

## Photobiologie

# Die bakterielle Biolumineszenz

Lumineszierende Bakterien findet man in den verschiedensten ökologischen Nischen, die meisten Arten kommen jedoch im Meerwasser vor. Einige Arten bevorzugen eine symbiotische Lebensweise und verhalten damit bestimmten, in der Tiefsee lebenden Fischen (Knochenfische) zu einer biologisch vielfältig „nutzbaren“ Lichtquelle (sekundäre Leuchten); andere leben frei im Salzwasser. Welchen Vorteil haben die im Salzwasser lebenden Bakterien von ihrer Fähigkeit zur Lichtemission? Eine häufig gestellte Frage, die seit der Entdeckung der bakteriellen Biolumineszenz immer wieder Anlaß zu Spekulationen und Untersuchungen war. Es trifft übrigens keinesfalls zu, daß Bakterien, die biolumineszieren können, ständig Licht emittieren. Nur wenn die Konzentration eines bestimmten Botenstoffes, eines „Autoinducers“, eine bestimmte Konzentration erreicht hat, beginnen die Bakterien mit der de-novo-Synthese des gesamten benötigten Enzymapparates. Im Falle von *Vibrio fischeri* ist die Struktur dieses „bakteriellen Pheromons“ als *N*-( $\beta$ -Ketocaproyl)homoserin ermittelt worden. Im Meer wird die kritische Konzentration in seltenen Fällen und nur dann erreicht, wenn die zur Verfügung stehenden Substrate (Nahrung) eine ausreichende Zelldichte zulassen. Wachsen die Bakterien dagegen symbiotisch, so kommt es zur „autoinduzierten“ Biolumineszenz.

Die Vorteile der Biolumineszenz für den Wirtsorganismus sind vielfältig (Kommunikation, Flucht, Beutefang), doch darauf soll im Rahmen dieses Artikels nicht eingegangen werden, da dieses Thema in der Spezialliteratur ausreichend behandelt wird<sup>1)</sup>. Welche Vorteile die Lichtemission dem Bakterium selbst einbringt, darüber kann nur spekuliert werden. Es ist denkbar, daß durch das Lumineszieren einer Bakterienkultur Koprophenen angelockt werden, die durch Aufnahme der Bakterien zu deren Verbreitung beitragen (kommensalistische Lebensweise!). Andere Vermutungen zielen in eine völlig andere Richtung und leiten sich von der Gesamtbilanz der Biolumineszenzreaktion ab:

$$\text{NAD(P)H} + \text{R-CH=O} + \text{O}_2$$

$$\downarrow \begin{array}{l} \text{Reduktase,} \\ \text{Luciferase, FMN} \end{array}$$

$$\text{NAD(P)}^+ + \text{R-COOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{h}\nu$$

Danach wäre es denkbar, daß das Licht nur als „Nebenprodukt“ bei bestimmten

Oxidationsreaktionen anfällt, welche Reaktionen mit molekularem Sauerstoff beinhalten<sup>2)</sup>. Somit könnte die obige Reaktion ursprünglich bei der Beseitigung von für diese Organismen giftigem Disauerstoff eine Rolle gespielt haben; die Lichtemission wäre heute nur noch als Relikt dieser Funktion anzusehen.

Bemerkenswert ist der Unterschied zwischen der bakteriellen Biolumineszenz und allen anderen biolumineszierenden Systemen insofern, als im ersten Fall die Übertragung von Redoxäquivalenten von NAD(P)H via Flavin zum „Endacceptor“ Sauerstoff praktisch einen „Kurzschluß“ der für den Aufbau von ATP funktionierenden Atmungskette bedeutet (Abbildung 1). Unter ungünstigen Umweltbedingungen (Mangel an Eisen oder geringe Sauerstoffkonzentration), wenn die Atmungskette in ihren Funktionen ausfällt, kann ein biolumineszierendes Bakterium durch Verwendung der Luciferase als terminale Oxidase weiterhin – wenn auch weniger – metabolisch verwertbare Energie produzieren. Diese Fähigkeit könnte einen ausgezeichneten Selektionsvorteil gegenüber Bakterien darstellen, die unter diesen ungünstigen Bedingungen auf die Atmungskette angewiesen sind.

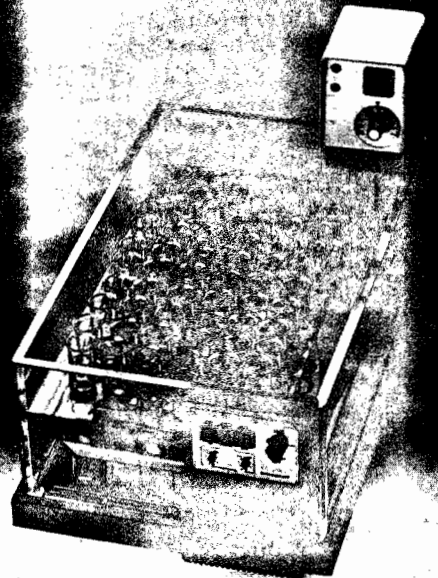
## Der Enzymapparat der Biolumineszenz *in vivo*

Die bekannten, lumineszierenden Bakterien sind kürzlich zu den Gattungen *Photobacterium*, *Vibrio*, *Altermonas* und *Xenorhabdus* umklassifiziert worden<sup>3)</sup>. Die am besten untersuchten Spezies sind sicher die beiden erstgenannten, in welchen die in Abbildung 2 dargestellten Reaktionen für die Biolumineszenz verantwortlich sind.

