

Photo- und Magnetobiologie 15

Lumineszenz

Moleküle, die durch Lichtabsorption in einen angeregten Zustand gelangen, können die Energie des S_1 oder T_1 -Zustandes durch Emission von Photonen abgeben. Photonenemission vom S_1 -Zustand wird als Fluoreszenz, Photonenemission vom T_1 -Zustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Moleküle können nicht nur durch Licht sondern auch durch chemische Energiezufuhr in einen angeregten Zustand überführt werden. Wird die Energie des Anregungszustandes in Form von Photonen emittiert, spricht man von Lumineszenz (Abb. 1). Je nachdem, ob Lumineszenz in vitro oder aber in vivo auftritt, spricht man von Chemi- bzw. von Biolumineszenz; die physikalischen Prinzipien sind dieselben. Da Lumineszenz ebenso wie die Fluoreszenz vom S_1 -Zustand aus abläuft, sind die entsprechenden Emissionsspektren gleich.

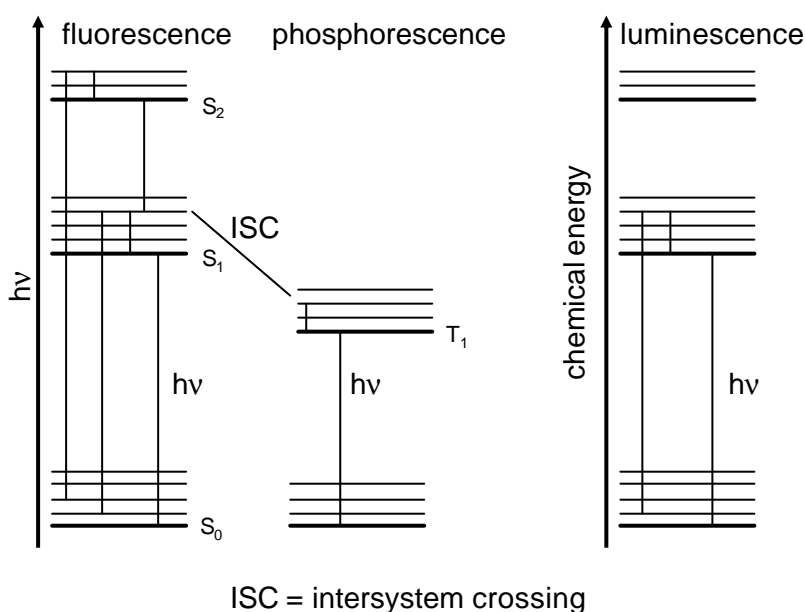


Abb. 1 Elektronische Übergänge, die für Lichtemission von Molekülen verantwortlich sind.

Bei der Biolumineszenz werden organische Moleküle, sogenannte Luciferine, typischerweise durch ATP und Sauerstoffzufuhr in energiereiche Zwischenprodukte überführt, die ihre Energie in Form von Photonen abgeben. Der Vorgang wird durch Enzyme, Luciferasen, katalysiert. In der Natur sind zahlreiche Luciferine und dazugehörige Luciferasen bekannt, die weitgehend nach folgendem Prinzip, arbeiten:

- (i) Luciferin + Luciferase + ATP ? Luciferyl-Adenylat-Luciferase + PP
- (ii) Luciferyl-Adenylat-Luciferase + O₂ ? Oxoluciferin + Luciferase + AMP + hv -ΔG₀

Luciferin und Luciferase bilden unter ATP-Verbrauch einen Komplex, der mit Sauerstoff reagiert. Das Luciferin wird in ein Oxoluciferin überführt, das ein energiereiches Intermediat darstellt, das Energie in Form von Photonen abgibt. Die Reaktion ist exergonisch, d.h. die ursprünglich als ATP zugeführte chemische Energie wird in Form von Photonen frei gesetzt. Die Energieausbeute liegt bei etwa 95%, ein Wert, der ausgesprochen hoch ist. Bei einer

Glühbirne liegt die Energieausbeute bei etwa 5-10%, d.h. der größte Teil der elektrischen Energie wird in Form von Wärme, nicht aber als Licht abgegeben. Man spricht daher bei der Biolumineszenz auch von „kaltem“ Licht.

Bakterielle Biolumineszenz

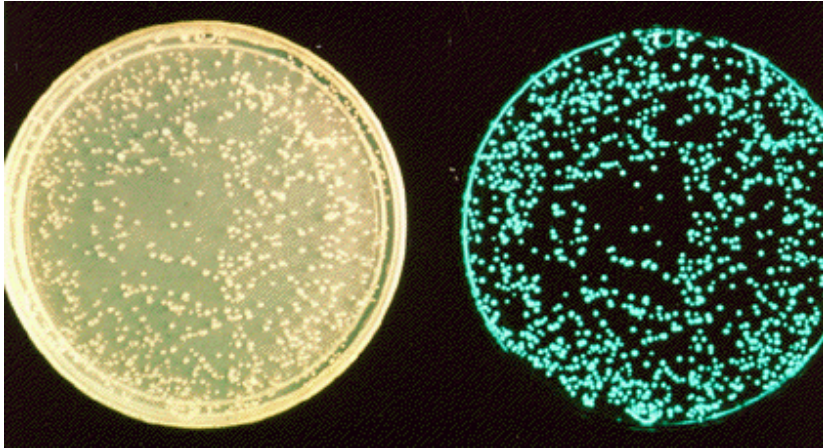


Abb. 2 Lumineszierende Bakterien. Links im Tageslicht, rechts in Dunkelheit.

Bekannte lumineszierende Bakterien sind *Photobacterium luminescens*, *Vibrio harveyi* und *Vibrio fischeri*. Diese Organismen lumineszieren kontinuierlich und nicht in kurzen Lichtpulsen wie z.B. die Glühwürmchen oder Dinoflagellaten. Bei lumineszierenden Bakterien ist das Luziferin FMNH_2 , das aus dem metabolischen pool von FMN/FMNH_2 bereitgestellt wird (Abb. 3). Für die Oxidation von FMNH_2 werden O_2 , aliphatische Aldehyde (RCHO) und ATP gebraucht (Abb. 3).

Der erste Schritt der katalytischen Reaktion ist die Bildung eines stabilen Intermediats, dem Luciferase-gebundenen Flavinhydroperoxid (Abb. 4). In einem nachfolgenden Schritt reagiert ein langkettiger Aldehyd (RCHO), um ein Peroxyhemiacetal E^*FOOH zu bilden (Abb. 4). Das Licht-emittierende Molekül ist das 4a-Hydroxyflavin (Quantenausbeute = 0.3 pro FMNH_2).

