

Prof. Giorgio Sartor

Bioluminescenza

Copyright © 2001-2014 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 1.2 - dec 2014

Luminescenza

- Emissione della luce in seguito al passaggio dallo stato eccitato allo stato fondamentale di un elettrone;
- Lo stato eccitato viene raggiunto a seguito di una somministrazione di energia.

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

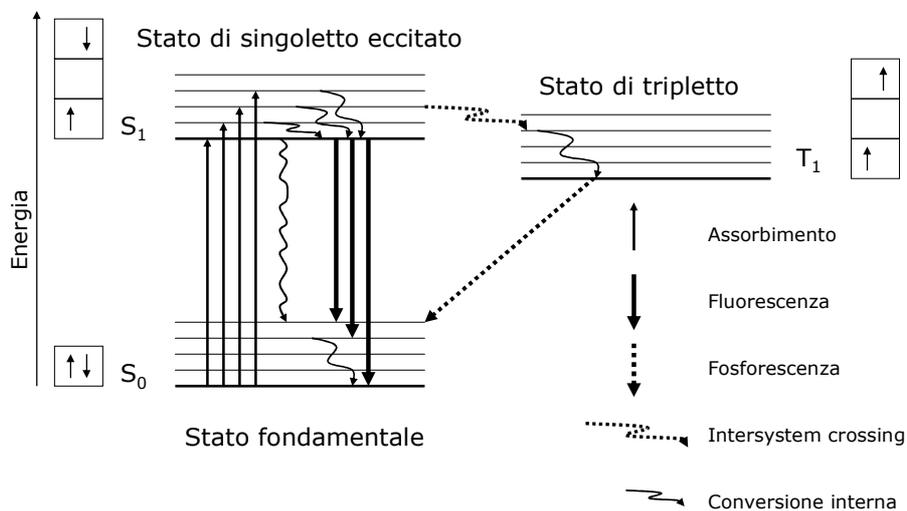
- 2 -



Luminescenza

TIPO	CAUSA
Elettroluminescenza	corrente elettrica in gas ionizzato o semiconduttore
Radioluminescenza	materiale radioattivo incorporato nel fosforo
Chemiluminescenza	reazione chimica
Bioluminescenza	reazione enzimatica
Termoluminescenza	temperatura e radioattività
Triboluminescenza	rottura di cristalli
Sonoluminescenza	onde sonore in liquidi
Fotoluminescenza	assorbimento di luce

Le transizioni elettroniche



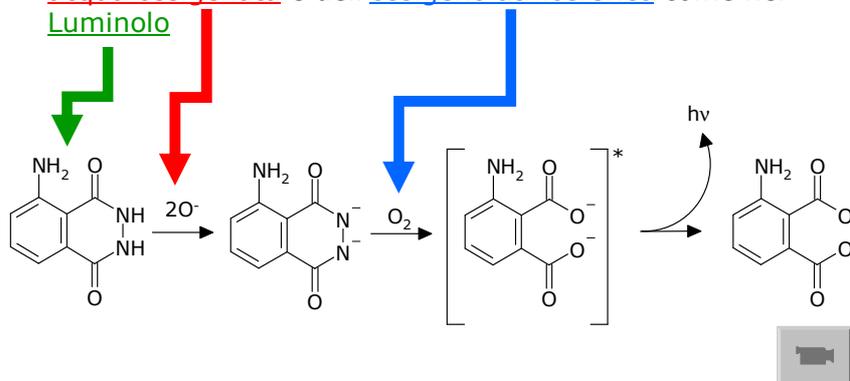
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 5 -

Chemiluminescenza

- La luminescenza che viene emessa nel corso di una reazione chimica ha a che fare in genere con un'ossidazione. L'ossidazione può avvenire a causa di [acqua ossigenata](#) e dell'[ossigeno atmosferico](#) come nel



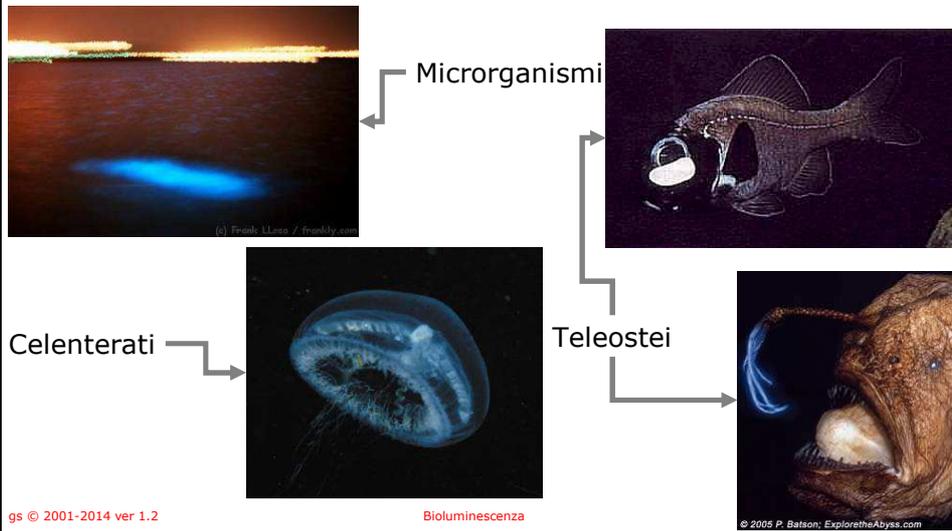
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 6 -

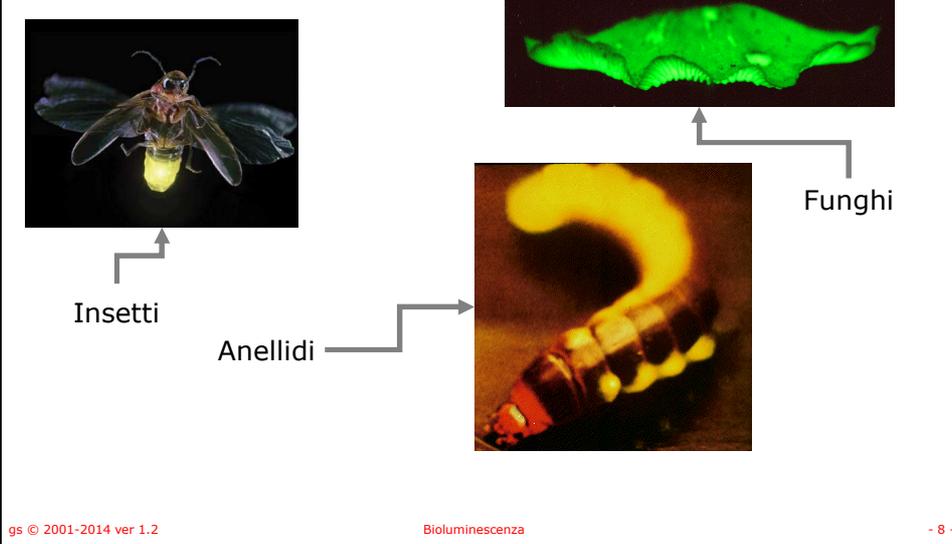
Bioluminescenza

- Il fenomeno della bioluminescenza è proprio di alcuni organismi marini:



Bioluminescenza

- ... e terrestri:



Bioluminescenza

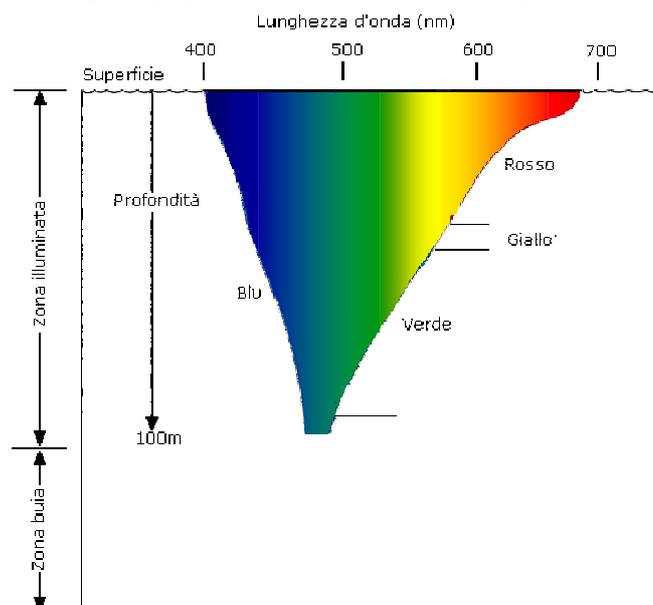
- L'uso che gli organismi fanno della bioluminescenza sono molteplici:
 - Comunicazione
 - Difesa
 - Attacco
 - Predazione
 - Illuminazione
 - Mimetismo
 - ...
 - Vantaggio riproduttivo

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 9 -

La luce in fondo al mare



gs © 2001-2014 ver

- 10 -

Bioluminescenza

- L'emissione della luce da parte di un organismo può essere dovuta a:
 - bioluminescenza propria dell'organismo (luciole, batteri o protozoi ecc.);
 - la presenza di batteri simbiotici;
- In ogni caso la luminescenza è prodotta da un meccanismo molecolare che coinvolge delle reazioni di ossidoriduzione.

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

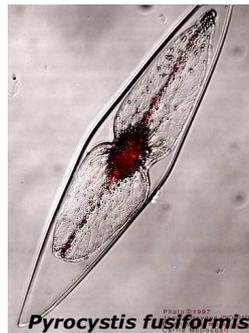
- 11 -

Organismi marini

- Batteri e protozoi



Renilla koellikeri



Pyrocystis fusiformis

- Celenterati



Aequorea victoria

gs © 2001-2014 ver 1.2

- 12 -

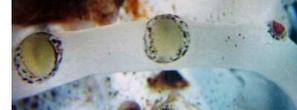
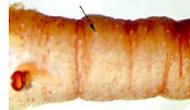
Organismi marini



http://www.youtube.com/watch?v=_QUt-Rrs6Co

<http://www.youtube.com/watch?v=SfNBLR72W7g&NR=1>

- Molluschi
 - Cefalopodi



- Crostacei
 - Ostracodi

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 13 -

Organismi marini

- Teleostei
 - Stomiatoidei
 - Mictofidi



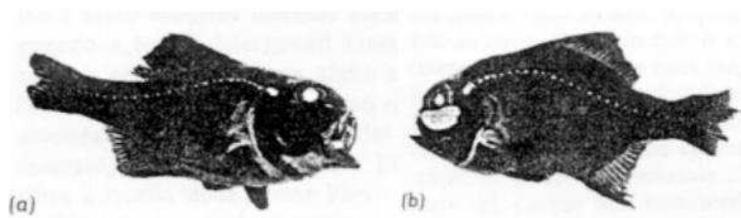
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 14 -

Photoblepharon

- Possiede un sistema per aprire e chiudere l'organo fotoforo.



gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 15 -

Batteri simbiotici

- Il batterio marino *Vibrio fischeri* in natura esiste allo stato planctonico o come simbionte di pesci e seppie luminescenti
- Colonizza organi specializzati nell'animale ospite (*Euprymna scolopes*, *Anomalops katoptron*, *Photoblepharon*) che usa la luminescenza di *V. fischeri* come esca per le prede o come camuffamento dalla luce lunare,
- La sorgente di luce sono i batteri che allo stato libero non emettono luce.
- Il meccanismo con il quale *V. fischeri* regola la propria bioluminescenza è legato alla presenza di un segnale chimico di consenso.

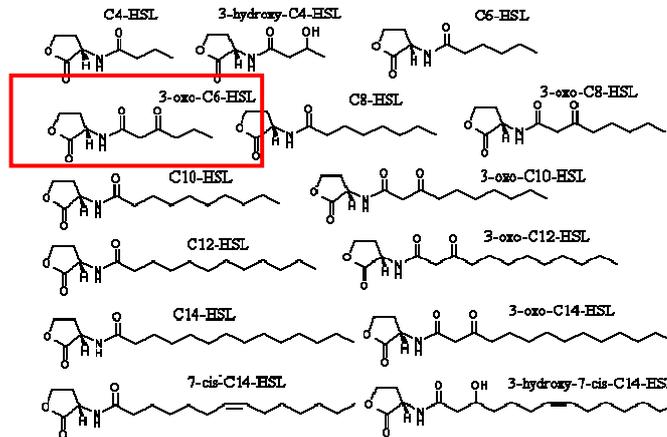


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 16 -

N-acil-L-omoserina lattone (AHL)



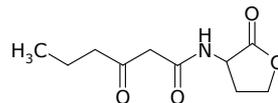
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 17 -

Batteri simbiotici

- Il segnale di consenso è legato alla sintesi e all'accumulo del segnale chimico di consenso (3-ossido-C6-HSL, AHL).
- In *V. fischeri*, il segnale è sintetizzato dalla proteina LuxI e raccolto dalla proteina LuxR.
- Quando *V. fischeri* è a bassa densità il segnale chimico è basso.
- Quando la densità cresce (nei organi fotofori) il segnale si accumula ed interagisce con LuxR.
- Il complesso LuxR/AHL si lega alla regione del DNA chiamata "lux box" causando l'attivazione del gene per la sintesi delle proteine che provocano la bioluminescenza.



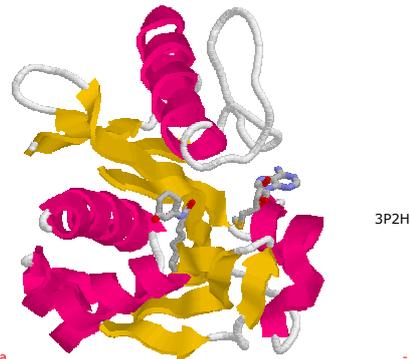
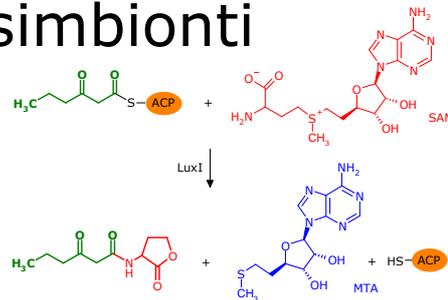
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 18 -

Batteri simbiotici

- Inoltre, il complesso LuxR/AHL provoca la biosintesi di AHL (via LuxI) la cui sintesi viene quindi autoindotta
- Allo stato planctonico i batteri sono "spenti" mentre nei fotofori di *Photoblepharon* sono luminosi.



