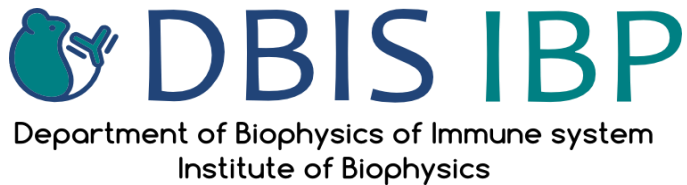


# Bioluminescence živočichů



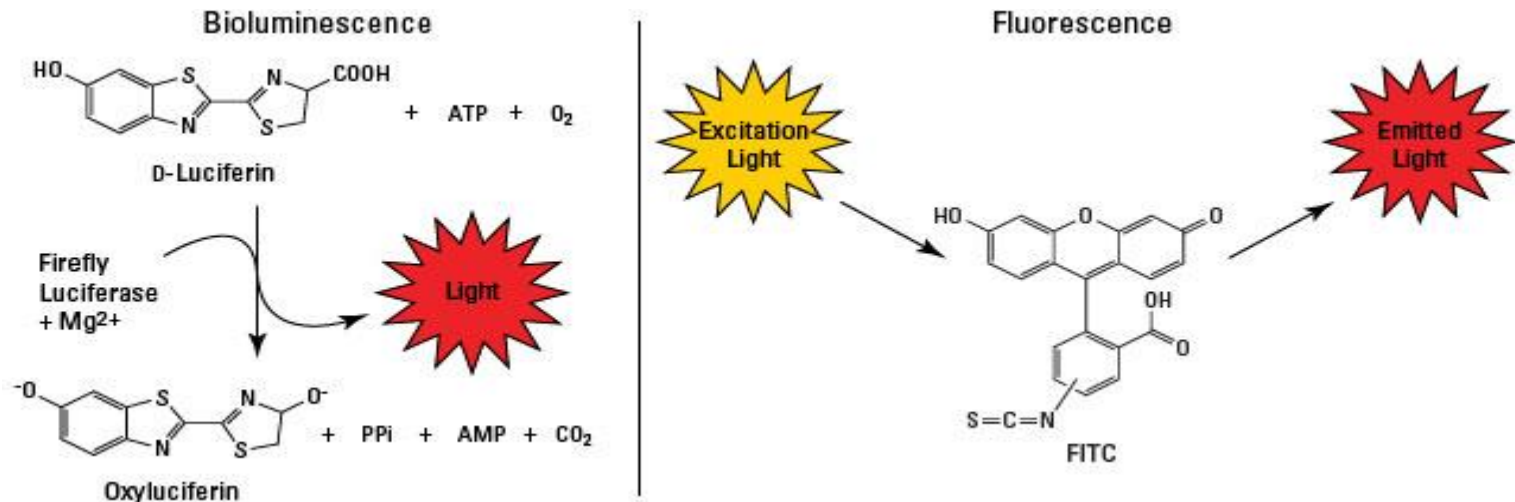
Ondřej Vašíček

[ondrej.vasicek@ibp.cz](mailto:ondrej.vasicek@ibp.cz)

# Bioluminescence

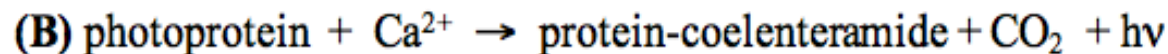
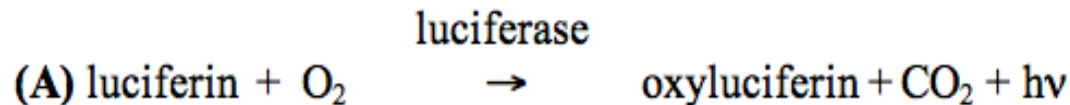
Bioluminescence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

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 %)



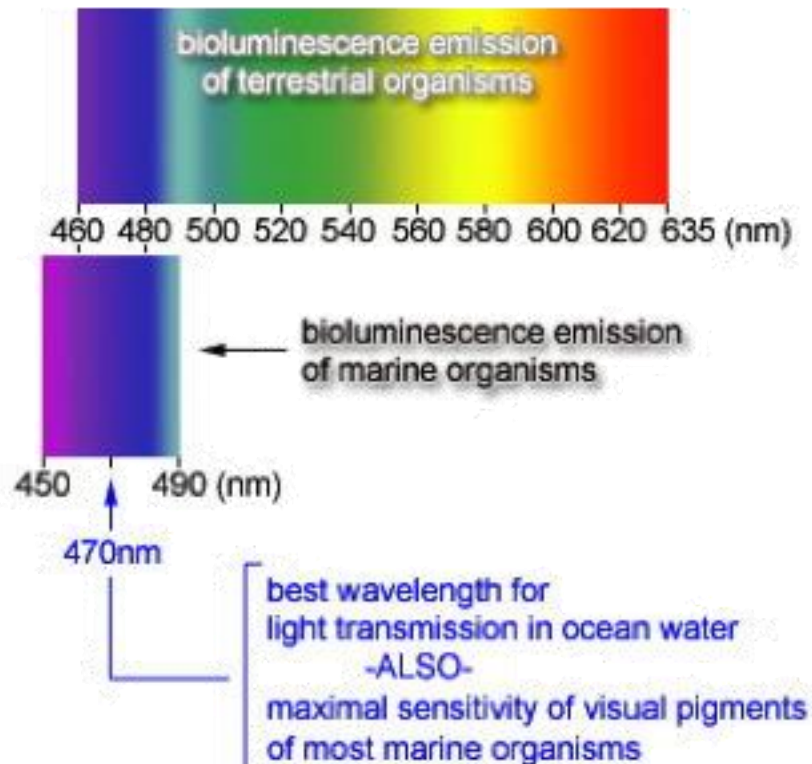
# Bioluminescence – charakteristické rysy

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
4. Luciferáza katalyzuje reakci
5. Někdy jsou luciferin a luciferáza navázány a tvoří jednotku nazvanou fotoprotein. Aktivita fotoproteinu je spouštěna dodáním určitého typu iontu (nejčastěji  $\text{Ca}^{2+}$ ).

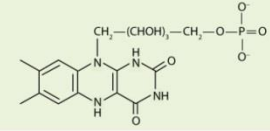
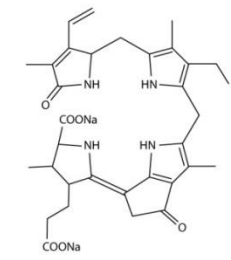
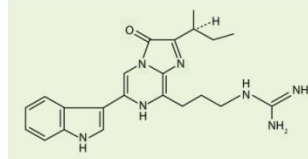
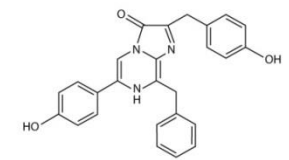
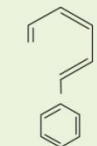


