

# Bioluminescenza



Copyright © 2001-2013 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

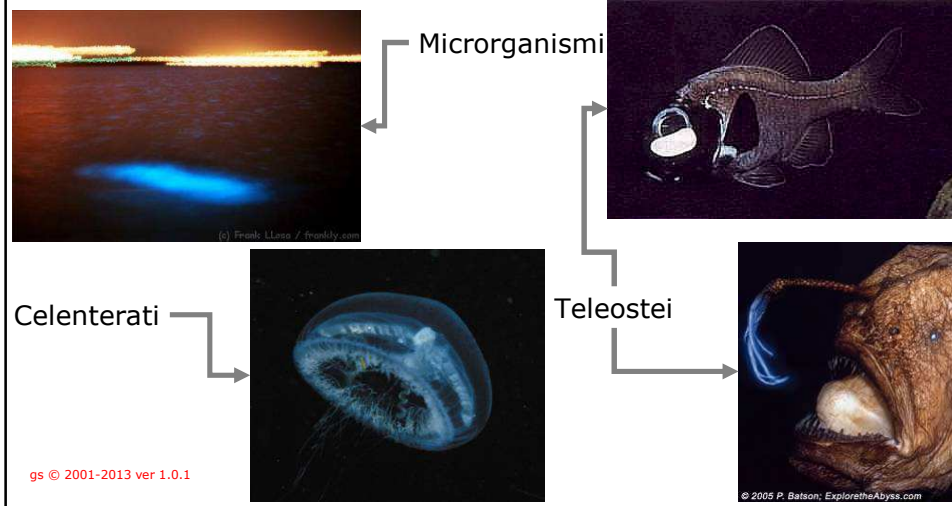
Versione 1.0.1 - nov 2013

## 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.

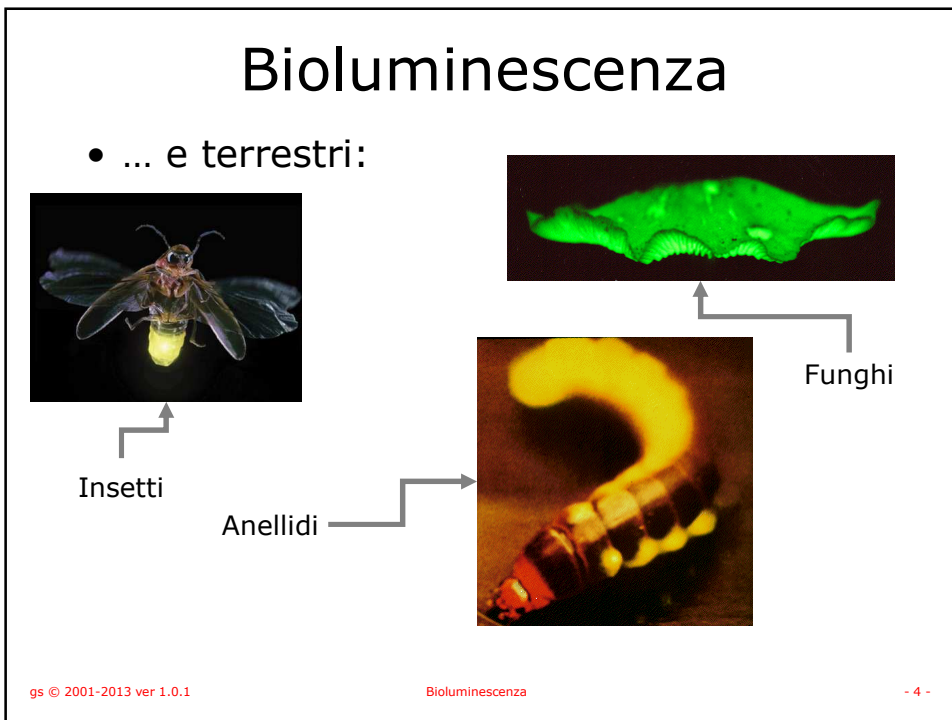
# Bioluminescenza

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

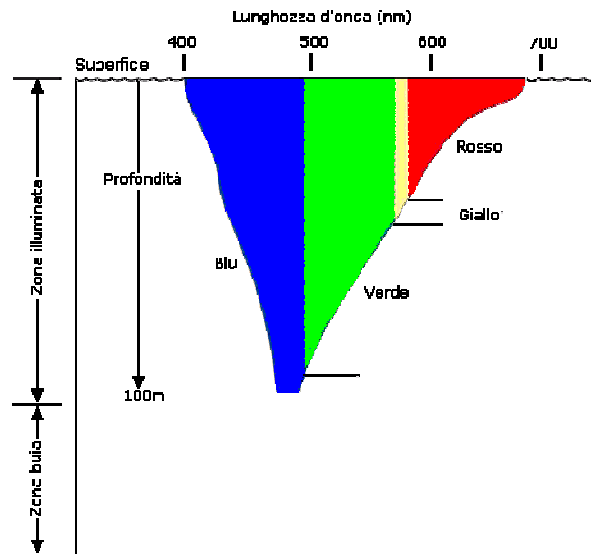


# Bioluminescenza

- ... e terrestri:



