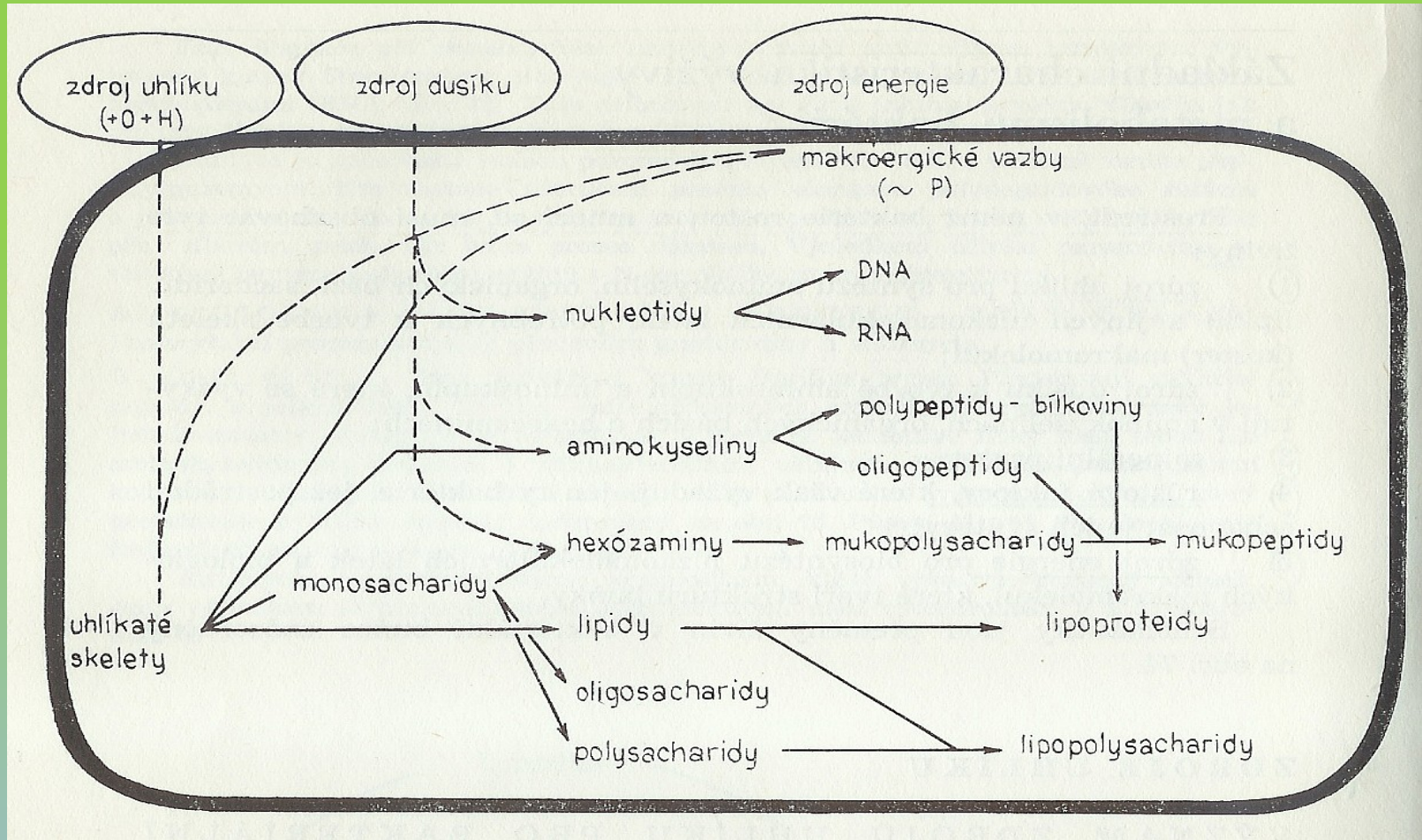


Výživa a transport látek

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 získávání uhlíku** – autotrofie, heterotrofie
a
dva způsoby získání energie - fototrofie a chemotrofie,
kteřé jsou vzájemně kombinovatelné
- Podle výživy lze tedy organizmy rozdělit na **foto**autotrofní, **foto**heterotrofní, **chemo**autotrofní, **chemo**heterotrofní

Zdroje uhlíku

- **Fotoautotrofní** – **zelené rostliny**, cyanobakterie - 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; 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 minerálních látek

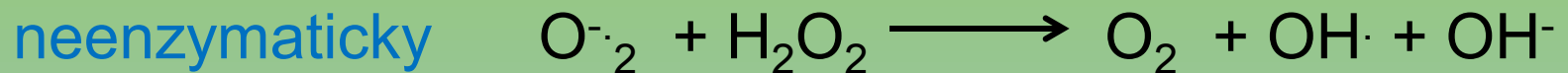
- **Kyslík a vodík** – významně ovlivňují celkový metabolismus buňky. Některé organizmy vyžadují molekulový kyslík a některé mohou využívat molekulový vodík.
- Podle **vztahu ke kyslíku** se organizmy dělí na
 - striktní (obligatorní) aeroby** – aerobní respiratorní metabolismus
 - striktní (obligatorní) 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 - kyslík

- přítomnost je bezpodmínečná u aerobních bakterií
- pro aerobní bakterie je charakteristická přítomnost cytochromů a cytochromoxidázy
- některé **oxidoredukční enzymy** reagují s molekulovým kyslíkem za vzniku superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylového radikálu ($OH\cdot$) nebo peroxidu vodíku (H_2O_2)



neenzymaticky



- superoxid dizmutáza



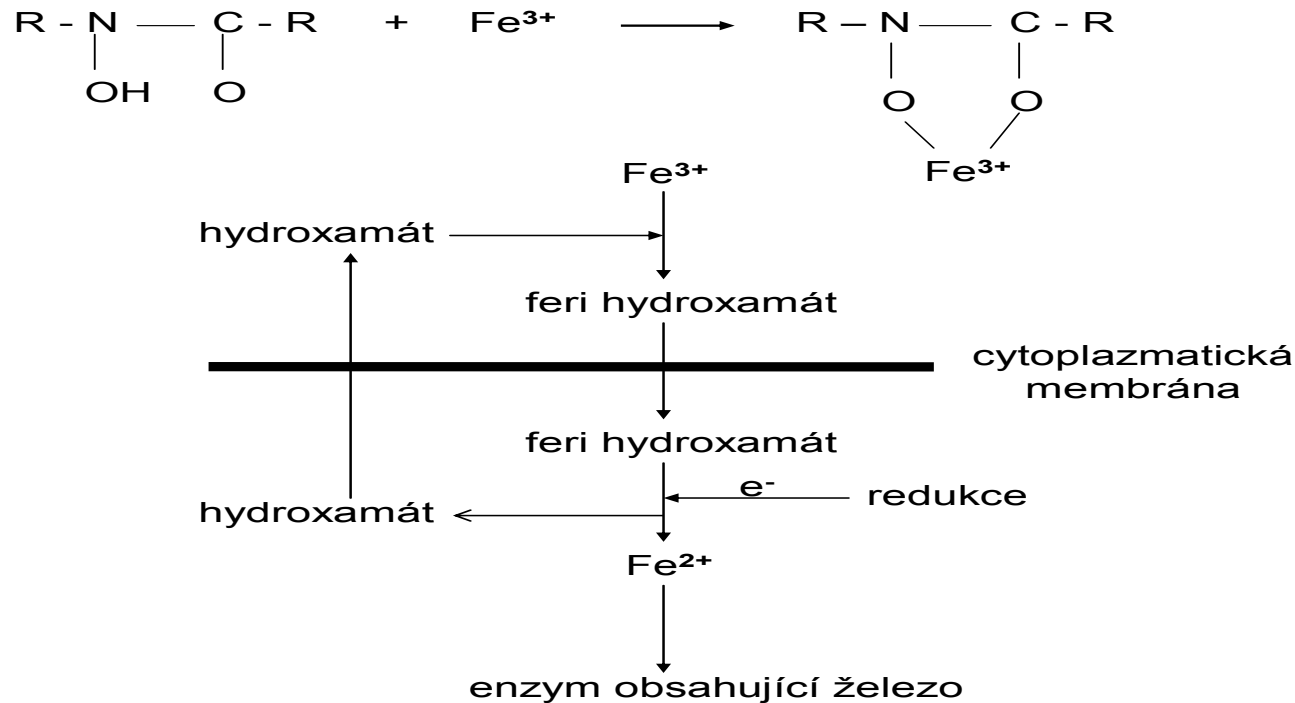
Zdroje minerálních látek

- **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
- **Kobalt** – složka vitamínu B_{12}
- **Vápník** – význam při sporulaci
- **Zn, Cu, Mo, Ni, Se** atd. součástí metaloenzymů

Zdroje minerálních látek - železo

- Přítomnost železa je bezpodmínečná při procesech respirace
- Za anaerobních podmínek se železo v buňce nachází jako Fe^{2+} (rozpustné), zatímco v aerobních podmínkách je to Fe^{3+} (nerozpustné)
- Produkce **sideroforů**, které váží železo a transportují je do buňky
- Komplex železo-hydroxamát je potom přenesen do buňky, železo se redukcí uvolní ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) a hydroxamát je exkretován z buňky
- Řada bakterií mohou produkovat komplex sideroforů, který je označován jako **enterobaktin** (*E. coli* a ostatní enterobakterie), **bacilibaktin** (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*) atd.
- Komplex Fe^{3+} - enterobaktin je přes membránu přenášen aktivním transportem

Zdroje minerálních látek - železo



Mořské bakterie produkují modifikovaný siderofor, který umožňuje získat železo i z tohoto na Fe velmi chudého prostředí.

Funkce stopových prvků v buňce

prvek	podíl na funkci buňky
bór	podílí se na uskutečnění quorum sensing, součástí polyketidů (antibiotika, mykotoxiny)
kobalt	vitamin B12, transkarboxyláza (propionové bakterie)
měď	respirace, cytochrom c oxidáza, fotosyntéza, plastocyanin, některé superoxid dismutázy
železo	cytochromy, katalázy, peroxidázy, FeS-proteiny, všechny nitrogenázy
mangan	aktivátor řady enzymů, některé superoxid dismutázy, fototrofie (fotosystém II)
molybden	některé flavin obsahující enzymy, nitrát reduktázy, sulfit oxidázy, ureáza, některé formiát dehydrogenázy, koenzym F ₄₃₀ (metanogenové), karbon monoxid dehydrogenáza
selen	formiát dehydrogenáza, některé hydrogenázy, selenocystein
wolfram	některé formiát dehydrogenázy, oxotransferázy hypetermofilů
vanad	vanadium nitrogenáza, bromoperoxidáza
zinek	karbonik anhydráza, alkohol dehydrogenáza, RNA a DNA polymerázy, proteiny vážící DNA
hořčík	proteosyntéza, bakteriochlorofyl
vápník	sporulace
nikl	ureáza, hydrogenázy, metylkoenzym M reduktáza, karbon monooxid dehydrogenáza

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

- aminokyseliny – především pro syntézu proteinů
- puriny a pyrimidiny – pro syntézu nukleových kyselin
- vitaminy – široké spektrum organických látek, které tvoří prostetické skupiny enzymů nebo aktivní centrum řady enzymů

Růstové faktory - aminokyseliny

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

Růstové faktory – puriny, pyrimidiny

- Intracelulární koncentrace purinů a pyrimidinů nepodléhá tak dramatickým změnám jako v případě aminokyselin
- V průběhu existence buňky se mění poměr zastoupení jednotlivých typů nukleových kyselin a tím také k jejich rychlejší „recyklaci“.

Růstové faktory - vitaminy

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 diptheriae</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

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

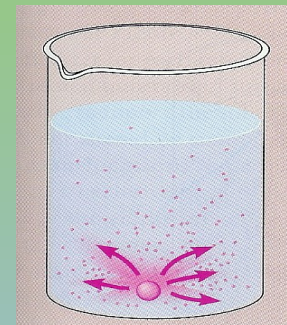
- Energii osmotickou – při transportu látek přes cytoplazmatickou membránu a osmoregulaci
- Energii kinetickou – proudění cytoplazmy a pohyb buňky
- Energii elektrickou – povrchový náboj nutný pro sorbci
- Energii světelnou – bioluminiscence u bakterií (*Photobacterium*, *Vibrio*)
- Energii tepelnou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

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)

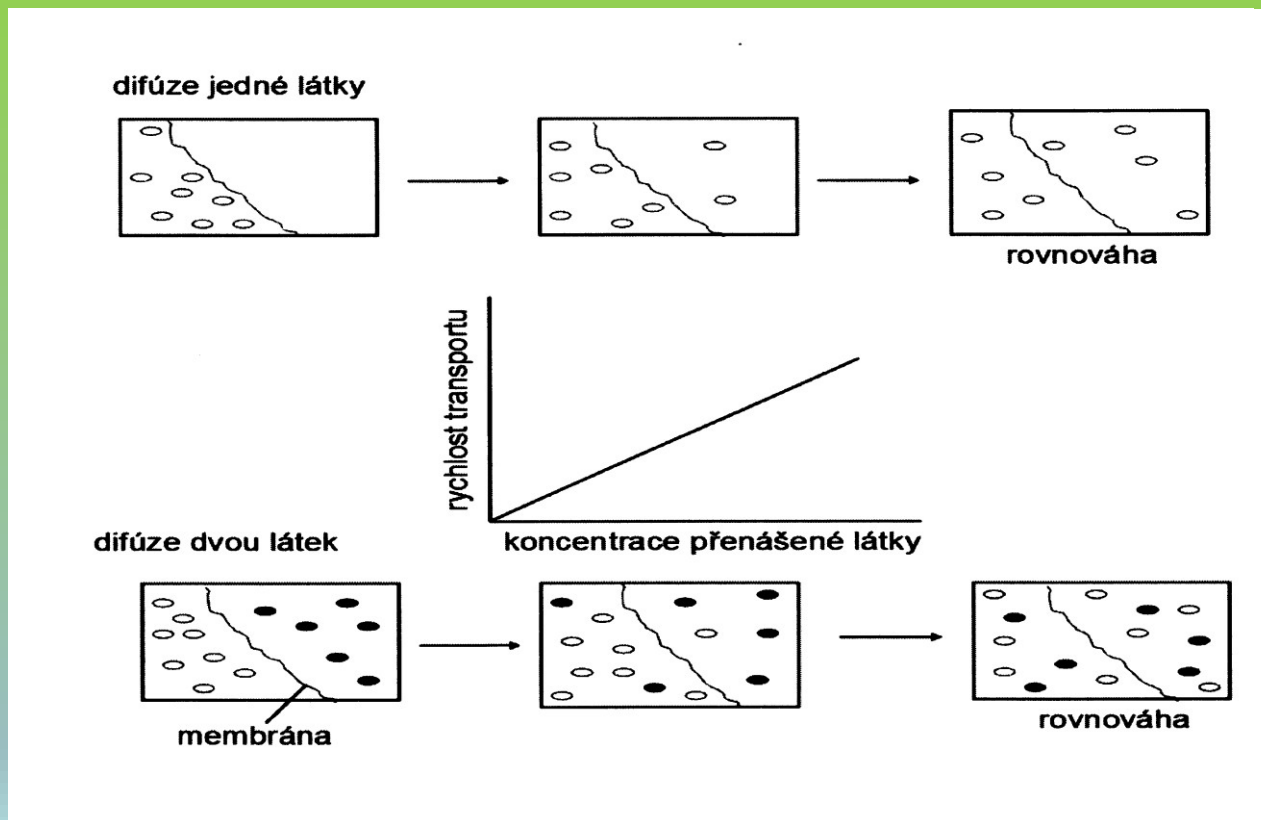
Nespecifická (prostá) difúze

- 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



Nespecifická (prostá) difúze

- Prostá difúze je uskutečňována oběma směry (do buňky i z buňky)

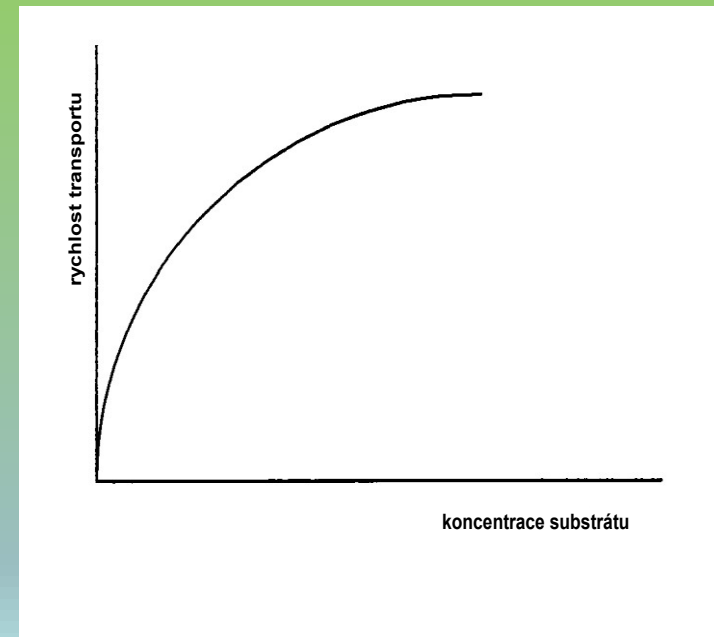
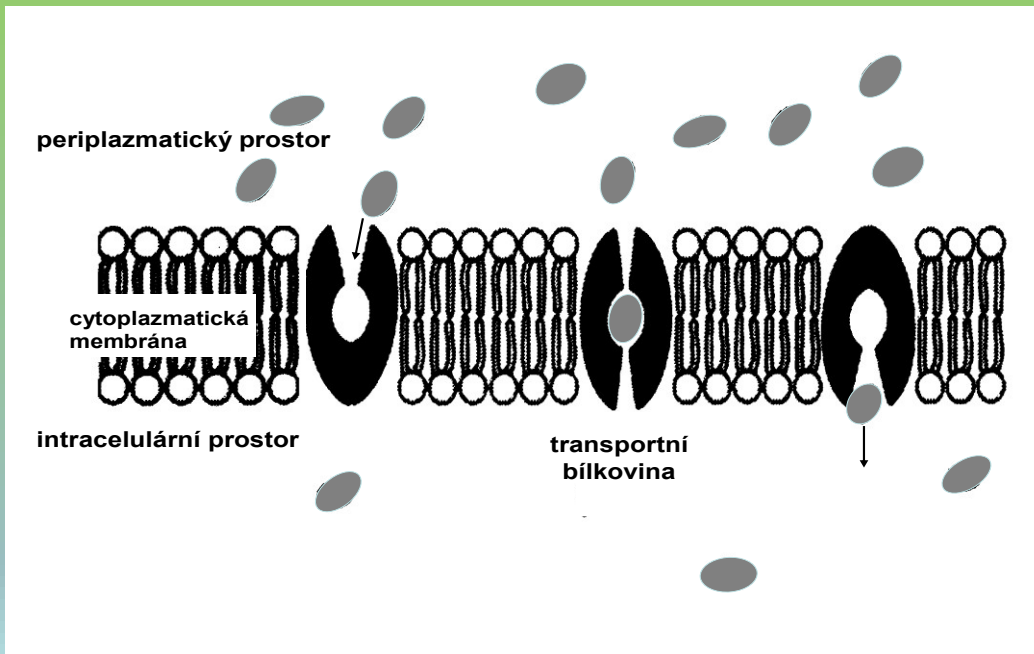


