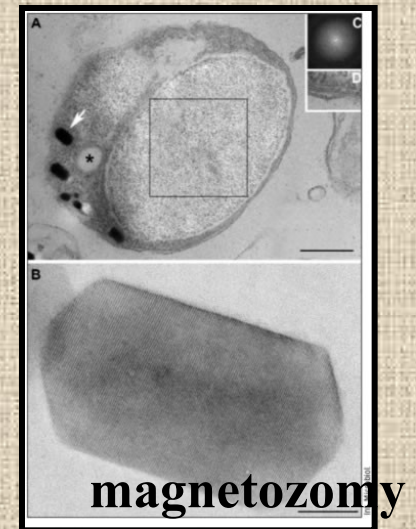
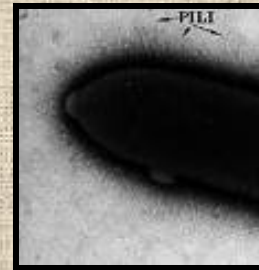


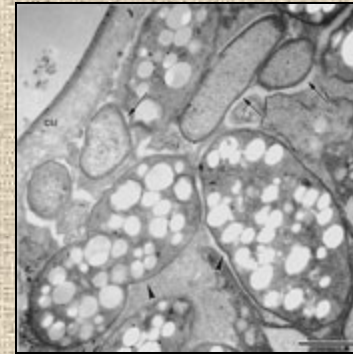
„Neesenciální struktury“

- **Inkluze**
- **Vrstvy vně buněčné stěny**
- **Struktury pohybu**
- **Fimbrie**



**Za určitých podmínek může chybět i
buněčná stěna (některá Archea, mykoplazmata,
chlamydie)**

Inkluze



- Zásobní látky
- produkty metabolismu
- uložené nepotřebné látky z vnějšku a prozatím bez funkce (kvasinky a stafylokoky hromadí vitamíny)

- Bez membrány nebo s membránou

----- **není biologická**

----- **není dvojvrstvou fosfolipidů.**

Je jednovrstevná: bílkovina+lipid

bílkovina+polysacharid



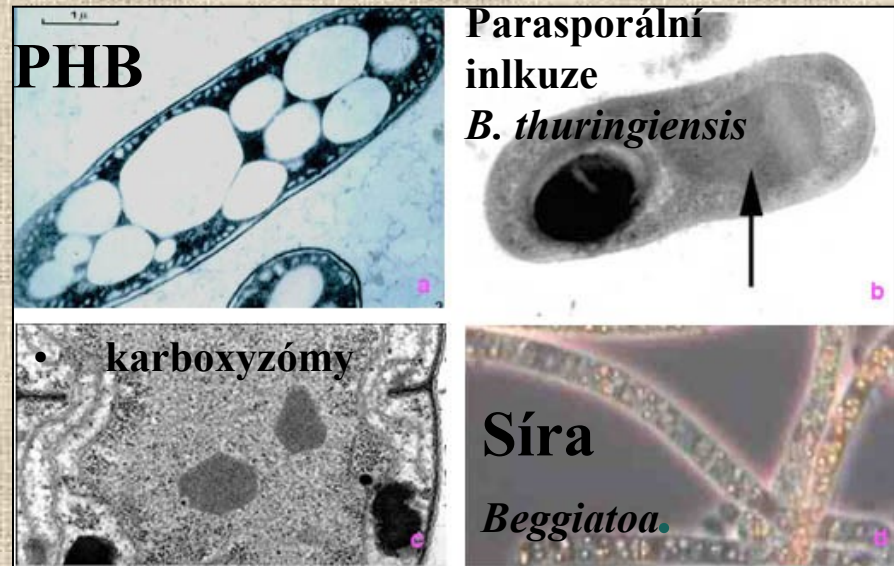
fenaziny

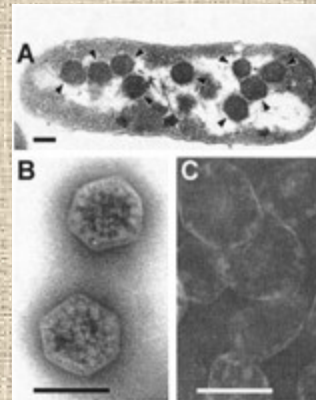
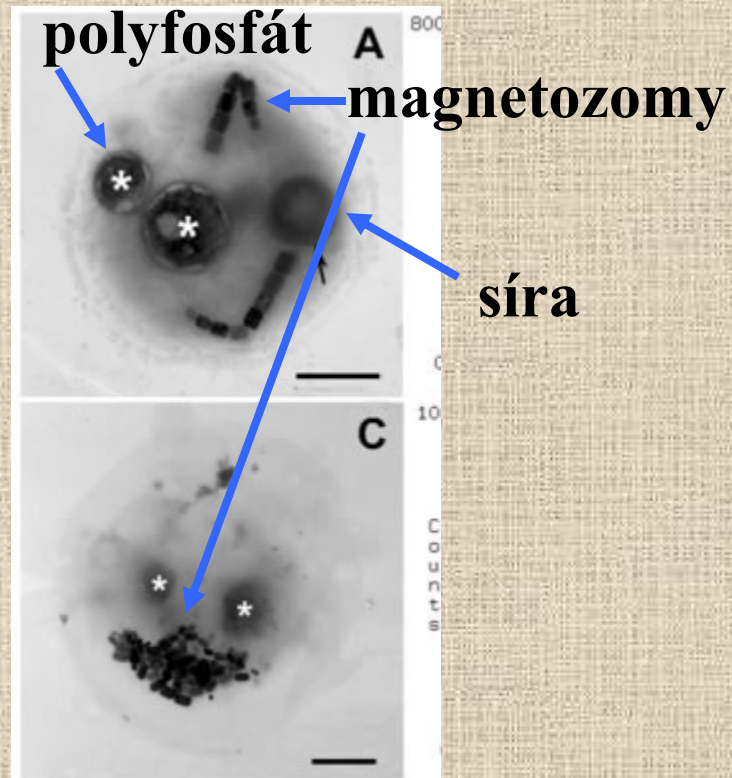
- Svým charakteristickým vzhledem uvnitř buněk **napomáhají identifikaci** – zde si všímáme barvitelnosti těchto struktur či jejich pozorování bez barvení
- V cytoplazmě v podobě granul nebo kapének **hl. starších buněk!**
- Při produkci rekombinantních proteinů poskytují inkluze možnost „zabalení“ a stabilizace těchto proteinů (ochrana před proteázami), dále možnost jejich nahromadění (jsou v jednom klubíčku - usnadnění následné purifikace a navíc jsou izolovány od rozpustných proteinů cytoplazmy)

- Rozvoj využití inkluzí (s obsahem enzymů) v suspenzi jako **katalyzátorů v průmyslu** a biotechnologiích – použití „**surových inkluzí**“ bez refoldingu proteinů, tedy v jejich nerozpustné formě.
- **Aktivita enzymů je v nich vysoká!**
- Inkluze jsou **snadno odstranitelné** po skončení reakce – centrifugací.
- Výhoda: vysoký obsah proteinů; možnost agregace i rekombinantních proteinů (enzymů) bez jejich inaktivace.

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

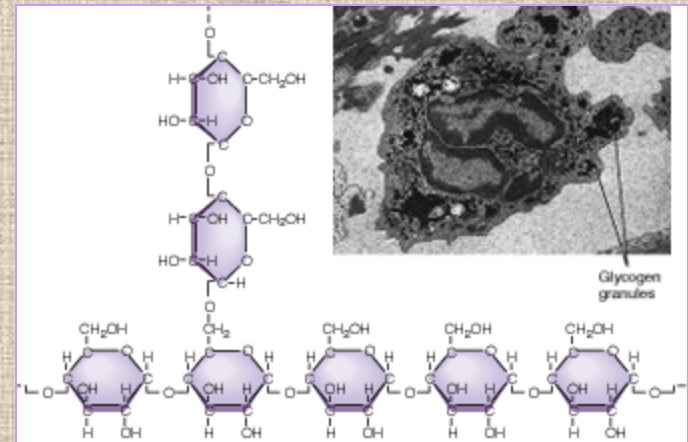
- Glykogen
- PHB
- Síra
- Plynové vakuoly
- Karboxizómy
- Chlorobiové váčky





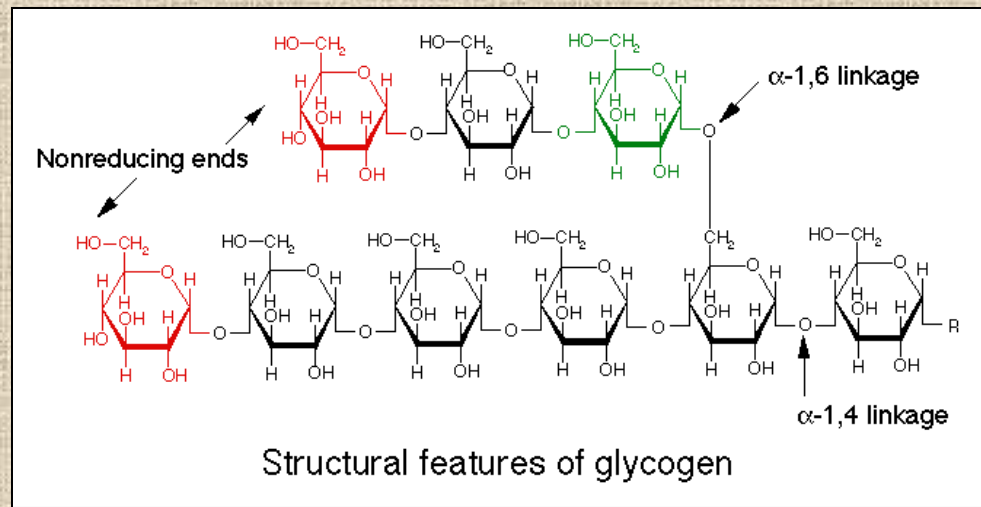
polyhedral carboxysomes
from *H. neapolitanus*,
Měřítko: 100nm

Kok z Itaipu Lagoon,
Brazílie



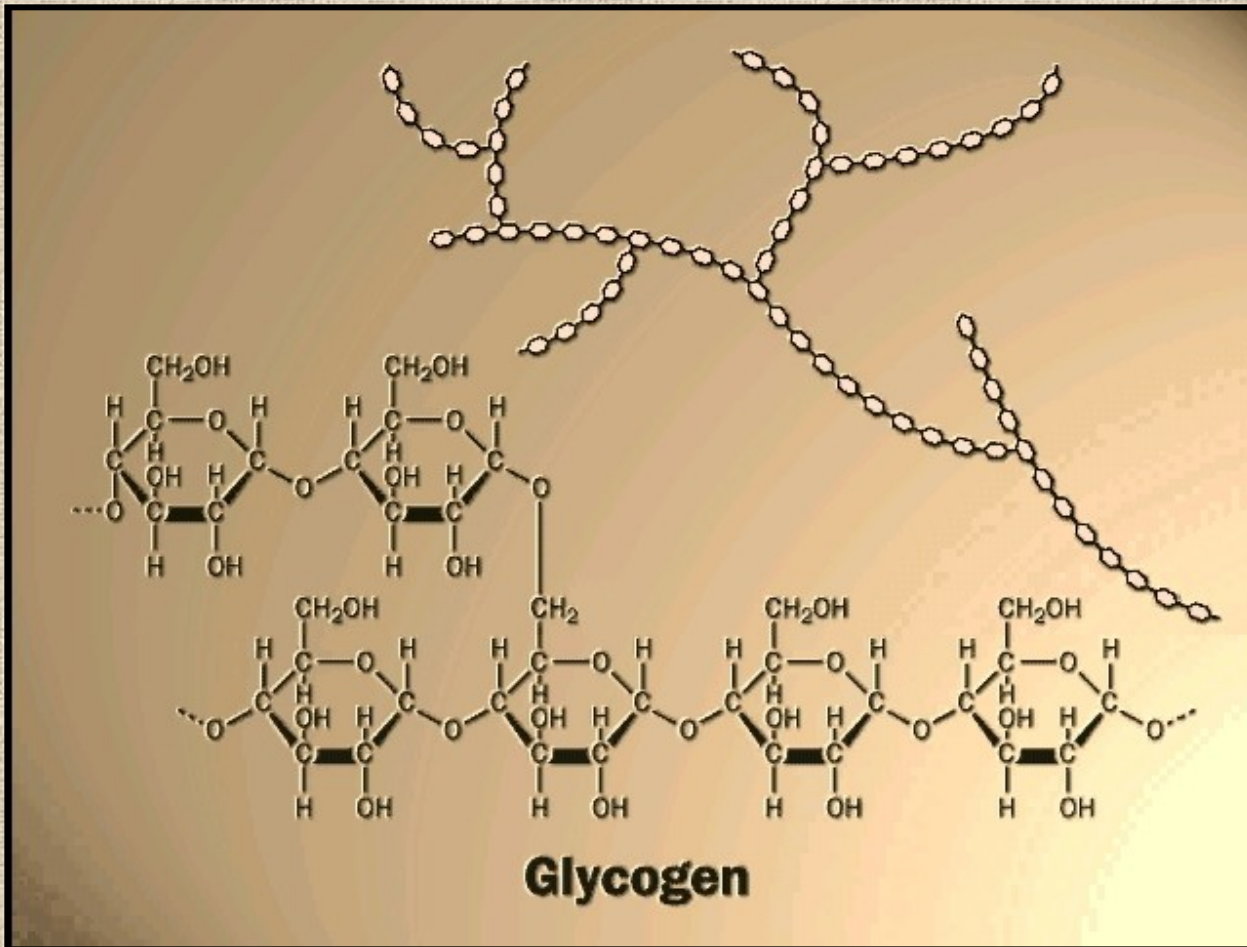
glykogen

Glykogen



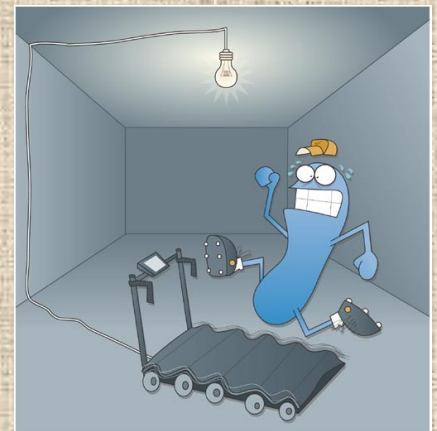
- membránový 160 – 300 nm, až 50% sušiny
- počet 1-10
- rozpustný polymer glukózy
- α -1,4 **vazby** a α -1,6 **větvení** na každém 8-10tém monomeru
- Může a nemusí mít membránu
- Ve světelném mikroskopu není viditelný:

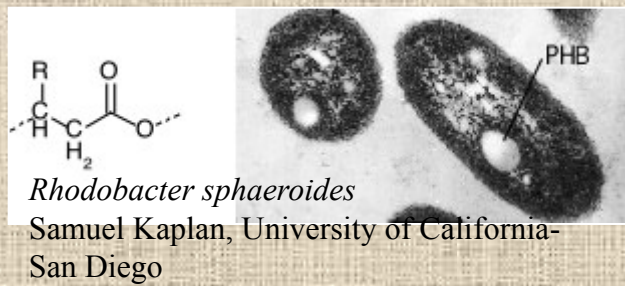
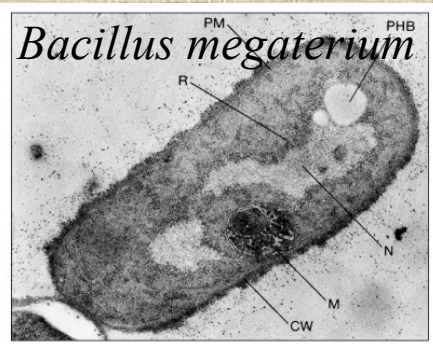
Barvení Lugolovým roztokem



Bakteriální glykogen je silně větvený.
Slouží jako pohotová rezerva.

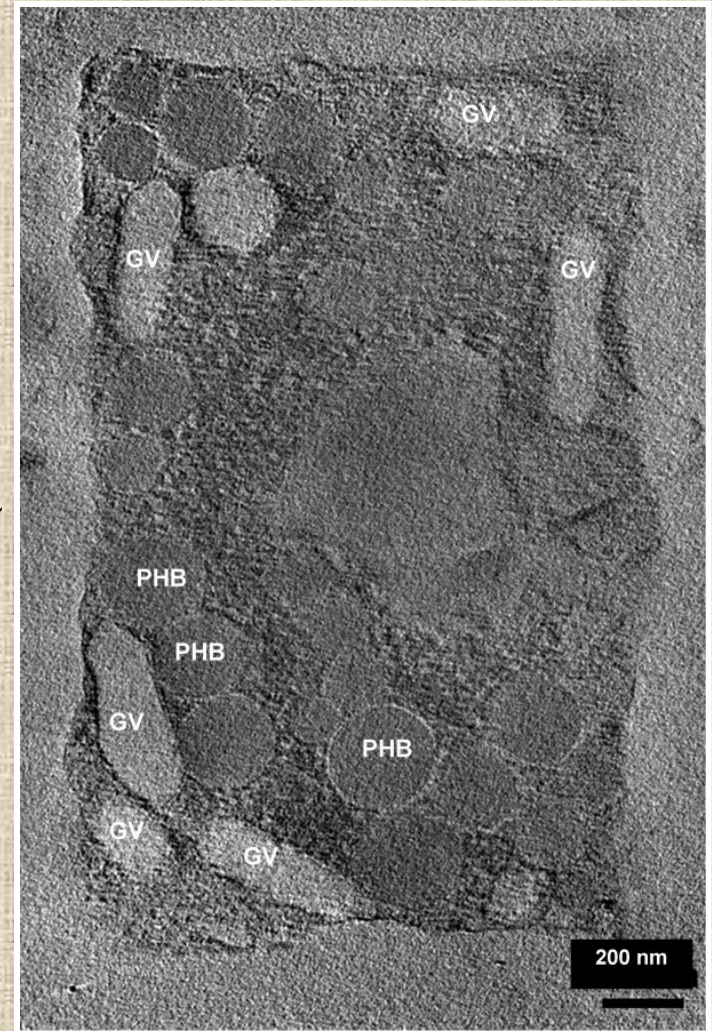
**Nachází se
především v
buňkách bacilů
a enterobakterií!**

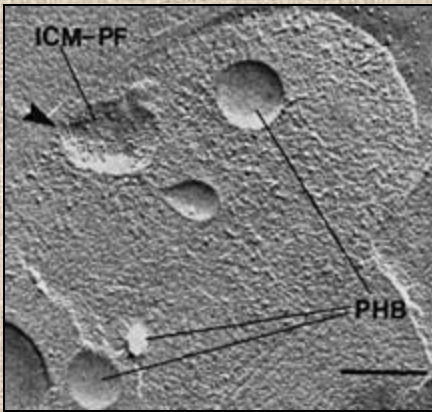




PHB

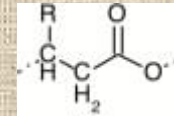
- kyselina polyhydroxymáselná
- až 60% sušiny
- viditelná ve světelném mikroskopu
- Je to odpadní produkt metabolismu uhlíkatých látek
- Vyskytuje se u aerobů: *Bacillus*, *Pseudomonas*



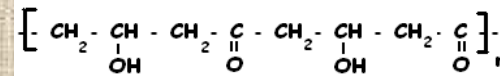


Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB)
in a *Rhodospirillum* species.

