

Bioluminiscence živočichů

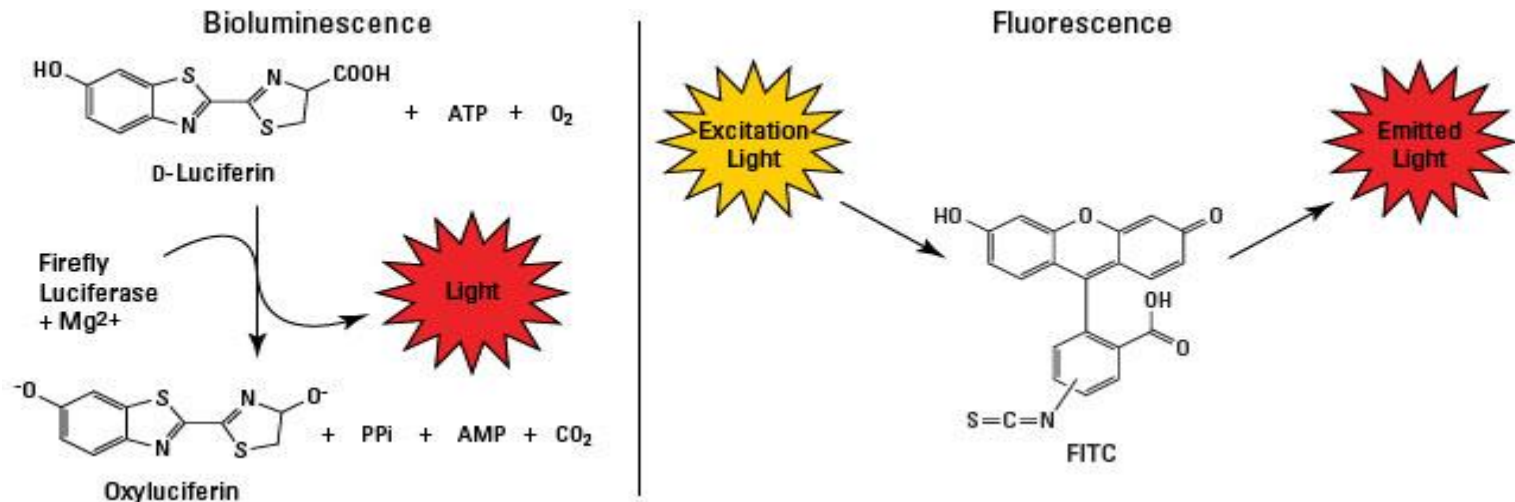
Ondřej Vašíček

ondrej.vasicek@ibp.cz

Bioluminescence

Bioluminescence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

Při této reakci se vyzařuje až 96 % světla a jen 4 % tepla, je tedy z hlediska daných organismů velmi efektivní (pro porovnání, u výbojek je jen 10 %)



Bioluminescence – charakteristické rysy

1. Probíhá v přítomnosti kyslíku

2. Vždy jsou zapotřebí dva typy látek:

luciferin

luciferáza

(lucifer znamená přinášející světlo).

Struktura a vlastnosti luciferázy a luciferinů se liší u jednotlivých skupin lumineskujících organismů

3. Luciferin je základním substrátem reakce

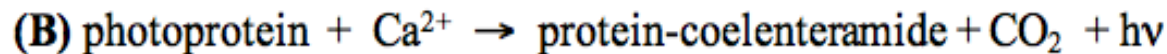
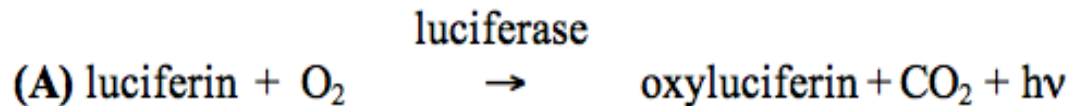


Bioluminiscence – charakteristické rysy

4. Luciferáza katalyzuje reakci.

Luciferin je buď:

v organismech syntetizován nebo je dodáván v potravě



<http://photobiology.info/LeeBasicBiolum.html>

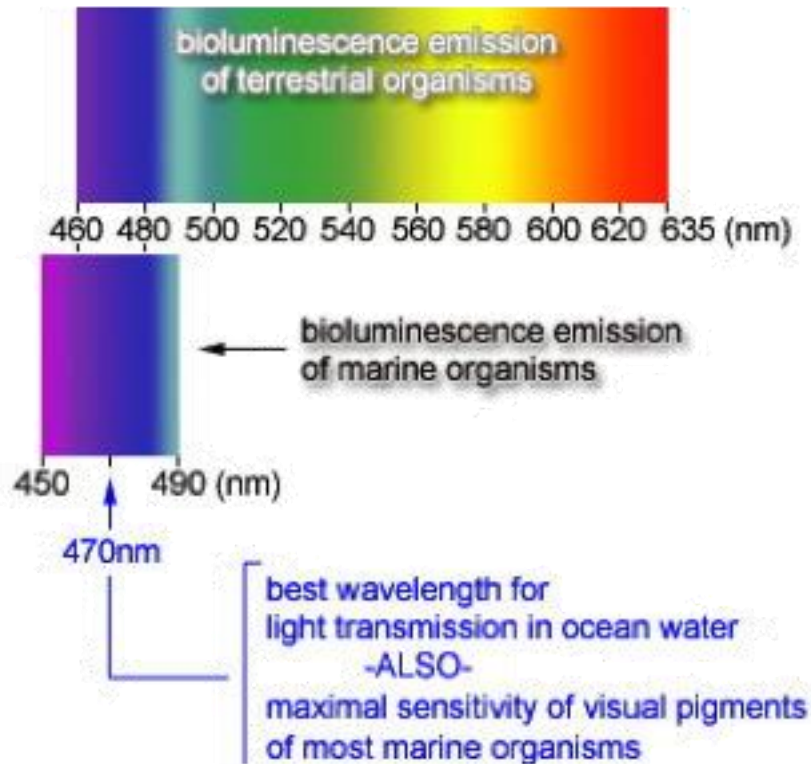
5. Někdy jsou luciferin a luciferáza-like protein navázány a tvoří jednotku nazvanou **fotoprotein**.

Aktivita fotoproteinu je spuštěna, když určitý iont je dodán do systému

Tímto iontem je většinou vápník

Bioluminescence - rozšíření

Obvyklá hlavně v hlubinách moří



<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-marine-120308-081028>

CC1=CC=C(C=C1)N2C(=O)NC(=O)N2C3=CC=C(C=C3)COP(=O)([O-])[O-]

Bacterial
Luciferin + Aldehyde + Luciferase

Bacteria
Some fish
Some squid
Pyrosomes?

CC1=CC=C(C=C1)N2C(=O)NC(=O)N2C3=CC=C(C=C3)COP(=O)([O-])[O-]

Dinoflagellate
Luciferin + Luciferase

Dinoflagellates
Euphausiid shrimp

CC1=CC=C(C=C1)N2C(=O)NC(=O)N2C3=CC=C(C=C3)COP(=O)([O-])[O-]

Cypridina
Luciferin + Luciferase

Some ostracods
Midshipman fish
Some other fish

CC1=CC=C(C=C1)N2C(=O)NC(=O)N2C3=CC=C(C=C3)COP(=O)([O-])[O-]

Coelenterazine
Luciferin + Luciferase
Photoprotein

Radiolarians
Ctenophores
Cnidarians
Squid
Some ostracods
Copepods
Decapod shrimp
Mysid shrimp
Some ophiuroids
Chaetognaths
Larvaceans
Some fish

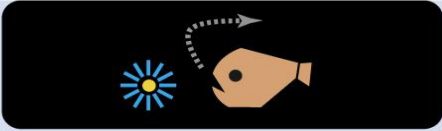
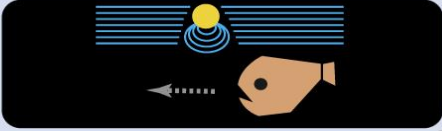




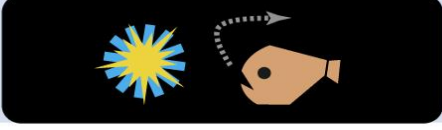
CC1=CC=C(C=C1)N2C(=O)NC(=O)N2C3=CC=C(C=C3)COP(=O)([O-])[O-]

Other or unknown mechanism
Luciferin + Luciferase
Photoprotein
? + ?

Some polychaetes
Bivalves
Hemichordates

Amphipods
Nemertean worms
Tunicates and doliolids
Echinoderms
Other polychaetes

Bioluminescence - funkce

DEFENSE		Startle	Dinoflagellates, squid, stern-chaser myctophid
		Counterillumination	Many: crustaceans, fish, squid
		Misdirection: smoke screen	Many: crustaceans, polychaetes, scyphozoans, chaetognaths, squids, tube-shoulder fishes, ctenophores, siphonophores, larvaceans?
		Distractive body parts	<i>Octopoteuthis</i> squid, brittle stars, polychaetes, siphonophores
		Burglar alarm	Dinoflagellates, jellies, others?
		Sacrificial tag	Pelagic sea cucumbers, jellies, polychaetes
		Warning coloration (deter settlers)	Jellies, brittle stars? (tube worms, clams)



Flash



Glow



Prey

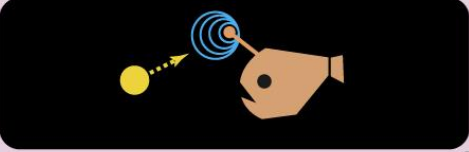
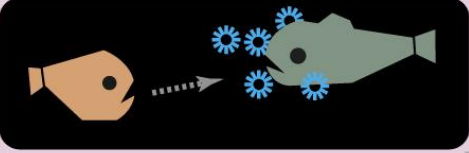


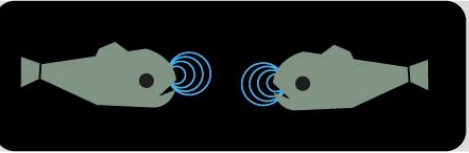


Predator



2° Predator

Bioluminescence - funkce

OFFENSE		Lure prey or attract host (bacteria)	Anglerfishes, siphonophores, cookie cutter shark, squid?
		Lure with external light (evaluate habitat?)	Sperm whale? megamouth shark?
		Stun or confuse prey	Squid, headlamp myctophid?
		Illuminate prey	Flashlight fish, dragonfishes
		Mate attraction/recognition (swarming cue)	Ostracods, <i>Japetella</i> octopus? lanternfish, flashlight fish, anglerfish? syllid polychaetes, others?