Specifický přenos bílkovinným přenašečem

- **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)



Aktivní transport

- **Aktivní transport** - přenos živin do buňky **a** přenos metabolitů do vnějšího prostředí
- Aktivní transport je **vždy** realizován bílkovinami
- Některé jsou v membráně přítomné stále (**konstitutivní**), některé jsou syntetizovány jen na základě přítomnosti substrátu na vnější straně membrány (**inducibilní**)

Aktivní transport

- **Na aktivní transport látek přes cytoplazmatickou membránu je vždy nutné určité množství energie**
- **Rychlost transportu (přenos substrátu) bude limitována počtem molekul stereospecifických transportních bílkovin a množstvím energie nutné pro uskutečnění procesu**

Aktivní transport

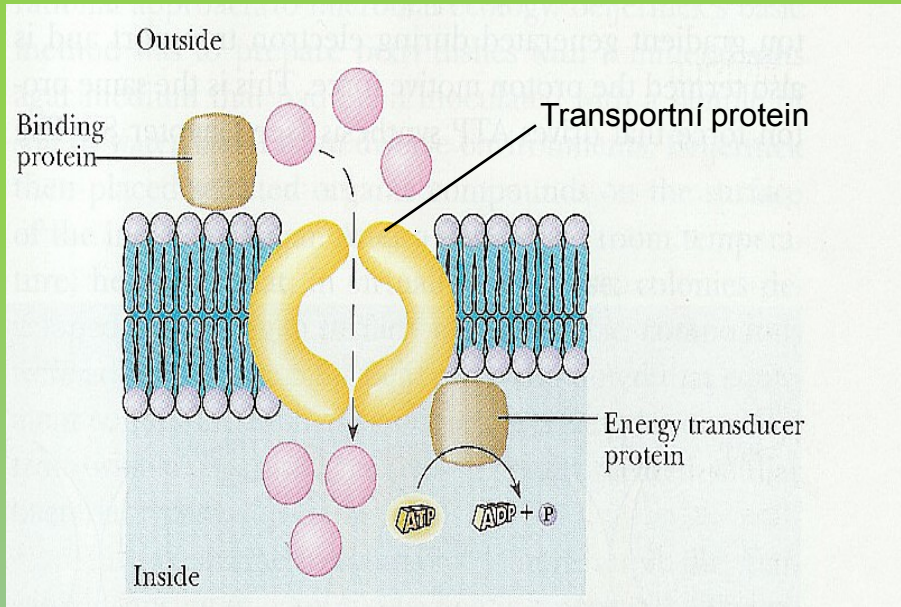
- Způsoby získání energie pro transportní systém
 1. štěpením ATP - **primární aktivní transport**
 2. transport spojený s elektrochemickým gradientem iontů – **sekundární aktivní transport**
 3. fosfoenolpyruvát-dependentní **fosfotransferázový systém** – skupinová translokace
 4. protonový gradient může být generovaný i světlem

Primární aktivní transport

- Primární aktivní transport je také nazýván **přímý aktivní transport**
- Využívá se přímo „metabolické“ energie k přenosu látek přes cytoplazmatickou membránu
- Většina enzymů, které uskutečňují tento typ transportu patří mezi **transmembránové ATPázy**

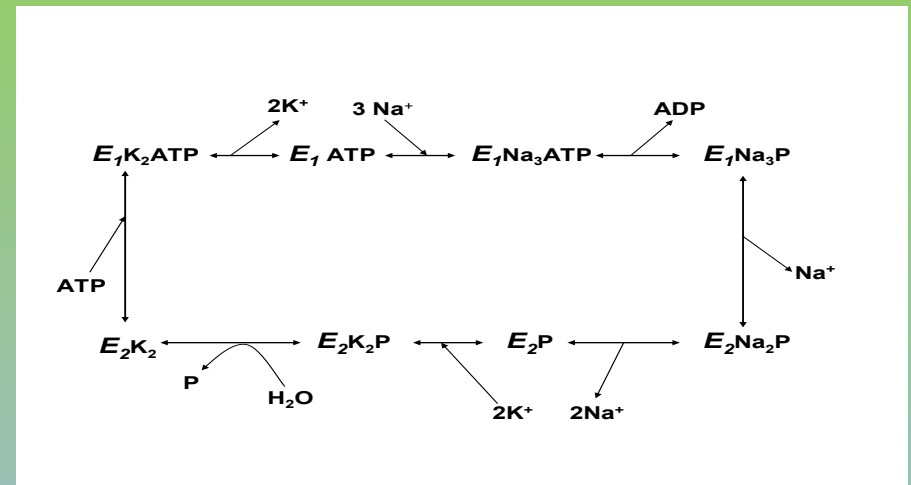
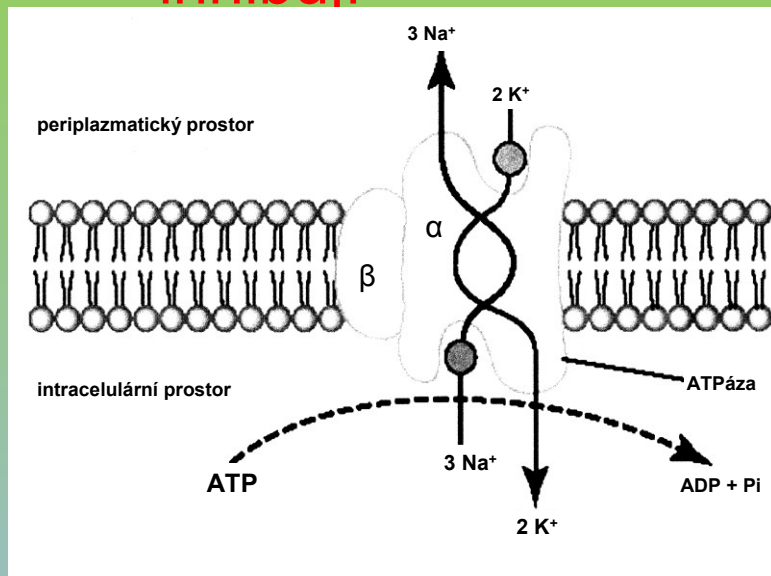
Primární aktivní transport

- 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



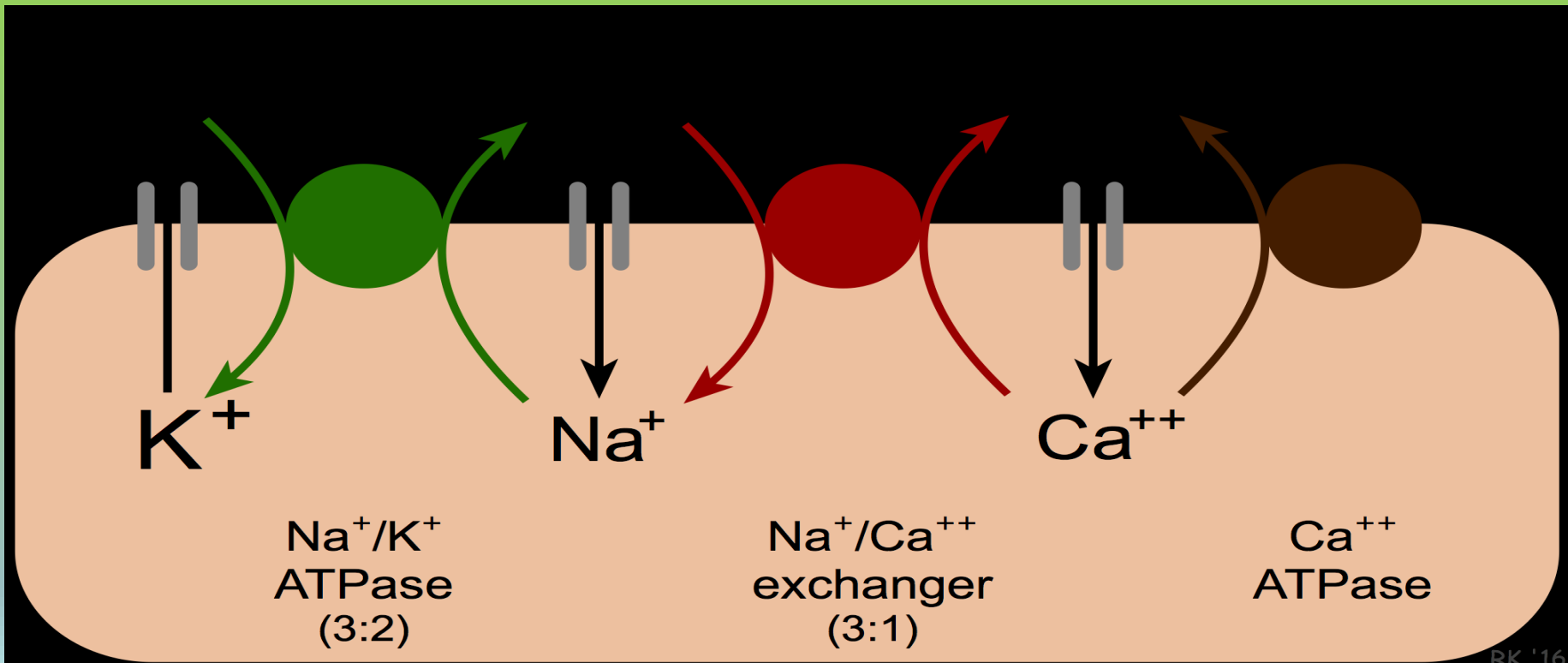
Primární aktivní transport – sodno-draselná pumpa

- sodná pumpa, Na^+/K^+ -ATPáza, Na^+-K^+ -ATPáza, sodíko-draselná pumpa
- přítomnost draslíku je vyžadována u celé řady enzymatických reakcí; **vysoké koncentrace sodíku uvnitř buňky reakce inhibují**



Primární aktivní transport – sodno-draselná pumpa + Ca^{2+}

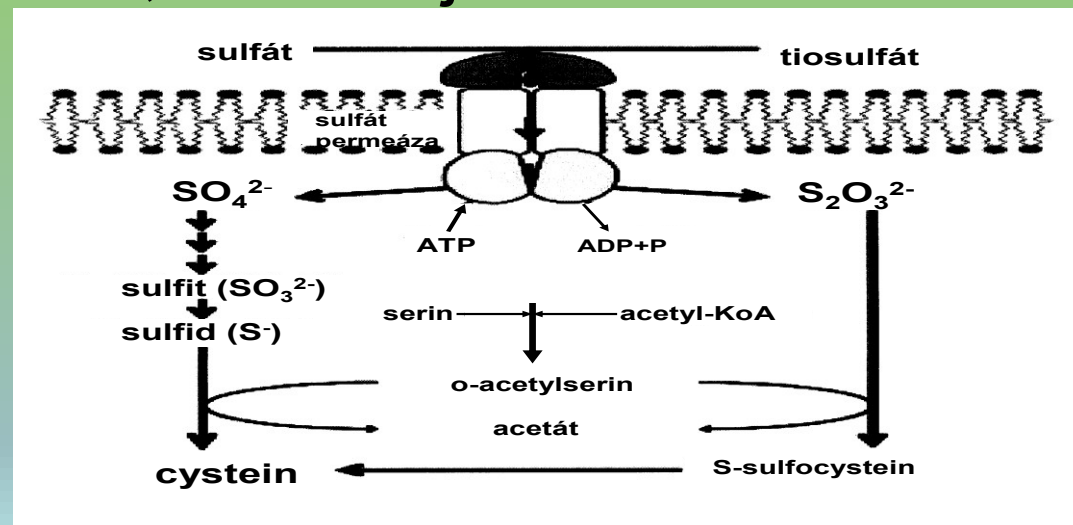
- Membránový potenciál **negativní** Ca^{2+} odchází z buňky a Na^+ vstupuje
- Membránový potenciál **pozitivní** – opačný proces



Primární aktivní transport – transport síry

- **Sulfát, tiosulfát** jsou přenášeny sulfát permeázou (sulfát-tiosulfát permeáza). Na vnitřní straně membrány je sulfát nejprve redukován na sulfit potom na sulfid pro tvorbu **cysteinu**
- **Tiosulfát** reaguje nejdříve s O-acetylserinem, za vzniku S-sulfocysteinu, následuje redukce na **cystein**

Obdobný způsob transportu je i u dalších aniotů, patřících do skupiny 6 – molybdát, selenát, chromát, wolframát



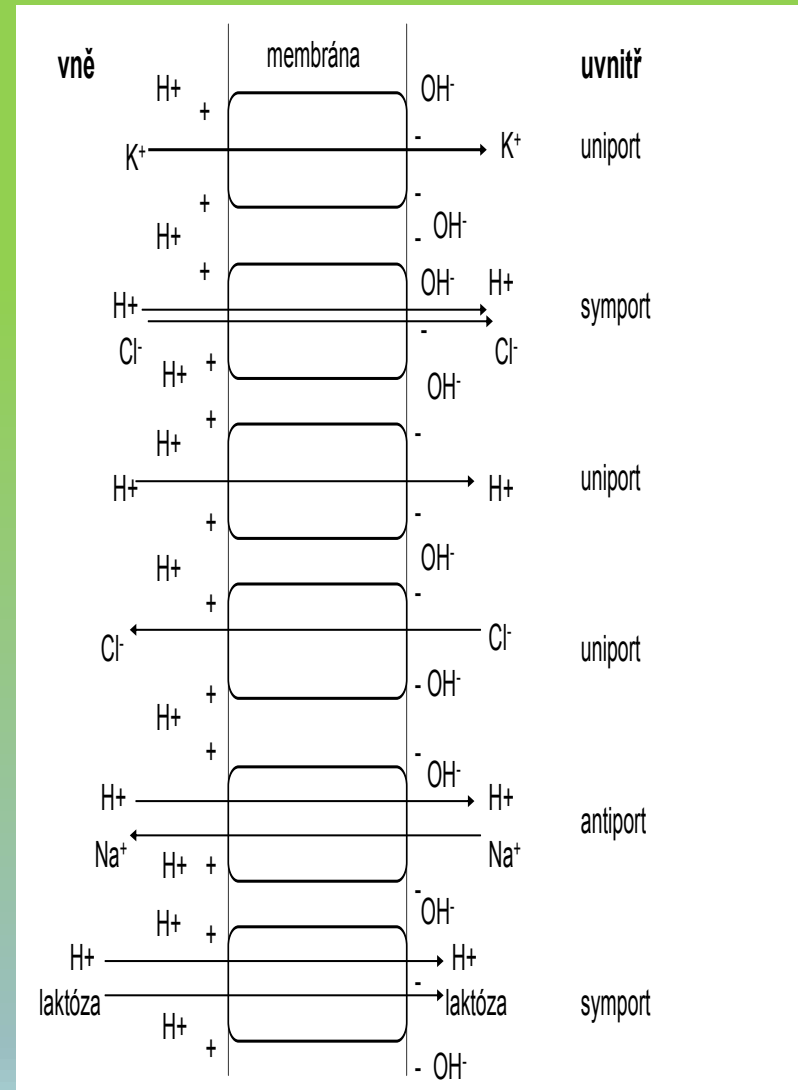
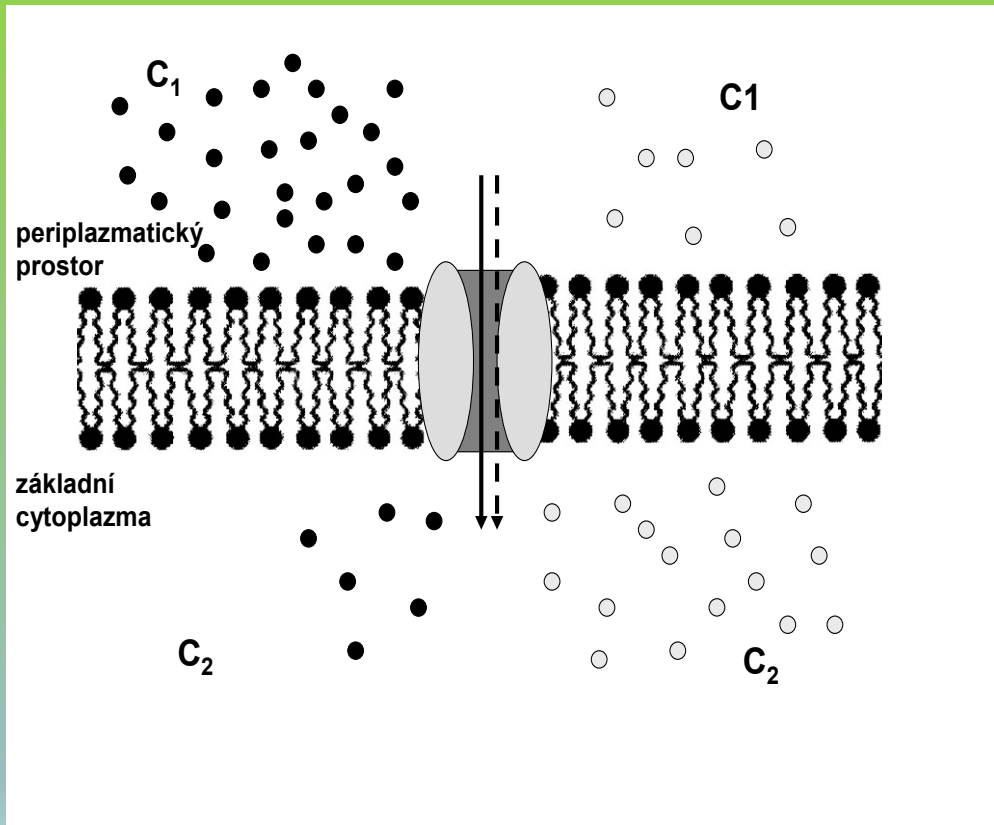
Sekundární aktivní transport

- Transport je uskutečňován specifickými transportními bílkoviny
- Energie pro tento aktivní transport je získávána z elektrochemického gradientu – **protonmotivní síly**
- Přenos částice proti gradientu svého elektrochemického potenciálu, takže její energie roste
- **Vždy jsou přenášeny dvě odlišné látky**

Sekundární aktivní transport

- Dva základní typy sekundárního aktivního transportu: **symport a antiport**
- Někdy se uvádí ještě **uniport**, charakteristický přenosem **jen** iontů (K^+ , H^+ , Cl^-) a to pouze **jedním** směrem
- Jako primární iont (primární látka) slouží především Na^+ nebo H^+ za předpokladu, že v extracelulárním prostoru bude vysoká koncentrace (více než desetinásobná) ve srovnání s intracelulární koncentrací