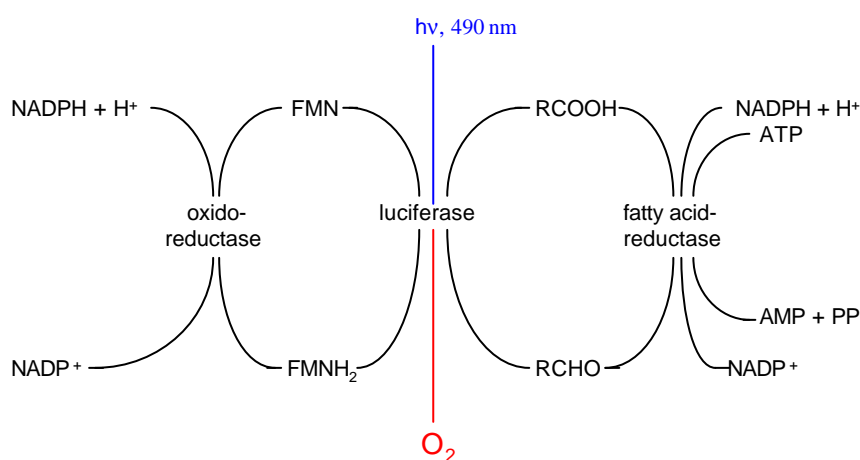


Abb. 3 Bakterielle Biolumineszenz. Übersicht.

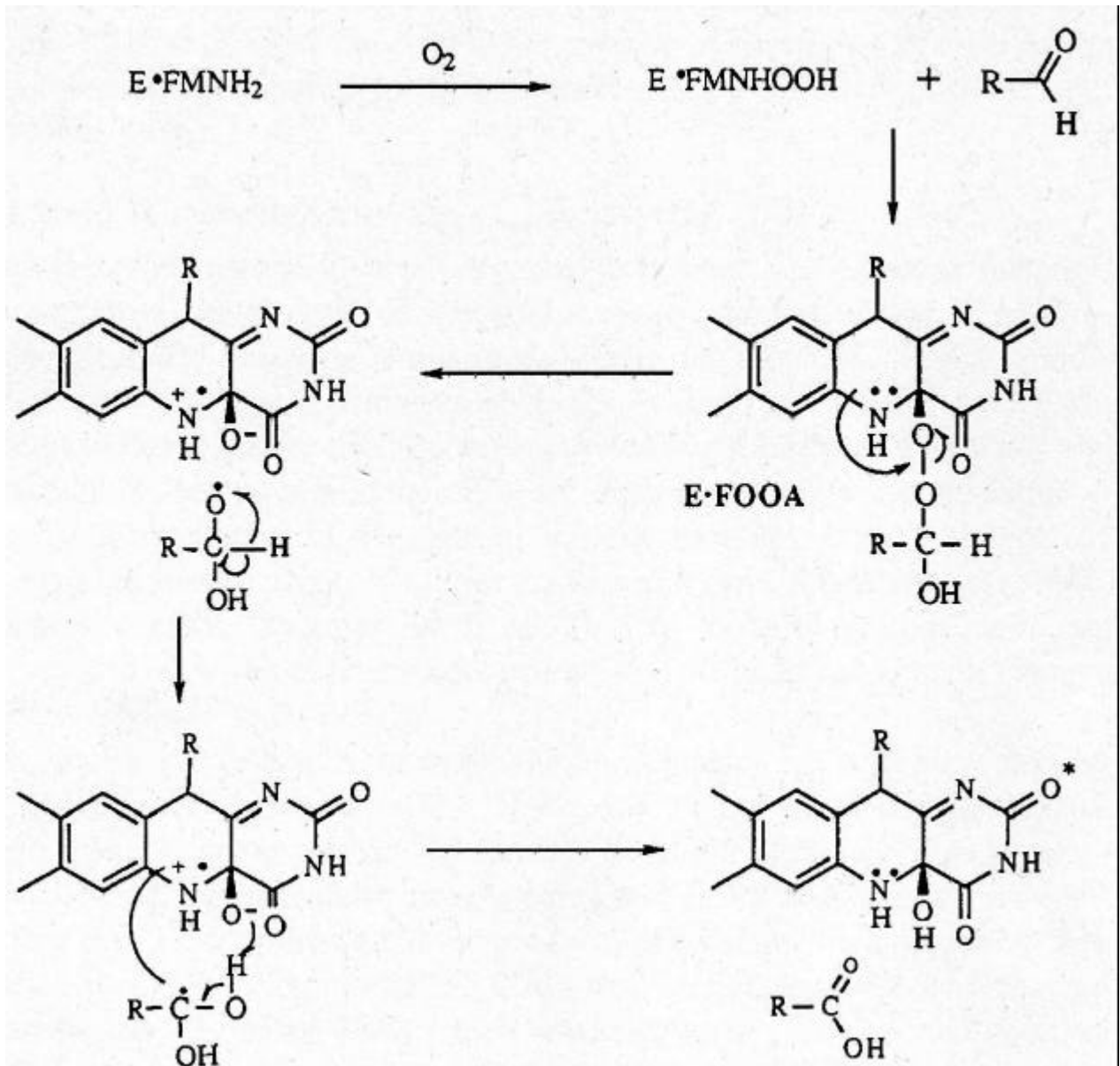


Abb. 4 Bakterielle Biolumineszenz. Strukturformel von FMNH₂ und Intermediate (Wilson und Hastings 1998)

