

Bioluminescence

- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo (suchozemští a mořští živočichové, houby)
- v roce 1887 profesor Raphael Duboise izoloval ze světlušek dvě látky: luciferin a luciferázu
- na zemi světélkují zejména brouci z čeledi Lampyriade (světlušky) a někteří kovařáci (např. Pyrophorus noctilucus)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakaticé, ryby, paryby, atd. Zatím nebyl objeven žádný sladkovodní živočich jevící bioluminiscencí...
- bioluminescence živočichů je z evolučního hlediska vysvětlována různými důvody: hledání partnera (světlušky), lákání kořisti (např. ryba zubatka, některé druhy světlušek), maskování (žraloček brazilský), zastrašení nepřátel (ryba stříbrnák, medusy z čeledi klanonožců)
- bioluminescence hub (např. některé druhy václavek, „Jack-O-Lantern“, helmovky)

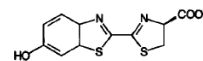
Princip

- Luciferin se mění na oxidovanou formu (oxoluciferin), která má přebytek energie, která se může uvolnit ve formě fotonu
- Tuto reakci většinou katalyzuje enzym (luciferáza)
- Oxidovadlem bývá často H_2O_2 nebo O_2
- Reakci často doprovází přítomnost některých kovů (Cu, Fe, Ca, Mg, atd.)
- Analogie s chemiluminiscencí, ale probíhá v těle organismů

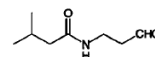
Základní pojmy

- Luciferiny: skupina látek s **různou** strukturou

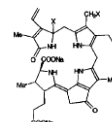
Luciferin ze světlušky (Firefly)



Červí luciferin (Earthworm)



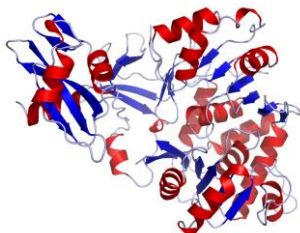
Luciferin z obrněnky (Dinoflagellate)



Základní pojmy

• Luciferáza: oxidativní enzym

- „divoká“ luciferáza ze světlušky *Photinus pyralis*, tento protein má $M_r = 62\,000$
- jen u čeledi světlušek (Lampyridae) bylo popsáno přes 2000 typů luciferáz
- v některých organismech (např. houbách) se luciferáza zřejmě nenachází



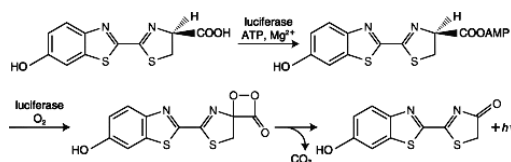
Základní pojmy

- místo jednoduchého luciferinu je v některých organismech „komplex“ fotoprotein-luciferin (tedy komplex substrátu s enzymem)
- jedná se o intramolekulární reakci
- Komplex fotoprotein-luciferin je velmi stabilní
- pro bioluminiscenci je zpravidla nutná přítomnost některých iontů nebo molekul, např. peroxid, ATP, Ca^{2+} nebo Fe^{2+} , které spustí bioluminiscenční reakci
- např. fotoprotein *aequorin* emituje světlo ve vodném prostředí po dodání Ca^{2+}
- emitované světlo je přímo-úměrné koncentraci fotoproteinu

Světlušky

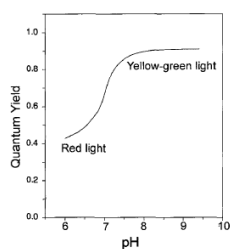
- v ČR se vyskytuje pouze **Světluška větší** (*Lampyris noctiluca*)
- samečci létají a světélkují méně jak samičky
- samičky nelétají (pohlavní dimorfismus), pohybují se po zemi a svítí výrazněji
- také larvy světlušek mohou světélkovat
- světlušky regulují bioluminiscenční reakci
- „naše“ světlušky světélkují kvůli rozmnožování
- existují i druhy světlušek, které vysílají světelné signály s určitou frekvencí
- některé světlušky dokáží měnit frekvenci signálů, aby mohly lovit menší druhy světlušek