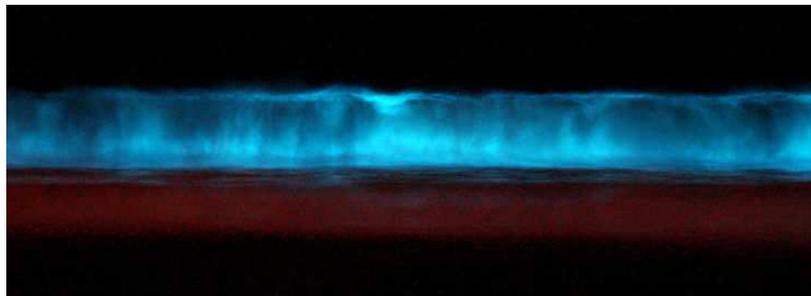
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 19 -

Bioluminescenza

- Luminescenza prodotta da reazione catalizzate da enzimi.
- Fotoproteine.



gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 20 -

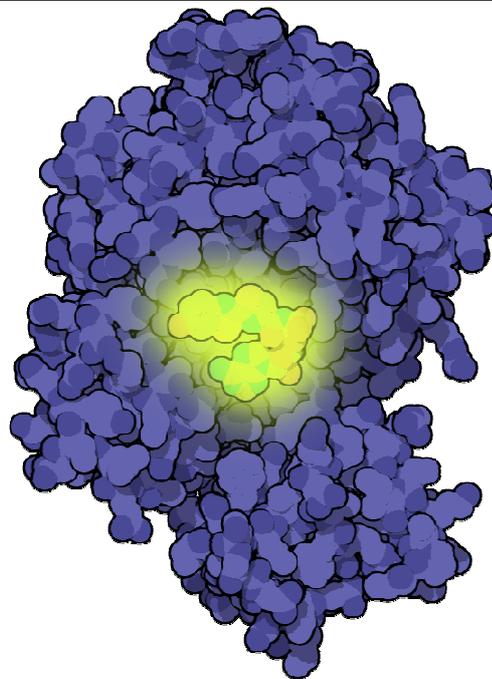
Luciferasi

- Le luciferasi appartengono ad una classe di enzimi redox che hanno affinità diverse per le diverse luciferine:
 - EC 1.13.12.5
 - Renilla-luciferina 2-monoossigenasi; Renilla-type luciferasi; Aequorina; Obelina; Luciferase (Renilla luciferina)
 - EC 1.13.12.6
 - Cipridina-luciferina 2-monoossigenasi; Cipridina-type luciferasi; Luciferasi (Cipridina luciferina); Cipridina luciferasi
 - EC 1.13.12.7
 - Fotinus-luciferina 4-monoossigenasi (ATP-asi); Luciferasi delle lucciole; *Photinus pyralis* luciferasi
 - EC 1.13.12.8
 - Watasenia-luciferina 2-monoossigenasi; Watasenia-type luciferasi
 - EC 1.13.12.13
 - Oploforus-luciferin 2-monoossigenasi; Oploforus luciferasi
 - EC 1.14.99.21
 - Latia-luciferina monoossigenasi (demetilante); Luciferasi (Latia luciferina)

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 21 -



2D1S

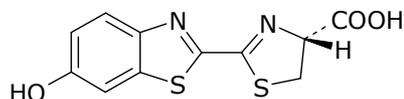
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

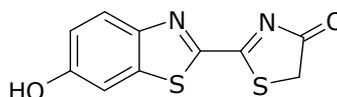
- 22 -

Gruppi prostetici di fotoproteine

- Responsabili dell'emissione di luce sono, generalmente, proteine che permettono l'ossidazione di un gruppo prostetico.
- I gruppi prostetici sono diversi tra i vari organismi, anche se vengono spesso chiamati con lo stesso nome di **luciferina**.



D(-) Luciferina



Ossiluciferina

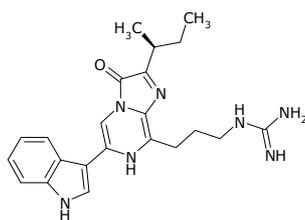
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

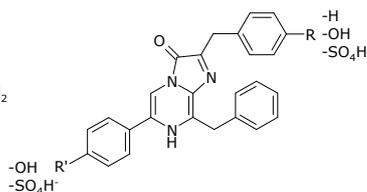
- 23 -

Gruppi prostetici di fotoproteine

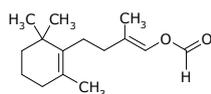
- In mare



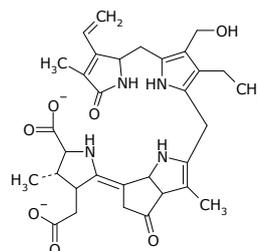
**Cipridina Luciferina
(Vargulina)**



Celenterazine



**Luciferina
di Latia (Latiidae)**



**Luciferina
dei dinoflagellati**

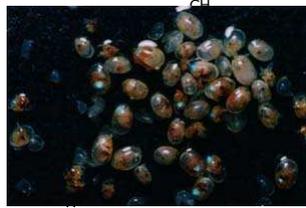
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 24 -

Gruppi prostetici di fotoproteine

- In mare



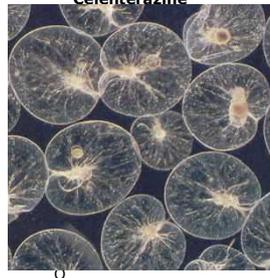
Cypripina Luciferina (Vargulina)



Celenterazine



Luciferina di Latia (Latidae)



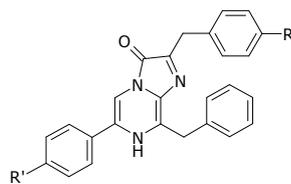
Luciferina dei dinoflagellati

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 25 -

Celenterazine



Origine	R	R'
<i>Renilla kolikeri</i>	-H	-OH
<i>Watasenia scintellans</i>	-OSO ₃ H	-OSO ₃ H
<i>Oplophorus gracilorostris</i>	-OH	-OH

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

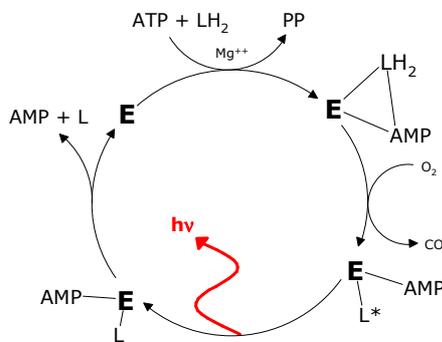
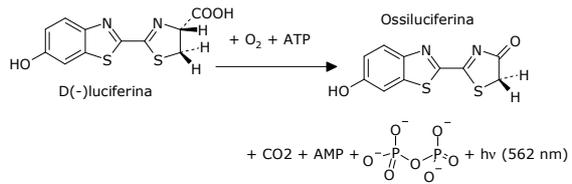
- 26 -



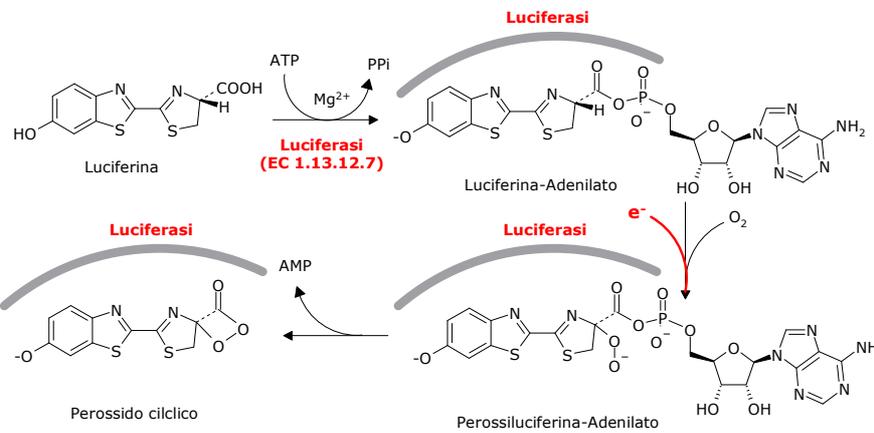
Meccanismo

Bioluminescenza

- In alcune specie l'ossidazione è provocata da una LUCIFERASI ATP dipendente con rilascio di AMP e ossiluciferina.