# Bioluminescence - rozšíření

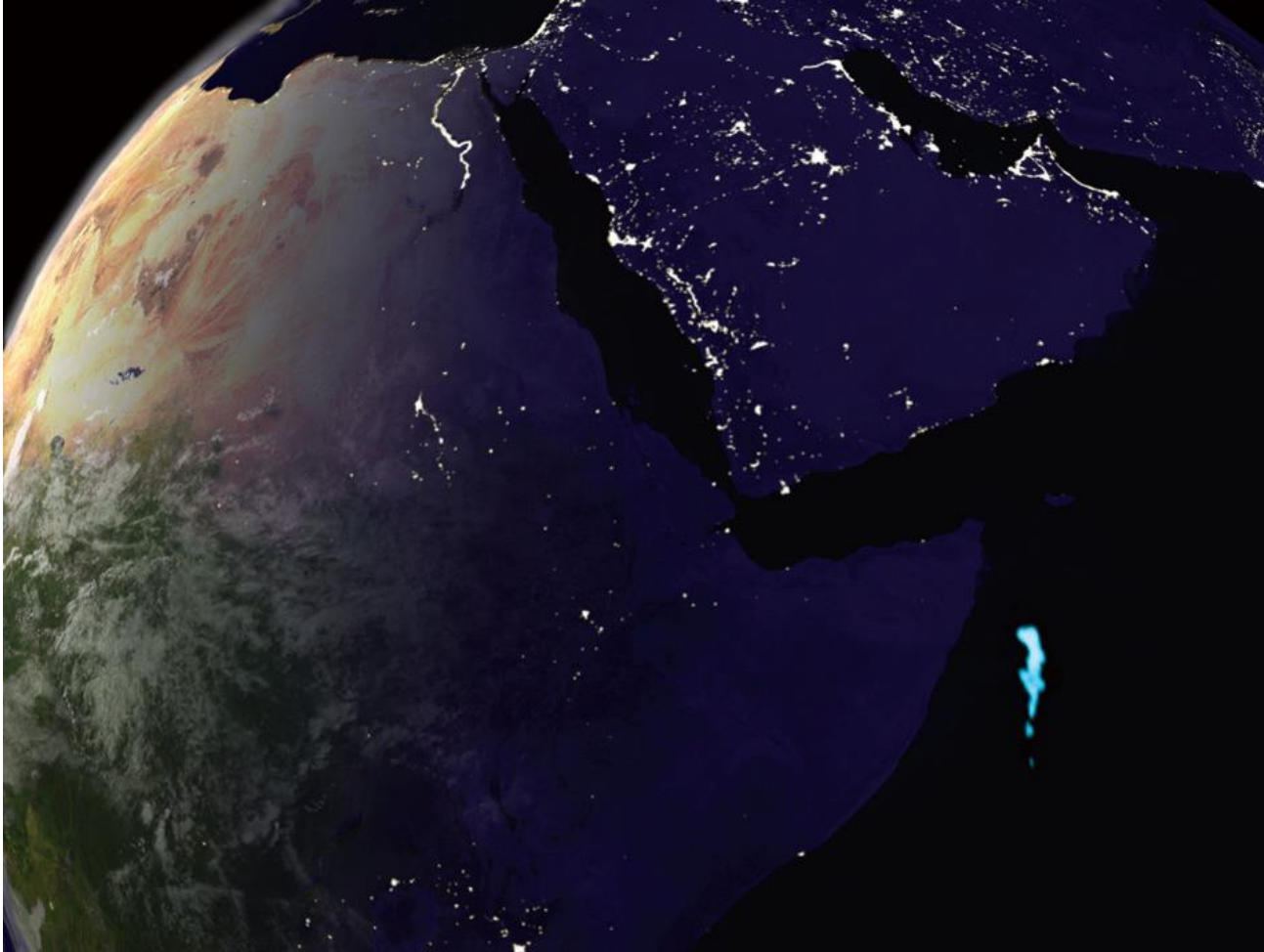
Obvyklá hlavně v hlubinách moří



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

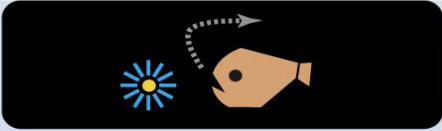
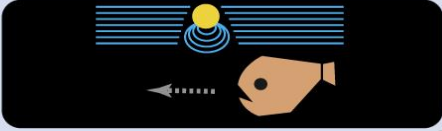




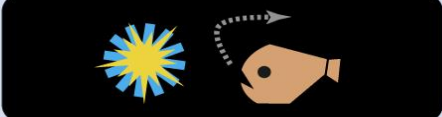
	<p><b>Bacterial</b></p> <p>Luciferin + Aldehyde + Luciferase</p>	<p>Bacteria Some fish Some squid Pyrosomes?</p>
	<p><b>Dinoflagellate</b></p> <p>Luciferin + Luciferase</p>	<p>Dinoflagellates Euphausiid shrimp</p>
	<p><b>Cypridin</b></p> <p>Luciferin + Luciferase</p>	<p>Some ostracods Midshipman fish Some other fish</p>
	<p><b>Coelenterazine</b></p> <p>Luciferin + Luciferase Photoprotein</p>	<p>Radiolarians Ctenophores Cnidarians Squid Some ostracods Copepods Decapod shrimp Mysid shrimp Some ophiuroids Chaetognaths Larvaceans Some fish</p>
	<p><b>Other or unknown mechanism</b></p> <p>Luciferin + Luciferase Photoprotein ? + ?</p>	<p>Some polychaetes Bivalves Hemichordates ----- Amphipods Nemertean worms Tunicates and doliolids Echinoderms Other polychaetes</p>

# Bioluminescence - rozšíření



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

# Bioluminescence - funkce

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



Flash



Glow



Prey

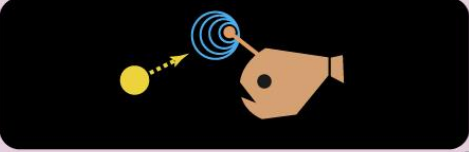
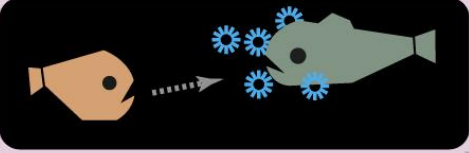





