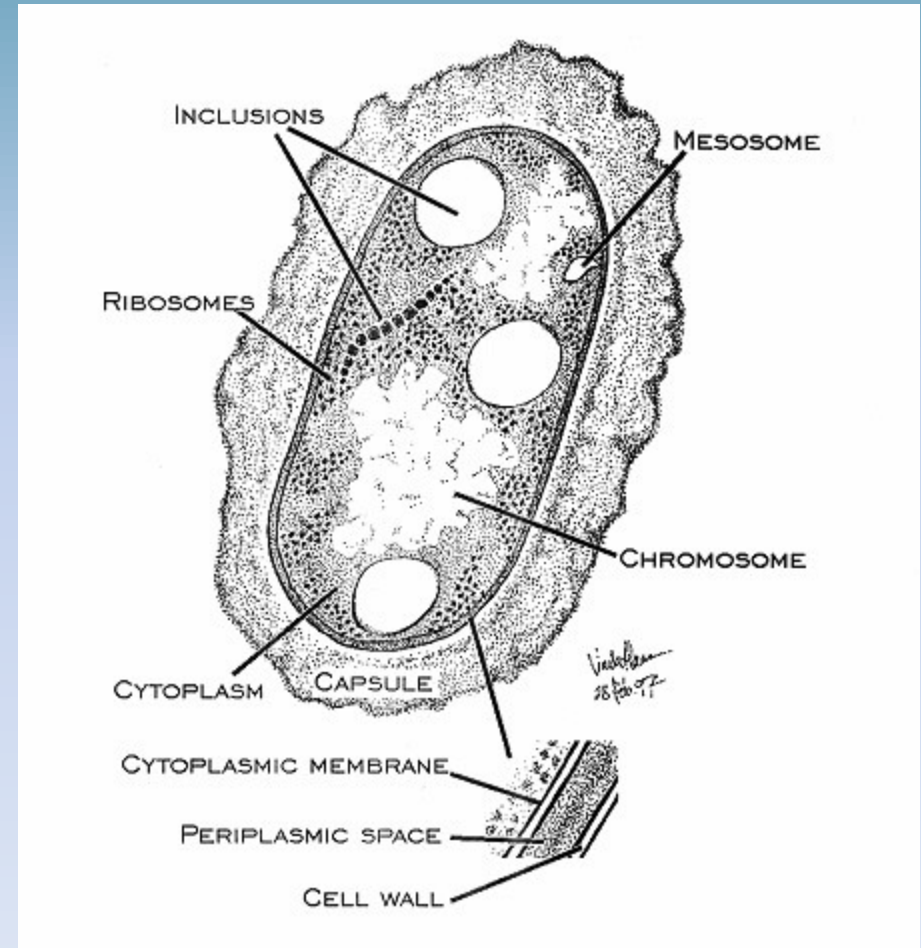


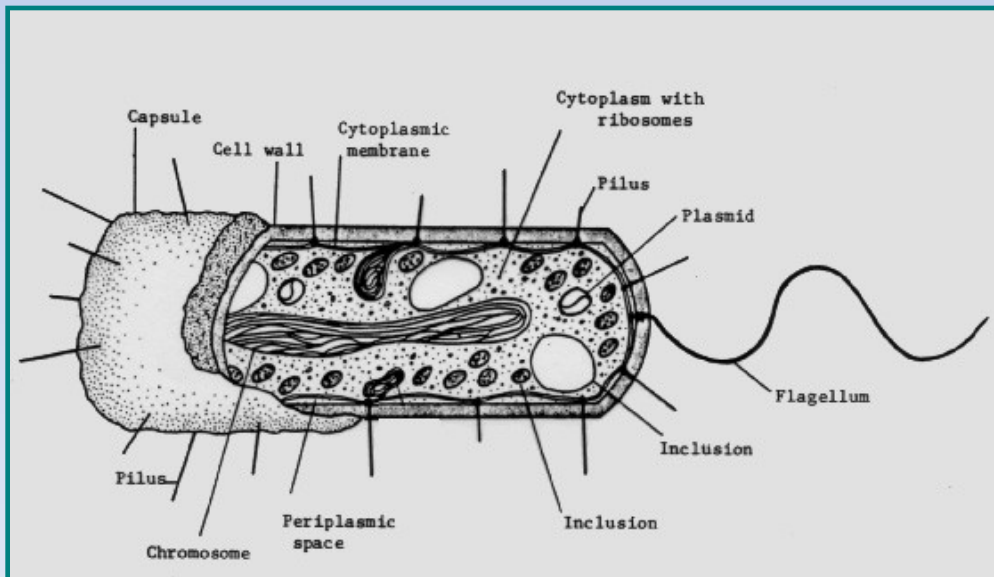
Struktury prokaryotické buňky

- Základní - esenciální
- Obvyklé
- nejsou nutné k přežití buňky, poskytují výhodu

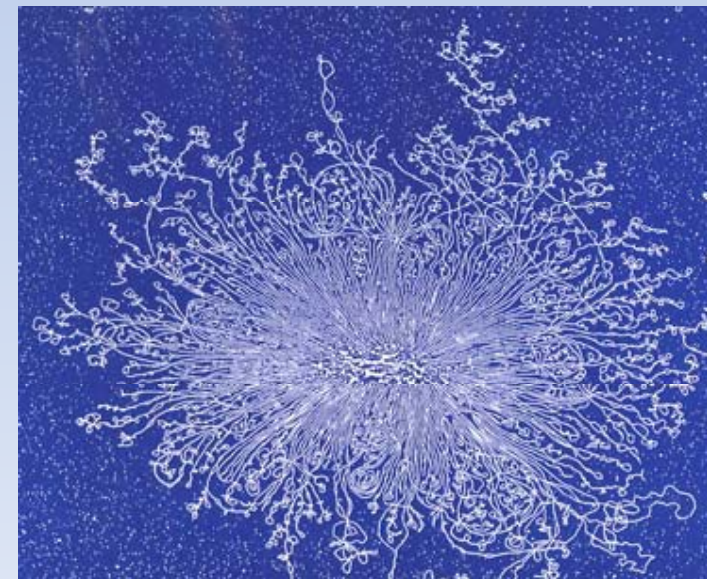


Základní struktury

- Cytoplazmatická membrána
- Nukleoid
- Ribozómy





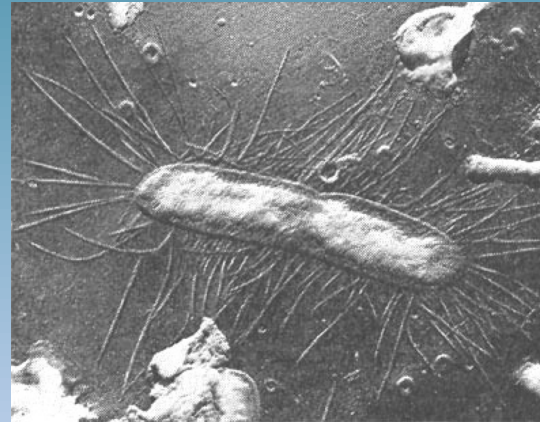
6.10.2015



Rozvinutý nukleoid *E.coli*

Obvyklé struktury

- Buněčná stěna
- Organely pohybu
- Fimbrie 
- Plazmidy
- Kapsuly, slizy
- Inkluze 



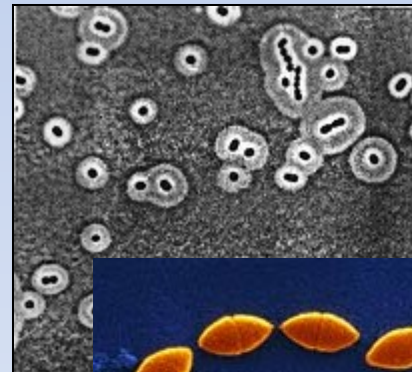
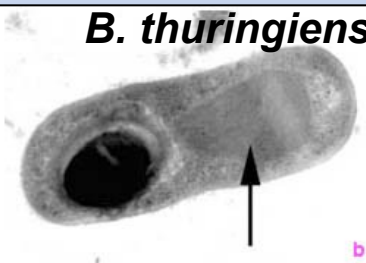
E.coli - fimbrie



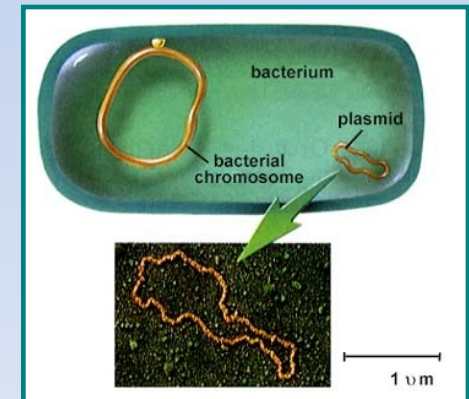
E.coli - bičičky

Parasporální
inkluzie

B. thuringiensis



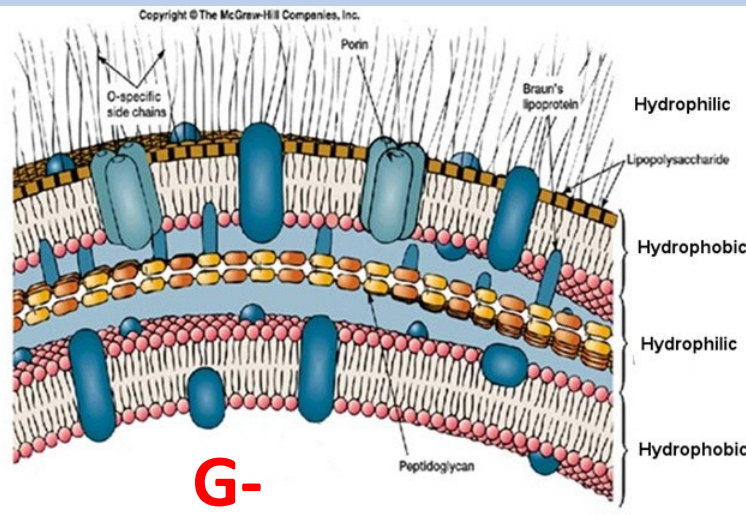
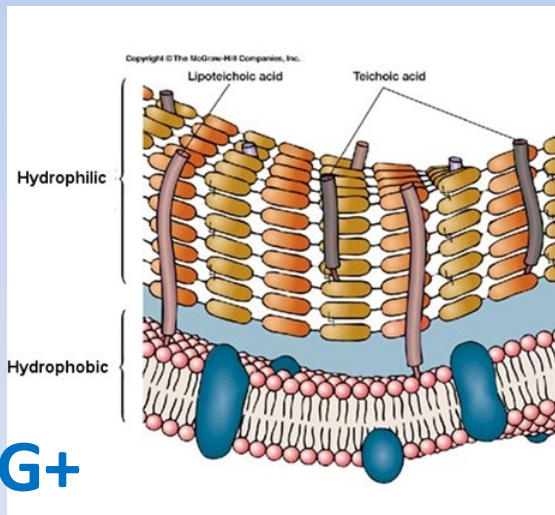
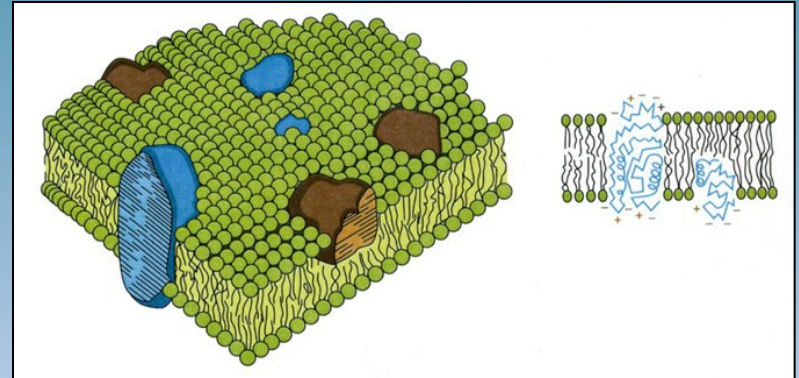
Streptococcus pneumoniae



replikony

Cytoplazmatická membrána

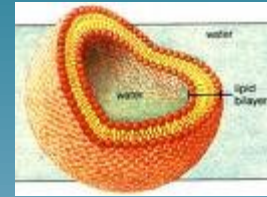
- Fluidní vrstva **fosfolipidů**
(jednoduchý řetězec, esterová vazba)
- *Archaea* – etherová v. !!
- Vnořené bílkoviny – mnoho proti Eucarya
- Semipermeabilní – transport




G- buňky
Lipid A
(toxin)

G- buňky
cytoplazmatická membrána
+ vnější membrána!!