Dieses System ist in vielerlei Beziehungen bemerkenswert. Flavine, als FMN- oder FAD-Derivate, spielen in allen bekannten enzymatischen Systemen die Rolle einer prosthetischen Gruppe, d. h. sie sind entweder kovalent an das Protein gebunden oder binden mit so kleinen Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ), daß die Dissoziation während des katalytischen Vorganges vernachlässigbar ist (kinetisch sehr langsame Bindungs/Dissoziationsschritte). Im vorliegenden Fall hingegen (Abbildung 2) ist FMN einerseits Substrat der FMN-Reduktase, andererseits ist reduziertes FMN ( $\text{FMN}_{\text{red}}\text{H}^-$ ) (1) ein Co-Substrat der Luciferase und kann somit im

In vieler Hinsicht unvergleichlich.

## Electronicruhrer



Ein Beispiel:  
 10 Liter Wasserbad mit  
 6, 15 oder 60 Rührstellen  
 für  
 Mischen und  
 Temperieren im  
 Wasserbad

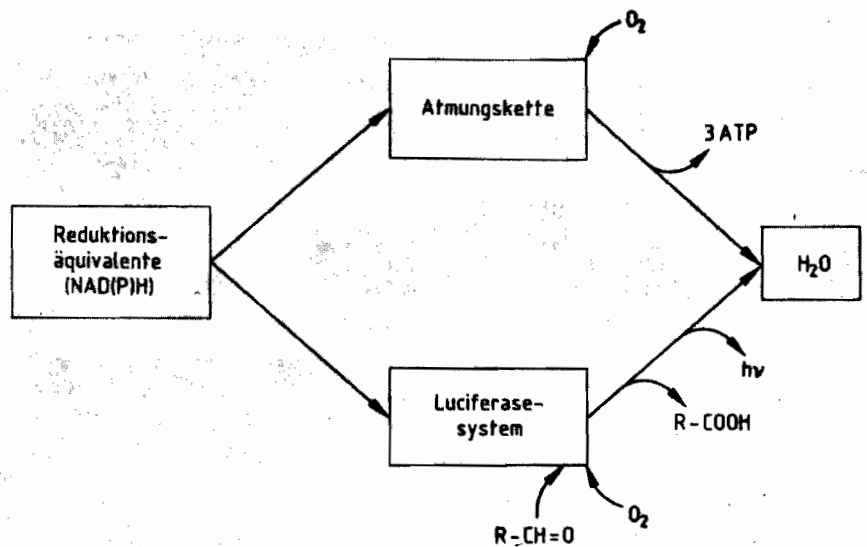
- transparentes Wasserbad mit 6, 15 oder 60 Rührstellen
- maximale Rührhöhe durch Wannensboden aus Edelstahl
- effektives Mischen und Temperieren ohne aufwendige Schüttleinrichtung
- motorlos, verschleißfrei und wasserdicht
- nur ebene Flächen, leicht zu reinigen
- frei wählbare Rühr- und Pausenzeiten
- Sicherheit durch Schutzkleinspannung
- echte elektronische Vielfach-Rührsysteme, weltweit die Nummer 1

**Dr. Hoiss + Partner GmbH**  
 Triebstraße 9 · D-8000 München 50  
 Telefon: (089) 14 60 61/62  
 Telex: 17 898 152 = HPSco  
 Teletex: 89 81 52 = HPSco

klassischen Sinne als ein Luciferin angesehen werden.

Die Definition der Begriffe „Luciferin“ und „Luciferase“ geht auf Dubois (1887) zurück: Demnach sind für die Lichtemission eine hitzlabile (nach heutiger Erkenntnis ein Enzym) und eine wasserlösliche, hitzestabile Komponente (Substrat, das Luciferin) erforderlich. Die bakterielle Luciferase ist ein Heterodimeres, dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 41 000 und 38 000 besitzen. Im Falle von *Vibrio harveyi* stellt die Luciferase ca. 5 % des gesamten, löslichen Proteingehaltes der Zelle. Das Enzym aus dem *Vibrio harveyi*-Strang M17 ist kürzlich in *E. coli* kloniert worden<sup>1)</sup>. Die Klone sind im Normalzustand dunkel, leuchten aber nach Zugabe von langkettigen Aldehyden auf wie die *Vibrio*-Wildtypen während ihres normalen Wachstums. Die Gencodierung und die Sequenz des Enzyms sind ebenfalls bekannt. Das Enzym aus *V. harveyi* ist kristallisiert worden, und aus der z. Z. laufenden Strukturaufklärung verspricht man sich einen Durchbruch im Verständnis der weiter unten besprochenen Mechanismen der Luciferase-Reaktion. Das reduzierte FMN soll an die kleinere Untereinheit binden, während die größere das eigentliche katalytische Zentrum enthält. Langkettige Aldehyde werden als Substrate gebunden; das effizienteste Substrat ist Tetradecanal<sup>5)</sup>.

Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ( $\lambda_{max} \sim 490 \text{ nm}$ ) *in vitro* entspricht einer Energie von ca.  $60 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $= 240 \text{ kJ} \cdot \text{Einstein}^{-1}$ ). Die in der Gesamtbilanz für die Emission eines Lichtquants theoretisch erforderlichen Moleküle – zwei NAD(P)H und ein ATP – sind für diesen Energiebetrag mehr als genug. Andererseits beträgt die Quantenausbeute der Lichtemission *in vitro*<sup>6)</sup> „nur“ 0,1 bis 0,15. Wenn dies *in vivo* auch zuträfe, hätte es zur Folge, daß die Zelle 50 bis 60 ATP-Äquivalente für die „Produktion“ eines Lichtquants aufbringen müßte. Neuere Schätzungen<sup>7)</sup> deuten jedoch darauf hin, daß die Quantenausbeute der Lichtemission *in vivo* nahe eins kommen muß. Demnach würde ein Bakterium ungefähr 20 % der metabolisch bereitgestellten Energie für die Erzeugung von Licht aufwenden. Eine so hohe Quantenausbeute wird u. a. auch durch spezielle „Fluoreszenz“- oder „Sensitizer“-Proteine ermög-