Sistema luciferina-luciferasi

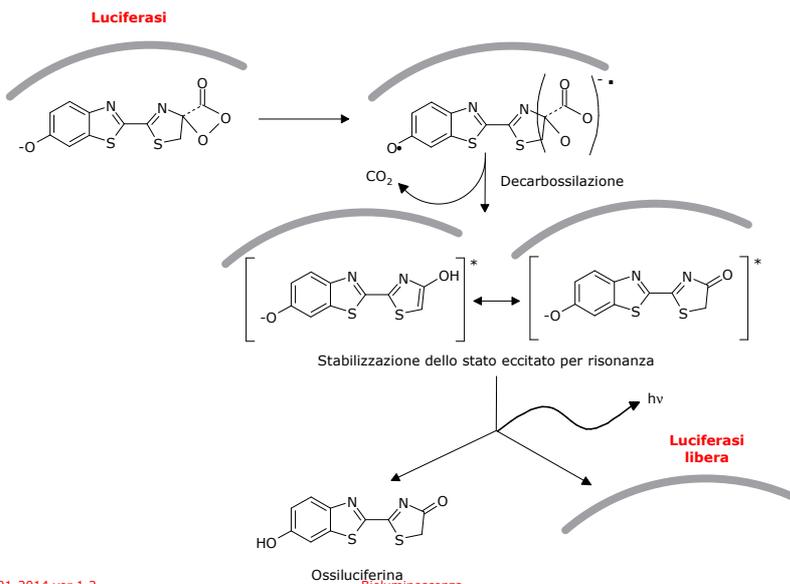


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 29 -

Sistema luciferina-luciferasi



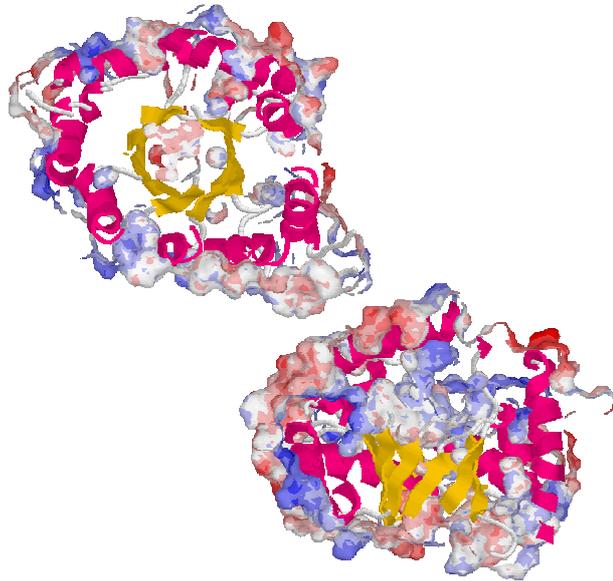
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 30 -

Bioluminescenza

- Il processo ossidativo viene catalizzato da LUCIFERASI che hanno una LUCIFERINA come gruppo prostetico e che utilizzano come sorgenti di elettroni una deviazione della catena respiratoria



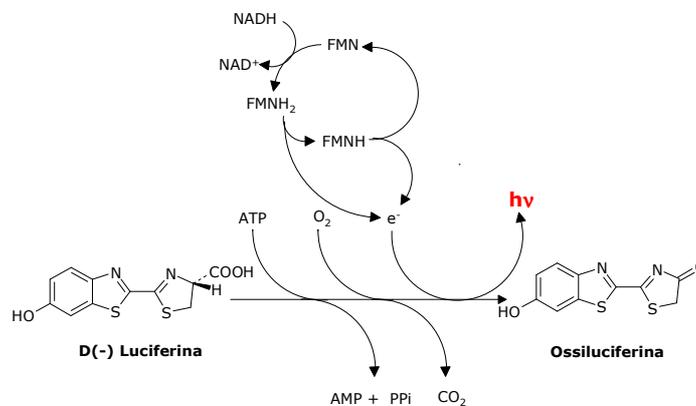
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 31 -

Sistema luciferina-luciferasi

- In alcuni organismi può essere alimentato da elettroni provenienti dalla catena respiratoria batterica, una frazione di e^- viene trasferita dal substrato all'ossigeno.



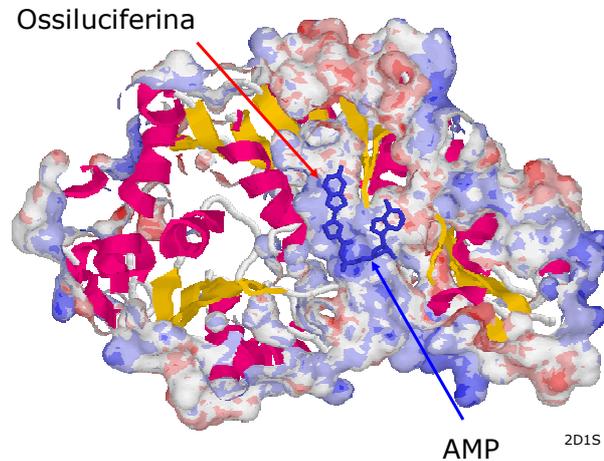
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 32 -

Bioluminescenza

- In alcune specie l'ossidazione è provocata da una LUCIFERASI ATP dipendente con rilascio di AMP e ossiluciferina.



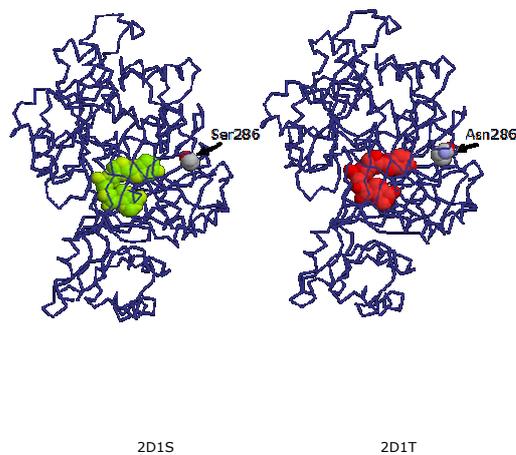
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 33 -

Colori diversi...

- Il "colore" della luce che viene prodotta dalla luciferasi dipende dall'intorno chimico della luciferina.
- La struttura della luciferasi di *Luciola cruciata* (luciolina giapponese, 源氏螢) è riportata a sinistra.
- Normalmente emette luce giallo-verde, la sostituzione di una Serina con una Asparagina in posizione 286 provoca l'emissione di luce rossa.
- Il cambio di colore sembra esser dovuto alla differente struttura III e alla diversa flessibilità intorno alla luciferina.

