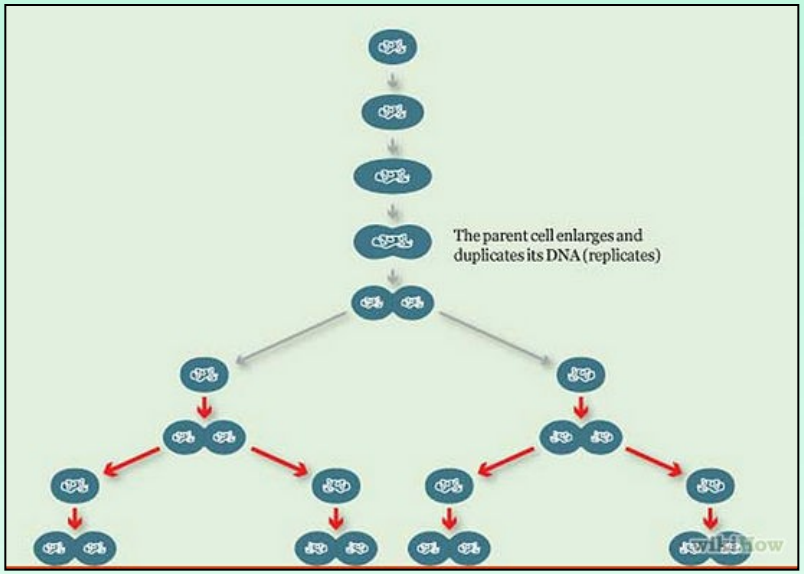
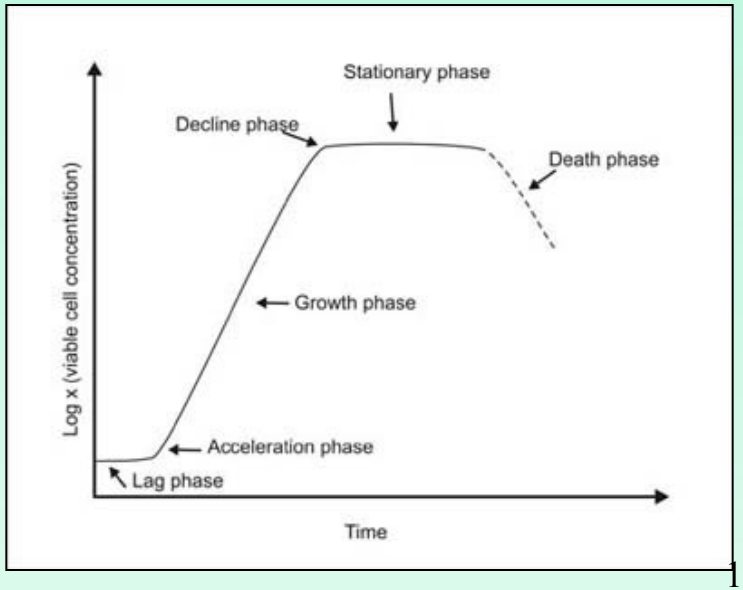
Bakteriální genom v populaci buněk

- Vztah mezi:
  - krátkou **generační dobou**
  - frekv. **mutace**
  - přenos **mobil.genet.elementů a plazmidů**
    - vertikálně…horizontálně
    - i mezi rody….
  - **množství buněk** v populaci

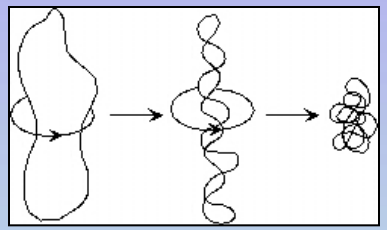
Význam pro mikrobiální technologie; Genetické inženýrství...



Dělení buněk



Růstová křivka populace



Nukleoid

- Zpravidla **<u>cirkulární DNA</u>**

  (lineární – *Borrelia, Streptomyces, Coxiella, Paracoccus denitrificans)*

  2 oddělené chromozomy – *Rhodobacter sphaeroides*
- ***E. coli*** – 4,7 . 10^6 nukleotidů
- Průměrná hmotnost: 5 . 10^{-15} g DNA
- **0.58 Mbp** *Mycoplasma genitalium*
- **4.4 Mbp** *Mycobacterium tuberculosis, E. coli*
- Vazba na **CM – mezozomy**, dělení
- G+C obsah (melting point): 28% (*Clostridium*) - 72% (*Sarcina*).
- Frekvence mutace
- NCBI – databáze sekvenovaných genomů

A GFP-based bacterial biosensor with chromosomally integrated sensing cassette for quantitative detection of Hg(II) in environment....

- Architektonická organizace:

- kondenzace do kompaktní struktury, HLP proteiny asociované s DNA (vazba cca 10^5 mlk histon-like proteins), napomáhají skládání NK. Vysoce konzervované u eubakterií

- Superhelicita = nadšroubovicové vinutí
- **Relaxovaná podoba DNA – spotřeba ATP**

závity přitaženy:

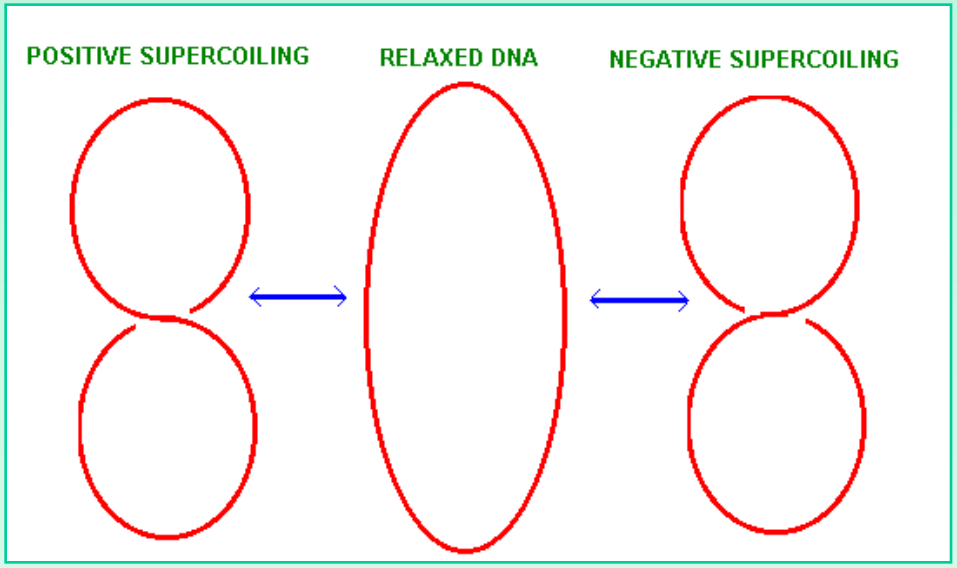
- negativní s.

(**fyziologický stav**)

závity rozvolněny:

- pozitivní s.
- enzymy topoizomerázy

– inhibice kumarinová atb.



- **Haploidní**

Páry bazí A-T, C-G:

- Neplatí paradox hodnoty C
- **Replikace předchází dělení buňky**
- Reprodukce – asexuální = děti jsou klonem rodičů...
- Změna sekvence – rekombinací nebo mutacemi

První sekvenovaný: *Haemophilus influenzae* (1995 by The Institute for Genomic Research)

Počet genů: 575 – 5500..
High coding densities....
(Člověk 3 mld bp a 23 000 genů)

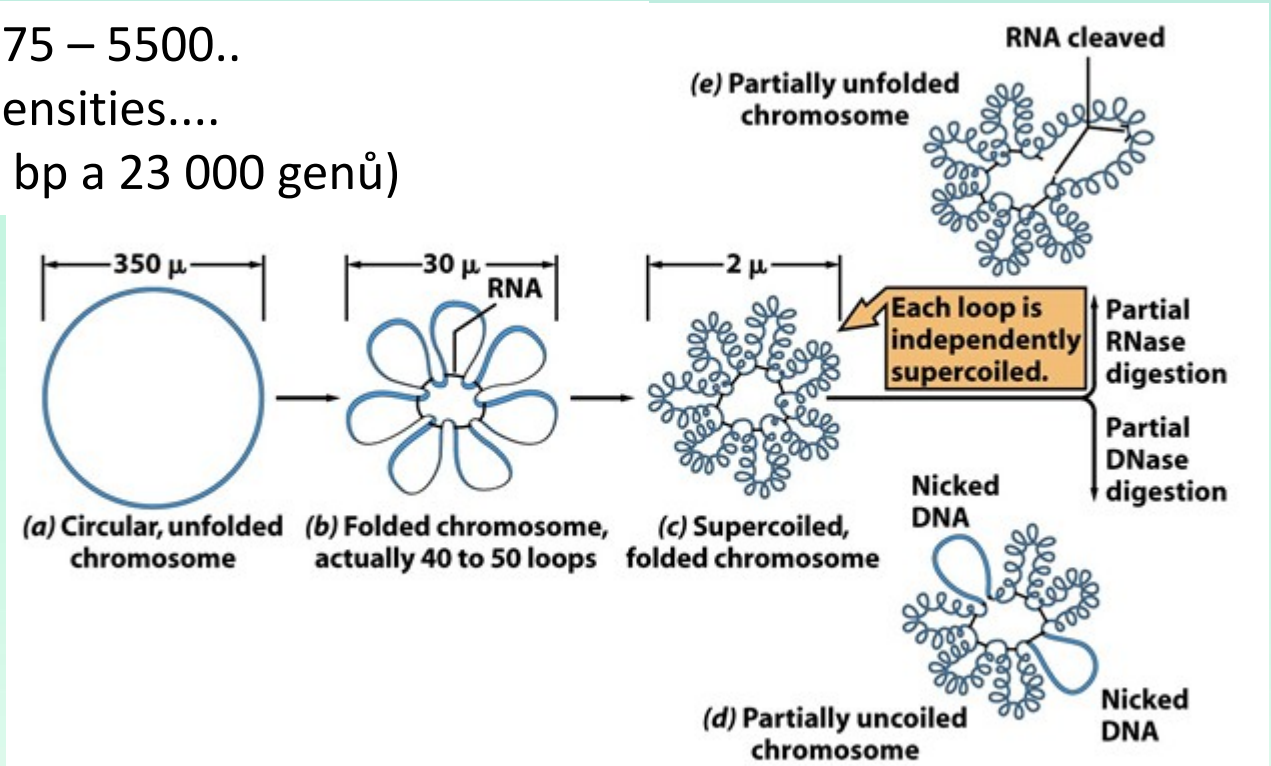
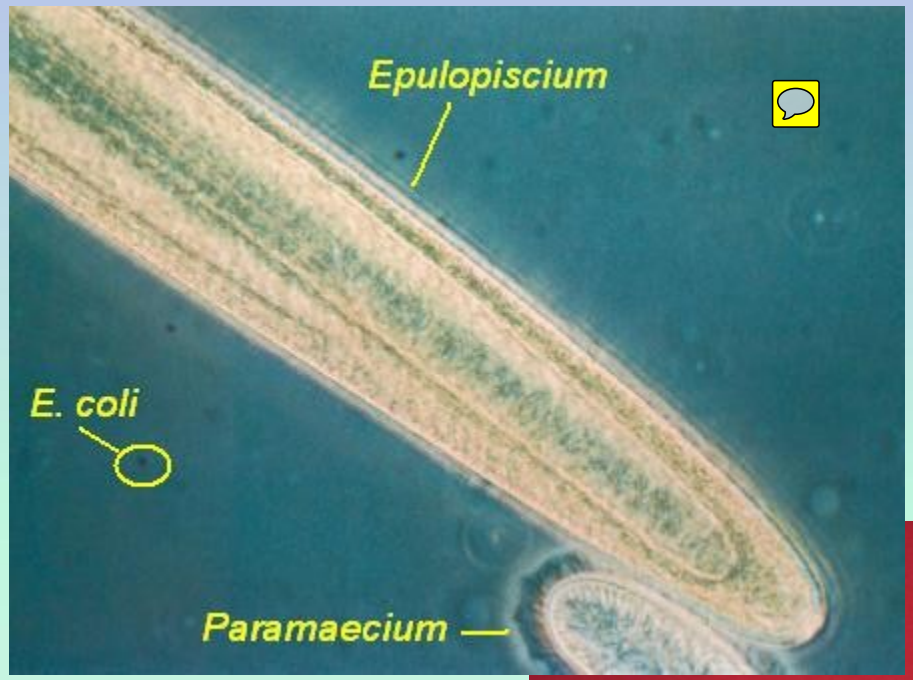
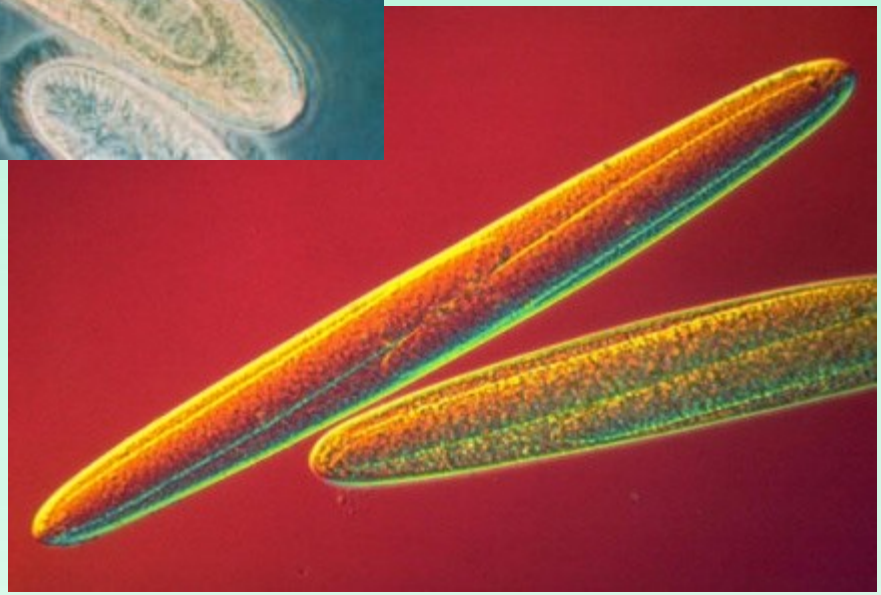


Figure 9-15 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

Výjimka v asexuální reprodukci





Genom kóduje, ale vyvíjí se, mění se…

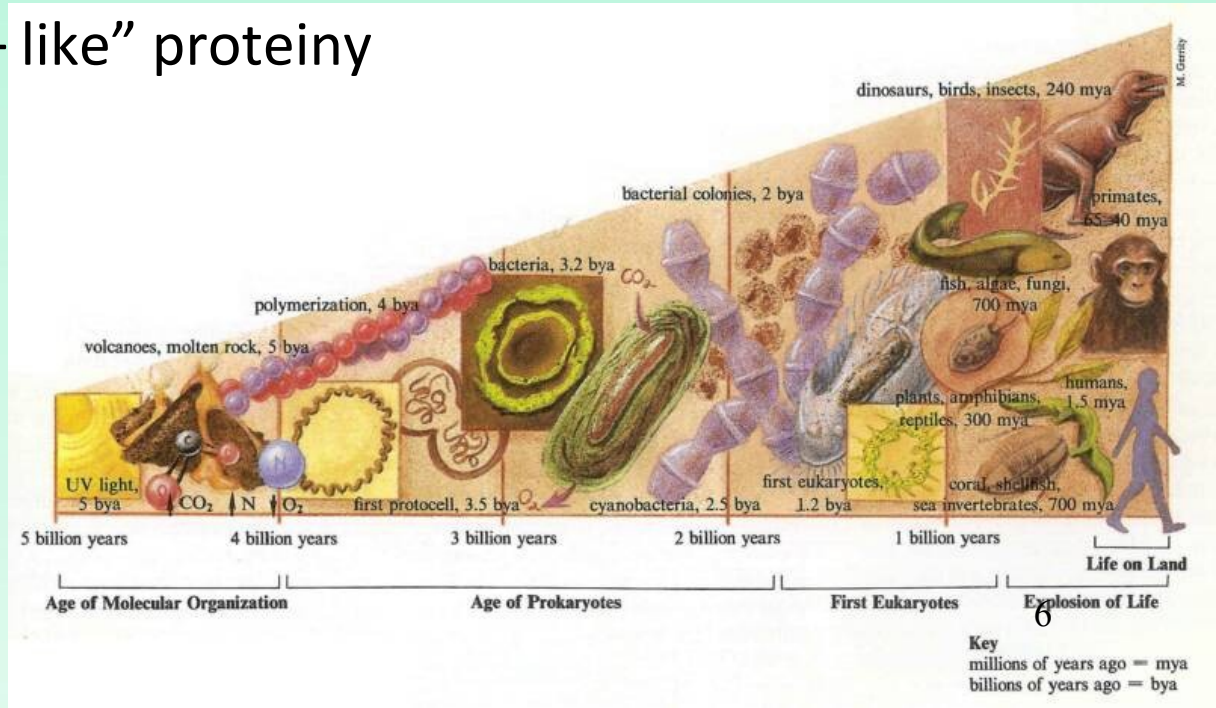
- Po několika miliardách let evoluce

  adaptace na všechny niky
- Adaptace a) evoluční; *b) regulace metabolizmu v daném momentě*
- Vývoj ochranných látek chránících proteiny a NK