Flash



Glow



Prey

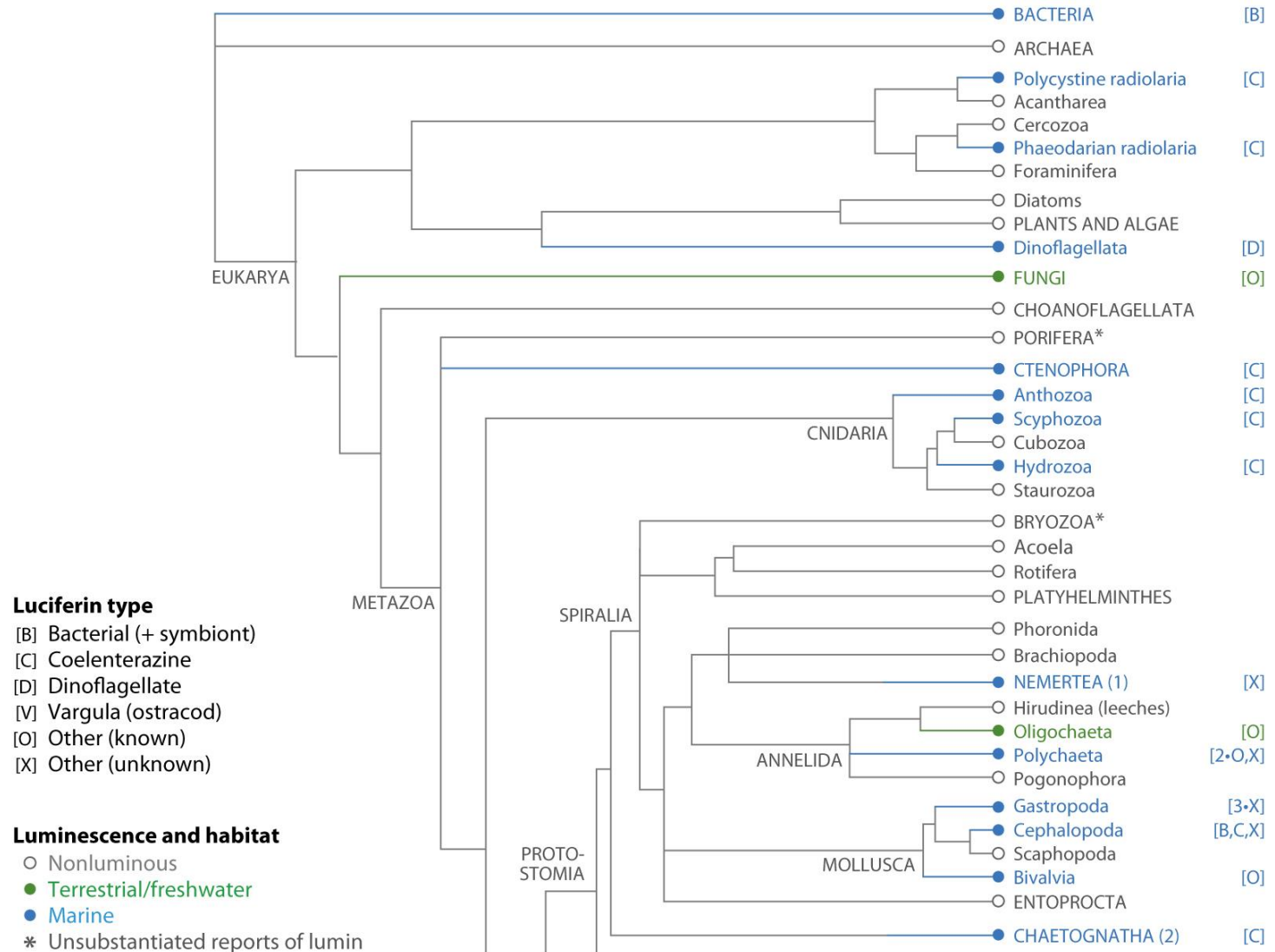


Predator



2° Predator

Bioluminescence živočichů



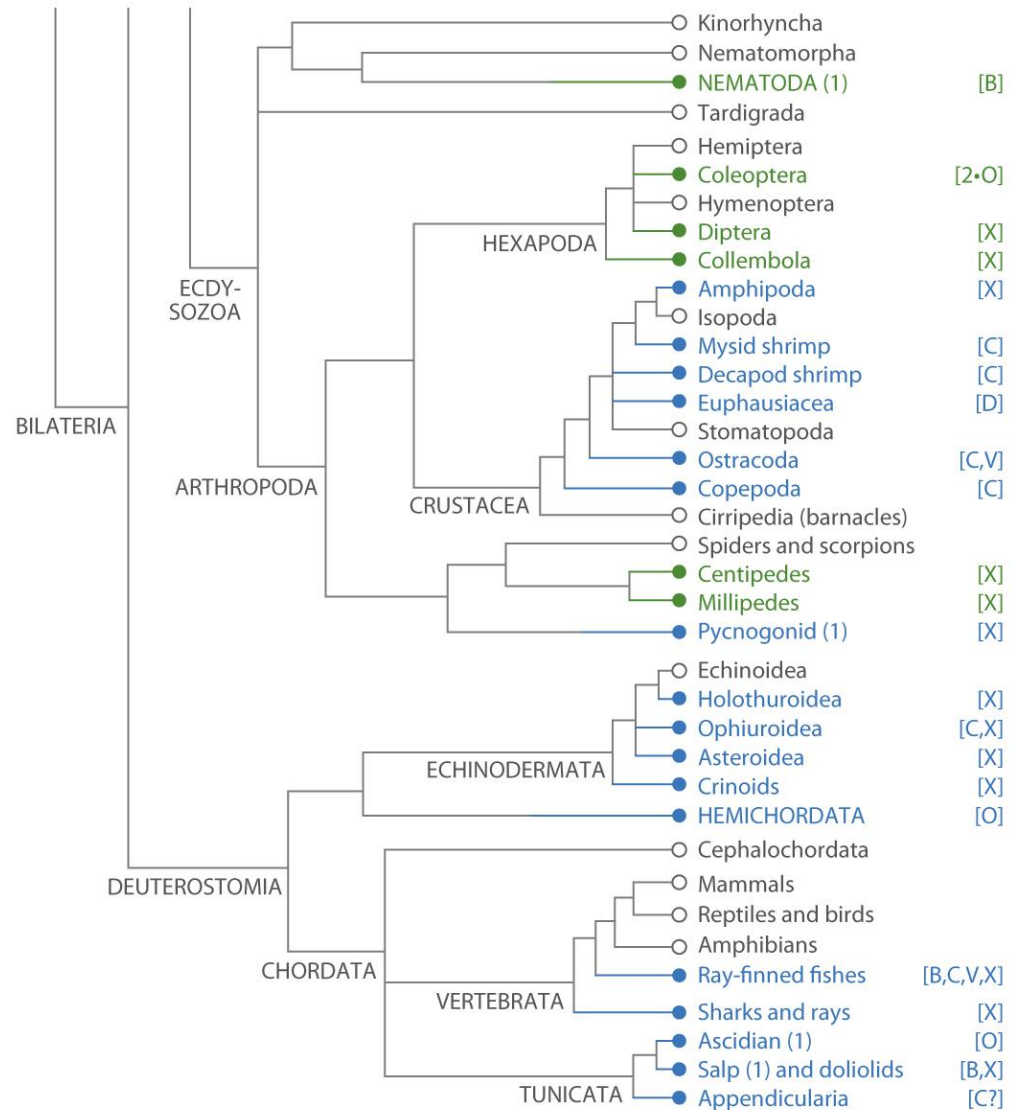
Bioluminescence živočichů

Luciferin type

- [B] Bacterial (+ symbiont)
- [C] Coelenterazine
- [D] Dinoflagellate
- [V] Vargula (ostracod)
- [O] Other (known)
- [X] Other (unknown)

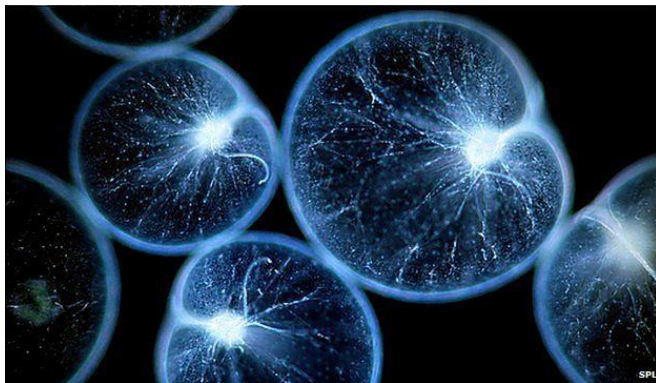
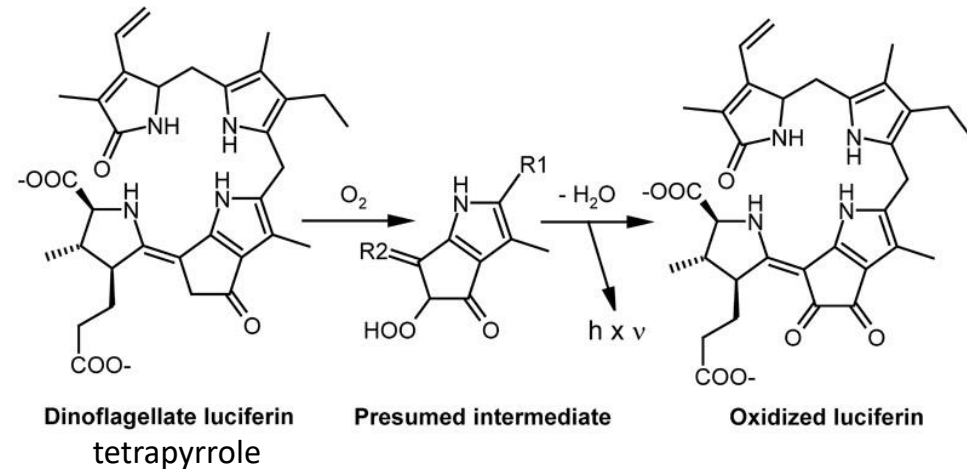
Luminescence and habitat

- Nonluminous
- Terrestrial/freshwater
- Marine
- * Unsubstantiated reports of lumin



Dinoflagellata (= Obrněnky)

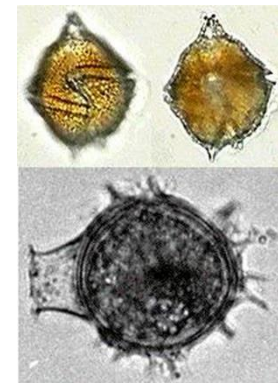
- Planktonní bičíkovci hojní v teplých mořích. Luciferin je zde pravděpodobně odvozen od chlorofylu, který má podobnou strukturu
- *Noctiluca miliaris*, *N. scintilans*, *Pyrocystis fusiformis*, *Gonyaulax* sp.



Noctiluca sp.



