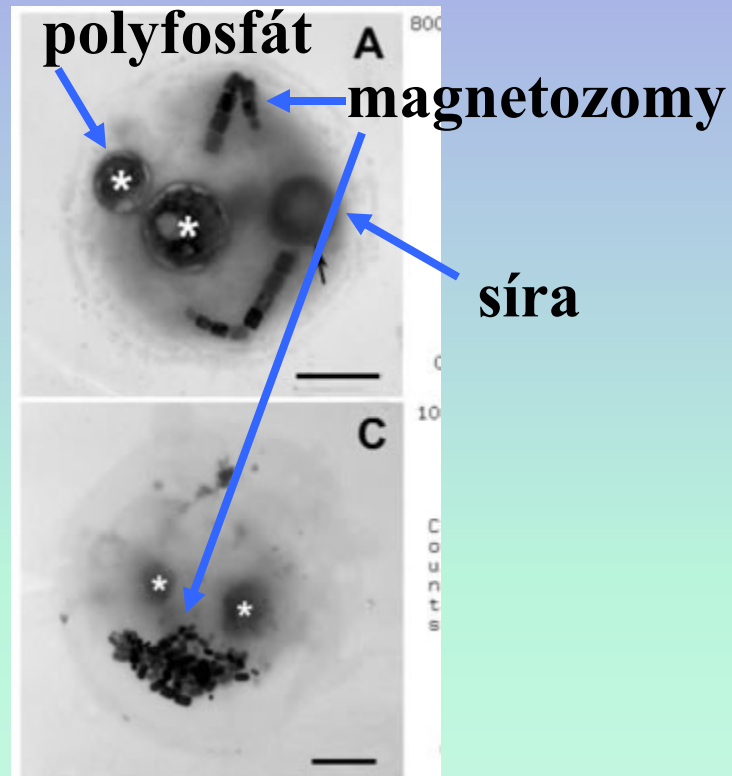
- vysoký obsah proteinů

- možnost agregace i rekombinantních proteinů (enzymů) bez jejich inaktivace



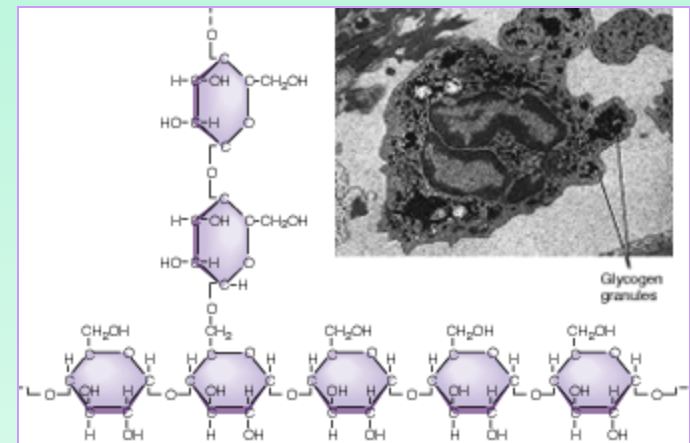
a) obdané membránou – 1 vrstva fosfolipidů (až na plyn.vakuoly)





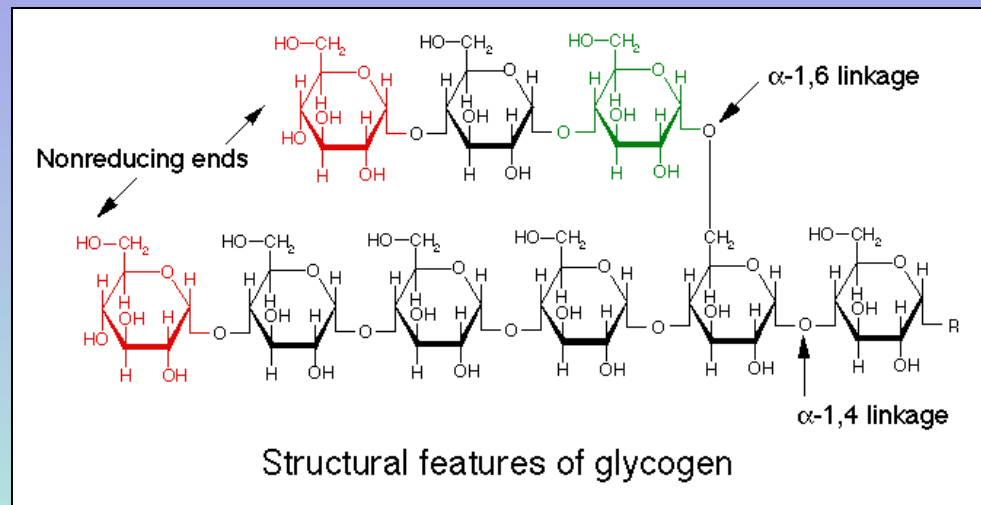
polyhedral carboxysomes
from *H. neapolitanus*,
Měřítko: 100nm

Kok z Itaipu Lagoon,
Brazílie

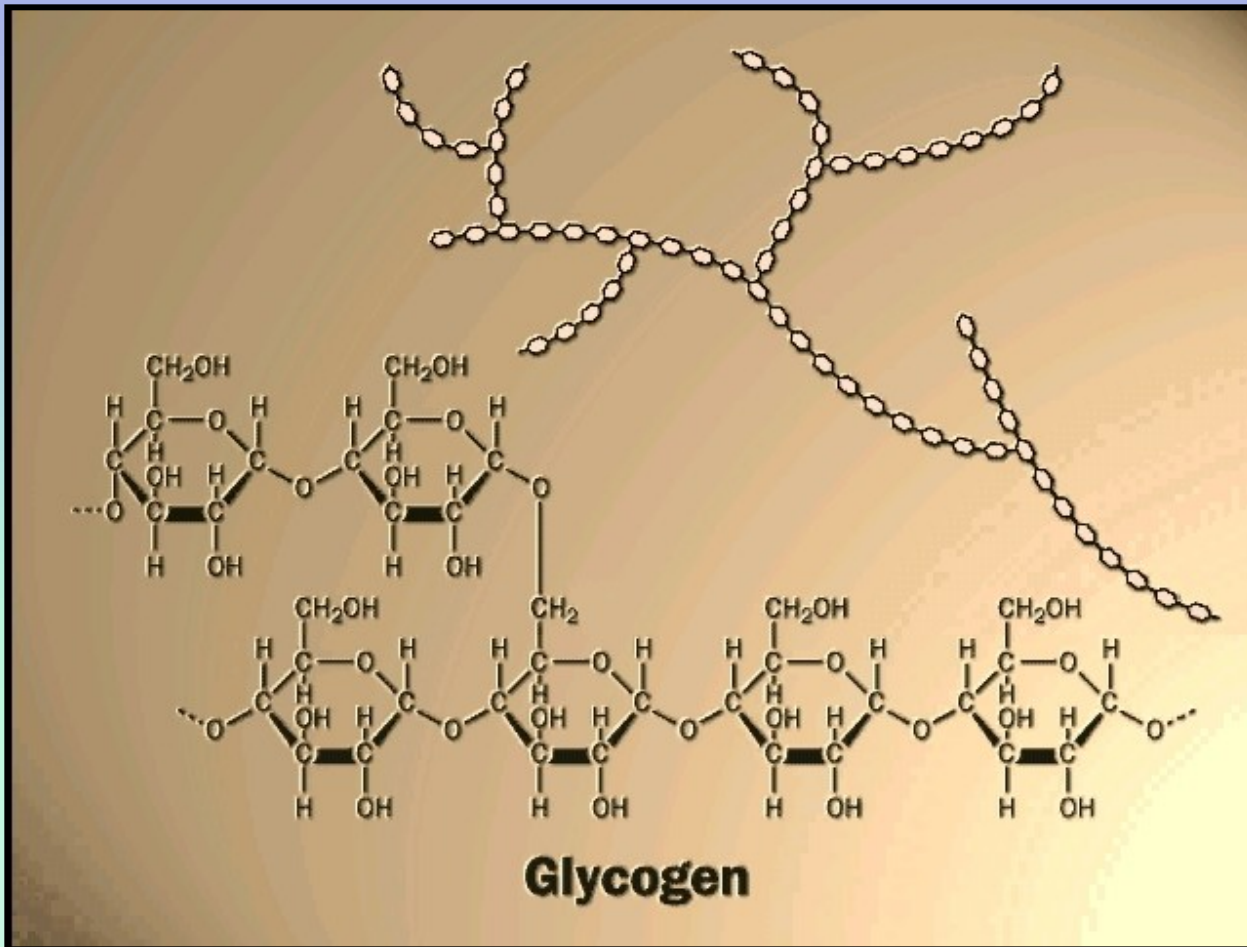


glykogen

Glykogen

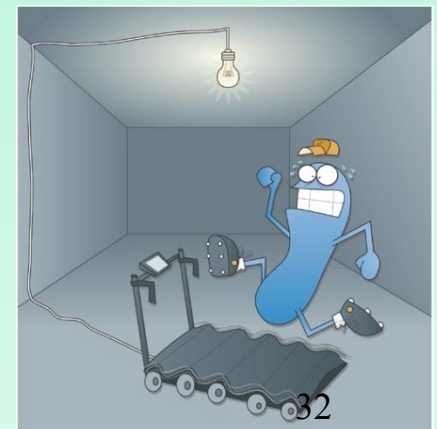


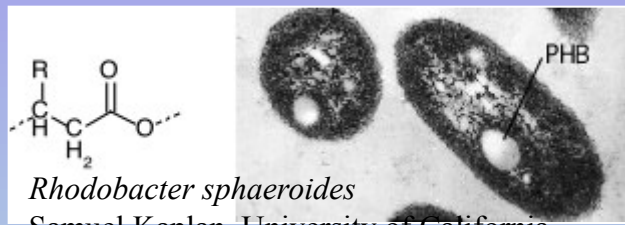
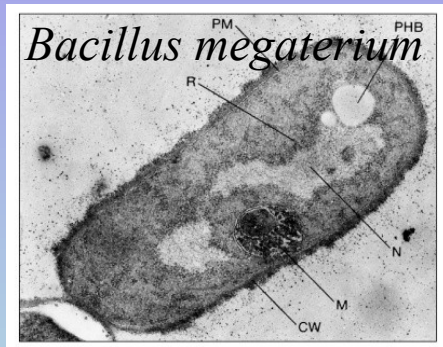
- membránový 160 – 300 nm, až 50 % sušiny
- počet 1-10
- rozpustný polymer glukózy
- α -1,4 **vazby** a α -1,6 **větvení** na každém 8-10tém monomeru
- **Může a nemusí** mít membránu
- Ve světelném mikroskopu **není viditelný:**
Barvení Lugolovým roztokem



**Nachází se
především v
buňkách bacilů
a enterobakterií!**

**Bakteriální glykogen je silně větvený.
Slouží jako pohotová rezerva.**

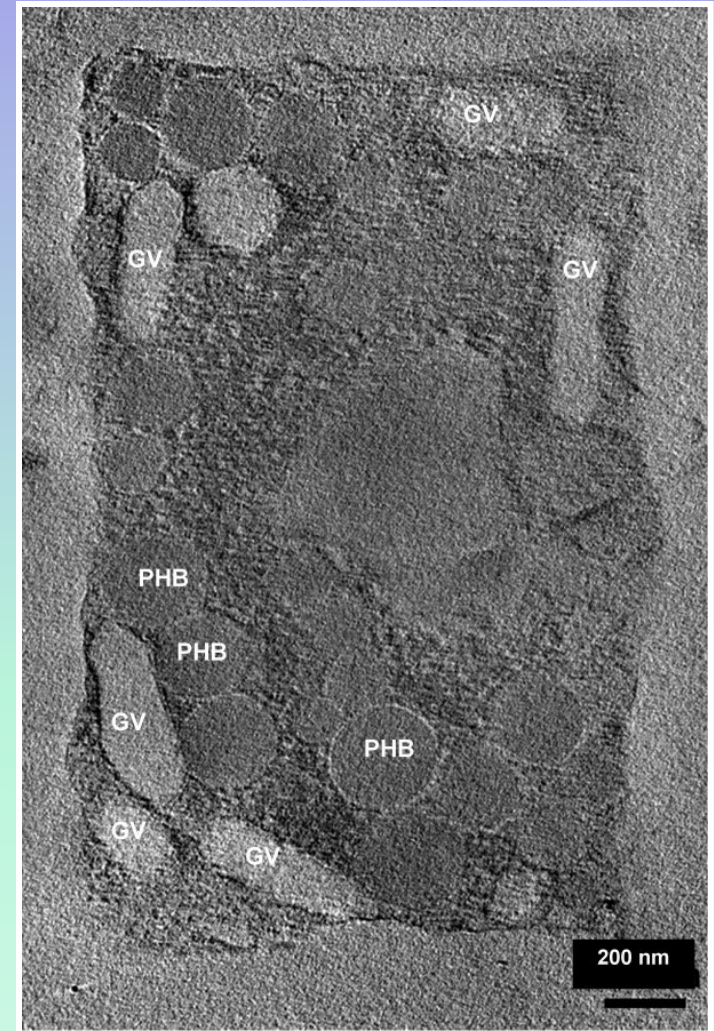




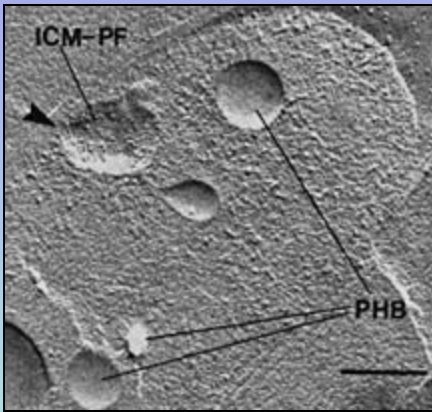
Rhodobacter sphaeroides
Samuel Kaplan, University of California-San Diego

PHB

- kyselina polyhydroxymásečná
- až 60% sušiny
- **viditelná** ve světelném mikroskopu
- Je to odpadní produkt

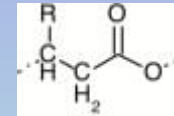


- Vyskytuje se u **aerobů**: *Bacillus*, *Pseudomonas*

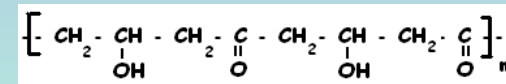


Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB)
in a *Rhodospirillum* species.