Predator



2° Predator

# Bioluminescence - funkce

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



Flash



Glow



Prey



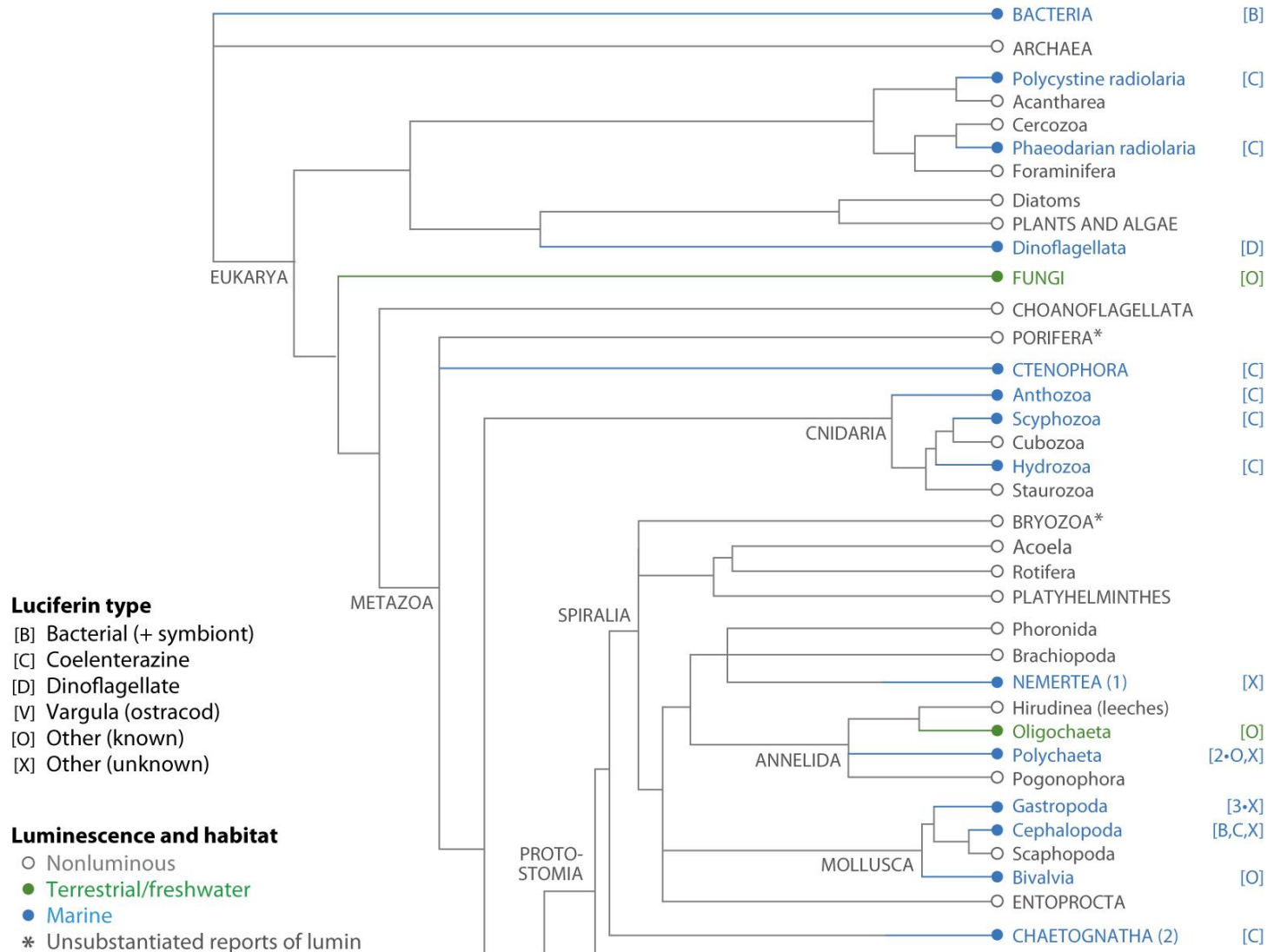
Predator



2° Predator



# Bioluminescence živočichů





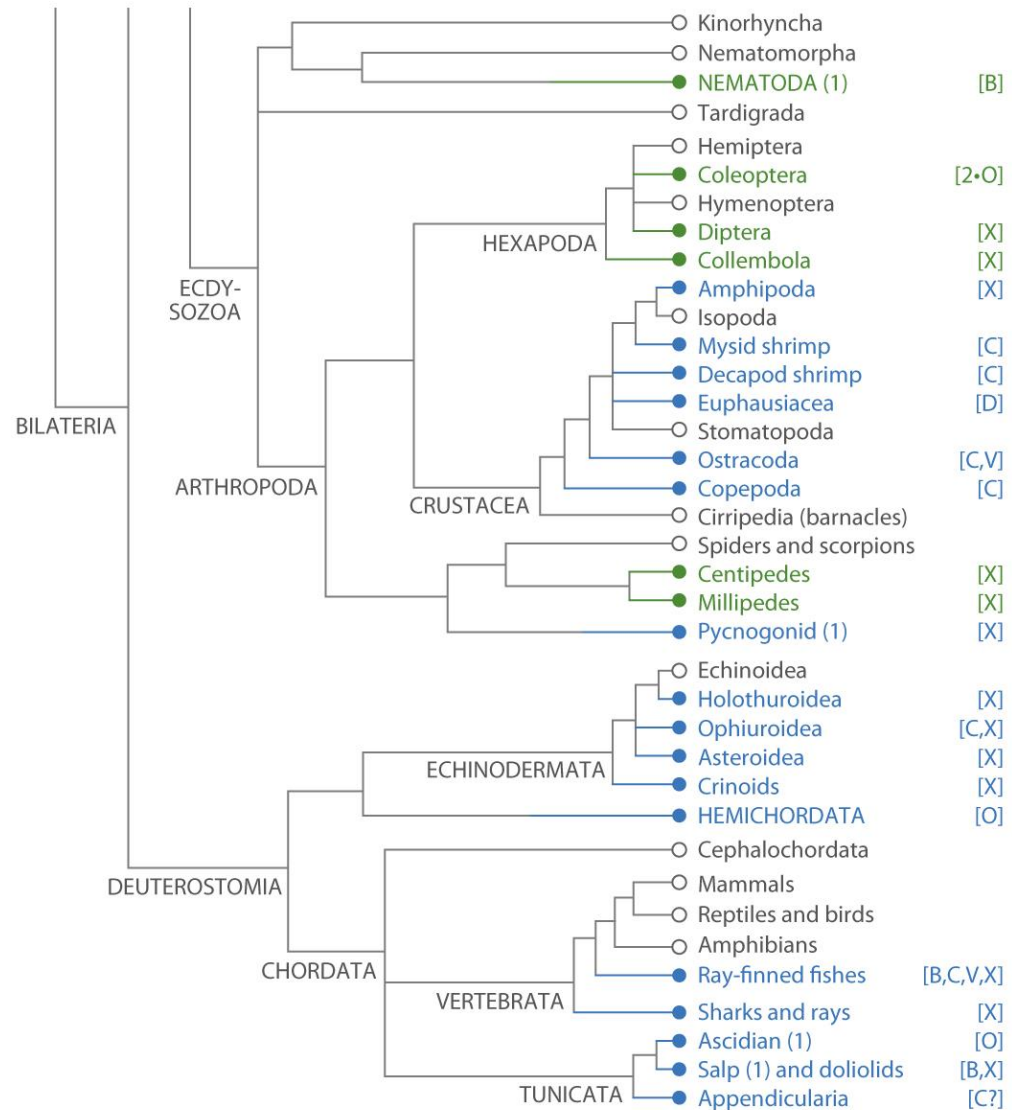
# Bioluminescence živočichů

## Luciferin type

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

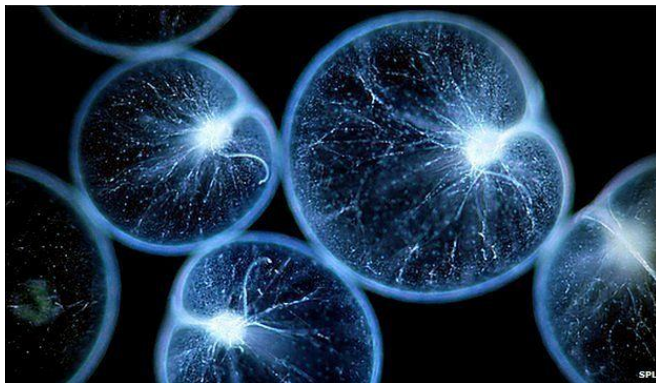
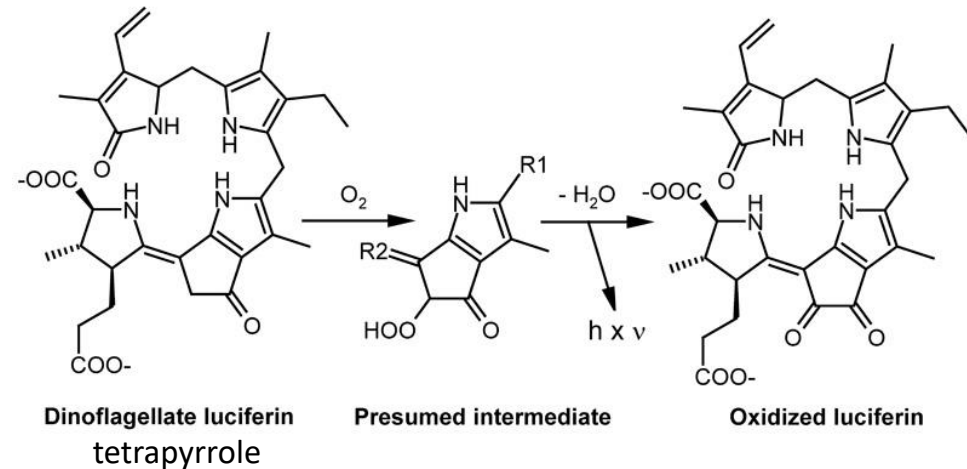
## Luminescence and habitat

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



# Dinoflagellata (= Obrněnky)

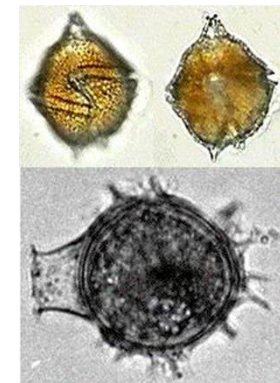
- Planktonní bičíkovci hojní v teplých mořích. Luciferin je zde pravděpodobně odvozen od chlorofylu, který má podobnou strukturu
- *Noctiluca miliaris*, *N. scintillans*, *Pyrocystis fusiformis*, *Gonyaulax* sp.



