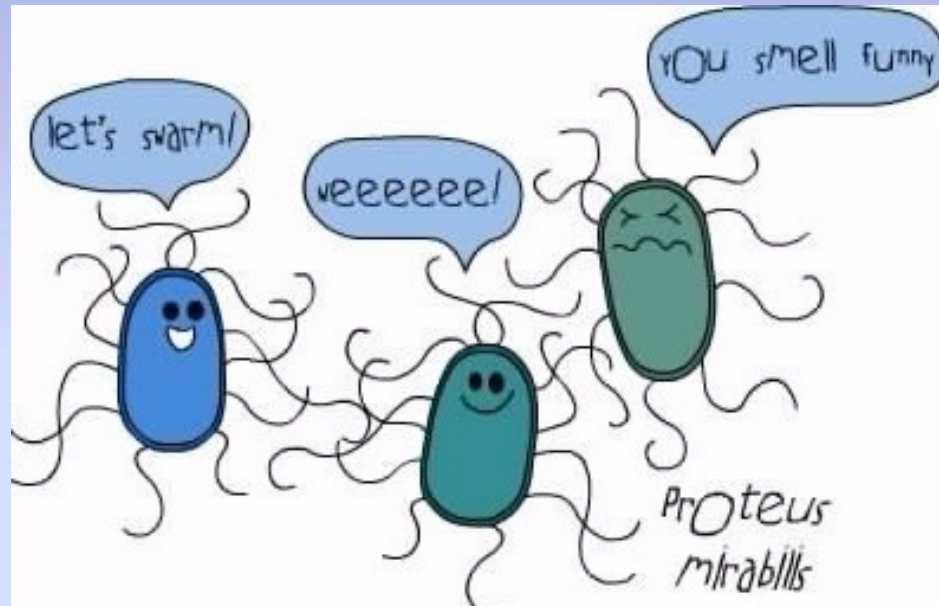


Taxe bakteriálních buněk

Vláknité útvary na povrchu buňky




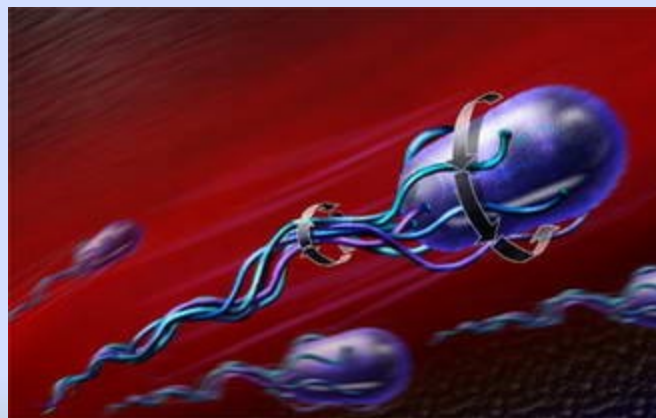
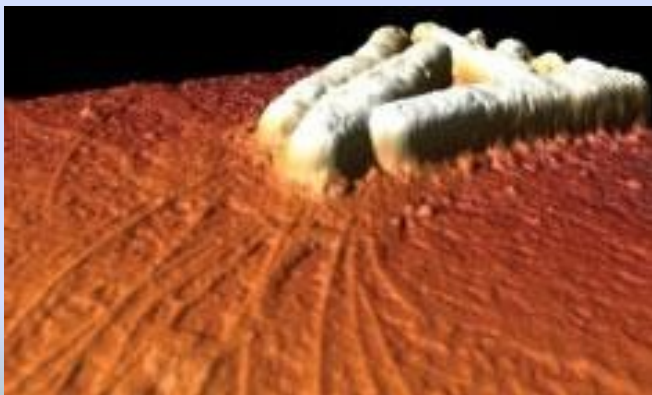
Bakterie detekují 2% změnu koncentrace

Bakterie vyhodnocují změnu gradientu koncentrace v prostoru i v čase

Chemotaxe je jednou z nejprozkoumanějších signálních drah

Důvody pohybu bakterií

- nejčastější – pohyb ke zdroji živin 
- reakce na repelent
- shlukování buněk za účelem vytvoření plodnice – *Myxobacteria*
- Intenzita odpovědi závisí i na teplotě

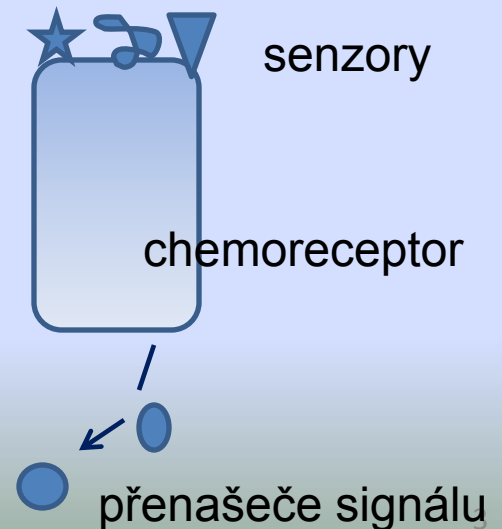


Signalizace

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

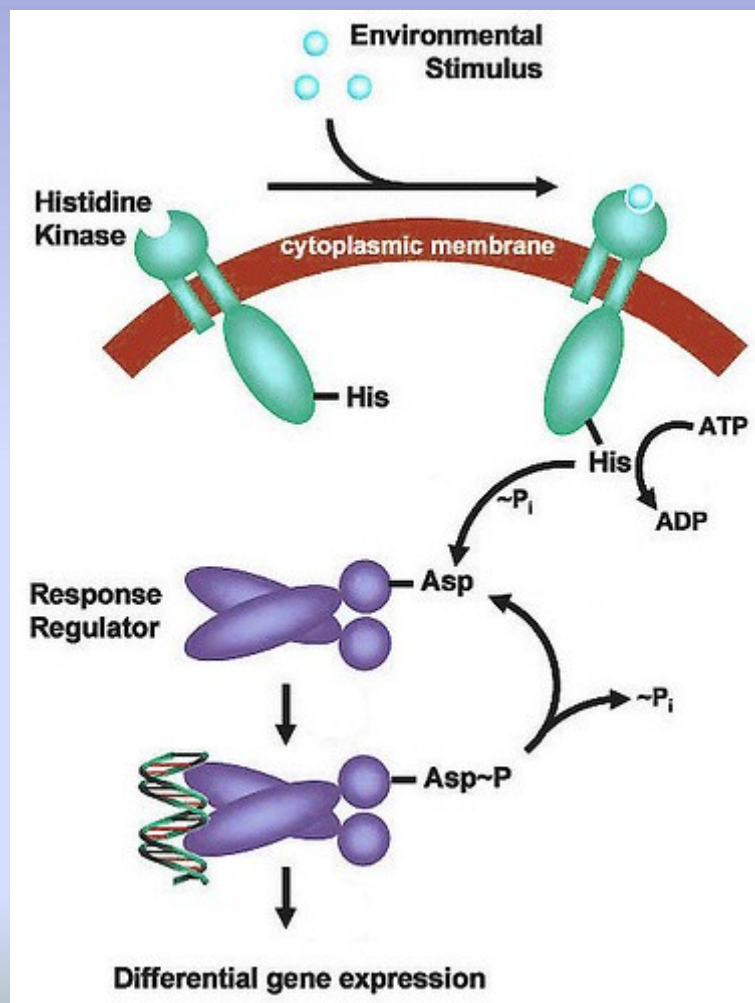


[Nature](#). 2004 Apr 1;428(6982):574-8.

From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium.

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

dvoukomponentní systém (two component system, TCS)

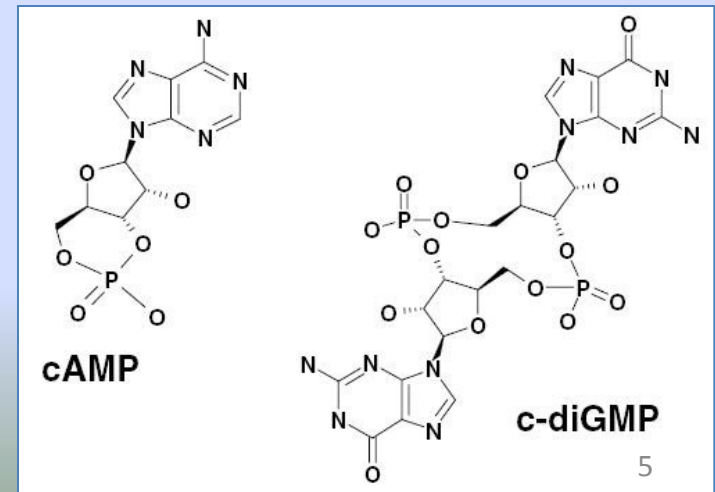


Organizace signálních drah



- (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



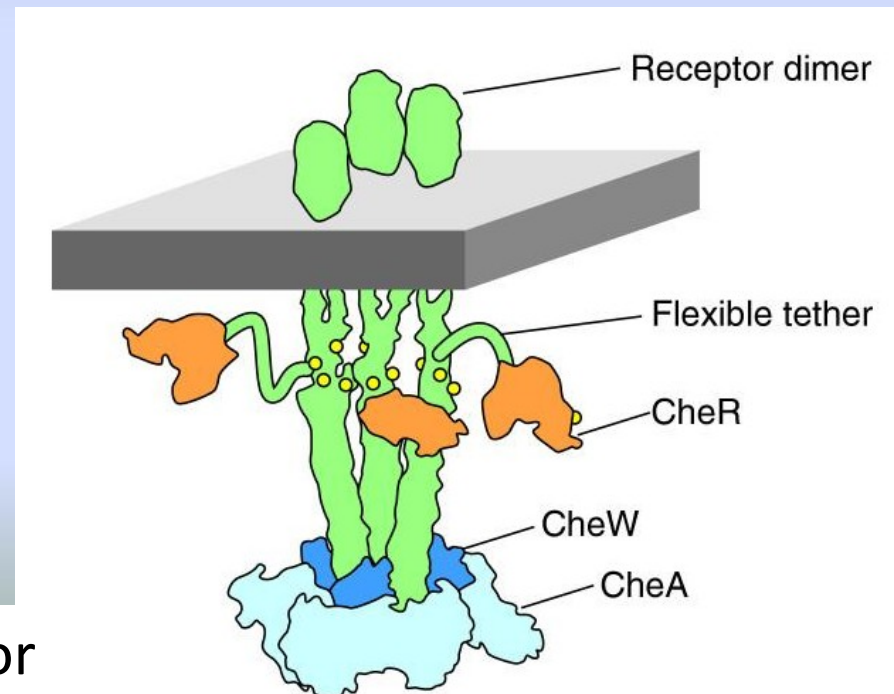
Signalizace a chemotaxe

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

Regulace chemotaxe

- Spočívá v samotné struktuře a interakcích proteinů sítě drah
- Chemoreceptory s proměnlivými senzory (5 typů)

Senzory rozeznávají **serin**,
aspartát, **ribózu**, **galaktózu**,
dipeptidy a **redoxní reakce**



Tsr, Tar receptor

Prostorová organizace senzorů

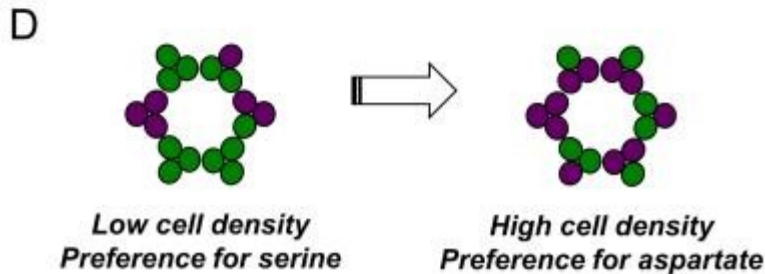
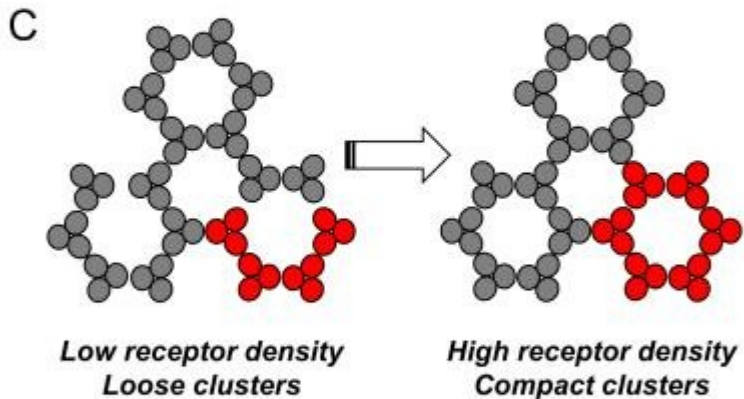
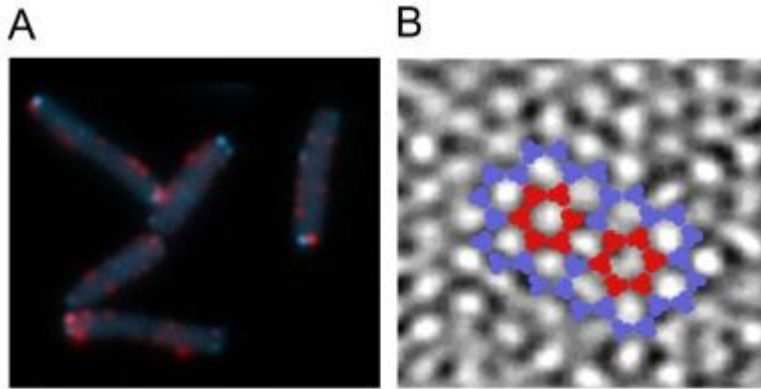
Proteiny chemotaxe a pohybu rozmístěné do klastrů.

Kryoelektronová mikroskopie

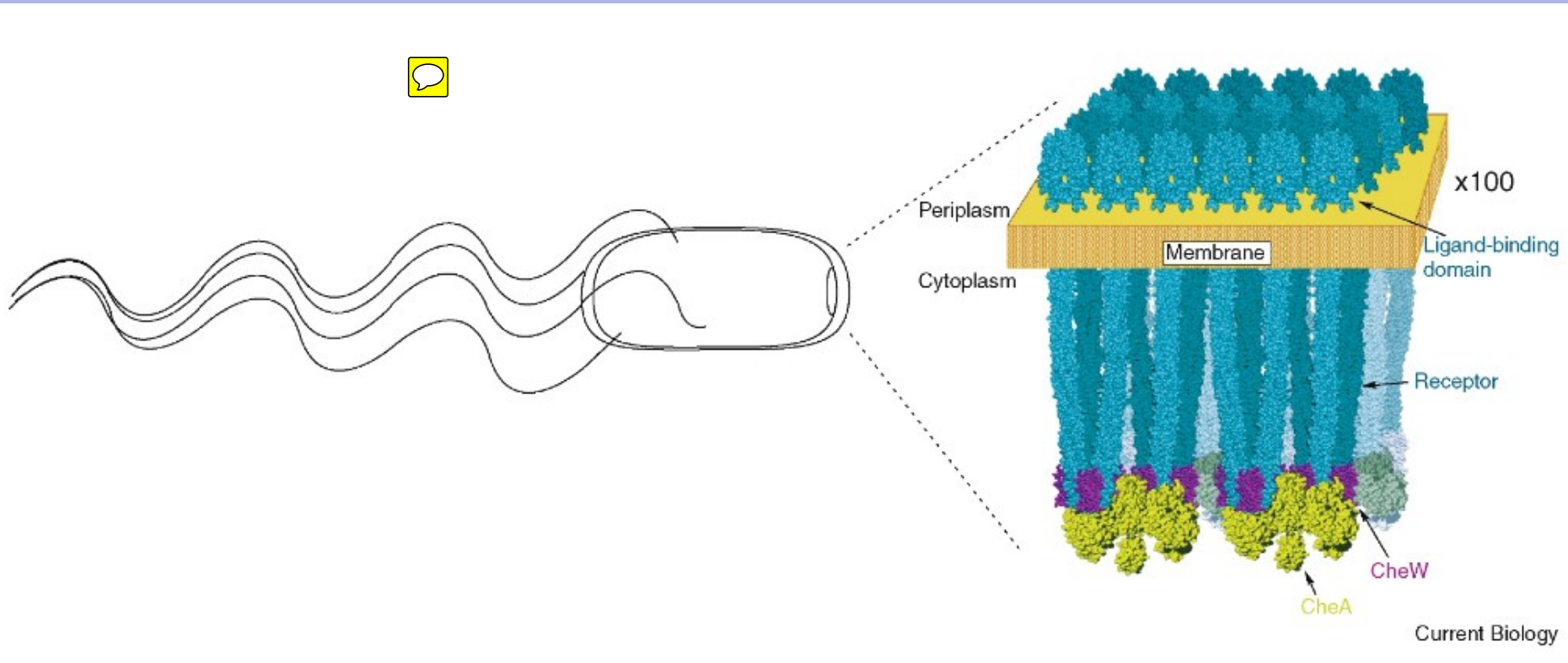
Receptory fungují jako signalizující di- nebo trimery; amplifikují a integrují chemotaktické signály.

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

Regulace preference ligandu.