PHB is one type of PHA. →



**Je neutrální – COOH skupiny
jsou vzájemně estericky vázané!**



PHB a glykogen

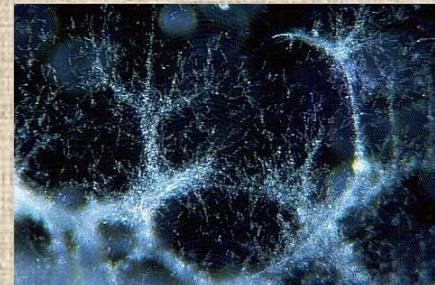
jsou

osmoticky a iontově **neaktivní,**

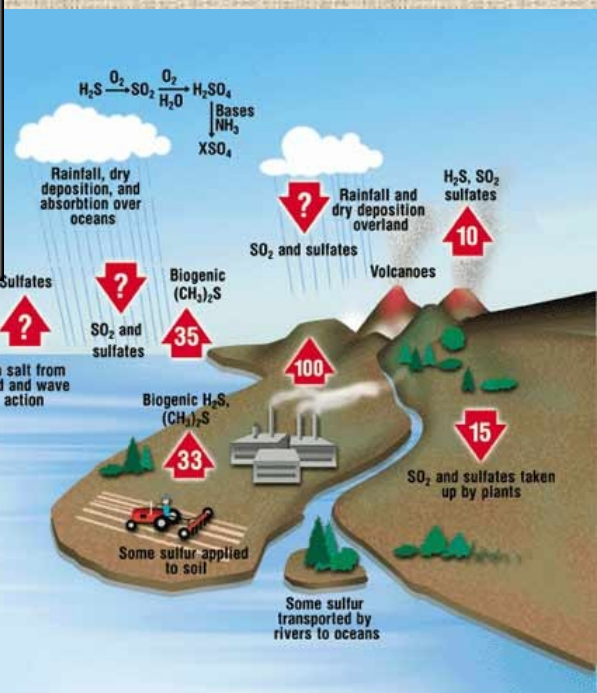
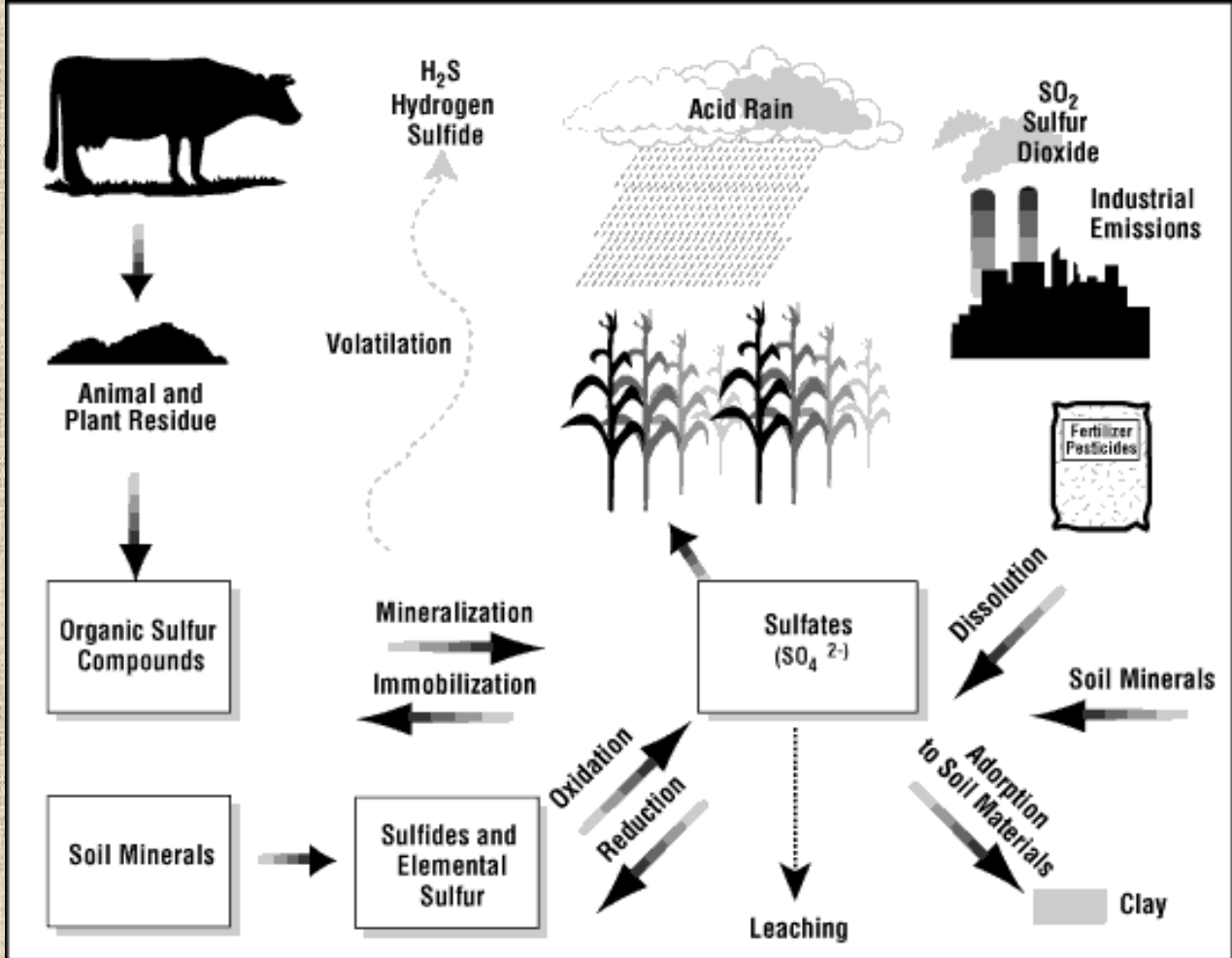
vyskytují se v buňce při **nadbytku** zdrojů
uhlíku a **nedostatku** zdrojů dusíku.

Síra

- viditelné kapénky **amorfní síry** se vyskytují ve skupině chemolitotrofních sírných bakterií schopných oxidace redukovaných sírných sloučenin (sirovodíku, thiosulfátu), je tedy pro ně **zdrojem energie**.



- Dále se vyskytuje u fototrofních siřných bakterií – zelených a purpurových. Pro ně již **není zdrojem energie** (tyto přijímají energii transformací slunečního záření), ale **zdrojem elektronů v procesu fotosyntézy**. Oxidace siřovodíku primárně poskytuje elementární síru. Když je siřovodík vyčerpán, síra je následně oxidována na sulfát.





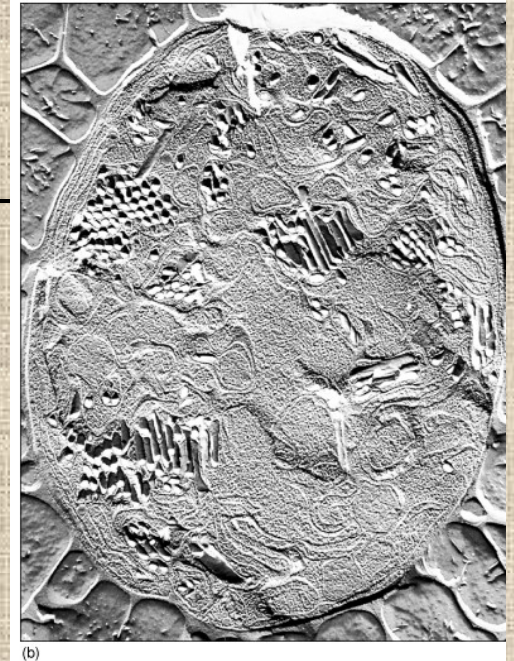
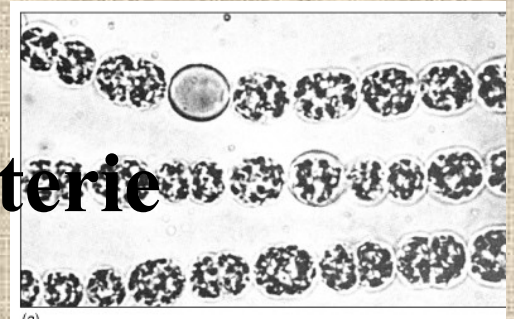
Plynové vakuoly



cylindrické aerosomy (45 – 200 nm)
nadlehčující **sinice a planktonní bakterie**

(cca u 50ti rodů bakterií; purpurové a zelené sírné a halofilní *Archea*)

plyny vznikajícími při metabolismu –
podle jeho intenzity buňka množství
plynu reguluje, čímž reguluje i svůj
vertikální pohyb.



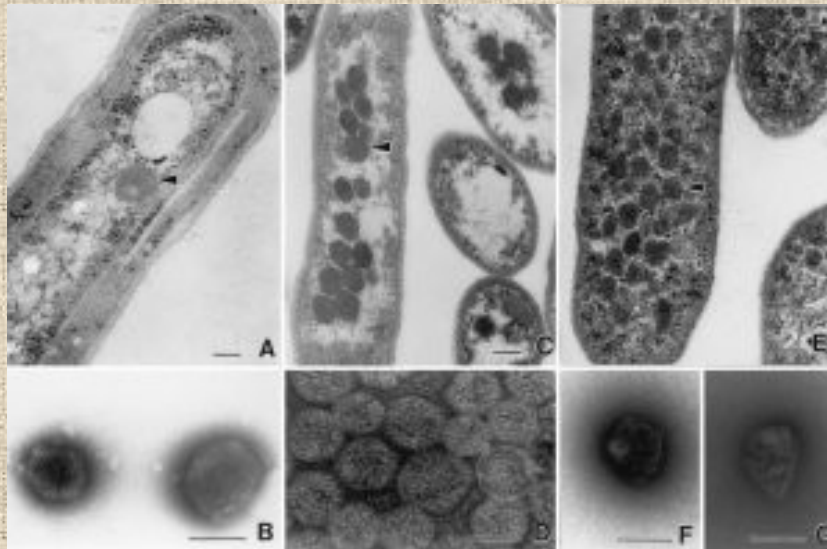
- U archeí například **napomáhají pohybu** ve vodě s extrémní salinitou.
- Množství plynu závisí na **teplotě a viskozitě**.
- Membrána je z **jedné vrstvy bílkovin**, nepropustná pro vodu. Tato rigidní struktura však může při kritickém tlaku prasknout.
- Šířka vakuolky je **geneticky determinovaná** (v r.1994 známo 14 genů)



Plynové vakuoly
Clark, Walsby 1979

Karboxizómy

- protáhlé polyhedrické cisterny
- usnadňující fixaci CO_2 , enzymy Calvinova cyklu
- syntéza hexóz u autotrofů, chemolitotrofů a fotolitotrofů.
- za vhodných podmínek je vyšší počet (1-10)
- nedělí se



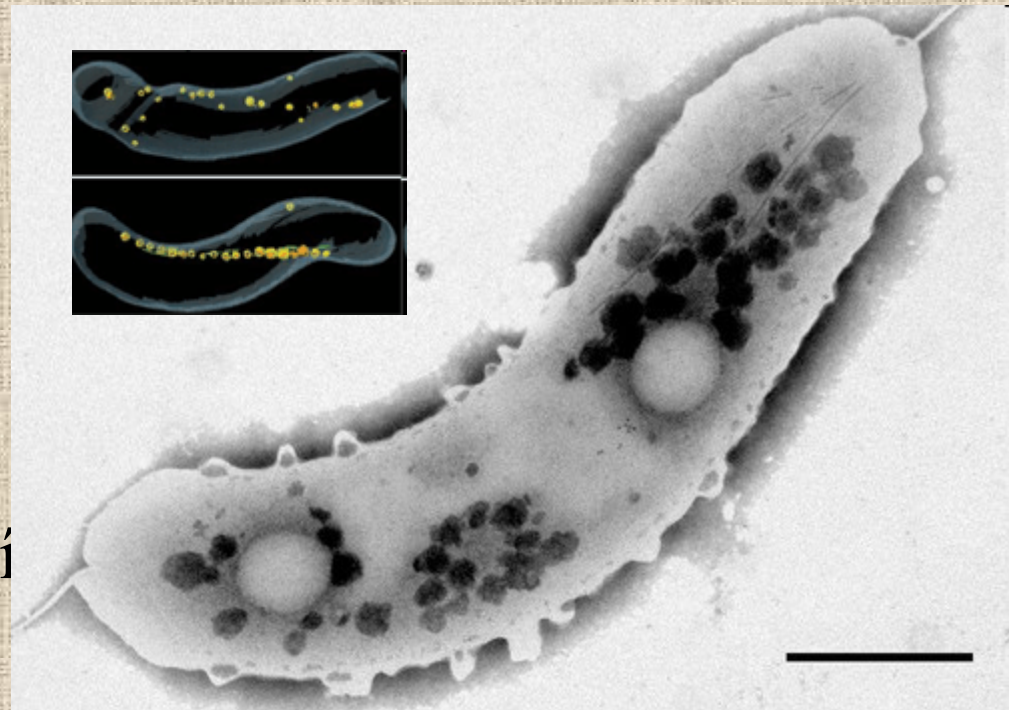
A) *Synechococcus* carboxysome
B) The same but negatively stained
C) *H. neapolitanus* carboxysome
D) Negative stain of *H. neapolitanus* carboxysome, you can even see RuBisCO assemblies inside

Chlorobiové váčky

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

Magnetosomy

- krystaly **oxidu železnato – železitého (Fe_3O_4)** vytvářející permanentní magnetický dipól a dovolující **orientaci v magnetickém poli** = magnetotaxe.
- většina bakterií s magnetosomy jsou **vodní organismy citlivé ke kyslíku**; tyto částice jim napomáhají klesání v gradientu O_2 ve vodním sloupci.
- obaleny **speciální membránou** umožňující precipitaci Fe_3O_4

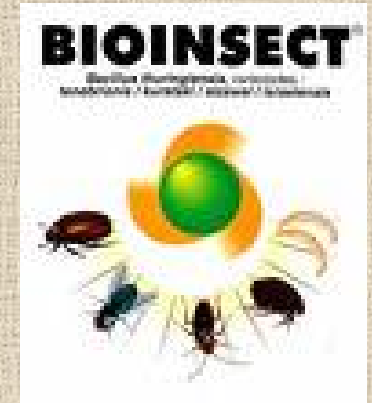


b) bez membrány

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

Krystaly – produkty metabolismu (oxalacetát)

Parasporální inkluze = bílkovina vznikající při sporulaci. Je to zbytkový materiál nespotřebovaný při vzniku spor.



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

Polyfosfátová granula

= **volutin** - při nadbytku ATP (možnost uložení velkého množství P při nadbytku energie).

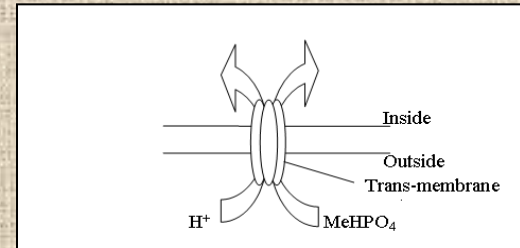
- Akumulace se děje z toho důvodu, že v prostředí je častý nedostatek fosfátu (limitující živina).
- Je dobře viditelný pod mikroskopem.
- Až 500 molekul, nerozpustný ve vodě.
- **Nikdy není zdrojem energie, jen fosforu.**
- Počet: 1 – mnoho, podle metabolismu.
- Vysoký počet je v době před přechodem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

- Transport fosfátu do buňky se děje hlavně těmito dvěma mechanismy:

a) nespecifický transport

s nízkou afinitou

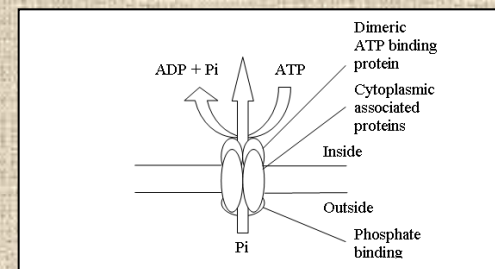
(konstitutivně exprimovaný transportér)



b) specifický přenašeč s vysokou afinitou pro fosfát:
prim. transport H_2PO_4^- a HPO_4^{2-} .

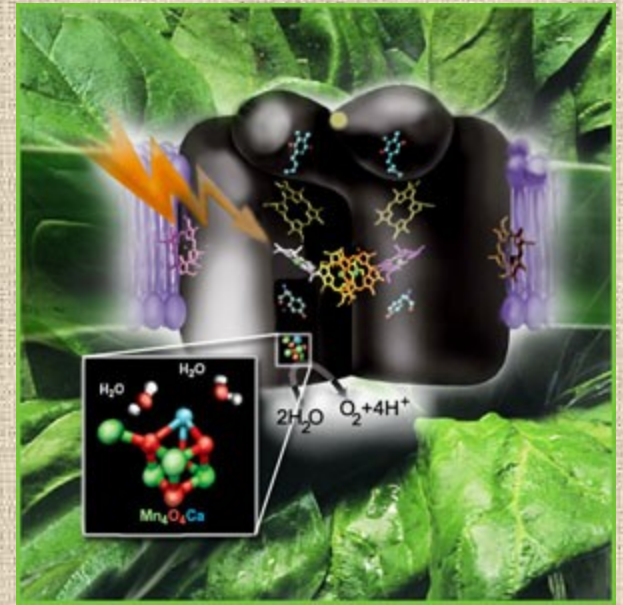
Komplex polyP vzniká za silné energetické dotace při nadbytku ATP (možnost uložení přebytku energie ve formě P).

Vazba vyžaduje ATP





Pigmenty



- Produkty primárního i sekundár. metabolismu. Produkovány v závislosti na stanovišti.
- Využívají se při metabolismu nebo mají protektivní účinek či jiný ekologický význam (inhibiční účinky). Pokud jsou produktem primárního metabolismu – jsou bezpodmínečné potřeby (bakteriochlorofyl, karotenoidy).

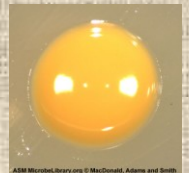
- Protektivní účinek – absorbuje světlo o určité vlnové délce, jsou syntetizovány až v rámci **sekundárního metabolismu**.

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

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

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

- Buňka může produkovat endo- (protektivní) i exopigmenty různých barev.
- Řada pigmentů vzniká nadprodukcí látek.
Př: kolonie Azotobacteria na manitolové půdě po týdnu zčernají (zprostředka) – na základě nadprodukce tryptofanu
- Lokalizace (podle své úlohy): v cytoplazmě, v CM u fototrofů, v periplazmatickém prostoru, (v buněčné stěně u kvasinek), jako exopigmenty – ekologický význam (inhibiční agens, ATB).

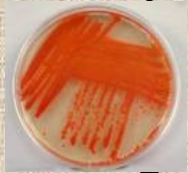


Nejčastěji: karotenoidy – endopigmenty u většiny buněk

- Bakteriochlorofyly a,b,c,d – anaerobní prostředí
- Prodigiozin – extracelulární, **mikrobicidní** účinek – bakterie a plísně
- Fenaziny – extracelulární, sek. metab., mikrobicidní účinek – bakterie a plísně (*Erwinia*)
- Melaniny – hnědé, černé, tmavě červené.

V závislosti na době kultivace.

- Anthokyany – sek.metab., barva **závisí na pH**, u 5 druhů bakterií
- Př: *Micrococcus flavocianus* – žlutý endopigment a fialový exopigment. Na MPA jen žlutý endop. Na glukozókvasničním agaru – oba pigmenty.



Struktury vně buňky

- **Kapsuly – mikro a makro**

- dobře organizované, rigidní, AMK nebo cukry

Bacillus – kyselina glutamová

Bacillus anthracis – poly-D-glutamová

- **Slizy** - polysacharidy

- lépe odstranitelné, difúzní, neorganizované

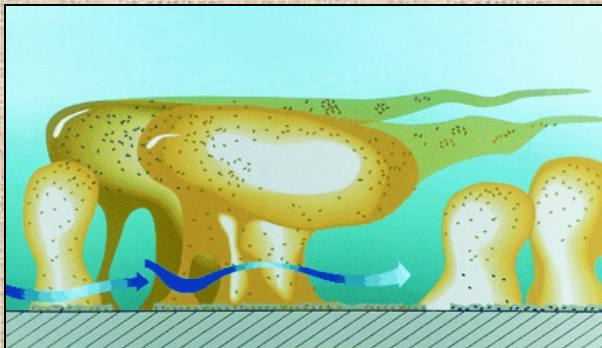
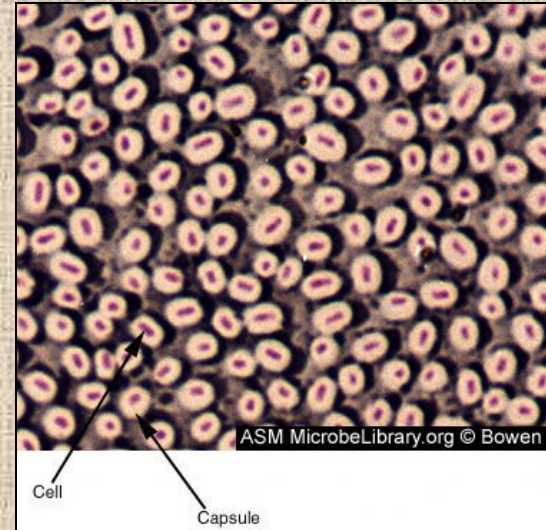
- **S – vrstvy**

