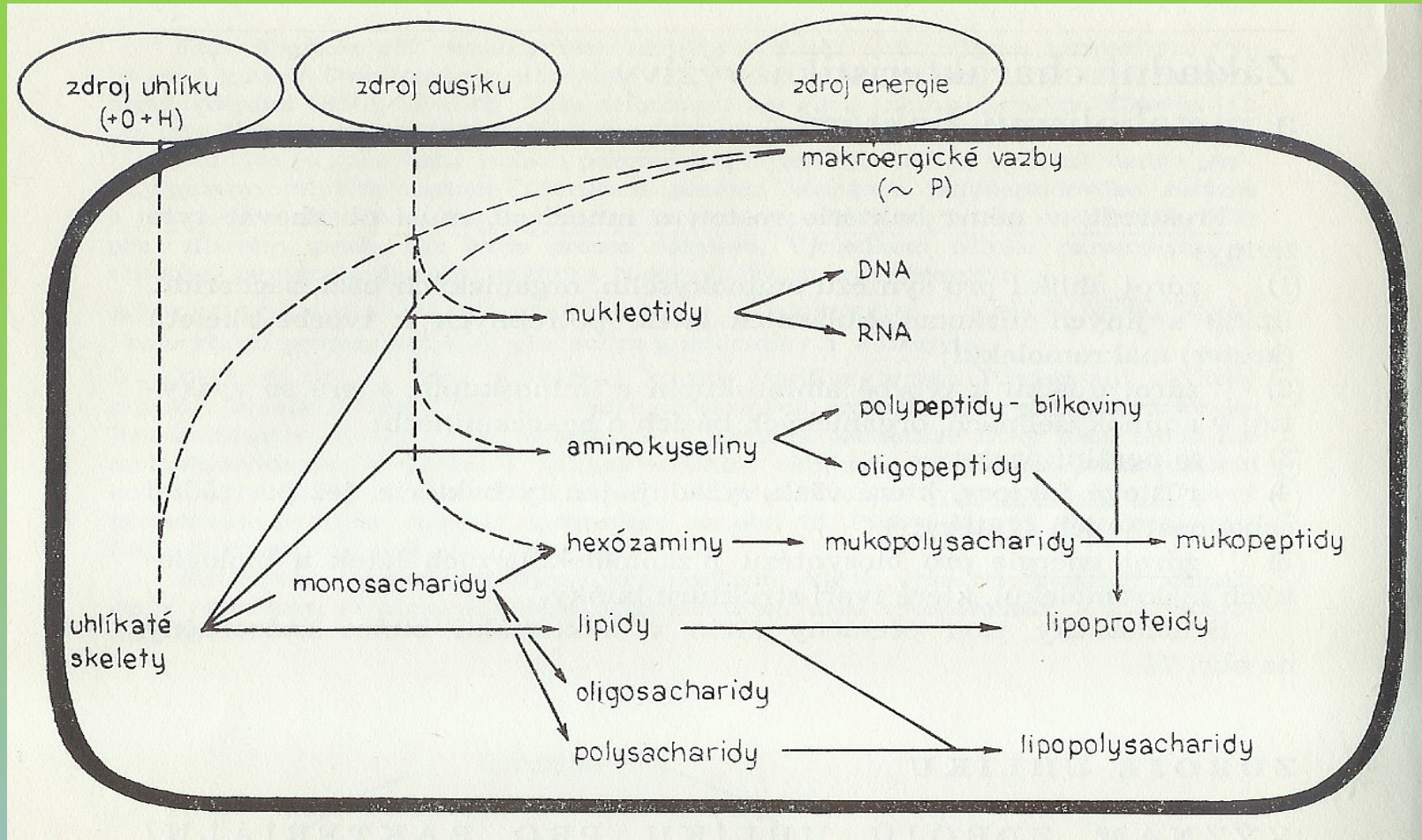


Výživa a transport látek

Prostředí, ve kterém bakterie rostou a množí se, musí obsahovat :

- Zdroj uhlíku – pro syntézu malých organických molekul, sloužících jako skelet makromolekul
- Zdroj dusíku – tvorba amino- a imino- skupin jako součásti organických látek
- Zdroj energie – pro biosyntézu nízkomolekulárních látek a biologických makromolekul, tvořících strukturu buňky
- Minerální prvky
- Růstové faktory – vyžadované organizmy, pokud si je nedokáží syntetizovat

Schéma přeměny živin v buňce



Výživná hodnota zdrojů výživy

- Výživná hodnota závisí na jejich fyzikálním stavu, chemické struktuře a fyziologických vlastnostech buňky
- Z fyzikálně chemických vlastností je nejdůležitější rozpustnost ve vodě, velikost molekuly, prostorová konfigurace, stupeň okysličení, ...
- Makromolekuly vystupující jako zdroj musí být nejdříve rozštěpeny na nízkomolekulární látky
- U nerozpustných látek (tuk, celulóza,..) se uskutečňuje rozklad na rozhraní látka-voda

Zdroje uhlíku

Zdroj uhlíku = výchozí substrát
pro biosyntézu



Zdroje uhlíku

- Rozdělení bakterií podle uhlíkaté výživy
 - * **autotrofní** – základním zdrojem uhlíku je CO_2
 - * **heterotrofní** – základním zdrojem uhlíku je jakákoliv organická látka

Zdroje uhlíku

- U bakterií není autotrofie vázána jen na fotosyntézu.
- Existují **dva způsoby získání energie** - fototrofie a chemotrofie a **dva způsoby získávání uhlíku** – autotrofie, heterotrofie, které jsou vzájemně kombinovatelné.
- Podle výživy lze tedy organizmy rozdělit na fotoautotrofní, fotoheterotrofní, chemoautotrofní, chemoheterotrofní

Zdroje uhlíku

- **Fotoautotrofní** – zelené rostliny, sinice - zdrojem vodíku pro redukci CO_2 je voda, zelené sírné bakterie (*Anoxyphotobacteria*) - zdrojem vodíku je H_2S nebo H_2 . *Chlorobium* může využívat jako zdroj uhlíku vedle CO_2 i acetát (mixotrofie)
- **Fotoheterotrofní** – purpurové sírné (*Chromatium*), purpurové bezsírné (*Rhodospirillum*) využívají jako zdroj energie světelné kvantum (cyklická fosforylace) a zdrojem uhlíku je organická látka. Purpurové sírné mohou ve tmě v přítomnosti kyslíku uskutečňovat aerobní respiraci

Zdroje uhlíku

- **Chemoautotrofie** (chemolitotrofie) – známa jen u bakterií. Energie se získává oxidací redukovaných anorganických sloučenin (síry, dusíku, železa,..) a zdrojem uhlíku je CO_2 .
- **Chemoheterotrofie** – zdrojem uhlíku a energie je prakticky jakákoliv oxidovatelná organická látka – většina organismů
- **Bakterie metylotrófní** – jako zdroj energie a uhlíku slouží většinou jednouhlíkaté sloučeniny obsahující metylskupinu $-\text{CH}_3$ (metan, dimetyleter, metanol).

Metylotrofie je obligatorní (*Methylomonas*) nebo fakultativní (*Hyphomicrobium*)

Zdroje uhlíku

- Zdroje uhlíku využívané heterotrofními organizmy
 - soli organických kyselin (monokarbonových s nasycenými i nenasycenými vazbami; monokarbonových hydroxy- a keto-kyselin; dikarbonových s nasycenými vazbami; trikarbonových hydroxykyselin)
 - sacharidy (monosacharidy - pentózy, hexózy; disacharidy – sacharóza, trehalóza, maltóza, celobióza, laktóza, melibióza; trisacharidy – rafinóza, melisitóza; polysacharidy)
 - lipidy
 - aminokyseliny, peptony, bílkoviny

Zdroje dusíku

- Amonné soli, amoniak – pro většinu organizmů – snadno se transportují do buňky (nejvhodnější jako síran a fosfát nebo sůl organických kyselin)
- Dusičnany – využívány houbami a některými kvasinkami nebo bakteriemi (nejprve nutná redukce a amonné soli)
- Aminokyseliny
- Močovina – výhradně jako zdroj dusíku u urobakterií
- Molekulový dusík – většinou u bakterií a sinic

Zdroje energie

- Světelné kvantum – **fototrofie**
- Organické a anorganické látky – **chemotrofie** (energie se získává oxidoredukčními pochody, jedna látka je oxidována, druhá redukována)
 - akceptor elektronů a vodíku vzniká katabolizmem donoru - **kvašení** (fermentace)
 - akceptorem elektronů a vodíku je molekulový kyslík – **aerobní respirace**
 - akceptorem elektronů a vodíku je kyslík v oxidované anorganické sloučenině **anaerobní respirace** (sířany, nitráty, CO₂, ...)

Zdroje energie

- V závislosti na genetické výbavě mohou **chemotrofní** mikroorganismy vytvářet energii jedním nebo více způsoby
 1. Jen aerobní respirací (*Pseudomonas putida*)
 2. Aerobní i anaerobní respirací, ale ne fermentací (*Paracoccus denitrificans*)
 3. Aerobní, anaerobní respirací i fermentací (*Escherichia coli*)
 4. Aerobní respirací a fermentací (některé enterobakterie)
 5. Anaerobní respirací a fermentací (*Desulfovibrio*)
 6. Jen fermentací (*Clostridium*)
 7. Jen anaerobní respirací (*Methanobacterium*)

Transformace energie (ATP) na jiné formy

- Energii osmotickou – při transportu látek přes cytoplazmatickou membránu a osmoregulaci
- Energii kinetickou – proudění cytoplazmy a pohyb buňky
- Energii elektrickou – povrchový náboj nutný pro sorpci
- Energii světelnou – bioluminiscence u bakterií (*Photobacterium*, *Vibrio*)
- Energii tepelnou – zbytek nevyužité energie

Zdroje minerálních látek

- **Kyslík a vodík** – významně ovlivňují celkový metabolismus buňky. Některé organizmy vyžadují molekulový kyslík a některé mohou využívat molekulový vodík.
- Podle **vztahu ke kyslíku** se organizmy dělí na
 - striktní (obligatorní) aeroby** – aerobní respiratorní metabolismus
 - striktní (obligatorní) anaeroby** – rostou jen v anaerobních podmínkách (i malý parciální tlak O_2 je pro ně toxický)
 - fakultativní anaeroby** – mají metabolické dráhy jak pro respiratorní tak i fermentatorní metabolismus
 - aerotolerantní organizmy** – mají fermentatorní metabolismus, rostou v přítomnosti O_2 , ale nevyužívají jej

Zdroje minerálních látek

- **Síra** – sírany, thiosírany, sirovodík, S_0 – při oxidoredukčních pochodech spojených se změnou rH
- **Fosfor** – soli kyseliny fosforečné – součást NK, koenzymů, fosfolipidů, makroergické vazby, ...
- **Draslík** – v různých reakcích, při syntéze bílkovin
- **Sodík** – regulace osmotického tlaku, transportní systém, ovlivňuje aktivitu některých enzymů
- **Hořčík** – syntéza bílkovin, syntéza nebo hydrolýza ATP, součást chlorofylu
- **Železo** – reaktivní místo v proteinech obsahujících hem (cytochromech, kataláze) a dalších proteinech
- **Kobalt** – složka vitamínu B_{12}
- **Vápník** – význam při sporulaci
- **Zn, Cu, Mo, Ni, Se** atd. součástí metaloenzymů

Růstové faktory

- **Růstový faktor** – molekula (komponenta buňky), kterou buňka nedovede syntetizovat ze živin přítomných ve vnějším prostředí
- Podle vztahu k růstovým faktorům jsou buňky
 - prototrofní** – všechny potřebné složky syntetizují ze živin
 - auxotrofní** – některé molekuly nedokáží syntetizovat a získávají je z prostředí. Auxotrofie je „přirozená“ (organismus nemá odpovídající genetickou výbavu) nebo vzniká z prototrofního organismu ztrátovou mutací
- Vyžadovány jsou především vitaminy, aminokyseliny a baze

Růstové faktory

Růstový faktor	Funkce	Je využíván baktériemi
Vitamíny skupiny B:		
B ₁ — tiamin (aneurin)	prekurzor TPP	laktobaktérie, propionové baktérie, stafylokoky
B ₂ — riboflavin (laktoflavin)	prekurzor FMN, FAD	laktobaktérie, propionové baktérie, klostridie, streptokoky
B ₃ — kyselina pantotenová	prekurzor koA	laktobaktérie, hemolytické streptokoky, <i>Proteus morganii</i> , <i>Corynebacterium diphteriae</i>
B ₄ — cholin	donor metylových skupin	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
B ₅ — kyselina nikotinová	prekurzor NAD ⁺ , NADP ⁺	laktobaktérie, <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>
B ₆ — pyridoxin (adermin)	koenzym transaminázy	laktobaktérie, <i>Streptococcus faecalis</i>
B ₇ — biotin	účast v procesech karboxylace	laktobaktérie, propionové baktérie, stafylokoky, β-hemolytické streptokoky, <i>Bacillus coagulans</i> aj.
B ₁₂ — kyanokobalamin	složka koridinového enzymu	laktobaktérie, auxotrofní kmeny <i>E. coli</i> aj.
Kyselina listová	prekurzor koenzymu F	laktobaktérie
Kyselina lipoová	složka LTPP	laktobaktérie, korynebaktérie
Vitamín C — kys. askorbová	regulace redoxpotenciálu	některé laktobaktérie, <i>Serratia marcescens</i>
Vitamín E — tokoferol	transport elektronů	mykobaktérie
Vitamín K — fylochinon		
Organická báze	syntéza nukleotidů	
Adenin		některé laktobaktérie, <i>Clostridium tetani</i> , <i>Shigella boydii</i>
Xantin a guanin		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Uracil		některé laktobaktérie, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Clostridium tetani</i> , β-hemolytické streptokoky

Růstové faktory

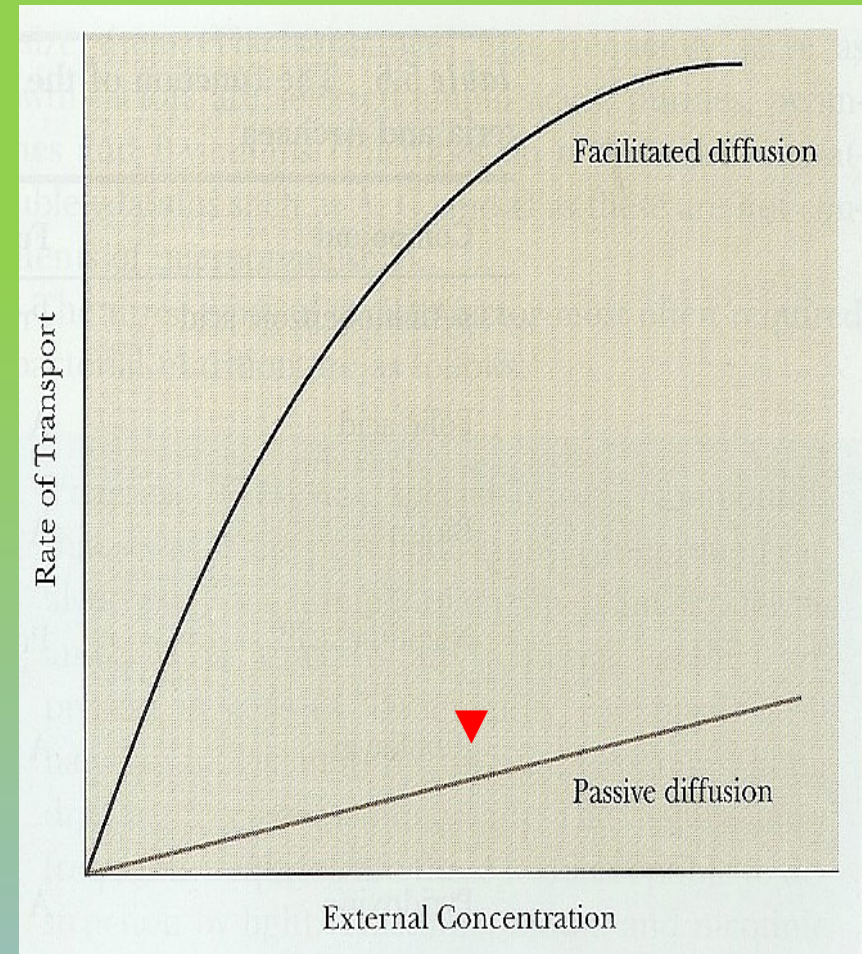
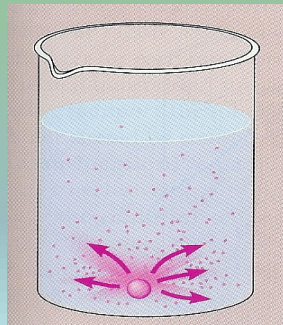
Růstový faktor	Funkce	Je využíván baktériemi
Aminokyseliny	syntéza bílkovin	
Alanin		<i>Leuconostoc cremoris</i>
Kyselina asparagová, cystein, lyzin, fenylalanin, prolin		rod <i>Leuconostoc</i>
Arginin		<i>Lactobacillus casei</i>
Kyselina glutamová, valin		<i>Lactobacillus plantarum</i>
Tryptofan		<i>Lactobacillus xylosus</i>
Tyrozín, serin		<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Histidin		některé streptokoky