Fosfolipid

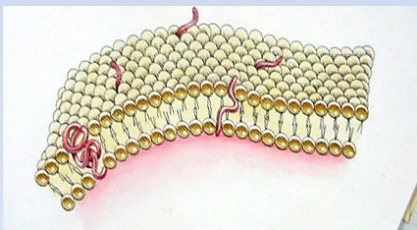
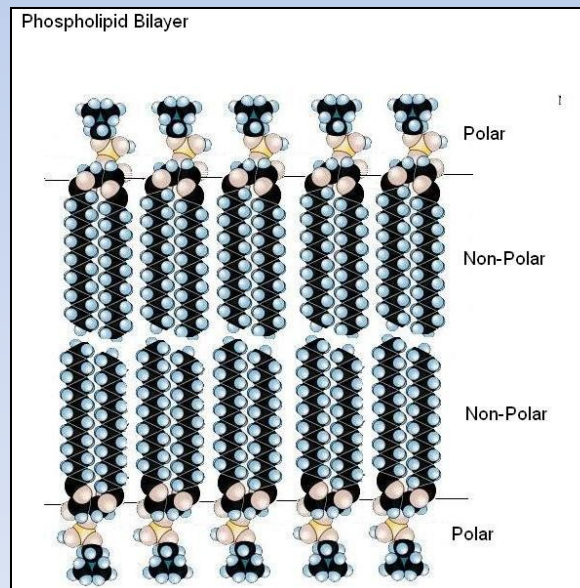
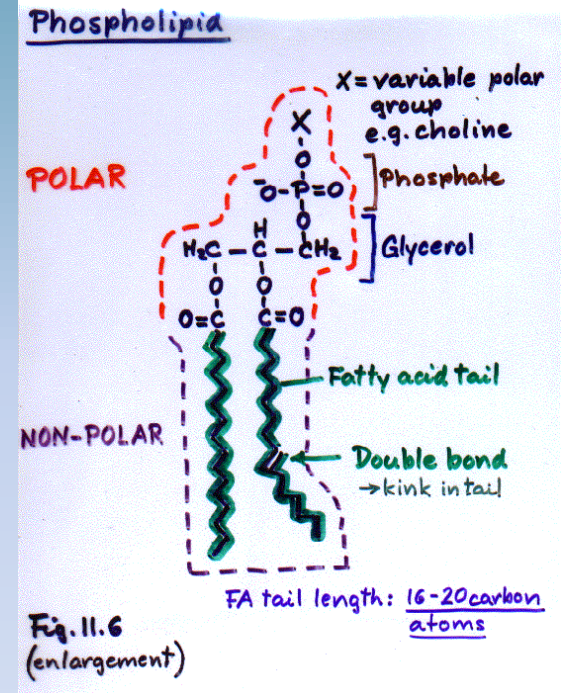


- 1) Fosfátová skupina vázaná na glycerol
- 2) 2 mastné kys.vázané na glycerol – 16-18C

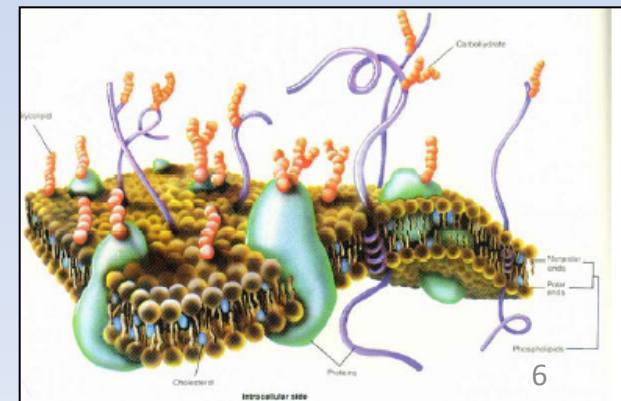
 - nasycené – snižují fluiditu

 - nenasycené – zvyšují

- **Hydrofobní složka** - nepolární
- Negativní náboj



- **Lipidy** – složení do urč.míry podle výživy a typu prostředí
- **Proteiny**
 - integrální - hydrofobní vazby, cca 70%
 - periferní – elstat.síly, H-můstky
- **Lipoproteiny** – lipid do periplazmy
- **Glykoproteiny a glykolipidy** – orientovány cukernou složkou vně membrány
- **Lipopolysacharidy** G-
- **Hopanoidy** – lipidy u 50% bakt.
- obdoba euk. sterolů

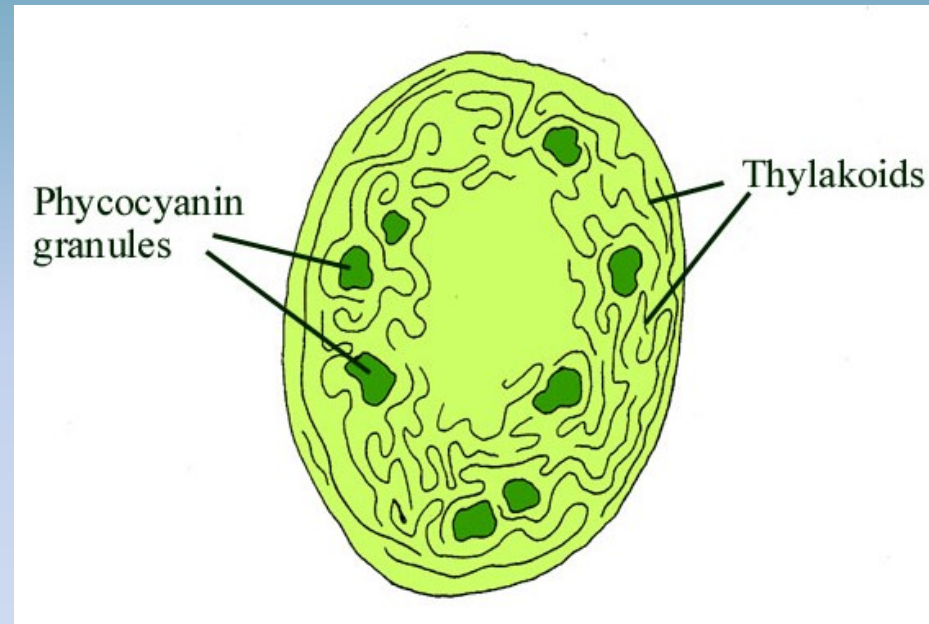
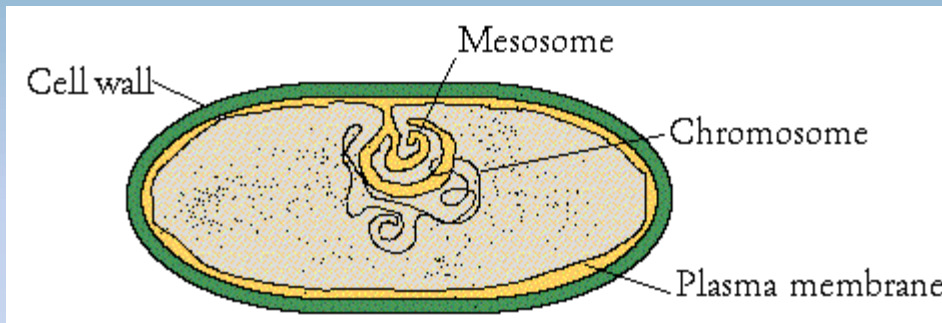


- **Bílkoviny pevně vázané – enzymy**
(ATPáza, nukleáza, fosfatázy), **transportéry, strukturální.**
- **Volné bílkoviny** – fosfatázy
- **Inducibilní složky membrány** existují, dokud existuje spouštěcí faktor syntézy
= bílkovinné spektrum proměnlivé
- **Invaginace**

Pozn: Membránou obdány i některé typy **inkluzí** (glykogen, PHB, S, plyn. vakuoly, karboxyzomy) – 1 vrstevná!!

Funkce cytoplazmatické membrány

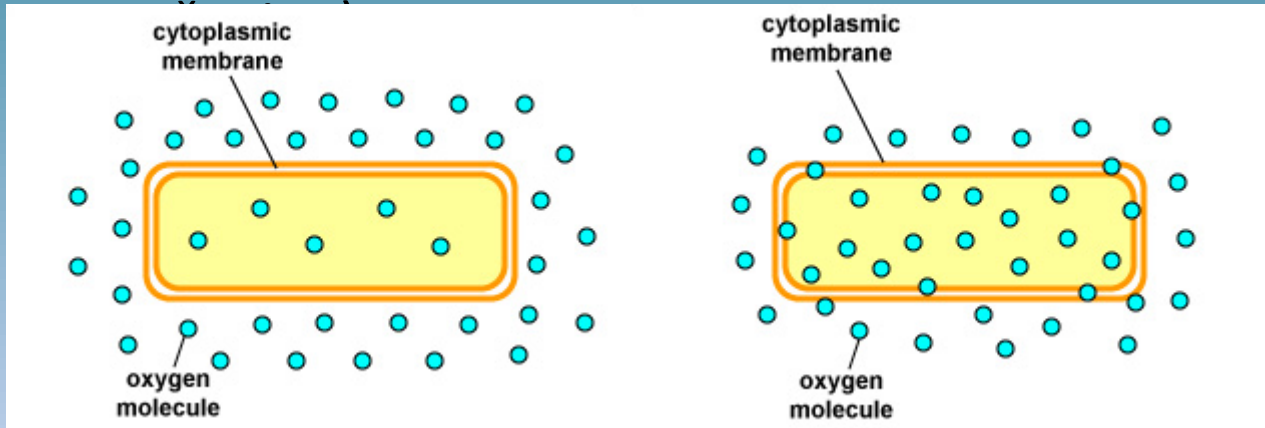
- **Bariéra; receptory; antigeny**



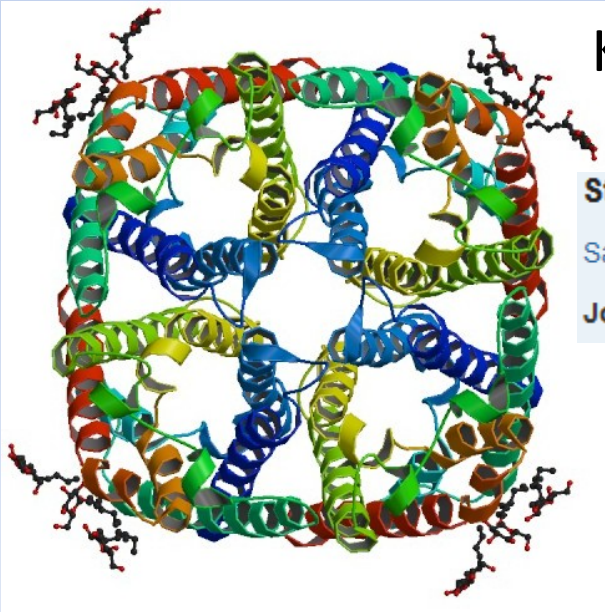
- **Transport** – prostá difúze
zprostředkovaná difúze
aktivní transport

1) Prostá difúze

Plyny (N_2 , O_2 , CO_2), malé polární molekuly bez náboje (etanol, voda,



<http://faculty.ccbcmd.edu>



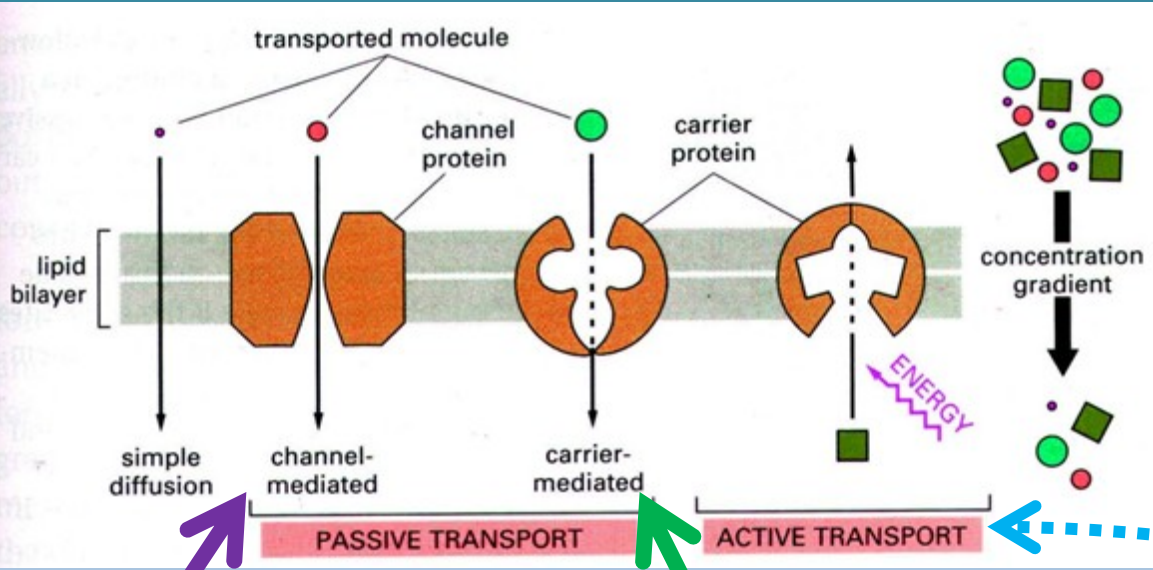
Krystalová struktura AqpZ

Structural context shapes the aquaporin selectivity filter.