PHB is one type of PHA. →



Je neutrální



PHB a glykogen

jsou

osmoticky a iontově **neaktivní**,

vyskytují se v buňce při **nadbytku** zdrojů uhlíku a
nedostatku zdrojů dusíku.

Síra

- viditelné kapénky

amorfní síry

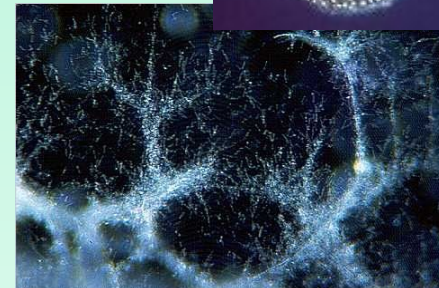
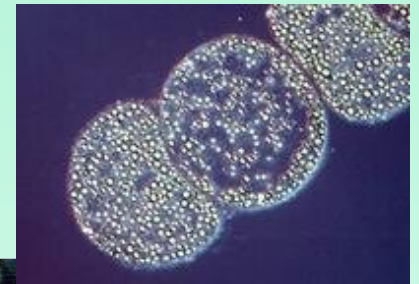
chemolitotrofní

sírné bakterie

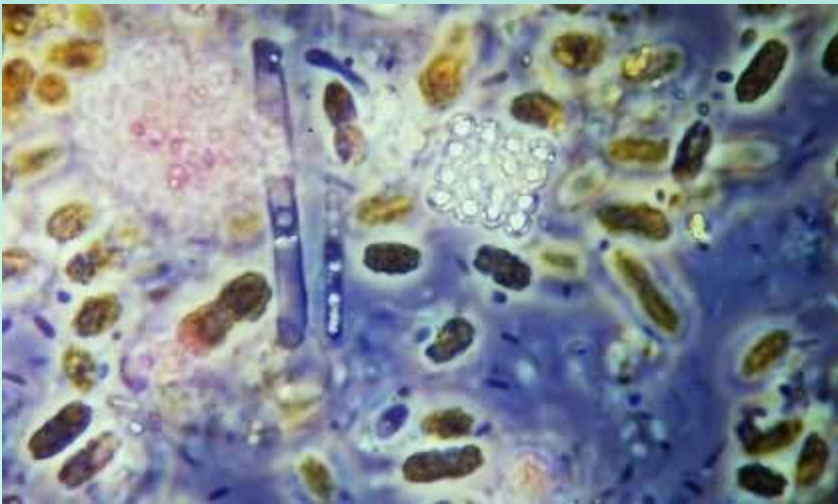
oxidace redukovaných sírných sloučenin

je tedy pro ně **zdrojem energie**.

- Oxidace sirovodíku primárně poskytuje elementární síru
- síra je následně oxidována na sulfát



- Dále u fototrofních sirných bakterií
 - zelených a purpurových
- není zdrojem energie, ale zdrojem elektronů v procesu fotosyntézy.



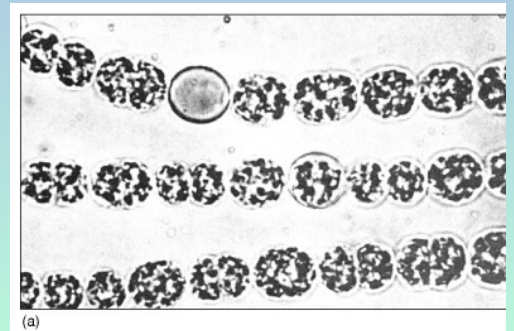


Plynové vakuoly



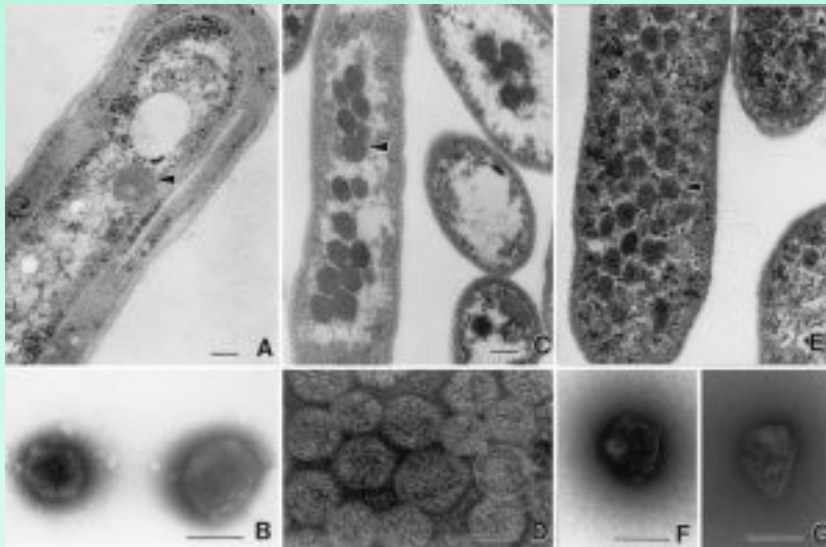
cylindrické aerosomy (45 – 200 nm)

- **sinice a planktonní bakterie**
- (cca u 50ti rodů bakterií;
- purpurové a zelené sirmé a halofilní *Archea*)
- plyny vznikající při metabolismu
- u archeí **napomáhají pohybu** ve vodě
- množství plynu závisí na **teplotě a viskozitě**
- Membrána z **jedné vrstvy bílkovin**



Karboxizómy

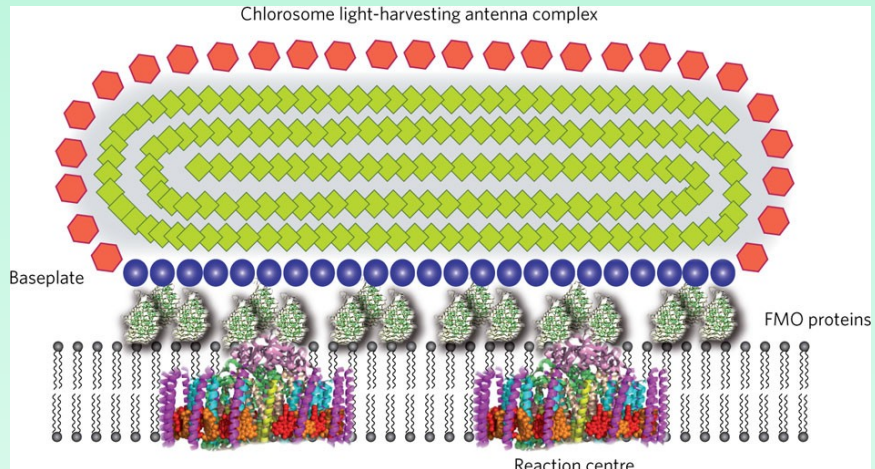
- protáhlé polyhedrické cisterny
- usnadňující fixaci CO₂
- syntéza hexóz
- za vhodných podmínek je vyšší počet (1-10)
- nedělí se



A) *Synechococcus* carboxysome
B) The same but negatively stained
C) *H. neapolitanus* carboxysome
D) Negative stain of *H. neapolitanus* carboxysome, you can even see RuBisCO assemblies inside

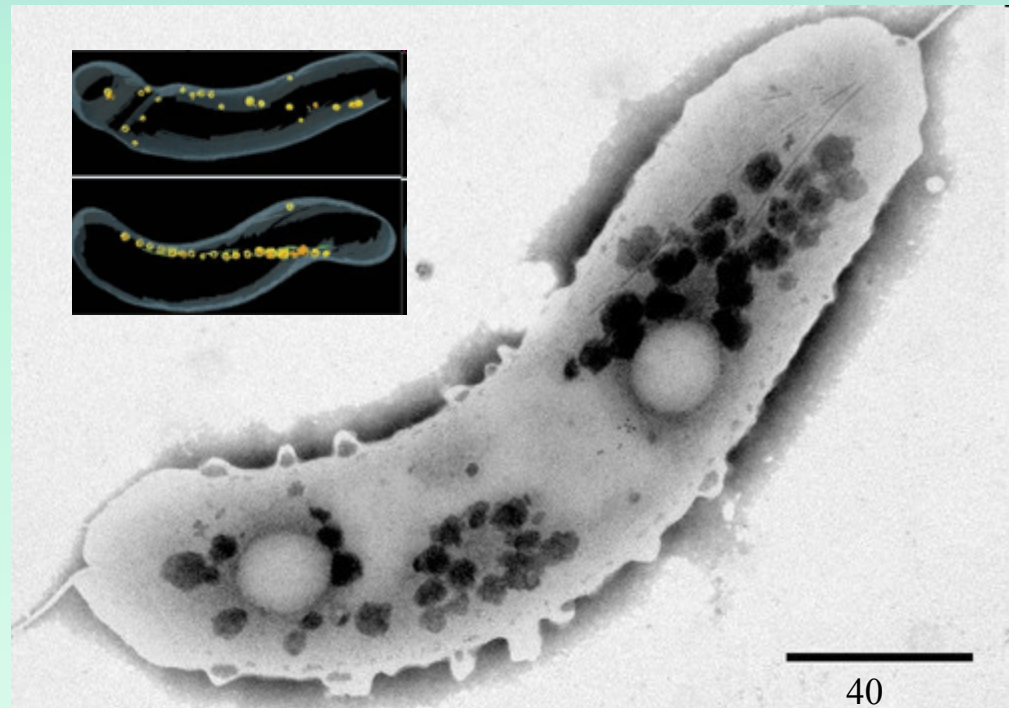
Chlorobiové váčky

- Jen **zásobárny pigmentů** – bakteriochlorofyl a karotenoidy
- Nikoli reakce a vazba světla
- Přenášeny do chromatoforů, kde vlastní fotosyntéza
- Počet: 2-10



Magnetosomy

- krystaly oxidu železnato – železitého (Fe_3O_4) orientace v magnetickém poli = magnetotaxe
- vodní organizmy citlivé ke kyslíku
- obaleny speciální membránou umožňující precipitaci Fe_3O_4



b) bez membrány

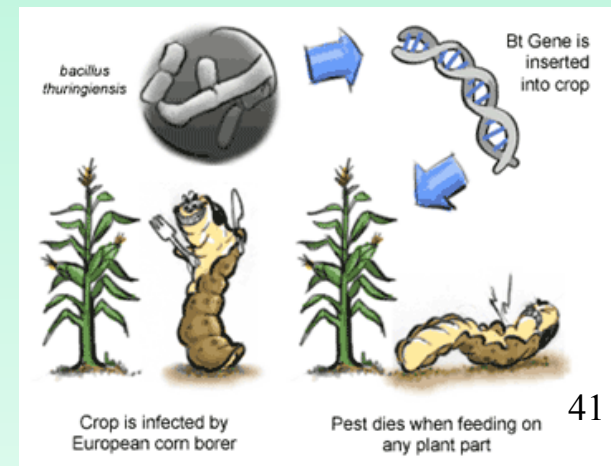
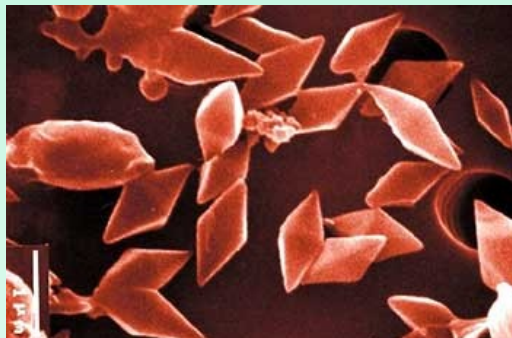
Glykogenová granula – 20 – 100 nm, jedna buňka je může mít pouze s nebo bez membrány, **v rámci rodu lze obojí zároveň.**

Krystaly

Parasporální inkluze = bílkovina vznikající při sporulaci.