*Noctiluca* sp.



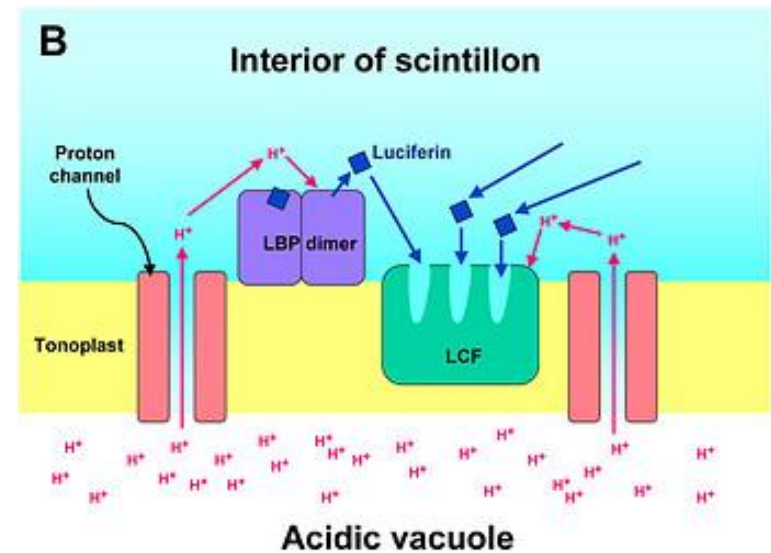
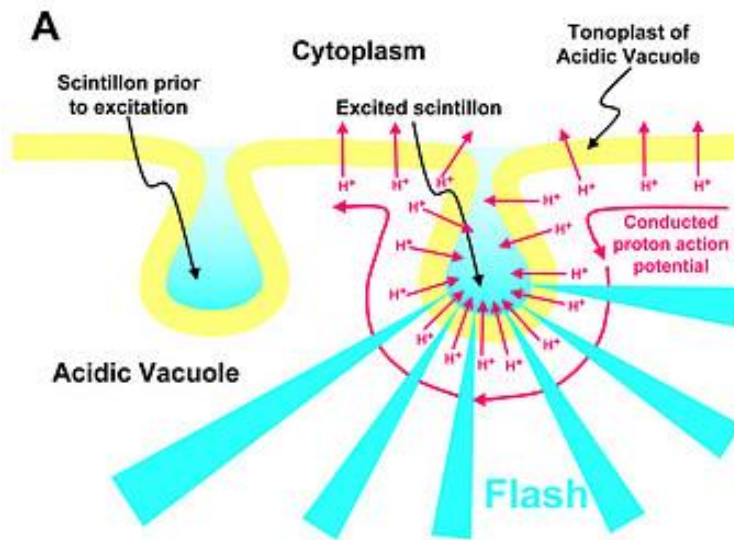
*Pyrocystis* sp.



*Gonyaulax* sp.

# Dinoflagellata (= Obrněnky)

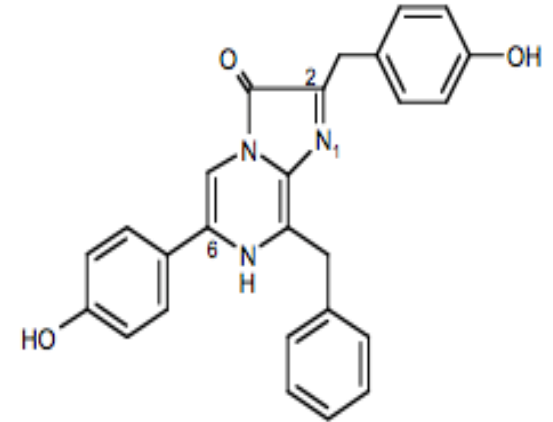
U rodu *Gonyaulax*, při pH 8 je molekula luciferinu „chráněna“ před luciferázou pomocí "luciferin-binding protein", když pH klesne, volný luciferin může reagovat a světlo je produkováno.





# 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*

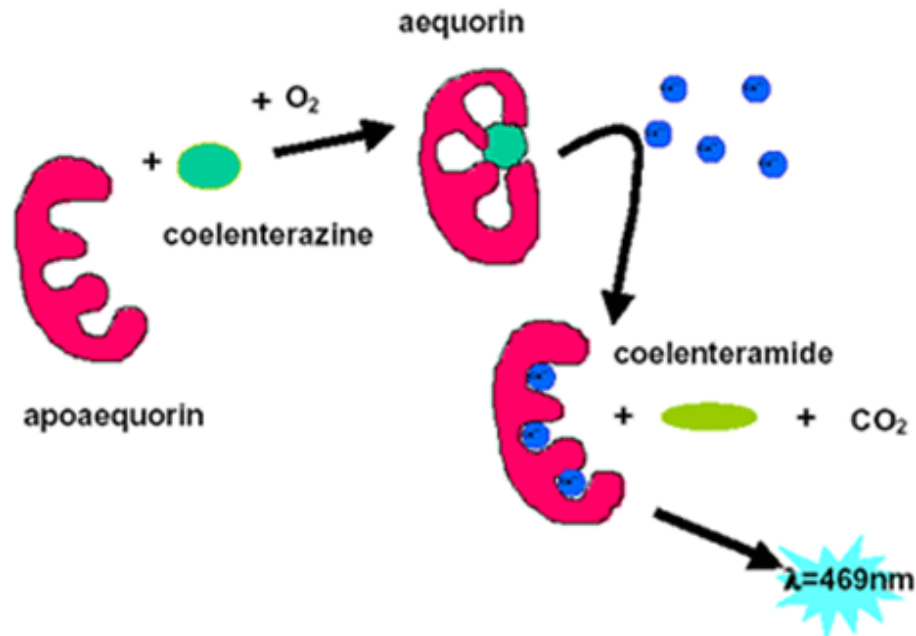


*Anthozoa*



# Cnidaria (= Žahavci)

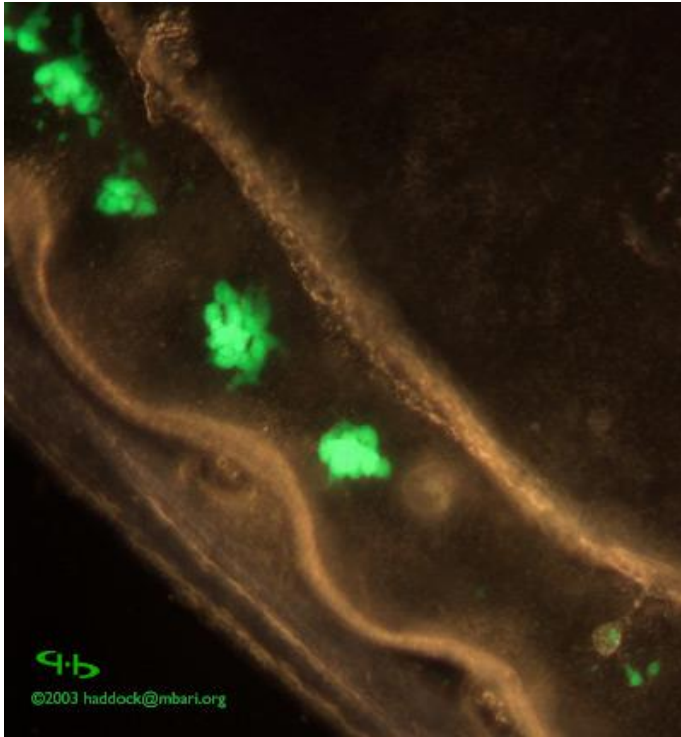
- **Aequorin** – využití pro analýzu  $\text{Ca}^{2+}$
- Je fotoproteinový komplex izolovaný z medúzy *Aequorea* (a jiných mořských druhů).
- Funkční komplex = apo-aequorin (protein) + molekulární kyslík + luciferin coelenterazin.
- Když se  $\text{Ca}^{2+}$  naváže na komplex, coelenterazin je oxidován na coelenteramide při uvolnění  $\text{CO}_2$  a modrého světla (469 nm).