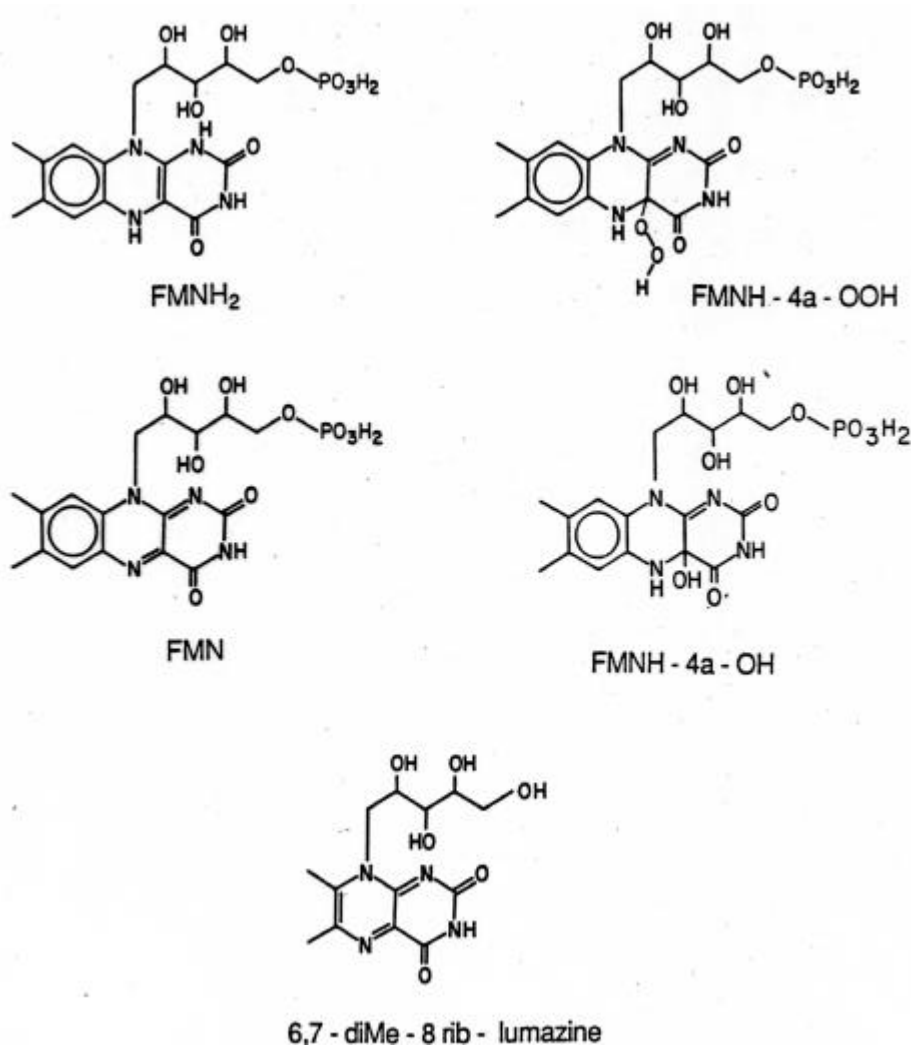


Abb. 5 Strukturformeln der Moleküle, die an der Biolumineszenz lumineszierende Bakterien beteiligt sind.

Bakterielle Luciferasen sind Heterodimere, die aus einer α - (≈ 40 kDa) und einer β -Untereinheit (≈ 35 kDa) bestehen. Sie werden von den Genen *luxA* und *luxB* kodiert, die beide im *Lux*-Operon nebeneinander liegen.

Autoinduktion

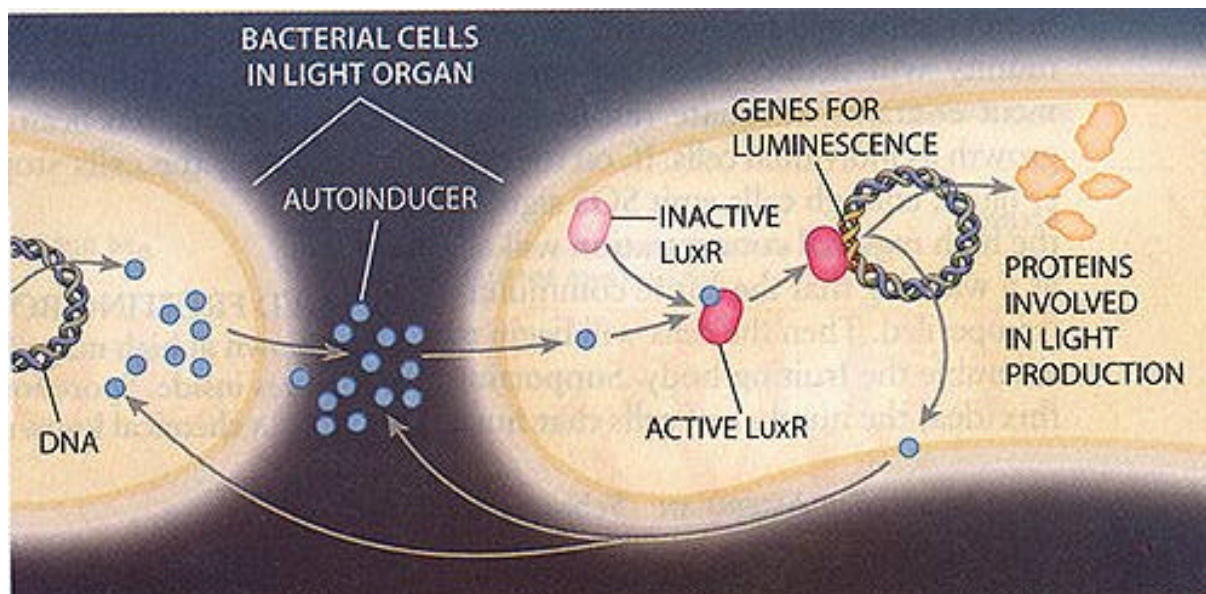


Abb. 6 Sensormoleküle (autoinducer) regulieren die Transkription des *Lux*-Operons. Der Autoinduktor bindet an das *Lux-R*-Protein, wodurch dieses aktiviert wird und die Transkription ermöglicht.

Biolumineszierende Bakterien können als Symbionten in Leuchtorganen anderer Tiere vorkommen, z.B. in Laternenfischen, die das Leuchtorgan wie eine Laterne tragen. In jungen Fischen müssen diese Leuchtorgane durch die lumineszierenden Bakterien neu besiedelt werden. Damit es überhaupt zu einer Induktion des *Lux*-Operons kommt, wird in geringen Mengen ein Sensormolekül (= Autoinduktor, N-Acyl-Homoserinlacton, = HSL), synthetisiert. Für die Synthese dieses Autoinduktors ist das *luxI*-Gen notwendig. Sind Bakterien an einem Ort konzentriert, wie z.B. in einem Leuchtorgan eines Fisches, wird eine kritische Konzentration des Autoinduktors überschritten, sodass es zur Induktion des *Lux*-Operons und somit auch zur Expression der Luciferase kommt. HSL stellt also einen Mechanismus dar, durch den die Bakterien ihre eigene Konzentration messen können (quorum sensing). Dieser Mechanismus bewirkt, dass frei schwimmende Bakterien das *Lux*-Operon nicht exprimieren, denn der Autoinduktor wird unter diesen Bedingungen verdünnt und unterschreitet somit die kritische Konzentration.