- Zbytkový materiál nespotřebovaný při vzniku spor.

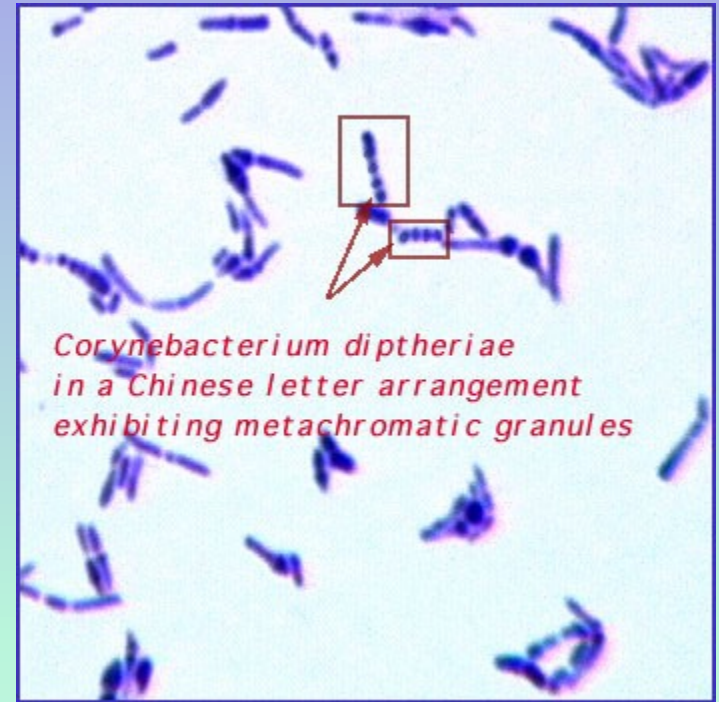
Bioinsekticidy – *Bacillus thuringiensis* – na moučné červy, i selektivní působení (až na druhy)



Polyfosfátová granula

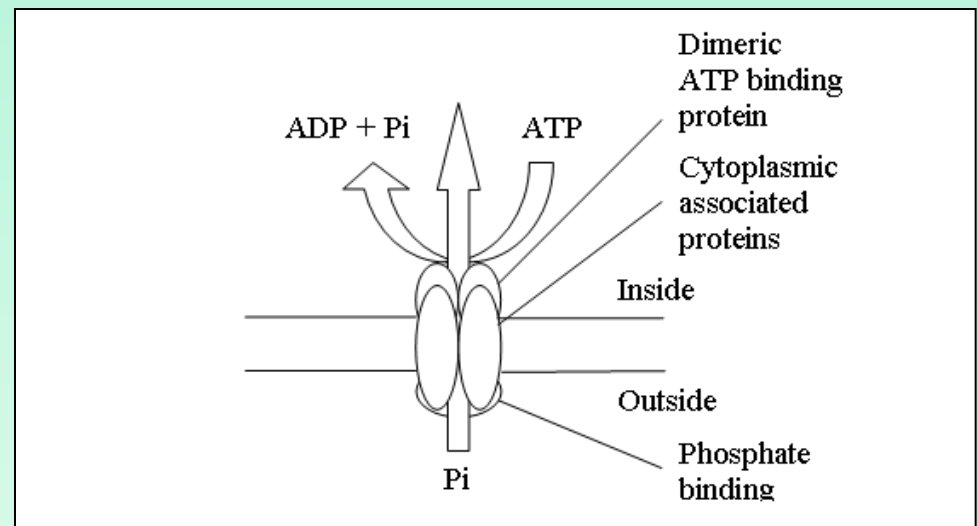
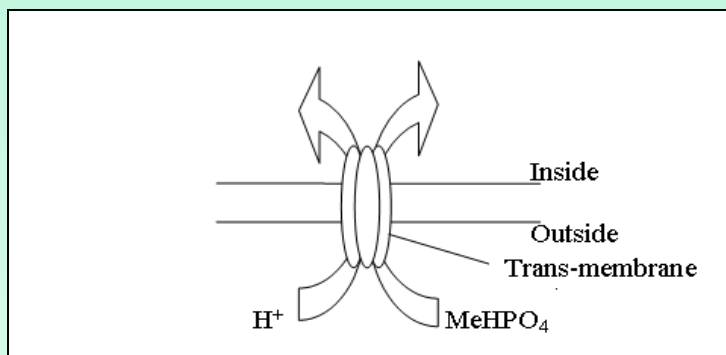
= **volutin** - při nadbytku ATP

- Akumulace z jakého důvodu??
- Je dobře viditelný pod mikroskopem
- Až 500 molekul, nerozpustný ve vodě
- **Nikdy není zdrojem energie**
- Počet: 1 – mnoho, podle metabolismu.
- Vysoký počet je v době před přechodem do klidového stadia
- Slouží jako:
 - rezervoár fosforu, alternativní zdroj P (namísto ATP) při fosforylaci cukrů při jejich katabolismu, chelatační činidlo divalentních iontů, jako pufr při alkalickém stresu a jako regulátor při odpovědích na stres



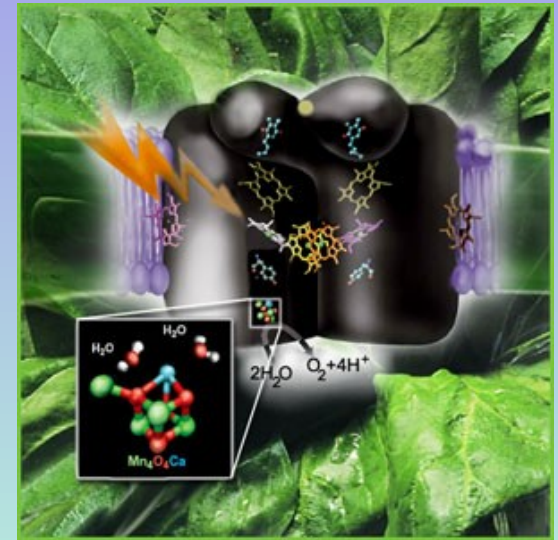
- Transport fosfátu do buňky se děje hlavně těmito dvěma mechanismy:
 - a) nespecifický transport
 - b) specifický přenašeč s vysokou afinitou pro fosfát: prim. transport H_2PO_4^- a HPO_4^{2-}
Komplex polyP vzniká za silné energetické dotace při nadbytku ATP

Vazba vyžaduje ATP





Pigmenty



- Produkty primárního i sekundár. metabolismu. Produkovány v závislosti na stanovišti
- Pokud jsou produktem primárního metabolismu – jsou bezpodmínečné potřeby (bakteriochlorofyl, karotenoidy)
- Využívají se při **metabolismu** nebo mají **protektivní účinek** či jiný ekologický význam (**inhibiční účinky**)
- Protektivní účinek – absorbuje světlo o určité vlnové délce, jsou syntetizovány až v rámci **sekundárního metabolismu**.

Př: absorpce UV záření, pufrý při ničení kyslíkatých radikálů – to je důležité např. u patogenů: fagocyty na ně nemohou toliko působit např. peroxidem vodíku!

Př: **karotenoidy *Streptococcus B*** – závažný původce pneumonií a meningitid u novorozenců;

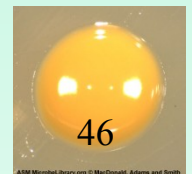
zlatý karotenoid *Staphylococcus aureus* opět brání proti oxidačním reakcím imunitního systému) či má jiný ekologický význam (inhibiční antibiotické účinky exopigmentů)



- Buňka může produkovat endo- (protektivní) i exopigmenty různých barev
- Řada pigmentů vzniká nadprodukcí látek.

Př: kolonie Azotobacteria na manitolové půdě po týdnu zčernají (zprostředka) – na základě nadprodukce tryptofanu

- Lokalizace (podle své úlohy): v cytoplazmě, v CM u fototrofů, v periplazmatickém prostoru, (v buněčné stěně u kvasinek), jako exopigmenty – ekologický význam (inhibiční agens, ATB).



Nejčastěji vyskytující se pigmenty:

- **karotenoidy – endopigmenty u většiny buněk**
- bakteriochlorofyly a,b,c,d – **anaerobní prostředí**
- prodigiozin – extracelulární, **mikrobicidní účinek** – bakterie a plísně
- Fenaziny– extracelulární, sek. metab., mikrobicidní účinek – bakterie a plísně (*Erwinia*)
- Melaniny – hnědé, černé, tmavě červené - v **závislosti na době kultivace**
- Anthokyany – sek.metab., barva **závisí na pH**
- Př: *Micrococcus flavocianus* – žlutý endopigment a fialový exopigment. Na MPA jen žlutý endop. Na glukozókvasničním agaru – oba pigmenty

pH prostředí? Kultivační medium? Stáří kultury?
Endopigment? Exopigment?
Mikrobicidní? Protektivní?

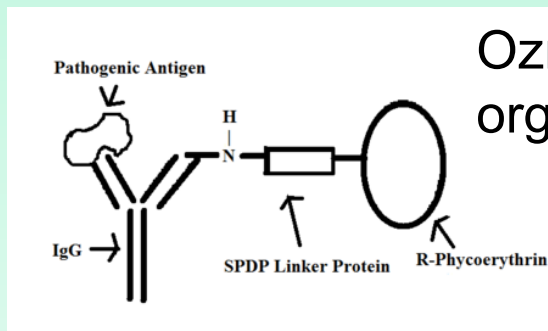
Úprava a využití bakteriálních pigmentů

- Potravinové doplňky – karoteny - retina, antioxidanty (melanin)
- Barviva v potravinářství
- A jako přírodní barviva textilií – akrylová vlákna, hedvábí, bavlna (vydrží míň), PE (míň), ...
 - většina syntetických barviv obtížně degradovatelná a toxická! (obsah karcinogenních dioxinů☹)

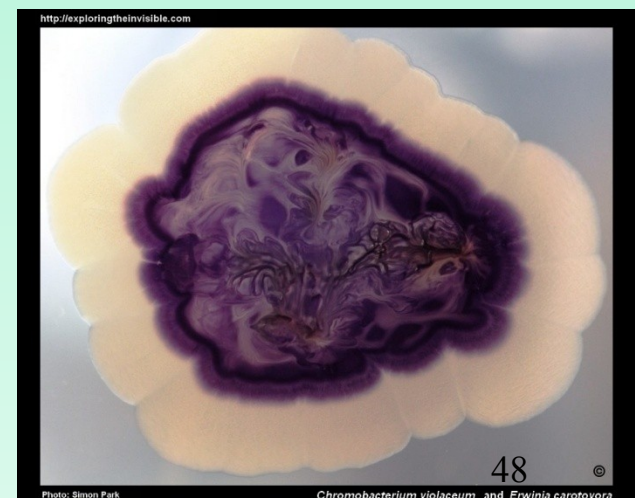
Testy toxicity!

Př: žlutooranžové, červené a růžové pigmenty *Chryseobacterium sp.*, *Serratia marcescens*, and *Chromobacterium violaceum*

- Některé pigmenty fluoreskují – značení Ab



Označení patogenního organismu



Struktury vně buňky

- **Kapsuly – mikro a makro**

- dobře organizované, rigidní, AMK nebo cukry

Bacillus – kyselina glutamová

Bacillus anthracis – poly-D-glutamová

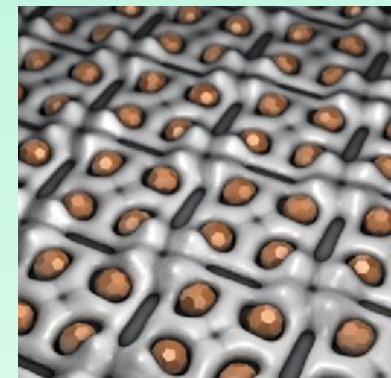
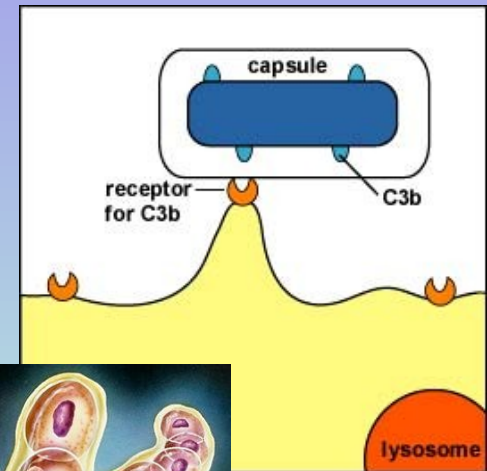
- **Slizy** - polysacharidy