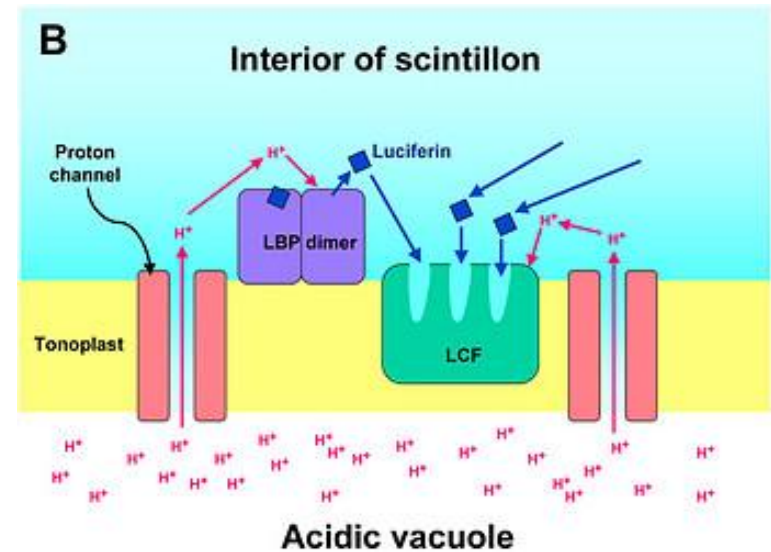
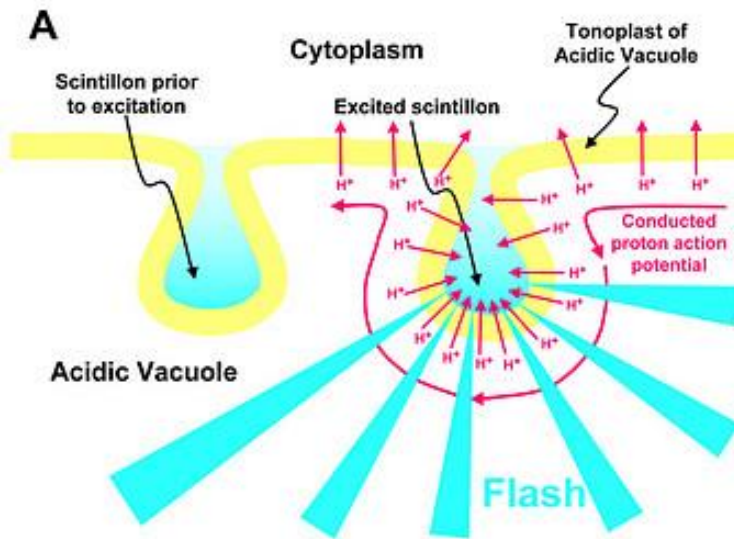
Pyrocystis sp.



Gonyaulax sp.

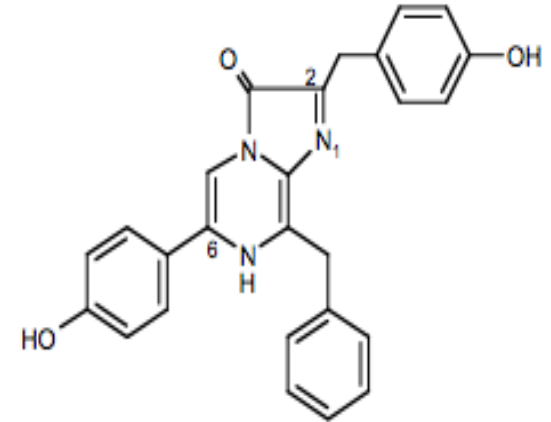
Dinoflagellata (= Obrněnky)

U rodu *Gonyaulax*, při pH 8 je molekula luciferinu „chráněna“ před luciferázou pomocí "luciferin-binding protein", když pH klesne, volný luciferin může reagovat a světlo je produkováno.



Cnidaria (= Žahavci)

- Typickým luciferinem je **Coelenterazin**, Je to obecně nejrozšířenější mořský luciferin nalezený v mnoha živočišných taxonech.
- Molekula luciferinu se může objevit v komplexu (fotoprotein nazvaný **aequorin**)
- Cílem bioluminiscence je přilákat kořist
- *Scyphozoa* (medúzovci), *Hydrozoa* (polypovci) a *Anthozoa* (korálnatci)



Coelenterazin



Scyphozoa



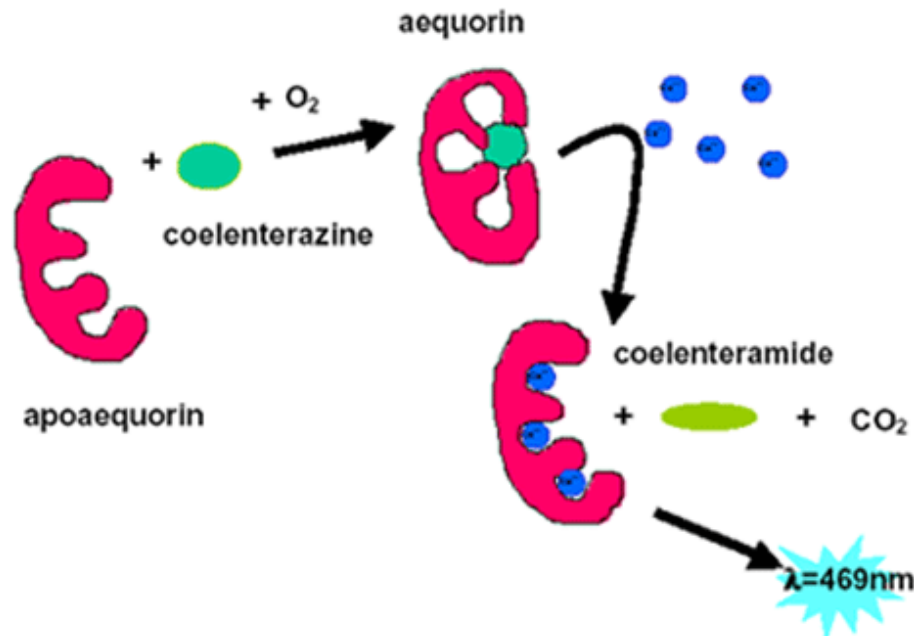
Aequorea victoria



Anthozoa

Cnidaria (= Žahavci)

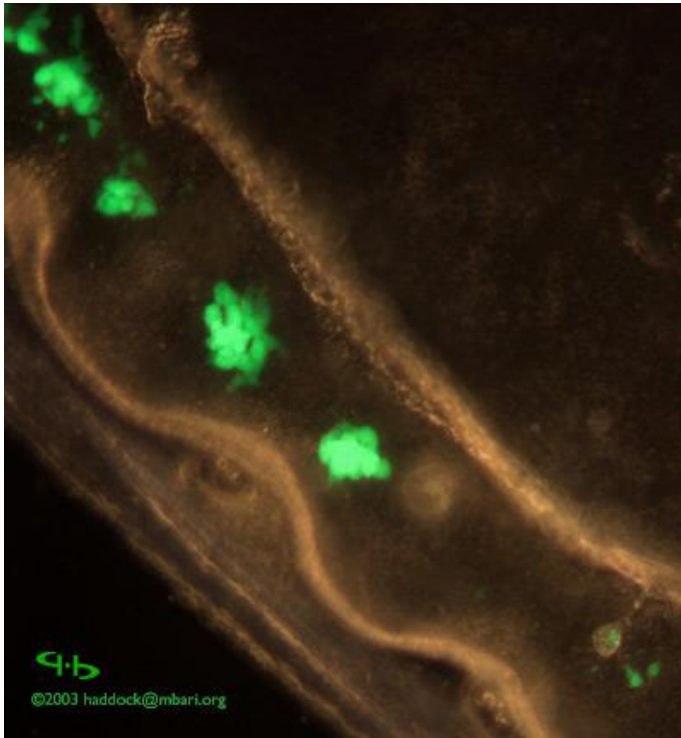
- **Aequorin** – využití pro analýzu Ca^{2+}
- Je fotoproteinový komplex izolovaný z medúzy *Aequorea* (a jiných mořských druhů).
- Funkční komplex = apo-aequorin (protein) + molekulární kyslík + luciferin coelenterazin.
- Když se Ca^{2+} naváže na komplex, coelenterazin je oxidován na coelenteramide při uvolnění CO_2 a modrého světla (469 nm).



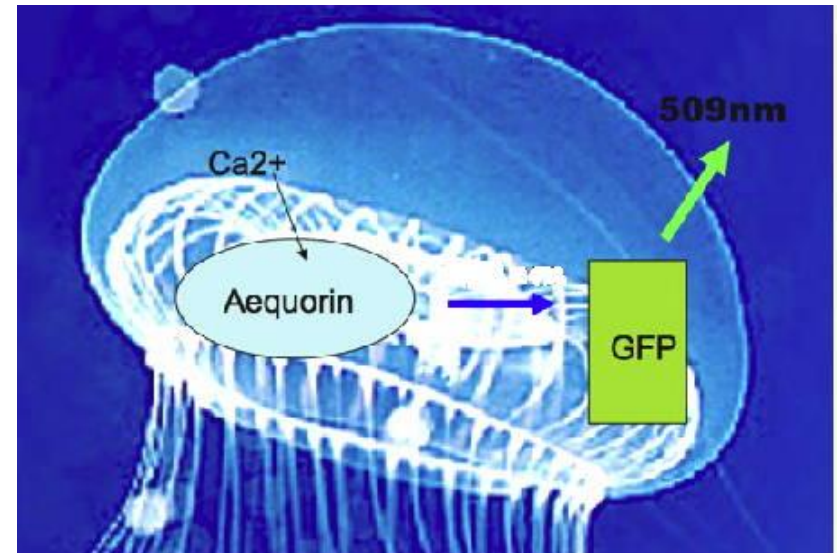
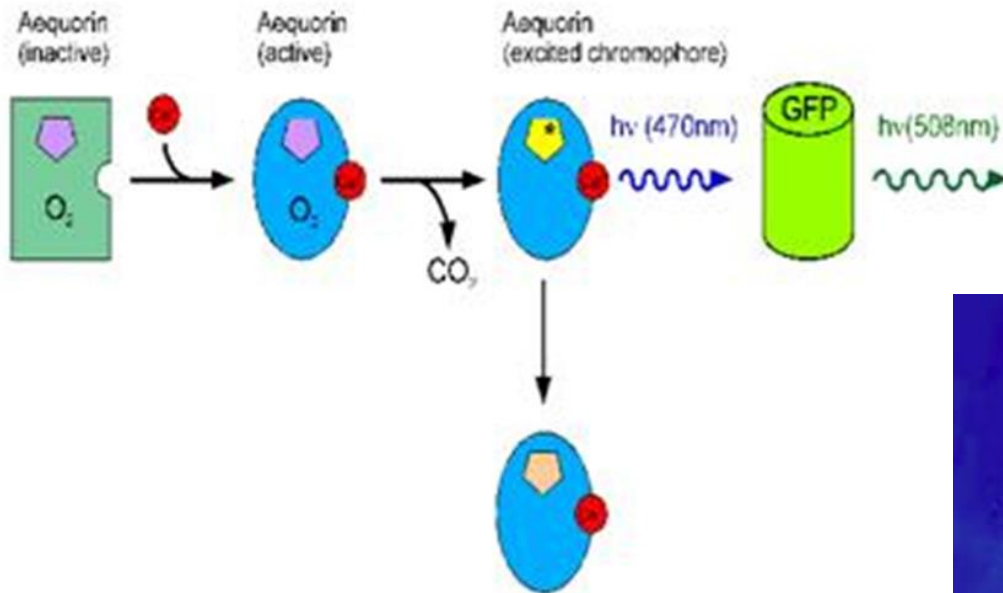
Cnidaria (= Žahavci)

Žahavci mohou krom Aequorinu emitovat světlo přes green fluorescent protein (GFP)

Př. *Aequorea victoria* - okraj zvonu



Cnidaria (= Žahavci)



Annelida (= Kroužkovci)