(unikátní chem.struktury

př: dipikolinová, “histon – like” proteiny

HS proteiny…)



Genetická informace

- Velikost genomu:

  „specialisté“: ~1,5 MBp, „generalisté“- ~4 – 8 MBp

- Složky genomu:

  Chromozom

  Plazmidy – F, R, Ti, Col

  Mobilní elementy: transpozony, inzerční sekvence

  Profágy

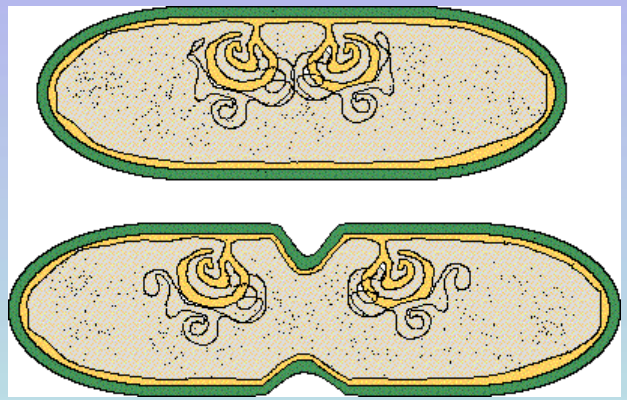
Replikony

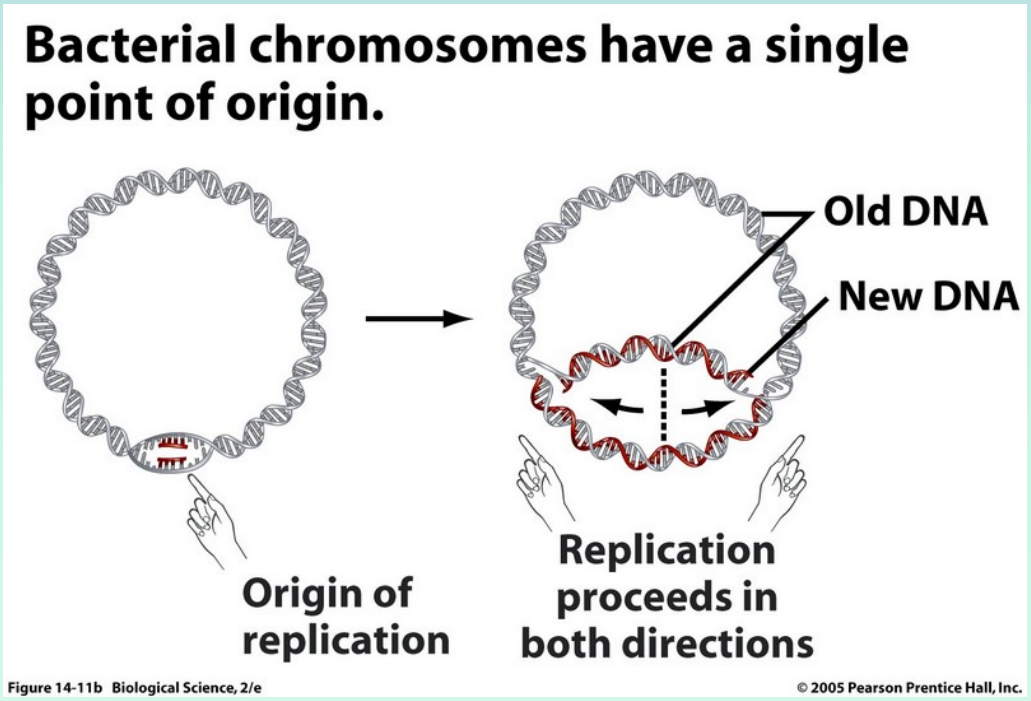
- Způsoby přenosu

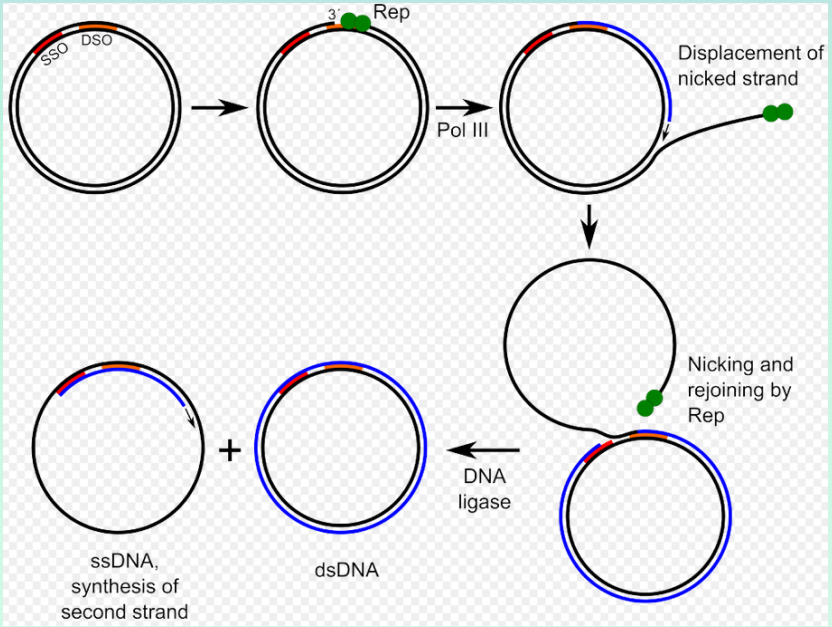
– transformace, konjugace,
transdukce

Replikace

- Místa ori (počátek) a ter (konec)
- Prodlužování buňky
- Nová replikace ještě před úplným rozdělením buňky..

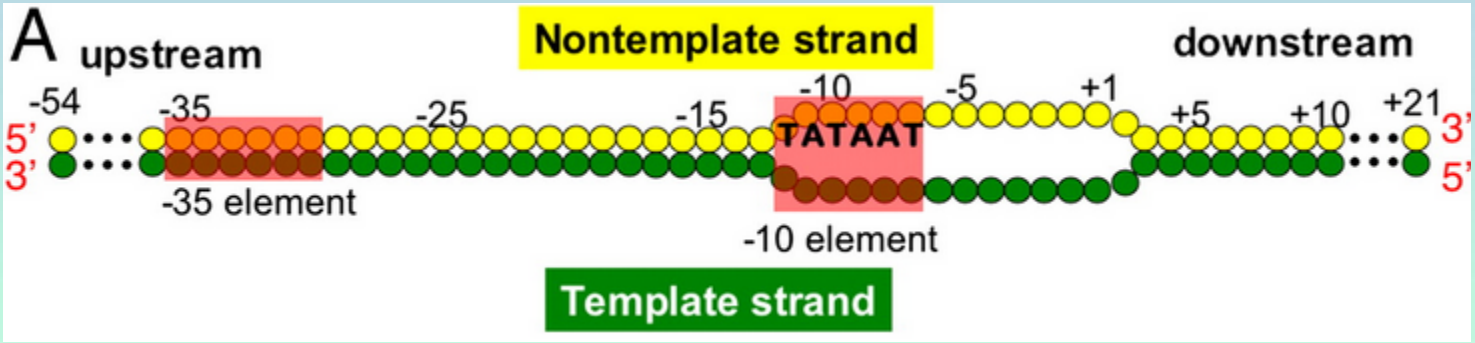




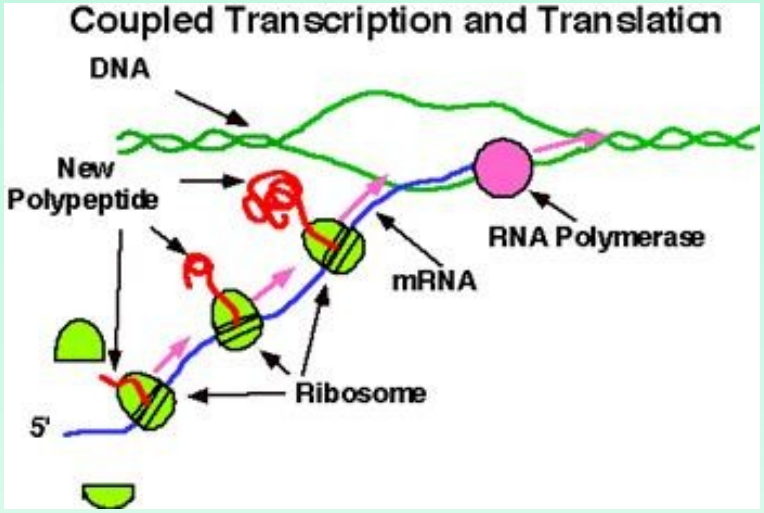


Transkripce

- RNA-polymeráza – 5 podjednotek
- Syntéza 1 mRNA trvá 1 min, nejsou postranskripční úpravy

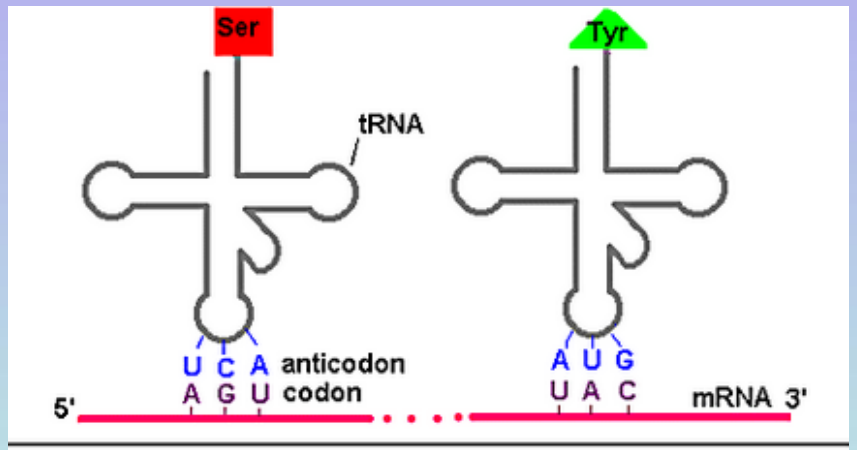


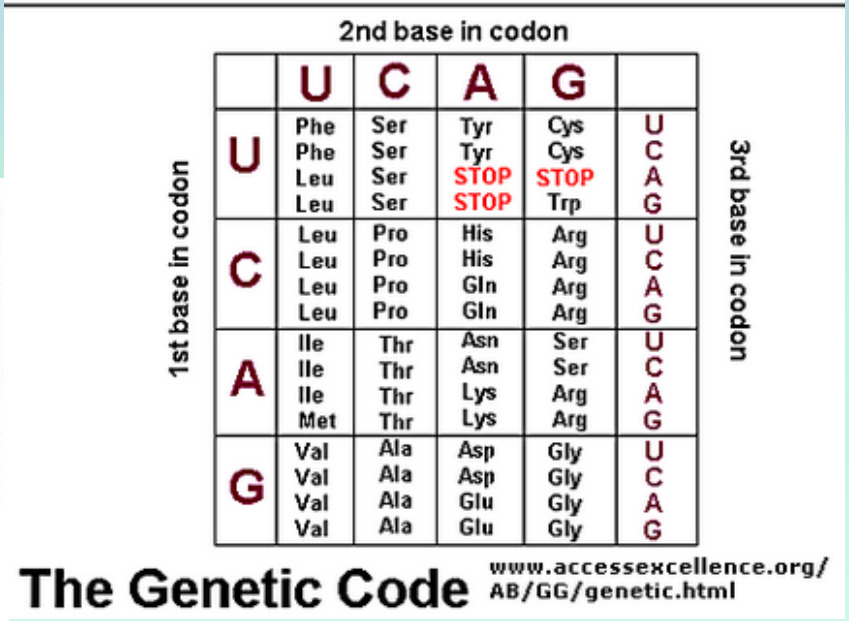
- Různá hladina mRNA = různá hladina proteinů
- Evolučně konzervované, podobná eukaryotické (rozdíly ve složení genů, prokaryotická je spojena s translací)



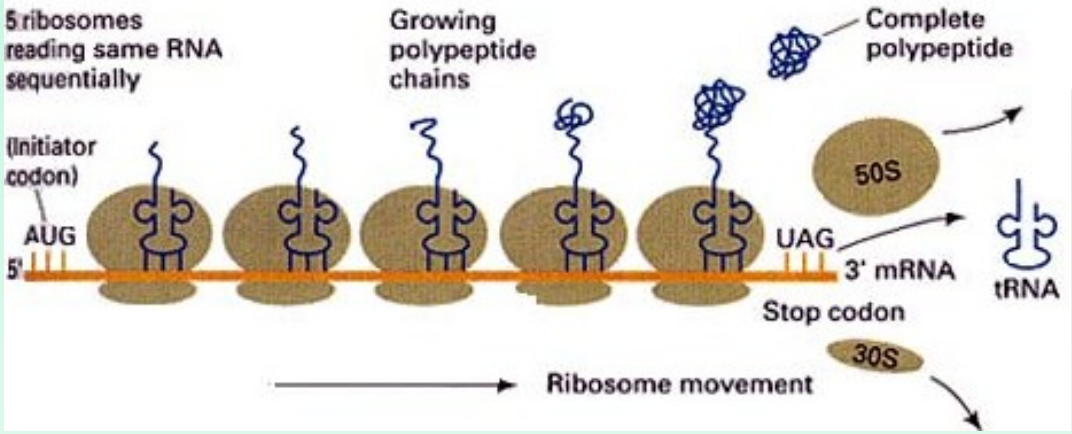
Translace

- Iniciace translace
- Elongace polypeptidového řetězce
- Terminace translace





The Genetic Code www.accessexcellence.org/AB/GG/genetic.html



Ribozomy

- Proteosyntéza

RNA – *Bacteria* vs. *Archaea* !!