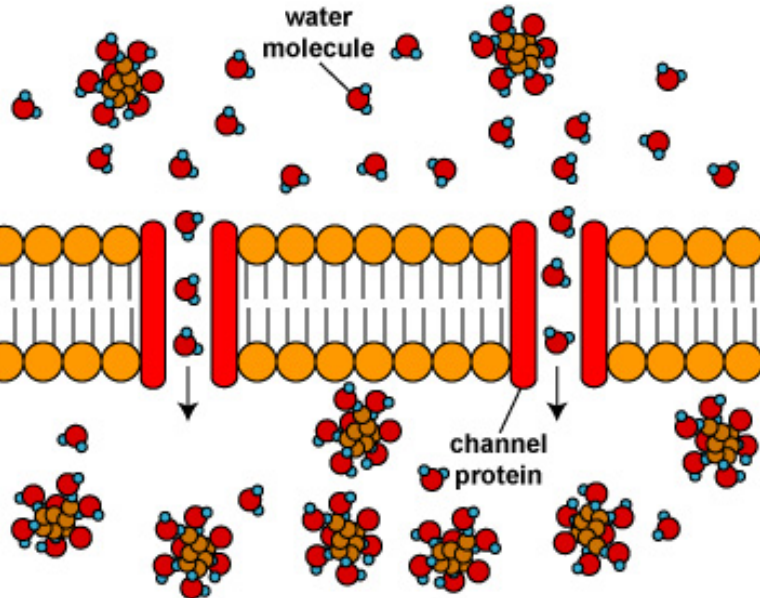
Savage, D.F. ¹, O'Connell, J.D. ², Miercke, L.J. ³, Finer-Moore, J. ⁴, Stroud, R.M. ¹

Journal: (2010) Proc.Natl.Acad.Sci.USA **107**: 17164-17169

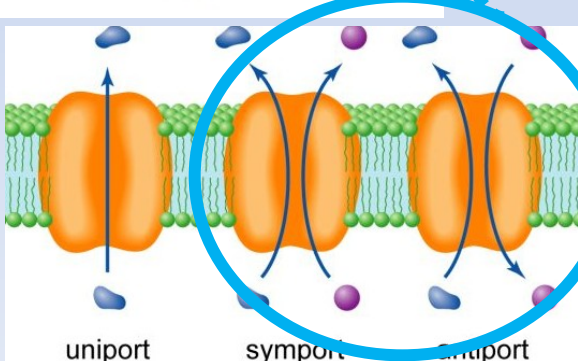
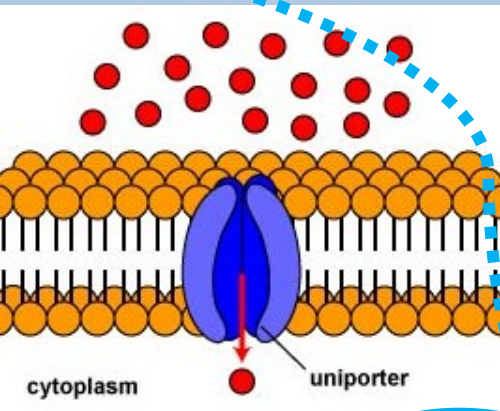
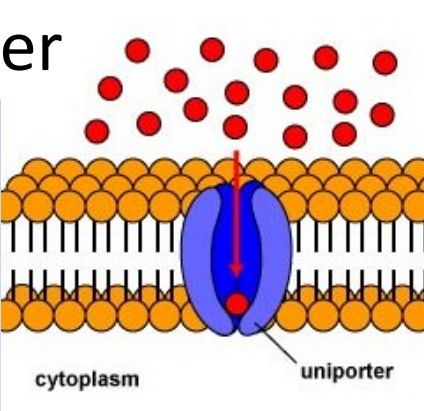
2) Zprostředkovaná difúze



kanál



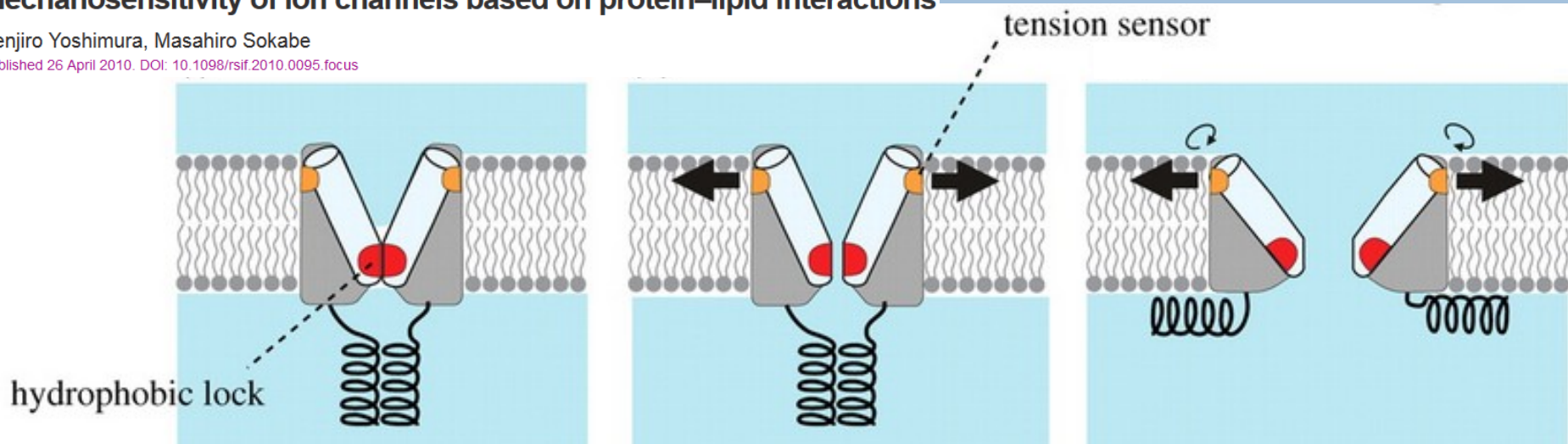
uniporter



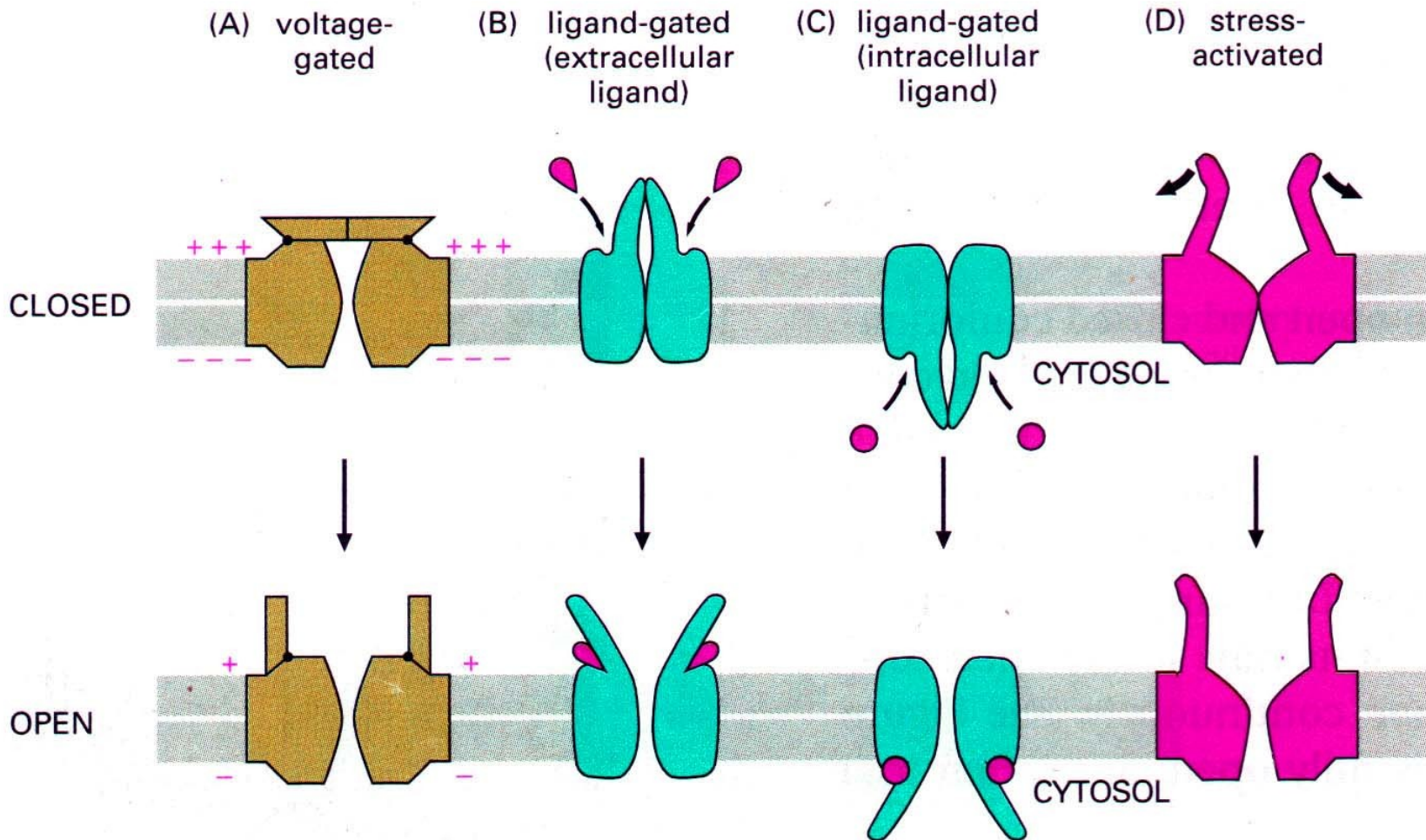
Msc channels – mechanosenzivní – reagují na zvýšení turgoru buňky zvětšením velikosti póru – adaptace na osmotický stres - MscL – *E. coli*

Mechanosensitivity of ion channels based on protein–lipid interactions

Kenjiro Yoshimura, Masahiro Sokabe
Published 26 April 2010. DOI: 10.1098/rsif.2010.0095.focus



A) KANÁLY hradlové mají specifitu!!



KANÁLY hradlové

- otevřenost je **regulována**
- mají specifitu – pomocí vazebných míst rozpoznávají ionty
- část polypeptidického řetězce = **uzavíratelé hradlo**
- hradlo regulováno:
 - **napětím**
 - **chemicky**
 - **mechanicky**
- specifické **iontové kanály** slouží pro rychlý průchod iontů jako **Na⁺, K⁺** a **Cl⁻**
- Příklad: K⁺ pasivně difundují z cytoplasmy do extracelulárního prostoru přes transmembránové proteiny
 - tetramery řízené el. polem

B) KANÁLY prosté



- **stále otevřené** válcové struktury s centrálním vodním kanálem
- **neregulovány**
- př: **poriny** β vnější membrány
 - maltoporin umožňující difúzi maltodextrinů

Maltoporin
v komplexu
s maltodextrinem
(6 Glu jednotek).

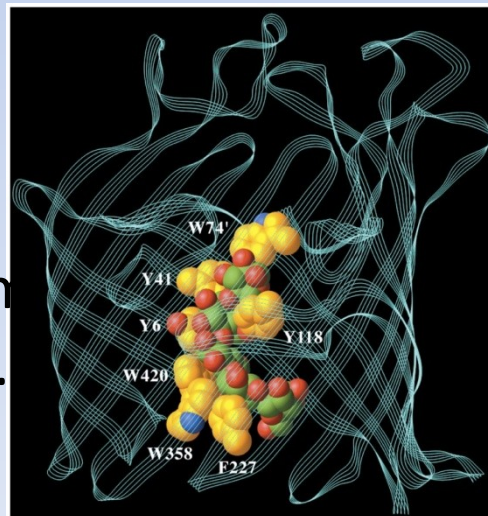


Figure 10-6 Fundamentals of Biochemistry, 2/e

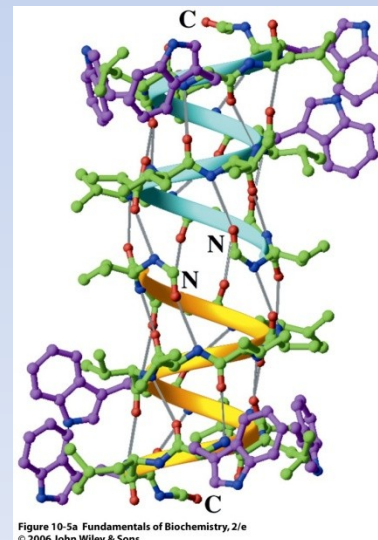
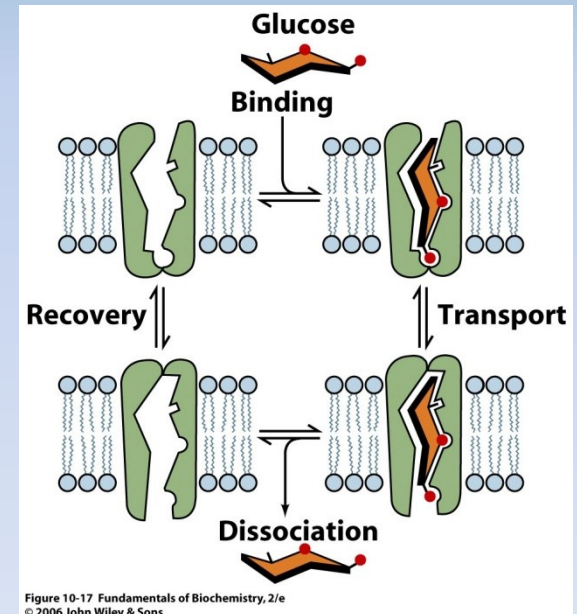
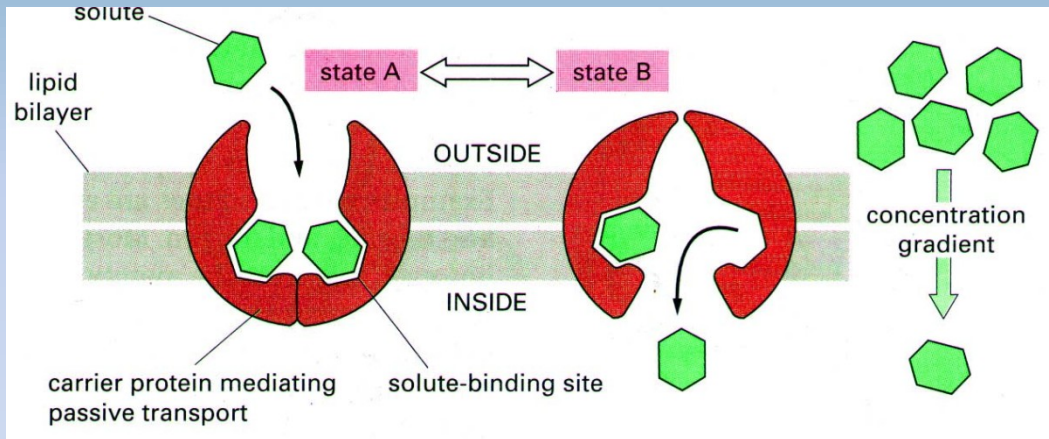


