



Extremofilové ...

... aneb někdo to rád horké
(případně i studené, kyselé atp.)

Vladimír Kopecký Jr.

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze
Oddělení fyziky biomolekul
<http://atrey.karlin.mff.cuni.cz/~ofb/kopeccky.html>
kopeccky@karlov.mff.cuni.cz

Evoluce jak ji známe

Extremofilní organismy



Extremofilové

Extremofilní organismy – definice

- Extremofilní organismus je ten, který prospívá v extrémních podmínkách
- Polyextremofilní organismus prospívá nejlépe v podmínkách dvou a více extrémů
- Extrémem se rozumí fyzikální (např. teplota, tlak, radiace) či chemické podmínky (např. salinita, vysychání, pH, redox potenciál, oxidační prostředí)
- Mezi extrémy by se mohly též zařadit biologické faktory (např. nutriční extrémy, populační hustota, parasite, atp.)

Extremofilové

Kdo je extremofil?

- Jaké podmínky jsou skutečně extrémní?
 - Naše definice jsou antropocentrické
 - Z pohledu mikrobů je člověk extremofil libující si v oxidačním prostředí
- Musí extremofil opravdu milovat (-fil) své extrémní prostředí?
 - Mnoho organismů spíše toleruje extrémní podmínky než aby je aktivně vyhledávalo
- Musí být organismus extremofilem po celý život a ve všech fázích svého vývoje?
 - *Deinococcus radiodurans* vlivem extrémního zatížení ztrácí odolnost vůči radiaci
 - Života tolerují během zimního spánku překvapivě nízké teploty
 - Želvušky krátkodobě snášejí teploty od -253°C do 151°C , X-ray, vakuum, tlaky 600 MPa

Evoluce jak ji známe

Limity života

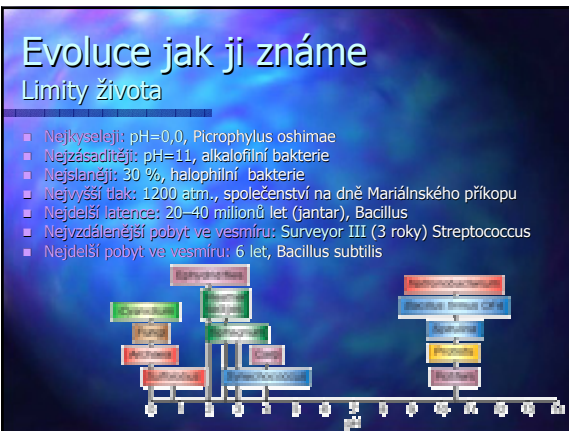
- Nejtepleji: 113°C , *Pyrococcus furiosus* (Islandské a Italské sopky)
- Nejstudeněji: -15°C , *Cryptotendolithotroph* (Antarktida)
- Nejhlouběji: 2 míle pod zemí, bakterie v hloubkových vrtech
- Nejvyšší radiace: 5 Mrads, *Deinococcus radiodurans* (všudyprítomný)



Evoluce jak ji známe

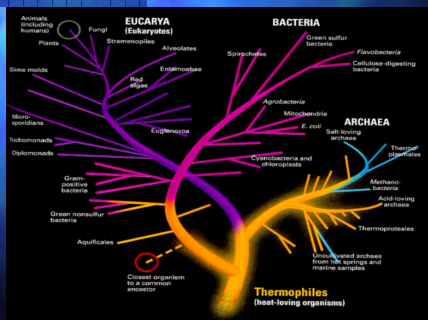
Limity života

- Nejvyšší pH: $\text{pH}=0,0$, *Picrophilus_torresmariae*
- Nejslaději: $\text{pH}=11$, alkalofilní bakterie
- Nejslaněji: 30 %, halofilní bakterie
- Nejvyšší tlak: 1200 atm., společenství na dně Mariánského příkopu
- Nejdelší latence: 20–40 milionů let (jantar), *Bacillus*
- Nejvzdálenější pobyt ve vesmíru: Surveyor III (3 roky) *Streptococcus*
- Nejdelší pobyt ve vesmíru: 6 let, *Bacillus subtilis*