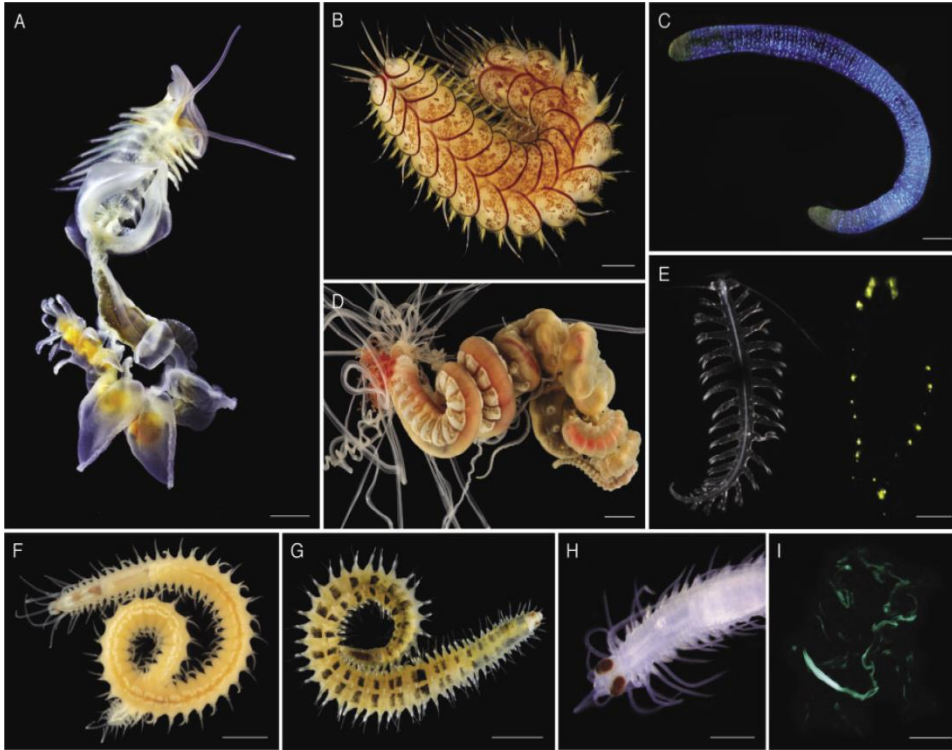
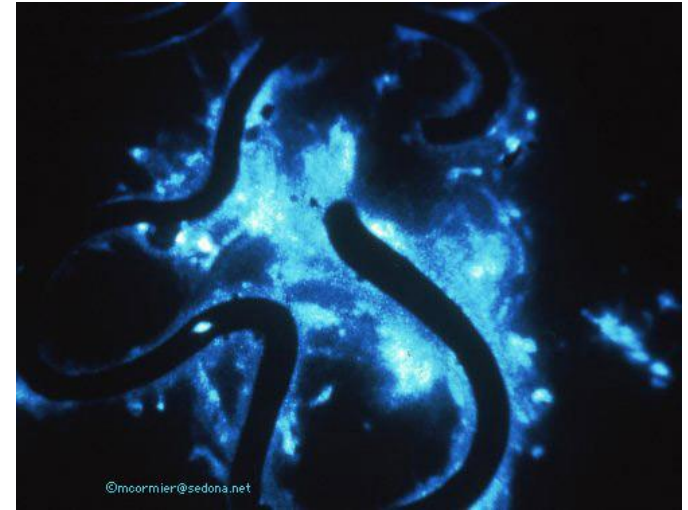
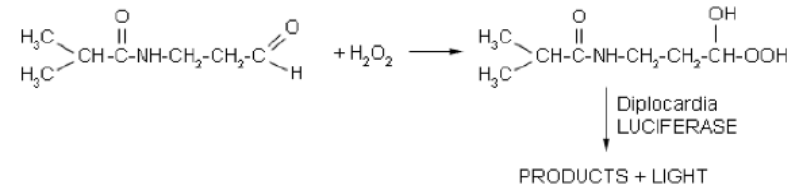


Fig. 2 Bioluminescent annelids. (A) *Chaetopterus variopedatus*, scale bar 2 mm; (B) *Harmothoe imbricata*, scale bar 2 mm; (C) *Fridericia heliota* bioluminescence, scale bar 1 mm; (D) *Thelepus cinnatus*, scale bar 2 mm; (E) *Tomopteris helgolandica* photographed under natural light (left) and in the dark after KCl-induced bioluminescence (right), scale bar 500 μ m; (F) *Eusyllis blomstrandii*, scale bar 2 mm; (G) *Odontosyllis fulgurans*, scale bar 2 mm; (H) Close-up of *Odontosyllis enopla* male, scale bar 1 mm; (I) *Odontosyllis enopla* female bioluminescent display, still frame from Supplementary Video S1, scale bar 2 cm. Images courtesy of Alexander Semenov (A, C), Fredrik Pleijel (B, D, F, G), Anaïd Gouveneaux (E) and John Sparks (I). Image E was adapted with permission from The Journal of Experimental Biology (Gouveneaux and Mallefet 2013).



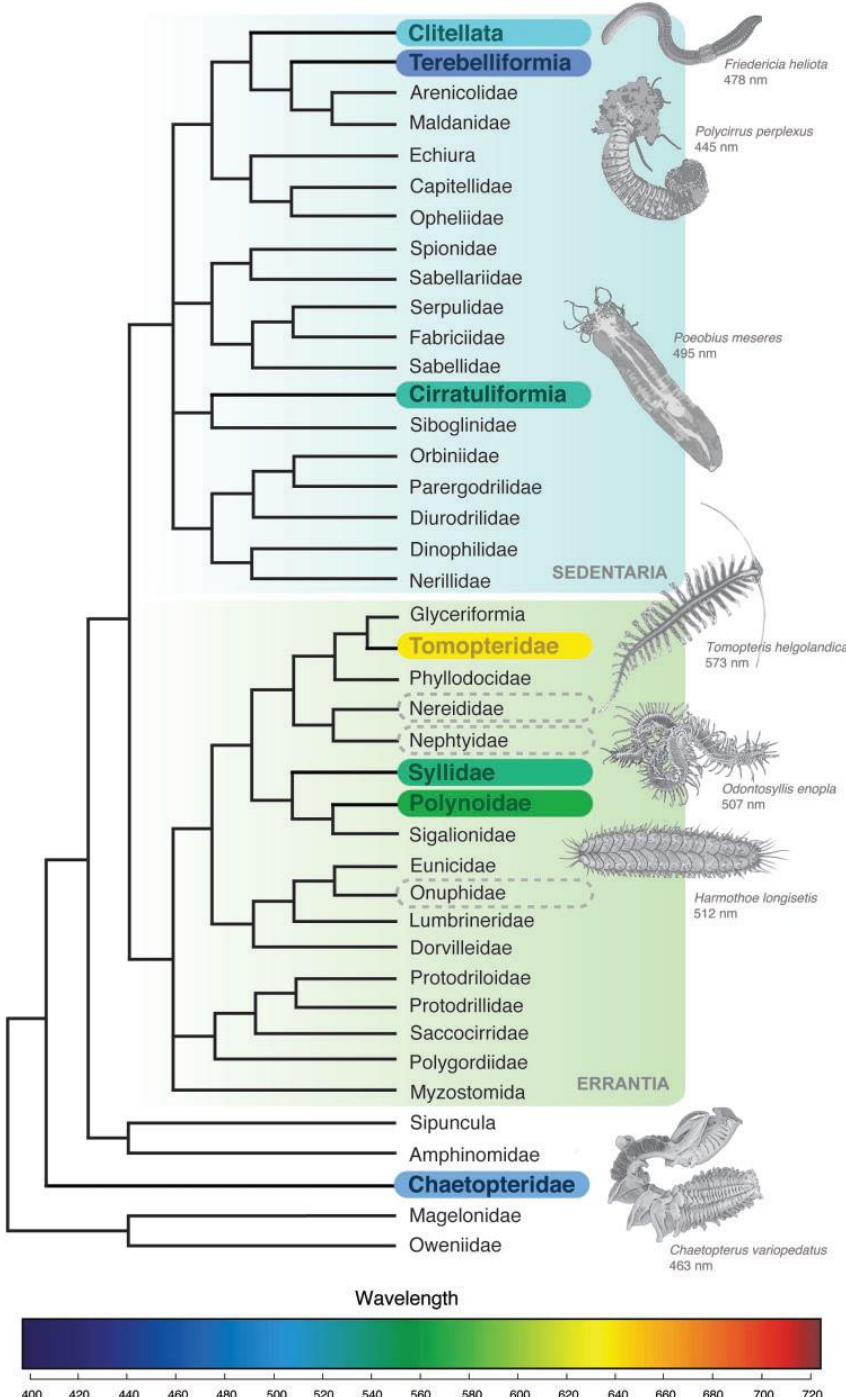
Diplocardia longa



Verdes A. and D. F. Gruber 2017, Glowing Worms: Biological, Chemical, and Functional Diversity of Bioluminescent Annelids

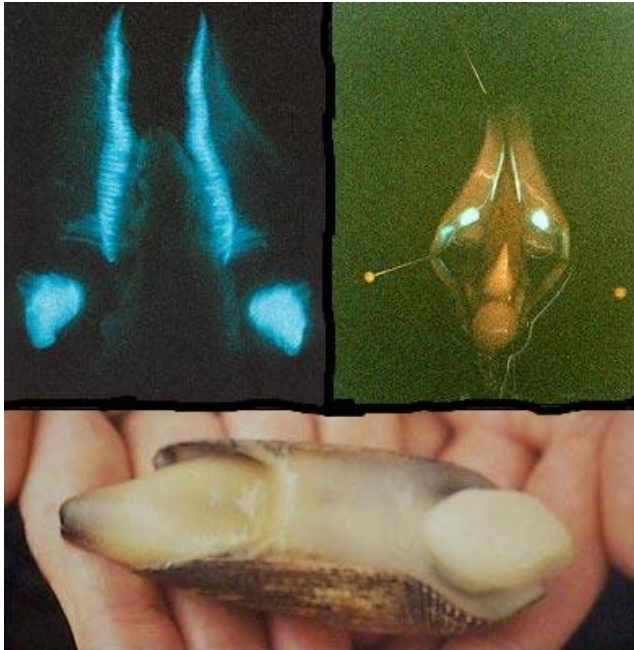
Table 1 Biochemical characteristics of annelid bioluminescence. Peak emission wavelengths and components necessary for bioluminescence reaction in luminous clitellates (top half) and polychaetes (bottom half). Shaded rows correspond to terrestrial species and clear rows indicate marine species. Bioluminescent species for which none of these characteristics are known are not included in the table.