- pravidelně organizované proteiny a GP

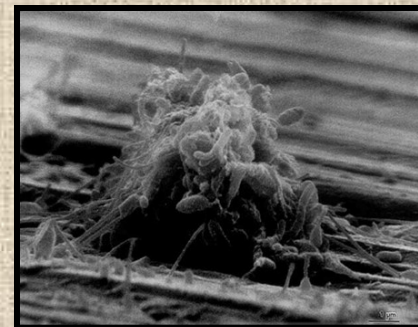
Glykokalyx = kapsuly a slizy

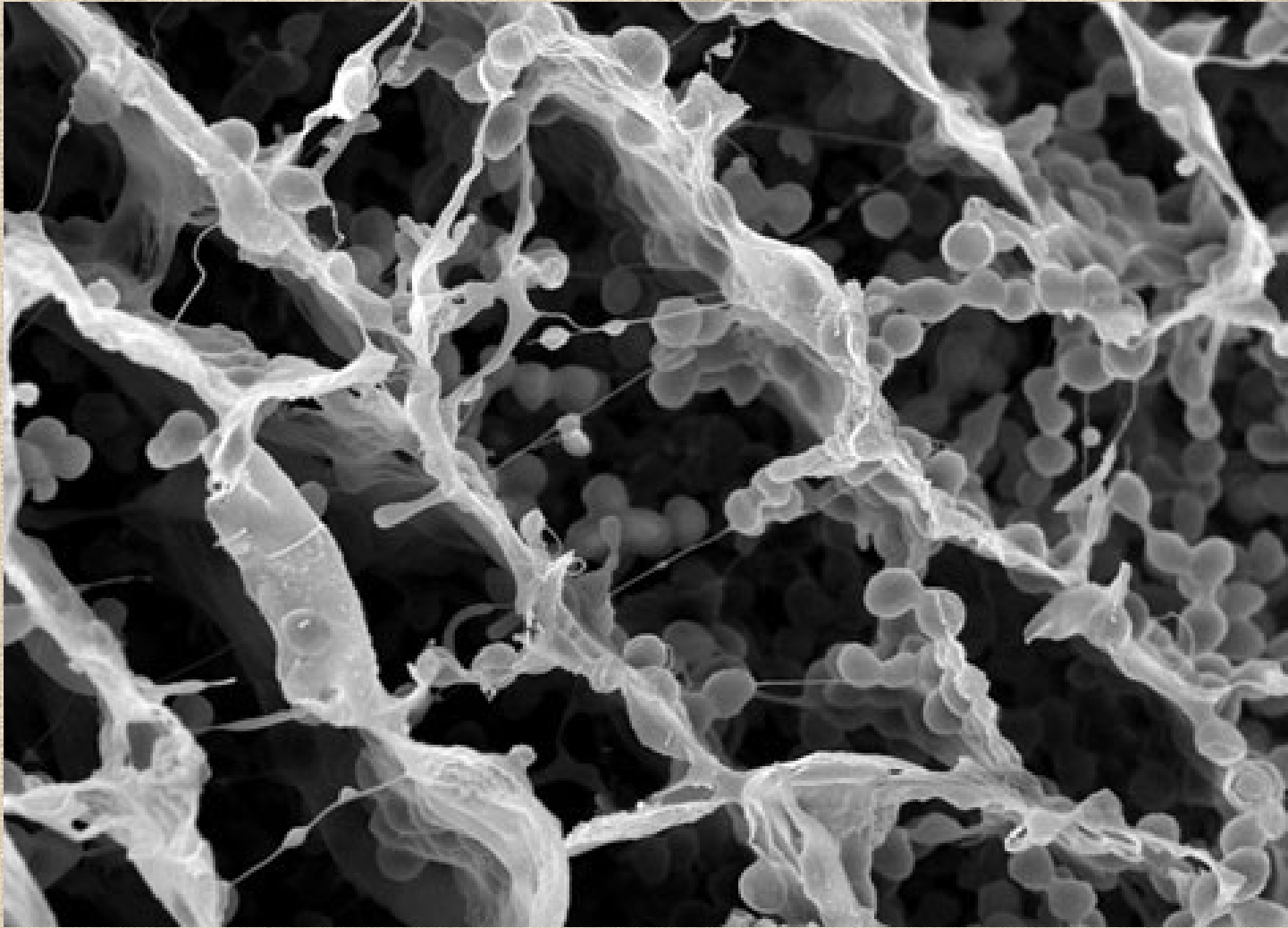
Struktury vně buněčné stěny

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

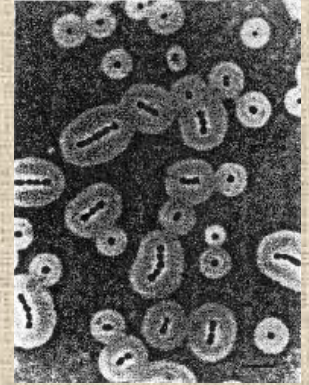


Biofilm structure
cartoon



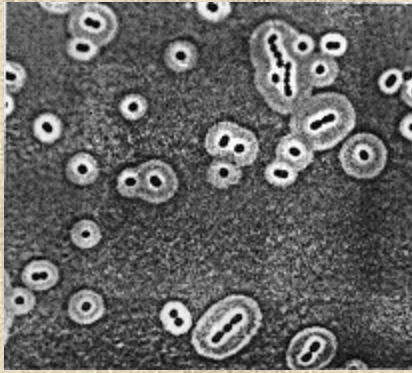


Pouzdro = kapsula

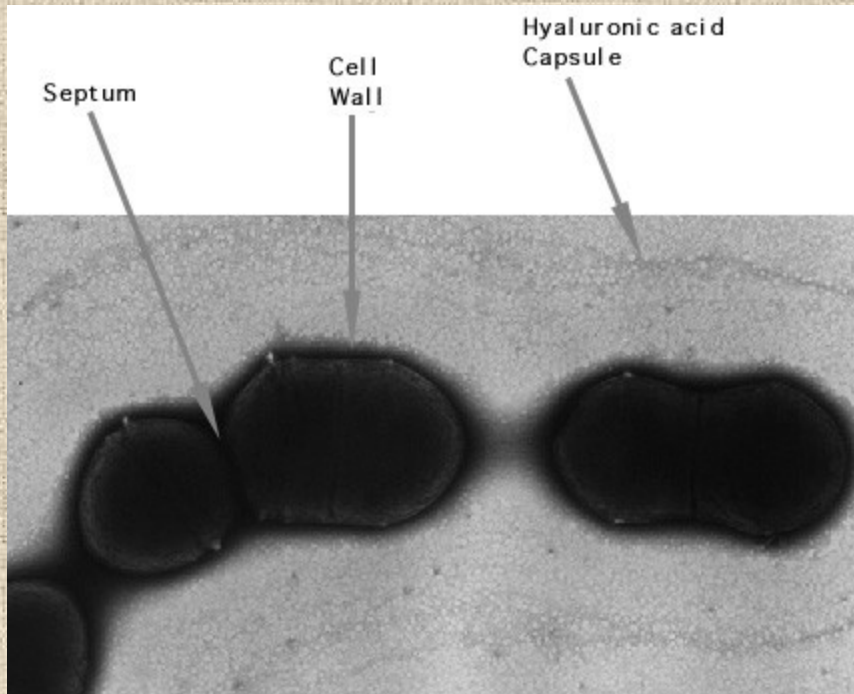


- u téměř všech zástupců *Enterobacteriaceae*
- zřetelně odděluje buňku
- má antigenní vlastnosti, znemožňuje detekovat somatický antigen. Charakteristické pro virulentní kmeny. Míra virulence: formy S, M a R
- působí proti fágům, protilátkám a fagocytóze, jako **ochranná vrstva** proti vlivům prostředí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

Kapsula - virulence



Jeden druh až **60 druhů**
kapsulových antigenů



Bacillus anthracis
poly-D-glutamát

Negativní barvení - *Streptococcus pyogenes*
TEM (28,000X).

Kapsula – kys. hyalurnová- PS

Tvorba pouzdra ovlivněna
složením media, prostředím

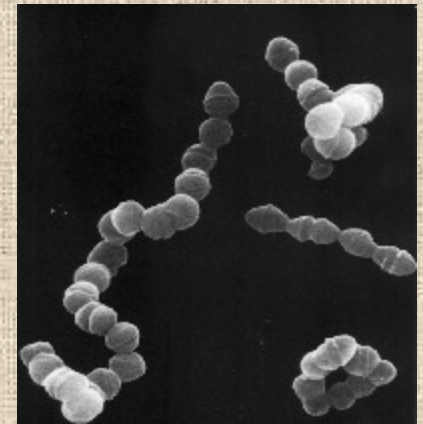
Mikrokapsula – do 0,2 nm

- syntetizována **stále**
- překrývá antigen buněčné stěny a má své vlastní antigenní vlastnosti
- Složena z bílkovin, lipidů a polysacharidů
- Není to bariéra proti průniku živin
- Průkaz – ne mikroskopicky, pouze serologicky
- Důkaz u vitální buňky:

barvením tuku, terčíky v mikrokapsule, ale barveny i tukové kapénky v buňce.

Makrokapsula

- složena z polysacharidů, bílkovin nebo celulózy
- minimálně **dvakrát tlustší než buňka**
- **velikost není** geneticky kódována
- Průkaz prostý: **téměř jednotné složení** – převažuje buď pouze bílkovina nebo pouze polysacharid. Lipidy jen do 1%.
- *Streptococcus* – polysacharid
- *Bacillus anthracis* – bílkovinná složka kyseliny poly-D-glutamové
- *Bacillus* – k. glutamová



*Streptococcus
Pneumoniae* -

- **S-vrstva** - jeden druh **bílkoviny**
 - druhově specifické
 - **monovrstva**
 - **pravidelně organizovaná** vrstva proteinů a glykoproteinů na povrchu bakt. buňky
- **Sliz** – řídký **difúzní neorganizovaný** materiál
 - spojuje více buněk, **snadno odstranitelný**, nejčastěji **polysacharid**
 - může sloužit k pohybu ve vlhkém prostředí.

Glykokalyx

- netvoří se v laboratorních podmínkách za dostatku živin

= síťovina z vláken polysacharidů a glykoproteinů

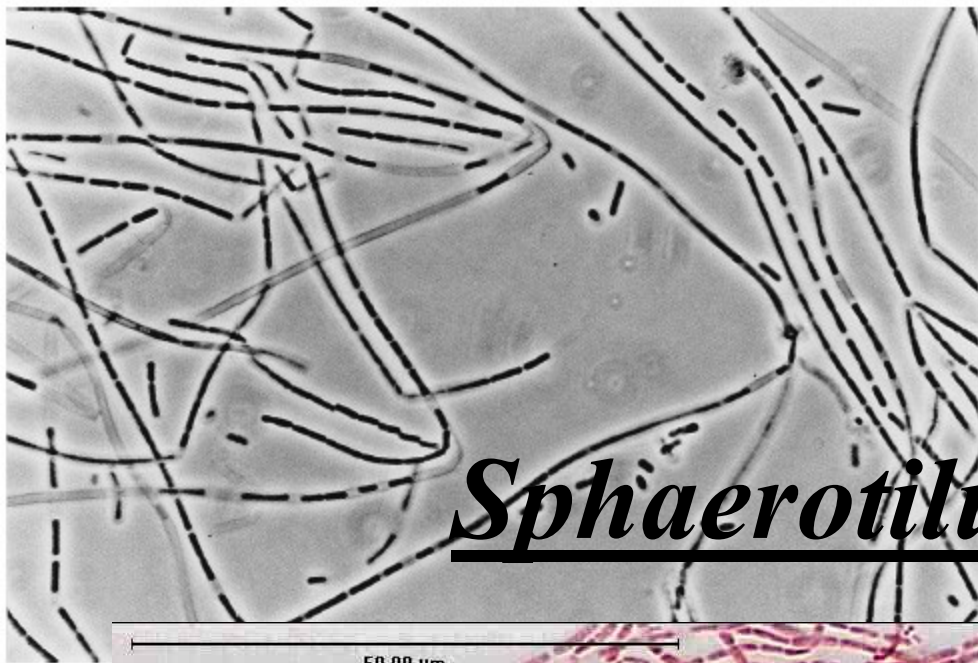
- umožňuje adherenci, která je málo (za pomoci kationtů, Př: zub) až vysoce (za pomoci lektinů, Př: uretra) specifická
- Kationty umožňují spojení stejně nabitých buněk a povrchů, elektrostatické síly

Pochvy

Pouze mechanická funkce.

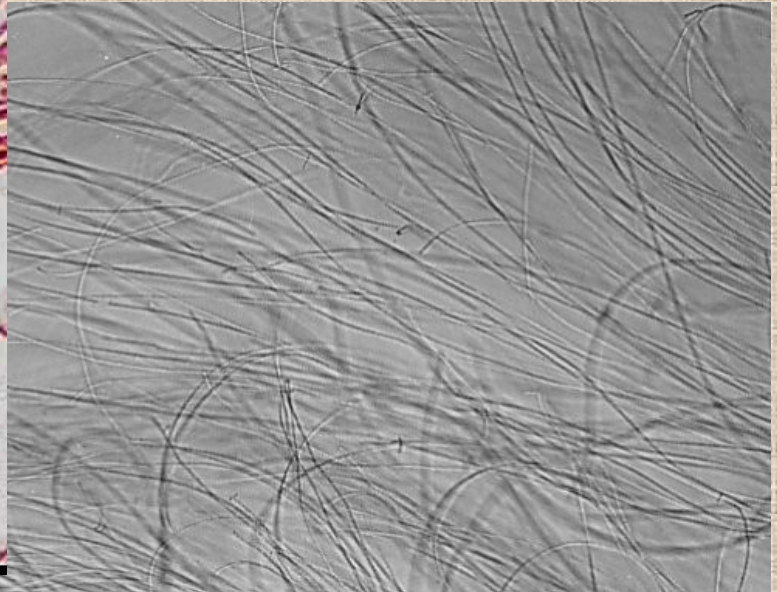
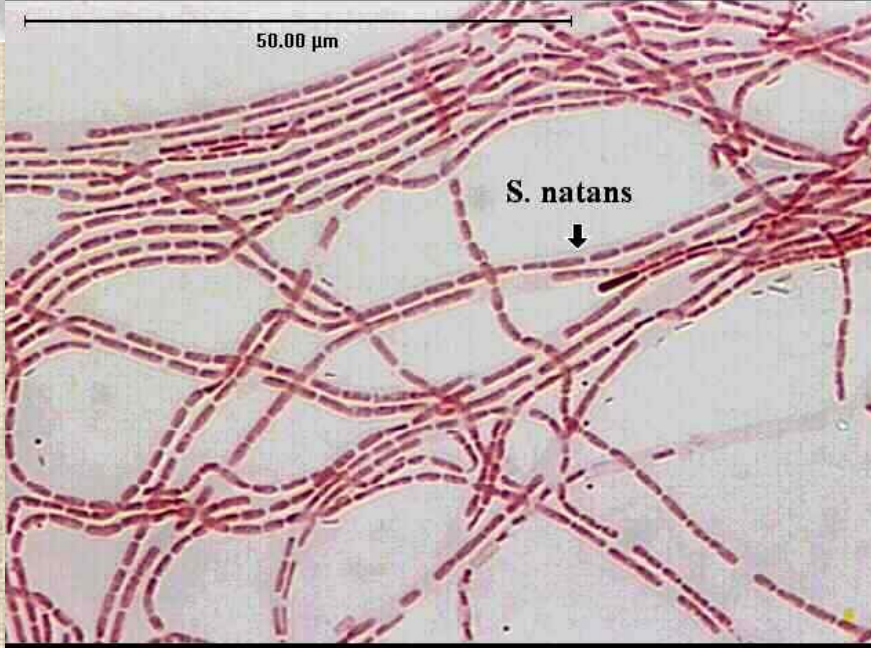
- geneticky kódované
- výhradně z polysacharidů
- chemické složení a zbarvení druhově specifické
- **glukóza + kyselina glukuronová** (*Sphaerotilus*) u jiných rodů např. fukóza
- Někdy obsaženy **hydroxidy kovů** – v malém množství (zbarvení; Fe, Mn, Cu; závisí na druhu)
- Př: *Sphaerotilus*, *Leptothrix*

- Přisedlé mikroorganismy
- Trubkovitý tvar
- Až několik mikrometrů
- Bakterie se v trubce mohou pohybovat



Sphaerotilus natans

50.00 µm



Bakteriální cytoskelet

- řada vláknitých proteinů nutných pro regulaci **tvarování buňky, polaritu buňky, buněčné dělení a segregaci chromozomů a plazmidů**
- jsou analogické třem cytoskeletárním strukturám eukaryotní buňky (3D strukturou, biochemickými vlastnostmi)
- nedávné technologické pokroky osvětlily vazby mezi buněčným dělením a segregací chromozomů

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

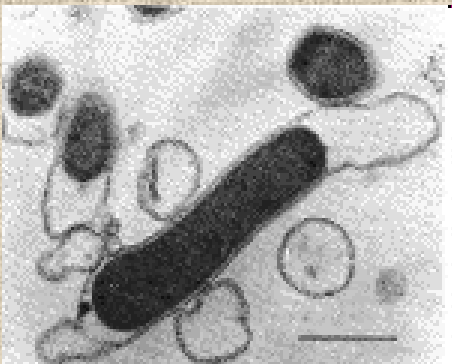
Původ bakteriálního aktinového cytoskeletu

- v bakteriálních buňkách funguje **analog tubulinu**, jmenovitě **FtsZ** (filamentous-temperature sensitive protein Z)
 - u druhu (a u více rodů) *Bacillus subtilis* objeven **analog aktinu** - protein **MreB**, bez tohoto genu ztrácí svůj tvar
 - je složen z páru polymerů; zbývá pochopit, zda MreB formuje vlákna
- distribuce MreB genů v říši *Bacteria* ukazují, že nesférické buňky vlastní jeden nebo více těchto genů

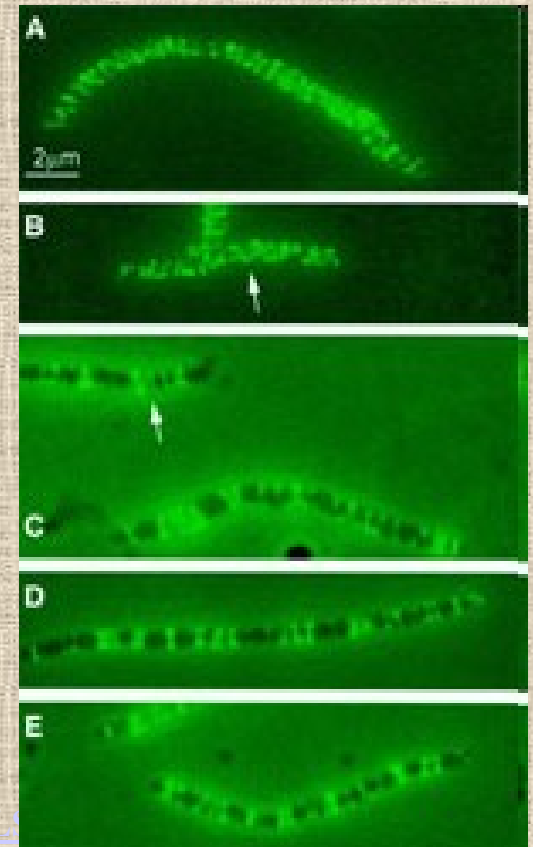
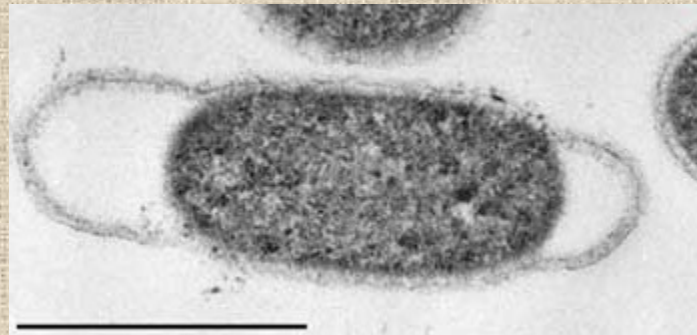
- zkoumána podobnost

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

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



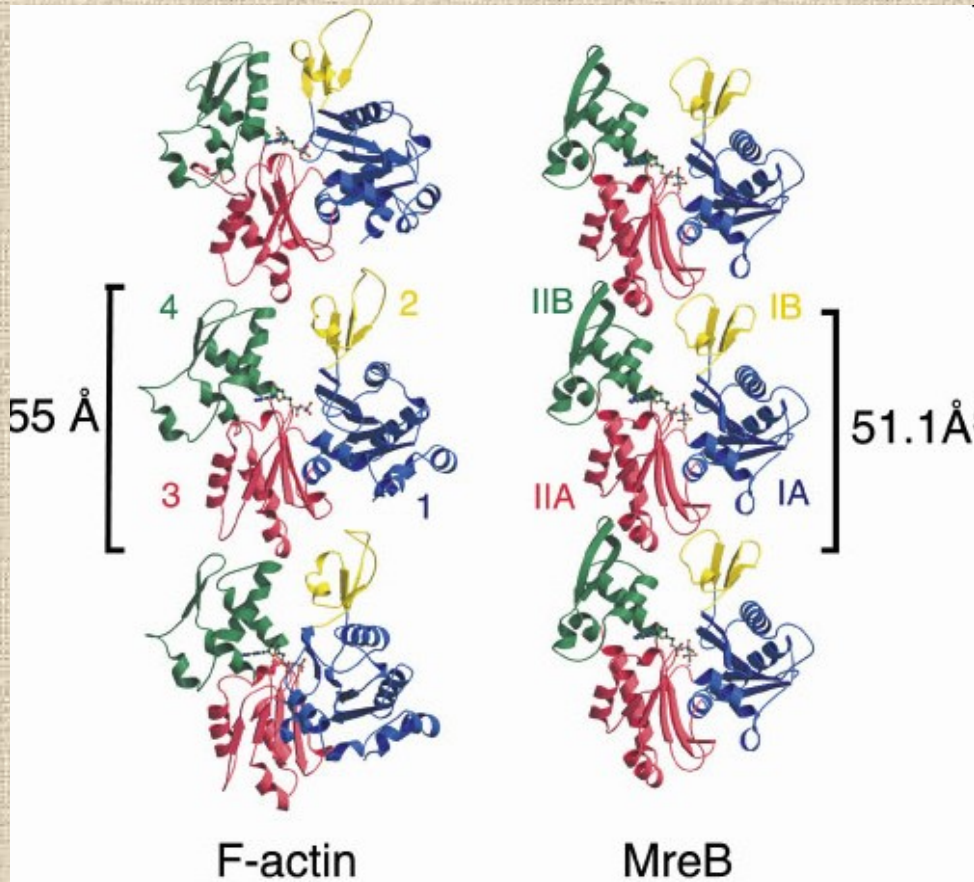
Thermotoga maritima



mreB; IF

- F. van den Ent, L.A. Amos a J. Löwe (2007): Bacterial Origin of the Actin Cytoskeleton. MRC-Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (UK)
- <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2001/life-sciences/L>
- <http://www.nature.com/emboj/journal/v22/n19/full/7595414a.html>
- <http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Thermotogales.htm>

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



Srovnání protofilament F-aktinu a proteinu MreB.



