

## Sucul Canlılarda Biyoluminesens

Atakan Sukatar, İsmail Karaboz

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.

**Abstract:** *Bioluminescence in Aquatic Organisms.* In this review, bioluminescent aquatic organisms, the mechanism, physical, chemical and genetical properties of bioluminescence, and major luciferin types, are discussed.

**Key Words:** Bioluminescence, aquatic, luciferin, luciferase

**Özet:** Bu derlemede biyoluminesens gösteren canlılar, biyoluminesensin mekanizması, fiziksel, kimyasal ve genetiksel özellikleri ile başlıca lusiferin tipleri üzerinde durulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoluminesens, sucul, lusiferin, lusiferaz

### Giriş

Biyoluminesens, organizmalarda kimyasal bir reaksiyon ile ışık üretimidir. Biyoluminesens, fosforesens ve fluorensens olaylarından farklıdır. Bir ışık kaynağından absorbe edilen ışık fluorensens ve fosforesensde değişik dalga boyunda farklı bir ışımaya olarak yansıtılırken, biyoluminesensde ise ışık oluşumu için gerekli enerji kimyasal bir reaksiyonla hücre içinde sağlanır. Bazı karasal canlılarda (örneğin ateş böcekleri, bazı şapkaklı mantarlar, bazı toprak solucanları, vb.) da görülmekle birlikte, biyoluminesens esas olarak deniz canlılarında görülür. Okyanuslarda yaşayan organizmaların %90'dan fazlasının biyoluminesens özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Biyoluminesens, derin denizlerin başlıca ışık kaynağıdır. Eskiden endişe ve korku ile izlenen bu olay, günümüzde doğanın en büyüleyici ve harika olaylarından biri olmuştur (Gitelson and Levin, 1999).

Bir organizmanın ışık çıkarmasının temel nedeni halen kesin olarak belli olmamakla birlikte, çoğu kez yaşamsal fonksiyonlardan üreme, beslenme, savunma ve iletişim kurma ile ilgili olduğu

görülmüştür. Bu nedenle, denizlerde yaşayan değişik gruplardaki canlıların, yaşamını sürdürmek amacıyla farklı zamanlarda ışık oluşturan benzer yapıdaki sistemleri geliştirdikleri saptanmıştır (Hastings, 1983, Herring, 1987). Deniz canlıları içinde bakteriden planktona ve birçok omurgasız ve omurgalı hayvana kadar yüzlerce cins ve binlerce türde biyoluminesens olayı görülmektedir. Bunlar içinde başlıca yer alan grup, planktonik organizmalardır. Oluşturulan ışık bu canlılar tarafından doğrudan yansıtıldığı gibi, ışık çıkaran özel bir organ içinde (çoğu kez bakterilerce) de oluşturulabilir. Bu ışığın rengi genelde mavidir. Bunun nedenlerinden birisi mavi ışığın en kısa dalga boylu ve en enerjistik ışık olması, deniz içinde uzaklara gidebilmesi ve diğeri ise deniz canlılarının duyarlı olduğu yegane rengin mavi olmasıdır. Mavinin dışında yeşil, sarı, turuncu ve hatta kırmızı renkte ışık çıkaran deniz canlıları da bulunmaktadır. Hatta bazı deniz organizmalarında iki farklı renkte ışığın aynı canlı tarafından çıkarıldığı da bilinir (Herring, 1985, Nealson, 1992).