## La luce in fondo al mare



## Bioluminescenza

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

# Bioluminescenza

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

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

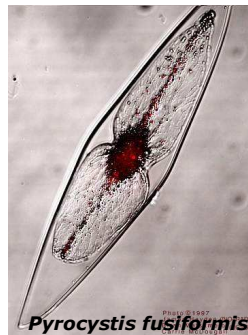
- 7 -

# Organismi marini

- Batteri e protozoi



*Renilla koellikeri*



*Pyrocystis fusiformis*

- Celenterati



*Aequorea victoria*

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

- 8 -

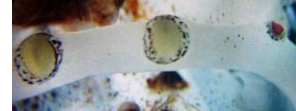
# Organismi marini



[http://www.youtube.com/watch?v=\\_QUt-Rrs6Co](http://www.youtube.com/watch?v=_QUt-Rrs6Co)

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

- Molluschi
  - Cefalopodi



- Crostacei
  - Ostracodi

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 9 -

# Organismi marini

- Teleostei
  - Stomiatoidei
  - Mictofidi



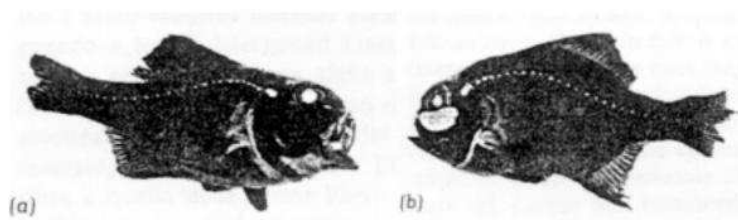
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 10 -

# Photoblepharon

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



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 11 -

# Batteri simbiotici

- Il batterio marino *Vibrio fischeri* in natura esiste allo stato planctonico o come simbiote 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.

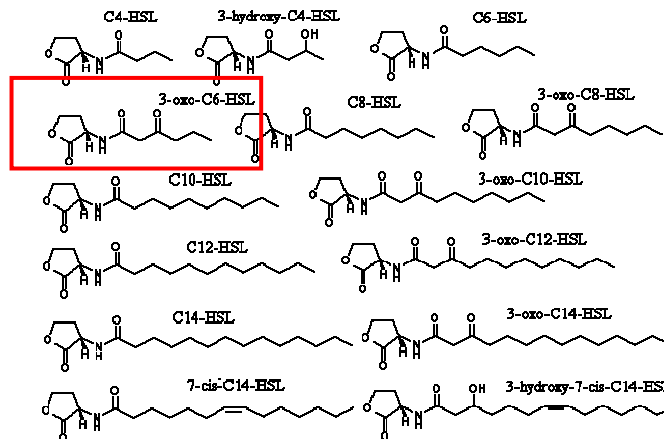


gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 12 -

## N-acyl-L-homoserina lattone (AHL)



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 13 -

## 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 proteina che provocano la bioluminescenza,
- Inoltre il complesso LuxR/AHL provoca la biosintesi di AHL (via LuxI) la cui sintesi viene quindi autoindotta
- Allo stato planctonico i batteri sono "bui" mentre nei fotofori sono luminosi.

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 14 -

# Diversi tipi di luminescenza

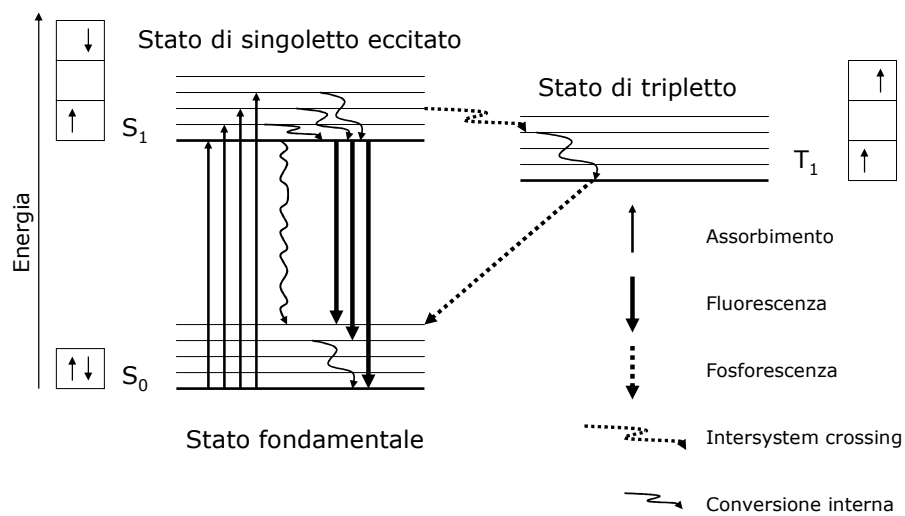
TIPO	CAUSA
Elettroluminescenza	corrente elettrica in gas ionizzato o semiconduttore
Radioluminescenza	materiale radioattivo incorporato nel fosforo
<b>Chemiluminescenza</b>	<b>reazione chimica</b>
<b>Bioluminescenza</b>	<b>reazione enzimatica</b>
Termoluminescenza	temperatura e radioattività
Triboluminescenza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

