

Bioluminescence

Jak to dělá příroda?

Petr Tábořský

Bioluminiscence

- 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 kovaříci (např. *Pyrophorus noctilucus*)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakatice, ryby, paryby, atd. Zatím nebyl objeven žádný sladkovodní živočich jevící bioluminiscenci...
- bioluminiscence 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 stříbrnáč, medusy z čeledi klanonožců)
- bioluminiscence hub (např. některé druhy václavek, „Jack-O-Lantern“, helmovky)

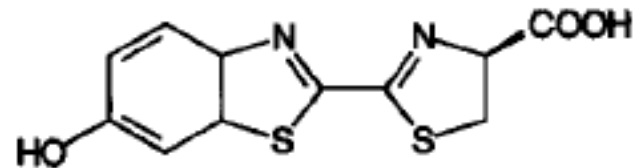
Princip

- 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

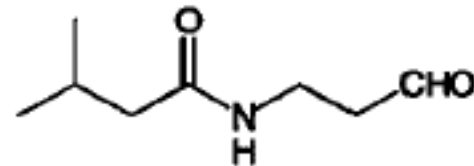
Základní pojmy

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

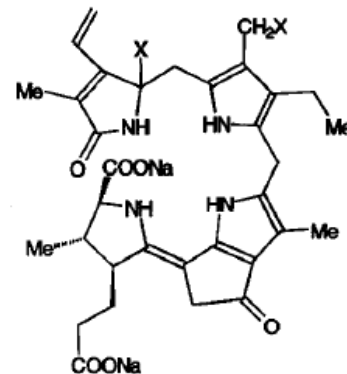
Luciferin ze světlušky (Firefly)



Červí luciferin (Earthworm)



Luciferin z obrněnky (Dinoflagellate)



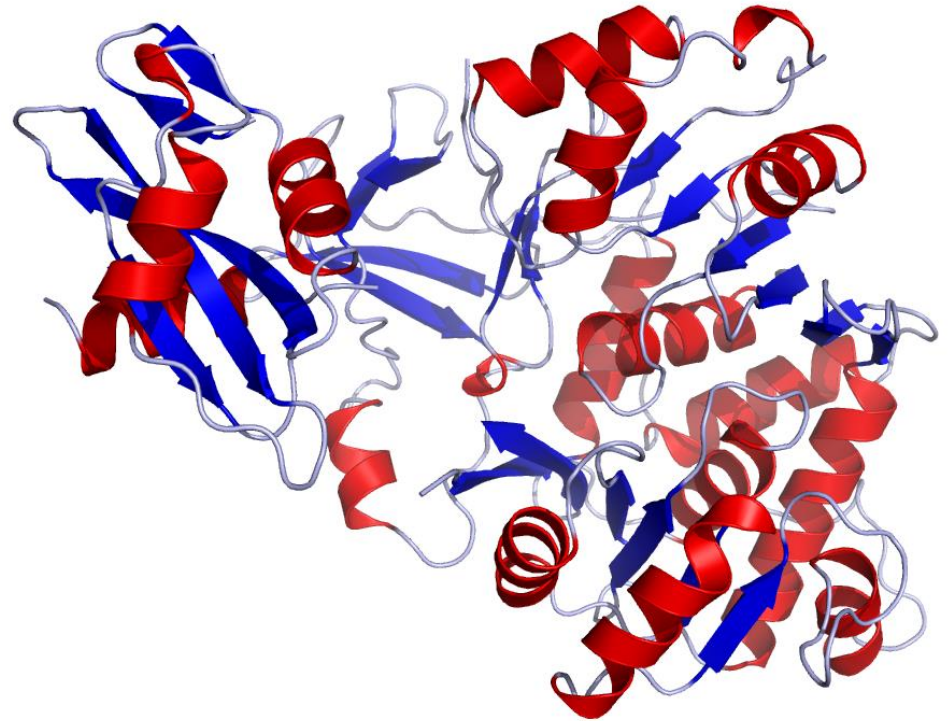
Základní pojmy

- Luciferáza: oxidativní enzym

- „divoká“ luciferáza ze světlušky *Photinus pyralis*, tento protein má $M_r = 62\ 000$

- jen u čeledi světlušek (Lampyriade) 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

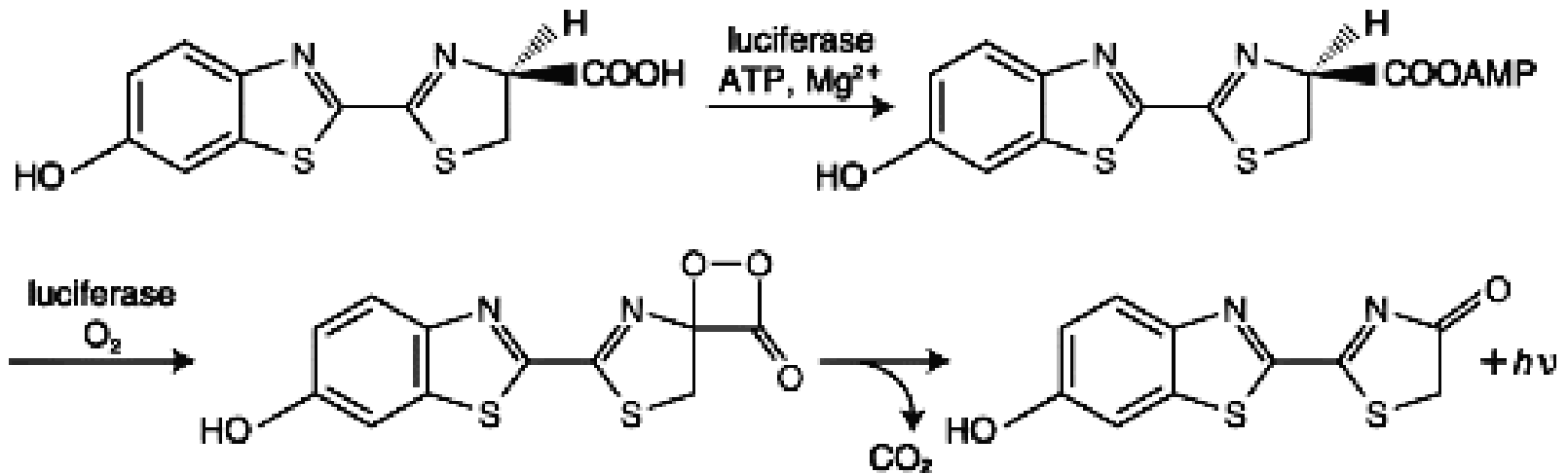
Světlušky

- v ČR se vyskytuje pouze **Světluška menší** (*Lamprohiza splendidula*)
- 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

Světluška větší (*Lampyris noctiluca*)

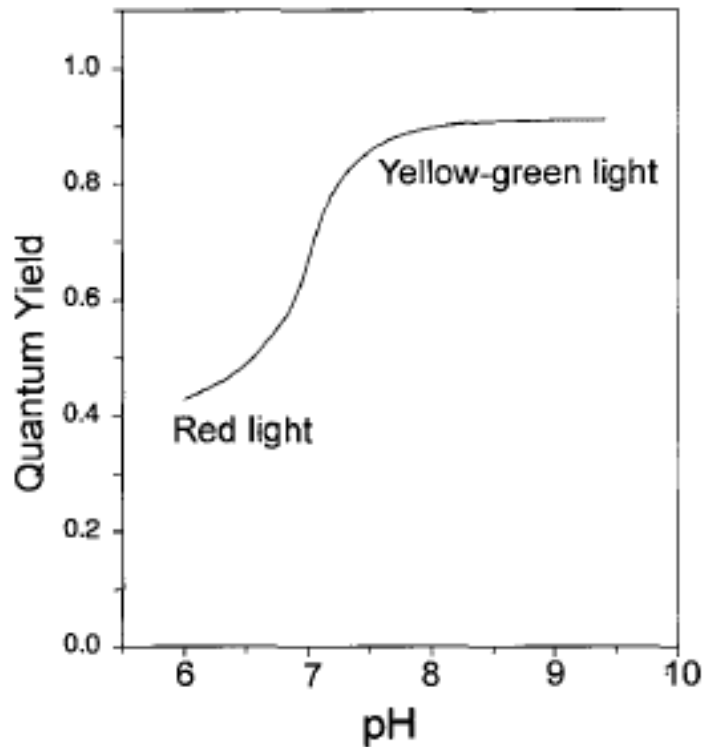


Oxidace luciferinu (světluška)

