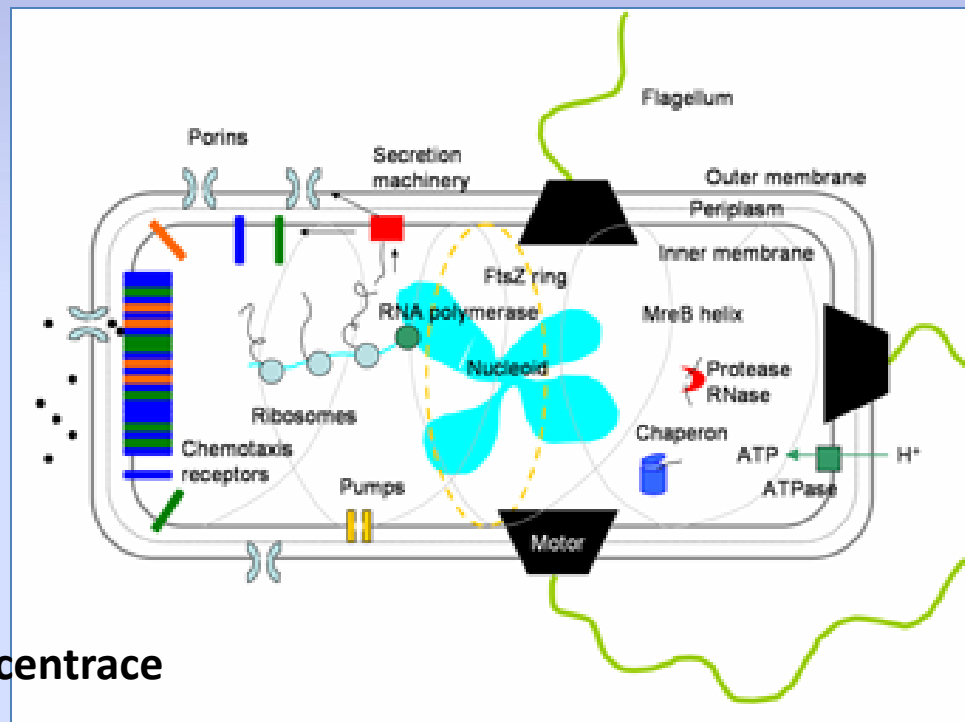


Vláknité útvary na povrchu buňky

Taxe bakteriálních buněk

Vybrané principy bakteriálních signálních drah

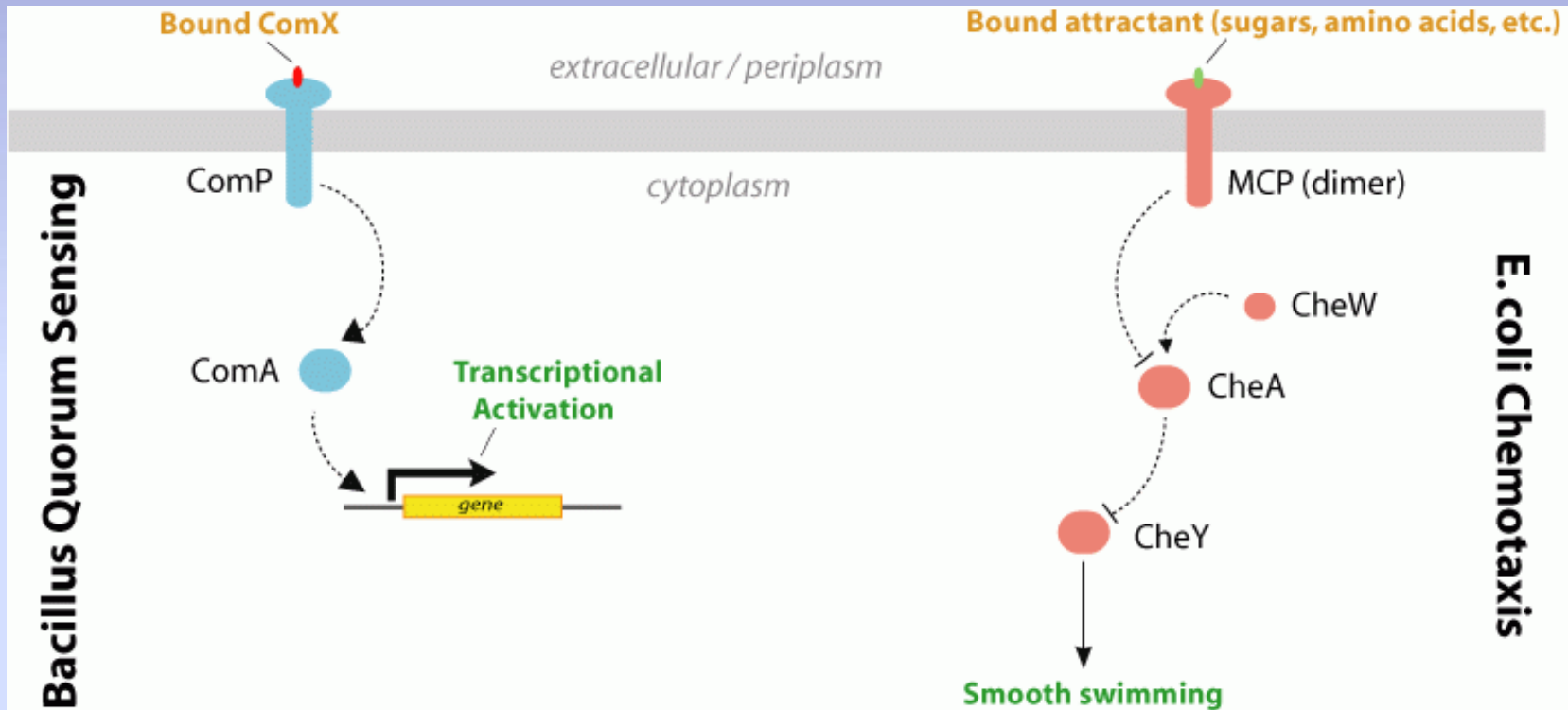


Bakterie detekují 2% změnu koncentrace

Bakterie vyhodnocují změnu gradientu koncentrace v prostoru i v čase

Chemotaxe je jednou z nejprozkoumanějších signálních drah

Signální dráhy bakterií



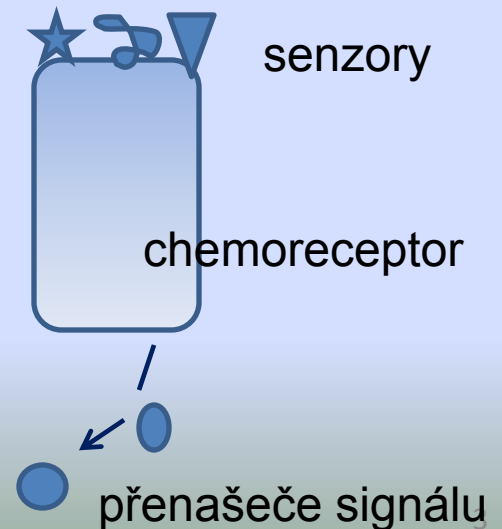
M. Kollmann, L. Lovdok, K. Bartholom e, J. Timmer, V. Sourjik.
Design principles of a bacterial signalling network, Nature 438:504, 2005

Signalizace

rozpoznání významných a nevýznamných signálů

= sítě pro regulaci přepisu genů nebo pro přenos signálů

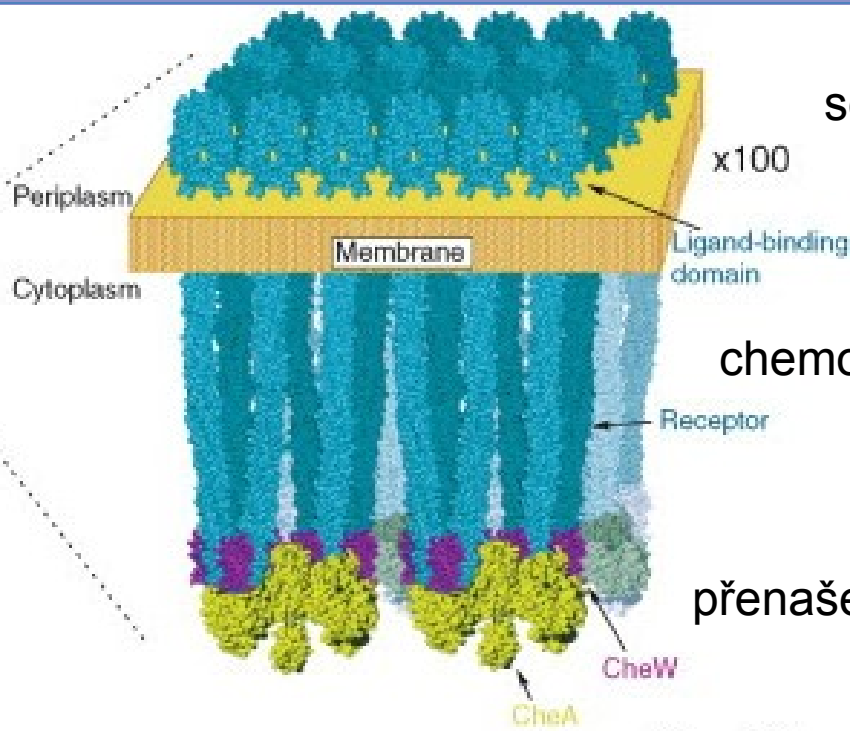
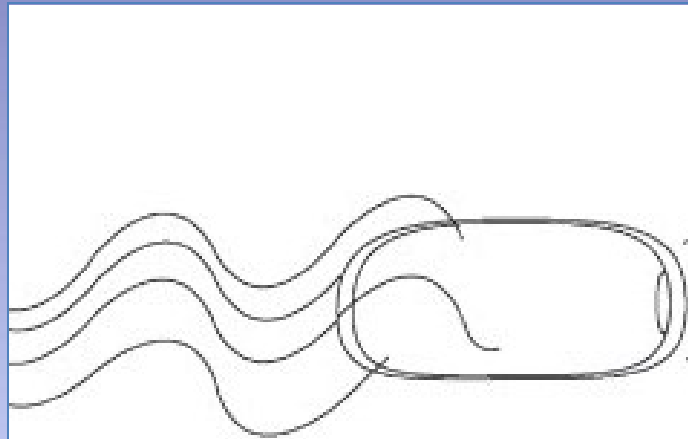
- monitoring environmentálních a vnitrobuněčných dějů a následná odpověď
- evoluce senzorů, receptorů a přenašečů signálu – pro maximální citlivost a zároveň inhibice neustálé stimulace
- adaptace: na atraktant/repelent kovalentními modifikacemi struktur receptorů
- design chemoreceptorů konzervovaný



[Nature](#). 2004 Apr 1;428(6982):574-8.

From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium.

[Korobkova E1](#), [Emonet T](#), [Vilar JM](#), [Shimizu TS](#), [Cluzel P](#).



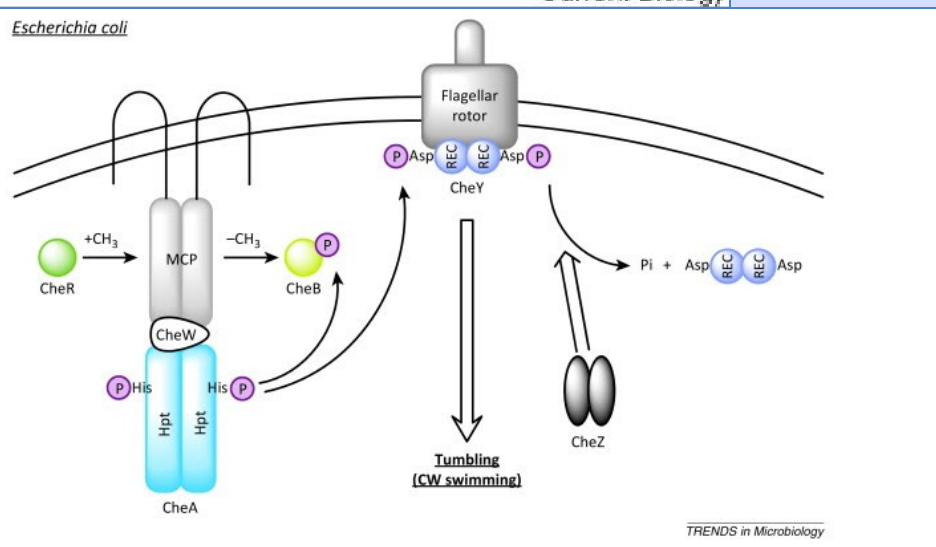
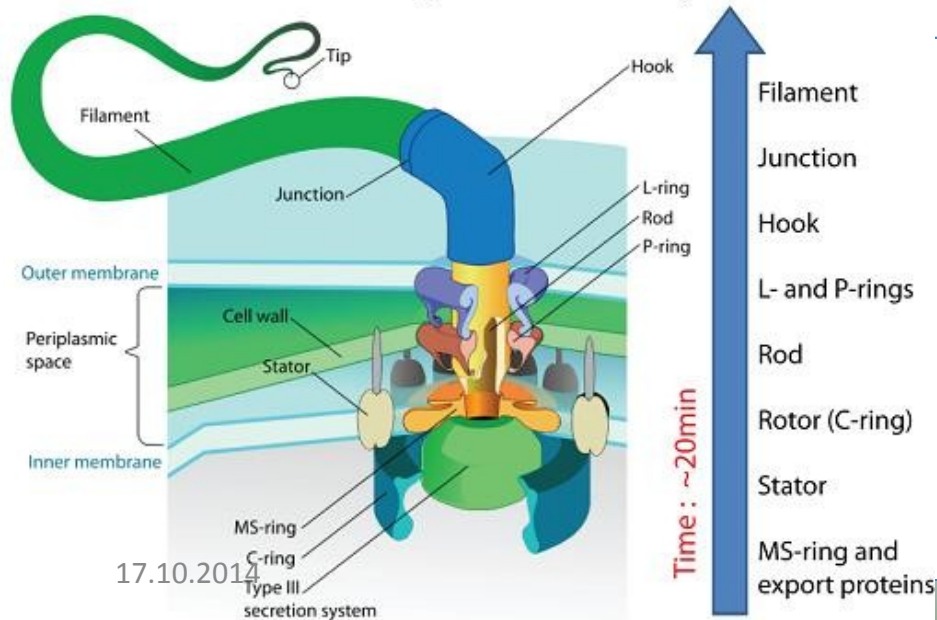
senzory

chemoreceptor

přenašeče signálu

Current Biology

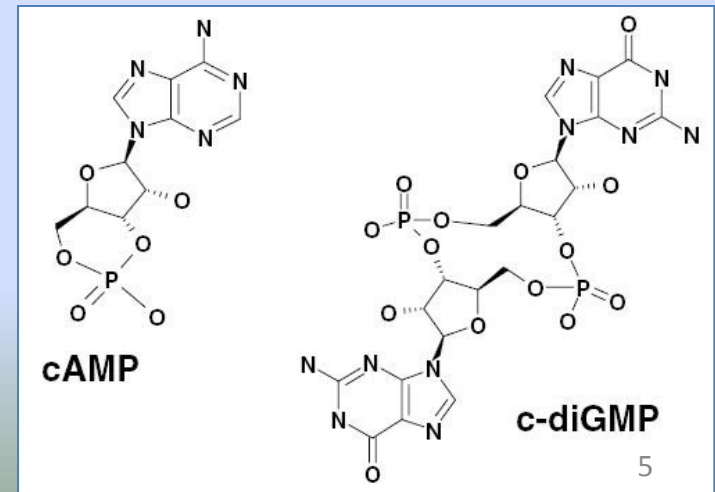
Order of Flagellum Self-Assembly



Organizace signálních drah

- (i) **Pestrá struktura** signálních proteinů
- (ii) Tok informace od **N-konce** senzoru k **C-doméně** přenašeče (N-to-C flow)
- (iii) Různé receptory se shodují v **senzorických sektorech**
- (iv) Jeden signál může spouštět více úrovní/drah odpovědi
- (v) Posel signální dráhy cAMP (aktivátor proteinkináz) a cyklický diguanylát
- (vi) Souhra signálních drah.

Experimenty: 3D a 4D struktury domén, charakterizace domén receptorů



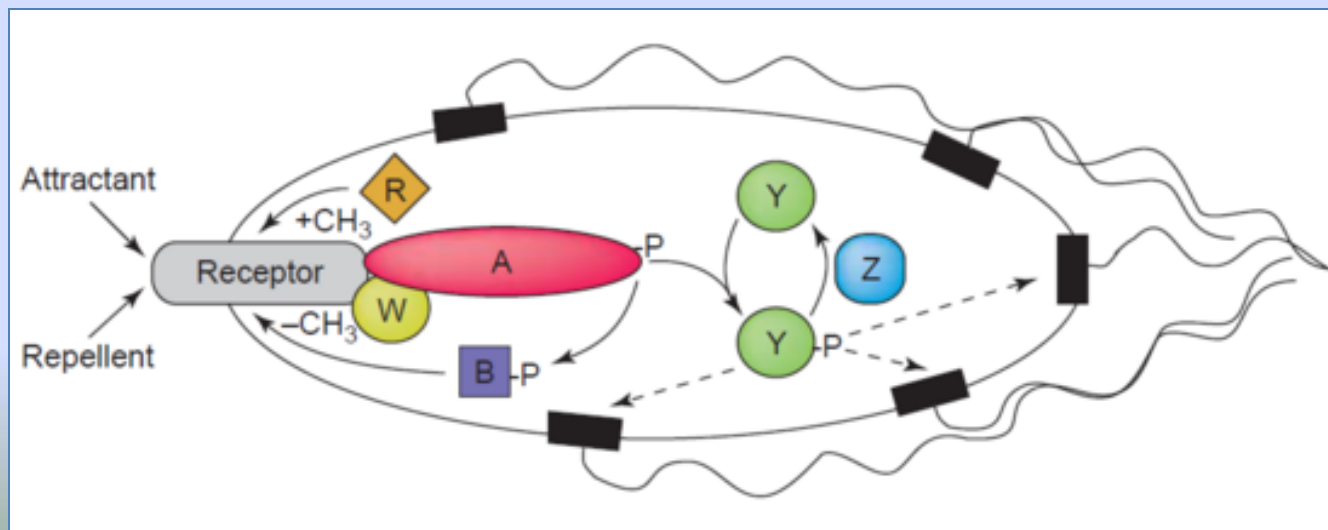
Signalizace a chemotaxe

- Výzkum v oblasti chemotaxe od r. 1880
- Síť chemotaktických drah komplexní, adaptabilní, paměť...
- Analýza rušivých elementů spolu s analýzou podstatných signálů
- Přenos informace i v populaci buněk

Regulace chemotaxe

- Spočívá v samotné struktuře a interakcích proteinů sítě drah
- Chemoreceptory s proměnlivými senzory

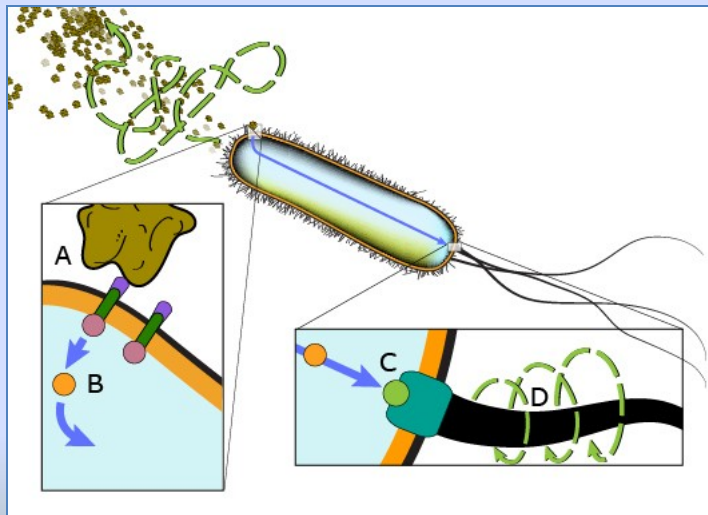
Senzory rozeznávají serin, aspartát, maltózu, ribózu, galaktózu a dipeptidy