# Cnidaria (= Žahavci)

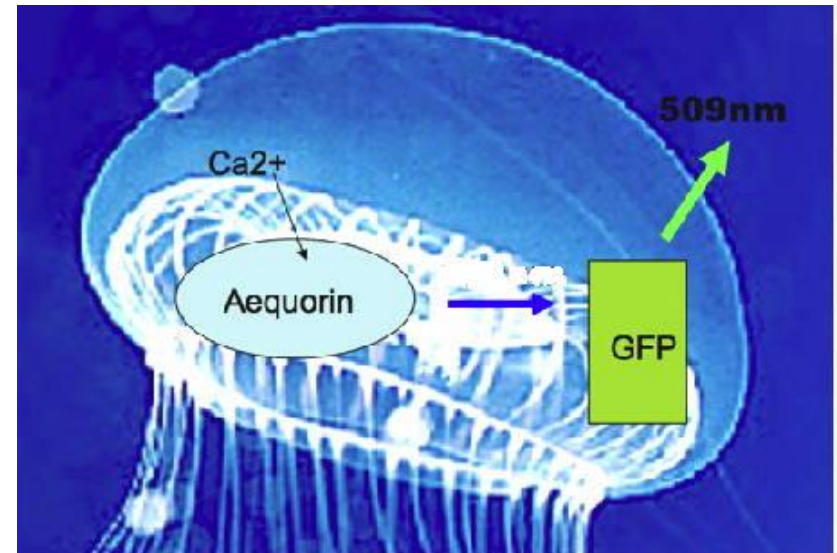
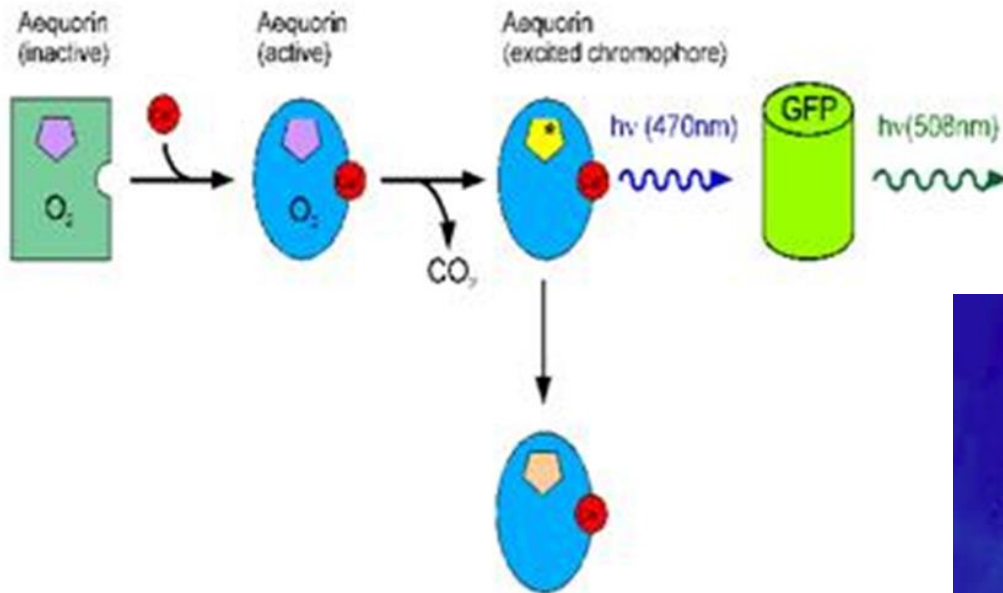
Žahavci mohou krom Aequorinu emitovat světlo přes green fluorescent protein (GFP)

Př. *Aequorea victoria* - okraj zvonu

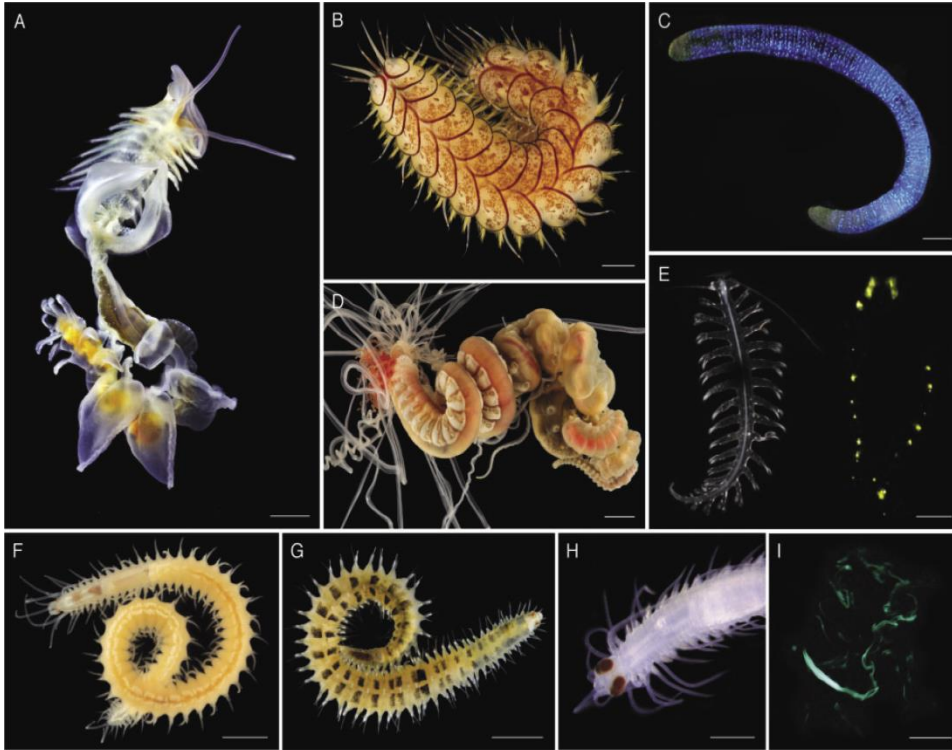




# Cnidaria (= Žahavci)



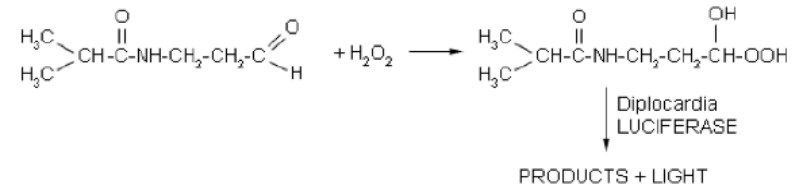
# Annelida (= Kroužkovci)



**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  $\mu$ 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).

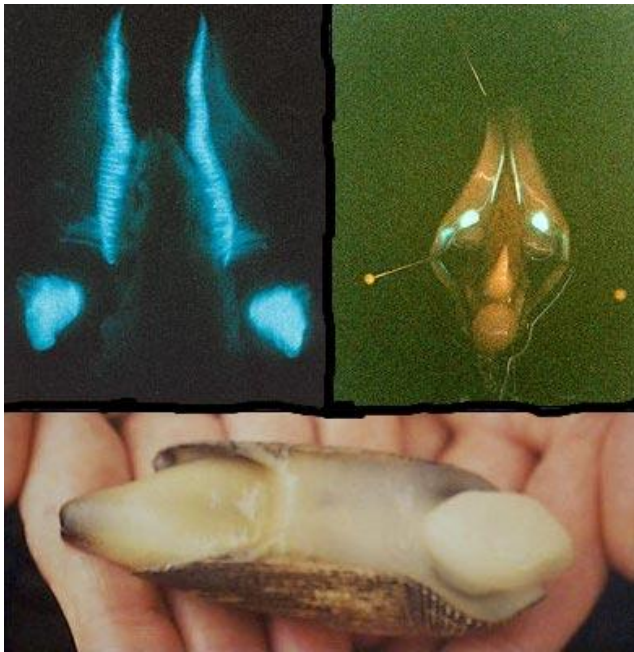


## *Diplocardia longa*

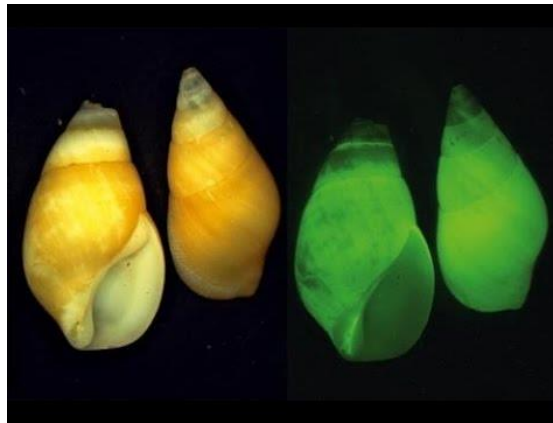


# Mollusca (= Měkkýši)

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



*Pholas dactylus* - skulař vrtavý



*Hinea brasiliana*



*Watasenia* sp.