Evoluce jak ji známe

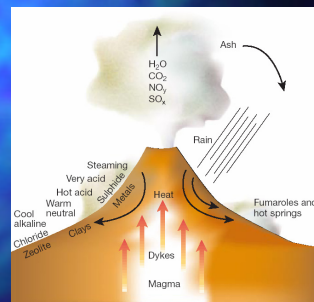
Hledání nejvzdálenějšího předka



Evoluce jak ji známe

Podmínky na pradávné Zemi

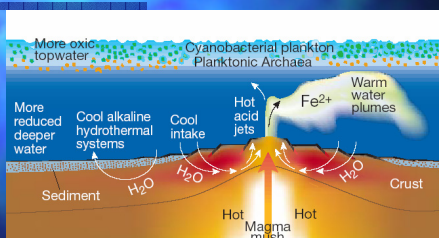
- Podmínky na pradávné Zemi v mnohém připomínají podmínky v nichž žijí extremofilní organismy
- V těchto podmínkách se dnes vyskytují zástupci archaee
- Oblasti pozemských sopek hostí prostředí s velkým rozsahem pH, s vysokou koncentrací SO_4 a CO_2 , magnesia a niklu



E. G. Nisbet & N. H. Sleep, Nature 409 (2001) 1083–1091.

Evoluce jak ji známe

Podmínky na pradávné Zemi



Oblasti podmořských sopek jsou dodnes oázy archaického života nezávislé na fotosyntéze. Prostor je silně kyselé, teplota až 400 °C, vysoký tlak (ca. 3 km pod hladinou) dostatek Fe a sloučeniny síry

E. G. Nisbet & N. H. Sleep, Nature 409 (2001) 1083–1091.

Evoluce jak ji známe

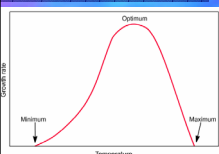
Pozoruhodný svět v temnotách

- Svět „železných kufáků“ objeven ponorkou Alvin v roce 1977
- Jde o horká termální zřídla (ca. 350 °C) ve velkých hloubkách (>3000 m) bohatá na sloučeniny síry
- Doposud objeveno okolo 30 zón termálních podmořských zřídél
- Ekosystém je založen na sirmých bakteriích
- Červy rodu Riftia pachyptila nepřijímá potravu a žije pouze ze symbiózy s bakteriemi

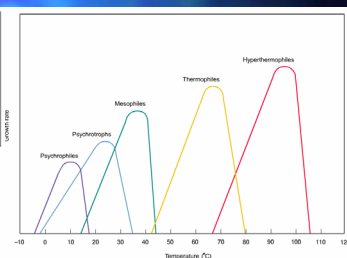


Extrémní teplota

Rozdělení organismů dle optimální teploty růstu



Mikroorganismy lze rozdělit do skupin dle optimální teploty pro růst. Teplotní rozsah možného růstu je relativně široký. Ve formě spor mohou mikroby přežít mnohem nepříznivější okolnosti.

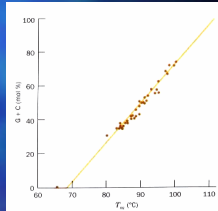


L. M. Prescott et al., McGraw-Hill (1999).

Extrémně vysoká teplota

Kdo pak to rád horké?

- Většina hypertermofilních organismů jsou zástupci archaee
- Chlorofyl degraduje při 75 °C → fotosyntéza je vyloučena
- Zdrojem energie je nitrifikace či příbuzné reakce
- Průměrná DNA denaturuje při ca. 70 °C
 - DNA termofilů je stabilizována (před hydrolyzou a depurinací) solemi KCl a MgCl_2
 - G+C nejsou častější v DNA pouze v ribozomální RNA a tRNA
- Proteiny denaturují při ca. 60 °C
 - Proteiny termofilů nemají jiné teplotní optimum
 - Jsou rigidnější a teplotní křivka je plošší



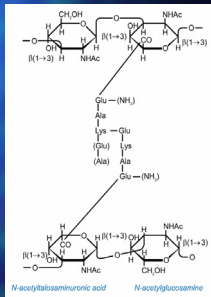
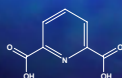
Teplota tání nukleové kyseliny v závislosti na obsahu G+C párů (guanin + cytosin)