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 15 -

# Le transizioni elettroniche



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

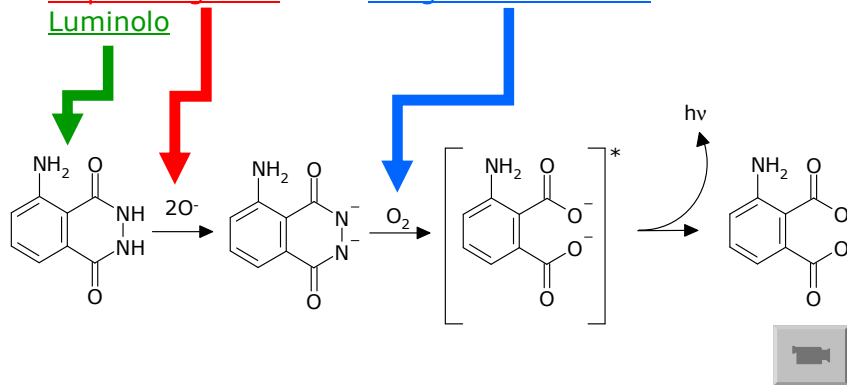
Bioluminescenza

- 16 -



# 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 Luminolo



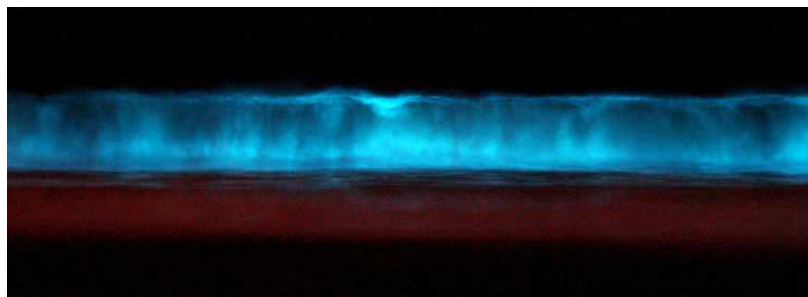
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 17 -

# Bioluminescenza

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



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 18 -

# 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)

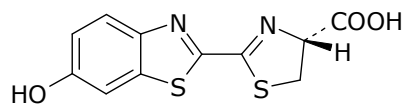
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

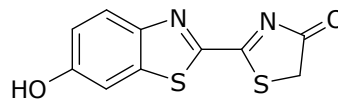
- 19 -

# 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**

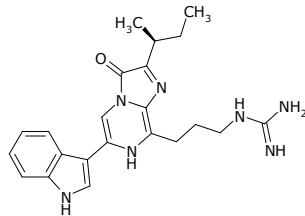
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

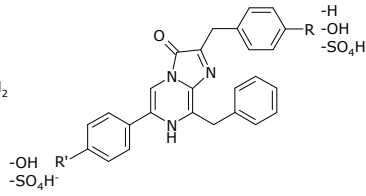
- 20 -

# Gruppi prostetici di fotoproteine

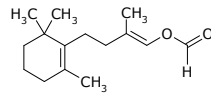
- In mare



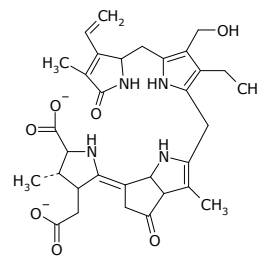
**Cipridina Luciferina (Vargulina)**



**Celenterazine**



**Luciferina di Latia (Latiidae)**



**Luciferina dei dinoflagellati**

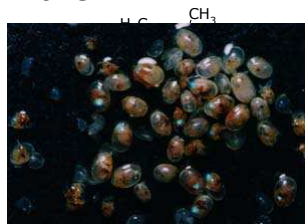
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

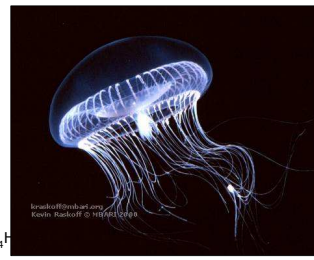
- 21 -

# Gruppi prostetici di fotoproteine

- In mare



**Cipridina Luciferina (Vargulina)**



**Celenterazine**



**Luciferina di Latia (Latiidae)**



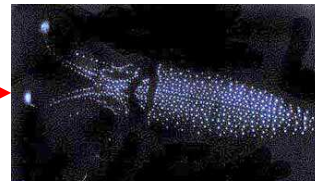
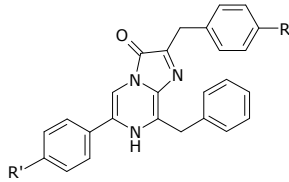
**Luciferina dei dinoflagellati**

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 22 -

# Celenterazine



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

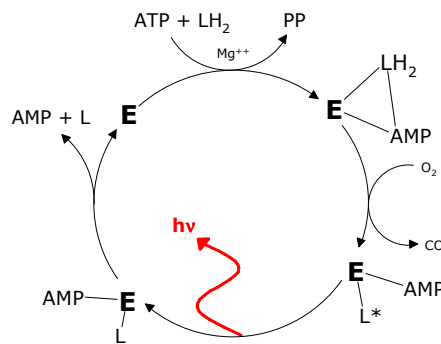
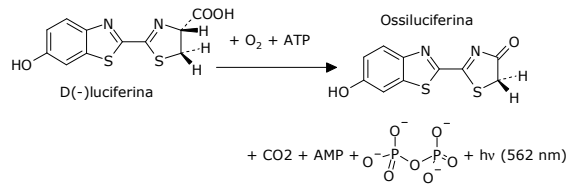
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