- lépe odstranitelné, difúzní, neorganizované

Glykokalyx = kapsuly a slizy

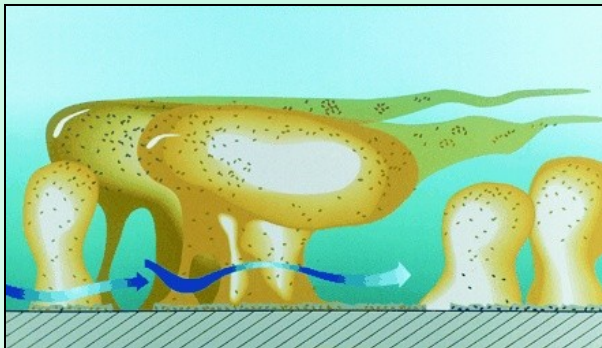
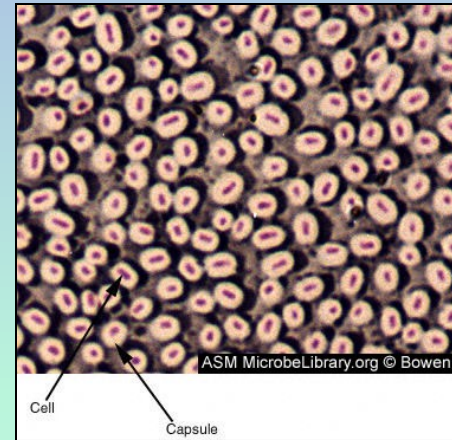
- **S – vrstvy**

- pravidelně organizované proteiny a GP



Struktury vně buněčné stěny

- ochrana před fagocytózou
- před protilátkami
- před vysycháním
- před detergenty
- vazba na povrch předmětů, tvorba biofilmu

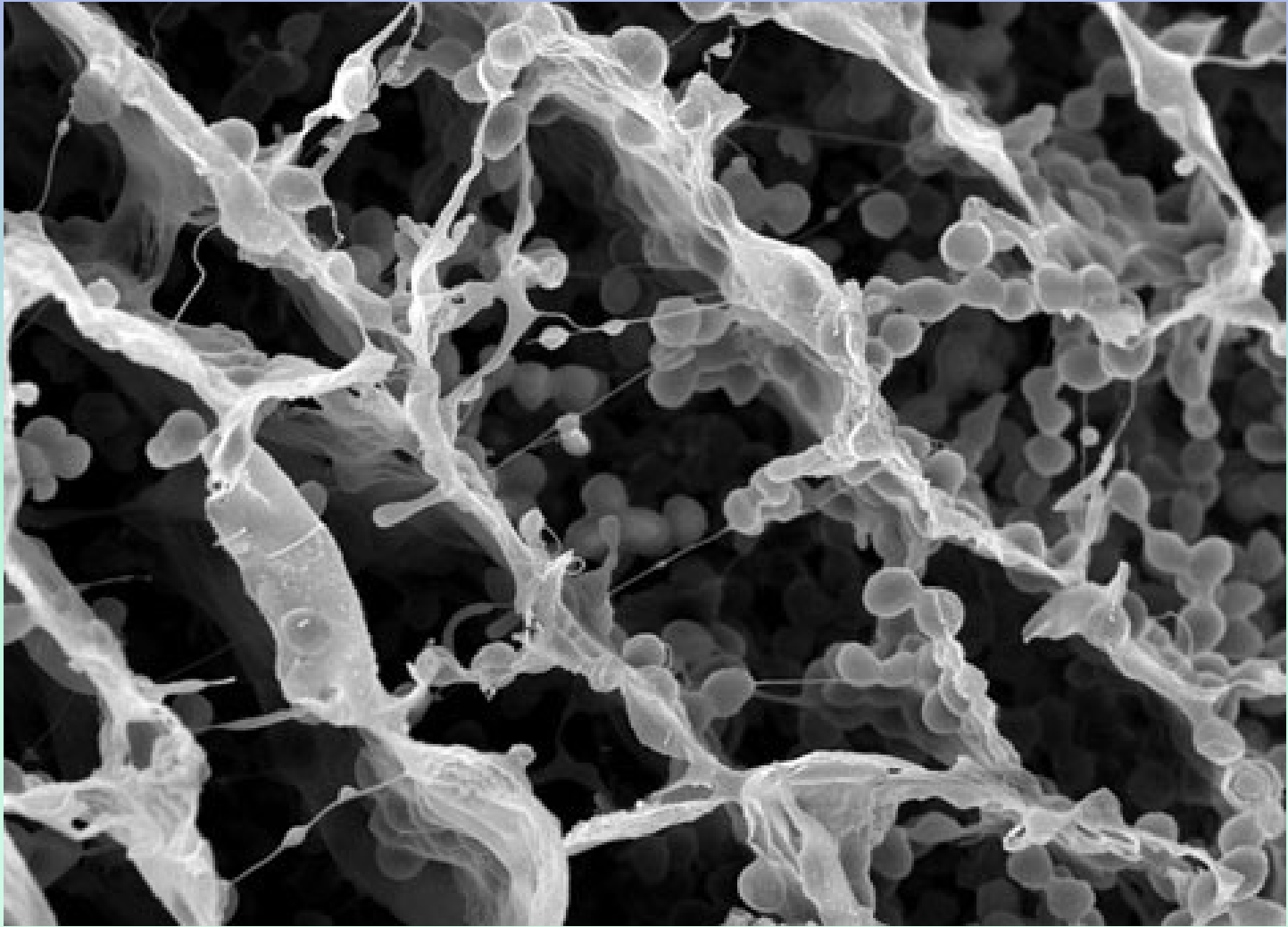


Biofilm structure cartoon

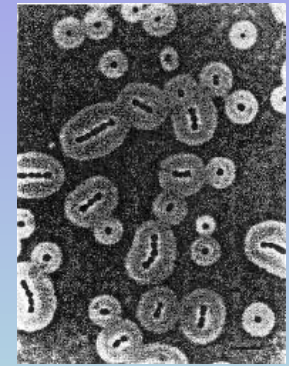


Glykokalyx

- netvoří se v laboratorních podmínkách za dostatku živin
= síťovina z vláken polysacharidů a glykoproteinů
- umožňuje **adherenci**, která je málo až vysoce specifická
- Kationty umožňují spojení stejně nabitých buněk a povrchů



Pouzdro = kapsula

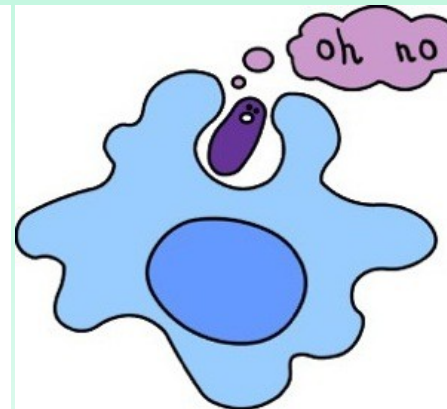
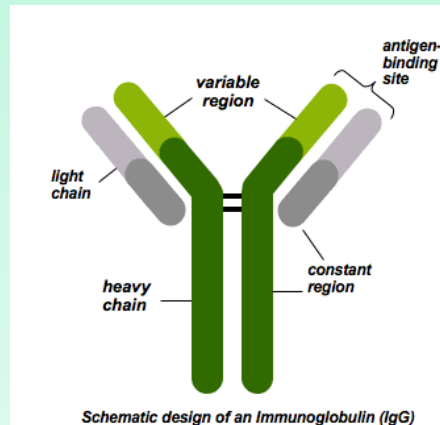


- zřetelně odděluje buňku
- vrstva dobře organizovaného materiálu, který nelze snadno odmyt z buněčného povrchu

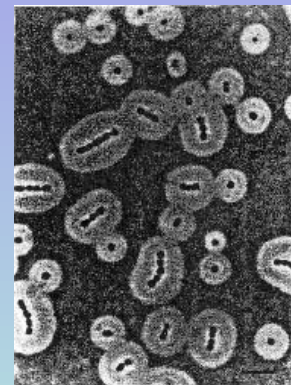
- má antigenní vlastnosti

- formy S, M a R

- Funkce???

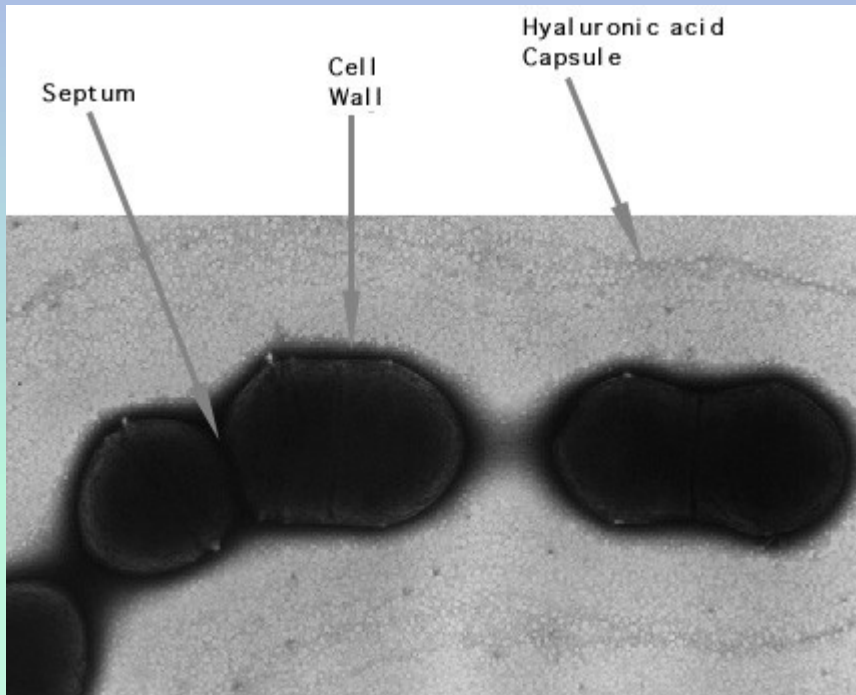


Pouzdro = kapsula



- u téměř všech zástupců *Enterobacteriaceae*
- zřetelně odděluje buňku
- má **antigenní vlastnosti**, znemožňuje detekovat somatický antigen. Charakteristické pro virulentní kmeny. Míra virulence: formy S, M a R
- působí proti fágům, protilátkám a fagocytóze, jako **ochranná vrstva** proti vlivům prostředí a proti první vlně imunitní odpovědi
- je to vrstva dobře organizovaného materiálu, který nelze snadno odmyt z buněčného povrchu

Kapsula - virulence



Jeden druh až **60 druhů**
kapsulových antigenů



Negativní barvení - *Streptococcus pyogenes*
TEM (28,000X).
Kapsula – kys. hyalurnová- PS

Bacillus anthracis
poly-D-glutamát

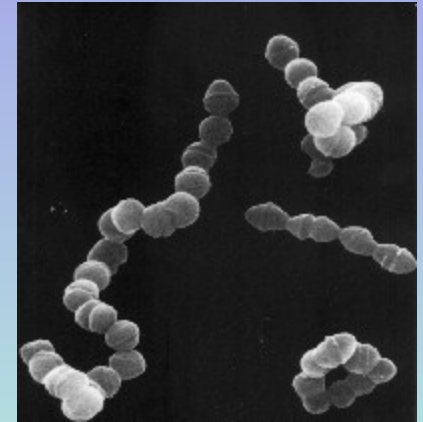
Tvorba pouzdra ovlivněna
složením media, prostředím⁵⁵

Mikrokapsula – do 0,2 nm

- syntetizována **stále**
- překrývá antigen buněčné stěny a má své vlastní antigenní vlastnosti
- Bílkoviny, lipidy a polysacharidy
- **Není to bariéra** proti průniku živin
- Průkaz – pouze **serologicky**
- Důkaz u vitální buňky: barvením tuku, terčíky v mikrokapsule, ale barveny i tukové kapénky v buňce.