Figure 10-5a Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

Dimer
Gramicidinu
A
tvoří kanálek
pro
transport
lontu K^+

Proteinové nosiče, přenašeče

- Malá konformační změna přenašeče
 - následuje návrat do původní konformace



Model
transportu
glukosy

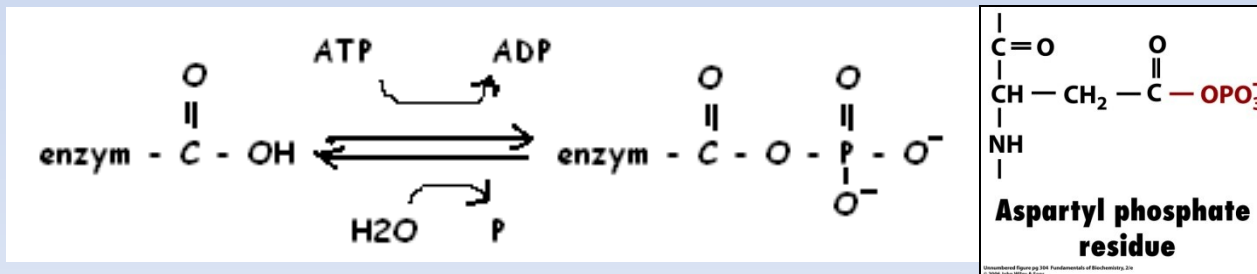
Proteinové nosiče, přenašeče

- **a) pasivní** = zprostředkovaná difúze – netřeba energie, nevede k zakoncentrování přenášené látky

3) Aktivní transport

- **b) aktivní** = aktivní transport vede ke kumulaci látky, transport proti koncentračnímu spádu za spotřeby ATP
 - l) **primární** – zdroj energie nesouvisí s dalším průběhem přenosu

ATPázy – přenáší ionty; fosforylovaný enzym = meziprodukt při hydrolýze



*Fosforylace
probíhá na zbytku
kys. asparagové*

☹ *Inhibováno
vanadičitanem
– zapojuje se namísto P*

Příklady primárních aktivních nosičů

- **ABC transportéry** – motivy vážící ATP a štěpící je při příjmu látky; u bakterií **stovky typů pro transport živin, vitamínů**

Př: (*E. coli* tak přijímá vit. B₁₂ z prostředí), export toxinů

- **F₀F₁ ATPáza** –

F₀ dává enzymu citlivost, kruh z 12ti C kanálem pro H⁺

F₁ katalytická fce střídajících se podjednotek α a β

- syntéza nebo hydrolýza ATP

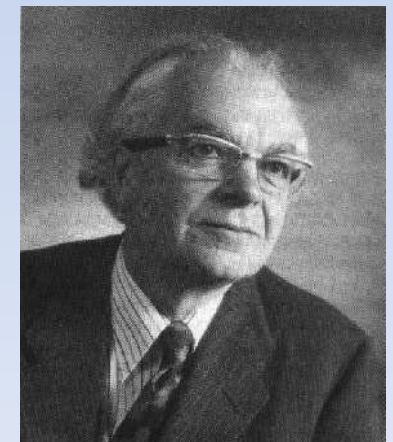
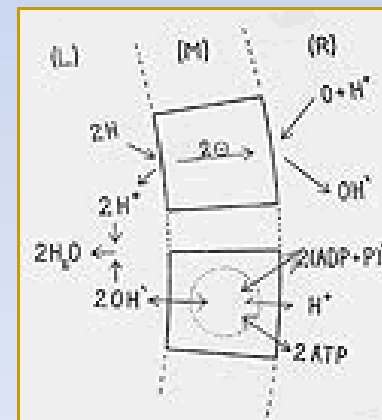
- hydrolyzuje ATP i po izolaci z membrány

- u *E. coli* je z osmi podjednotek

(3x α , 3x β , γ , δ)

kódováno operonem *unc*

- Mitchellova chemiosmotická teorie

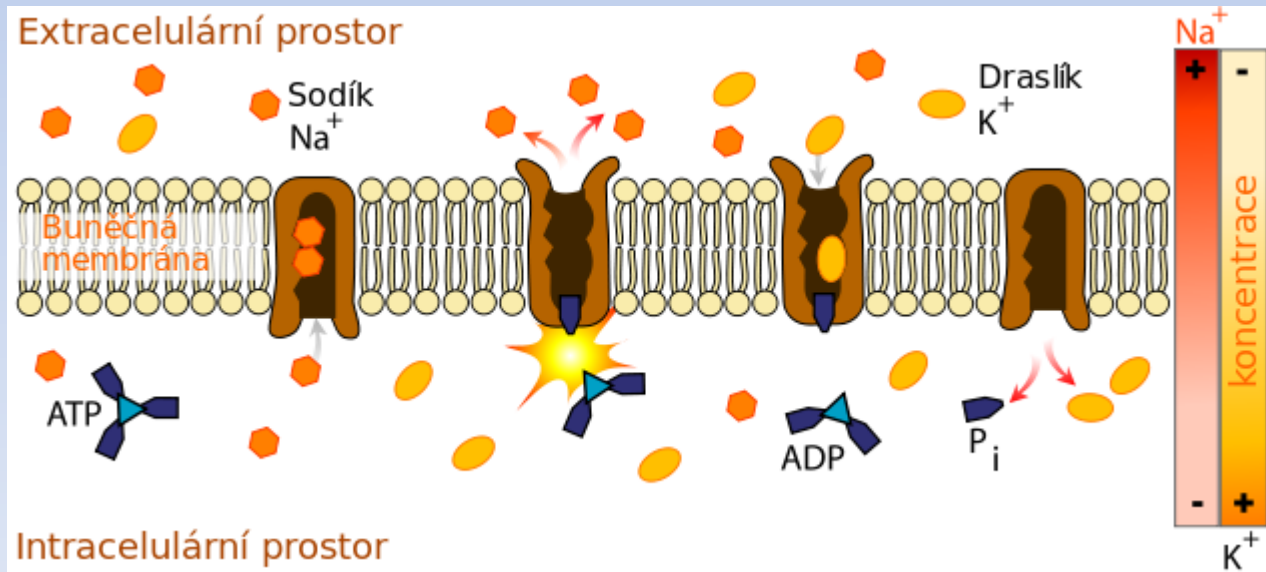
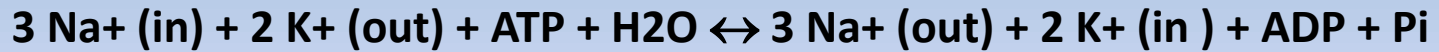


- II) sekundární

- proces spojen se změnou koncentrace na membráně
- volná E využita pro transport neutrálních molekul proti koncentračnímu spádu

(symport, antiport)

Na⁺K ATPáza (sodno-draselná pumpa) – symport Na⁺ a Glu, zároveň antiport Na⁺ a K⁺



Aktivní transport:

ATPázy

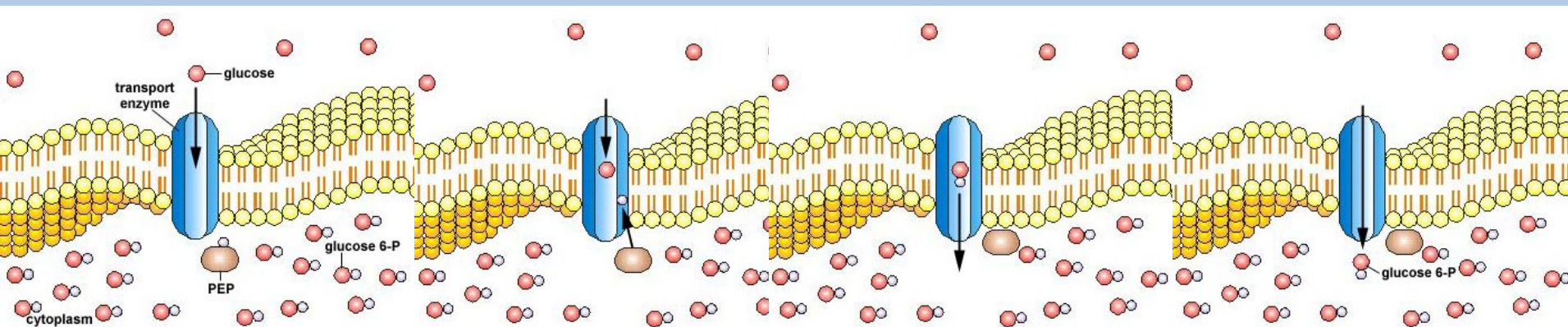
Symport

Antiport

Skupinová translokace

Skupinová translokace

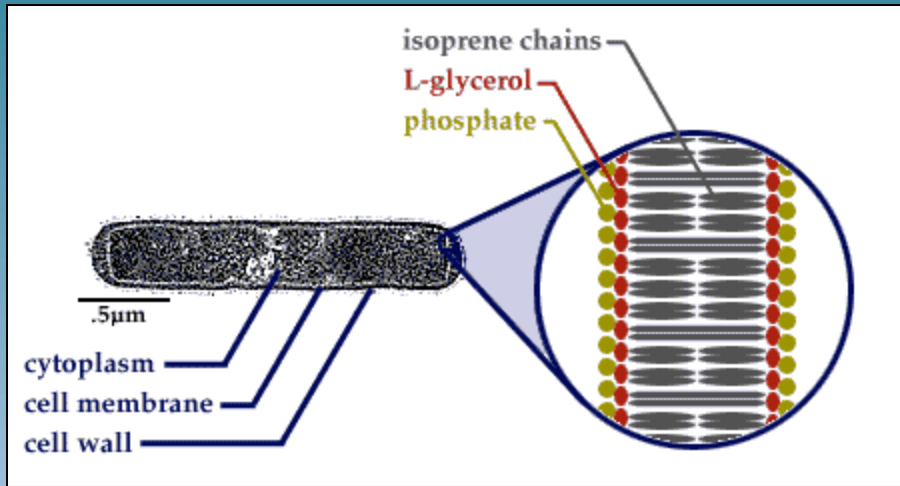
- méně častá
- při transportu **substrát chemicky modifikován** (dostane se do buňky a zůstává v ní)
- př: fosfotransferázový systém
 - fosforylace substrátu; akumulace PEP
 - (přináší do buňky cukry proti koncentračnímu spádu)



Vysokoenergetická fosfátová skupina je z fosfoenolpyruvátu přenesena na glukózu za tvorby glukóza-6-fosfátu

Transport s lokální přestavbou membrány

- přes membránu transportovány i velké molekuly
- přestavbou membrány vzniká váček
- málo časté, neprostudované
- př: transport NK



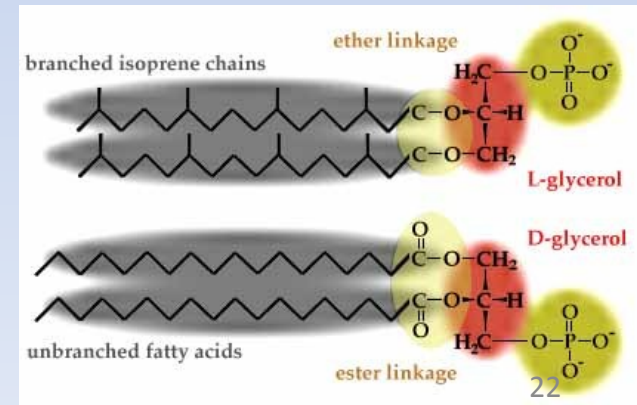
Cytoplazmatická membrána archeí

Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy, větvené lipidy,
mnoho proteinů v membráně

FOSFOLIPID:

- (1) **chiralita glycerolu** (L-glycerol; dáno enzymy)
 - (2) **etherové vazby** - glyceroldiether, tetraether = jiné chem.vlastnosti fosfolipidů
 - (3) řetízky větvených **isoprenoidů** namísto MK
- Nepřítomnost sterolů**

jednovrstevná – diglycerol tetraether



Buněčná stěna

- Peptidoglykan 

Glykan – cukerná složka, NAG, NAM

N-acetylglukózamin+N-acetylmuramová k.,

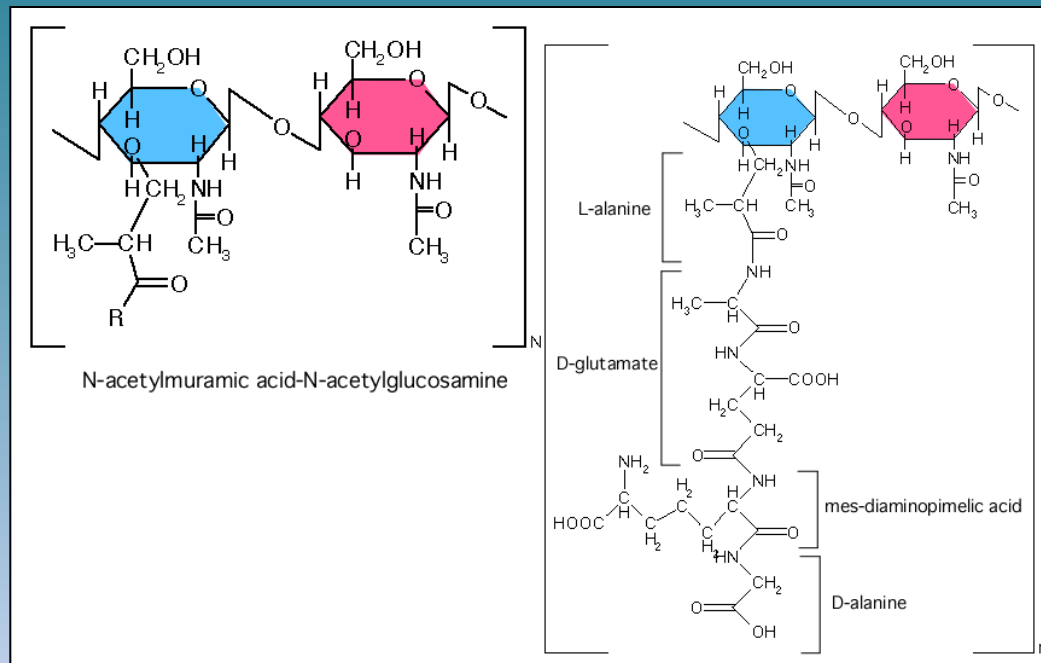
β -1,4-glykosidická vazba – kostra = opakování aminocukrů