Transport látek do buňky

- Protože buňka je systém otevřený, musí existovat řízený, selektivní a obousměrný transport mezi základní cytoplazmou a vnějším prostředím – barierou je semipermeabilní cytoplazmatická membrána
- **Tři typy transportu**
 - nespecifická prostá difúze
 - specifický přenos bílkovinným přenašečem
 - pinocytóza (u bakterií neexistuje)

Nespecifická prostá difúze

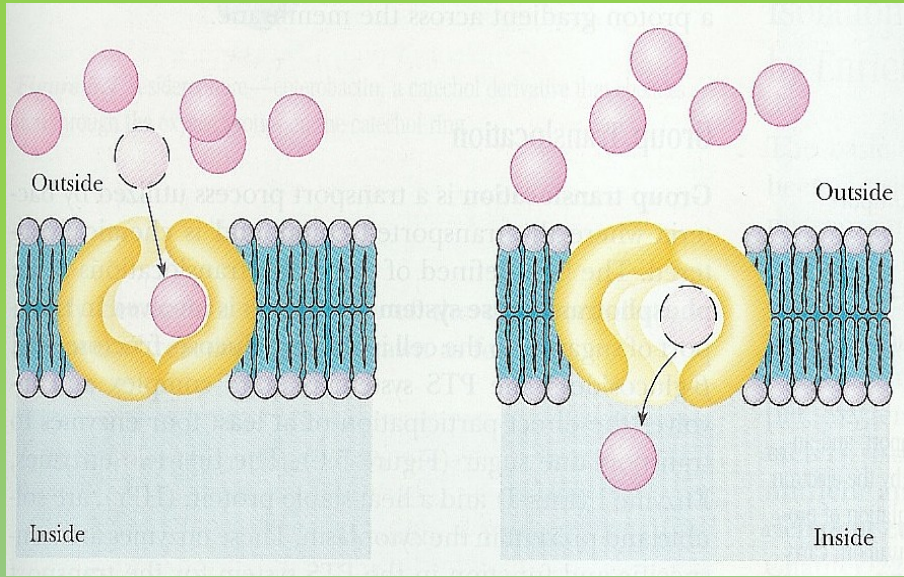
- Nespecifická difúze se týká jen malého počtu molekul a iontů (voda, molekuly rozpustné v tucích, Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , ..)
- Rychlost je přímo úměrná koncentračnímu (nebo elektrochemickému) gradientu dané látky a teplotě



Specifický přenos bílkovinným přenašečem

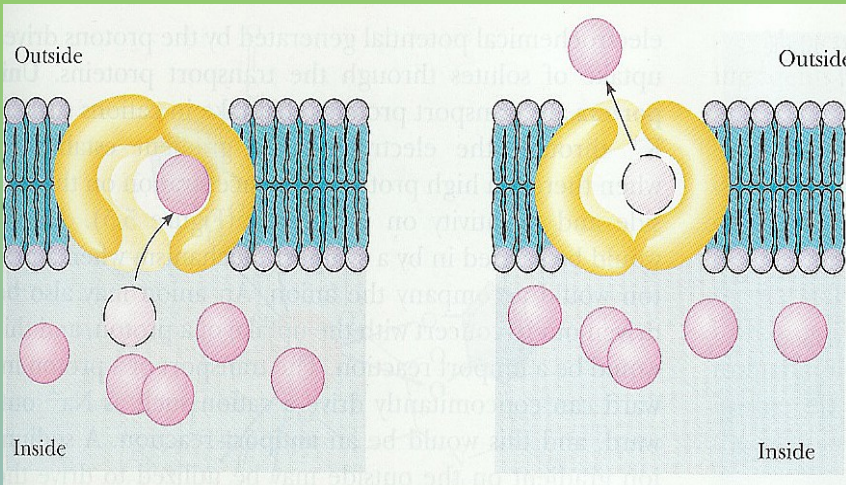
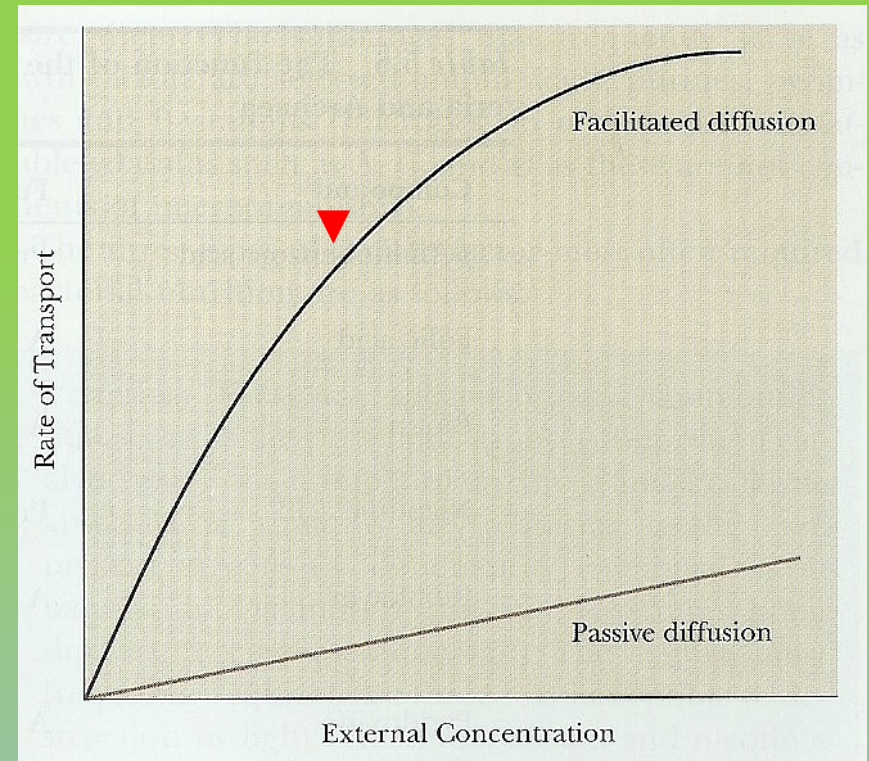
- **Usnadněná difúze** – přenos specifickou bílkovinou po koncentračním gradientu (bez dodání energie)
- Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu. energii dodává ATP. **Primární aktivní transport**
- Aktivní transport využívající chemiosmotický gradient cytoplazmatické membrány (protonový gradient). **Sekundární aktivní transport**
- **Skupinová translokace** je uskutečňována transportním bílkovinou a přenos je spojen s modifikací přenášené látky (fosforylací)

Usnadněná difúze



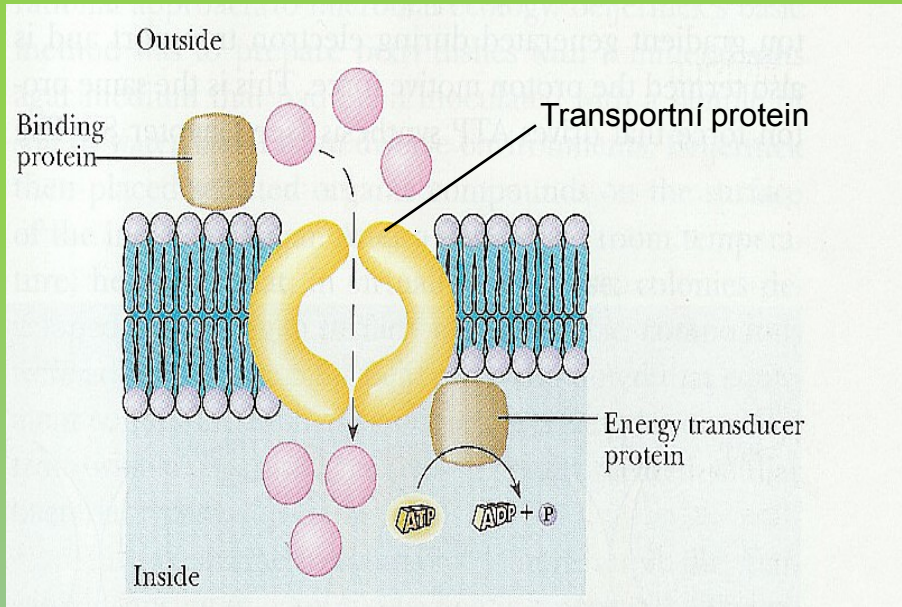
- Transport je uskutečňován specifickou bílkovinou, ale po koncentračním spádu dané látky
- Rychlost je závislá na koncentračním gradientu, počtu transportních bílkovin a teplotě. Jedna molekula transportní bílkoviny může přenášet až 60 000 molekul substrátu za sekundu
- Transport funguje obousměrně (do buňky i z buňky)

Usnadněná difúze



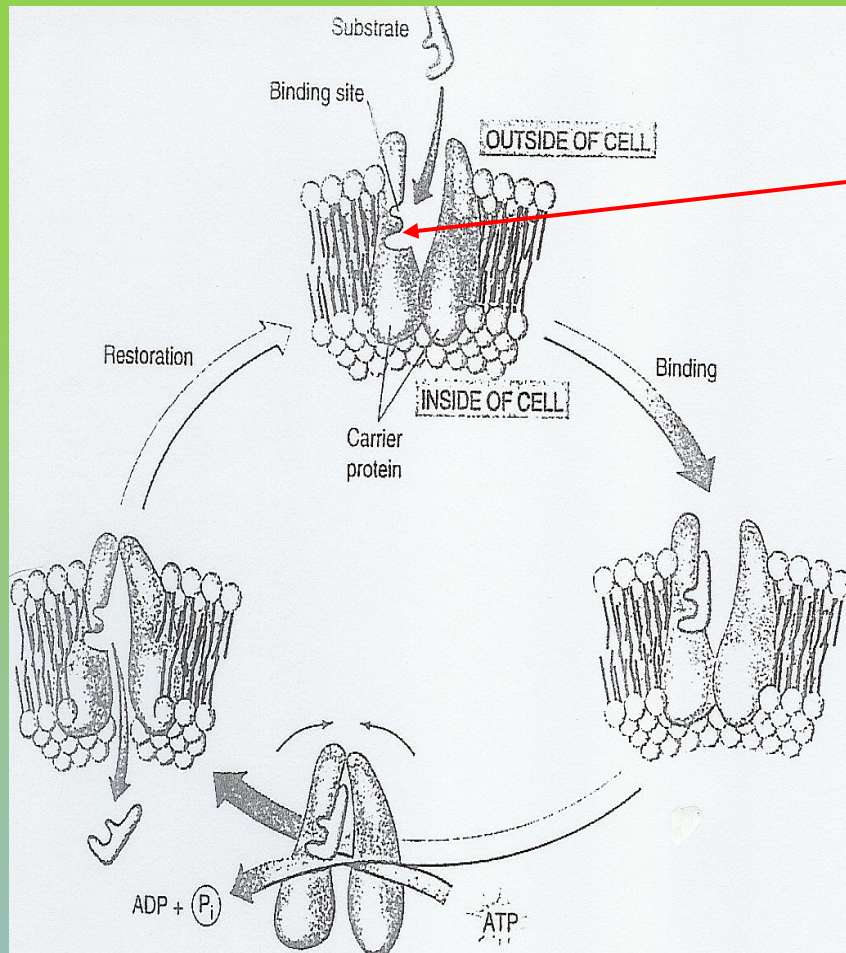
U *E.coli* je takto transportován jen glycerol

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu - **primární aktivní transport**



- V periplazmatickém prostoru se na velmi afinní vazební bílkovinu naváže přenášená látka a předá ji na integrální membránový protein, který ji přenese na vnitřní stranu membrány
- Předáním energie (z ATP) na transportní protein se rozpadne komplex substrát-bílkovina a substrát se uvolní do základní cytoplazmy

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu - primární aktivní transport

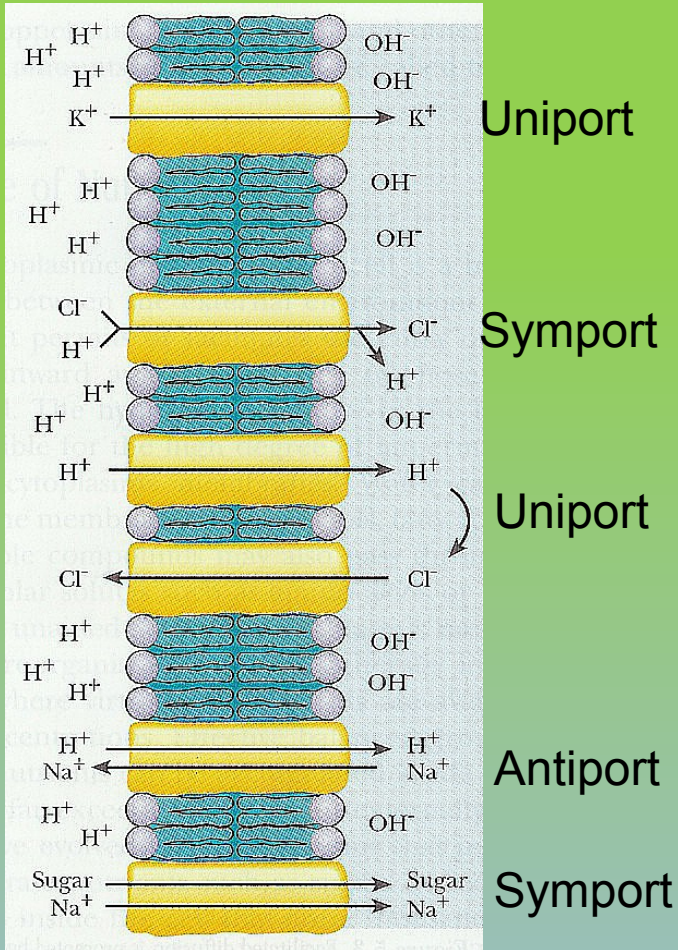


- Transportní systém je značně selektivní (vazebná místa)
- Bílkoviny přenášející anorganické látky se také označují jako **přenašeče** (nosiče), organické látky jsou transportovány **permeázami** nebo **translokázami**
- Primárním aktivním transportem je u *E.coli* přenášeno asi 40% substrátů

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu - sekundární aktivní transport