- 2 podjednotky –

  Mg + energie (ATP, GTP) – podmínka funkce

  rRNA + proteiny

- 70S = 30S + 50S (Svedbergovy jednotky)

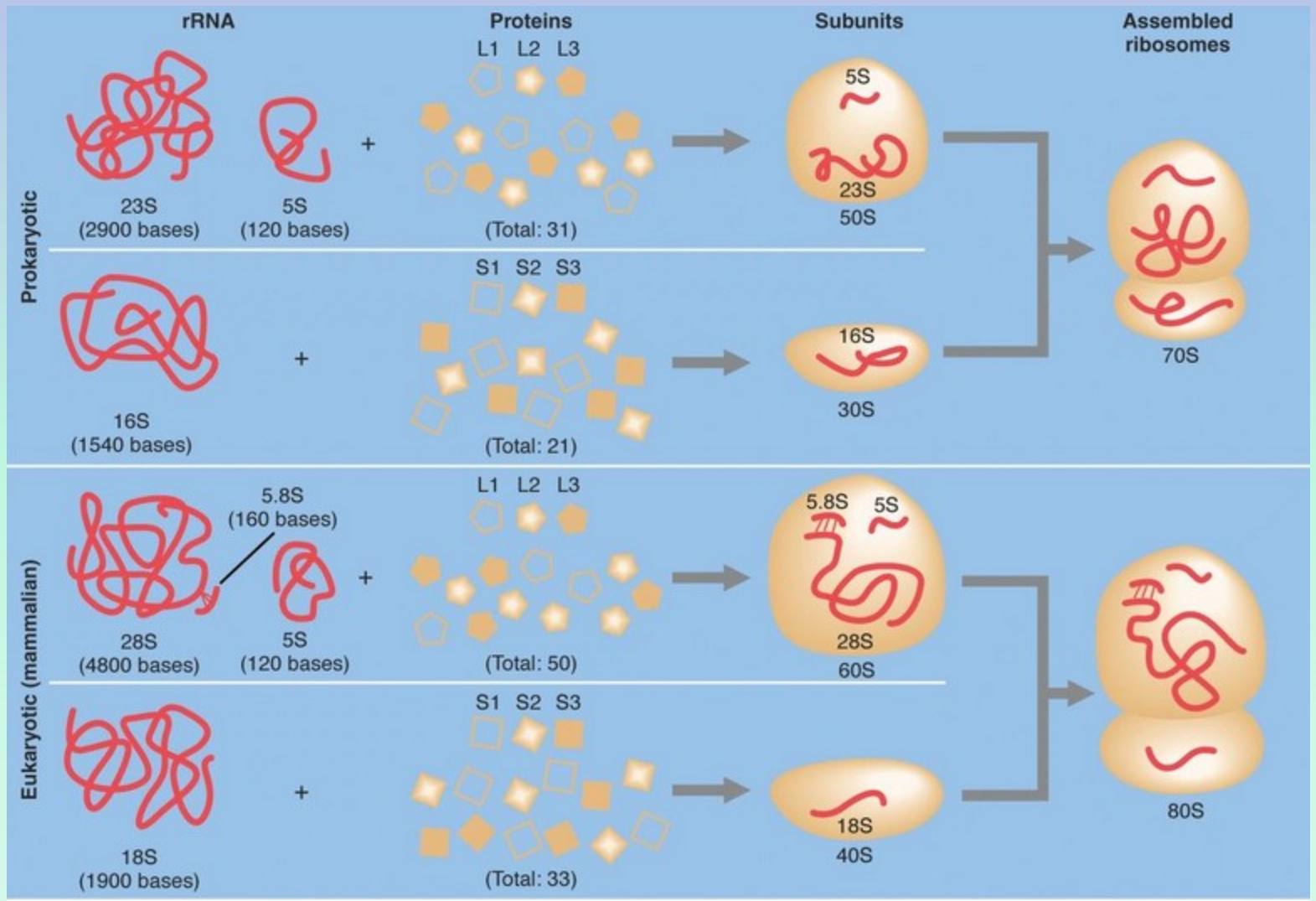
  (sedimentaci vedle hmotnosti ovlivňuje i konformace)

  30S…….1540 nukleotidů, 21 proteinů

  50S…….2900 nukleotidů, 34 proteinů

- Selektivní působení ATB pouze na bakteriální ribozomy – jiné cílové místo
- *Archea* – odlišnosti, větší resistence (Kan, Ery)

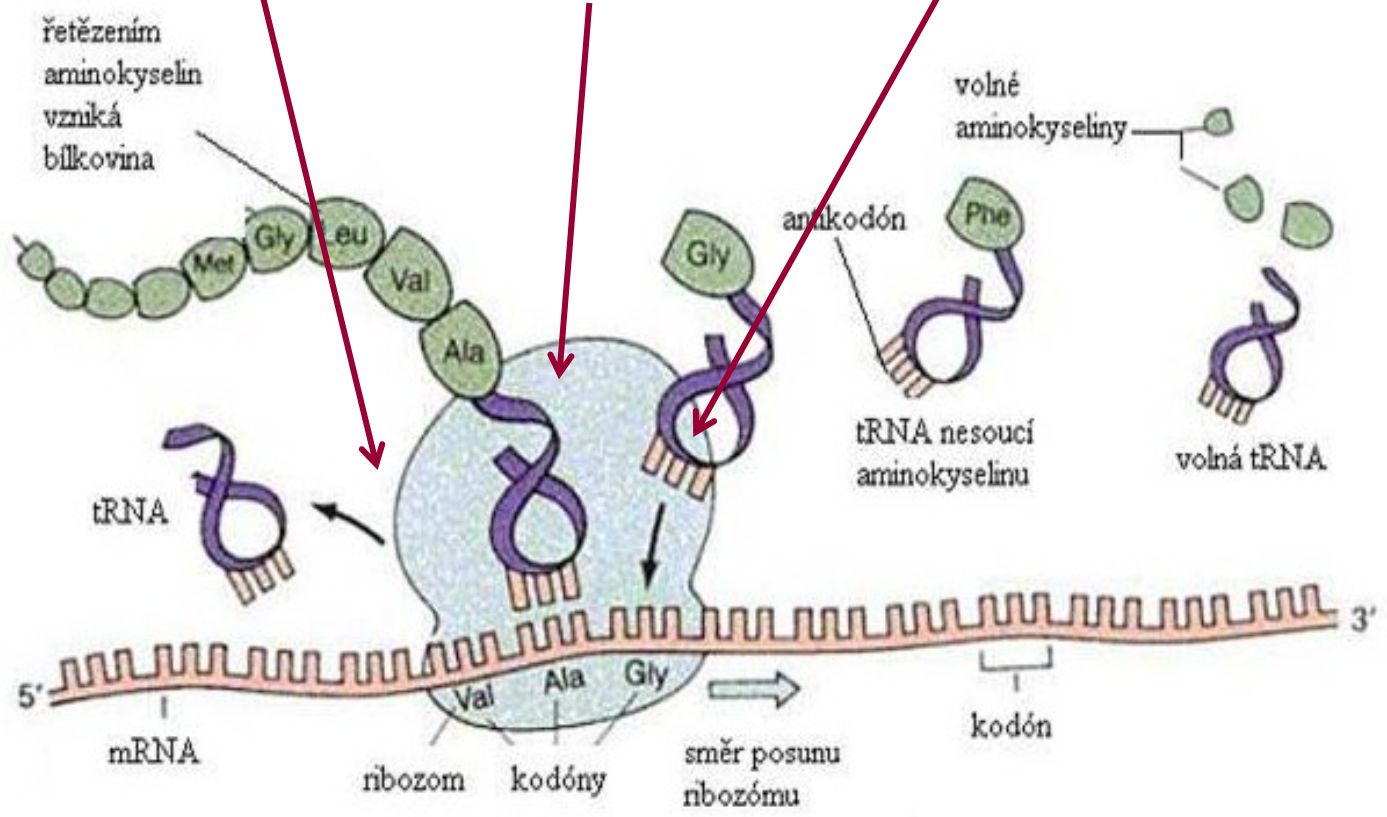
(Proteosyntéza je inhibována anisomycinem)


rRNA
Proteins
Subunits
Assembled ribosomes
Prokaryotic
23S
(2900 bases)
5S
(120 bases)
+
L1 L2 L3
(Total: 31)
5S
23S
50S
16S
(1540 bases)
+
S1 S2 S3
(Total: 21)
16S
30S
70S
Eukaryotic (mammalian)
5.8S
(160 bases)
28S
(4800 bases)
5S
(120 bases)
+
L1 L2 L3
(Total: 50)
5.8S
5S
28S
60S
18S
(1900 bases)
+
S1 S2 S3
(Total: 33)
18S
40S
80S

E – místo exitu tRNA

P - peptidylové vazebné místo

A - aminoacylové vazebné místo

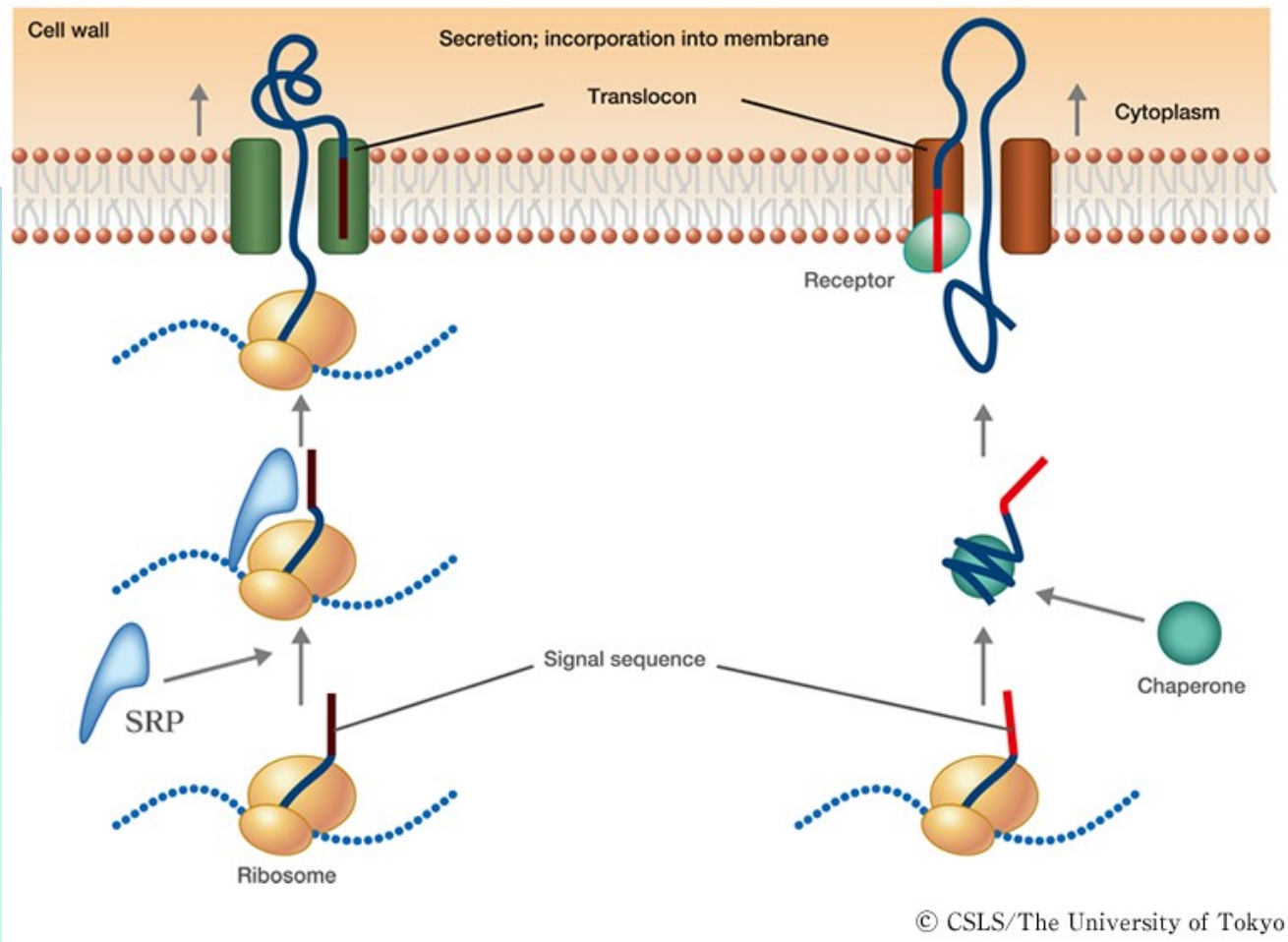


Transport proteinů

Prostorově i časově regulováno – tato všestrannost zabezpečuje morfologickou potažmo fyziologickou diferenciaci v procesu buněčného cyklu!

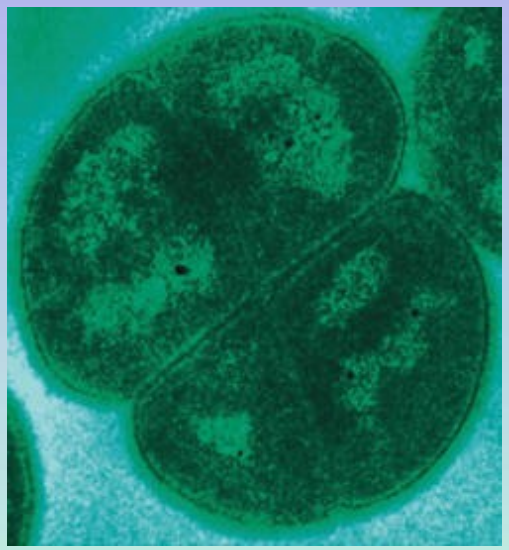
Buněčná organizace proteinů v buňce:

a) statická – skupina proteinů precizně lokalizovaná, proměny jen na bázi podjednotek (integrální membr.proteiny…)

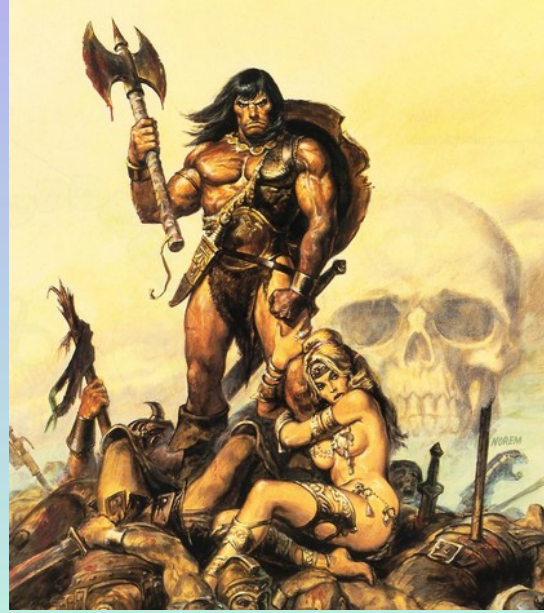


b) proměnlivá – díky cytoskeletu a pohybu proteinů „diffusion-and-capture“ (Rudner, 2002), sítě dynamických interakcí

Zvláštnosti genomu některých bakterií



Deinococcus radiodurans



- *Objeven* 1956 (Arthur W. Anderson) – maso po radiaci...
- Přežil radiaci, která je 3000x silnější než hodnota, která by usmrtila člověka
- Ionizující záření – zlomy obou řetězců NK
- Reparace
- 2 lineární chromozomy, megaplazmid a malý plazmid

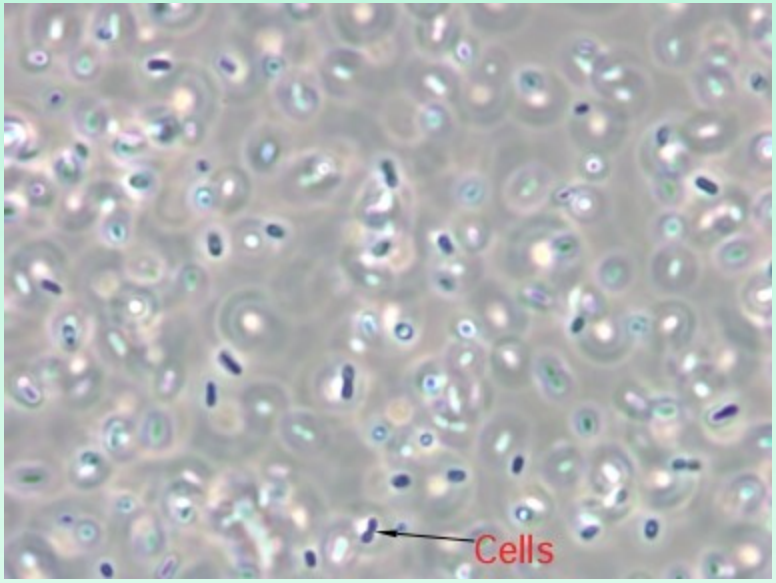
Rising from the Ashes: DNA Repair in *Deinococcus radiodurans*

Michael M. Cox, James L. Keck, John R. Battista

Published: January 15, 2010 • DOI: 10.1371/journal.pgen.1000815

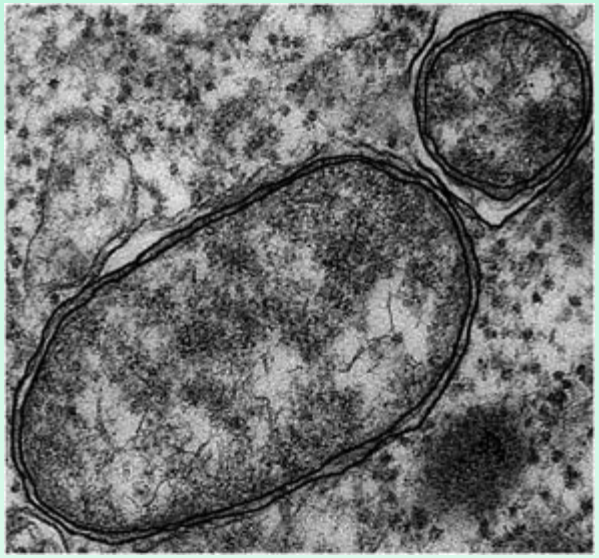
Azotobacter vinelandii

- Schopen fixace dusíku
- Metabolizuje mnoho uhlovodíků, org.kys a alkoholů
- Počet chromozomů závisí na fázi buněčného cyklu
- Exponenciální fáze: 2-4 kopie
- Stacionární fáze – 50-100



Buchnera spp.