Jsou znázorněny tři podjednotky obou polymerů, každá ze čtyř domén různé barvy. Podélné uspořádání je podobné

- další podrobně studované proteiny s vlastnostmi aktinu jsou **ParM** (*E. coli*) a **MamK** (*Magnetospirillum magneticum*) a crescentin – podobnost intermediárním filamentům (*Caulobacter crescentus*).

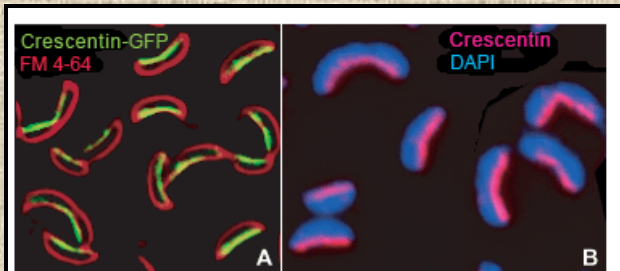
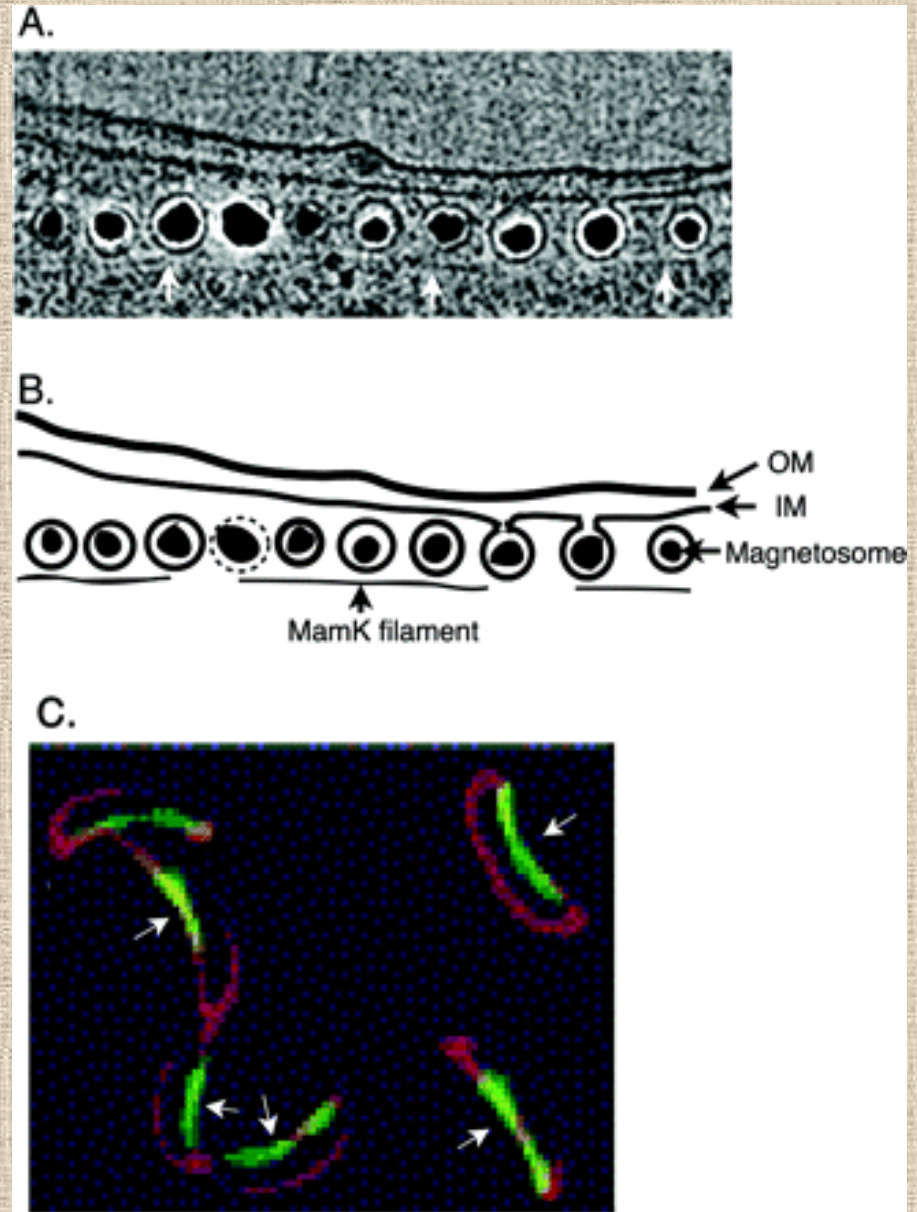
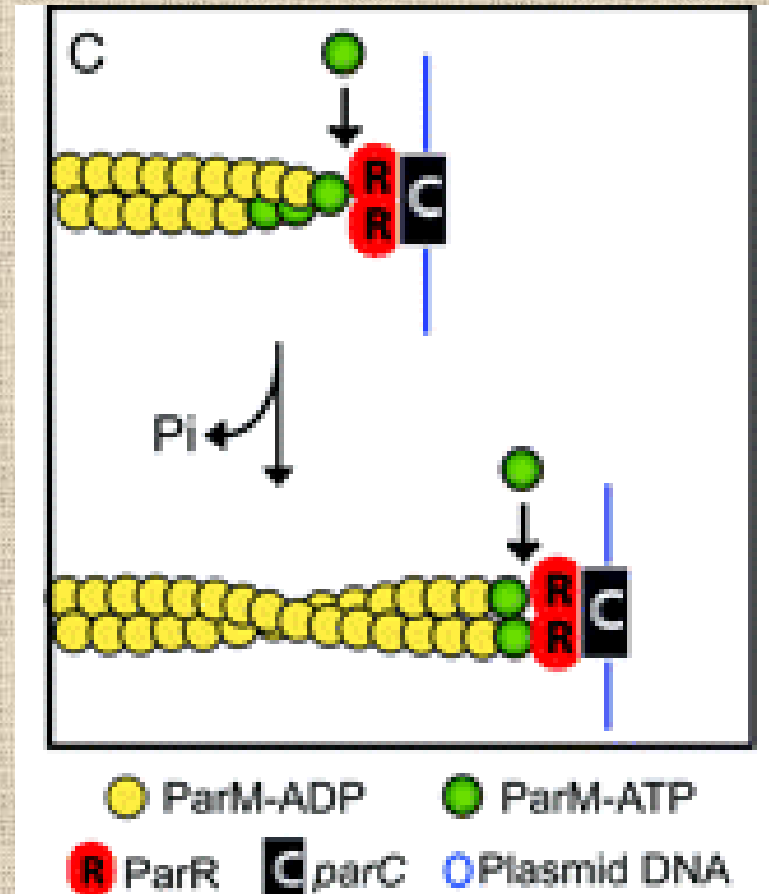
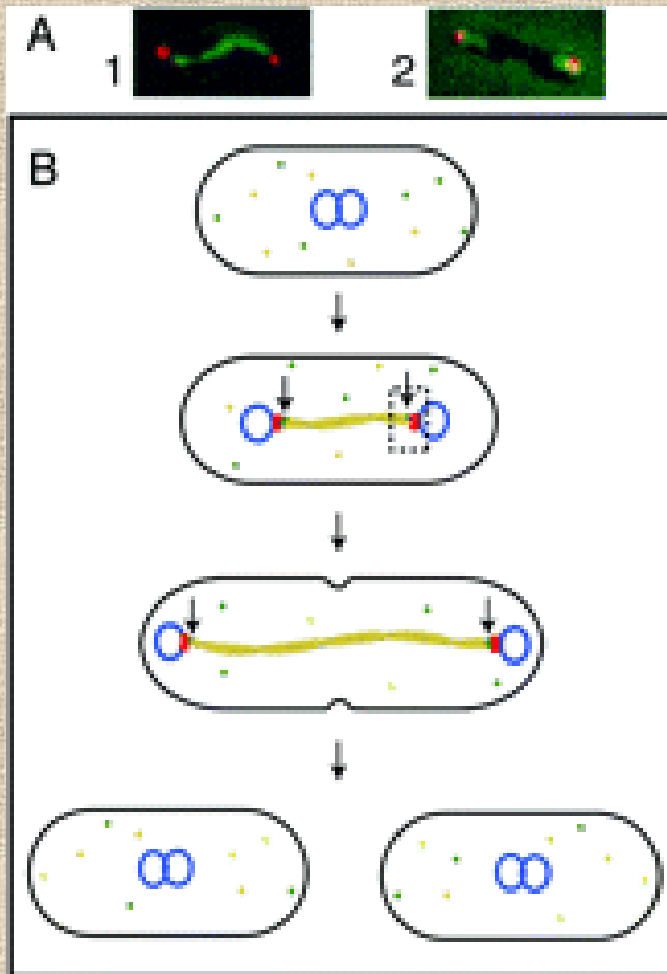


Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings. Photo reprinted courtesy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



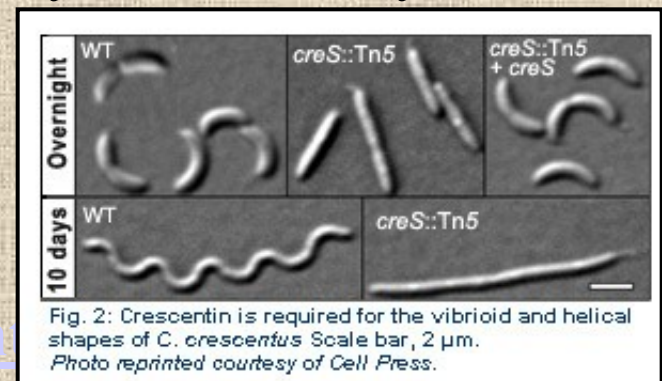


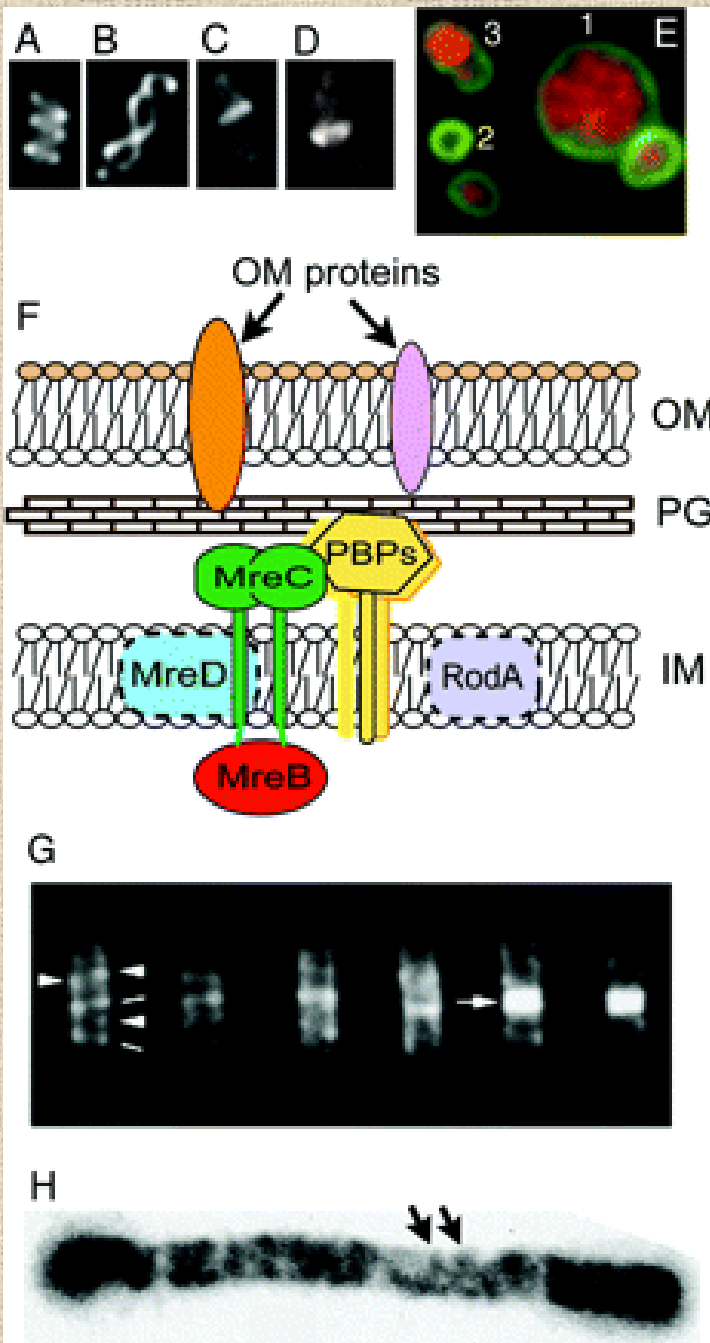
Yu-Ling Shih and Lawrence Rothfield (2006): The Bacterial Cytoskeleton *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 729-754, Vol. 70, No. 3).

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

Caulobacter crescentus

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





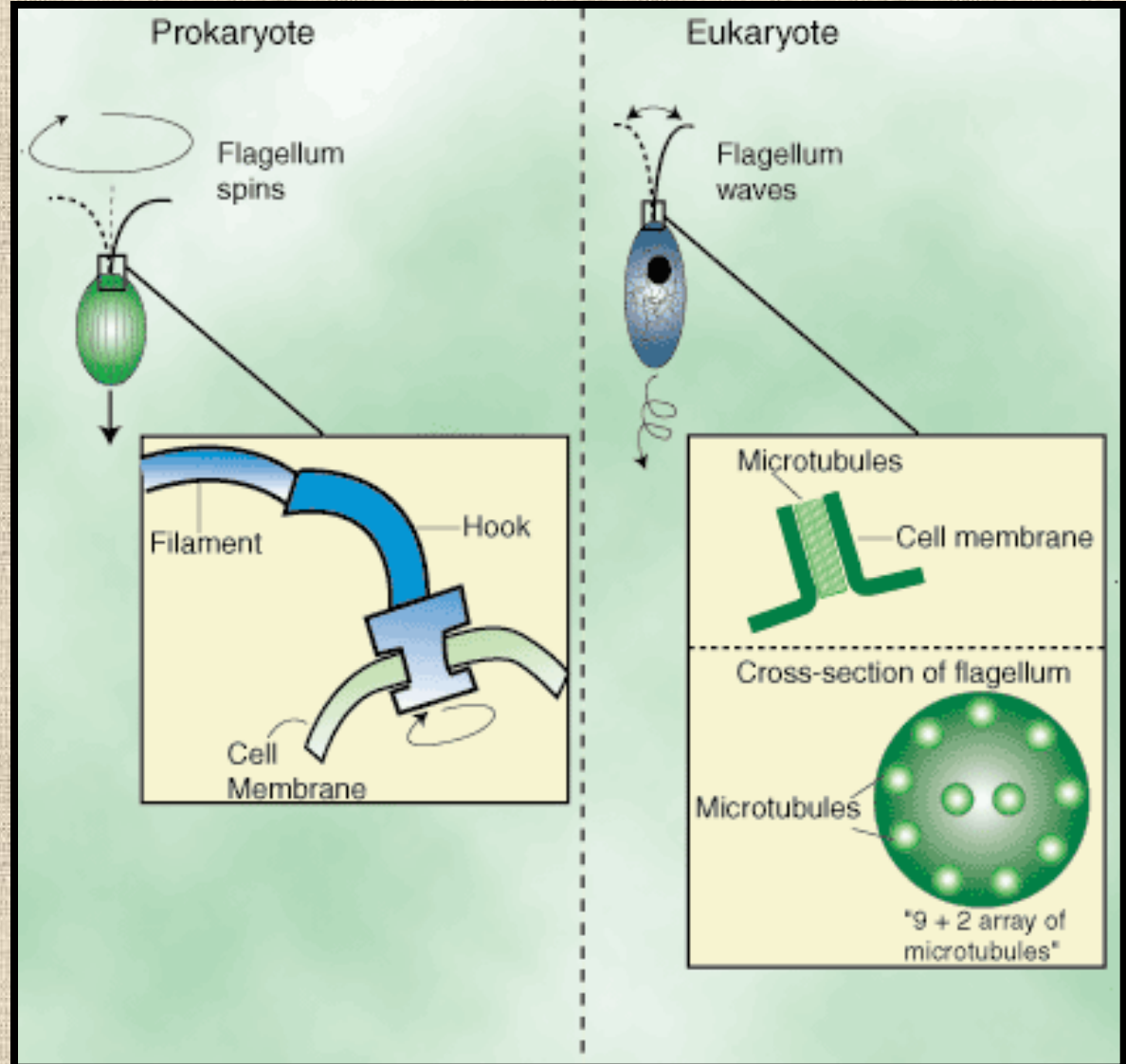
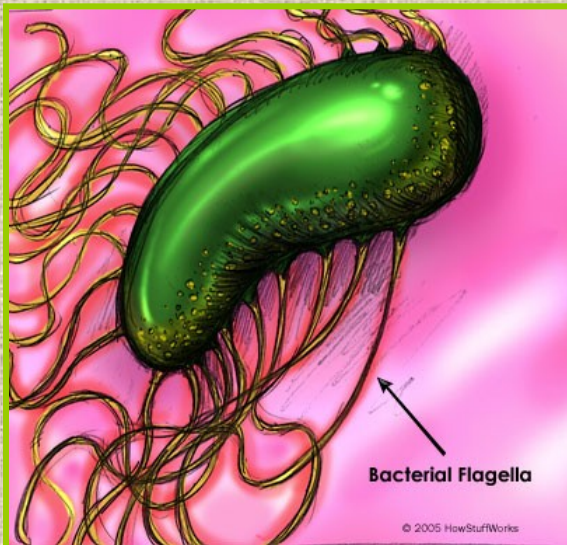
- **MreC** je podstatný pro prostorovou organizaci složek holoenzymů periplazmy syntetizujících peptidoglykan
- **MreB** řídí lokalizaci prekurzorů peptidoglykanu v cytosolu
- Fluorescenční značení Van dokazuje, že MreB a FtsZ, MreC a RodA působí při syntéze PG.
- MreB a FtsZ jsou vyžadovány pro morfogenezi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

- **FtsZ** (filamentous-temperature sensitive protein Z) = **protein buněčného dělení**
- je vyžadován pro start časně syntézy peptidoglykanu vedoucí k tvorbě mezivrstev, reguluje tedy prodlužování buňky zatímco **MreB** je nutný pro prodlužování stélky.
- Bakteriální cytoskelet a proteiny určující tvar buněčné stěny jako MreC spolupracují při lokalizaci komplexů koordinovaně syntetizujících buněčnou stěnu

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

Vláknité útvary na povrchu buňky

- bičík
- fimbrie, pili
- curli



Pohyb bakteriální buňky

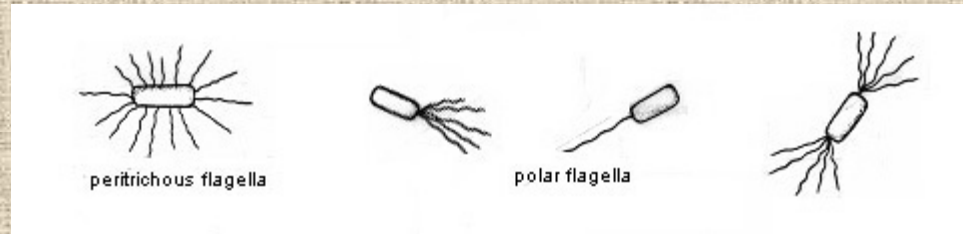
- **swimming motility** – pohyb bičíky, plavání
- **swarming motility** – plazivý pohyb kolonií, bičíky, *Proteus*
- **twitching motility** – trhavý, skákavý pohyb
- **gliding motility** – klouzavý pohyb

Důvody pohybu bakterií

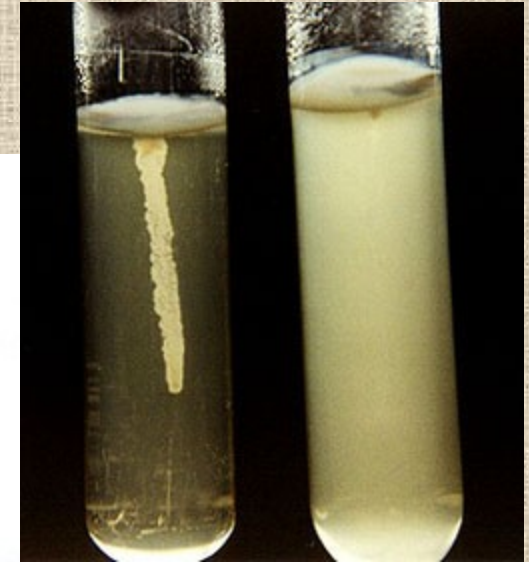
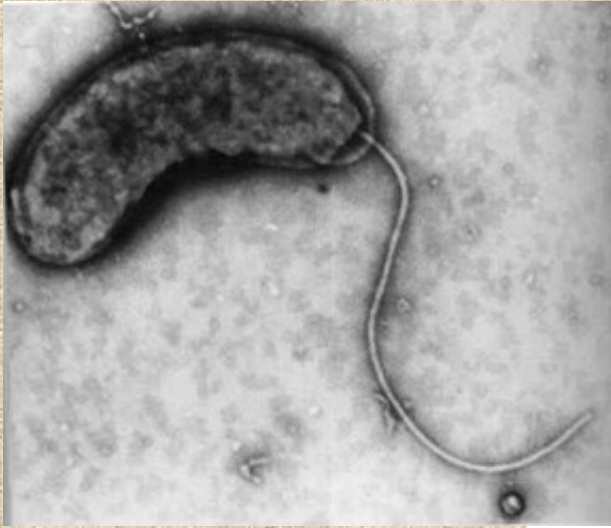
- **nejčastější – pohyb ke zdroji živin – po koncentračním gradientu**
- **reakce na repelent**
- Intenzita odpovědi závisí na **počtu bičíků, na teplotě a viskozitě prostředí.**
- **shlukování buněk za účelem vytvoření plodnice**
- *Myxobacteria*

