

Bakteriální bioluminiscence

Ondřej Vašíček

ondrej.vasicek@ibp.cz

Bakteriální bioluminiscence - obsah



Základy bioluminiscence



Historie bioluminiscence



Bioluminiscenční bakterie



Výskyt BL bakterií



Biochemie reakce – *lux* operon

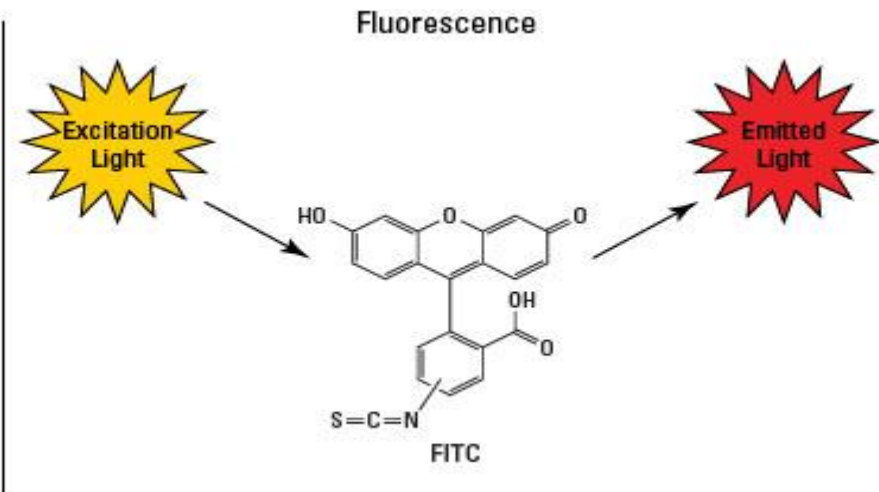
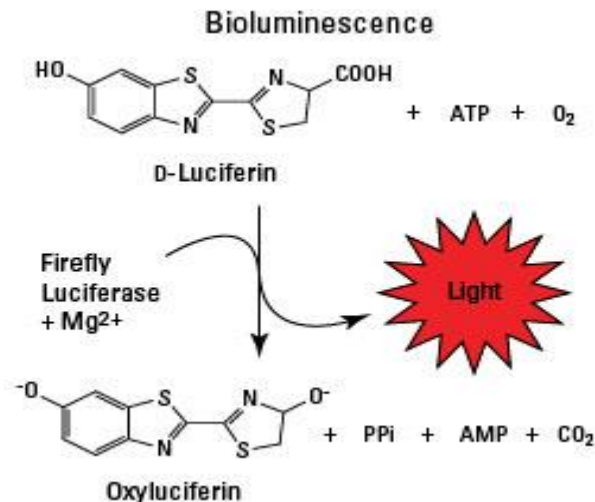


Využití bakteriální luminiscence

Bioluminescence

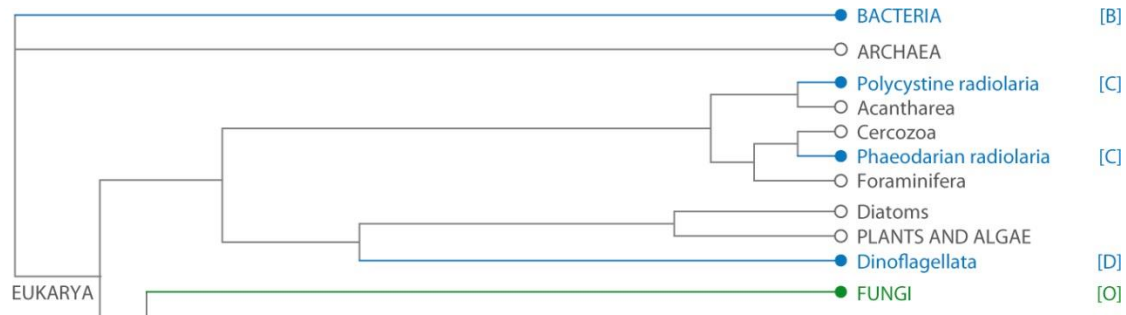
Bioluminescence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

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 – fylogenetické rozšíření

Bioluminescence však je fylogeneticky rozšířený fenomén, který se rozvíjel nezávisle u mnoha živočichů a mikrobů