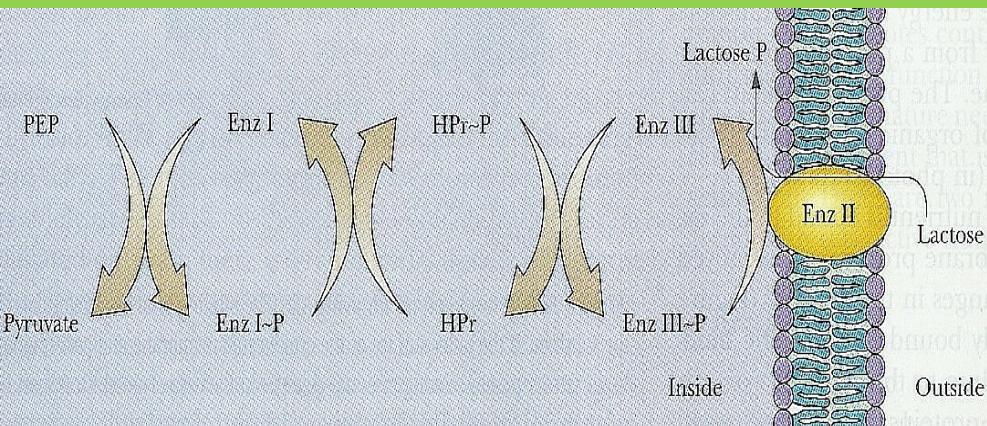
Vně

Uvnitř



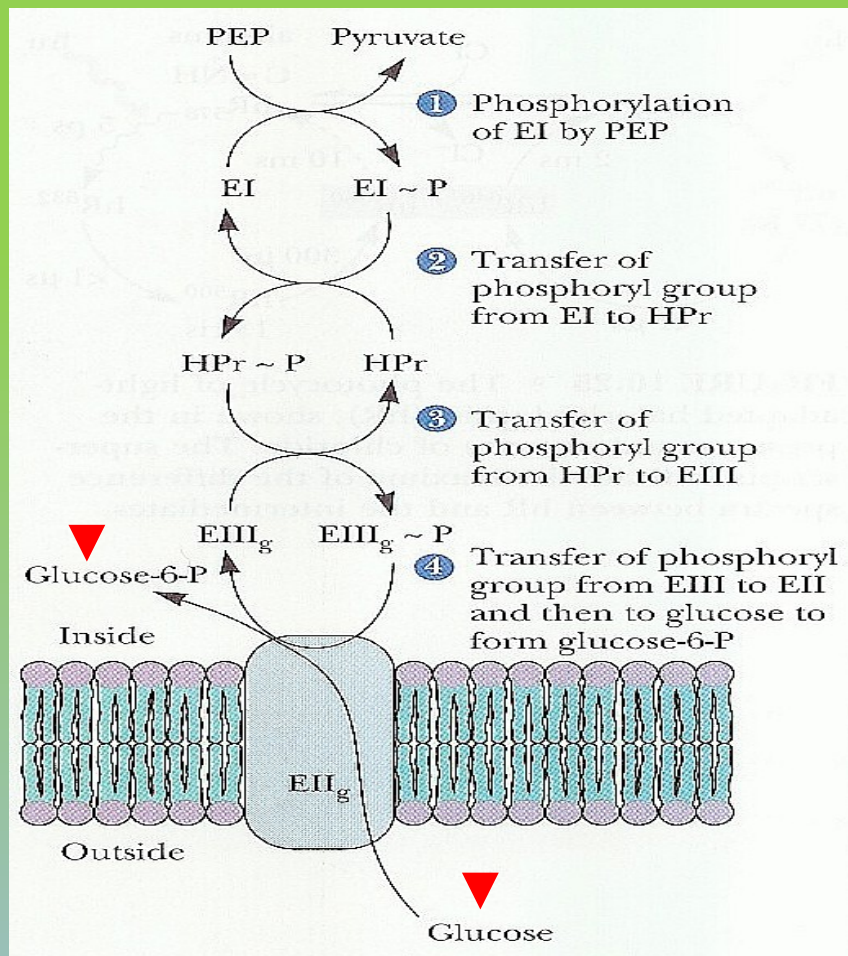
- Zdrojem energie pro transport je protonový gradient
- **Transport je uskutečňován jediným membránovým proteinem**
- Transport iontů jde po koncentračním gradientu, transport živin proti koncentračnímu gradientu
- **Symport** – oba ligandy jsou transportovány jedním směrem
- **Antiport** – ligandy jsou transportovány opačným směrem
- **Uniport** – přenášejí se jen ionty
- Je velice častý u bakterií (u *E.coli* se takto dostává do buňky až 40% substrátů)

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu – skupinová translokace



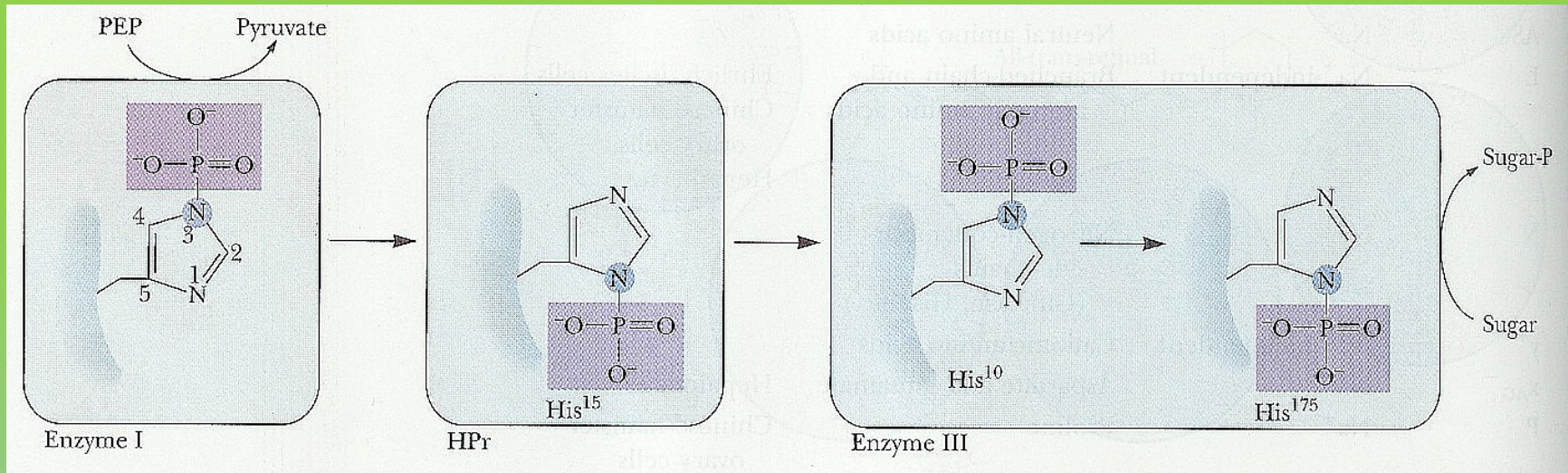
- Specifické pro **každý** přenášený cukr jsou enzymy Enz II a Enz III vázané na cytoplazmatickou membránu
- **Fosfotransferázový systém plní také regulační funkci** (např. transport glukózy inhibuje transport laktózy sekundárním transportem – **glukózový efekt**; nebo inhibuje adenylátcyklázu, která je nutná pro přepis laktózového operonu ,
- Při skupinové translokaci nemůže dojít k vytvoření rovnováhy přenášeného substrátu na membráně, protože je chemicky modifikován
- **Většina substrátů je přenášena více než jedním mechanismem** (galaktóza celkem 5)

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu – skupinová translokace



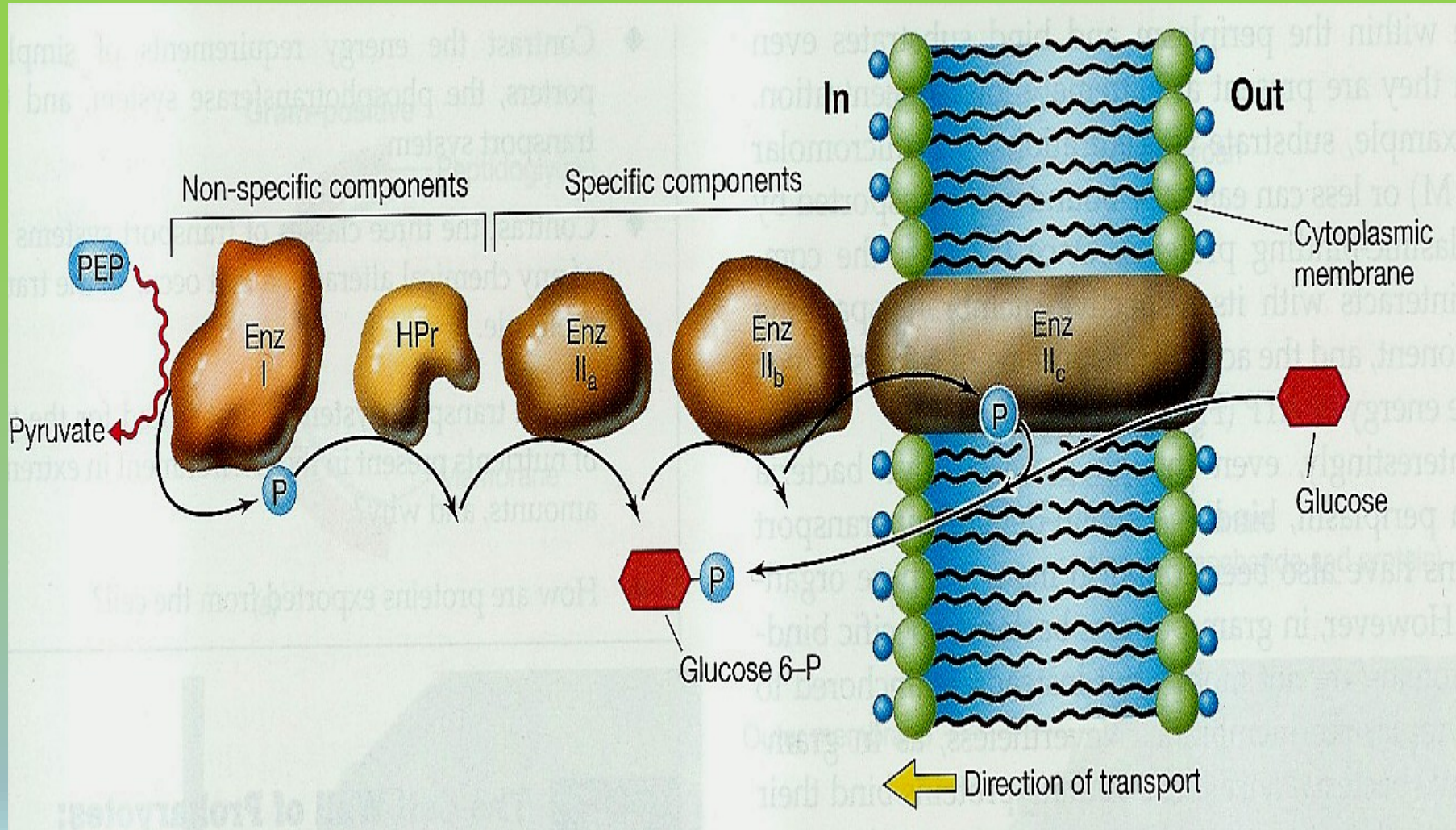
- Transportní systém uskutečňuje vedle přenosu i chemickou modifikaci substrátu
- Příkladem je fosfotransferázový systém u bakterií zajišťující přenos většiny cukrů
- Zdrojem energie je obvykle fosfoenolpruvát (PEP)
- Z PEP je energie přenášena na EI a termostabilní bílkovinu HPr
- Enzymy EI i HPr jsou rozpustné cytoplazmatické bílkoviny, nejsou specifické a jsou požadovány pro fosforylaci jakéhokoliv přenášeného cukru

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu – skupinová translokace – fosfotransferázové reakce

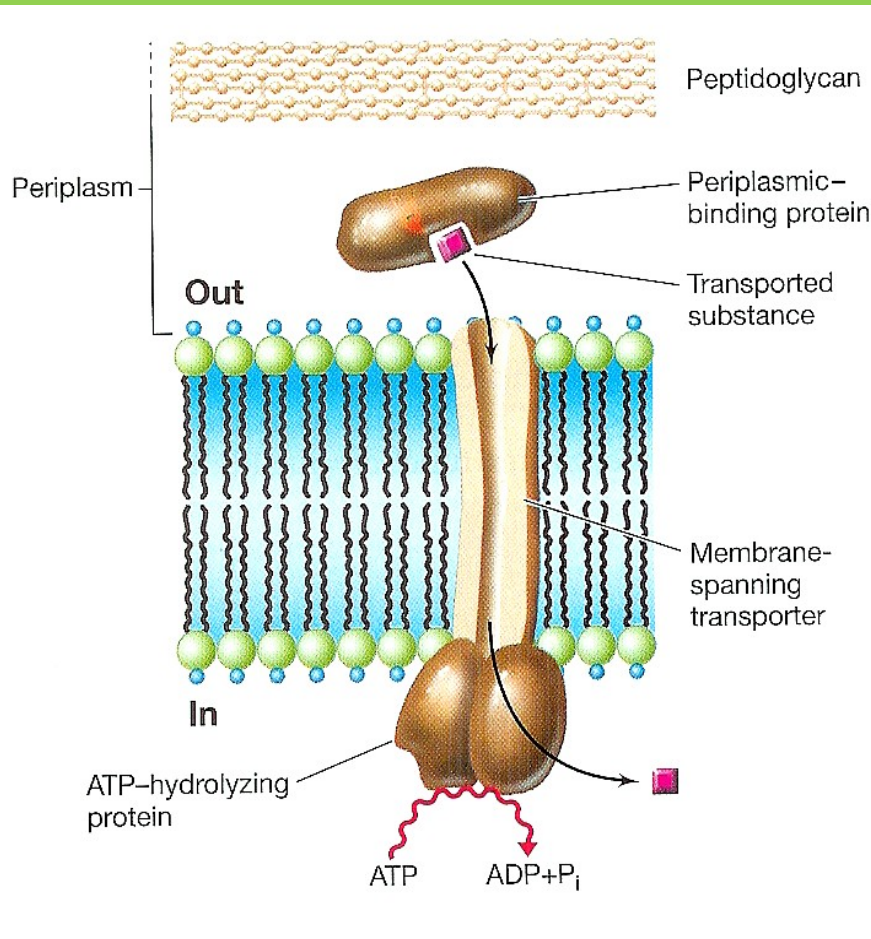


1. Krok – fosforylace Enz I z PEP za vytvoření reaktivního fosfohistidylového intermediátu
2. Krok – přenesení fosfátu z Enz I na histidylový zbytek HPr
3. Krok – Fosforylace Enz III. Ve stejném čase je přenesen substrát na vnitřní stranu membrány a fosforylová skupina je hned předána na substrát za vzniku cukr-P

Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu – skupinová translokace – fosfotransferázové reakce

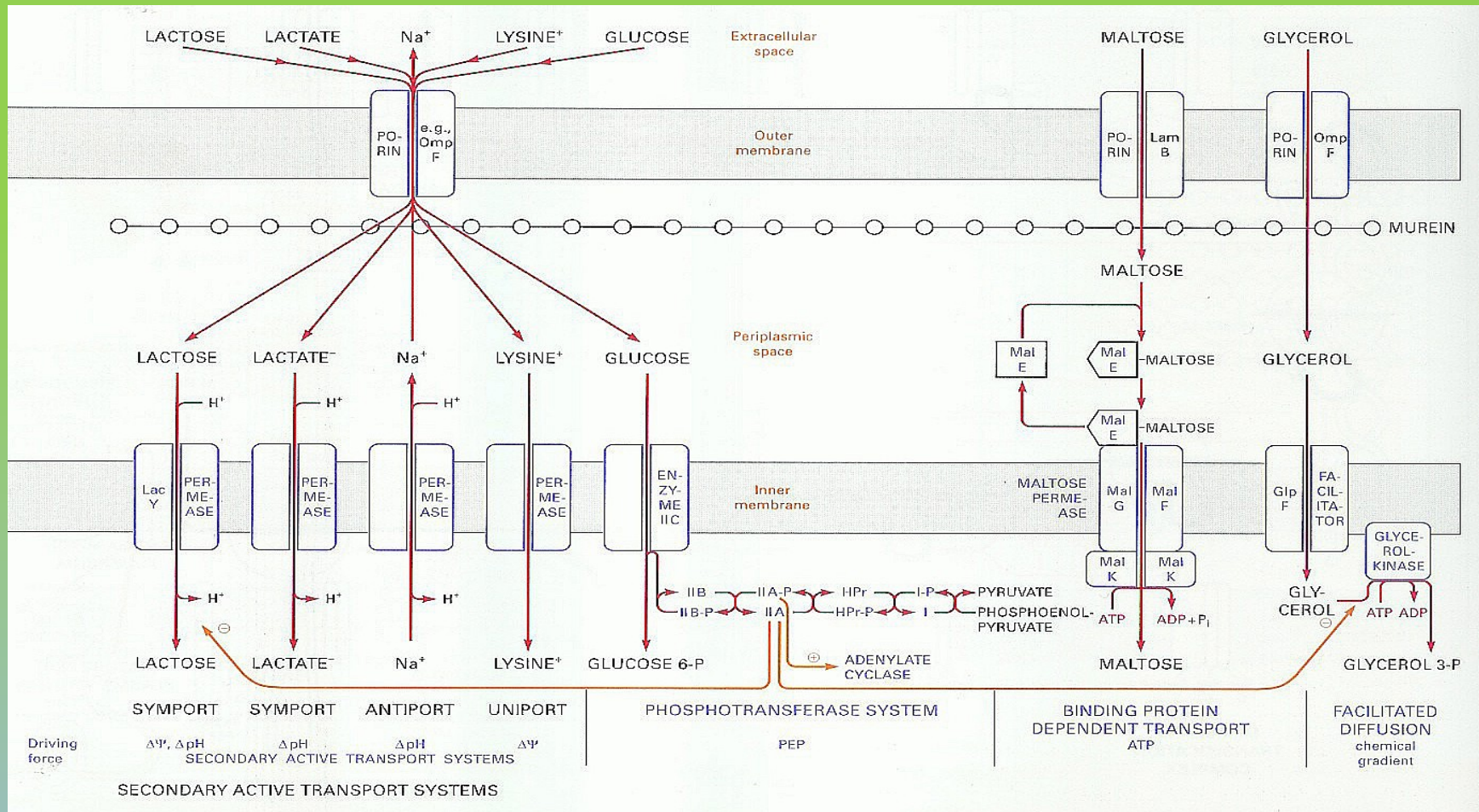


Aktivní transport prostřednictvím vazebného proteinu – přenos substrátu z periplazmatického prostoru u G- bakterií