Senzory chemotaxe *E. coli*

- Trg - ribóza a galaktóza
- Tar - aspartát
- Tsr – serin
- Tap – peptidy
- Aer - redox

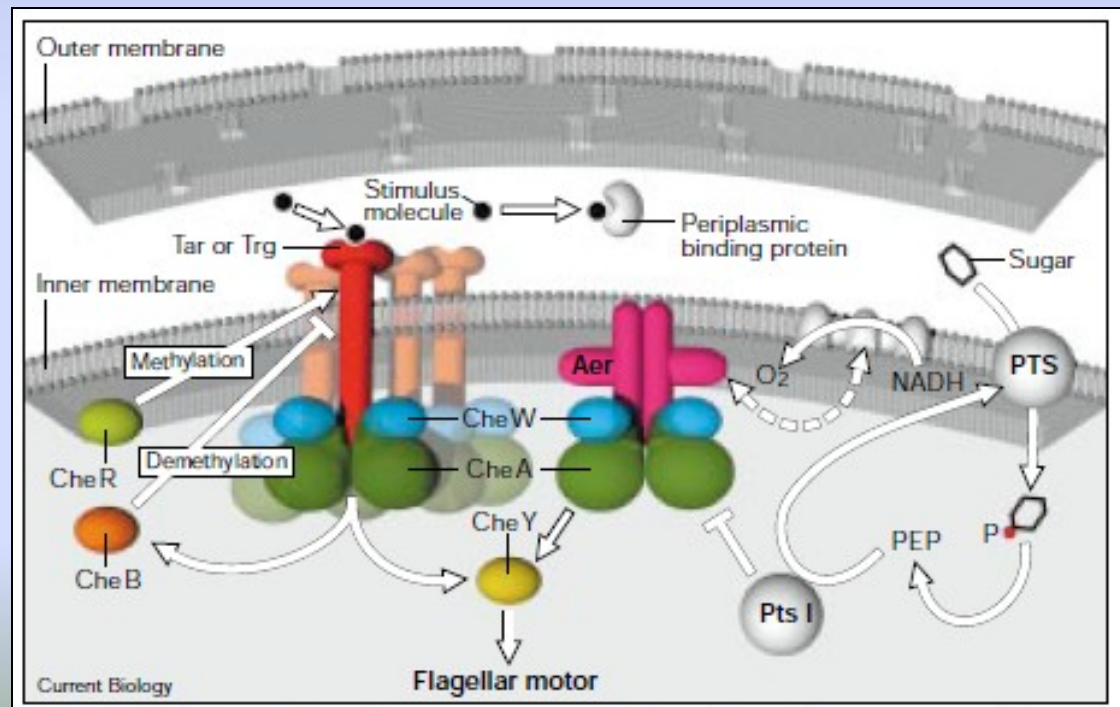
detektor



System chemotaxe *E. coli*



<http://www.flickr.com/photos/microbeworld/5786278737/>



Prostorová organizace senzorů

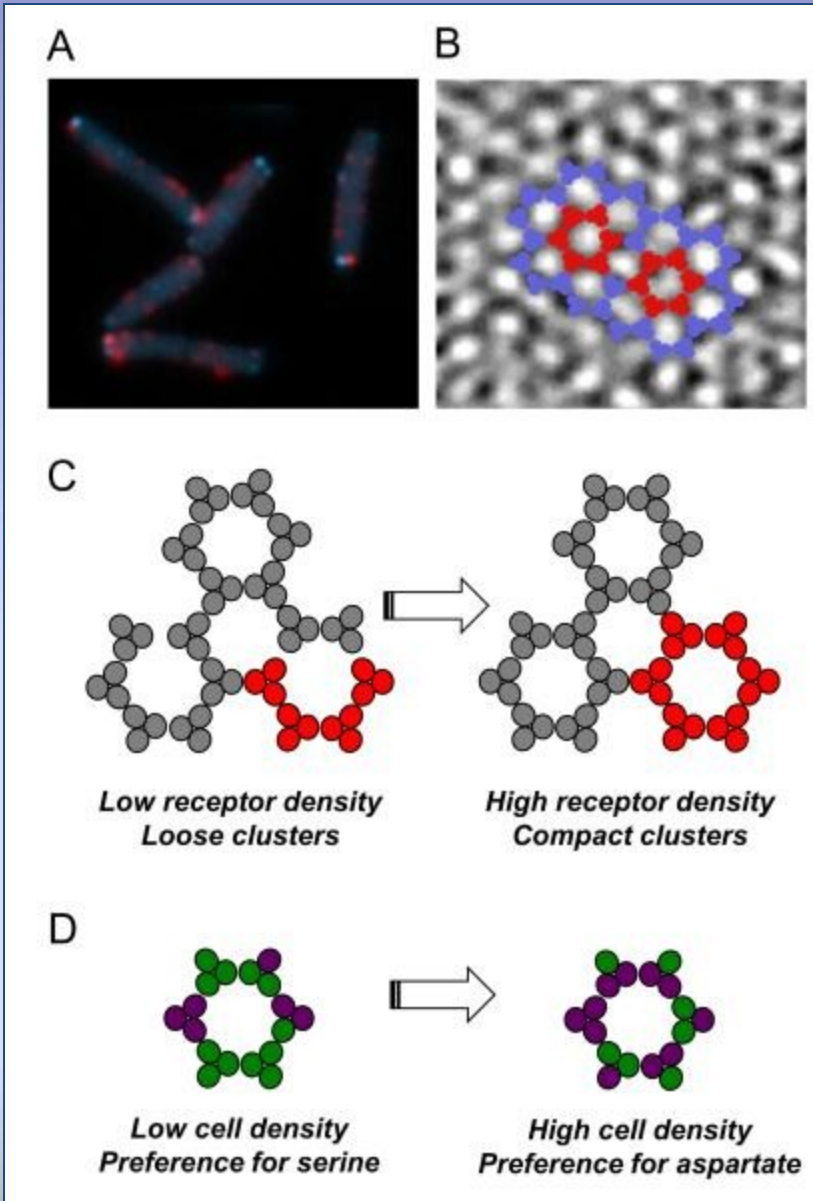
Proteiny chemotaxe a pohybu rozmístěné do MML klastrů.

Kryoelektronová mikroskopie

Receptory fungují jako signalizující di- nebo trimery; amplifikují a integrují chemotaktické signály.

Chudé medium – vysoká hladina exprese receptorů a jiných chemotaktických proteinů. Zvyšuje hustotu a kooperaci receptorů.

Regulace preference ligandu.



Chemotaxe – strukturně-funkční vztahy

Vysoce konzervované chemoreceptory – Eubacteria, Archaea

- Studie: *E. coli* a salmonela
 - multimer na jednom nebo obou pólech buňky
 - histidin proteinkináza CheA
 - SH3-like adaptor protein CheW
 - fosfoprotein fosfatáza CheZ
- Tisíce regulačních proteinů a proteinů pro přenos signálu
- Objevena **diverzita** od modelových MO
 - velikost a topologie chemoreceptorů
 - modus signálu
 - přítomnost přídatných CPL proteinů přenášejících signál

Mechanismus chemotaxe *E. coli*

Regulace pomocí MCP systému

MCP = „*methyl accepting chemotactic protein*“

váží se na něj proteiny CheA a CheW – enzymy cytosolu (1)

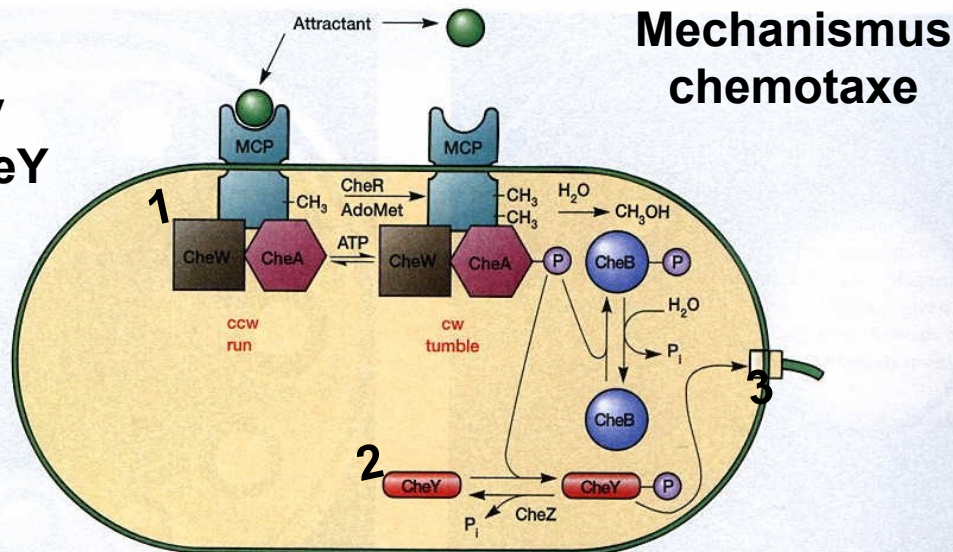
CheA = autofosforylující membránová kinasa (CheA-P)

CheA-P přenáší fosfát na CheY (2)

CheY-P spouští motor bičíku a pohyb (3)

CheZ – fosfatáza, defosforyluje CheY-P(4)

Bez atraktantu –
rovnovážný stav
mezi CheA a CheY



Mechanismus
chemotaxe

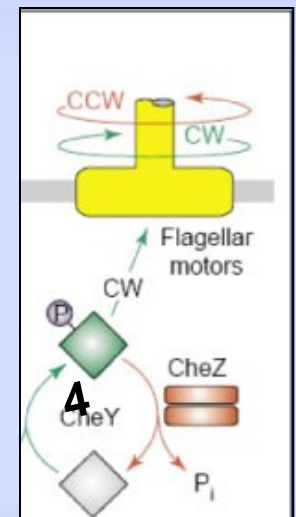
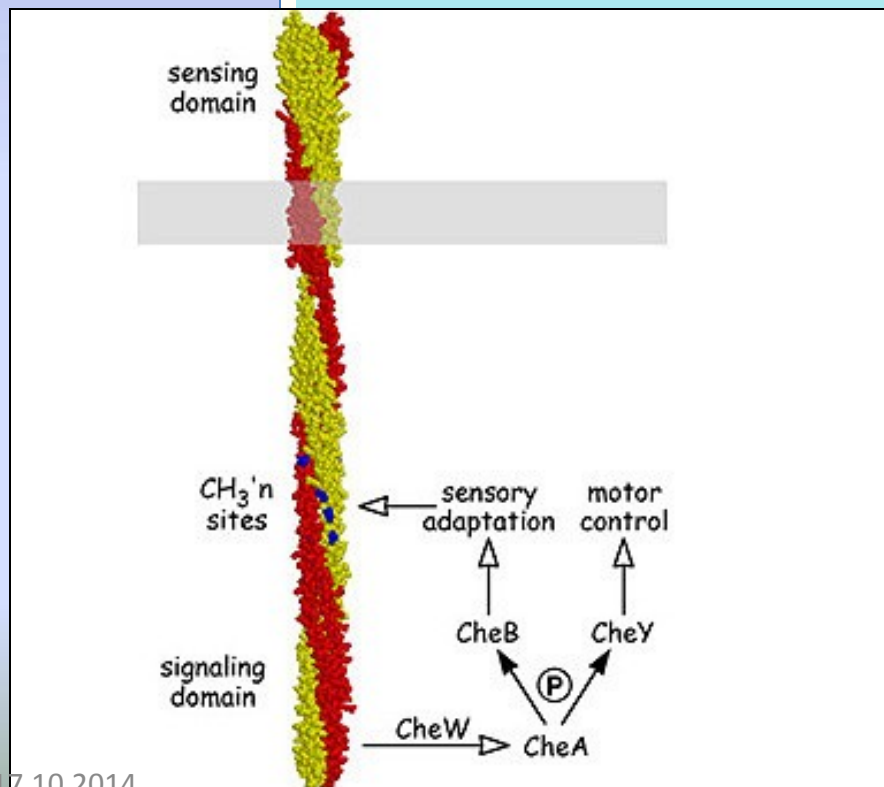
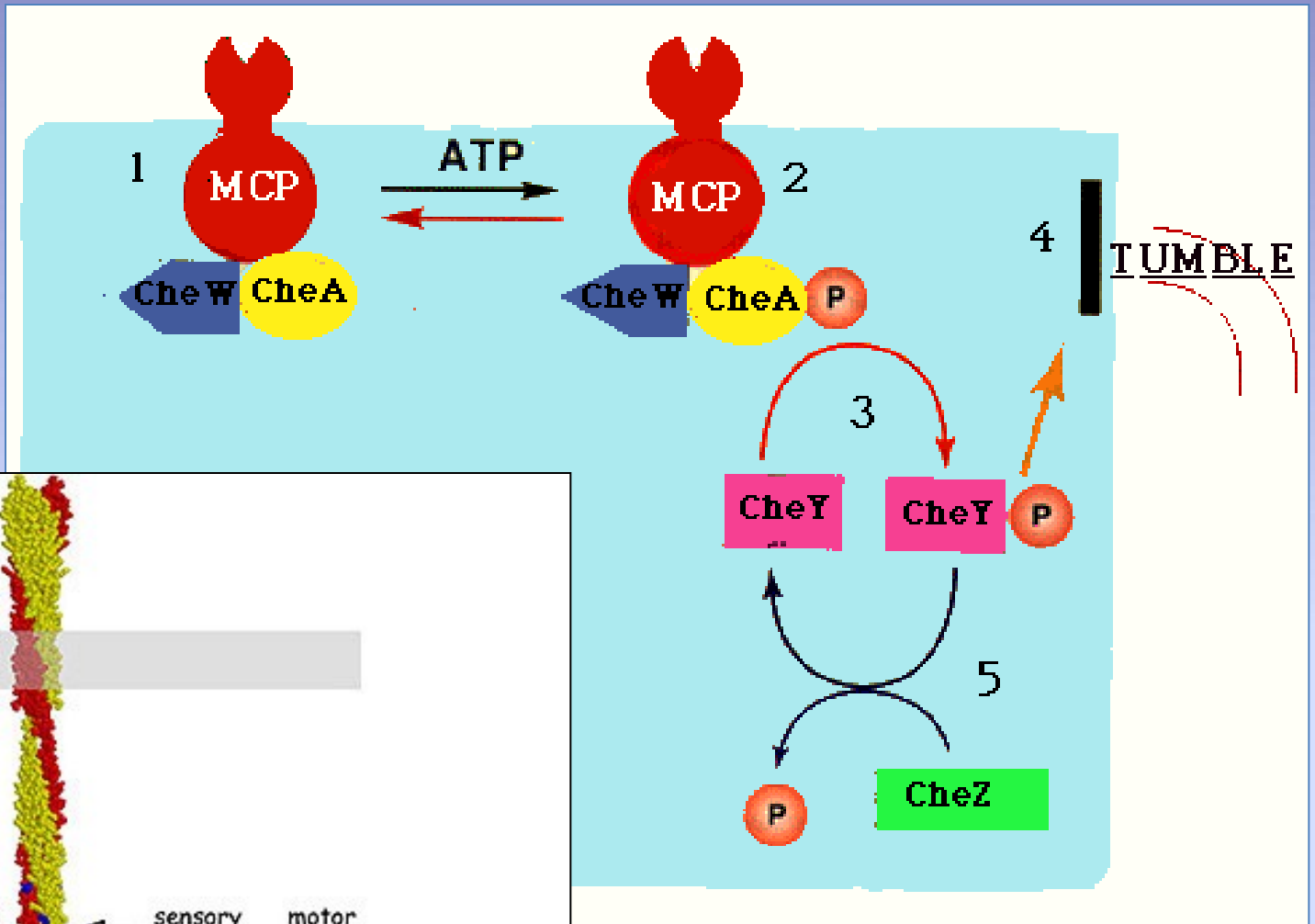
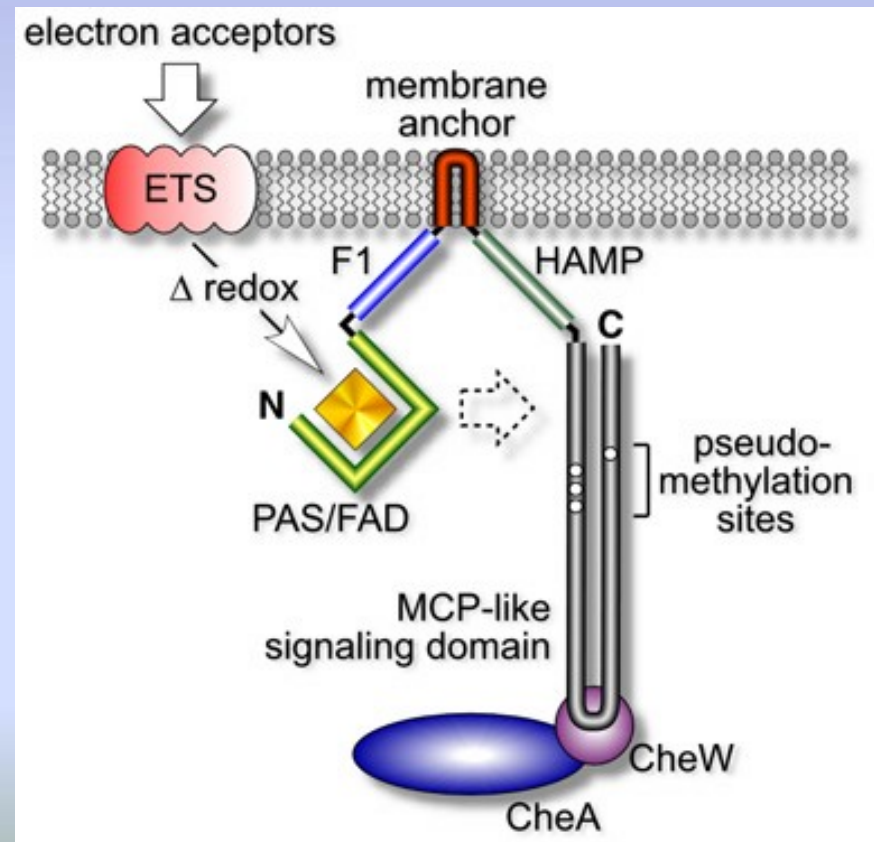
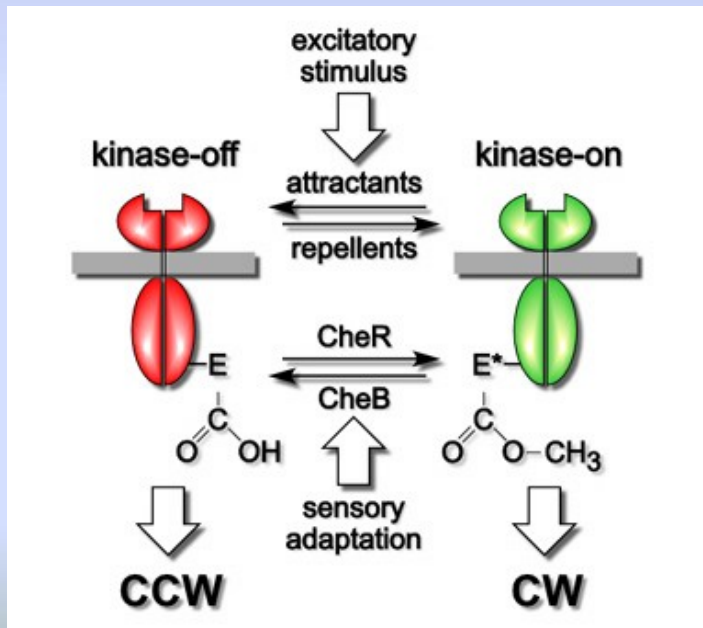
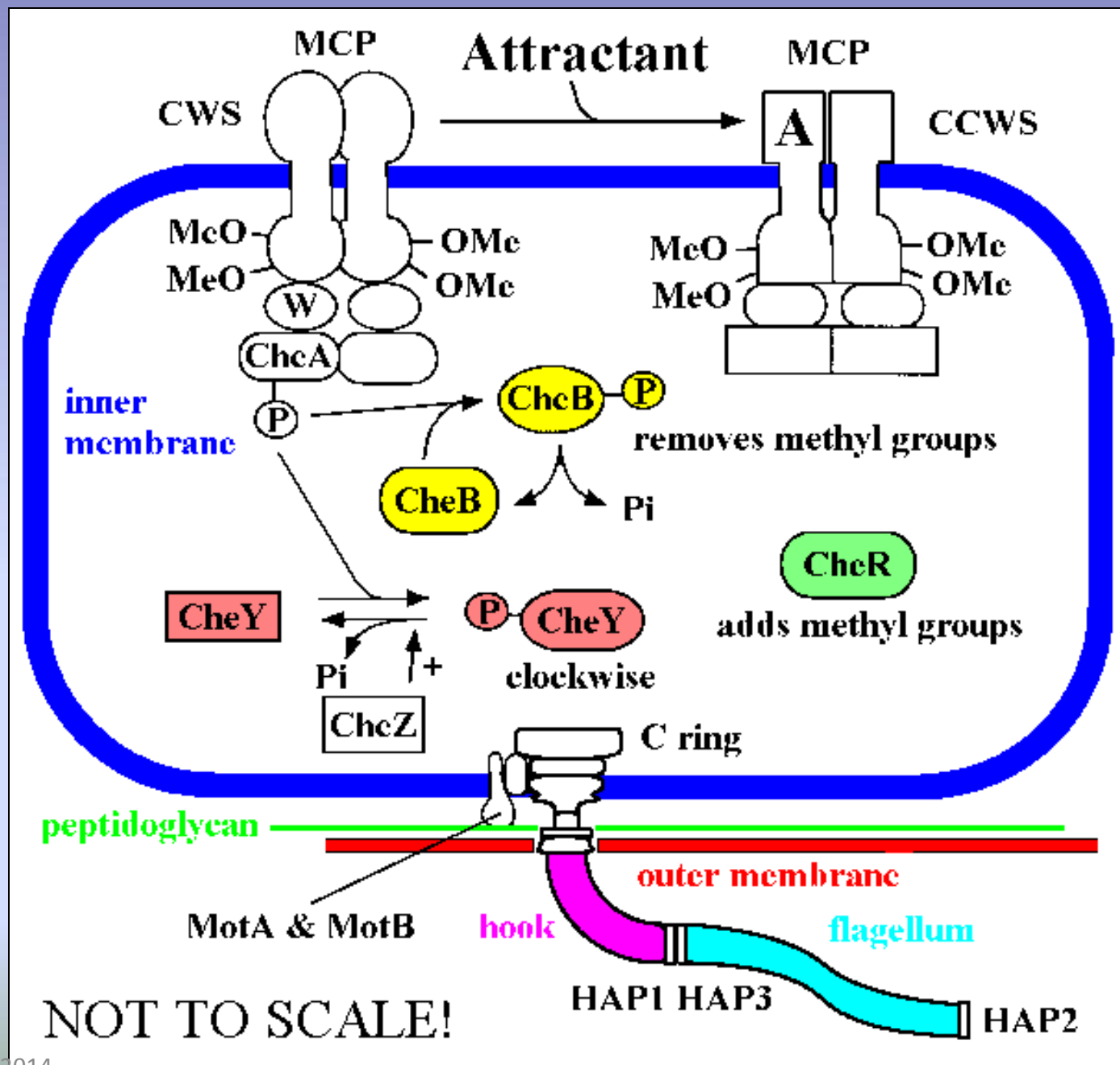