licht. Solche Proteine sind vermutlich nicht obligate Komponenten eines biolumineszierenden Systems und bisher nur in wenigen Bakteriensträngen nachgewiesen worden. Drei solcher Proteine sind kürzlich isoliert und teilweise charakterisiert worden. Zwei haben ein relativ niedriges Molekulargewicht ( $M_r \sim 20\,000$ ) und enthalten ein Lumazin bzw. ein Flavinderivat als Chromophor. Sie induzieren die Emission von blauem ( $\lambda_{max} \sim 472 \text{ nm}$ ) bzw. von gelbem Licht ( $\lambda_{max} \sim 545 \text{ nm}$ ), weshalb man sie als BFP (Blue Fluorescent Protein) und YFP (Yellow Fluorescent Protein) bezeichnet (Abbildung 2).

Abb. 1. Korrelation von „Atmungskette“ und Luciferasesystem in lumineszierenden Bakterien.

und wie wird gegebenenfalls die Anregung auf die „Sensitizer“-Proteine übertragen?

● Die Aktivierung von molekularem Sauerstoff

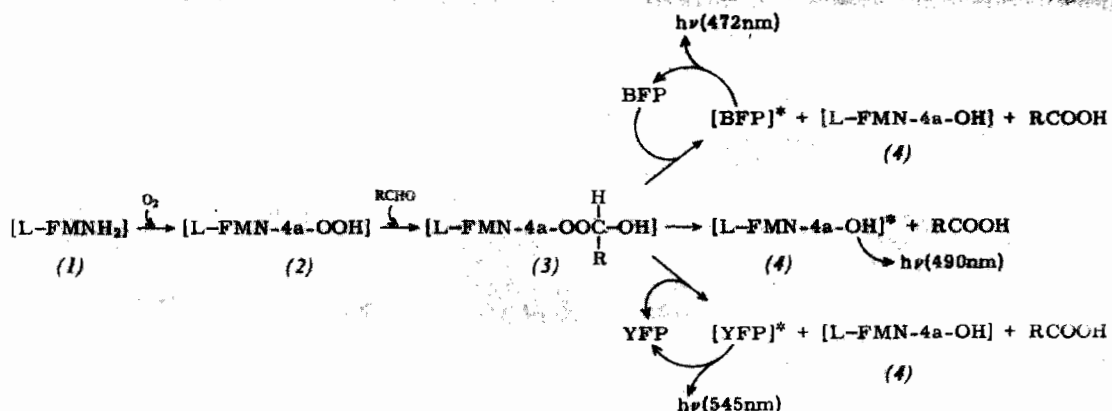
Die Aktivierung von  $O_2$  durch das reduzierte Flavin ist ein Prozeß von grundlegender biochemischer Bedeutung, welcher nicht nur im Zusammenhang mit dem Mechanismus der bakteriellen Biolumineszenz relevant ist. Untersuchungen darüber sind Hand in Hand mit Studien an der bakteriellen Luciferase vorangetrieben worden. Der erste, strukturell eindeutige Nachweis des metastabilen Primäradduktes von  $O_2$  an reduziertes Flavin gelang bezeichnenderweise an diesem Enzym. Die Schwierigkeiten dieses Unterfangens werden verdeutlicht, wenn man bedenkt, daß für diese Spezies in den siebziger Jahren von verschiedenen Laboratorien nicht weniger als acht unterschiedliche

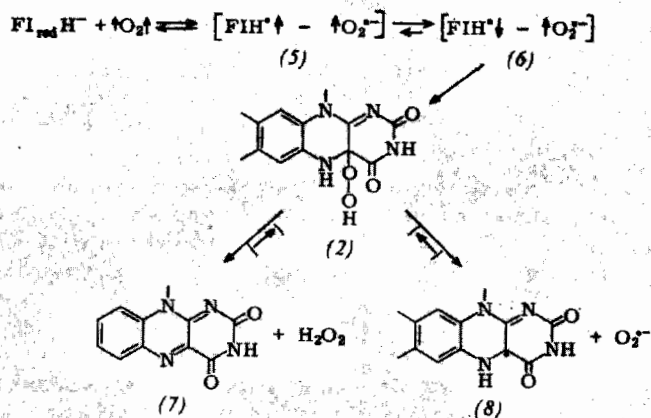
Mechanismen der Biolumineszenzreaktion

In diesem Zusammenhang stehen, vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus gesehen, drei mechanistische Fragen im Vordergrund:

- Wie wird molekularer Sauerstoff durch das enzymgebundene, reduzierte Flavin aktiviert?
- Wie ist die Oxidation des zweiten Substrates, des Aldehyds, mit der Erzeugung des angeregten Zustandes (Emitter) gekoppelt?
- Welche Struktur hat dieser angeregte Zustand? Ist er mit dem Emitter identisch,

Abb. 2. Schematische Darstellung und Sequenz der biochemischen Prozesse, welche in lumineszierenden Bakterien zur Lichtemission führen können. BFP und YFP stehen für „Blue Fluorescence Protein“ und „Yellow Fluorescence Protein“.





Strukturvorschläge publiziert wurden, welche für die Flavin-O<sub>2</sub>-Bindungsstelle so gut wie jede mögliche Flavinringposition beanspruchten<sup>8)</sup>.