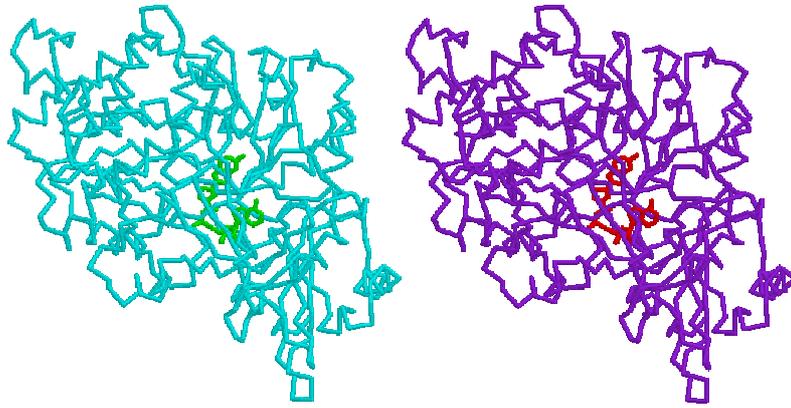


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 34 -

Colori diversi...



2D1S

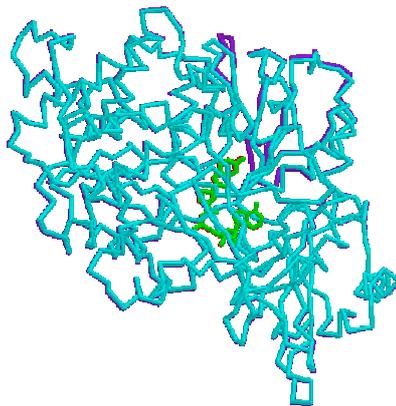
2D1T

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 35 -

Colori diversi...



2D1S

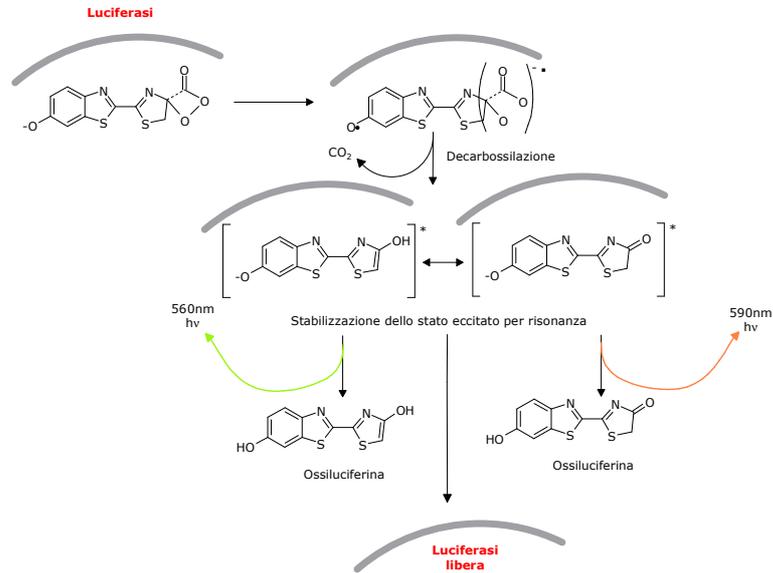
2D1T

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 36 -

Colori diversi...



gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 37 -

Celenterazina

- Un altro gruppo prostetico molto importante nel fenomeno della bioluminescenza di animali marini è la **celenterazina** che emette luce a seguito di un'ossidazione Ca^{2+} dipendente.
- La reazione è catalizzata da un enzima come la obelina (*Obelia geniculata*) o acqueorina (*Aequorea aequorea* e *A. victoria*)

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 38 -

Bioluminescenza da celenterazina

- La bioluminescenza è dovuta ad una ossidazione Ca^{2+} dipendente della celenterazina.
- La reazione è catalizzata da enzimi come la obelina (da ***Obelia geniculata***) o acqueorina (da ***Aequorea aequorea*** e ***A. victoria***).

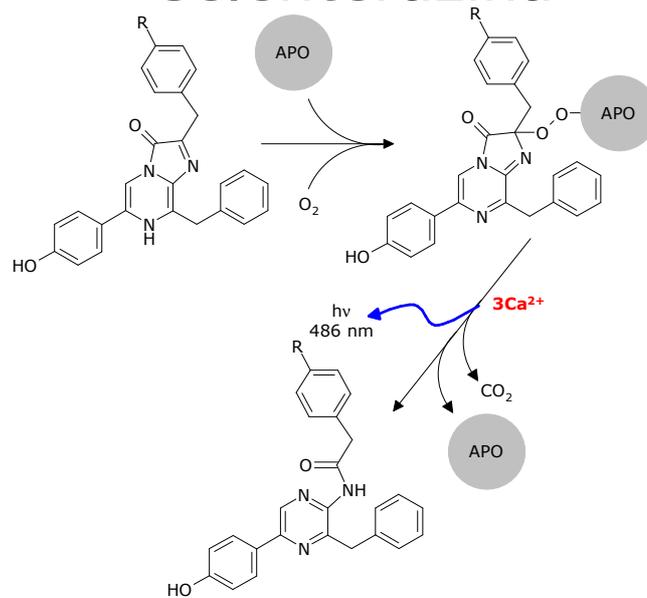


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 39 -

Celenterazina



gs © 2001-2014 ver 1.2

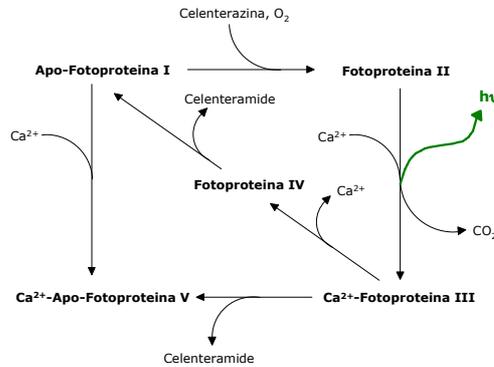
Bioluminescenza

- 40 -

Celenterazina

Stati conformazionali

- I. Apo-proteina,
- II. fotoproteina con legata 2-idroperossicelenterazina in assenza di Ca^{2+} ,
- III. Fotoproteina scarica con legato il prodotto: celenteramide) e Ca^{2+} legato,
- IV. Fotoproteina scarica senza Ca^{2+} ,
- V. Apo-proteina con Ca^{2+} .



DA: All three Ca^{2+} -binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin LU DENG, EUGENE S. VYSOTSKI, SVETLANA V. MARKOVA, ZHI-JIE LIU, JOHN LEE, JOHN ROSE, AND BI-CHENG WANG Protein Science (2005), 14:663-675