Peptid – tetrapeptid – L-ala – D-glu – R – D-ala

R = DAP – pouze v b.s., taxonomický znak u aktinobakterií, LL DAP, meso DAP

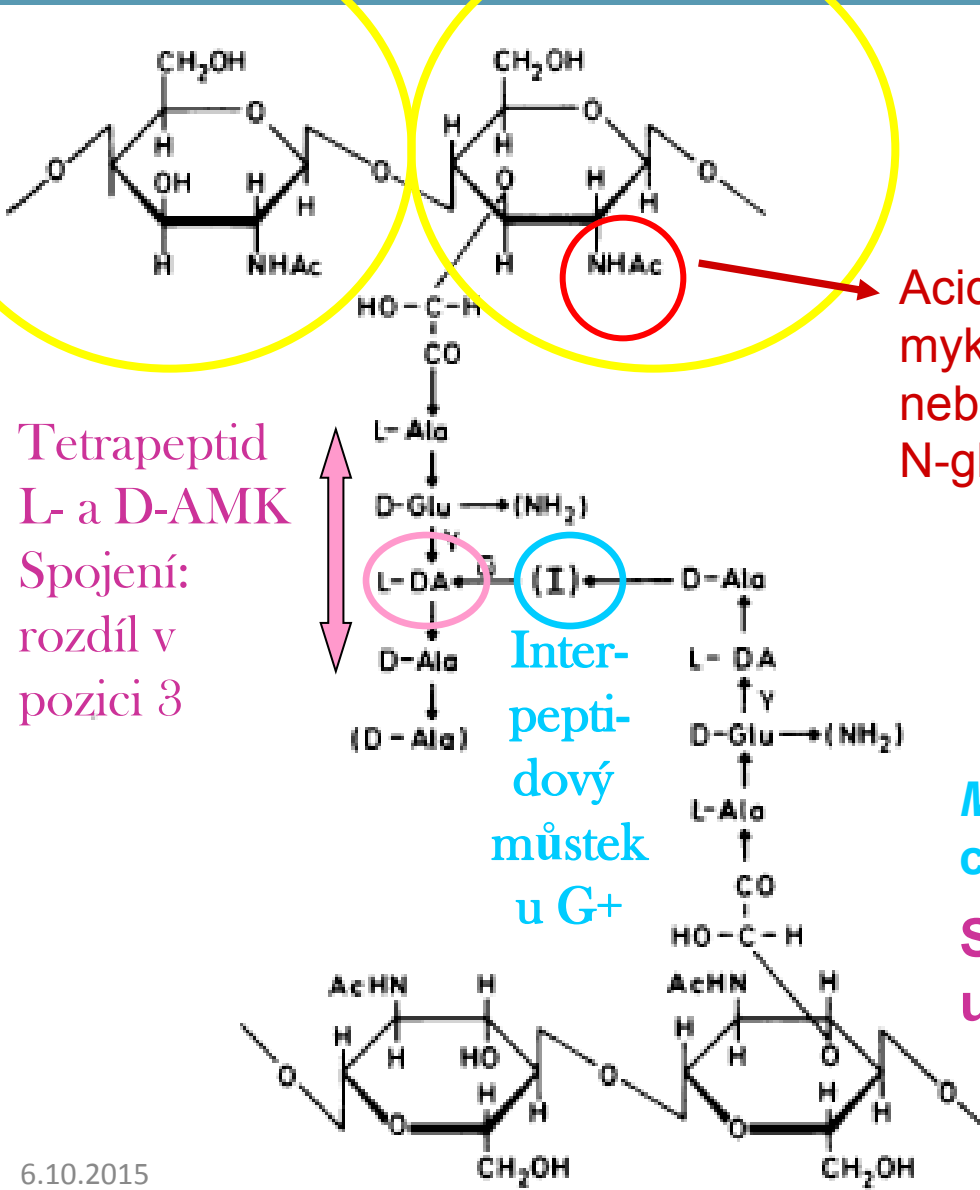
G+ :R = lysin větš., tetrapeptidy spojeny pentapeptidem

G- :vždy DAP a meso-DAP, tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP



Peptidoglykan = uniformní disacharid
N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová

Vztah mezi tvarem buňky a počtem disacharidových jednotek v peptidoglykanu (10 - 65)



Acidorezistentní mykobakteria, nokardie..
 nebarvitelné Gramem:
 N-glykolylmuramová

CHEMOTAXONOMIE:

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

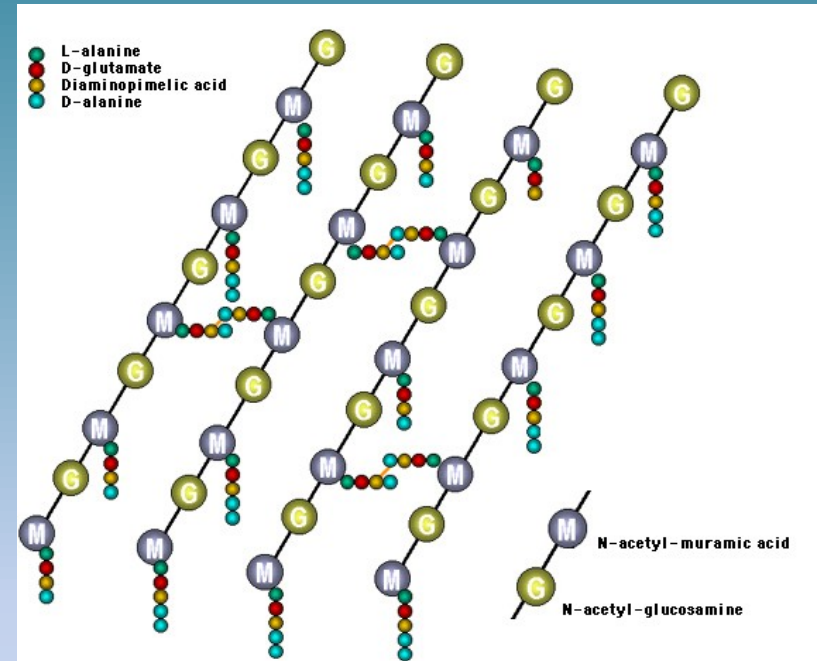
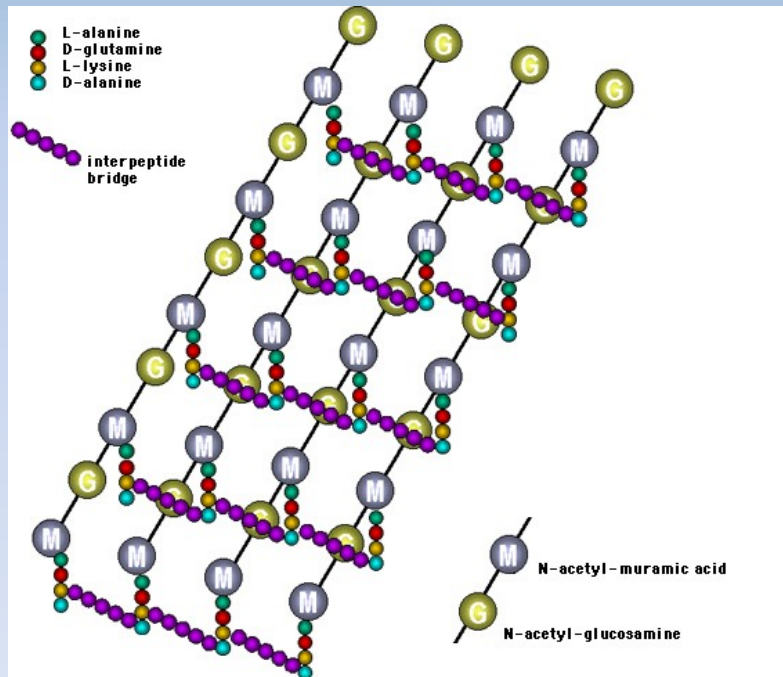
Micrococcaceae – až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!

Peptidoglykan

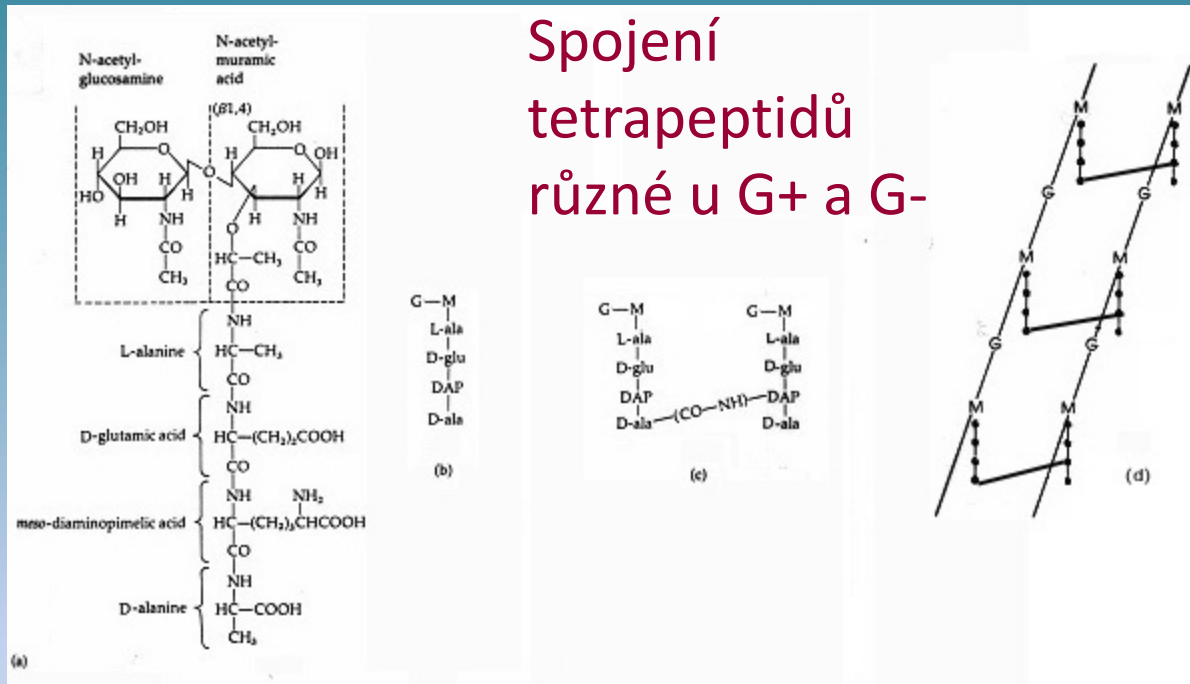
G+



G-

G+ : tetrapeptidy spojeny pentapeptidem
G- : tetrapeptidy spojeny přímo D-ala na DAP

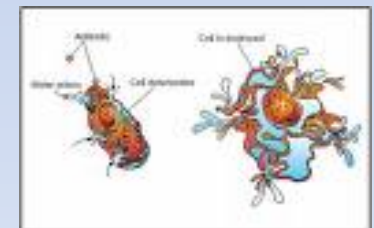
Spojení tetrapeptidů různé u G+ a G-



Polymer



- **Lysozym** – štěpí vazbu mezi aminocukry; = působí na hotovou stěnu
- **Penicilin** – brání spojení tetrapeptidů = působí při syntéze stěny
- **Bacitracin** - cyklický polypeptid blokující defosforylaci fosfolipidu, potřebného pro transportní funkci během výstavby *buněčné stěny*.



Taxonomický význam

- Barvení buněčné stěny
- Chemotaxonomie složek stěny a membrány



Význam struktury peptidoglykanu v taxonomii bakterií

■ **diaminopimelové kyseliny**

■ přítomny pouze v buněčné stěně – průkaz z celé buňky

■ G- buněčná stěna jednotného charakteru, bez DAP nebo stopy meso-DAP

G+

■ přítomnost či nepřítomnost DAP charakteristická

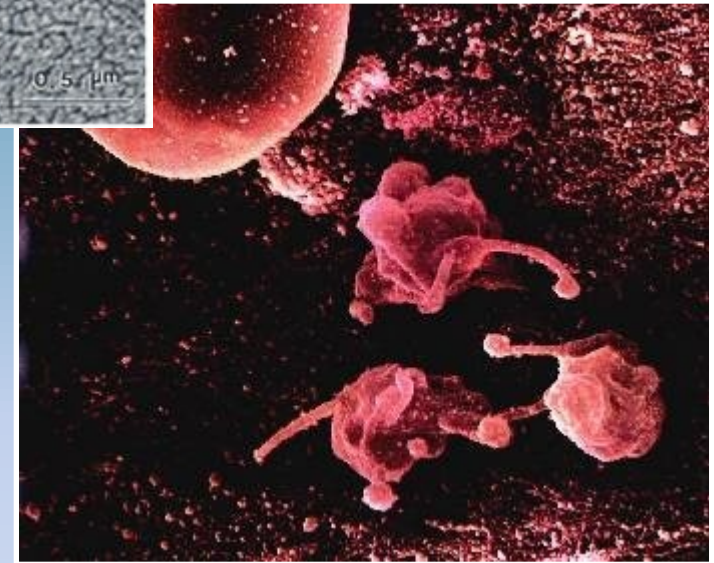
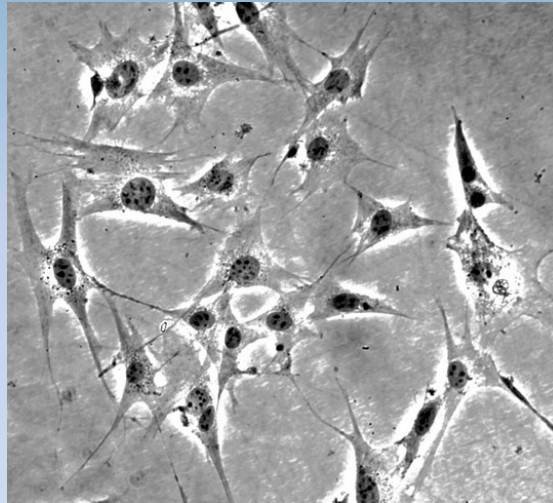
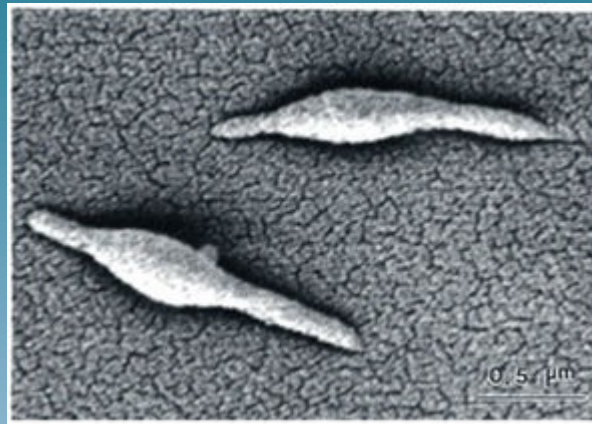
■ např. nokardioformní aktinomyceety, mykobakteria – meso-DAP

■ streptomyceety – LL-DAP

■ *Micrococcaceae* – bez DAP, L-lysin



- Mykoplazmata
- bez b.s.



