



© Lorelyn Medina – FOTOLIA

LABORSEITE

Wie Glühwürmchen dabei helfen, Translationsprozesse zu verstehen

Biolumineszenz in Glühwürmchen wird durch das Enzym Luciferase katalysiert. Die zugrundeliegende Reaktion kann für molekularbiologische Analysen von z. B. Translationsprozessen verwendet werden. Ein Beispiel dafür ist der Dual Luciferase Assay.

Das Enzym Luciferase (lateinisch *lucifer* = Lichtbringer) kennen die meisten von uns als Paradebeispiel für Biolumineszenz in Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Luciferasen katalysieren die Oxidation von Luciferinen, welche daraufhin zerfallen und Energie in Form von Licht freisetzen. Biolumineszenz ist im Tierreich weit verbreitet. Man findet sie nicht nur bei Insekten, sondern auch häufig bei aquatisch lebenden Tieren, Pilzen und Bakterien. Weitere sehr bekannte Nutzer von Biolumineszenz sind die sogenannten Tiefsee-Anglerfische (z. B. *Bufoerattias wedli*). Sie locken mit ihrer leuchtenden Angel Beute in der sonst finsternen Tiefsee an. Im Laufe der Evolution sind dabei in ganz unterschiedlichen Organismen zahlreiche Varianten der Luciferase und der dazugehörigen Luciferine entstanden.

Den Tieren hilft die Biolumineszenz unter anderem bei der Kommunikation und beim Anlocken von Beute oder von Partnern. Aber auch im Labor können Luciferasen sehr nützlich sein. So wurden verschiedene Assays entwickelt, die sich das messbare Leuchten der Luciferasen zu Nutzen machen: Sie werden unter anderem zum Nachweis von ATP, für Enzymaktivitätsassays, bei der Mikroskopie und auch als Reportergene genutzt, indem sie mit anderen Genen fusioniert werden. Im Gegensatz zur Fluoreszenz benötigen Luciferasen keine Lichtquellen, stattdessen aber Luciferin als Substrat. Die abgegebenen Photonen können von einem Luminometer detektiert werden.

Die Luciferase der Glühwürmchen und die der Korallenart *Renilla reniformis* (umgangssprachlich auch Seestiefmütterchen genannt) weisen unterschiedliche Eigenschaften auf, so dass man sie unabhängig voneinander messen kann. Die Firefly-(engl. für Glühwürmchen)-Luciferase (Fluc) oxidiert Luciferin zu Oxyluciferin in einer von ATP, O₂ und Magnesium abhängigen Reak-

tion. Die Renilla-Luciferase (Rluc) dagegen benötigt nur O₂, um ihr spezifisches Luciferin zu oxidieren.

Analyse der Genexpression

Durch die Kombination der beiden unterschiedlichen Reaktionen konnte ein sogenannter *Dual Luciferase Reporter Assay* entwickelt werden, mit dem z. B. Genexpression analysiert werden kann [1]. Das Gen für Fluc kann auch in einem Plasmid hinter ein beliebiges anderes Gen, welches untersucht werden soll, eingefügt werden. Somit kann das Genprodukt des Zielgens nach erfolgreicher Translation und Zugabe von spezifischem Luciferin Biolumineszenz erzeugen, welche wiederum im Luminometer gemessen werden kann. So kann über das Lumineszenzsignal ein Rückschluss auf