23 -

# Bioluminescenza

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

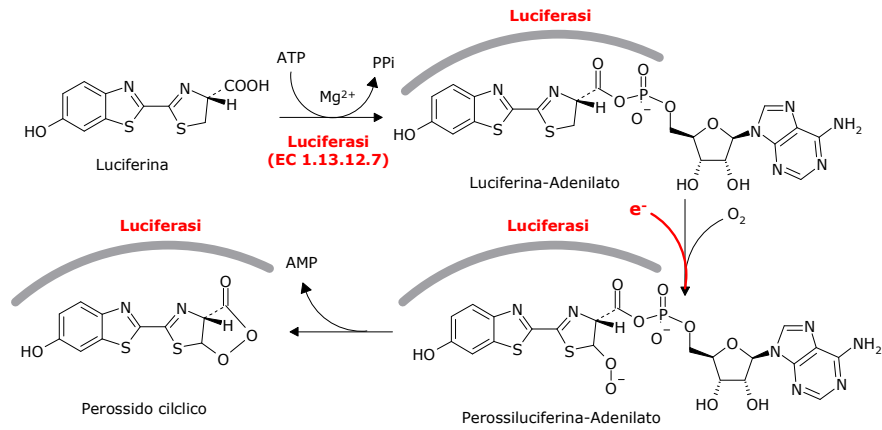


gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 24 -

# Sistema luciferina-luciferasi

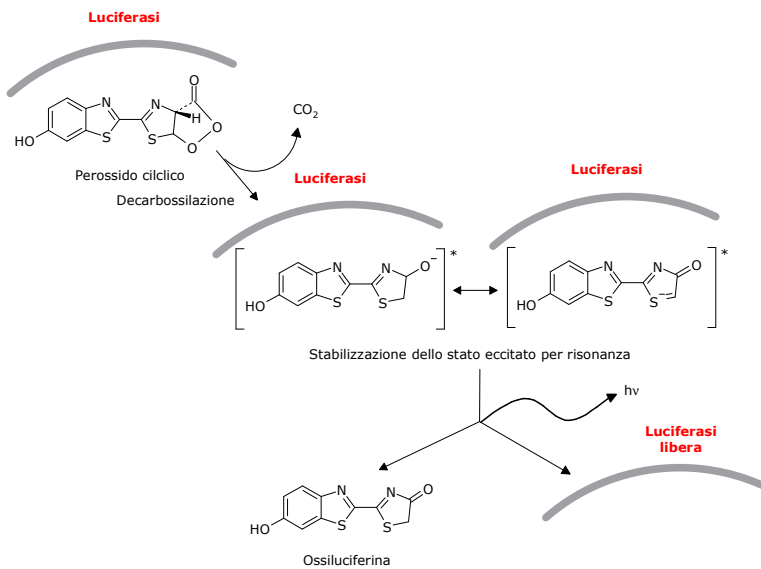


gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 25 -

# Sistema luciferina-luciferasi



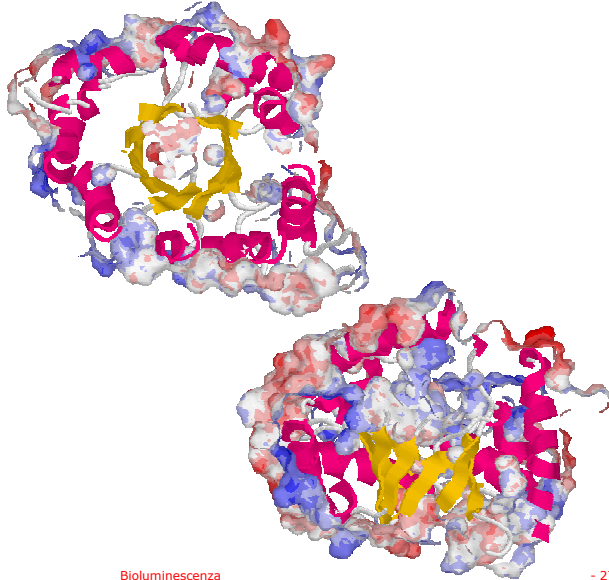
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 26 -

## 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



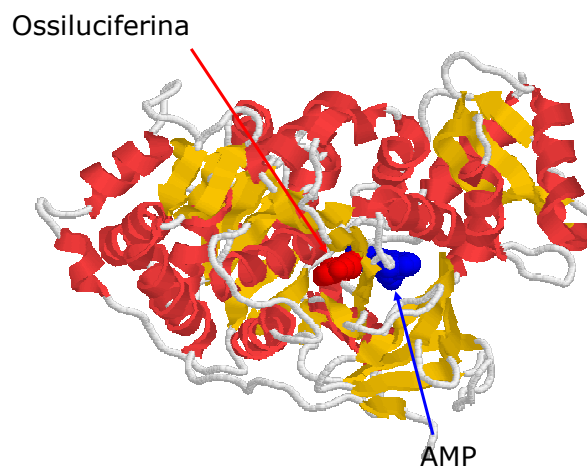
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 27 -

## Bioluminescenza

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



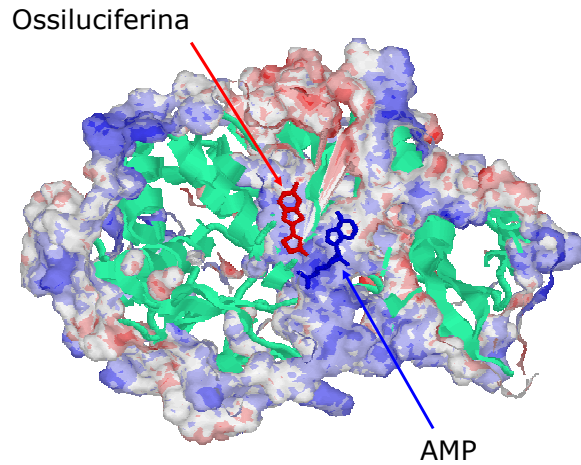
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 28 -