Beim heute akzeptierten Mechanismus wird angenommen, daß molekularer Sauerstoff Fl<sub>red</sub>H<sup>-</sup> durch Übertragung eines Elektrons zum („caged“) Komplex (5) reversibel reduziert wird (Abbildung 3). Die darauf folgende (geschwindigkeitsbestimmende?) Spinumkehr führt formal zum Komplex (6), in welchem die nun antiparallelen Spins die kovalente Peroxidbindung zum Hydroperoxid (2) ausbilden. Bezeichnenderweise entsteht diese Bindung an der Flavinposition C(4a), an welcher im Flavinradikal (8) (Ab-

bildung 3) die höchste Spindichte besteht. Die Struktur dieses Flavin-C(4a)-hydroperoxids wurde durch Tieftemperatur-<sup>13</sup>C-NMR mit an C(4a) <sup>13</sup>C-angereichertem Flavin eindeutig nachgewiesen<sup>9)</sup>. In Lösung zerfällt (2) innerhalb von Millisekunden zu oxidiertem Flavin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>10)</sup>. Durch Alkylierung der Flavinstellung N(5) kann (2) jedoch stabilisiert werden. Im Enzymverband findet vermutlich eine ganz analoge Stabilisierung statt, nämlich durch Ausbildung einer starken und kinetisch stabilen Wasserstoffbrückenbildung zwischen N(5)-H in (2) und dem Protein. Die Abspaltung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist am Enzym so verlangsamt, daß luciferasegebundenes (2) durch Gelfiltration bei 0 °C isoliert

Abb. 3. Mechanismus der Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch das reduzierte Flavin.

werden kann<sup>11)</sup>. Interessanterweise kommt der reversible, homolytische Zerfall von enzymgebundenem (2) zwar vor, ist aber sehr langsam und katalytisch unbedeutend<sup>12)</sup>.

● Die Oxidation vom Co-Substrat Aldehyd; Erzeugung des angeregten Zustandes

Auch für diese Reaktion sind im vergangenen Jahrzehnt eine Vielzahl von z. T. recht phantasievollen Mechanismen vorgeschlagen worden, welche u. a. komplizierte Umlagerungsreaktionen am Flavingerüst beinhalten. Der Mechanismus konnte bisher aber noch nicht aufgeklärt werden. Für die Oxidation der Aldehydfunktion zur Carbonsäure durch Hydroperoxid wurde in den meisten Fällen eine mehr oder weniger abgeänderte Form der Baeyer-Villiger-Reaktion formuliert (Abbildung 4).

Es ist jedoch nicht einfach, wenn überhaupt möglich, die Bildung eines angeregten Zustandes in dieser Sequenz einzubauen. Die Formulierung von Dioxetan-Strukturen am Flavingerüst, in Analogie zu den bei anderen Biolumineszenzreaktionen vorkommenden Zwischenstufen<sup>13)</sup>, ist ebenfalls nicht ohne weiteres möglich. Andererseits ist von

# Nikon in der

# GENEHEIME

Nikon bietet ein breites, unverwechselbares Programm an Mikroskopen.

Z. B.: Das Semi-Forschungsmikroskop OPTIPHOT, die Labormikroskope LABOPHOT und ALPHAPHOT. Alle sind von anerkannt hoher mechanischer und optischer Qualität und für die Mikrofotografie hervorragend geeignet.

Und das sind einige der unübertroffenen Qualitätsmerkmale:

- CF-Objektive (CF = frei von chromatischer Aberration) für alle Betrachtungsarten.
- Trocken-, Immersions-, Phasenkontrast- und Dunkelfeldkondensoren.
- 50 oder 100 W Halogen, zentrierbar auf optische Achse oder 20 W vorzentriert.
- Auflichtfluoreszenzen in Halogen und HBO.
- Fotodokumentation über Nikon-Mikroflexen oder vorhandene Spiegelreflex-Kamera.



Semi-Forschungsmikroskop OPTIPHOT

Ob OPTIPHOT, LABOPHOT oder ALPHAPHOT, Ihre Anforderungen erfüllt, das werden wir Ihnen zeigen, indem Sie damit arbeiten. Ausprobieren, wenn Sie wollen. Fordern Sie es an!



## Infos kommen sofort!

Bitte einsenden an:  
**Nikon GmbH, Instrumentenvertrieb**  
 Tiefenbroicher Weg 25, 4000 Düsseldorf 30  
 Telefon: (0211) 4157-0

Ich möchte ein  OPTIPHOT,  LABOPHOT,  ALPHAPHOT 14 Tage zur Probe, kostenlos und unverbindlich.

Bitte senden Sie ausführliches Prospektmaterial.

Name: \_\_\_\_\_

Straße: \_\_\_\_\_

Ort: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

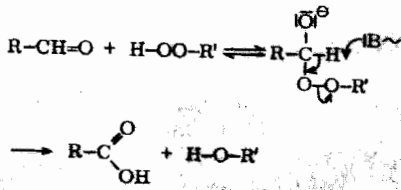


Abb. 4. Anpassung des Baeyer-Villiger-Mechanismus an die Oxidation von Aldehyd durch die bakterielle Luciferase.