Oxidace luciferinu (světluška)



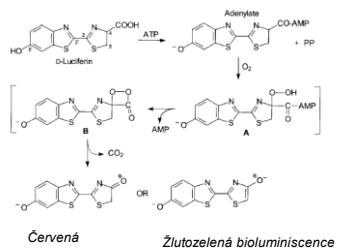
- na oxidaci luciferinu pomocí O_2 je třeba ATP, Mg^{2+} a enzym luciferáza
- všechny druhy světlušek využívají tento luciferin („firefly luciferin“), stejně jako další druhy bioluminiscenčních brouků (Lampyridae, Phengodidae, Eleteriodae)
- jsou ale i druhy hmyzu (např. *Arachnocampa*), které využívají jiné luciferiny

„Firefly“ luciferin



Seliger and McElroy (1962)

Světlo emitované světluškami je zpravidla zeleno-žluté (552-582 nm), v kyselém prostředí (laboratorní podmínky) může být i červené (615 nm)



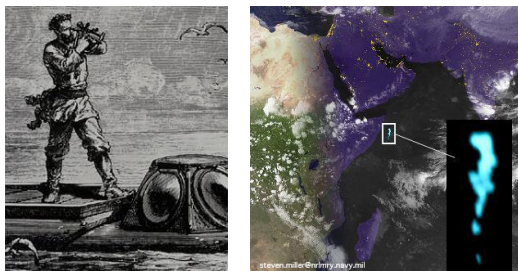
Využití systému luciferin-luciferáza

- Stanovení koncentrace ATP
- Stanovení některých kovů
- Použití v chemiluminiscenční EIA:

Příklad stanovení antigenu

1. protilátka je značen enzymem
2. protilátka značená luciferázou se sráží s antigenem
3. zbytková (nesražená) protilátka značená luciferázou zůstává v systému a je schopna katalyzovat oxidaci luciferinu
4. čím větší kvantový výtěžek, tím méně antigenu ve vzorku

Bioluminiscence bakterií



Tzv. Mléčné moře – způsobený pravděpodobně bakteriemi

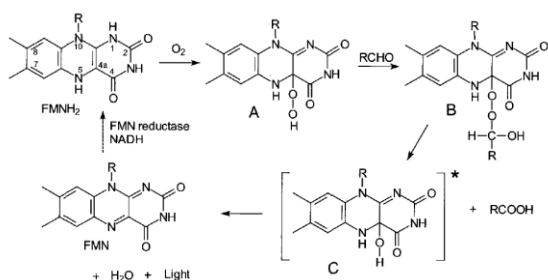
zdroj: <http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/organism/milkysea.html>

Bioluminiscenční bakterie

- Bioluminiscenční bakterie se vyskytují v mořské vodě, na povrchu a v tělech mořských živočichů
- Některé žijí v symbióze s vyššími organismy
- Všechno jsou to „Gram negativní“ bakterie (např. *Photobacterium*, *Beneckea*, *Vibrio*, atd.)
- Bakteriální luciferin je aldehyd s dlouhým řetězcem (10-18 uhlíků), který se v přítomnosti bakteriální luciferázy oxiduje na karboxylovou kyselinu
- Za přítomnosti FMN₂ a O₂
- Někdy dochází k energetickému přenosu (*energy transfer*) na jinou molekulu

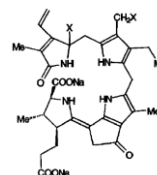


Bakteriální bioluminiscence – předpokládané schéma



Obrněnky (dinoflagellates) a další prvoci (protozoa)

- Prvoci jsou mikroskopické jednobuněčné organismy
- Bioluminiscenci jeví pouze obrněnky a mřížovci
- Obrněnky někdy tvoří tzv. rudý příliv (red tide)