Patogeny - např: plicní nákaza skotu (pleuropneumonie)

Mykoplazmata jsou tvořena pouze plazmatickou membránou, chromozómem prokaryotického typu, ribozómy a základní cytoplazmou; postrádají pevnou buněčnou stěnu ostatních prokaryot. Jsou to nejmenší živé buňky (cca 0,12 μm v průměru) a obsahují jen asi 20 % DNA ve srovnání s bakteriální buňkou *Escherichia coli*. Tato genetická informace se blíží minimálnímu množství nezbytnému k zajištění základního metabolického vybavení pro život buňky.

Tab. 1 – Klasifikace mykoplazmat

Říše	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Firmicutes</i>
Třída:	<i>Mollicutes</i>
Řád:	<i>Mycoplasmatales</i>
Čeleď:	<i>Mycoplasmataceae</i>
Rod:	<u><i>Mycoplasma</i></u>
Druh:	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Mycoplasma penetrans</i> <i>Mycoplasma fermentans</i> a další
Rod:	<u><i>Ureaplasma</i></u>
Druh:	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (dříve <i>Ureaplasma urealyticum</i> biovar 2) <i>Ureaplasma parvum</i> (dříve <i>Ureaplasma urealyticum</i> biovar 1)

nejmenší známý mikroorganismus
schopný samostatného života

- netvoří peptidoglykan

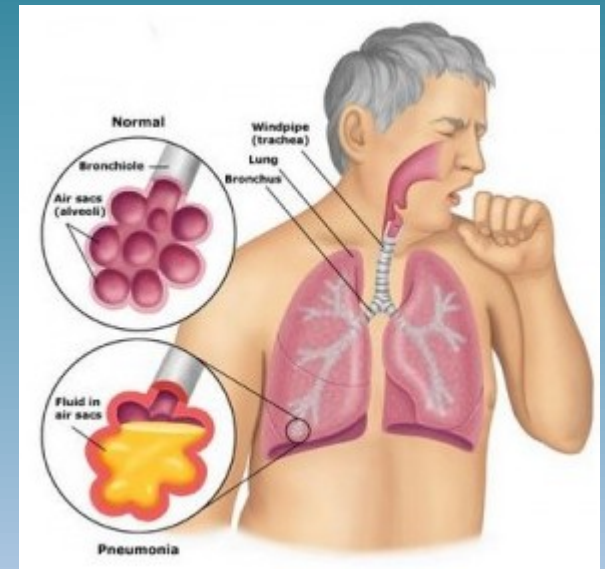


Během evoluce se objevily mnohonásobné redukce velikosti genomu a byl pozměněn i genetický kód. Celkové tempo evoluce je necharakteristicky vysoké. Jediným předpokládaným významem redukce velikosti genomu je evoluce Mollicutes na striktní parazity, jejichž velká část metabolické mašinerie zakrněla.

<http://www.zdravotnickenoviny.cz>

6.10.2015

M. pneumoniae je nejvýznamnějším patogenem lidského respiračního systému (faryngitis, tracheobronchitis, bronchitis, bronchiolitis, pneumoniae, pneumonitis, otitis acuta, bulózní hemorrhagická myringitis)



M. hominis vyvolává např. lidskou primární atypickou pneumonii (PAP), meningitidu, ...

M. genitalium, *M. urealyticum*

Acidoresistentní bakterie nebarvitelné Gramem

Buněčná stěna:

- Obsah lipidických látek
 - hl. **mykolové kyseliny**
(3-OH mastné kyseliny s dlouhým C řetězcem na pozici 2).
 - **Délka řetězce specifická.**
- PŘ: mykobakterie, nokardioformní aktinomycety, korynebakterie
- Mykolyl-arabinogalaktan tvoří lipidickou bariéru – brání penetraci kyseliny
- B.s. acidorezistentních bakterií se neodbarvují kyselým alkoholem (1. stupeň acidorezistence) a 1% HCl (2. stupeň acidorezistence) po obarvení karbolfuchsinem

Odlišnosti ve složení peptidoglykanu

- přítomnost amidických skupin na glutamátu i na meso-DAP v peptidech opakující se peptidické podjednotky
- přítomnost 2 typů mezipeptidového spojení – D-ala-meso-DAP a meso DAP-DAP, 70% meso DAP-DAP – pouze u mykobakterií
- N-glykolylmuramová kyselina místo
N-acetylmuramové

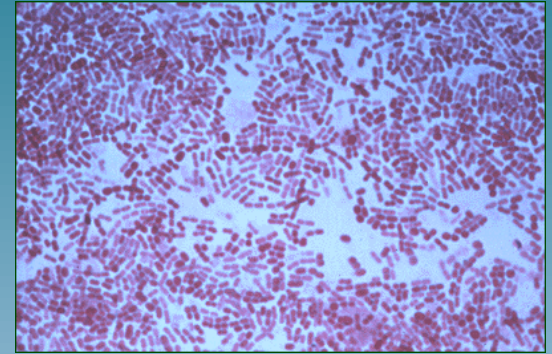
(DAP - kyselina diaminopimelová)

Postup Ziehl-Neelsenova barvení:

- 1) Příprava plamenem fixovaného preparátu
- 2) Převrstvit koncentrovaným karbolfuchsinem
- 3) Zahřát do výstupu par, pak 3 – 5 minut – nesmí vařit
- 4) Oplach kyselým alkoholem (dvakrát max. 15s)
- 5) Dobarvit Löfflerovou methylenovou modří – 30s
- 6) Oplach vodou

Mycobacterium

acidorezistence 1.stupně – po 1.obarvení bazickým barvivem (fuchsin) se již neodbarví kyselinou ani alkoholem



- **Hydrofobní buněčná stěna**

- problém s transportem Fe

→ siderofory – chelatizují Fe - exocheliny – extracelulární
- mykobaktiny – uvnitř buňky

- **Pomalý růst – 3-9 týdnů**

- zpomalení transportu přes hydrofobní povrch

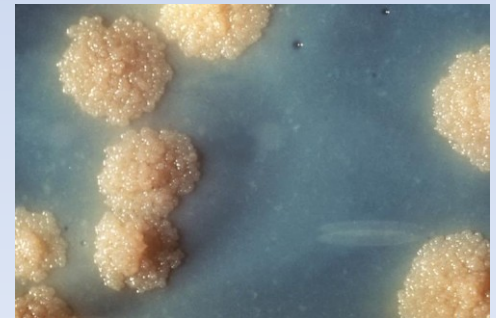
- RNA-pol – nižší reakční rychlost (pomalejší syntéza RNA)

- nízký poměr RNA/DNA – pomalejší syntéza proteinů

Mycobacterium tuberculosis – patogen člověka

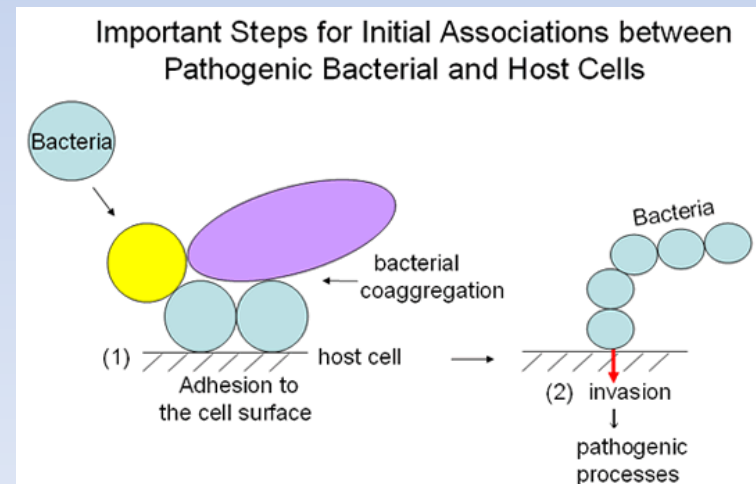
Mycobacterium africanum – patogen člověka

Mycobacterium bovis - patogen skotu i člověka



Adheze bakterií

- **Interakce s povrchy** – biotickými i abiotickými
- Bakterie evolučně úspěšné – kolonizují všechny niky...
- Research topic (pubmed 120-200 publikací/rok)
- Jeden z **faktorů virulence**



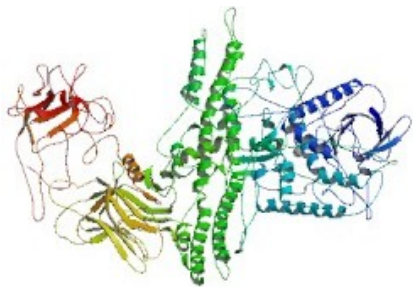
Adheze – poskytuje mikroorganismům výhodu v přežití

- lepší dostupnost a využitelnost substrátu
- adsorpce makromolekul a malých hydrofobních molekul na povrch
- lepší využitelnost koncentrovaných živin
- ochrana před inhibičními účinky antibakteriálních látek (antibiotika, chlor, těžké kovy)
- ochrana před bakteriofágy a parazitickými bakteriemi

Má však i nevýhody – př. potlačení pohyblivosti

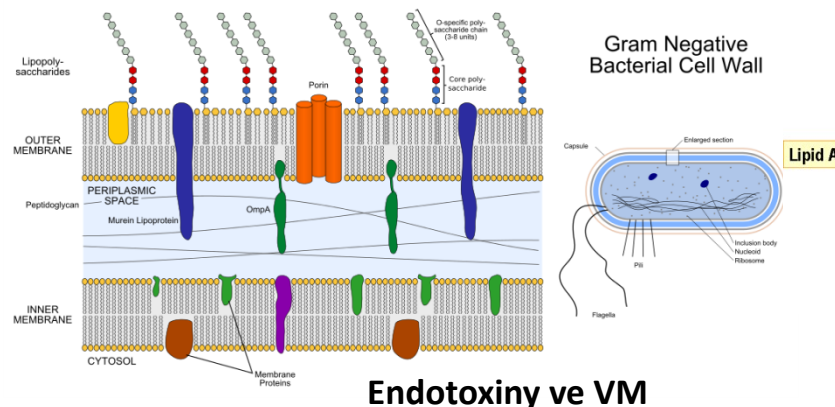
Vsuvka: Cytologie buňky a virulence

- **Patogenita** – schopnost organismu způsobovat onemocnění
- **Virulence** – stupeň patogenity – míra schopnosti organismu infikovat makroorganismus a způsobovat onemocnění
- **Faktory virulence** = struktury/složky buňky
 - faktory adheze
 - extracelulární enzymy – invazivní faktory (hyaluronidáza, kolagenáza, koaguláza, kinázy, keratináza, mucináza)
 - faktory zabraňující fagocytóze (kapsuly, produkty metabolismu)
 - toxiny (exo- a endotoxiny)

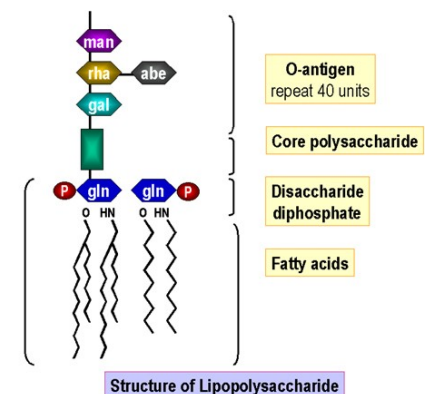


Exotoxin - botulotoxin

6.10.2015



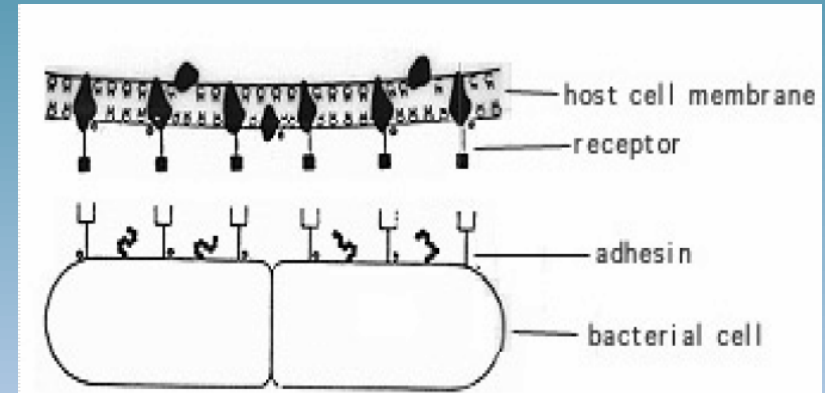
Endotoxiny ve VM



Endotoxin = LPS A

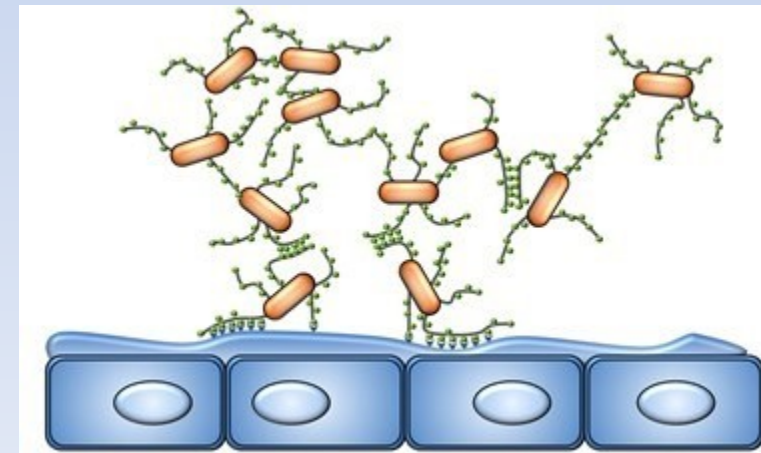
Adheze bakterií a indukce cytologických změn