### Mekanizması

Tüm biyoluminesens reaksiyonları için genel olarak bilinen birkaç ortak özellik vardır. Bunlardan birincisi oksijenin olmasıdır. İkincisi lusiferin ve lusiferaz gibi iki kimyasal maddenin gerekli olduğudur. Lusiferin reaksiyon için temel substrat olup, ışık üretimini sağlar. Lusiferaz ise bir enzim olup lusiferini okside eder ve ışık ile inaktif oksilusiferin oluşturur. Çoğu organizmada lusiferinin yenilenmesi beslenmeyle bağlantılıdır veya içsel olarak yaşamsal faaliyetleri için sentezlenmektedir. Birçok deniz canlısında lusiferin ve lusiferaz “Fotoprotein” denilen bir yapı içinde birlikte bulunmaktadır (örneğin *Aequorea*’da aequorin ve GFP= green fluorescent protein; *Obelia*’da obelin; kalamarlardaki symplectin; *Pholas*’da Pholasin, vb.) (Reichl v.d. 2000). Fotoproteinlerden ışık oluşturulması Coelenteratae’da genellikle  $Ca^{++}$  gibi bir iyonun sisteme eklenmesiyle tetiklenmektedir. Fotoproteinleri taşıyan yapılar fotosit ya da fotofor olarak da adlandırılır. Tek hücreli planktonik algler olan dinoflagellatlarda ise biyoluminesens hücrenin sitoplazma-sındaki vakuoller içinde yer alan “sintillon” denilen organellerde gerçekleşir. Biyoluminesense salınan enerji çoğu kez ışık formunda olduğu için, biyoluminesense “soğuk ışık” adı verilmektedir (Hasting, 1996; 1983; George and Philips, 1997).

### Lusiferin tipleri

Denizlerdeki yüzlerce çeşit lüminoz canlı olmasına karşın, ışık oluşumunun temel maddesi olan lusiferinin ilginç bir şekilde sadece birkaç tipi bulunmaktadır. Lusiferinin bilinen 5 ana tipi bulunur.

Bunlar:

1) Bakteriyel lusiferin: Redüklenmiş riboflavin fosfat ( $FMNH_2$ )tır; bakteriler, bazı balıklar ve kalamarlarda görülür.

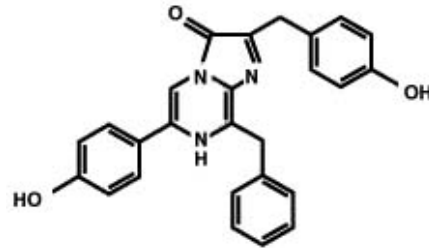
2) Dinoflagellat lusiferini: Klorofile benzer bir yapı gösterdiği için klorofilden tüvelendiği düşünülür. Dinoflagellatlar ile krillerde bulunur.

3) Vargulin lusiferini: Ostrakod’lardan *Vargula*’da bulunur.

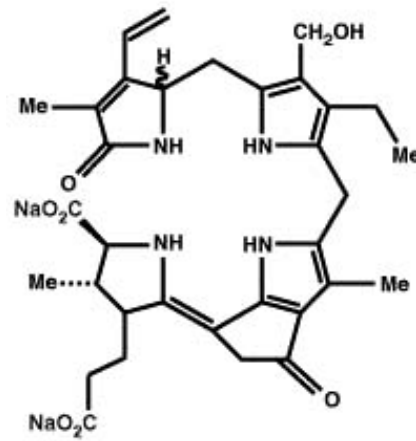
4) Söleterazin: En yaygın görülen lusiferin tipidir. Birçok filumda görülür (*Radiolaria*, *Ctenophora*, *Cnidaria*, *Cephalopoda*, *Copepoda*, *Chaetognatae*, bazı balıklar ile karideslerde bulunur).

5) Ateş böceği lusiferini: Reaksiyonda kofaktör olarak ATP’ye gereksinir. Ateş böceklerinde bulunur (Haddock vd. 2000; Jons vd. 1999).

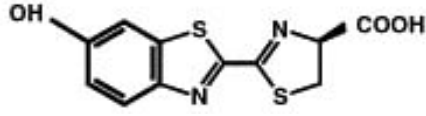
Lusiferin’in molekül tipleri:



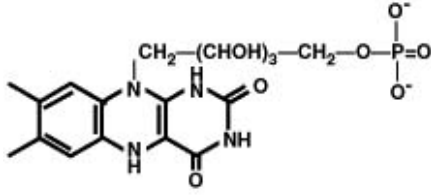
Söleterazin tipi



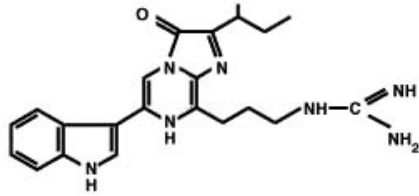
Dinoflagellat tipi



Ateş böceği tipi



Bakteriyel tip

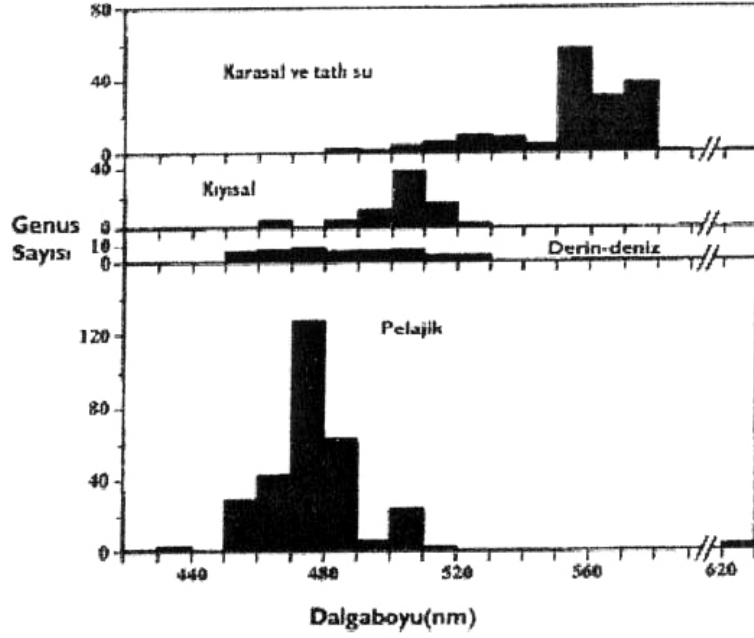


Vargula tipi

**Lüminoz Canlılar:** Biyolüminesens olayı, deniz canlılarından bakteriler ve tek hücreli protistlere, kalamar ve balıklara dek hemen hemen her organizma grubunda görülür. Biyolüminesensin çeşitliliği hakkında fikir sahibi olmak için aşağıda belirtilen lüminoz canlılar listesine bir göz atmak yeterlidir. Bu listede belirtilen gruplar tümüyle olmasa bile en azından bir türüyle biyolüminesensistir (Haddock, vd 2000). Lüminoz olan canlı grupları: Bakteriler , Funguslar , Dinoflagellatlar, *Radiolaria* - Işınlılar, *Cnidaria* (*Coelenterata*), *Scyphozoa* (=Gerçek Medüzler), *Hydrozoa* (=Hidralar), *Anthozoa* (=Mercanlar, Deniz şakayıkları), *Ctenophora Nemertinler* (=Kurdela kurtları), *Mollusca* (=Yumuşakçalar), Deniz minaresi (bir tür), *Nudibranchia* (birkaç) (=Deniz sümüklü böceği), Kalamarlar (birçoğu), *Octopoda* (birkaç) (=Ahtapotlar), *Annelida* (birkaç) (=Hal-

kalı solucanlar), Toprak Solucanları, *Pycnogonidler* (=Deniz örümcekleri), *Crustacea*, *Copepoda*, *Ostracoda*, *Amphipoda*, *Euphausidae* (=kriller), *Chaetognatae* (1 tür) (=Kılıççeneliler), *Echinodermata* (=Derisidikenliler), *Asteroidea* (=Deniz Yıldızları), *Ophiuroidea* (=Yılan Yıldızları), *Holotharidea* (=Deniz Hıyarları), *Hemicordata* (=Yarım Kordalı Kurtlar), *Urochordata* (=Kuyruğu kordalılar), *Pyrosomae*, *Tunicata* (1 tür) (=Tulumlular), *Larvacea*, *Chordata*, Köpekbalıkları, Balıklar, *Centipedeae* (=Çıyanlar), *Millipedeae* (=Kırkayaklar), *Insecta* (=Böcekler), Ateş böcekleri, Elanteritler, Mantar tatarcığı, Işıklı kurtlar.