- Periplazmatický vazebný protein má velkou afinitu k substrátu
- Membrane-spanning protein je transportní tunel
- ATP-hydrolysing protein přenáší energii – konformační změna v komplexu
- U *E. coli* je transport maltózy příkladem ABC systému (**ATP binding cassette**)

Využití transportních systémů u G- bakterií



Sekrece látek u bakterií

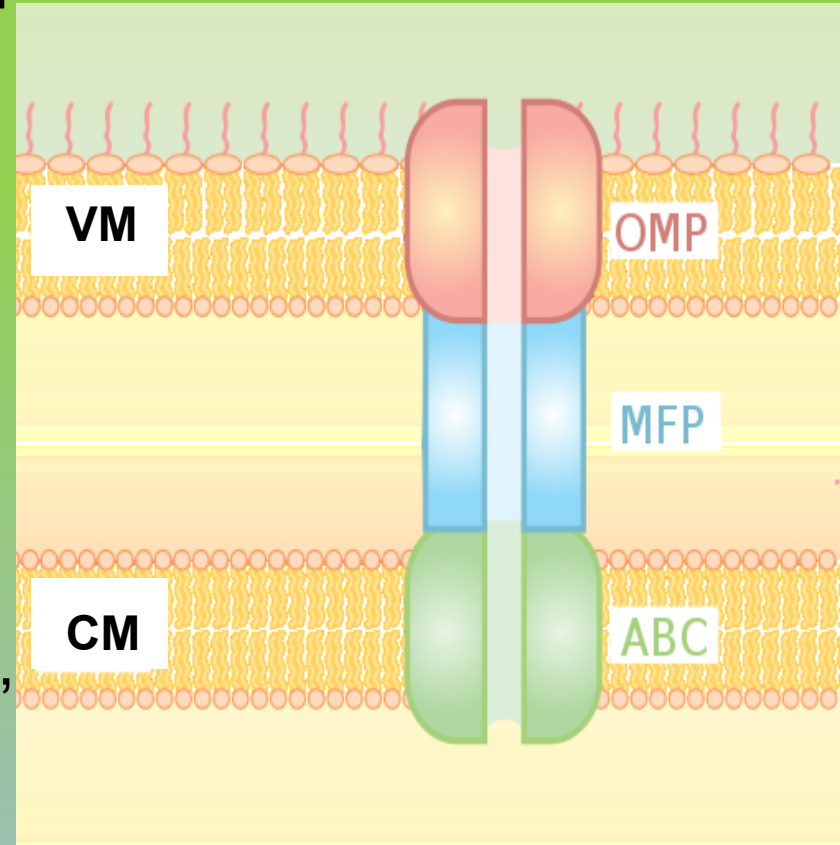
- Sekrece není jednotná (ani u eukaryot). Existuje řada mechanismů u jednotlivých organismů i pro sekretované látky
- Řada mechanismů je společná pro eukaryota i prokaryota včetně *Archaea*
- Pro všechny tři domény je společný typ transportérů označovaných jako
 - ABC (ATP binding cassette)
 - Sec systém (vyžaduje N-terminální signální peptid ne sekretovaném proteinu)

Sekrece látek u G⁻ bakterií

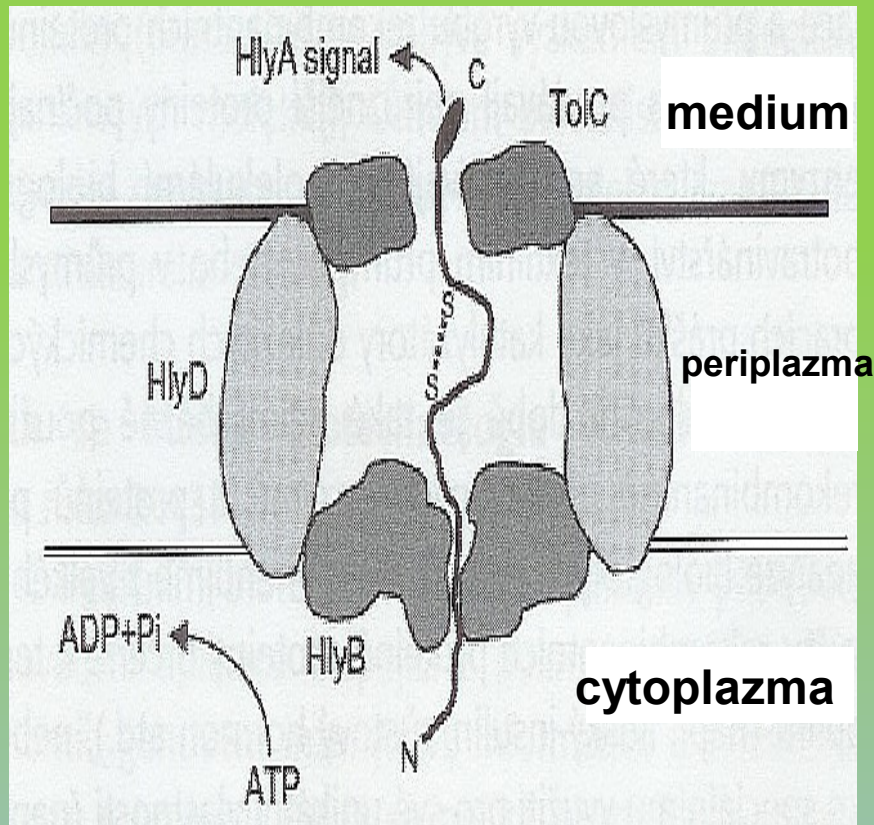
- ABC
- Sec
- Sekreční systém I – VI
- Tat
- Sekreční váčky a tvorba vnější membrány

Sekreční systém u G⁻ Typ I (T1SS-TOSS)

- Je to jednoduchý systém zahrnující 3 proteiny
 - ABC
 - MFP (vazebný protein)
 - OMP (protein vnější membrány)
- Sekreční systém je nespecifický - transportuje různé látky od iontů přes polysacharidy až po bílkoviny (kolicin V – *E.coli* 10kDa, adhezni protein LapA *Pseudomonas fluorescens* 900kDa, toxiny, lipázy, cyklické β -glukany, polysacharidy, ...)

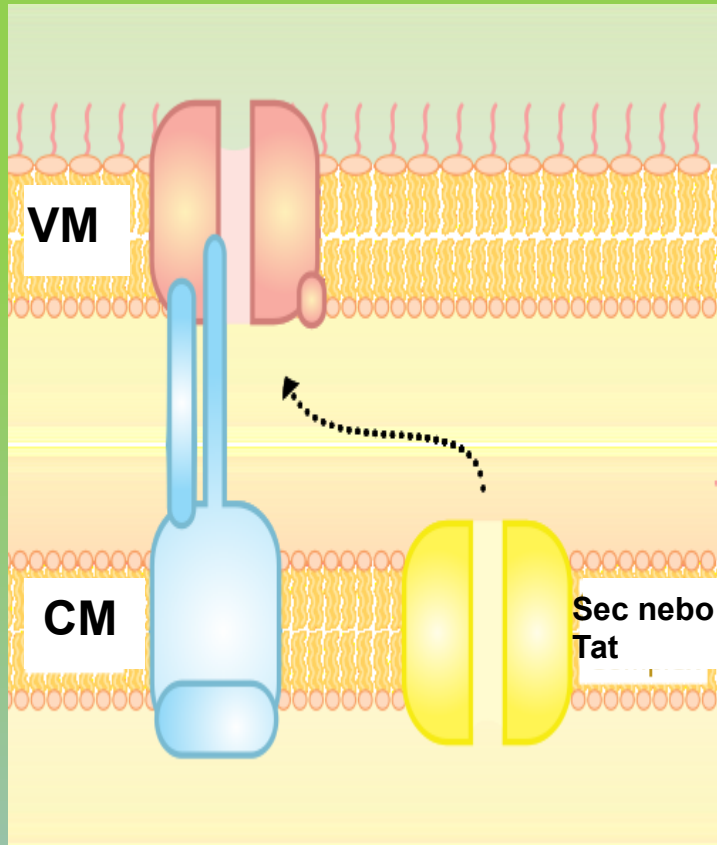


Sekreční systém u G⁻ Typ I (T1SS-TOSS)



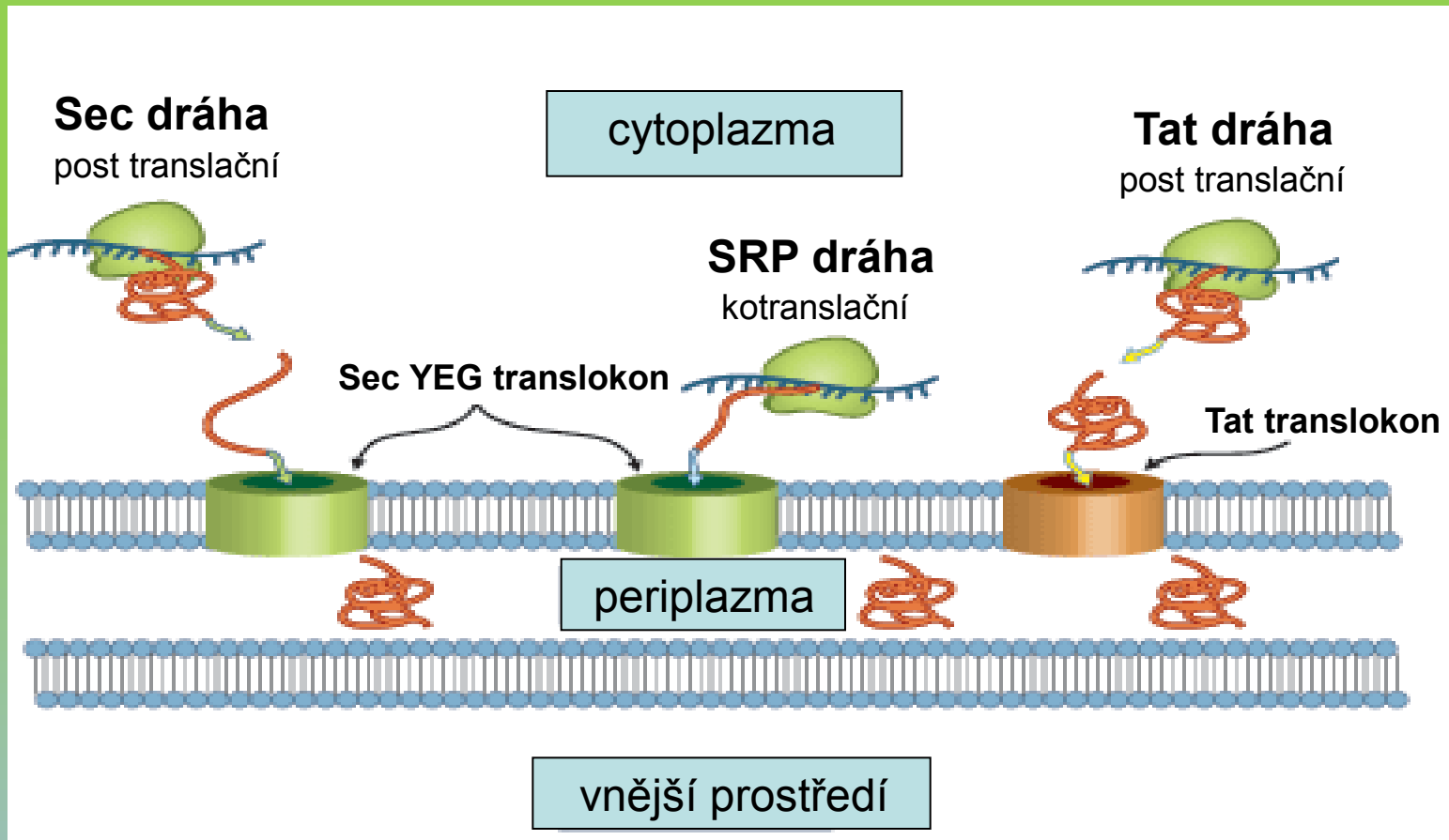
- Sekrece je realizována 3 membránovými proteiny – **HlyB** a **HlyD** jsou na vnitřní straně CM a **TolC** na vnější straně CM
- Připojení signální sekvence HlyA k C-terminální sekvenci
- Spojení HlyA s HlyB a HlyD a vazba na ATP
- Na tento aktivní komplex se naváže trimer TolC, tvořící jednoduchý pór
- Hydrolýza ATP proteinem HlyB umožní transport proteinu přes nově vytvořený kanál
- Po přenosu se TolC odpojí a kanál zaniká

Sekreční systém u G⁻ Typ II (T2SS)



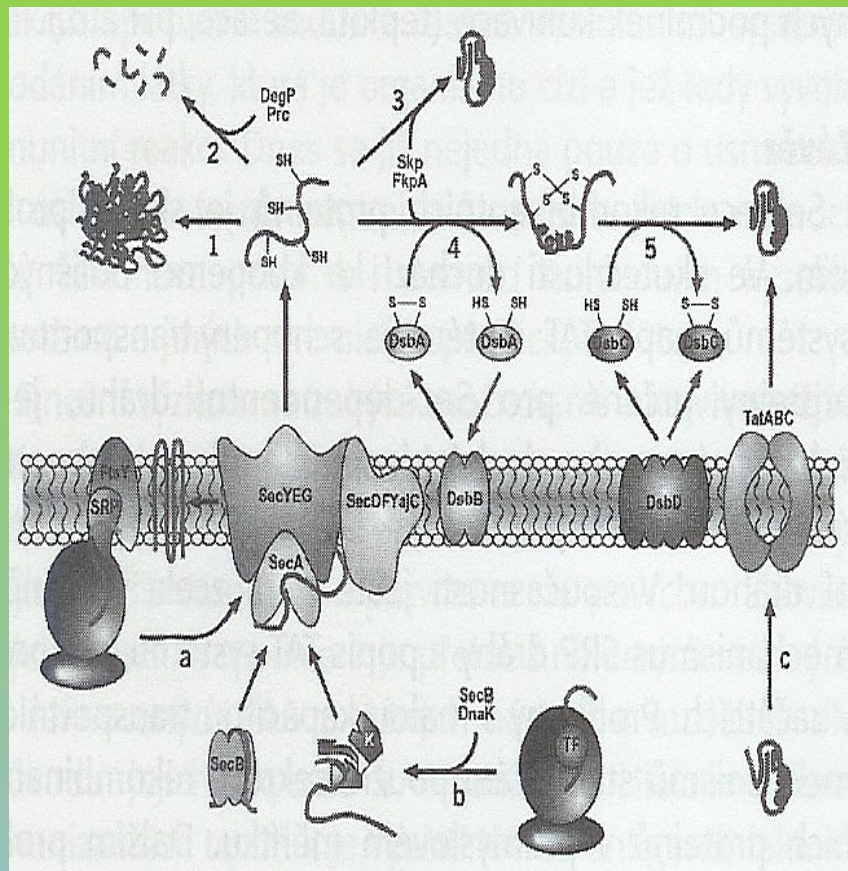
- Jde o dvoustupňový, systém nejprve je bílkovina transportována do periplazmatického prostoru a potom do vnějšího prostředí
- V procesu je využíván Sec nebo Tat
- U některých G⁻ je tento systém modifikován pro tvorbu pili