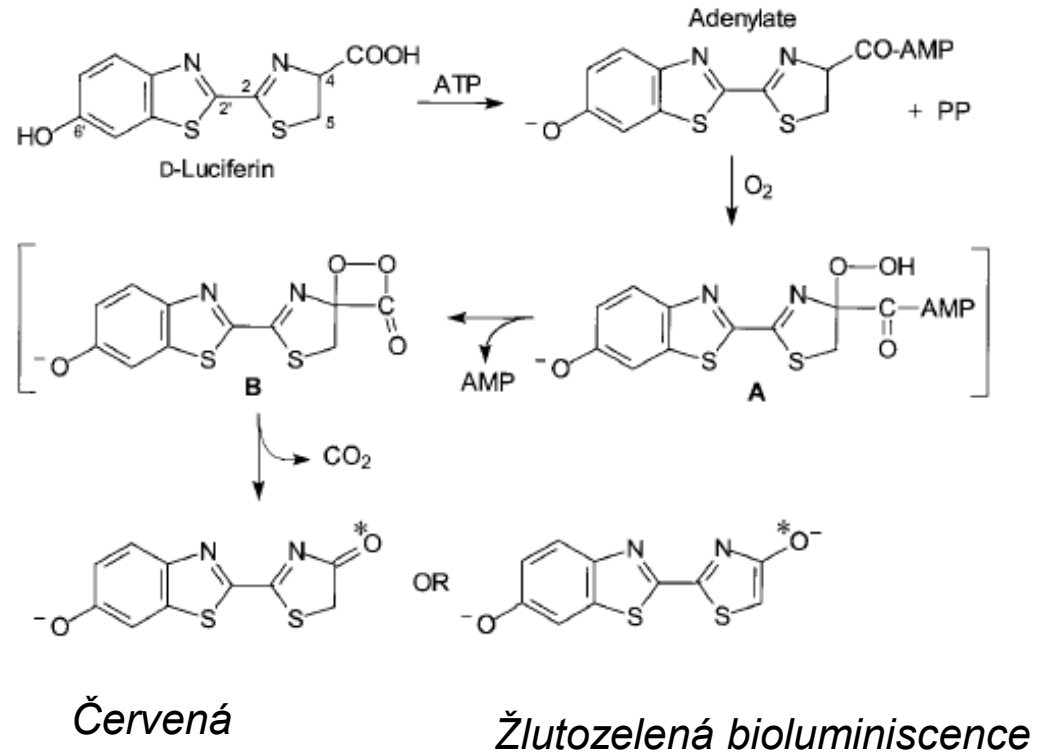


- na oxidaci luciferinu pomocí O_2 je třeba ATP, Mg^{2+} a enzym luciferázu
- všechny druhy světlušek využívají tento luciferin („firefly luciferin“), stejně jako další druhy bioluminiscenčních brouků (Lampyridae, Phengodidae, Eleteriodae)
- jsou ale i druhy hmyzu (např. *Arachnocampa*), které využívají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

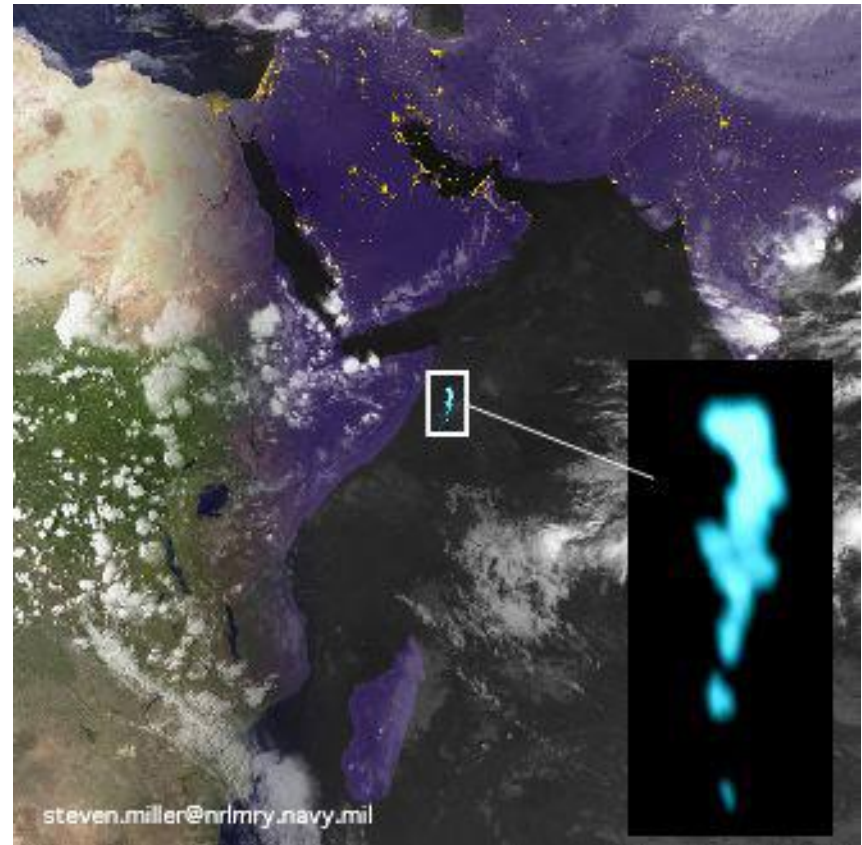
Využití systému liciferin-luciferáza

- 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

Bioluminescence bakterií



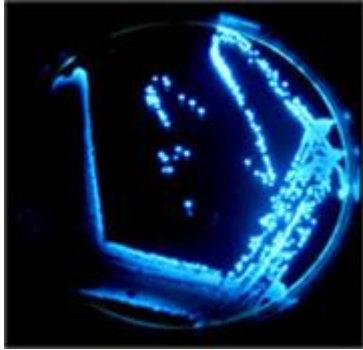
Tzv. Mléčné moře – způsobený pravděpodobně bakteriemi

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

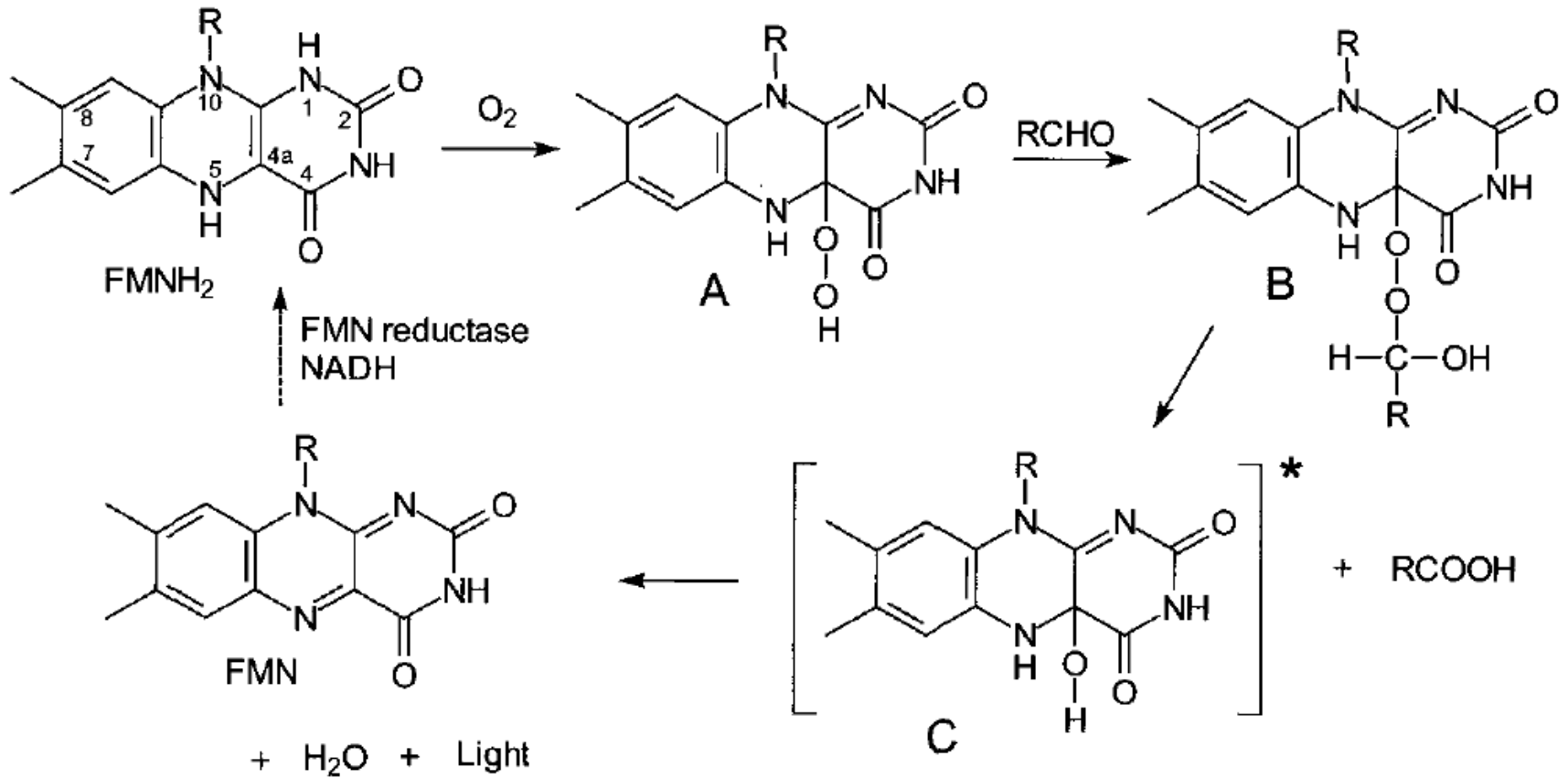
Bioluminiscenční bakterie

- 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 FMNH₂ a O₂
- Někdy dochází k energetickému přenosu (*energy transfer*) na jinou molekulu