**Işık Spektrumu:** Deniz canlılarının oluşturduğu biyolüminesens ışığın spektrumları incelendiğinde (670 lüminoz genustan 170'inin inceleme sonuçlarına göre), pik emisyonlarının genelde mavi, yeşil ve turuncuda kümelendiği görülmüştür. Çoğu organizma 440–470nm'de ışık yaymasına karşın, 400nm'de koyu mor ve 620nm'de kırmızı ötesi olan birkaç istisna da vardır. Oluşturulan rengin belirli bir ölçüde habitatla bağlantılı olduğu da belirlenmiştir. Pelajik ve derin deniz türlerinde oluşturulan ışık, büyük çoğunlukla mavi renkte ışımaya yapar (genelde 450 – 490nm aralığında). Kıyısız deniz türlerinde görülen ışımaya ise büyük ölçüde yeşil renktedir (490 – 520 nm). Karasal ve tatlı su türlerinde oluşturulan ışığın ise 550 – 580 nm civarında topladığı görülmüştür. Yani oluşturulan ışığın spektrumu, denizlerden karalara doğru yöneldikçe maviden yeşile, turuncuya kırmızıya doğru değişimler ve çeşitlenmeler göstermektedir.



Şekil 1. Farklı ortamlarda gelişen cinslerin sayılarına göre ışık spektrumundaki dağılımları (Hastings, 1996).

Tablo 1. Farklı Organizmalarda Biyoluminesensin Kimyası ve Rengi (Hastings, 1996).

Luminöz Organizmalar <sup>a</sup> (Genuslar)	Lusiferinler <sup>b</sup> , diğer faktörler	Lusiferazlar (kDa)	Emisyon maks <sup>c</sup> (nm)
Bakteriler ( <i>Photobacterium</i> , <i>Vibrio</i> )	FMNH <sub>2</sub> :RCHO	80	495-500
Dinoflagellatlar ( <i>Gonyaulax</i> , <i>Pyrocystis</i> )	Tetrapirrol; H <sup>+</sup>	60-130	475
Cnidaria ( <i>Aequorea</i> ; <i>Renilla</i> )	Sölenferazin; Ca <sup>2+</sup> (imidazopirazin çekirdek)	21	460-490
Annelida ( <i>Diplocardia</i> )	N-izovaleril-3-amino propanal H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300	500
Mollusca ( <i>Latia</i> )	Enol format; terpen veya aromatik aldehit	170	500
Crustacea ( <i>Vargula</i> , <i>Cypridina</i> )	İmidopirazin nükleus	60	465
Böcekler ( <i>Photinus</i> , <i>Photuris</i> )	(Benzo)tiazol; ATP; Mg <sup>2+</sup>	100	560

<sup>a</sup>Ana gruplar ve bazı örnek genuslar

<sup>b</sup>Substratlar(lusiferinler) ve reaksiyonlar için bazı biyokimyasal gereksinimler

<sup>c</sup>Gruptaki temsilci üyelerin maksimum emisyonlarının dalgaboyları

Bazı durumlarda ise belirli bir organizma 2 farklı ışık yayabilmektedir (örneğin ışıklı kurtlar karın kısmından yeşil ışık çıkarırken, baş kısmı ise kırmızı biyoluminesens vermektedir). Aynı lüsiferinin farklı sistemlerde farklı renkler oluşturduğu saptandığı için, rengi belirleyen aslında lusiferaz enzimi olduğu öne sürülmüştür (Wilson and Hastings, 1998). Lusiferin substratı ve lusiferaz enzimi dışında organizma içinde oluşturulan optik biyolojik filtrelerin ve yardımcı lumiforların da (örneğin GFP= Green Fluorescent Pigment; YFP=Yellow Fluorescent Pigment vb.) oluşturulan ışığın rengini etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca diğer lüminesens organizmaların varlığının da biyoluminesensi indüklediği saptanmıştır (Shimomuro, 1985; Rees, 1998).

Bazı deniz canlıları oluşturdukları ışığı sürekli yayarken, çoğu ışığı 0,1–10 saniye arasında değişen sürelerde parıltılı olarak çıkarırlar. Bazı dinoflagellatlar kısa süre uyarılmaya sürekli yanıt verirken, çok hücreli türlerde lüminesens genellikle nöral olarak denetlenmektedir. Bu nedenle, bazı balıklarda biyoluminesensin sempatik sinir sistemi tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Işınlılar veya dinoflagellatlar gibi tek – hücreli organizmalarda, biyoluminesens hücre yüzeyine uygulanan küçük kuvvetlerin etkisiyle tetiklenebilir (Wilson and Hastings, 1998).