Vnitřní faktory ovlivňující pohyb

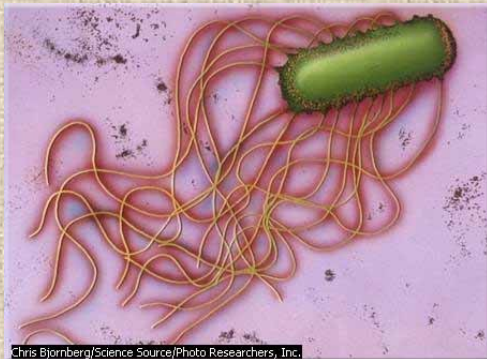
- počet bičíků
- lokalizace bičíků na buněčném povrchu (nejpomaleji reagují peritrichia, efekt rychlý u vibrií, $v =$ několik mikrometrů za sekundu)



- dostatek redukčních ekvivalentů



**motility test medium
(polotuhé medium)**



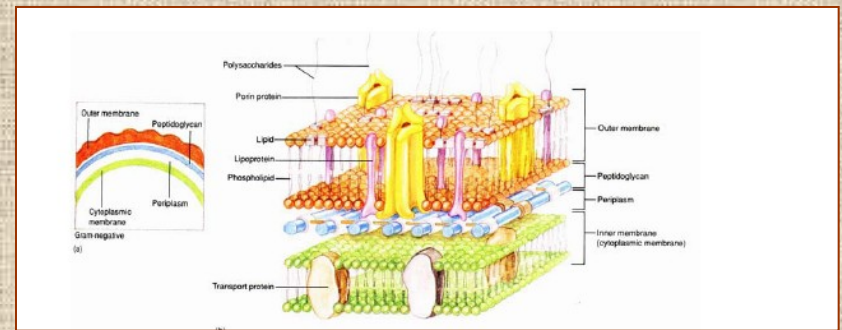
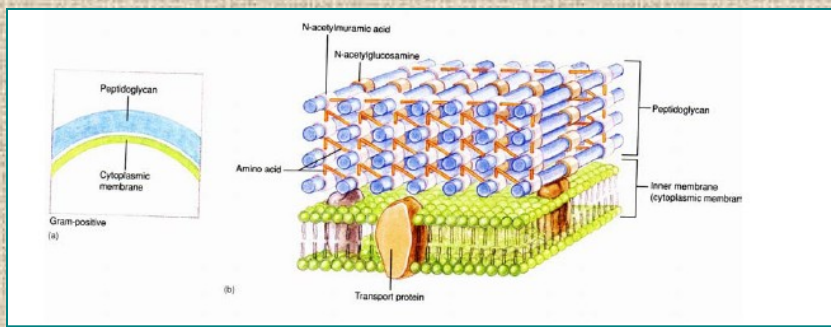
Bakteriální bičík

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

- **supramolekulární** komplex, několik řetězců bílkovin
- tvoří jej více jak 4 vlákna oproti fimbriím
- molekul.hmotnost **flagelinu větší než pilinu**
- flagelární antigen, tvořen specif. bílkovinami, **nemůže být zakryt** kapsulárním ani somatickým antigenem

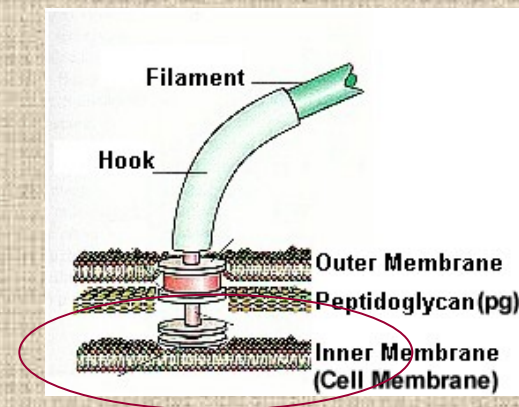
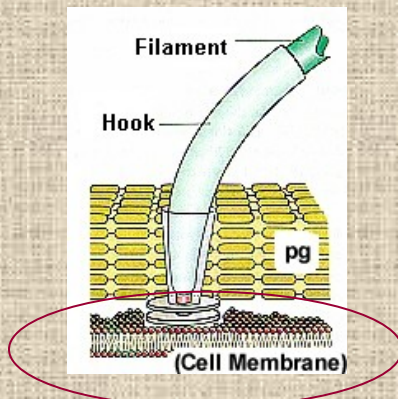
• začíná v **CM** (oproti fimbriím, kt. jsou strukturou B.S.)

- délka bičíku několikanásobně větší než délka buňky
- bičíky lze snadno odstranit sklem (pipeta, tyčinka)



- **G⁺** : zakotvení do CM a B.S.: bazální tělísko, 2 disky – jeden v CM, druhý v periplazmat. prostoru, B.S. kluzné ložisko-tam se otáčí osa, háček pro ohyb

- **G⁻** : B.S. ne tak pevná, navíc vnější membrána
- L a P pruh horního kruhu – vnější membrána a PG (buněčná stěna – P pruh)



Komponenty bičíku:

- vždy **bazální tělísko** —

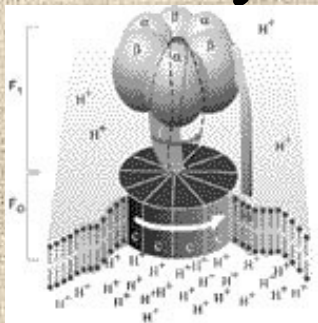
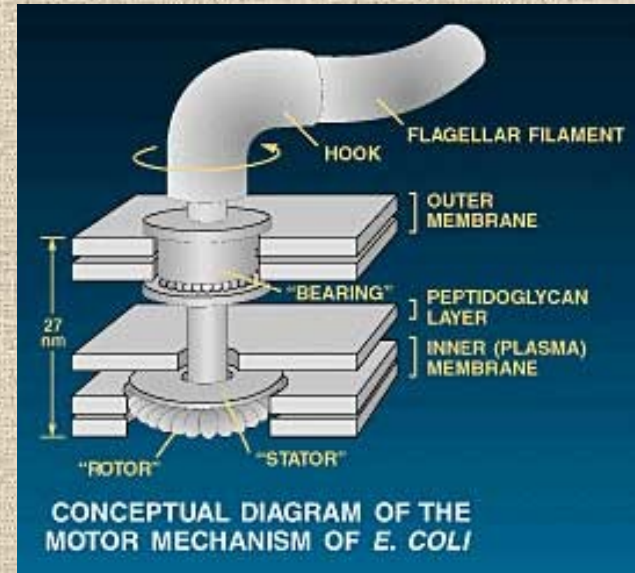
u G- 4 kruhy (CM, PG a VM)

G+ - 2 kruhy v CM

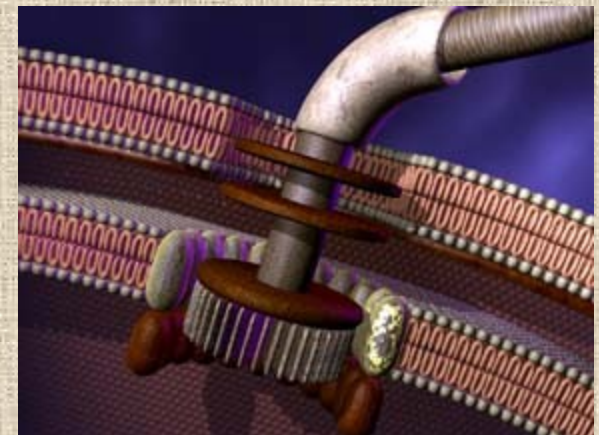
- **háček** (hook)

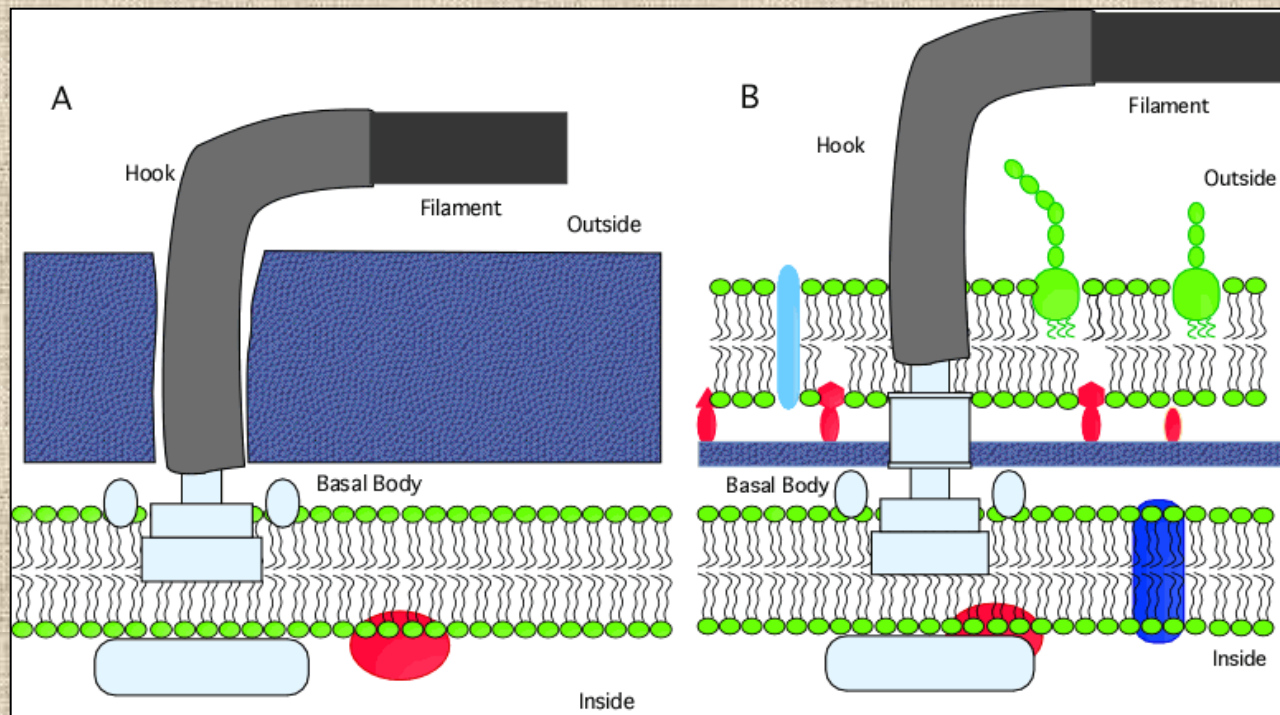
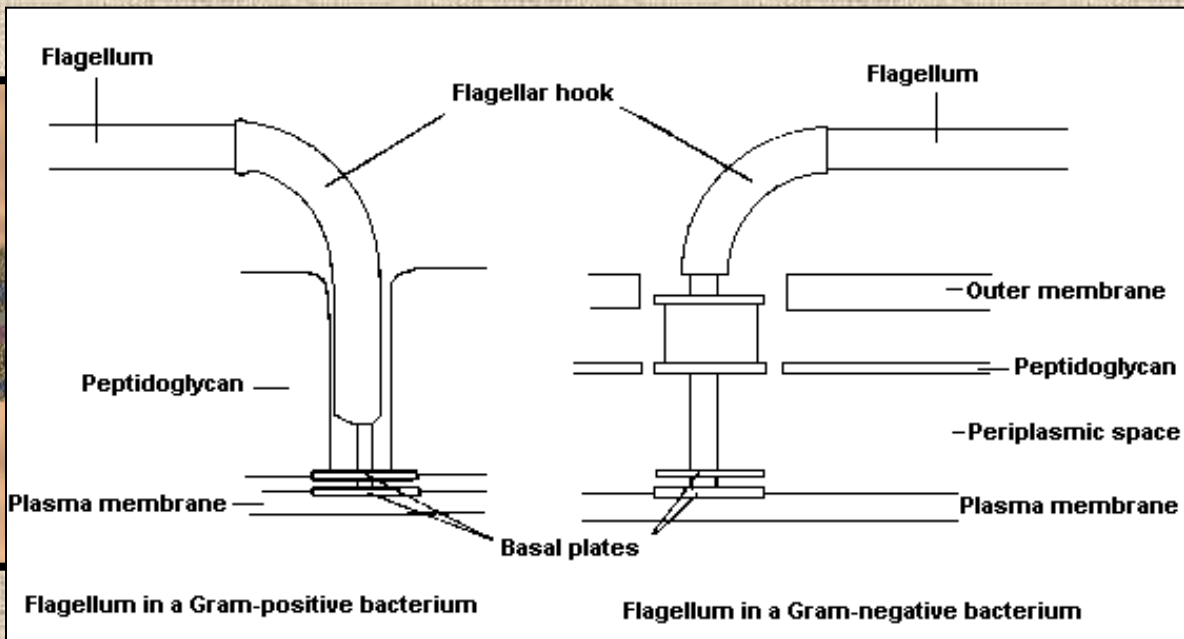
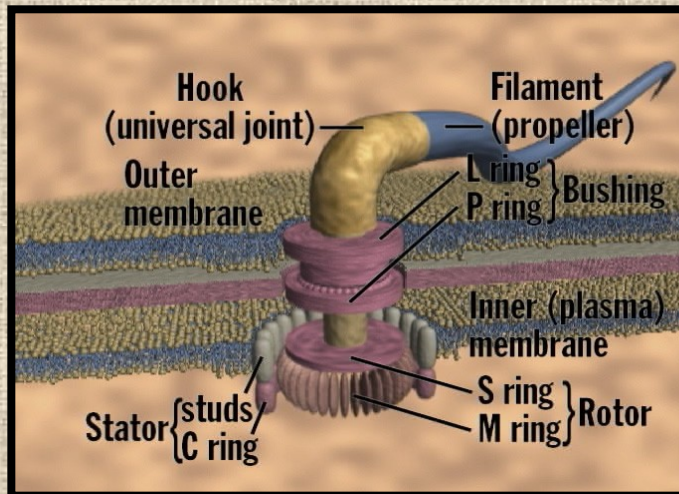
- vlastní **vlákno** (jen to antigenem)

- Bazální tělísko zůstává po odstranění bičíkového vlákna, to je do 20 až 30 min dosyntetizováno



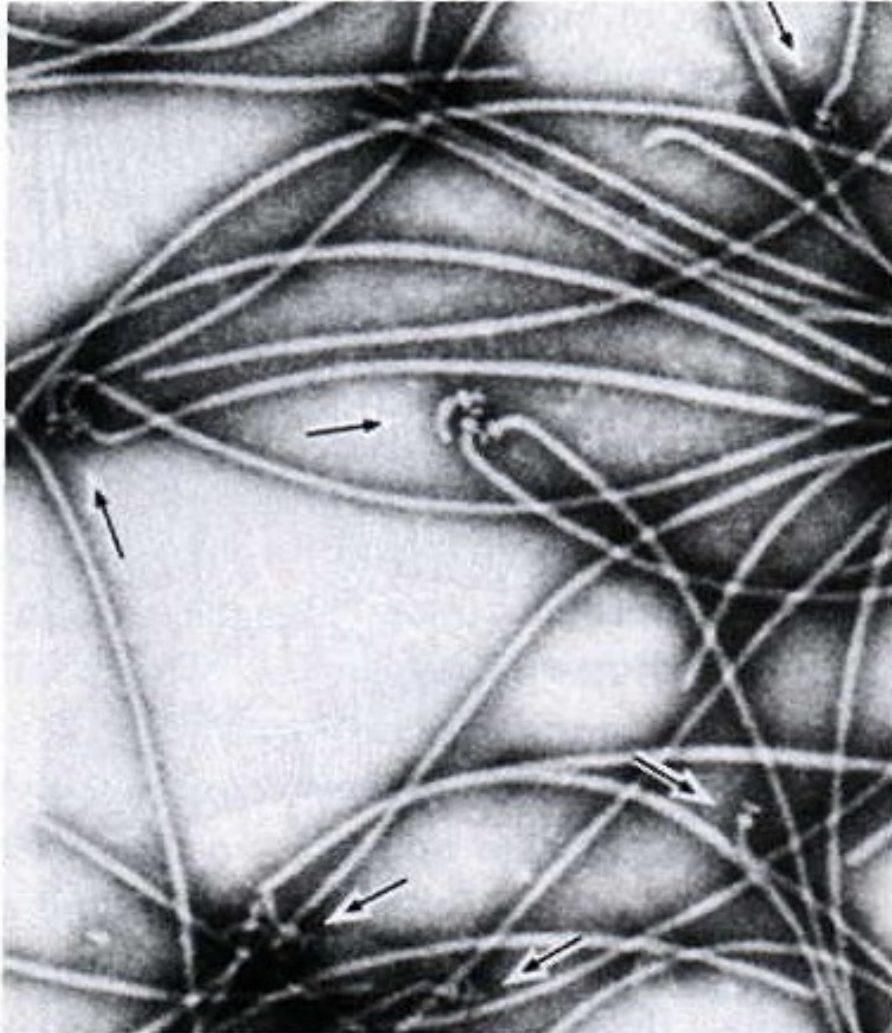
ATP synthase motor



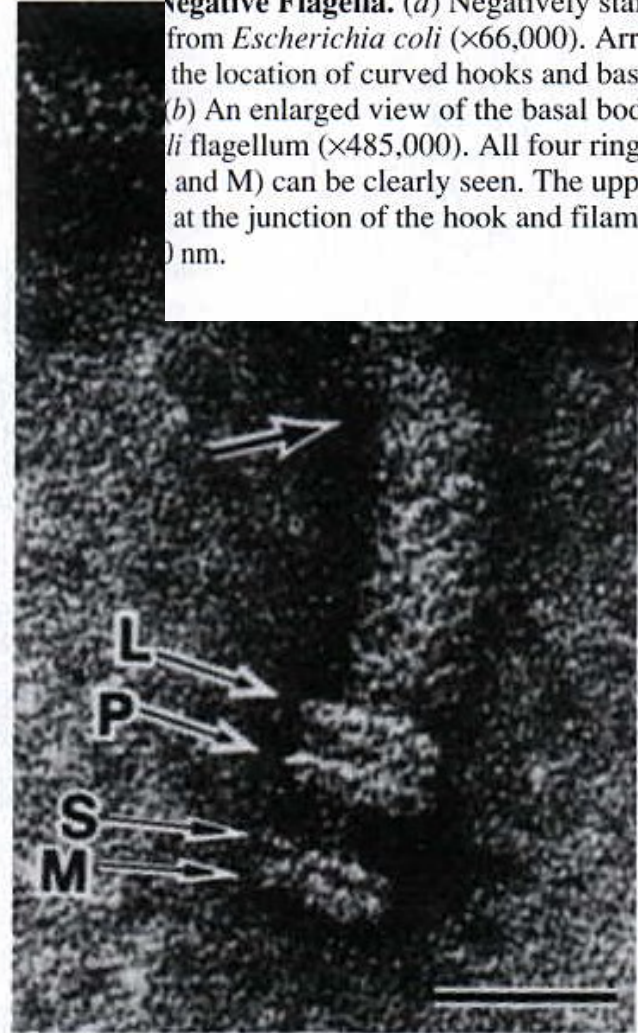


Ultrastruktura bičíku

3.34 The Ultrastructure of Negative Flagella. (a) Negatively stained from *Escherichia coli* ($\times 66,000$). Arrows the location of curved hooks and basal (b) An enlarged view of the basal body of *E. coli* flagellum ($\times 485,000$). All four rings (L, P, S, and M) can be clearly seen. The uppermost ring (L) is located at the junction of the hook and filament. Scale bar = 100 nm.