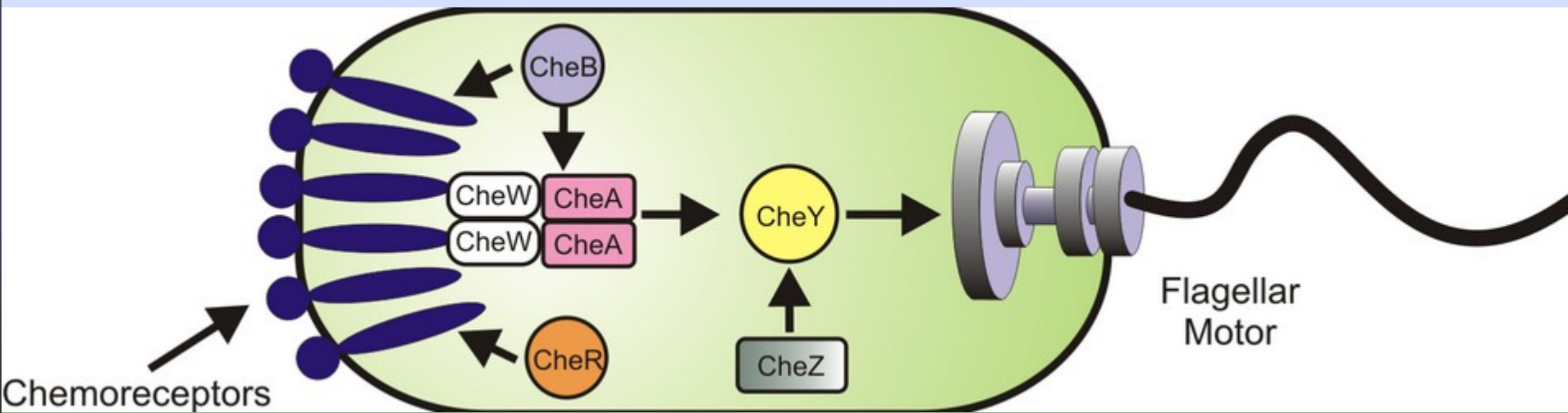
„Bakteriální nanomozek“



Chemotaxe – strukturně-funkční vztahy

Vysoce konzervované chemoreceptory – Bacteria, Archaea

- Studie: *E. coli* a salmonela
 - multimer na jednom nebo obou pólech buňky
- Tisíce regulačních proteinů a proteinů pro přenos signálu
- Objevena **diverzita** od modelových MO
 - velikost a topologie chemoreceptorů
 - modus signálu
 - přítomnost přídatných proteinů přenášejících signál



Mechanismus chemotaxe *E. coli*

Regulace pomocí MCP systému

MCP = „methyl accepting chemotactic protein“

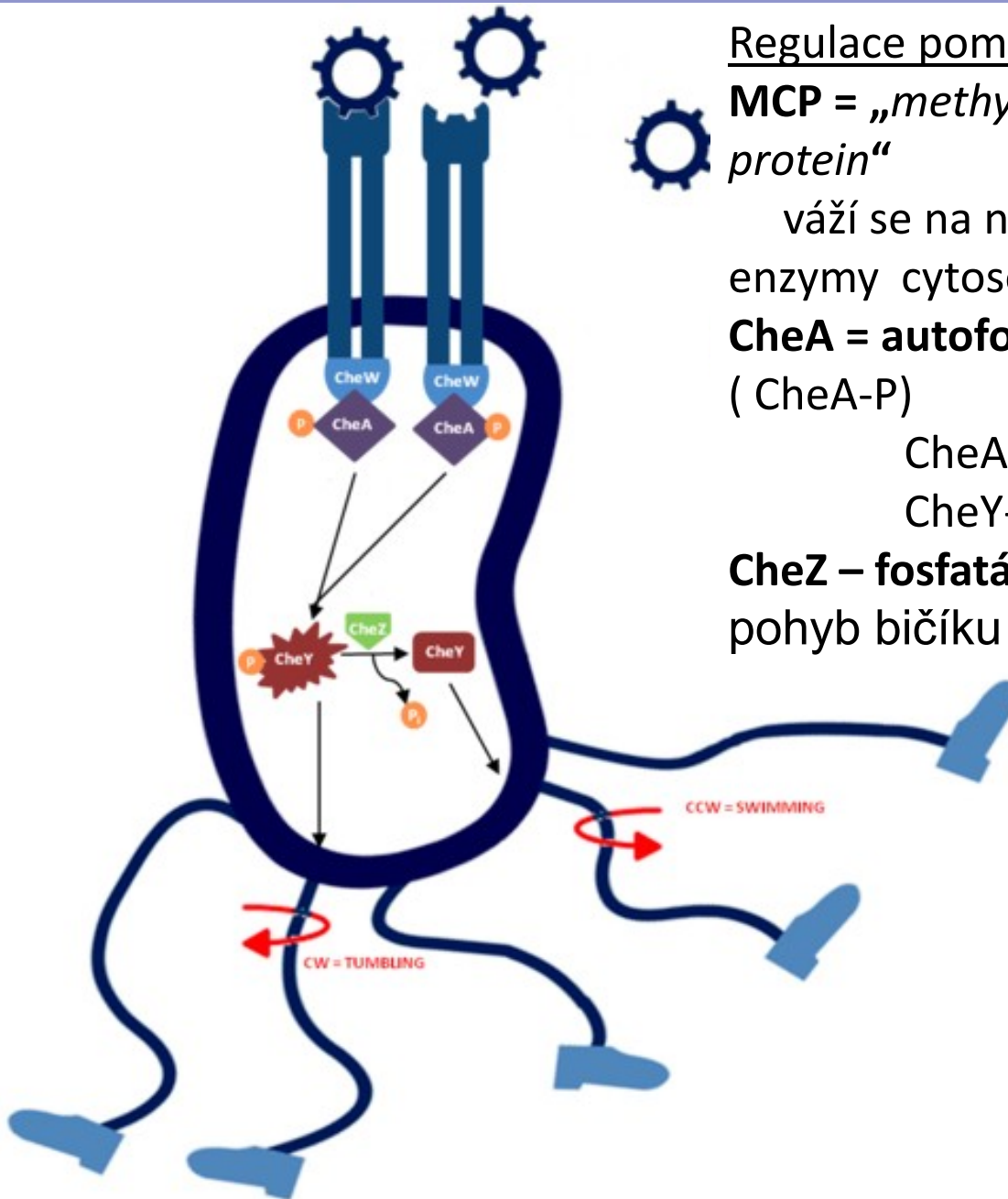
váží se na něj proteiny CheA a CheW –
enzymy cytosolu

CheA = autofosforylující membránová kinasa
(CheA-P)

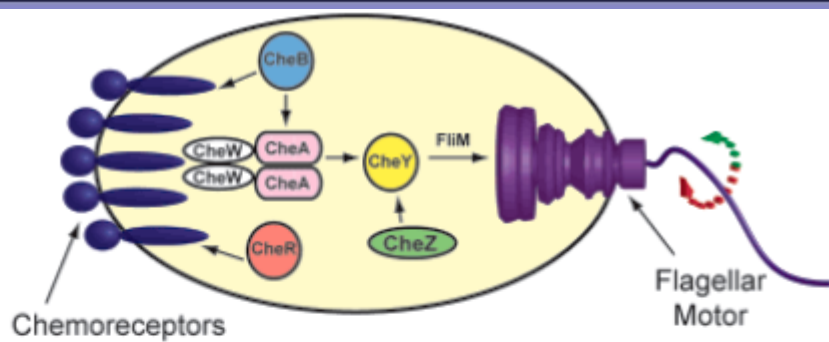
CheA-P přenáší fosfát na CheY

CheY-P = pohyb bičíku CW

CheZ – fosfatáza, desfosforyluje CheY-P =
pohyb bičíku CCW

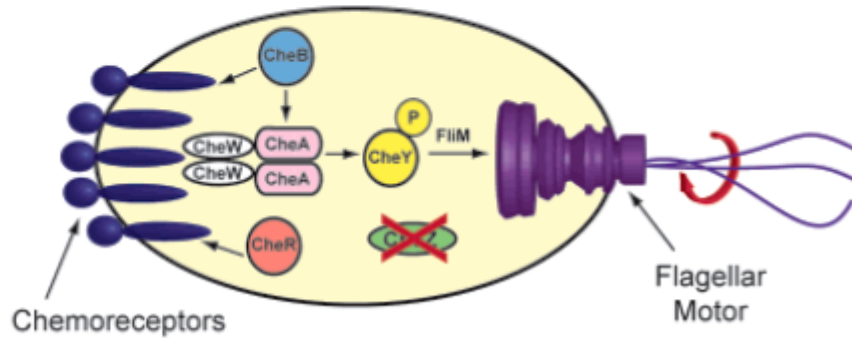


wild type
(RP437)

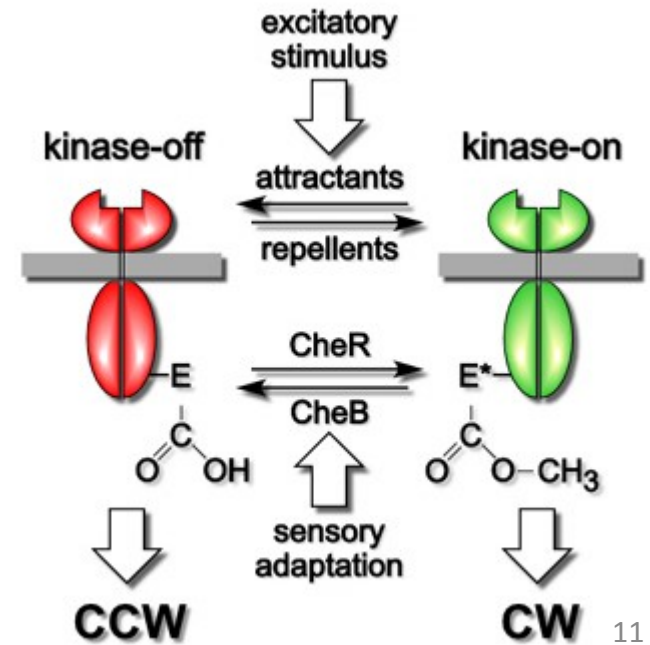
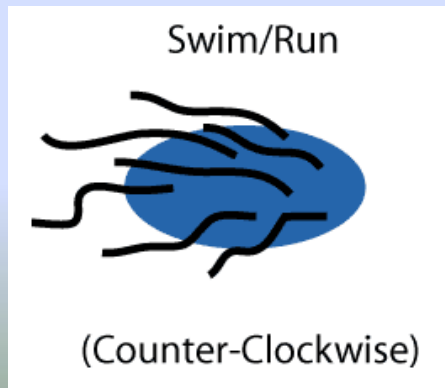
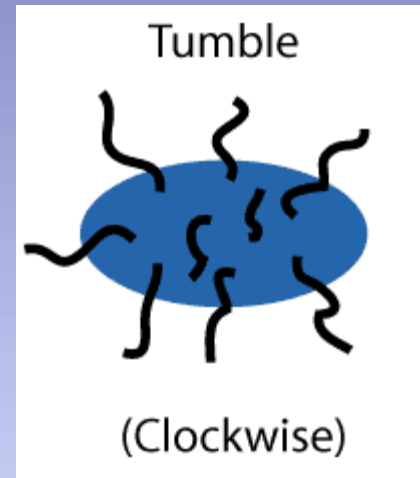


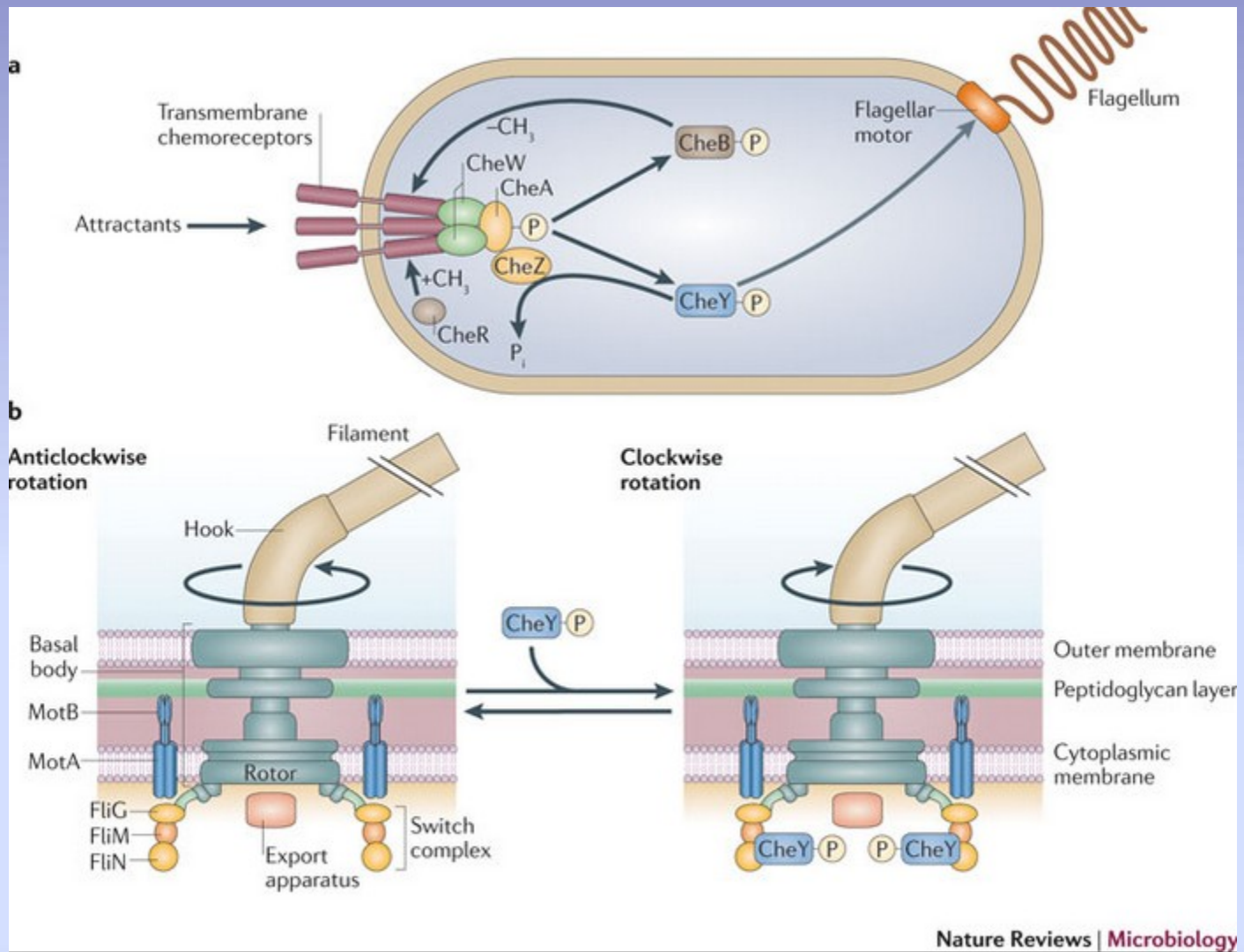
Flagellar Motor Alternates Between **CCW** and **CW** Rotation — Cells Run and Tumble

$\Delta cheZ$
(RP1616)



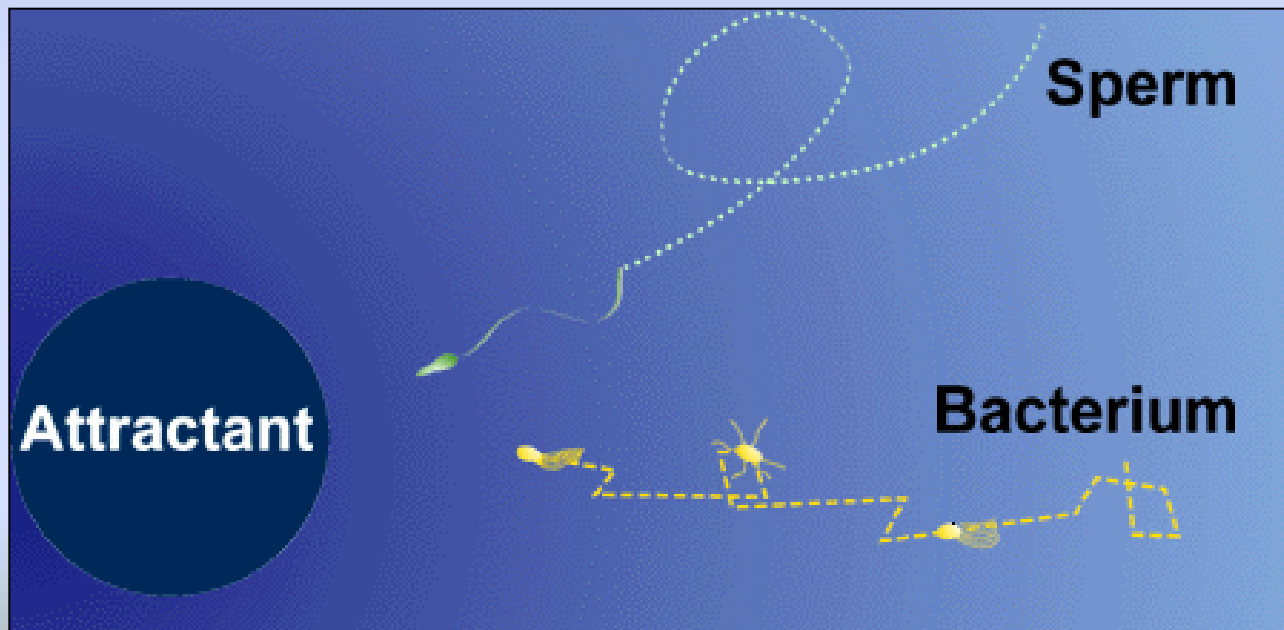
CheY Remains Phosphorylated, Flagellar Motor Rotates **CW** — Cells Tumble Exclusively





Prokaryota vs eukaryota

- **rotace bičíku** kolem vlastní osy
 - pouze u prokaryot
- poháněn **proton motive force** (pmf) – pohyb protonů přes cytoplazmatickou membránu