Sekundární aktivní transport



Sekundární aktivní transport

- **symportem** do buňky se přenášejí např.
 - do buňky** $3\text{Na}^+ / 1\text{P}_i$, $2\text{Na}^+ / 1\text{I}^-$, $1\text{Na}^+ / 1\text{Cl}^-$, $1\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / 1\text{K}^+$, $1\text{Na}^+ / 2\text{HCO}_3^-$, $\text{H}^+ / \text{di, tripeptid}$
 - z buňky** $1\text{K}^+ / 1\text{Cl}^-$, $1\text{Na}^+ / 3\text{HCO}_3^-$, $\text{H}^+ / \text{prolin}$, $\text{H}^+ / \text{dikarboxylové kyseliny}$
- **antiportem** 3Na^+ dovnitř/ 1Cl^- ven,
 1Na^+ dovnitř/ 1H^+ ven, 1Cl^- dovnitř/ 1HCO_3^- ven,
 3Na^+ dovnitř/ 1Ca^{2+} ven

Sekundární aktivní transport

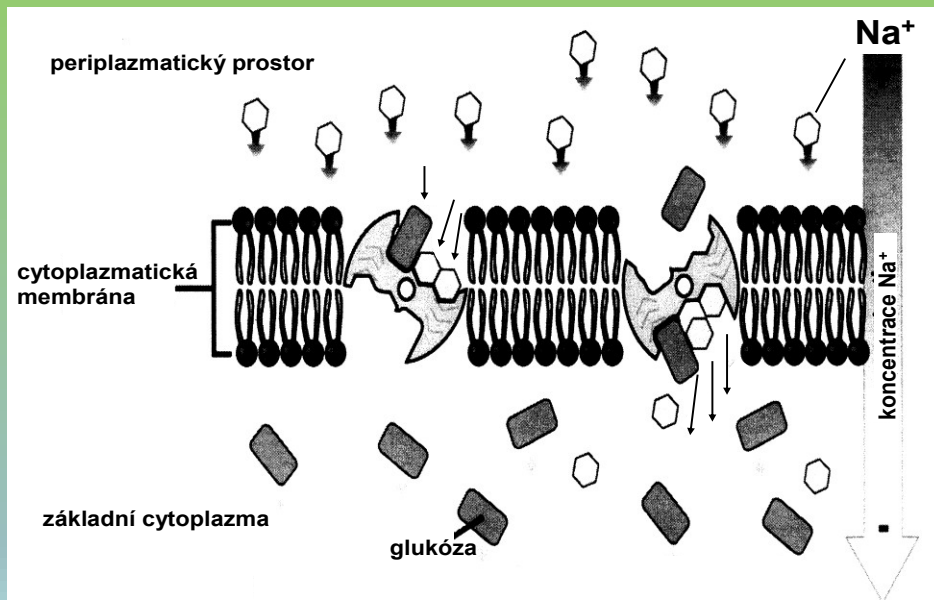
- Mimo ionty je možné přenášet i malé organické molekuly
- symportem

ven $1\text{H}^+/1\text{R-COOH}$ (R-COO⁻ - monocarboxyláty
-laktát, pyruvát, acetoacetát, β -hydroxybutyrát)

dovnitř $2\text{Na}^+/1\text{GABA}/1\text{Cl}^-$ (GABA γ -aminomáselná
kyselina)

Sekundární aktivní transport

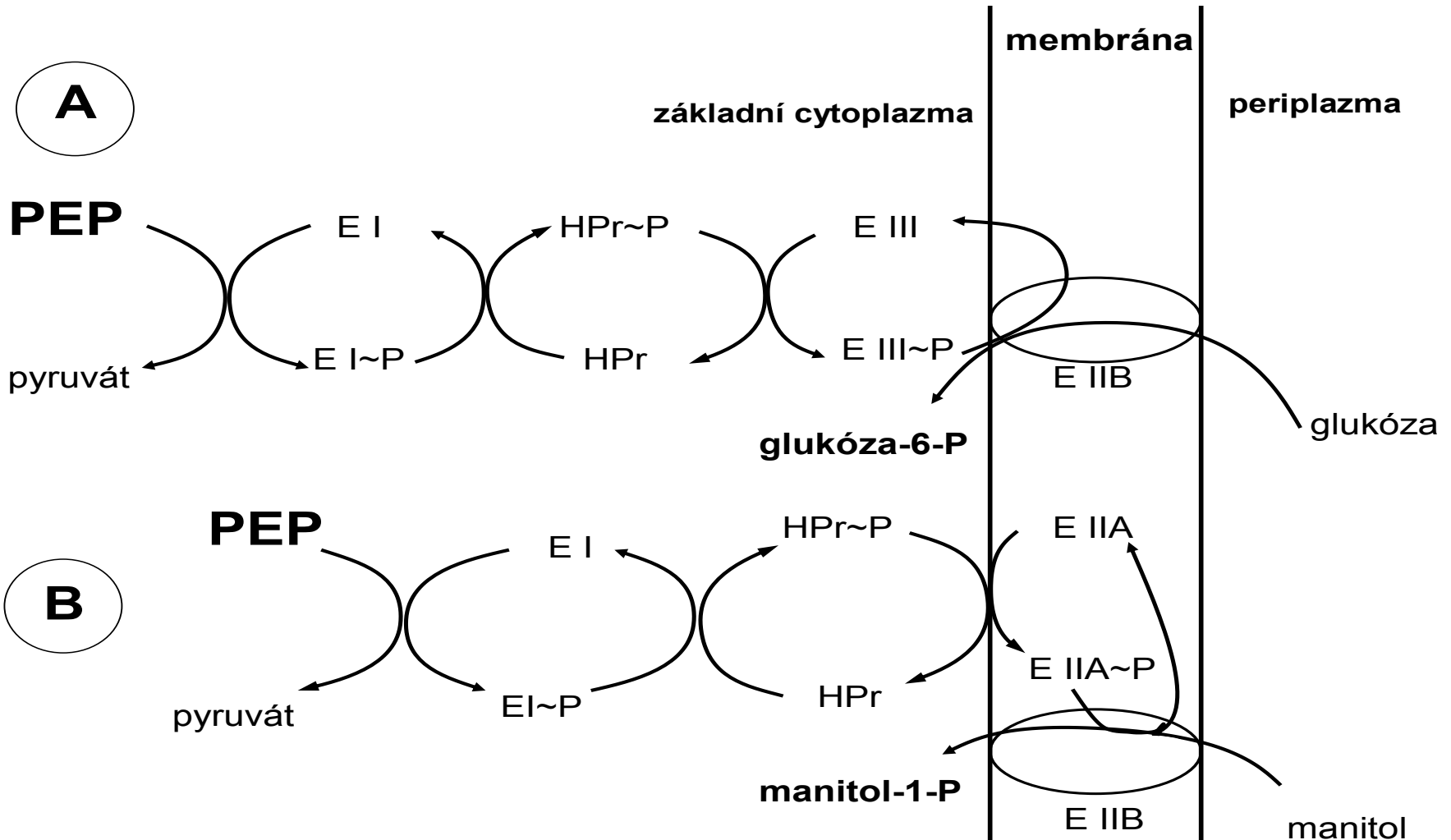
- Každý transportér má na vnější (nebo vnitřní) straně jedno či více vazebných míst, které slouží k vazbě látek, které se mají přenášet
- U *E. coli* galaktozid permeáza v **symportu** dovnitř 2 Na⁺/1 glukóza – má dvě vazebné polohy jedna pro Na⁺ (nebo H⁺) a druhá pro glukózu



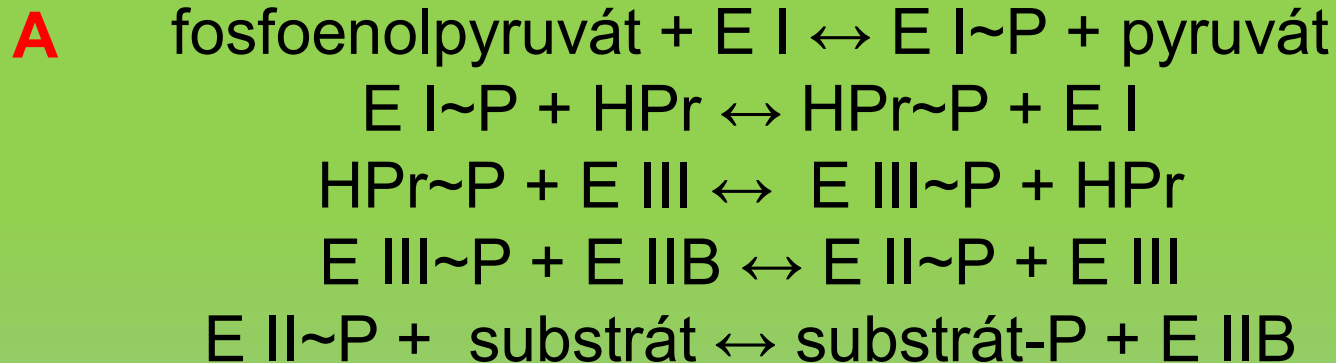
Aktivní transport – fosfotransferázový systém

- **Fosfotransferázový systém** (skupinová translokace, skupinová translokace glycidů, fosfoenolpyruvát dependentní fosfotransferázový systém; PTS)
- Po přechodu komplexu enzym-substrát přes membránu, je v základní cytoplazmě fosforylován substrát, což vede ke konformační změně a tím také k rozpadu komplexu
- Donorem makroergické vazby je obvykle **fosfoenol pyruvát**

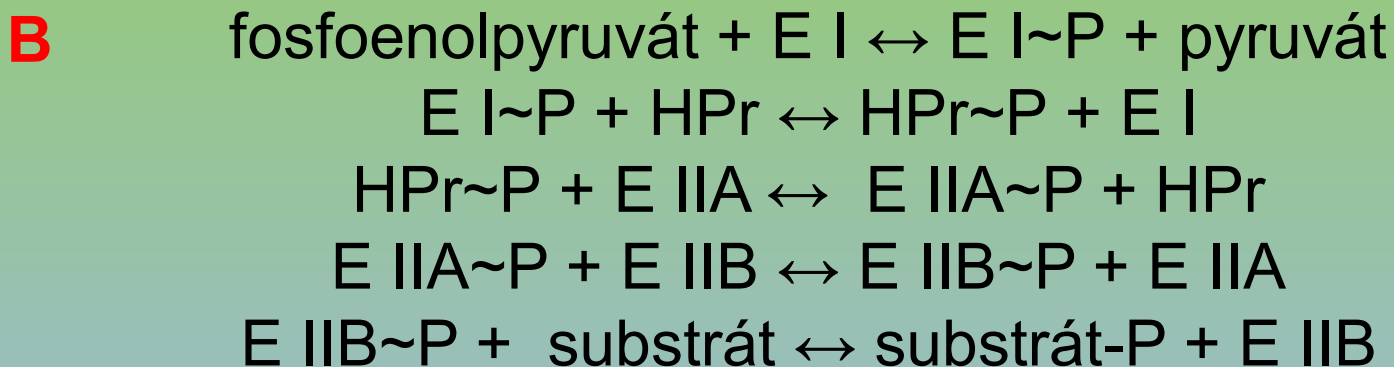
Aktivní transport – fosfotransferázový systém



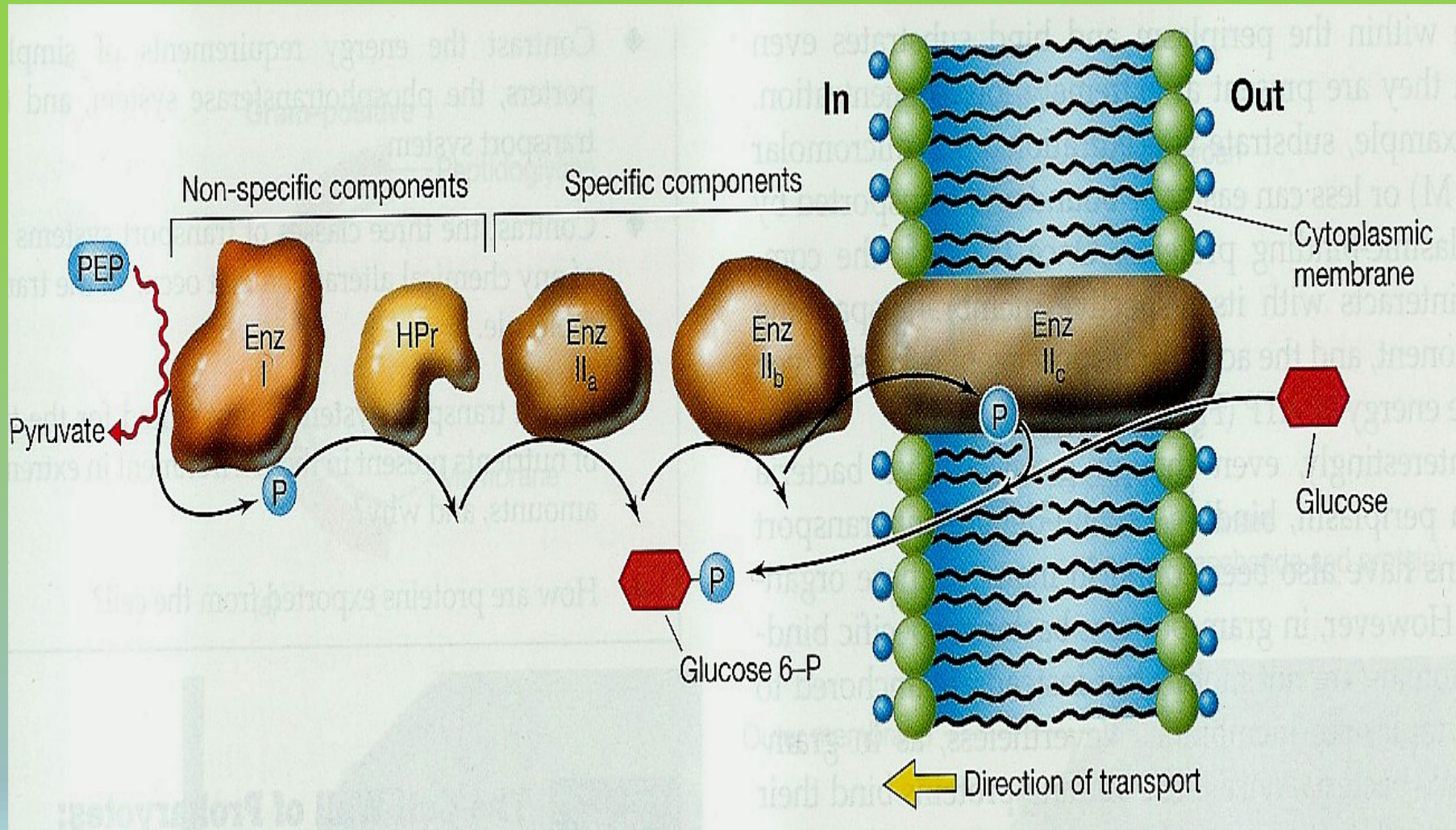
Aktivní transport – fosfotransferázový systém



modifikovaný systém



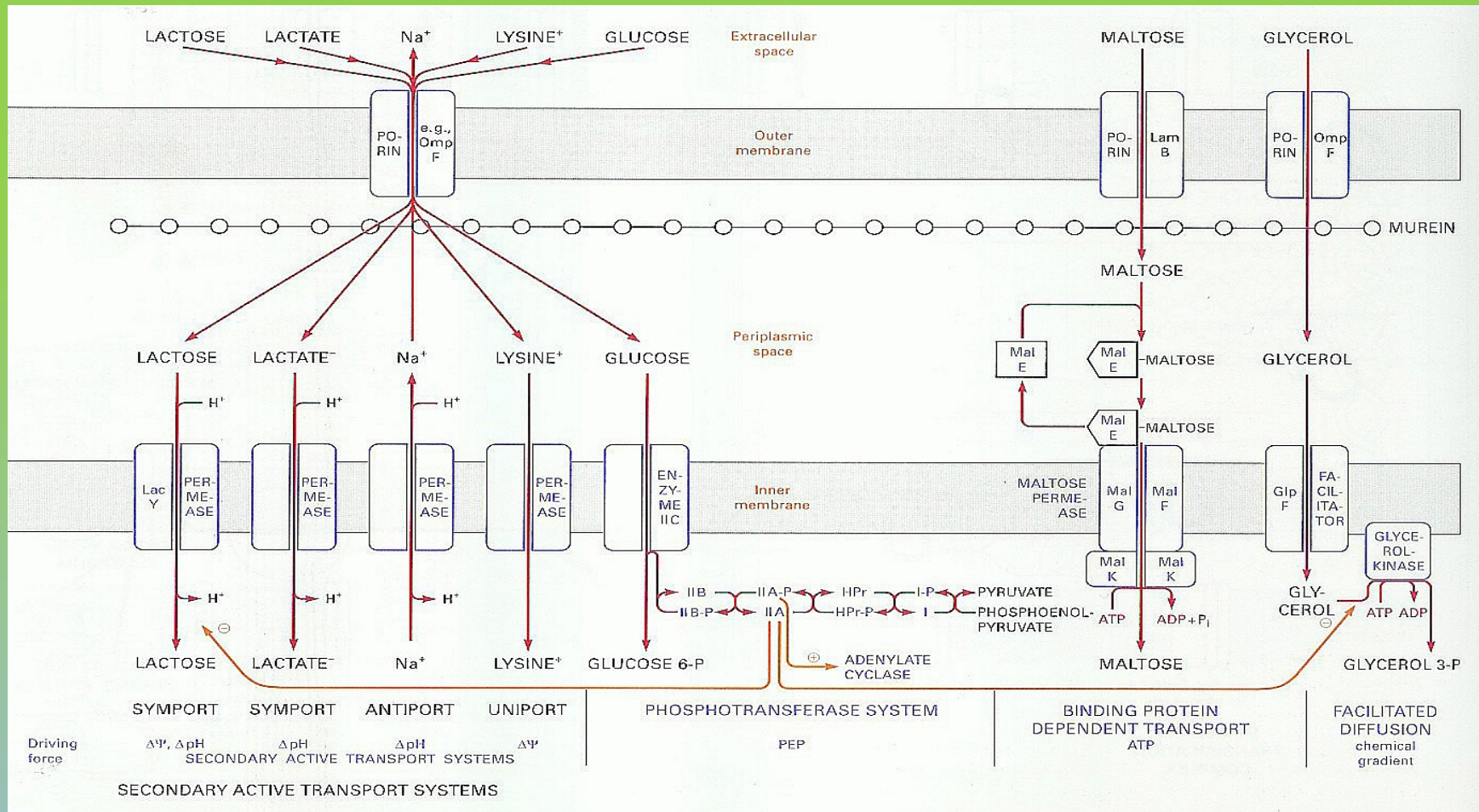
Aktivní transport – fosfotransferázový systém



Aktivní transport – fosfotransferázový systém

- Specifické pro **každý** přenášený cukr jsou 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)