# Bioluminescenza

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



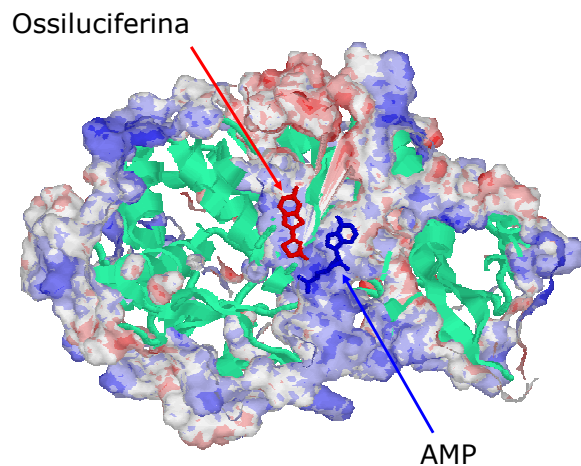
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 29 -

# Bioluminescenza

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



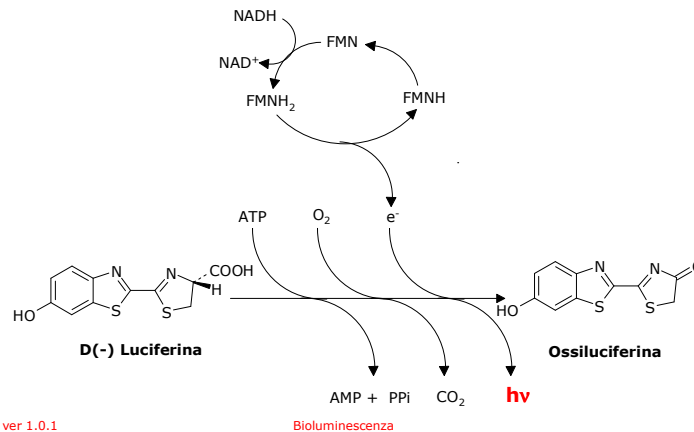
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 30 -

## 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.

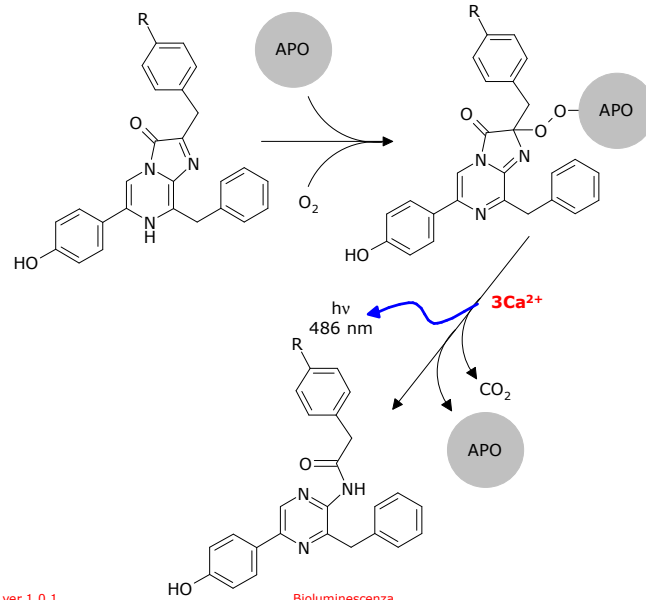


## Celenterazina

- 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*)



## Celenterazina



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 33 -

## Bioluminescenza da celenterazina

- In alcuni animali mari 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*).



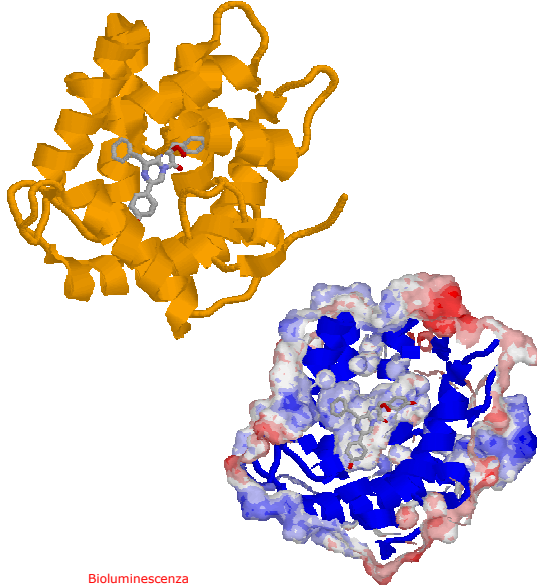
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 34 -

## Bioluminescenza da celenterazina

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



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 35 -

## Bioluminescenza da celenterazina

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



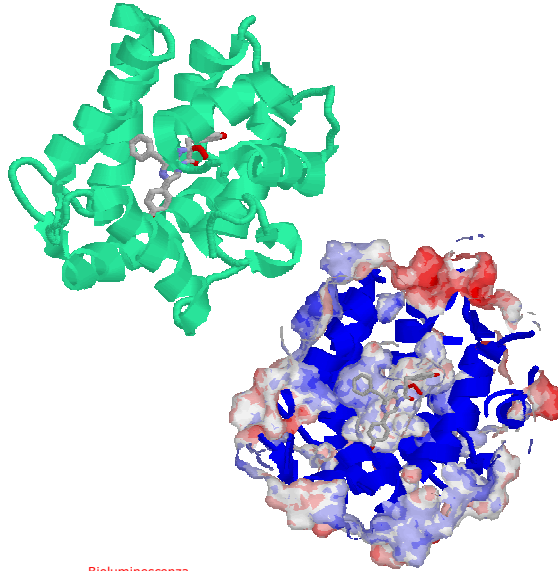
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 36 -