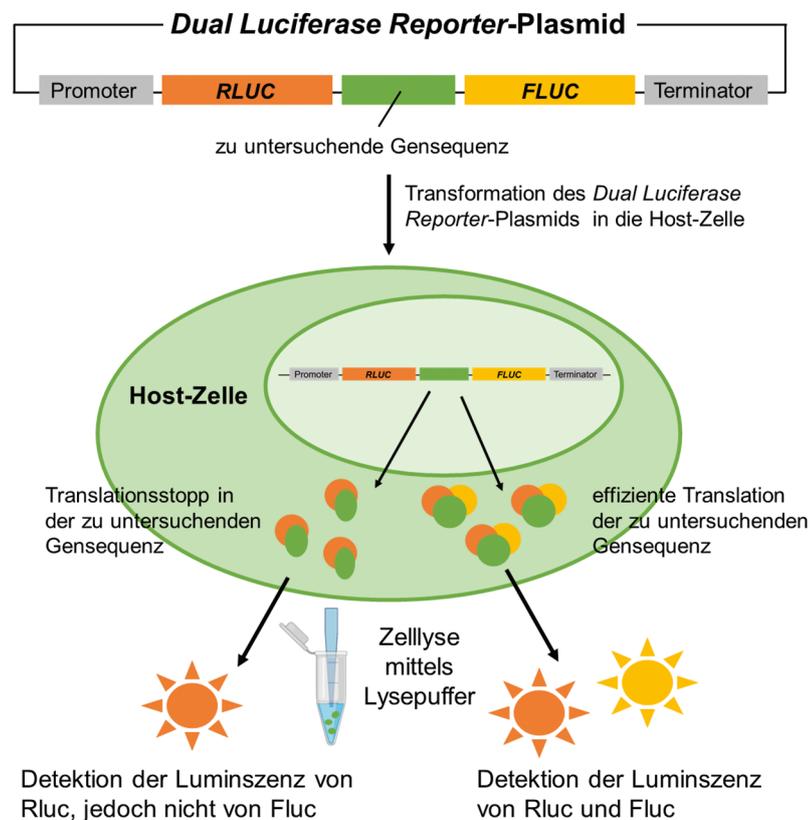


ABB. 1 Der *Dual Luciferase Assay*. Das *Dual Luciferase-Plasmid* besteht aus einem Promoter, dem Gen für die Renilla-Luciferase, einer zu untersuchenden Gensequenz, dem Gen für die Firefly-Luciferase und einem Terminator. Das Plasmid wird in eine Host-Zelle (grün) gebracht. Dort erfolgt Transkription und Translation der zu untersuchenden Gensequenz. Die Zellen werden lysiert und die Biolumineszenz wird in einem Luminometer vermessen, um Rückschluss auf die Effizienz der Genexpression zu ziehen.

die Expression des entsprechenden Genprodukts geschlossen werden.

Als Kontrolle, dass die Translation des Gens wirklich begonnen wurde, wird das Gen für Rluc auf dem Plasmid vor dem Zielgen eingefügt. Dessen Biolumineszenz kann durch Zugabe des spezifischen Luciferins für Rluc gemessen werden. Aus dem Verhältnis der Biolumineszenz von Fluc/Rluc kann man anschließend nicht nur die generelle Translationsaktivität, sondern auch die Genauigkeit/Effizienz des entsprechenden Translationsprozesses ermitteln. Bei einem Translationsabbruch wird dabei dann entsprechend nur Rluc detektiert (Abbildung 1).

Forschergruppen verwenden die Flexibilität der *Dual Luciferase Reporter Assays* zum Beispiel, um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen bei der Translation mehr *frameshifts* stattfinden, also ob sich das Leseraster des Gens um ein Codon nach hinten oder nach vorne verschiebt und somit ein verändertes oder beschädigtes Protein entsteht. Hierfür wurden Reporter-Plasmide mit DNA-Sequenzen erstellt, welche bekannt dafür

sind, dass sie Leserasterverschiebungen von -1 oder $+1$ auslösen [2]. Diese Sequenz wird von den beiden Luciferasegenen flankiert, *Rluc* vor der Sequenz, *Fluc* hinter der Sequenz. Die Plasmide werden z. B. in Zellen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), einem klassischen Modellorganismus genetischer Untersuchungen, eingebracht. Die auf dem Plasmid kodierten Gene durchlaufen dann den Translationsprozess der Hefe. Je nachdem ob eine Leserasterverschiebung erfolgt, wird entweder nur das Lumineszenzsignal der Rluc detektiert, oder durch die Expression beider Luciferasen werden sowohl Signale der Rluc als auch der Fluc gemessen. Generell läuft die Messung dabei immer in zwei Schritten ab, wobei zunächst mit dem ersten Substrat die Fluc-Aktivität bestimmt wird. Dann wird diese Reaktion gestoppt und mit einem zweiten Substrat kann daraufhin die Rluc-Aktivität gemessen werden. Das Verhältnis Fluc/Rluc gibt dann an, wie oft ein *frameshift*-Event während der Translation der Sequenz passiert ist.

Um Rückschlüsse auf den Einfluss von Mutationen an in der Translation beteiligten Genen auf *frameshifting* zu ziehen, wird die Methode in passenden Hefemutanten verwendet. Natürlich gibt es bereits zahlreiche Weiterentwicklungen des *Luciferase Reporter Assays*. So wird inzwischen auch mit genetisch optimierten Proteinen gearbeitet und der Assay findet Einsatzmöglichkeiten in vielen unterschiedlichen Forschungsbereichen und Routinelaboren. Luciferasen sind also ein wichtiger Bestandteil biologischer Assays und in Zukunft werden sicherlich noch weitere Anwendungsgebiete dazukommen.

Literatur

- [1] D. S. McNabb et al. (2005). Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell 4, 1539–49.
- [2] J. W. Harger, J. D. Dinman (2003). An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 9, 1019–24.

Meike Arend & Harmen Hauer,
Diphthamigos por siempre

HELFEN SIE UNS, (ANGEHENDEN) PROMOVIERENDEN EINE STIMME ZU GEBEN!



Im Rahmen unserer DFG-Studie „IPaWi – Individuelle Pfade in der Wissenschaft“ sind wir derzeit auf der Suche nach Studierenden aller Fächer, die planen, im kommenden Semester eine Promotion zu beginnen. Sie sind Dozent/-in und haben Kontakt zu potenziell interessierten Masterstudierenden? Geben Sie an diese gerne den folgenden Link oder den QR-Code zur Studie weiter: <https://tinyurl.com/4kjm6fcb>. Gemeinsam schaffen wir repräsentative und aussagekräftige Ergebnisse zur Lage von Doktorand/-innen in Deutschland!



Fragen oder Anmerkungen? Melden Sie sich gerne bei ronja.steinhauser@uni-mannheim.de