Species	λ max (nm)	Components of bioluminescence system	References
Family Acanthodrilidae			
<i>Diplocardia alba</i>	501	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>D. eigeni</i>	505	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>D. longa</i>	507	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂ /O ₂ /Cu ²⁺	Bellisario et al. (1972)
<i>Diplostrema heteropora</i>	545	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>Microscolex phosphoreus</i>	538	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler (1982)
Family Enchytraeidae			
<i>Fridericia heliota</i>	478	Luciferin/luciferase/ATP/Mg ²⁺ /O ₂	Rodionova et al. (2003)
<i>Henlea</i> sp.	464	Luciferin/luciferase/O ₂ /Ca ²⁺	Rodionova et al. (2002)
Family Lumbricidae			
<i>Eisenia lucens</i>	493	Riboflavin/luciferase/aldehyde/O ₂	Pes et al. (2016)
Family Megascolecidae			
<i>Fletcherodrilus fasciatus</i>	–	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>F. unicus</i>	–	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>Pontodrilus bermudensis</i>	540	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1986)
<i>Spenceriella cormieri</i>	–	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>S. curtisi</i>	535	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>S. minor</i>	531	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
<i>S. noctiluca</i>	–	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
Family Octochaetidae			
<i>Octochaetus multiporus</i>	>570	Luciferin/luciferase/H ₂ O ₂	Wampler and Jamieson (1979)
Family Flabelligeridae			
<i>Flota flabelligera</i>	497	–	Francis et al. (2016)
<i>Poeobius meseres</i>	495	–	Francis et al. (2016)
Family Chaetopteridae			
<i>Chaetopterus variopedatus</i>	463	Riboflavin/luciferase/H ₂ O ₂ /Fe ²⁺	Nicol (1957a), Rawat and Deheyn (2016)
Family POLYNOIDAE			
<i>Gattiana cirrhosa</i>	517	–	Nicol (1957b)
<i>Harmothoe longisetis</i>	512	–	Nicol (1957b)
<i>Harmothoe extenuate</i>	515	–	Nicol (1957b)
<i>Malmgrenia lunulata</i>	510	Polynoidin/superoxide anions/O ₂	Bassot and Nicolas (1995)
<i>Polynoe scolopendrina</i>	511	–	Nicol (1957b)
Family Syllidae			
<i>Odontosyllis enopla</i>	507	Luciferin/luciferase/Mg ²⁺ /cyanide/O ₂	Shimomura et al. (1963)
<i>Odontosyllis phosphorea</i>	494	Photoprotein/co-factor	Deheyn and Latz (2009)
Family Terebellidae			
<i>Polycirrus perplexus</i>	445	–	Huber et al. (1989)
Family Tomopteridae			
<i>Tomopteris</i> sp.	565	Aloe-emodin/luciferase	Francis et al. (2014)

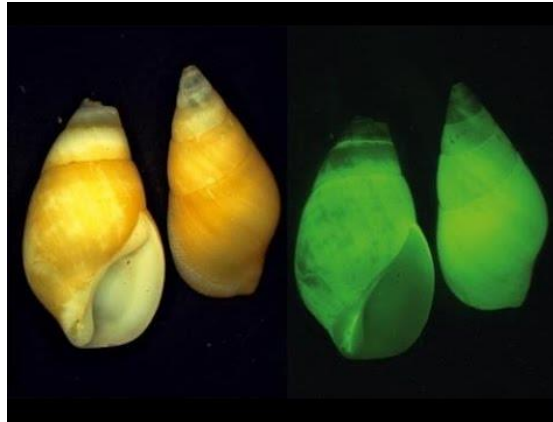


Mollusca (= Měkkýši)

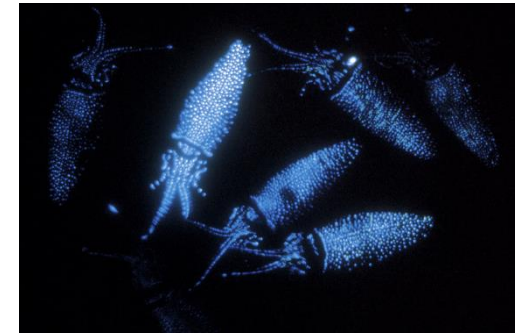
- Rod *Pholas* je nejdéle zkoumaným rodem. Objevem **pholasin**, který je strukturně velice podobný **coelenterazinu**.
- Využití v detekci produkce ROS



Pholas dactylus - skulař vrtavý



Hinea brasiliana



Watasenia sp.



Staurotheutis sp.

Crustacea (= Korýši)

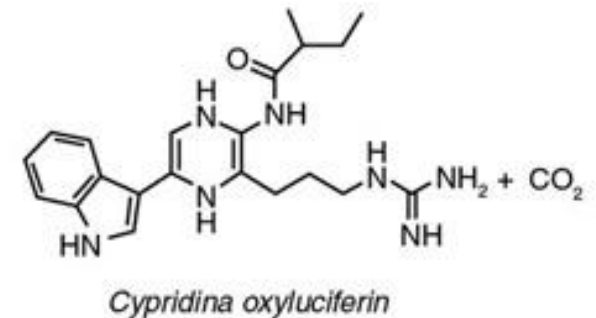
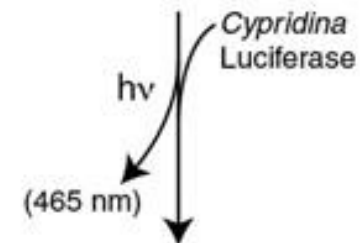
- *Vargula hilgendorffii* má dvě luminiscenční žlázy schopné rychle vystříknout luciferin a luciferázu do mořské vody, za účel vylekat jejich predátory.
- U tohoto druhu byl nalezen luciferin Vargulin (Cypridina).



Vargula hilgendorffii



Oplophorus sp.



Korýši/Ryby

- **Vargulin** je rovněž používán rybou *Porichthys*.
 - Zde je přímá souvislost s potravou – ryba emituje BL pouze tehdy, přijímá-li potravu nesoucí vargulin.

- Luciferin a luciferáza reagují ve zvláštních buňkách nazývaných photocyty. Tyto buňky jsou buď různě rozmístěny ve tkáních organismu, nebo seskupené v jednom specializovaném orgánu, nazývaném photophory.

- Jedna ryba má kolem 700 photophorů.

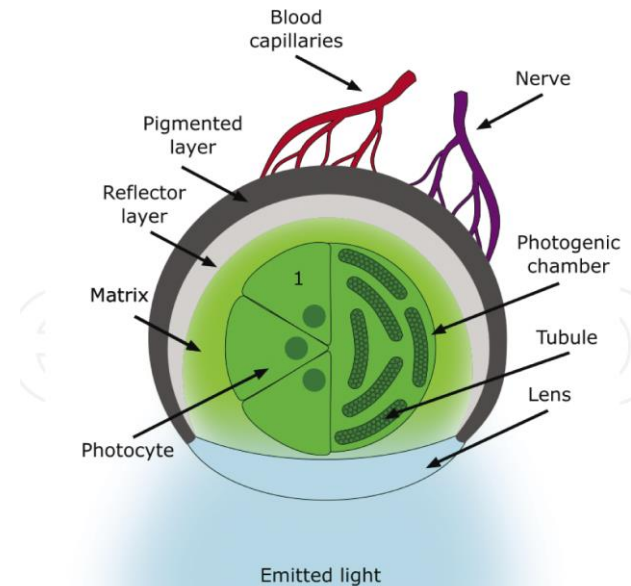


Figure 2. Schematic representation of the general structure of light organs in fishes. External side with light emission and internal side with blood capillaries and nerve supply. Matrix represents the space between the photogenic chamber and other structures. The right half of the photogenic chamber represents an intrinsic light organ with photocytes. The left half of the photogenic chamber represents a symbiotic light organ with transverse section of tubules filled with luminous bacteria.

Figure 3. Light organs in fishes per family. Intrinsic bioluminescence in blue and symbiotic in green. The light organs are represented in coloured bands or circles delimited by a black outline. Blur coloured forms represent internal bioluminescence through diffusive tissues. ^aUsed in cases that bioluminescent emissions and organs are very similar between families of the same order. ^bCrane [101] also found luminescence in skin samples of the ventral surface of the fish. Images are representative for the families and are not on scale. Same references used for bioluminescence in **Figure 1** plus [10, 13, 15, 95]. Source of drawings: Food and Agriculture Organization of the United Nations [15, 26, 96, 102–105]. Reproduced with permission.

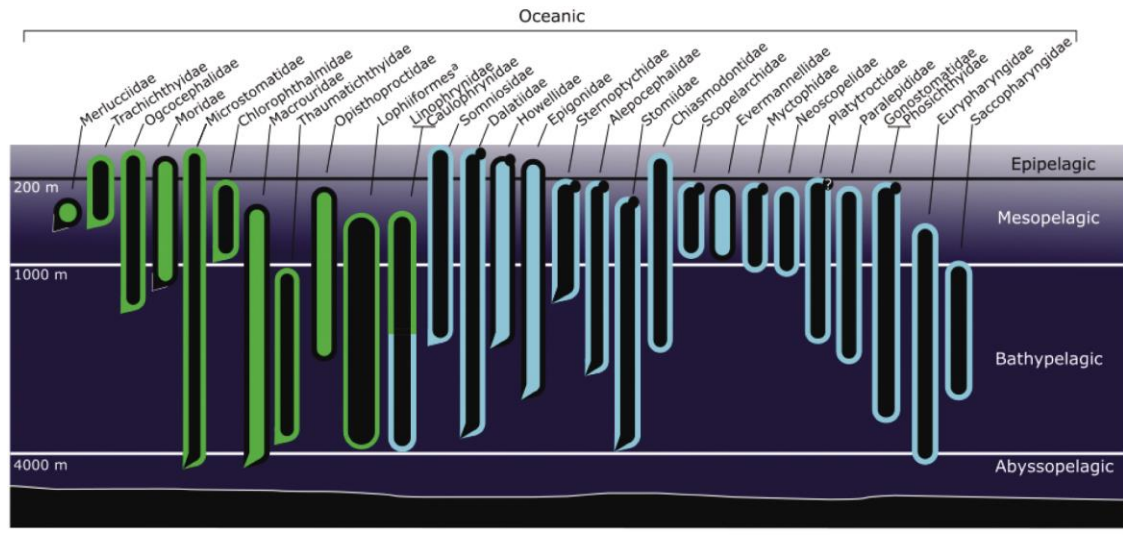
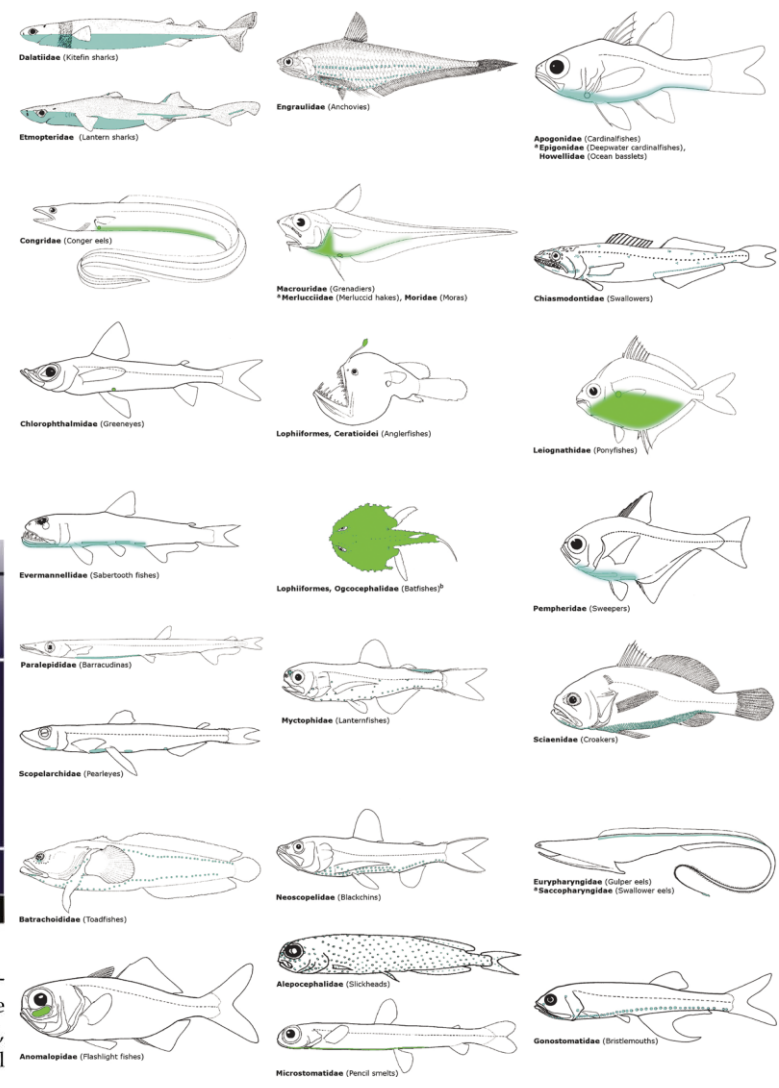
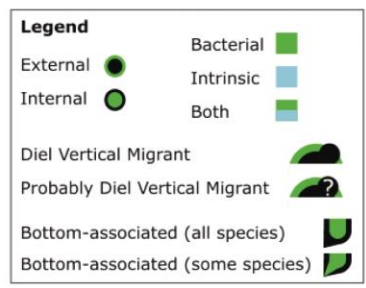
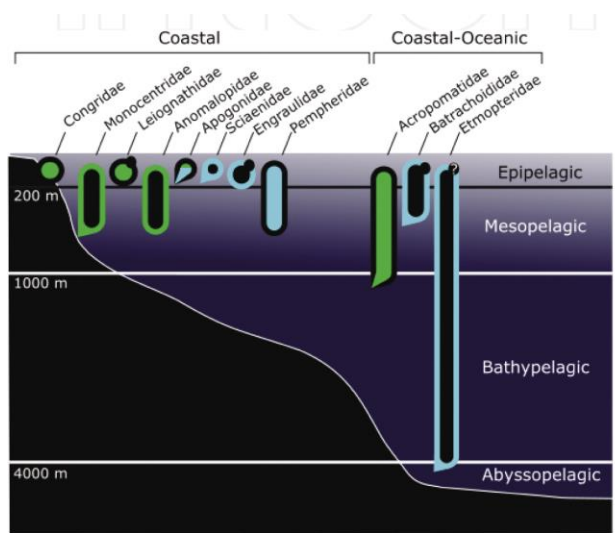