Figure 3.41 The Mechanism of Chemotaxis in *Escherichia coli*. The chemotaxis system is designed to control counterclockwise (ccw) and clockwise (cw) flagellar rotation so that *E. coli* moves up an attractant gradient by a sequence of runs and tumbles. See the text for a description of the process.



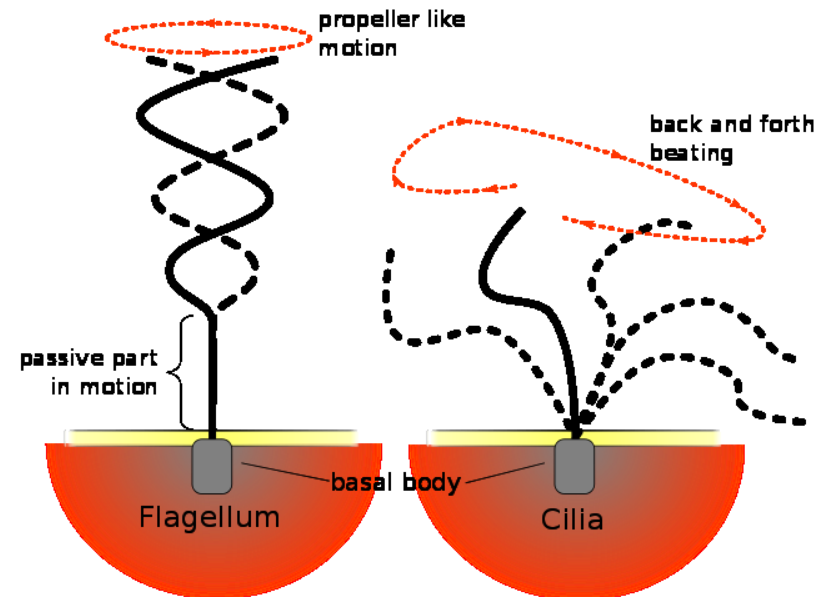
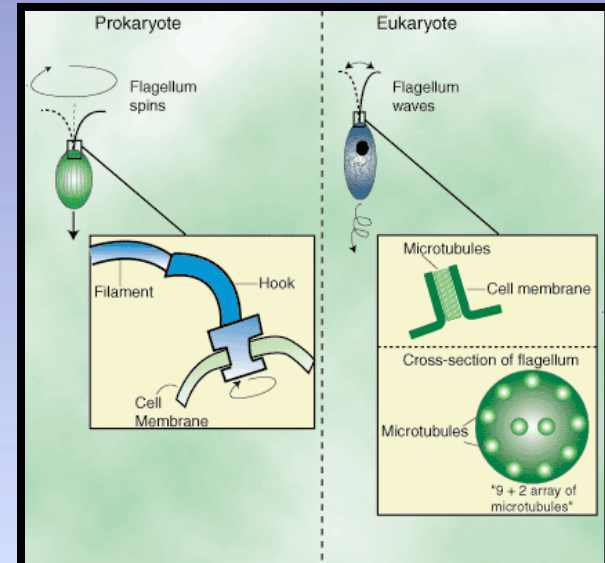
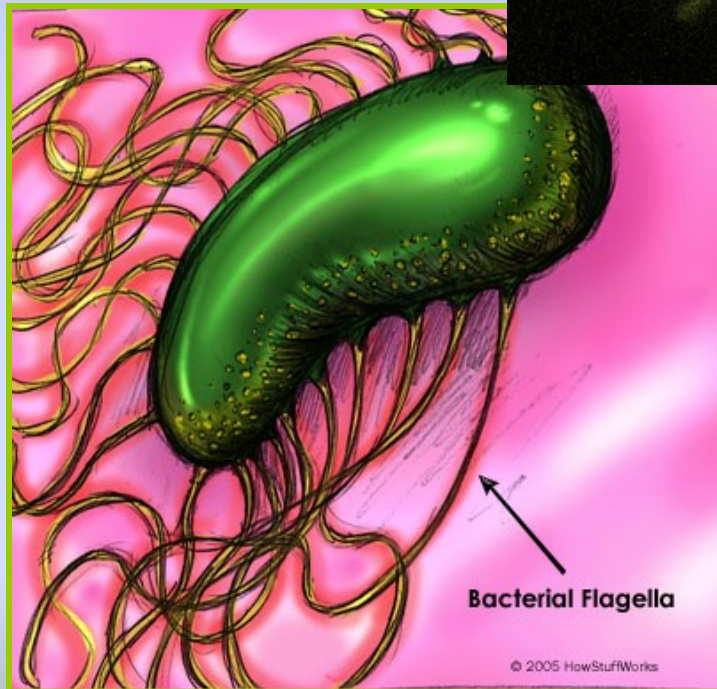
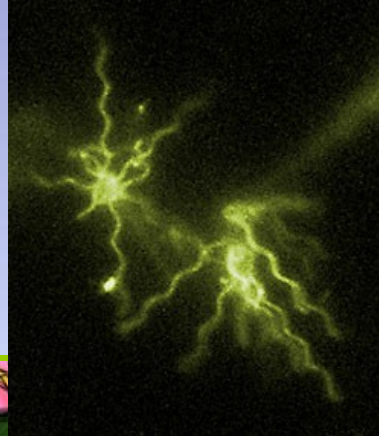
- Krátkodobá paměť receptorů!!!
- Pomocné látky pohybu – slizy, surfaktanty





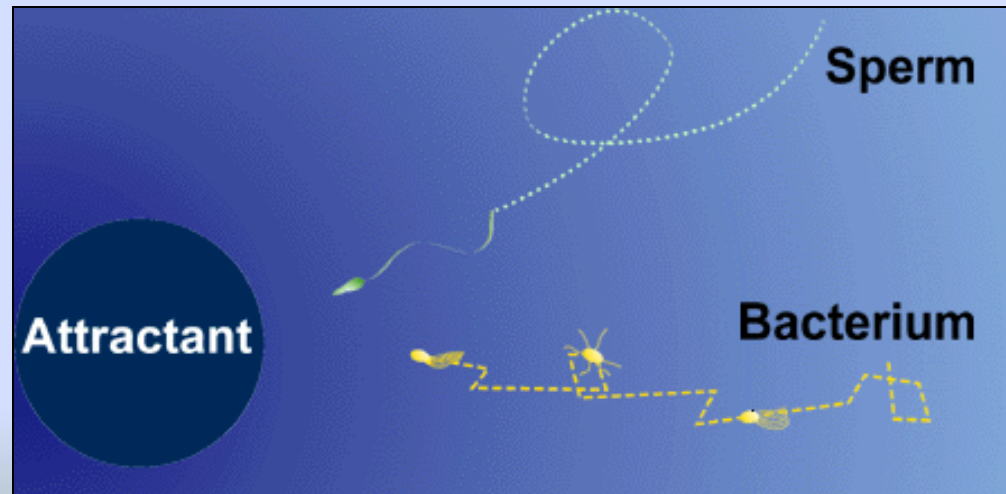
Vláknité útvary na povrchu buňky

- bičík
- fimbrie, pili
- curli



Prokaryota vs eukaryota

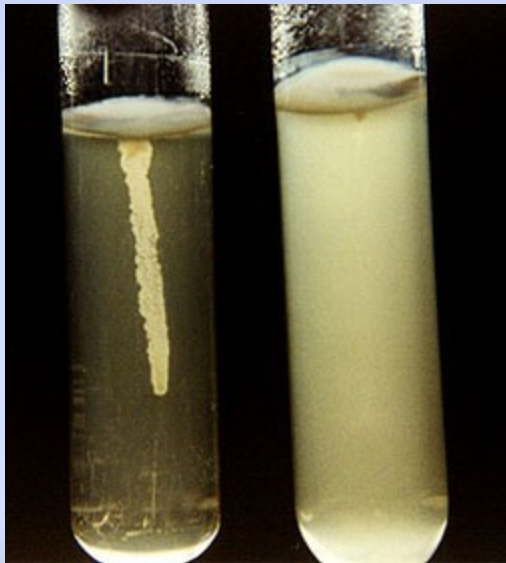
- **rotace bičíku** kolem vlastní osy
 - **pouze u prokaryot**
- motor – jeho rotační pohyb způsobuje pohyb celého bičíku
- poháněn **proton motive force** (pmf) – pohyb protonů přes cytoplazmatickou membránu
- výjimka – **alkalifilní bacily** – pohyb iontů Na = „Na motive force“



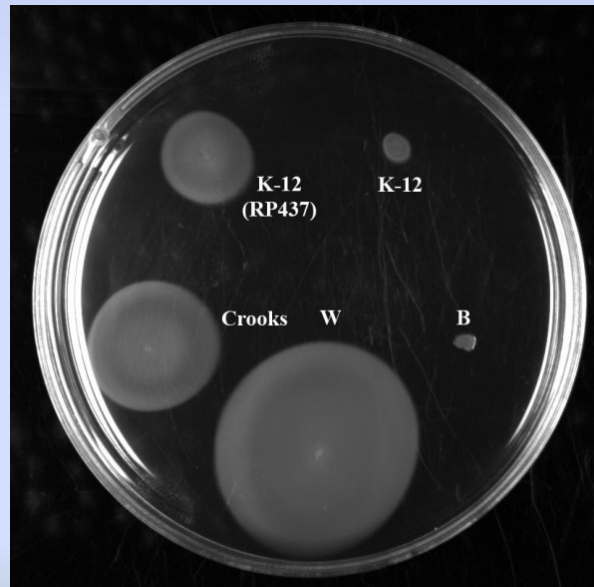
Pohyb bakteriální buňky

spojeno s pohybem po tkáních/sliznicích

- **swimming motility** – pohyb bičíky, plavání
- **swarming motility** – plazivý pohyb kolonií, bičíky, *Proteus*
- **twitching motility** – trhavý, skákavý pohyb – př. *Neisseria gonorrhoeae*, pili IV
- **gliding motility** – klouzavý pohyb



Motility medium



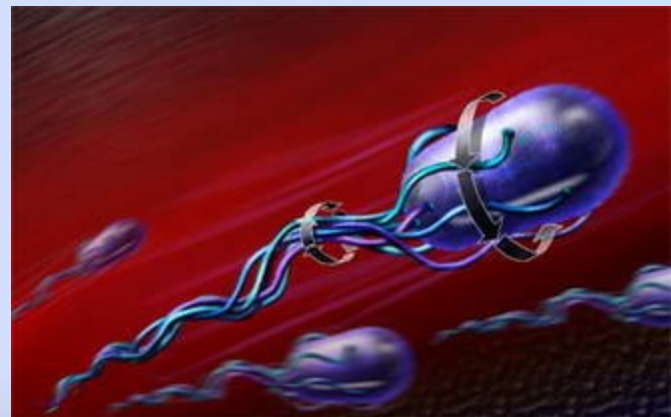
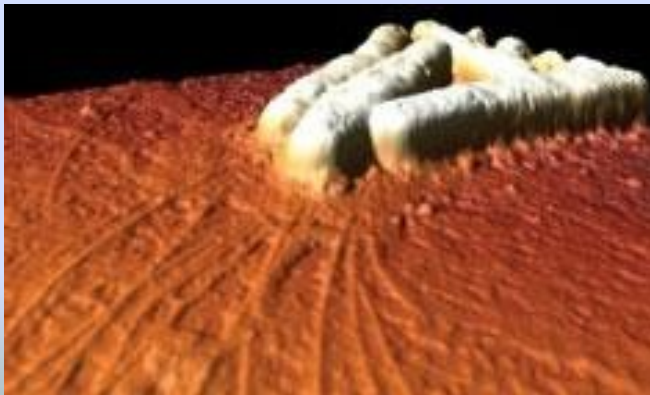
Swarming motility – kmeny *E. coli*



Terasovitý růst – střídání fází
Proteus

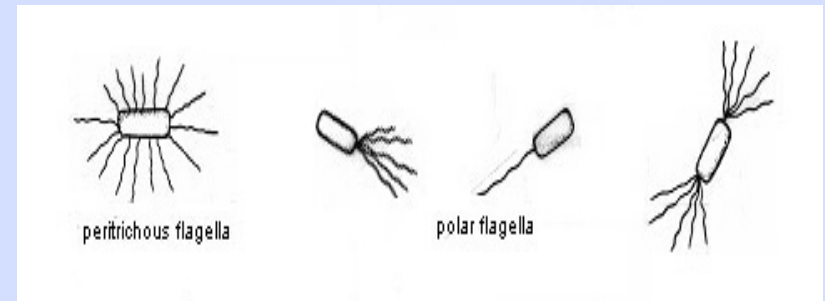
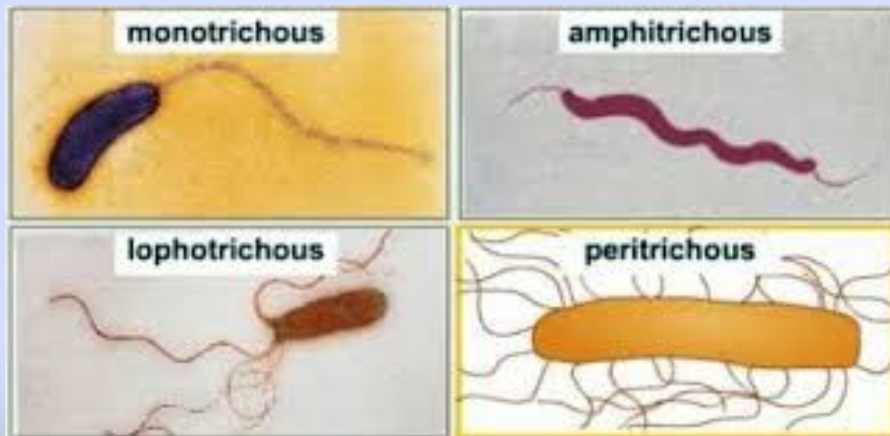
Důvody pohybu bakterií

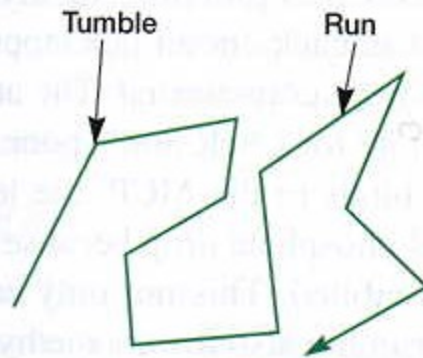
- nejčastější – pohyb ke zdroji živin (c gradient)
- reakce na repelent
- shlukování buněk za účelem vytvoření plodnice – *Myxobacteria*
- Intenzita odpovědi závisí na teplotě, počtu bičíků, viskozitě..