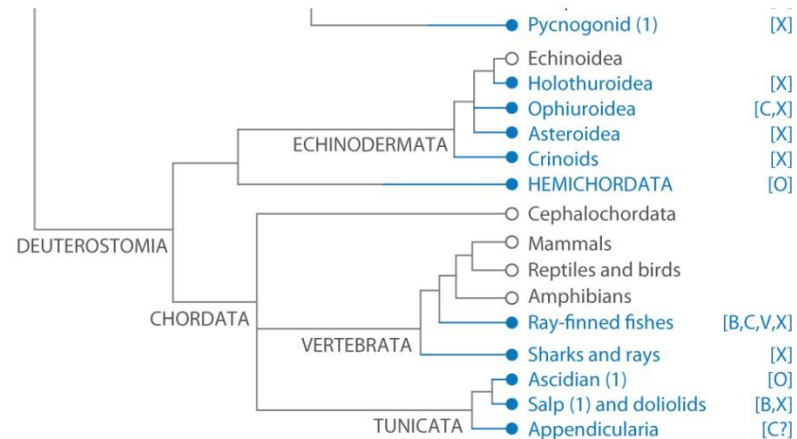


Luciferin type

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

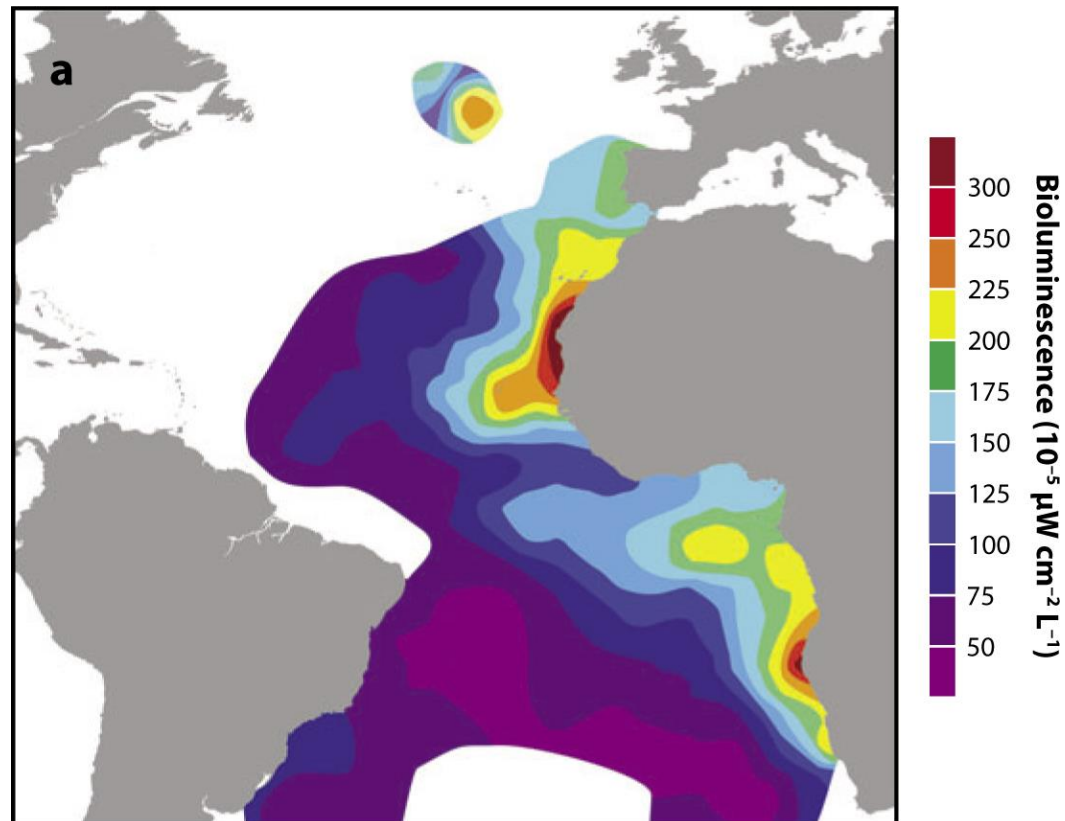
Luminescence and habitat

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



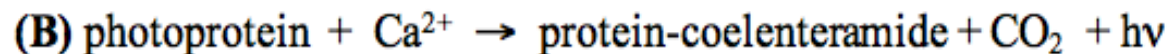
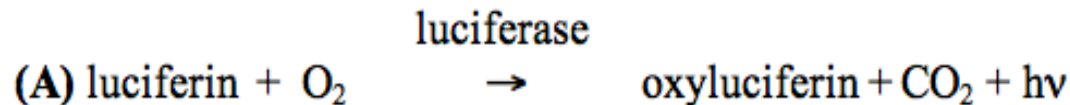
Bioluminescence - rozšíření

Obvyklá hlavně v hlubinách moří, kde obecně všichni živočichové emitují světlo v celém spektru barev

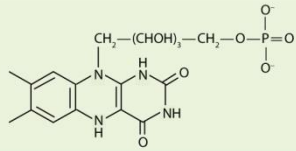


Bioluminescence – charakteristické rysy

1. Probíhá pouze 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 Ca^{2+}).

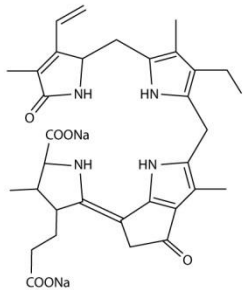


Bioluminescence - spektrum



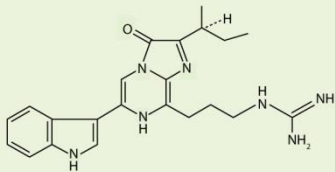
Bacterial
Luciferin + Aldehyde + Luciferase

Bacteria
Some fish
Some squid
Pyrosomes?



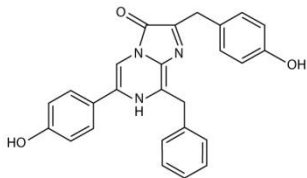
Dinoflagellate
Luciferin + Luciferase

Dinoflagellates
Euphausiid shrimp



Cypridina
Luciferin + Luciferase

Some ostracods
Midshipman fish
Some other fish



Coelenterazine
Luciferin + Luciferase
Photoprotein

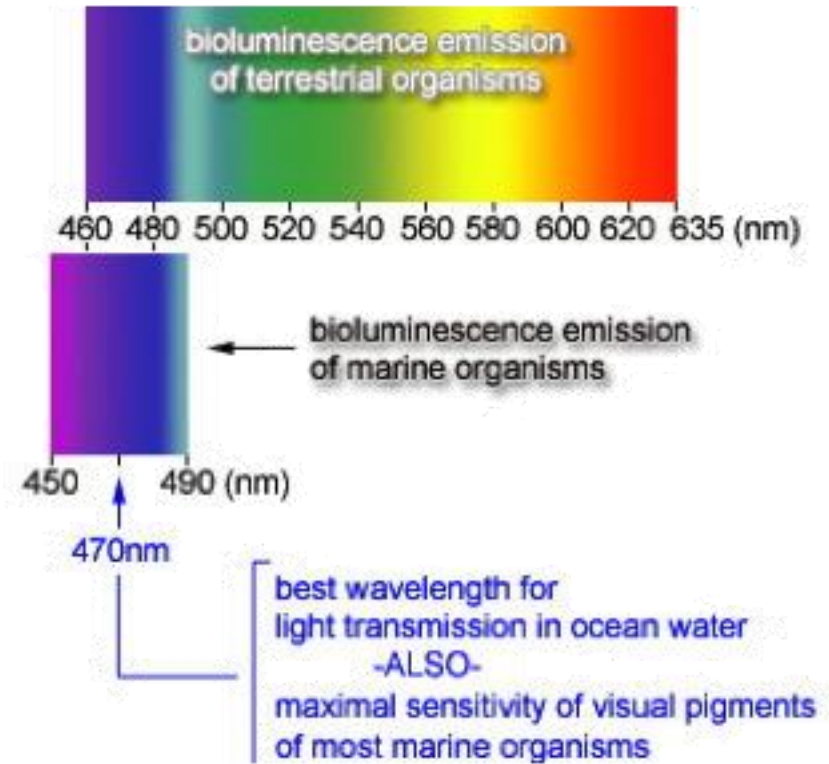
Radiolarians
Ctenophores
Cnidarians
Squid
Some ostracods
Copepods
Decapod shrimp
Mysid shrimp
Some ophiuroids
Chaetognaths
Larvaceans
Some fish