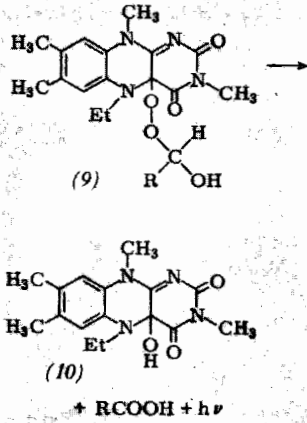


Abb. 5. Modellsystem für die bakterielle Luciferase nach Bruce et al.<sup>20). Der Zerfall des gezeigten gemischten Flavin-4a-hydroperoxids führt zur Bildung der Flavinpseudobase, von Carbonsäure und von Licht mit einer Quantenausbeute von ca. 0,5 %.</sup>

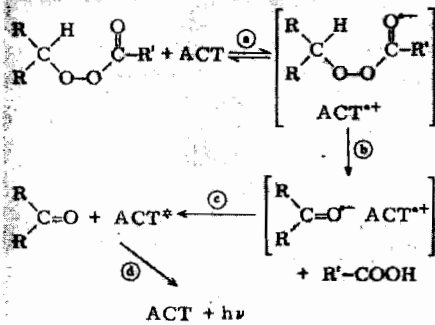


Abb. 6. Allgemeine Form des CIEEL-Mechanismus. Es ist die Bildung eines angeregten Aktivatorchromophors (ACT) durch Zerfall eines gemischten Peroxids dargestellt (nach Schuster<sup>15).</sup>

Abb. 7. (rechts) Adaptation der allgemeinen Formulierung des CIEEL-Mechanismus (s. Abbildung 6) für die flavinkatalysierte Biolumineszenz. Nach der Variante (A) würde ein angeregtes Flavin-4a-hydroxid entstehen, dessen Existenz nachgewiesen wurde. Die hypothetische Variante (B) führt zur Bildung einer angeregten Carbonylverbindung, welche die Anregungsenergie weiter auf das Flavinhydroxid oder auf BFP/YFP übertragen könnte.

Bruce und Mitarbeitern an Modellen nachgewiesen worden, daß gemischte Peroxide der Struktur (9) unter Lichtemission (Quantenausbeute ca. 1/20 derjenigen des enzymatischen Systems) zu den entsprechenden Carbonsäuren zerfallen können (Abbildung 5).

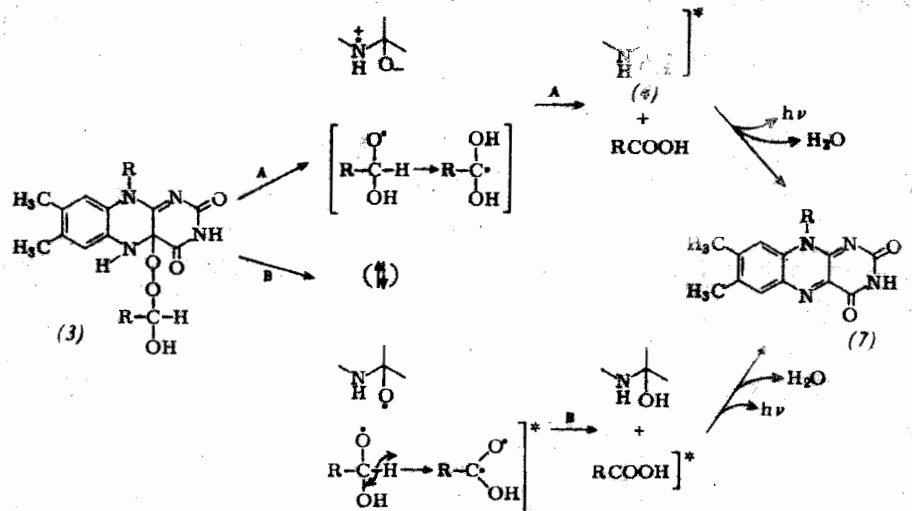
Das lineare Peroxidstrukturelement von (9) kommt somit als Zwischenstufe auf dem Wege zur Bildung des angeregten Zustandes durchaus in Frage. Bei einem Baeyer-Villiger-Mechanismus müßte die Geschwindigkeit der Lumineszenzreaktion parallel zur „Oxidationskraft“ des Flavin-Peroxids zunehmen. Diese ist wiederum eine Funktion der Elektronegativität des Peroxidsubstituenten, in unserem Fall des Flavins. Die Geschwindigkeit der Luciferasereaktion ist in der Tat vom Redoxpotential des Flavins linear abhängig<sup>14).</sup> Allerdings findet man eine zunehmende Geschwindigkeit mit abnehmendem Potential des Flavins<sup>14).</sup> Dies spricht gegen einen Baeyer-Villiger-Mechanismus, denn dafür müßte man eine umgekehrte Abhängigkeit erhalten.

Ende der siebziger Jahre ist von Schuster für die Chemilumineszenz ein neuartiger, CIEEL (Chemically Induced Electron Exchange Luminescence) genannter Mechanismus formuliert worden<sup>15)</sup> (Abbildung 6). In diesem wird die Reaktion durch ein Aktivator-molekül (ACT, in der Praxis ein Chromophor mit hoher Fluoreszenzausbeute) eingeleitet, das durch Übertragung eines Elektrons das Peroxid reduziert (Schritt a). Das entstandene Peroxidradikal zerfällt (b) zum Komplex aus Aktivatorradikal (-Kation) und Carbonylradikal (-Anion). Durch Rückübertragung eines Elektrons aus dem Carbonylradikal (Schritt c) entsteht der Aktivator im angeregten Zustand, der schließlich durch Emission eines Lichtquants in den Grundzustand übergeht.