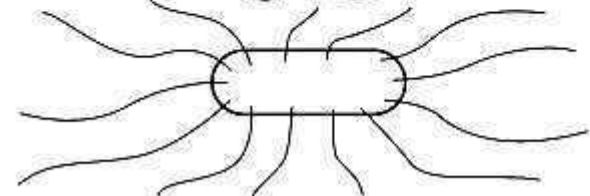


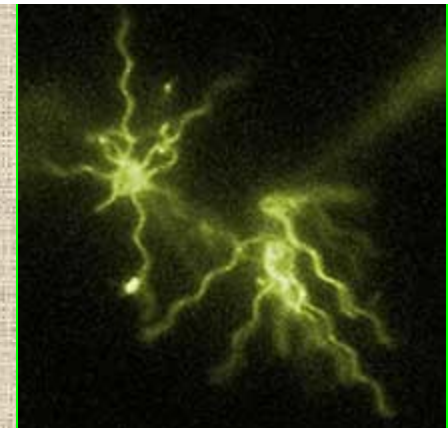
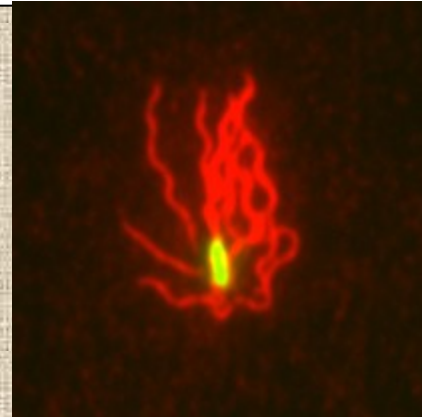
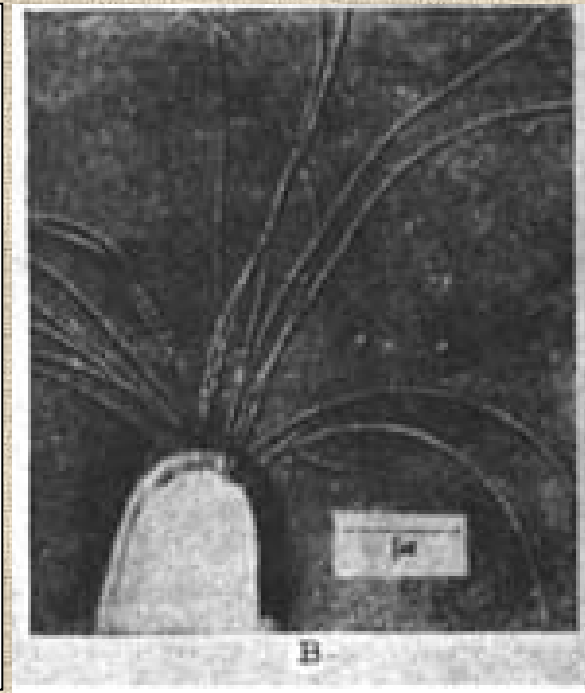
(a)

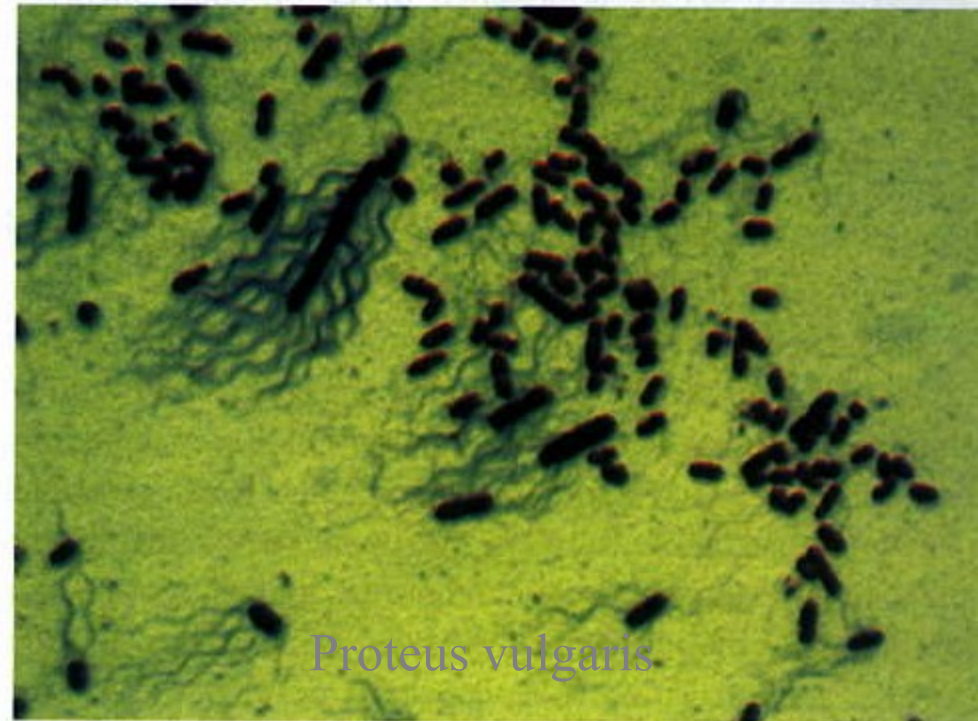
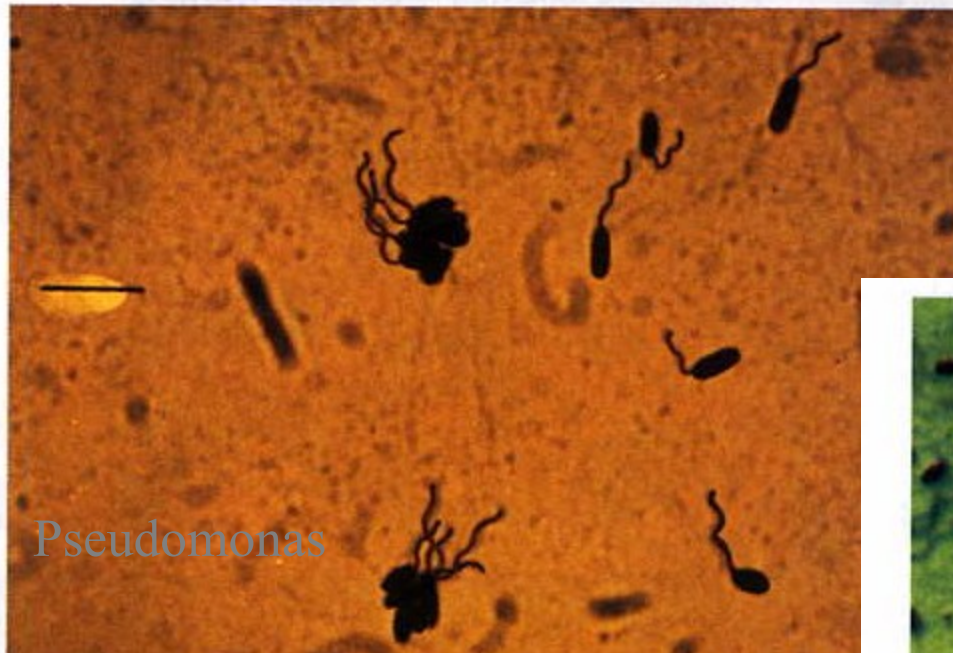


(b)

uspořádání: taxonomický znak

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

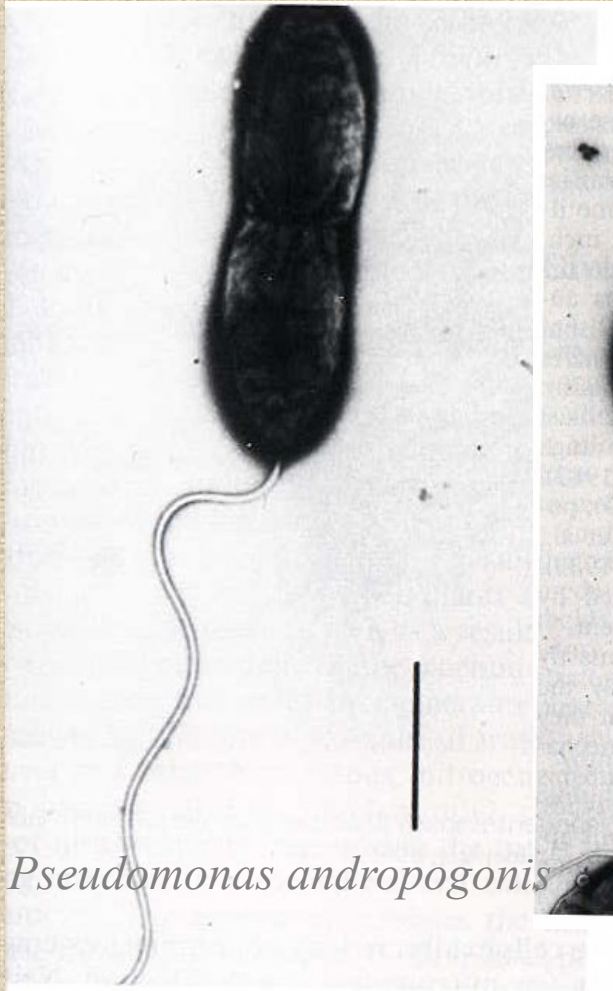




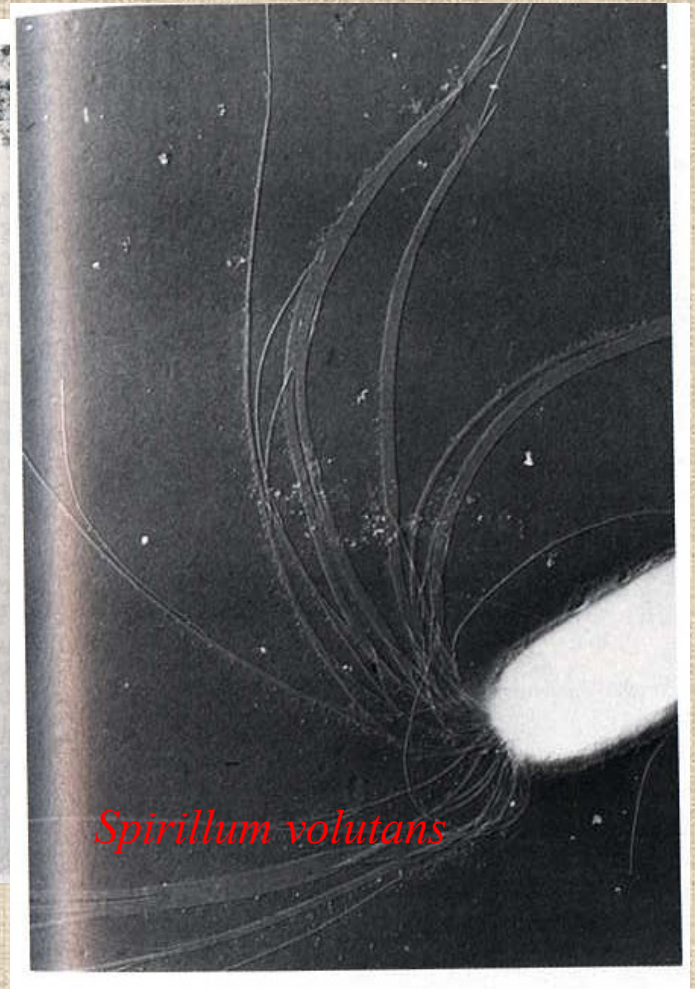
(c)

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

(b)



Pseudomonas andropogonis spirillum



Spirillum volutans

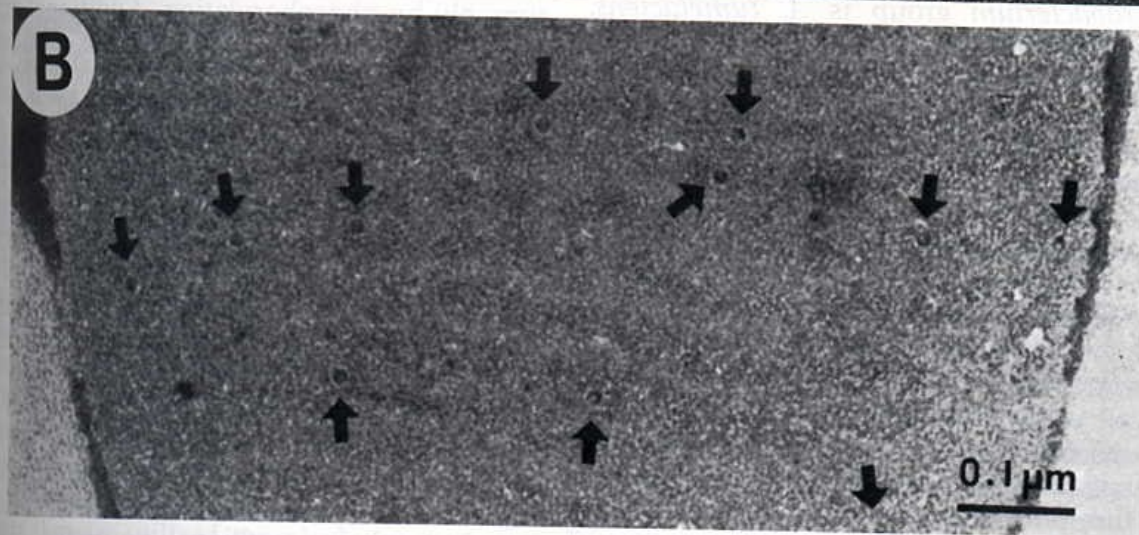
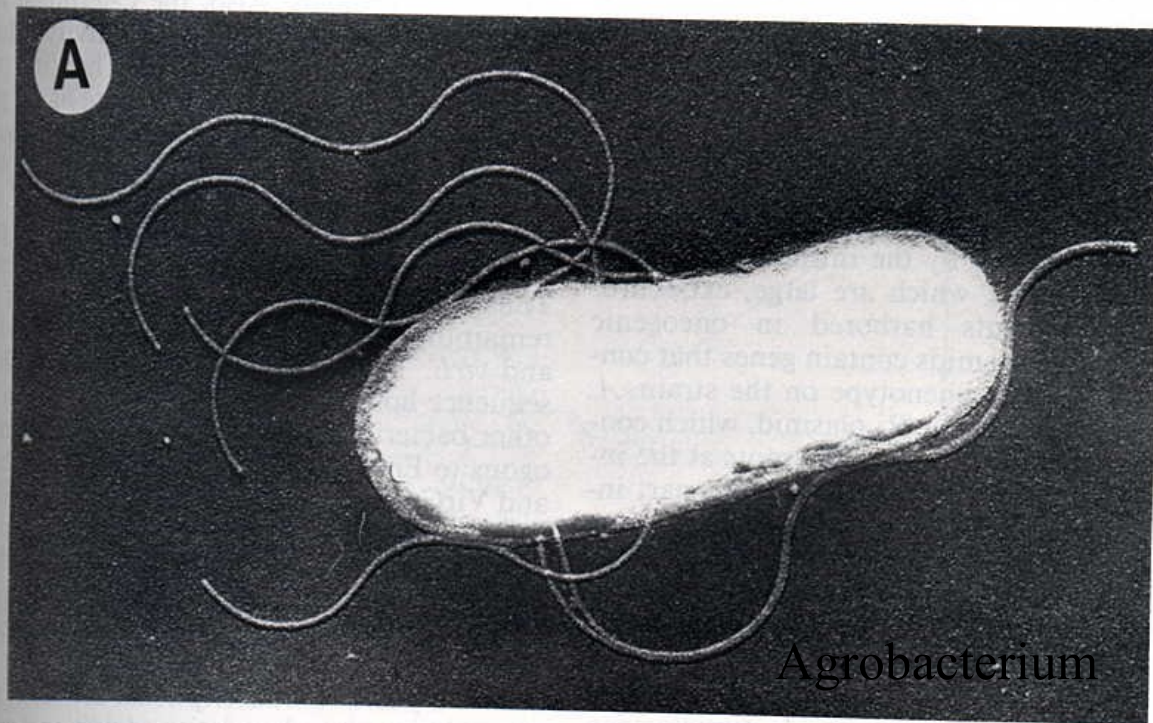


Fig. 1. (A) Electron micrograph of *Agrobacterium* with circumtrecital flagellation. (B) Arrows indicate the sites of flagellar attachment to the bacterial cell. (Courtesy of Dr. Shuhei Tanaka.)

1) polárně – 1 nebo oba póly

- **monotricha** (*Pseudomonas*): pohyb dopředu: proti směru hodinových ručiček. Otáčení buňky: po směru hodinových ručiček.
- **amfitricha** (*Spirillum*)
- **lofotricha** (*Spirillum*)

2) po celém povrchu – **peritricha**
(*Proteus vulgaris*, *Agrobacterium*).

- **Pohyb dopředu**: shloučení bičíků a pohyb proti směru hodinových ručiček.
- Díky **náboji** se nezamotají.
- **Rozpletení = kroucení buňky na místě.**
- „Chce-li“ se buňka pohybovat jedním směrem, namotá bičíky, které jsou ve směru pohybu, na sebe a je tlačena bičíky druhé strany

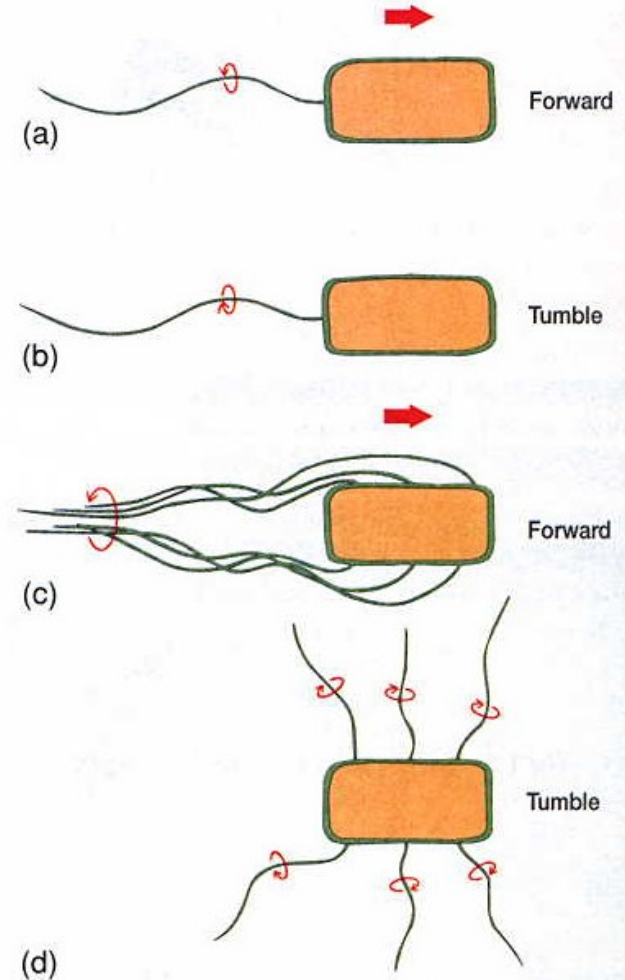
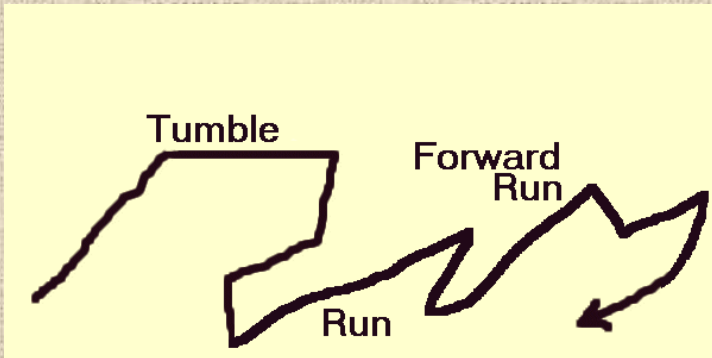
proti směru
hodinových
ručiček


Pohy

po směru
hodinových
ručiček

shluk

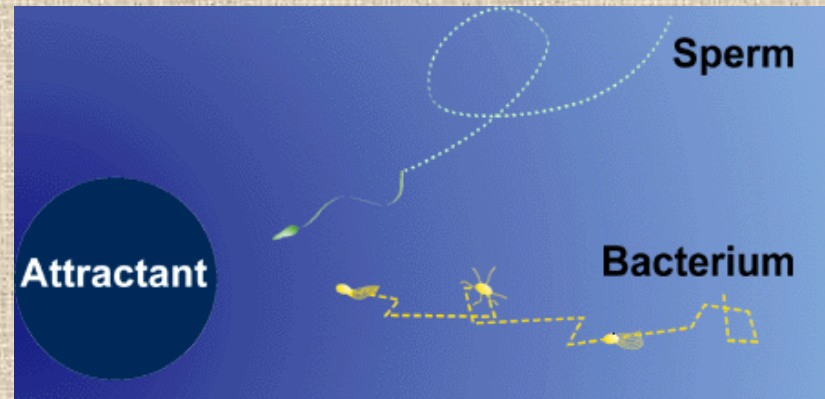
rozpletení
bičíků



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

Prokaryota vs eukaryota

- **rotace bičíku** kolem vlastní osy – **pouze u prokaryot a vždy 1 směrem**
- motor – jeho rotační pohyb způsobuje pohyb celého bičíku
- poháněn **proton motive force** (pmf) – pohyb protonů přes cytoplazmatickou membránu
- výjimka – **alkalifilní bacily** – **pohyb iontů Na**
= „Na motive force“



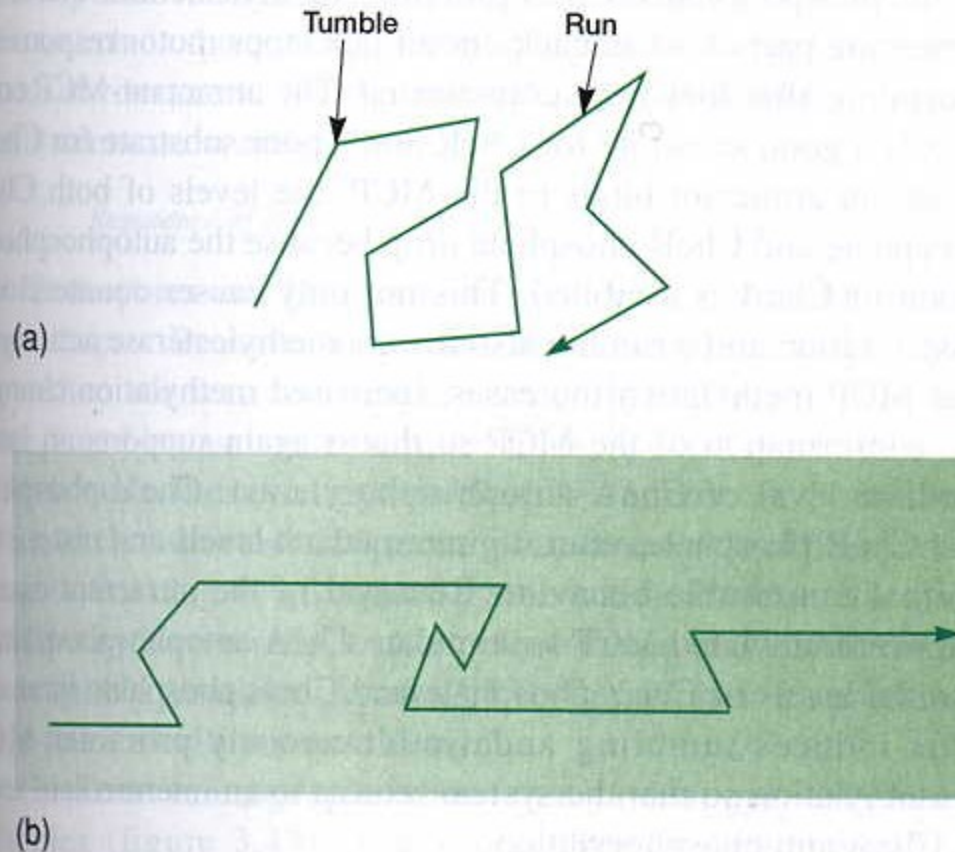


Figure 3.40 Directed Movement in Bacteria. (a) Random movement of a bacterium in the absence of a concentration gradient. Tumbling frequency is fairly constant. (b) Movement in an attractant gradient. Tumbling frequency is reduced when the bacterium is moving up the gradient. Therefore runs in the direction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