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 41 -

Bioluminescenza da celenterazina

B	Aequorin	MISKQYSVKLTSDFDNPFWLGRHKKHFNFLDVNHNOKISLDEMVKASDI	50
	Clytin	MAUTASKYAVKLRNFDFDPKVVNRHKHFNFLDINGDGRITLDEIVSRASDD	52
	Mitroccomin	MSWGSRYAVKLTDFDNPFWIARHKKHFNFLDINGNGQINLNEMVHKASNI	51
	Obelin	MSSKYAVKLTDFDNPFWIKRHKKHFNFLDINGNGKITLDEIVSKASDD	49
		A I B	
	Aequorin	VINNLGATPEQAKRHKDAVEAFPFGGAGMKYGVETDWPATIEGKKLATDELEKYAK	106
	Clytin	ICAKLGATPEQTKRHQDAVEAFPFGKIGMDYKKEVEFPFVDFWKELANYDEKLVWQ	108
	Mitroccomin	ICCKLGATEEQTKRHKCVEDFPFGGAGLEYDKDITWPEYIEGWKRLAKTELELRHSK	107
	Obelin	ICAKLEATPEQTKRHQCVVEAFPFGGAGLEYDKDITWPEYIEGWKRLAKTELELRHSK	105
		C III D	
	Aequorin	NEFTLIRIWCDAFLDIVDKDQNGAITLDEWKA YTRAAGITQSSDCESETRVCDID	162
	Clytin	NKSLTRDWGEAVFDIFDKDGSSTSLDENKAYGRITSGICSDDEAERTEKHCDDLD	164
	Mitroccomin	NQVTLIRIWCDAFLDIVDKDRNGSVSLDENIQYTRCAGIQSSRQCCEATEFHCDDLD	163
	Obelin	NEFTLIREWCDAVFDIFDKDGSCTITLDEWKA YGRITSGISPSQDCEATEFHCDDLD	161
		E III F G	
	Aequorin	ESGQLDVDETRQHILGFWYITMDPACERLYGGAVP	196
	Clytin	NSGKLDVDETRQHILGFWYITLDMADGLYGNFVP	199
	Mitroccomin	GDGKLDVDETRQHILGFWYSVDPTCEGLYGGAVPY	198
	Obelin	NSGDLVDVDETRQHILGFWYITLDFEADGLYGNFVP	195
		IV H	

Structure of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure ZHI-JIE LIU, E.S. VYSOTSKI, CHUN-JUNG CHEN, J.P. ROSE, JOHN LEE, and BI-CHENG WANG Protein Science (2000), 9:2085-2093.

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 42 -

Bioluminescenza da celenterazina

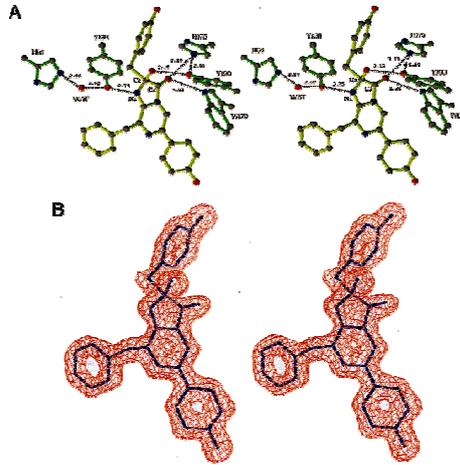


Fig. 3. A: The interaction of the coelenterazine oxygen atoms with the Tyr-His-Tyr triad (residues Y196, H175, W179) and residue Y190. B: A macroscopic view of the fit of the coelenterazine-oxygen molecule to the 3.72 Å simulated annealing $2F_o - F_c$ omit map contoured at 1.5 σ . Note that the electron density next to the C2 position can only be fitted by a single oxygen atom, not by a peroxide group.

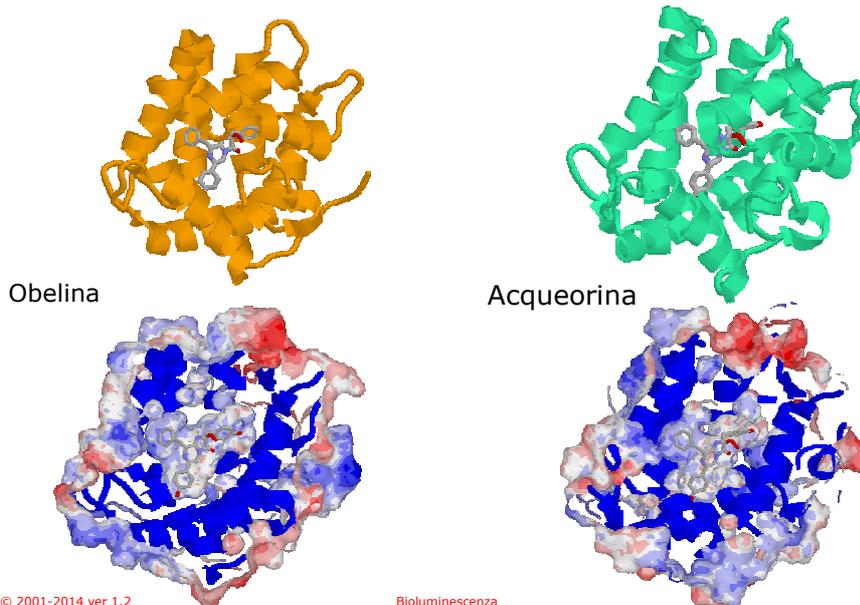
Structure of the Ca21-regulated photoprotein obelina at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure
 ZHI-JIE LIU, E.S. VYSOTSKI, CHUN-JUNG CHEN, J.P. ROSE, JOHN LEE, and BI-CHENG WANG
 Protein Science (2000), 9:2085–2093.

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 43 -

Bioluminescenza da celenterazina



Obelina

Acqueorina

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 44 -

Bioluminescenza da celenterazina

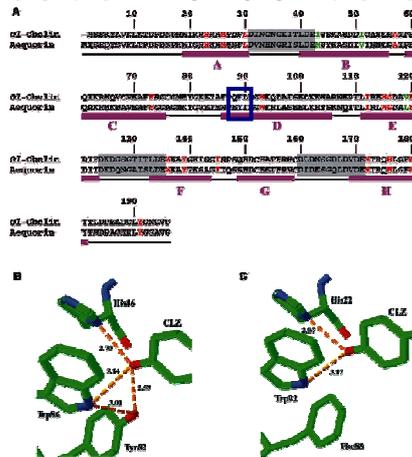


Fig. 1. (A) The sequence alignment of aequorin [9] and obelin [10]. The pink underlines indicate the helices A-H of the EF-hand. The three known Ca^{2+} -binding loops are marked in gray. Strictly conserved residues between aequorin and obelin sequences, which are found in the coelenterazine-binding pocket, are colored in red and variable residues in green and blue. The conserved residues in aequorin and obelin are marked in blue. (B, C) The aequorin (PDB 1LE7) [9] and obelin (PDB 1LE4) [10] spatial structures, respectively, with the 6-(p-hydroxy) phenyl group of coelenterazine (CLZ). The hydrogen bond network shown in brown and blue distances are in Å. The residues of aequorin are numbered according to the three-dimensional structure [9].

Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein
 G.A. Stepanyuk, S. Golz, S.V. Markova, L.A. Frank, J. Lee, E.S. Vysotski
 FEBS Letters 579 (2005) 1008–1014

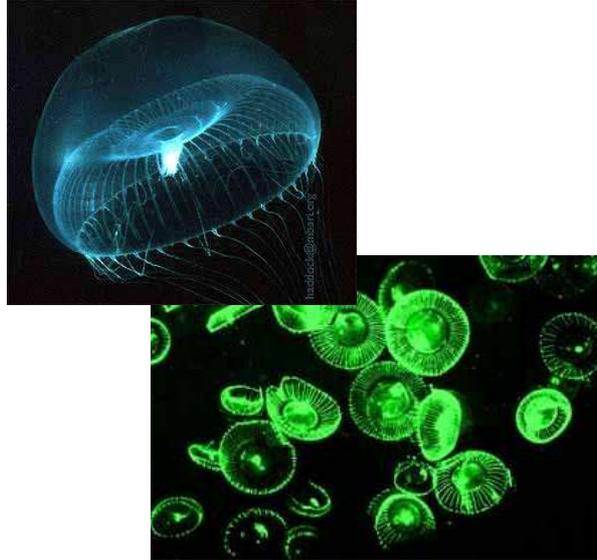
Colori diversi...