Vnitřní faktory ovlivňující pohyb

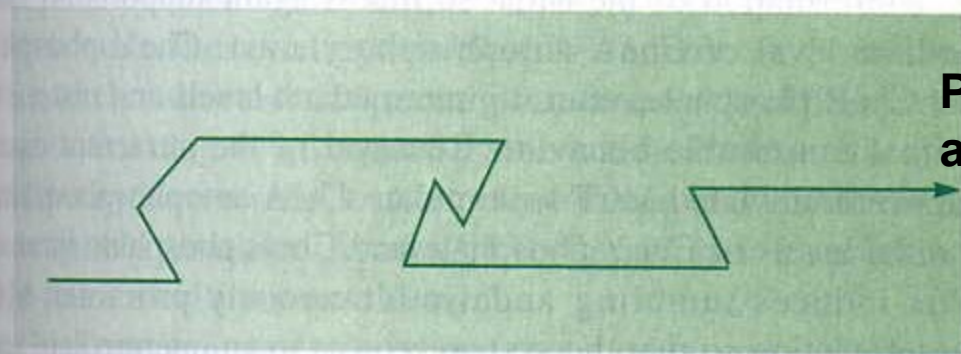
- počet bičíků
- lokalizace bičíků
- dostatek redukčních ekvivalentů





(a)

Pohyb bez gradientu koncentrace atraktantu

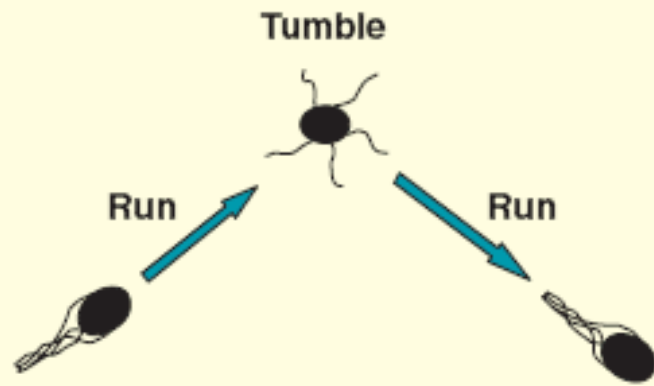


(b)

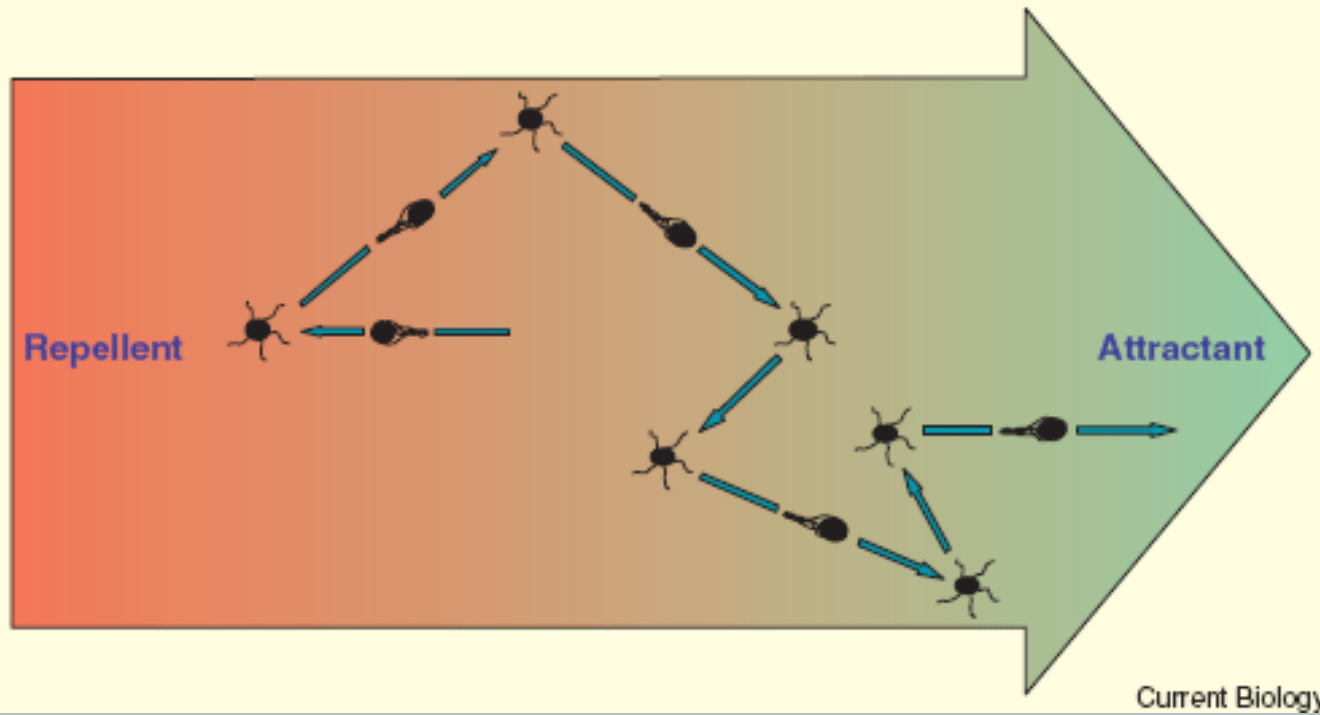
Pohyb v gradientu atraktantu

Figure 3.40 Directed Movement in Bacteria. (a) Random movement of a bacterium in the absence of a concentration gradient. Tumbling frequency is fairly constant. (b) Movement in an attractant gradient. Tumbling frequency is reduced when ~~the bacterium is~~ moving up the gradient. Therefore runs in the direction of increasing attractant are longer.

A



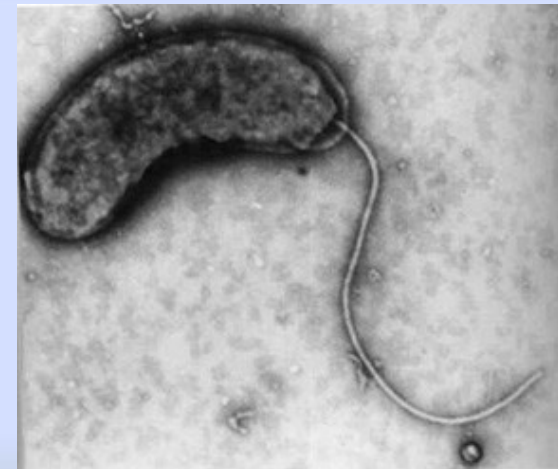
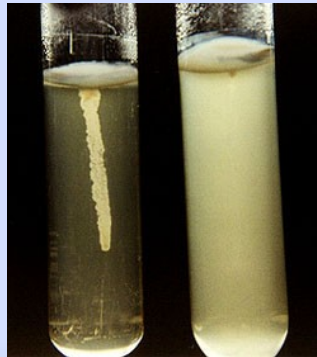
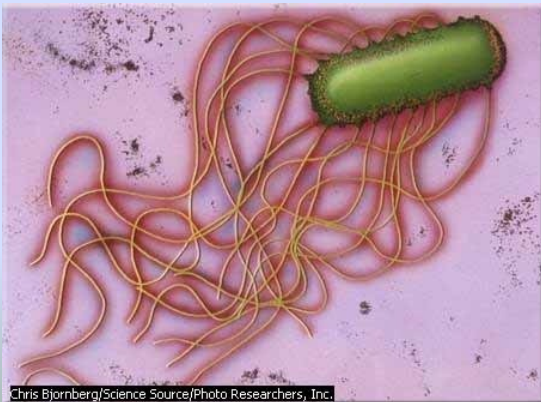
B



Current Biology

Bakteriální bičik

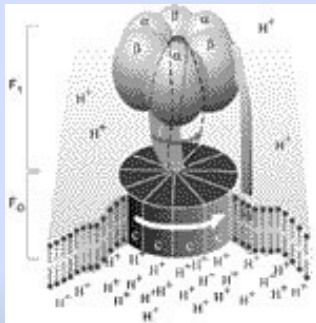
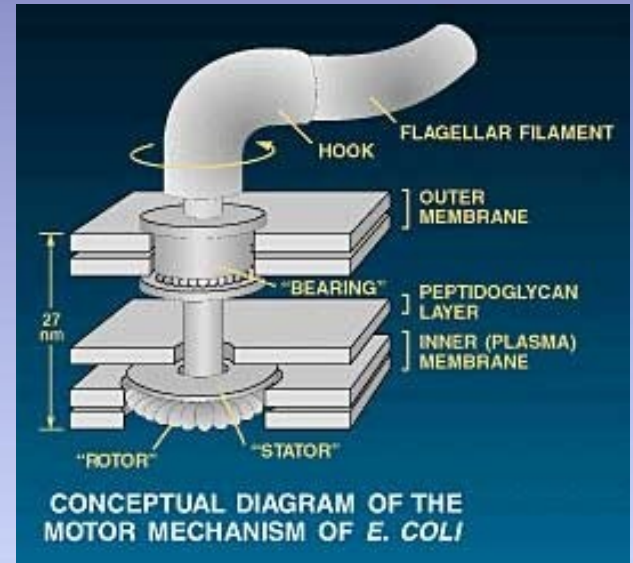
- semirigidní vláknitá struktura
1 – 4 proteiny – **flagelin**
- **podobná stavba** u všech dosud zkoumaných druhů bakterií
- tloušťka 13 – 20 nm
- 1 – 100 mm/s
- atraktant – faktor



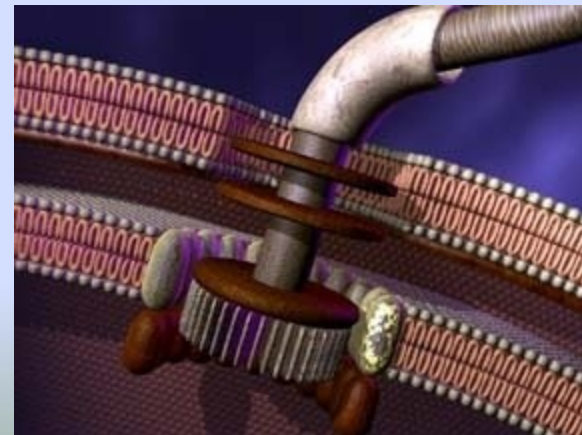
motility test medium
(polotuhé medium)

Komponenty bičíku:

- vždy **bazální tělísko** –
 - G- 4kruhy (CM, PG a VM)
 - G+ 2 kruhy
- **háček** (hook)
- vlastní **vlákno** (jen to antigenem)
- Bazální tělísko zůstává po odstranění bičíkového vlákna, to je do 20 až 30 min dosyntetizováno

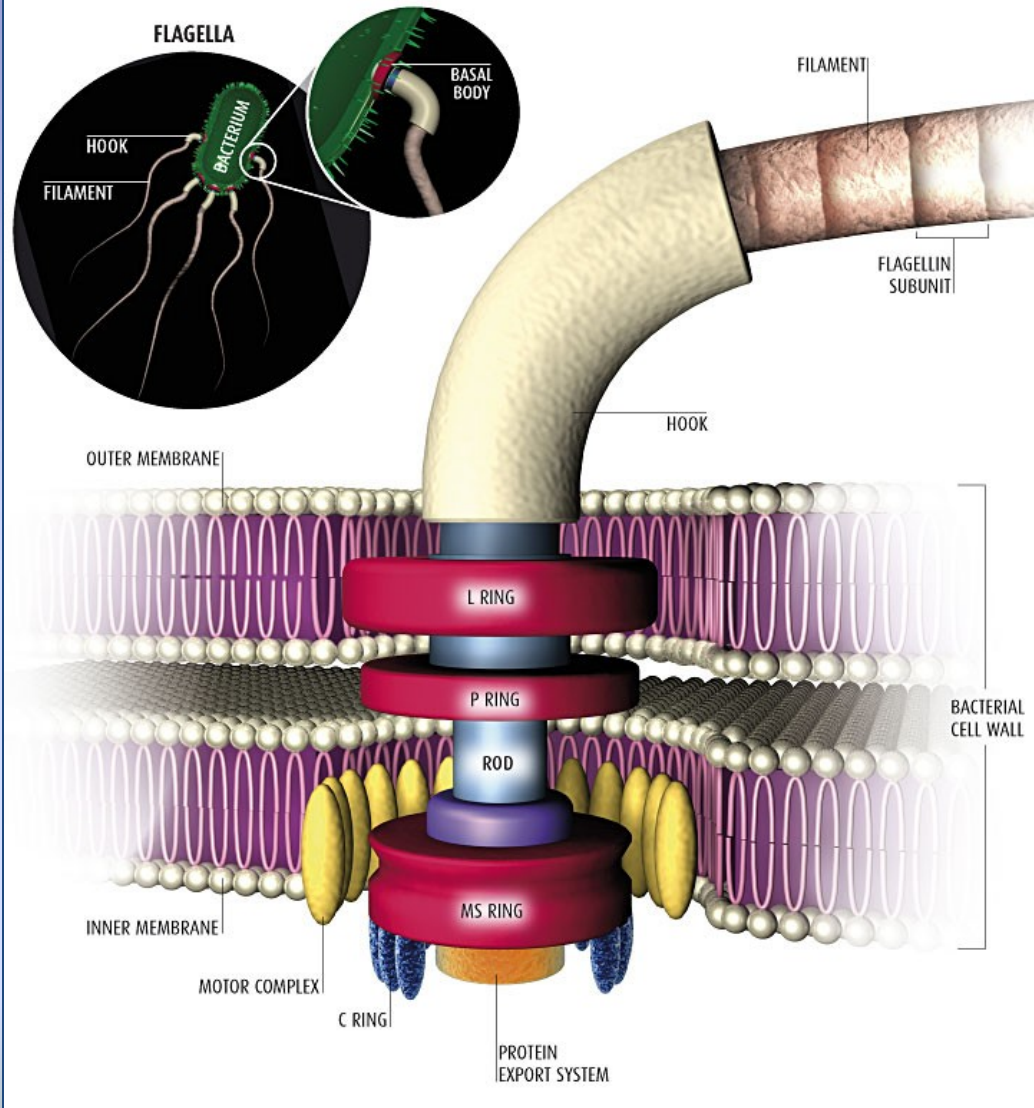


ATP synthase motor



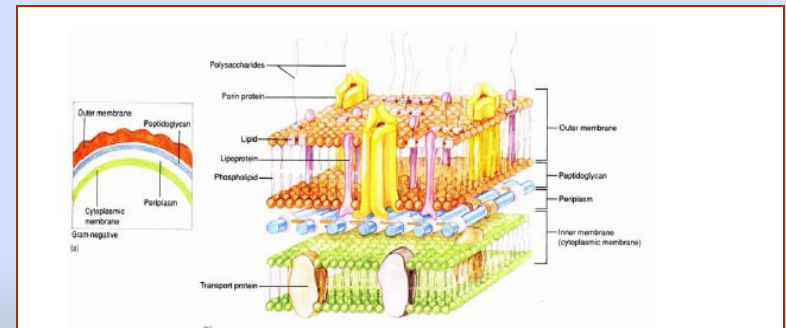
NATURE'S OUTBOARD MOTOR

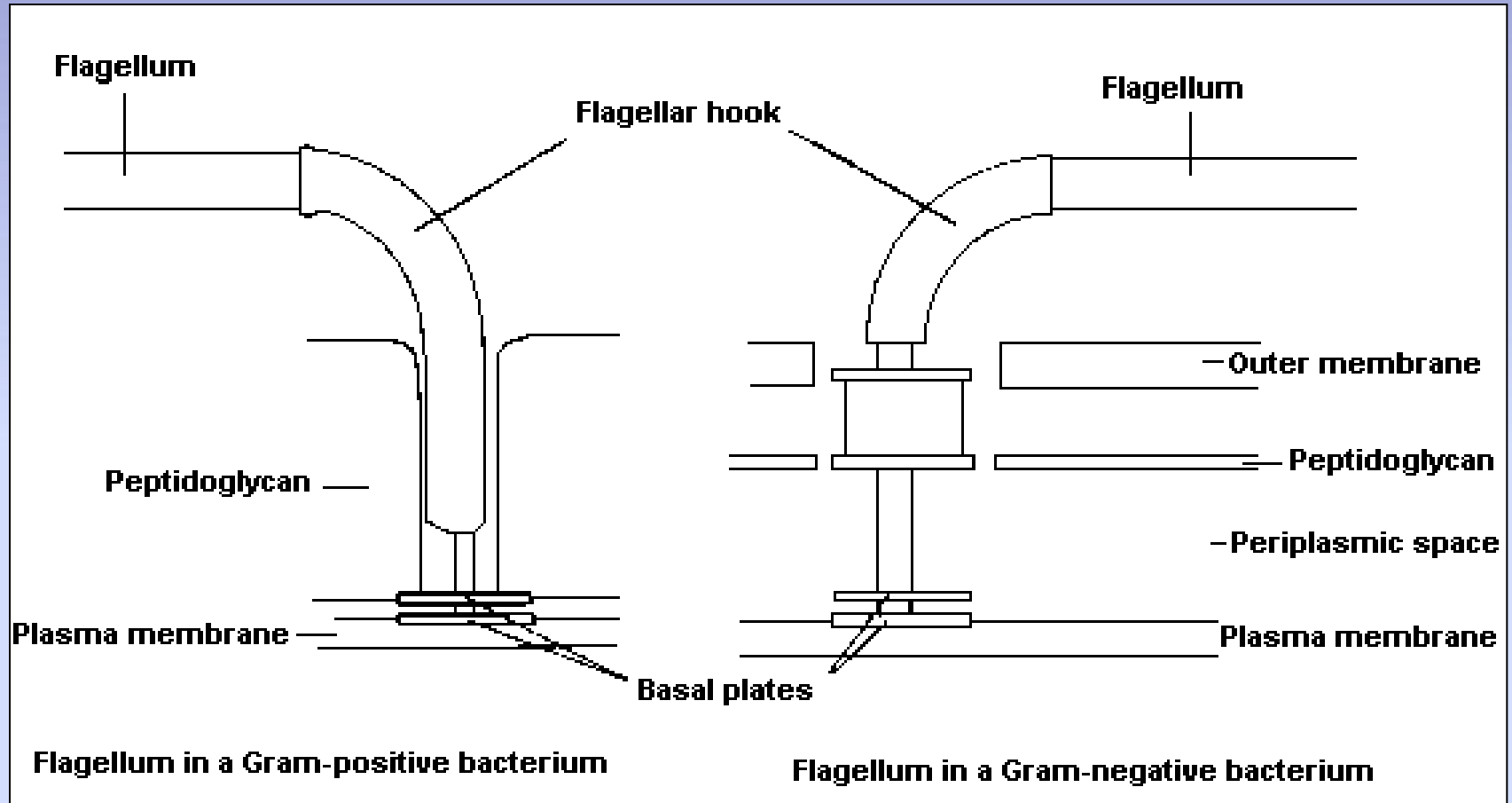
Despite the intricacies of the bacterial flagellum, biologists are unravelling its workings and making great headway in understanding how the nanoscale appendage evolved



G- typ B.S.

- B.S. ne tak pevná, navíc vnější membrána
L pruh - vnější membrána
P pruh – PG buněčné stěny



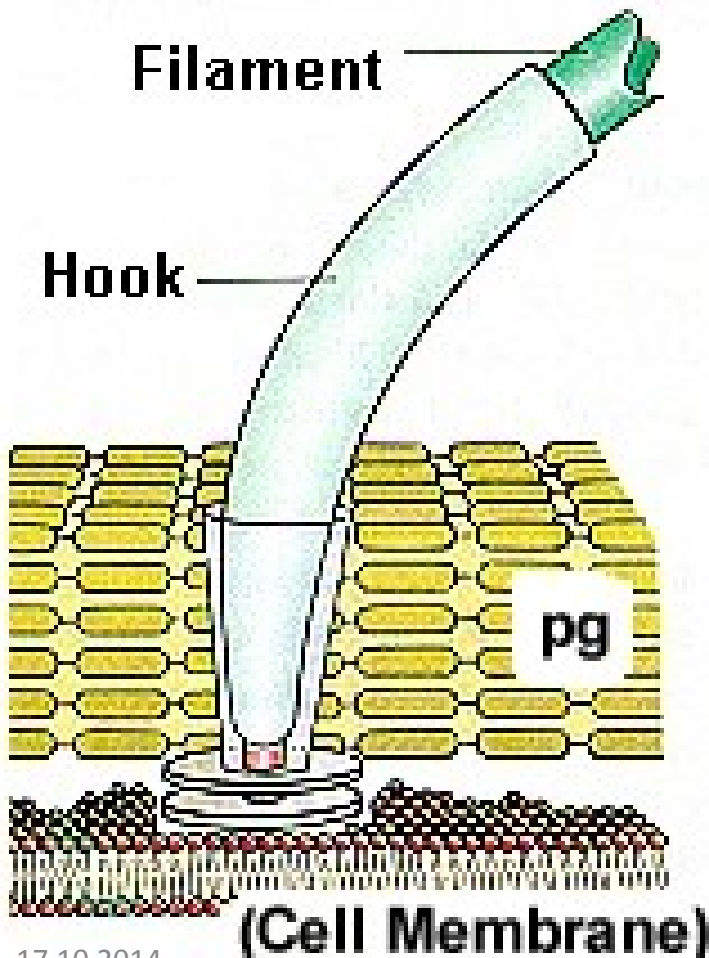


- **G+** :