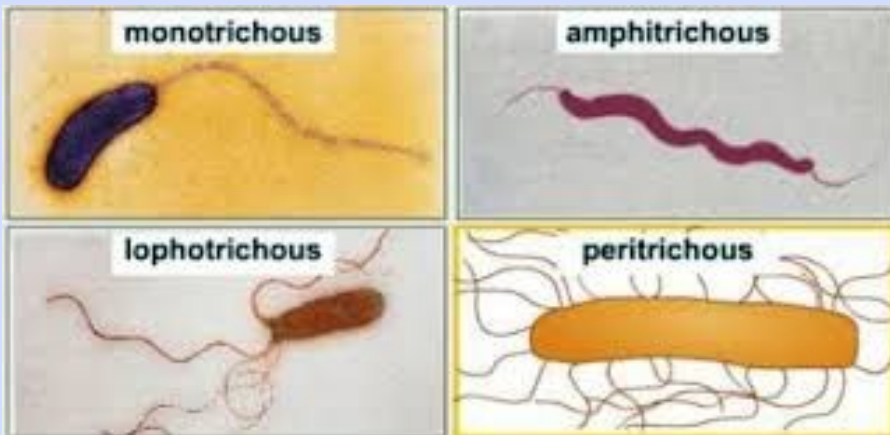



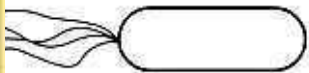

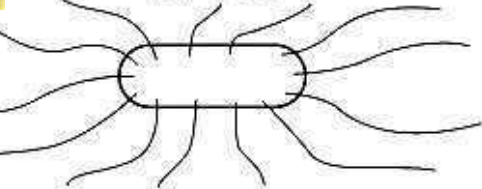
Vnitřní faktory ovlivňující pohyb

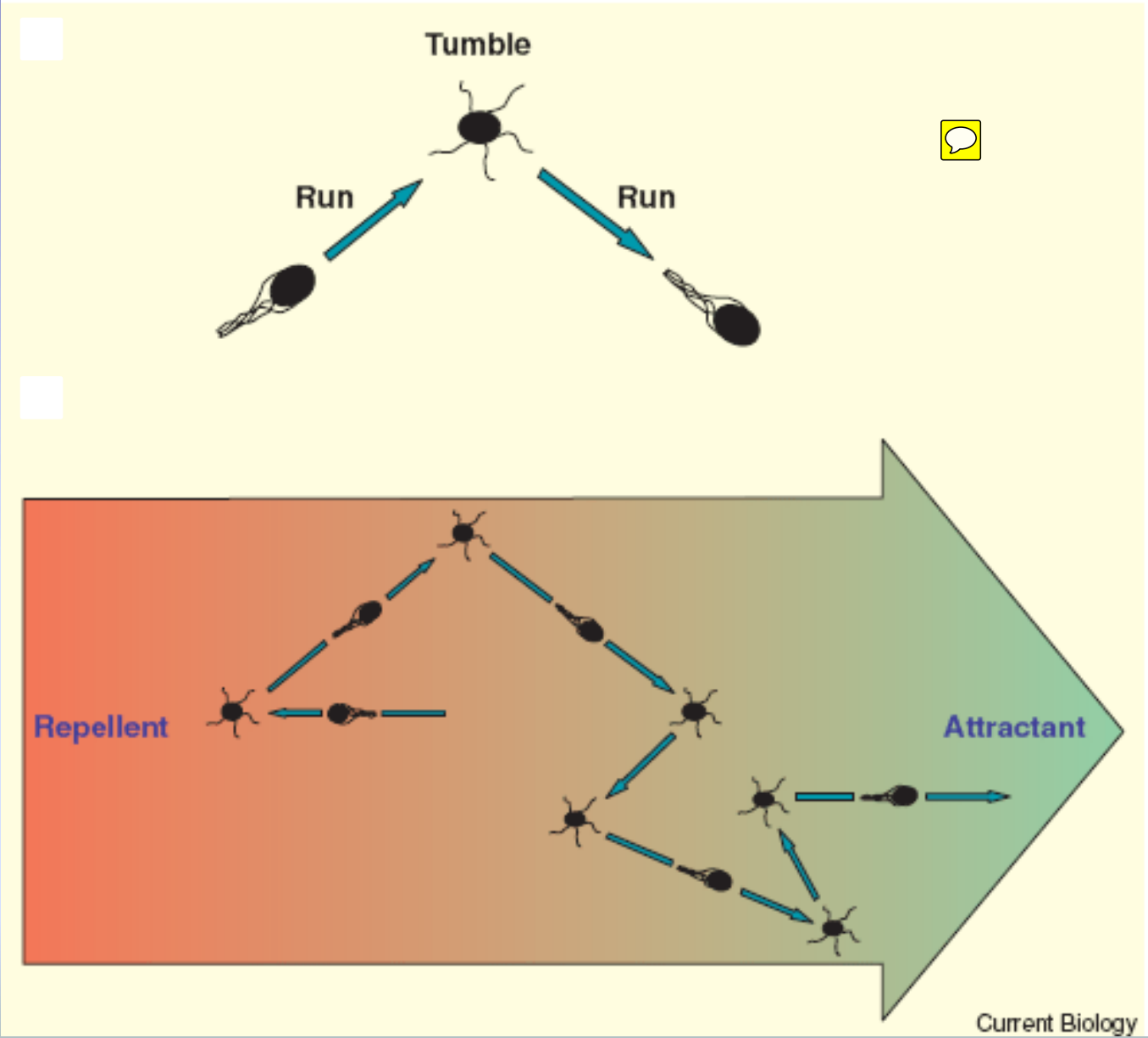
- počet bičíků 

- lokalizace bičíků

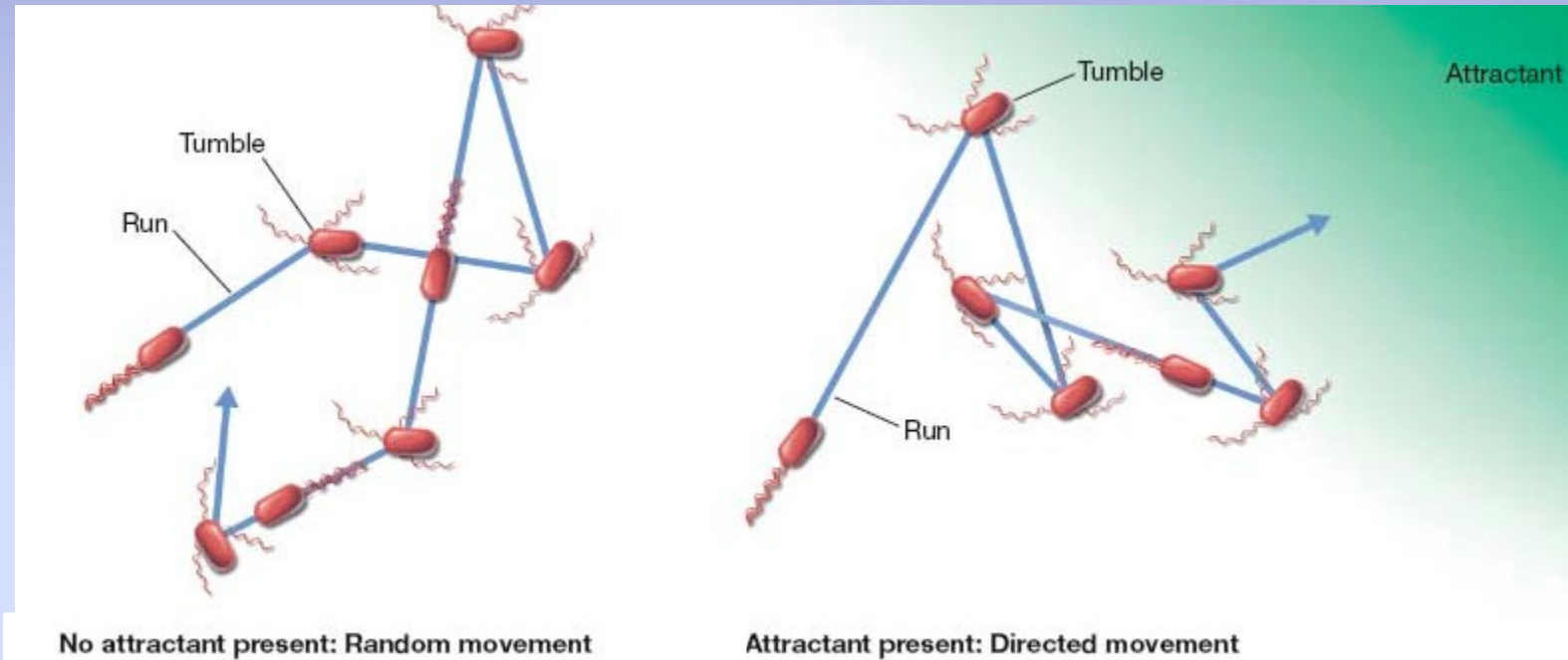
- dostatek redukčních ekvivalentů



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

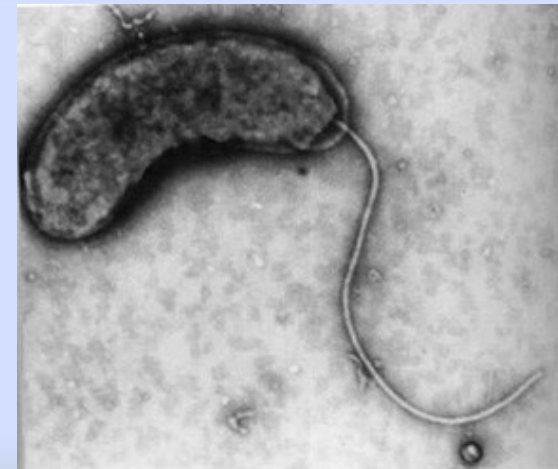
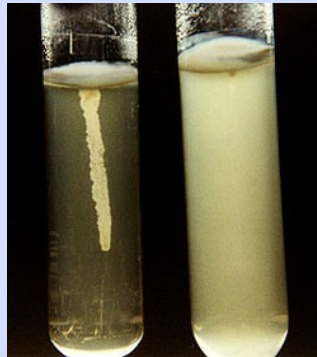
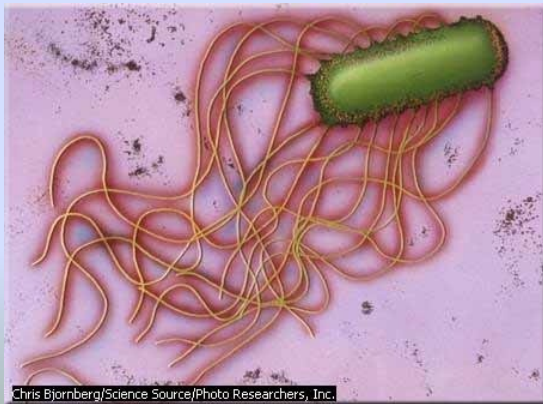


Přítomnost/nepřítomnost atraktantu



Bakteriální bičik

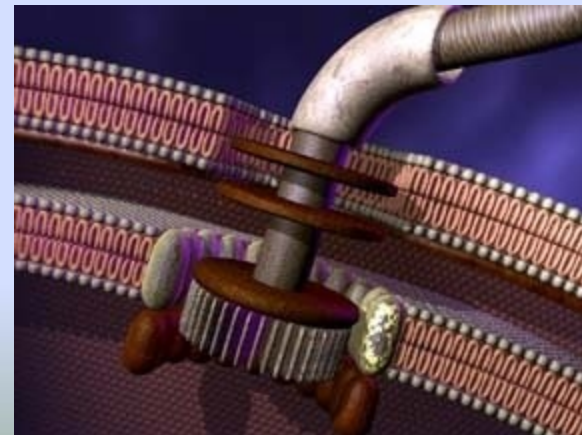
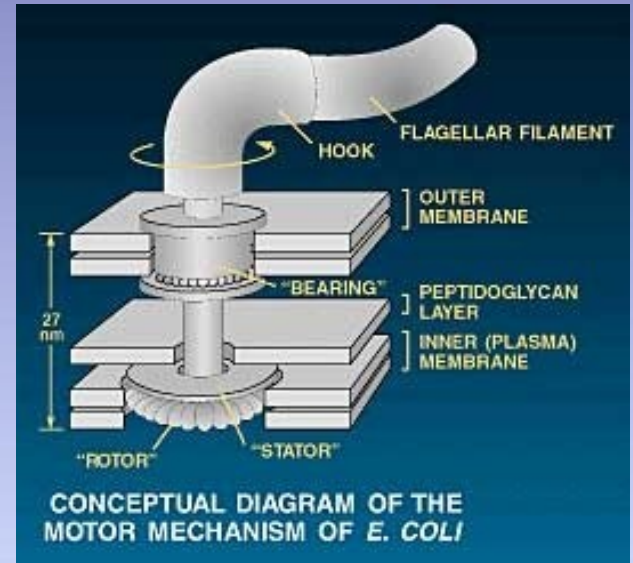
- semirigidní vláknitá struktura
1 – 4 proteiny – **flagelin**
- **podobná stavba** u všech dosud zkoumaných druhů bakterií
- tloušťka 13 – 20 nm
- 1 – 100 $\mu\text{m/s}$
- atraktant – faktor



motility test medium
(polotuhé medium)

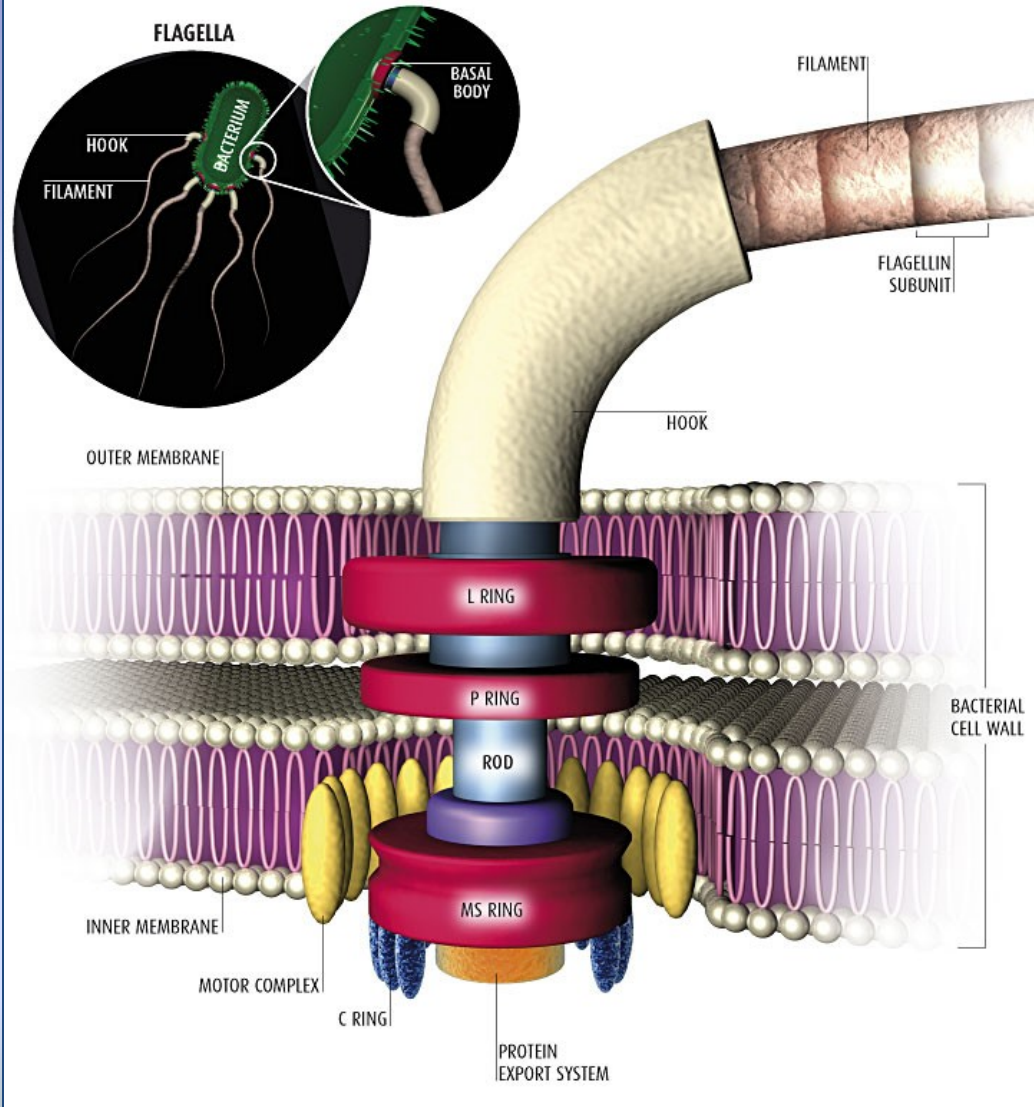
Komponenty bičíku:

- vždy **bazální tělísko** –
G- **3** kruhy (CM, PG a VM)
G+ **2** kruhy
- háček** (hook)
- vlastní **vlákno**
- Bazální tělísko zůstává po odstranění bičíkového vlákna, to je do 20 až 30 min dosyntetizováno



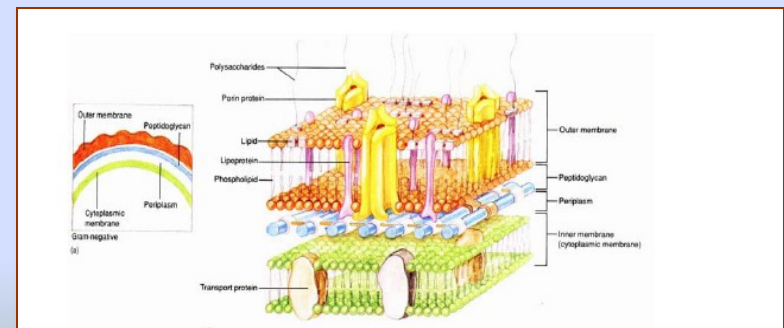
NATURE'S OUTBOARD MOTOR

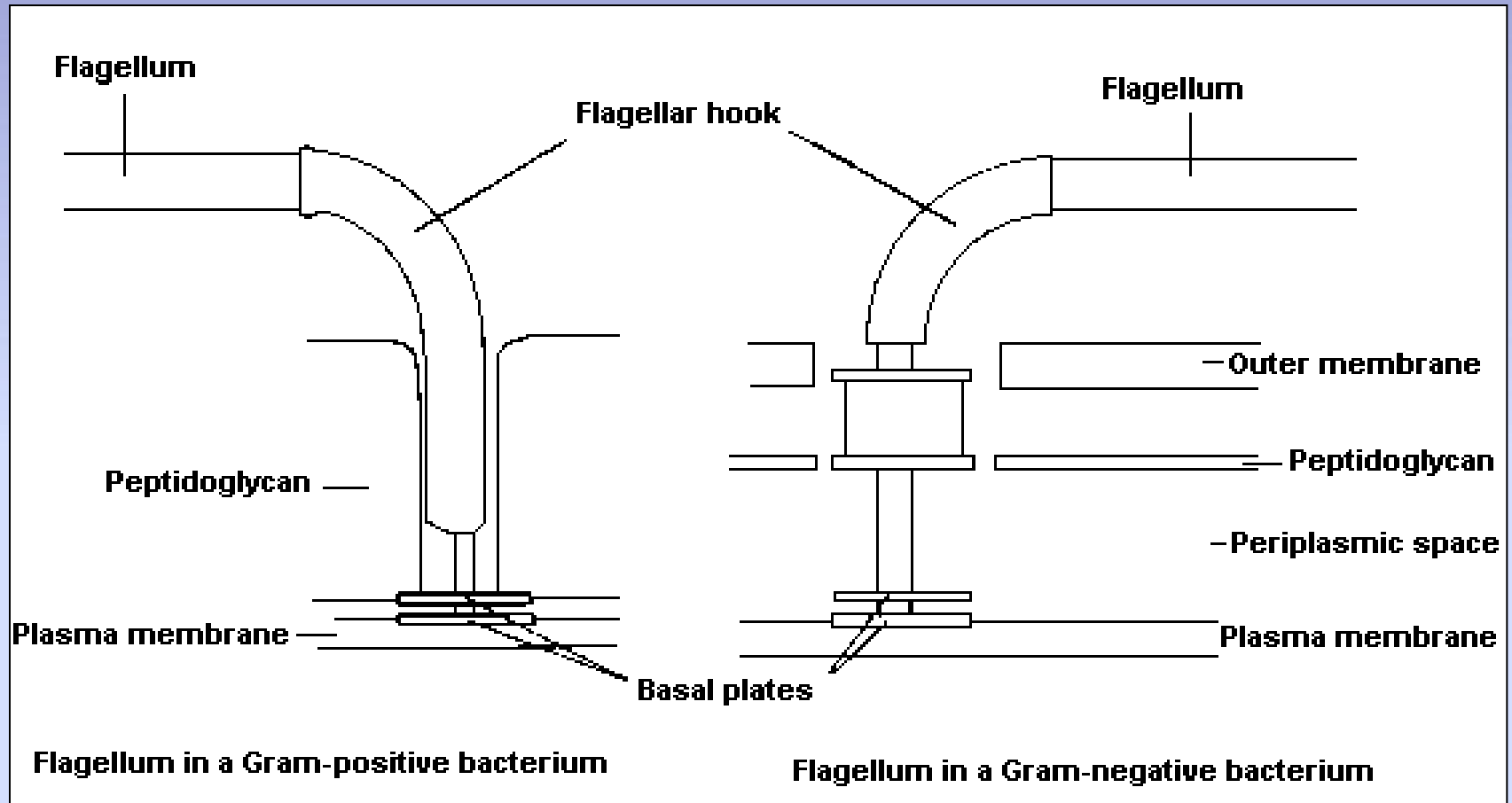
Despite the intricacies of the bacterial flagellum, biologists are unravelling its workings and making great headway in understanding how the nanoscale appendage evolved



G- typ B.S.