Figure 1. Schematic representation of the spatial distribution of bioluminescent fish families and some ecological details. ^aLophiiformes families other than Thaumatochthyidae, Linophrynidae, Caulophrynidae and Ogcoccephalidae. The data presented only refer to species that are known as bioluminescent. The order of disposition within the coastal, coastal-oceanic and oceanic categories is ecological and not spatial. References used for spatial distribution and diel vertical migrations [10, 13, 15, 26, 40, 65, 79, 95–99] and for bioluminescence [2, 9, 16, 21, 24, 47, 48, 50, 58, 60, 67, 100].

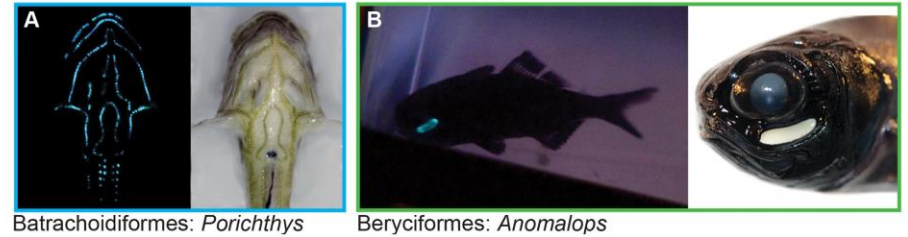
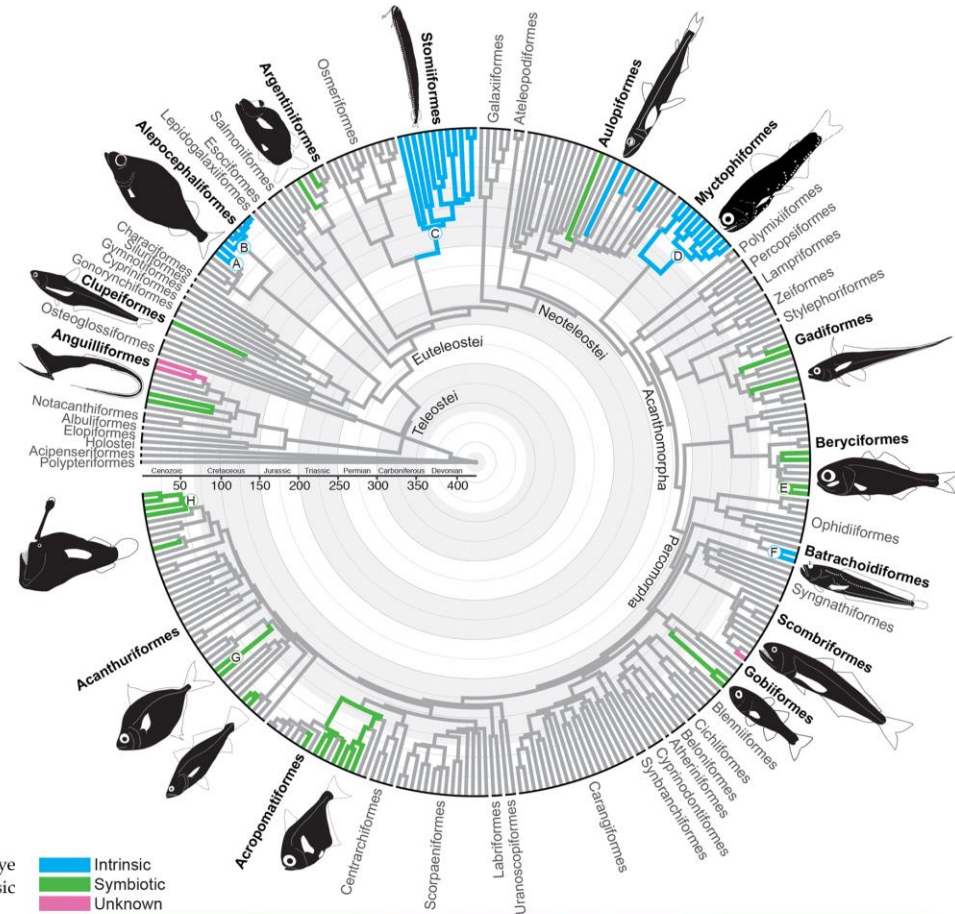
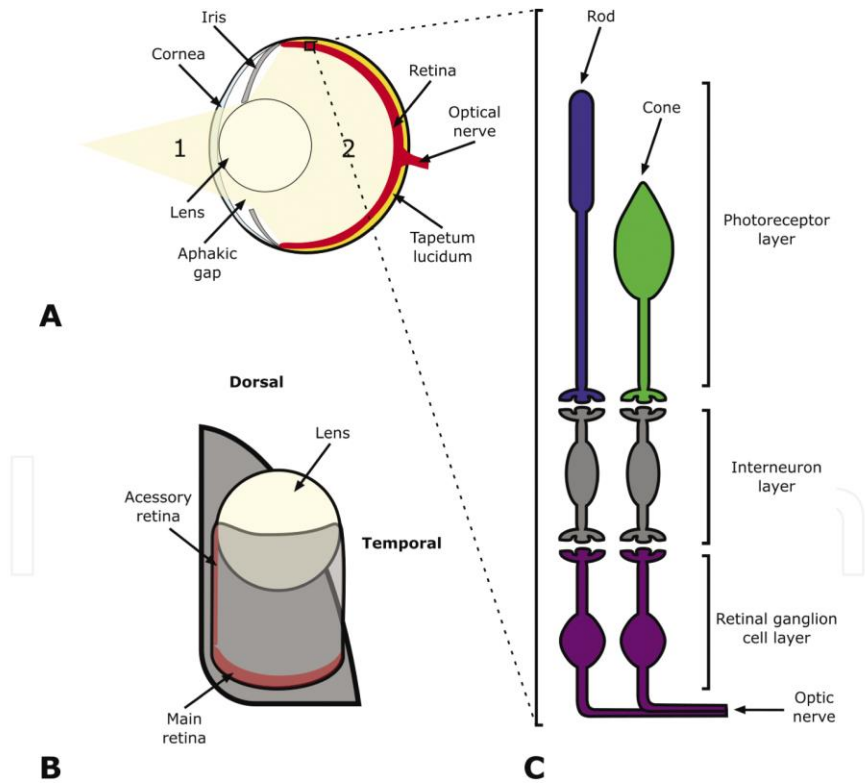
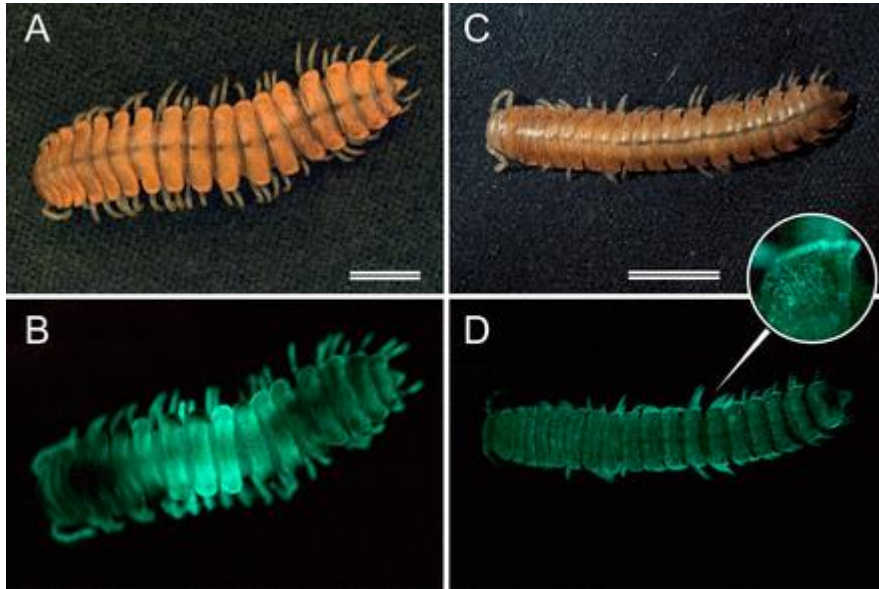


Fig 1. Evolution of Bioluminescence across Ray-Finned Fishes. Evolutionary relationships and divergence times of ray-finned fishes inferred from 11 gene fragments. Letters at nodes correspond to clades indicated in Fig 4. Branch colors indicate the presence of bioluminescence and whether the mechanism of bioluminescence is intrinsic, bacterially mediated, or unknown. Examples of bioluminescent ray-finned fishes include the A: midshipman (*Porichthys*: intrinsic), and B: flashlight fish (*Anomalops*: bacterially mediated).