Antennenproteine

Das Emittermolekül ist ein Luciferase-Hydroxyflavin-Intermediat (Abb. 4, 5), das Licht der Wellenlänge 490 nm emittiert. Obwohl das Emittermolekül bei 490 nm sein Maximum hat, zeigen manche lumineszierende Bakterien ein Emissionsmaximum bei anderen Wellenlängen, d.h. es kann eine hypsochrome oder aber bathochrome Verschiebung vorliegen. Dies wird durch Antennenproteine bewirkt, die mit der Luciferase assoziiert sind. In *Photobacterium phosphoreum* liegt der Lumineszenzmaximum bei 480 nm; bei *Vibrio fischeri* dagegen bei 540 nm. Die Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen wird durch ein Antennenprotein bewirkt, das ein Lumazin (Abb. 5) bindet; die Verschiebung zu längeren Wellenlängen wird durch Antennenproteine mit Flavin als Chromophor bewirkt. Die Antennenproteine erhalten Anregungsenergie von der Luciferase mit dem Primäremitter 4a-Hydroxyflavin (Abb. 5); sie übertragen diese Energie via Förster-Transfer auf die eigenen Emittermoleküle, die dann lumineszieren.

Biolumineszenz von Dinoflagellaten

Dinoflagellaten der Gattung *Ceratium* und *Gonyaulax* (Abb. 7, 8) sind häufig für Meeresleuchten verantwortlich. Sie sind ubiquitär und sowohl im Salz- als auch im Brackwasser anzutreffen.

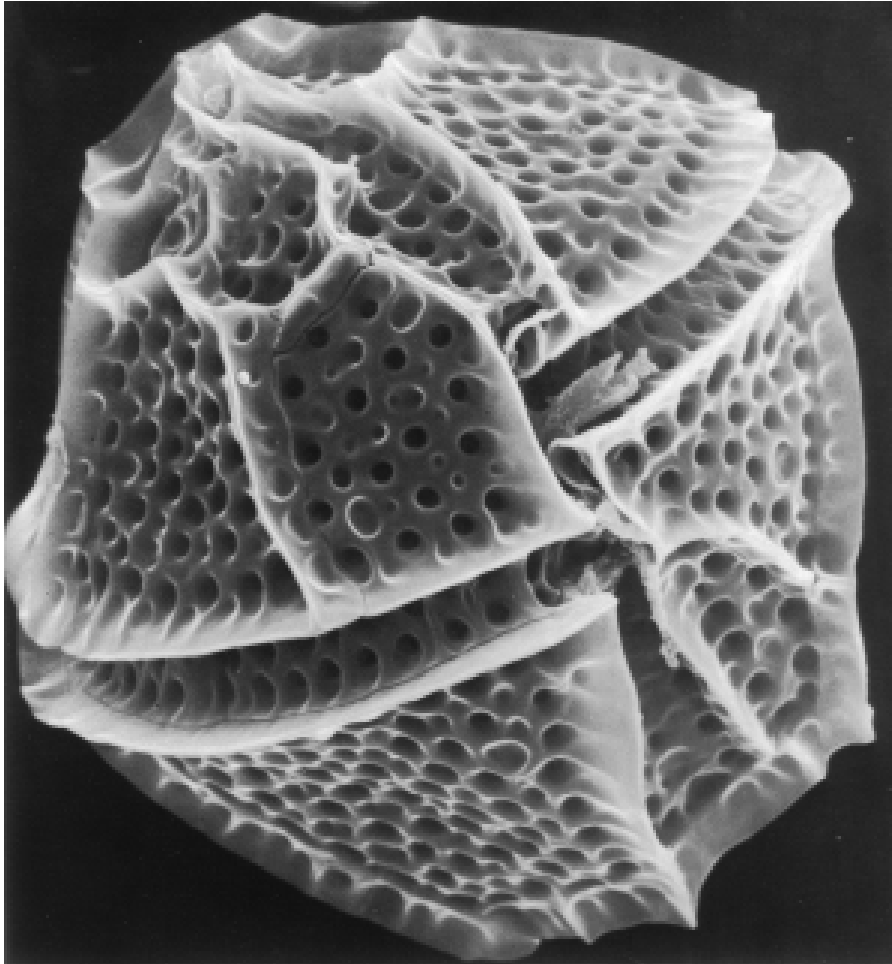


Abb. 7 *Gonyaulax polyedra*

Dinoflagellaten besitzen pro Zelle etwa 400 kleine lumineszierende Organellen, sogenannte Scintillone (Abb. 9). Dies sind kleine sphärische Luciferase enthaltende Vesikel, die in die Vakuole hineinragen. Aktionspotentiale an der Vakuolenmembran lösen eine Öffnung von Protonenkanälen aus, was zu einer transienten pH-Änderung in einem Scintillon führt und damit zu einer kurzen Emission von Licht (= Lichtblitz) (Abb. 9). Die Hauptproteine in einem Scintillon sind die Luciferase und das Luciferin-bindende Protein. Eine Ansäuerung von isolierten Scintillonen *in vitro* (pH 6) führt zur Emission eines Lichtblitzes. Der Lichtblitz verbraucht Luciferin, ein offenkettiges Tetrapyrrol, das wahrscheinlich vom Chlorophyll abstammt (Abb. 10). Eine Neubeladung der Scintillone mit Luciferin aktiviert diese erneut.



Abb. 8 *Pyrocystis fusiformis*, ein Dinoflagellat. Biolumineszenz.

Mechanismus der Biolumineszenz der Dinoflagellaten

Biolumineszenz wird in Dinoflagellaten durch verschiedene Reize ausgelöst:

- (i) mechanische Stimulierung, wie z.B. Scherkräfte, Wasserwellen, brechende Wellen, die Bewegung eines Bootes oder eines Fisches. Die Deformation der Zellmembran führt zu kurzen Lichtpulsen, die etwa 10^{-2} Sekunden andauern und 10^8 Photonen frei setzen.
- (ii) chemische Stimulierung wie z.B. Erniedrigung des pH (s.o.).
- (iii) Temperaturwechsel. *Gonyaulax* emittiert Licht, wenn die Temperatur erniedrigt wird.

Einem Lichtblitz eines Scintillons geht ein Aktionspotential am Tonoplasten (die Innenseite wird hyperpolarisiert) voraus (Abb. 9). Das Aktionspotential bewirkt eine Erniedrigung des pHs im Scintillon, sodass Luciferin vom Bindeprotein abgelöst wird und mit der Luciferase interagieren kann. Luciferase kann dann die Oxidation des Luciferins katalysieren; es kommt zur Bildung von Oxyluciferin und zur Emission eines Photons (474 nm) (Abb. 10). ATP wird benötigt, um Luciferin zu regenerieren.