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



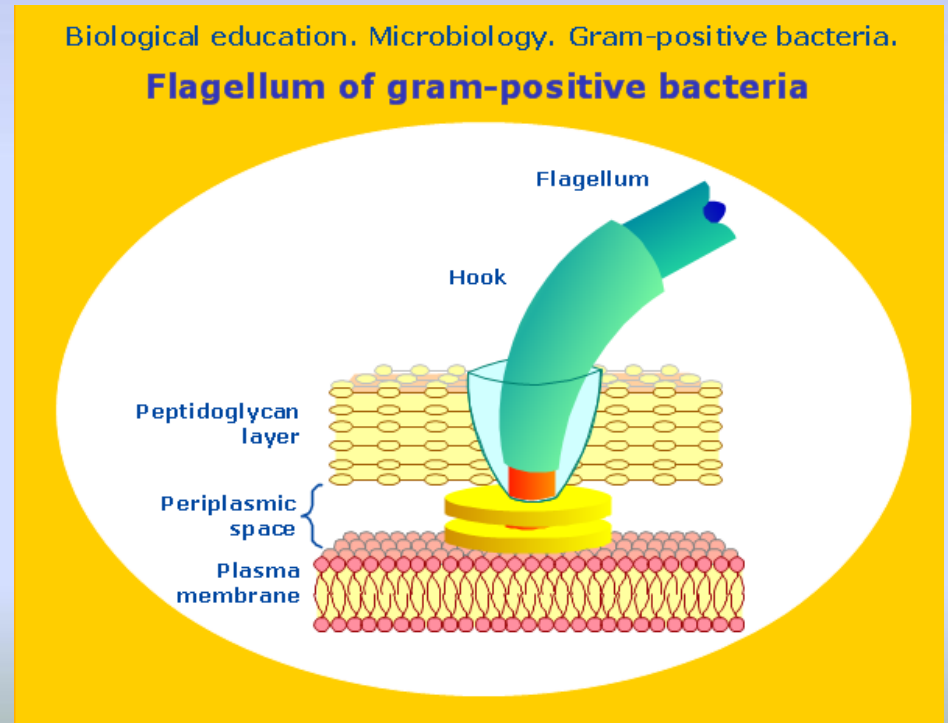
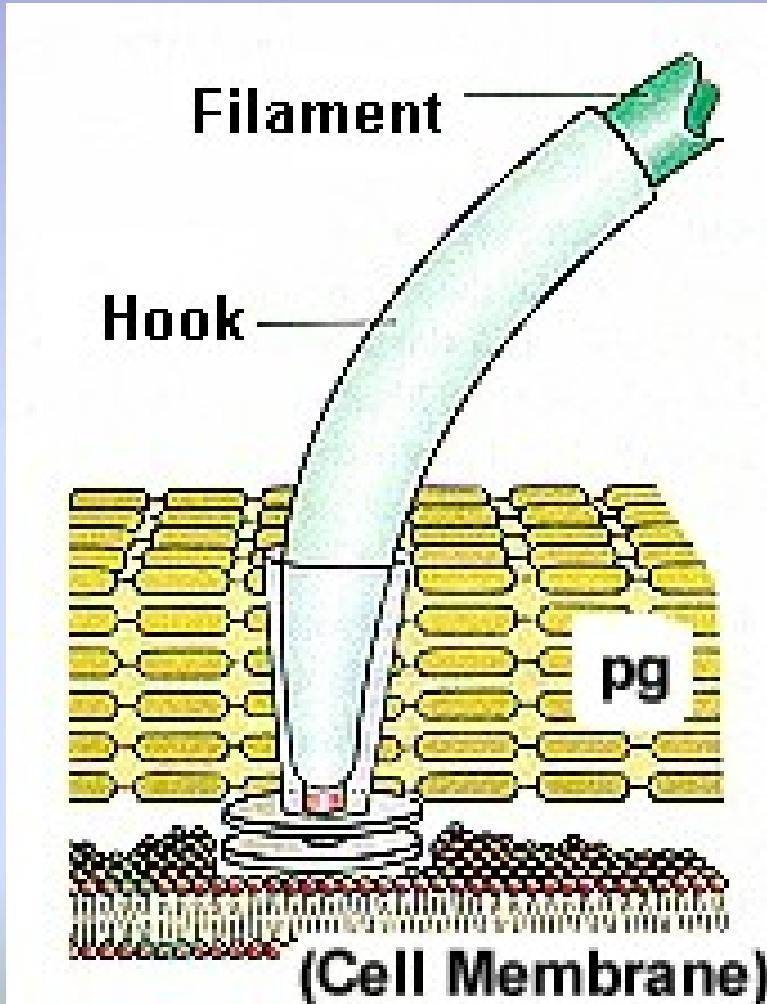


- **G+** :


bazální tělísko - 2 disky

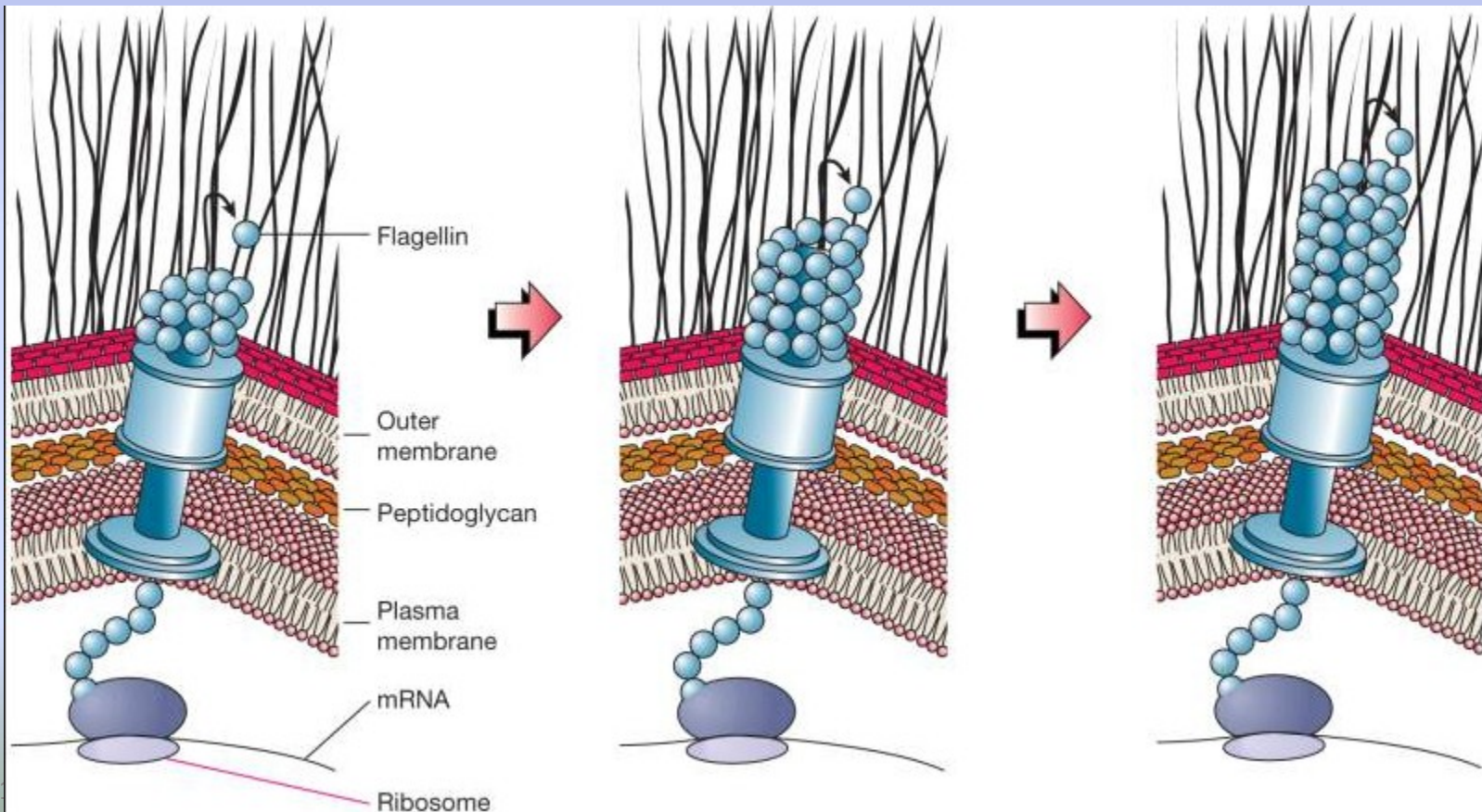
spodní disk - v **CM**

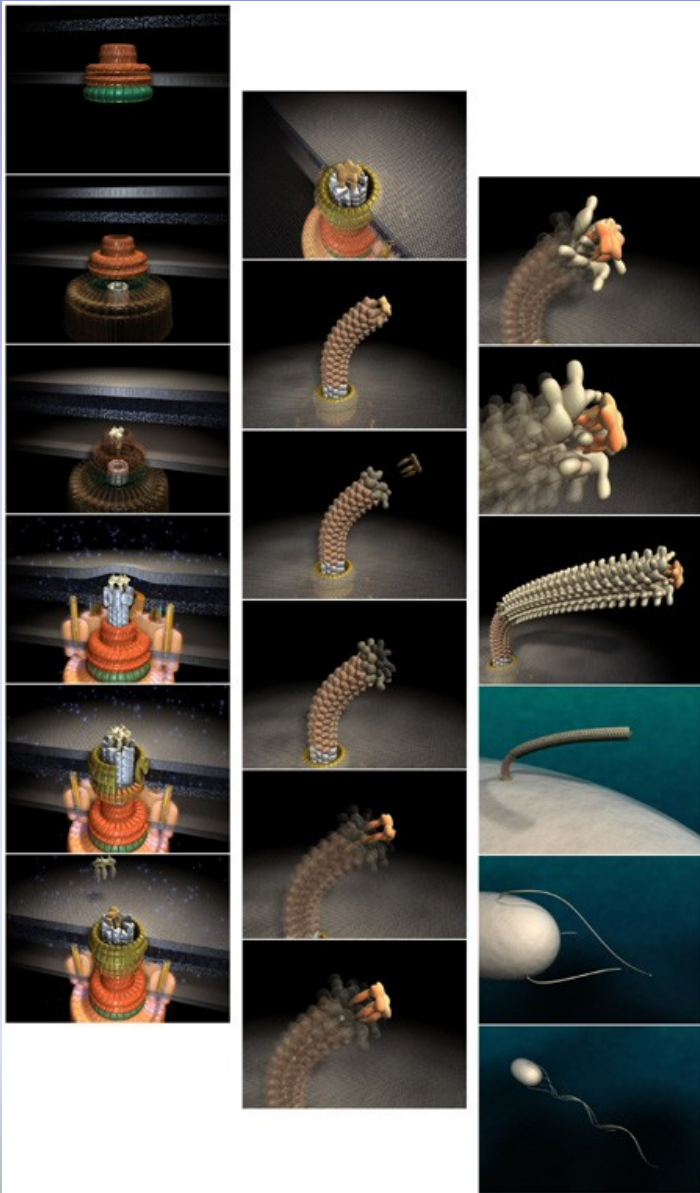
horní disk – v **B.S.** - kluzné ložisko -
tam se otáčí osa, háček pro ohyb




Tvorba:

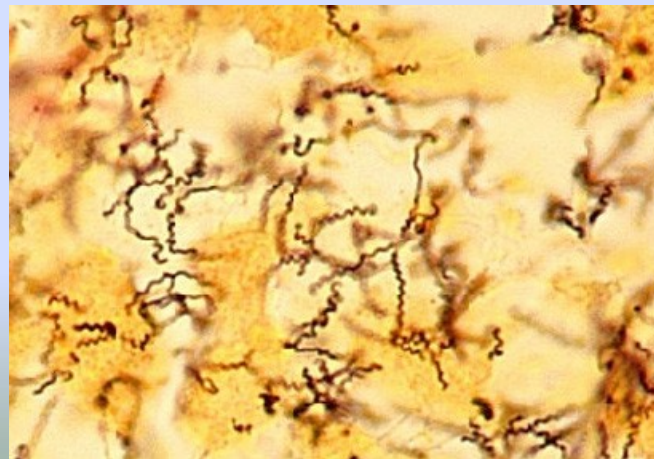
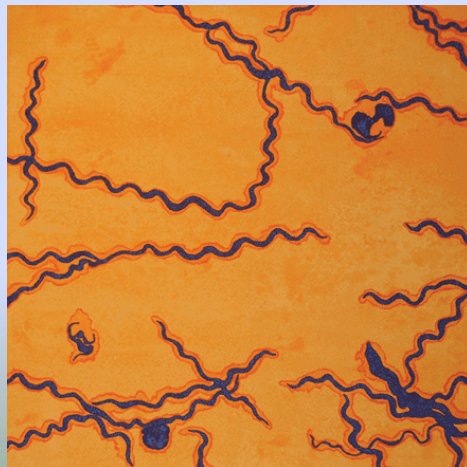
- Samouspořádání – „self-assembly“
- molekuly flagelinu jsou středem vlákna **transportovány na konec**, vazba na konci bez enzymů, dosyntetizuje se **vždy do stejné délky**. 



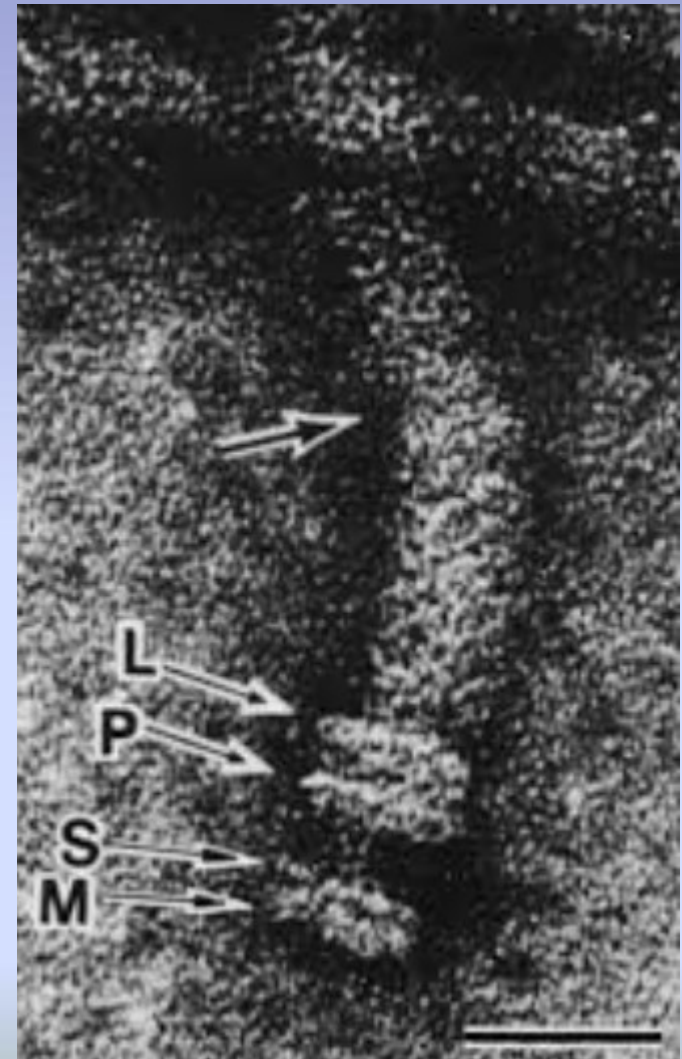
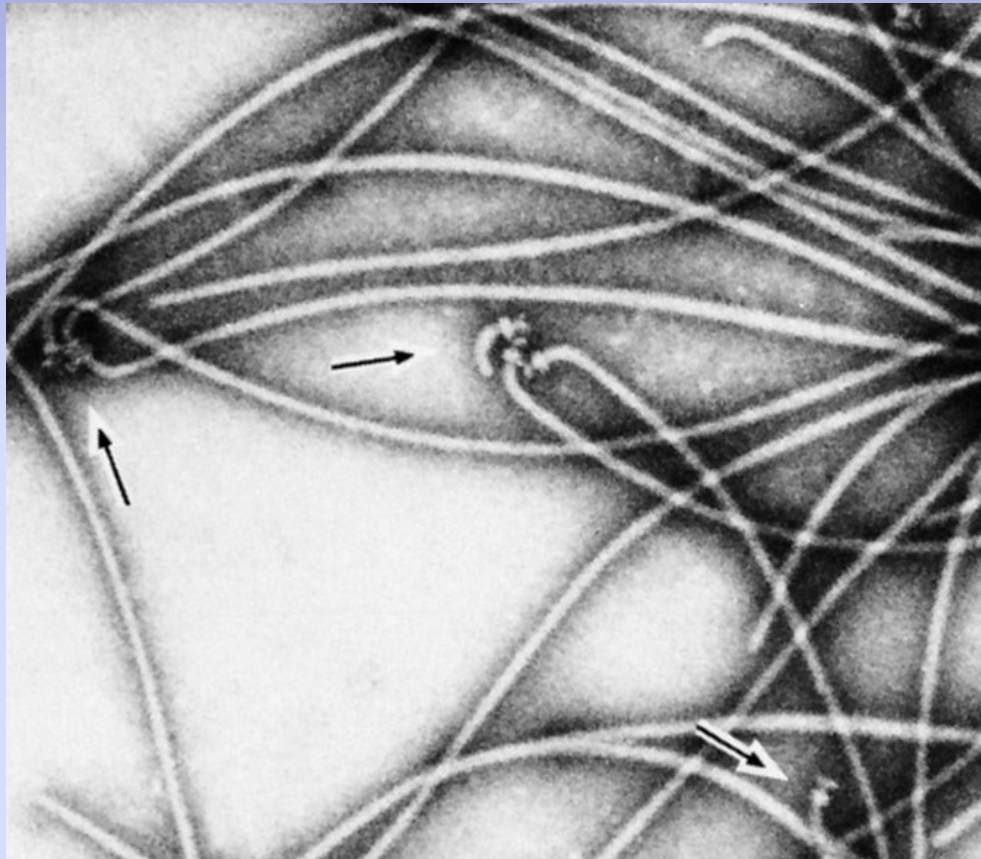


Selfassembly....