- „surface sensing“;
ne všechny buňky na všechny povrchy

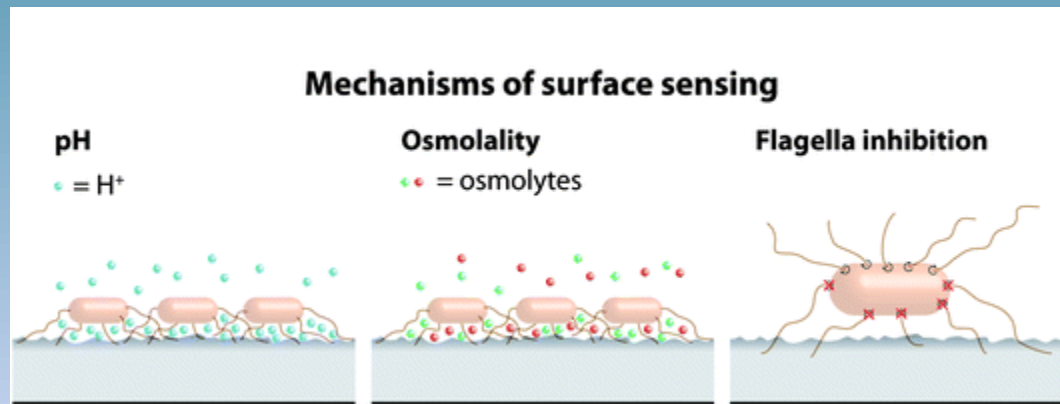


- Roli hrají:
 - vhodné receptory a kompatibilita s cílovou molekulou (*C. diphtheriae* epitel hrdla; *S. salivarius* – zub, chlopně...)
 - hydrofobicita buněčného povrchu (hydrofobní MO formují biofilmy)

Interakce buňky s povrchem indukuje **změnu exprese genů** buněčné morfologie, motility a adheze - souvislost mezi cytologickými znaky a proměnlivými formami existence buňky .



Blízkość bakterií k povrchu vyvolává změny v pH, osmolalitě a rotaci bičíků



Bacteria–surface interactions

Hannah H. Tuson ^a and Douglas B. Weibel ^{*ab}

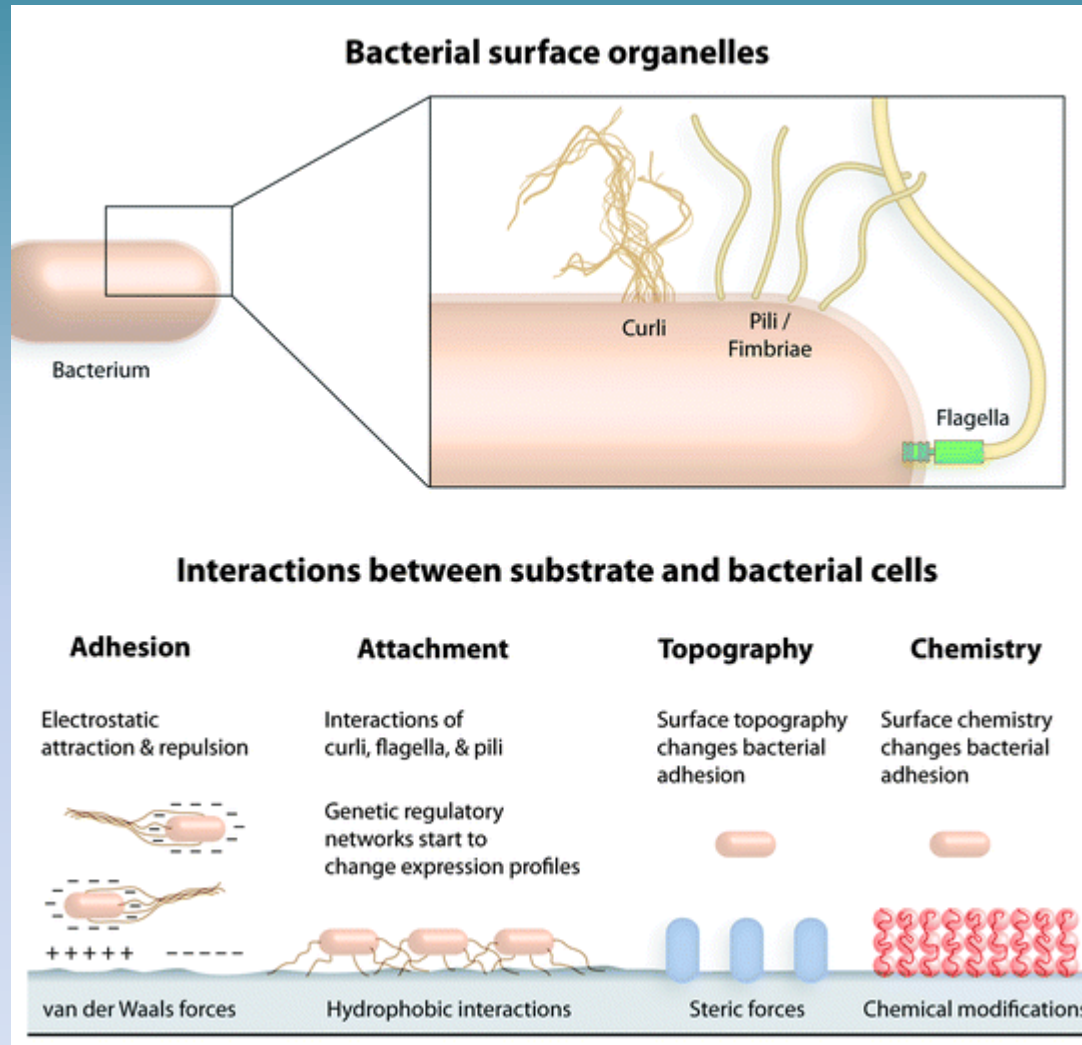
^aDepartment of Biochemistry, University of Wisconsin–Madison, 471 Biochemistry Addition, 433 Babcock Drive, Madison, WI 53706, USA.

^bDepartment of Biomedical Engineering, University of Wisconsin–Madison, Madison, WI 53706, USA

Received 23rd November 2012, Accepted 19th February 2013

First published on the web 4th March 2013

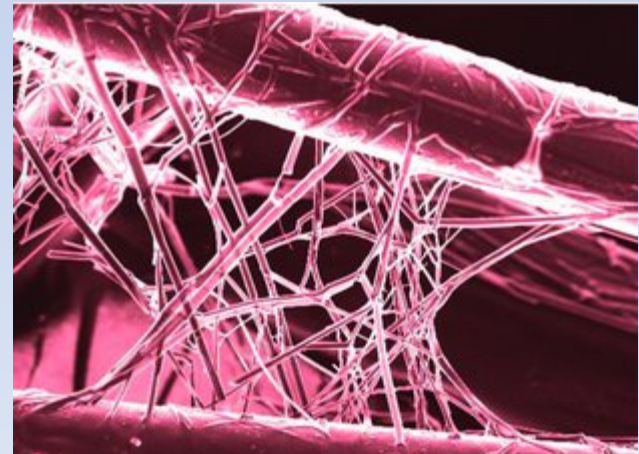
Buňka - pilli, povrchové proteiny, kapsuly a slizy



Prostředí – náboj, hydrofobicita, topografie povrchu, vystavené různé chemické skupiny reagují s fyzikálně chemickými vlastnostmi buňky

Adheze bakterií - význam

- Bioenergetika, technologie (fermentory), znečištění, bioremediace, biofilm, infekce
- Budoucí výzkum: ovlivněním buněčné adheze modulací hydrofobicity buněk; vývoj nepřilnavých materiálů



Bakterie a hostitelský makroorganismus

adheze bakterií

biofilm

Zubní povlak 

– A. van Leewenhoek

Střevní sliznice

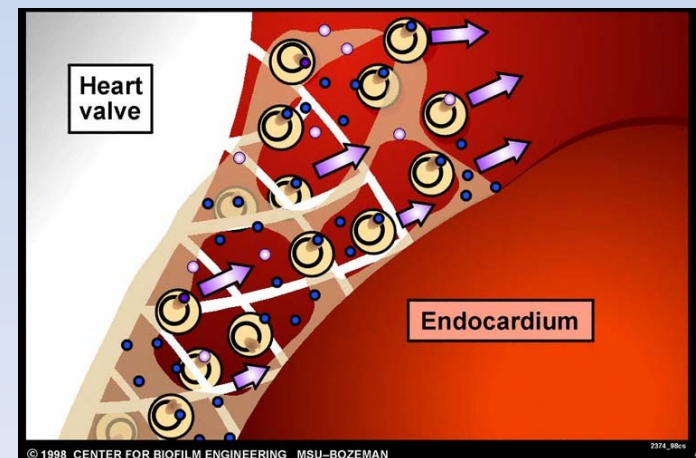
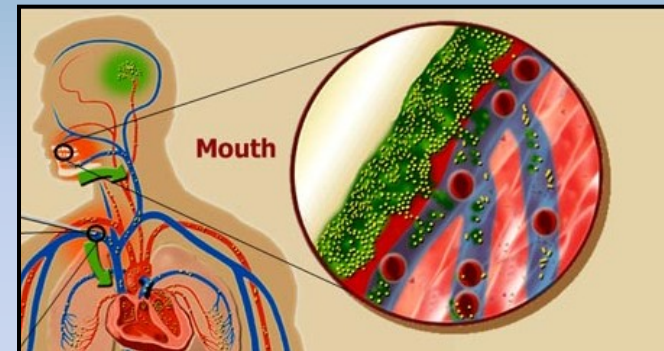
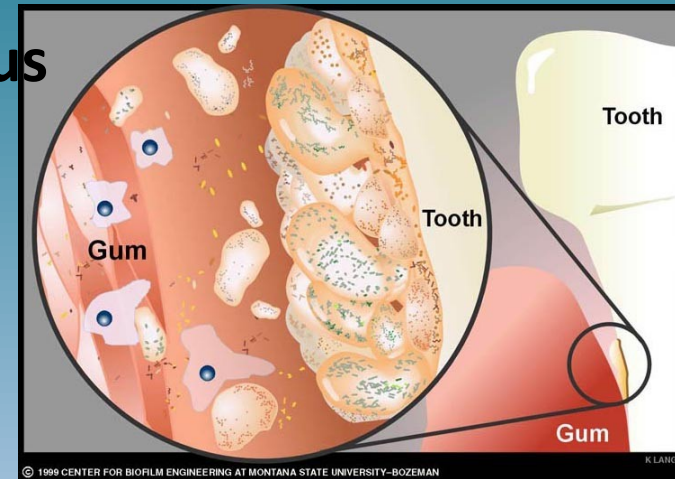
Infekce

– sliznice nebo uvnitř tkáně;

- endokarditida

- trvalý biofilm na chlopních
(hl. strepto- a stafylokoky;
nebezpečí krvácivých dásní..)

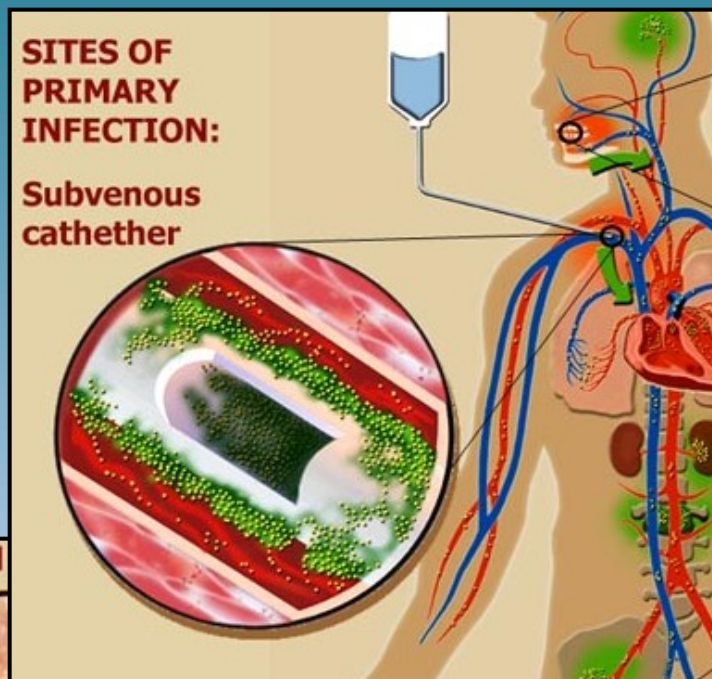
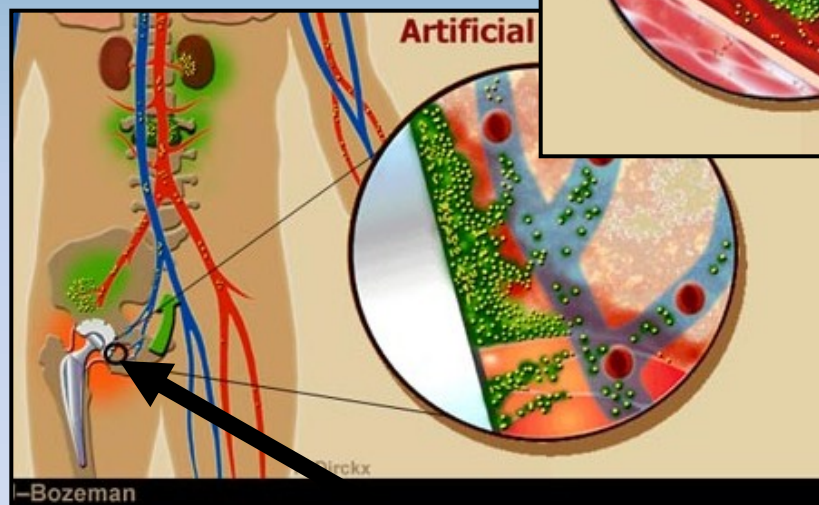
- rány; bércové vředy; spáleniny



Biofilm a medicína

Cévký – arteriální, žilný
Močové katetry
Dýchací a dializační přístroje
Umělé chlopně
Kontaktní čočky
Děložní tělísko

Bakterie jsou unášeny proudem krve a mohou začít infekční proces na odlehlem místě....