- Per *Renilla kolikeri*, *Aequorea aequorea* e *A. victoria* ed altri organismi, vi è una ulteriore complicazione al fenomeno della bioluminescenza.
- Possiedono, oltre ad un proprio sistema luciferina/luciferasi che genera luce blu, anche una proteina fluorescente che permette loro di emettere luce nel verde: la

Green Fluorescent Protein (GFP)

GFP

- La medusa *A. victoria* presenta una curiosa luminescenza verde dovuta ad una proteina con un peculiare gruppo prostetico.
- Tale gruppo prostetico NON emette luce per fenomeni ossidativi ma "cambia" il colore della bioluminescenza.



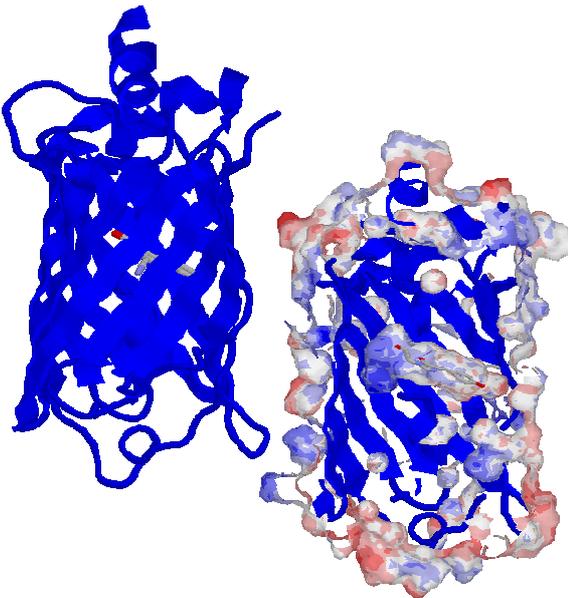
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 47 -

GFP

- La Green Fluorescent Protein ha una struttura "beta can" fatta di 11 β -strands
- Contiene al suo interno una cavità idrofobica con una catena di tre AA (Ser-Tyr-Gly) modificati per formare un fluoroforo caratteristico



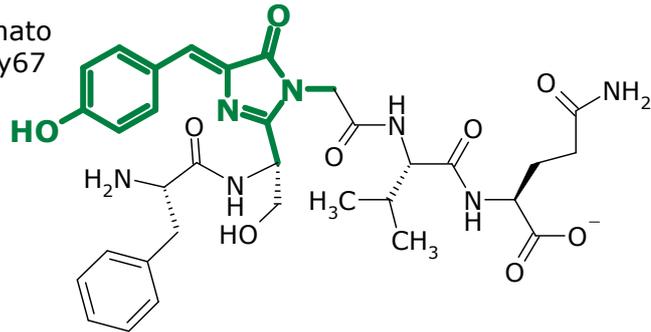
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 48 -

GFP

- Il fluoroforo vero e proprio è formato dall'anello fenolico della Tyr66 connesso con un ponte metilenico all'imidazolo formato dalla Ser 65 e Gly67



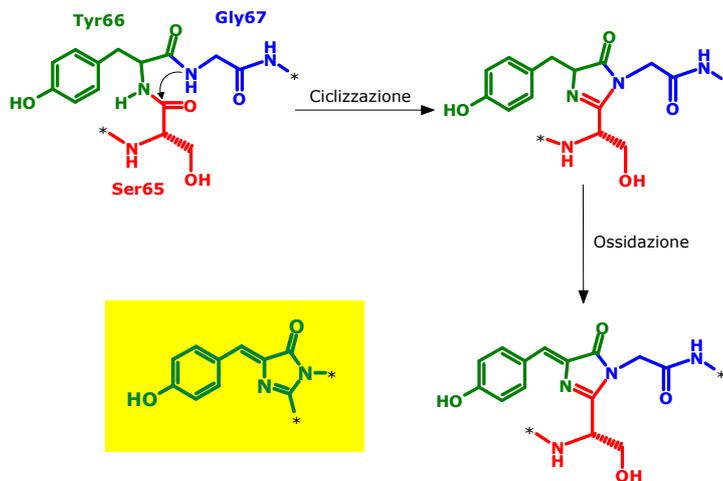
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 49 -

GFP

- Il fluoroforo deriva da una modificazione postraduzionale della proteina.



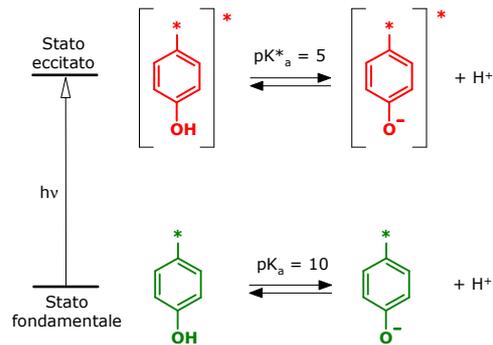
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 50 -

Fotofisica della GFP

- La capacità della GFP di emettere luce verde deriva dalla proprietà della tirosina di avere diversi pK_a di dissociazione dell'OH fenolico allo stato fondamentale e allo stato eccitato:



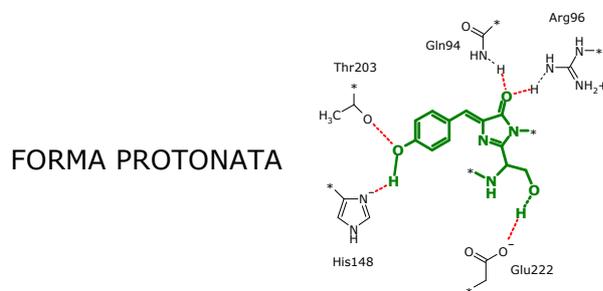
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 51 -

Fotofisica della GFP

- Inoltre, nella GFP la forma deprotonata della Tyr66 è stabilizzata da interazioni con altri residui:
 - Legame idrogeno tra OH fenolico e His 148 e Thr203,
 - Legame idrogeno tra ossigeno carbonilico e Gln94 e Arg96
 - Legame idrogeno tra OH di Ser65 con Glu222