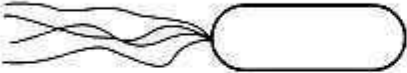

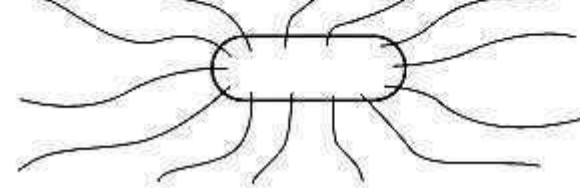
- supramolekulární komplex
- molekul.hmotnost flagelinu větší než pilinu
 - flagelární antigen
- začíná v CM (oproti fimbriím) 
- délka bičíku několikanásobně větší než délka buňky
 - bičíky lze snadno odstranit sklem

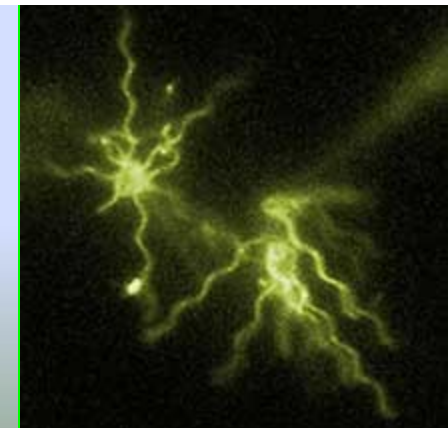
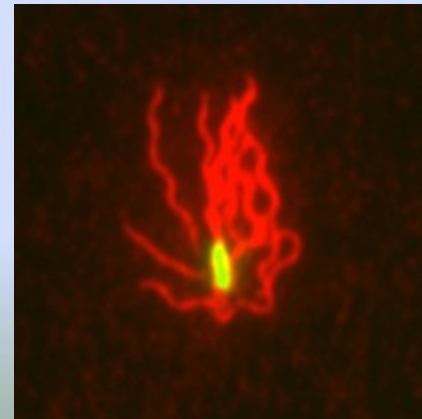
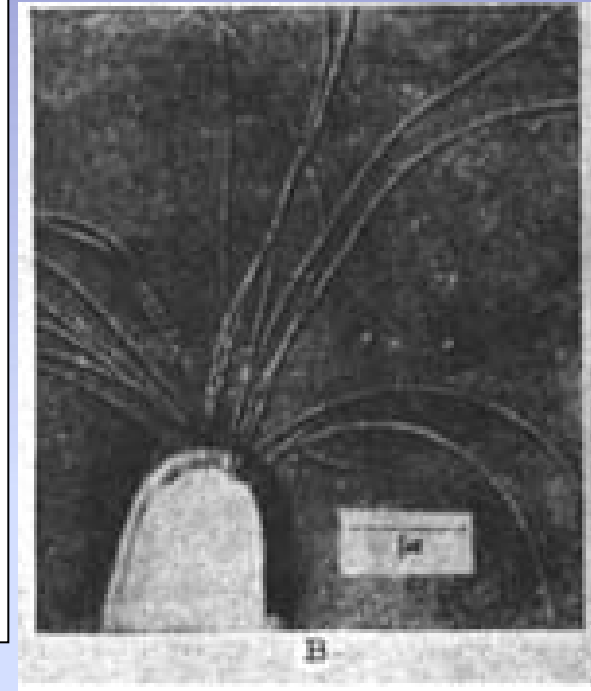


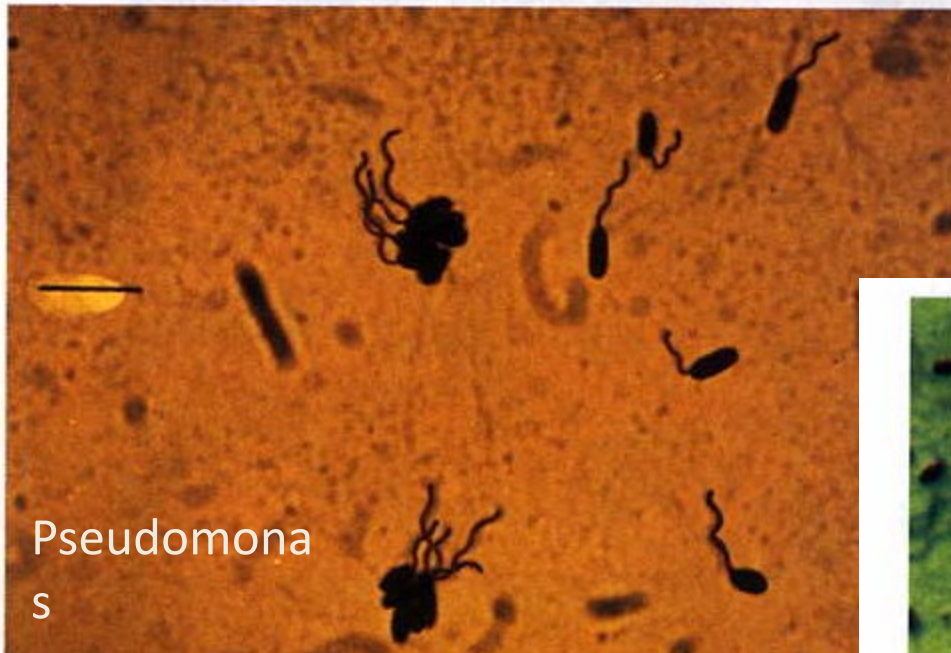
Ultrastruktura bičíku



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>





Pseudomonas



Spirillum

22.10.2015

(b)



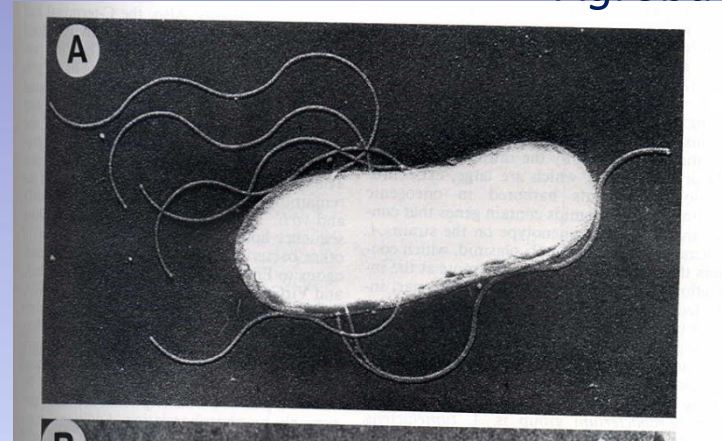
Proteus vulgaris

(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 .

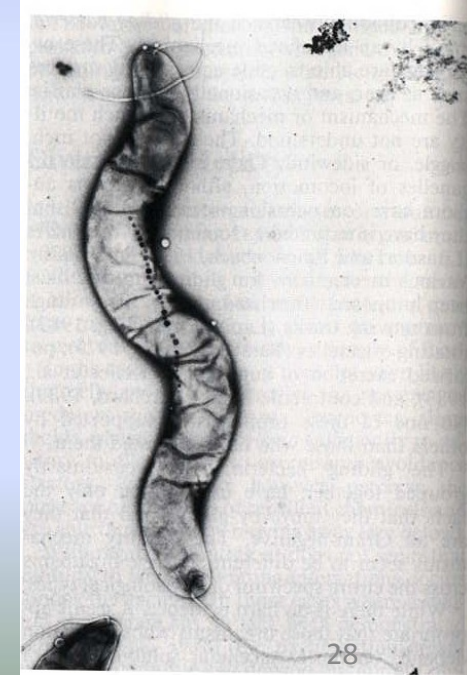
**Pozorování pohybu bičíku –
visutá kapka**

- důležitý dostatek kyslíku
v temném poli a intenzivním
světle




Pozorování bičíků samotných

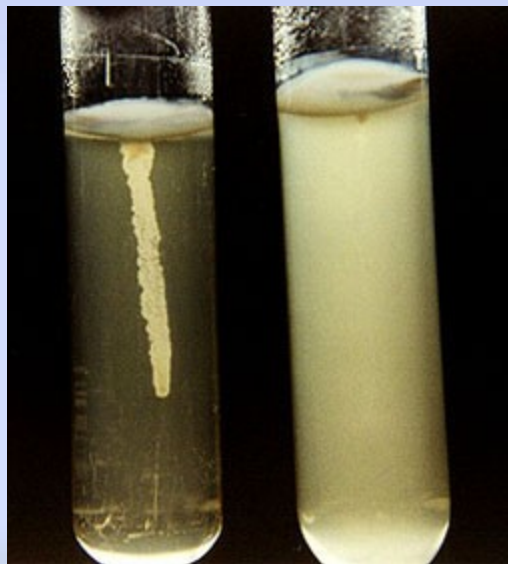
- **světelný mikroskop** po
spec. barvení (obalení
bičíku vrstvou mořidla,
znásobení a zviditelnění
jeho průměru)
- **elektronový mikroskop** –
negativní barvení
otiskové preparáty po
rychlém zmražení na -150 C



Pohyb bakteriální buňky

spojeno s pohybem po tkáních/sliznicích

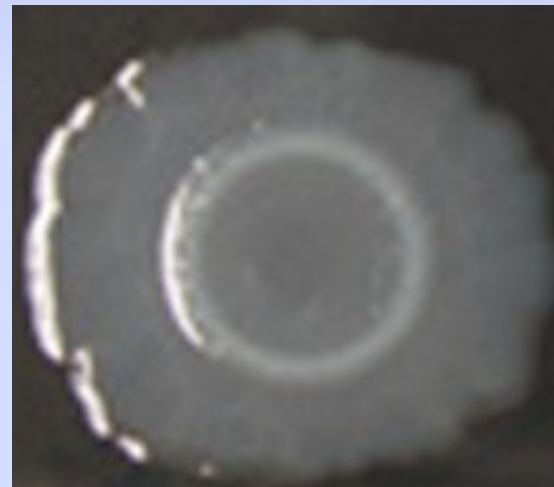
- **swimming motility** – pohyb bičíky, plavání 
- **swarming motility** – plazivý pohyb kolonií, bičíky, *Proteus*
- **twitching motility** – trhavý, skákavý pohyb – př. *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*
- **gliding motility** – klouzavý pohyb



Motility medium



Terasovitý růst – střídání fází
Proteus

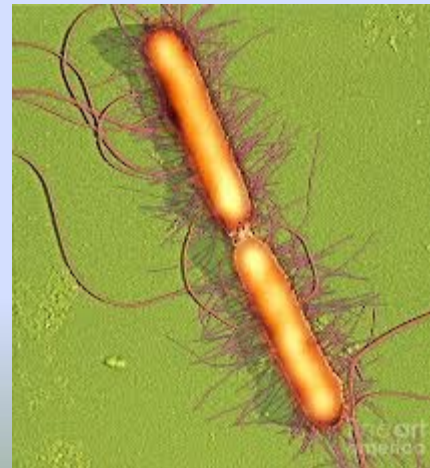
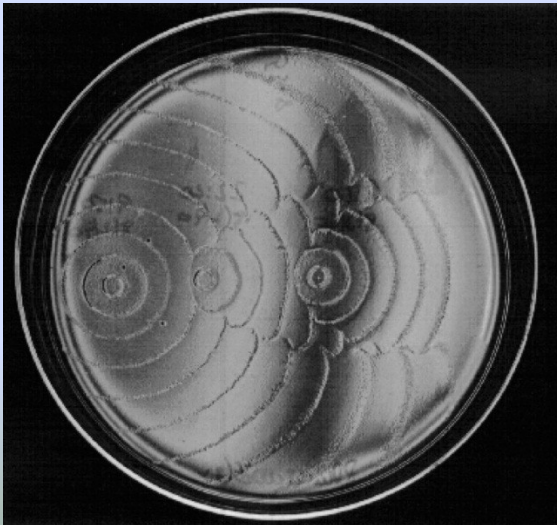


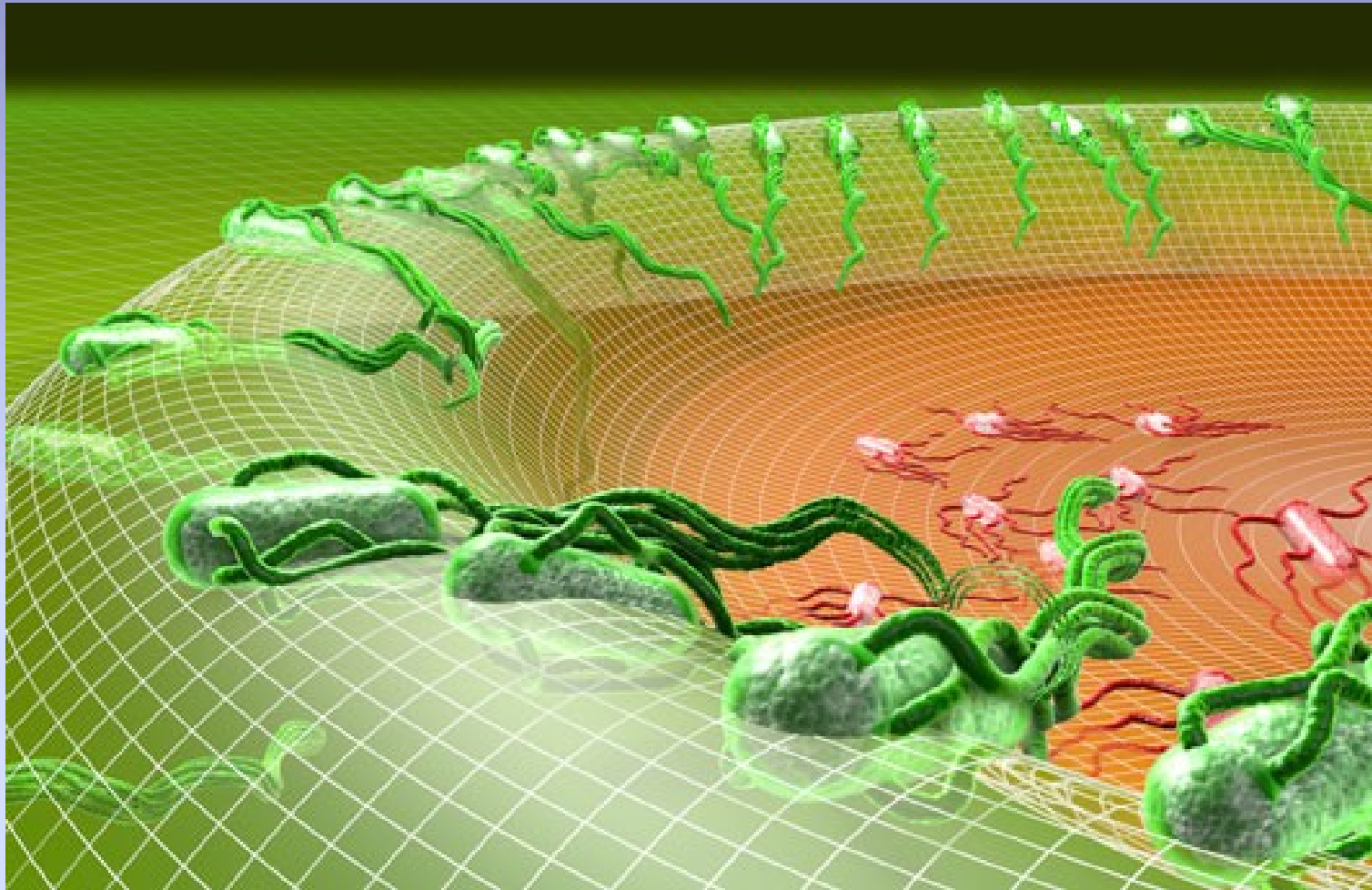
twitching motility -
Legionella pneumophila

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

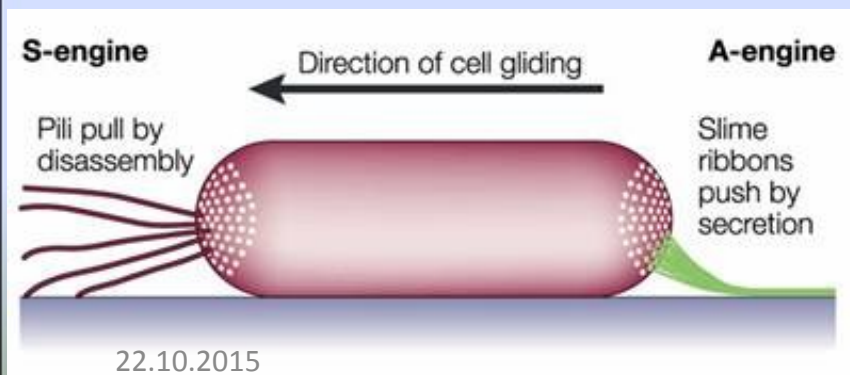




Klouzavý pohyb (Gliding motility)

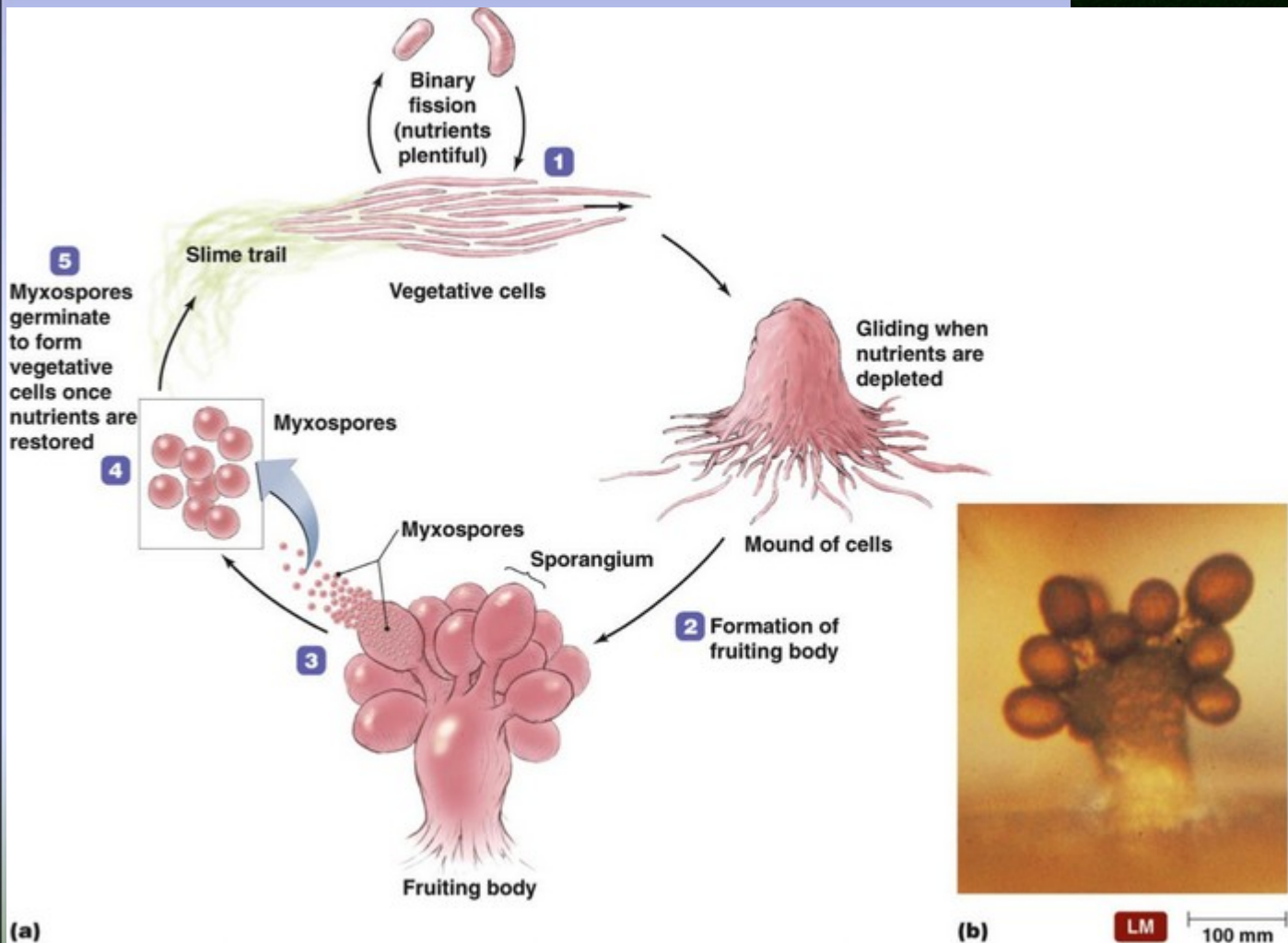
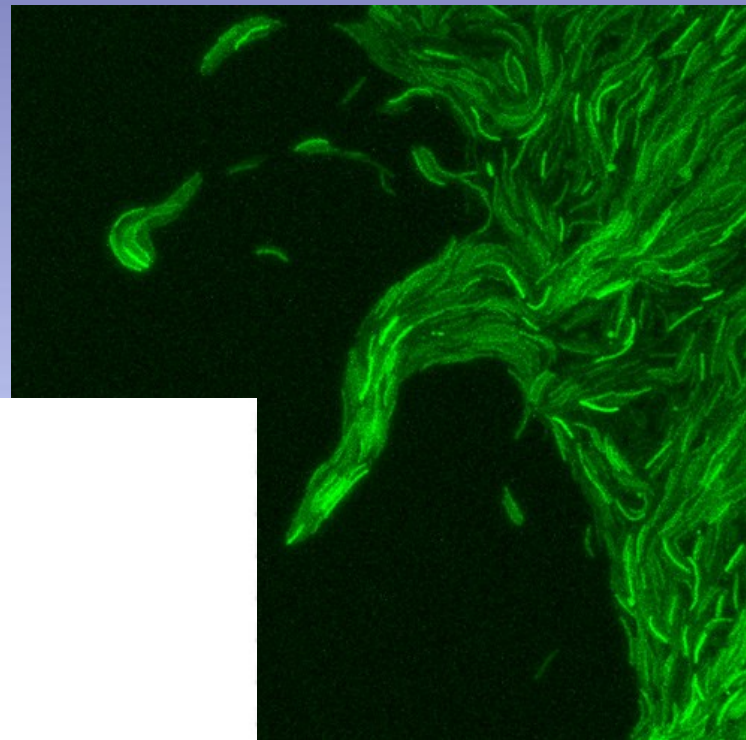