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémně vysoká teplota

Jak přežít vysoké teploty

- Biomolekuly disintegrují při teplotách 200–250 °C
- Fluidita membrán se při vysokých teplotách zvyšuje
- Archae využívá modifikované biomolekuly
 - Zvýšené množství heat-shock proteinů
 - Zvýšené množství disacharidů
 - Rigidnější lipidy v membránách
 - Glykopeptidy ke zpevnění membrán např. Molekuly příbuzné těm, jež jsou užívány při sporulaci za účelem snížení fluidity membrány (např. kys. dipicolinovou – DPA)

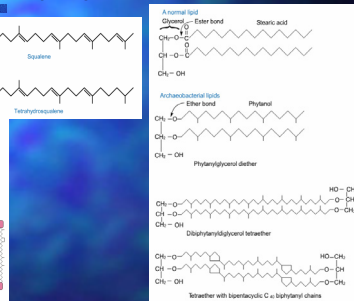
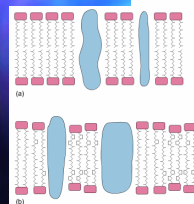


L. M. Prescott et al.: Microbiology, McGraw-Hill (1999).

Extrémně vysoká teplota

Jak přežít vysoké teploty

Modifikace membránových lipidů u archae

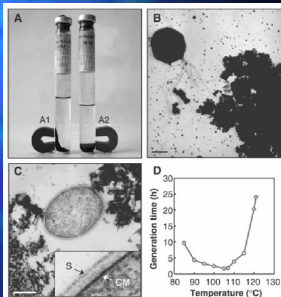


L. M. Prescott et al.: Microbiology, McGraw-Hill (1999).

Extrémně vysoká teplota

Mikrobiální život za teploty 130 °C

- Pouze 1 % rekordmana *Pyrolobus fumarii*, standardně se množícího za teploty 113 °C, přežilo autoklavování při 121 °C
- Nově nalezený kmen 121 (příbuzný *Pyrodicticum occultum*), z 300 °C hořkého „černého kuráku“, se při teplotě 121 °C množí a přežije teplotu min. 130 °C
- Mechanismy přežití nejsou známy
- Bakterie využívá jako zdroj energie redukci Fe(III) na Fe(II) za vzniku magnetitu
- Horní teplotní limit je zřejmě dán nestabilitou biomolekul

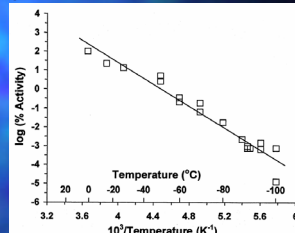


K. Kashefi & D. R. Lovley, Science 301 (2003) 934.

Extrémně nízká teplota

Aktivita enzymů při teplotě –100 °C

- Funkčnost enzymů vyžaduje kapalné rozpouštědlo
- Některé enzymy ztrácejí při nízkých teplotách funkčnost díky dynamickému přechodu do jiné konformace
- Při nižších teplotách je aktivita enzymů ovlivněna fluiditou roztoku pro substrát/produkt
- Nebyl nalezen žádný limit v oblasti nízkých teplot pro fungování enzymů



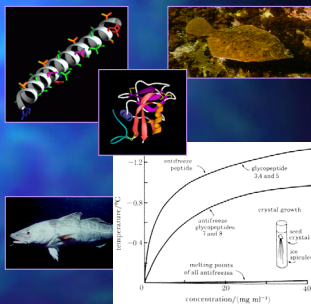
Arrheniův graf pro aktivitu alkalín fosfatázy v roztoku methanol/ethylenglykol/voda (70/10/20 %)

J. M. Bragge et al., Biochim. Biophys. Acta 1480 (2000) 278–282.

Extrémně nízká teplota

Nemrzoucí proteiny

- Existují proteiny, které umožňují život vyšším živočichům za nízkých teplot (především rybám)
- Existují antifreeze proteiny a glykoproteiny IV typů
- Molekulová váha 2,6–33 kDa
- V sekvenci převažuje Ala ca. 60 % (někdy Cys), ve struktuře helix
- Mechanismus účinku není přesně znám, snad vazba na specifické konformace ledu