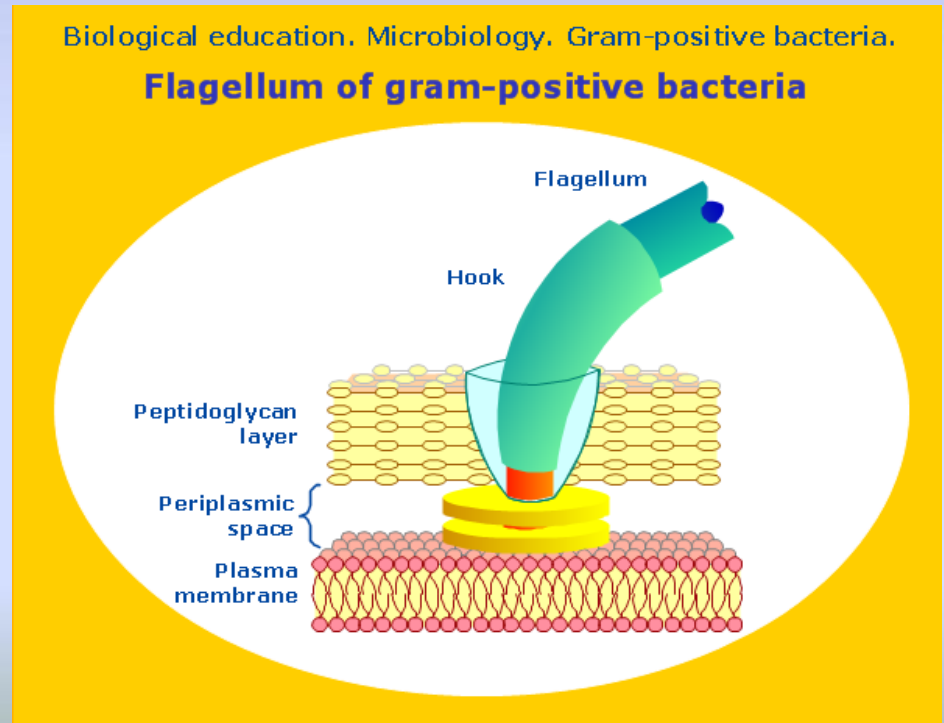
bazální tělísko - 2 disky

spodní disk - v **CM**

horní disk – v **B.S.** - kluzné ložisko -
tam se otáčí osa, háček pro ohyb

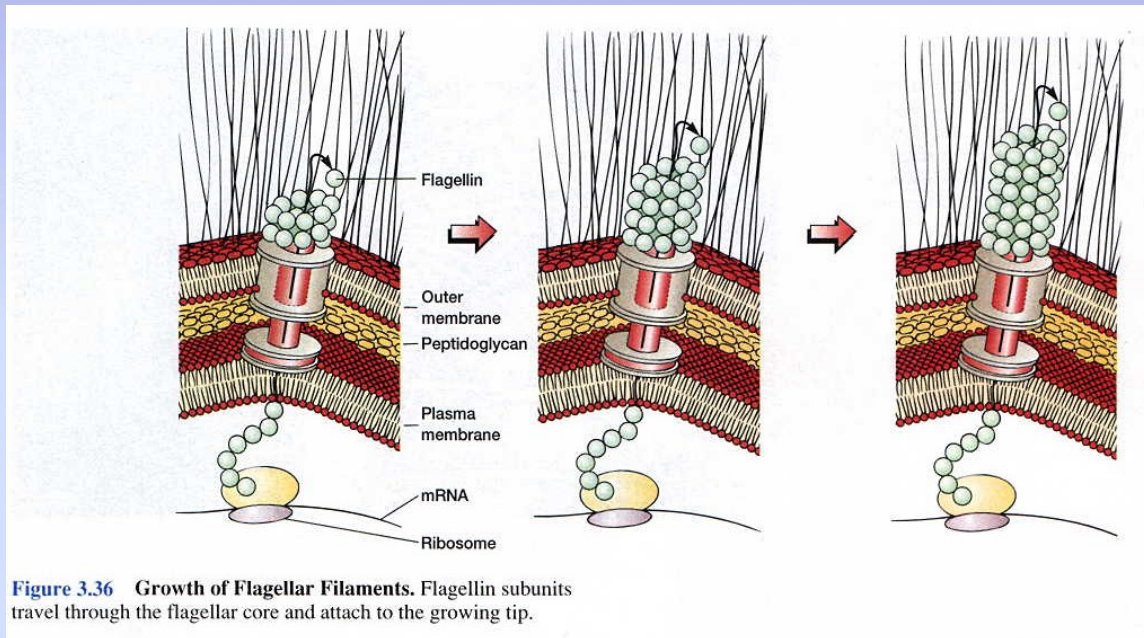


17.10.2014

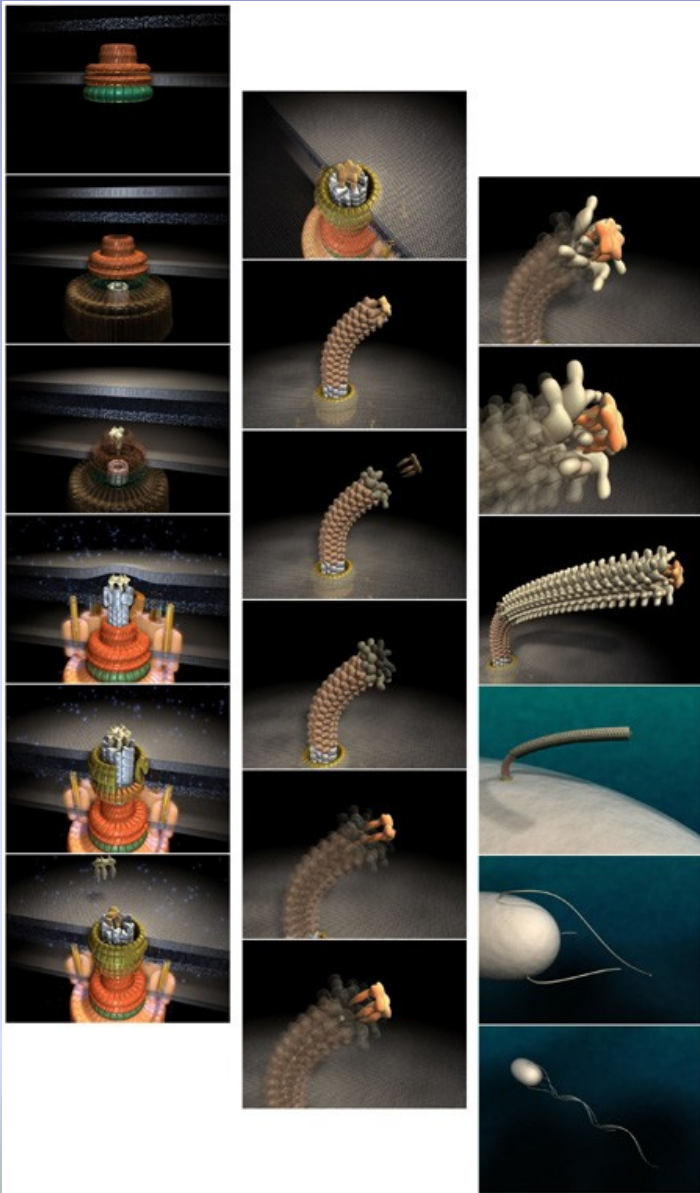


Tvorba:

- Samouspořádání – „self-assembly“
- molekuly flagelinu jsou středem vlákna **transportovány na konec**, vazba na konci bez enzymů, dosyntetizuje se **vždy do stejné délky**.

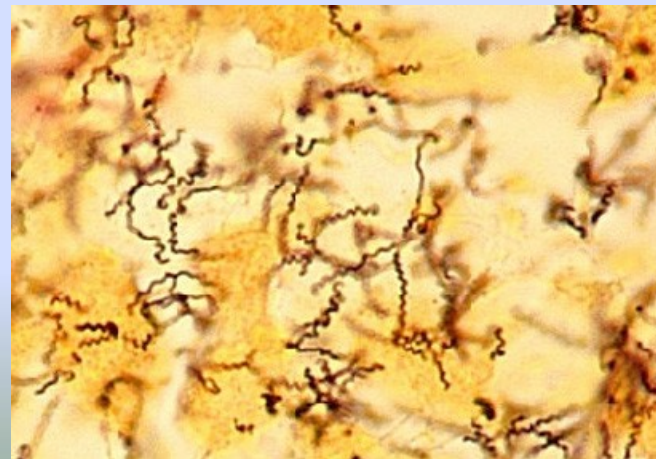
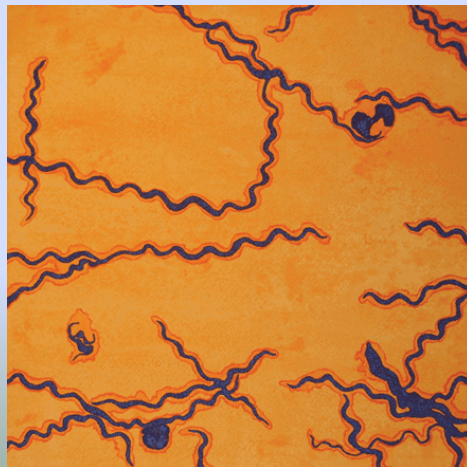


- Geny pro výstavbu bičíku: HAP 1, 2, 3...

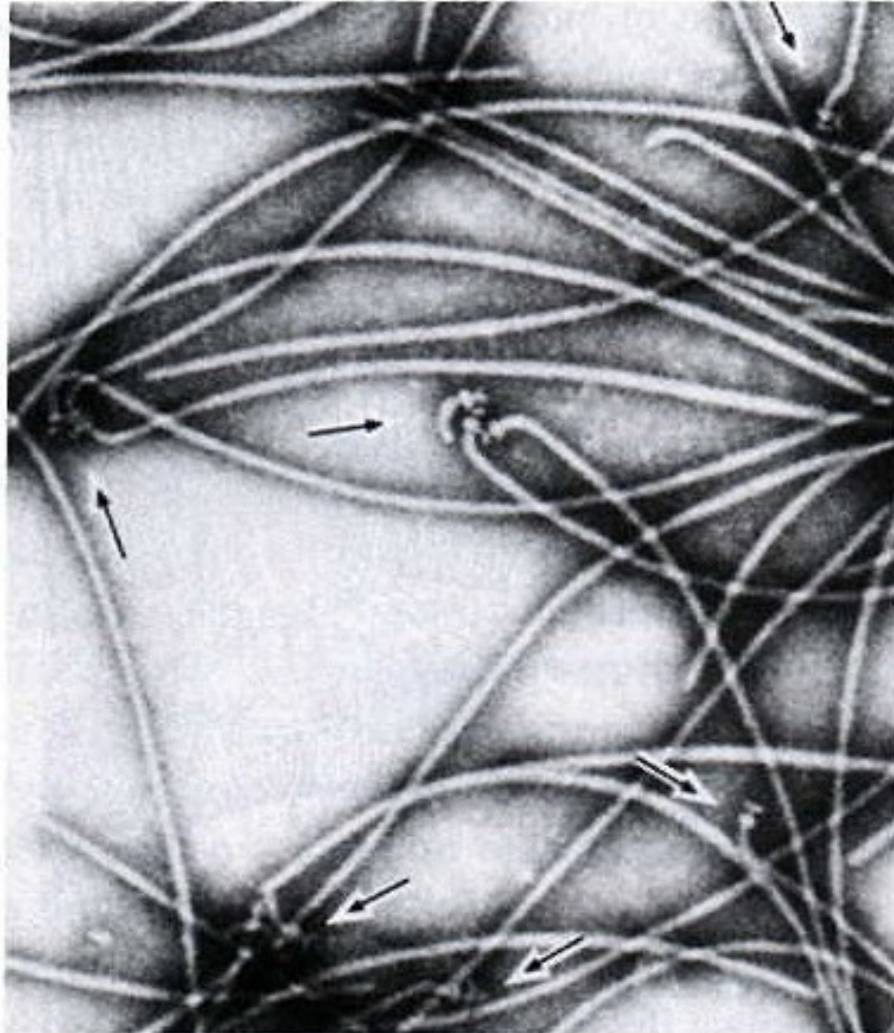


Selfassembly....

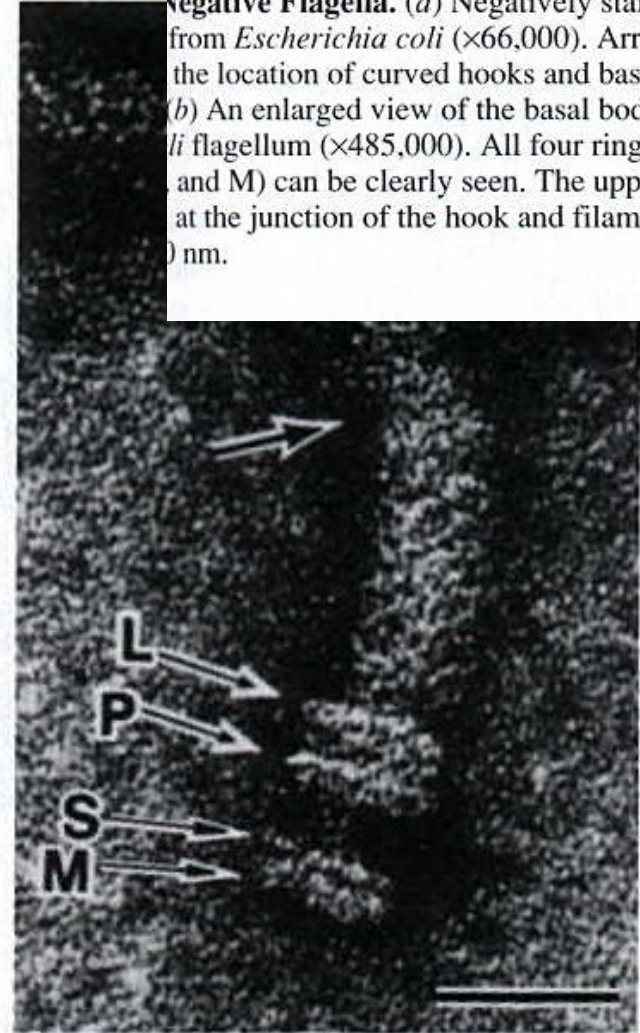
- supramolekulární komplex
- molekul.hmotnost flagelinu větší než pilinu
 - flagelární antigen
 - začíná v CM (oproti fimbriím)
- délka bičíku několikanásobně větší než délka buňky
 - bičíky lze snadno odstranit sklem



Ultrastruktura bičíku






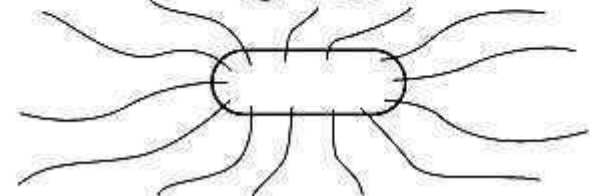
(a)

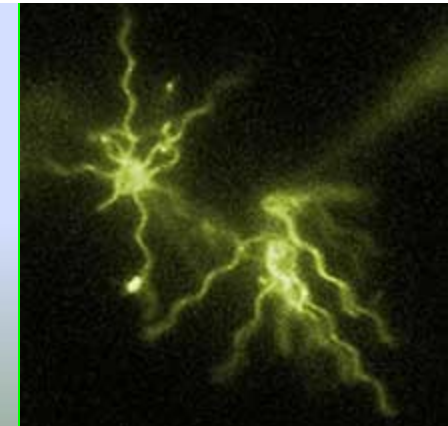
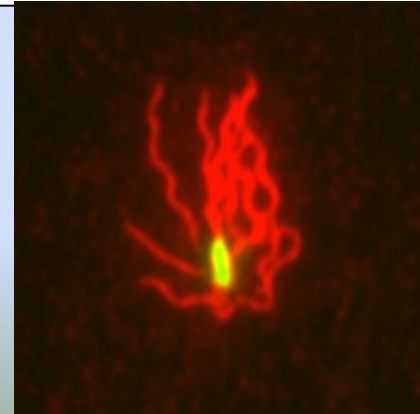
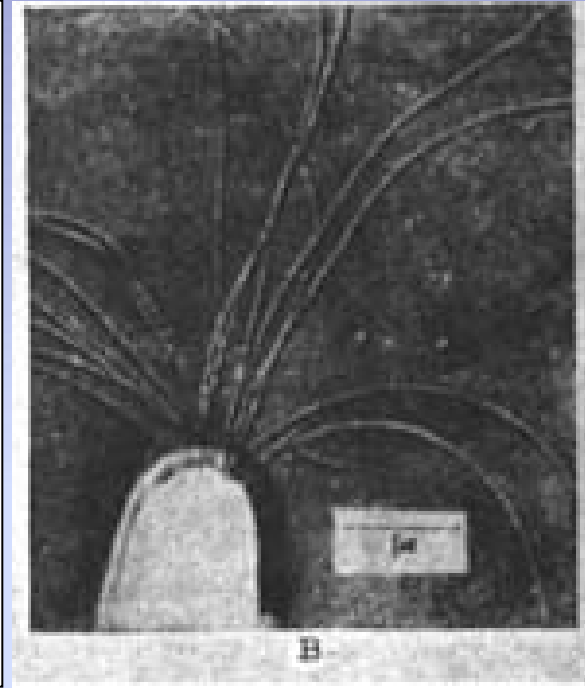


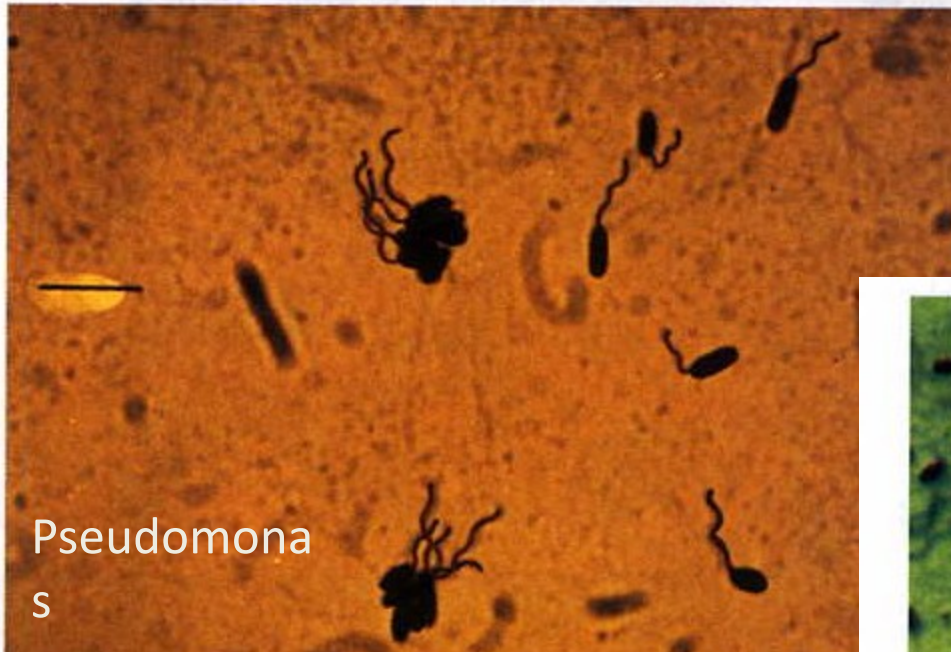
(b)

3.34 The Ultrastructure of Negative Flagella. (a) Negatively stained from *Escherichia coli* ($\times 66,000$). Arrows the location of curved hooks and basal (b) An enlarged view of the basal body of *E. coli* flagellum ($\times 485,000$). All four rings (L, P, S, and M) can be clearly seen. The uppermost ring is 20 nm thick. The lowermost ring is 20 nm thick.

uspořádání: taxonomický znak

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





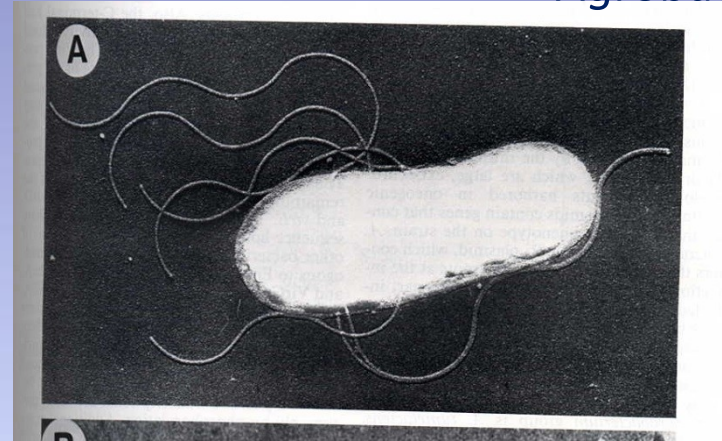
(c)

Figure 3.33 Flagellar Distribution. Examples of various patterns of flagellation as seen in the light microscope. (a) Monotrichous pole flagellation (*Pseudomonas*). (b) Lophotrichous flagellation (*Spirillum*). (c) Peritrichous flagellation (*Proteus vulgaris*, $\times 600$). Bars = 5 μm .