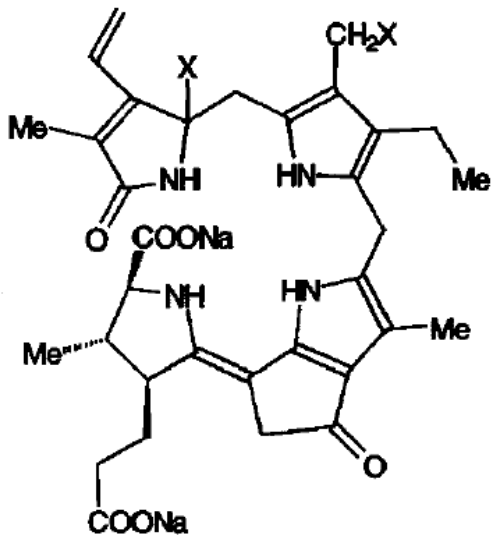


Bakteriální bioluminiscence – předpokládané schéma



Obrněnky (dinoflagellates) a další prvoci (protozoa)

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





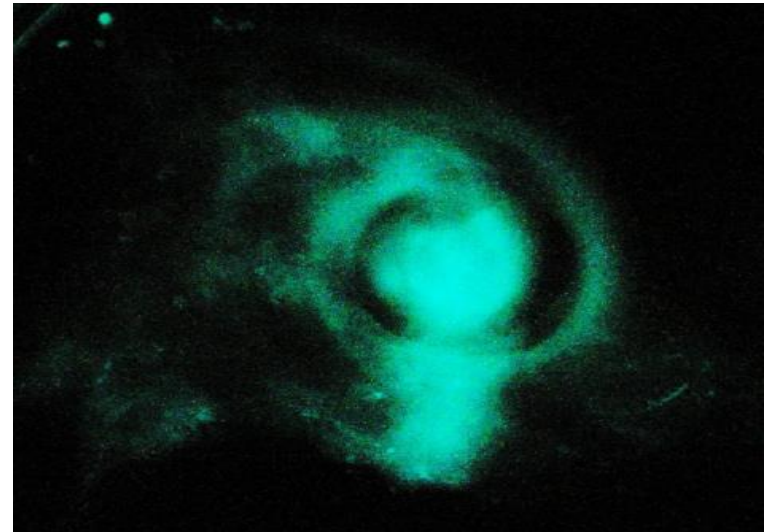
Bioluminiscenční organismy – Austrálie, jezero Gippsland

Bioluminiscence kroužkovců

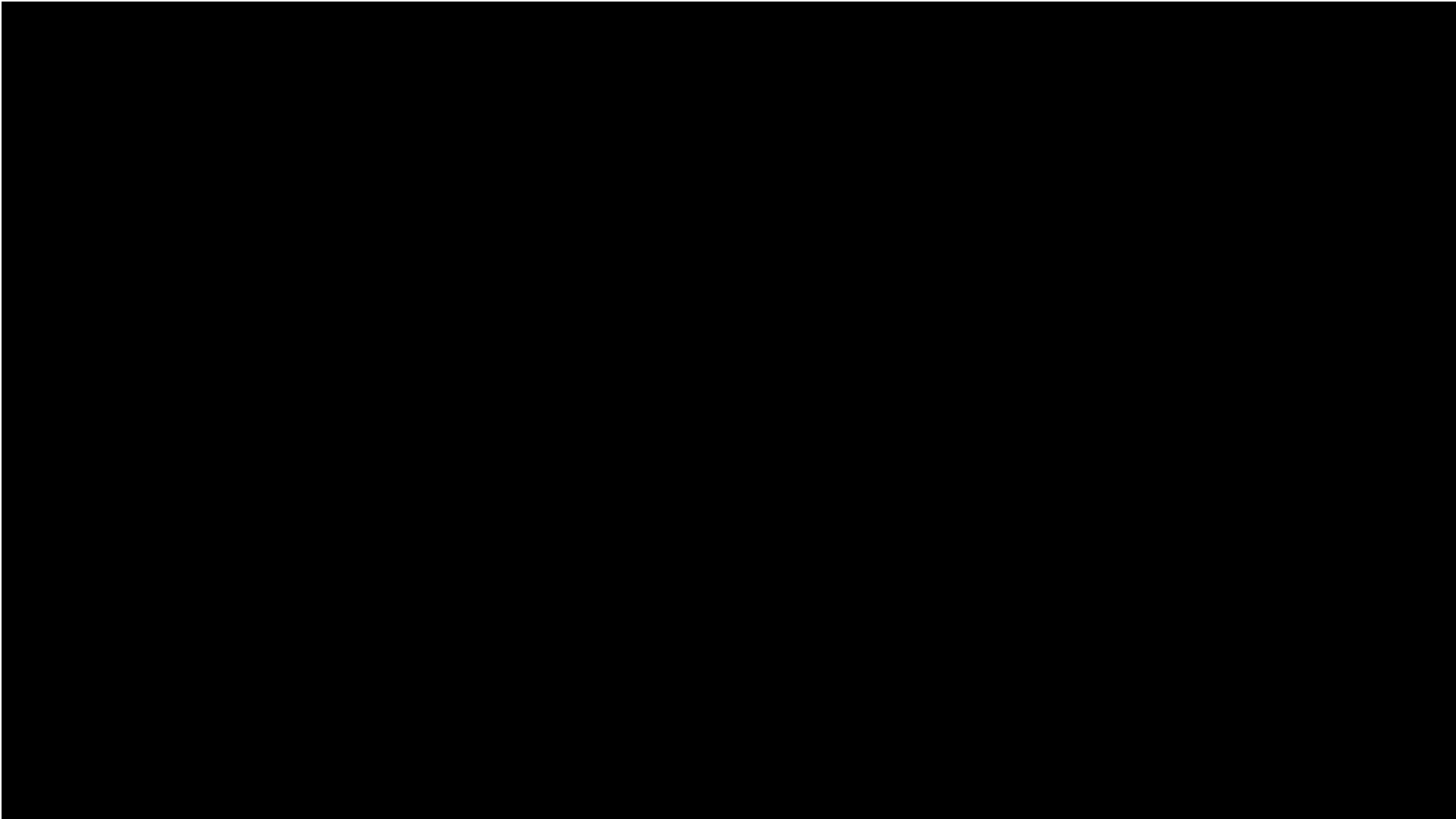
- bioluminiscence kroužkovců (bioluminescent earthworms) –v svítí zástupci mnohoštětinatců (např. *chaetopterus* a *tomopteris*) i máloštětinatců (např. *diplocardia* a *eisenia*)
- bioluminiscenci jeví kolem 33 druhů červů rozšířených po celém světě (hlavně Austrálie a JV Asie)
- v ČR: žížala podhorská/svítivá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

Bioluminescence žížaly *Eisenia lucens*

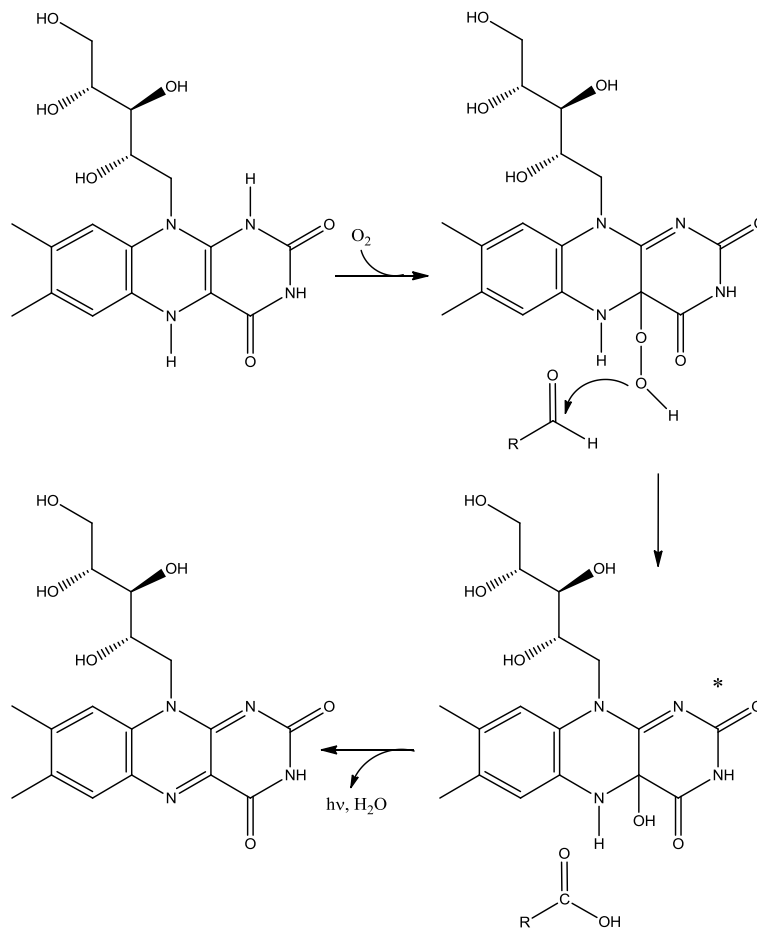
- *Eisenia lucens* (submontana) – žížala svítivá (podhorská)
- Žije v hniјícím dřevě (nejlépe smíšené lesy bez dlouhodobé údržby – pralesy)
- Beskydy, Orlické hory, Vysočina, atd.
- Mechanismus bioluminiscence ještě není zcela prozkoumán
- Žížalu můžeme podráždít např. několika kapkami ethanolu nebo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