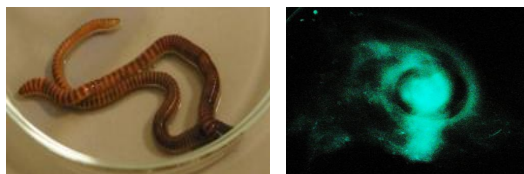
Bioluminiscenční organismy – Austrálie, jezero Gippsland

Bioluminiscence kroužkovců

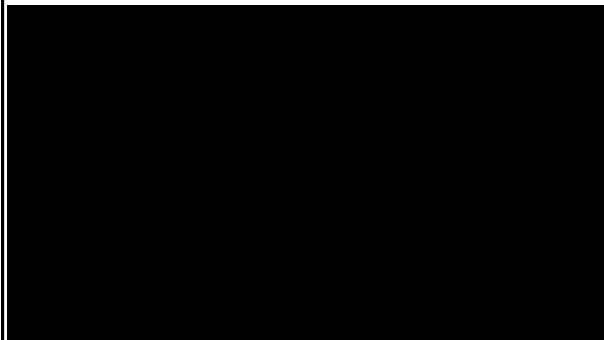
- bioluminiscence kroužkovců (bioluminescent earthworms) – v svítí zástupci mnohoštětináčů (např. *chaetopterus* a *tomopteris*) i máloštětináčů (např. *diplocardia* a *eisenia*)
- bioluminiscenci jeví kolem 33 druhů červů rozšířených po celém světě (hlavně Austrálie a JV Asie)
- v ČR: žížala podhorská/svitivá (*eisenia submontana/lucens*), která žije v podhorských a horských oblastech střední Evropy
- základem luminiscence je opět reakce luciferinu s vodou, nebo peroxidem
- bioluminiscenční je nejčastěji vyloučený sliz
- emise záření od modré po oranžovou barvu

Bioluminiscence žížaly *Eisenia lucens*

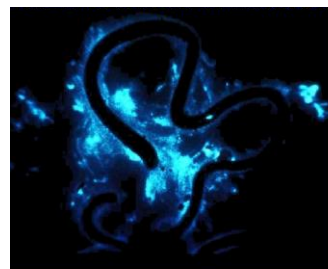
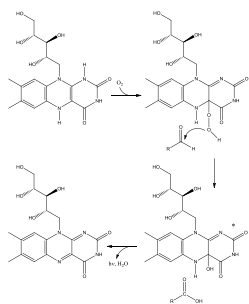
- *Eisenia lucens* (submontana) – žížala svítivá (podhorská)
- Žije v hnijcím dřevě (nejlépe smíšené lesy bez dlouhodobé údržby – pralesy)
- Beskydy, Orlické hory, Vysočina, atd.
- Mechanismus bioluminiscence ještě není zcela prozkoumán
- Žížalu můžeme podráždit např. několika kapkami ethanolu nebo formalínu (formaldehydu)



Eisenia lucens - video



Možné schéma bioluminiscenční reakce – žížala *Eisenia lucens*



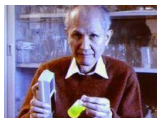
Bioluminiscence kroužkovce *diplocardia longa*

<http://www.bmb.uga.edu/vampler/biolum/worm/index.htm>

Nobelova cena za chemii 2008

„...for the discovery and development of the green fluorescent protein“

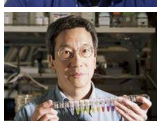
OSAMU SHIMOMURA (Japonsko)



MARTIN CHALFIE (USA)



ROGER Y. TSIEN (USA)



21

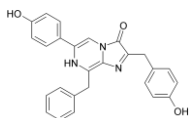
Bioluminescence medusy *A. Victoria*

Většina mořských živočichů jeví bioluminiscenci emituje namodralé světlo. Z evolučního hlediska to lze vysvětlit tím, že v mořských hlubinách se modré světlo lépe šíří. U medusy *Aequorea Victoria* však byla pozorována **zelená** luminiscence...