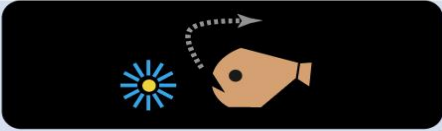
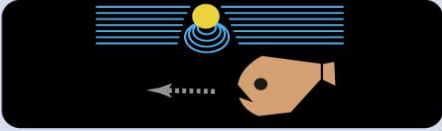




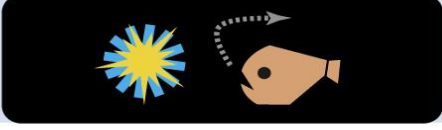
Other or unknown mechanism
Luciferin + Luciferase
Photoprotein
? + ?

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

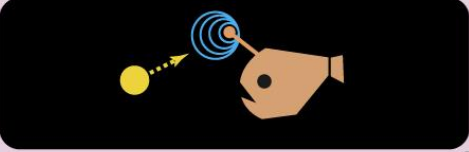
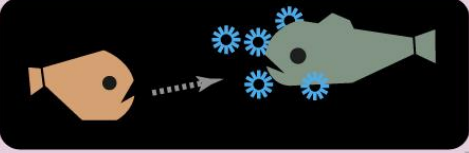


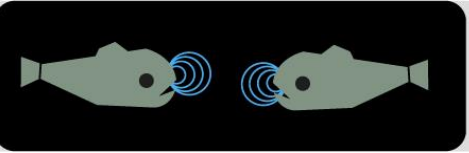


Predator



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 – historické milníky

1947 The energy source for bioluminescence in an isolated system. W.D. McElroy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 33: 342-345. Adenosine triphosphate (ATP) is an essential requirement for the in vitro reaction of firefly bioluminescence.

1953 The requirement of riboflavin phosphate for bacterial luminescence. W.D. McElroy, J.W. Hastings, V. Sonnefeld, and J. Coulombre. Science 118: 385-386. Reduced flavin mononucleotide (FMNH₂) is one essential requirement being reduced by NADH.

1954 Isolation, identification, and function of long chain fatty aldehydes affecting the bacterial luciferin-luciferase reaction. B.L. Strehler and M.J. Cormier. J. Biol. Chem. 211: 213-225.

1955 Crystalline firefly luciferase. A.A. Green and W.D. McElroy. Biochim. Biophys Acta 20: 170-176. Firefly luciferase was purified as a protein with a mass around 100 kDa.

1961 The structure and synthesis of firefly luciferin. E.H. White, F. McCapra, G. Field, and W.D. McElroy. J. Amer. Chem. Soc. 85: 337-343.

1962 Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the hydromedusan, Aequorea. O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y. Saiga. J. Cell. Comp. Physiol. 59: 223-239. Aequorin was named a "photoprotein", as it required only Ca²⁺ and not oxygen for light emission.

Bioluminescence – historické milníky

1965 Cypridina bioluminescence. Structure of Cypridina luciferin. Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura, and F. H. Johnson. Tetrahedron Lett. No. 29, 3427-3436.

1969 Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. E.H. White, E. Rapaport, T.A. Hopkins, and H.H. Seliger. J. Amer. Chem. Soc. 91; 2178-2180. A red shifted bioluminescence induced by pH attributed to keto-enol tautomerism in the excited state.

1971 Mechanism of luminescent oxidation of *Cypridina* luciferin. O. Shimomura and F.H. Johnson. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 340-346. A dioxetanone intermediate was proposed from product analysis of the reaction using oxygen-18.

1981 The use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. A.A. Bulich and D.L. Isenberg. ISA Trans. 20: 29-33. This technical report was the basis of a patent, which resulted in the widest application of bioluminescence methodology.

1992 Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. D.C. Prasher, V.K. Eckenroad, W.W. Ward, and M.J. Cormier. Gene 111: 229-233. The result of this cloning, and later expression, of GFP was a revolution in biotechnology applications.

Bioluminescence



<https://www.youtube.com/watch?v=oKjFVBVGad0&t=1s>



<https://www.youtube.com/watch?v=9HXXQBz6Vv0>

Bakteriální bioluminiscence

Bakteriální bioluminiscence

Nejvíce se vyskytují v mořské vodě, některé jsou terestrické a sladkovodní.