Es bestehen nun zwei Möglichkeiten, diesen CIEEL-Mechanismus auf die bakterielle Luciferase zu übertragen. In der einen, welche schon von Schuster<sup>15)</sup> angedeutet wurde und welche in vereinfachter Form in Abbildung 7 dargestellt ist, wären interessanterweise Peroxid und Aktivator-Chromophor im sel-

ben Molekül, im gemischten Peroxid (3) vereint. Dies wäre eine Parallele zum Leuchtkäferluciferin, in welchem Peroxid und Aktivatorchromophor ebenfalls intramolekular wechselwirken<sup>15).</sup> Die Reaktion würde durch Übertragung eines Elektrons vom Flavin auf das Peroxid eingeleitet werden (Reduktion). Anschließend würde die Aldehyd-(1)-C-H-Bindung (radikalisch) gespalten. Rücktransfer eines Elektrons auf das Flavinradikal würde den angeregten Zustand des Flavin-4a-hydroxids (4) erzeugen (Abbildung 7, Weg A). Eine von Baldwin und Ziegler<sup>23)</sup> vorgeschlagene Abwandlung dieses Mechanismus zieht die Bildung einer Carbonylverbindung als primären angeregten Zustand in Betracht (Abbildung 7, Weg B).

Die zweite Variante (paralleler Mechanismus) des CIEEL-Mechanismus ist kürzlich von Hastings et al.<sup>22)</sup> postuliert worden. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß der lichtintensivierenden und beschleunigenden Eigenschaft der Fluoreszenzproteine (BFP und YFP) Rechnung getragen wird. Hierbei würden diese Fremdchromophore die Funktion eines externen Aktivators im Sinne des klassischen CIEEL-Mechanismus übernehmen (Abbildungen 6 und 2). Die erste mechanistische Variante kann als „verzweigter Mechanismus“ (siehe Abbildung 7) bezeichnet werden. Dieser ist dadurch charakterisiert, daß aus einem primären, angeregten Zustand die Anregung via Förster-Mechanismus auf weitere Chromophore übertragen werden kann. Die zweite Variante entspricht der Folge von Abbildung 2. Darin könnten die emittierenden Chromophore durch eine CIEEL-Reaktion mit dem gemischten Peroxid (3) direkt angeregt werden. Für einen Elektronentransfer-Mechanismus sprechen die chemischen Eigenschaften der Reaktionspartner: Die radikalische Oxidation von Aldehyden in Anwesenheit von Peroxiden ist einerseits ein gut bekannter, wenn auch mechanistisch noch kaum untersuchter Prozeß. Andererseits ist das Flavin ein ausgesprochener Einelektron-Katalysator. Für einen Elektronentransfer-Mechanismus spräche auch die Erhöhung der





Geschwindigkeit der Luciferase-Reaktion beim Einsatz von Flavinderivaten mit abnehmendem Redoxpotential<sup>[14]</sup>

● Zur Struktur des primär gebildeten, angeregten Zustandes und des Emitters

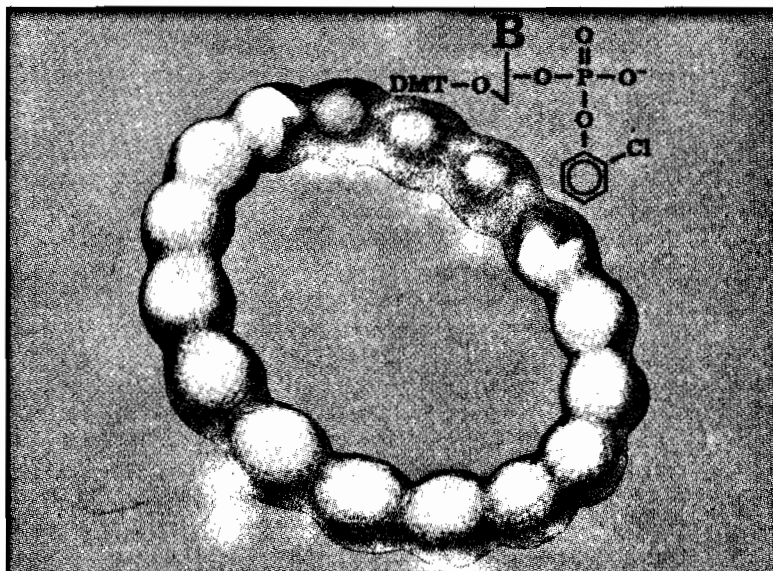
Ohne Kenntnis der Struktur der angeregten Zustände und der lichtemittierenden Chromophore ist ein Mechanismus der Biolumineszenz nicht akzeptabel. Auch diese Frage ist noch nicht beantwortet worden, obwohl in letzter Zeit einige bedeutende Fortschritte zu registrieren sind. Eine Besonderheit der bakteriellen Luciferase ist die Nichtübereinstimmung der Spektren der Lichtemission in vivo und in vitro ( $\lambda_{max}$  jeweils 490 nm) mit dem Fluoreszenzspektrum des aus der Reaktion entstehenden Luciferin-chromophors (oxidiertes Flavin (7),  $\lambda_{max} \sim 530$  nm). (Dies bezieht sich natürlich nur auf diejenigen Fälle, wenn kein BFP oder YFP anwesend ist.) Die einzige Form von oxidiertem Flavin, welche in der Gegend von 500 nm emittiert, ist das in Stellung N(1) protonierte Kation (11), welches jedoch nur im gefrorenen (immobilisierten) Zustand emittiert. Dies führte zum noch heute in vielen Fachbüchern zu findenden Vorschlag, daß dieses Flavinkation (11) ( $Fl_{ox}H^+$ , pK 0) mit dem Emitter identisch sei<sup>[15]</sup>. Daß dies nicht zutreffen kann, wurde eindeutig durch Einsatz eines FMN-Analogen, des 1-Deaza-FMN (12) (Abbildung 8) gezeigt, welches genauso wie normales FMN, wenn auch nur mit ca. 15 % Intensität verglichen mit diesem, die Lichtemission katalysiert. 1-Deaza-FMN (12) kann aber an Stellung 1 des Flavingerüsts nicht protoniert werden, im kationischen Zustand – Protonierung wahrscheinlich an N(5) – hat es zudem ein Absorptionsmaximum bei 510 nm<sup>[18]</sup>.