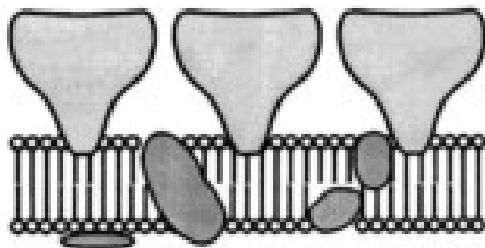
Makrokapsula

- složena z polysacharidů, bílkovin nebo celulózy
- minimálně **2x silnější než buňka**
- **velikost není** geneticky kódována
- Průkaz prostý: **téměř jednotné složení**
- *Streptococcus* – polysacharid
- *Bacillus anthracis* – bílkovinná složka kyseliny poly-D-glutamové
- *Bacillus* – k. glutamová

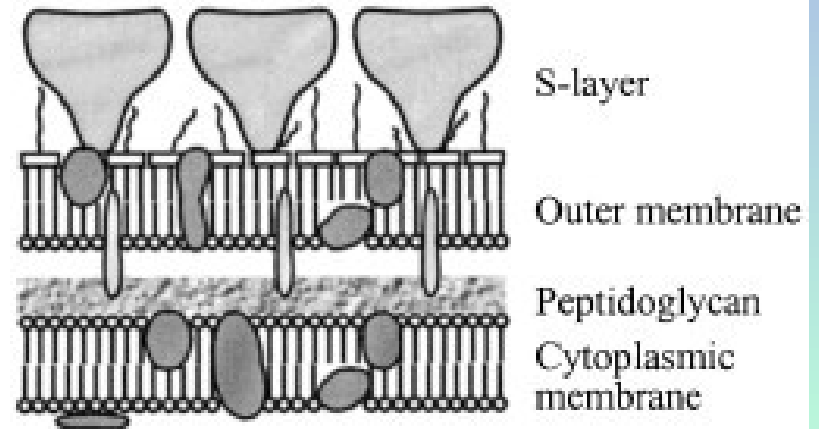


*Streptococcus
Pneumoniae* -

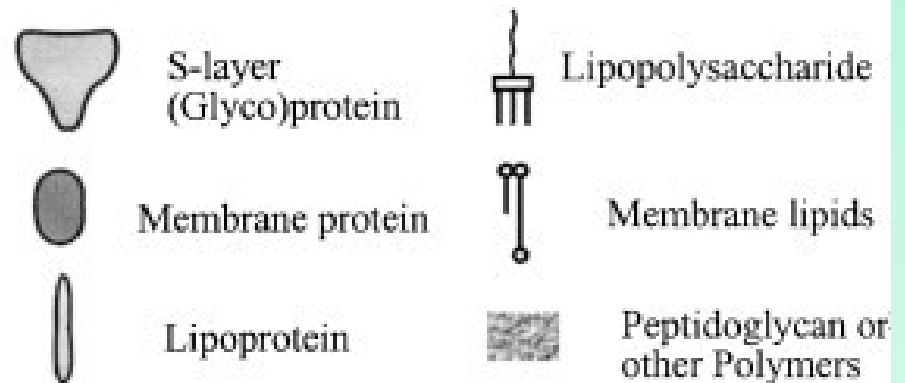
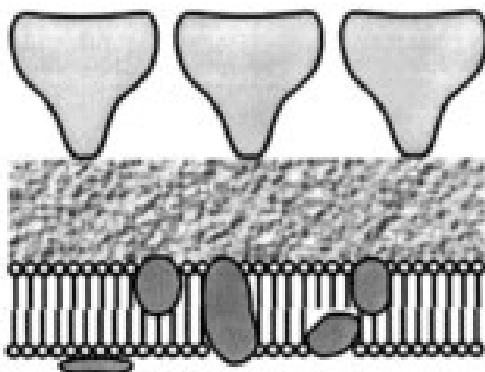
a) Gram-negative Archaea



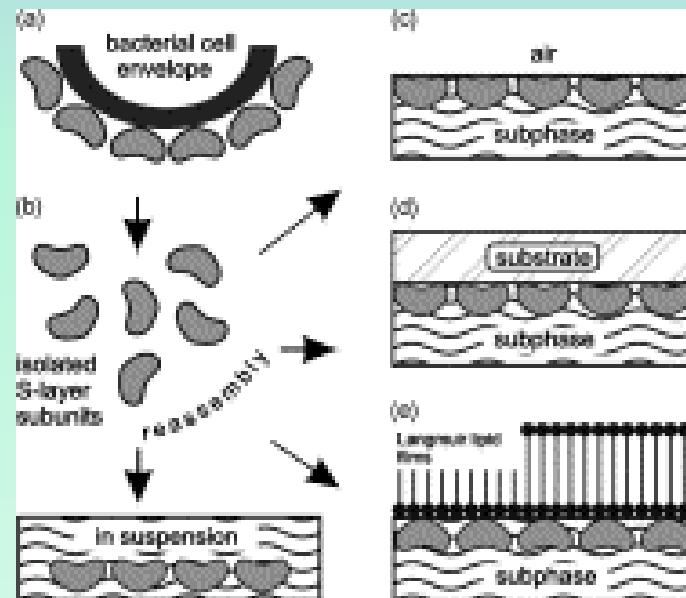
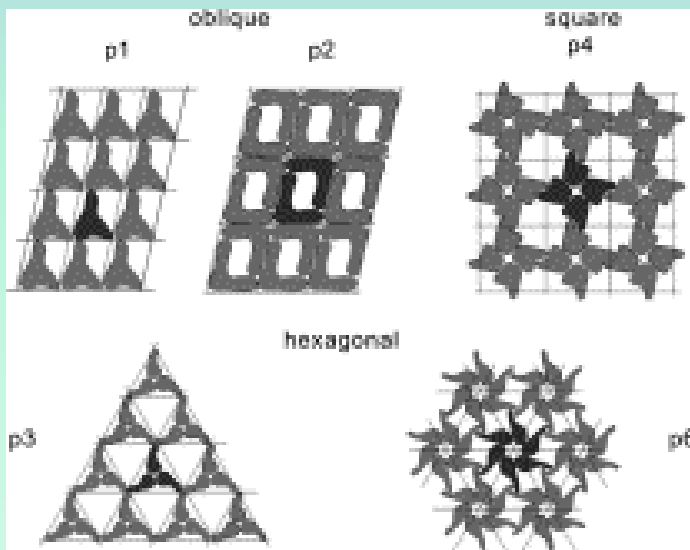
c) Gram-negative Bacteria



b) Gram-positive Archaea and Bacteria

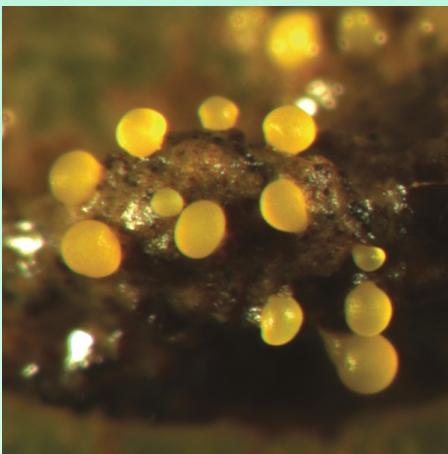


- **S-vrstva** - jeden druh **bílkoviny**
 - druhově specifické
 - **monovrstva**
 - **pravidelně organizovaná**



Sliz

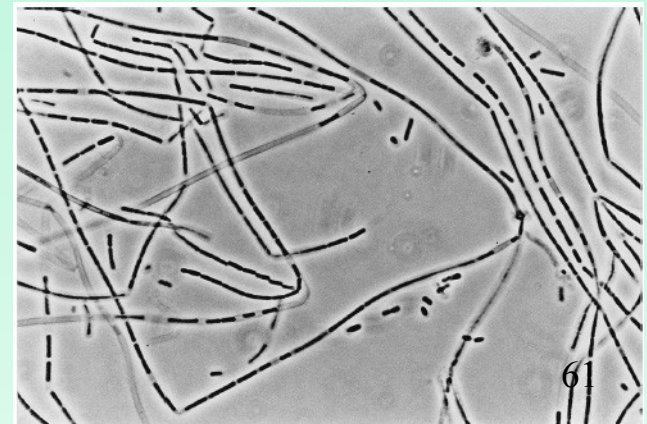
- **Sliz** – řídký **difúzní neorganizovaný** materiál
 - spojuje více buněk, **snadno odstranitelný**, nejčastěji **polysacharid**
 - může sloužit k pohybu ve vlhkém prostředí.

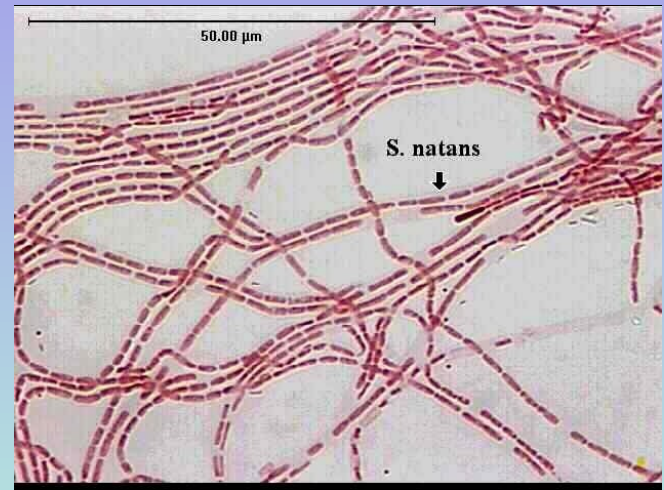


Pochvy

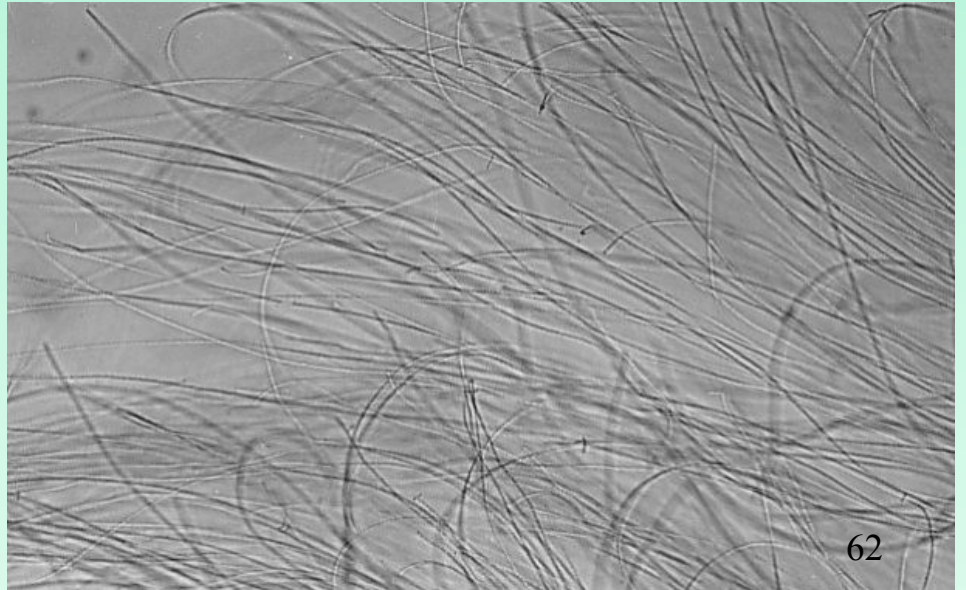
- geneticky kódované
- výhradně z PS
- chemické složení a zbarvení druhově specifické
- **glukóza + kyselina glukuronová** (*Sphaerotilus*) u jiných rodů např. fukóza
- Někdy **hydroxidy kovů** – v malém množství
(zbarvení; Fe, Mn, Cu; závisí na druhu)
- Př: *Sphaerotilus*, *Leptothrix*

- Přisedlé MO
- Trubkovitý tvar
- Až několik mikrometrů
- Pohyb





Sphaerotilus natans

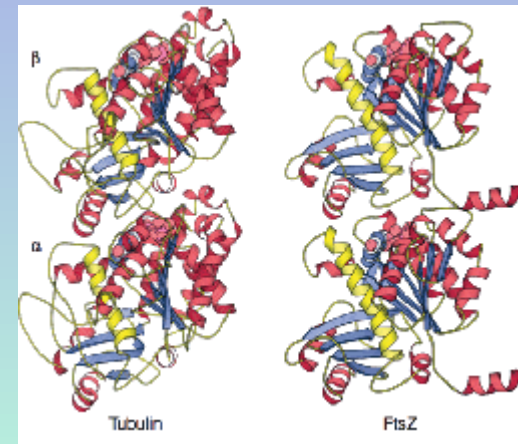


Bakteriální cytoskelet

- vláknité proteiny



tvar buňky
polarita



buněčné dělení a segregace chromozomů a plazmidů

- jsou analogické cytoskeletárním strukturám eukaryotní buňky
(**3D** strukturou, **biochemickými vlastnostmi**)

- [Michie KA](#), [Löwe J.](#) (2006): Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. Annu Rev Biochem.;75:467-92
- Yu-Ling Shih and Lawrence Rothfield (2006): The Bacterial Cytoskeleton. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 729-754, Vol. 70, No. 3

Bakteriální cytoskelet

- souvislost s buněčným dělením

- porovnání s eukaryoty – meióza, mitóza!!
- Bakterie – dělení buněk...
- Rozdíl iniciace morfologických změn:
 - tyčinkovité buňky – klasika + variace (*Caulobacter*)
 - kokovité buňky!!!
- Uspořádání **prstence FtsZ** – rodina proteinů FtsZ = **divizom**
 - téměř všechna prokaryota
 - výjimky:
 - mutace FtsZ proteinů
- FtsZ může být cílové místo pro ATB!!
- Elongace buňky – tyčinky – multiple locations FtsZ kruhu; koky – ze středu
 - autolyziny – hydrolýza beta 1,4 glykosid.v., díry zaplněny přídatným mat.
 - nutná regulace – jinak programovaná buněčná smrt!!!