17.10.2014

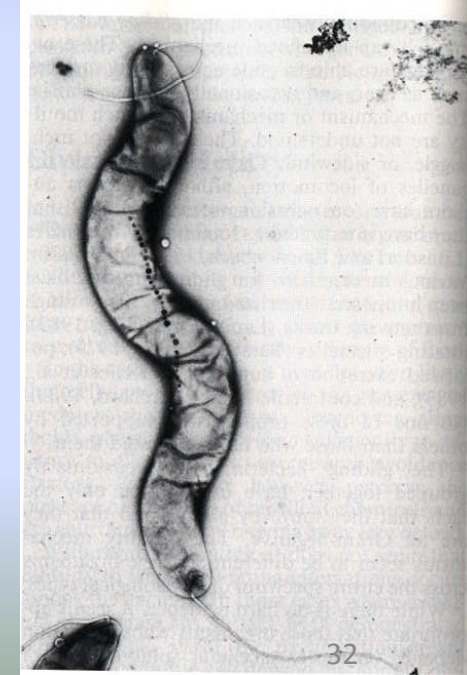
**Pozorování pohybu bičíku –
visutá kapka**

- důležitý dostatek kyslíku
v temném poli a intenzivním
světle



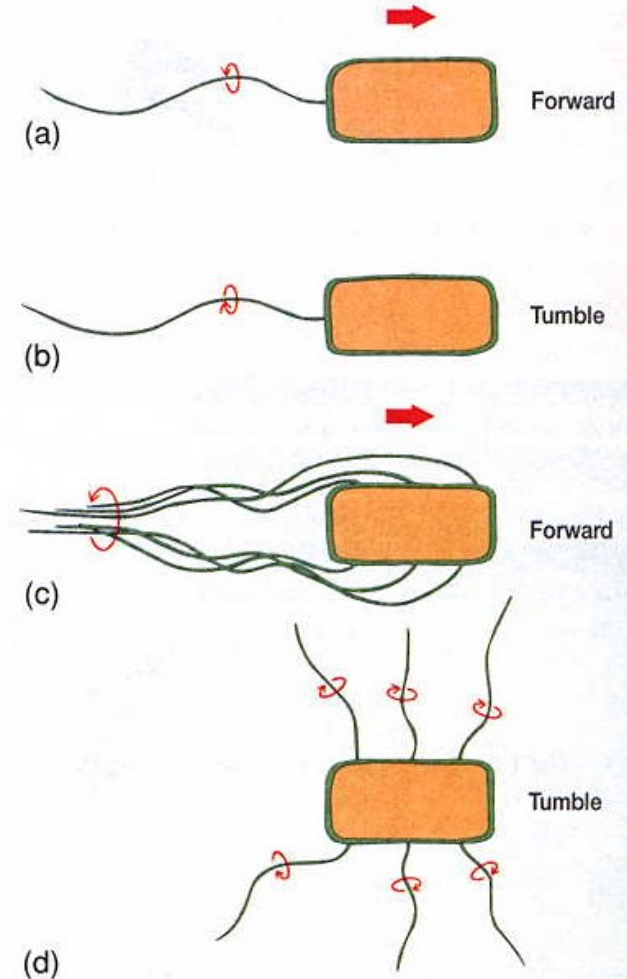
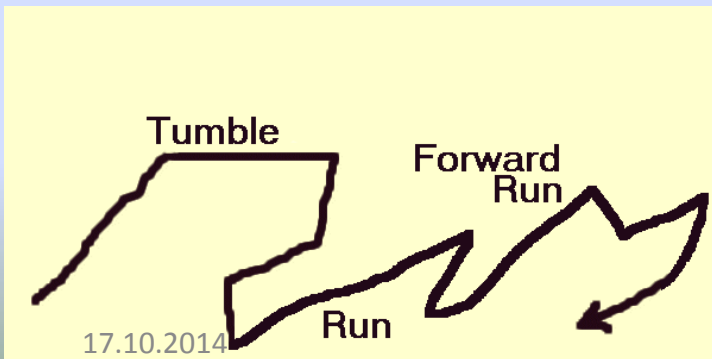
Pozorování bičíků samotných


- **světelný mikroskop** po
spec. barvení (obalení
bičíku vrstvou mořidla,
znásobení a zviditelnění
jeho průměru)
- **elektronový mikroskop** –
negativní barvení
otiskové preparáty po
rychlém zmražení na -150 C

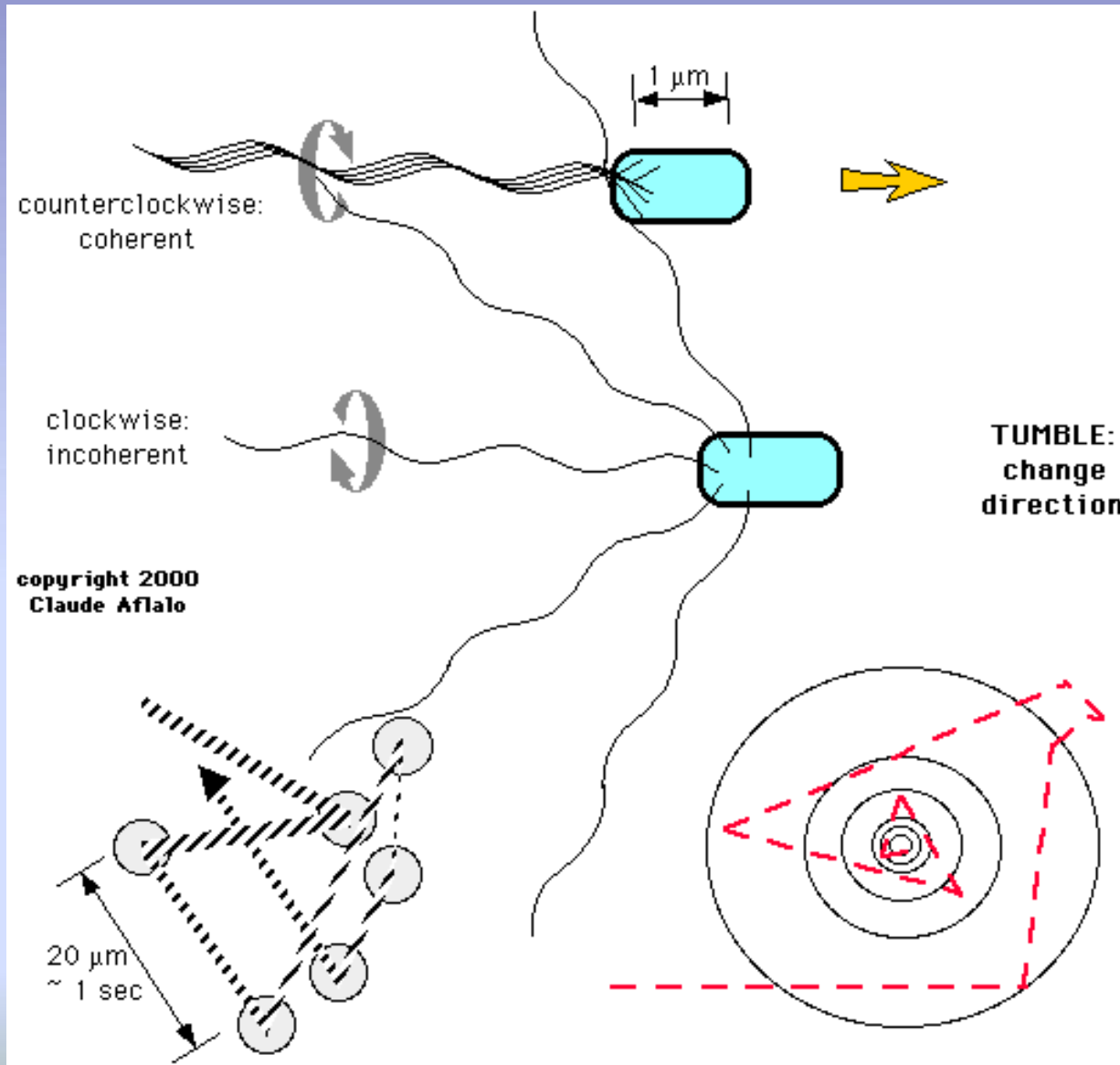


- 1) polárně – 1 nebo oba póly
- **monotricha** (*Pseudomonas*): pohyb dopředu: proti směru hodinových ručiček. Otáčení buňky: po směru hodinových ručiček.
 - **amfitricha** (*Spirillum*)
 - **lofotricha** (*Spirillum*)

- 2) po celém povrchu – **peritricha** (*Proteus vulgaris*, *Agrobacterium*).
- **Pohyb dopředu:**
 - shloučení bičíků a pohyb proti směru hodinových ručiček.
 - **náboj**
 - **Rozpletení = kroucení buňky na místě**
 - „Chce-li“ se buňka pohybovat jedním směrem, namotá bičíky, které jsou ve směru pohybu, na sebe a je tlačena bičíky druhé strany



 **Figure 3.37 Flagellar Motility.** The relationship of flagel rotation to bacterial movement. Parts (a) and (b) describe the mc monotrichous, polar bacteria. Parts (c) and (d) illustrate the mov of peritrichous organisms.



- vnější faktory ovlivňující pohyb:

magnetické pole Země (zvl. struktury – magnetosomy (*Aquaspirillum*) od dvou do několika desítek, uvnitř či ve středu buňky, málo v blízkosti jádra)

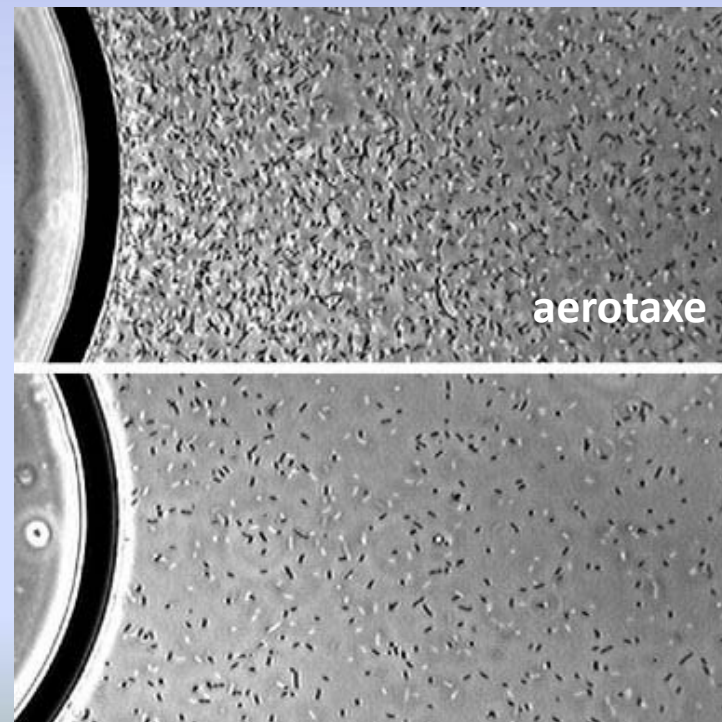
chemotaxe (odpověď na změny ve vnějším prostředí, funguje i při

↑ c živin, negativní chemotaxe od barviva, rychlost pohybu úměrná koncentraci barviva)

fototaxe (odpovědí na světlo

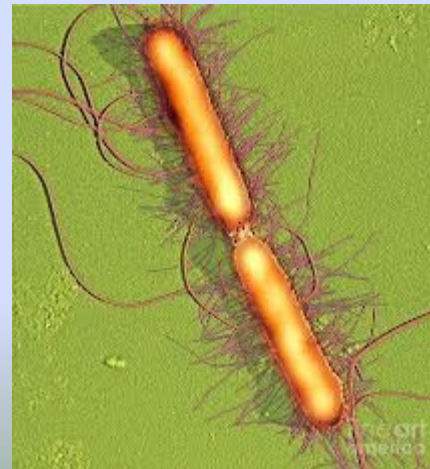
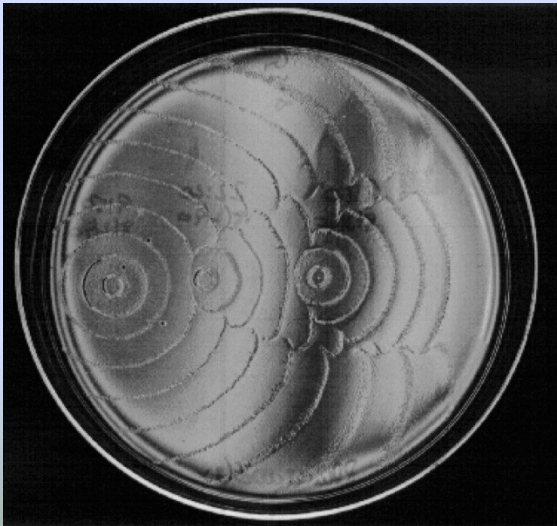
je pohyb ↑ rychlosti než při chemotaxi)

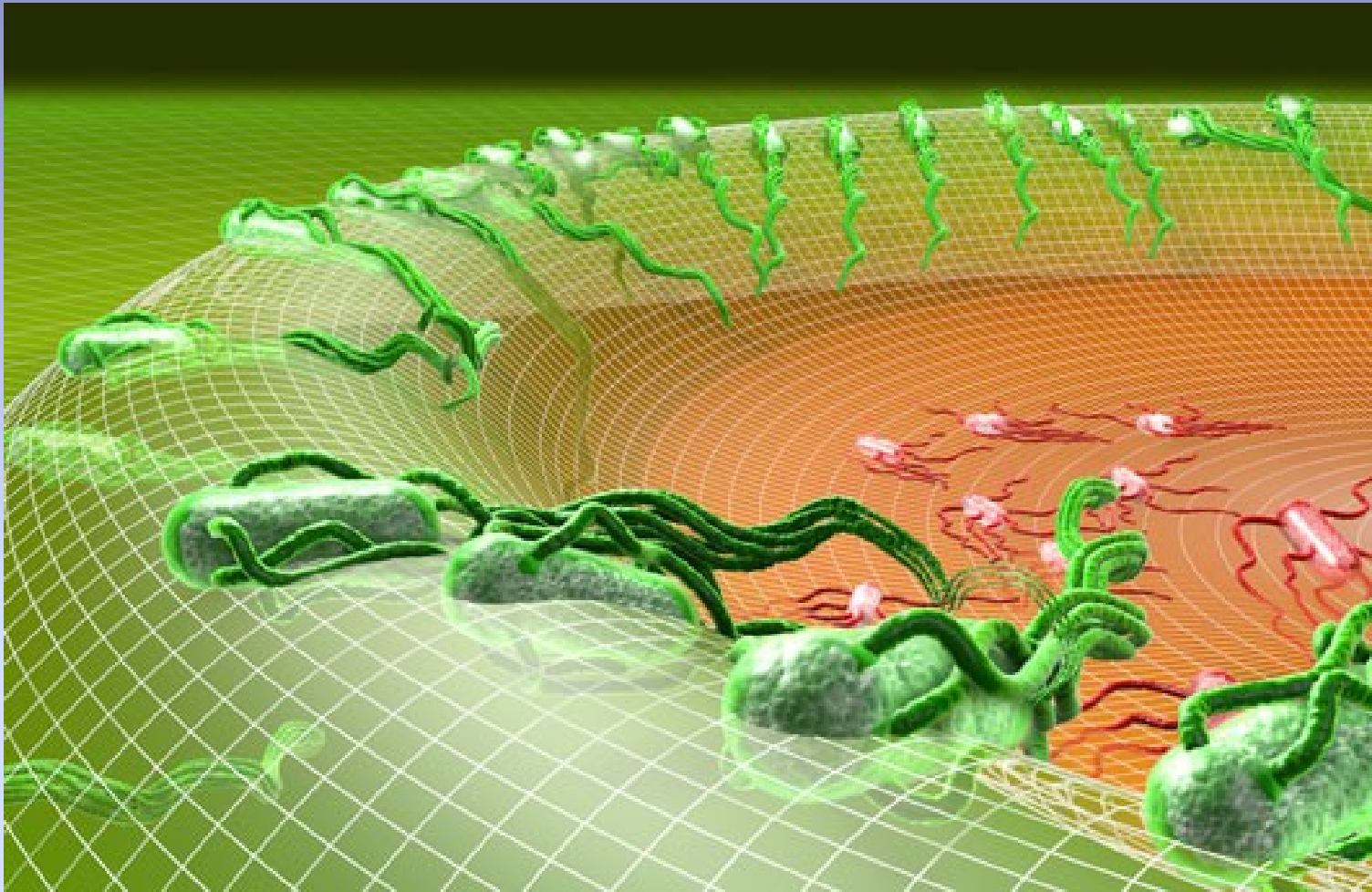
aerotaxe



Plazivý pohyb kolonií (swarming)

- ***Proteus, Vibrio***
- pohyb indukovaný kontaktem s tuhým médiem
- delší buňky, více bičíků
- oblak, roj buněk, který se pohybuje koordinovaným pohybem
- má schopnost přerůstat i vyvýšené útvary na médiu



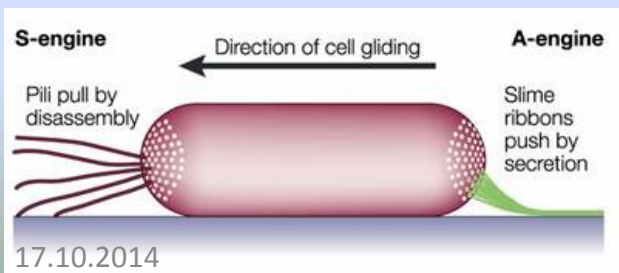


Quantitative measurements of their growth show that a population of bacteria that migrates on a surface grows at constant density, similar to bacterial growth in a continuous culture such as a chemostat.