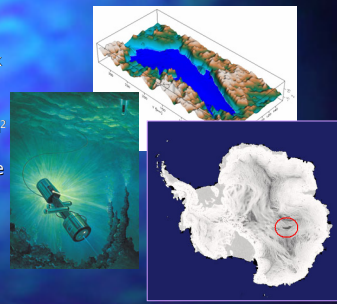


F. Sicheri & D. S. C. Yang, Nature 375 (1995) 427–431.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vostok

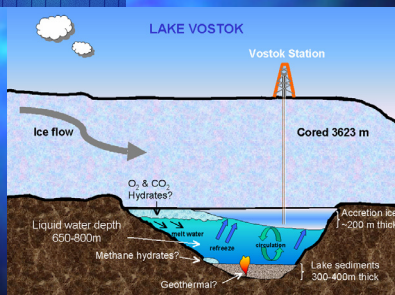
- Roku 1974 se podařilo u antarktické stanice Vostok nalézt jezero ukryté pod vrstvou ~4 km ledu
- Jde o rozlehlé (10 000 km² – tj. ca. jezero Ontario) sladkovodní jezero o délce 180 km
- Průměrná hloubka 125 m
- Odhaduje se, že vodní svět jezera je izolován již miliony let



A. P. Kapitsa et al., Nature 381 (1996) 684–686.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vostok



J. C. Priscu et al., Science 286 (1999) 2141-2144.

Extrémní radiace

Nepřirozené podmínky

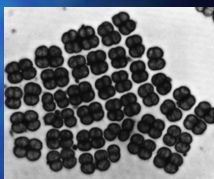
- Radiaci se rozumí vysoké dávky částicového záření (neutrony, elektrony, alfa částice, těžké ionty) nebo elektromagnetického záření (prakticky celé spektrum od gama, přes X-ray, až po radiové vlny)
- Jde o podmínky, které se na Zemi přirozeně nevyskytují
- Studium probíhá vzhledem k důležitosti pro medicínu, válečnictví a kosmický výzkum
- Radiace inhibuje fotosyntézu a přímo poškozuje nukleové kyseliny
- Mezi rekordmany snášející vysoké dávky záření patří mikroby *Deinococcus radiodurans*, *Rubrobacter* a zelená řasa *Dunaliella bardawil*

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092-1101.

Extrémní radiace

Velký rekordman

- Deinococcus radiodurans* (půdní bakterie, všeobecně rozšířená) je zřejmě největším extremofilem vůbec
- Snáší vysoké dávky ozáření – 20 kGy gama záření – UV ozáření více než 1000 J/m² – 3–5 milionů rad (100 rad je pro člověka letální dávka)
- Přežívá i extrémně vysoké tlaky a zrychlení
- Jde zřejmě o vedlejší efekt rezistence vůči vysychání
- Bakterie obsahuje velké množství antioxidantů a detoxifikačních enzymů
- Má unikátní mechanismus pro opravu DNA, který umožňuje její správné poskládání z fragmentů

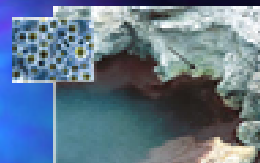


Mikrokolonie *Deinococcus radiodurans* organizovaného do tetrad. Průměr bakterie je 2,5 µm.

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092-1101.

Extrémní pH

Jak žít a přežít...



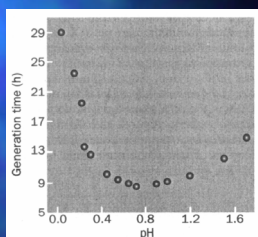
- Acidofilní organismy vyžadují jako optimální pH pro růst <2 (ryby a cyanobakterie nesnáší pH<4, rostliny a hmyz <3, jen někteří eukaryoti tolerují pH<1)
- Alkalofilní organismy tolerují pH>11 (zástupci všech říší)
- Schopnost přežít je závislá na změněné fyziologii (více protonových pump, pasivní mechanismy nábojů na membránách) a schopnosti přizpůsobit pH okolí neutrálnímu

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092-1101.