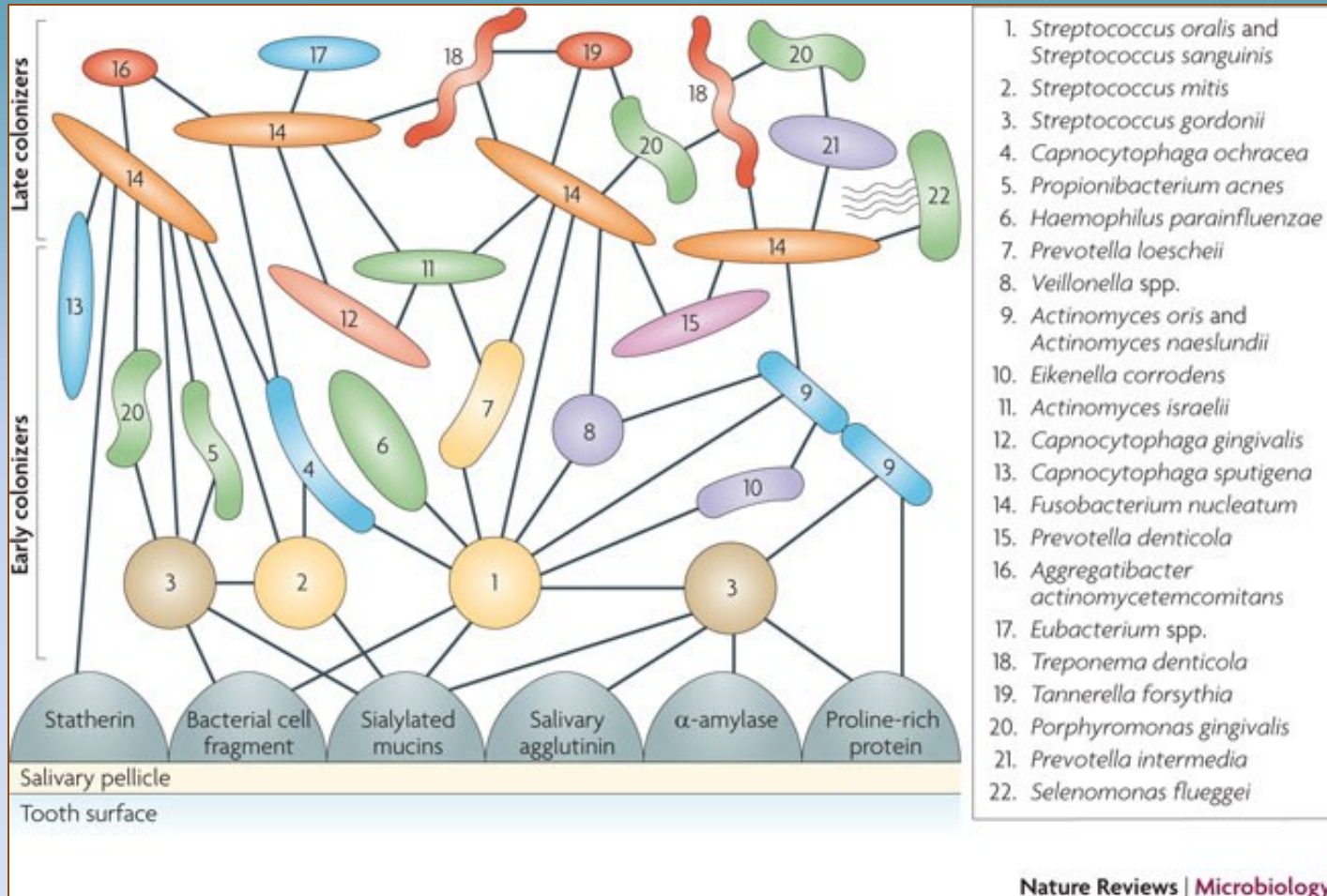
Vytrvalá syntéza a uvolňování toxinů...

Nemusí být kontakt s vnějškem! - kovové náhrady kloubů

Stafylokoky – fibronektin-binding protein..
pseudomonády, *E. coli*, streptokoky, aktinomycety...

Biofilm skloviny



700 kmenů z 18ti rodů



Mezibuněčný kontakt – role **adhezinů (lektiny)** a **receptorů (sacharidy)**

Kontakt s povrchem zubu – pelikula proteinů, lektiny... (Rickert et al. 2003)

Adheze: Střevní mikroflóra

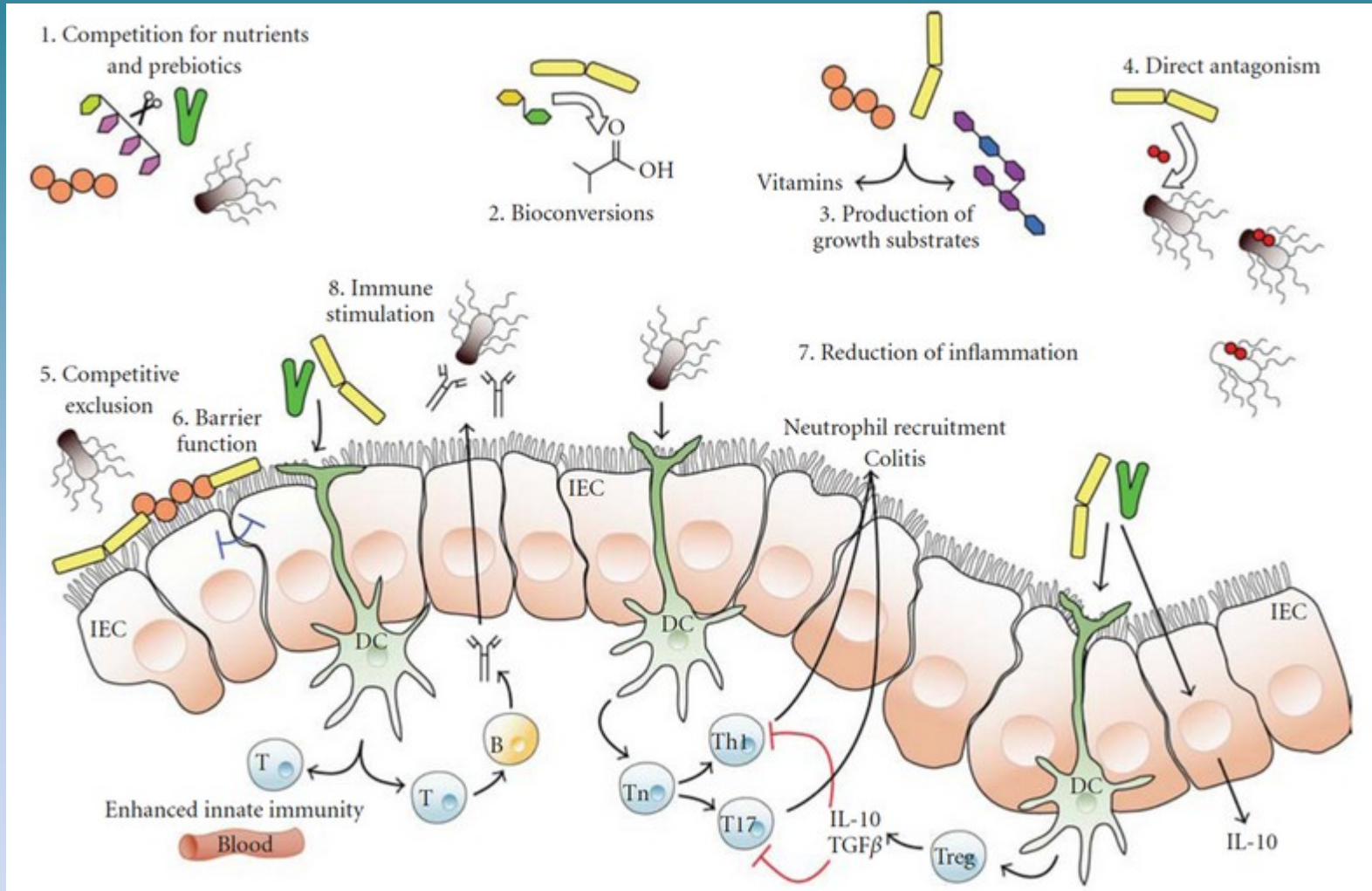
- Střevní mikroflora: 10^{14} CFU/ml 
- Proměna s věkem, dietou (polysacharidy; prebiotika..), imunitou, hygienou a ATB léčbou 
- Poměr populací – „přínosná mikroflora“ vs. anaerobní mikroflora jako clostridia...
- Alterovaná střevní mikroflora – obezita, cukrovka, záněty, metabolické poruchy

Střevní mikroflora a probiotika

- Funkční potraviny: bakterie mléčného kvašení
- Fce: metabolismus, produkce vitamínů, zábrana adheze patogenů, modulace imunity – alergie, bakteriociny
- probiotický efekt – kmenově specifický
(genetické inženýrství – konstrukce vhodných kmenů...)
- živé vektory a nosiče vakcín – protektivních antigenů:
(LABVAC – evrop. projekt – *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gordonii*, *Lactobacillus* spp.)

mikroorganismy používané jako probiotika

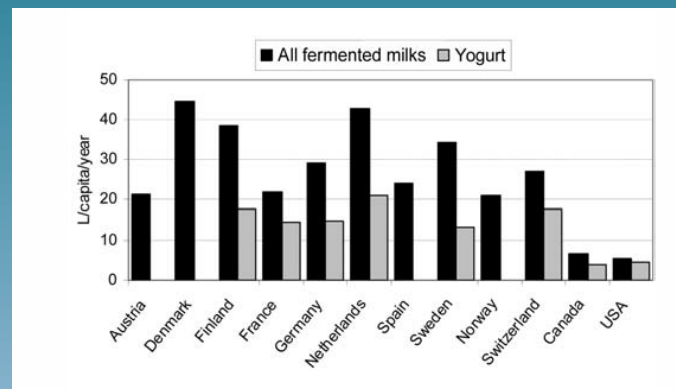
Lactobacillus	Bifidobacterium	jiné mléčné bakterie	ostatní
L. acidophilus	B. adolescentis	Enterococcus faecium	E. coli
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	B. animalis subsp. animalis	Streptococcus thermophilus	Saccharomyces cerevisiae
L. delbrueckii subsp. lactis	B. animalis subsp. lactis	Leuconostoc mesenteroides	Saccharomyces boulardii
L. amylovorus	B. longum subsp. infantis	Pediococcus acidilactici	
L. casei	B. breve	Lactococcus lactis	
L. crispatus	B. longum subsp. longum		
L. fermentum	B. bifidum		
L. gasseri			
L. plantarum			
L. reuteri			
L. rhamnosus			



(1) competition for dietary ingredients as growth substrates, (2) bioconversion of, for example, sugars into fermentation products with inhibitory properties, (3) production of growth substrates, for example, EPS or vitamins, for other bacteria, (4) direct antagonism by bacteriocins, (5) competitive exclusion for binding sites, (6) improved barrier function, (7) reduction of inflammation, thus altering intestinal properties for colonization and persistence within, and (8) stimulation of innate immune response (by unknown mechanisms). IEC: epithelial cells, DC: dendritic cells, T:T-cells.

Příjem probiotik

- Mléčné produkty
- Fermentované cereálie, ovoce a zelenina (severské země; intolerance laktózy)



Spotřeba mléčných produktů

Forma: potraviny, doplňky, léčiva....

Lactobacillus acidophilus/johnsonii/gasseri

Lactobacillus casei

Lactobacillus paracasei

Lactobacillus rhamnosus

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus reuteri

Bifidobacterium animalis/lactis

Bifidobacterium bifidum

Bifidobacterium breve

Bifidobacterium longum

Bifidobacterium adolescentis

**Nejběžnější
Probiotické kultury
v potravinách**

Lactobacillus and *Bifidobacterium* species^a

Streptococcus thermophilus^b

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*^b

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Bacillus subtilis^c

Bacillus clausii^c

Escherichia coli strain Nissle

Saccharomyces boulardii and other yeasts

**Nejběžnější
probiotické kultury
v doplňcích a léčivech**

^a See table 1 for names of specific species.

^b Yogurt cultures.

^c Spores.

Další funkce probiotik



- Produkce bakteriocinů – x patogenům
- Produkce EPS – biofilm – quorum sensing
- Produkce biosurfaktantů – antimikrobní aktivita proti pg, snížení adheze pg
- Produkce antioxidantů – vychytávají volné radikály (superoxidové anionty, hydroxylové radikály)