Klouzavý pohyb (Gliding motility)

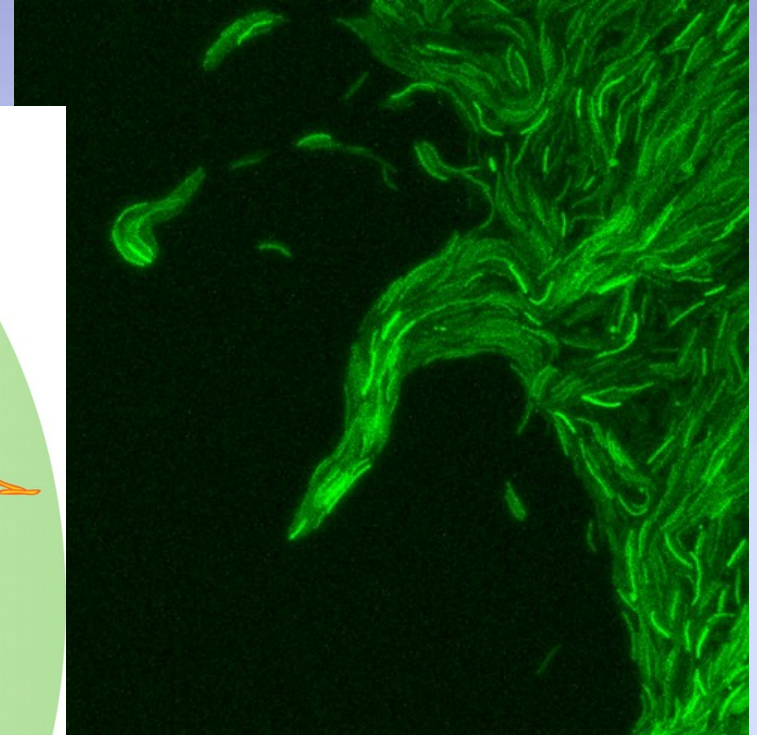
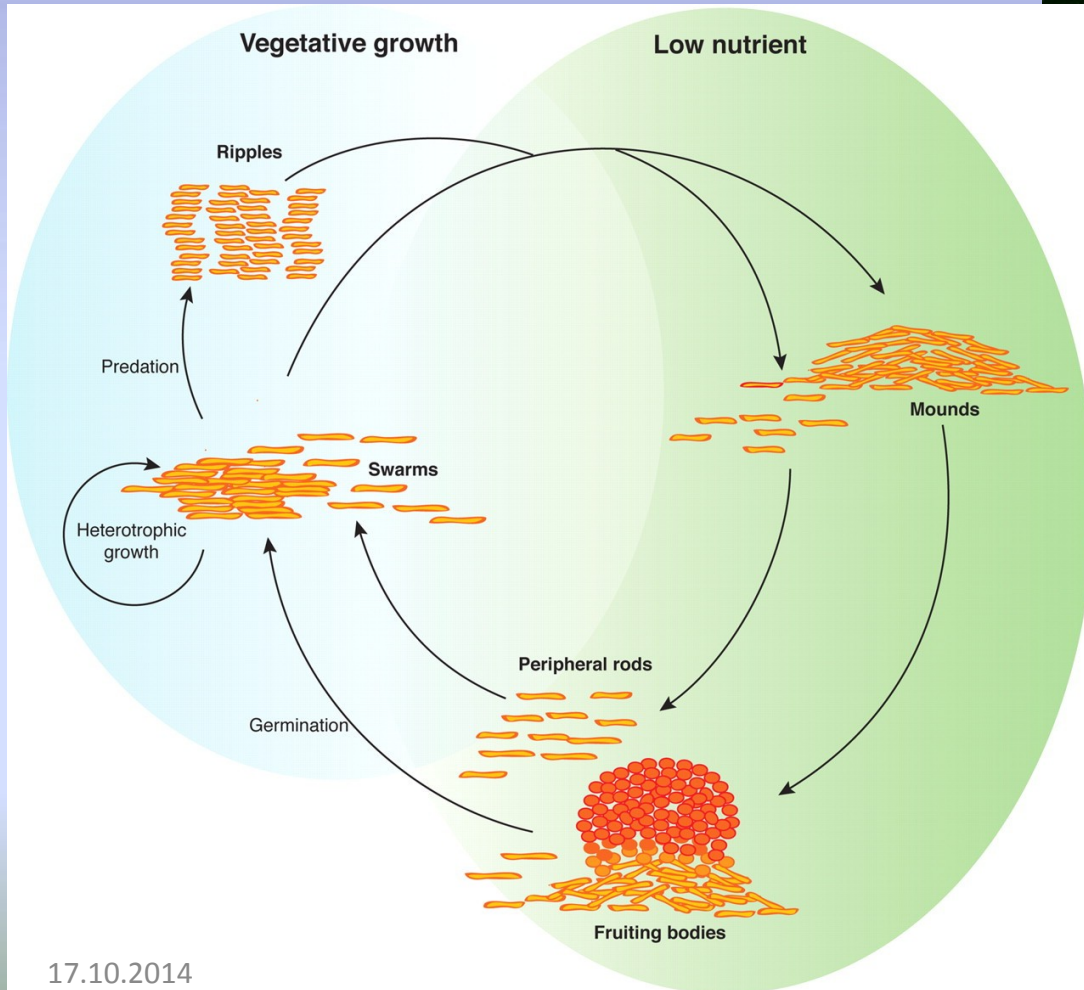


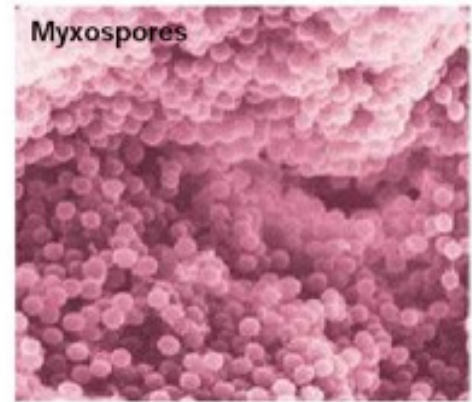
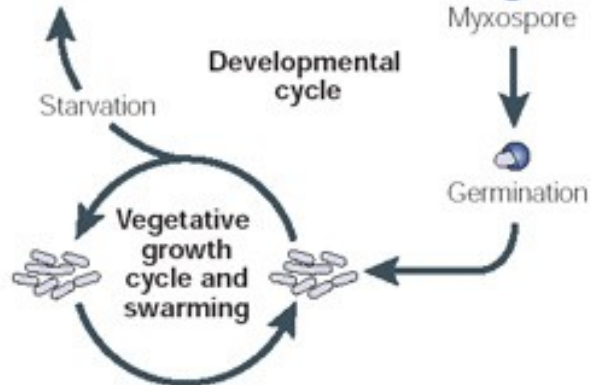
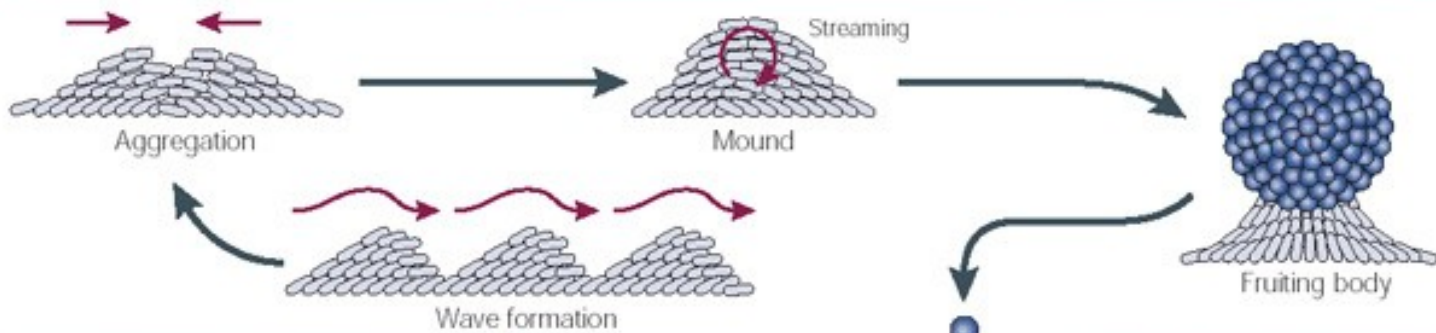
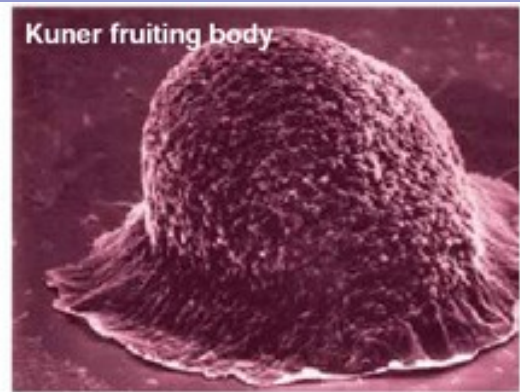
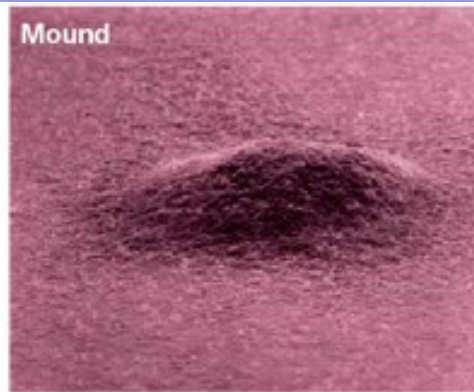
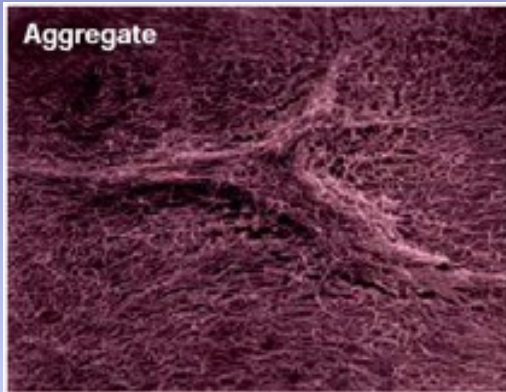
- na pevných površích
- mechanismus nejasný
- pmf patrně zahrnutý
- přizpůsobení – slizy, surfaktanty, struktury podobné motoru v BS, specif. membránové komponenty, které tvoří reverzibilní vazbu se substrátem, actine-like systém
- Makoto Miyata, profesor Osaka City University zkoumal klouzavý pohyb *Mycoplasma mobile*
- Za pomoci **cytoskeletárních filament udržují nesférický tvar**. („They look like schmoos that are pulled along by their heads. How they are able to glide is a mystery“.)



Miyata, M., Ryu, W.S., and Berg, H.C. "Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding." *J. Bacteriol.* 184, 1827-1831 (2002).

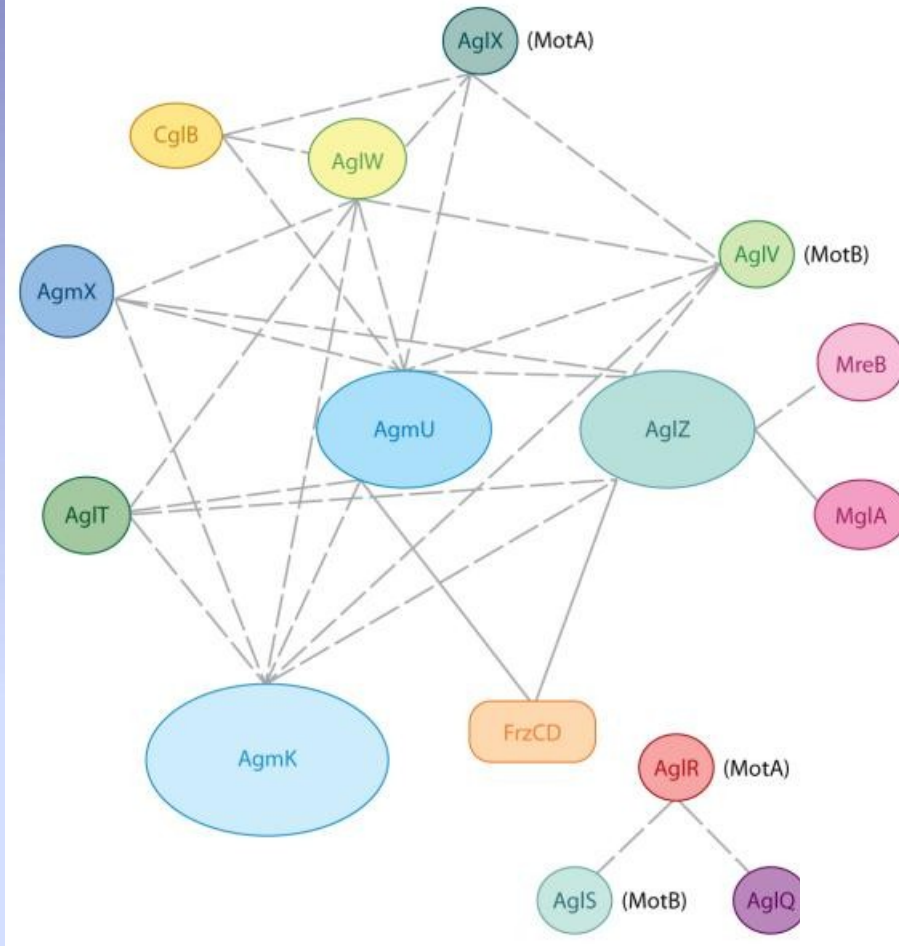
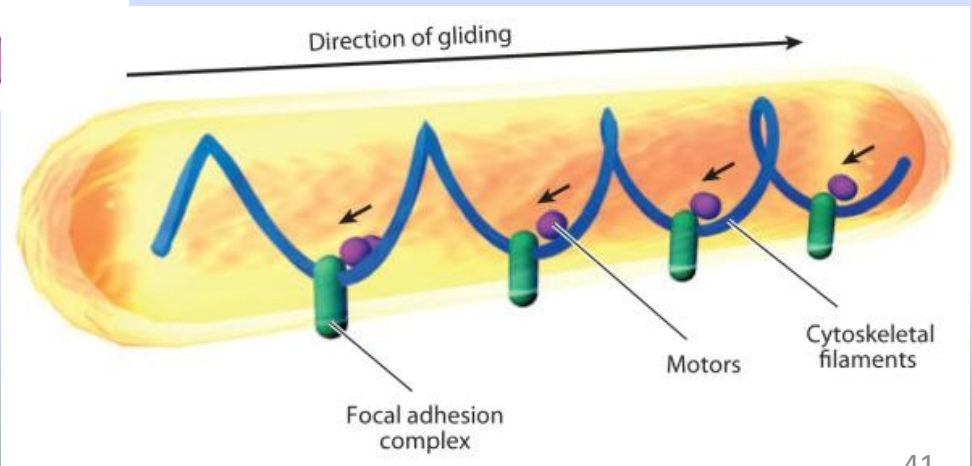
Klouzavý pohyb - tvorba plodnice myxobakterií





Gliding motility

Large focal adhesion complexes penetrate the cell envelope, stick to the substratum at one end, and connect to cytoskeletal filaments at the other end. Motor proteins push backward (marked by small arrows) against those focal adhesion complexes, pushing the cells forward.



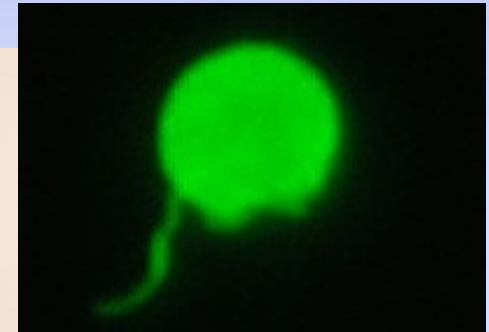
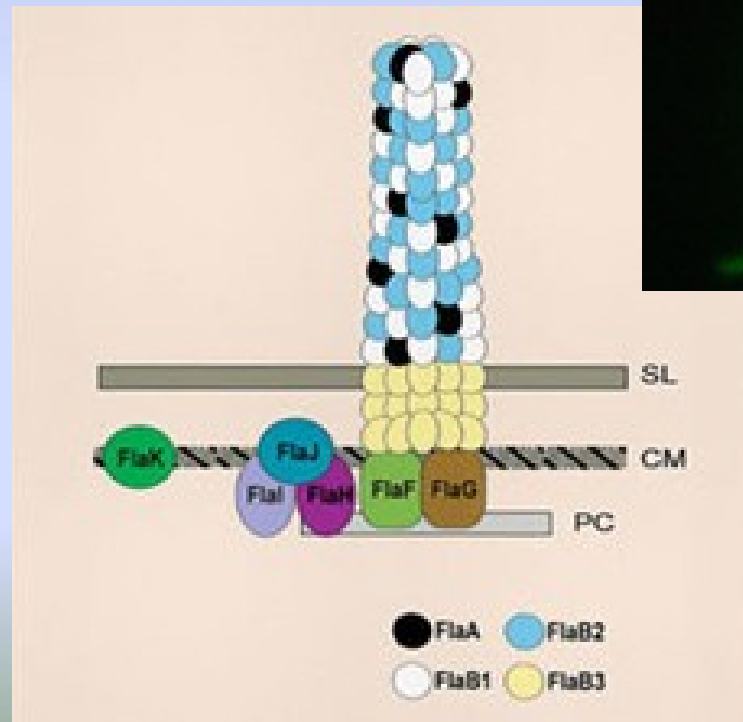
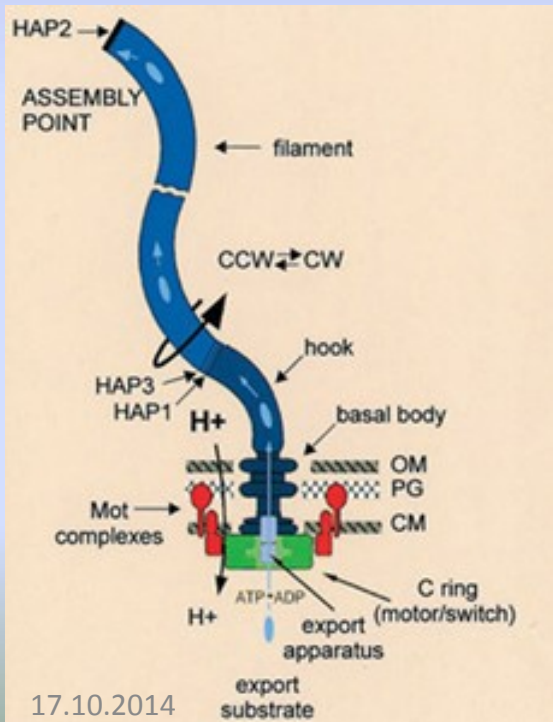
Interakce proteinů zahrnutých do klouzavého pohybu.

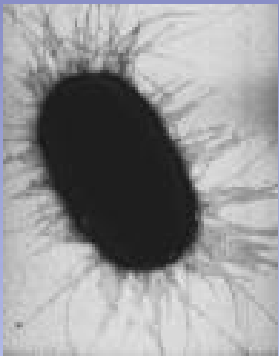
Bičíky archeobaktérií

- strukturní a funkční podobnost bakteriálním bičíkům

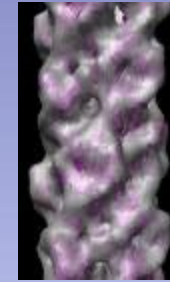
Rozdíly

- pohon ATP (mechanismus neznámý)
- bičík nemá centrální dutiny – nemožnost dorůstání od konce
- koordinovaný pohyb více filament

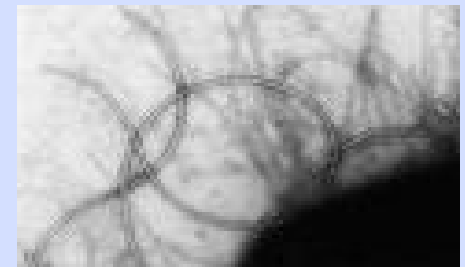




PILI - fimbrie



- Různě velké, typicky u G-
 - struktura B.S, stovky
 - duté, vždy nepohyblivá trubička - 3, 4 nebo 5 vláken stočených do spirály - **pilin**
 - kratší než bičík
 - \varnothing 2-8 nm, délka 0,1 – několik nm, 3-5 molekul
 - Fce: přenos DNA konjugací, přichycení fágů
- Pohyb (twitching motility); adheze k nenabitým povrchům



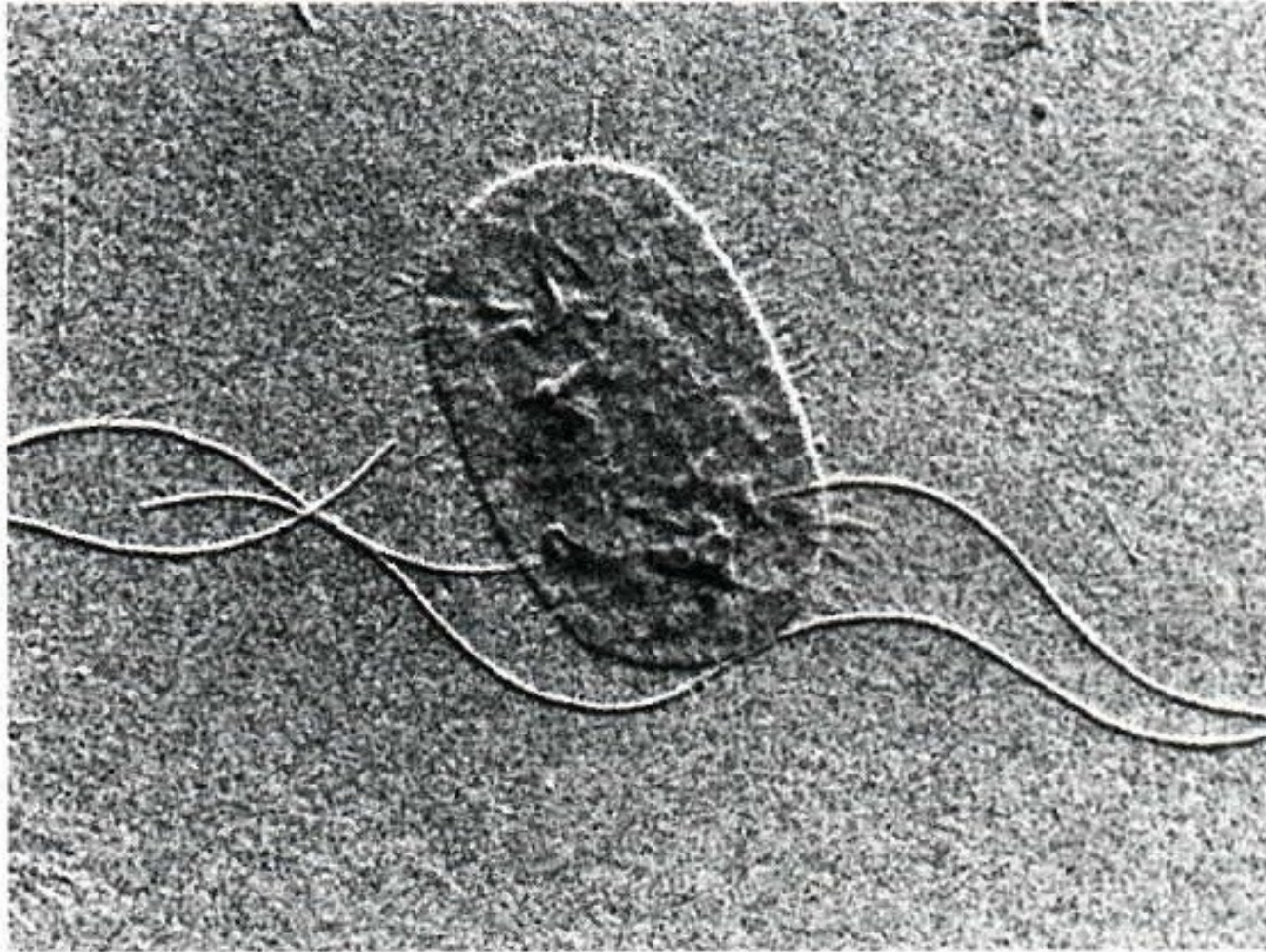


Figure 3.32 Flagella and Fimbriae. The long flagella and the numerous shorter fimbriae are very evident in this electron micrograph of *Proteus vulgaris* ($\times 39,000$).