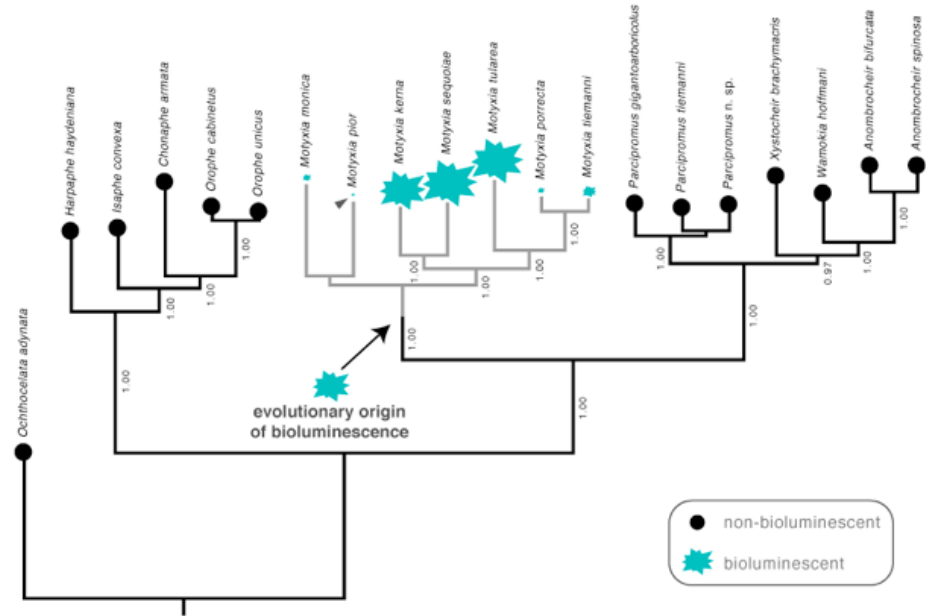
Figure 4. Schematic representations of the eye structure in fishes. (A) Camera-eye representing light entering the eye (1) and refracted by the lens focused on the retina (2). (B) Front-view of a left tubular eye in the head of a fish. (C) Basic retinal structure by cell layers.

Paitio J., Oba Y. and Meyer-Rochow V.B., 2016, *Bioluminescent Fishes and their Eyes*

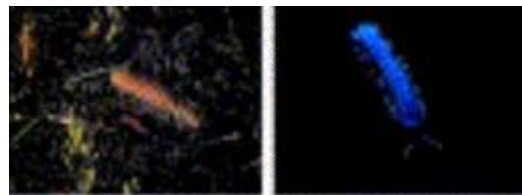
Millipedes (= Mnohonožky)



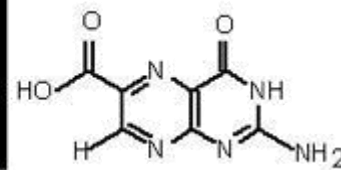
Mytoxia sp.



http://www.apheloria.org/Paul_Marek/Aposematism.html



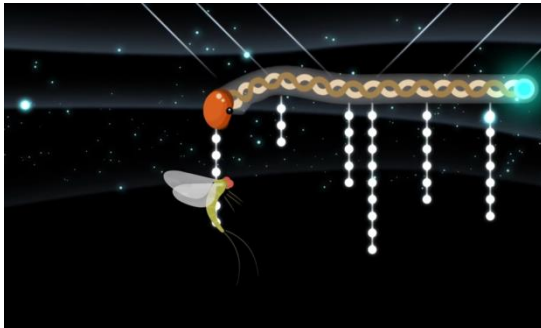
Luminodesmus sequoiae



7,8-dihydropterin-6-carboxylic acid

Diptera (= Dvoukřídlí)

- Jedná se především o rody *Arachnocampa* (*Arachnocampa luminosa*)
Orfelia (*Orfelia fultoni*)



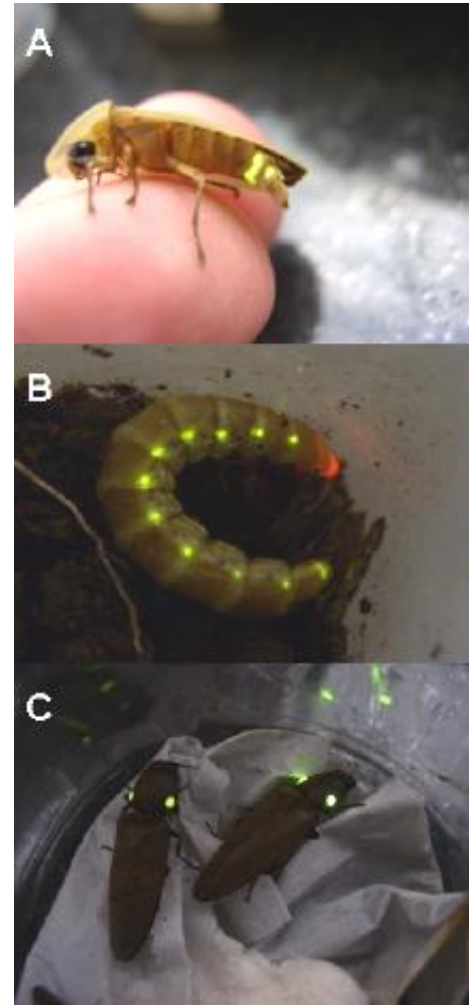
Arachnocampa luminosa



Orfelia fultoni

Coleoptera (= Brouci)

- Známo více jak 200 druhů především reprezentováno rody *Lampyridae sp.*, *Phengodidae sp.* a *Elateridae sp.*
- Svítit dokáží nejen létající samečci a na zemi žijící samičky, ale i larvy. Mnohdy svítí i vajíčka. Samičky mají více světelných orgánů než samci.
- Světélkování dospělců („sexy-svit“) umožňuje sblížení jedinců, kteří si způsobem svícení vzájemně imponují. Samci létají se slabým svícením a hledají si samičky, které leží v trávě a svítí velmi výrazně.
- Světlo také napomáhá vymezovat teritorium a upozorňuje i na nebezpečné překážky (pavučina, voda).



(A) *Cratomorphus* sp. (Lampyridae);
(B) *Phrixotrix* sp. (Phengodidae);
(C) *Pyrophorus* sp. (Elateridae).

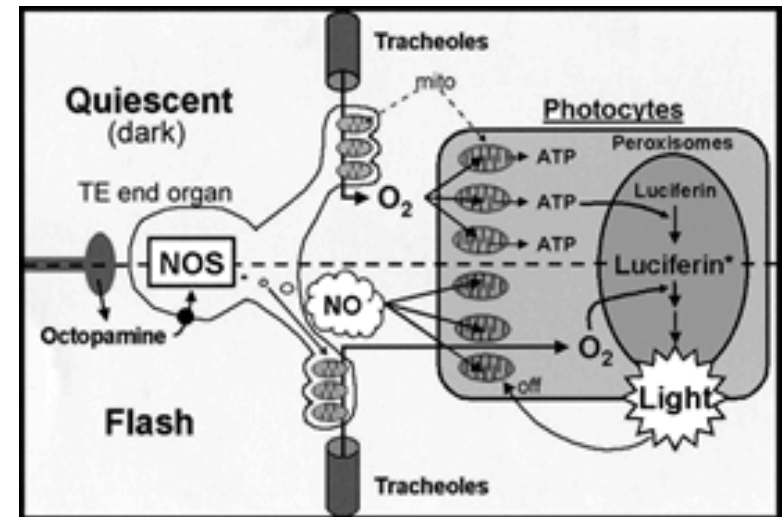
Coleoptera (= Brouci)

Regulace emise světla světluškami:

- Vzplanutí nervové aktivity stimuluje uvolnění primárního neurotransmiteru - **octopaminu**.
- To spouští světelný orgán lokalizovaný na zadečku, který obsahuje tisíce fotocytů s organelami obsahujícími luciferin a luciferázu.
- Ty reagují a emitují světlo, pokud je přítomen kyslík. Ten je dodáván z mitochondrií přítomných na koncích fotocytů.

Které faktory kontrolují emisi světla ?

- Kyslík proudí do mitochondrií fotocytů. Nějaká látka musí regulovat oxidaci luciferinu a luciferázy ve fotocytech, pokud světluška chce/nechce svítit.
- mitochondriální spotřeba kyslíku je konečný kontrolní bod pro odstranění veškerého kyslíku, který dosáhne fotocytů.
- V odpovědi na neuronální excitaci je uvolňován NO – ten inhibuje extrakci kyslíku mitochondriemi.
- To dovoluje kyslíku oxidovat luciferin.



Coleoptera (= Brouci)

Světlo není

Kyslík je dodáván „lanternovým tracheolárním systémem“ a je konzumován mitochondriemi fotocytů

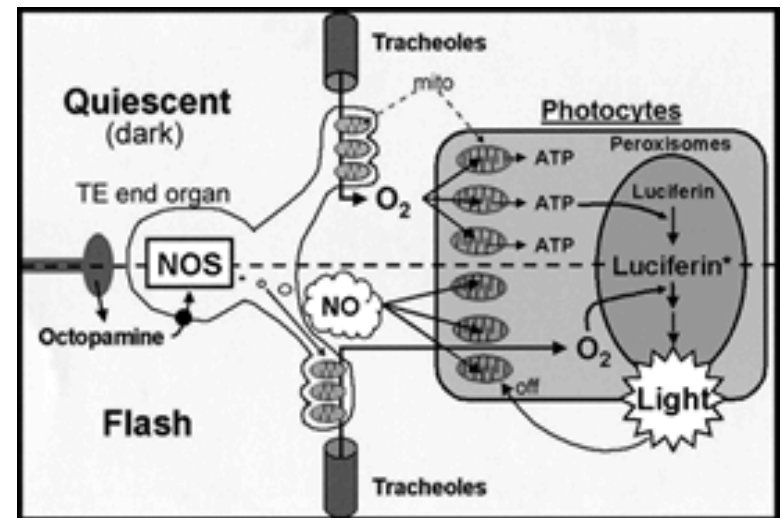
To způsobuje hypoxii cytoplasmy fotocytů a brání kyslíku, aby dosáhl peroxisomů (organel obsahujících luciferin a luciferázu).

ATP produkovaný oxidativní fosforylací je zapotřebí k formování a akumulaci aktivovaného luciferyl-adenylát meziprojektu (označený jako Luciferin*).

Světlo je

Neurotransmitter octopamin aktivuje „lantern“ NO syntázu (NOS), která produkuje NO. NO difunduje rychle a inhibuje zpracování kyslíku mitochondriemi fotocytů.

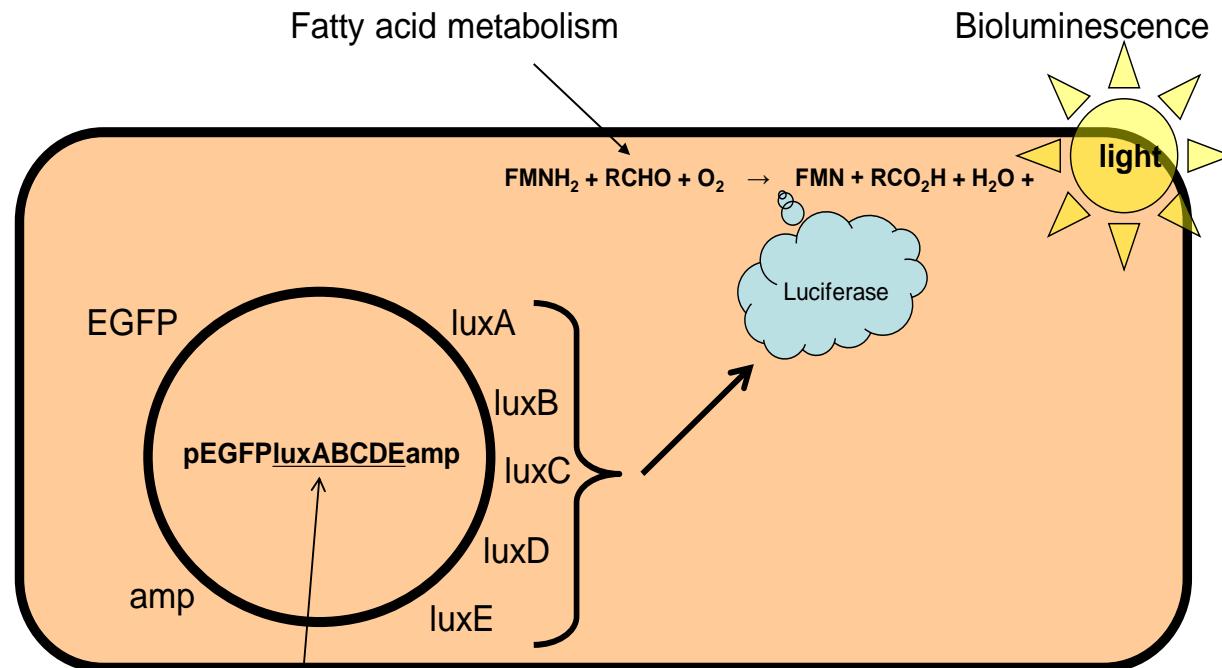
Kyslík dodávaný tracheolami difunduje do peroxisomů a spouští reakci produkující světlo.