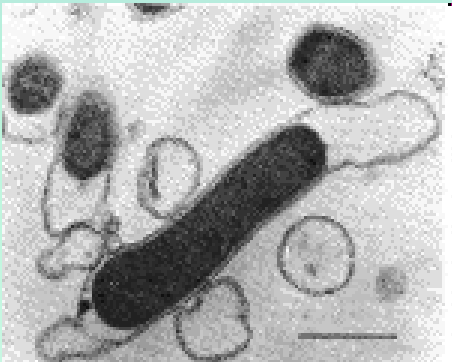
Původ bakteriálního aktinového cytoskeletu

- **analog tubulinu = FtsZ** - prodluž. buňky, protein buněčného dělení (filamentous-temperature sensitive protein Z)
 - jen strukt. podobnost (20% N-konec, nikoli C- konec)
 - vyžadován pro start časně syntézy PG vedoucí k tvorbě mezivrstev
reguluje tedy prodlužování buňky
 - u druhu *Bacillus subtilis* (a u více rodů) objeven **analog aktinu = MreB** - determinace tvaru buňky, prodl.stélky
 - kokovité buňky - chybí homology MreB genů; výjimky...
 - crescentin...
- distribuce MreB genů v říši *Bacteria* ukazují, že nesférické buňky vlastní jeden nebo více těchto genů
- Elektronová krytomografie

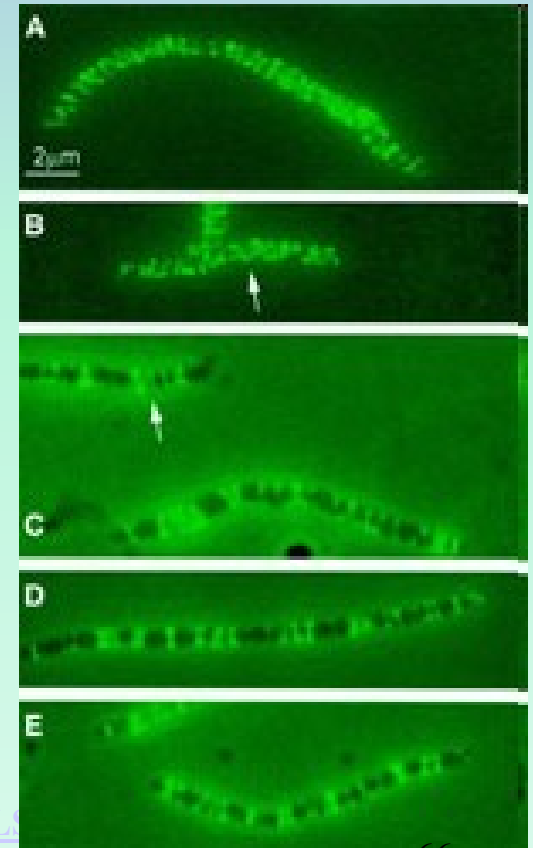
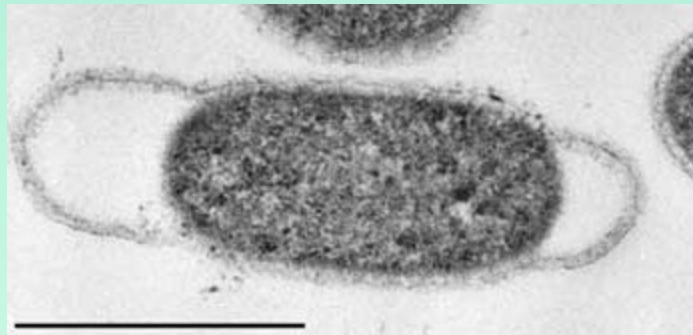
- zkoumána podobnost

krystalická struktura proteinu **MreB** (*T. maritima*) vs. eukaryotický aktin

- pomocí MAD (multiple anomalous dispersion), RTG, EM
- strukturálně jsou si podobné, i svou orientací
- 2 shod. podjednotky **jako u aktinu**



Thermotoga maritima



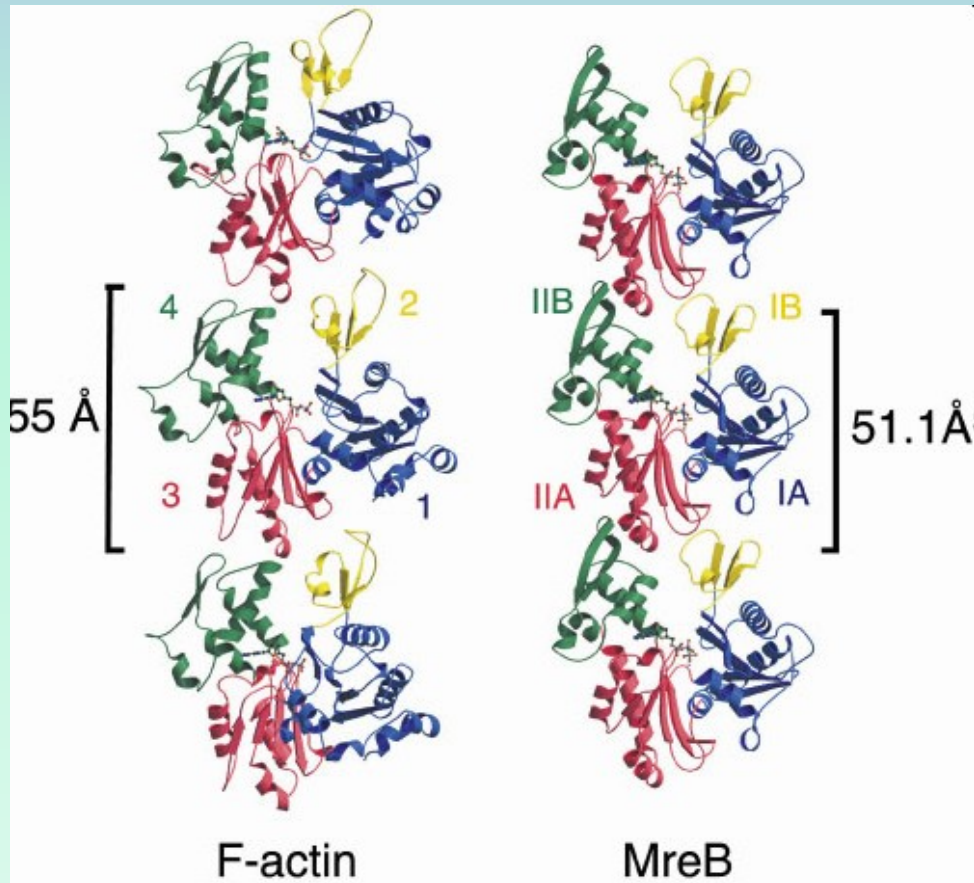
•F. van den Ent, L.A. Amos a J. Löwe (2007): Bacterial Origin of the Actin Cytoskeleton. MRC-Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (UK)

•<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2001/life-sciences/L>

•<http://www.nature.com/emboj/journal/v22/n19/full/7595414a.html>

•<http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Thermotogales.htm>

- markantní rozdíl mezi polymery MreB a F-aktinem:
 - eukaryotní aktin tvořen 2 protofilamenty jemně **propletenými** do helikálního vlákna
 - bakteriální „aktin“ sestává z páru **rovných protofilament**



Srovnání protofilament
F-aktinu a proteinu MreB.



- další proteiny s vlastnostmi aktinu:

ParM (*E. coli*)

MamK (*Magnetospirillum magneticum*)

- podobnost intermediárním filamentům **crescentin** – (*Caulobacter crescentus*).

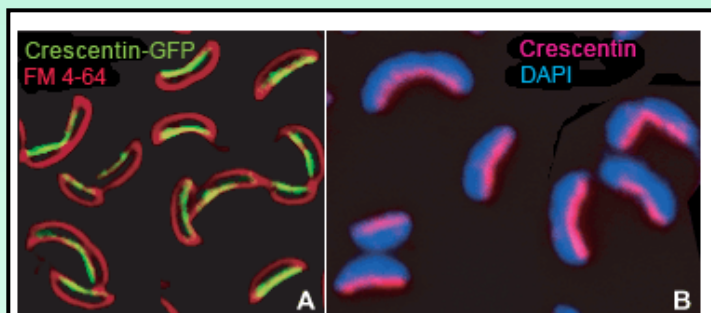
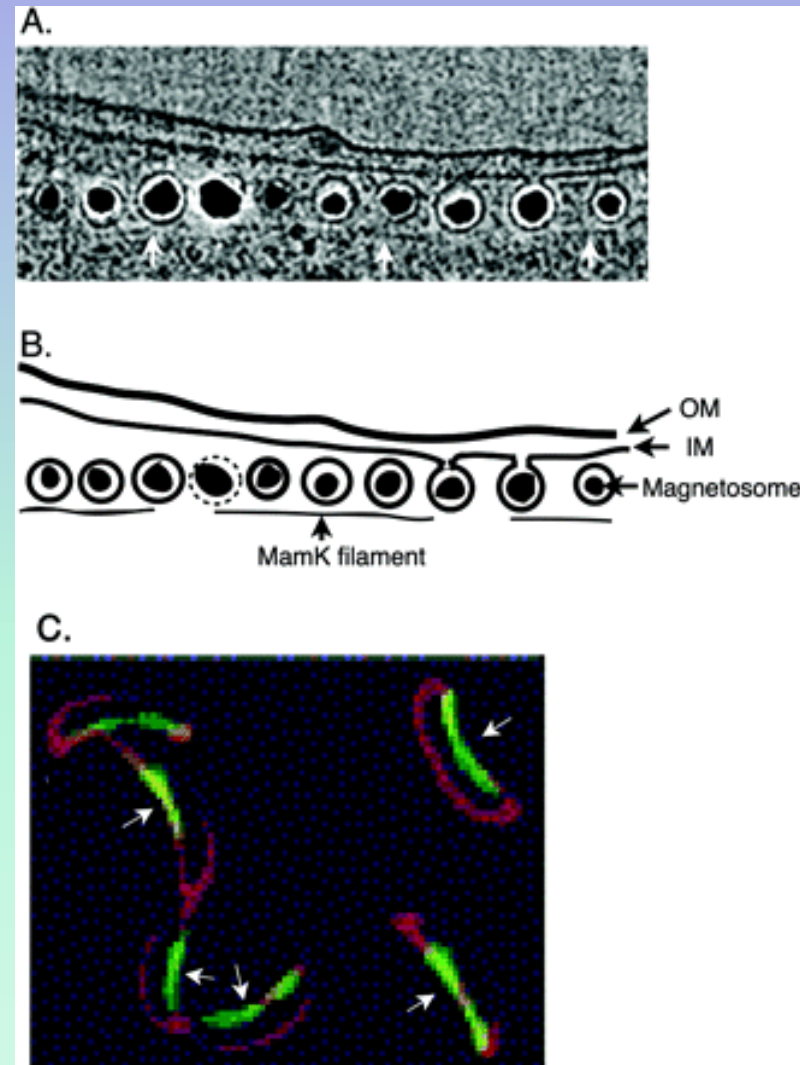
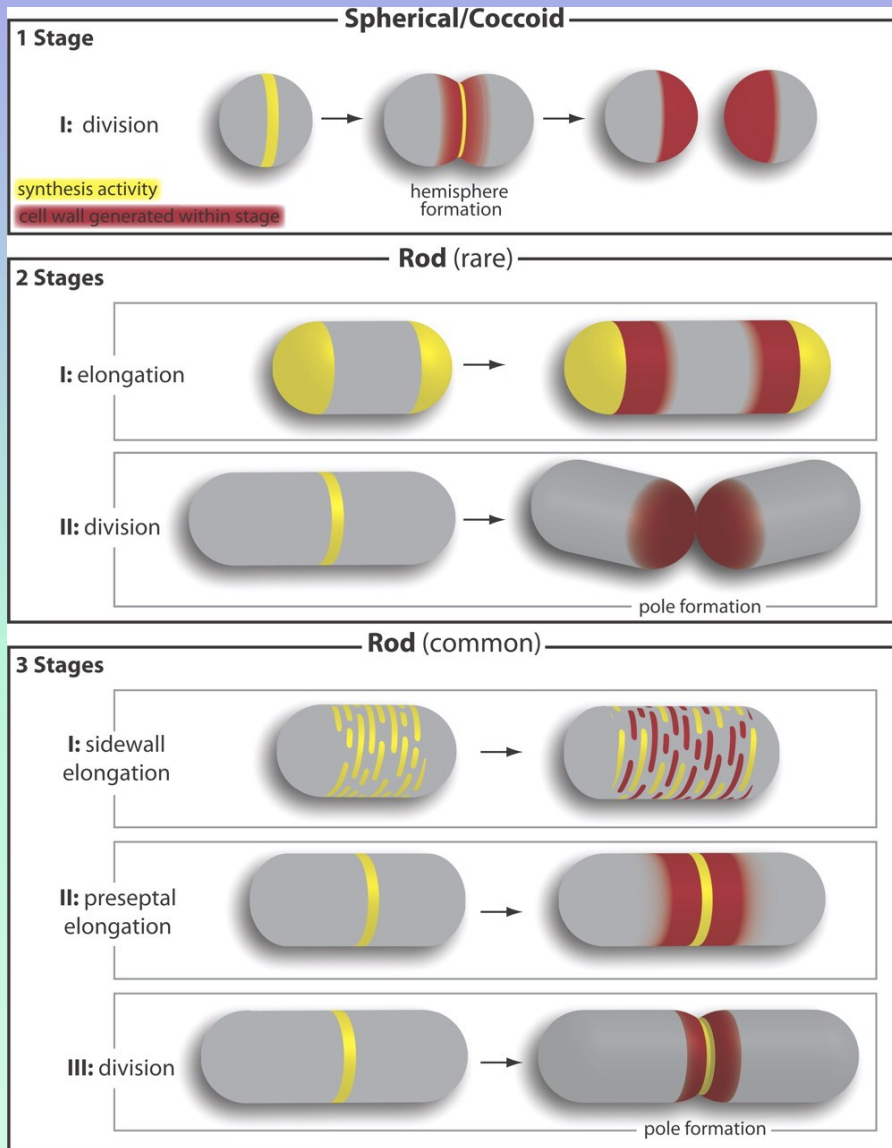


Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings. Photo reprinted courtesy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

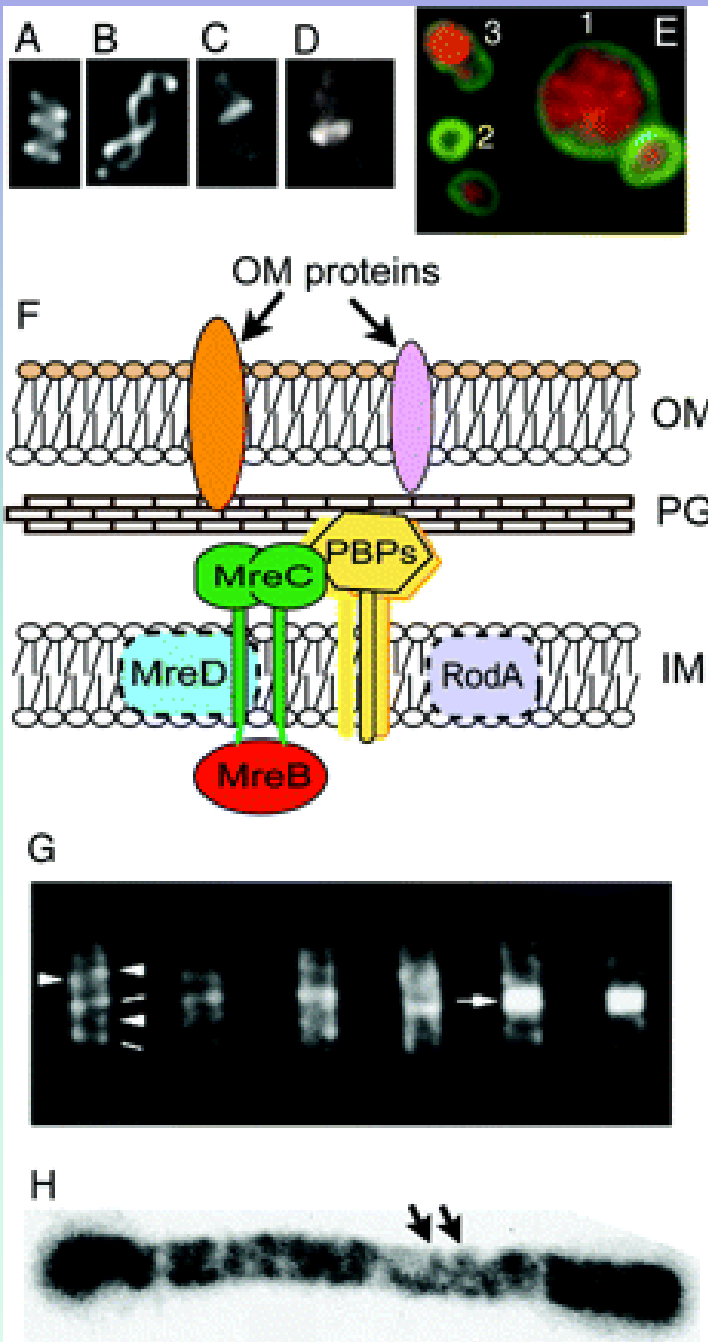




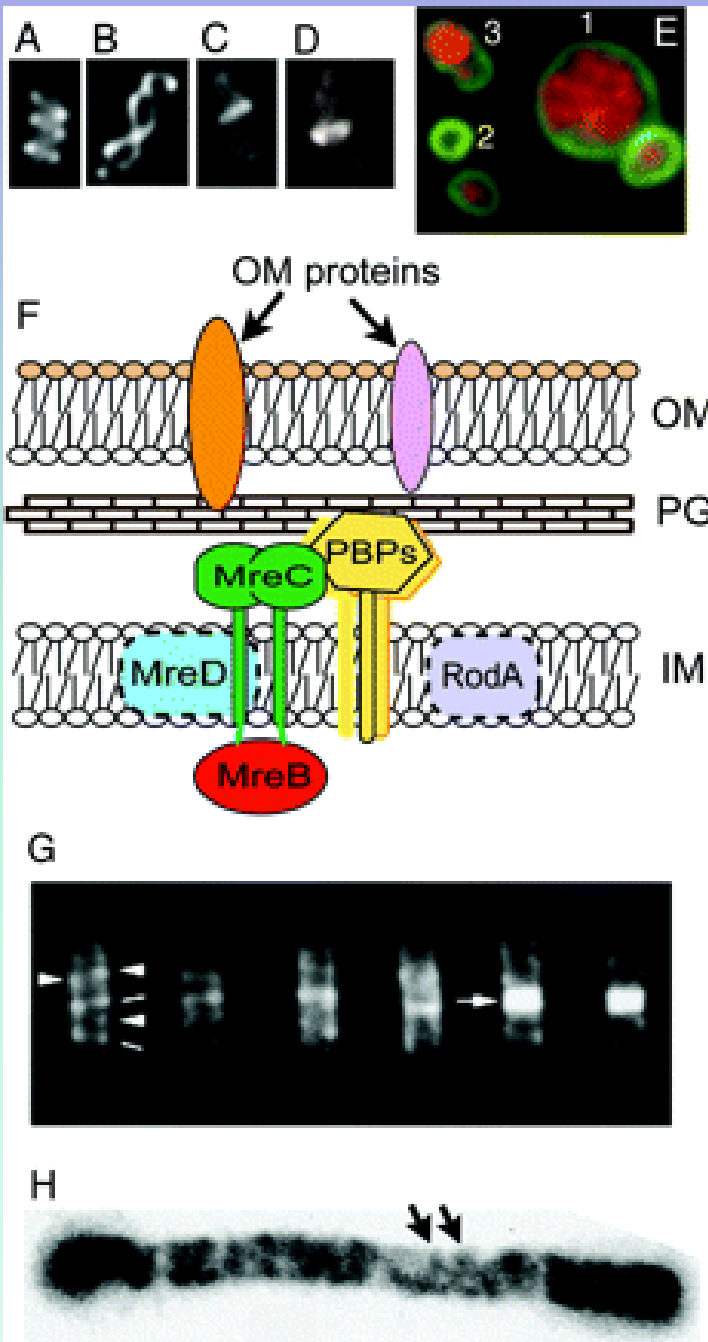
• Formování divizomu:

- 1) Polymerace tisíců mlk FtsZ
- 2) Formování prstence
- 3) Přídavné proteiny – min 1
 - ZipA (gamma-proteobact.)
 - FtsA (Firmicutes)
- 4) Následování replikace DNA (nukleoidy blokují uspořádání FtsZ kruhu před segregací kopií NK)
 - oscilace proteinů MinC a MinD, inhibují FtsZ assembly, záleží jak dlouho jsou u pólu buňky)
- 5) Determinace tvaru buňky
 - MreB, MreC, MreD, Mbl

Bakteriální cytoskelet a proteiny určující tvar buněčné stěny jako MreC spolupracují při lokalizaci komplexů koordinovaně syntetizujících buněčnou stěnu

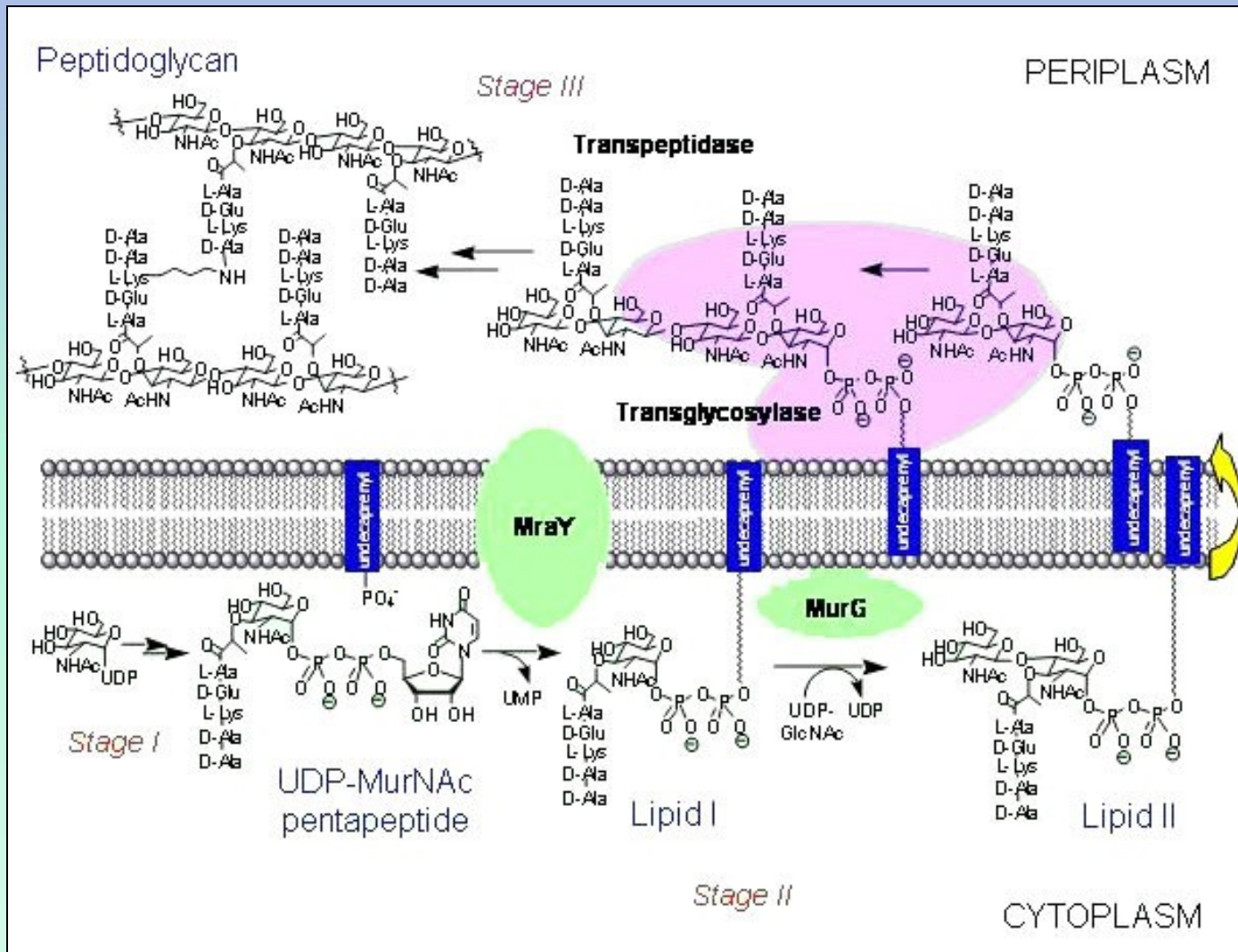


- **MreC**
 prostorová organizace složek syntetizujících peptidoglykan
- **MreB** řídí lokalizaci prekurzorů peptidoglykanu v cytosolu
- Dk: fluorescenční značení
- MreB a FtsZ jsou vyžadovány pro morfogenezi polární stélky



- **MreC** je podstatný pro prostorovou organizaci složek holoenzymů periplazmy syntetizujících peptidoglykan
- **MreB** řídí lokalizaci prekurzorů peptidoglykanu v cytosolu
- Fluorescenční značení Van dokazuje, že MreB a FtsZ, MreC a RodA působí při syntéze PG.
- MreB a FtsZ jsou vyžadovány pro morfogenezi polární stélky.

Syntéza peptidoglykanu (Vollmer et al. 2008)



Transpeptidázy
G- DAP+D-Ala
G+ L-lys+D-Ala

Katalýza
 glykosidových
 vazeb prekurzorů

Bactoprenol
 -extr.hydrofob.