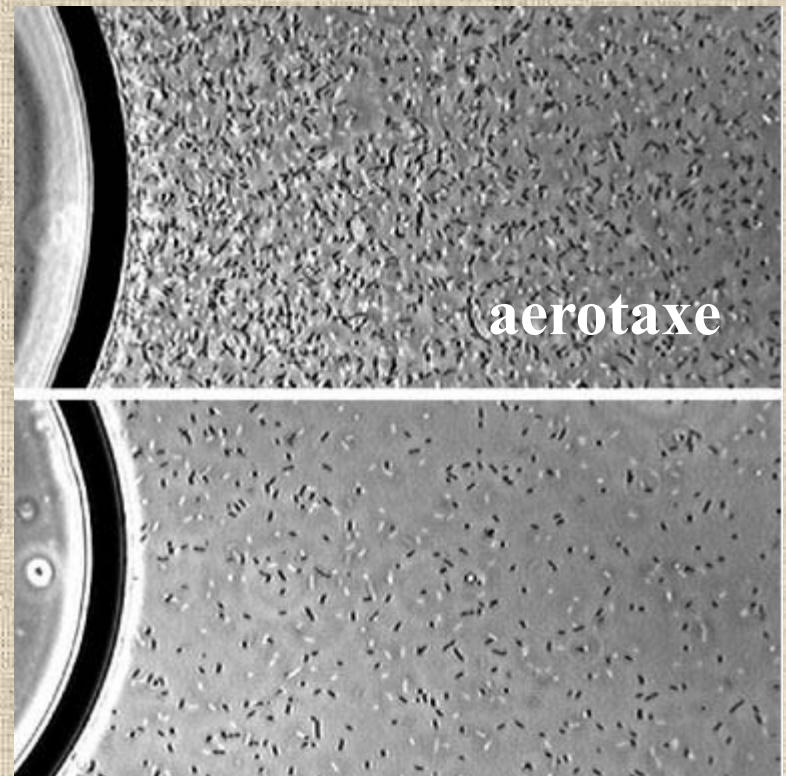
- vnější faktory ovlivňující pohyb:

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

chemotaxe (odpověď na změny ve vnějším prostředí, funguje i při \uparrow c živin, negativní chemotaxe od barviva, rychlost pohybu úměrná koncentraci barviva)

fototaxe (odpovědí na světlo je pohyb \uparrow rychlosti než při chemotaxi)

aerotaxe



Plazivý pohyb kolonií (swarming)

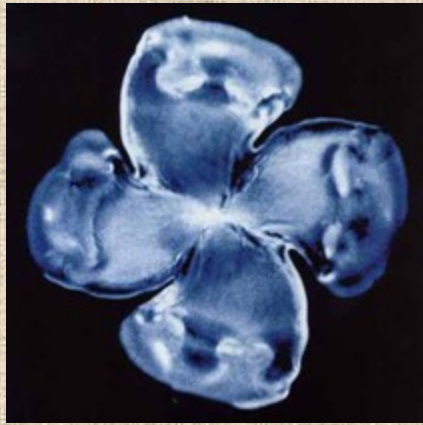
- *Proteus, Vibrio*
- pohyb indukovaný kontaktem s tuhým médiem
- delší buňky, více bičíků
- oblak, roj buněk, který se pohybuje koordinovaným pohybem
- má schopnost přerůstat i vyvýšené útvary na médiu

Klouzavý pohyb (Gliding motility)

- na pevných površích
- mechanismus nejasný
- pmf patrně zahrnutý
- přizpůsobení – slizy, surfaktanty, struktury podobné motoru v BS, specif. membránové komponenty, které tvoří reverzibilní vazbu se substrátem, actine-like systém

Gliding motility

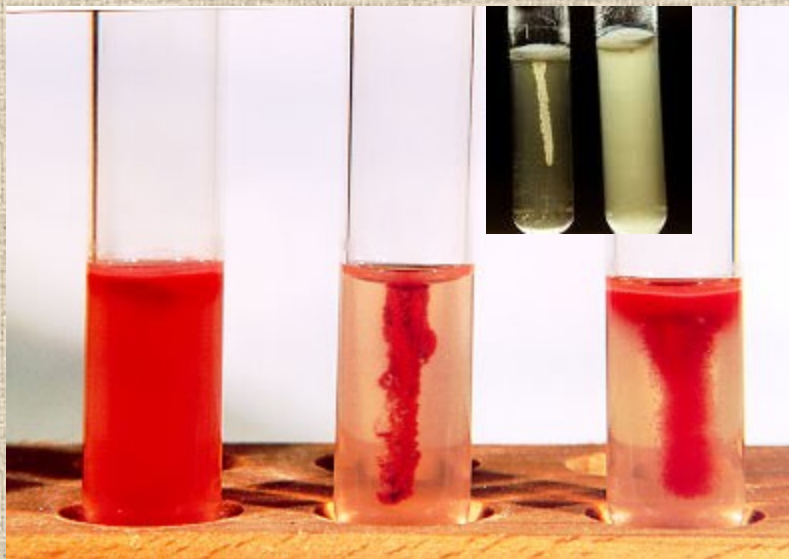
- Makoto Miyata, profesor Osaka City University zkoumal klouzavý pohyb *Mycoplasma mobile*. Za pomoci **cytoskeletárních filament udržují nesférický tvar**. („They look like schmoos that are pulled along by their heads. How they are able to glide is a mystery“.)
- Miyata, M., Ryu, W.S., and Berg, H.C. "Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding." *J. Bacteriol.* 184, 1827-1831 (2002).



Swarming colony of E. coli

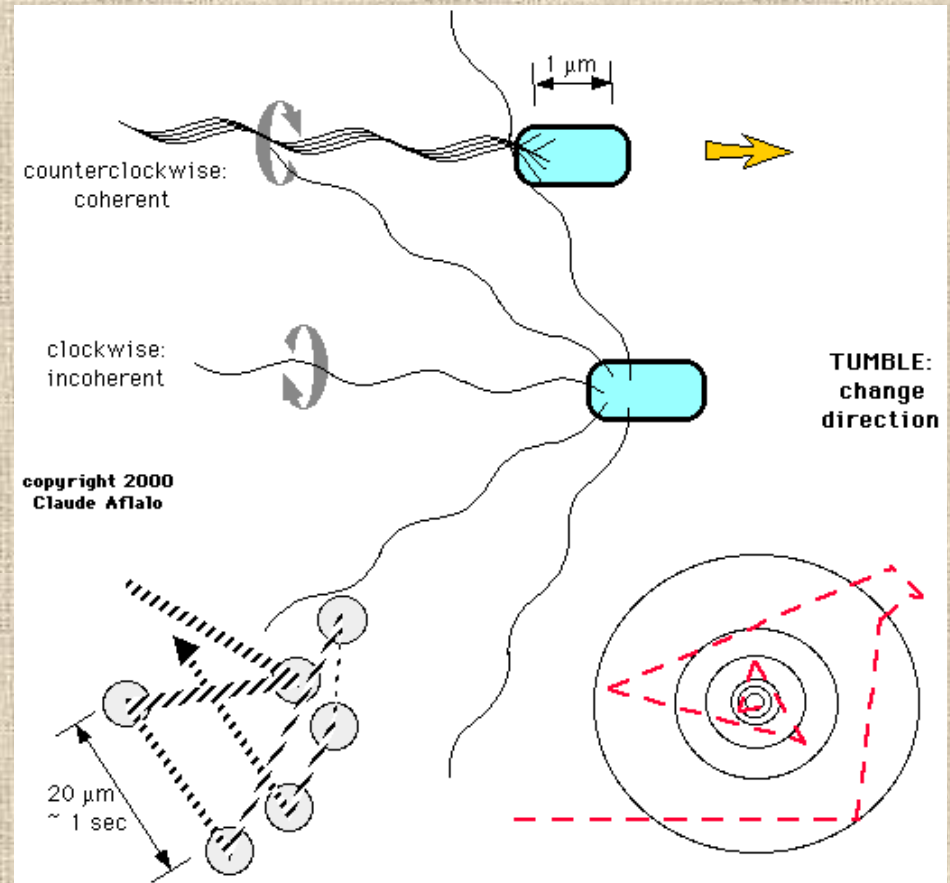


Plazení - myxobakterie



motility test medium, polotekuté

Pohyblivý kmen roste i mimo inokulaci – v celém mediu



Pozorování pohybu bičíku – visutá kapka

- důležitý dostatek kyslíku

v temném poli a intenzivním světle

Pozorování bičíků samotných

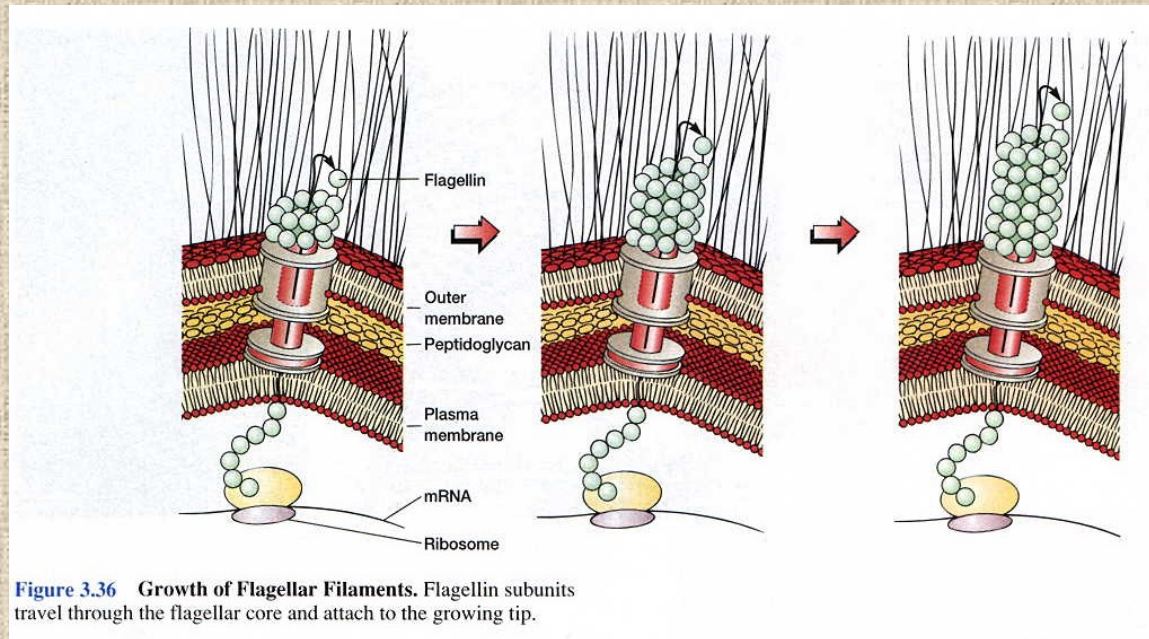
– **světelný mikroskop** po spec. barvení (obalení bičíku vrstvou mořidla, znásobení a zviditelnění jeho průměru)

– **elektronový mikroskop** – negativní barvení

otiskové preparáty po rychlém zmražení na -150 C

Tvorba:

- Samouspořádávání – molekuly flagelinu jsou středem vlákna **transportovány na konec**, vazba na konci bez enzymů, dosyntetizuje se **vždy do stejné délky**. Geny na stavbě: je jich asi **40**, popsáno však jen 20.



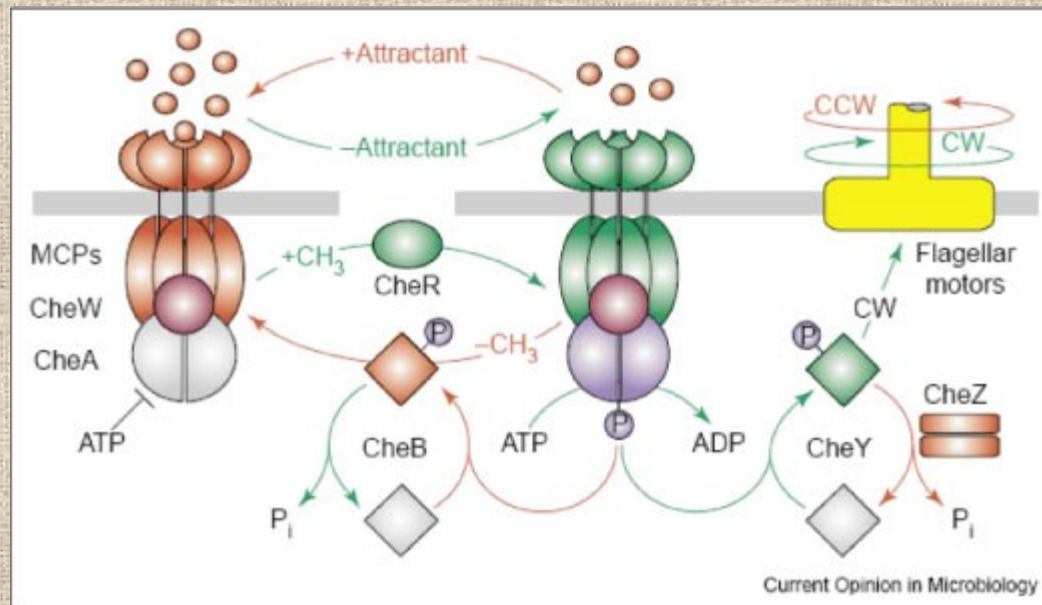
- Př. genů: HAP 1, 2, 3...

Mechanismus chemotaxe *E. coli*

- Regulace pomocí MCP systému

MCP systém –

methyl-accepting chemotaxis proteins



Mechanismus chemotaxe – *E.coli*

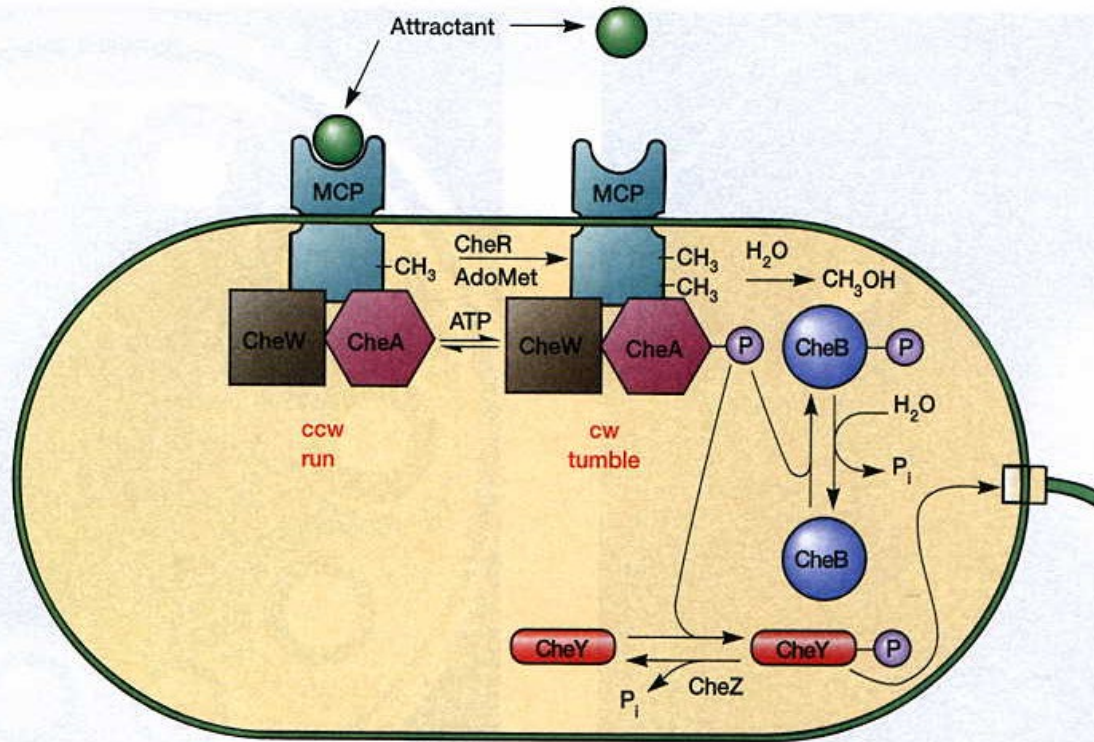
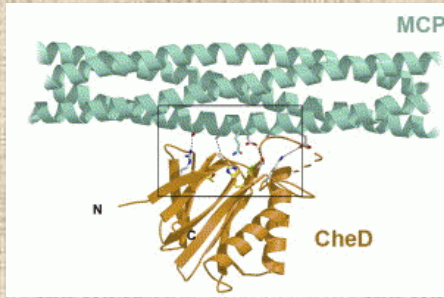


Figure 3.41 The Mechanism of Chemotaxis in *Escherichia coli*. The chemotaxis system is designed to control counterclockwise (ccw) and clockwise (cw) flagellar rotation so that *E. coli* moves up an attractant gradient by a sequence of runs and tumbles. See the text for a description of the process.

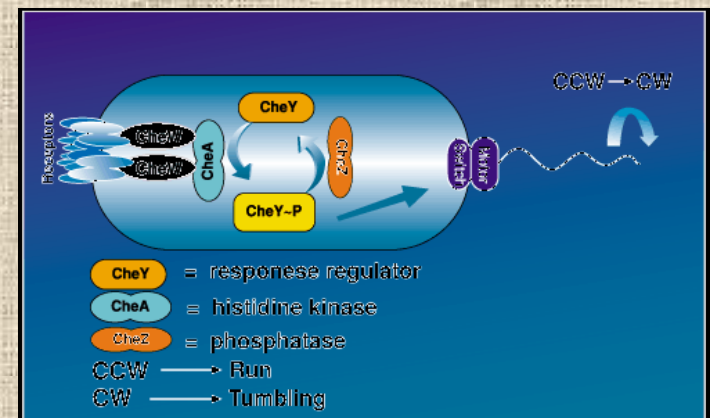


Regulace:

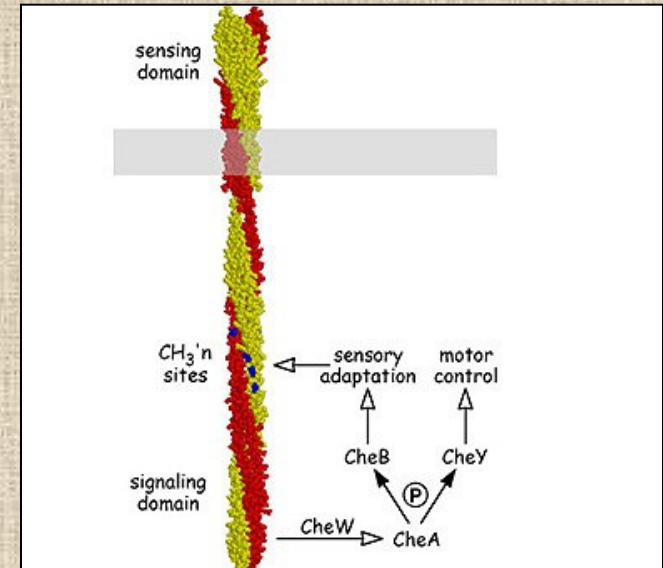
- po koncentračním gradientu živin – regulována **délka přímého a otáčivého** pohybu za atraktantem
- rozeznává serin, aspartát, maltózu, ribózu, galaktózu a dipeptidy, 200ms
- proteiny lokalizovány v sériích, nejčastěji na tyčkovitých koncích

E.coli: MCP systém – methyl – accepting chemotaxis protein.