- Vnitrobuněční symbionti mšic (mutualismus)
- velikost genomu – 7x menší než genom *E. coli* !!
- 640 kbp
- Chromozom + 2 plazmidy
- Počet chromozomů však závisí na vývojovém stadiu mšice

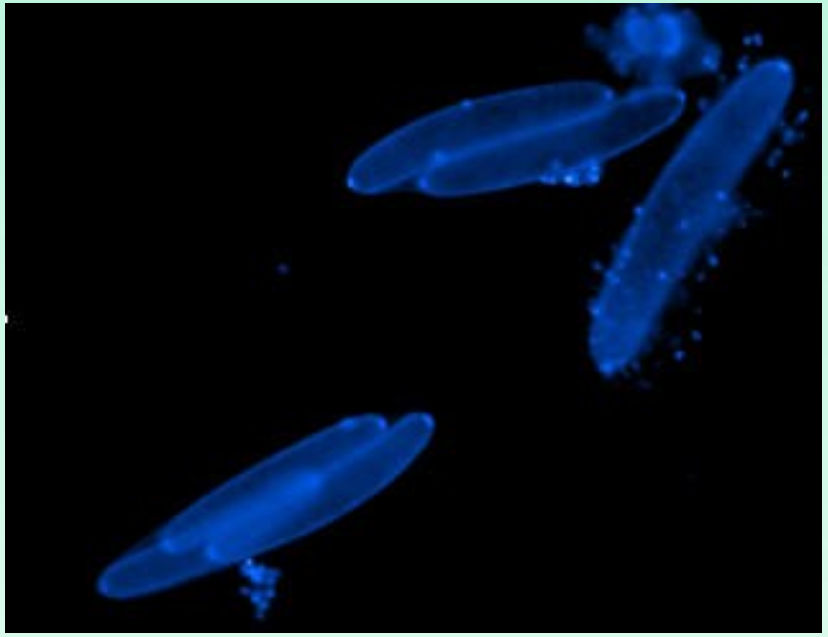


Agrobacterium tumefaciens

- Gramnegativní, pohyblivé
- Nádory rostlin
- Přírodní genetický inženýr transformující svou DNA do buněk rostlin
- 5,7 Mbp
- 1 cirkulární + 1 lineární chromozom a 2 plazmidy
- Tumor Inducing plasmid – zodpovědný za virulenci

Epulopiscium spp.

- Střevní symbionti rybek *Acanthuridae*.
- Některé buňky delší než 0,5 mm!
- DAPI barvení NK
- real-time PCR –tisíce kopií genomu??
- Adaptace vzhledem k velikosti buněk??



Bakteriální cytoskelet

- vláknité proteiny

tvar buňky

polarita

buněčné dělení a segregace chromozomů a plazmidů

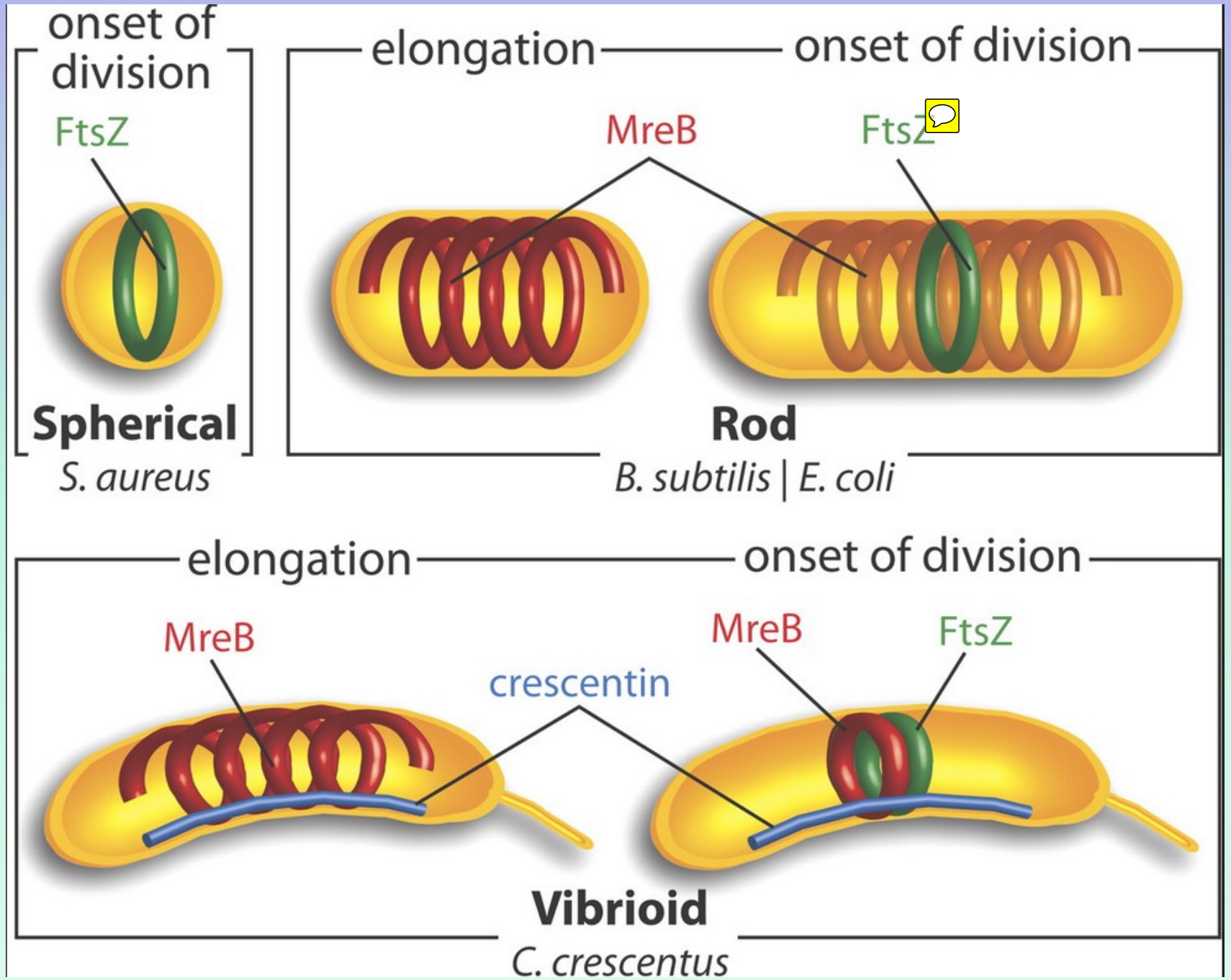
- jsou analogické cytoskeletárním strukturám eukaryotní buňky (**3D** strukturou, **biochemickými vlastnostmi)**

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

- **analog tubulinu = FtsZ** - protein buněčného dělení
  (filamentous-temperature sensitive protein Z)
  - strukt. podobnost – GTP vazebná doména (20% N-konec,nikoli C-konec)
  - vyžadován pro start časné syntézy PG vedoucí k tvorbě mezivrstev
- **analog aktinu = MreB** - determinace tvaru buňky, prodl.stélky
  - kokovité buňky - chybí homology MreB genů
- **analog intermediálním filamentům = Crescentin**

distribuce MreB genů v říši *Bacteria* ukazují, že nesférické buňky vlastní jeden nebo více těchto genů

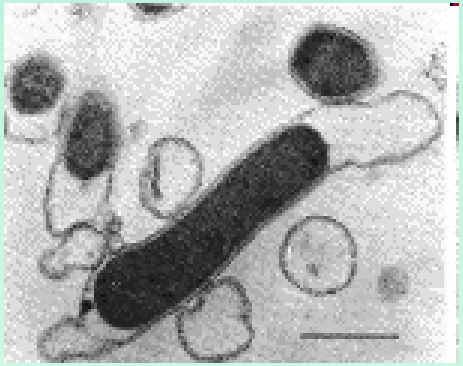
L.J.F. Jones, R. Carballido-Lopez and J. Errington, (2001), *Cell*, **104**, 913-922

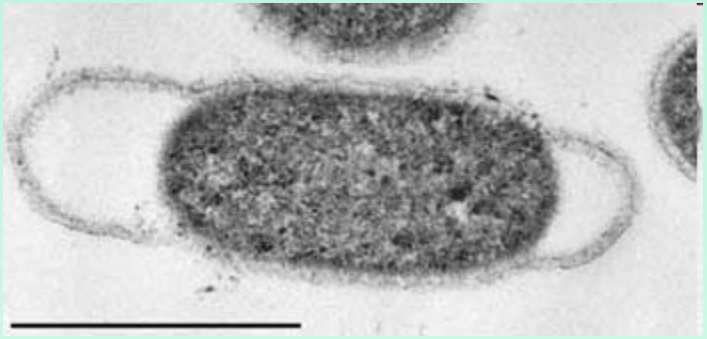

onset of division
FtsZ
Spherical
S. aureus
elongation
onset of division
MreB
FtsZ
Rod
B. subtilis | E. coli
elongation
onset of division
MreB
crescentin
MreB
FtsZ
Vibrioid
C. crescentus

- zkoumána podobnost

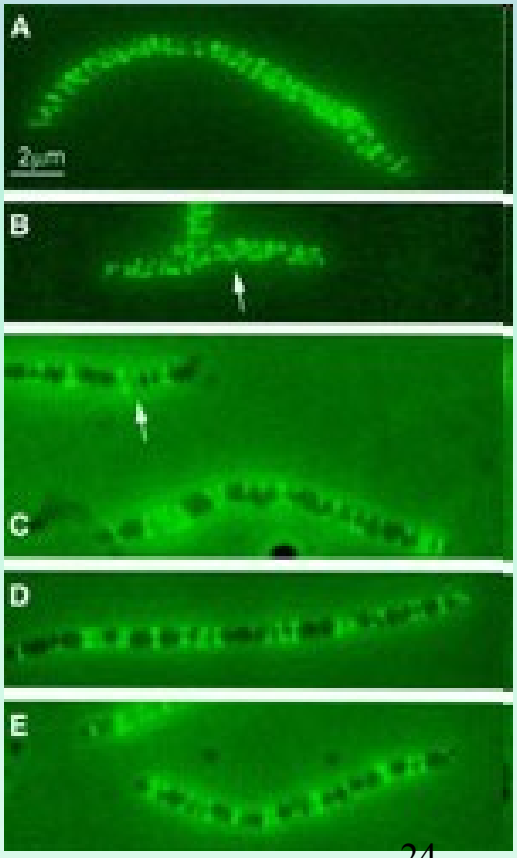
krystalická struktura proteinu **MreB** (*T. maritima*) **vs. eukaryotický aktin**

- pomocí MAD (Multi-wavelength anomalous diffraction), EM
- strukturálně jsou si podobné, i svou orientací
- 2 shod. podjednotky **jako u aktinu**





Thermotoga maritima

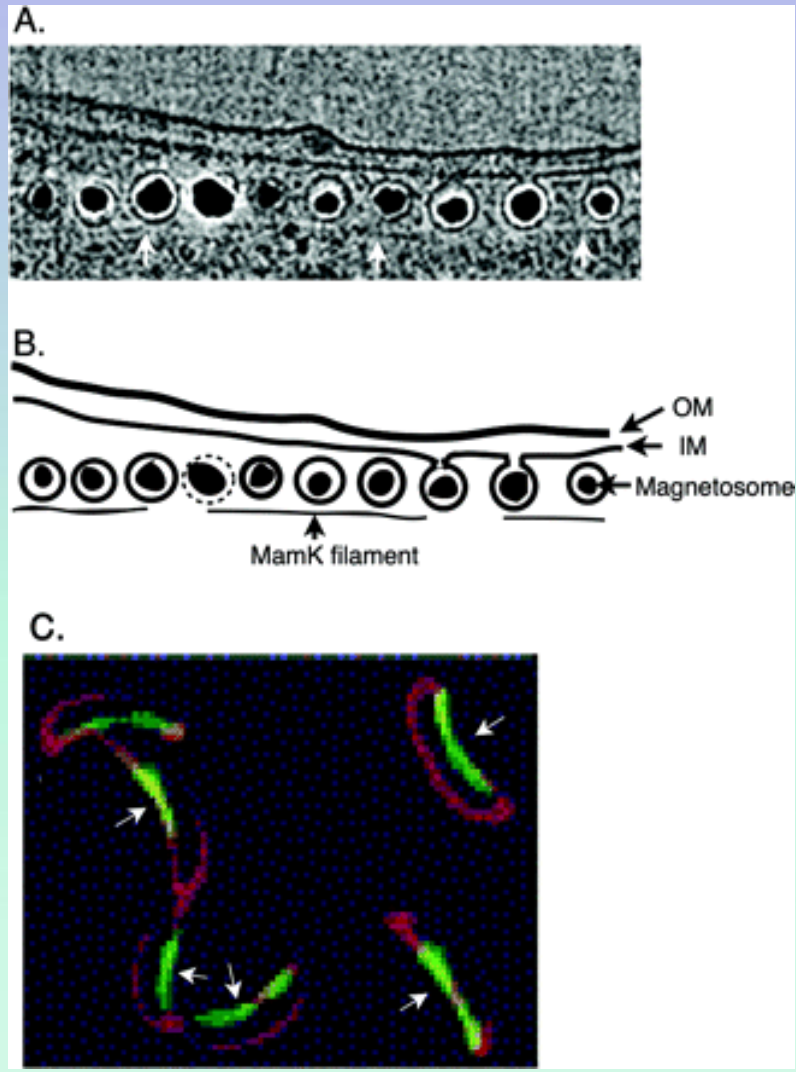


F. van den Ent, L.A. Amos a J. Löwe (2007): Bacterial Origin of the

mreB; IF

- další proteiny s vlastnostmi aktinu:
  ParM (*E. coli*)
  MamK (*Magnetospirillum magneticum)*

- podobnost intermediánním filamentům
  crescentin –(*Caulobacter crescentus*).



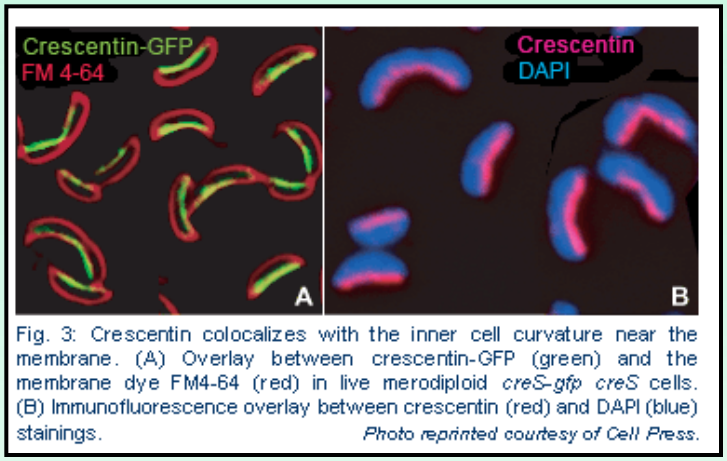
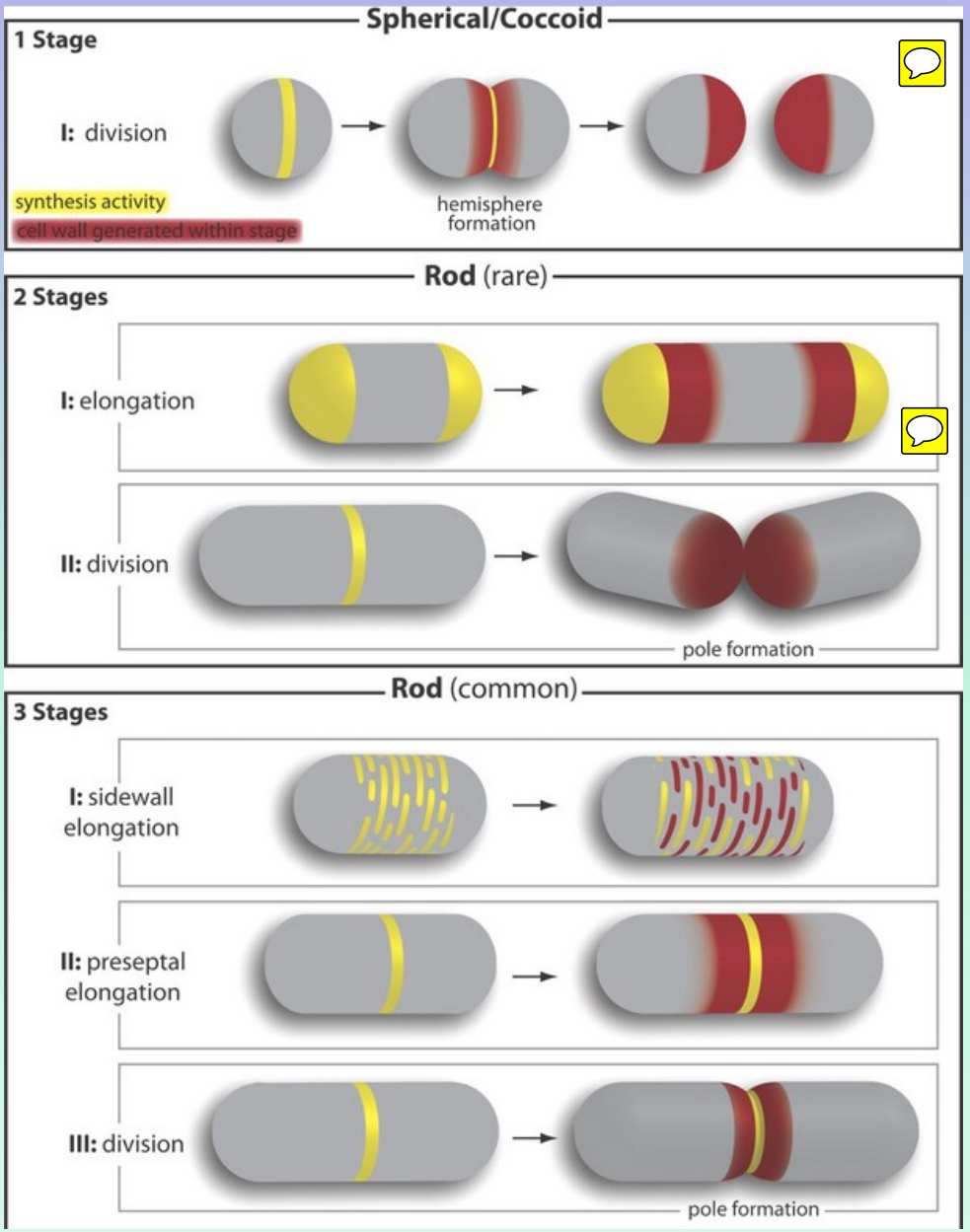