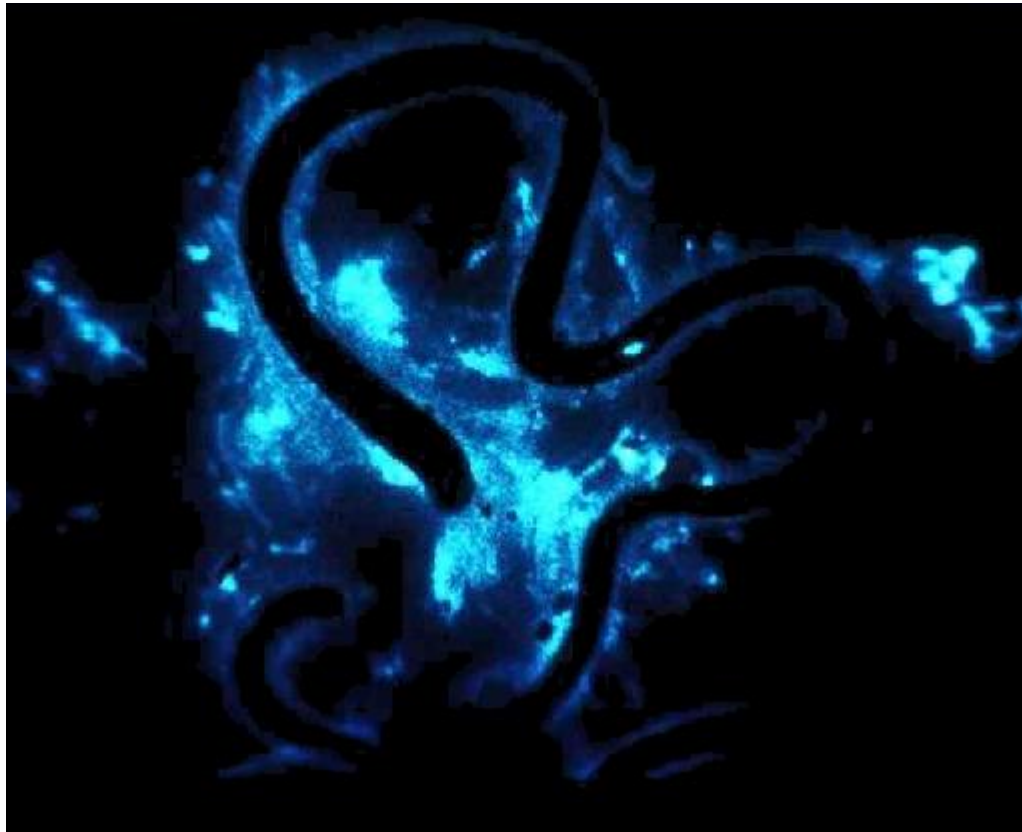


Eisenia lucens - video



Možné schéma bioluminiscenční reakce – žížala *Eisenia lucens*





Bioluminescence kroužkovce *diplocardia longa*

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

Nobelova cena za chemii 2008

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

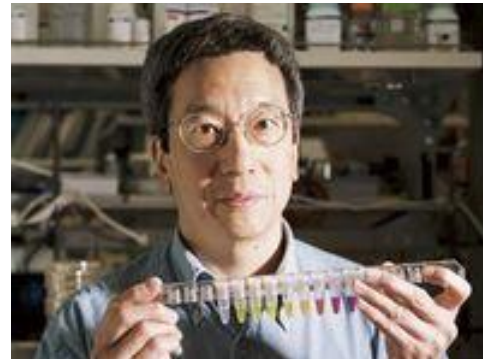
OSAMU SHIMOMURA (Japonsko)



MARTIN CHALFIE (USA)



ROGER Y. TSIEN (USA)



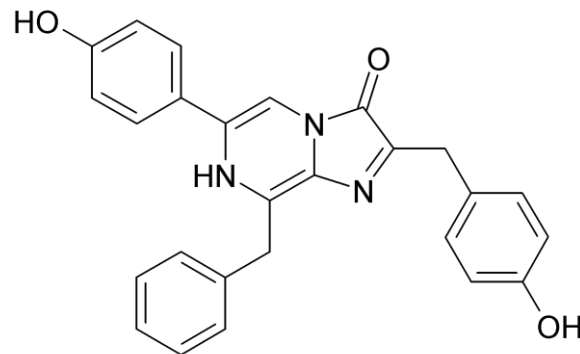
Bioluminescence medusy *A. Victoria*

Většina mořských živočichů jevících 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...



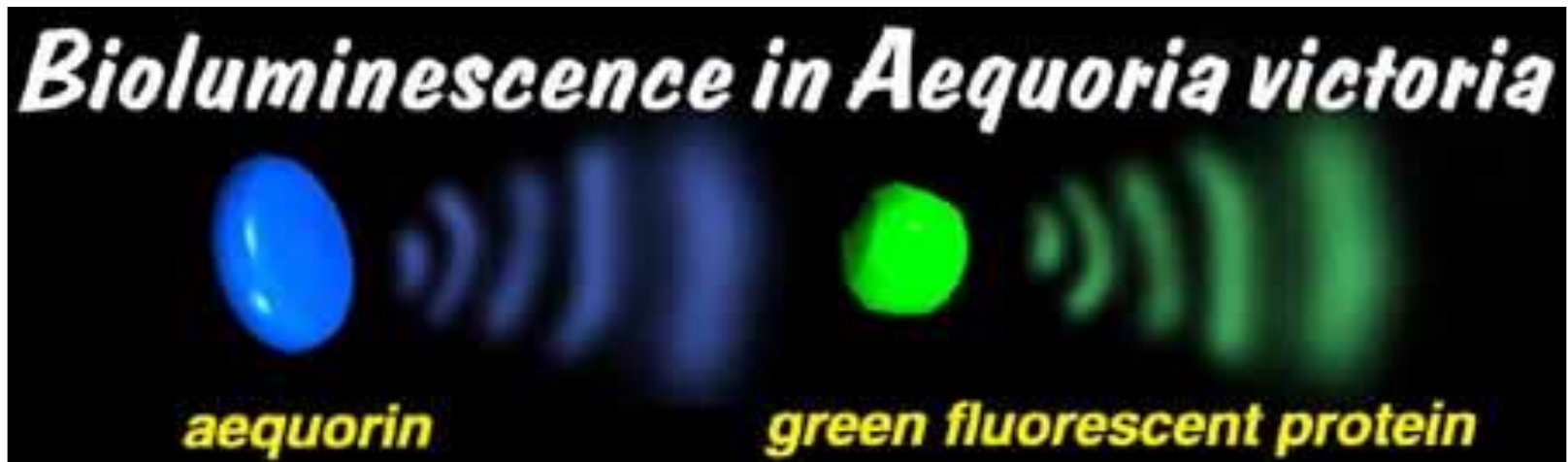
Bioluminescence medusy *A. Victoria*

- medusa obsahuje fotoprotein *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



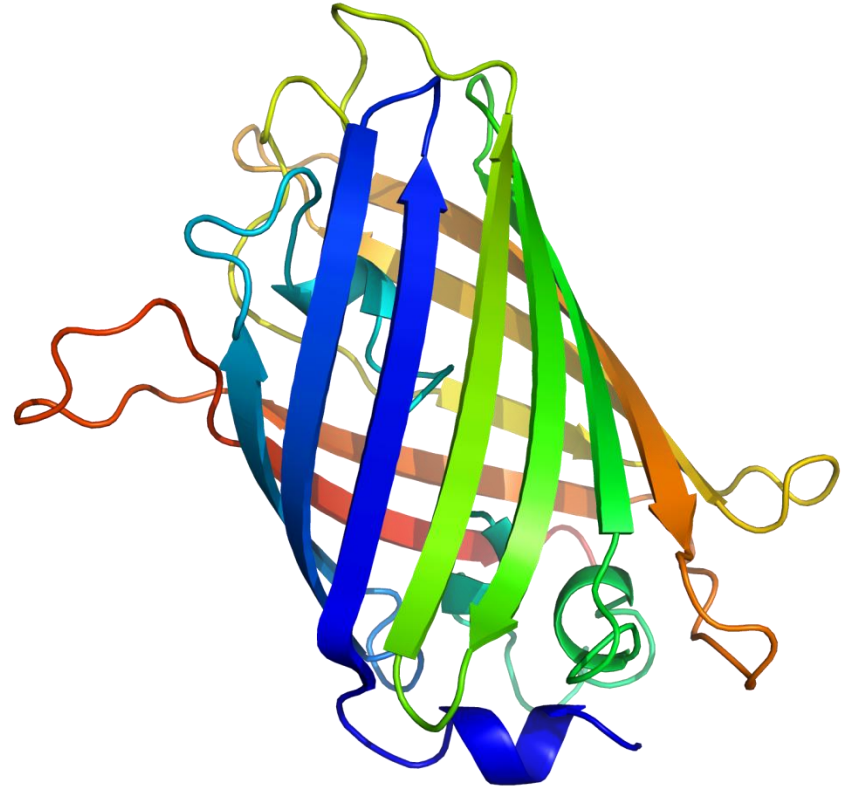
„Green fluorescent protein“

- 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 ($\lambda = 509$ nm)