Sekreční systém u G⁻ Typ II (T2SS)



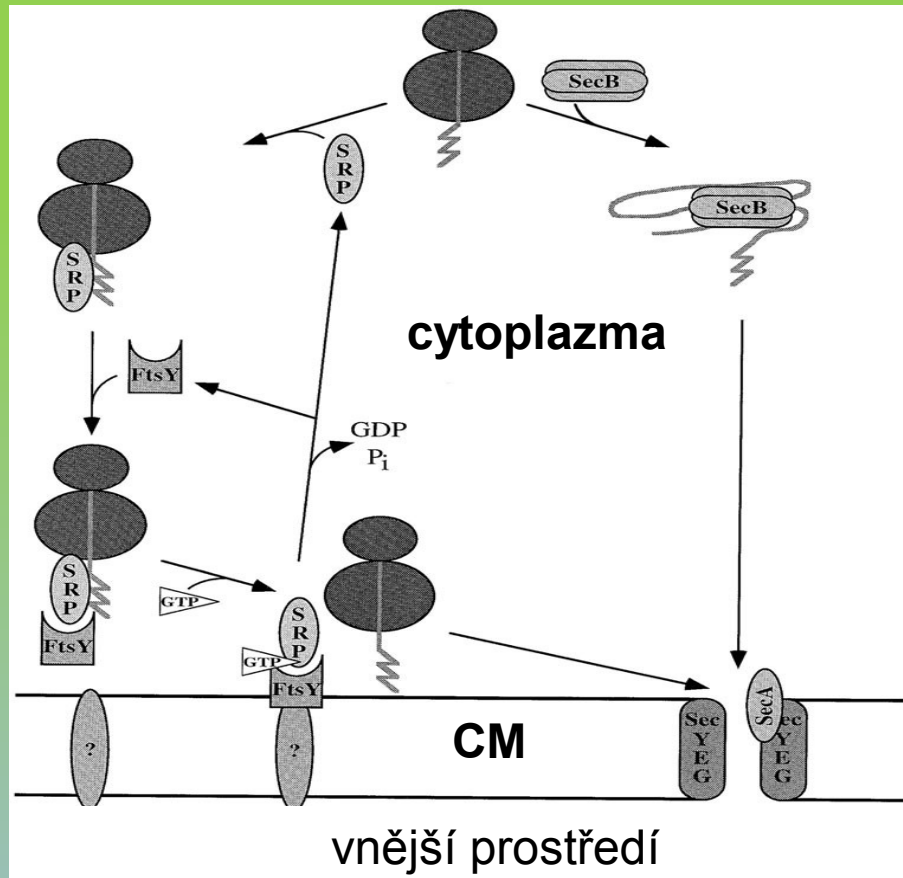
Translokon (translokator, translokační kanál) je komplex proteinů spojených s translokací (přenosem) nascentních polypeptidů přes membránu

Sekreční systém u G⁻ Typ II (T2SS)



- **Transport do** **periplazmatického prostoru** : SecB-dependentní dráha, SRP (signal recognition particle) dráha nebo TAT dráha
- **Transport přes vnější membránu** zajišťuje komplex proteinů - sekreton

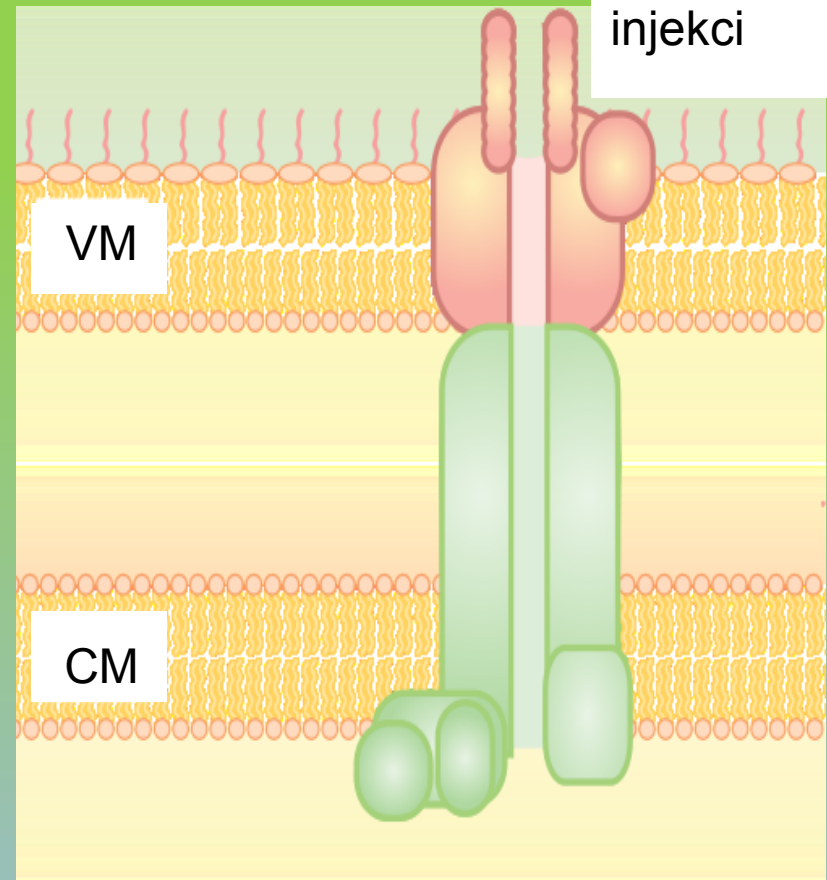
Sekreční systém u G- Typ II (T2SS) – SRP dráha



- SRP dráha je pravděpodobně využívána pro hromadění a zabudování proteinů na vnitřní straně CM
- Protein SRP reaguje s hydrofobní signální částí nascentního proteinu
- Pro uvolnění SRP je nutná přítomnost **GTP** a receptoru FtsY
- Potom je nascentní protein uložen do translokonu, který obsahuje SecA, SecY a SecG
- Pro transport do vnějšího prostředí může být využit sekreton

Sekreční systém u G⁻ Typ III (T3SS, TTSS)

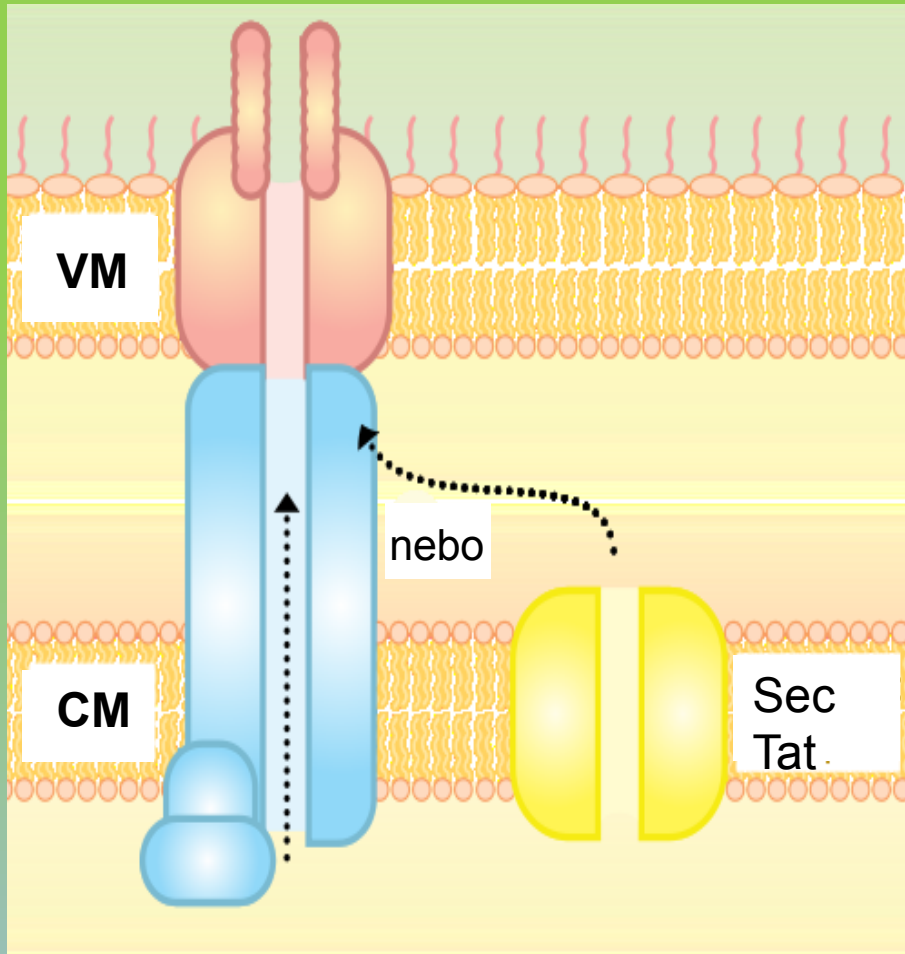
System pro
injekci



- System je využíván především pro „tvorbu“ bazální části bičíku
- Slouží také pro specifickou injekci „patogenních proteinů“ do eukaryotických buněk (především patogenní bakterie *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, patogenní serotypy *E. coli*)
- System je závislý na intracelulární koncentraci Ca²⁺
- Jedním z mechanismů je **IcrV** (Low Calcium Response) u *Y. pestis*, který otevírá kanál pro uvolnění toxinu
- Podobný je mechanismus i Hrp systému rostlinných patogenů pro uvolnění harpinů

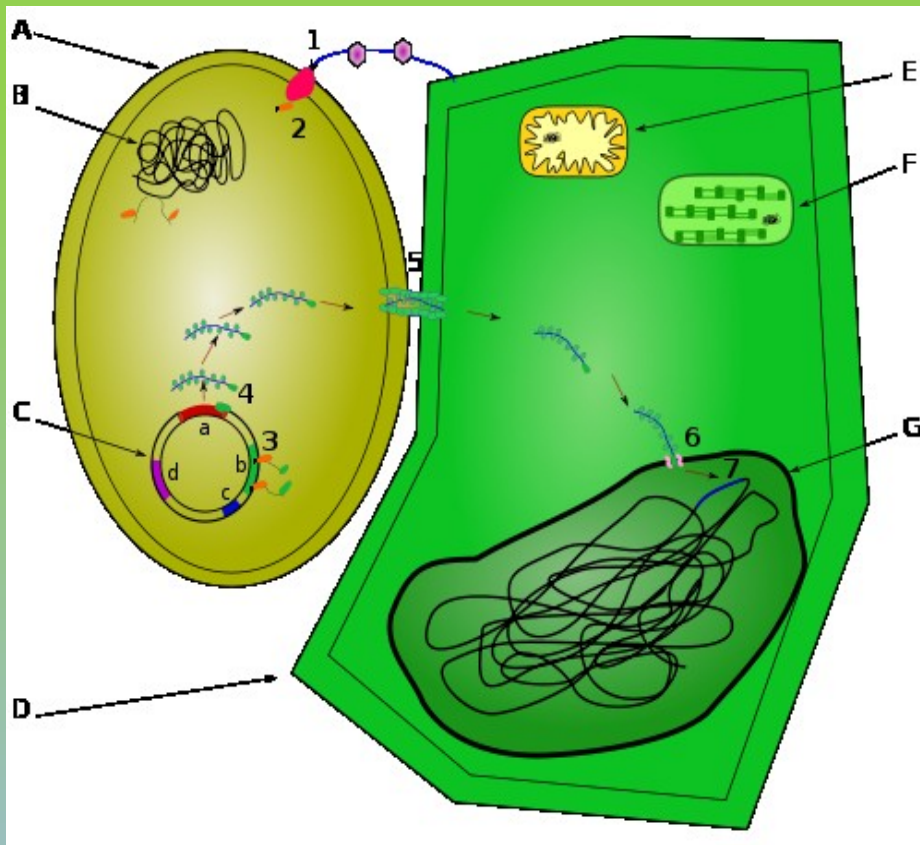
Harpiny jsou termorezistentní proteiny, které po infiltraci do rostlin vyvolávají odumření buněk. Mechanismus není dosud známý.

Sekreční systém u G⁻ Typ IV (T4SS, TFSS)



- Je schopný transportovat jak proteiny, tak i DNA
- Předpokládá se, že je zodpovědný za tvorbu sexuálních pili a bičků u *Archaea*
- Popsán byl nejprve u *Agrobacterium tumefaciens* (přenos T-DNA plazmidu Ti do rostlinných buněk)
- U *Helicobacter pylori* přenos CagA do epiteálních buněk
- *Bordetella pertusis* – přenos toxinu
- *Legionella pneumophila* přenos icm/dot (intracellular multiplication/defect in organelle trafficking genes)

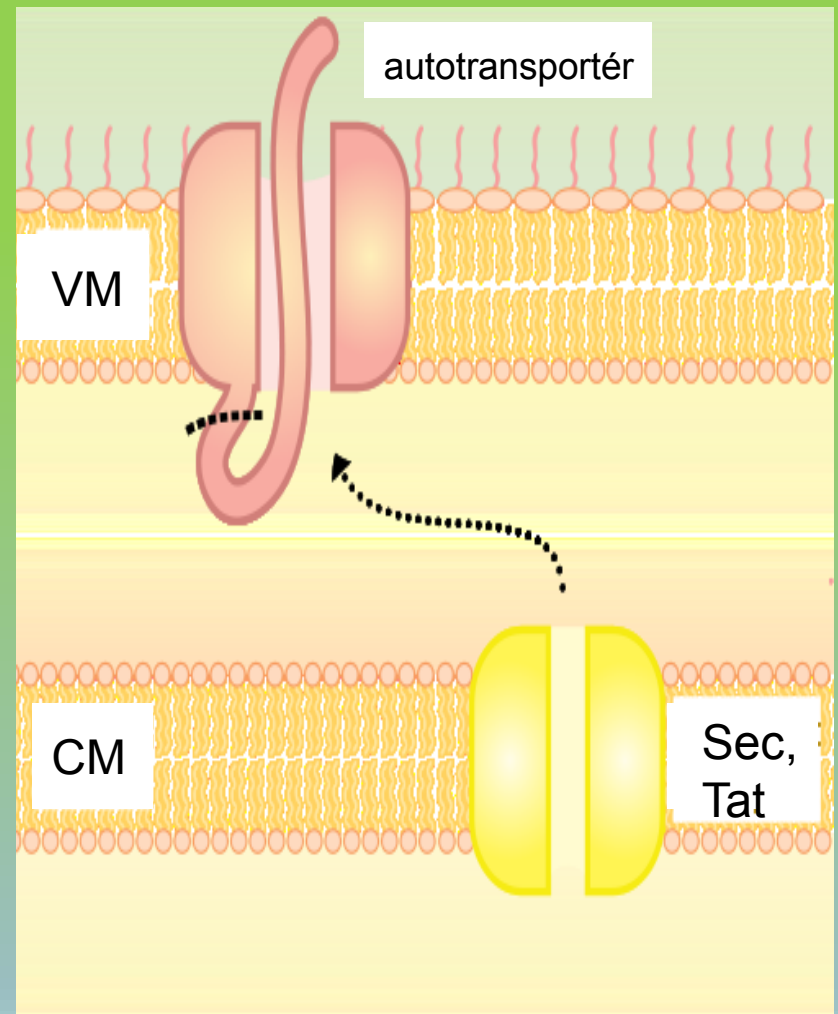
Sekreční systém u G⁻ Typ IV (T4SS, TFSS) - *Agrobacterium tumefaciens*