Rozlišujeme 4 rody:

Vibrio, *Photobacterium*, *Shewanella* a *Photorhabdus*

Vyskytují se jak samostatně, tak v symbióze s hostitelským organismem
- nutný přísun potravy/energie

Některé jsou i parazitické

Bakteriální bioluminiscence - symbióza

Řas mořský (*Lophius piscatorius*, Linnaeus, 1758)

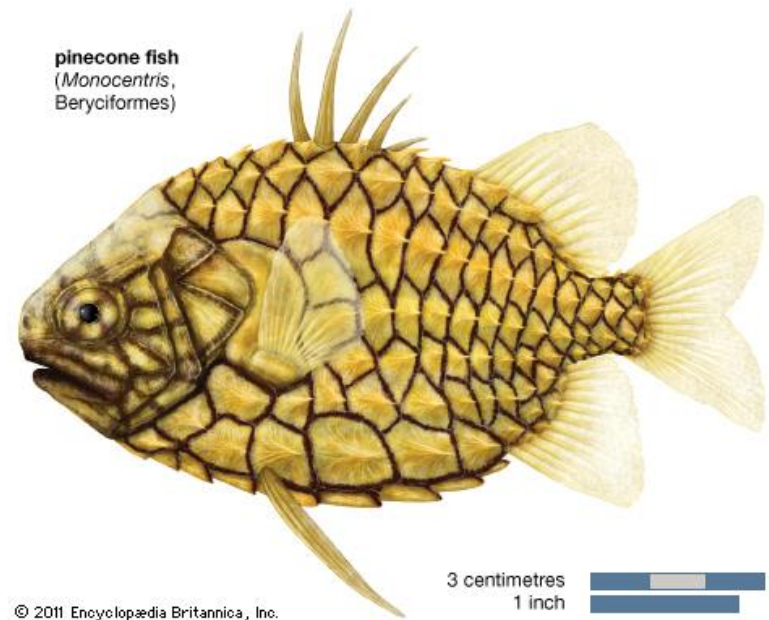
První tři paprsky hřbetní ploutve jsou modifikovány v dlouhé útvary, připomínající tykadla. Na prvním se nachází světélkující útvar, který slouží jako návnada při lovu. Světélkování je zajištěno miliony bioluminiscenčních bakterií.



Bakteriální bioluminiscence - symbióza

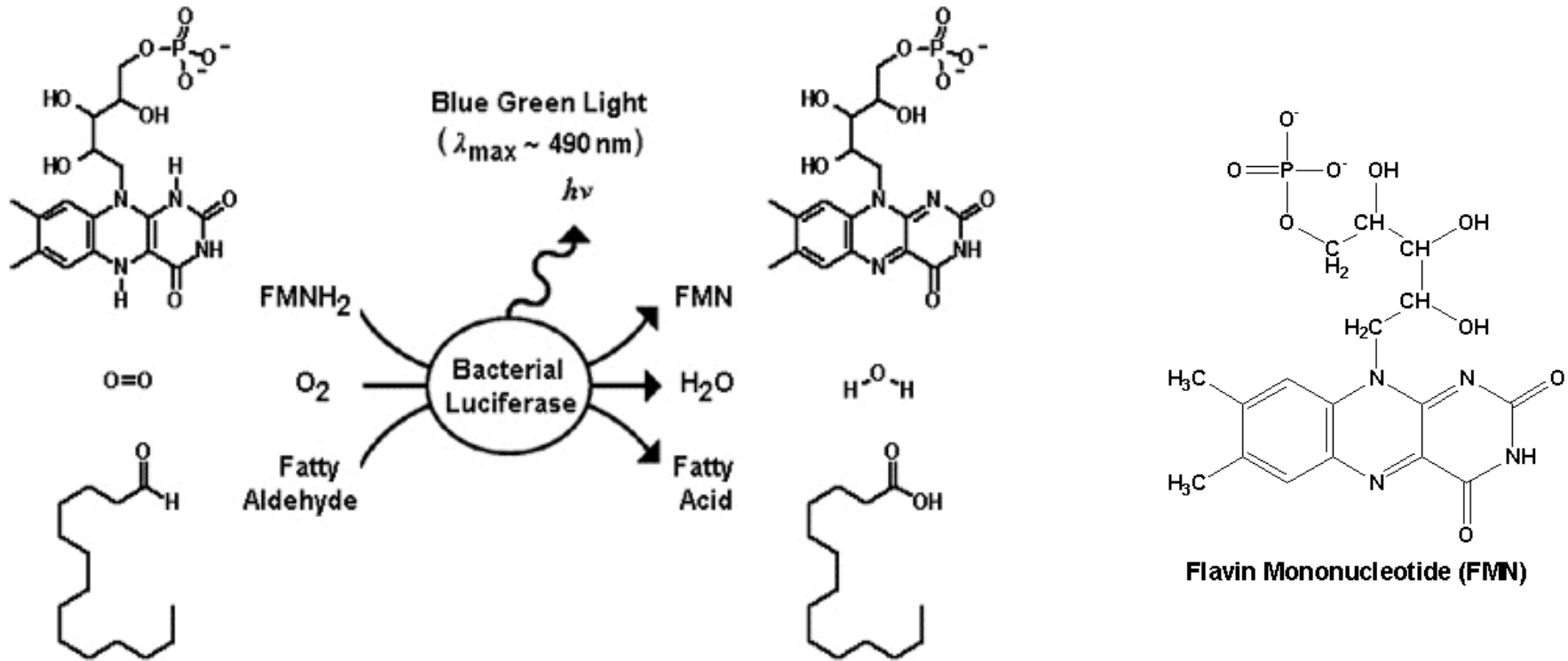
Tronoš (*Monocentris japonica*, Houttuyn, 1782)

Bioluminiscenční bakterie využívány ke komunikaci mezi ostatními druhy.