Bioluminescence medusy *A. Victoria*

- medusa obsahuje fotonprotein *aequorin*, který se skládá s apoproteinu (apoaequorin) a prostetického proteinu, resp. luciferinu (coelenterazin)
- v přítomnosti O_2 a při vysoké hladině Ca^{2+} dojde k oxidaci coelenterazinu na excitovaný coelenteramid a CO_2
- relaxací coelenteramidu do základního stavu se uvolňuje modré světlo ($\lambda = 469 \text{ nm}$)
- uvolněné světlo může být absorbováno dalším proteinem obsaženým v těle medusy – GFP



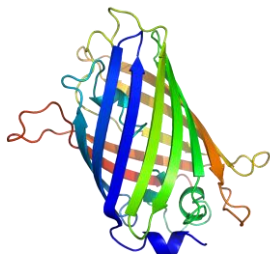
„Green fluorescent protein“

- absorpční maxima GFP jsou 395 a 475 nm ~ může dojít k absorpci světla uvolněného z aequorinu
- absorbované světlo excituje GFP a dochází k vyzáření **zeleného** světla ($\lambda = 509 \text{ nm}$)



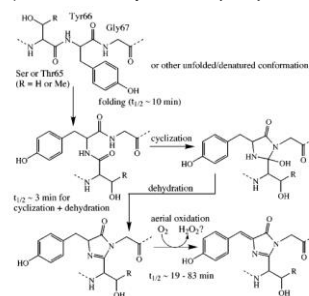
Struktura GFP

- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- V roce 2008 byla udělena Nobelova cena „za objev a výzkum zelené fluoreskujícího proteinu“ (Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien)
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...
- Klíčová sekvence (Ser-Tyr-Gly) se nachází „uvnitř plechovky“
- Protein má celkem 238 aminokyselin (26,9 kDa)



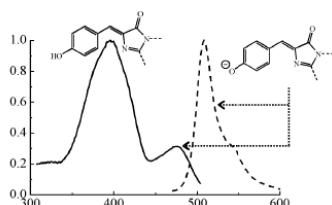
Struktura GFP

- GFP vzniká cyklizací, dehydratací a oxidací vzdušným kyslíkem sekvence proteinu obsahujícím Ser-Tyr-Gly



Tsien Y. R., *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509–44.

Fluorescenční vlastnosti GFP



„Divoký“ typ GFP – směs fenolového a fenolátového derivátu

Hlavní excitační pik - 395 nm (emisní maximum - 508 nm)
 Minoritní excitační pik - 475 nm (emisní maximum - 503 nm)

Použití GFP v chemii a biologii

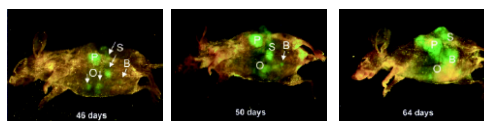
- Ize připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly), který má vlastnosti stejné jako ostatní proteiny, ale je mnohem lépe detegovatelný
- genové inženýrství – sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...



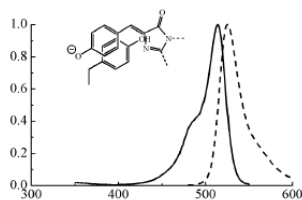
GFK – Green Fluorescent Králík

Použití GFP v chemii a biologii

- nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru

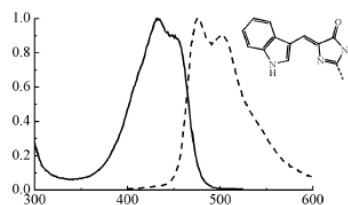


Jiné varianty GFP - YFP



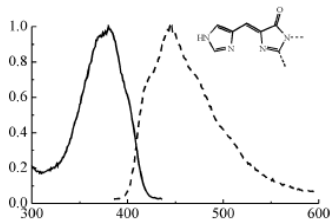
π -electronový „stocking“ s dalším Tyr (tzv. class 4)
516 nm \rightarrow 529 nm
zelenožlutlá luminiscence – YFP (yellow fluorescent protein)