Využití transportních systémů u G- bakterií

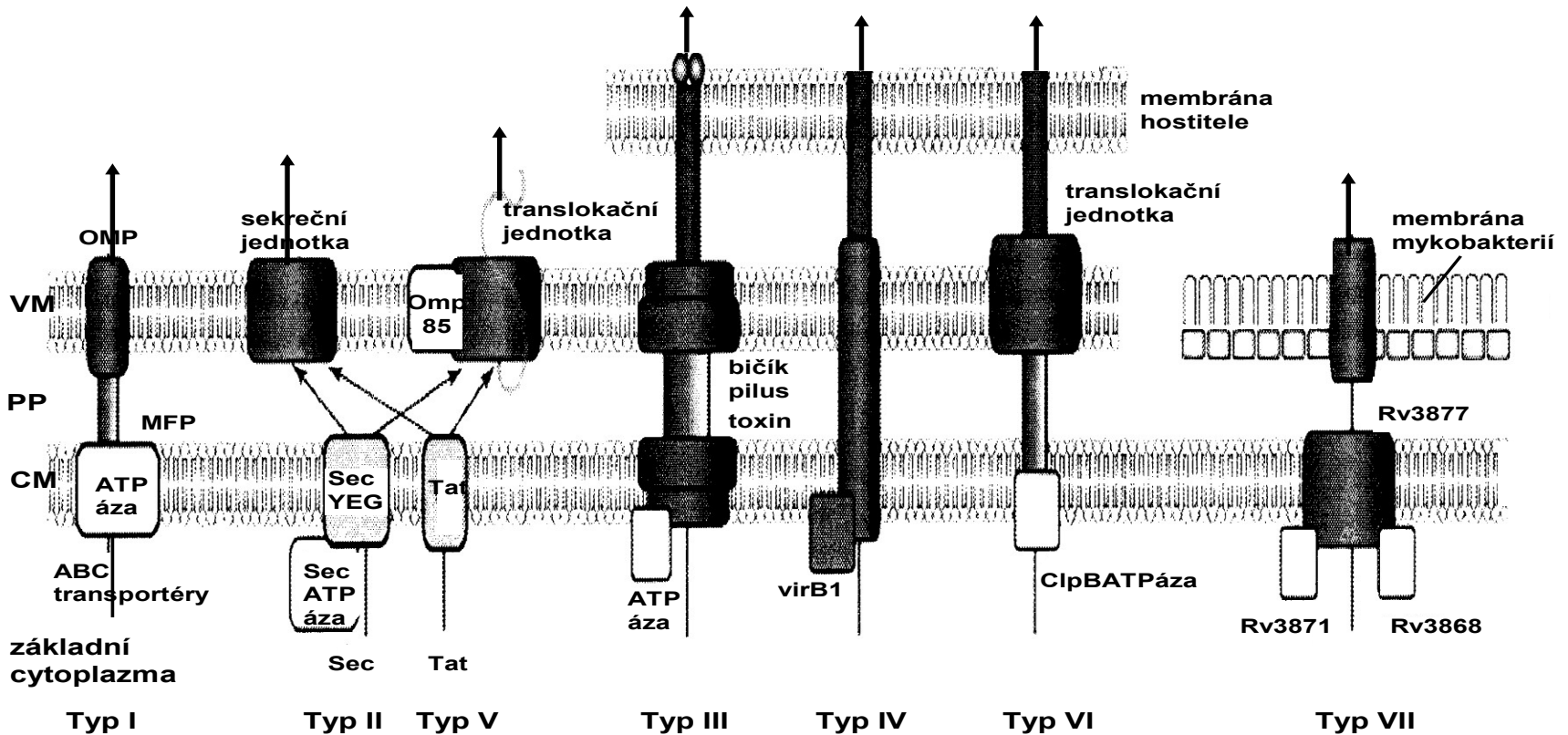


Sekrece látek u bakterií

- Sekrece není jednotná (ani u eukaryot). Existuje řada mechanismů u jednotlivých organizmů 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 na sekretovaném proteinu)

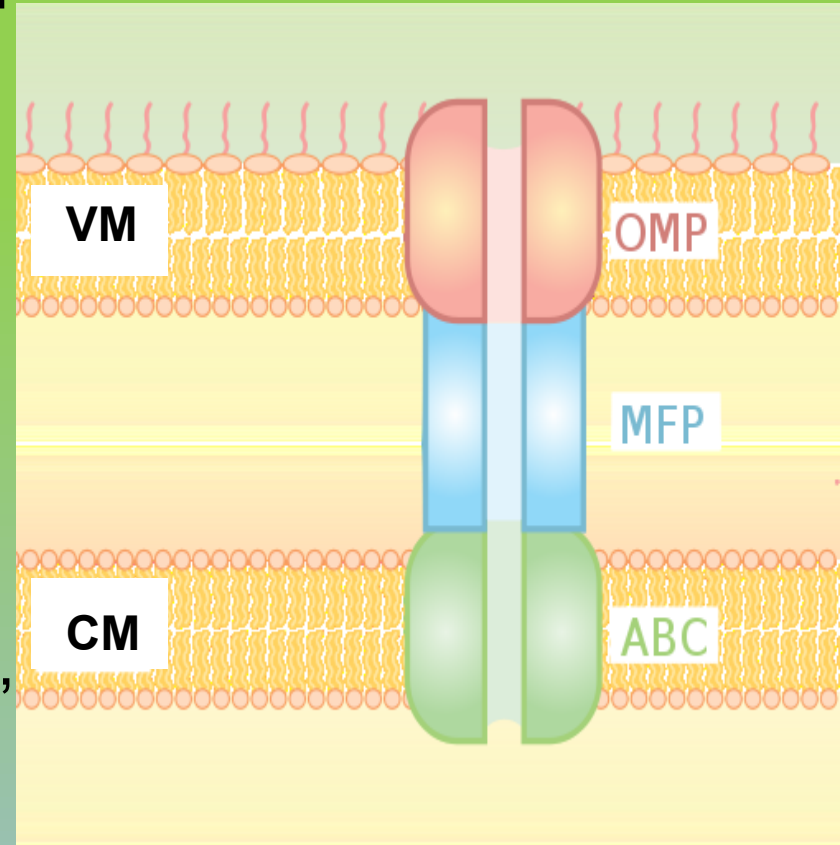
Sekrece látek u bakterií

sekreční systémy



Sekreční systém Typ I u G⁻

- 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, ...)
- také nazýván jako **transportní systém ABC**

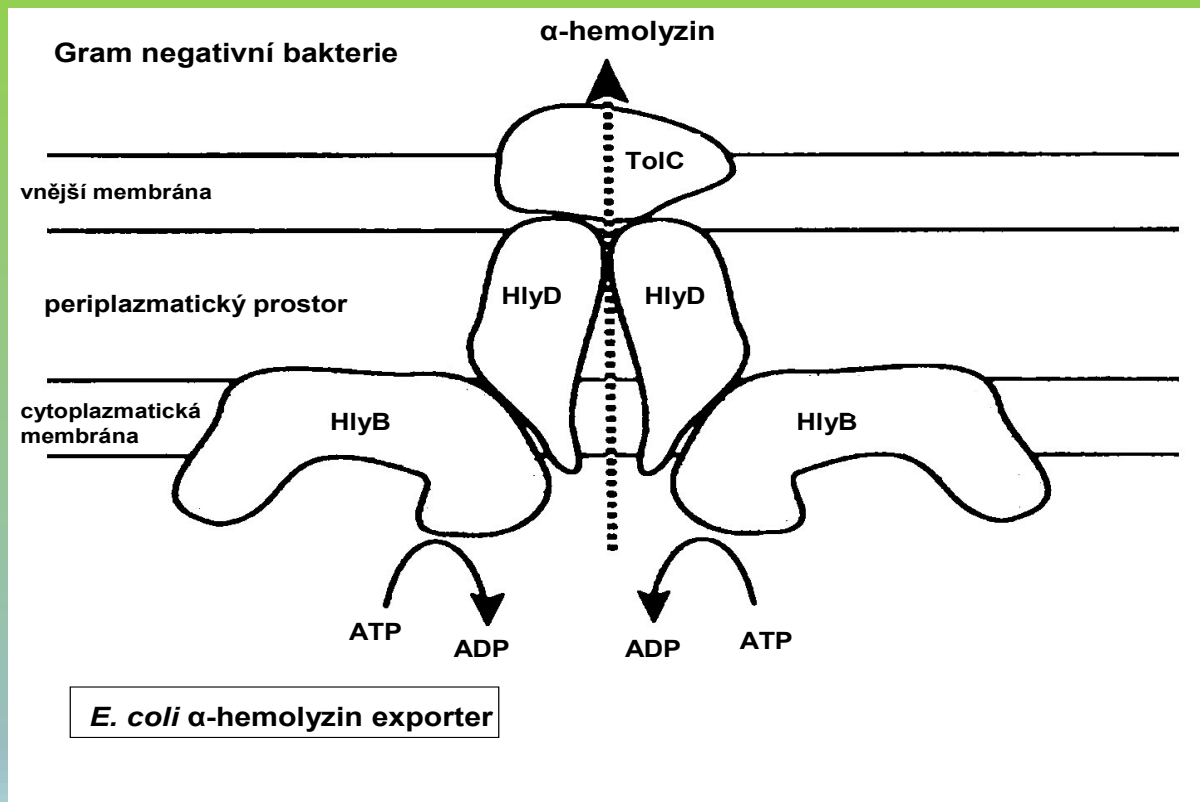


Sekreční systém **Typ I** u **G⁻**

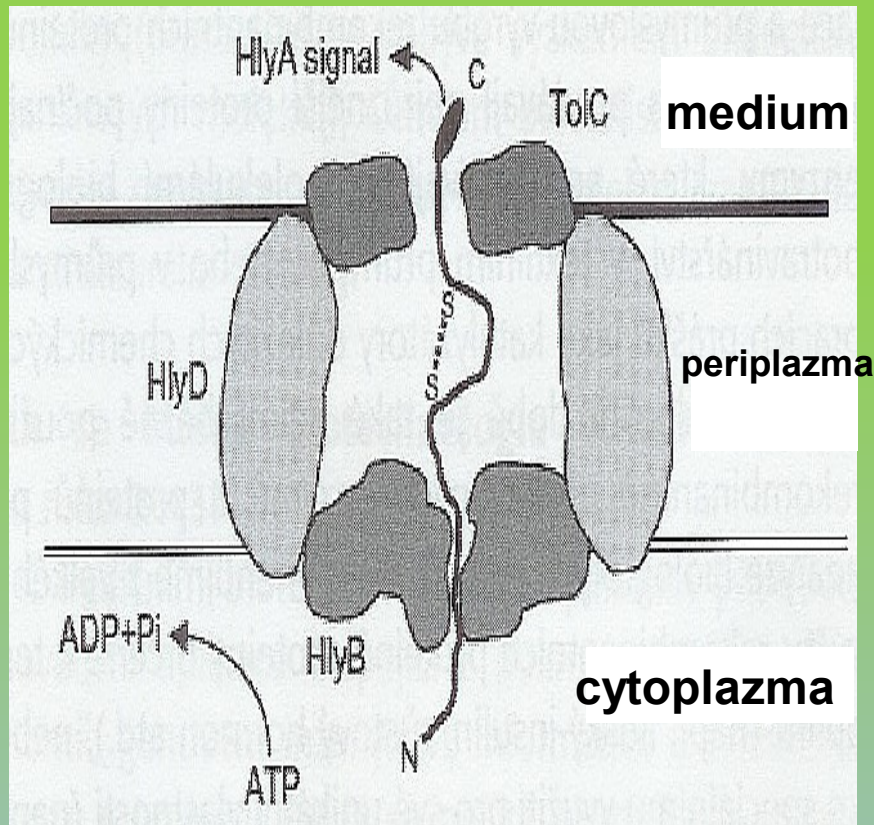
- Je **nespecifický** a může tedy sloužit jako alternativní transportní dráha pro široké spektrum látek a lze jím přenášet od iontů přes sacharidy, polysacharidy až po bílkoviny (kolicin V – *E.coli* 10kDa, adhezní protein LapA *Pseudomonas fluorescens* 900kDa, toxiny), polysacharidy cyklické β -glukany, lipázy
- látka se dostává **přímo** ze základní cytoplazmy do vnějšího prostředí

Sekreční systém **Typ I** u **G⁻**

- **Bakteriální ABC exportéry**
- Předpokládá se, že ABC exportéry jsou diméry



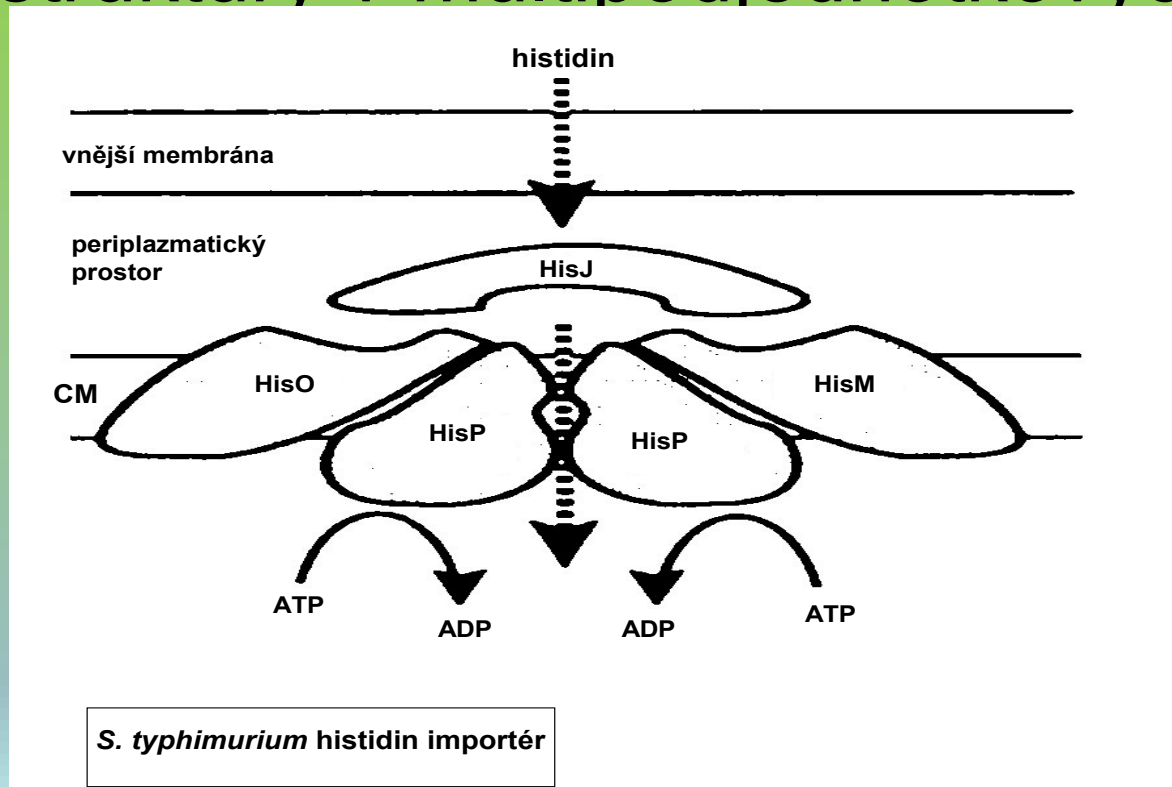
Sekreční systém **Typ I** u **G⁻** (T1SS-TOSS)



- 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

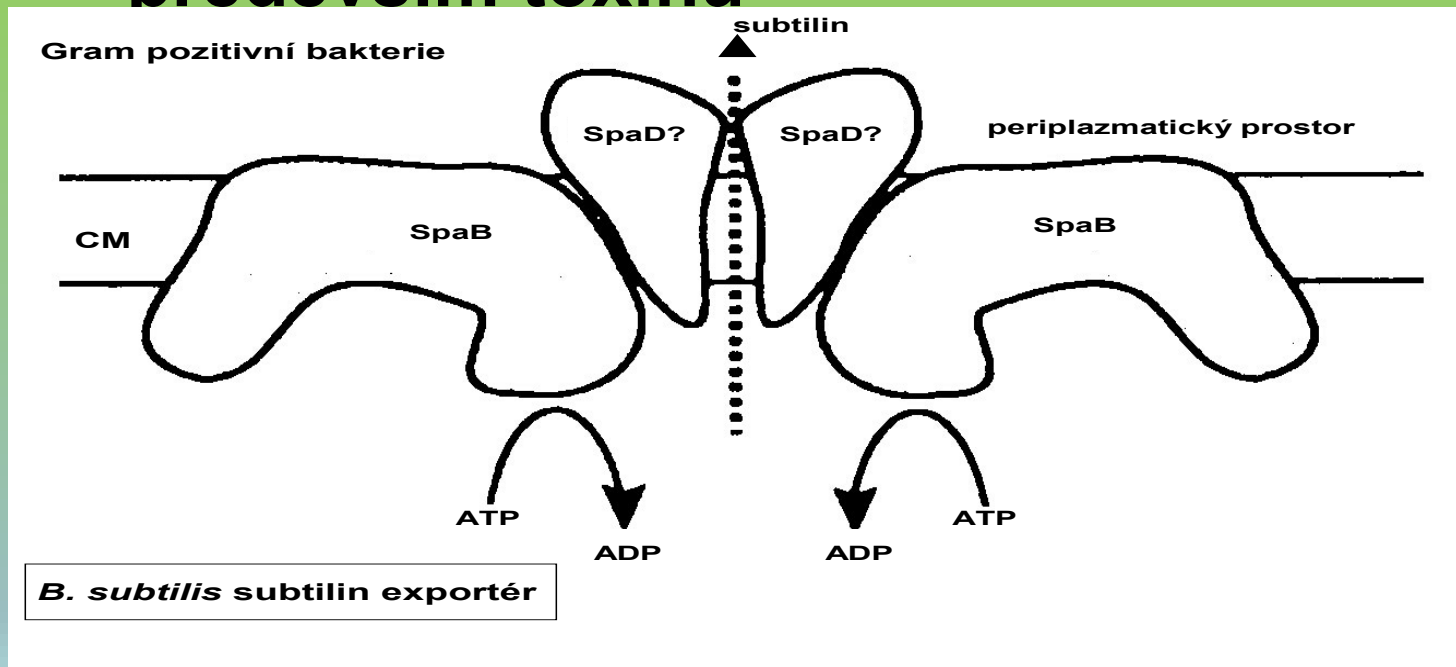
Sekreční systém **Typ I** u **G⁻**

- **Bakteriální ABC importéry**
- Velká skupina transportérů s velmi podobnou organizací struktury v multipodjednotkových systémech