<https://www.pinterest.de/pin/347129083762967396/>

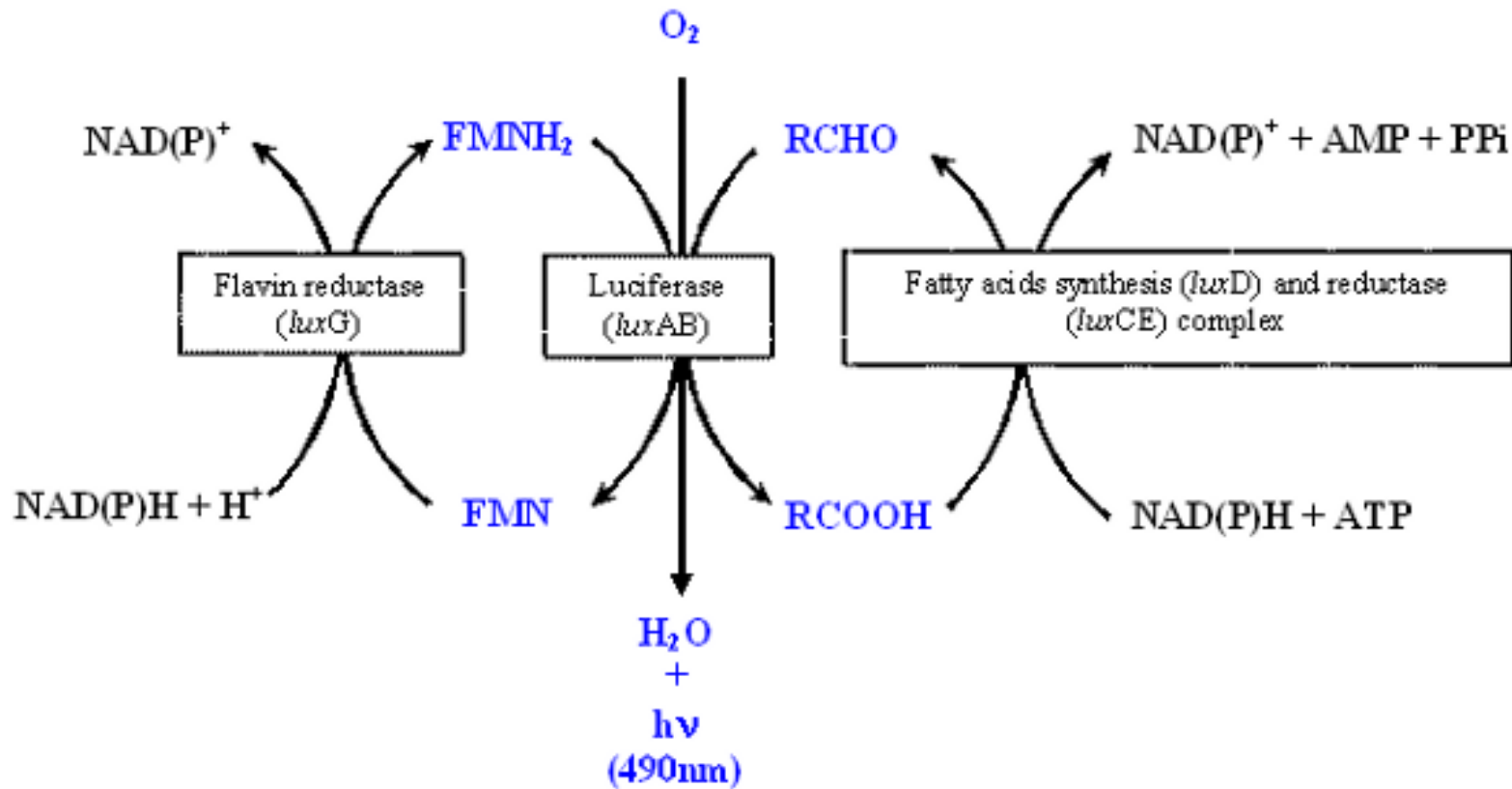
Bakteriální bioluminiscence



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

Bakteriální bioluminiscence

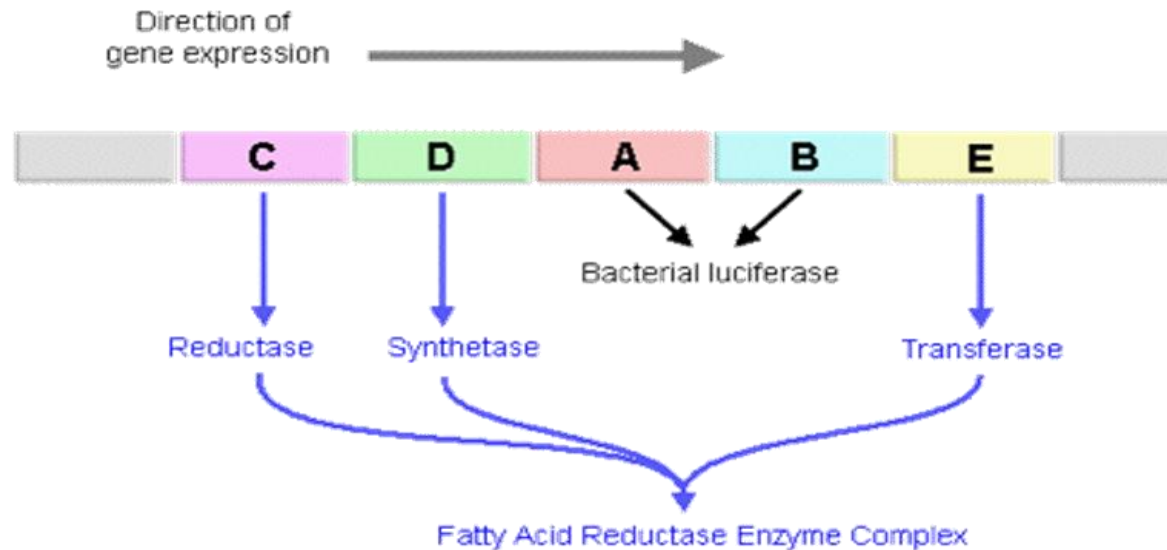
Luminiscence je energeticky náročná (vysoká spotřeba ATP luciferázou), spotřebovává až 20% celkové buněčné energie (Nealson & Hastings 1979, Bassler & Silverman 1995).



Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Bioluminiscenční (*lux*) geny jsou podobné pro všechny BL bakterie. Zahrnují 5 genů: *lux A* a *lux B* jsou zodpovědné za alfa a beta podjednotky luciferázy

lux C, *D* a *E* kódují komplex reduktázy mastných kyselin potřebné pro generování a recyklaci mastných kyselin na aldehyd (decanal).



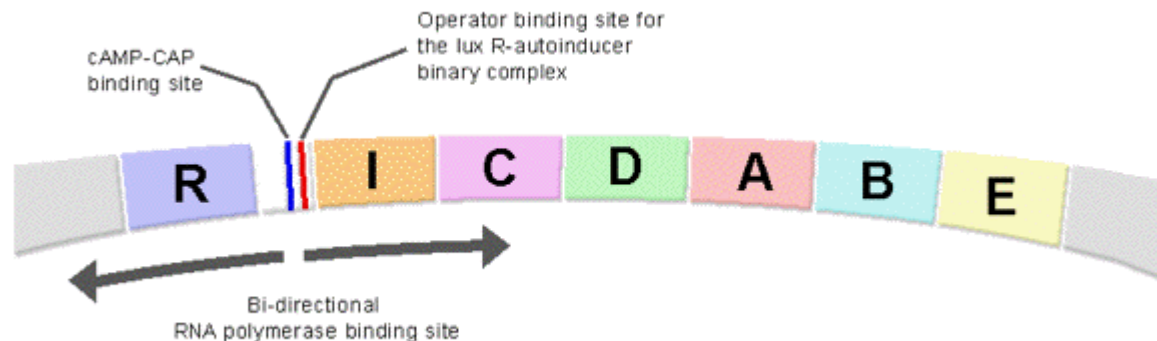
Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Dva regulační geny:

Gen *lux I* řídí syntézu N-acyl homoserin laktonu (HSL), signalizační molekuly známé jako autoinduktor potřebný pro aktivaci *lux* genů.

Gen *lux R* kóduje syntézu N-acyl HSL receptoru - transkripčního faktoru odpovídajícího na N-acyl HSL signál. Receptor má DNA binding doménu a N-acyl HSL binding doménu.

Hustota bakteriální suspenze je potřebná k dosažení kritické koncentrace autoinduktoru. Poté dojde k vazbě luxR produktu a transkripci luminiscenčních genů = Quorum sensing

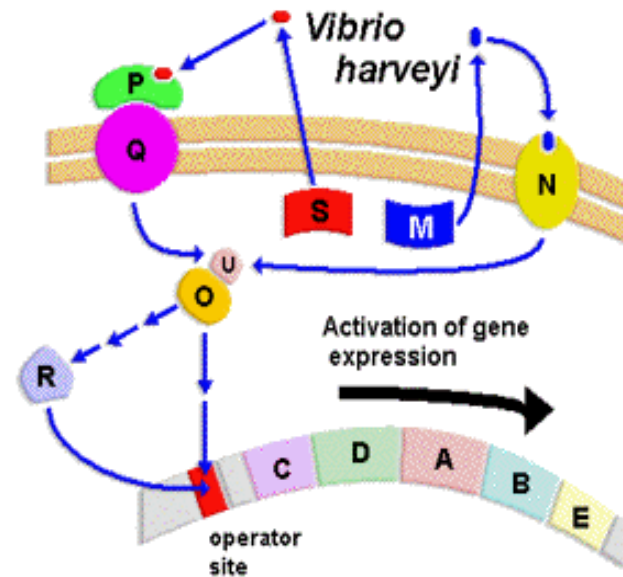
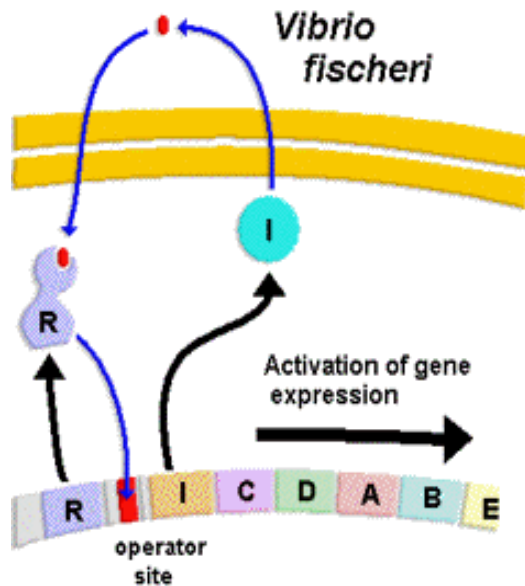


<http://photobiology.info/Lin.html>

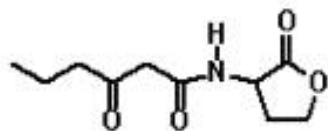
Produkce luminiscence je těsně spjata s buněčným metabolismem a je tedy odrazem viability bakterií.

Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Srovnání mechanismů regulace exprese lux genů u *V. fischeri* a *V. harveyi*

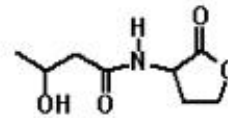


Autoinducer in *V. fischeri*



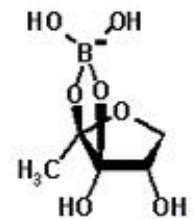
N-(3-oxohexanoyl)
homoserine lactone

Two autoinducers in *V. harveyi*



N-(3-hydroxybutanoyl)
homoserine lactone

Autoinducer-1 (AI-1)