Das Luciferin der Dinoflagellaten ist sehr empfindlich gegen Autooxidation, die unterbunden werden muss (Abb. 10). Das Luciferin-bindende Protein (LBP) ist ein Dimer, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht (75 kDa). Es bindet Luciferin und schützt es damit vor einer Autooxidation. Wenn im Scintillon der pH auf einen Wert von 6 absinkt, löst sich das Luciferin und wird somit für die Luciferase zugänglich. Die Luciferase (137 kDa) ist bei pH 8 inaktiv; das Enzym wird aber bei pH 6 aktiv, d.h. genau bei dem pH, bei dem das LBP das Luciferin frei setzt

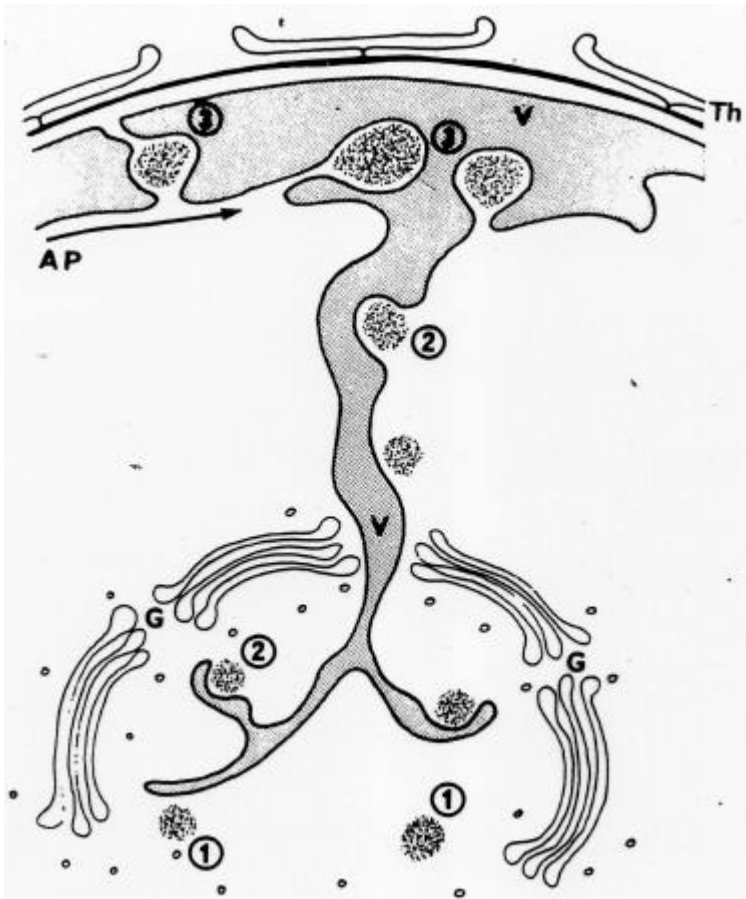


Abb. 9 Entstehung von Scintillonen in Dinoflagellaten. Vorläuferorganellen (1) bilden sich im Cytoplasma im Bereich des Golgi-Apparates (G). Sie machen Kontakt (2) mit der Vakuole (V) und wandern gleichzeitig zur Zellperipherie (3). Reife Scintillone machen ausserdem Kontakt mit dem Tonoplasten (3) und dringen dabei in den Vakuolenraum ein (3). Wird am Tonoplasten ein Aktionspotential (AP) ausgelöst, z.B. durch mechanische Reizung, so könnte das einen Einstrom von Protonen in die Scintillone auslösen, was den pH erniedrigt und somit einen Lichtblitz auslöst. Die Biolumineszenz der Dinoflagellaten besteht aus kurzen intensiven Lichtpulsen und ausserdem aus einer schwachen kontinuierlichen Hintergrundlumineszenz (Abb. 13).

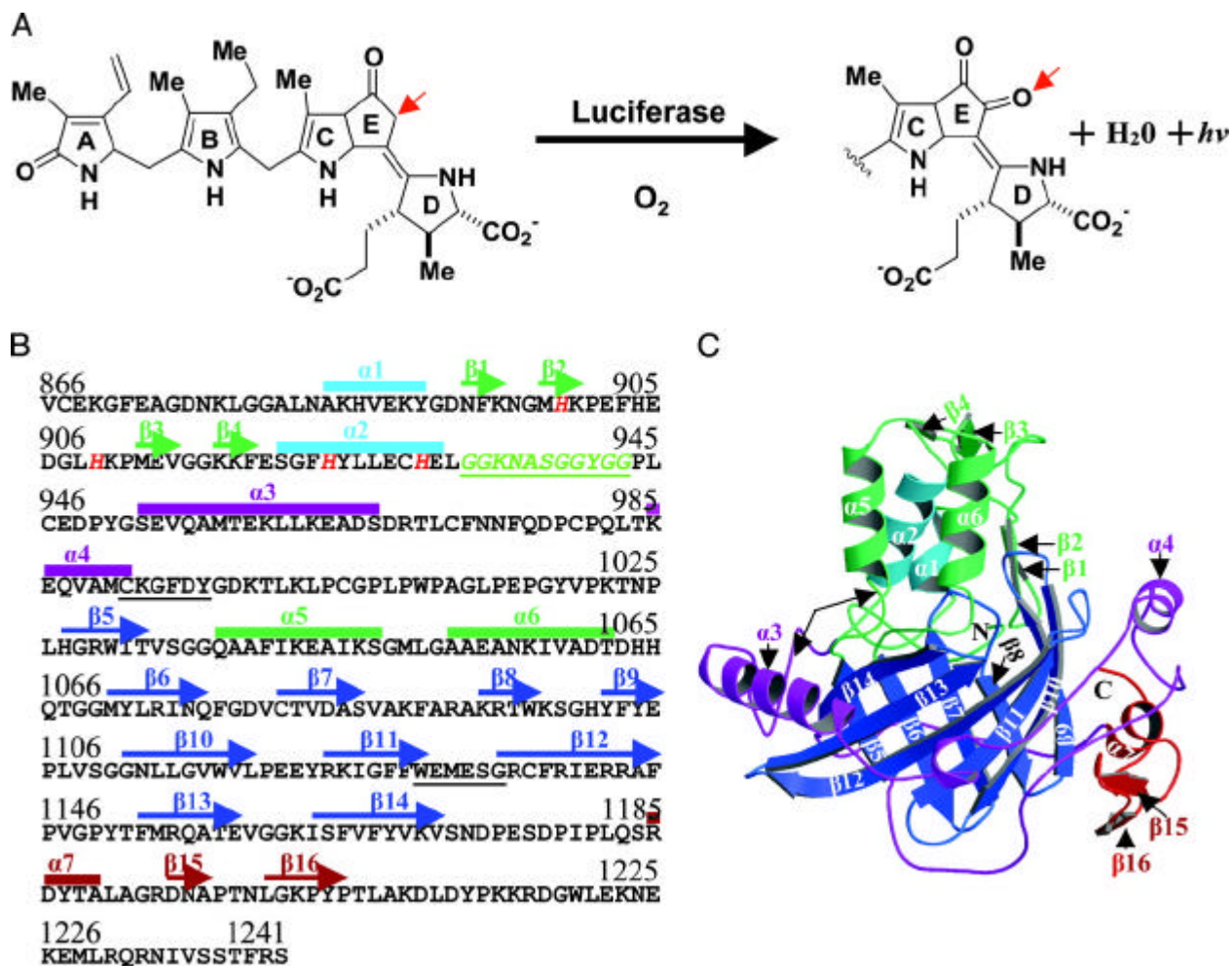


Abb. 10 Luciferin und Luciferase von *Gonyaulax polyedra*. Es wird blaues Licht (474 nm) emittiert.