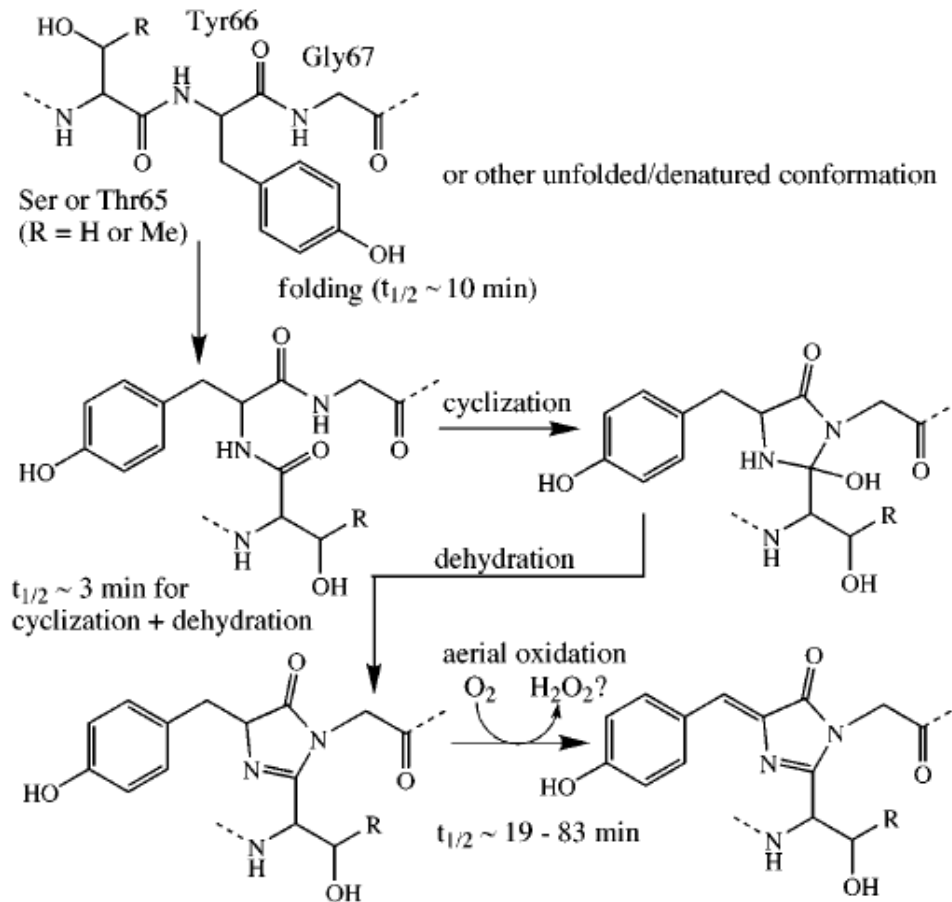
Struktura GFP

- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- V roce 2008 byla udělena Nobelova cena „za objev a výzkum zeleně 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)

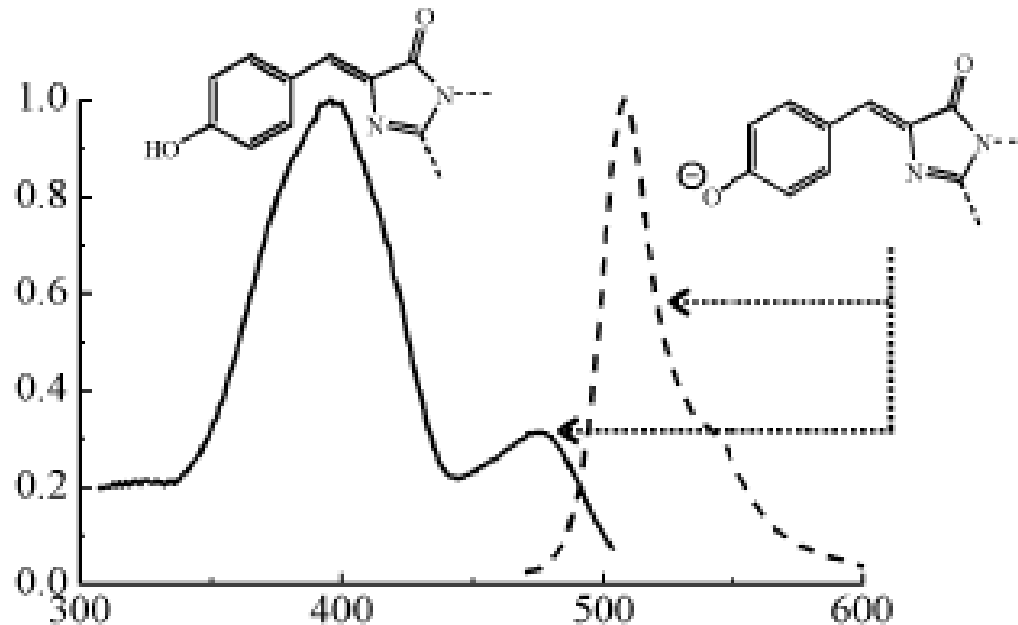


Struktura GFP

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



Fluorescenční vlastnosti GFP



„Divoký“ typ GFP – směs fenolového a fenolátového derivátu

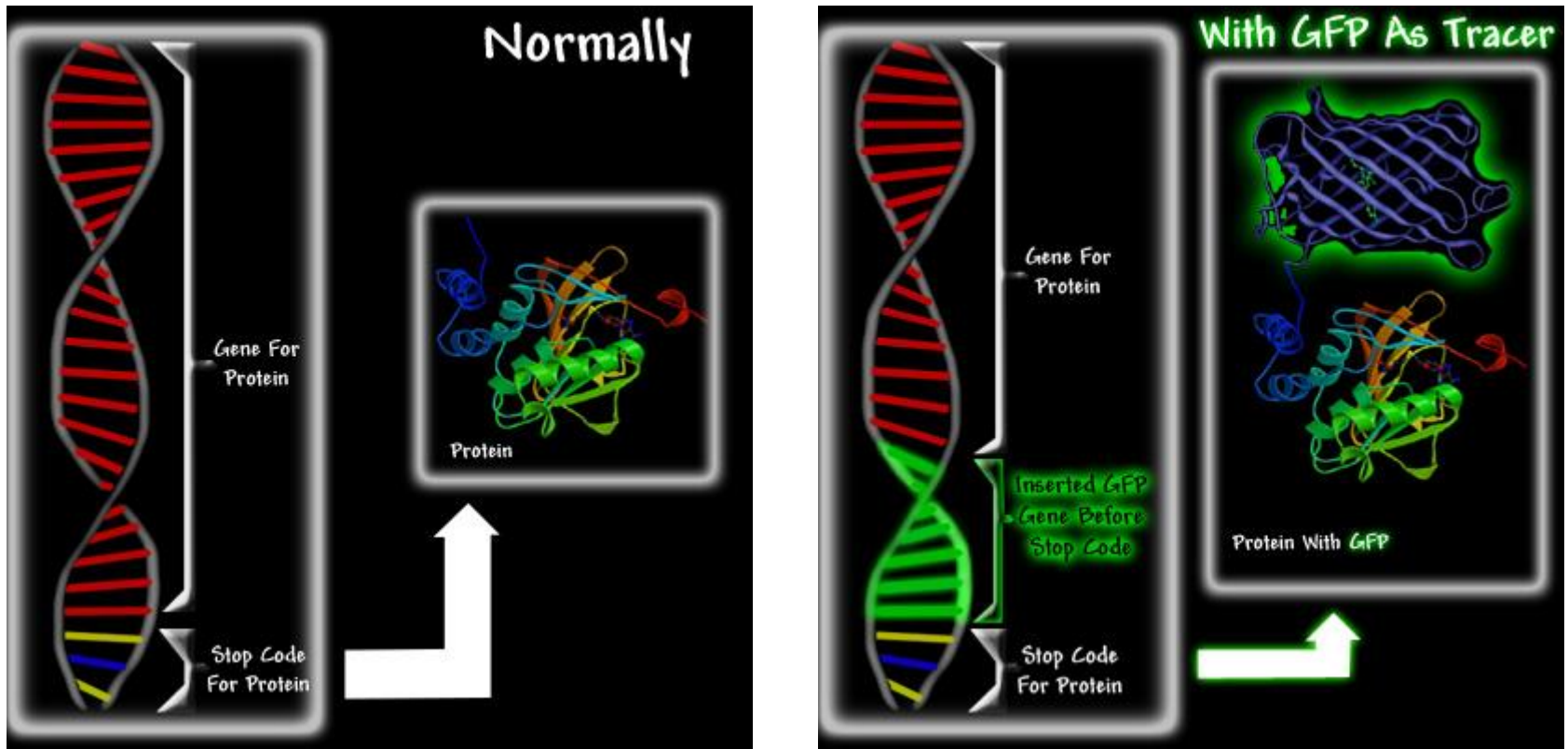
Hlavní excitační pík - 395 nm (emisní maximum - 508 nm)

Minoritní excitační pík - 475 nm (emisní maximum – 503 nm)

Použití GFP v chemii a biologii

- lze 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...