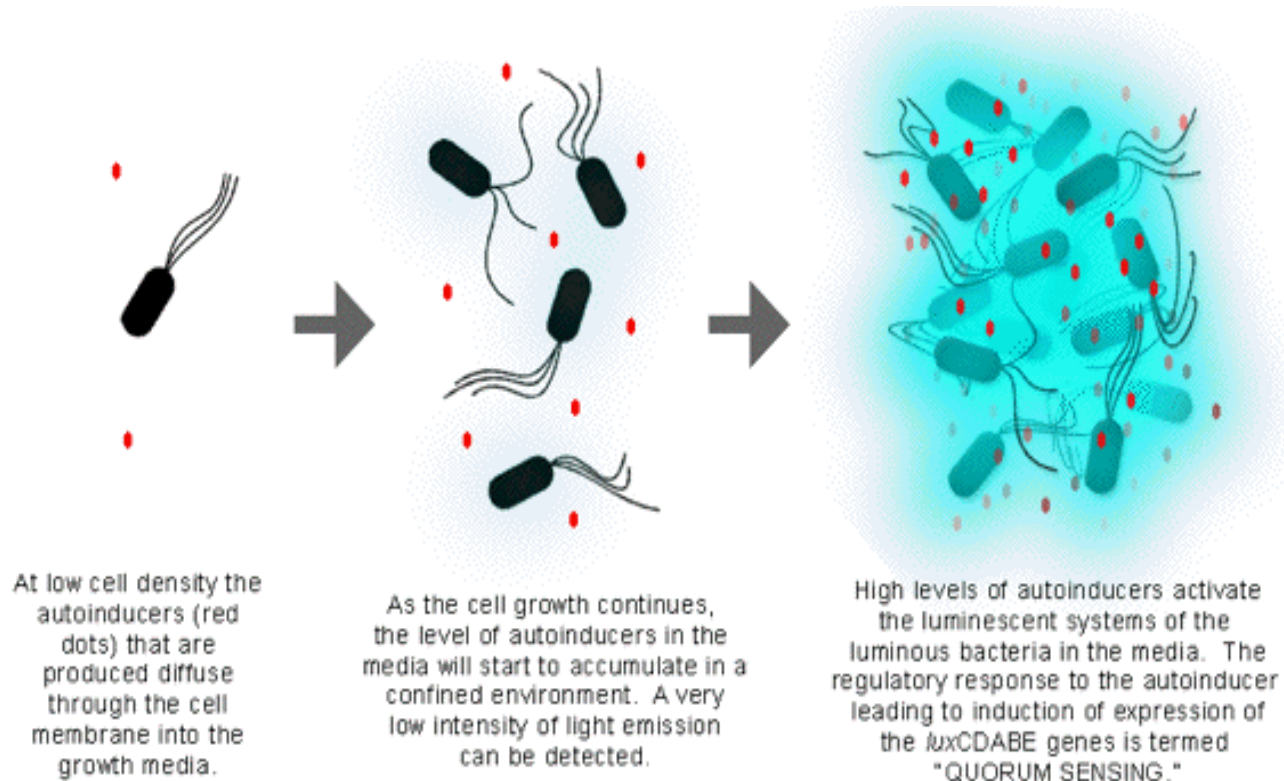


Furanosyl borate diester

Autoinducer-2 (AI-2)

Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Regulace exprese lux genů u bioluminiscenčních bakterií



Bakteriální bioluminiscence – aplikace

Ekotoxikologie

Aplikace metody:

- odpadní vody
- čerstvá voda (povrchová i spodní)
- slaná a brakická voda
- sedimenty a výluhy
- další vzorky rozpustné ve vodě

Faktory ovlivňující bakteriální biolum. aktivitu:

- optimální pH kolem 7
- změny v koncentraci NaCl
- absorpce světla silným zabarvením vzorku
- vysoká spotřeba kyslíku vzorkem

Factory ovlivňující *in vivo* reakci:

- genetická kontrola
- koncentrace rozpuštěného kyslíku
- koncentrace Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů
- intracelulární energetická rovnováha

Chemické, fyzikální a biologické toxikanty, které ovlivňují:

- respiraci buněk
- syntézu proteinů
- syntézu lipidů
- integritu buněk
- a zvláště funkce buněčných membrán

= > mají silný vliv na *in vivo* bioluminiscenci

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

Výhody analýz

- snadno proveditelné
- finančně nenáročné
- vysoce citlivé
- široké spektrum aplikací
- eticky akceptovatelné
- toxicitu je možno vztáhnout i na vyšší organismy
- malý objem analyzovaného vzorku
- krátká doba provedení = rychlé výsledky
- statisticky spolehlivé (vysoký počet testovaných organismů)

Mezinárodní normy

- Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*; Leuchtakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien, DIN 38 412-L34 (L341)
- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), ISO/CD 11348

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

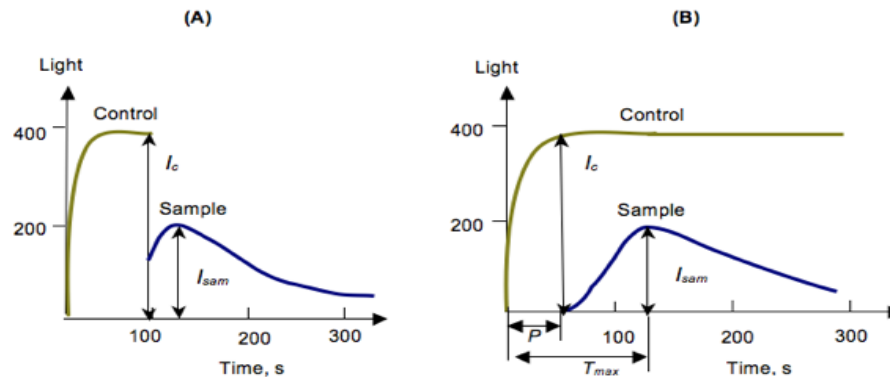


Figure: (A) Bioluminescent assay scheme; (B) Modified scheme of bioluminescent assay. The Light is bioluminescence intensity in relative units; I_c and I_{sam} are maximum values of bioluminescence intensity in the presence of control or analyzed sample respectively; T_{max} is the time when the coupled enzyme system reached the luminescence maximum; P is a time when the bioluminescent signal is absent due to an effect of redox active compounds in a sample.