*Staurotheutis* sp.

# Crustacea (= Korýši)

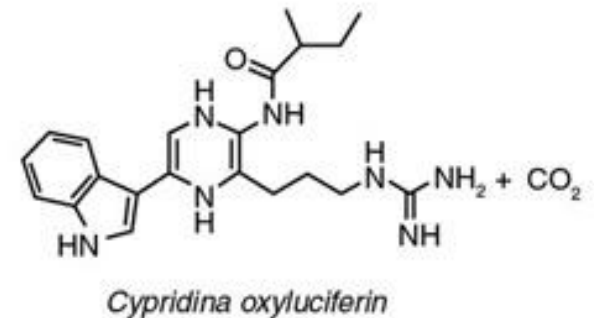
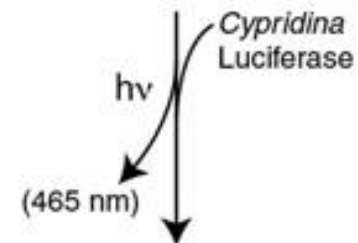
- *Vargula hilgendorffii* má dvě luminiscenční žlázy schopné rychle vystříknout luciferin a luciferázu do mořské vody, za účel vylekat jejich predátory.
- U tohoto druhu byl nalezen luciferin Vargulin (Cypridina).



*Vargula hilgendorffii*

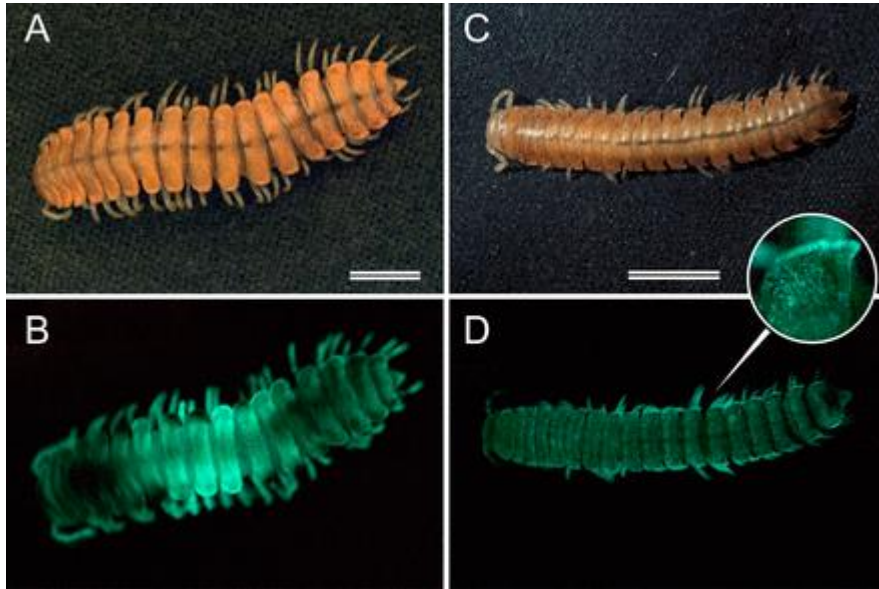


*Oplophorus sp.*

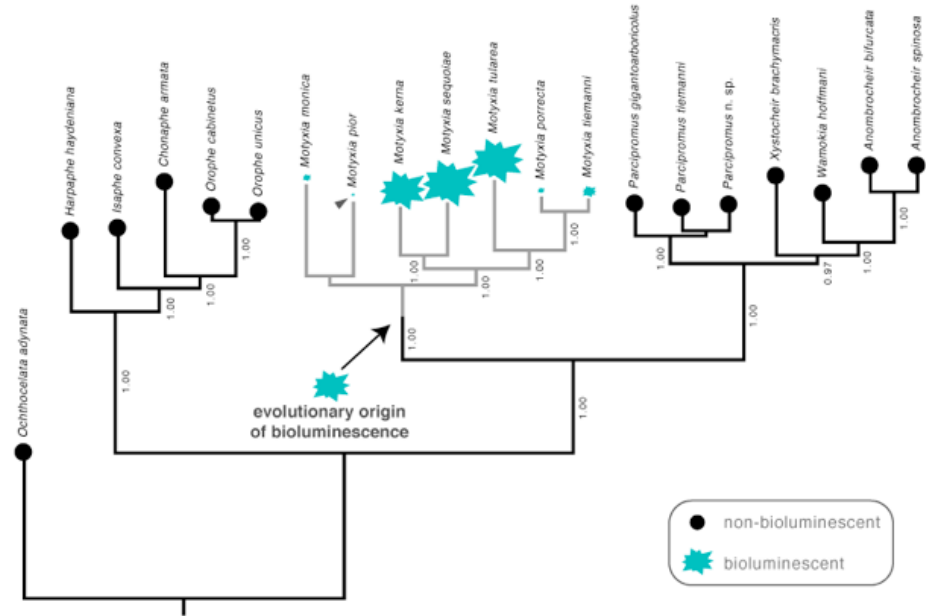




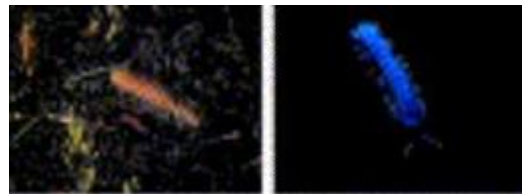
# Millipedes (= Mnohonožky)



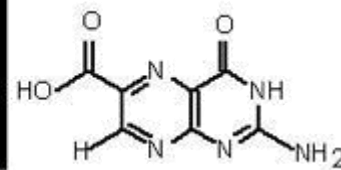
*Mytoxia* sp.



[http://www.apheloria.org/Paul\\_Marek/Aposematism.html](http://www.apheloria.org/Paul_Marek/Aposematism.html)