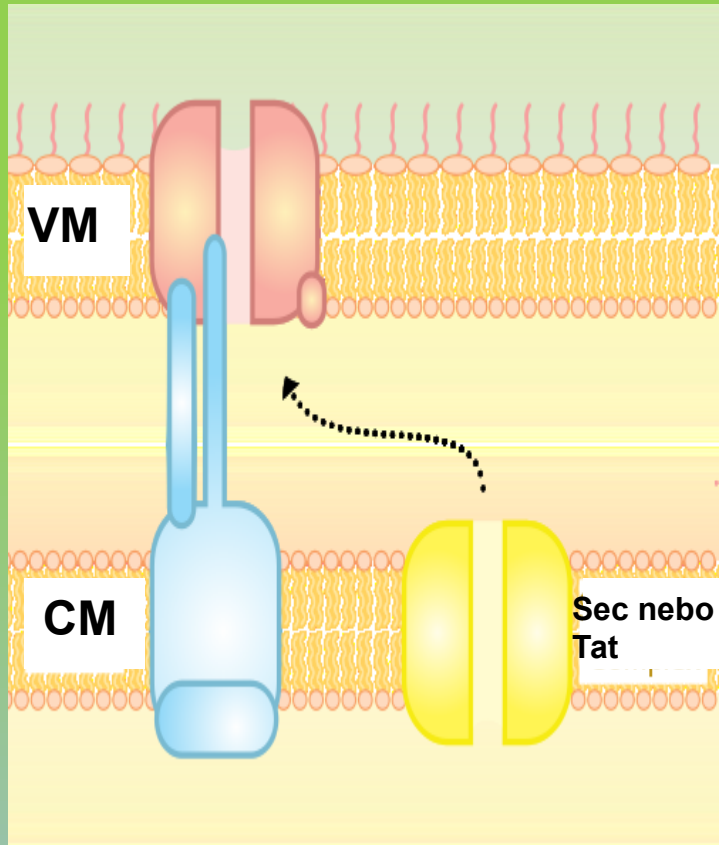


Sekreční systém **Typ I** u **G⁺**

- Bakteriální ABC **exportéry**
- **Sekreční systém Typ I** je využíván i u **G⁺** bakterií pro exkreci některých látek, především toxinů



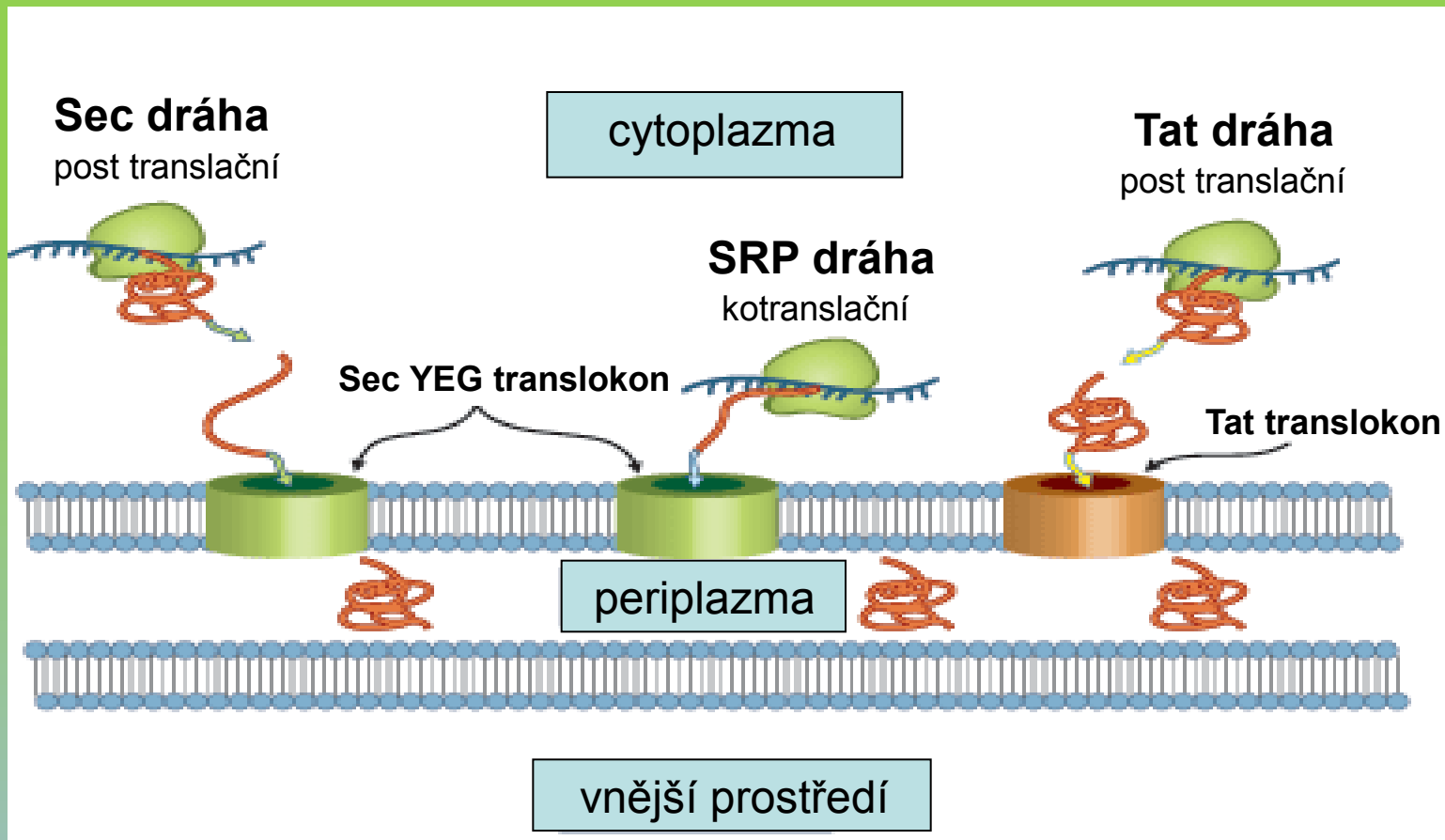
Sekreční systém **Typ II** u **G⁻** (T2SS)



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

Do periplazmatického prostoru je bílkovina přenesena jako **nascentní** (nesbalená).

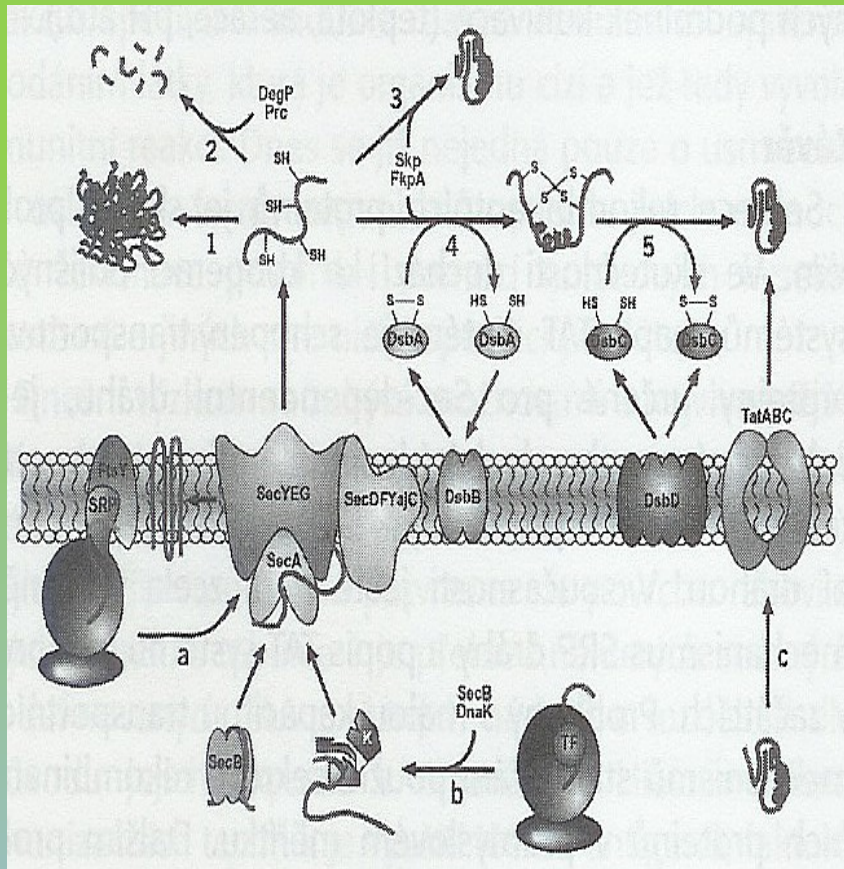
Sekreční systém **Typ II** u **G⁻**



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

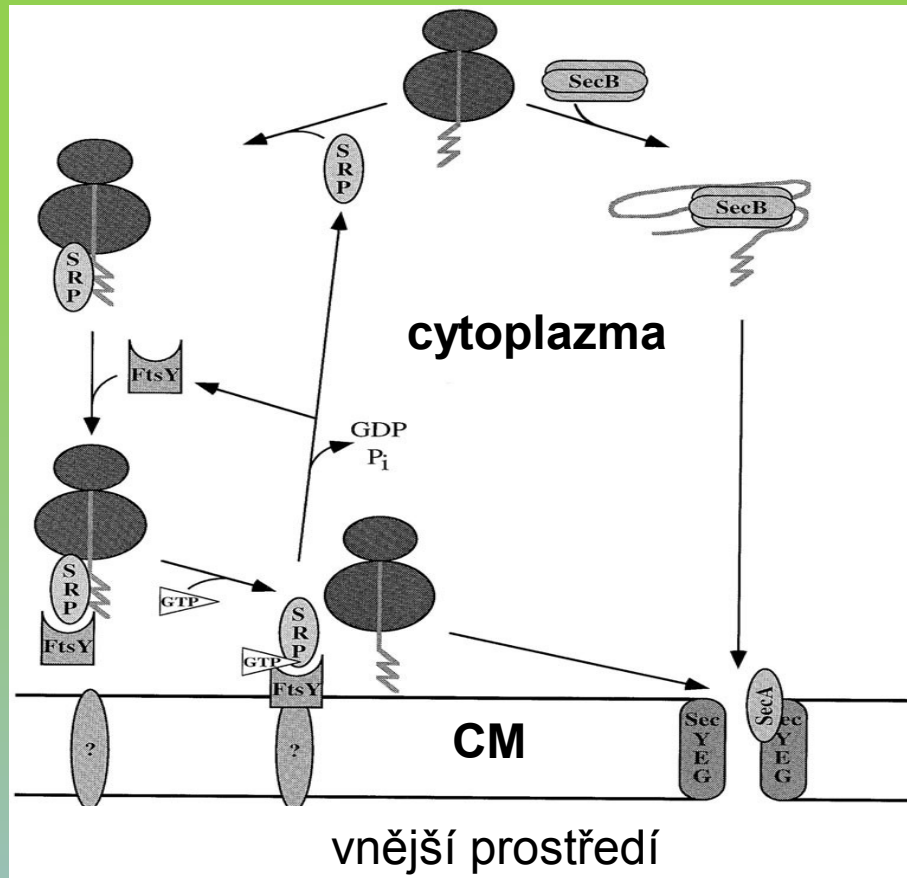
Sekreční systém **Typ II** u **G⁻** **SRP** dráha

- Transport do **periplazmatického prostoru** :
SecB-dependentní dráha, **SRP**
(signal recognition particle)
dráha nebo TAT dráha
- Transport přes **vnější membránu** zajišťuje komplex proteinů – **sekretion**
- Je pravděpodobně využívána častěji pro hromadění a zabudování proteinů na vnější straně CM



Sekreční systém Typ II u G^-

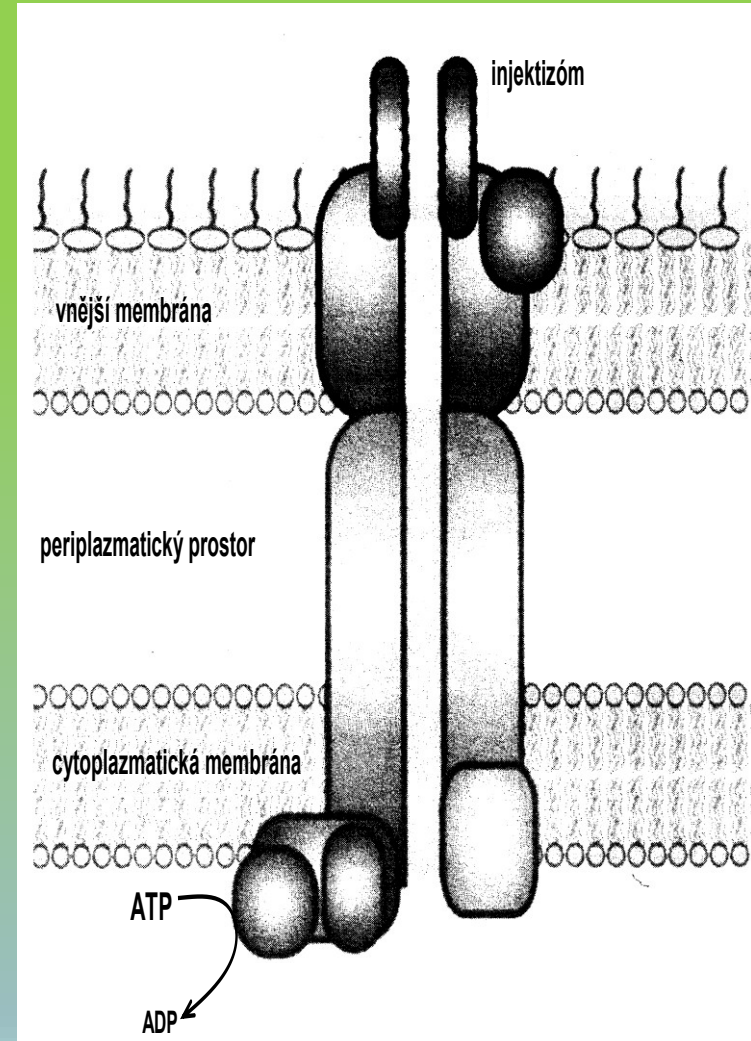
– SRP dráha



- SRP dráha je pravděpodobně využívána pro hromadění a zabudování proteinů na vnější 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

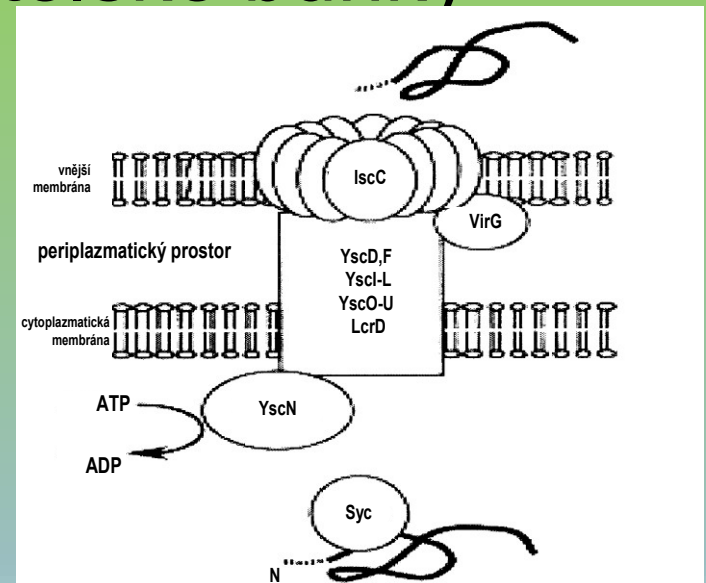
Sekreční systém **Typ III** u **G⁻** (T3SS)

- Je označován jako „sec independent systém“ nebo **injektozom**
- Základní funkcí je přenést efektorové proteiny přes bakteriální hostitelskou membránu do cytosolu hostitelské buňky
- Systém je závislý na intracelulární koncentraci Ca^{2+}
- **nejdříve** byl popsán pro tvorbu bazální destičky bičíku a syntézu pilusů a fimbrií



Sekreční systém **Typ III** u **G⁻**

- Aparát sekrečního typu III je tvořen přibližně 20 proteiny; většina je lokalizována v CM a vyžaduje membránově vázanou ATPázu
- sekrece proteinů může být regulována přímo kontaktem s povrchem hostitelské buňky
- Výhodou tohoto systému je, že patogenní buňka není v přímém kontaktu s hostitelskou buňkou



Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻** (T4SS)

- T4SS jsou univerzální systémy, které se vyskytují jak u G⁻, tak i G⁺
- Slouží k sekreci širokého spektra látek od jednoduchých proteinů až po komplexy protein-protein nebo protein-DNA
- Systém vyžaduje dodání energie (ATP, ATPázy – B4, B11, D4)
- Systém je obvykle tvořen 12 komponentami a prochází oběma membránami

Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻**

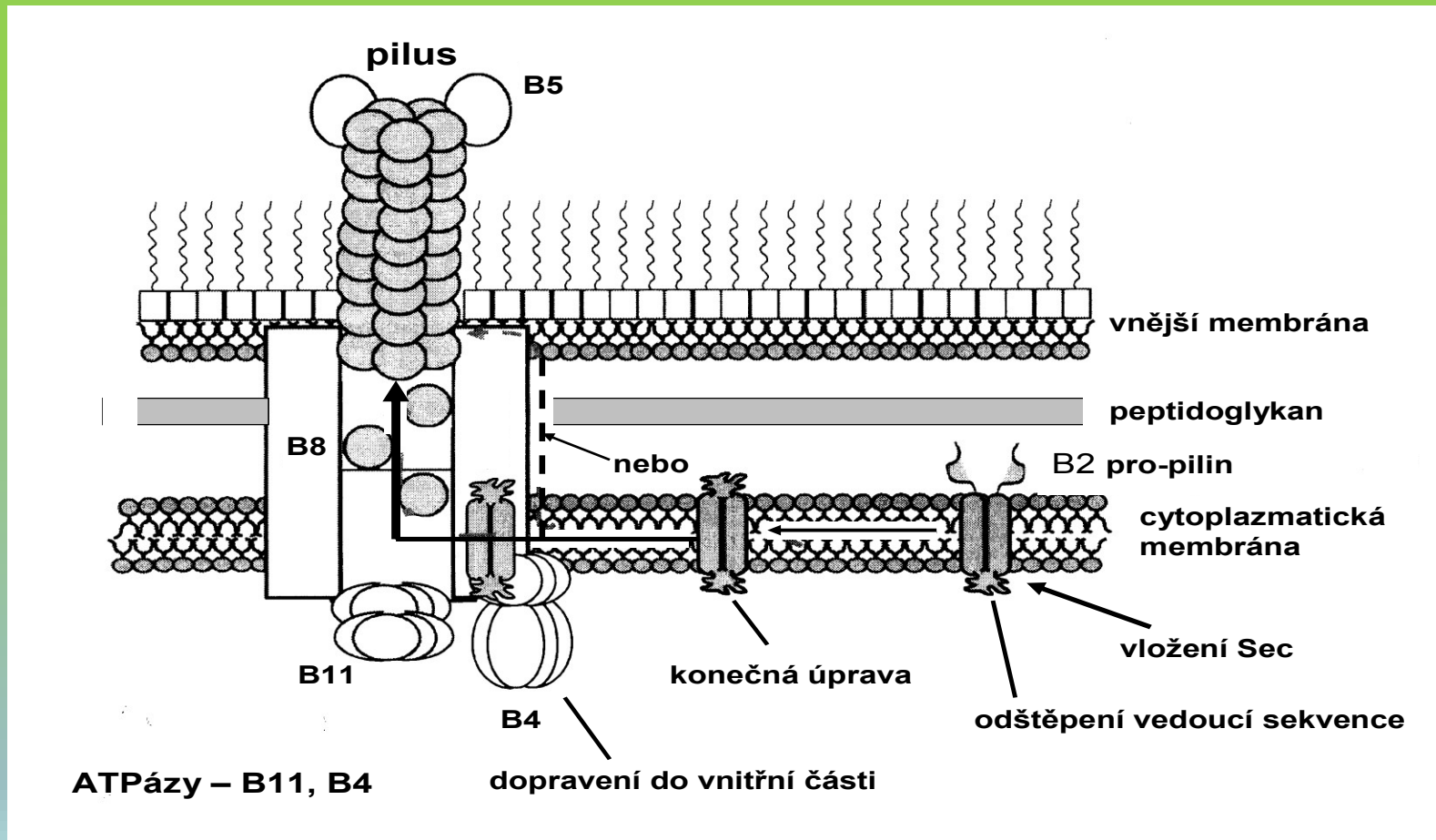
- Systém se obvykle ještě dělí na typ **IVA** (**T4ASS**) v závislosti na tom, zda se podobají strukturální komponenty komplexu *VirB/D4 Agrobacterium tumefaciens* (T4ASS) nebo
- a **IVB T4BSS** přenášející především plazmidy – F (IncF), RP4 (IncP), pKM101 (IncN)

Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻**

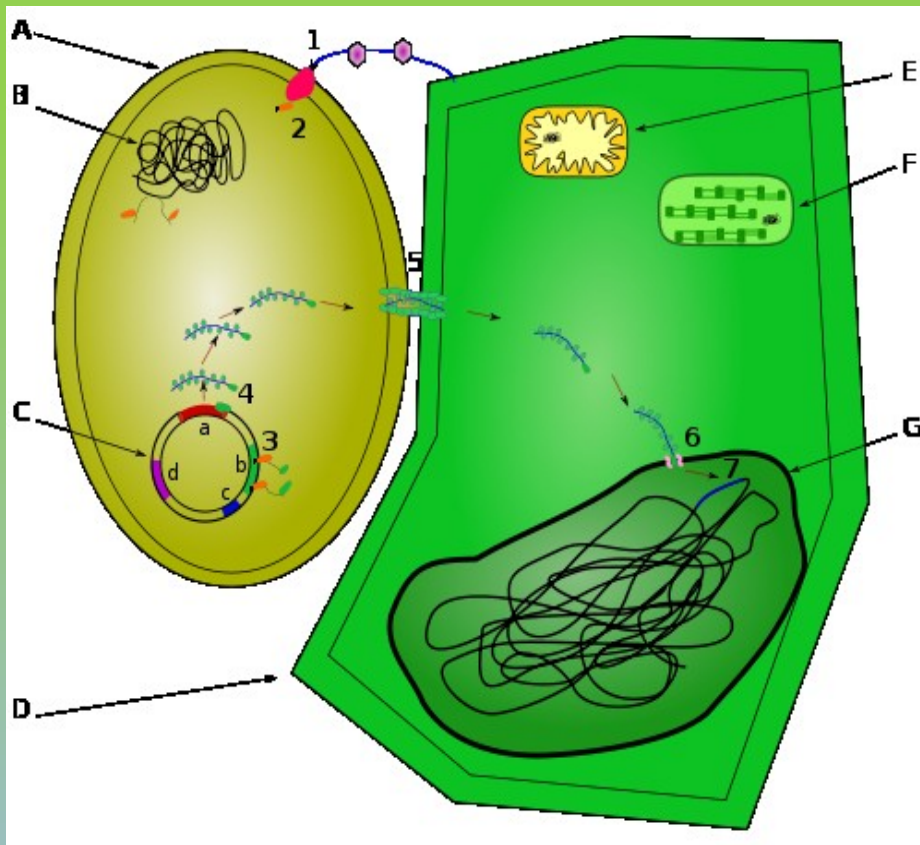
- Systémy T4SS jsou u většiny G⁻ bakterií syntetizovány i pilusy i u *Archaea*
- V základní cytoplazmě nasyntetizovaný peptidický řetězec pilinu se k B2 za vytvoření komplexu B2-propilin a odštěpení vedoucí sekvence
- Další úpravy a molekula se dostává do centrální části, za spotřeby energie se připojuje jako součást supramolekulového komplexu – pilusu. Pilus se tedy prodlužuje přikládáním jednotlivých molekul pilinu ze spodní části

Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻**

- Předpokládaná tvorba pilusu *A. tumefaciens*



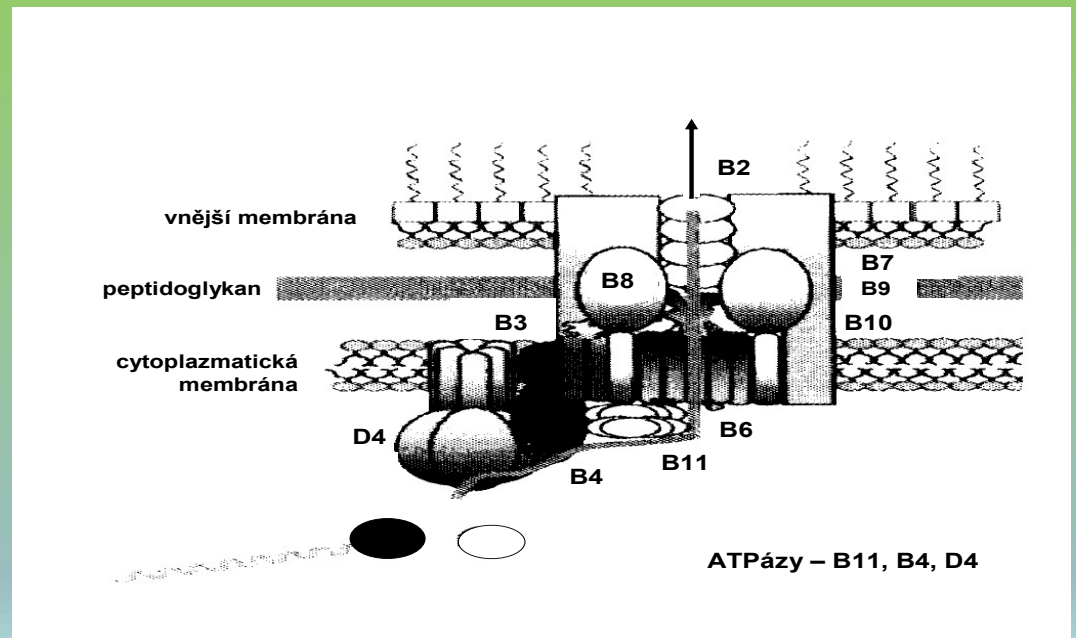
Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻** *Agrobacterium tumefaciens*



- **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- prepis katabolických genů
- D - rostlinná buňka**
E - mitochondrie
F - chloroplast
G - jádro

Sekreční systém **Typ IV** u **G⁻**

- G- bakteriím systém T4SS také slouží k transportu nejrůznějších látek, které jsou přenášeny ze základní cytoplazmy přímo mimo buňku

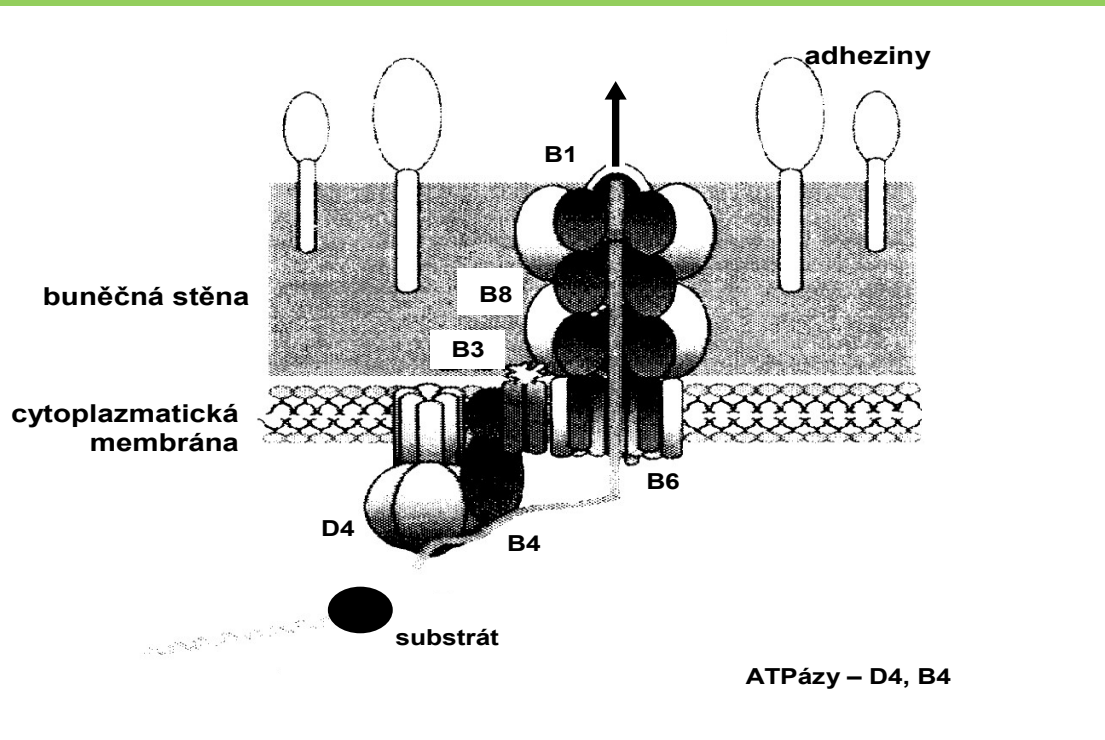


Sekreční systém **Typ IV** u **G+**

- Systém T4SS je běžný i u G+ bakterií
- Vhodný pro rychlé šíření multirezistence a determinant virulence mezi mnoha medicínsky významnými patogeny
- popsáno několik **konjugačních systémů**, které jsou většinou kódovány na plasmidech
(pCF10 – *E. faecalis*, pIP501 – *S. agalactiae*,
pCW3 – *C. perfringens*)

Sekreční systém Typ IV u G+

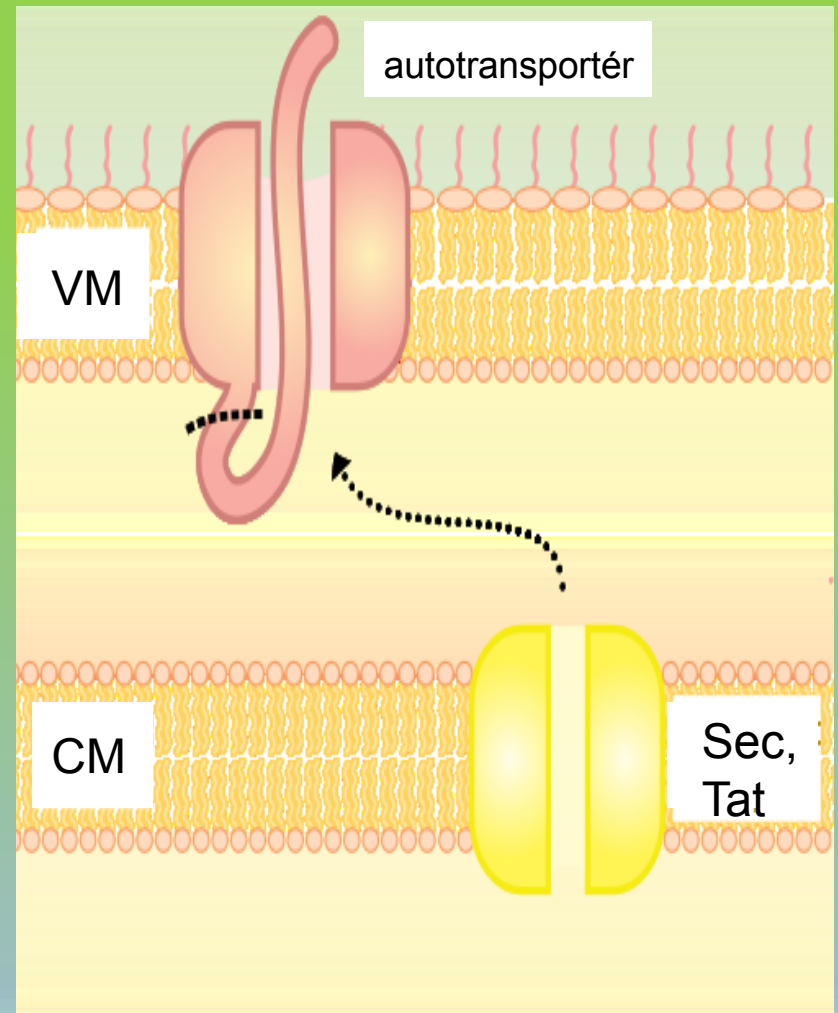
- U G+ bakterií jsou podjednotky tvořící kanál identické s podjednotkami VirB/VirD4 translokační dráhy G- bakterií



Protože G+ buňky nemají sexuální pilusy, jejich funkci „přebírají“ **adheziny** umožňující agregaci buněk, tedy vytvoření potřebného kontaktu mezi buňkami nutného pro přenos DNA z donorové do recipientní buňky

Sekreční systém Typ V u G⁻ (T5SS)

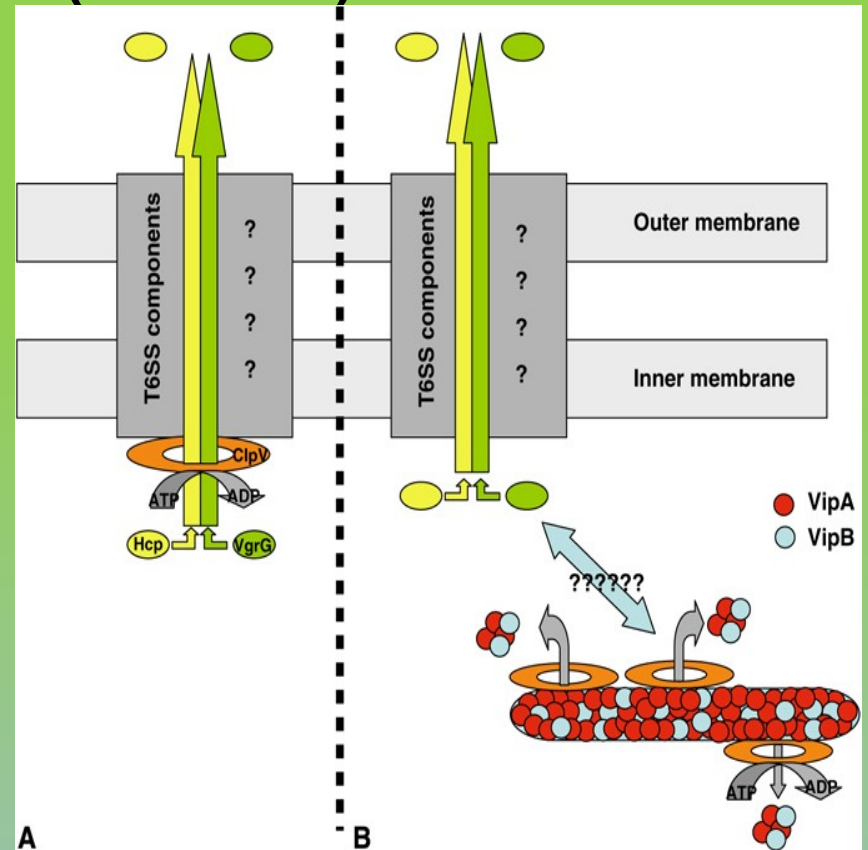
- Označovaný jako **autotransportní systém**
- Využívá Sec nebo Tat systému pro přenos přes cytoplazmatickou membránu
- Většina proteinů přenášených tímto systémem přednostně vytvářejí **beta-barel**, kdy C-koncem se vkládají do vnější membrány a dále jsou transportovány do vnějšího prostředí
- tzv. “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



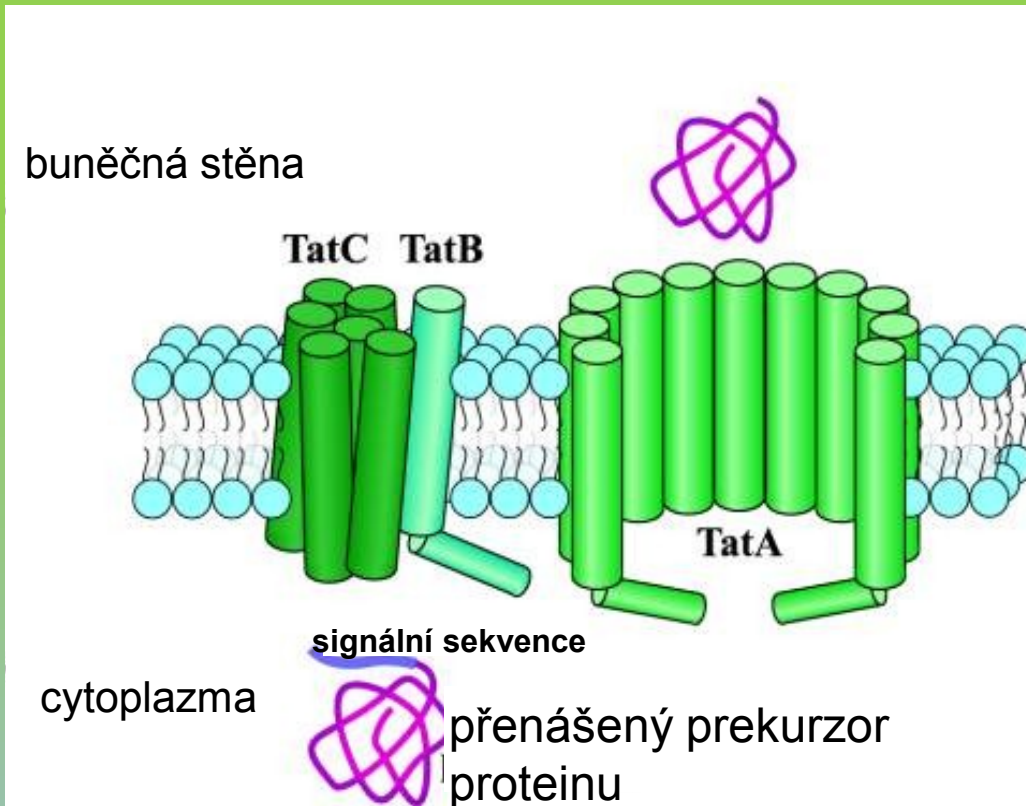
Sekreční systém Typ VI u G⁻

(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) 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 **Tat** u **G⁻** (Twin-arginine translocation)