Endogene Rhythmik

Die Biolumineszenz von Dinoflagellaten ist unter der Kontrolle einer Inneren Uhr (endogener Rhythmus) (Abb. 11, 12). Die stärkste Aktivität tritt Nachts auf. Am Ende der Nachtphase werden in *Gonyaulax* sowohl das Luciferin-bindende Protein als auch die Luciferase abgebaut. Bei Beginn des nächsten Zyklus werden sie neu synthetisiert. Auch die Scintillone selber unterliegen diesem Abbau und müssen bei Beginn der Lumineszenzphase neu synthetisiert werden. Auf- und Abbau der Luciferase und des Luciferin-bindenden Proteins werden auf der Ebene der Translation reguliert. Während des Tag-Nacht-Rhythmus bleibt die mRNA der beiden Gene konstant.

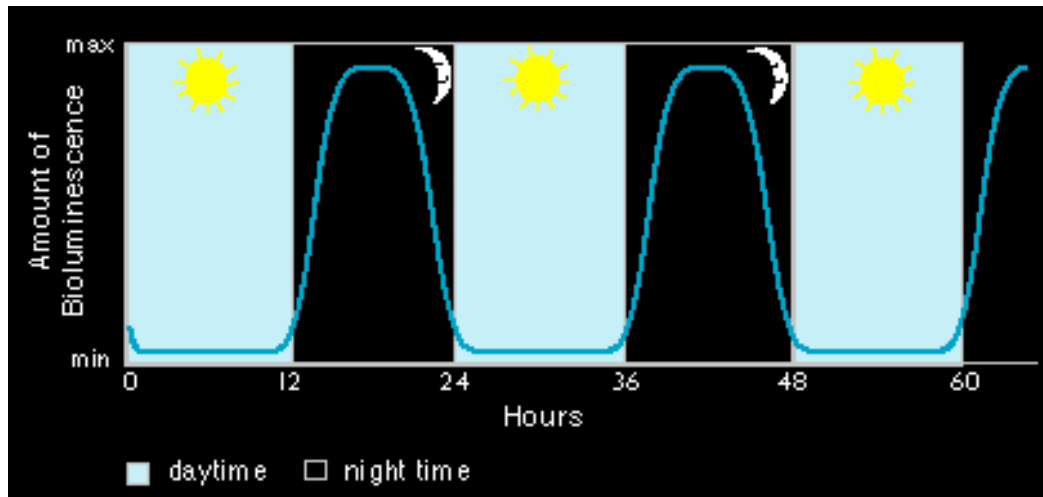


Abb. 11 Endogener Rhythmus der Biolumineszenz von Dinoflagellaten

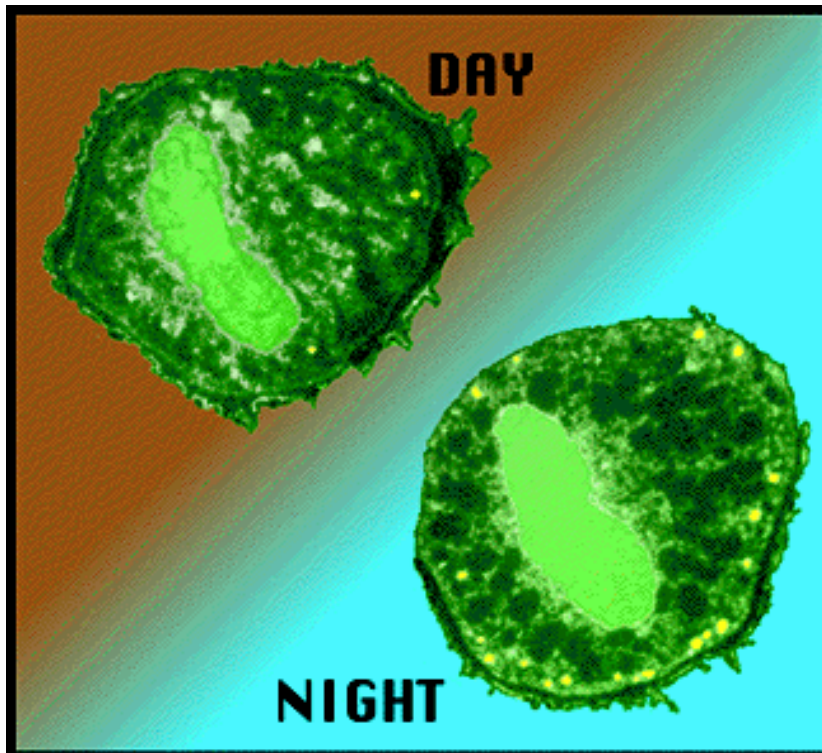


Abb. 12 Falschfarbendarstellung eines Dinoflagellaten. Gelbe Punkte in der Nachtphase sind Scintillone, lichtemittierende Organellen. Image Prof. Larry Fritz (Northern Arizona University).