PILI – fimbrie - typy

I.

- kódované chromozomálně
- specifická kolonizace u symbiontů, parazitů a patogenů
Př: Vibrio cholerae O1, E.coli – uropatogenní P pilus, adherentnce fimbrie + enterotoxin E. coli)

II.

- **sex fimbrie** - kódované konjugativním plazmidem u donora DNA, můstek pro plazmid (F pilus u *E.coli*, konjugativní plazmidy salmonel)

barvení :

- kys.fosfowolframová
- kys. osmičelová

IV.

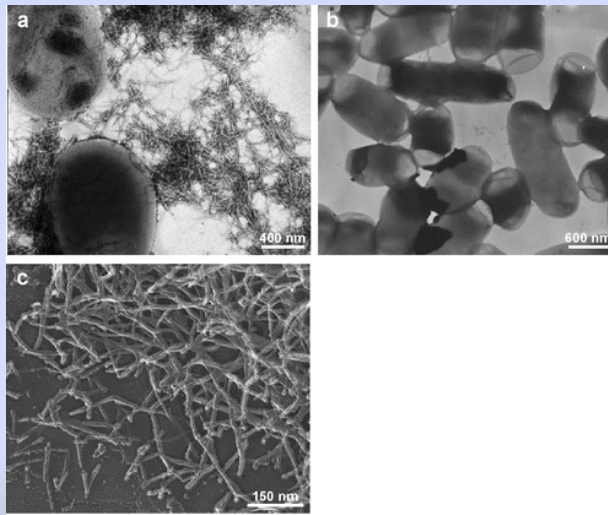
„odskočení“ buněk streptokoků způsobuje „vrubkování“ kolonií

Přenos DNA – pilli?? Proteinové kanálky??

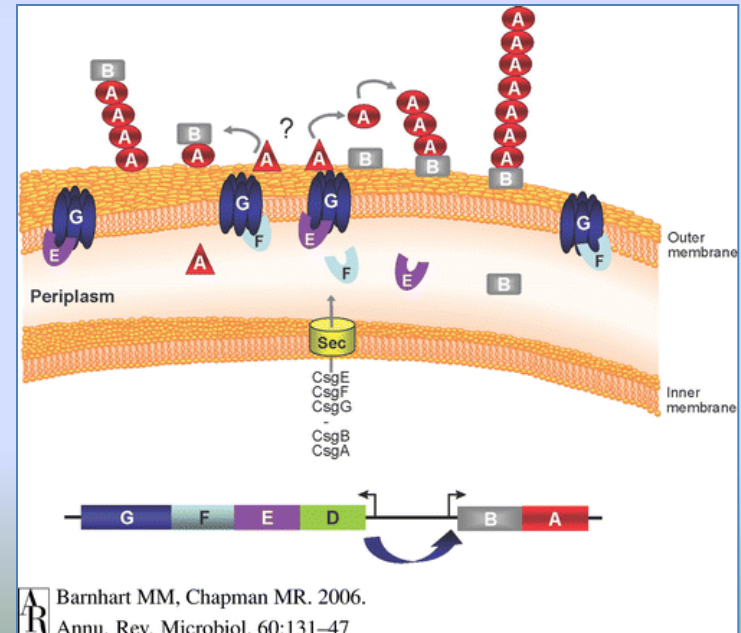
- **Transformation and conjugation permit the passage of DNA through the bacterial membranes and represent dominant modes for the transfer of genetic information between bacterial cells or between bacterial and eukaryotic cells. As such, they are responsible for the spread of fitness-enhancing traits, including antibiotic resistance. Both processes usually involve the recognition of double-stranded DNA, followed by the transfer of single strands. Elaborate molecular machines are responsible for negotiating the passage of macromolecular DNA through the layers of the cell surface. All or nearly all the machine components involved in transformation and conjugation have been identified, and here we present models for their roles in DNA transport.**

Curli

- Proteinové komponenty *Enterobacteriaceae*
- forma amyloidních vláken (strukturou);
- Proces jejich samouspořádání proto model formování amyloidních vláken (např. při výzkumu Alzheimerovy, Huntingtonovy choroby a onemocnění způsobených priony)
- Objeveny 1980
- Adheze na povrchy, agregace buněk, formování biofilmu, invaze do hostitele
- Indukují záněť



Barnhart MM, Chapman MR. 2006. Annu. Rev. Microbiol. 60:131-47



Barnhart MM, Chapman MR. 2006. Annu. Rev. Microbiol. 60:131-47

Příklady variability struktur bakteriální buňky

Příklady faktorů ovlivňujících
morfologii a funkci struktur
bakteriální buňky

In vivo?? In vitro???

Cytoplazma

- Prostorová organizace (vysoký stupeň)
 - řízeno ATPázami, protonovým gradientem membrány, aktinovými vlákny – **udělují polaritu**
 - maximální hustota a rychlost a specifita reakcí
- Mobilizace cytoplazmy (difúze? X)
 - řízeno IR zářením a generováním vody exkluzní zóny
- Mikroskopická struktura - **gel**

Nukleoid, plazmidy

- ATPáza ParA
 - aktivní rozdělování nízkokopiových plazmidů
 - par-geny i na chromozomu!
 - par-geny kódují – centromeru a trans-acting proteiny a,b
- TEM
- Nukleoid jako biosenzor – detekce Hg....
- **HU proteiny** – konzervované; nadšroubovice, 3D,
+ **ncRNA** – komplex – architektura chromozomu

Ribozom

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

Biogeneze CM membrány

- Při kolonizaci u parazitů
- shift
- Cílová léčba: ovlivnění mechanismů transportu beta-barelů

Buněčná stěna

- Tvar bňky – souvislost s cytoskeletem
- Ovlivnění komplexů syntetizujících PG - ATB

Polarita buňky

- Zabezpečuje:
 - pohyb za atraktantem
 - pohyb buněk pro tvorbu kolonií
 - vstup do hostitele u parazitů
 - adheze (*Bradyrhizobium* – kořínky)
- ATPázy – pohyb a tvar DNA a struktur

The phrase 'diffusion-and-capture' has been coined to identify the mechanism by which a protein moves to a specific location by signals encoded within its primary structure, and is then captured by a target protein (Rudner et al., 2002; Shapiro et al., 2009)

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 cytoplazmatické membrány za regulace cytoskeletu
- b) přímým vstupem produktů do buňky
- Intracelulární patogeni vlastní ligandy reagující s receptory a sekreční systém IV typu translokuje molekuly efektorů 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

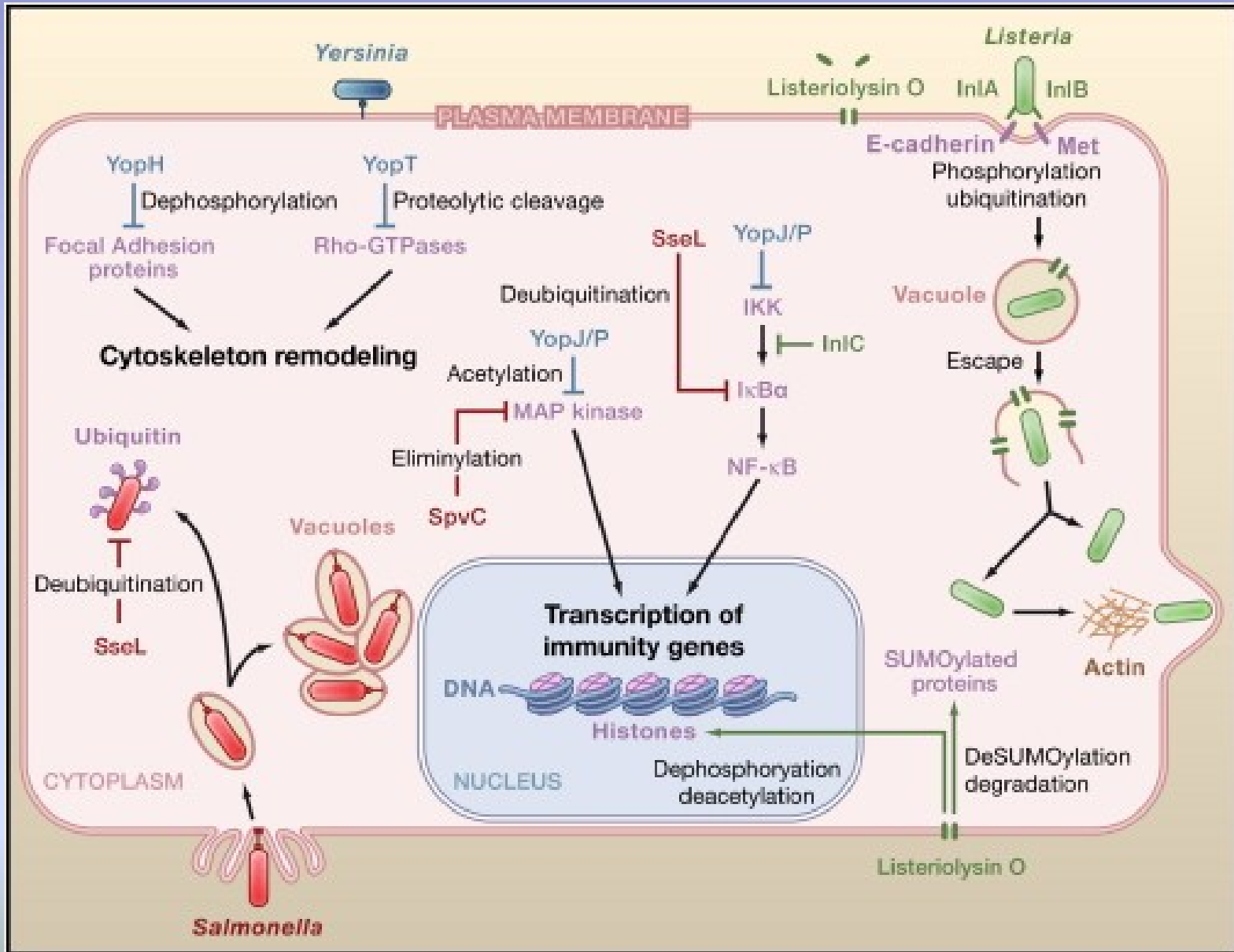
- Naopak - produkují substance vstupující do eukaryotické buňky a ničí síť aktinových vláken
- Tím zabrání pohlcení a natrávení eukaryotickou buňkou

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

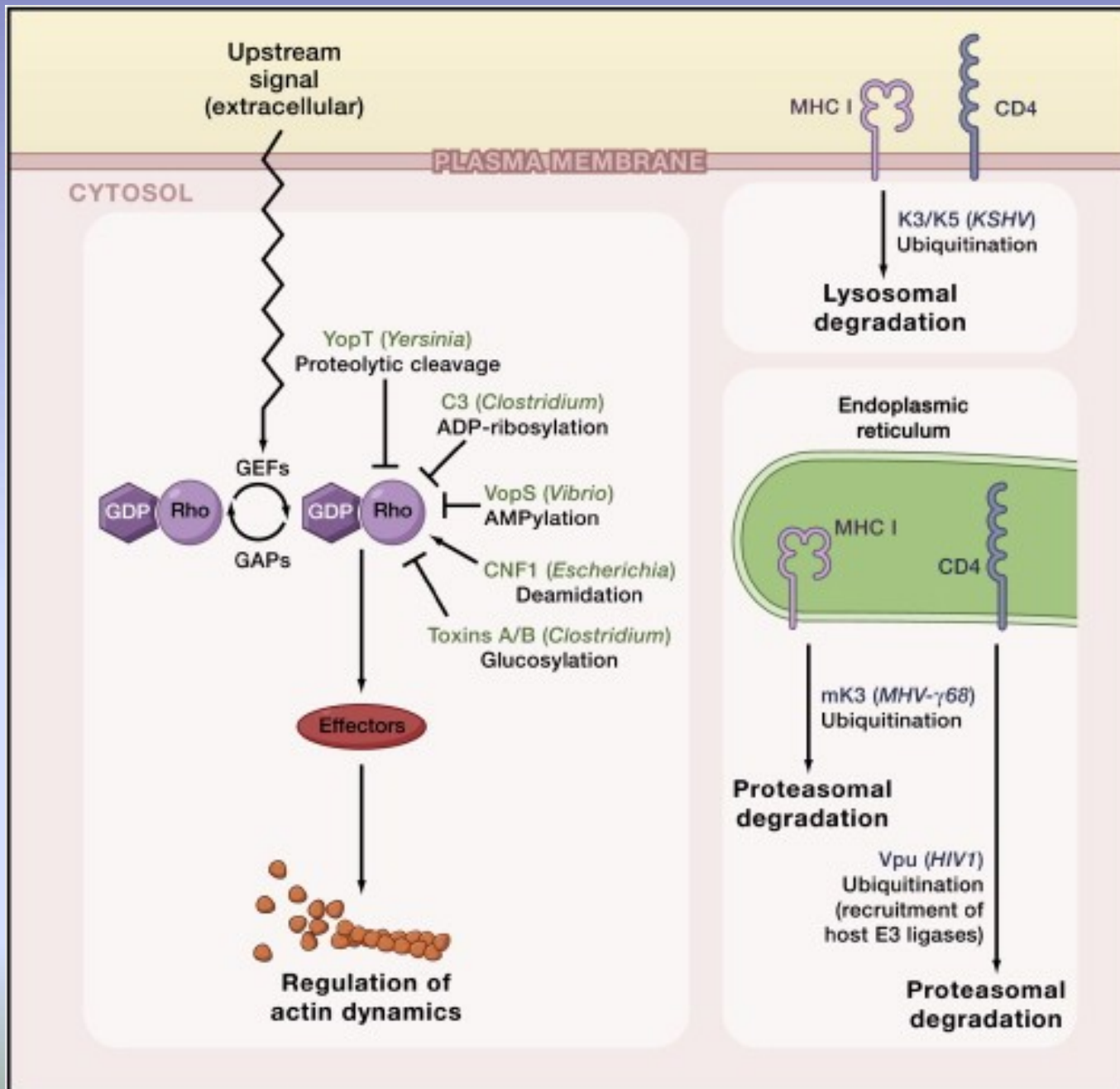
- Intracelulární parazity
- Vstup do vakuol, replikace
- V přítomnosti povrchů epiteliálních buněk se indukuje syntéza některých proteinů důležitých pro adherenci a invazi
- Indukce proteinů stimulována trypsinsenzitivními a nueraminidázaseenzitivními strukturami epitelu

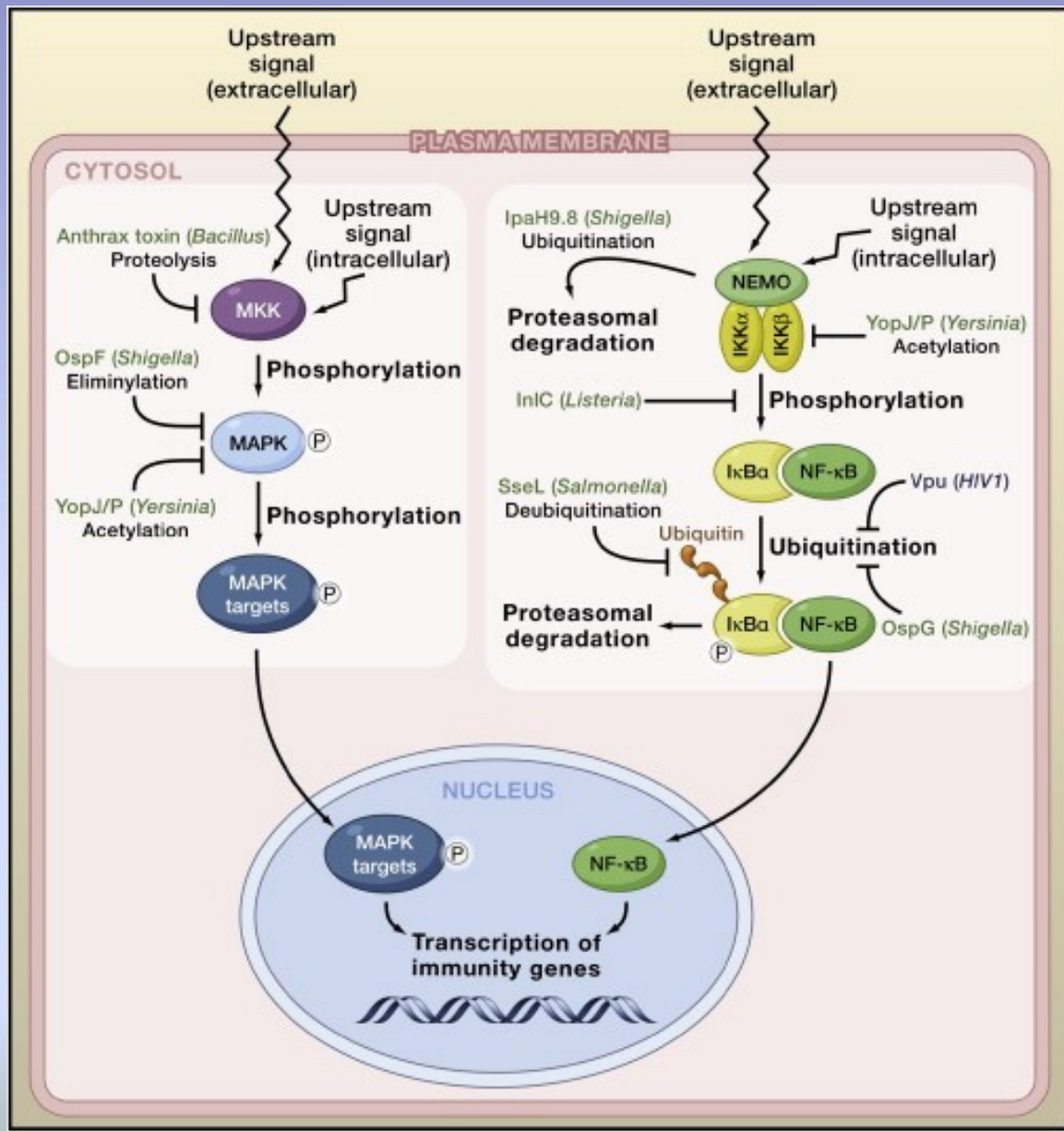


Přestavba cytoskeletu provázející vstup salmonel epitelem

- 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

Děkuji za pozornost