- **Pro přenos je nutný T pilus**
- **A - *Agrobacterium tumefaciens***
B - genom agrobakterie
C - Ti Plasmid
a- T-DNA , b- Vir geny
c- počátek replikace
d- přepis katabolických genů
- D - rostlinná buňka
E - mitochondrie
F - chloroplast
G - jádro

Sekreční systém u G- Typ V (T5SS)

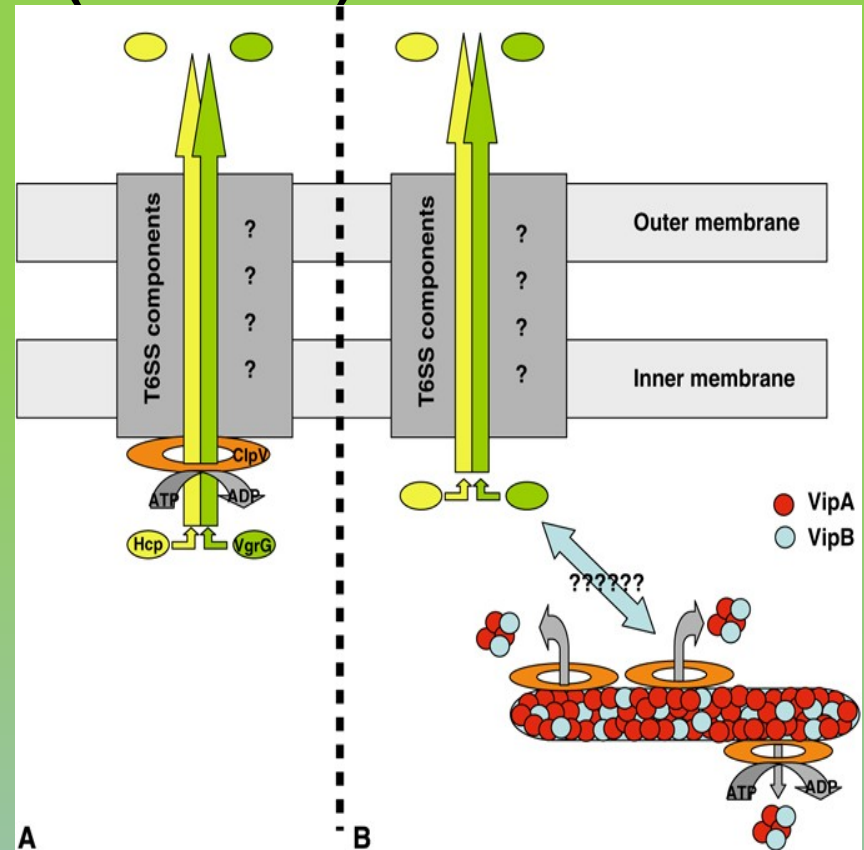
- Označovaný jako autotransportní systém
- Využívá Sec systému pro přenos přes cytoplazmatickou membránu
- Většina proteinů přenášených tímto systémem přednostně vytvářejí beta-barel, kdy C-koncem se vkládají do vnější membrány a dále jsou transportovány do vnějšího prostředí
- tzv. “two-partner“ sekrece, pro transport velkých “patogenních“ proteinů (100-500kDa)
- Předpokládá se, že zbytky autotransportérů dávají vznik porinům, které mají také strukturu podobnou beta-barelu



Sekreční systém u G- Typ VI

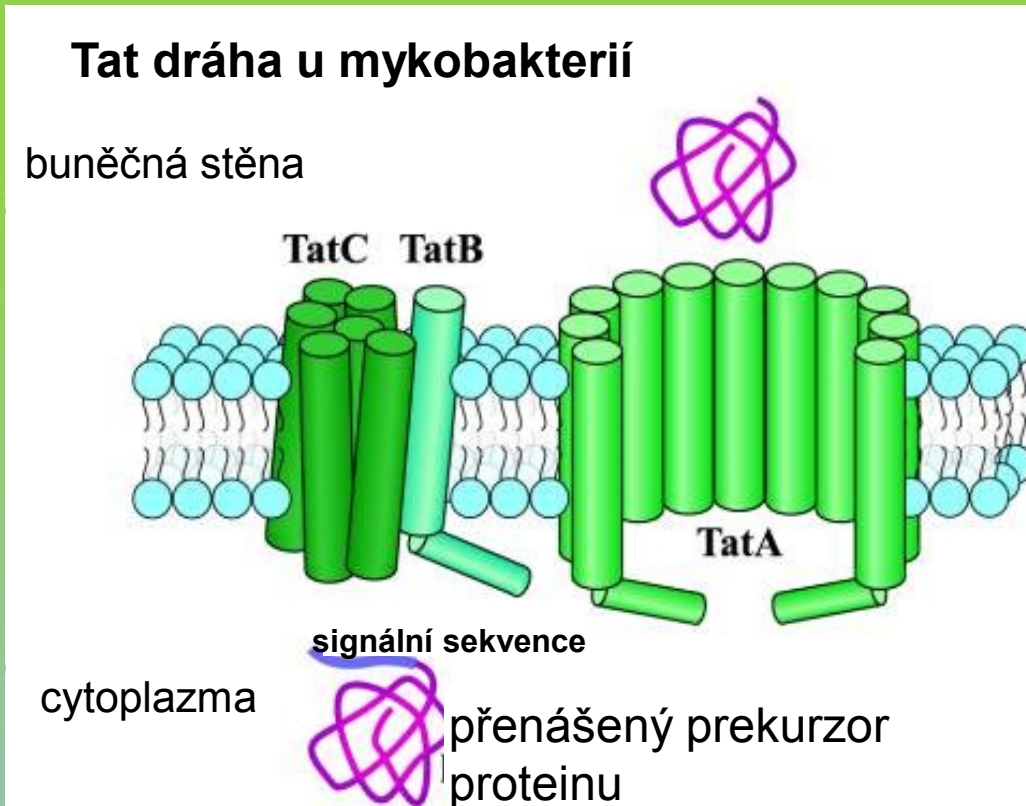
(T6SS)

- T6SS byl popsán v roce 2006 u *Vibrio cholerae* a *Pseudomonas aeruginosa*
- Podobný typ se vyskytuje i u některých živočišných, rostlinných a lidských patogenů
- Sekreční systém zahrnuje několik komponent v membráně a dva proteiny ve vnějším prostředí (Hcp a VgrG)
- Proteiny sekretované typem VI nemají N-terminální sekvenci a pravděpodobně nemohou využívat Sec dráhu
- (A) Model, ve kterém Hcp (žlutá) a VgrG (zelená) jsou sekretovány neznámým systémem pomocí dosud necharakterizovaným T6SS systémem. V první fázi sekrece je řetězec Hcp a VgrG přenesen hexamerním centrálním kanálem ClpV ATPázy (oranžová)
- (B) Druhý model je znázorňuje funkci ClpV ATPázy při oddělení tubulů VipA (červená) a VipB (modrá), která je nutná pro průchod malých VipA/VipB komplexů přes ClpV pór do vnějšího prostředí



Sekreční systém u G⁻ Tat (Twin-arginine translocation)

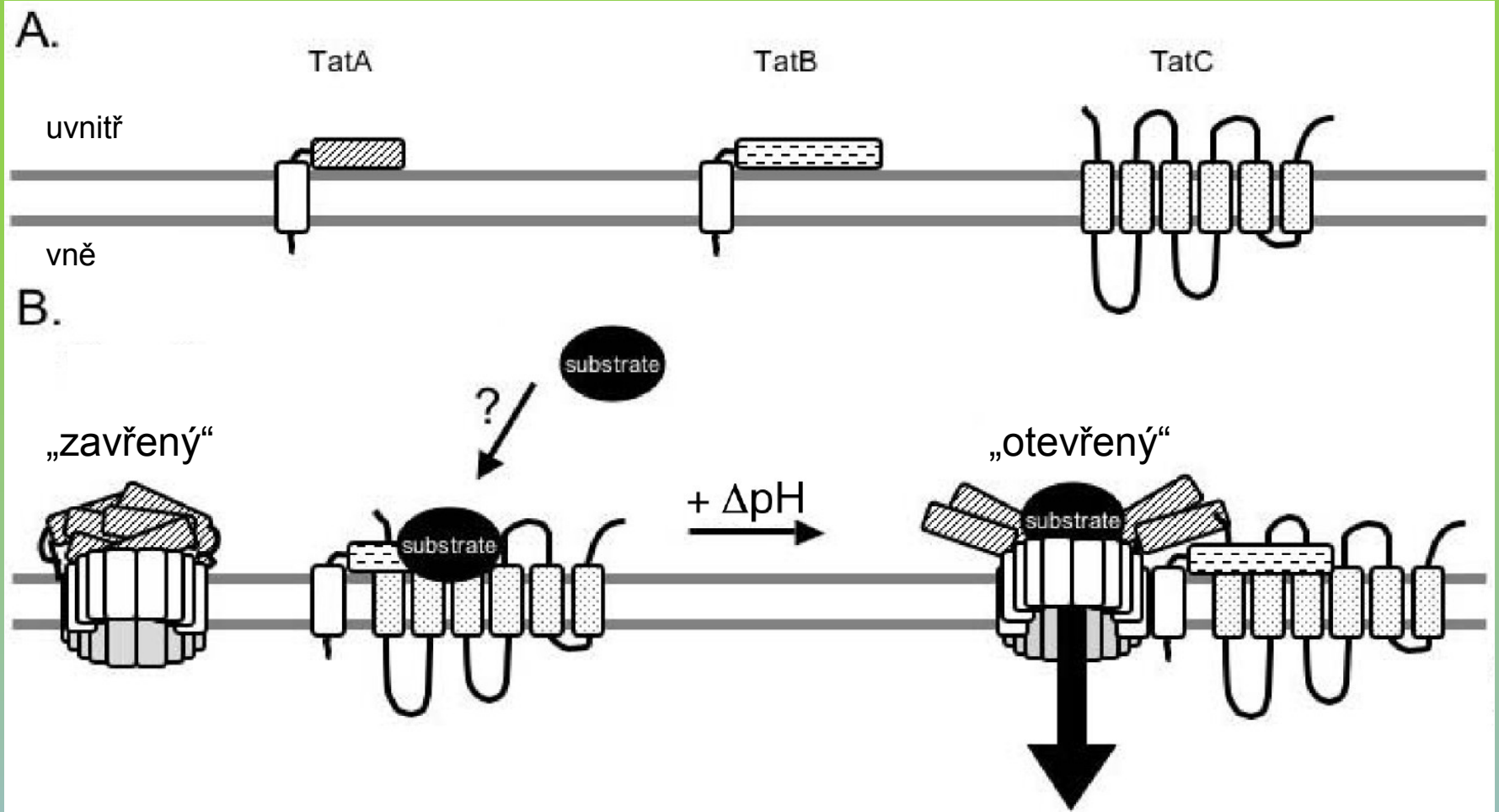
- CM G⁻ bakterií a v tylakoidech Tat translokáza je tvořena 3 membránovými proteiny TatA, TatB a TatC



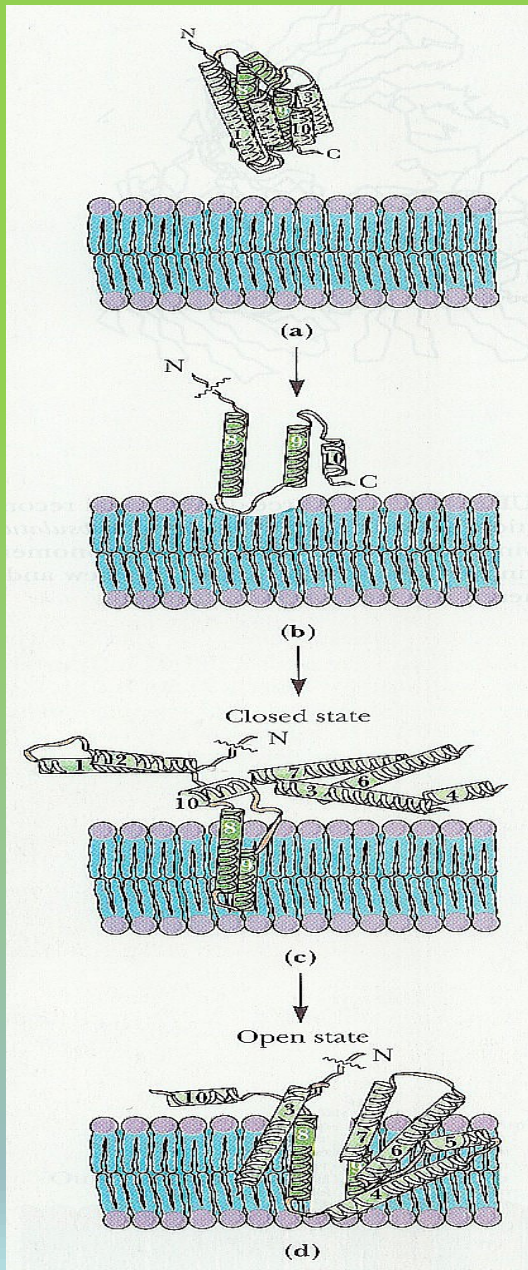
Sekreční systém u G- Tat

- Název dostala podle dvou argininů (**twin-arginin-transport**). Ty se nacházejí v signálních sekvencích syntetizovaných proteinů
- TAT dráha není závislá na Sec proteinech. Přenáší sbalené i nesbalené proteiny
- Přesný mechanismus není dosud znám. Předpokládá se, že protein TatA tvoří transportní kanál. Proteiny TatB a TatC vytváří komplex obsahující vazebné místo
- Jakmile se objeví signální sekvence dojde k interakci proteinu s TatBC s následnou vazbou na TatA. Po skončení transportu do periplazmatického prostoru celý komplex disociuje
- Signální sekvence je delší (asi 38 AMK) než u Sec (18-30 AMK)
- Transport je pomalejší Sec – sekundy, TAT – minuty
- Transportní řetězec je brzy vysycen (snížení rychlosti transportu), proto je nutná koexprese TatABC operonu

Sekreční systém u G⁻ Tat

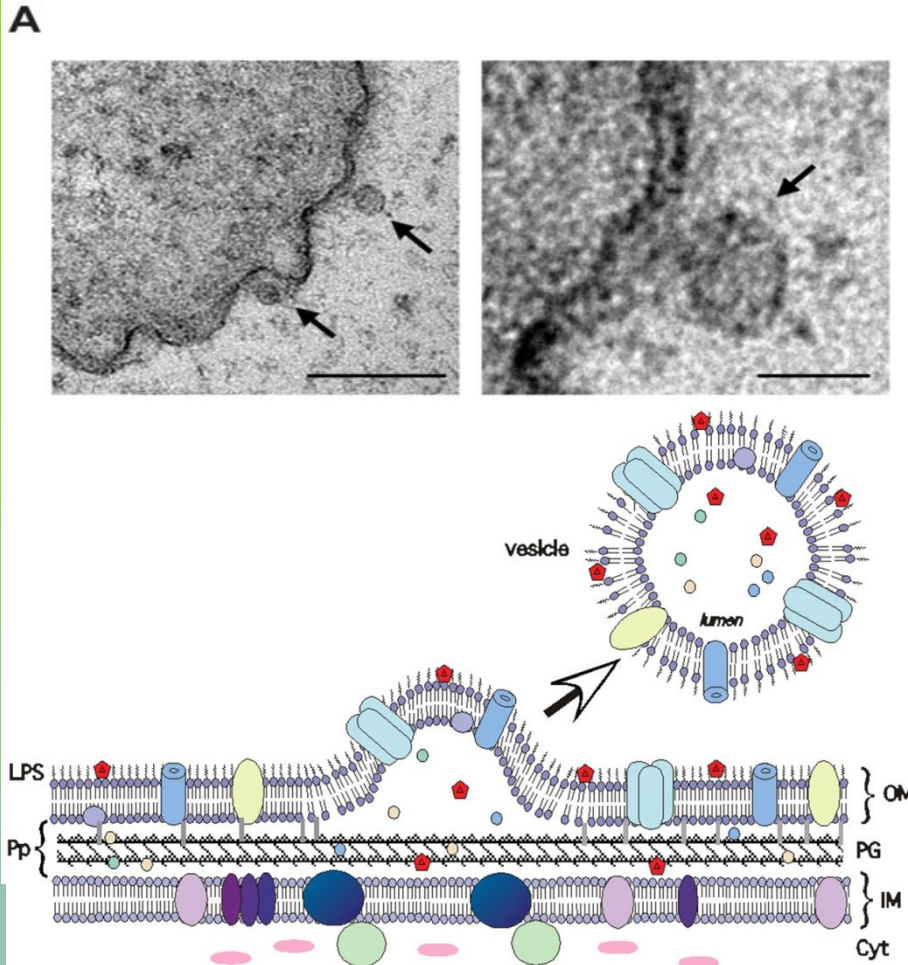


Vkládání bílkoviny porinu do vnější membrány



- Hydrofobní část spirály se vkládá přímo do membrány (umístění řetězců na povrchu membrány připomíná deštník)
- Spouštěcí signál (nízké pH nebo potenciálový gradient) "stáhne" některé amfipatické šroubovice do a přes membránu. Tím se pór otevře

Uvolňování vezikulů vnější membrány G- bakterií



Část vnější membrány G- bakterií může „odstřižena“ za tvorby sférických struktur, které mají lipidickou dvojrstvu a uvnitř periplazmatický materiál.