Vložení GFP



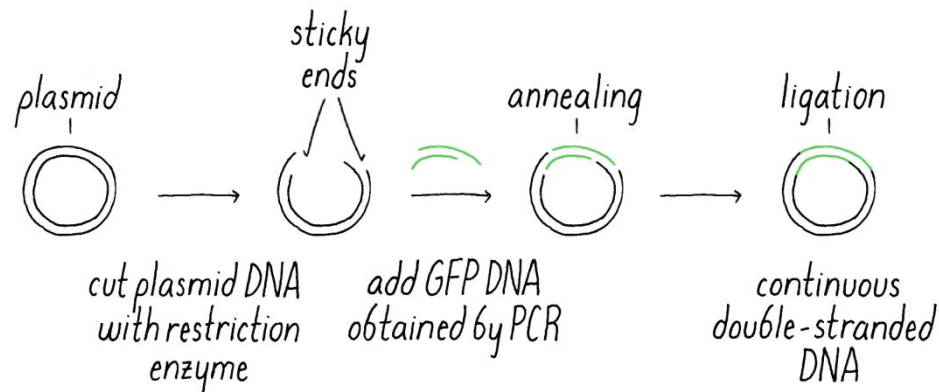
<https://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/prasher.html>

Vektor

- jakákoliv částice DNA, kterou je možné cíleně vnášet do buňky (včetně cizorodé DNA sekvence), která se do vektoru vloží a následně je v příjemcově buňce replikována a přepisována
- vektory plazmidového typu, odvozené z přirozeně se vyskytujících plazmidů
- vektory virového typu odvozené z virů

Vložení vektoru do buňky se nazývá dle cílové buňky: transformace (bakterie), transfekce (eukaryota), transdukce (virů)

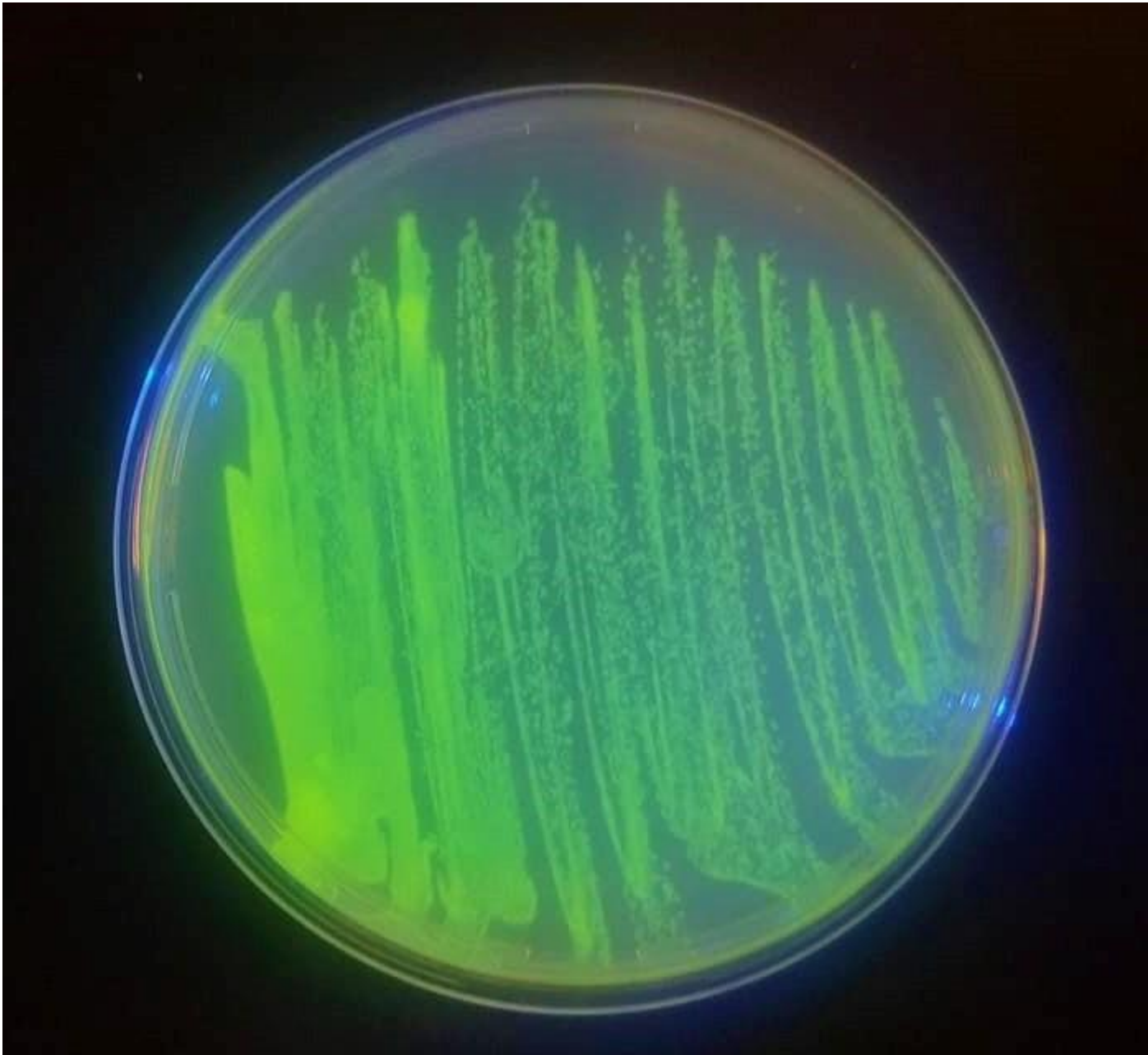
CLONING GFP INTO A PLASMID





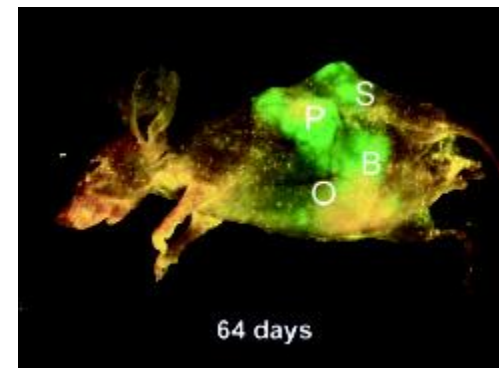
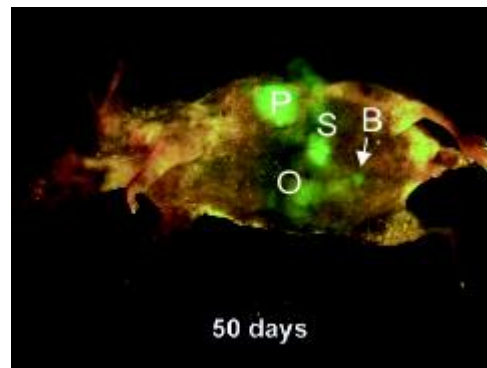
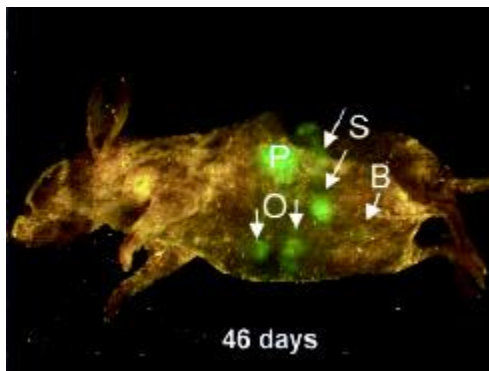
GFK – Green Fluorescent Králík