Extrémní pH

Mikrobiální život při pH=0

- Je známo zhruba ca. 5 druhů bakterií žijících při pH=0
- Hyperacidofilní bakterie vyžadují k růstu většinou i teplotu >50 °C
- Obsah G+C párů je ca. 40 %
- Není zřejmé jak bakterie přežívají nízká pH, buď užívají silné protonové pumpy, nebo nízkou protonovou permeabilitu membrán



Graf růstu *Picrophilus oshimae* (při teplotě 60 °C)

C. Schleper et al., Nature 375 (1995) 741-742.

Extrémní koncentrace solí

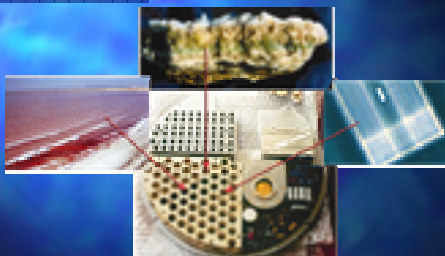
Jak žít a přežít

- Haloofilní organismy vyžadují prostředí s vysokou koncentrací solí, někdy i nasycených roztoků solí
- Mezi haloofilními organismy lze nalézt zástupce erchae, cyanobakterie, ale i zelenou řasu *Dunaliella salina*
- Ochranné mechanismy jsou podobné jako ochrana před suchem (dehydratací) – podobné podmínky s kosmickým prostorem, sicc!
- Organismy užívají zvýšení osmolarity v cytosolu (ochrana před dehydratací), některé zvyšují obsah K⁺, či prokaryoté užívají jako osmotikum glycin betain
- K zadržení vody se užívá snížení permeability membrán, zvýšení obsahu cukrů, glutamátu, glutaminu, prolinu etc.

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092-1101.

Extrémní koncentrace solí

Experimenty v kosmu



Experiment BioPan vystavil haloofilní organismy na dobu dvou týdnů kosmickému prostředí. Vlevo erchae Dunaiaella, uprostřed Synechococcus (z pacifické solné zóny), vpravo mikrofotografie Haloarculy uzavřené v krystalu NaCl.

Extrémní tlak

Jak přežít tlaky

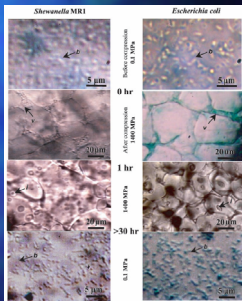
- Zvýšený tlak posunuje hranici kapalnosti vody (na dně moře ca. 10 km voda vře při 400 °C) a tak i možnost optimálního růstu mikrobů – využíváno velmi zřídka
- Vysoký tlak snižuje fluiditu buněčných membrán (reakcí je zvýšení obsahu mastných kyselin v membránách)
- Vysoký tlak může pomoci stabilizovat konformace proteinů, některé však destabilizuje a navíc může ohrozit i stabilitu DNA
- Mezi „tlaky“ by měl být zařazen i vliv gravitace

L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní tlak

Mikrobiální život za tlaku GPa

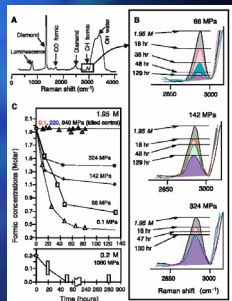
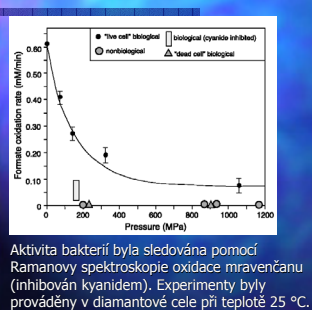
- Bakterie žijí při tlacích do 1060 MPa
- Aktivita byla sledována pomocí oxidace mravenčanu
- Bakterie zamrzlé ve VI-ledu přežívají tlak až do 1600 MPa
- Z 10^6 bakterií přežilo 30 h expozici GPa tlaku 10^4
- Stres způsobený vysokým tlakem zároveň selektuje jedince odolné k vyšším teplotám
- Použitý tlak 1200–1600 MPa odpovídá hloubce ~50 km pod povrchem Země nebo ~160 km pod hladinou moře



A. Sharma et al., Science 295 (2002) 1514–1516.

Extrémní tlak

Mikrobiální život za tlaku GPa



A. Sharma et al., Science 295 (2002) 1514–1516.

Organismy žijí v extrémtech...

... ne všechny je však přežijí