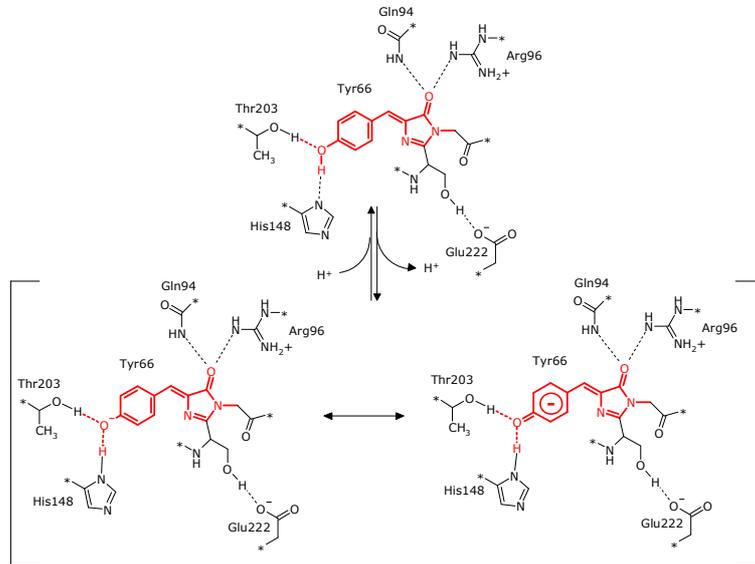


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 52 -

Fotofisica della GFP

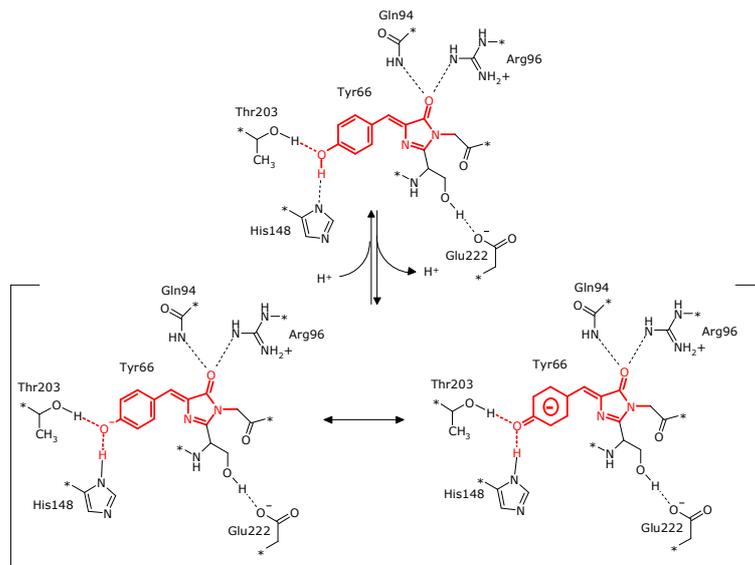


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 53 -

Fotofisica della GFP



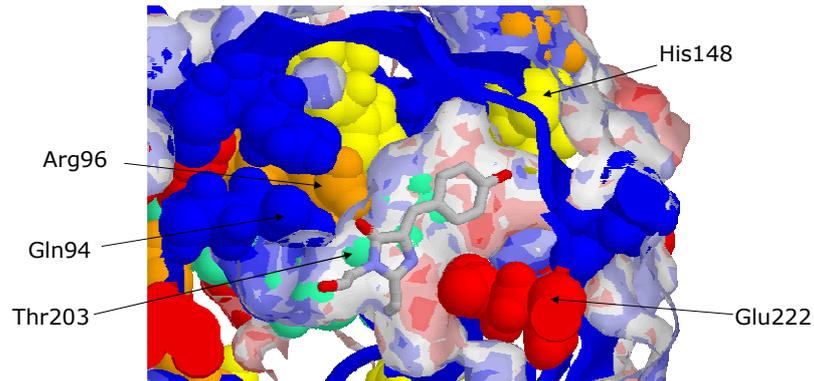
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 54 -

Fotofisica della GFP

- Inoltre, nella GFP la forma deprotonata della Tyr66 è stabilizzata da interazioni con altri residui:
 - Legame idrogeno tra OH fenolico e His 148 e Thr203,
 - Legame idrogeno tra ossigeno carbonilico e Gln94 e Arg96
 - Legame idrogeno tra OH di Ser65 con Glu222

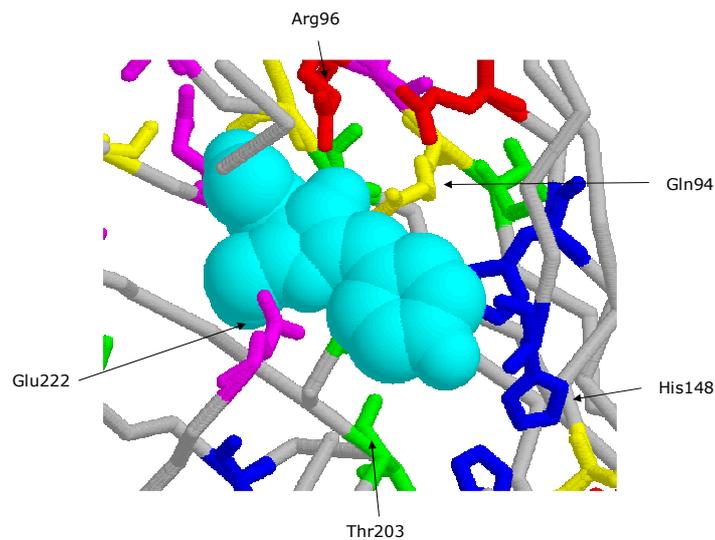


gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 55 -

Fotofisica della GFP



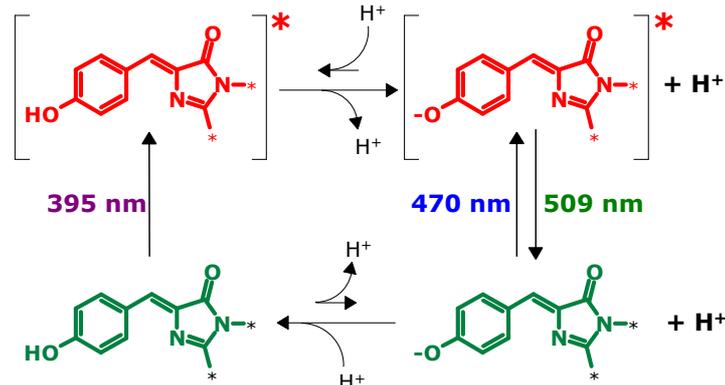
gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 56 -

Fotofisica della GFP

- La capacità di stabilizzare la forma TyrO⁻ rende il fluoroforo della GFP eccitabile a 470 nm (blu) dove emette il sistema luciferina luciferasi della *A. victoria* con emissione verde (509-540nm).



gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 57 -



The Nobel Prize in Chemistry 2008
Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

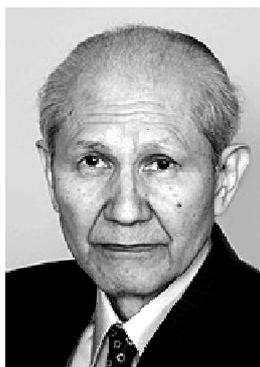


Photo: U. Montan

Osamu Shimomura

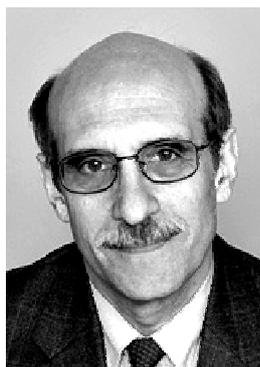


Photo: U. Montan

Martin Chalfie



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien

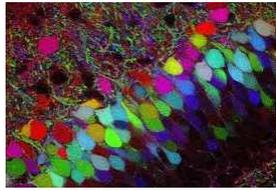
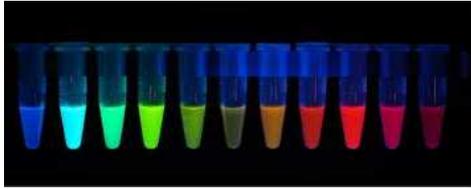
The Nobel Prize In Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 58 -

GFP: applicazioni (!-?)



gs © 2001-2014 ver 1.2

Bioluminescenza

- 59 -

"Il mare appariva come illuminato da sotto la superficie dell'acqua. La luminescenza disegnava sul mare un grande ovale al cui centro sembrava bruciare un falò che andava gradatamente attenuandosi verso le estremità. -Può essere un agglomerato di piccoli animali marini fosforescenti.- osservò un ufficiale..."

(Giulio Verne - 20000 leghe sotto i mari)