Wenn also nicht das oxidierte Flavin als Emitter infrage kommt, so (zumindest in Abwesenheit von BFP und YFP) dessen Vorläufer, das Flavin-4a-hydroxid (4) (Abbildung 3), dessen Fluoreszenzemissionsspektrum mit demjenigen der Biolumineszenz identisch ist, und aus welchem FMN (7) durch Abspaltung von  $H_2O$  entsteht (Abbildung 7). Der 4a,5-Dihydroflavinchromophor fluoresziert in Lösung nicht. In gefrorenem Zustand hat er aber ein Emissionsspektrum ( $\lambda_{max} \sim 486$  nm), welches demjenigen der Biolumineszenz sehr ähnlich ist<sup>[21]</sup>. Das Vorkommen des Flavin-4a-hydroxids während der Luciferase-Reaktion wurde kürzlich kinetisch und spektral nachgewiesen<sup>[18]</sup>.

Die gelegentlich anzutreffende Behauptung, daß Flavine bei der Luciferase-Lichtemission keine Rolle spielen<sup>[19]</sup>, ist allerdings sehr unwahrscheinlich: Die anfangs erwähnte Emission in *E. coli*-Bakterien, welche mit dem Luciferase-Gen cloniert wurden, gleicht dem Spektrum der Flavin-4a-hydroxid-Emission<sup>[9]</sup>. Es wäre ein unwahrscheinlicher Zufall, wenn in *E. coli* andere Chromophore

# Gentechnologie

## Bausteine und Reagenzien für zukunftsweisende Technologien



Geschützte Nucleoside und Nucleotide für die Synthese von Oligodesoxynucleotiden nach der Phosphotriester-Methode und der Phosphit-Triester-Methode.

- 5'-OH-geschützte Nucleoside
- 3'-OH-geschützte Nucleoside
- 3'-Phosphat- und 5'-OH-geschützte Nucleotide
- 3'-Phosphat-doppelt-geschützte Nucleotide

- Vollgeschützte Phosphoramidite (Morpholido-)
  - Trägergebundene geschützte Nucleoside als Starter für Festphasen-Synthesen
- Chromatographisch rein und funktionsgeprüft

Spezialreagenzien für Kupplung, Kondensation und selektive Schutzgruppenabspaltung.

Bitte fordern Sie unsere ausführliche Spezialinformation an.

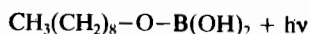
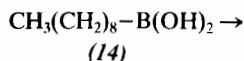
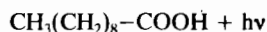
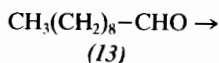
**Reagenzien**

**MERCK**

E. Merck, Frankfurter Straße 250, D-6100 Darmstadt 1

die Funktion der Lichtemission übernehmen könnten.

Zwei Befunde sind im Zusammenhang mit der Natur des primären, angeregten Zustandes von besonderer Bedeutung: Der erste ist das bereits erwähnte Phänomen der Blau- bzw. Rot-Verschiebung im Spektrum der in-vivo-Emission, welche bei manchen Bakterienstämmen beobachtet wird und welche auch in vitro durch Zugabe der entsprechenden Fluoreszenzproteine zur Luciferase bewirkt werden kann. Zweitens kann das langkettige Aldehydsupstrat (13) durch Boronsäure (14) ausgetauscht werden. Die Lichtemission bleibt hierbei zu 3% erhalten.



Im Falle der induzierten Blauverschiebung ist die Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des 4a-Hydroxy-flavins ( $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$ ) und dem Absorptionsspektrum des „Sensitizers“ BFP (Lumazinchromophor,  $\lambda_{\text{max}} \sim 407 \text{ nm}$ ) zu klein um einen effizienten Förster-Energietransfer vom ersten zum zweiten Chromophor zu gewährleisten. Es gibt prinzipiell zwei Ansätze, um diesen Widerspruch zu lösen: Entweder wird der angeregte Zustand nach dem parallelen Mechanismus gebildet (siehe oben) oder es muß primär ein angeregter Chromophor erzeugt werden, der energetisch höher als das angeregte 4a-Hydroxyflavin und das BFP liegt. Ein Kandidat wäre die in Abbildung 7 gezeigte angeregte Carbonylverbindung. Eine solche kann aber nicht der alleinige primäre, angeregte Zustand sein, denn eine Carbonylverbindung wird bei der Oxidation von Boronsäure nicht gebildet. Eine weitere Möglichkeit leitet sich aus dem großen „Stokes-Shift“ von ca. 130 nm zwischen dem Absorptionsmaximum des Flavin-4a-hydroxids ( $\lambda_{\text{max}} \sim 360 \text{ nm}$ ) und dem Fluoreszenzmissionsmaximum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$ ) ab. Demnach könnte bei der Anregung zunächst ein energetisch höherliegender angeregter Zustand ausreichender Energie entstehen, um

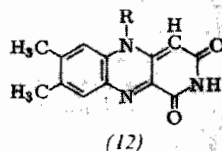
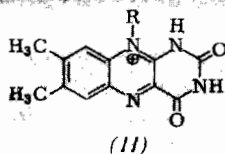


Abb. 8. Strukturformel des protonierten Flavins (11) und des 1-Deaza-flavins (12).