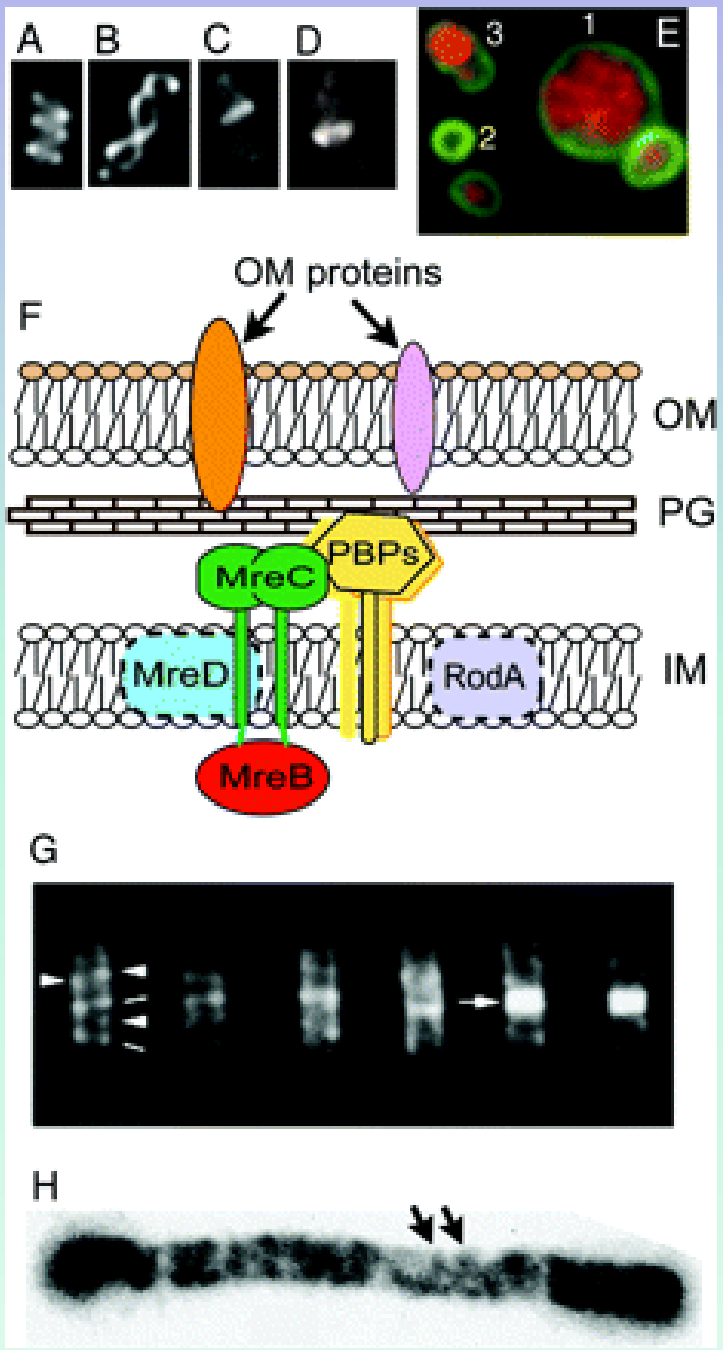
Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings. *Photo reprinted courtesy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



- **<u>Růst BS při dělení</u>**

1) Polymerace tisíců mlk FtsZ
2) Formování prstence
3) Přídatné proteiny – min. 1
   - ZipA (gamma-proteobact.)
   - FtsA (Firmicutes)
4) MinC a MinD proteiny
5) Determinace tvaru buňky
   - MreB, MreC, MreD, Mbl

Bakteriální cytoskelet a proteiny určující tvar buněčné stěny jako MreC spolupracují při lokalizaci komplexů koordinovaně syntetizujících buněčnou stěnu



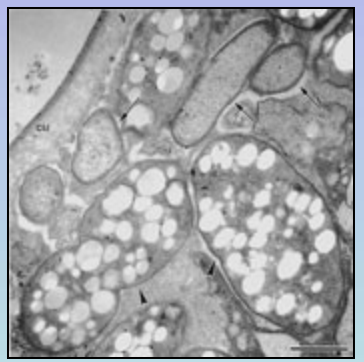
- **MreC** je podstatný pro prostorovou organizaci složek holoenzymů periplazmy syntetizujících peptidoglykan
- **MreB** řídí řídí lokalizaci prekurzorů peptidoglykanu v cytosolu

- Fluorescenční značení dokazuje, že MreB a FtsZ, MreC a RodA působí při syntéze PG.
- MreB a FtsZ jsou vyžadovány pro morfogenezi polární stélky.

- **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 neávislý na FtsZ;** důležitost jednoho nebo druhého režimu závisí **na načasování uspořádání FtsZ během elongace buňky.**

Inkluze



- Zásobní látky
- Produkty metabolismu
- uložené nepotřebné látky

- Bez membrány nebo s membránou

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

Membrána jednovrstevná

fenaziny

Funkce a podoba

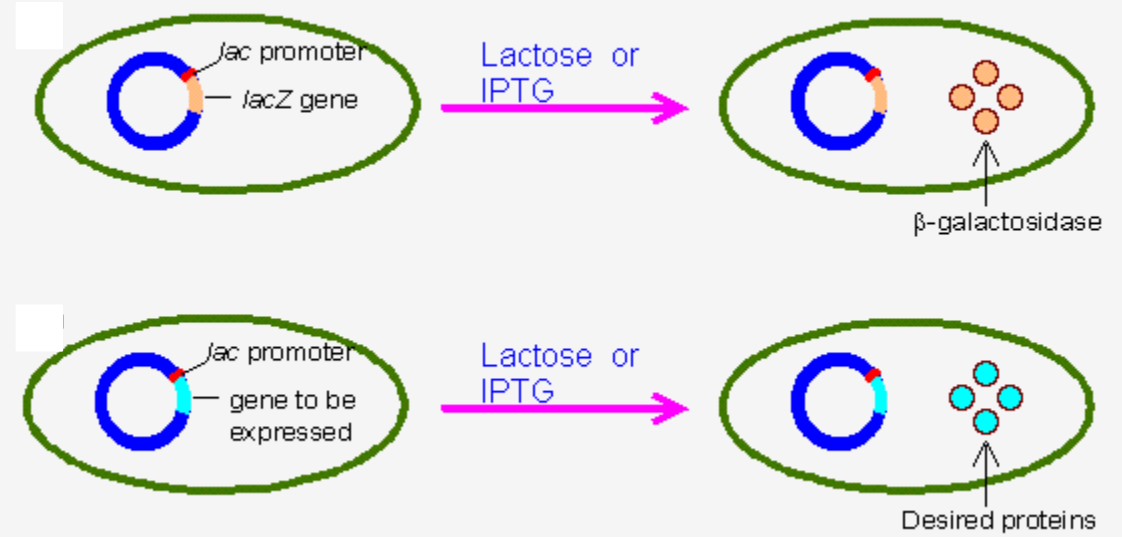
- V cytoplazmě v podobě granul nebo kapének

- Svým charakteristickým vzhledem uvnitř buněk napomáhají identifikaci

- Produkce rekombinantních proteinů

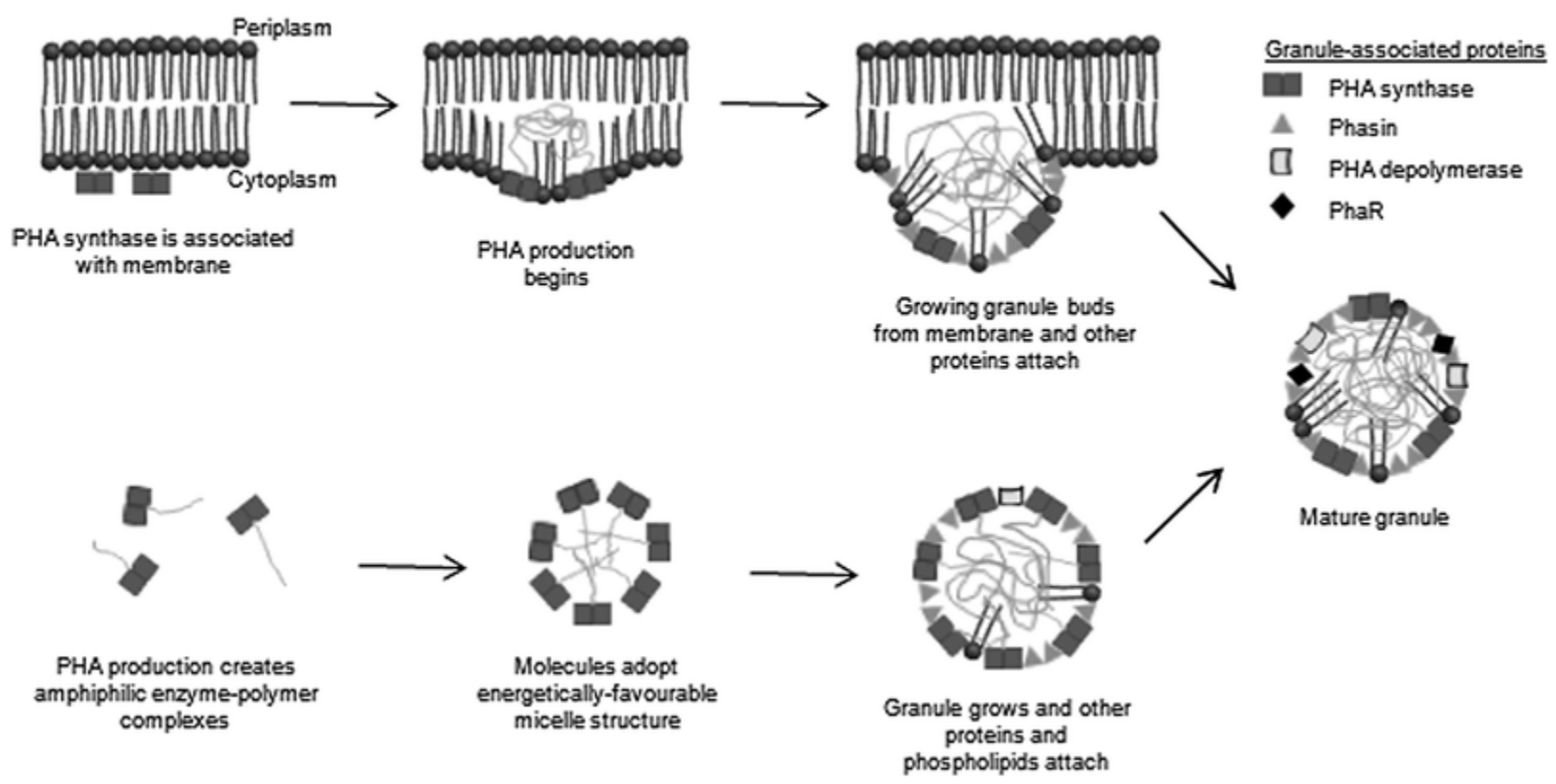
„zabalení“ a stabilizace proteinů

nahromadění



Př: 2 modely formování inkluzí PHA

(polyhydroxyalkanoát)



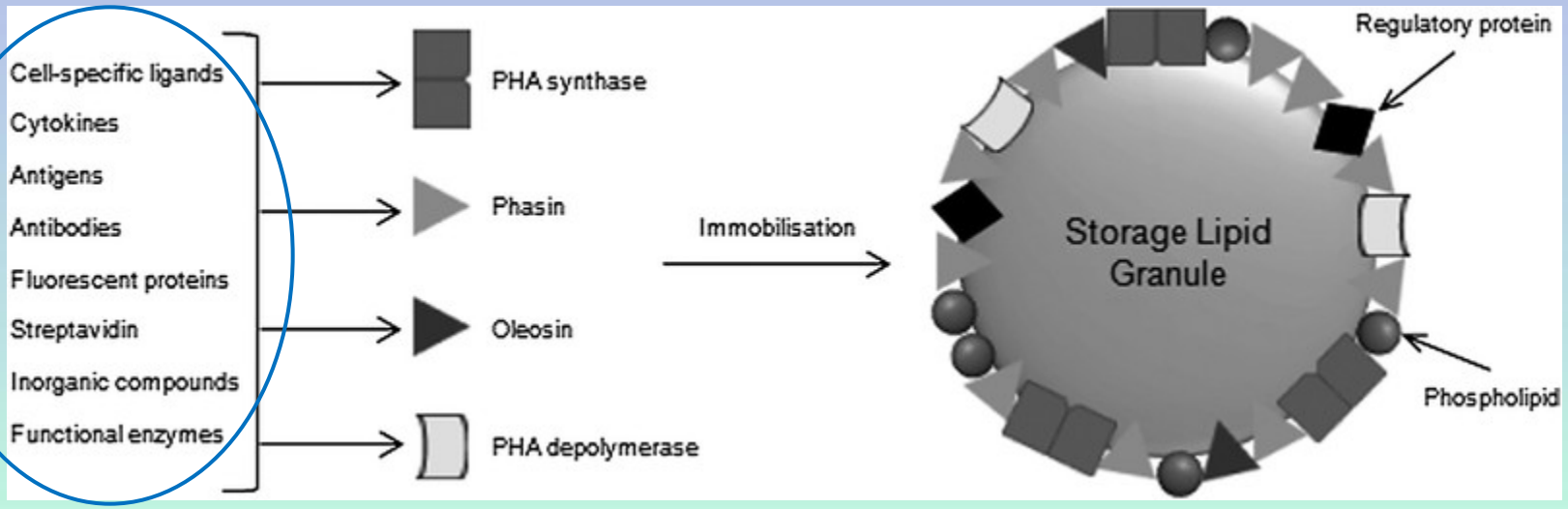
Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles

Nicholas Thomson [a], **David Summers** [b] **and Easan Sivaniah** *[a]

[a]*Cavendish Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK. E-mail: es10009@cam.ac.uk; Fax: +44 (0)1223 337000; Tel: +44 (0)1223 337267*

[b]*Genetics Department, University of Cambridge, Cambridge, UK. E-mail: dks11@hermes.cam.ac.uk; Fax: +44 (0)1223 333992; Tel: +44 (0)1223 333991*

Imobilizace molekul v inkluzích



protein of interest

granule-associated proteins

fusion protein

Following growth in conditions suitable for PHA synthesis...

Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles

Nicholas Thomson [a], **David Summers** [b] **and Easan Sivaniah** *[a]

[a]*Cavendish Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK. E-mail: es10009@cam.ac.uk; Fax: +44 (0)1223 337000; Tel: +44 (0)1223 337267*

[b]*Genetics Department, University of Cambridge, Cambridge, UK. E-mail: dks11@hermes.cam.ac.uk; Fax: +44 (0)1223 333992; Tel: +44 (0)1223 333991*

- Rozvoj využití inkluzí jako

katalyzátorů v průmyslu a biotechnologiích „**surové inkluze**“

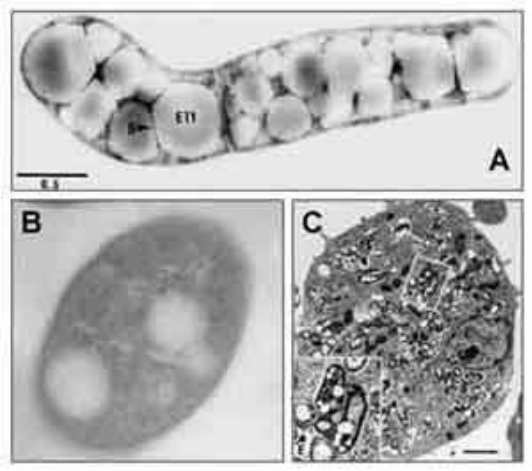
- **Aktivita enzymů je v nich vysoká**!

- Inkluze jsou **snadno odstranitelné**

- Výhoda:

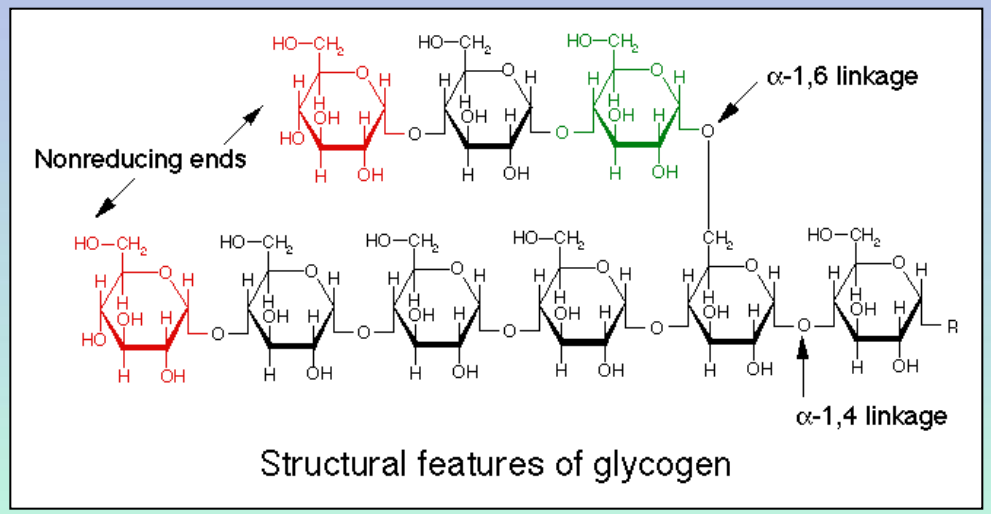
- vysoký obsah proteinů

- možnost agregace i rekombinantních proteinů (enzymů) bez jejich inaktivace



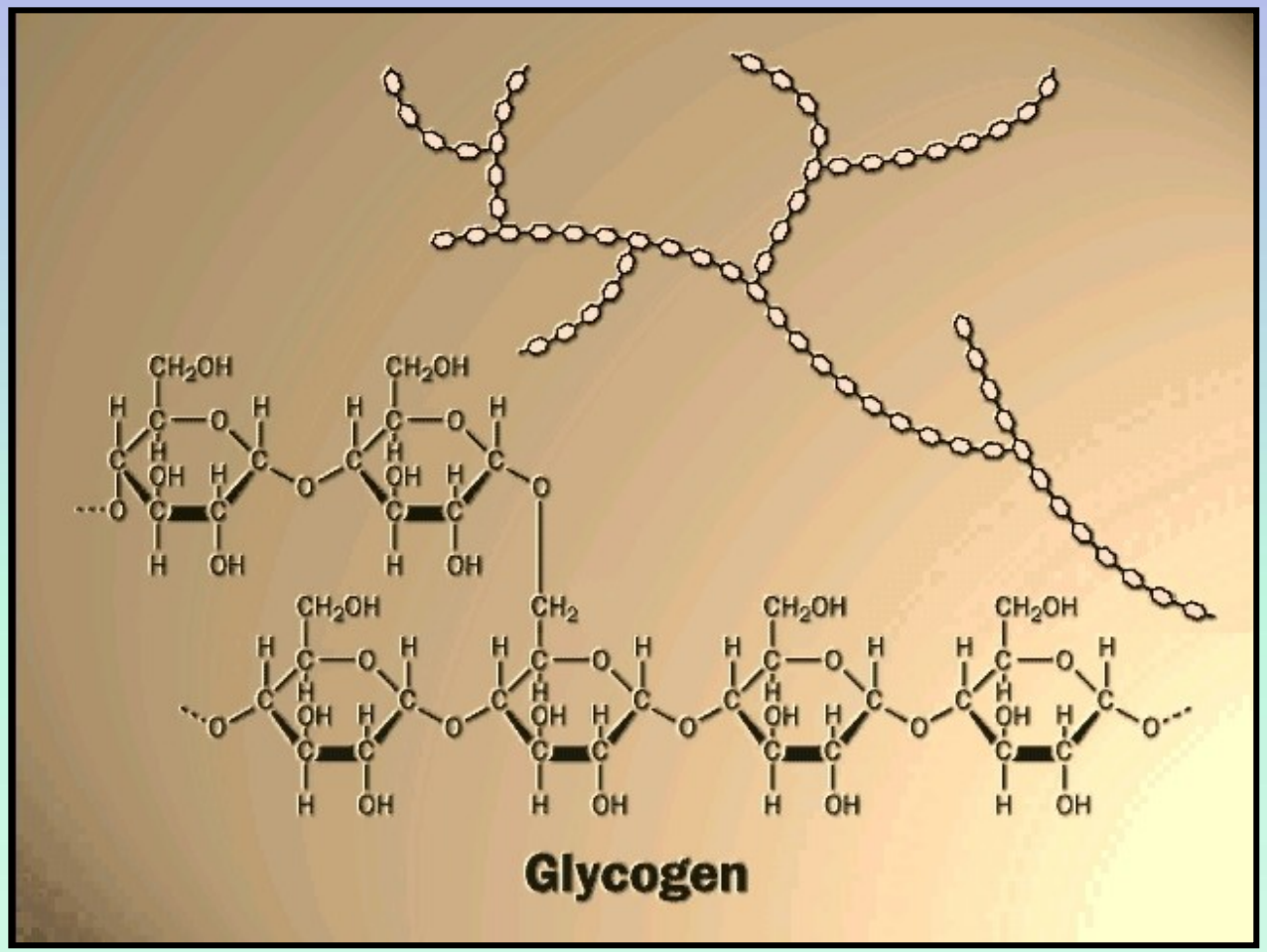
a) obdané membránou

Glykogen



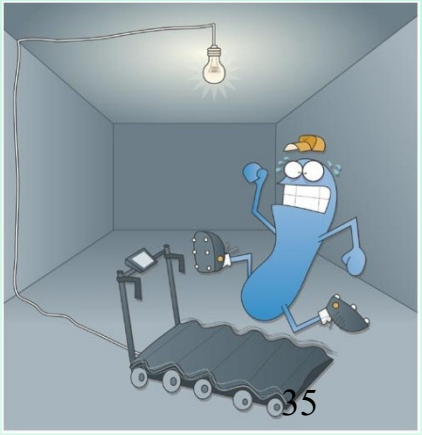
- 160 – 300 nm, až 50 % sušiny
- počet 1-10
- rozpustný polymer glukózy
- α-1,4 **vazby** a α-1,6 **větvení** na každém 8-10tém monomeru
- **Může a nemusí** mít membránu
- Ve světelném mikroskopu **není viditelný:**

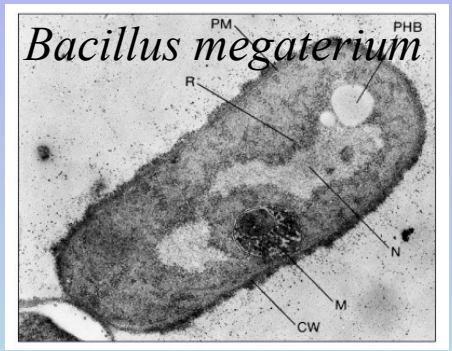
Barvení Lugolovým roztokem

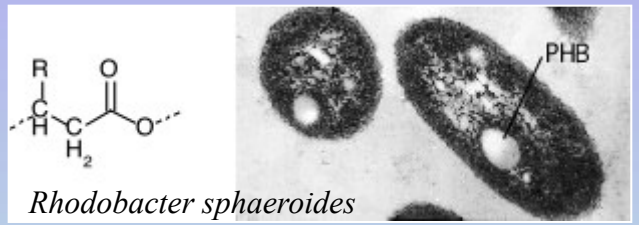


Nachází se především v buňkách bacilů a enterobakterií!

Bakteriální glykogen je silně větvený. Slouží jako pohotová rezerva.



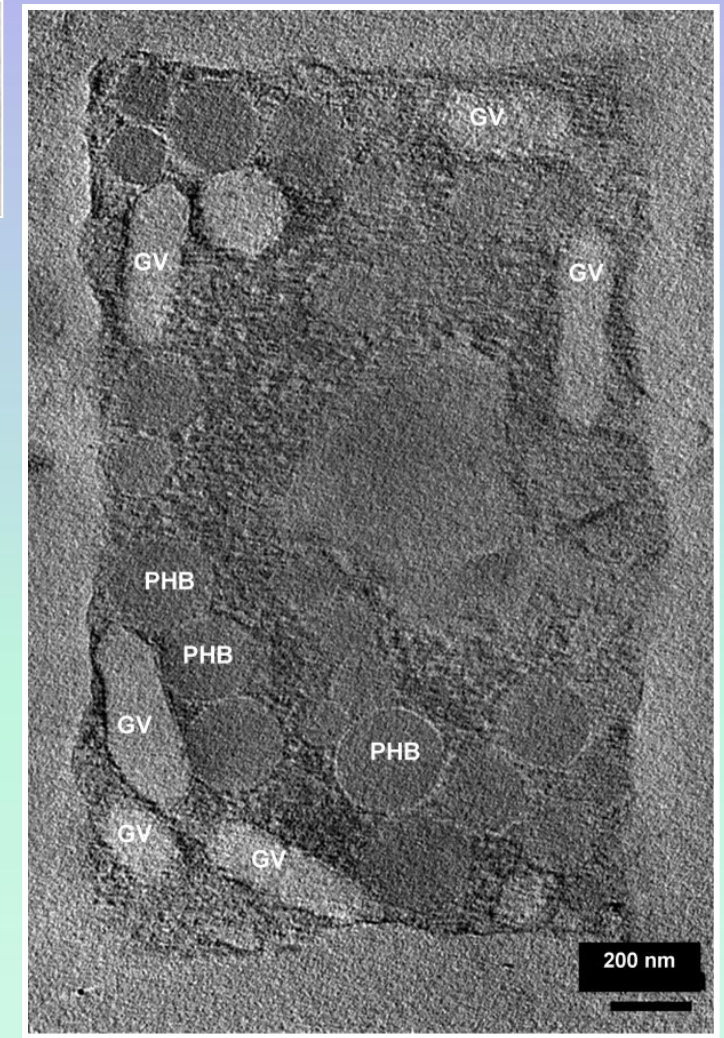




Rhodobacter sphaeroides
Samuel Kaplan, University of California-San Diego

PHB

- kyselina polyhydroxymáselná
- až 60% sušiny
- **viditelná** ve světelném mikroskopu
- Je to odpadní produkt



- Vyskytuje se u **aerobů**: *Bacillus, Pseudomonas*

Síra

Granula elementární síry, *Beggiatoa*
Temné pole, 800x

- viditelné kapénky

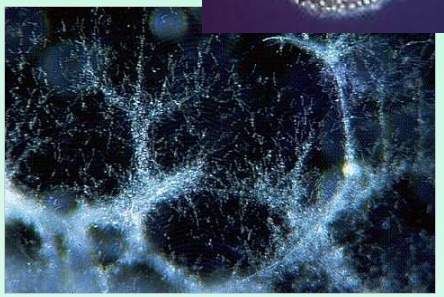
amorfní síry

<u>chemolitotrofní</u>

<u>sirné bakterie</u>

oxidace redukovaných sirných sloučenin

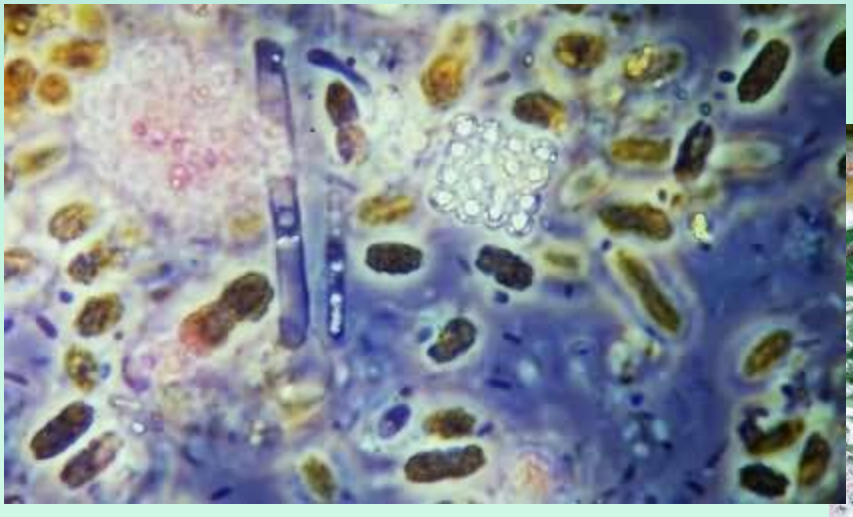
je tedy pro ně **zdrojem energie**.



•Oxidace sirovodíku primárně poskytuje elementární síru

•síra je následně oxidována na sulfát

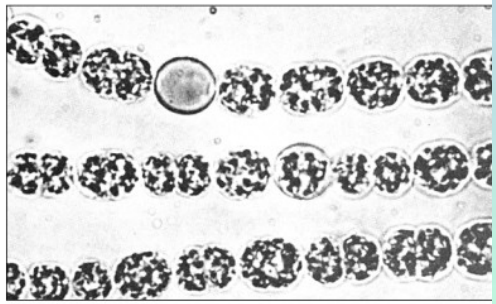
- Dále u fototrofních sirných bakterií
  - zelených a purpurových
- není zdrojem energie, ale zdrojem elektronů v procesu fotosyntézy.