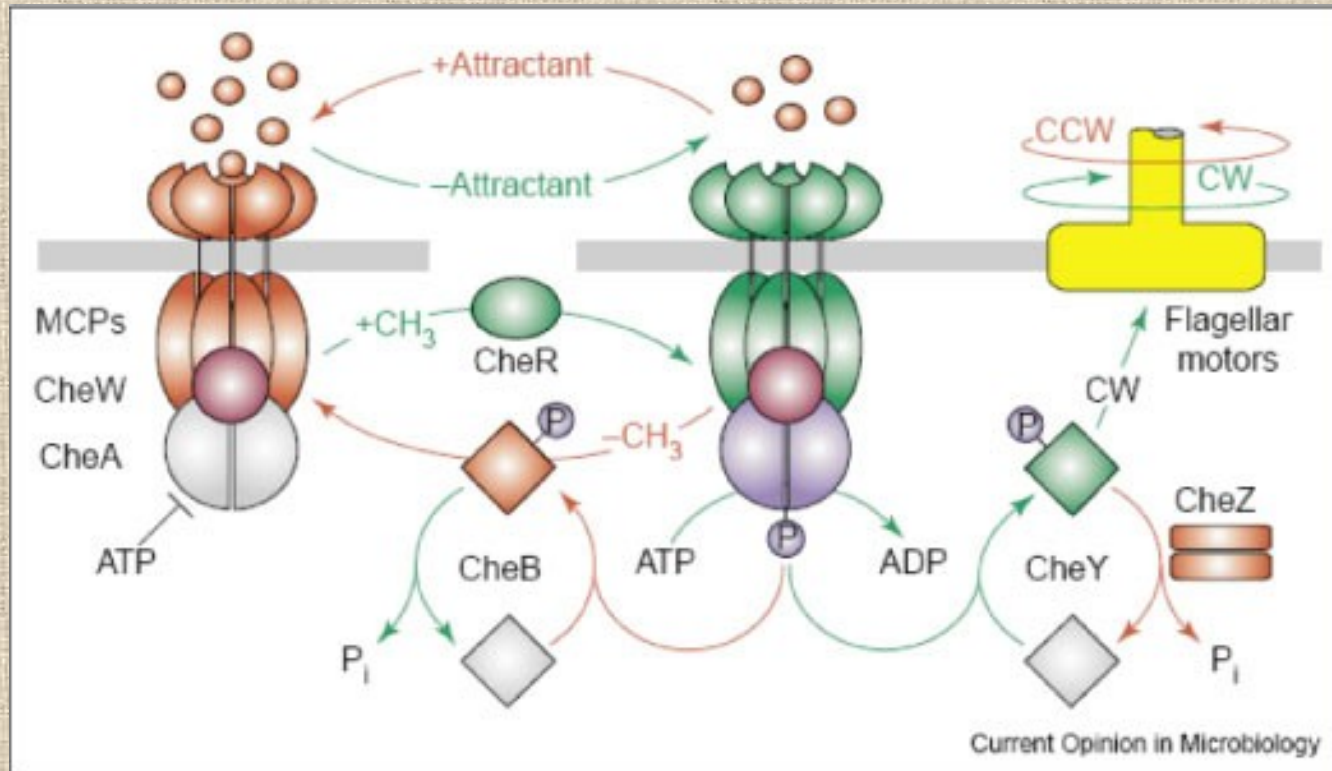
- Protein je řízen methylačním procesem
- Systém je vázán na CM
- vnitřní část proteinu v cytoplazmě, vnější částí ven
- Na vnitřní část proteinu (CheW) se váží enzymy cytosolu (proteiny CheE, CheA)
- na vnější se váže atraktant



- Protein **CheA** - schopen **autofosforylace** v případě, že na MCP **není navázán atraktant**
- **Po vazbě atraktantu předává protein CheA fosfátovou skupinu proteinu CheB (methylesteráza)**
- CheB enzym: **demethylace MCP systému**
- Protein CheB předává fosfátovou skupinu proteinu **CheY** – pohybuje se k bičíku, reakce s proteiny na jeho základně, následuje vrtivý pohyb bičíku (otáčení). Během 10s fosfát odstraněn pomocí CheZ



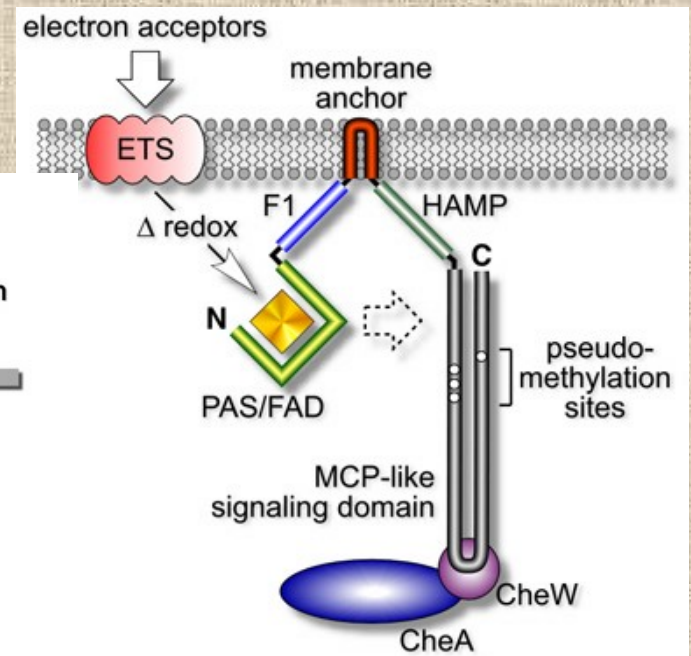
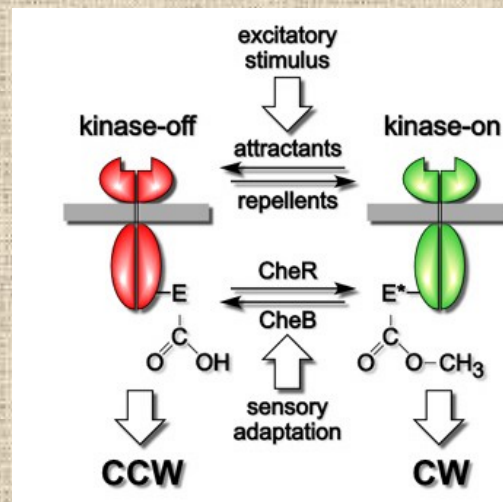
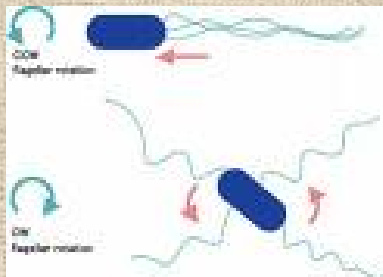
- Autofosforylace CheA bez atraktantu
- Jinak předání fosfátové skupiny a demethylace pomocí CheB

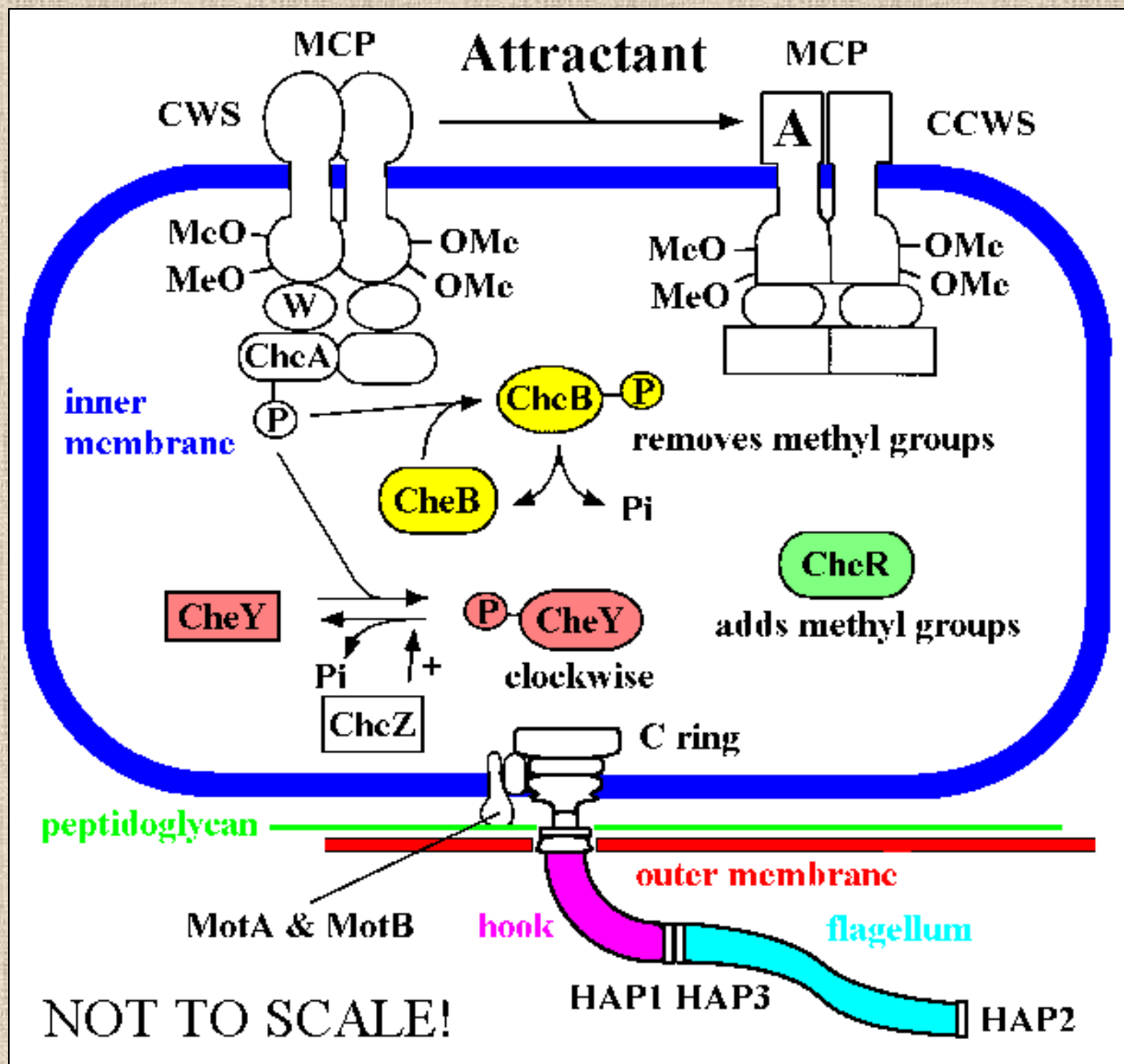


- Žádný pohyb nesmí trvat dlouho, pro správnou reakci musí buňka reagovat na aktuální podnět – krátkodobá paměť receptorů
- Pomocné látky pohybu – slizy, surfaktanty

- Bez atraktantu – rovnovážný stav mezi CheA a CheY – střídání

vrtivého a
 přímočarého
 pohybu





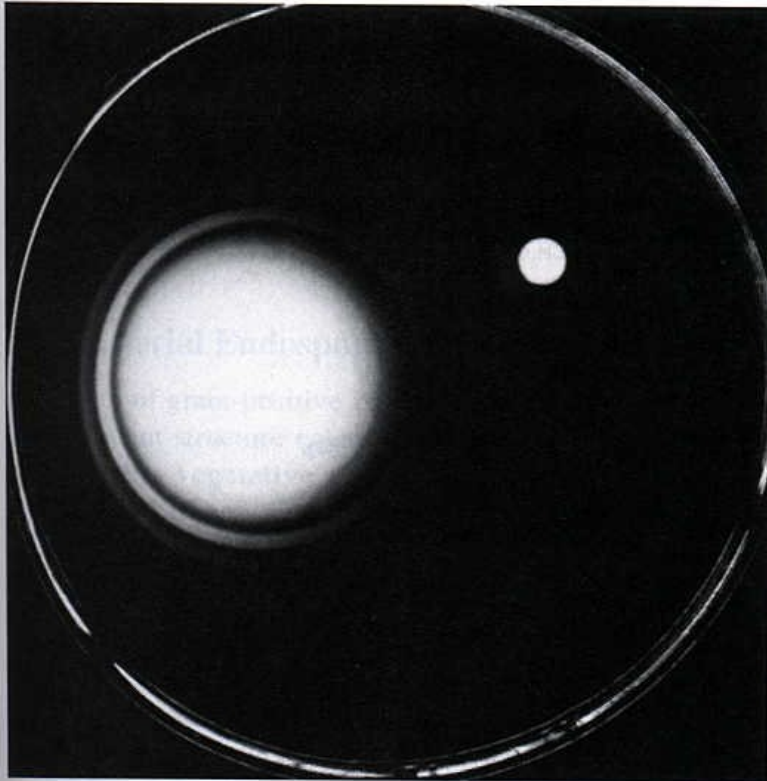


Figure 3.38 Positive Bacterial Chemotaxis. Chemotaxis can be demonstrated on an agar plate that contains various nutrients. Positive chemotaxis by *Escherichia coli* on the left. The outer ring is composed of bacteria consuming serine. The second ring was formed by *E. coli* consuming aspartate, a less powerful attractant. The upper right colony is composed of motile, but nonchemotactic mutants. The bottom right colony is formed by nonmotile bacteria.

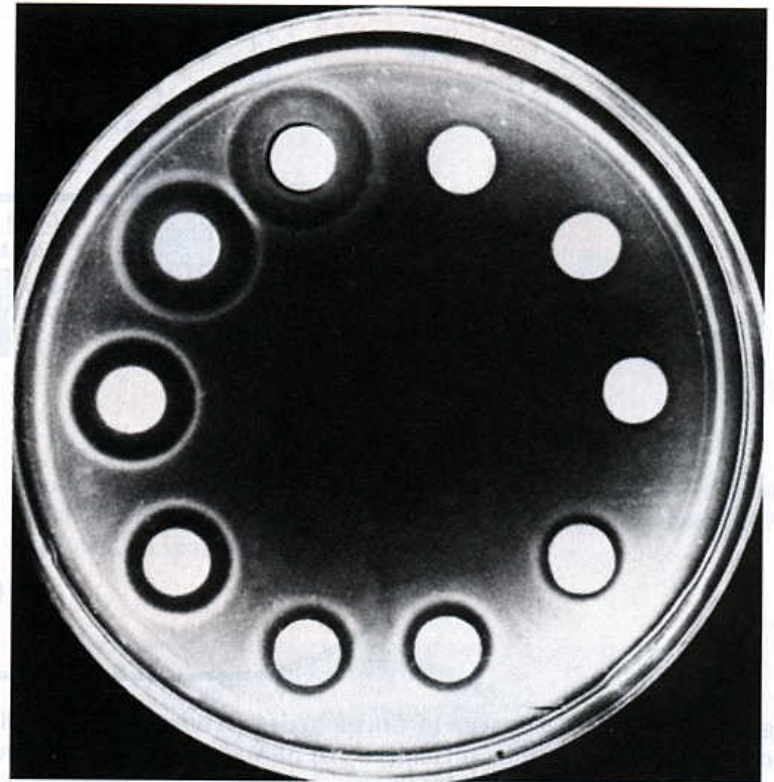


Figure 3.39 Negative Bacterial Chemotaxis. Negative chemotaxis by *E. coli* in response to the repellent acetate. The bright disks are plugs of concentrated agar containing acetate that have been placed in dilute agar inoculated with *E. coli*. Acetate concentration increases from zero at the top right to 3 M at top left. Note the increasing size of bacteria-free zones with increasing acetate. The bacteria have migrated for 30 minutes.

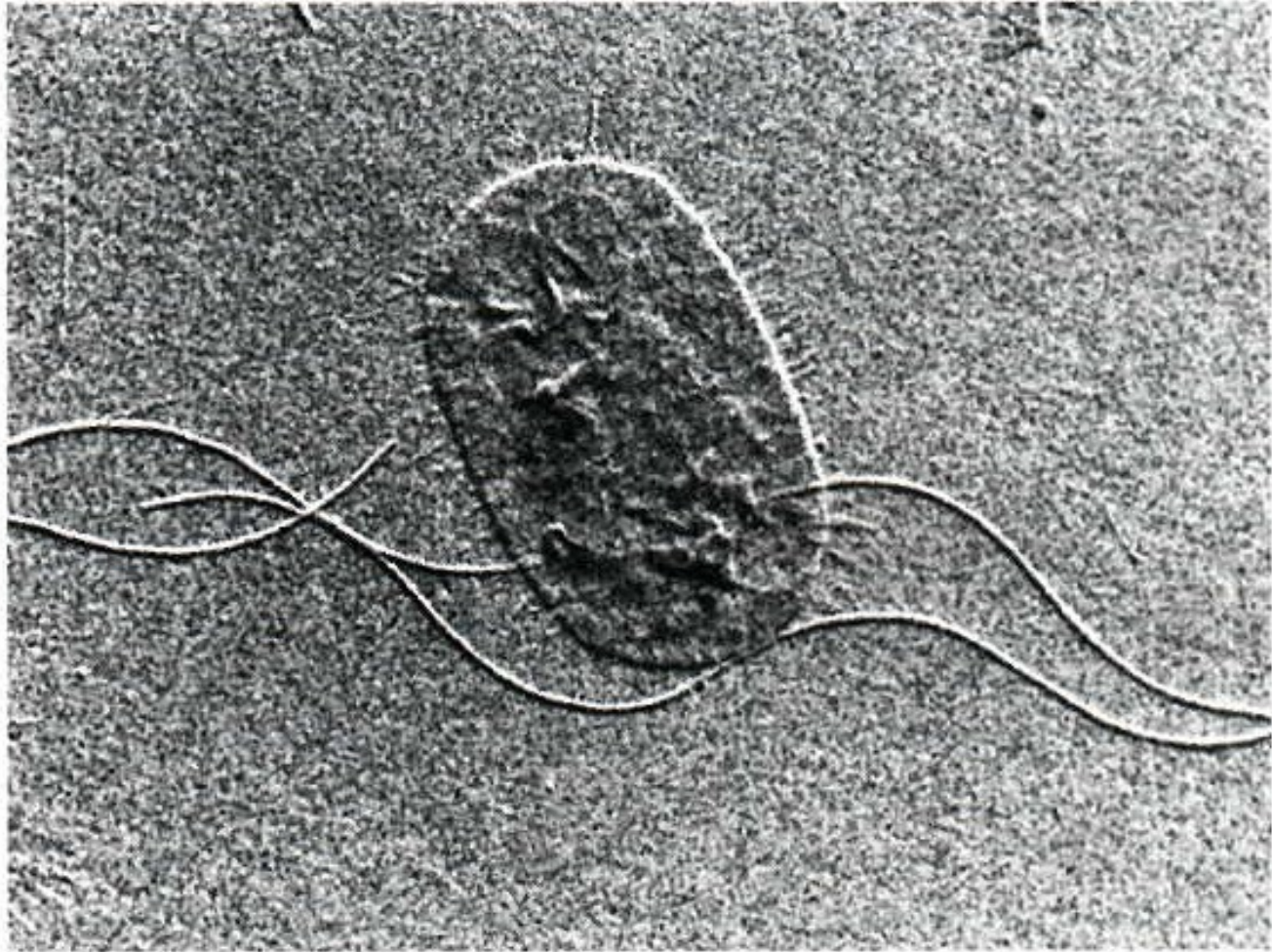
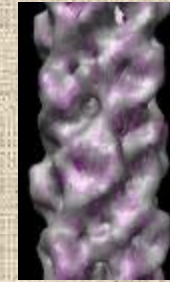


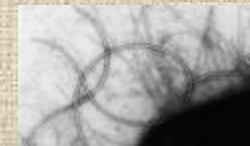
Figure 3.32 Flagella and Fimbriae. The long flagella and the numerous shorter fimbriae are very evident in this electron micrograph of *Proteus vulgaris* ($\times 39,000$).



PILI - fimbrie



- slouží k přenosu DNA konjugací, k přichycení fágů, různě velké, typicky u G-
- struktura B.S
- křehké, lámavé, různé morfologické typy – mnoho druhů
- duté, vždy nepohyblivá trubička
- jen G-, několik set



- stavba:
- 3, 4 nebo 5 vláken stočených do spirály
- pilin - rodově i druhově specifický, lineární sekvence proteinových podjednotek
- rozměry:
- kratší než bičík, nejdelší je maximum podélné osy buňky, $\text{Ø}2\text{-}8$ nm, délka 0,1 – několik nm, 3-5 molekul
- na celém povrchu či jen na určité části buňky

- Hemaglutinace
 - a. inhibována manosou (MSHA)
 - b. neovlivněna (MRHA)

- **fce :**
- uchycení k povrchům (adheze k nenabitým povrchům: G- drží lépe na podložním sklíčku lehkou jemnou vazbou)
- kontakt bakteriofága
- twitching motility

Příklady typů fimbrií:

I.

- kódované chromozomálně-specifická adherence
- specifická kolonizace u symbiontů, parazitů a patogenů (koregulace s tvorbou toxinu u *Vibrio cholerae* O1, *E.coli* – uropatogenní P pilus, adherentnce fimbrie + enterotoxin *E. coli* – obojí kódováno plazmidem)

II.

- sex fimbrie - kódované konjugativním plazmidem u donora DNA – 1ks, můstek pro plazmid (F pilus u *E.coli*, konjugativní plazmidy salmonel)

barvení : kys.fosfowolframová zachová podobu f., kys. osmičelová – f. ztlustí a zkrátí

IV.

„odskočení“ buněk streptokoků způsobuje „vroubkování“ kolonií

- http://parts2.mit.edu/wiki/index.php/PROJECT_PROPOSAL
- <http://www.webcom.com/alexey/moviepage.html>
- www.bact.wisc.edu/.../structure.html
- www.arn.org/mm/mm_movies.htm -
animace, pohyb bičíku
- <http://focosi.altervista.org/physiobacteria.html>
- www.sedin.org/mol_museum.html

Děkuji za pozornost