BFP anzuregen. Dieser Zustand könnte entweder in ein energetisch tieferliegendes Konformers übergehen oder aber die Energie einem „Sensitizer“-Protein (BFP) direkt übertragen. Daß reduzierte Flavine im Enzymverband in verschiedenen Konfigurationen vorliegen, ist sehr wahrscheinlich und wird durch spektroskopische Untersuchungen untermauert. Zu dieser letzten Möglichkeit liegen allerdings noch keine experimentellen Hinweise vor, so daß sie als rein spekulative Alternative gelten muß.

Peter Macheroux und  
Sandro Ghisla

- 1) J. W. Hastings in K. H. Neelson (Hrsg.): „The Prokaryotes“. Springer Verlag, Berlin 1981. S. 1332.
- 2) J. W. Hastings, J. Mol. Biol. 19, 309 (1983).
- 3) P. Baumann, L. Baumann, S. S. Bang und M. J. Woolkalis, Curr. Microbiol. 4, 127 (1980).
- 4) T. O. Baldwin, T. C. Johnston und R. Swanson in R. C. Bray, P. C. Engel und S. G. Mayhew (Hrsg.): „Flavins and Flavoproteins“. de Gruyter, Berlin 1984. S. 345.
- 5) J. W. Hastings, J. Spudich und G. Malnic, J. Biol. Chem. 238, 3100 (1963).
- 6) J. W. Hastings und K. H. Neelson, Ann. Rev. Microbiol. 31, 549 (1977).
- 7) D. M. Karl und K. H. Neelson, J. Gen. Microbiol. 117, 357 (1980).
- 8) T. C. Bruce, Adv. Chem. Ser. 191, 89 (1980).
- 9) S. Ghisla, J. W. Hastings, V. Favaudon und J. M. Lhoste, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5860 (1978).
- 10) R. F. Anderson in V. Massey und C.

H. Williams (Hrsg.): „Flavins and Flavoproteins“. Elsevier, Amsterdam 1982. S. 278.

- 11) J. W. Hastings, C. Balny, C. Le Peuch und P. Douzou, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3468 (1973).
- 12) M. Kurfürst, S. Ghisla und J. W. Hastings, Biochemistry 22, 1521 (1983).
- 13) O. Shimomura, T. Goto und F. H. Johnson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2799 (1977).
- 14) P. Macheroux, S. Ghisla, M. Kurfürst und J. W. Hastings in R. C. Bray, P. C. Engel und S. G. Mayhew (Hrsg.): „Flavins and Flavoproteins“. de Gruyter, Berlin 1984. S. 669.
- 15) G. B. Schuster, B. Dixon, J.-Y. Koo, S. P. Schmidt und J. P. Smith, Photochem. Photobiol. 30, 17 (1979).
- 16) M. Eley, J. Lee, J. M. Lhoste, C. Y. Lee, M. J. Cormier und P. Hemmerich, Biochemistry 9, 2902 (1970).
- 17) M. Kurfürst, S. Ghisla und J. W. Hastings in V. Massey und C. H. Williams (Hrsg.): „Flavins and Flavoproteins“. Elsevier, Amsterdam 1982. S. 353.
- 18) M. Kurfürst, S. Ghisla und J. W. Hastings, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2990 (1984).
- 19) I. B. C. Matheson, J. Lee und F. Müller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 948 (1981).
- 20) C. Kemal, T. W. Chan und T. C. Bruce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 405 (1977).
- 21) S. Ghisla, V. Massey, J. M. Lhoste und S. G. Mayhew, Biochemistry 12, 589 (1984).
- 22) J. W. Hastings, C. J. Portrikus, S. C. Gupta, M. Kurfürst und J. C. Makemson, Adv. Microb. Physiol. 26, 235 (1985).
- 23) M. M. Ziegler und Th. O. Baldwin, Curr. Top. Bioenerg. 12, 65 (1981).

## Neue Nomenklatur-Empfehlungen der IUPAC

Kommissionen der Internationalen Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) haben in englischer Sprache die folgenden Nomenklatur-Empfehlungen ausgearbeitet:

- Recommendations for the Presentation of Thermodynamic and Related Data in Biology (6 Seiten Zusammenstellung wichtiger SI-Einheiten und deren Symbole für biothermodynamische Publikationen).
- Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis (5 Seiten). – Bisher gab es zwei Dokumente, in denen Bezeichnungen aus dem Gebiet der automatisierten Analyse definiert wurden. Diese sind jetzt zu einem neuen Entwurf vereinigt worden, der auch die Besonderheiten klinisch-chemischer Analysenautomaten berücksichtigt.

- Red Book Revision, Chapter 1-3: Elements, atoms, and groups of atoms (11 Seiten). – Red Book Revision, Chapter 1-8: Ions, Radicals and Salts (17 Seiten). – Das „Rote Buch“ ist die Sammlung aller Regeln für die anorganische Nomenklatur. Eine Revision dieses Buches ist in Arbeit, und daraus werden hier die erwähnten Kapitel im Entwurf vorgestellt. Im Kapitel über die Elemente befindet sich insbesondere ein Vorschlag für eine neue Bezeichnung der Gruppen des Periodensystems.
- A Classification of Linear Single-Strand Polymers (9 Seiten). – Das neue Klassifikationsschema beruht auf der Struktur der Repetiereinheit in der Hauptkette und sieht vier hierarchische Ebenen vor: Klassen, Unterklassen, Gruppen, Individuen. Interessierte Fachkollegen werden jetzt gebeten, zu diesen Empfehlungen bis März 1986 Stellung zu nehmen. Kopien der Texte sind erhältlich von: Prof. Dr. H. Grünewald, VCH Verlagsgesellschaft, Postfach 1260/1280, D-6940 Weinheim.