**Genetik Özellikler** :Biyoluminesensin genetik özellikleri ile ilgili bilgiler özellikle denizde yaşayan lüminesens bakterilerden elde edilmiştir. Denizlerde biyoluminesens özellikte olduğu bilinen 3 genusa ait 9 bakteri türü bulunmaktadır. Belirtilen bakteri türleri biyoluminesens özellik gösteren *Vibrio*, *Photobacterium* ve *Alteromonas* genuslarına aittir. Bakterilerdeki biyoluminesens lux operonu ile çalıştırılır. Lux operonu 5 adet yapısal gen ile regülatör genlerden oluşmaktadır. Regülasyonu sağlayan lux genleri oto-indükleyci maddeleri sentezlemekte olup, regülasyon üzerinde ayrıca

katabolit bir baskı da vardır. Tüm deniz bakterilerinde bu baskı demir iyonları ile sağlanır. Biyoluminesensi regüle eden ve sentezlenip ortama salınan bu kimyasallar prokaryotik feromonlar için tipik bir örnektir (Stephons, 1986; Nealson and Hastings, 1997).

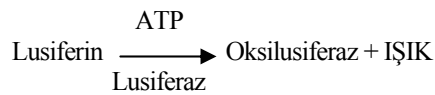
**Simbiyotik İlişkiler:** Deniz çevrelerinde görülen lüminoz bakteriler planktonik, saprofitik, parazitik, barsak simbiyontu ve ışık organı simbiyontu olarak bulunmak-tadır (Nealson and Hastings, 1992) (Tablo 2).

**Tablo 2.** Lüminoz Bakteriye Simbiyontlar (Nealson and Hasting, 1992)

Bakteriyel Simbiyont	Konukçu Grupları
<i>Vibrio fischeri</i>	Balıklar Monocentridae Kalamarlar <i>Euprymna scolopers</i>
<i>Photobacterium leiognathi</i>	Balıklar Leiognathidae Apogoidae Kalamarlar <i>Doryteuthis kensaki</i>
<i>P. phosphoreum</i>	Balıklar Macrouridae Merluccidae Moridae Opisthoproctidae
Kültüre-edilemeyen simbiyontlar	Balıklar Anomalopidae Ceratiidae Oneirodidae Melanocetidae Kalamarlar Sepeolidae Tunicata Pyrosoma

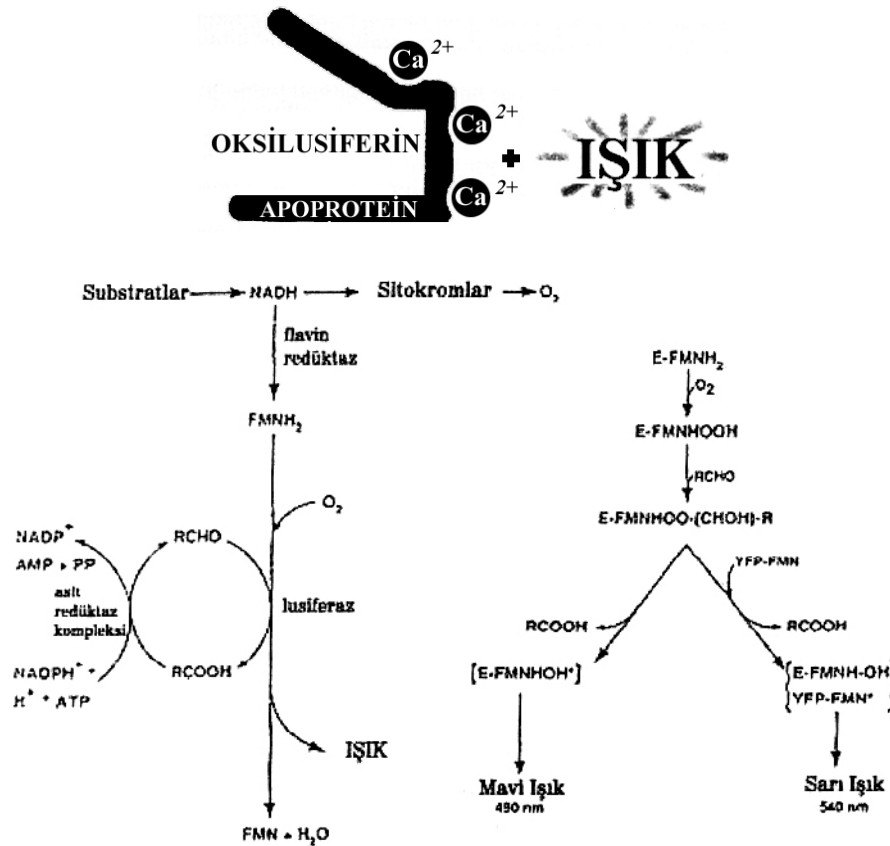
#### Biyoluminesensin Çalışma Prensipleri