Jiné varianty GFP



TYR je nahrazen indolem (tzv. class 5)
436 nm \rightarrow 476 nm
modrozelená luminiscence, rozštěpení píků

Jiné varianty GFP - BFP

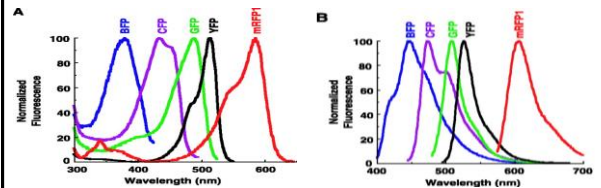


TYR je nahrazen imidazolem (tzv. class 6)

383 nm → 447 nm

modrá luminiscence – BFP (Blue Fluorescent Protein)

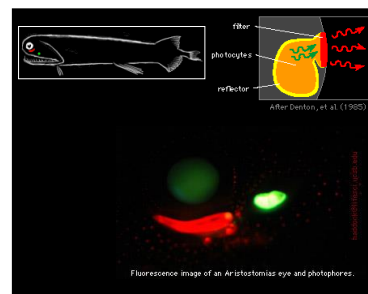
Jiné varianty GFP



Červená bioluminiscence

- většina podmořských živočichů světélkuje modře, nebo modro-zeleně
- modré, nebo modro-zelené světlo se ve vodě šíří dále, než světla vyšších vlnových délek
- „přesto“ několik druhů podmořských ryb (např. *Malacosteus*, *Aristostomias*, nebo *Pachystomias*) je schopno vysílat (a detekovat...) červené světlo (704 nm), aby mezi sebou mohli komunikovat

Červená bioluminiscence ryby *Malacosteus*



Energie vzniklá chemickou reakcí je kaskádově předávána se ztrátami mezi molekulami (energetický transfer) a výsledná vlnová délka emise má maximum okolo 626 nm. Speciální „biofiltr“ propustí jen světlo s vlnovou délkou nad 700nm (červené světlo). Ryba *Malacosteus* je schopno pomocí „antény“ pigmentu toto světlo i zachytit.

Campbell AK, Herring PJ, Comp Biochem Physiol B 86: 411-417 (1987).

Bioluminiscenční houby



- známo je asi 70 druhů hub jevících bioluminiscenci
- některé rostou i v ČR (václavky a helmovky)
- nejčastěji dřevokazné houby
- někdy není jasné jaký má produkce světla pro houbu význam...

Omphalotus olearius - Hliva olivová

- „Jack-O-Lantern“
- „svítí“ lupeny na spodní straně plodnice
- výskyt: srpen až říjen
- rozšířená celosvětově, vzácně i v ČR



Panellus stipticus – pařezník obecný, přovka obyčejná

- roste v mírném pásu severní polokoule (tedy i v ČR), ale bioluminiscence byla pozorována jen u hub rostoucích v sev. Americe ☹
- roste po celý rok, zejména na mrtvém dřevě listnáčů

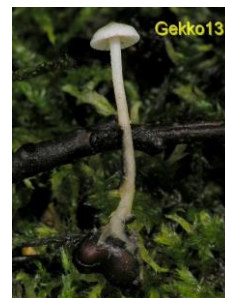


Armillaria mellea – václavka obecná

- "The Honey Fungus,
- celosvětově rozšířená houba, včetně ČR
- „svítí“ často i podhoubí, což vyvolává dojem, že svítí samotné dřevo, napadené touto dřevokaznou houbou



Collybia tuberosa - Penízovka hlíznatá



Mycena rorida - Helmovka lepkavá



Další...

- *Mycena epipterygia*
- Helmovka mléčná - *Mycena galopus*
- Helmovka ředkvičková - *Mycena pura*