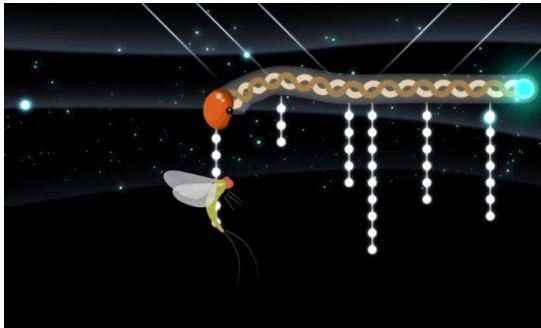
*Luminodesmus sequoiae*



7,8-dihydropterin-6-carboxylic acid

# Diptera (= Dvoukřídlí)

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



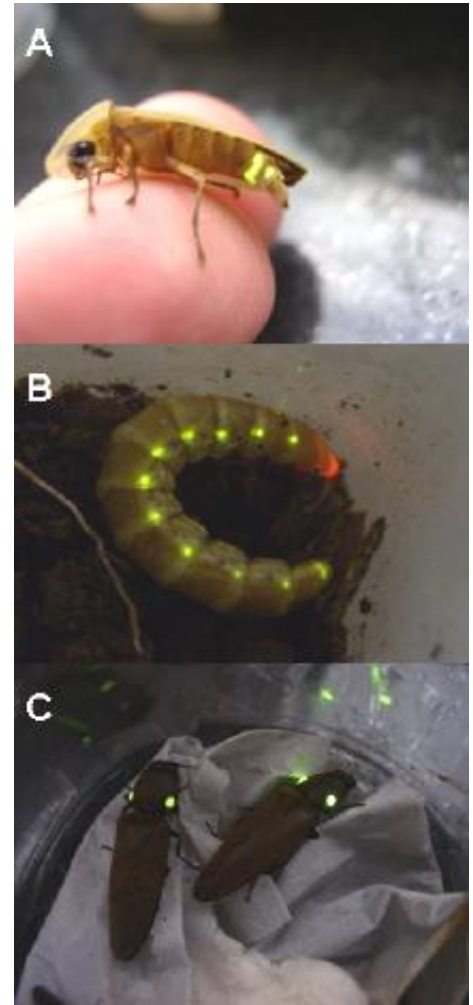
*Arachnocampa luminosa*



*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).



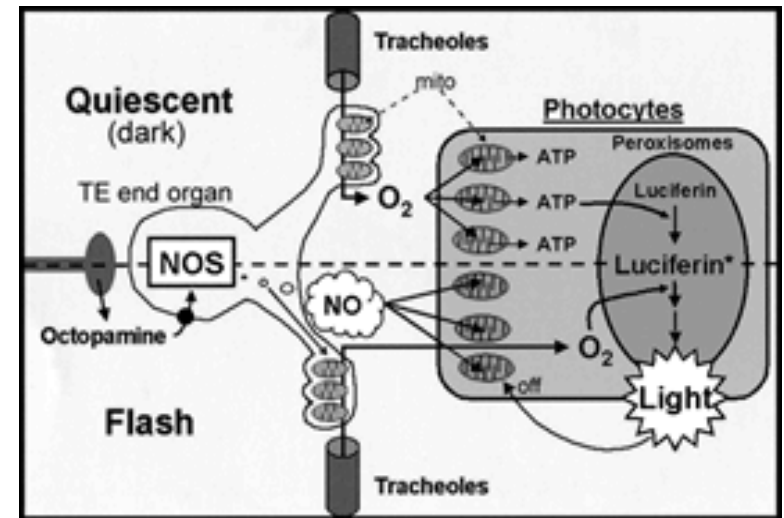
# Coleoptera (= Brouci)

## Regulace emise světla světluškami:

- Vzplanutí nervové aktivity stimuluje uvolnění primárního neurotransmiteru - **octapaminu**.
- 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 ?

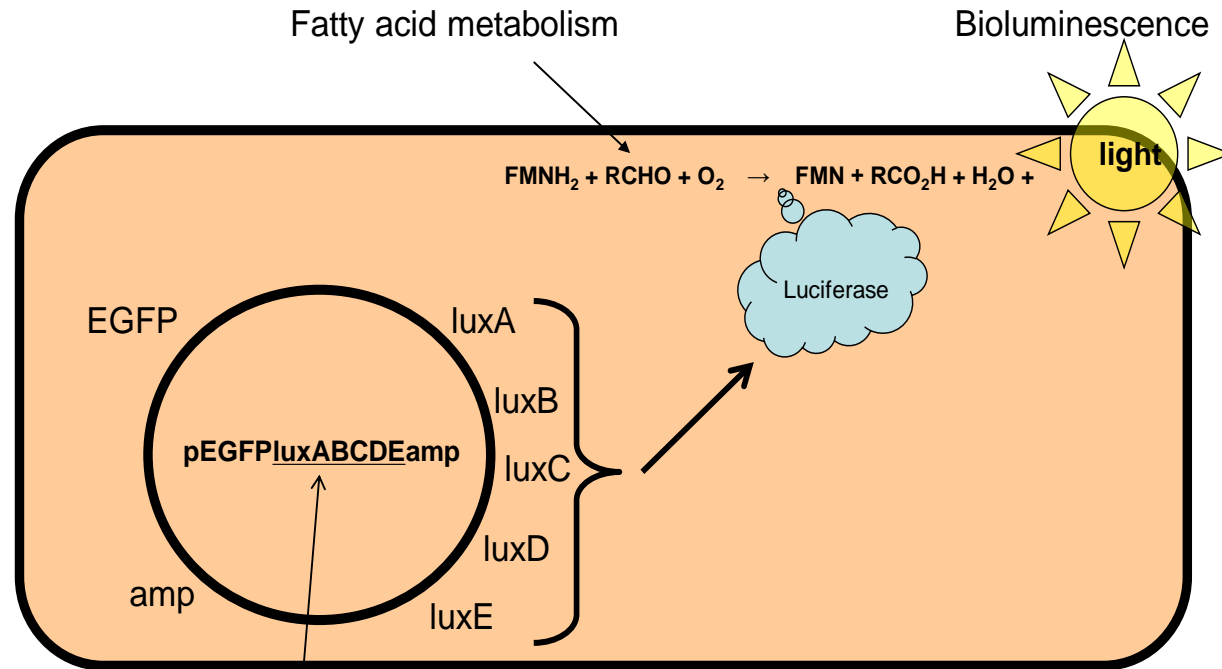
- Kyslík proudí do mitochondrií fotocytů. Nějaká látka musí regulovat oxidaci luciferinu a luciferázy ve fotocytech, pokud světluška chce/nechce svítit.
- mitochondriální spotřeba kyslíku je konečný kontrolní bod pro odstranění veškerého kyslíku, který dosáhne fotocytů.
- V odpovědi na neuronální excitaci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



# Využití bioluminiscence živočichů

## Toxikologie

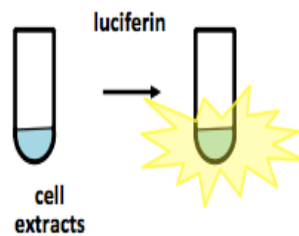
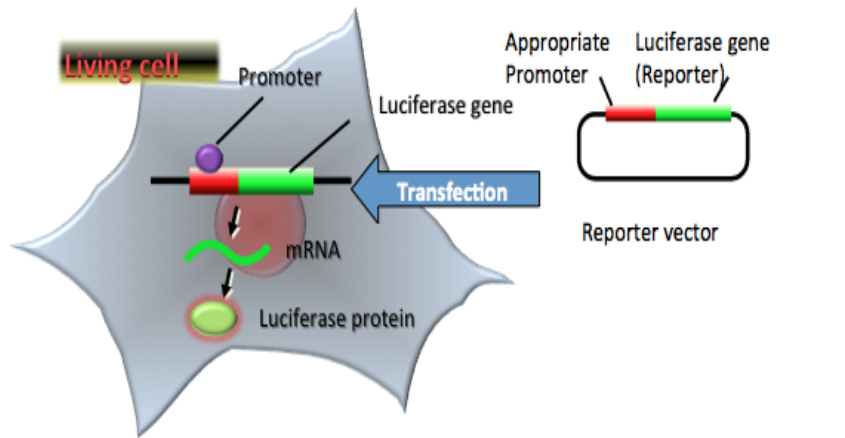
*Escherichia coli* K 12 (pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp) *E.coli-lux*