Vezikly některých druhů mohou představovat faktory virulence nebo vykazují imunomodulační efekt.

Také se předpokládá, že to může být odpověď na stresové faktory

Sekrece proteinů u G⁻ bakterií

sekreton

- Komplex 12 – 16 proteinů zajišťuje transport “nových” proteinů z periplazmatického prostoru do vnějšího prostředí
- Před transportem musí být protein sbalen (pomocí sekretonu)
- Mechanismus transportu není dosud znám
- V podmínkách in vitro u *E. coli* představují geny sekretonu až 5% genomu !

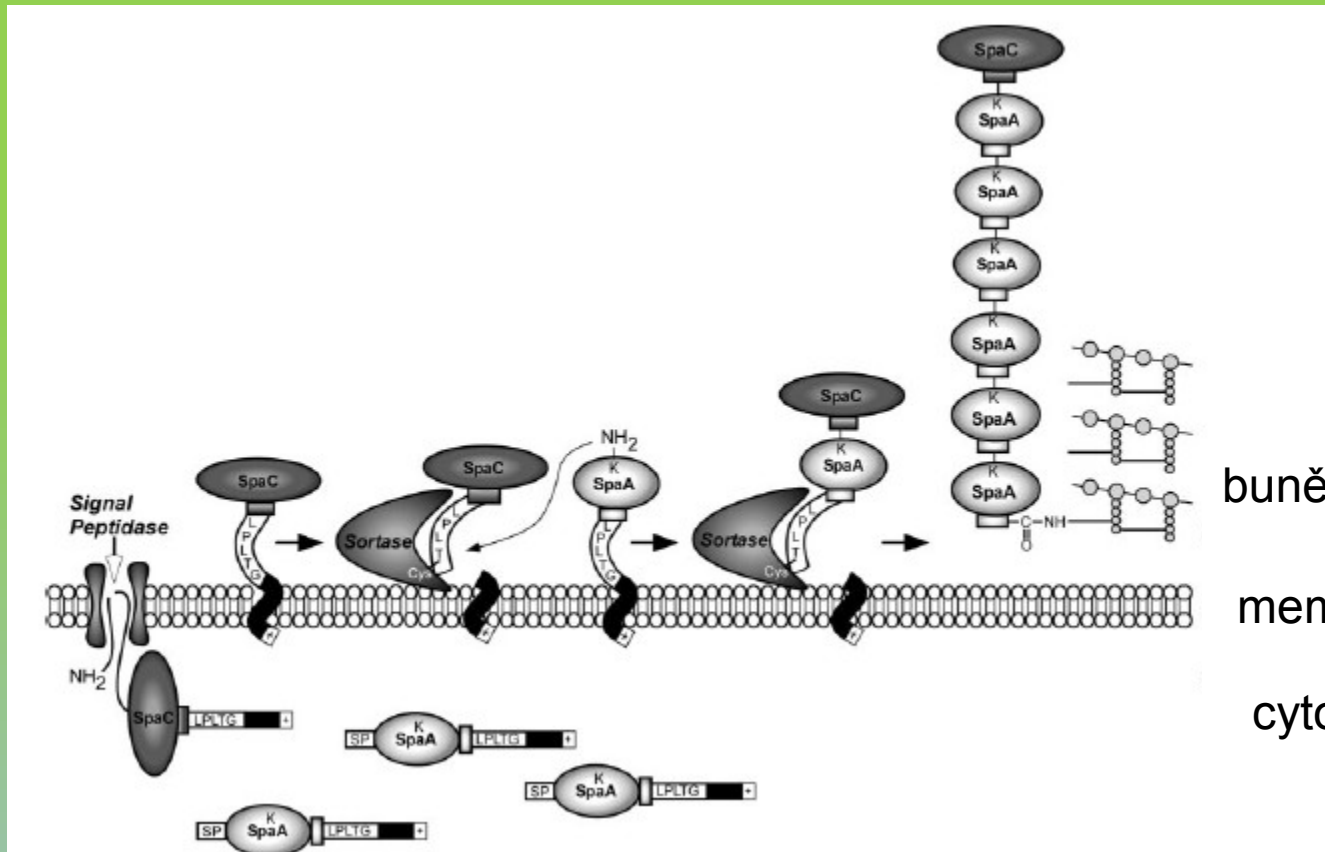
Sekrece u G+ bakterií

- Sekrece je jednodušší, protože není přítomna vnější lipidická membrána
- Pro sekreci je nutná přítomnost N-terminálních signálních sekvencí
- Klasifikace signálních peptidů je založena na typu signální peptidázy (SPázy), která je nutná k oddělení signálního peptidu
- Pro sekreci jsou obecně využívány systémy Sec nebo Tat
- Pro některé patogeny jsou typické specifické transportní systémy, které mohou přenášet pouze omezené spektrum proteinů
- Pro sekreci bakteriocinů jsou přítomné specifické ATP-binding cassette (ABC transportéry)

Sekrece u G+ bakterií

- Dráha **Tat** je G+ odlišná od G- bakterií
- U G- bakterií je tvořena třemi komponentami – TatA, TatB a TatC
- Gram pozitivní bakterie mají pouze Tat A a TatC. Protein TatA je bifunkční a přebírá i funkci proteinu TatB

Tvorba pili zprostředkovaná sortázou



buněčná stěna

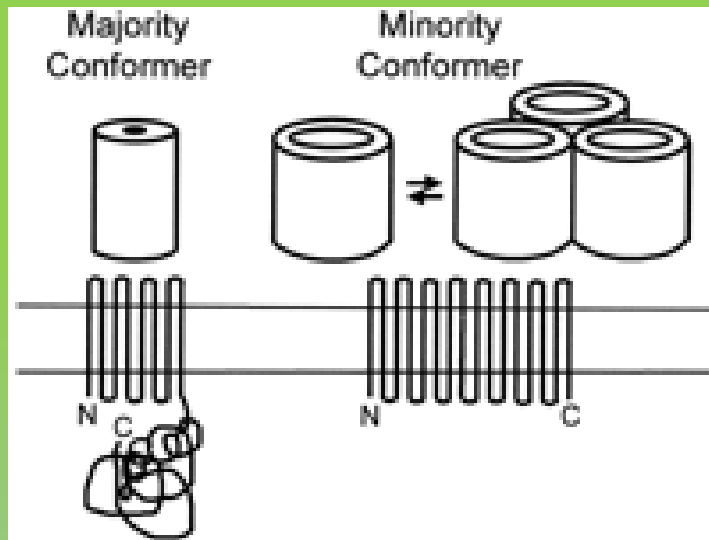
membrána

cytoplazma

Příklady proteinů vnější membrány G- bakterií a jejich funkce

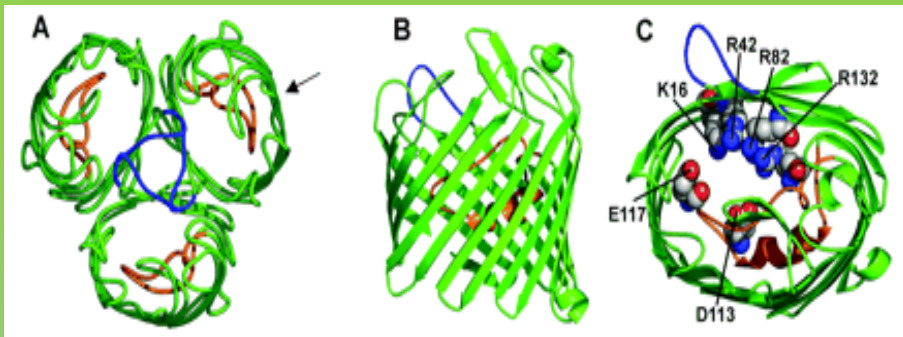
Protein	Functions
OmpF (porin protein 1a)	Diffusion channel for small molecules Receptor for phage TuIa, T2 Stabilization of cell surface structure
OmpC (porin protein 1b)	Diffusion channel for small molecules Receptor for phage TuIb, T4 Stabilization of cell surface structure
OmpA (protein 3a)	Specific interaction with LPS Receptor for phage TuII Stabilization of mating aggregates in F-dependent conjugation
OmpB (porin protein) LamB (maltoporin)	Diffusion channel for maltose, other metabolites Specific porin for maltose, maltodextrin Receptor for phage λ
Murein lipoprotein (Braun's lipoprotein)	Most abundant surface protein in <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ; major structural protein Stabilizing cell surface
TonA	Ferrichrome uptake Receptor for phage T1, T5, 80, colicin M
PhoE (protein E)	Anion-selective diffusion channels, induced under phosphate limitation
Protein P	Anion-selective diffusion channel in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Induced under phosphate limitation

Model porinů skupiny OmpA-OmpF



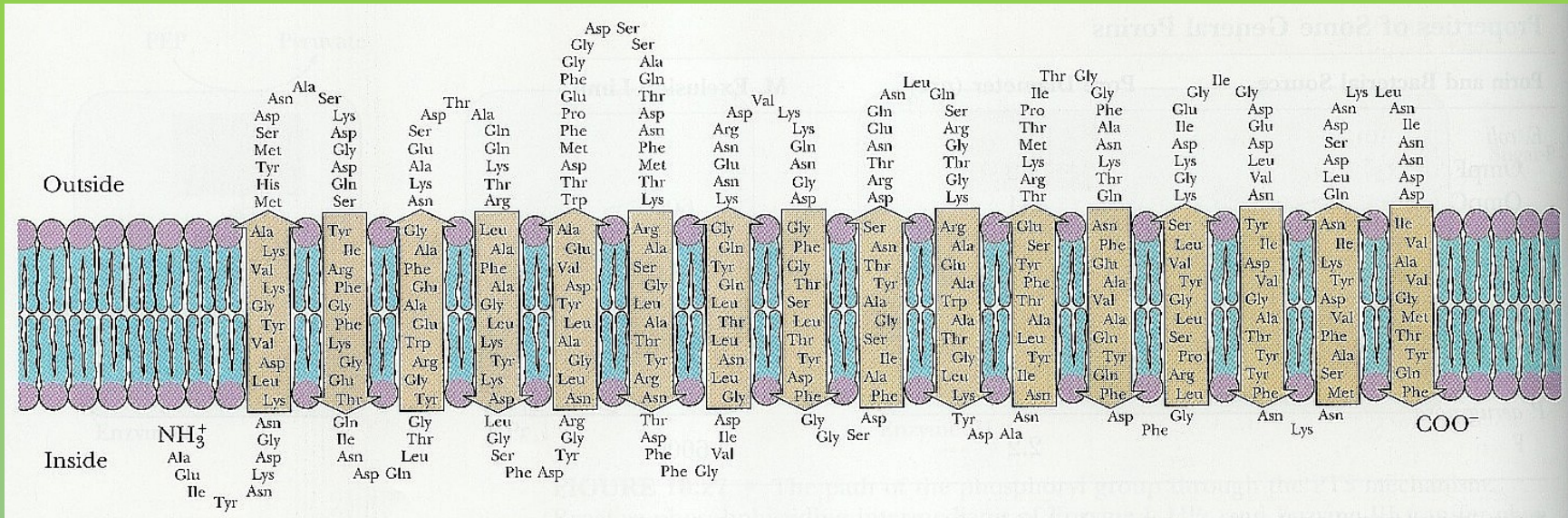
- Většina populace vytváří protein se dvěma doménami (v levo) a je důležitá pro vazbu na peptidoglykan (C-terminální globulární doména obsahuje peptidoglykan-vázací motív)
- Malá část populace vytváří otevřený " β -barrel". *E.coli* produkuje trimerní poriny s vysokou permeabilitou. Fluorescentní pseudomonády ztratily vysokopermeabilní poriny a pro ně to jsou pouze nespecifické poriny
- Tato frakce vede také vytváření volně spojených oligomerních struktur

Struktura porinu OmpF *E. coli*



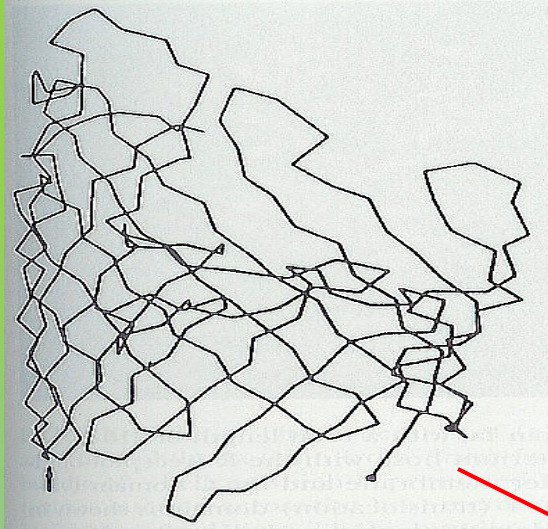
- (A) - pohled na trimer shora. Smyčka (modrá) je významná pro interakci s dalšími monoméry jednotky. Oranžově zbarvené smyčky vytvářejí kanál
- (B) - pohled na jednotlivé monomerní jednotky
- (C) – pohled na monomerní jednotku shora ukazující “očko” nebo stáhnutou oblast kanálu. Očko je tvořeno Glu117 a Asp113 smyčky L3

Struktura porinu PhoE *E.coli*

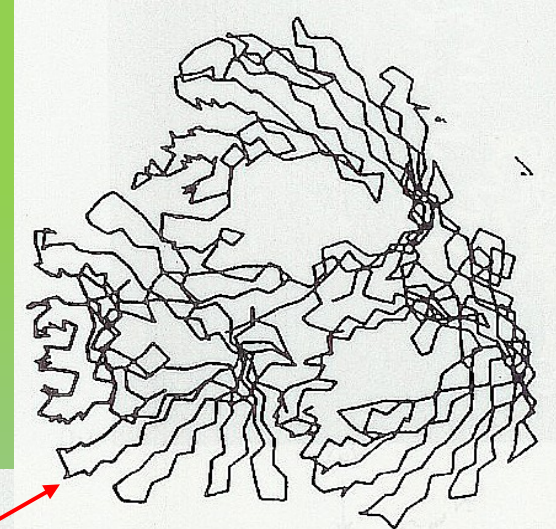
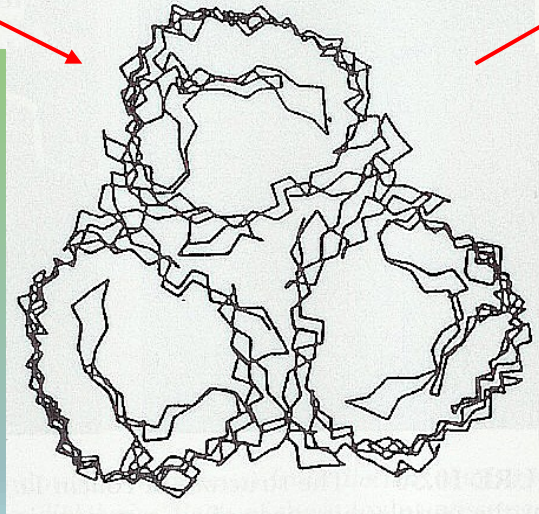


