

Biolumineszenz – Naturphänomen und Grundlage moderner Werkzeuge

Rüdiger Hardeland,
Institut für Zoologie und Anthropologie, Universität Göttingen

► Biolumineszenz ist in vielen Organismengruppen unabhängig voneinander entstanden. Sie beruht auf Reaktionen von Enzymen (Luciferasen) mit oxidierbaren Substraten (Luciferinen), wobei die Energie des emittierten Lichts dem Redox-Potential entstammt. Entsprechend ihrer polyphyletischen Entstehung sind Luciferasen und Luciferine der verschiedenen Taxa in hohem Maße unterschiedlich. Die Mechanismen der Biolumineszenz lassen sich auf zellulärer Ebene analysieren. Luciferin-Luciferase-Reaktionen sind für höchstempfindliche Messungen von Metaboliten und von Calcium einsetzbar. Luciferase-Gene gewinnen eine zunehmende Bedeutung als Reportergene. Durch Targeting von Proteinkonstruk-

ten können Vorgänge in Kompartimenten studiert werden.

Biolumineszenz in der Natur und ihre Diversität

Der Faszination, die von lichtemittierenden Organismen ausgeht, vermag man sich kaum zu entziehen. Mit Leuchtkäfern („Glühwürmchen“) hat schon fast jeder derartige Naturerlebnisse gehabt. Biolumineszenz kann in hohem Maße spektakulär sein, etwa im Falle südostasiatischer Leuchtkäfer, die zu Tausenden Bäume besetzen und synchron rhythmisch Licht aussenden. Oder auch beim Meeresleuchten, das zumeist von einzelligen Organismen, Dinoflagellaten, ausgeht, welche in der Nacht zu Zeiten von Massenvermehr-

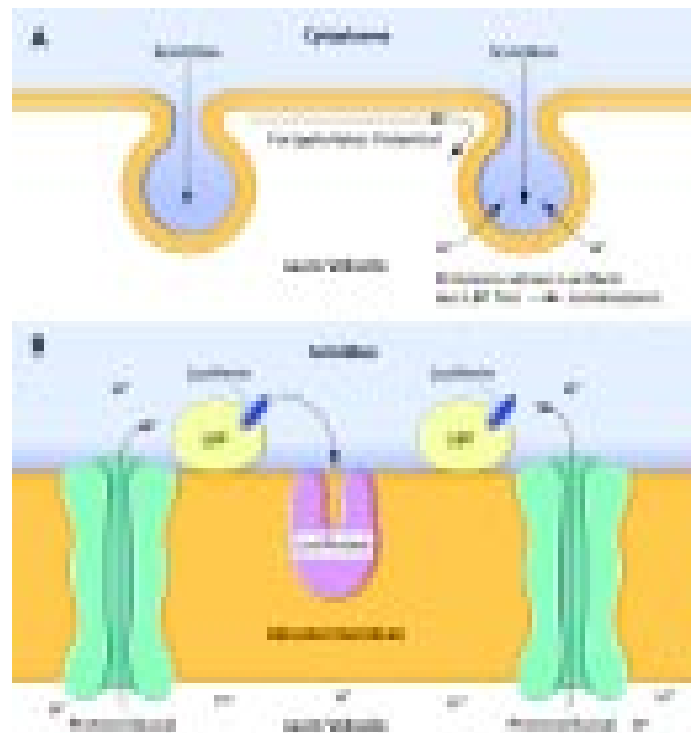


Abb. 1: Modell der Biolumineszenzkontrolle beim Dinoflagellaten *Gonyaulax*. Ein an der Membran einer sauren Vakuole fortgeleitetes Protonenpotential macht im Scintillon das Luciferin für die Luciferase verfügbar A: Sequentielle Ansteuerung der Scintillons; B: Vorgänge am Scintillon [8].