*Photorhabdus luminescens*

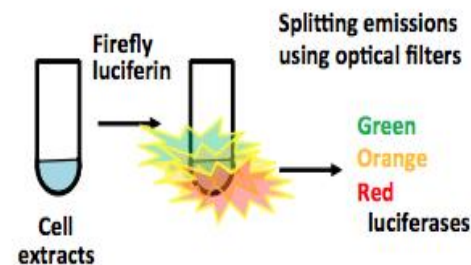
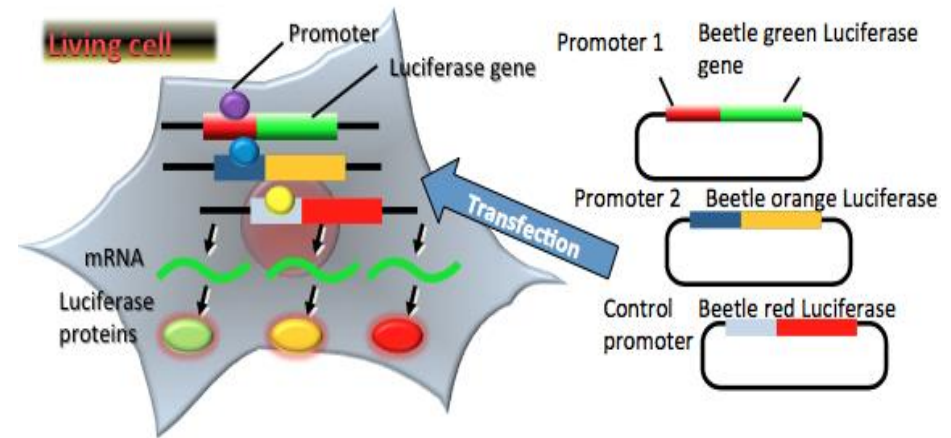
# Využití bioluminiscence živočichů

## Luciferase Reporter Assay



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

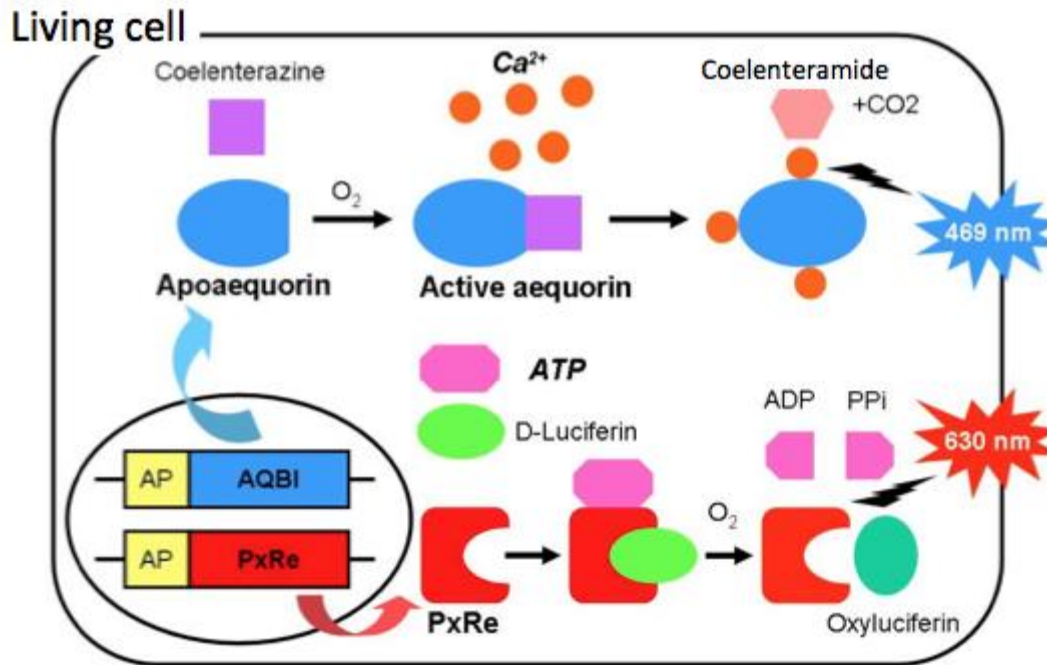
Principle of a simple luciferase reporter assay



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

Principle of multicolor luciferase reporter assay

# Využití bioluminiscence živočichů

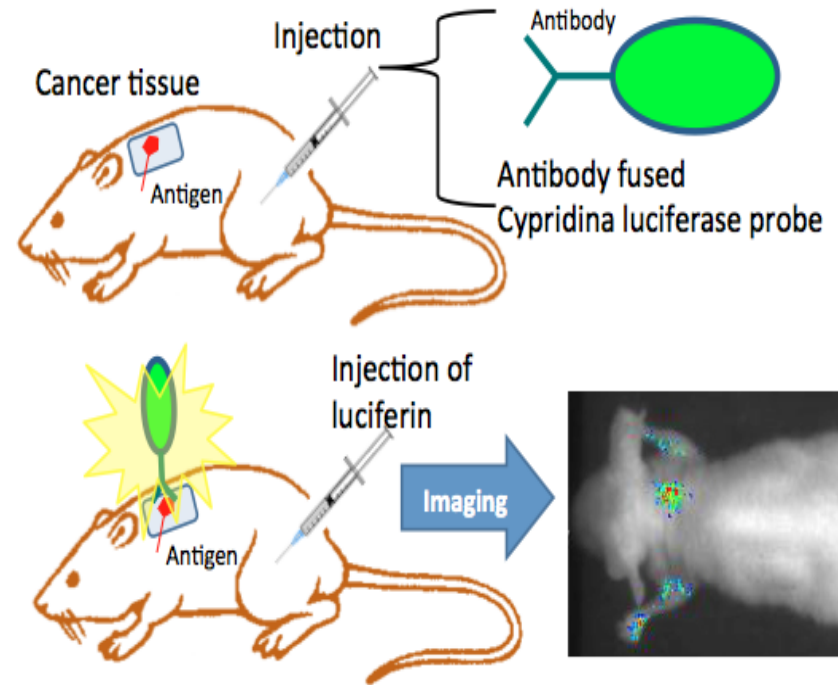
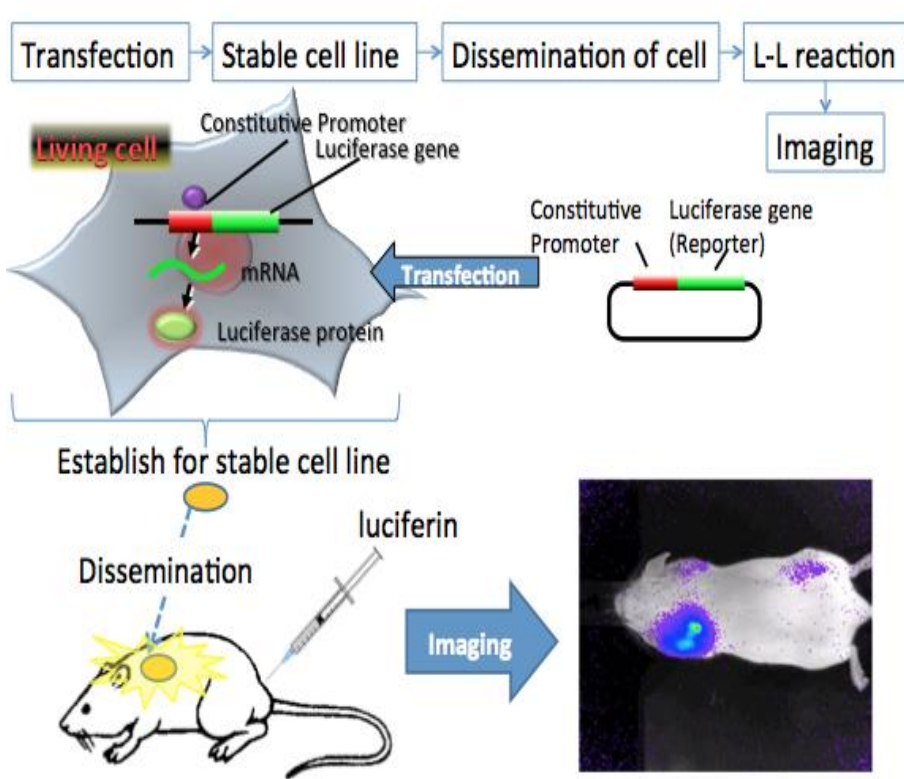


AP = Actin promoter, AQBI = apoaequorin gene , PxRE = Beetle red luciferase

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**