Biyoluminesensin temel reaksiyonunda:



Lusiferazın lusiferinin oksidasyonunu katalizlemesi; Sonuçta ışık ve inaktif oksilüsiferin oluşumu ;Yeniden lusiferin üretimi için sisteme ATP olarak enerji sağlanması gerekmektedir (Haddock v.d. 2000). Eğer lusiferin ve lusiferaz “Fotoprotein” olarak birlikte bulunuyorsa, ışık üretimi ancak sisteme özel bir iyon eklendiğinde (çoğu kez  $Ca^{++}$ ) gerçekleşmektedir. İster serbest lusiferin,

ister fotoprotein halindeki lusiferaz ile bağlı lusiferin olsun, biyoluminesensin yol izleri incelen-diğinde, organizmalarda solunuma giden yol izinde bir by-pass yapılarak biyoluminesense yönelindikleri görülmektedir (Nealson and Hastings, 1992). Bu yol izi en iyi bakterilerde incelenmiştir ve bakterilerdeki yol izi aşağıdaki gibidir (Şekil 2).



Şekil 2. Lüminoz bakterilerde ışık oluşumunun yol izi (Nealson and Hastings, 1992)

### Uygulamalar ve Sonuç

Deniz canlıları arasında hemen hemen 700 cinsin birçok türünde biyoluminesens olayı görülmüş olmakla birlikte, bu özelliği bilinmeyen ya henüz tam olarak aydınlatılmamış ya da uygulama alanına henüz yansıtılmamış birçok deniz canlısı

bulunmaktadır. Biyoluminesensin evrimsel orijini ve oluşum nedenleri de henüz kesin olarak bilinmemektedir (Hastings, 1983). Moleküler düzeydeki bilgileri ve genetik özellikleri aydınlatıldıkça, biyoluminesens pratikte daha çok uygulama alanı bulmaya devam etmektedir. Önceleri uygulama alanına ATP'ye dayalı

hızlı bir mikrobiyolojik yöntem olarak giren biyoluminesens tekniği ile gıda ve ilaç gibi endüstrilerde kalite kontrolü, hijyen ve temizlik kontrolü, bakteriyolojik analizler vb. analizler klasik yöntemlere göre daha hızlı, daha güvenilir ve daha doğru olarak yapılmaktadır. Halen bu amaçla ticari olarak geliştirilen birçok "luminometre" ve kitler ile gıda, eczacılık, klinik tıp, çevre vb. alanlarda mikrop yükü, hücre canlılığı, sitotoksosite, antimikrobiyal aktivite, tümör ve kanserlere karşı geliştirilen ilaçların duyarlılığının belirlenmesi, raf ömrü saptanması, HACCP gibi güvenilir gıda üretim standartlarına uygunluğun belirlenmesi konularında hem çeşitli endüstrilerde hem de mikrobiyoloji, ekoloji, klinik tıp, biyokimya, mühendislik, eczacılık, diş hekimliği vb. gibi bilimsel alanlara pratik çözümler getirilmektedir (Nealson and Hastings, 1992). ATP kullanan ve oluşturan çeşitli enzim ve substratlar da bu teknikten yararlanarak analiz edilebilmektedir. Böylece NADH, NADPH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kreatin fosfokinaz, miyokinaz, heksokinaz, apiraz gibi substrat ve enzimlerin analitik incelenmesi yapılabilmektedir. Genetik mühendisliği ve moleküler biyolojideki gelişmelere bağlı olarak, çeşitli deniz canlıları ve ateş böceklerinde lusiferaz enzimini kodlayan genler, moleküler biyolojide aktarılan ve ifade edilen gen çalışmalarında en sık kullanılan "raportör genler" arasında yer almaktadır (Nealson and Hastings, 1992). Biyoluminesensin kullanıldığı son alanlardan birisi de hücre düzeyinde Ca<sup>2+</sup> düzeyinin izlenmesidir (Brownlee, 2000). Bazı hücre proteinlerinin aktivitesini izlemede direkt veya indirekt etkisi olan serbest Ca<sup>2+</sup> iyonları, daha çok deniz canlılarında bulunan fotoproteinler (özellikle Aequorin)'den oluşan biyoluminesens problemler ile aranmaktadır (Gerdes and Gaether, 1996). Son yıllarda biyoluminesens kullanılarak enzim ve substratlar immüno-