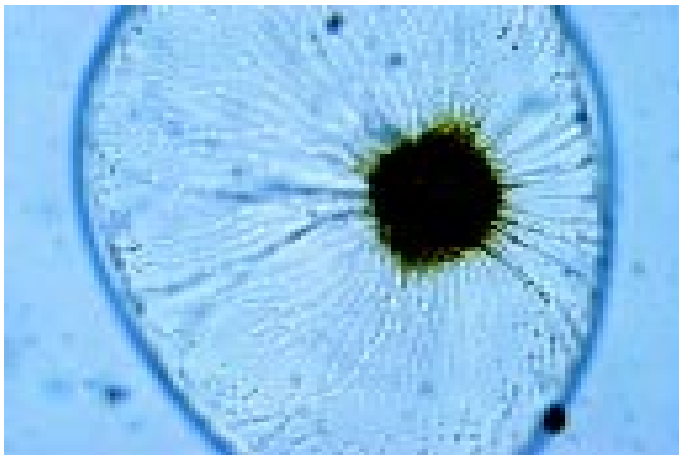


Abb. 2: Der Dinoflagellat *Pyrocystis noctiluca* im Nachtstadium. Von einem Pol gehen Cytoplasmastränge aus.

rungen jede umschlagende Welle zum Aufleuchten bringen; jeder Zug eines Schwimmers oder Ruderers zeichnet eine leuchtende Bahn. Bei diesen Einzellern ist demnach die Lichtemission mechanisch stimulierbar.

Biolumineszenz kommt in den verschiedensten Organismengruppen vor, bei Bakterien, Dinoflagellaten, Radiolarien, Pilzen, Schwämmen, Nesseltieren, Rippenquallen, Polychaeten, Mollusken, Crustaceen, Insekten, Manteltieren und Fischen. Doch in jeder dieser Gruppen ist es immer nur eine begrenzte Anzahl von Arten, die diese Fähigkeit besitzt. Allein hieran wird

bereits deutlich, daß Biolumineszenz polyphyletisch entstanden sein muß. Dies wird durch die hochgradige biochemische Diversität von Luciferinen und Luciferasen bestätigt.

Funktionell wird Biolumineszenz unterschiedlich genutzt. Zur Kommunikation kann sie bei Insekten, Kalmaren und Fischen verwendet werden, auch im sexuellen Kontext. Dem Beutefang dient sie bei einigen Insekten, die die Lichtorientierung nachfliegender Beuteinsekten nutzen oder sogar als „*femmes fatales* der Biologie“ mittels artfremder Paarungssignale Männchen anderer Species ins Verderben locken

(Leuchtkäfer *Photuris* als Räuber von *Photinus*). Auch Täuschung von Prädatoren kommt vor, so bei dem Ostracoden *Cypridina*, der Luciferin und Luciferase ins Wasser abgibt, mit der Biolumineszenzreaktion den Räuber ablenkt und derweil selber abtaucht. Bei „niederen“ Organismen – Bakterien, Protozoen, Pilzen, Nesseltieren – ist die biologische Bedeutung der Lichtemission zumeist unklar. Biolumineszente Dinoflagellaten und Nesseltiere senden Licht auf mechanische Reizung hin oder auch bei Zerstörung von Zellen aus, doch ob die naheliegende Vermutung zutrifft, daß dies einen Freßfeind abschreckt, ist unbewiesen. Bei dem auf Ölbäumen wachsenden Pilz *Mycena* leuchtet der Fruchtkörper, vor allem im Bereich der Lamellen. Der Nutzen mag in einer Verbreitung der Sporen durch nachfliegende, vom Licht angelockte Insekten bestehen. Doch warum ein anderer Holzpilz, der bekannte Hallimasch (*Armillariella*), nur im Bereich seines unterirdischen Mycel, nicht aber im Fruchtkörper leuchtet, bleibt ein Rätsel.

Wie erwähnt sind die Luciferine der verschiedenen Taxa sehr unterschiedlich. Bei Leuchtbakterien dient hierfür FMNH₂, bei Dinoflagellaten ein substituiertes offenkettiges Tetrapyrrol [1], bei Nesseltieren und anderen marinen Organismen ein als Coelenterazin bezeichnetes Imidazolopyrazinon, von dem Varianten mit diversen Substituenten existieren [2]. Das in vielen Lehrbüchern aufgeführte Luciferin des Leuchtkäfers *Photinus*, ein Benzothiazolylthiazol-Derivat, besitzt die Besonderheit, daß es zunächst mit ATP zu Luciferyl-AMP reagieren muß, bevor die eigentliche Lumineszenzreaktion stattfinden kann. Diese ATP-Abhängigkeit ist jedoch keineswegs eine generelle Eigenschaft der Luciferine; ganz im Gegenteil stellt dies eine Besonderheit von Insekten-Luciferinen dar. Auch stammt die Energie, die hier für das zu emittierende Photon benötigt wird, nicht in erster Linie aus der Hydrolyseenergie des ATP. Es gibt jedoch eine offenkundige Gemeinsamkeit der chemisch so verschiedenen Lu-