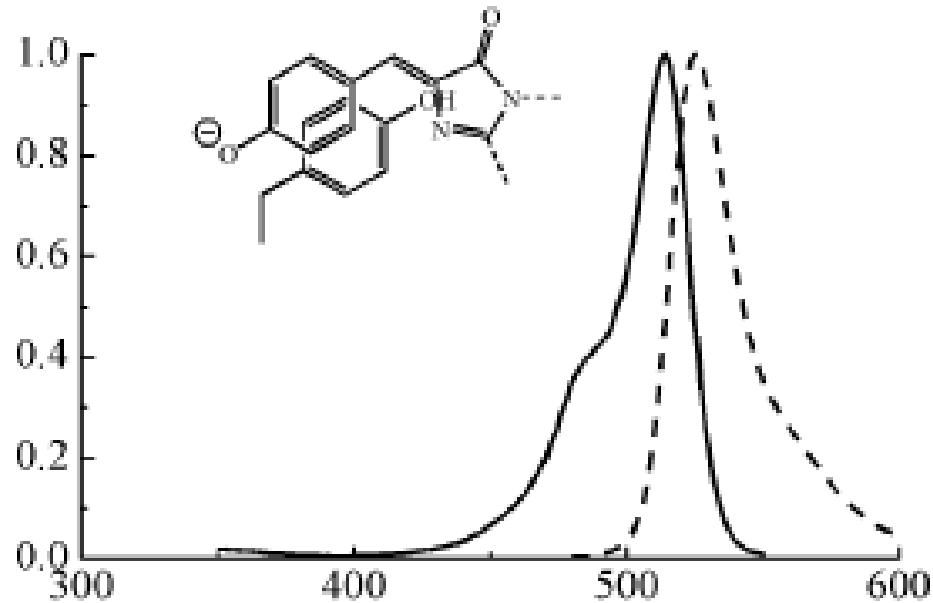


Použití GFP v chemii a biologii

- 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

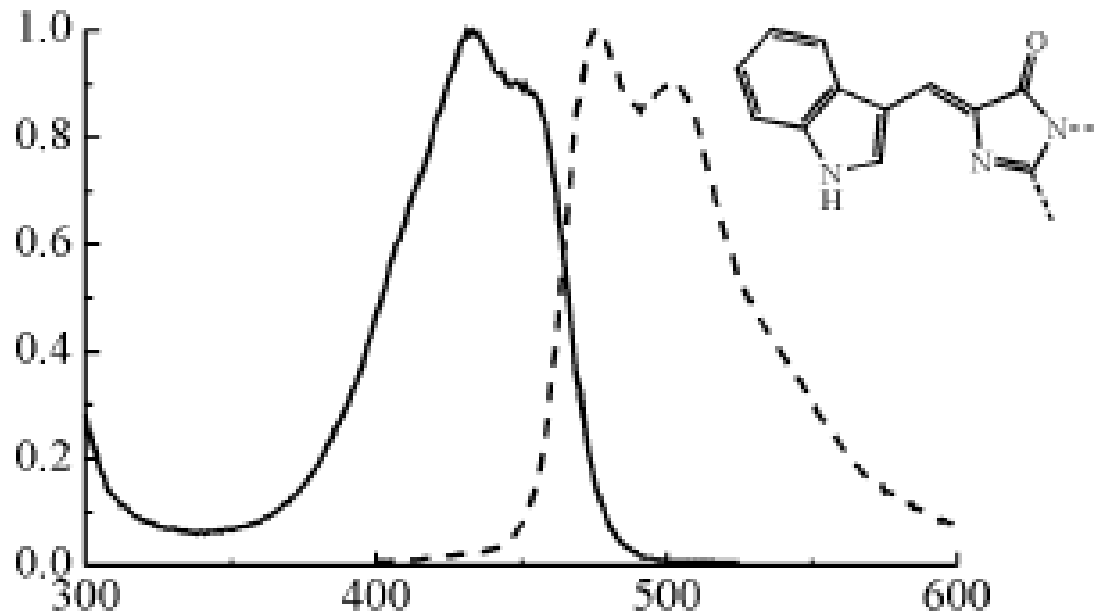


π -electronový „stocking“ s dalším Tyr (tzv. class 4)

516 nm \rightarrow 529 nm

zelenožlutlá luminiscence – YFP (yellow fluorescent protein)

Jiné varianty GFP

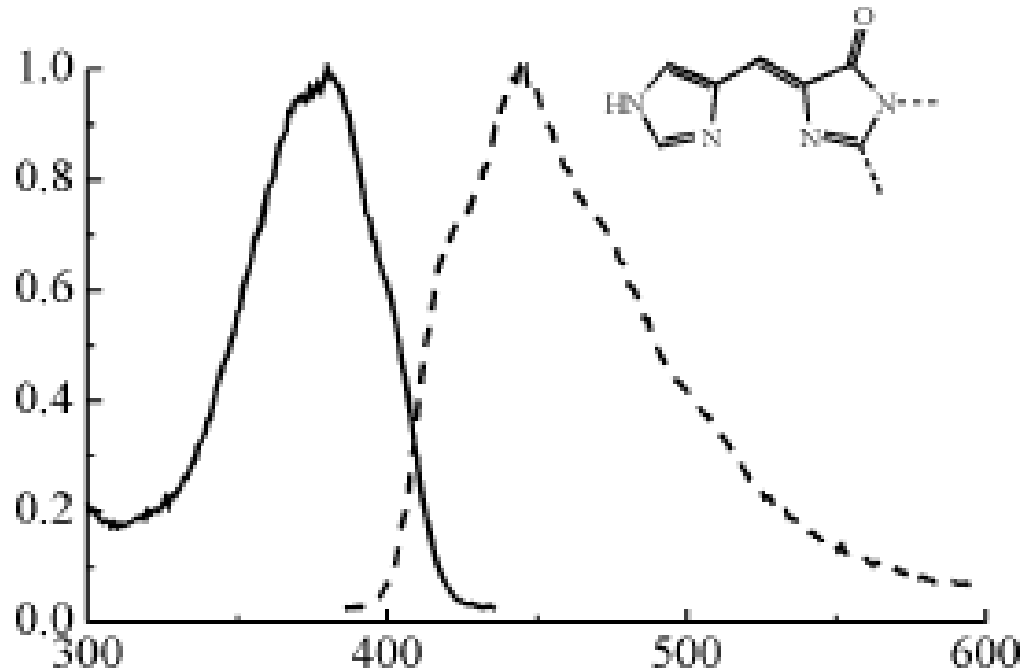


TYR je nahrazen indolem (tzv. class 5)

436 nm → 476 nm

modrozelená luminiscence, rozštěpení píků

Jiné varianty GFP - BFP

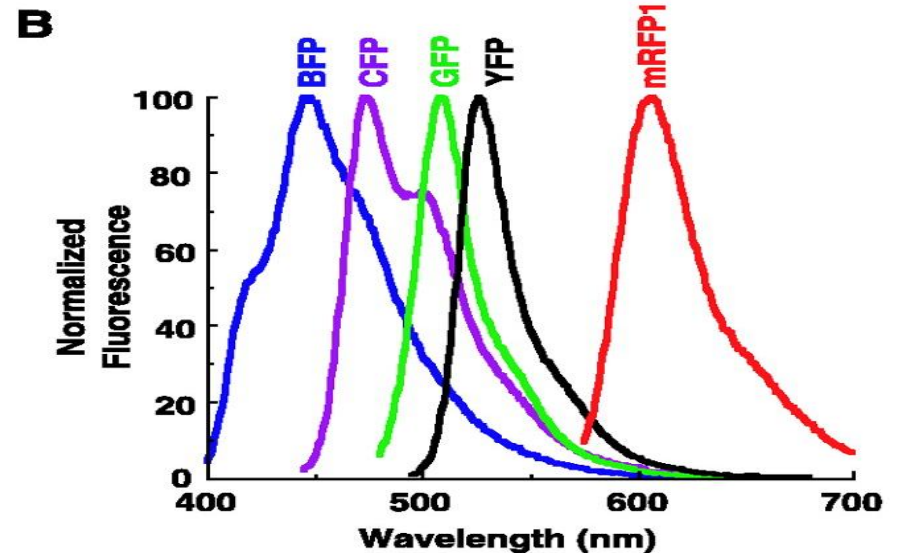
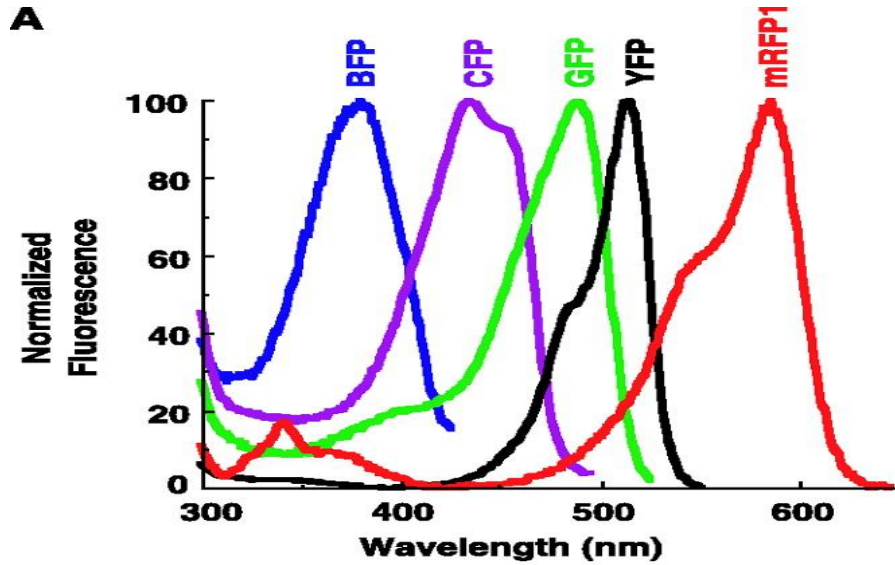