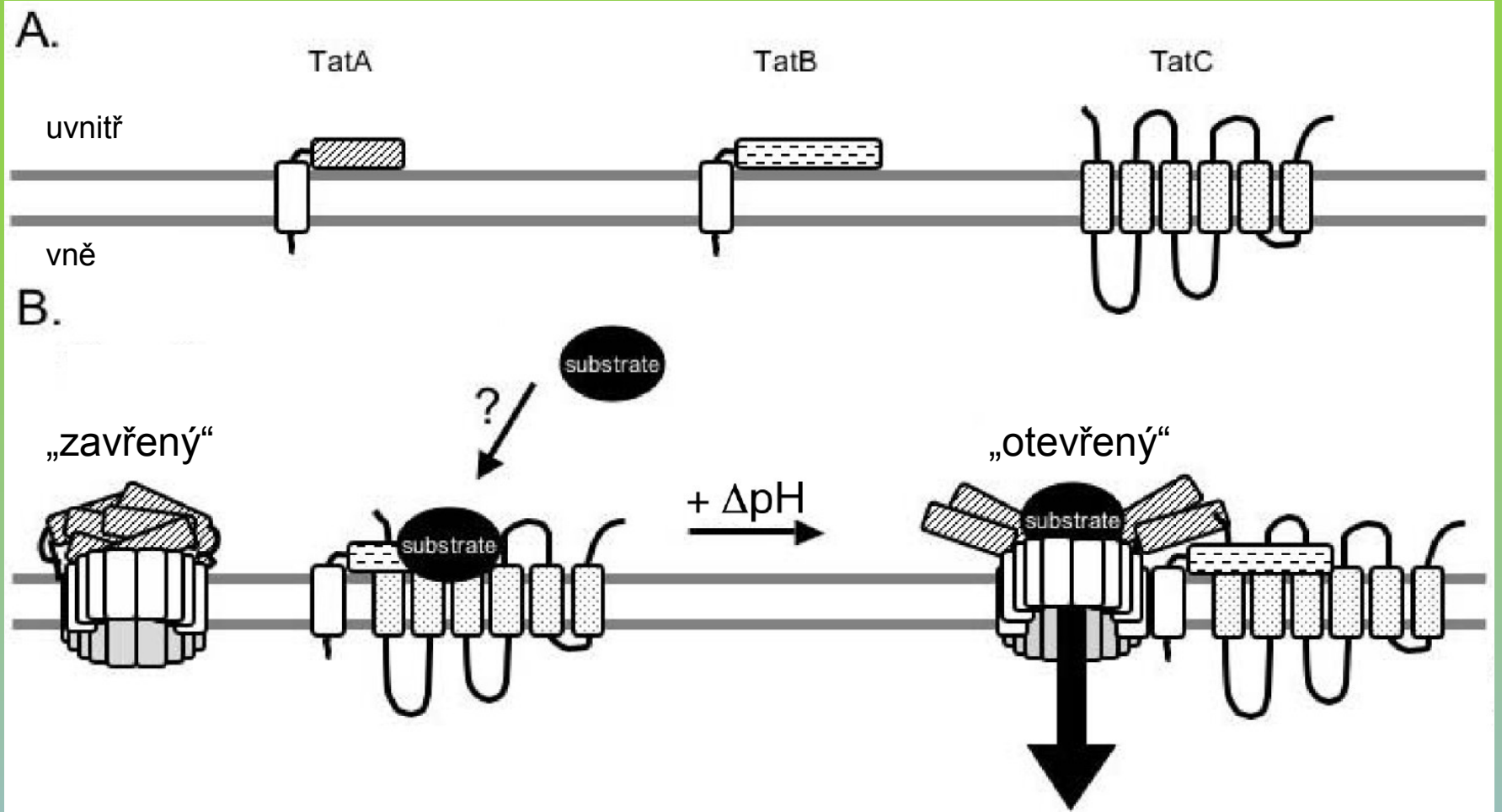


- CM G- bakterií a v tylakoidech Tat translokáza je tvořena 3 membránovými proteiny TatA, TatB a TatC

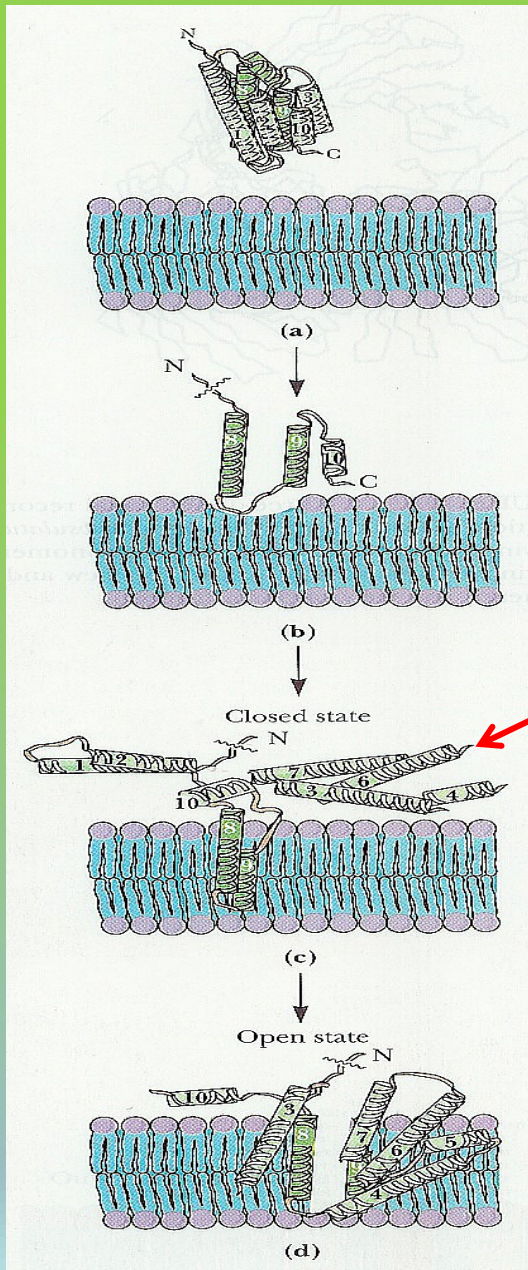
Sekreční systém **Tat** u **G⁻**

- 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 **Tat** u **G⁻**



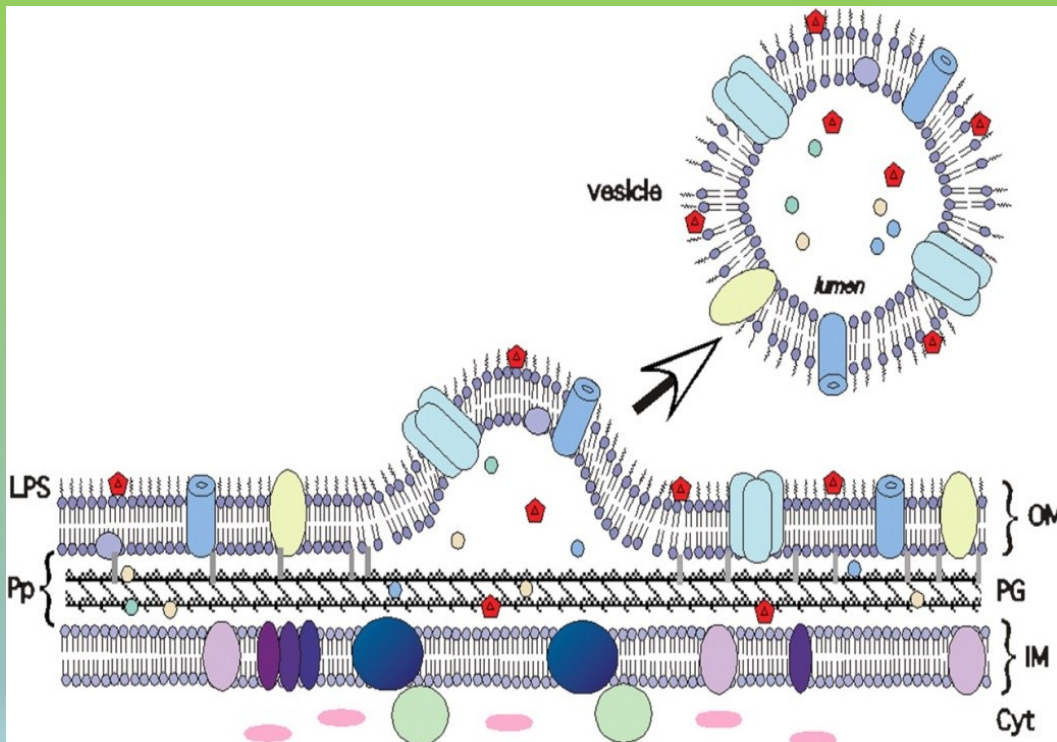
Vkládání bílkoviny porinu do vnější membrány



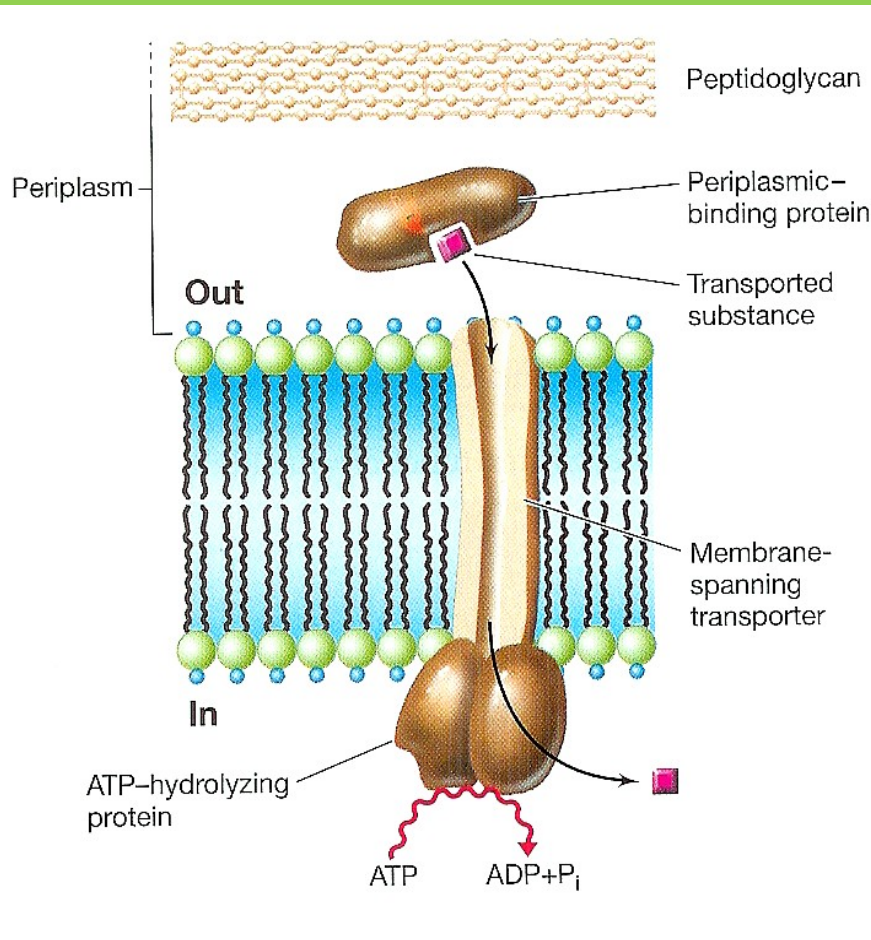
- Hydrofobní část spirály se vkládá přímo do membrány (umístění řetězců na povrchu membrány připomíná deštník)
- Spouštěcí signál (nízké pH nebo potenciálový gradient) “stáhne” některé amfipatické šroubovice do a přes membránu. Tím se pór otevře

Uvolňování **veziklů** vnější membrány G- bakterií

- Část vnější membrány G-bakterií může „odstřižena“ za tvorby sférických struktur, které mají lipidickou dvojvrstvu 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



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**)

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** !

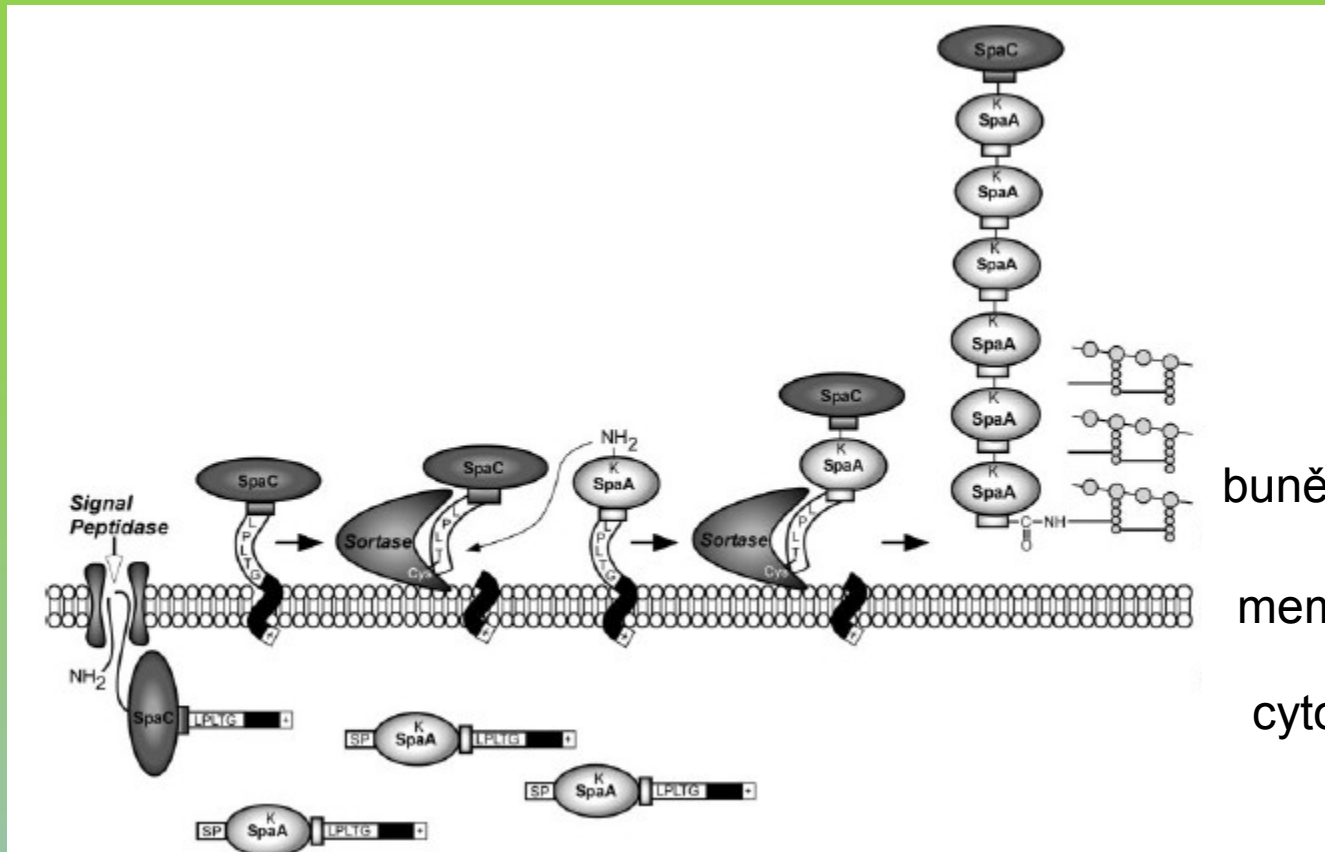
Sekrece u G+ bakterií

- 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 **ABC transportéry** (ATP- binding cassette)

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

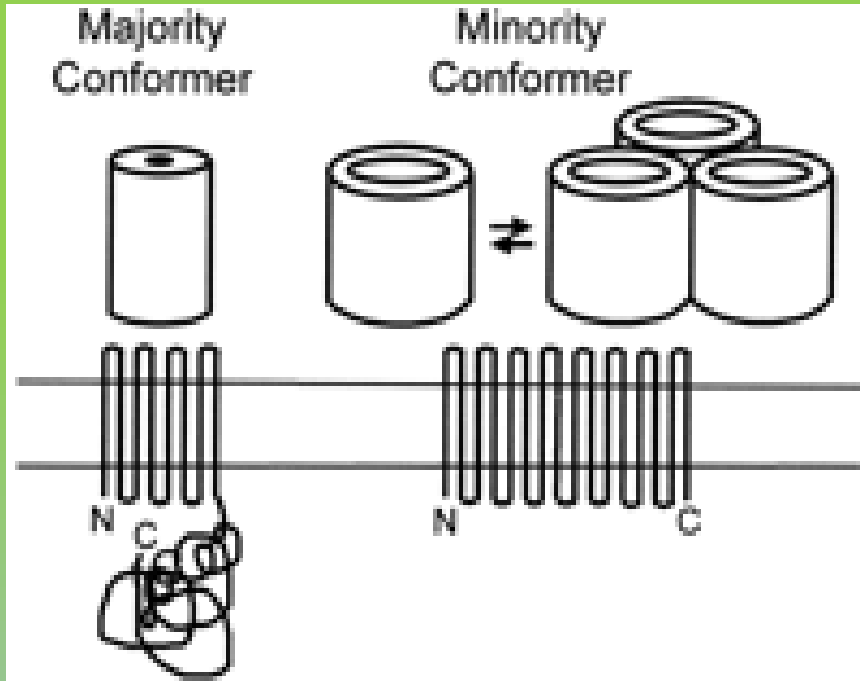
membrána

cytoplazma

Příklady proteinů vnější membrány G- bakterií a jejich funkce

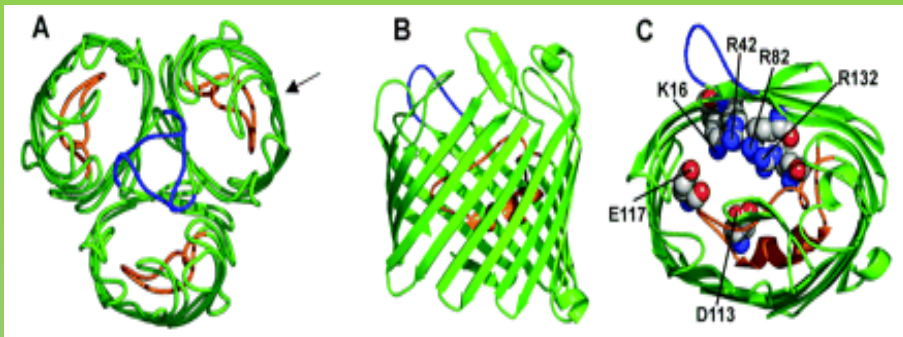
Protein	Functions
OmpF (porin protein 1a)	Diffusion channel for small molecules Receptor for phage TuIa, T2 Stabilization of cell surface structure
OmpC (porin protein 1b)	Diffusion channel for small molecules Receptor for phage TuIb, T4 Stabilization of cell surface structure
OmpA (protein 3a)	Specific 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