ciferine, einschließlich jenes der Leuchtkäfer: Die Energiedifferenz, die zur Emission eines Photons erforderlich ist, ergibt sich immer aus dem Redox-Potential einer Oxidationsreaktion. Ferner ist ein hinreichend großes mesomeres System vonnöten, das die vorübergehende Stabilisierung eines angeregten Zustands erlaubt; diese Bedingung ist durch die verschiedenen Luciferine erfüllt, die meist mehrere heterozyklische Gruppierungen enthalten. Die lichtemittierende Struktur eines Intermediats ist typischerweise ein angeregter Carbonyl-Sauerstoff, welcher aus einer Hydroperoxy- oder zyklischen Peroxidzwischenstufe hervorgeht. Ersteres findet sich in Form eines 4a-Hydroperoxy-FMNH bei der Lumineszenz von Leuchtbakterien, letzteres steht im Zusammenhang mit der oxidativen Spaltung von Doppelbindungen [weitere Details in Ref. 2]. Auf letztgenannte Weise erklärt sich auch die Abspaltung von CO₂ aus dem oxidierten *Photinus*-Luciferin (das in dieser Phase bereits vom AMP getrennt ist).

Ähnliche Strukturen, die bei der Spaltung von Doppelbindungen auftreten, finden sich auch bei Interaktionen geeigneter Metabolite mit freien Radikalen [3]. In der Tat zeigte sich, daß die radikalische Pyrrolringspaltung bei Melatonin und anderen Indolmetaboliten zur Lichtemission führt [4]. Derartige Chemilumineszenz ist auch in biologischem Material möglich. In der Tat läßt sich bei Oxidationsprozessen in Zellen und Geweben eine biogene „*low level*“-Chemilumineszenz demonstrieren [2]. Daß Metabolite mit umfangreicher Mesomerie unter Reaktion mit freien Radikalen Licht emittieren, erleichtert zudem die Vorstellung einer wiederholten unabhängigen Entstehung von Biolumineszenz in verschiedenen Taxa. Die betreffenden Organismen hatten „nur“ geeignete Metabolite für den neuen Zweck zu optimieren. Tatsächlich besitzen Luciferine wie Coelenterazin eine beträchtliche antioxidative Potenz und auch deswegen wurde die Frage aufgeworfen, ob sie sich aus Radikalfängern entwickelt haben [2].

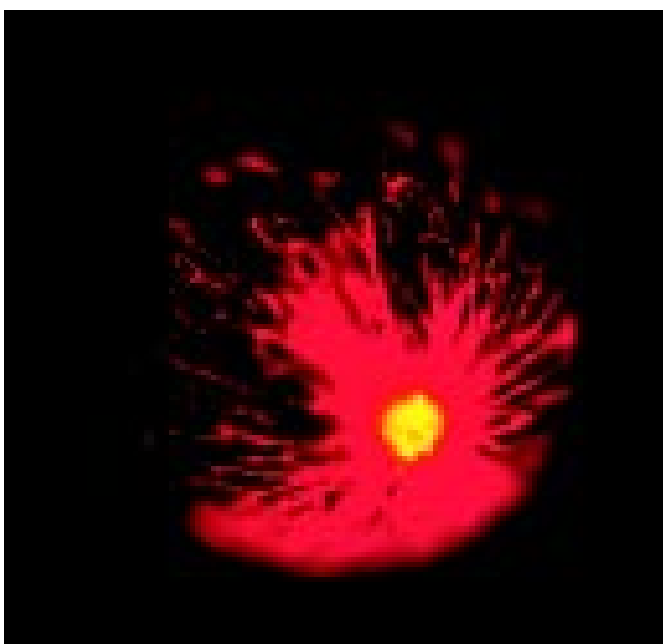


Abb. 3: *Pyrocystis noctiluca* im Tagstadium. Die Plastiden sind entlang der Plasmastränge expandiert und würden die Lumineszenz absorbieren. Autofluoreszenz: rot Chlorophyll, gelb ein autophagisches Organell.