- Model uspořádání porinu PhoE ve vnější membráně. Transmembránové segmenty jsou ve formě skládaného β -listu

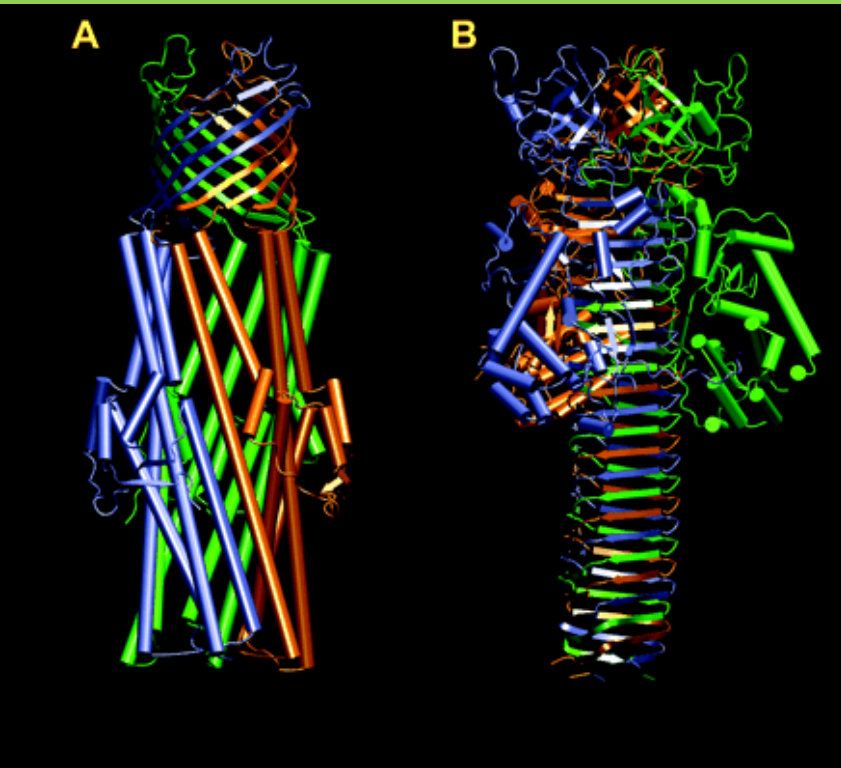
Vytváření porinu u *Rhodobacter capsulatus*



monomer



Krystalografická struktura



- **A** - TolC trimer. Každá podjednotka má jinou barvu. Nahoře je 12ti řetězcový barel a každá podjednotka má 4 řetězce. Dole je barel tvořící dlouhý periplazmatický tunel tvořený 12 spirálami
- **B** – OM trimer bílkovinné trubičky bičíku fága T4 sloužící k injekci DNA fága do buňky (každý monomer má jinou barvu). Dlouhá jehlovitá struktura jde přes OM a periplazmu do cytoplazmy (je podobný β -barrel). Helikální tunel TolC je vytvářen zcela odlišným způsobem - jako β -helix. Ve střední části je lysozymová doména, důležitá při vytváření otvoru v peptidoglykanu

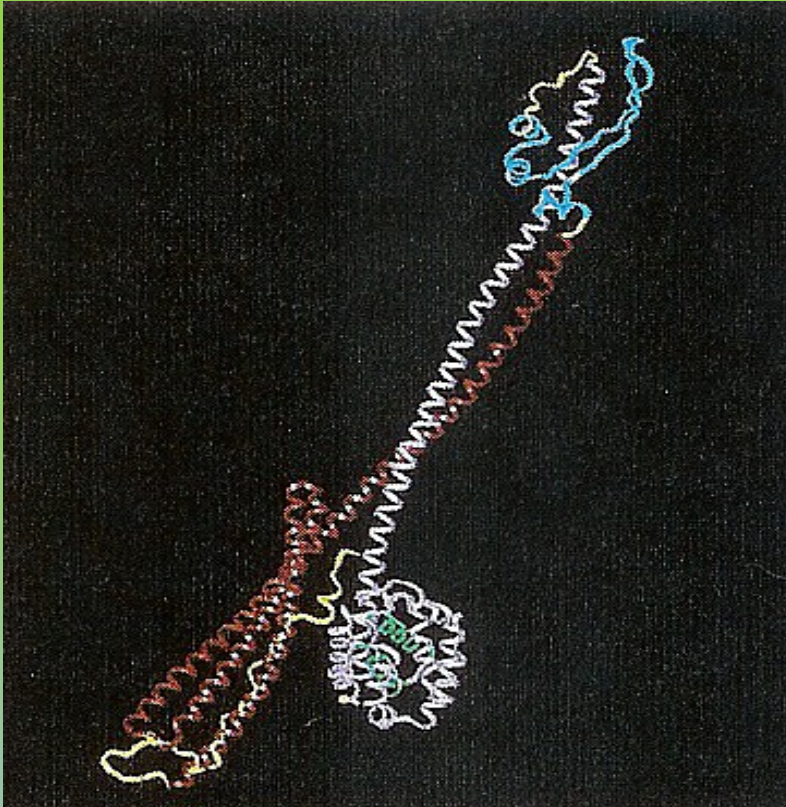
Toxiny vytvářející póry

- Řada mikroorganismů produkuje molekuly, které jsou označovány jako **toxiny vytvářející póry**
- Tyto molekuly vytváří v obalových strukturách buňky póry nebo kanály
- Vytvořením póru nebo kanálu může dojít ke kolapsu iontového gradientu nebo vstupu toxických agens do buňky – výsledek – porušení nebo i odumření buňky
- Mezi tyto molekuly patří koliciny, α toxin, δ -endotoxin, proaerolyzin aj.

Koliciny

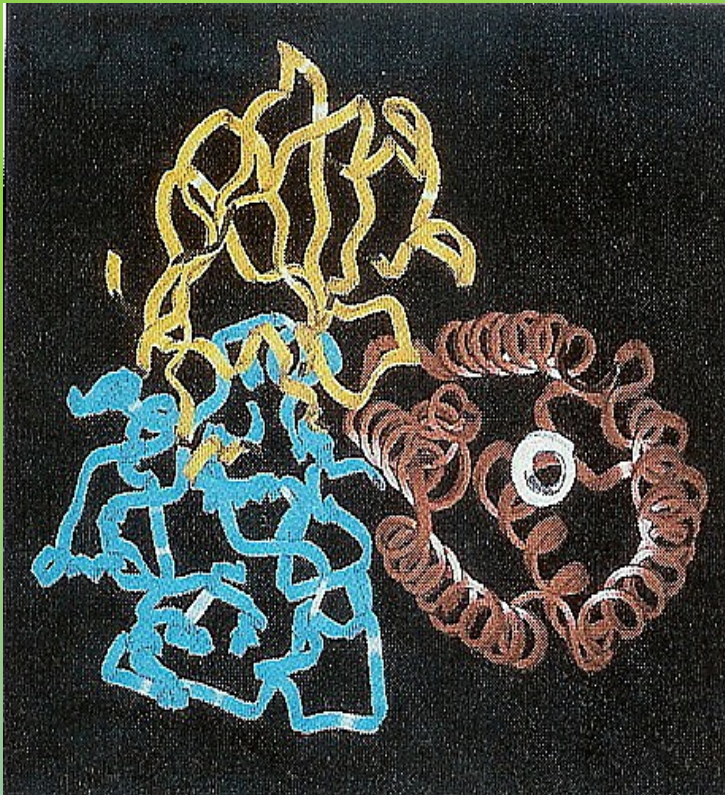
Kolicin	Receptor	Translokace	Cytotoxická aktivita
• A	Btu	BOmpF, TolQRAB	Tvorba kanálu
• E1	BtuB	TolC, TolQRA	Tvorba kanálu
• E2, E7, E8, E9	BtuB	OmpF, TolQRAB	DNáza
• E3, E4, E6	BtuB	OmpF, TolQRAB	RNáza hydrolyzující 16S rRNA
• E5	BtuB	OmpF, TolRAB	RNáza hydrolyzující antikodon loop tRNA
• N	OmpF	TolQRA	Tvorba kanálu
• K	Tsx	OmpF, OmpA, TolQRAB	Tvorba kanálu
• U, 28b	OmpA	OmpF, LPS, TolQRAB	Tvorba kanálu
• DF13	IutA	TolQRA	RNáza hydrolyzující 16S rRNA

Kolicin Ia



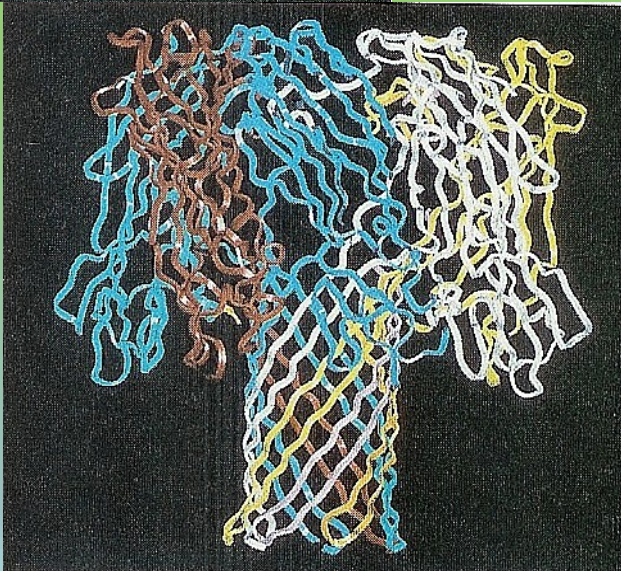
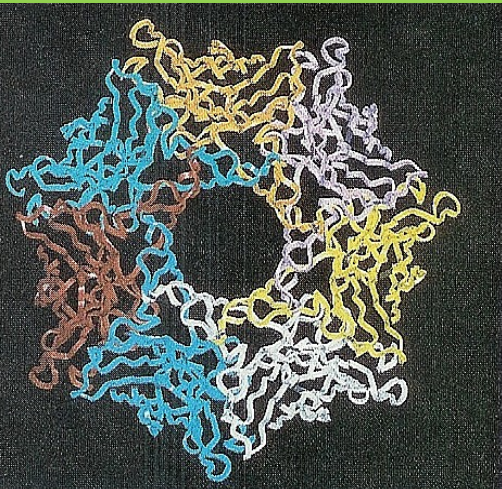
- Má celkovou délku 210Å a má tři domény
- T – doména (translokační) – červená
- R – doména (receptor binding) – modrá
- C – doména (channel-forming) – zelená – obsahuje svazek 10 α -helix procházející do cytoplazmatické membrány

δ-endotoxin



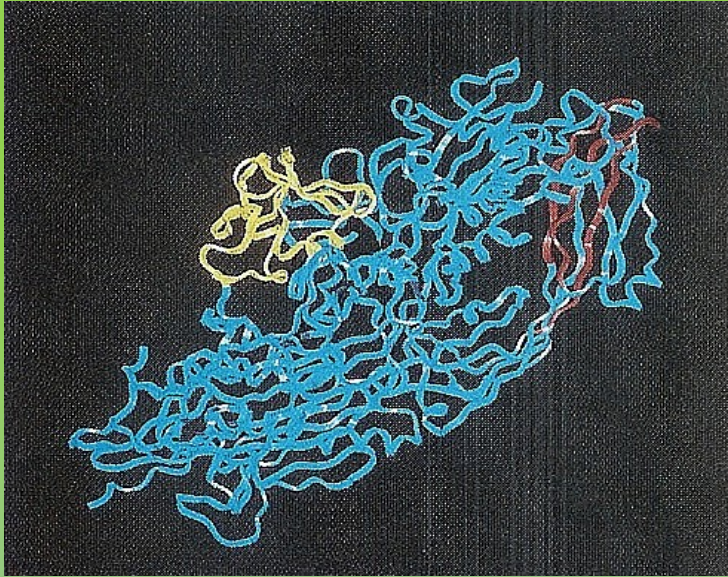
- δ-endotoxin je produkováný *Bacillus thuringiensis* a je toxický pro *Coleoptera*
- Je tvořen 3 doménami (obsahující – 7x helix jedna je silně hydrofobní, ostatní amfipatické, 3x skládaný list, β-sandwich)

α -hemolyzin



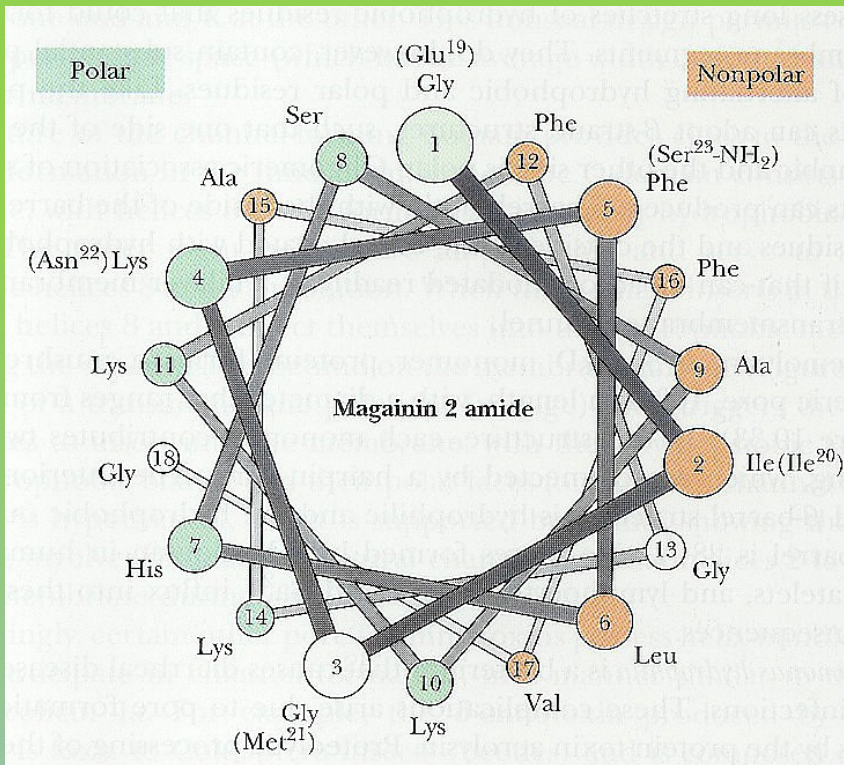
- Patří do skupiny dalších toxinů, které vytvářejí dlouhé segmenty (α -helix) procházející do cytoplazmatické membrány (α -hemolyzin – *Staphylococcus aureus*, aerolyzin – *Aeromonas hydrophila*, antrax toxin – *Bacillus anthracis*)
- α -hemolyzin je monomerní protein (33,2 kD, délce 100Å, průměr 14-46Å)
 - * α -hemolyzin vytváří heptamerní transmembránový kanál
 - *prostorové uspořádání ve formě deštníku (monomery jsou spojené vlásenkami)
 - *póry jsou vytvářeny u erytrocytů, lymfocytů a krevních destiček – výsledek rychlý influx Ca^{2+} -toxický efekt

Proaerolyzin



- proaerolyzin produkovaný *Aeromonas hydrophila* vytváří heptamerní transmembránový kanál
- Proaerolyzin je tvořený 3 řetězci (β řetězce 277-287, 287-290, 302-410 zbytků)
- Působí na buňky stěny střevní (průjmové onemocnění)

Amfipatické šroubovice tvořící iontové transmembránové kanály



- Původně objevené jako přírodní peptidy s charakteristickou molekulou – polární a nepolární část
- Peptidy tvoří α -helikální agregáty v membránách s iontovým kanálem v centru agregátu.
- Polární zbytky jsou zodpovědné za iontový kanál, nepolární zbytky interagují s hydrofobní částí lipidické dvojvrstvy

Cecropin A:

Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-NH₂

Melittin:

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

Magainin 2 amide:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-NH₂