- na pevných površích 
- mechanismus nejasný
- pmf patrně zahrnutý
- přizpůsobení – slizy, surfaktanty, specif. membránové komponenty, které tvoří reverzibilní vazbu se substrátem, actine-like systém
- Makoto Miyata, profesor Osaka City University zkoumal klouzavý pohyb *Mycoplasma mobile*
- Za pomoci **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



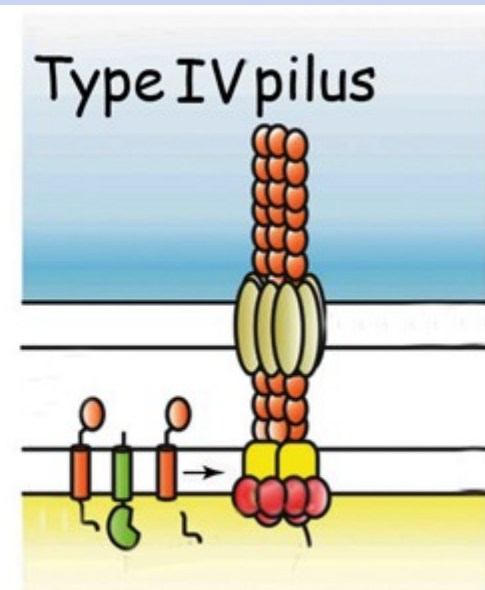
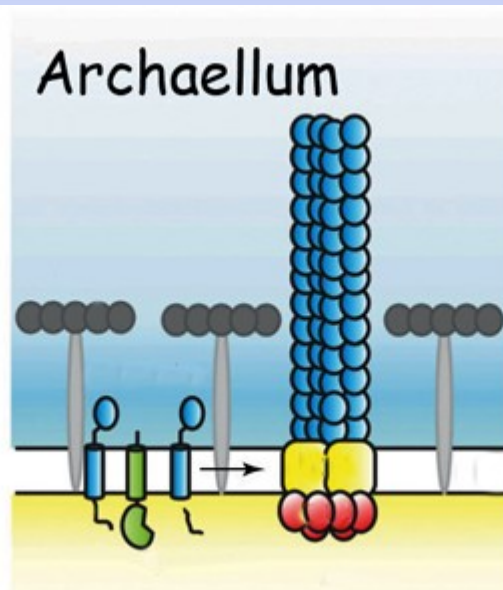
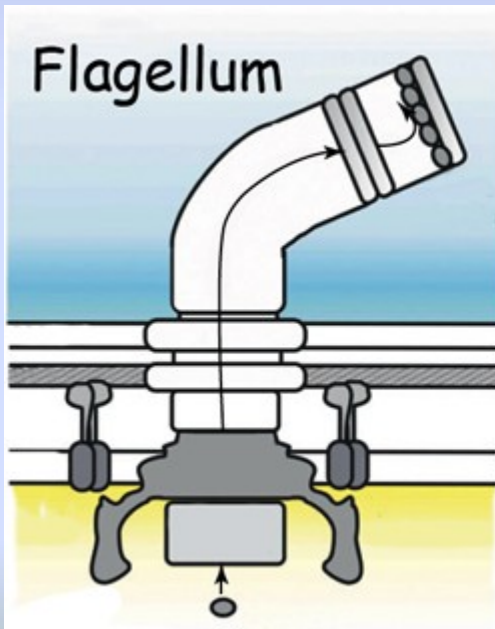
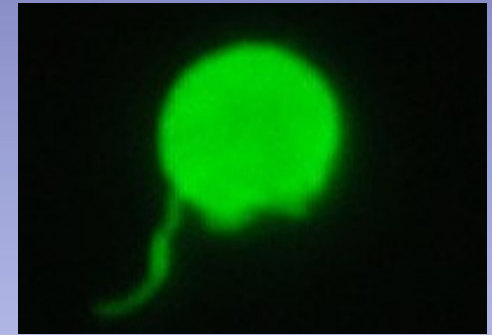
Bičíky archebaktérií

- strukturní a funkční podobnost bakteriálním bičíkům

Rozdíly



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



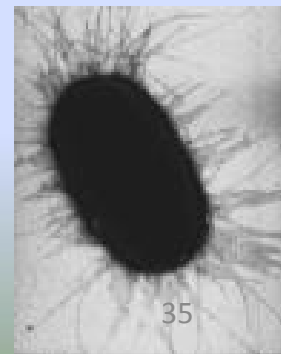
Revealing the Secrets of Motility in Archaea

News Release Paul Preuss 520-486-6249 • FEBRUARY 14, 2013

PILI - fimbrie



- Různě velké, typicky u G-
 - struktura B.S, stovky
 - duté, vždy nepohyblivá trubička - 3, 4 nebo 5 vláken stočených do spirály – protein **pilin**💬
 - kratší než bičík
 - Ø2-8 nm, délka 0,1 – několik nm, 3-5 molekul
 - Fce: **přenos DNA konjugací**, přichycení fágů
- Pohyb (twitching motility); adheze k nenabitým povrchům



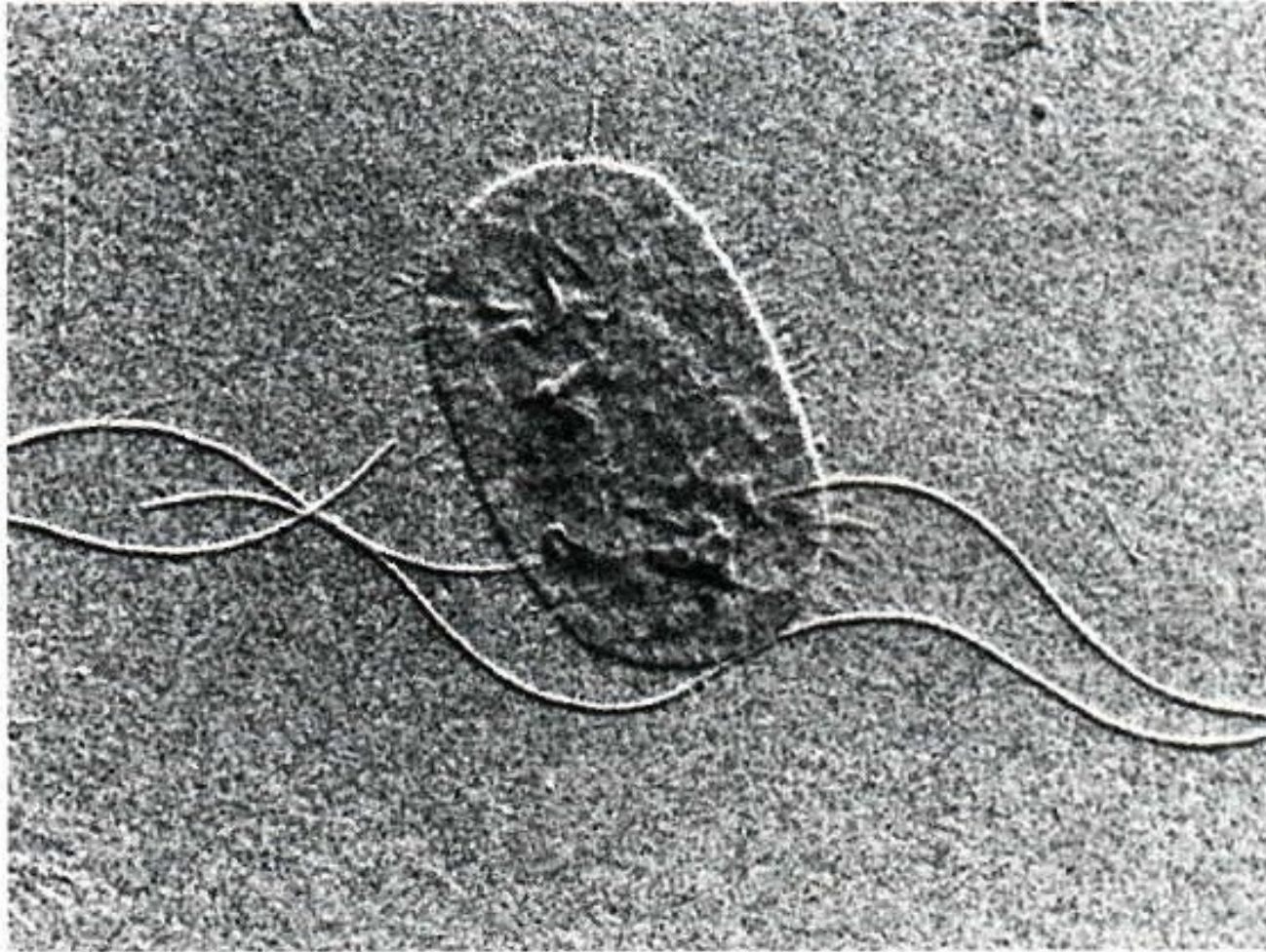


Figure 3.32 Flagella and Fimbriae. The long flagella and the numerous shorter fimbriae are very evident in this electron micrograph of *Proteus vulgaris* ($\times 39,000$).

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.

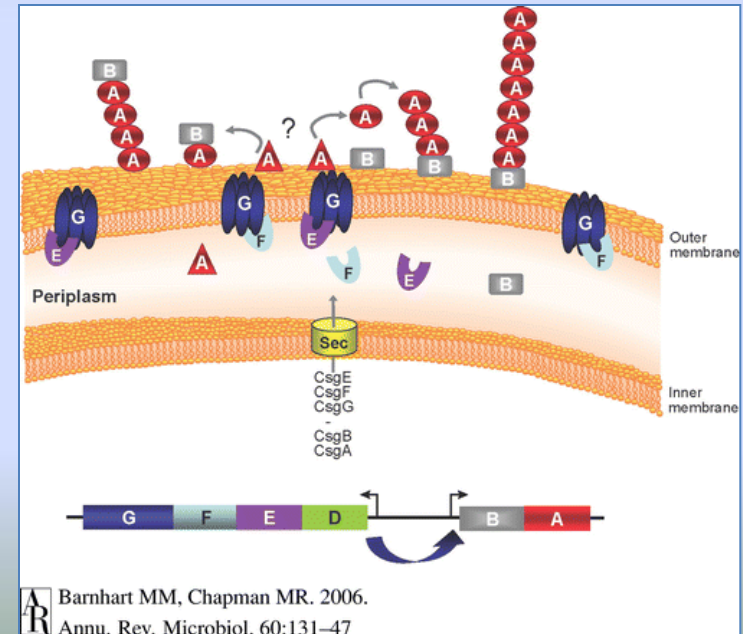
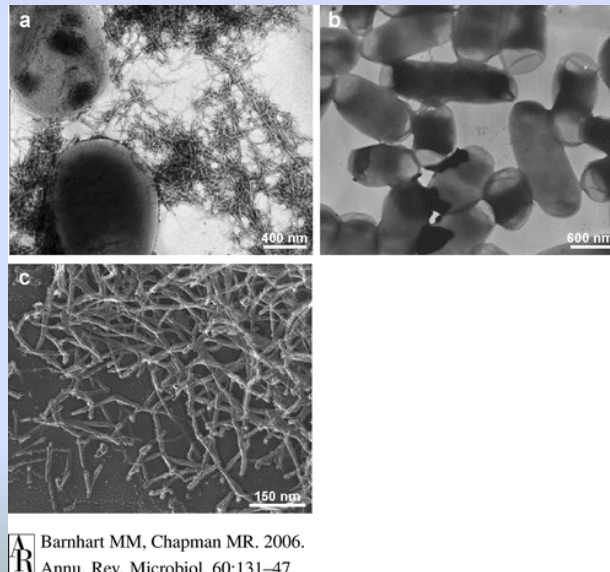
- sex fimbrie - kódované konjugativním plazmidem u donora DNA, můstek pro plazmid (F pilus u *E.coli*, konjugativní plazmidy salmonel)

barvení :

- kys.fosfowolframová
- kys. osmičelová

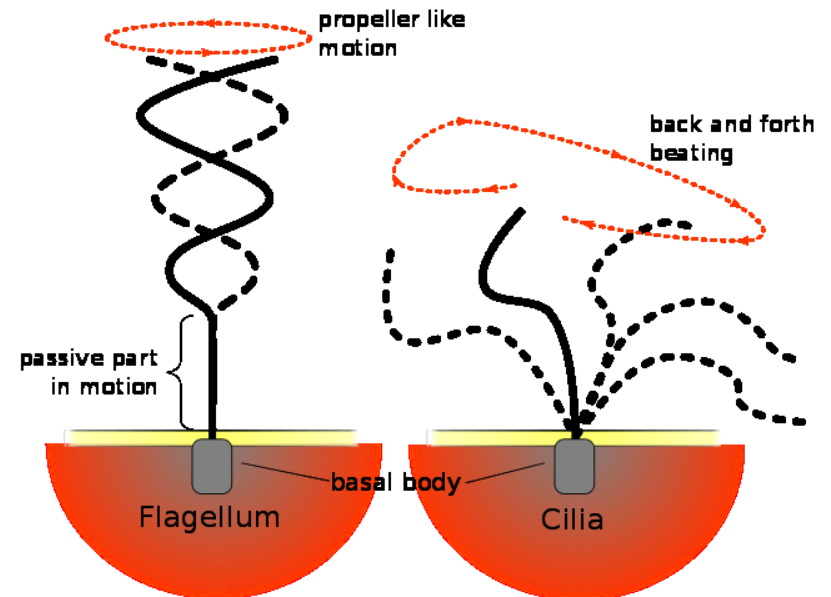
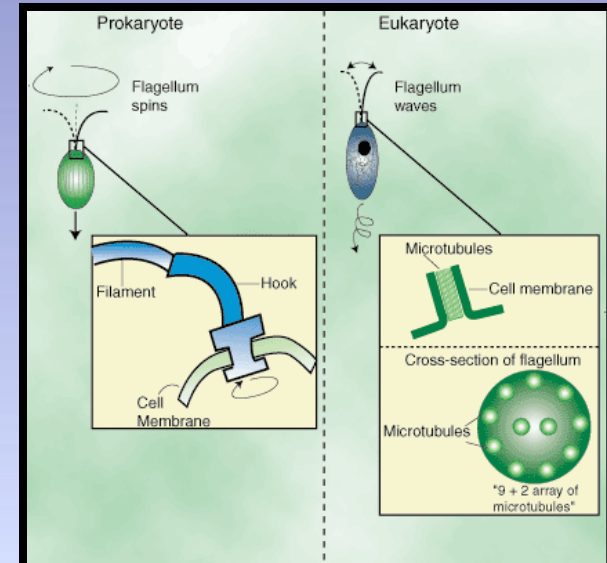
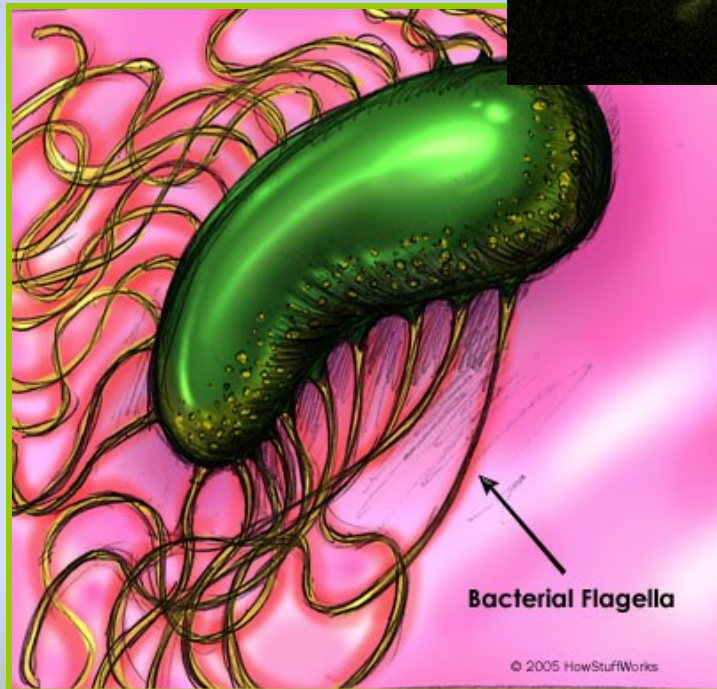
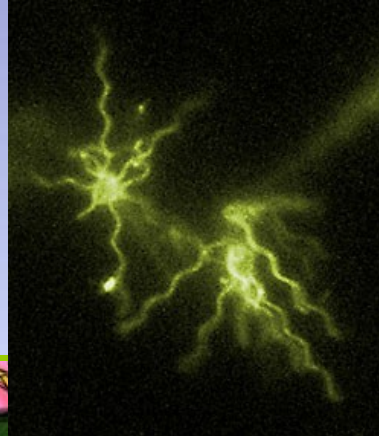
Curli