## Bioluminescenza da celenterazina

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



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 37 -

## 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).**

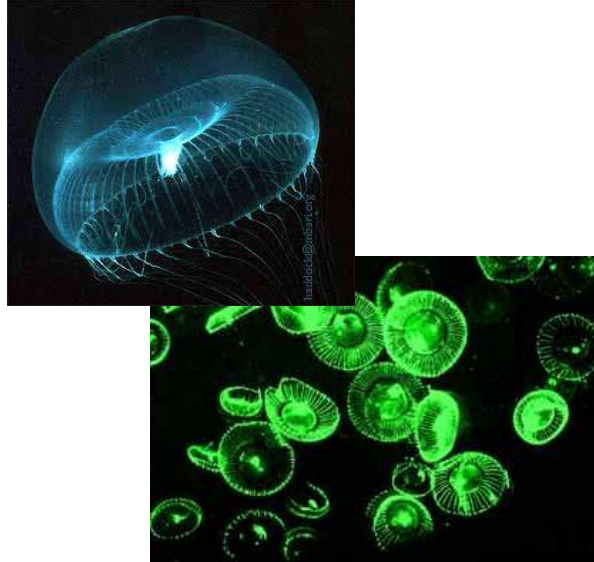
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 38 -

## 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.



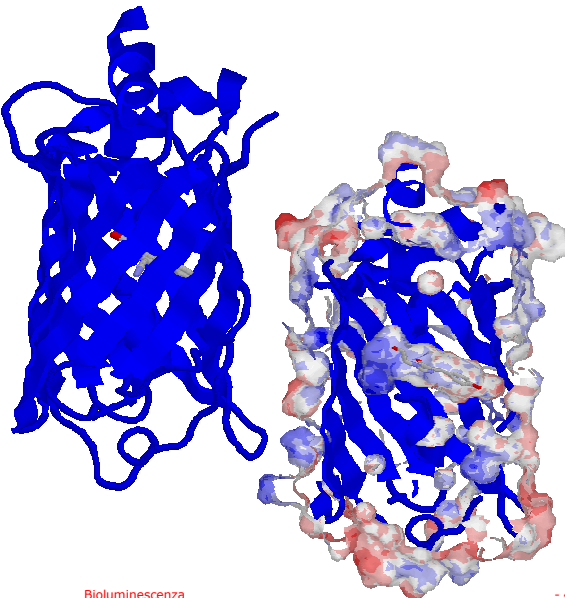
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 39 -

## GFP

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



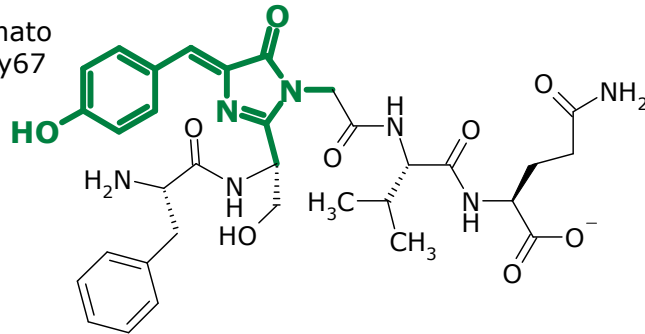
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 40 -

# 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



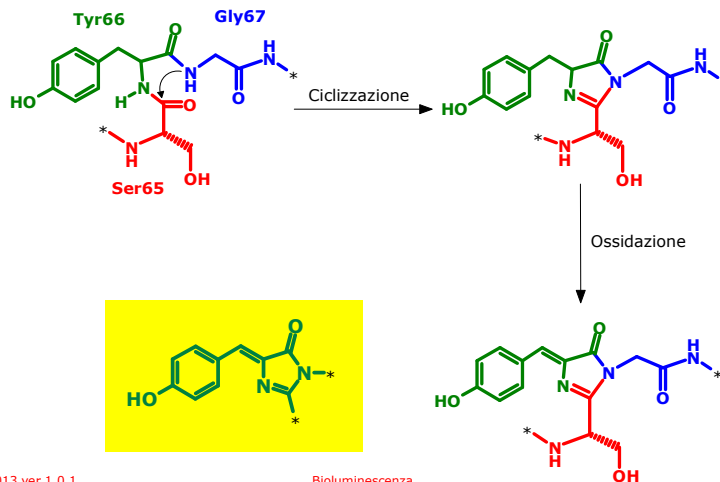
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 41 -

# GFP

- Il fluoroforo deriva da una modificazione postraduzionale della proteina.