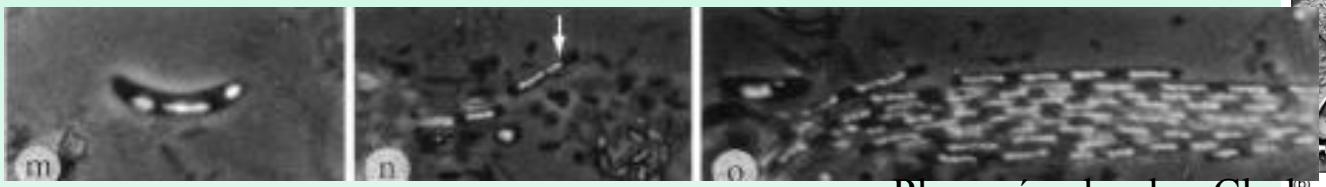


Plynové vakuoly

cylindrické aerosomy (45 – 200 nm)

- **sinice a planktonní bakterie**
- (cca u 50ti rodů bakterií;
- purpurové a zelené sirné a halofilní *Archea*)
- plyny vznikající při metabolismu
- u archeí **napomáhají pohybu** ve vodě
- množství plynu závisí na **teplotě a viskozitě**
- Membrána z **jedné vrstvy bílkovin**

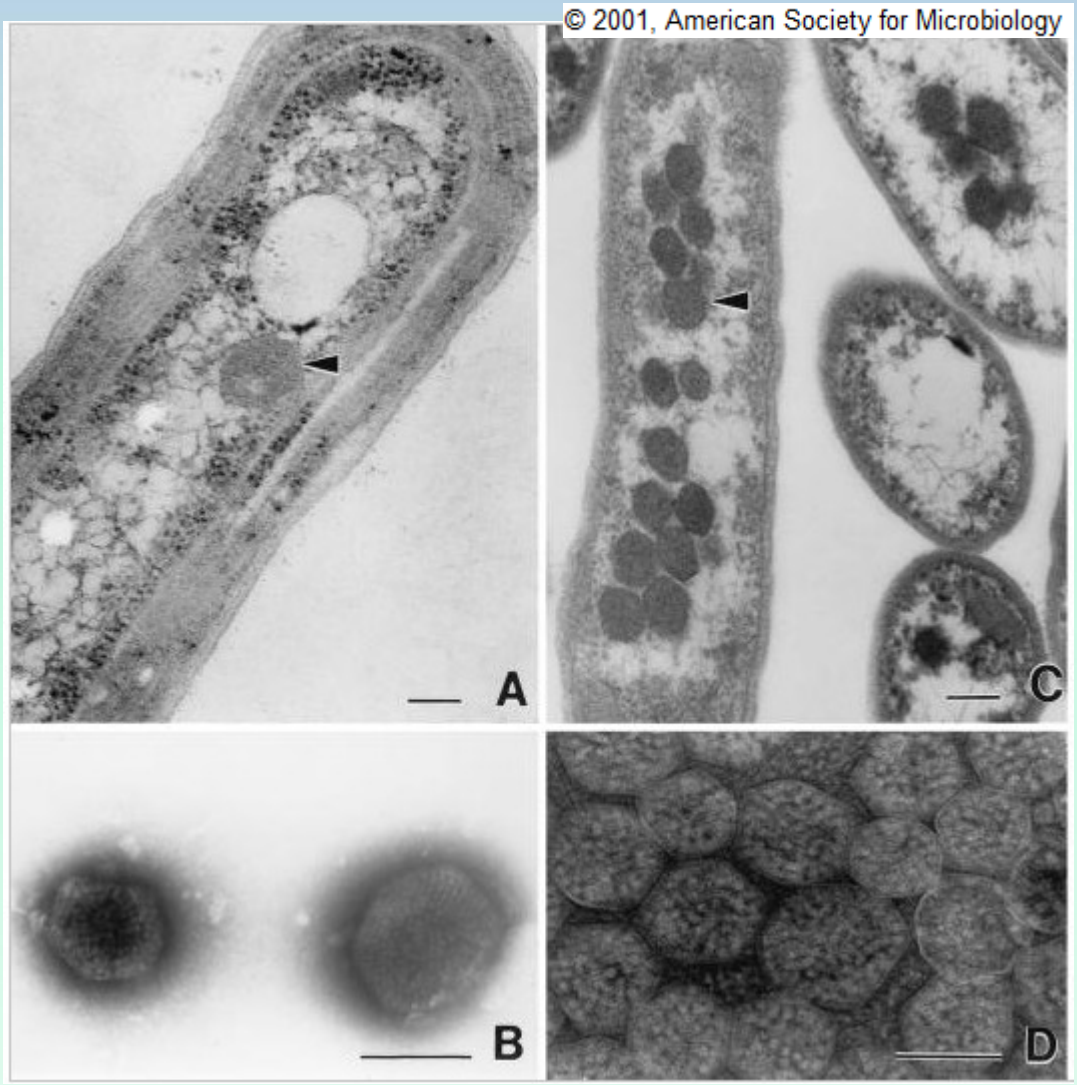




Plynové vakuoly , Clark, Walsby 1979

Karboxizomy

- protáhlé polyhedrické cisterny
- usnadňující fixaci CO_2
- syntéza hexóz
- za vhodných podmínek počet (1-10)
- nedělí se



A) *Synechococcus* karboxyzom
B) *–II-* negativní barvení
C) *H. neapolitanus* karboxyzom
D) *H. neapolitanus* karboxyzom, negativní barvení

Chlorobiové váčky

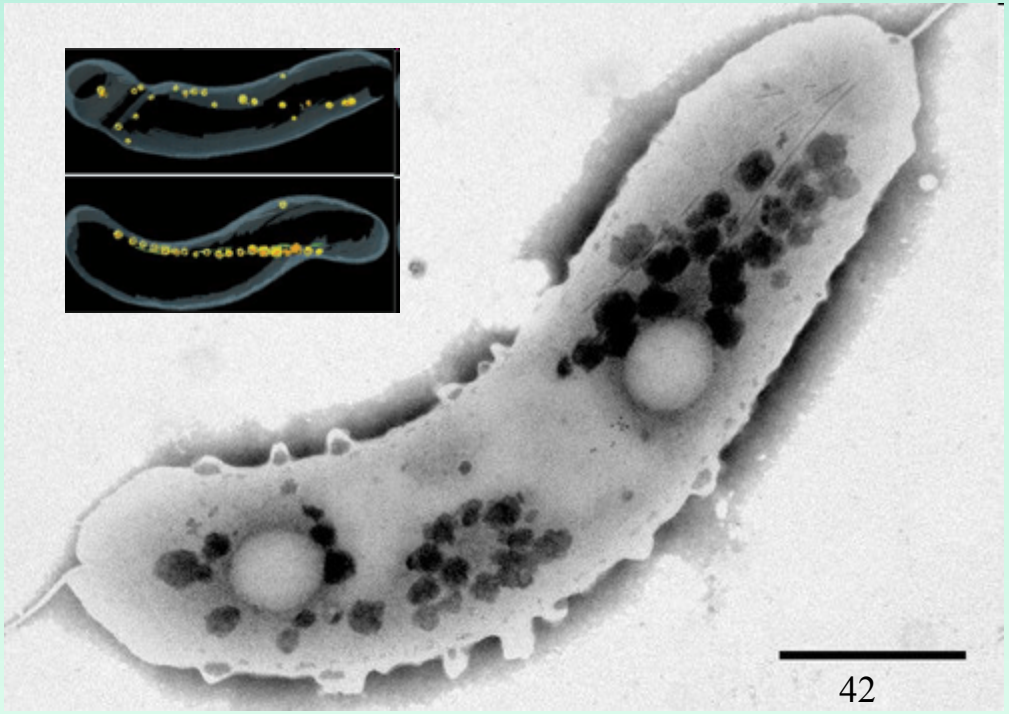
- Jen **zásobárny pigmentů** – bakteriochlorofyl a karotenoidy
- Nikoli reakce a vazba světla
- Přenášeny do chromatoforů, kde vlastní fotosyntéza
- Počet: 2-10

Magnetosomy

- krystaly **oxidu železnato – železitého (Fe_3O_4)**
  orientace v magnetickém poli = magnetotaxe

- **vodní organizmy citlivé ke kyslíku**

- obaleny **speciální membránou** umožňující precipitaci Fe_3O_4



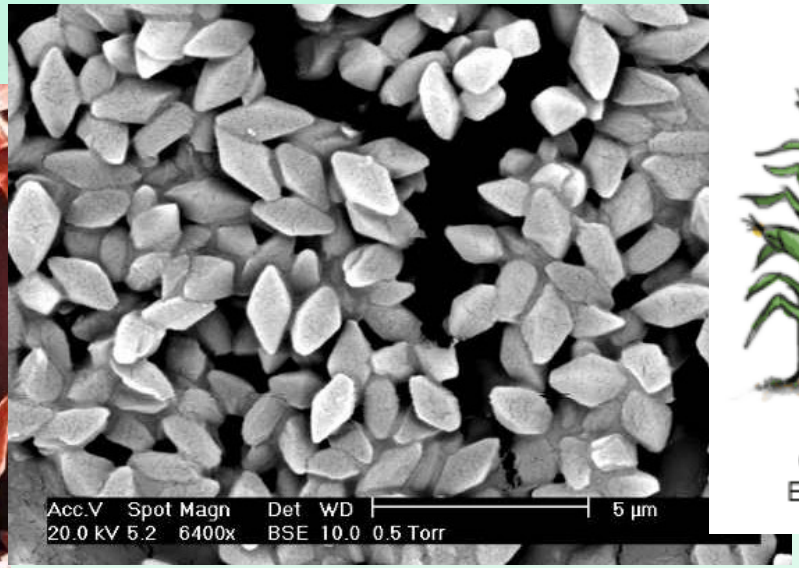
b) bez membrány

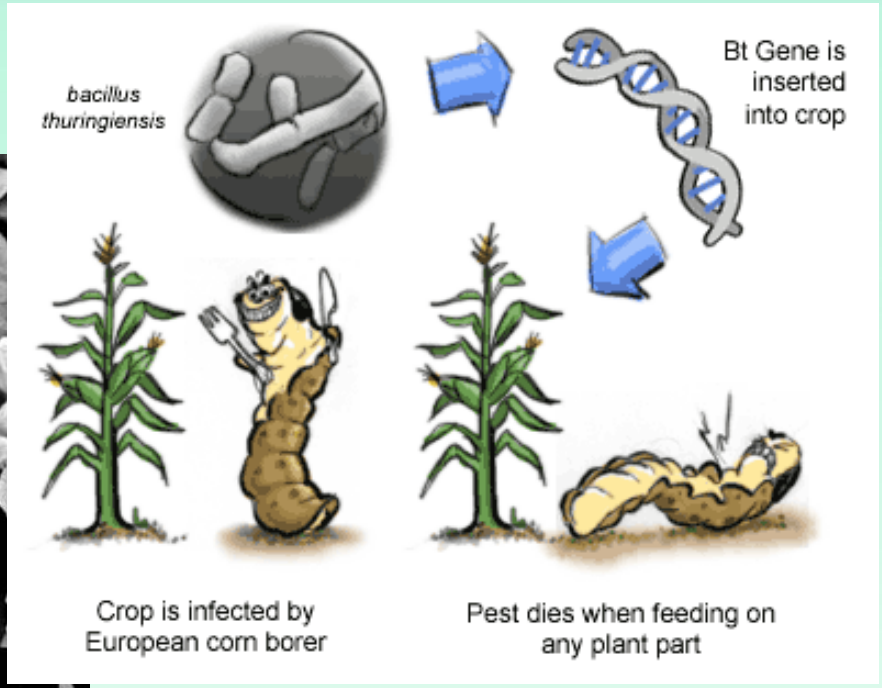
Glykogenová granula – 20 – 100 nm, jedna buňka je může mít pouze s nebo bez membrány, **v rámci rodu lze obojí zároveň.**

Krystaly

Parasporální

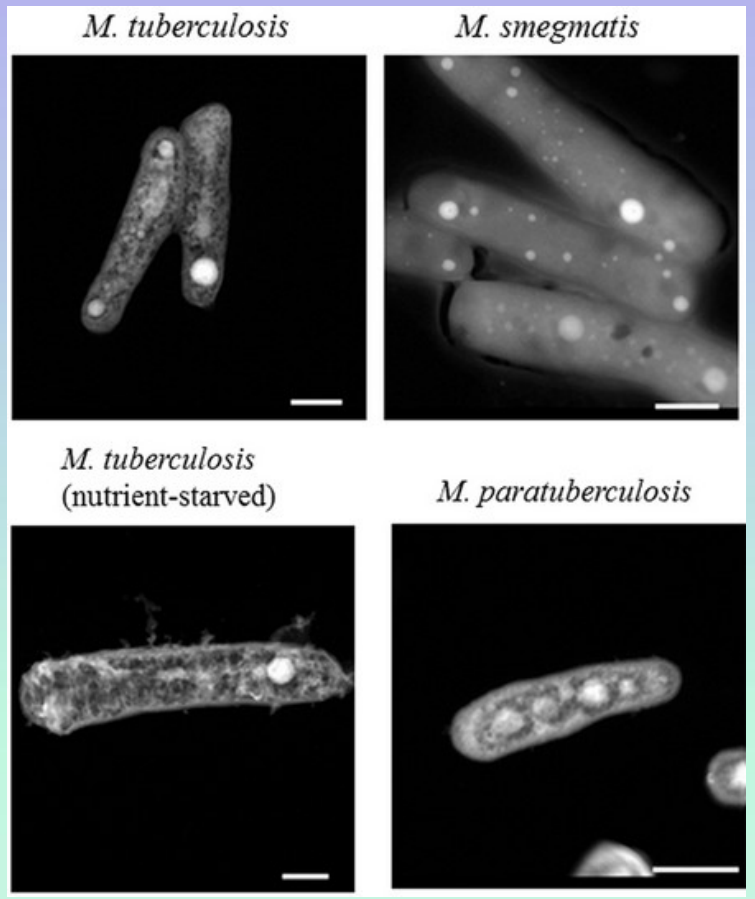
(Bioinsekticidy – *Bacillus thuringiensis* – na moučné červy, i selektivní působení (až na druhy))





Polyfosfátová granula

= **volutin** - při nadbytku ATP



- Akumulace z jakého důvodu??
- Je dobře viditelný pod mikroskopem
- Až 500 molekul, nerozpustný ve vodě
- **Nikdy není zdrojem energie**
- Počet: 1 – mnoho, podle metabolismu.
- Vysoký počet je v době před přechodem do klidového stadia
- 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

Pigmenty

- Produkty primárního i sekundár. metabolismu. Produkovány v závislosti na stanovišti

- Pokud jsou produktem primárního metabolismu – jsou bezpodmínečné potřeby (bakteriochlorofyl, karotenoidy)

- Využívají se při **metabolismu** nebo mají **protektivní účinek** či jiný ekologický význam (**inhibiční účinky**)
- Protektivní účinek – absorbuje světlo o určité vlnové délce, jsou syntetizovány až v rámci **sekundárního metabolismu**.

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

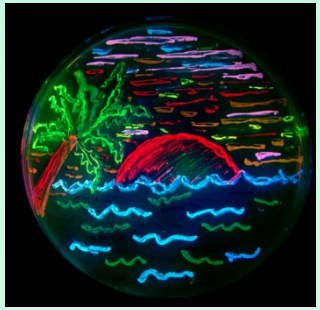
Př: **karotenoidy *Streptococcus* B** – závažný původce pneumonií a meningitid u novorozenců;

zlatý karotenoid *Staphylococcus aureus* opět brání proti oxidačním reakcím imunitního systému)

- Buňka může produkovat endo- (protektivní) i exopigmenty různých barev

- Řada pigmentů vzniká nadprodukcí látek.

- 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 vyskytující se pigmenty:

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

pH prostředí? Kultivační medium? Stáří kultury?
Endopigment? Exopigment?
Mikrobicidní? Protektivní?

Úprava a využití bakteriálních pigmentů

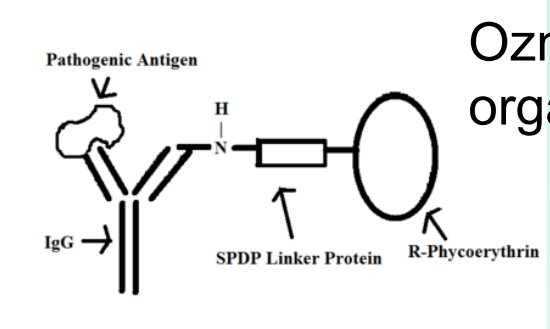
- Potravinové doplňky – karoteny - retina, antioxidanty (melanin)
- Barviva v potravinářství
- A jako přírodní barviva textilií – akrylová vlákna, hedvábí, bavlna (vydrží míň), PE (míň), ...

– většina syntetických barviv obtížně degradovatelná a toxická! (obsah karcinogenních dioxinů☹)

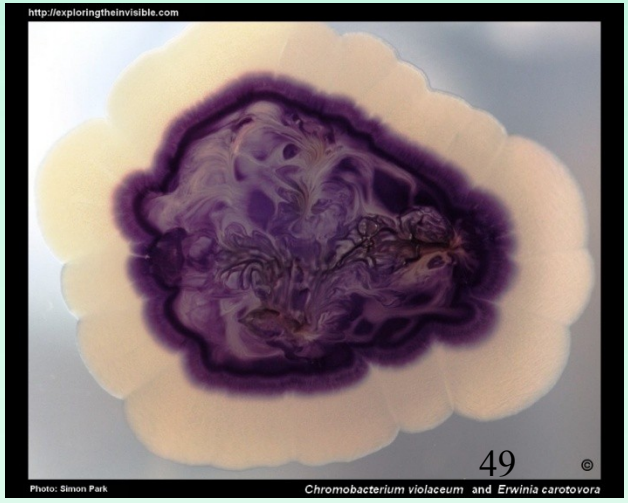
Testy toxicity!