- **FtsZ**

- prostorové umístění enzymu **MurG**

- **lipid II (prekurzor peptidoglykanu)**

- časné umístění **FtsZ** následováno převedením **MurG**

- = přesměrování syntézy prekurzorů PG do středového prstence b.s. buňky před buněčnou konstrikcí = elongace buňky

- Za nepřítomnosti FtsZ:

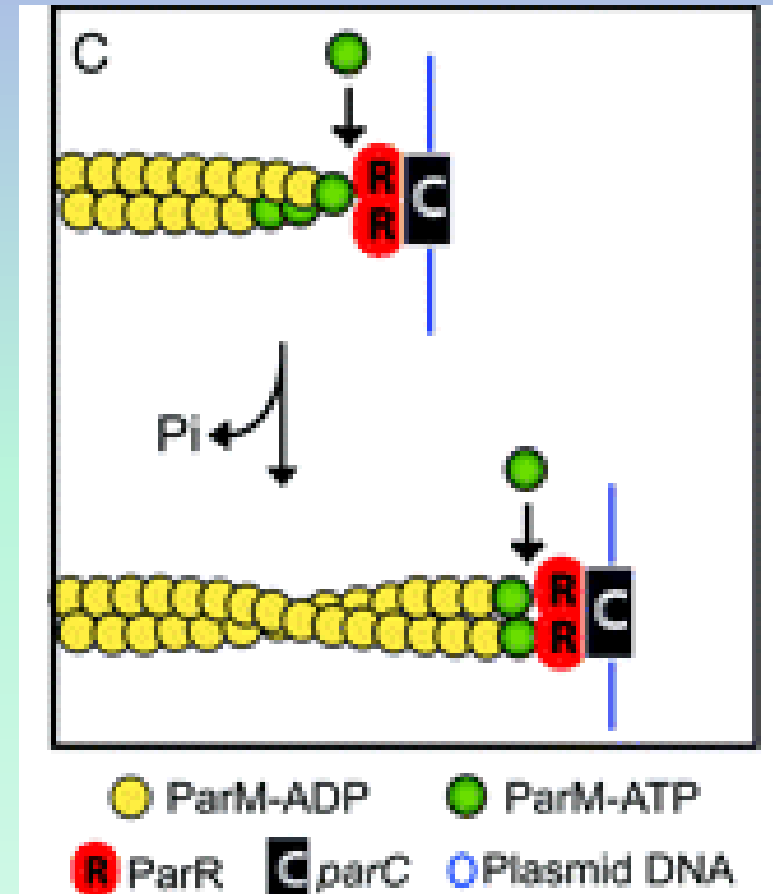
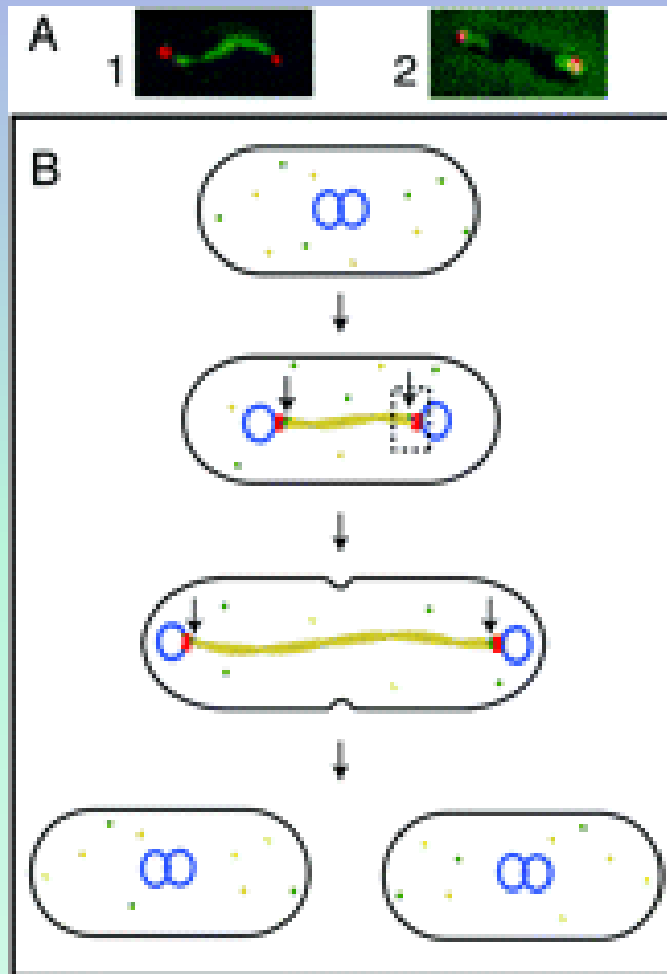
- enzym MurG se neakumuluje uprostřed buňky

- = buněčná elongace pokračuje inzercí PG i po okrajích

= buňka k elongaci využívá systém syntézy buněčné stěny závislý i nezávislý na FtsZ

- důležitost jednoho nebo druhého režimu závisí na načasování uspořádání FtsZ během elongace buňky.

- **FtsZ** reguluje prostorové umístění enzymu **MurG** produkujícího **lipid II (prekurzor peptidoglykanu)**. Časné umístění **FtsZ** do kruhové struktury během prodlužování buňky je následováno převedením **MurG** a přesměrování syntézy prekurzorů peptidoglykanu do středu buňky. Děje se tak před buněčnou konstrikcí s přispěním k elongaci buňky.
- **Za nepřítomnosti FtsZ se enzym MurG neakumuluje uprostřed buňky a buněčná elongace pokračuje inzercí peptidoglykanu i po okrajích buněčné stěny.** Buňka tedy k elongaci využívá systém syntézy buněčné stěny **závislý i nezávislý na FtsZ**; důležitost jednoho nebo druhého režimu závisí na **načasování uspořádání FtsZ během elongace buňky.**



Yu-Ling Shih and Lawrence Rothfield (2006): The Bacterial Cytoskeleton *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 729-754, Vol. 70, No. 3).

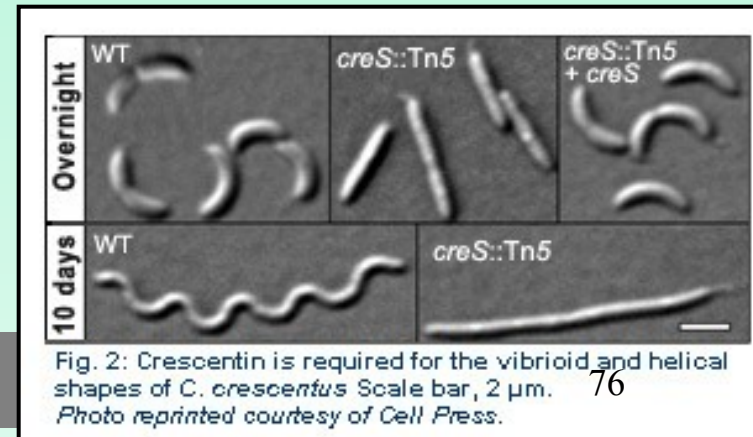
<http://mmbbr.asm.org/cgi/content/full/70/3/729?view=long&pmid=16959967>

Caulobacter crescentus

- **MreB** - tvar buněk

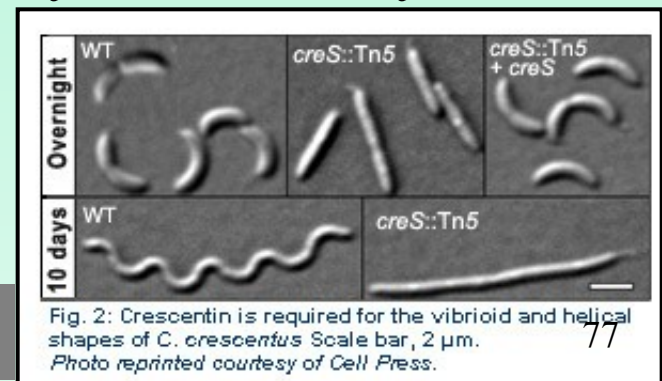
C. crescentus, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*

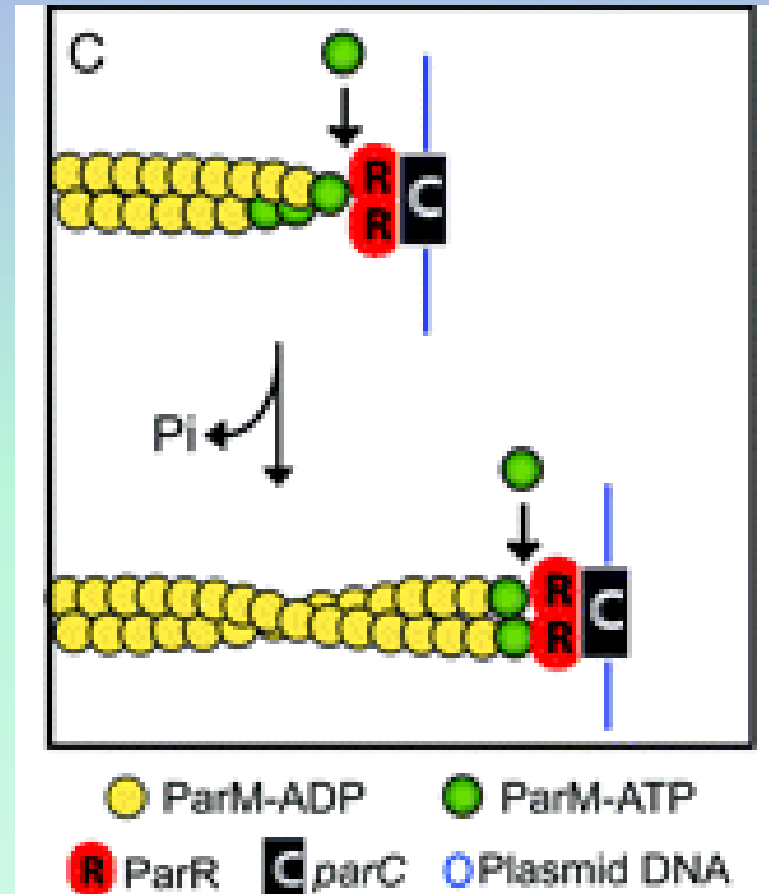
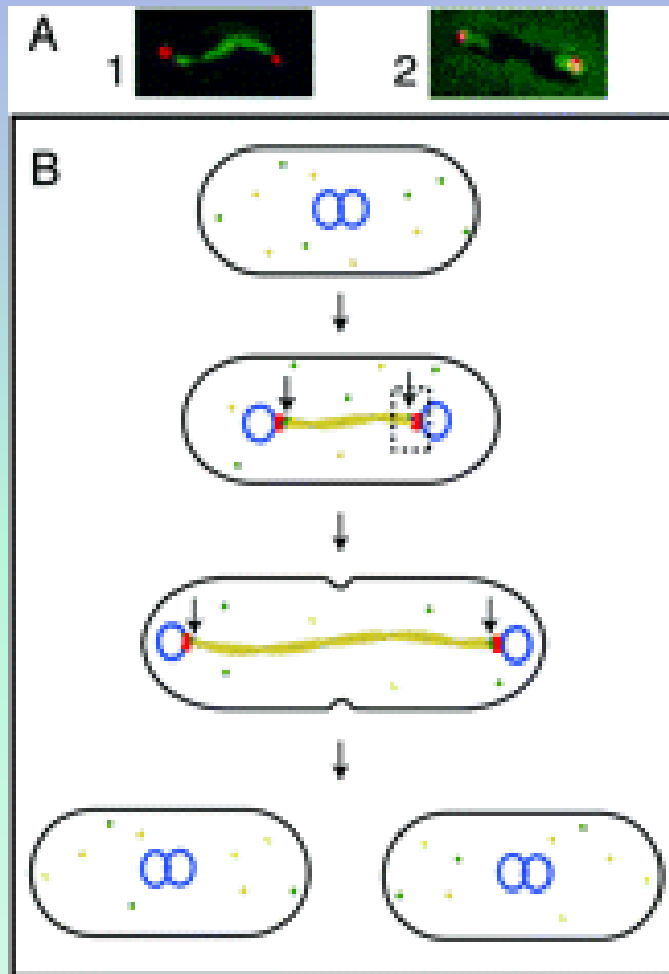
- ve spojení s **MreC** proteinem obalujícím buňku uvnitř periplazmatického prostoru
- v buňkách *Caulobacter crescentus*, je **MreC** spojen s penicilin vázajícím proteiny (PBPs)



Caulobacter crescentus

- strukturální analog aktinu (**MreB**) - předurčení tvaru buněk *C. crescentus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*
- koordinuje buněčnou morfogenezi ve spojení s **MreC** proteinem obalujícím buňku uvnitř periplazmatického prostoru
- v buňkách *Caulobacter crescentus*, je protein **MreC** spojen s penicilin vázajícím proteiny (PBPs), které katalyzují inzerci intracelulárně syntetizovaných prekurzorů do buněčné stěny





Yu-Ling Shih and Lawrence Rothfield (2006): The Bacterial Cytoskeleton *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 729-754, Vol. 70, No. 3).

<http://mmbbr.asm.org/cgi/content/full/70/3/729?view=long&pmid=16959967>