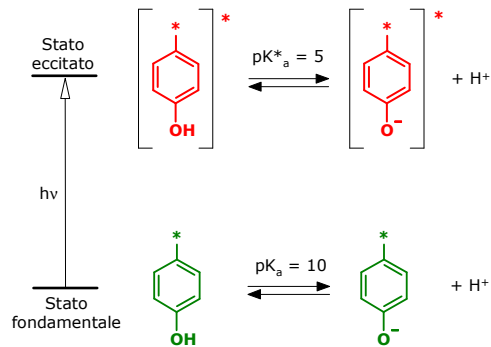
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 42 -

# 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 © 2001-2013 ver 1.0.1

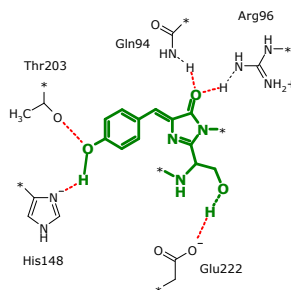
Bioluminescenza

- 43 -

# 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

FORMA PROTONATA

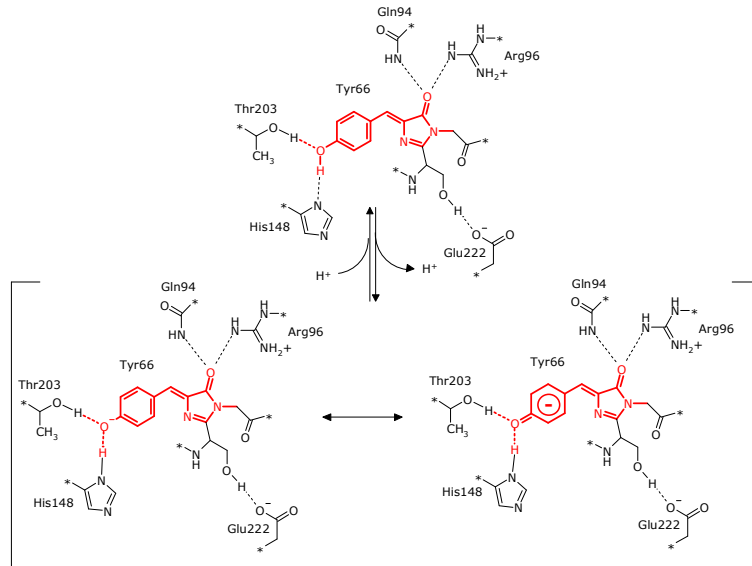


gs © 2001-2013 ver 1.0.1

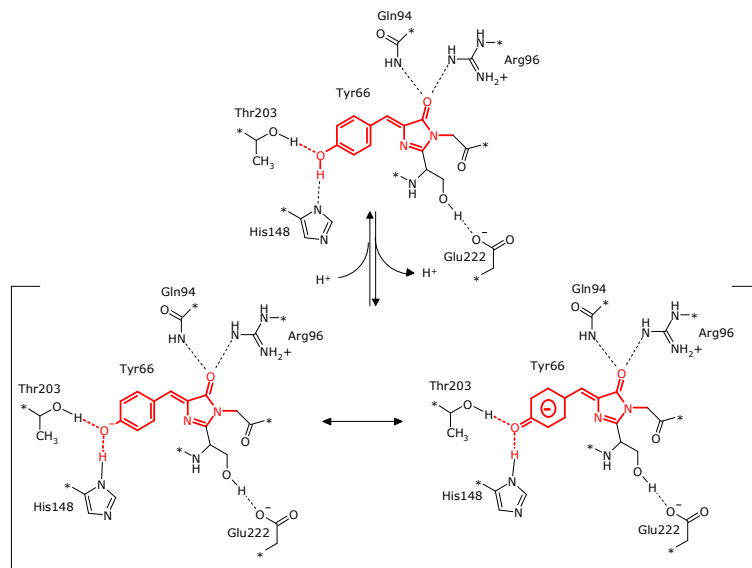
Bioluminescenza

- 44 -

# Fotofisica della GFP

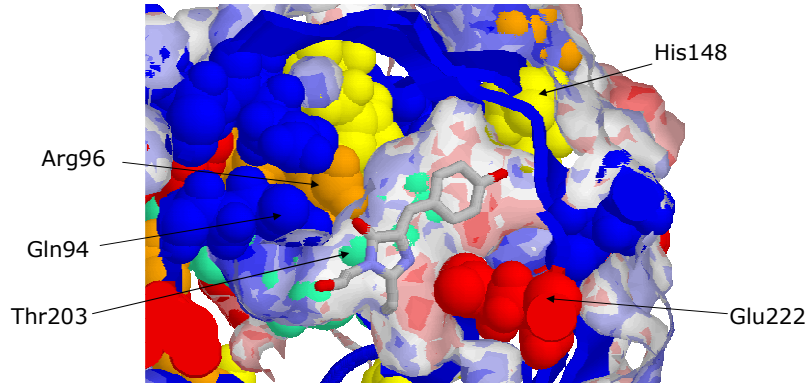


# Fotofisica della GFP



## 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

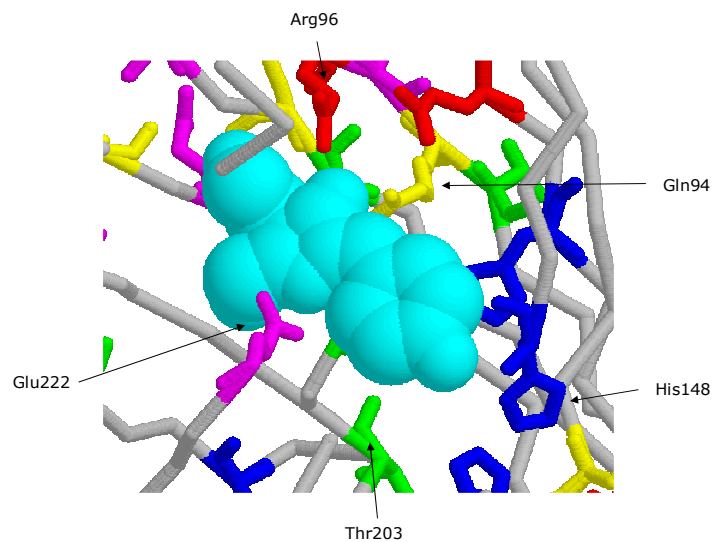


gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 47 -

## Fotofisica della GFP



gs © 2001-2013 ver 1.0.1

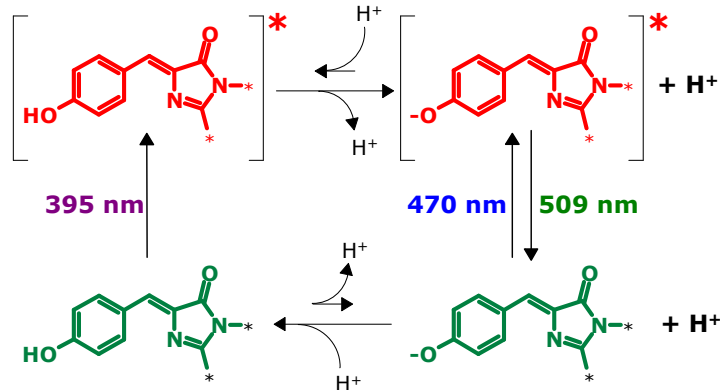
Bioluminescenza

- 48 -



# Fotofisica della GFP

- La capacità di stabilizzare la forma TyrO<sup>-</sup> 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 © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 49 -



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

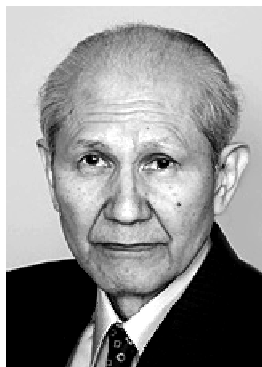


Photo: U. Montan

Osamu Shimomura

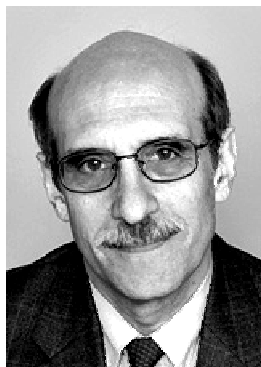


Photo: U. Montan

Martin Chalfie



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien

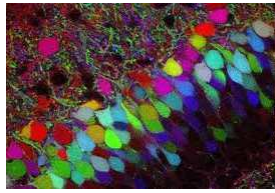