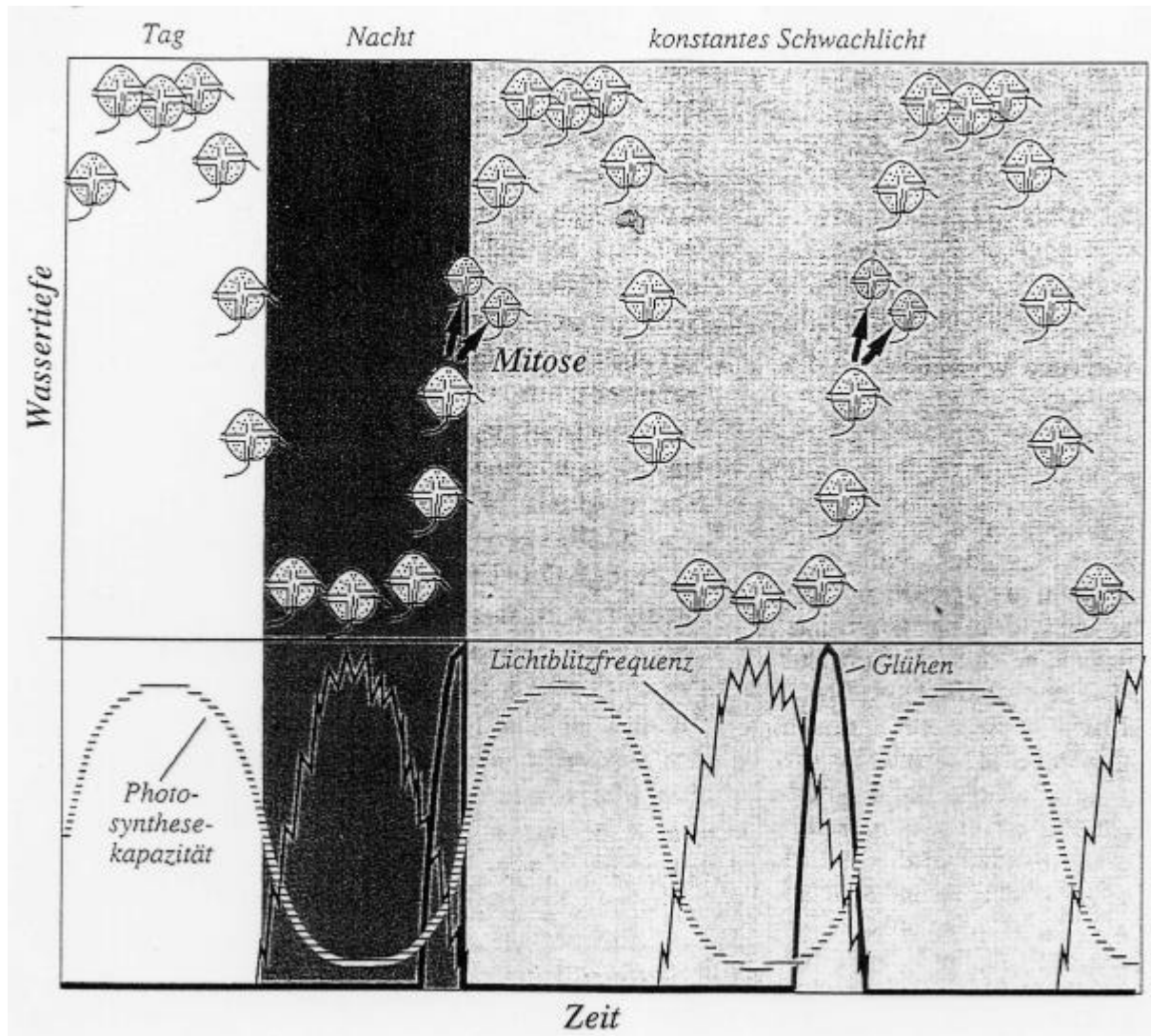


Abb. 13 Endogene Rhythmik des Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra*. Vor Tagesbeginn wandern die Zellen an die Wasseroberfläche. Zu diesem Zeitpunkt steigt die Mitoserate. Die Photosyntheserate ist ebenfalls rhythmisch und fällt unter Konstantbedingungen in die Tagesphase. Während der Nacht ist Biolumineszenz zu beobachten, die in zwei Formen auftritt: Lichtblitze während der Nacht und Basisglühen während des Nacht-Tag-Überganges. Roenneberg und Morse 1994.

Unter konstantem Schwachlicht zeigt *Gonyaulax* einen frei laufenden Rhythmus (Abb. 13). Macht man solche Versuche anstatt unter schwachem Weisslicht, wie in Abb. 13 dargestellt ist, unter monochromatischem Licht, so zeigt sich, dass die Periodenlänge von der Wellenlänge des Lichtes abhängt (Abb. 14). Kurzwelliges Licht bewirkt eine Verkürzung, langwelliges Licht dagegen eine Verlängerung der Photoperiode (Abb. 14). Aus solchen Versuchen kann man folgern, dass mehr als nur ein einziger Photorezeptor die Photoperiode kontrolliert.