Př: žlutooranžové, červené a růžové pigmenty *Chryseobacterium sp.*, *Serratia marceseus*, and *Chromobacterium violaceum*

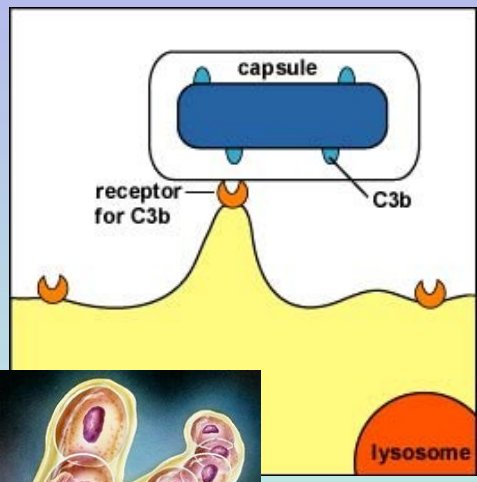
- Některé pigmenty fluoreskují – značení Ab



Označení patogenního organismu



Struktury vně buňky



- **<u>Kapsuly – mikro a makro</u>**

- dobře organizované, rigidní, AMK nebo cukry

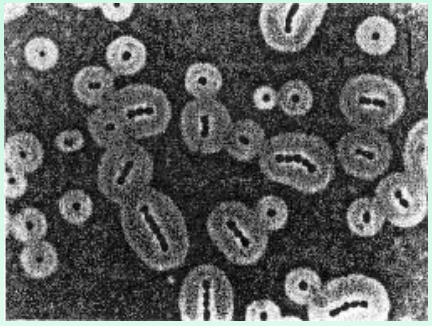
Bacillus – kyselina glutamová

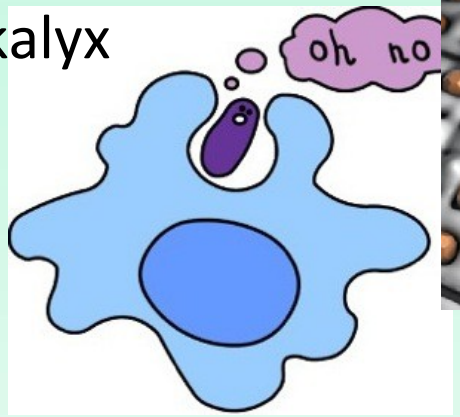
Bacillus anthracis – poly-D-glutamová

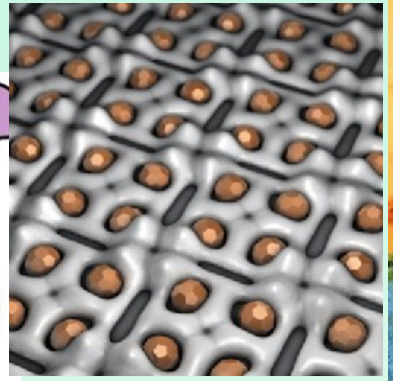
- **<u>Slizy</u>** - polysacharidy

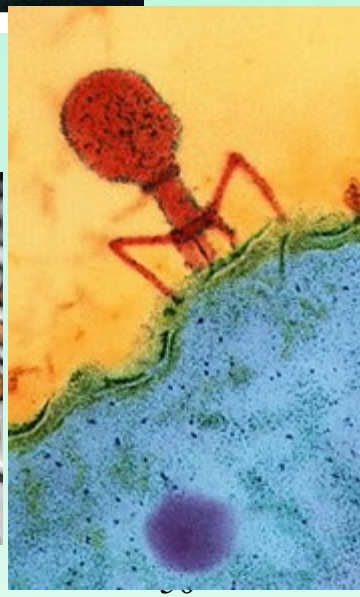
  - lépe odstranitelné, difúzní, neorganizované

kapsuly nebo slizy = glykokalyx

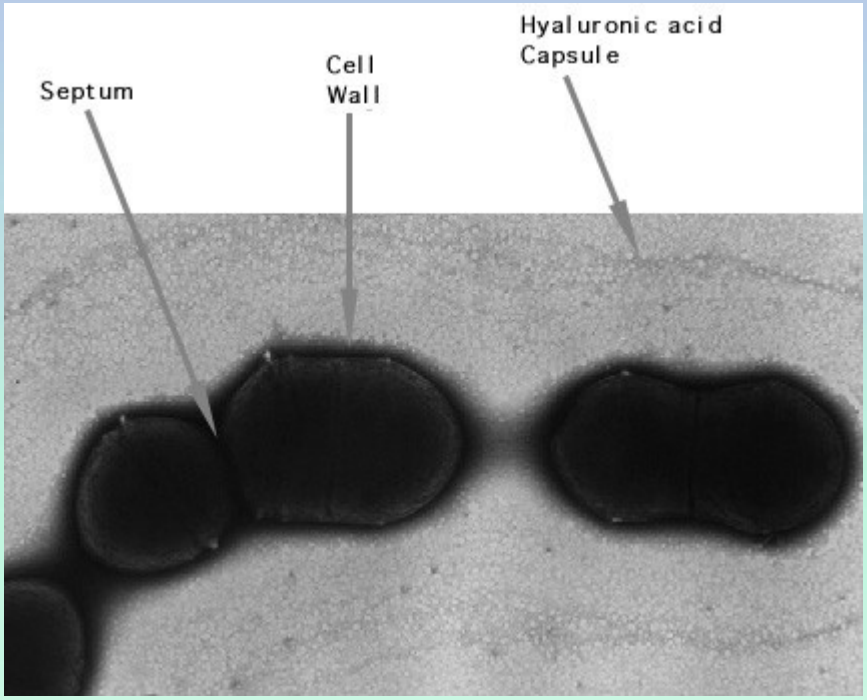




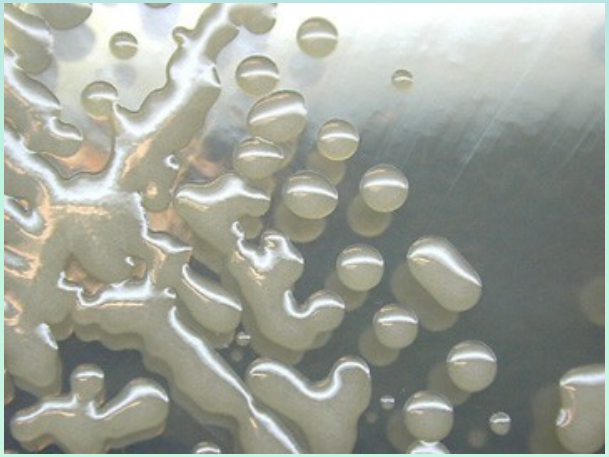




Kapsula - virulence



Jeden druh až **60 druhů** kapsulových antigenů



Negativní barvení - *Streptococcus* *pyogenes* TEM (28,000X).
Kapsula – kys. hyalurnová- PS

Bacillus* *anthracis
poly-D-glutamát

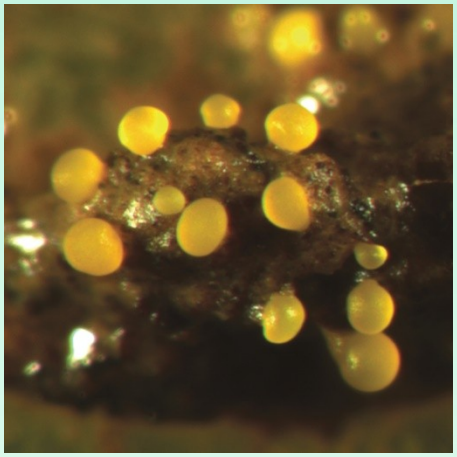
Tvorba pouzdra ovlivněna složením media, prostředím

Sliz

- **Sliz** – řídký **difúzní neorganizovaný** materiál

  - spojuje více buněk, **snadno odstranitelný**, nejčastěji **polysacharid**

  - může sloužit k pohybu ve vlhkém prostředí.



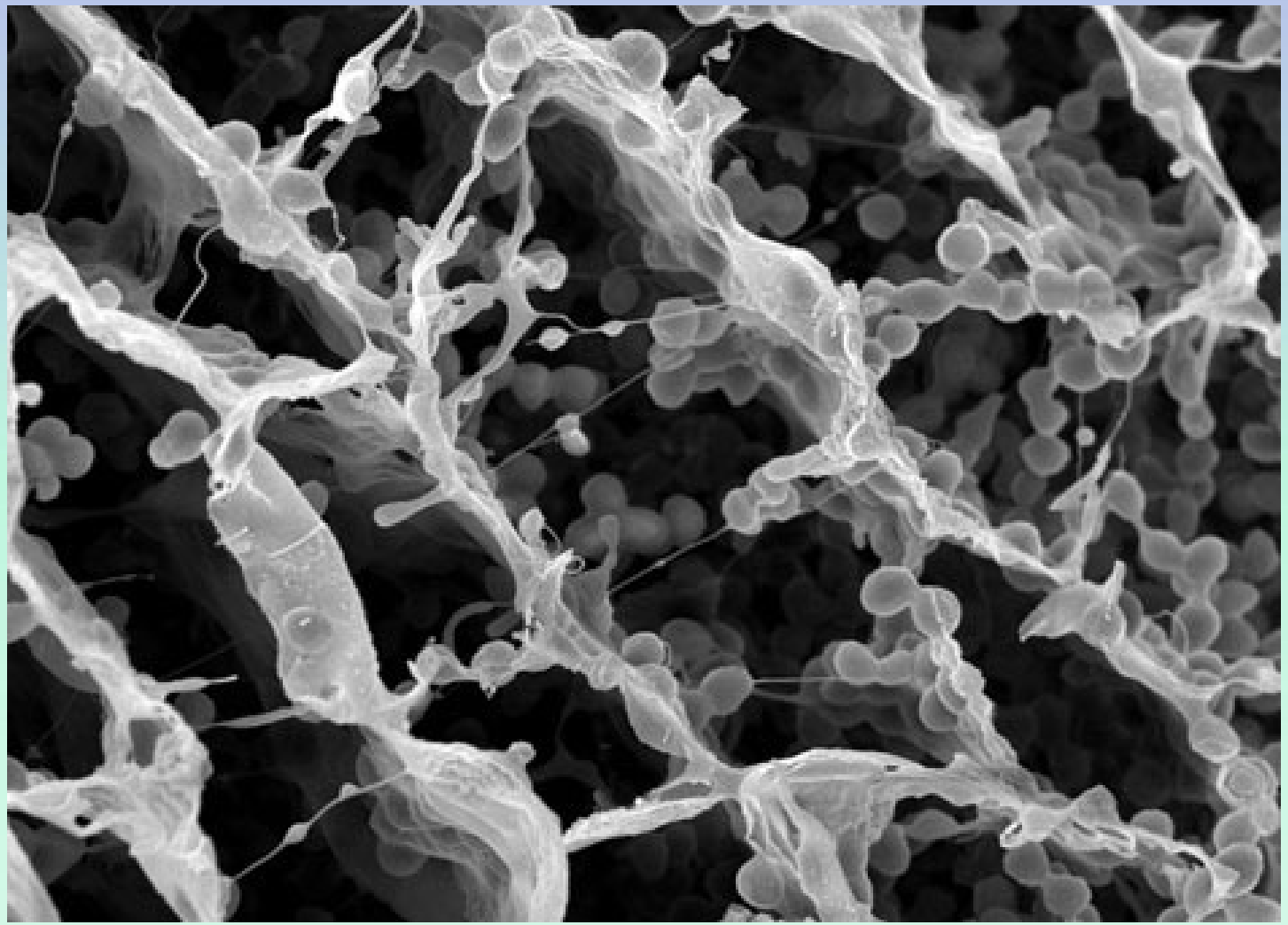
Glykokalyx

- netvoří se v laboratorních podmínkách za dostatku živin

  = síťovina z vláken polysacharidů a glykoproteinů

- umožňuje adherenci, která je málo až vysoce specifická

- Kationty umožňují spojení stejně nabitých buněk a povrchů

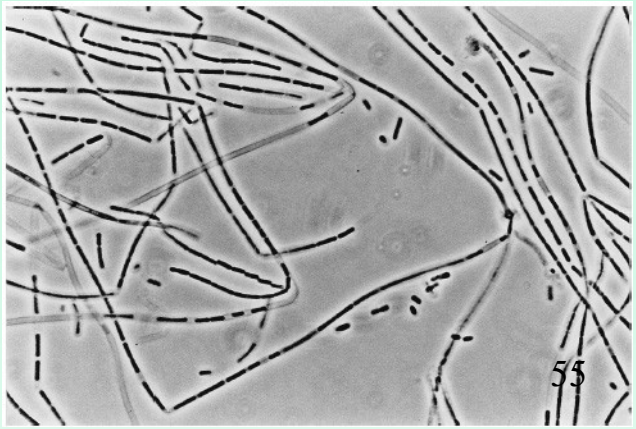


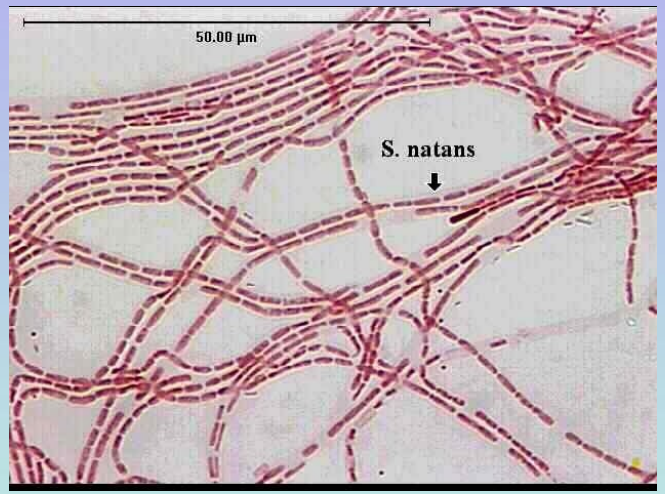
Pochvy

- Přisedlé MO
- Trubkovitý tvar
- Až několik mikrometrů
- Pohyb

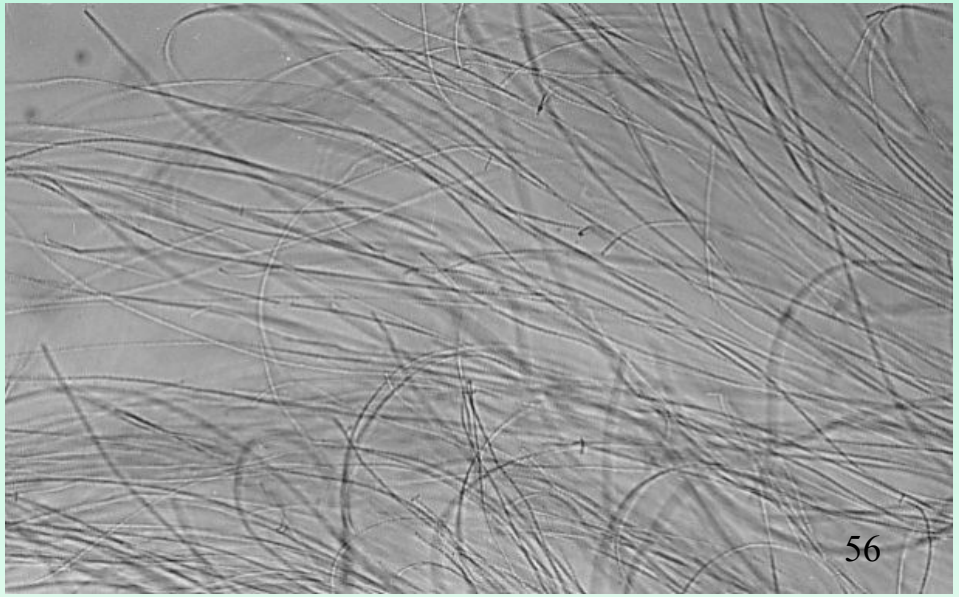
- výhradně z PS
- chemické složení a zbarvení druhově specifické
- **glukóza + kyselina glukuronová** (*Sphaerotilus*) u jiných rodů např. fukóza
- Někdy **hydroxidy kovů** – v malém množství

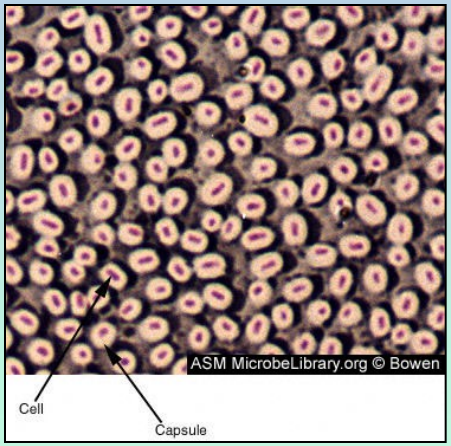
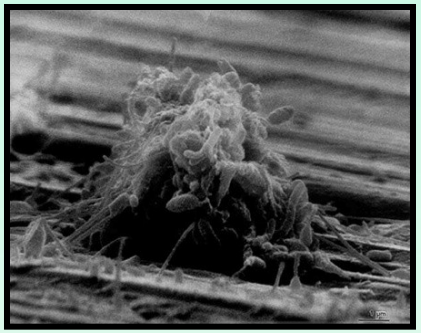
  (zbarvení; Fe, Mn, Cu; závisí na druhu)
- Př: *Sphaerotilus, Leptothrix*





Sphaerotilus natans



Struktury vně buněčné stěny

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