Využití bioluminiscence živočichů

Toxikologie

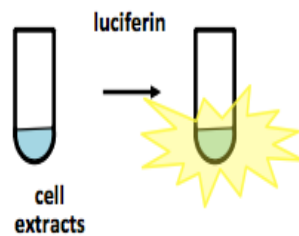
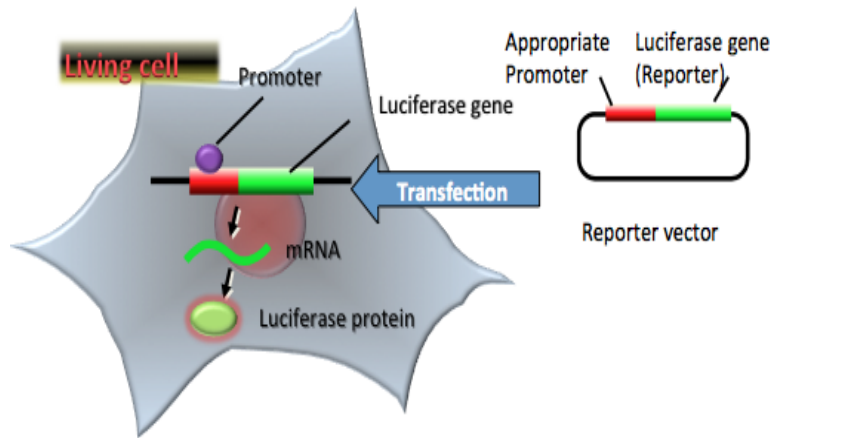
Escherichia coli K 12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp) *E.coli-lux*



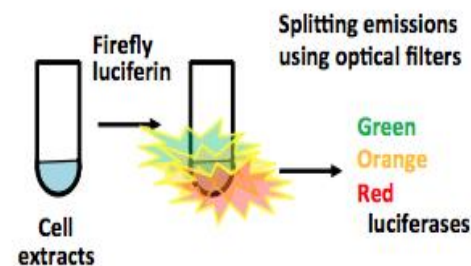
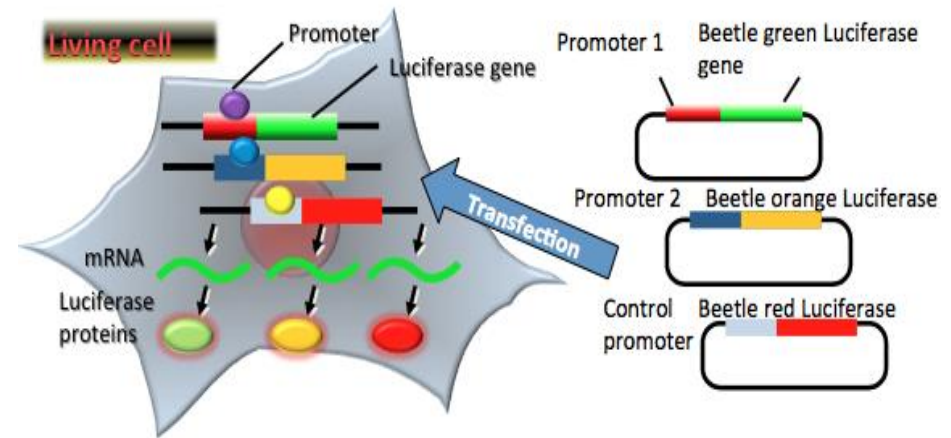
Photorhabdus luminescens

Využití bioluminiscence živočichů

Luciferase Reporter Assay



Promoter activity = Luciferase activity / Cell number or cellular enzyme activity

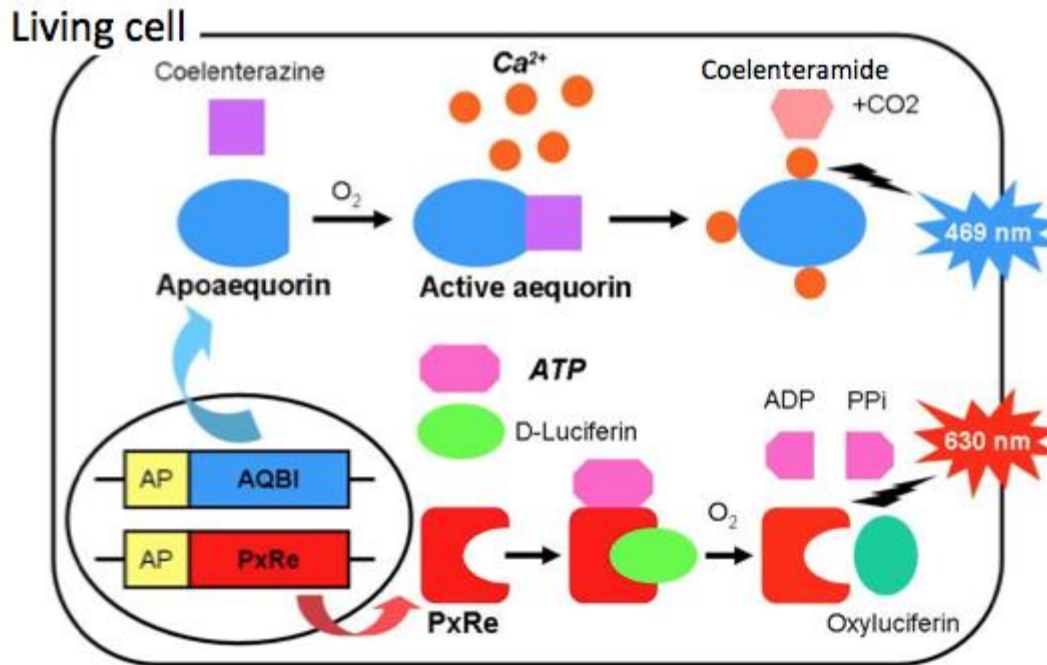


Promoter 1 activity
= Green luciferase activity
/ red luciferase activity
Promoter 2 activity
= Orange luciferase activity
/ red luciferase activity

Principle of a simple luciferase reporter assay

Principle of multicolor luciferase reporter assay

Využití bioluminiscence živočichů

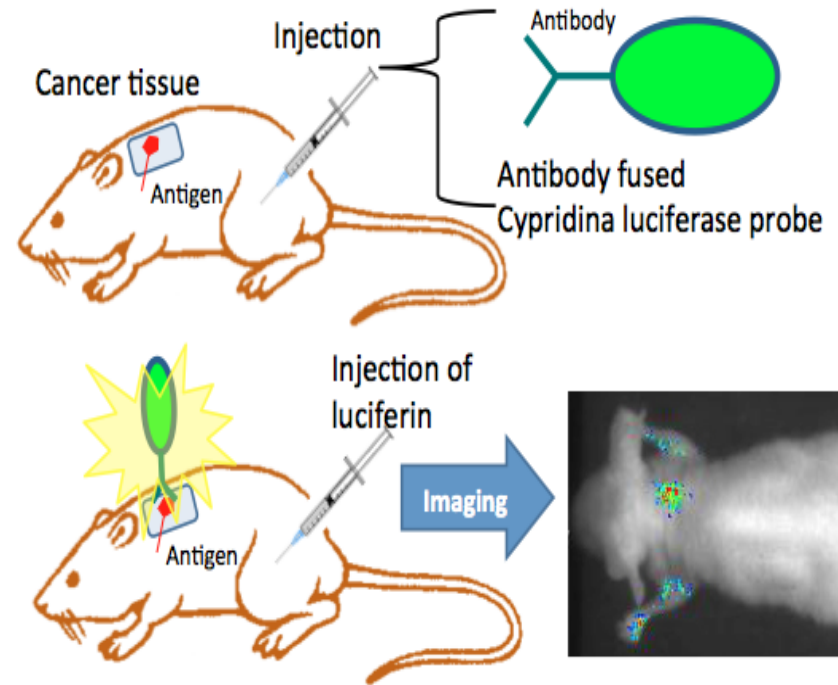
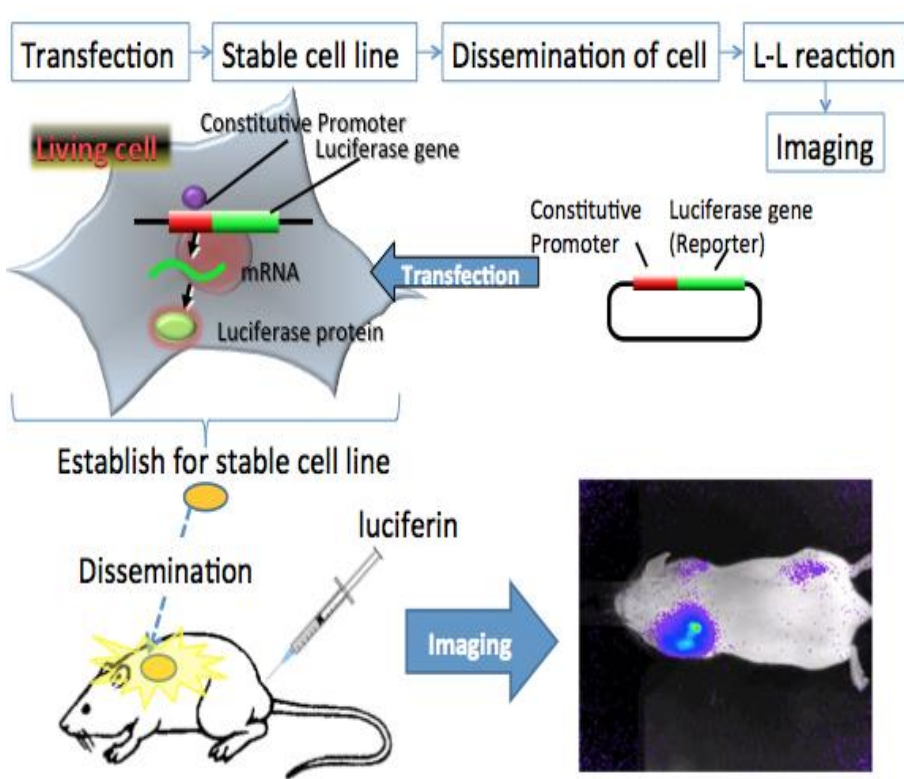


AP = Actin promoter, AQBI = apoequorin gene, PxRE = Beetle red luciferase

Principle of calcium ion and ATP monitoring using photoprotein and beetle luciferase

Využití bioluminiscence živočichů

In vivo assay



In vivo bioluminescence imaging using luminescent living cells and antibody-fused luciferase probe

Děkuji za pozornost