assaylerde etiketlemede kullanılmaya başlandığı için, günümüzde klinik analizlere yeni bir boyut kazandırmıştır (örneğin LIA= Lüminesens İmmün Assay; Lüminesens ELISA vb.).

Sonuç olarak biyoluminesensteki bilimsel gelişmelerin hem bilime hem endüstriye ve hem de teknolojiye olan katkılarının, günümüzde giderek artan bir şekilde devam ettiği görülmektedir.

#### Kaynakça

- Brownlee, C. 2000. Cellular calcium imaging so, what's new? Trends in Cell Biology 10:451-454
- George, N. and Jr. Philips. 1997. Structure and dynamics of green fluorescent protein. Current Opinion in Structured Biology. 7:821-827.
- Gerdes, H.H. and C. Kaether. 1996. Green fluorescent protein: application in cell biology. FEBS Letter. 389:44-47.
- Gitelson, I. I. and L. A. Levin. 1999. Bioluminescence in oceanology. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence. 4: 1, 555-562.
- Haddock, S. H. D., C. M. Mc Dougall. and J. F. Case. 2000. "The Bioluminescence Web Page" <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/>
- Hastings, J.W.1996.Chemistry and color of bioluminescent reactions: a review, Gene, 173:1,5-11.
- Hastings, J.W. 1983. Biological diversity, chemical mechanisms, and evolutionary origins of bioluminescent systems. Journal of Molecular Evolution. 19: 5, 309-321.
- Herring, P. J. 1987. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 1: 3, 147-163.
- Herring, P. J. 1985. How to survive in the dark: bioluminescence in the deep sea. Symposia of the Society for Experimental Biology. 39: 323-350
- Jones, K., F. Hibbert. and M. Keenan. 1999. Glowing jellyfish, bioluminescence and moleculecalled coelenterazine, Trends in Biotechnology. 17: 12, 477-481.
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings. Luminous bacteria, pp 625-639. In A. Balows., H. G. Trüper., M. Drowkin, W. Harder., K. H.

- Schleifer [eds.], The Procaryotes. Springer-Verlag
- Rees, J. F., B.de Wergifosse., O. Noiset., H. Dubuisson., B. Janssens. and E. M. Thompson. 1998. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 1211-1221.
- Reichl, S., J. Arnold., J. Knight., J. Schiller. and K. Arnold. 2000. Reaction of Pholasin with Peroxidases and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 28: 10, 1555-1563.
- Shimumuro, O. 1985. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symposia of the Societi for Experimental Biology*. 39: 351-372.
- Stephens, K. 1986. Pheromones among the procaryotes. *Critical Reviews in Microbiology*. 13: 4, 309-334.
- Thompson, C. M., P. J. Herring. and A. K. Campbell. 1997. The widespread occurence and tissue distribution of the imidazolopyrasine lusiferins. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 12: 2, 87-91.
- Wilson, T. and J. W. Hastings. 1998. Bioluminecence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 14: 197-230.