When analyzing toxicity of water samples, the luciferase index (LI) or toxicity coefficient (TC) are calculated according to the formulas:

$$LI = (I_{sam} / I_c) \cdot 100 \%$$
$$TC = [(I_c - I_{sam}) / I_c] \cdot 100 \%$$
$$TC = 100 - LI$$

LI and TC are the residual luminescence and the degree of inhibition, respectively, of the bacterial coupled enzyme system Red + Luc in the presence of the analyzed sample. The criterion of toxicity is a 50 % decrease in the maximum of light emission for the bacterial coupled enzyme system Red + Luc after the analyzed sample is added. To compare the toxicity of individual substances, values used for TC are the 50% and 20% loss of luminescence for the coupled enzyme system Red + Luc.

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

Potřebné vybavení:

- luminometr (přenosný)
- kyvety nebo mikrotitrační destičky
- kultura bakterií
- NaCl
- čistá (redestilovaná) voda

Pracovní postup – zjednodušený protokol:

- Připrav (odeber) vzorek
- Nastav salinitu a pH (pokud je to nutné)
- Připrav si několik ředění vzorku
- Připrav kulturu bakterií, stabilizuj ji
- Pipetuj bakterie do zkumavek
- Změř bioluminiscenci
- Přidej vzorek a inkubuj (podle bakt. kultury 15 nebo 30 minut nebo i déle)
- Změř bioluminiscenci po inkubaci
- Vypočítej výsledky (EC50)

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

EC50 – Efektivní koncentrace (ppm - parts per million) toxikantů, které působí 50% inhibici luminiscence

Toxicant	EC50 @20-30 min	EC50 @50-60 min
Cadmium (II)	0.06	0.06
Copper	0.02	0.007
Lead (II)	0.1	0.2
Nickel (II)	0.1	0.01
Mercury (II)	0.07	0.03
Chlorpyrifos	1	0.3
Chlordane	0.2	0.15
DDT	0.12	0.06
Pentachlorophenol (PCP)	0.007	0.003
Aldrin	0.2	0.1
2,4-D	1	1.25
Aroclor 1254 (PCB)	0.01	0.008
Aroclor 1232 (PCB)	0.125	0.1
Fluoranthene (PAH)	0.3	0.15
Bromoform (THM)	0.3	0.3
Kerosene (TPH)	0.2	0.1
Diesel fuel (TPH)	0.7	0.25

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

Typové kultury rodu *Photorhabdus* z CCM Brno:

***Photorhabdus asymbiotica* CCM 7074^T**

- izolace z lidského poranění, Texas

***Photorhabdus luminescens* ssp. *akhurstii* CCM 7075^T**

- izolace z *Heterorhabditis indica*, Guadeloupe

***Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii* CCM 7076^T**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Trinidad a Tobago

***Photorhabdus luminescens* ssp. *luminescens* CCM 7077^T**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Australia

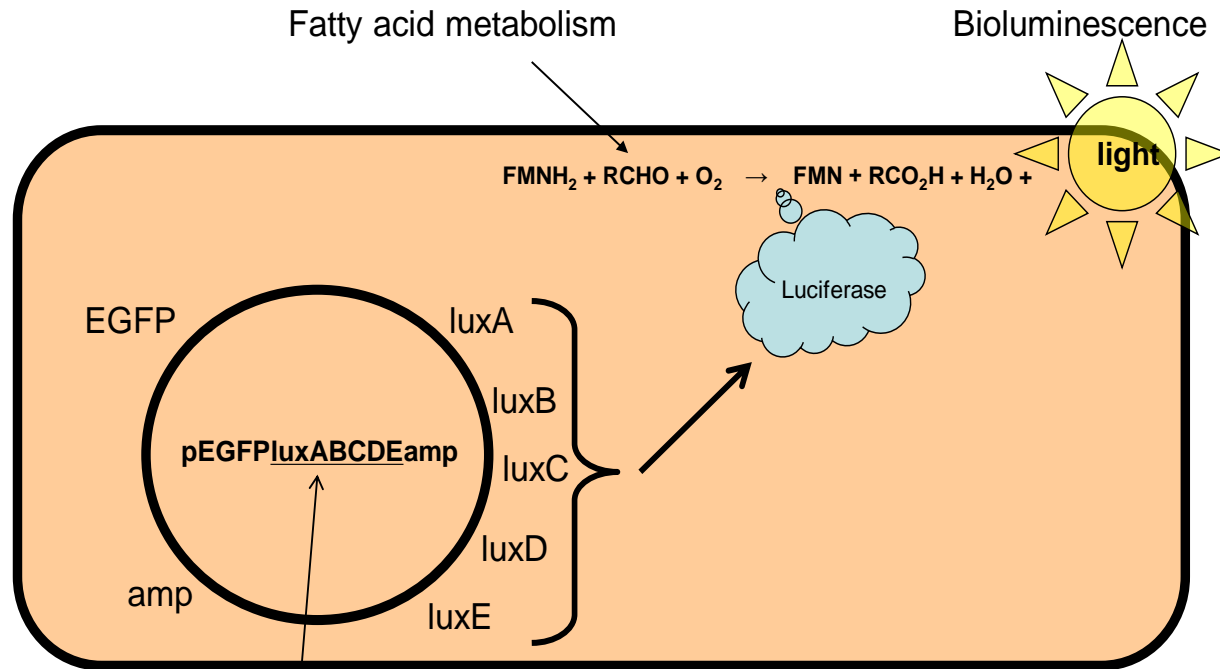
***Photorhabdus temperata* CCM 7078^T**

- izolace z *Heterorhabditis megilis*, Rusko

Bakteriální bioluminiscence – aplikace

Toxikologie

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



Photorhabdus luminescens

Literatura

<http://photobiology.info/#Biolum>

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

John Lee - <http://tube.sfu-kras.ru/video/1134>

Děkuji za pozornost