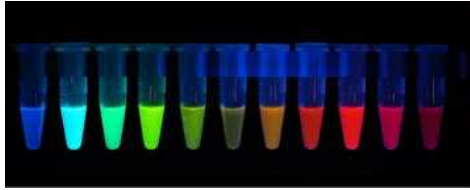
The Nobel Prize In Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 50 -

## GFP: applicazioni (!?)



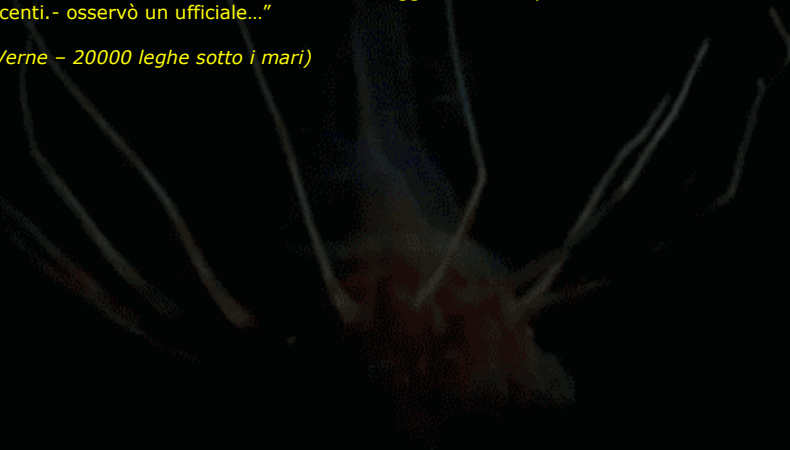
gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 51 -

"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)*



## Referenze sul WEB

- Siti interessanti per il fenomeno della bioluminescenza:
  - [The Bioluminescence Web Page](#) Latz Laboratory of Scripps Institution of Oceanography
  - [Bioluminescence Studies Research and Resources](#), Department of Biochemistry & Molecular Biology, The University of Georgia
  - [Harbor Branch Oceanographic](#)
- Interessanti immagini di organismi marini bioluminescenti sono reperibili a:
  - [Zooplankton in the Open Ocean](#)
  - [Harbor Branch Oceanographic](#)
  - [www.biobay.com](#)
- Le coordinate delle strutture proteiche sono reperibili presso la [Protein Data Bank](#)
- Dettagliate e più estensive trattazioni sulla struttura della GFP e sulla sua fotofisica sono rintracciabili a:
  - [Structure and Function of Green Fluorescent Protein](#)
  - [Unraveling the mysteries of the Green Fluorescent Protein](#)

gs © 2001-2013 ver 1.0.1

Bioluminescenza

- 53 -

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:  
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)