TYR je nahrazen imidazolem (tzv. class 6)

383 nm → 447 nm

modrá luminiscence – BFP (Blue Fluorescent Protein)

Jiné varianty GFP

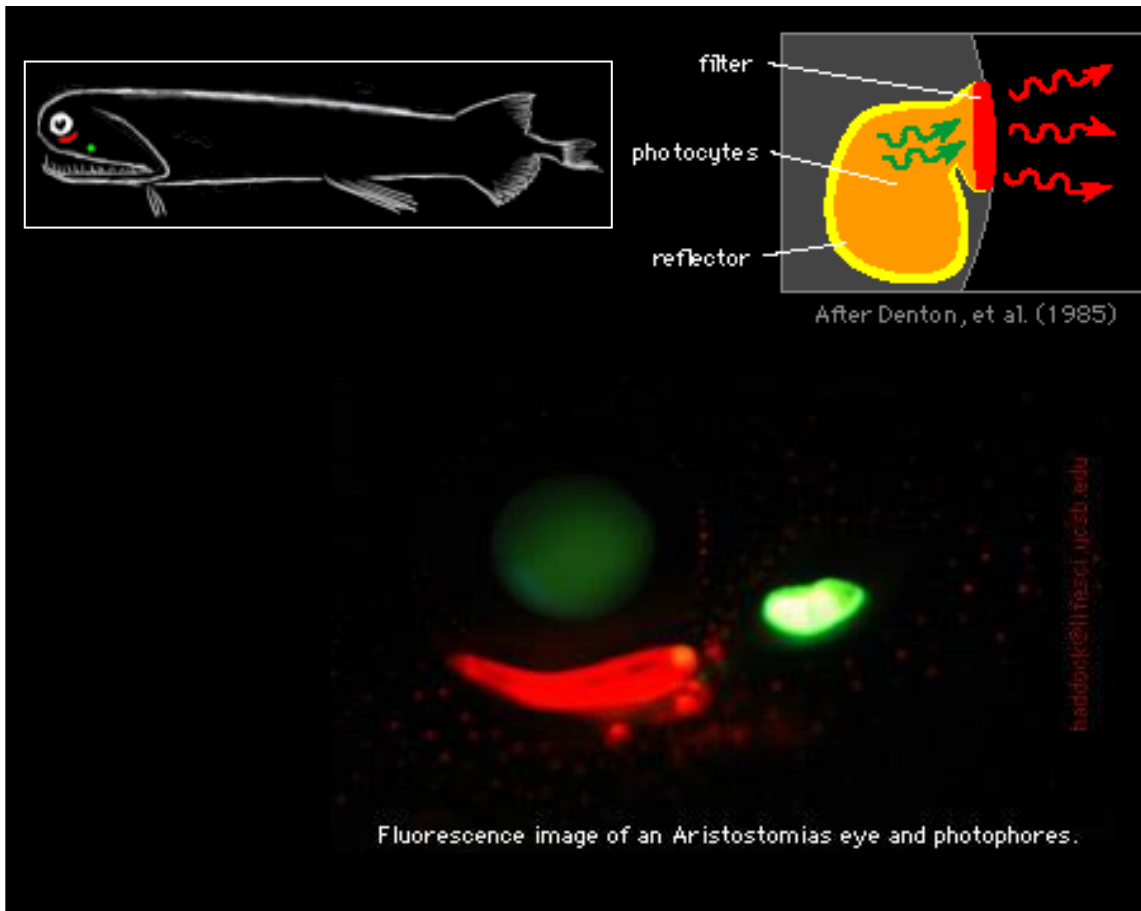


Červená bioluminiscence

- 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

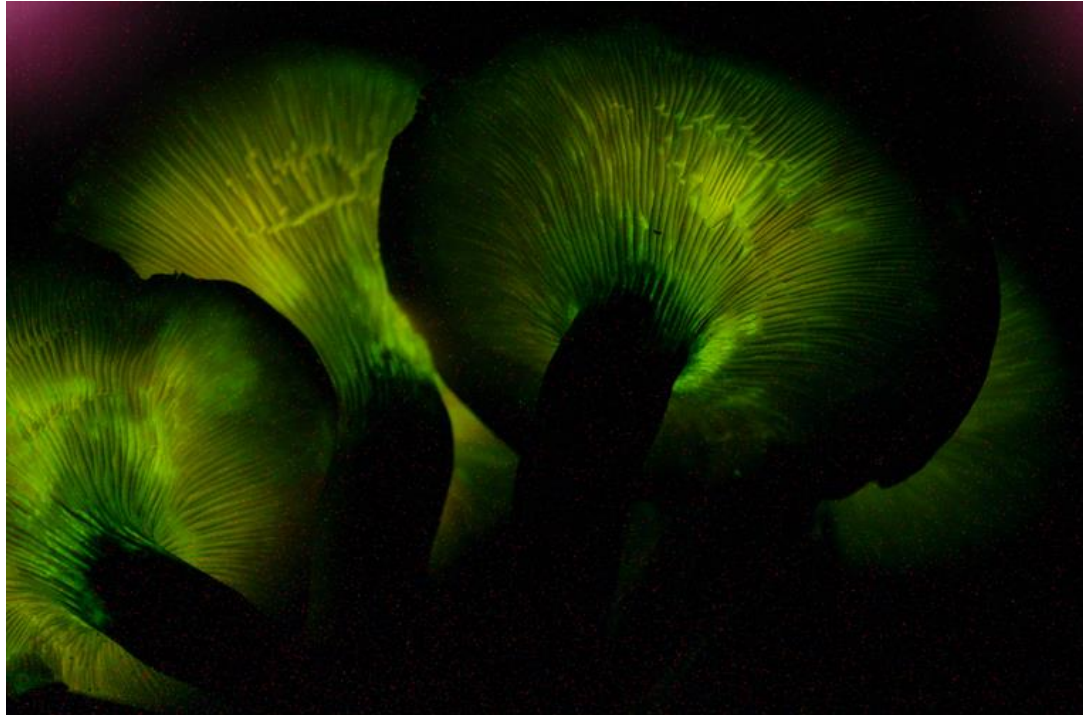
Červená bioluminiscence ryby

Malacosteus



Energie vzniklá chemickou reakcí je kaskádovitě 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.

Bioluminiscenční houby

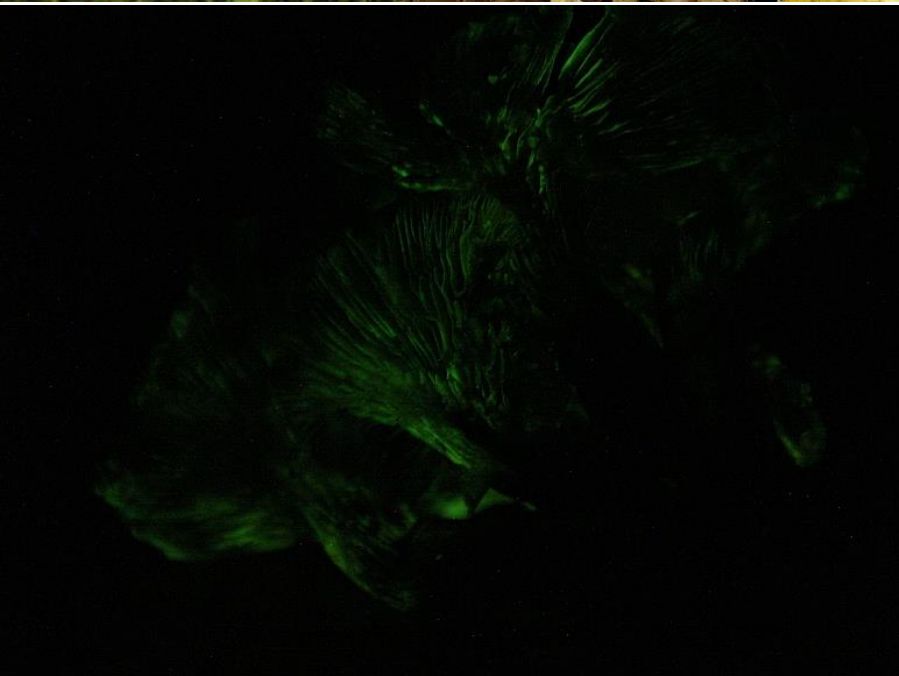


- známo je asi 70 druhů hub jevících bioluminiscenci
- některé rostou i v ČR (václavky a helmovky)
- nejčastěji dřevokazné houby
- někdy není jasné jaký má produkce světla pro houbu význam...

Omphalotus olearius - Hlíva olivová

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





Panellus stipticus – pařezník obecný, pňovka 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*