Die unmittelbare Verfügbarkeit von Luciferinen für Luciferase-Reaktionen ist bei den einzelnen Organismen recht verschieden. Beim Ostracoden *Cypridina* werden Luciferin und Luciferase in verschiedenen Abschnitten einer Art Speicheldrüse getrennt gebildet und erst durch Sekretion in Kontakt gebracht. Bei Insekten ist, wie erwähnt, die Reaktion mit ATP erforderlich. Einige Dinoflagellaten zeigen Lichtemission erst nach Freisetzung von Luciferin aus einem Bindungsprotein. Bei diversen Nesseltieren ist zudem die Biolumineszenz an eine Calcium-abhängige Erregung der emittierenden Zellen gekoppelt. Am besten studiert ist dies beim Lumineszenzsystem der Scyphomeduse *Aequorea*. Diese besitzt einen als Aequorin bezeichneten Luciferase-Luciferin-Komplex, der durch Ca^{2+} aktiviert wird und somit erst nach dessen Bindung Licht emittiert.

Aequorea zeigt noch ein weiteres bedeutsames Phänomen, das mit dem Begriff Energietransfer-Biolumineszenz bezeichnet wird. Die primär blaue Lumineszenz des Aequorins wird durch einen in enger räumlicher Nähe befindlichen Fluoreszenzfarbstoff in grünes Licht verwandelt. Man mag sich darüber wundern, daß die Meduse nicht imstande ist, von vornherein grüne Lumineszenz zu erzeugen, doch könnte dies in der Nutzung verfügbarer Luciferinvorstufen begründet sein. Interessanterweise ist der Fluoreszenzfarbstoff ein Protein (*green fluorescent protein* = GFP), dessen Chromophor aus einem Tripeptid durch spontane Dehydratierung und Sauerstoffaddition hervorgeht [5]. Andere Nesseltiere verfügen ebenfalls über GFPs. Das Prinzip der Energietransfer-Biolumineszenz scheint über diese Tiergruppe hinaus weiter verbreitet zu sein, dann jedoch – soweit bekannt – auf der Basis niedermolekularer Fluorophoren.

Intrazelluläre Mikroquellen der Lumineszenz

Dinoflagellaten eignen sich in besonderem Maße für die Untersuchung der subzellulären Verteilung der Lichterzeugung. Bei diesen Organismen geht die Lu-

mineszenz von relativ kleinen, eng umschriebenen Mikroquellen aus, die sich stets an Membranen von Vakuolen befinden, deren Inneres einen pH von 5 oder niedriger aufweist. In der Gattung *Gonyaulax* erhielten die Mikroquellen den Namen ‚Scintillons‘ [1]. Diese stellen Einstülpungen der Vakuolenmembran dar (Abb. 1). Assoziiert mit der Membran finden sich in den Scintillons ein Luciferin-bindendes Protein (LBP), das als Quelle von Luciferin dient, und die Luciferase. Ferner enthält die Membran der Sauren Vakuole Protonenkanäle, sowohl im Bereich der Scintillons wie auch außerhalb dieser. Reize, die die Biolumineszenz stimulieren, etwa Scherkräfte, die die Zelle verformen, führen auf nicht völlig geklärten Wege zum Übertritt von Protonen aus der sauren Vakuole ins Cytoplasma. Die hieran beteiligten Protonenkanäle erlauben die Ausbildung eines Potentials, das sich über die Membran ausbreitet: eine Form intrazellulärer elektrischer Erregung! Es ist in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert, daß hier der Fall eines fortgeleiteten Protonenpotentials an einer intrazellulären Membran vorliegt; fortgeleitete erregende Potentiale erwartet man üblicherweise an Plasmamembranen und auf der Basis anderer Ionen (Na^+ , Ca^{2+} oder, bei manchen Pflanzen, Cl^-). Im eng umgrenzten Bereich der Scintillons bewirkt der Übertritt von Protonen eine lokale Ansäuerung. Bei ca. pH 6 macht das LBP eine Konformationsänderung durch und setzt Luciferin frei, das nun der benachbarten Luciferase als Substrat verfügbar wird. Die Fortleitung des intrazellulären Potentials führt zu einer sequentiellen Ansteuerung der Scintillons; es ergibt sich ein räumliches und zeitliches Muster von Lichtblitzen.

Scintillons in Form der eben beschriebenen Struktur sind nicht bei allen biolumineszenten Dinoflagellaten zu finden, doch sind in jedem Fall diskrete Mikroquellen an der Grenze zu sauren Vakuolen auszumachen und zeitliche Muster der Lichtemission festzustellen. Dies läßt sich gut bei der bis zu 0,3 mm großen Art *Pyrocystis noctiluca* beobachten.