- Proteinové komponenty *Enterobacteriaceae*
- forma amyloidních vláken (strukturou);
- Objeveny 1980
- Adheze na povrchy, agregace buněk, formování biofilmu, invaze do hostitele
- Indukují zánět

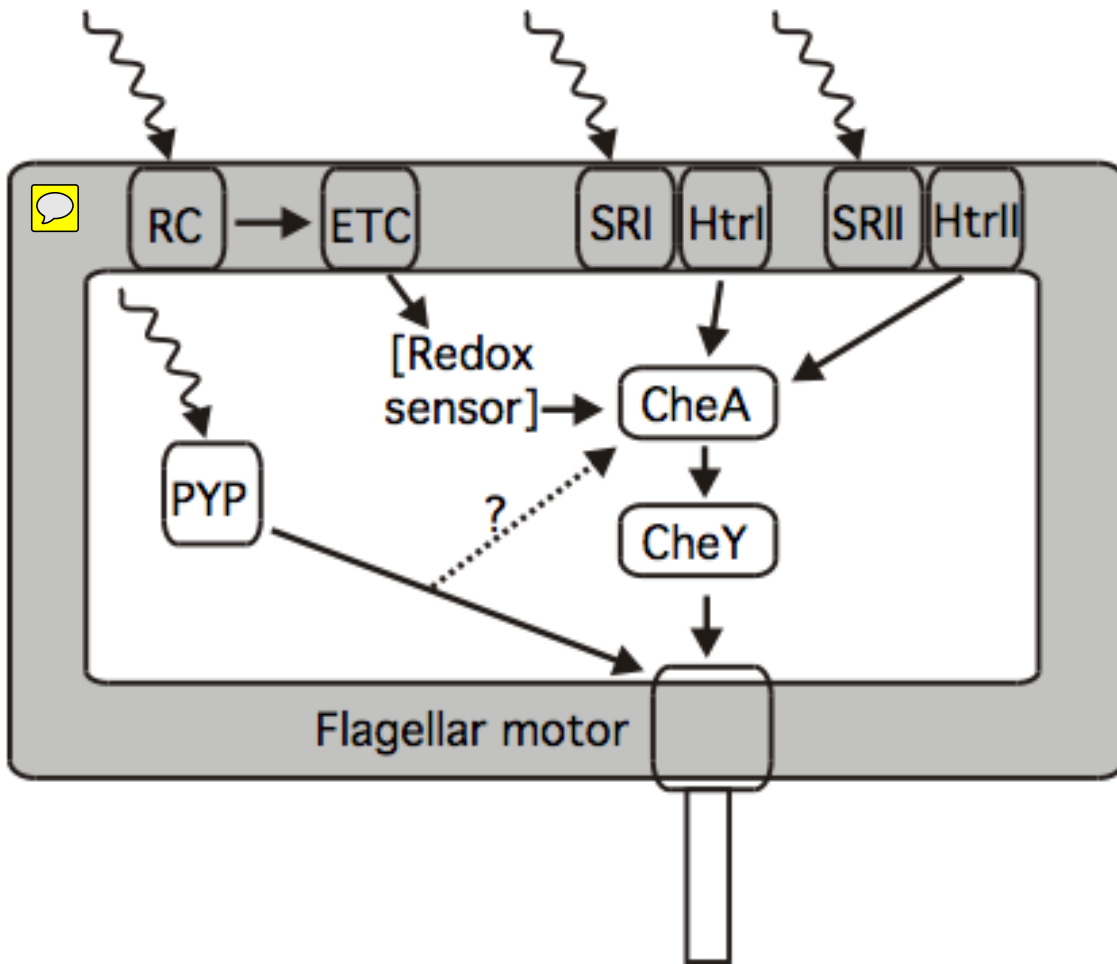


Vláknité útvary na povrchu buňky

- bičík
- fimbrie, pili
- curli



Fototaxe



RC - photosynthetic reaction center
ETC - electron transfer chain

SRI, SRII - photoreceptors

HtrI, HtrII - signal transducers

PYP - photoactive yellow protein (negativní fototaxe - *Halorhodospirum halophila*)

PHOTOMOVEMENT of BACTERIA and ARCHAEA



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

Eukaryotický cytoskelet a jeho modifikace vlivem patogenů

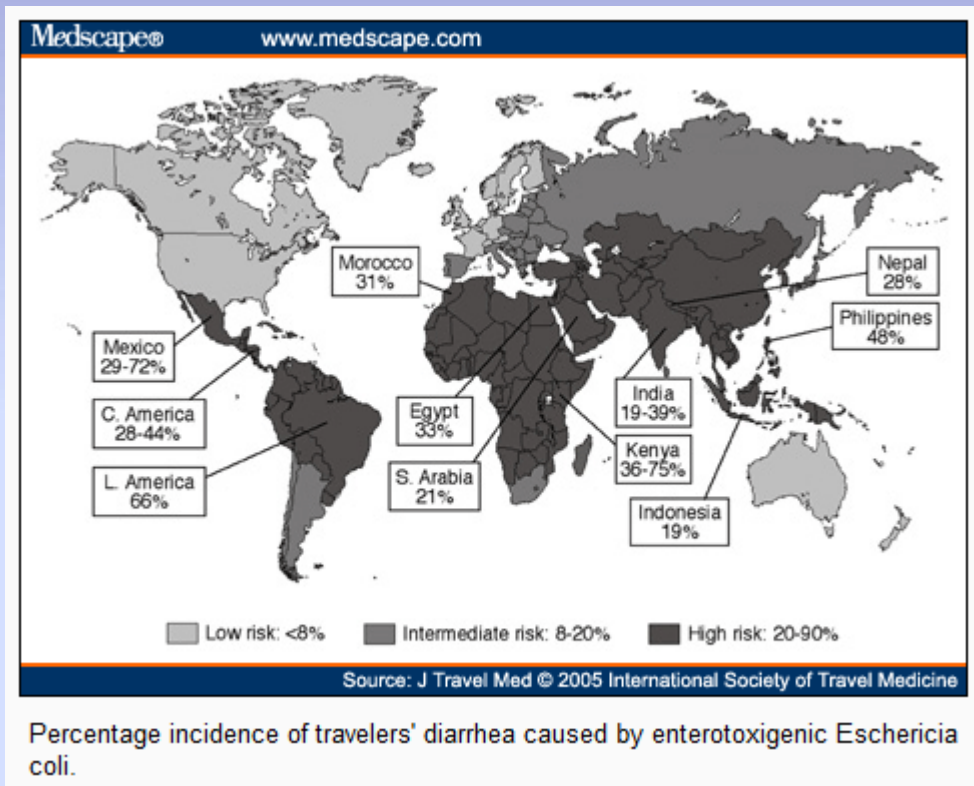
Tendence – vždy vhodná nika pro přežití

Ovlivněn viry i bakteriálními patogeny

Cytoskelet hostitele slouží k:

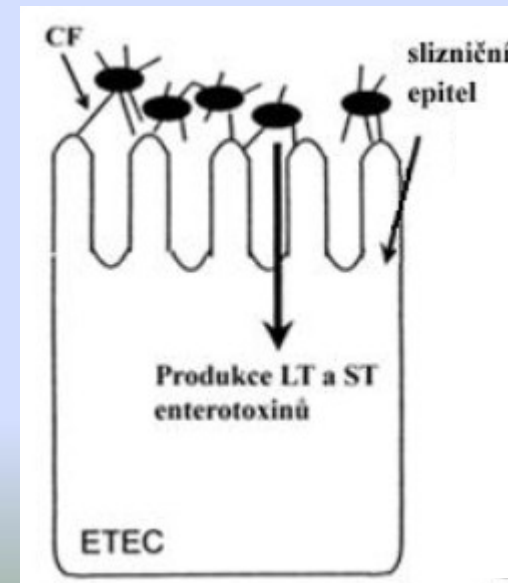
- přilnutí, vstup do buněk, pohyb uvnitř a mezi buňkami, formování vakuol a remodelace

Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

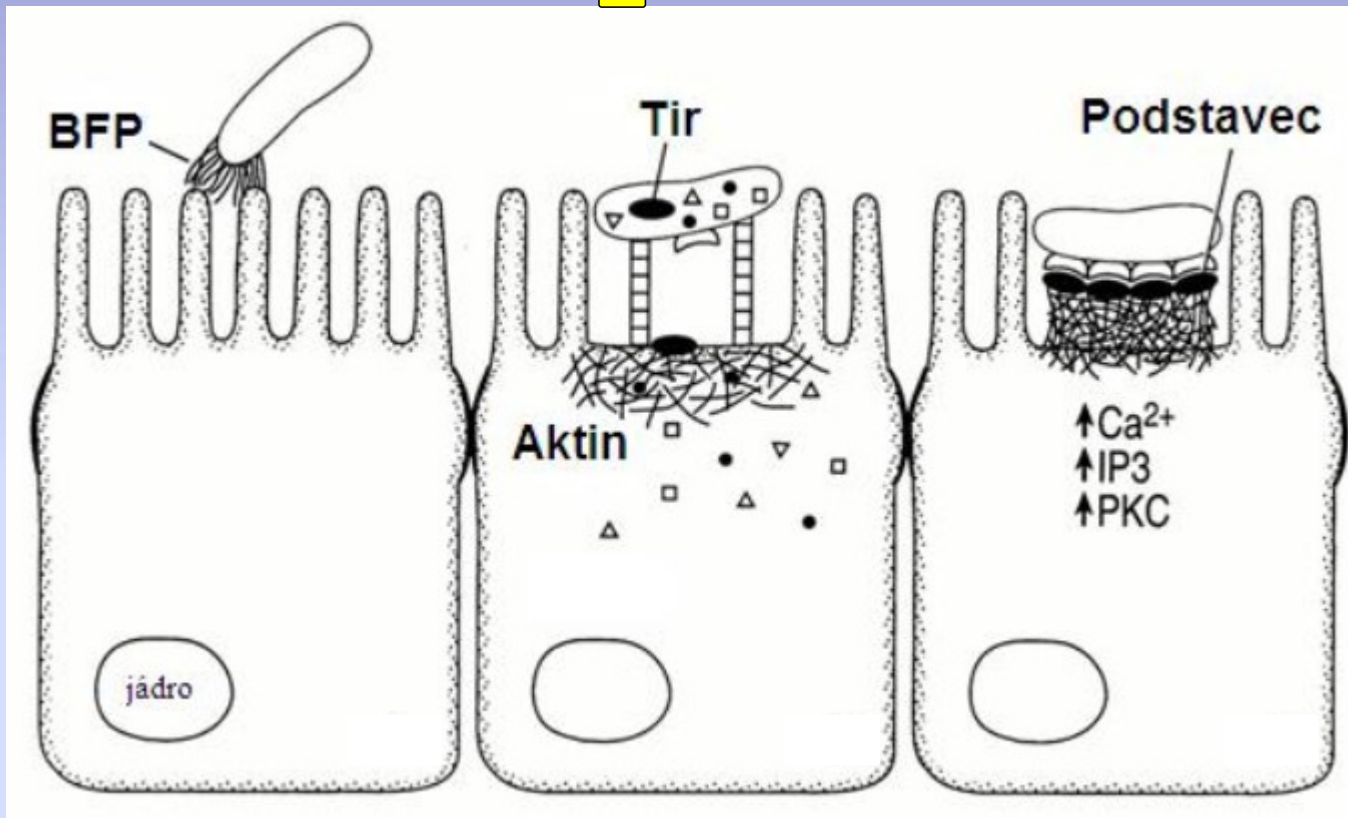


4 typy fimbriálních struktur:

- Fimbrie *sensu stricto*
- Fibrily
- Fimbrie typu 4
- curli



Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)



BFP = pilusy tvořící svazky („bundle forming pilus“); Tir = receptor intiminu („translocated intimin receptor“); IP3 = inozitoltrifosfát; PKC = proteinkináza C.

Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis

Huiwen Deborah Chen, Gad Frankel *

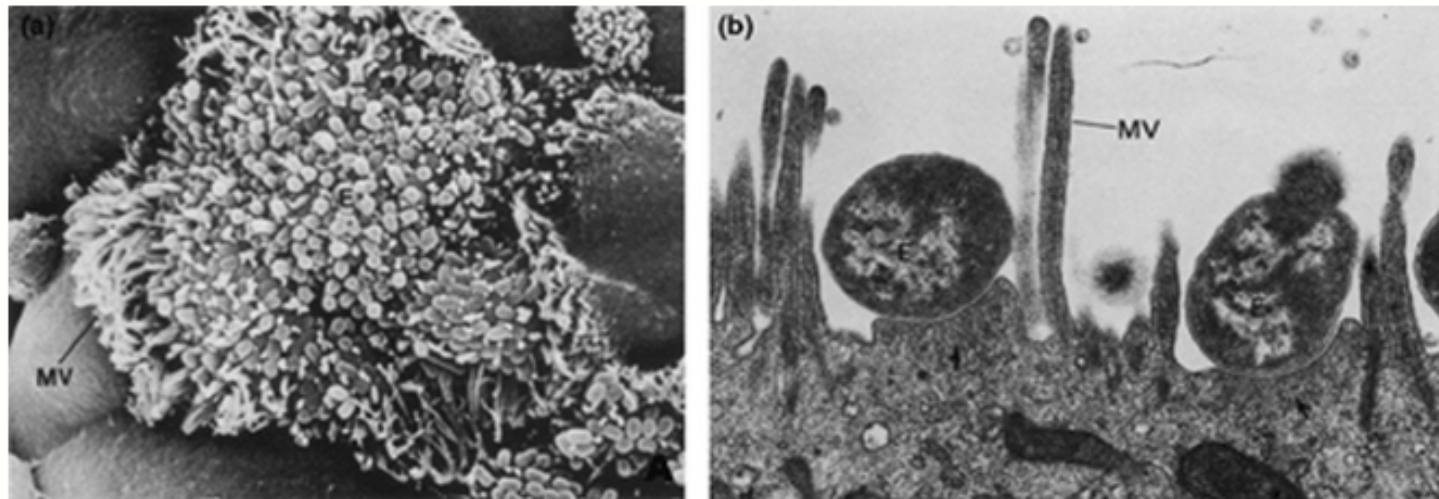
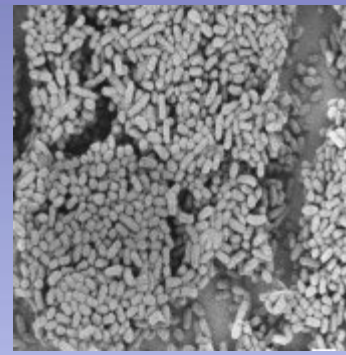


Figure 1

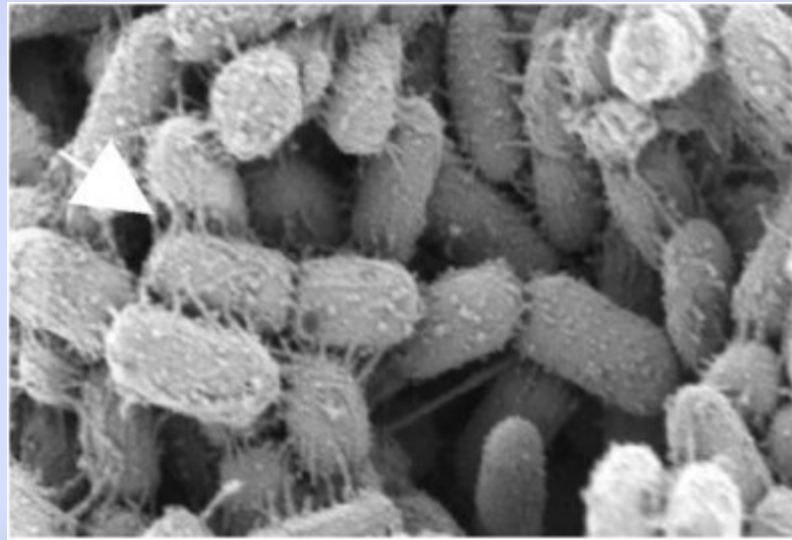
(a) Gross localised perturbation of brush border architecture. Original magnification: 5000 \times . (b) Electron micrograph of cultured human intestinal mucosa infected with EPEC, illustrating the key features of A/E histopathology. Bacteria are intimately attached to cup-like projections of the apical enterocyte membrane. At regions of attachment, localised destruction of microvilli (MV) and disruption of cytoskeleton were observed. Magnification: 45,000 \times . Reproduced from Knutton et al. (1987), with permission from ASM press.