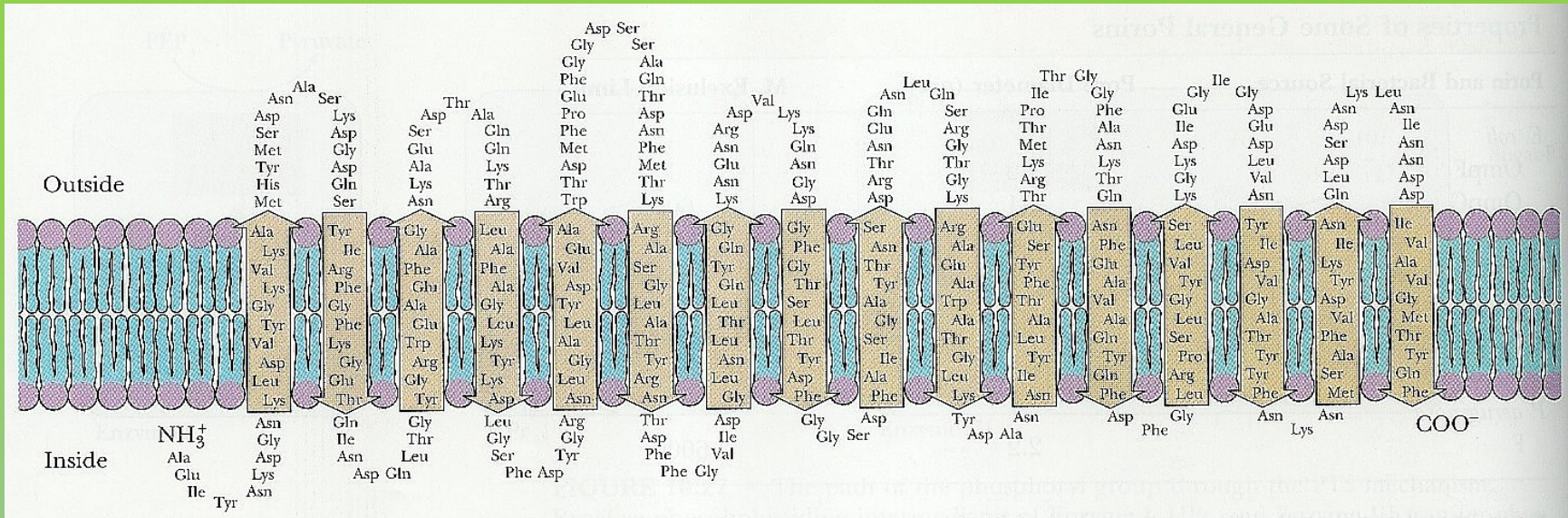
- Většina populace vytváří protein se dvěma doménami (v levo) a je důležitá pro vazbu na peptidoglykan (C-terminální globulární doména obsahuje peptidoglykan-vázající motiv)
- Malá část populace vytváří otevřený "β-barrel". *E.coli* produkuje trimerní poriny s vysokou permeabilitou. Fluorescentní pseudomonády 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*



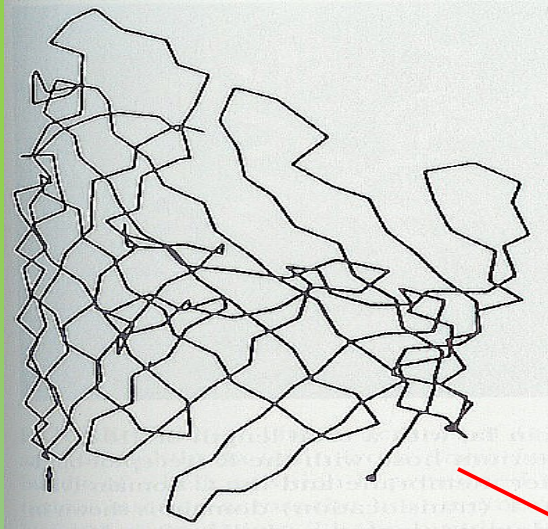
- (A) - pohled na trimer shora. Smyčka (modrá) je významná pro interakci s dalšími monoméry jednotky. Oranžově zbarvené smyčky vytvářejí kanál
- (B) - pohled na jednotlivé monomerní jednotky
- (C) – pohled na monomerní jednotku shora ukazující “očko” nebo stáhnutou oblast kanálu. Očko je tvořeno Glu117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

Struktura porinu PhoE *E.coli*

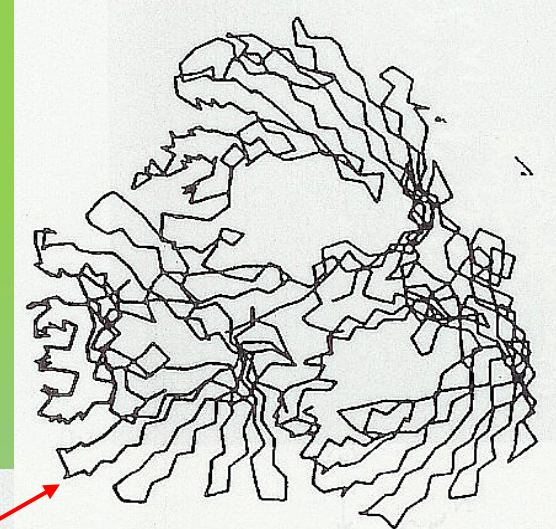
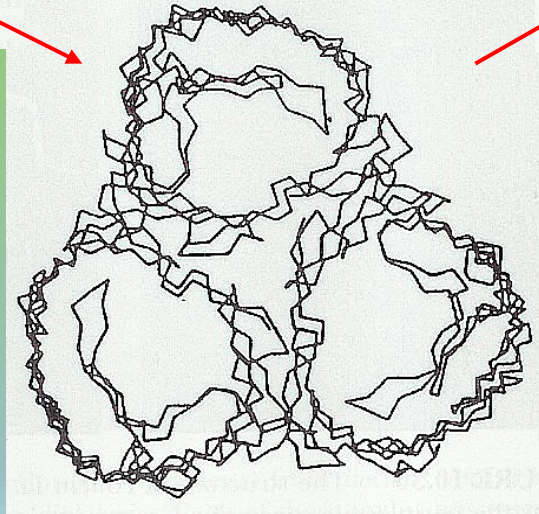


- Model uspořádání porinu PhoE ve vnější membráně. Transmembránové segmenty jsou ve formě skládaného β -listu

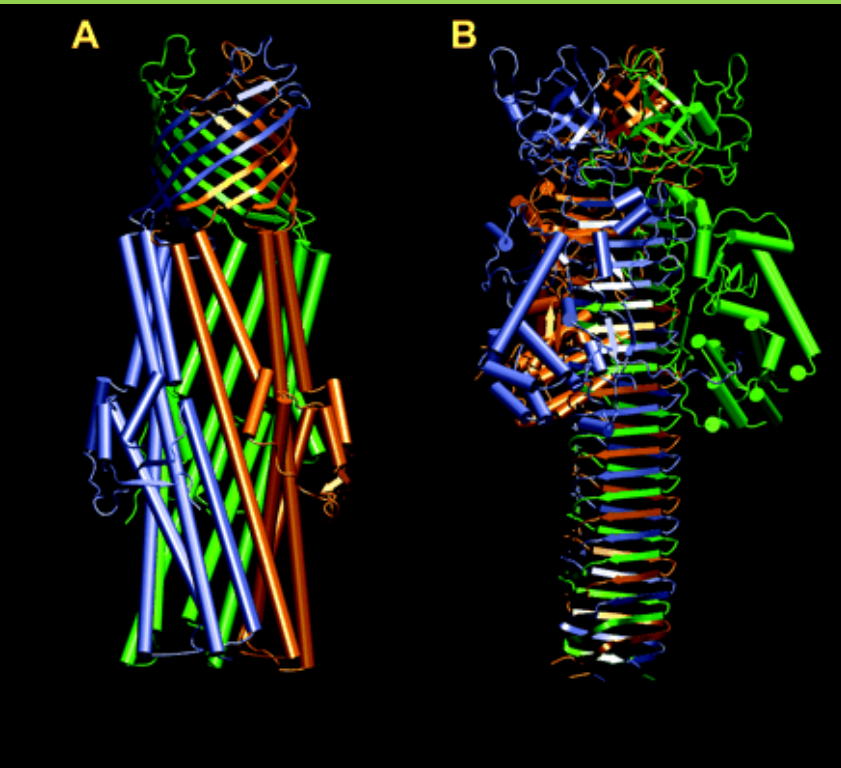
Vytváření porinu u *Rhodobacter capsulatus*



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

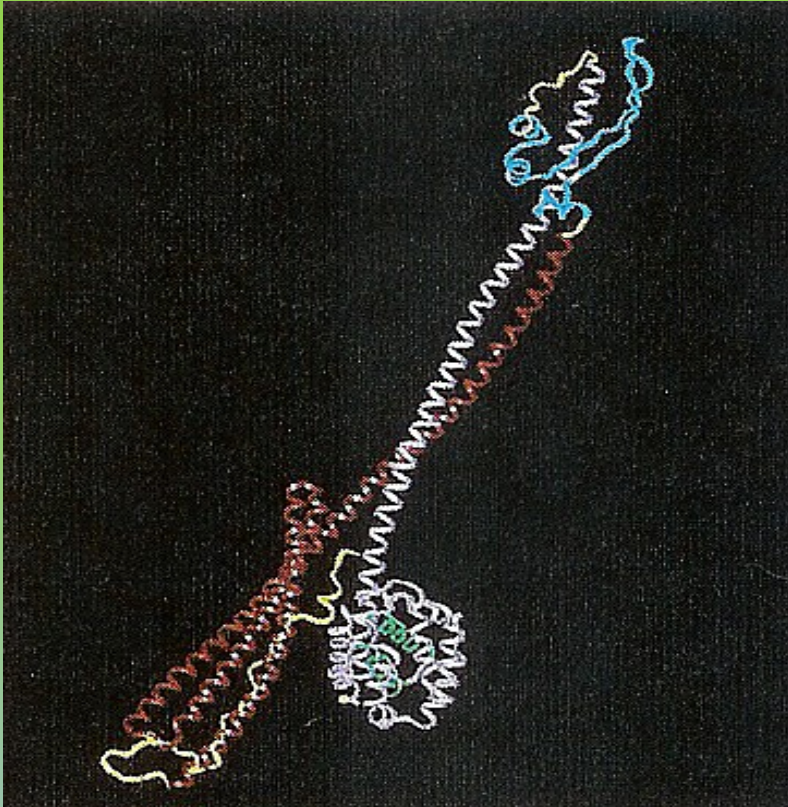
Toxiny vytvářející póry

- 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

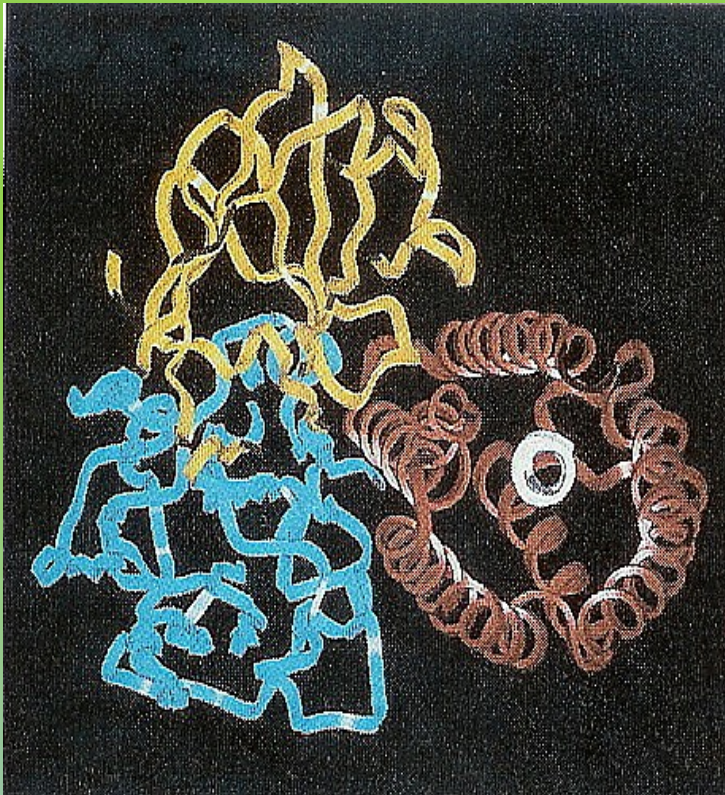
Kolicin	Receptor	Translokace	Cytotoxická aktivita
• A	Btu	BOmpF, TolQRAB	Tvorba kanálu
• E1	BtuB	TolC, TolQRA	Tvorba kanálu
• E2, E7, E8, E9	BtuB	OmpF, TolQRAB	DNáza
• E3, E4, E6	BtuB	OmpF, TolQRAB	RNáza hydrolyzující 16S rRNA
• E5	BtuB	OmpF, TolRAB	RNáza hydrolyzující antikodon loop tRNA
• N	OmpF	TolQRA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



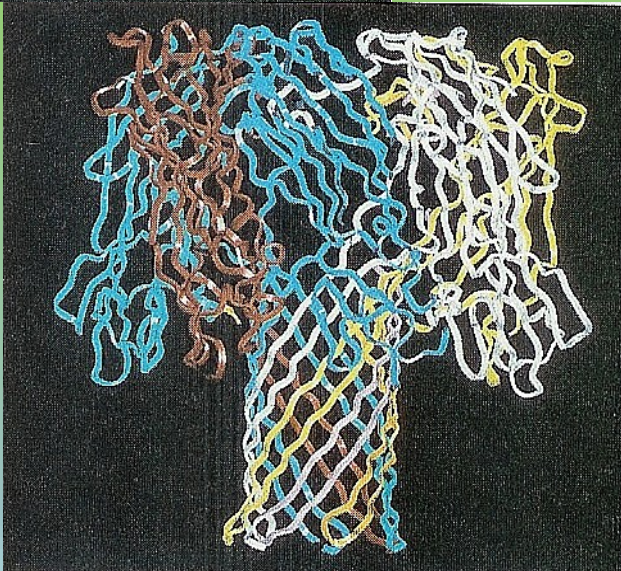
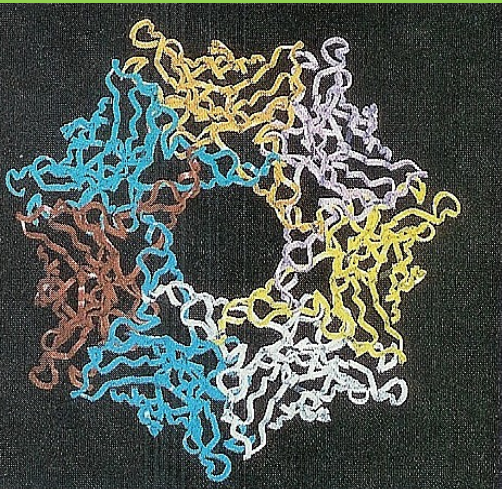
- Má celkovou délku 210Å a má tři domény
- T – doména (translokační) – červená
- R – doména (receptor binding) – modrá
- C – doména (channel-forming) – zelená – obsahuje svazek 10 α -helix procházející do cytoplazmatické membrány

δ-endotoxin



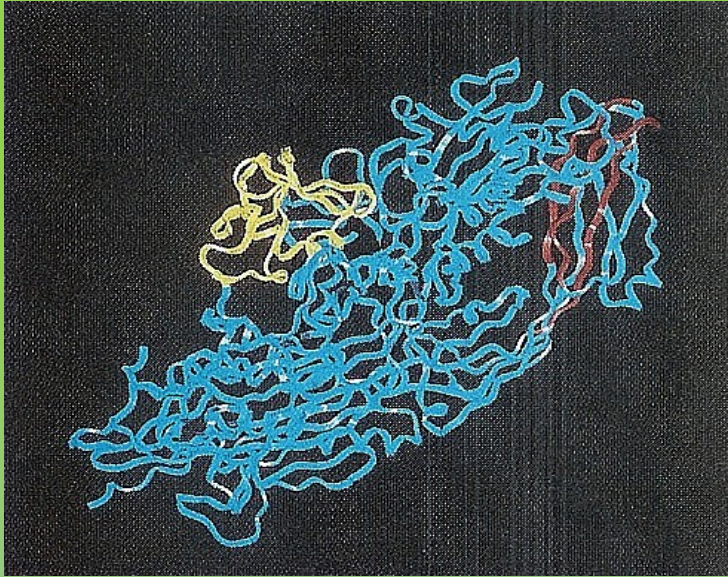
- δ-endotoxin je produkováný *Bacillus thuringiensis* a je toxický pro *Coleoptera*
- Je tvořen 3 doménami (obsahující – 7x helix jedna je silně hydrofobní, ostatní amfipatické, 3x skládaný list, β-sandwich)

α -hemolyzin



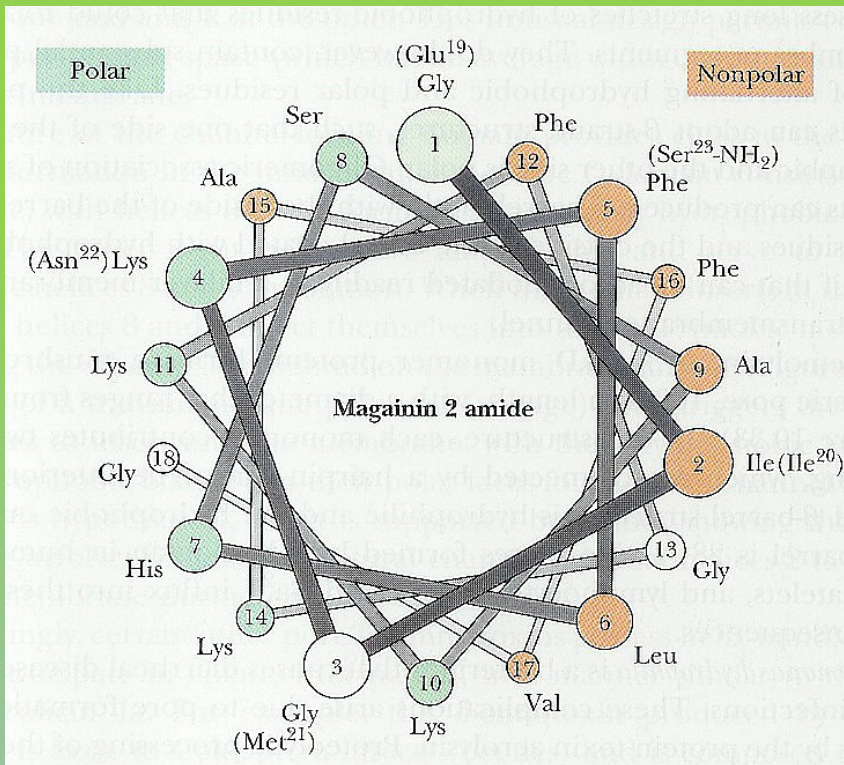
- Patří do skupiny dalších toxinů, které vytvářejí dlouhé segmenty (α -helix) procházející do cytoplazmatické membrány (α -hemolyzin – *Staphylococcus aureus*, aerolyzin – *Aeromonas hydrophila*, antrax toxin – *Bacillus anthracis*)
- α -hemolyzin je monomerní protein (33,2 kD, délce 100Å, průměr 14-46Å)
 - * 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