Die Zelle enthält eine umfangreiche zentrale Vakuole, an die auffällige Cytoplasmastränge grenzen. In Abbildung 2 sind diese Stränge deutlich; an einem Pol der Zelle, der eine Anhäufung von Organellen enthält, sind als brauner Fleck die Chloroplasten lokalisiert (braun durch das akzessorische Pigment Peridinin). Diese Organellverteilung ist jedoch nur charakteristisch für die Nacht. Biolumineszenz ist allein bei Dunkelheit auffällig! Am Tage sind die Plastiden in Form von dünnen Ästen entlang der Plasmastränge expandiert (Abbildung 3) und vermögen daher viel Licht zu absorbieren. Bliebe diese Ausbreitung in der Nacht erhalten, würden die plastidären Pigmente die Lumineszenz großenteils absorbieren. Daher sind bei lumineszenten Dinoflagellaten Tagesrhythmen der Plastidenexpansion und -retraktion [6] regelmäßig anzutreffen.

Entlang der Plastidenstränge sind bei *P. noctiluca* die Mikroquellen angeordnet (Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 4). Deren sequentielle Ansteuerung wird in Videobildern [6] im Abstand von 0,5 Sekunden deutlich (Abbildung 5).

Biolumineszenz als Werkzeug

Die Messung oder Darstellung von Licht stellt, im Vergleich zu komplizierten biochemischen Prozeduren, oftmals eine beträchtliche Erleichterung für den Experimentator dar. Hiermit kann zudem meist eine große Datenmenge gewonnen werden. Die ersten Anwendungen der Biolumineszenz standen im Zusammenhang mit Untersuchungen der circadianen Rhythmik, die bei Dinoflagella-

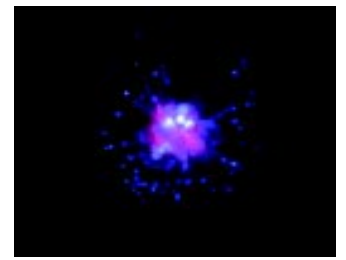


Abb. 4: Mikroquellen von *Pyrocystis noctiluca*. Autofluoreszenz: blau Luciferin; rot Chlorophyll [6].

ten automatische Messungen über viele Tage hinweg erlaubt [1]. Da diese Organismen ferner auf Gifte sensitiv reagieren, wurden verschiedene Konzepte entwickelt, sie als Biosensoren einzusetzen, die auf Toxine mit Änderungen der Lichtemission reagieren.

Biolumineszenzreaktionen können ferner zu höchstempfindlichen Messungen von Metaboliten herangezogen werden. Vielfach angewandt wird die Bestimmung von ATP mit Luciferin und Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus*. Grundsätzlich sind, obwohl seltener durchgeführt, auch Bestimmungen anderer Metabolite mit diesem System möglich, genauer: aller jener, die entweder enzymatisch in ATP überführt werden können ($5'$ -AMP, cAMP) oder in gekoppelten Tests zu ATP-Bildung oder Verbrauch führen. Die Anwendung ist nicht an die Verfügbarkeit eines speziellen Luminometers gebunden; ein Szintillationszähler vermag bei geeigneter Einstellung Entsprechendes zu leisten (niederenergetisches Fenster; hohe Verstärkung; ausgeschaltete Koinzidenz). Aequorin erlaubt hochsensitive Ca^{2+} -Messungen.

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Molekulargenetik

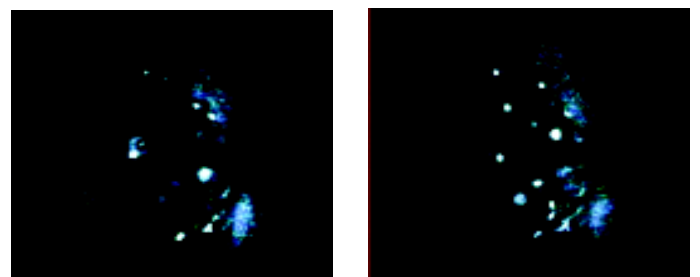


Abb. 5: Zwei kurz aufeinander folgende Videoaufnahmen zeigen bei einer Zelle von *Pyrocystis noctiluca* schnelle räumliche und zeitliche Änderungen der Lichtemission [6].