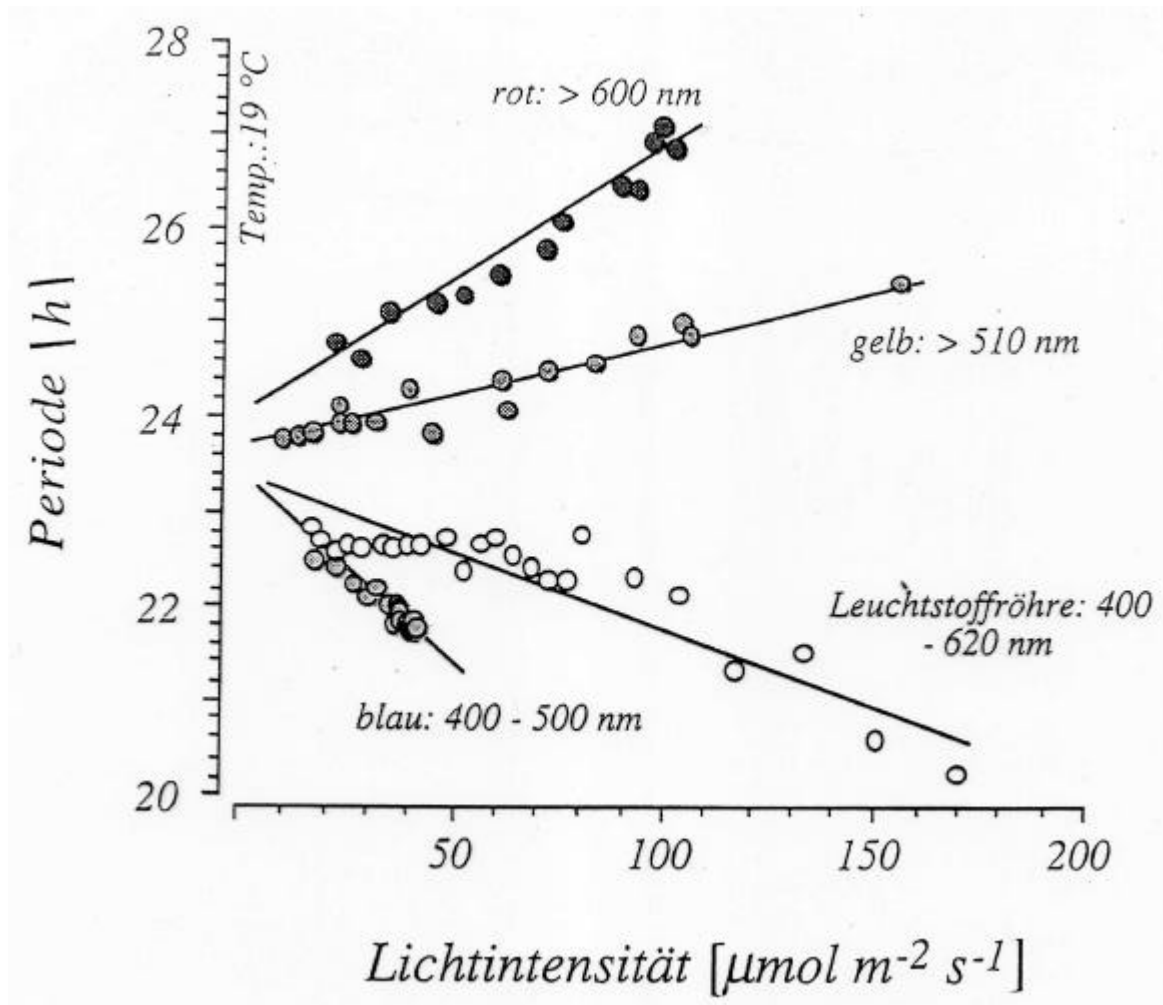


Abb. 14. Abhängigkeit der Periodenlänge der Biolumineszenz in *Gonyaulax* von der Wellenlänge. Roenneberg und Morse 1994.

Biolumineszenz bei Garnelen

Das Luciferin Vargulin wird von lumineszierenden Garnelen der Gattung *Vargula* synthetisiert (Abb. 15). Manche Fische, die diese Garnelen fressen, nehmen mit diesen das Vargulin auf und verwenden es ihrerseits für Biolumineszenz.

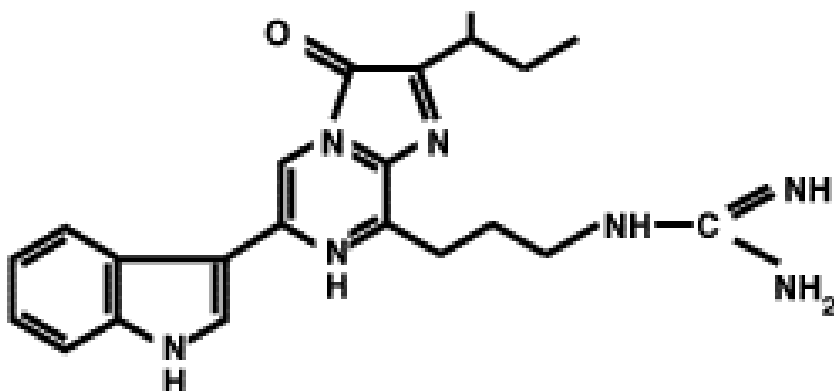


Abb. 15 Vargulin, Luciferin bei Garnelen der Gattung *Vargula*.

Biolumineszenz der Glühwürmchen

Das Luciferin der Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) und seiner etwa 2000 Leuchtkäfer-Verwandten ist ein Benzothiazolderivat. Es wird durch die Luciferase mit MgATP adenyliert und durch Sauerstoff oxidiert (Abb. 16). Die Emission von Photonen kann für die Quantifizierung von ATP eingesetzt werden.

Die Weibchen besitzen verkümmerte Flügel und haben Ähnlichkeit mit einer Käferlarve. Ihr Leuchtorgan liegt am hinteren Körperende und enthält spezialisierte lumineszierende Zellen sowie einen Reflektor.

Das Leuchtorgan enthält neben durchsichtigen Zellen („Fenster“) eine Reflektorschicht, die das Lumineszenzlicht nach aussen abstrahlt. In der Mitte sind Leuchtzellen mit zahlreichen Mitochondrien, die die ATP-Versorgung übernehmen. Die flugunfähigen Weibchen sitzen am Boden und machen sich den Männchen durch Biolumineszenz bemerkbar. Manche Arten von Glühwürmchen strahlen dauerhaft, während andere Lichtpulse abgeben. Die Frequenz und die Wellenlänge der Lichtpulse sind dabei artspezifisch. Die Weibchen mancher Leuchtkäfer-Arten imitieren mit ihren Lichtsignalen andere Arten, locken so deren Männchen an und fressen sie, wenn sie eines habhaft werden.

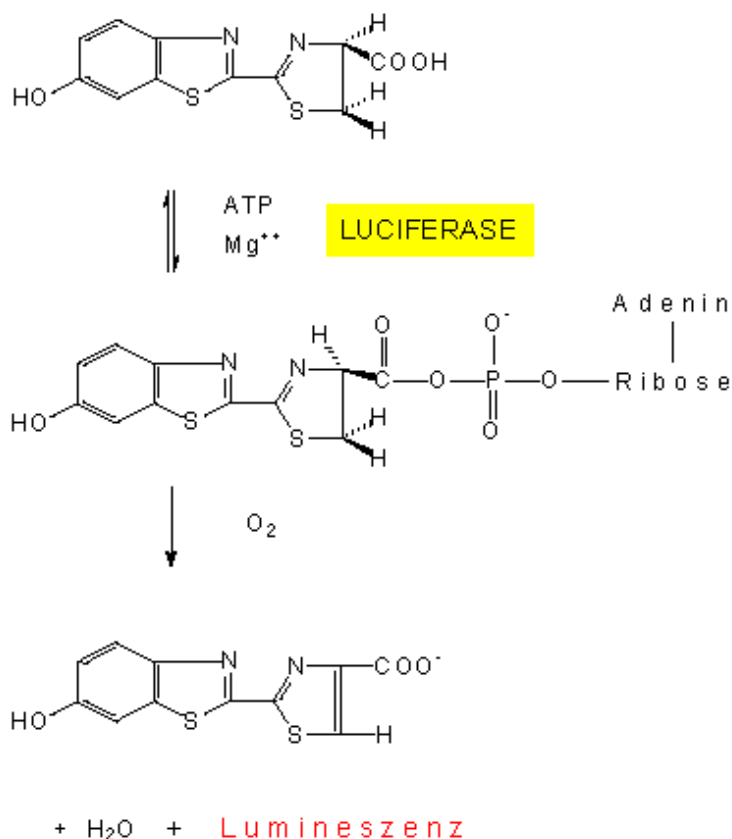


Abb. 16. Luciferase und Luciferin des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*)