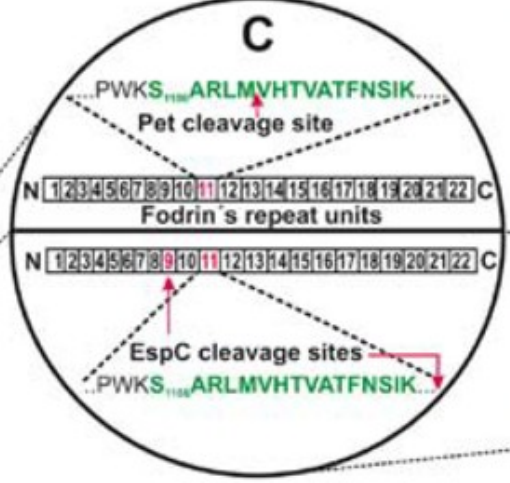
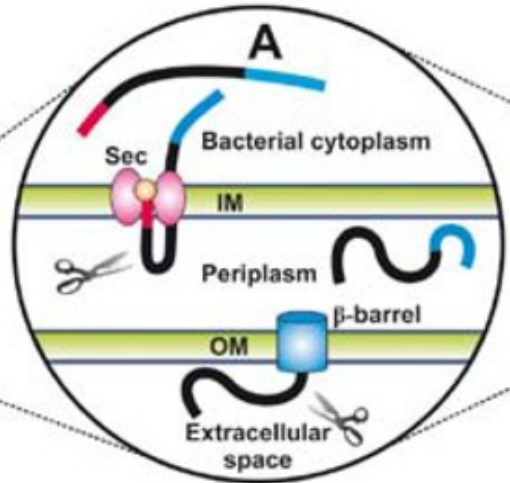
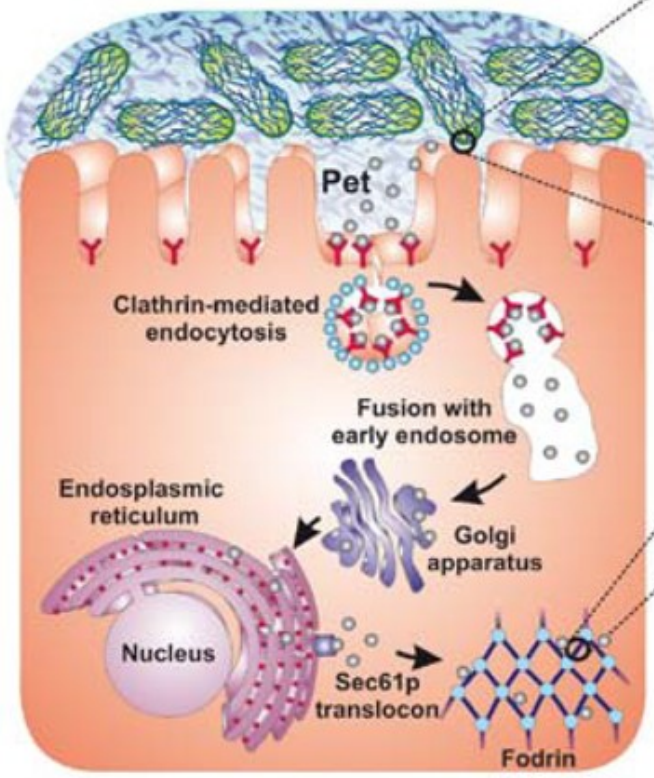
Enteroagregativní *E. coli*



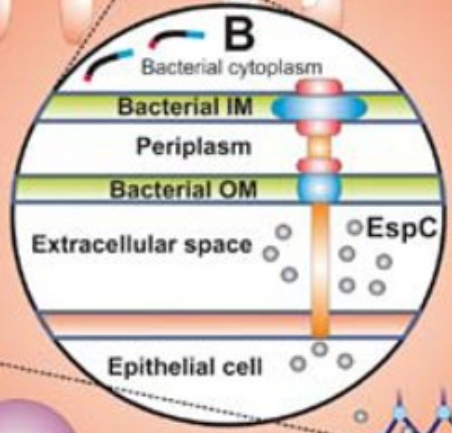
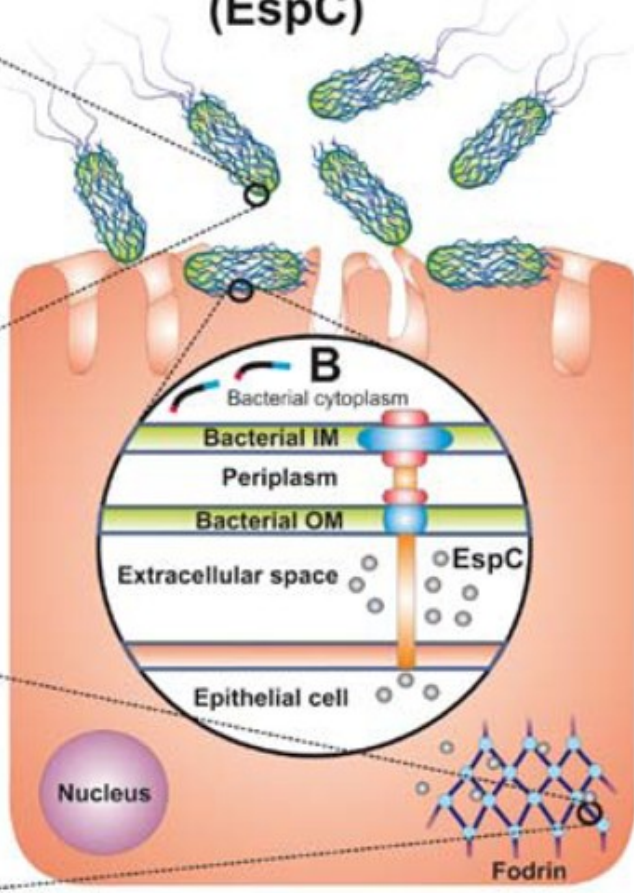
- plazmid pAA s molekulovou hmotností 60 MDa až 65 MDa, který kóduje fimbrie agregativní adherence



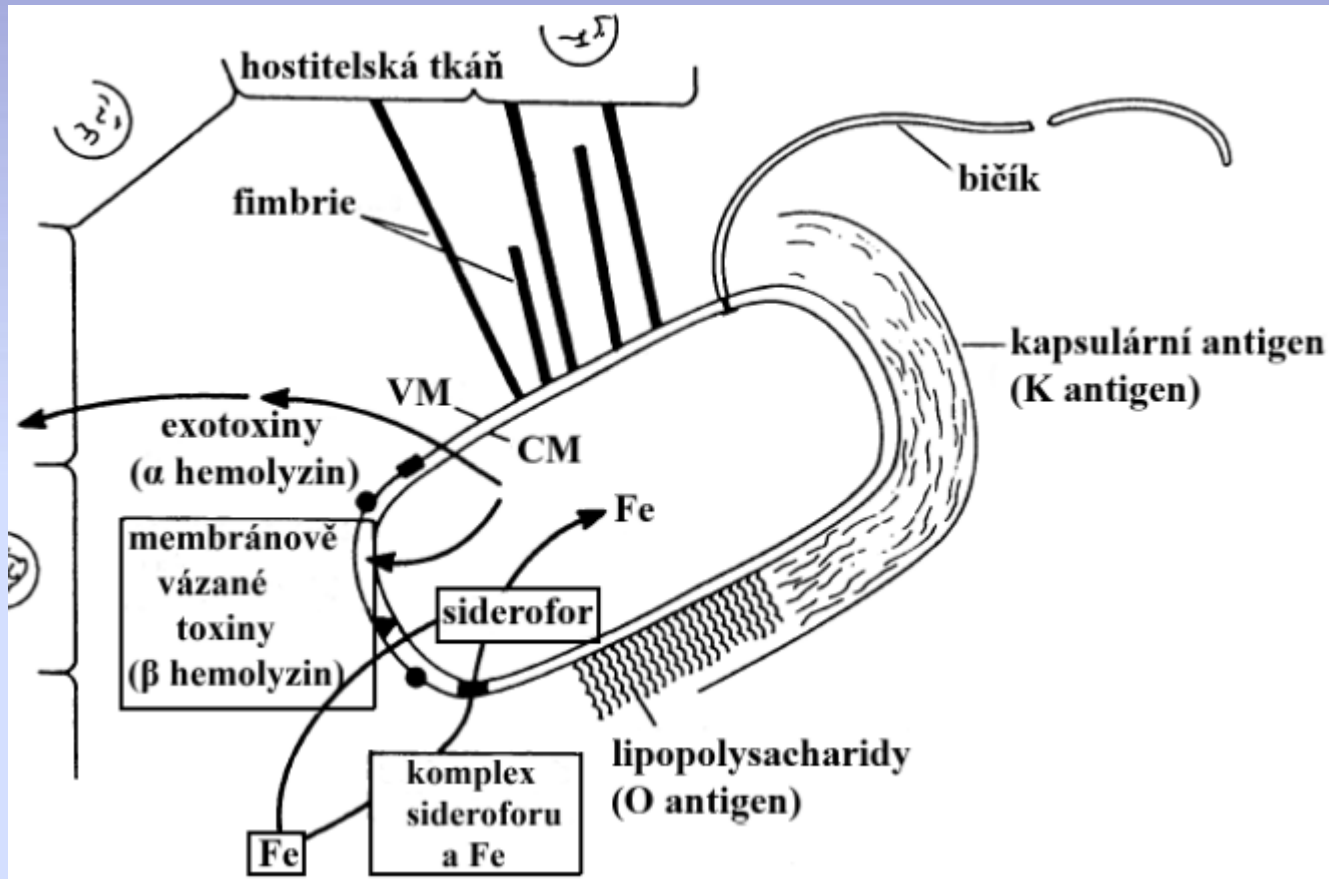
EAEC (Pet)



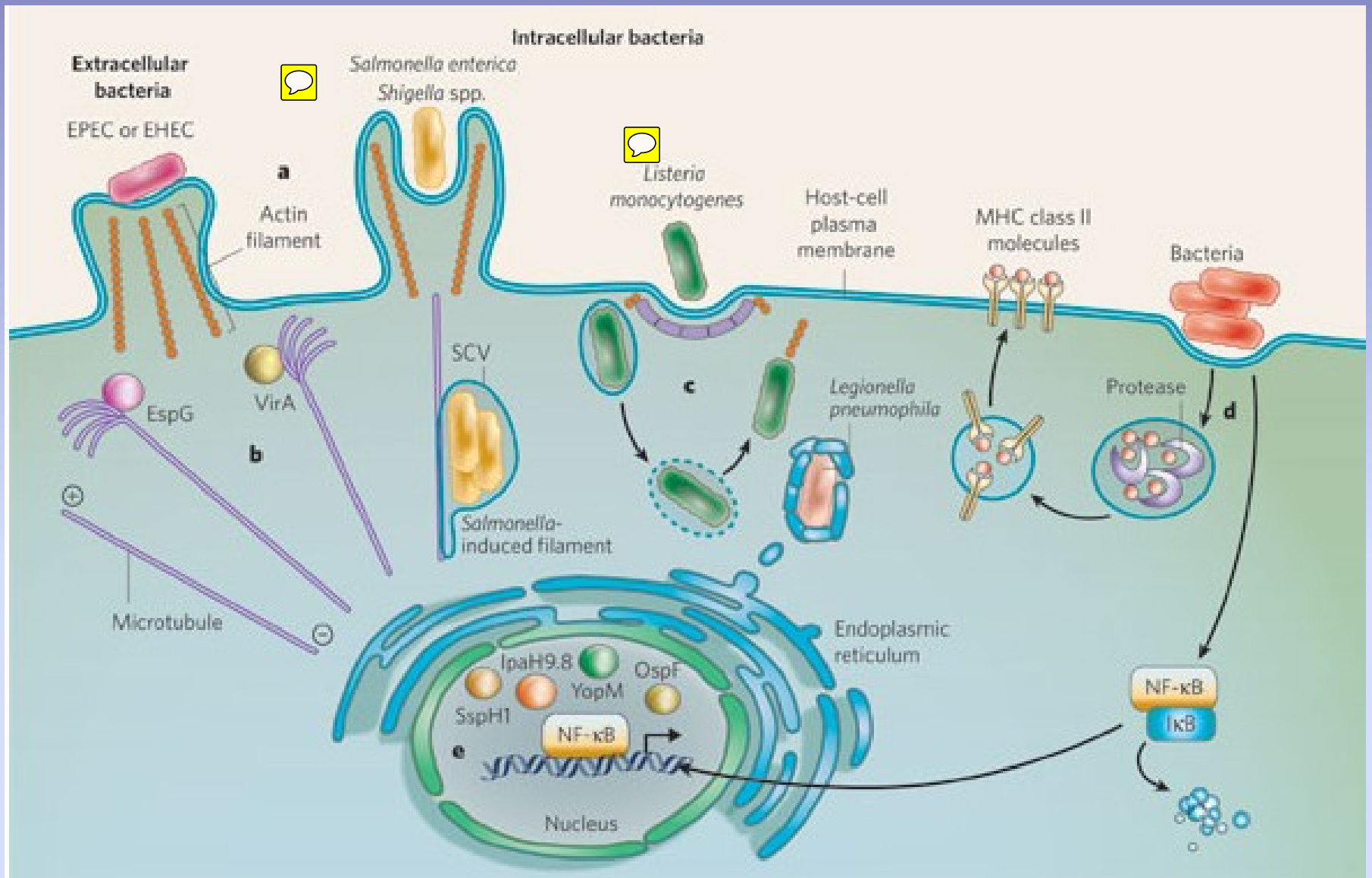
EPEC (EspC)



Extraintestinální *E. coli*



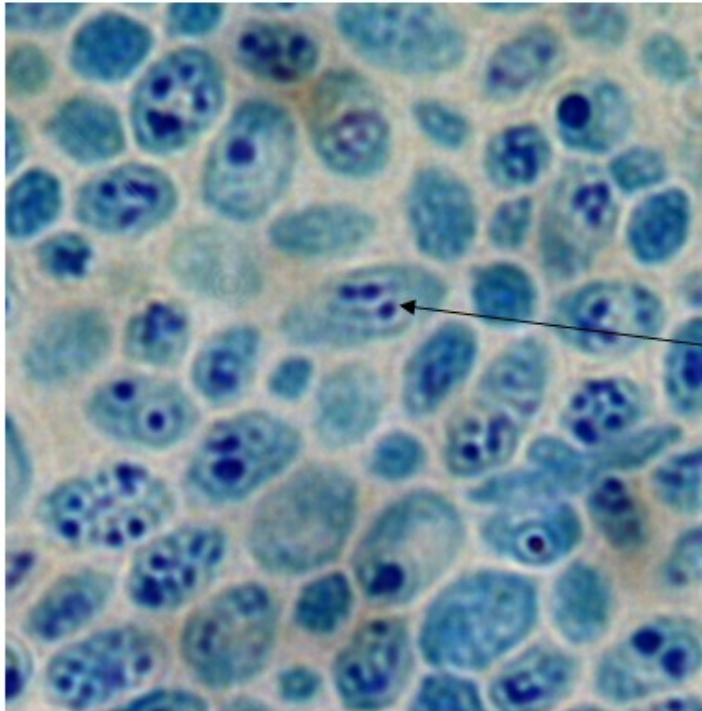
Nejvýznamnější virulenční faktory u extraintestinální *E. coli*.



Review Article Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens

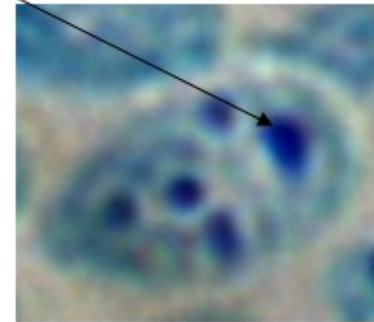
Amit P. Bhavsar¹, Julian A. Guttman^{1,2} & B. Brett Finlay¹

Volutin



Saccharomyces cerevisiae

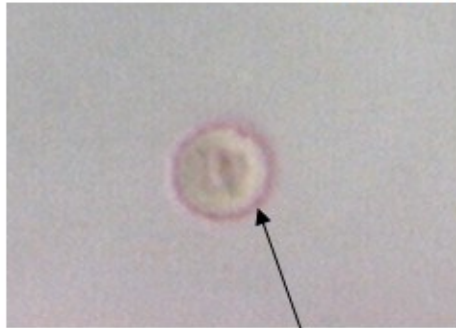
Volutin



Zvětšení 1000x

Tuk

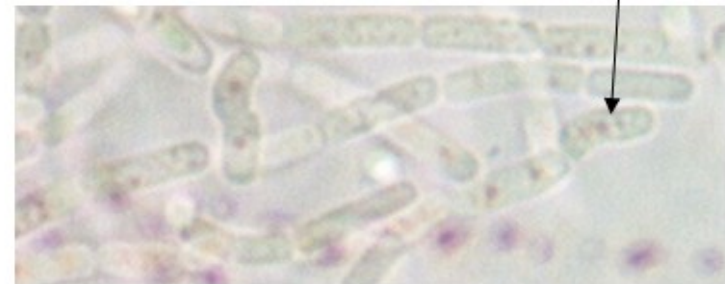
Saccharomyces cerevisiae



Tuk v membránách



Tukové kapénky



Zvětšení 1000x

Bacillus cereus CCM 2010

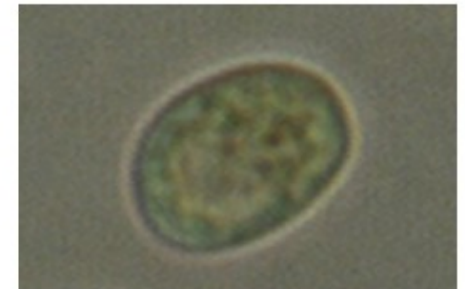
Glykogen

Bacillus cereus CCM 2010



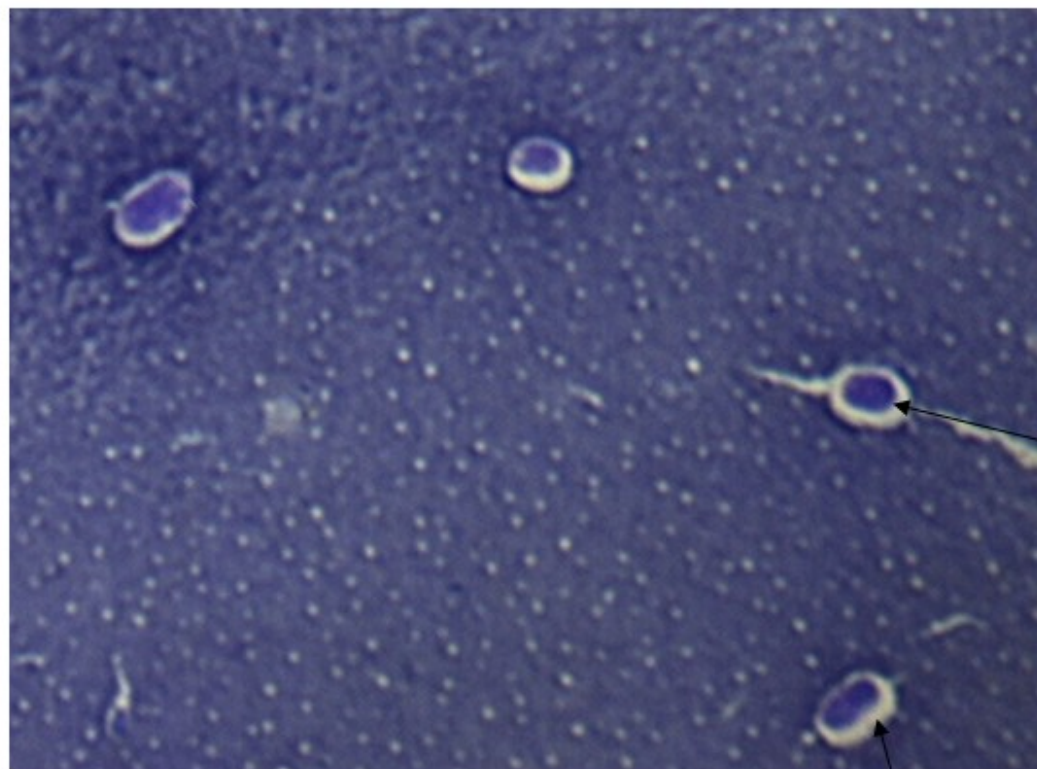
Glykogen (hnědá zrnka)

Saccharomyces cerevisiae



Zvětšení 1000x

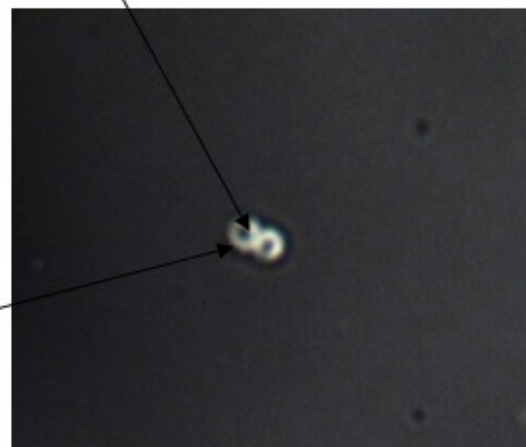
Pouzdra



Azotobacter vinelandii CCM 289

buňka

pouzdro



Zvětšení 1000x