haben es nunmehr ermöglicht, verschiedenste Organismen mit Luciferase-Genen zu transfizieren [2]. Verwendet werden bislang vor allem Luciferasen von Leuchtbakterien (*lux*-Gene) und Leuchtkäfern sowie Aequorin (inzwischen auch Homologe von anderen Coelenteraten wie *Renilla*). Dem Einsatz als Reportergene sind wenige Grenzen gesetzt, wenn, dann in der Applikation der Substrate, den jeweiligen Luciferinen, oder von Cosubstraten in Form langkettiger Aldehyde, wie im Falle bakterieller Luciferasen erforderlich. Zumeist ist dies jedoch kein praktisches Problem. Bakterielle Luciferase als Reporter gen hat beispielsweise dem Nachweis circadianer Rhythmen bei Cyanobakterien und der Identifikation von „clock“-Genen entscheidend gedient. Fusionsgene aus *recA::lux* wurden konstruiert, um Genotoxizität zu entwickeln [2]. Bei der Untersuchung eukaryotischer Zellen ist vor allem die Möglichkeit des „targeting“ von Luciferase-Genen von Interesse und auch schon praktiziert worden, um mit Hilfe der Sortierungssignale in den Konstrukten Informationen über die Kompartimente zu erhalten.

In dieser Hinsicht erweisen sich die Lumineszenzsysteme der Nesseltiere, vor allem von *Aequorea*, als äußerst wertvoll. Zum einen haben das *targeting* von GFP und die Herstellung von GFP-Fusionsproteinen unsere Vorstellungen von Struktur und Dynamik lebender Zellen geradezu revolutioniert [siehe auch Special Ref. 7]. Zudem hat die gezielte Mutagenese Farbvarianten von GFP hervorgebracht, die die gleichzeitige, verschiedenfarbige Markierung mehrerer Strukturen erlaubt [5, 7]. Aber auch Aequorin gewinnt derzeit an Interesse. Schon früh war diese Substanz zum Studium des intrazellulären freien Calciums eingesetzt worden, doch blieb die Anwendung immer mit dem Nachteil der Mikroinjektion verbunden. Daher verdrängten Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe das Aequorin. Die Möglichkeit des organell- oder sonstigen „site“-spezifi-

schen *targeting* eröffnet jedoch neue Perspektiven der intrazellulären Verteilung von freiem Ca^{2+} und seiner Dynamik, angesichts der eminenten Bedeutung von Ca^{2+} als *second messenger* von erheblichem Interesse. Grenzen der Anwendung können sich aus Aktivitätsverlusten durch posttranslationale Modifikationen innerhalb bestimmter Kompartimente ergeben. Ein besonderer Vorteil des Aequorins besteht jedoch darin, daß es für einen weitaus größeren Konzentrationsbereich des Ca^{2+} eingesetzt werden kann als die Fluoreszenzfarbstoffe. Vielversprechende Ergebnisse liegen bereits vor.

Literatur

- [1] Morse, D.S., L. Fritz & J.W. Hastings (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *Trends Biochem. Sci.* 15, 262-265.
- [2] Roda, A., M. Pazzagli, L.J. Kricka & P.E. Stanley [Eds.] (1999). *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Wiley, Chichester.
- [3] Hardeland, R. & B. Fuhrberg (1996). Ubiquitous melatonin – Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2, 25-45.
- [4] Hardeland, R., B.K. Zsizsik, B. Poeggeler, B. Fuhrberg, S. Holst & A. Coto-Montes (1999): Indole-3-pyruvic and propionic acids, kynurenic acids and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467, 389-395.
- [5] Tsien, R.Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- [6] Behrmann, G. & R. Hardeland (1999). Biolumineszenz und Tagesrhythmik bei Dinoflagellaten. *Videofilm C2013 (Institut für den Wissenschaftlichen Film Göttingen)*.
- [7] Keller, P. (2000): Fluoreszenz-Mikroskopie an lebenden Zellen. *BIOspektrum* 1, 60-63.
- [8] Fritz, L., D. Morse & J.W. Hastings (1990). The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles. *J. Cell Sci.* 95, 321-328.

Abb. 4 und 5 mit freundlicher Genehmigung und Unterstützung des Instituts für den Wissenschaftlichen Film, IWF, Göttingen

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Rüdiger Hardeland
 Institut für Zoologie und Anthropologie
 der Universität
 Berliner Str. 28, D-37073 Göttingen
 Tel.: 0551-395414, Fax: 0551-395438
 eMail: rhardel@gwdg.de